

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**“ESTUDIOS FUNCIONALES DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES
DE ARABIDOPSIS RELACIONADAS CON LOS MECANISMOS DE
DEFENSA GENERADOS POR ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO”.**

Lic. Francisco Colombatti

Director: Dra. Elina Welchen

Co-Director: Dr. Daniel Gonzalez

Laboratorio de Biología Molecular

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

UNL-CONICET

2016

AGRADECIMIENTOS

A los directores e instituciones:

A la Dra. Elina Welchen por la dirección de este trabajo de Tesis, por disponibilizar los recursos para la realización de la misma y por acercarme a la docencia. Por permitirme terminar la tesis a distancia, y por su sentido de justicia.

Al Dr. Daniel Gonzalez por contribuir al desarrollo de este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por sostener la docencia y la investigación en el espacio público y por brindarme durante más de 10 años un espacio de formación y de desarrollo.

A CONICET por la financiación económica durante el desarrollo experimental de este trabajo de tesis y apoyar la inclusión de los profesionales en los distintos espacios de desarrollo.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por brindarme un espacio de trabajo y por acercarme a la comunidad científica. A sus directivos, por los cambios y el progreso desde su creación.

A lo largo de este trabajo de tesis me encontré con formidables personas, entre ellas quisiera mencionar y agradecer porque cada uno contribuyó con un granito de arena a mi formación personal y profesional. A los “viejos”: Edu, Caro y Raulo. A los “mas nuevos”: Nori, Luli, Nata, Rodri, Eze y Ale. A Grace y a Sebas por ser parte de mis almuerzos. A los maestros de la docencia, Marta, Lala, Esteban y a Roseta.

A Luli por ser un pilar fundamental de esta tesis, por su apoyo y por su amor incondicional. Por motivarme y por ser parte, por bancarme, y por su infinita paciencia y comprensión. A Stefano, por esperar “a que papá se doctore para empezar a hacer cosas juntos”. A mis viejos, hermanos, tíos y padrinos, a la nona, al nono que nos guía desde arriba, a mis primos.....A mi FAMILIA.

A Luis y a Ernest por “enseñarme todo lo que no se aprende en el CONICET”. Por permitirme ver el mundo corporativo desde adentro y por su paciencia con esta tesis.

A Pablito por darme ánimo y recordarme lo difícil que sería transitar este camino, pero que la recompensa sería muchas veces más gratificante. Por ser parte del siguiente paso.

Hijo:

Esta tesis tiene que ser el fiel ejemplo de que todo se puede con esfuerzo y sacrificio. Trabajar en Molinos y escribir la tesis part-time, intentando ser papá full time no fue sencillo. Fueron muchos fines de semana dedicados a esta tesis. Tuve la suerte de tener a Luli conmigo, que me acompañó en todo momento. Fueron demasiados “portate bien para que papá pueda escribir la tesis”, hasta que por fin llegamos al final del recorrido. A partir de ahora se abren nuevos caminos, sin olvidar el esfuerzo y la dedicación que significaron alcanzar este punto, sin olvidar el sendero transitado. Cada vez que me digas “no puedo”, simplemente voy a recordarte que sí se puede, y ésta es la prueba. Cualquier cosa que te propongas, con esfuerzo y dedicación, la vas a alcanzar.

Para Toto y Luli.

LOS QUIERO MUCHO.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas - Universidad Nacional del Litoral. La gran mayoría de los resultados presentados en este trabajo manuscrito han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a Congresos:

Publicaciones en Revistas Internacionales con Referato Estricto.

Colombatti F, Welchen E y Gonzalez DH (2014) *Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath?* Mitochondrion 238-44. doi: 10.1016

Lucero LE, Uberti-Manassero NG, Arce AL, **Colombatti F**, Alemano SG, Gonzalez DH (2015) *TCP15 modulates cytokinin and auxin responses during gynoeceium development in Arabidopsis*. Plant J 84(2):267-82.

Patentes.

Welchen E, Gonzalez DH, Cecolli G, **Colombatti F** (2015) *Oxidative resistance chimeric genes and proteins, and transgenic plants including the same*. WO 2015193653 A1.

Publicaciones en Congresos.

Garcia L, **Colombatti F**, Welchen E, Gonzalez D. *Functional studies of COX17, an Arabidopsis copper chaperone involved in COX biogenesis and stress responses*. International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB). 2013 – Rosario, Argentina.

Colombatti F, Garcia L, Gonzalez DH, Welchen E. *The AtIPB gene induces response mechanisms related with pathogen attack in Arabidopsis plants*. XLVIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2012 – Mendoza, Argentina.

Garcia L, **Colombatti F**, Welchen E, Gonzalez DH. *COX17, copper and stress: a new menage a trios in Arabidopsis thaliana*. XLVIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2012 – Mendoza, Argentina.

Colombatti F, Garcia L, Gonzalez DH, Welchen E. *New insights into the action mechanisms of genes from the antioxidant resistance family in plants*. XLVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2011 – San Luis, Argentina.

Garcia L, **Colombatti F**, Welchen E, Gonzalez DH. *Mitochondrial copper chaperones Cox17 and Cox19: Roles beyond COX biogénesis*. XLVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2011 – San Luis, Argentina.

Colombatti F, Garcia L, Gonzalez D H, Welchen E. *Functional characterization of two Arabidopsis genes of the OXR eukaryotic protein family*. XLVI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2010 – Puerto Madryn – Argentina.

Garcia L, **Colombatti F**, Welchen E, Gonzalez D. *The role of Arabidopsis COX assembly factors in copper homeostasis and stress responses*. XLVI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2010 – Puerto Madryn – Argentina.

Colombatti F, Welchen E, Gonzalez D. *Functional characterization of genes from the Arabidopsis thaliana OXR (oxidation resistance) family*. XLV Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2009 – San Miguel de Tucumán – Argentina.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Flavio Antonio Blanco

Investigador Adjunto de CONICET.

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de La Plata.

Dr. Elena Graciela Orellano

Investigador Principal de CONICET.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario.

Dr. Guillermo Raúl Pratta

Investigador Adjunto de CONICET.

Instituto de Investigaciones Agrarias de Rosario.

1. ÍNDICE

1.	ÍNDICE	
1.	ÍNDICE GENERAL	
1.1	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	
2.	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
3.	RESUMEN	8
3.1.	Resumen	9
3.2.	Summary	13
4.	INTRODUCCION	17
4.1.	Generación de especies reactivas de oxígeno, consideraciones generales	18
4.2.	Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo en plantas	22
4.2.1.	Sitios de producción de ROS en plantas	26
4.2.2.	El mensaje de las especies reactivas del oxígeno	31
4.2.2.1.	ROS como moléculas señalizadoras	31
4.2.2.2.	Sobreproducción de ROS en condiciones de estrés: La cara perjudicial de las ROS	36
4.3.	La familia de proteínas OXR (<i>Oxidation Resistance</i>)	39
4.4.	Desarrollo, respuesta a hormonas y estrés: diferentes funciones de una familia de genes relacionadas con las ROS	40
4.4.1.	Desarrollo	40
4.4.1.1.	Desarrollo neuronal	43
4.4.2.	Respuesta a hormonas	45
4.4.3.	Estrés	47
4.4.3.1.	Estrés oxidativo	47
4.4.3.1.1.	TLDC, un dominio proteico que confiere protección frente al estrés oxidativo	48
4.4.3.2.	Estrés Biótico	49
4.4.3.2.1.	TLDC y estrés biótico en insectos	49
4.5.	¿Por qué estudiar proteínas con dominios TLDC en plantas?	51

5. OBJETIVOS	52
5.1. Objetivos generales	53
5.2. Objetivos específicos	53
6. MATERIALES Y MÉTODOS	55
6.1. Materiales	56
6.1.1. Material vegetal	56
6.1.2. Cepas utilizadas	56
6.1.3. Vectores utilizados	57
6.1.4. Secuencias utilizadas	59
6.2. Métodos	59
6.2.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR	59
6.2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	60
6.2.3. Purificación de fragmentos de ADN, digestión con endonucleasas de restricción y ligación de moléculas de ADN	60
6.2.4. Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico	61
6.2.5. Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico	61
6.2.6. Mini-preparación de ADN plasmídico	62
6.2.7. Clonados	62
6.2.8. Condiciones generales de crecimiento de Arabidopsis	67
6.2.9. Transformación de plantas de Arabidopsis	68
6.2.10. Selección de plantas transformadas	69
6.2.11. Mini-preparación de ADN genómico de plantas de Arabidopsis	69
6.2.12. Análisis de las plantas transformadas	69
6.2.13. Extracción de ARN de Arabidopsis	70
6.2.14. Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes	70
6.2.15. Técnica de Northern blot	70
6.2.16. Hibridización de membranas de nylon	71
6.2.17. Transcripción reversa	71
6.2.18. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	72

6.2.19. Análisis de la expresión génica en forma global utilizando microarreglos de ADN	72
6.2.20. Determinación de Ontologías en el grupo de genes regulados diferencialmente en las plantas <i>35S::AtOXR2</i>	77
6.2.21. Construcción de árboles filogenéticos	77
6.2.22. Caracterización fenotípica de <i>Arabidopsis</i>	78
6.2.23. Curva de deshidratación	78
6.2.24. Crecimiento de <i>Arabidopsis</i> en condiciones de alta intensidad lumínica (AIL)	78
6.2.25. Tratamiento de plantas de <i>Arabidopsis</i> con ácido abscísico (ABA)	79
6.2.26. Apertura estomática	79
6.2.27. Germinación y desarrollo de la raíz en presencia de ABA	80
6.2.28. Cuantificación de hormonas mediante cromatografía líquida de alta <i>performance</i> acoplada a espectrometría de masas	80
6.2.29. Cultivo de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato para ensayos de estrés biótico	81
6.2.30. Tratamiento de hojas de roseta de <i>Arabidopsis</i> con <i>P. syringae</i> pv. Tomato	82
6.2.31. Medición de la población bacteriana en hojas de roseta de <i>Arabidopsis</i>	82
6.2.32. Cuantificación de lípidos peroxidados	83
6.2.33. Cuantificación de clorofila	84
6.2.34. Determinación de antocianinas en <i>Arabidopsis</i>	84
6.2.35. Determinación de aniones superóxido en <i>Arabidopsis</i>	85
6.2.36. Determinación de peróxido de hidrógeno en <i>Arabidopsis</i>	85
6.2.37. Determinación de parámetros fotosintéticos en <i>Arabidopsis</i>	85
6.2.38. Pérdida de agua de rosetas escindidas	85
6.2.39. Cortes histológicos de órganos de <i>Arabidopsis</i>	86
6.2.40. Análisis de la expresión del gen reportero <i>GUS</i> en plantas transformadas mediante histoquímica	86
6.2.41. Análisis de la expresión del gen reportero <i>GUS</i> en plantas transformadas mediante fluorimetría	87
6.2.42. Determinación del contenido de proteína total mediante el	

método de Bradford	88
6.2.43. Actividad superóxido dismutasa en geles nativos	88
6.2.44. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS)	89
6.2.45. Determinación de metabolitos mediante GC-MS	89
6.2.46 Localización subcelular de proteínas mediante microscopía confocal	90
6.2.47. Determinación de la capacidad antimutagénica en mutantes de <i>E. coli</i>	90
6.2.48. Ensayo de complementación en levaduras mutantes	91
6.2.49. Análisis estadísticos	91
7. RESULTADOS	92
CAPÍTULO I	
7.1. “Presentación de la familia de proteínas OXR en <i>Arabidopsis thaliana</i> ”	93
7.1.1. Identificación de los miembros de la familia OXR en Arabidopsis	94
7.1.2. Reconstrucción filogenética de genes homólogos a <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i> en plantas	103
7.1.3. Análisis estructural del dominio TLDC	107
7.1.4. Caracterización de las proteínas <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i> mediante la utilización de sistemas heterólogos	114
7.1.4.1. Sistemas procariotas: Bacterias	114
7.1.4.1.1. Cuantificación de la capacidad antimutagénica de <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i> en bacterias mutantes	116
7.1.4.2. Sistemas eucariotas: Levaduras	118
7.1.4.2.1. Ensayo de complementación en levaduras mutantes	118
7.1.5. Conclusiones	120
CAPÍTULO II	
7.2. “Estudio y caracterización de los genes que codifican para proteínas <i>AtOXR</i> en Arabidopsis”	122
7.2.1. Localización subcelular de las proteínas <i>AtOXR</i> en Arabidopsis	123
7.2.2. Relevancia del dominio TLDC en la localización subcelular	128

7.2.3. Caracterización del patrón de expresión de <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i>	130
7.2.3.1. Caracterización de la región promotora del gen <i>AtOXR2</i> mediante histoquímica	131
7.2.3.2. Estudio del patrón de expresión conferido por la región promotora de <i>AtOXR4</i> mediante reacciones histoquímicas	134
7.2.3.3. Análisis de los niveles de expresión mediante reacciones fluorométricas	135
7.2.3.4. Estudio de la incidencia de factores de estrés en la regulación de la expresión de los genes <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i>	136
7.2.4. Estudio de la regulación de la expresión de los genes <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i> a nivel transcripcional	138
7.2.4.1. Análisis de los transcritos para el gen <i>AtOXR2</i>	139
7.2.4.2. Análisis de los transcritos para el gen <i>AtOXR4</i>	141
7.2.5. Evaluación de la información disponible en bases de datos	142
7.2.6. Conclusiones	146
CAPÍTULO III	
7.3. “Estudio de plantas sobreexpresantes y mutantes de los genes <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i> ”	148
7.3.1. Obtención de plantas de <i>Arabidopsis</i> con niveles alterados de <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i>	149
7.3.1.1. Obtención de plantas con mayores niveles de expresión	149
7.3.1.2. Obtención de plantas con niveles disminuidos de <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i>	150
7.3.2. Caracterización fenotípica de plantas con niveles alterados <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i>	152
7.3.2.1. Determinación de longitud de raíces en plántulas	152
7.3.2.2. Estudio de parámetros de crecimiento de tejidos aéreos de plantas con niveles alterados de los genes <i>AtOXR2</i> y <i>AtOXR4</i>	158
7.3.2.2.1. Determinación del número de hojas	159
7.3.2.2.2. Cálculo del área foliar, del número de aserramientos y del coeficiente de circularidad	162

7.3.2.2.3.	Evaluación de la biomasa de las rosetas	164
7.3.2.2.4.	Determinación de la longitud del tallo principal	166
7.3.2.2.5.	Determinación del número de flores y de la producción de semillas	169
7.3.2.2.6.	Evaluación del número de hojas y parámetros foliares en plantas $\Delta oxr2$	170
7.3.3.	Determinación de parámetros fotosintéticos	172
7.3.3.1.	Medidas de fluorescencia de la clorofila	173
7.3.3.2.	Parámetros de intercambio gaseoso en el sexto par de hojas de plantas de 6 semanas	177
7.3.4.	Determinación del perfil metabólico de plantas $35S::AtOXR2$ y WT en condiciones normales de crecimiento	178
7.3.5.	Discusión y conclusiones parciales	182
7.3.5.1.	Desarrollo radicular y potencial agrobiotecnológico	182
7.3.5.2.	Desarrollo vegetativo y producción de semillas	183
CAPÍTULO IV		
7.4.	" $AtOXR2$ y su rol en la respuesta a estrés en Arabidopsis"	185
7.4.1.	$AtOXR2$ y su rol en la respuesta a estrés en Arabidopsis	186
7.4.2.	Análisis del transcriptoma de plantas $35S::AtOXR2$	186
7.4.2.1.	Análisis de las categorías ontológicas enriquecidas	187
7.4.2.1.1.	Procesos biológicos	187
7.4.2.1.2.	Función molecular	192
7.4.2.1.3.	Componente celular	195
7.4.2.2.	Comparación del transcriptoma de plantas $35S::AtOXR2$	196
7.4.3.	Estrés oxidativo en plantas con niveles alterados de $AtOXR2$	204
7.4.3.1.	ROS y modificaciones en la pared celular: dos caras de la misma moneda	211
7.4.3.2.	Xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas (XTH) y expansinas (EXP)	213
7.4.4.	Respuesta a ABA en plantas $35S::AtOXR2$	223
7.4.4.1.	Ensayo de pérdida de agua de rosetas escindidas	224

7.4.4.2. Rol del ABA durante el proceso de germinación	230
7.4.4.3. Ensayos de germinación en placas con semillas de plantas <i>35S::AtOXR2</i> y WT	233
7.4.4.4. Determinación de la concentración de ABA en distintos tejidos	236
7.4.5. Metabolismo secundario	239
7.4.5.1. Compuestos fenólicos y su rol en la respuesta a estrés	239
7.4.6. Respuesta de plantas <i>35S::AtOXR2</i> al estrés por alta intensidad lumínica	241
7.4.7. Respuesta de plantas con niveles alterados de <i>AtOXR2</i> al estrés biótico	247
7.4.7.1. Reprogramación metabólica durante la respuesta inmune en las plantas y rol de las fitohormonas en la respuesta de defensa a patógenos	247
7.4.7.1.1. Señalización dependiente de SA	247
7.4.7.1.2. Señalización dependiente de JA	250
7.4.7.1.3. Regulación entre las vías de SA y JA	251
7.4.7.1.4. Moduladores de las hormonas SA y JA	252
7.4.7.2. Cuantificación del contenido de hormonas SA y auxinas en plantas que presentan niveles alterados de <i>AtOXR2</i>	255
7.4.7.3. Estudios de la interacción <i>35S::AtOXR2</i> / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato Pst. DC 3000	256
7.4.8. Conclusiones	260
8. CONCLUSIONES	264
9. ANEXOS	269
9.1. Anexo I	270
9.2. Anexo II	275
9.3. Anexo III	280
10. BIBLIOGRAFÍA	287

1.1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Capítulo 4. Introducción

Figura 4-1 | Estructura electrónica de las ROS, orden de reactividad y mecanismos de detoxificación.

Figura 4-2 | Mecanismos de reparación del ADN y estructuras de pares de bases.

Tabla 4-1 | Enzimas antioxidantes en plantas.

Figura 4.-3 | Eventos moleculares durante el daño oxidativo mediado por ROS.

Figura 4-4 | Compartimentos subcelulares en los que ocurre la generación de ROS en células vegetales.

Figura 4-5 | Participación de las ROS en distintos procesos vegetales que involucran a hormonas.

Figura 4-6 | Isoformas del *puff 82F* detectadas en *D. melanogaster*.

Figura 4-7 | Comparación entre genes *Oxr* de rata y de *Drosophila sp.*

Figura 4-8 | Esquema de la estructura del gen *hsTBC1D24* y localización de los dominios TBC y TLDC.

Figura 4-9 | Representación de las estructuras proteicas codificadas por los genes *NCOA7* y *NCOA7B* con sus dominios.

Figura 4-10 | Papel de OXR1 en *A. gambiae*.

Capítulo 7. Resultados y discusión

Capítulo 7.1.

Figura 7.1-1 | Proteínas con dominios TLDC.

Figura 7.1-2 | Alineamiento local de los dominios TLDC de las proteínas HsOXR1 y AtOXR2.

Figura 7.1-3 | Estructura exón-intrón de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Figura 7.1-4 | Proteínas con dominios TLDC en Arabidopsis.

Figura 7.1-5 | Estructura exón-intrón de los genes *AtOXR1*, *AtOXR5* y *At5G06260*.

Figura 7.1-6 | Familia OXR de Arabidopsis.

Figura 7.1-7 | Alineamiento de proteínas de la familia OXR en Arabidopsis.

Figura 7.1-8 | Árbol filogenético para las proteínas con dominio TLDC en Arabidopsis.

Figura 7.1-9 | Alineamiento del dominio TLDC de las proteínas de la familia OXR en Arabidopsis.

Figura 7.1-10 | Representación gráfica de la reconstrucción filogenética realizada sobre el clado *Viridiplantae*.

Figura 7.1-11 | Estructura de los dominios presentes en las proteínas OXR2 y OXR4 del clado *Viridiplantae*.

Tabla 7.1-1 | Cálculo del valor E y estructuras identificadas apropiadas para el modelado de proteínas pertenecientes a la familia OXR de Arabidopsis.

Figura 7.1-12 | Información estructural del dominio TLDc.

Figura 7.1-13 | Información estructural de las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 modeladas con el servidor I-TASSER.

Tabla 7.1-2 | Secuencia nucleotídica del gen de la β -galactosidasa y los diferentes codones que codifican el residuo 461 en las diferentes cepas.

Figura 7.1-14 | Capacidad antimutagénica de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Figura 7.1-15 | Resultados de ensayo de complementación en levaduras.

Capítulo 7.2

Tabla 7.2-1 | Predicción de la localización de proteínas de la familia AtOXR.

Figura 7.2-1 | Las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 se localizan en la mitocondria de células de raíz de Arabidopsis.

Figura 7.2-2 | Significancia de la colocalización.

Figura 7.2-3 | Esquema de la combinación de dominios utilizadas para construir las quimeras.

Figura 7.2-4. | Secuencia de las quimeras obtenidas.

Figura 7.2-5 | La combinación de los dominios de las proteínas AtOXR no modifica la localización mitocondrial.

Figura 7.2-6 | Representaciones gráficas de las regiones promotoras de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Figura 7.2-7 | Representaciones de las construcciones evaluadas y resultados de las histoquímicas.

Figura 7.2-8 | Esquema de la construcción realizada para evaluar el patrón de expresión de la proteína AtOXR4 y resultados histoquímicos.

Figura 7.2-9 | Análisis de la actividad GUS en extractos proteicos totales en diferentes órganos

de plantas transformadas con las regiones promotoras de *AtOXR2* (construcción -1252) y *AtOXR4* fusionadas al gen reportero *GUS*.

Figura 7.2-10 | Inducción del gen *GUS* dirigida por las regiones promotoras de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* en presencia de factores de estrés.

Figura 7.2-11 | Determinación de los niveles de transcripto del gen *AtOXR2* a distintos tiempos, luego de someter plantas salvajes (WT) de *Arabidopsis* a situaciones de estrés.

Figura 7.2-12 | Determinación de los niveles de transcripto del gen *AtOXR4* a distintos tiempos, luego de someter plantas salvajes (WT) de *Arabidopsis* a situaciones de estrés.

Figura 7.2-13 | Perfil de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en distintas condiciones obtenidos de la página web *Bio-Analytic Resource (BAR) for Plant Biology*.

Figura 7.2-14 | Perfil de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en distintos estadios de desarrollo obtenidos de la página web *BAR for Plant Biology*.

Figura 7.2-15 | Modelo de expresión propuesto para los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Capítulo 7.3.

Figura 7.3-1 | Niveles de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en plantas homocigotas *35S::AtOXR2* y *35S::AtOXR4*.

Figura 7.3-2 | Esquema de la inserción de T-DNA en las plantas $\Delta oxr2$, $\Delta oxr4$ y niveles de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Figura 7.3-3 | Largo de raíces de plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT.

Figura 7.3-4 | Niveles de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en plantas salvajes utilizadas en el ensayo de evaluación de la raíz en condiciones de estrés oxidativo.

Figura 7.3-5 | Longitud de la raíz primaria en plantas $\Delta oxr2$ y WT(W5).

Figura 7.3-6 | Número de hojas y composición de la roseta de plantas *35S::AtOXR2* y WT al día 38.

Figura 7.3-7 | Radio máximo de la roseta en plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT.

Figura 7.3-8 | Área foliar, número de aserramientos y coeficiente de circularidad en plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT.

Figura 7.3-9 | Biomasa de la roseta de plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT crecidas durante 4 y 6 semanas.

Figura 7.3-10 | Fenotipo de las líneas AtOXR2-A, AtOXR2-B y WT crecidas durante 4 semanas.

Figura 7.3-11 | Longitud del tallo principal y ramificaciones de plantas WT, *35S::AtOXR2* y *35S::AtOXR4*.

Figura 7.3-12 | Cortes histológicos de tallos de plantas *35S::AtOXR2* y WT crecidas durante 6 semanas.

Figura 7.3-13 | Producción de semillas en plantas *35S::AtOXR2* y WT.

Figura 7.3-14 | Parámetros foliares de plantas $\Delta oxr2$ y WT(WS).

Figura 7.3-15 | Parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila obtenidos en plantas *35S::AtOXR2* y WT crecidas durante de 4 semanas.

Figura 7.3-16 | Parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila obtenidos en plantas *35S::AtOXR2* y WT crecidas durante de 6 semanas.

Figura 7.3-17 | Parámetros asociados el intercambio gaseoso en plantas *35S::AtOXR2* y WT crecidas durante 6 semanas.

Tabla 7.3-1 | Niveles relativos de distintos metabolitos cuantificados en plantas *35S::AtOXR2*.

Figura 7.3-18 | Rutas metabólicas modificadas en plantas *35S::AtOXR2*.

Capítulo 7.4

Figura 7.4-1 | Ontologías enriquecidas en los genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT según Procesos Biológicos de GO.

Tabla 7.4-1 | Ontologías reguladas diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* según Procesos Biológicos.

Tabla 7.4-2 | Genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* según Procesos Biológicos.

Figura 7.4-2 | Ontologías enriquecidas en los genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT según Funciones Moleculares de GO.

Tabla 7.4-3 | Ontologías reguladas diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* según Función Molecular.

Tabla 7.4-4 | Genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* según Función Molecular.

Figura 7.4-3 | Categorías ontológicas enriquecidas en los genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* según Componente Celular.

Tabla 7.4-5 | Genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* según Componente Celular.

Figura 7.4-4 | Comparación del perfil transcripcional en plantas *35S::AtOXR2*.

Figura 7.4-5 | La sobreexpresión de *AtOXR2* deriva en la inducción de genes de respuesta a ABA.

Figura 7.4-6 | Representación de las vías celulares en las que participarían genes con niveles alterados en plantas que *35S::AtOXR2*.

Figura 7.4-7 | Esquema de compartimentalización celular de procesos metabólicos.

Figura 7.4-8 | Evaluación del contenido de ROS en plantas *35S::AtOXR2* y $\Delta oxr2$.

Figura 7.4-9 | Determinación del contenido de enzimas o compuestos detoxificadores de ROS en plantas *35S::AtOXR2* y WT.

Figura 7.4-10 | Cuantificación de transcritos involucrados en el estado redox celular en rosetas de 6 semanas.

Figura 7.4-11 | Heat map de la expresión de genes *EXP* y *XTH* bajo condiciones de estrés abiótico.

Figura 7.4-12 | Modelo de variaciones en la pared celular.

Tabla 7.4-6 | Genes involucrados en el metabolismo de la pared celular con expresión diferencial en plantas *35S::AtOXR2*.

Tabla 7.4-7 | Genes involucrados en el metabolismo de los fenilpropanoides y lignina con expresión diferencial en plantas *35S::AtOXR2*.

Figura 7.4-13 | Variaciones en las vías de síntesis de isoprenoides en plantas *35S::AtOXR2*.

Figura 7.4-14 | Curvas de deshidratación obtenidas mediante el ensayo de pérdida de agua de rosetas escindidas y contenido de agua de las rosetas.

Figura 7.4-15 | Ensayo de respuesta estomática frente al ABA.

Figura 7.4-16 | Fases que atraviesa la semilla seca hasta convertirse en una plántula naciente.

Figura 7.4-17 | Ensayo de establecimiento en medios conteniendo factores que reprimen el establecimiento de la plántula.

Figura 7.4-18 | Ensayo de germinación y establecimiento de distintos genotipos de plantas *35S::AtOXR2* en placas conteniendo MS 0,5X con Glucosa al 2%.

Figura 7.4-19 | Ensayo de germinación y establecimiento de distintos genotipos de plantas *35S::AtOXR2* en placas formuladas con MS 0,5X suplementado con manitol al 2% y ABA 0,2 μ M.

Figura 7.4-20 | Contenido de ABA en semillas y rosetas de plantas *35S::AtOXR2* y plantas mutantes.

Figura 7.4-21 | Biosíntesis de compuestos fenólicos.

Figura 7.4-22 | Parámetros de fluorescencia de la clorofila en plantas sometidas a estrés por alta intensidad lumínica.

Figura 7.4-23 | Contenido de antocianinas en plantas sin tratar y en plantas sometidas a estrés por AIL.

Figura 7.4-24 | Cuantificación de transcritos de genes marcadores de estrés por AIL.

Figura 7.4-25 | Vías hormonales de respuesta de defensa mediadas por SA y JA.

Figura 7.4-26 | Vía de respuesta de defensa mediada por auxinas.

Figura 7.4-27 | Resultados de concentración de SA y auxinas en plantas con niveles alterados de *AtOXR2*.

Figura 7.4-28 | Niveles de transcritos de marcadores de estrés biótico a las 24 horas post infección con la cepa virulenta de *P. syringae*.

Figura 7.4-29 | Resultados obtenidos del recuento de *P. syringae* a las 72 h posteriores a la infección.

Figura 7.4-30 | Niveles de transcritos WRKY70 en plantas de 15 días de edad incubadas en SA 0,5 mM.

2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
AIL	Alta intensidad lumínica
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa A
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
AOC	aleno oxidasa ciclasa
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
<i>CaMV</i>	virus del mosaico de la coliflor
cm	centímetros
CO ₂	dióxido de carbono
COI1	insensible a coronatina1
COX	citocromo c oxidasa
Da	daltos
DAB	3,3'-diaminobencidina
dATP	desoxiadenosina trifosfato

dNTP	desoxinucleótidos trifosfato(mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	densidad óptica
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
ET	etileno
ETI	respuesta inmune disparada por efector
FAD	dinucleótido de flavina-adenina
FC	<i>fold change</i>
g	gravedad
GSLs	glucosinolatos
GUS	β -glucuronidasa
h	hora
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HR	respuesta hipersensible
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRGA	Infra Red Gas Analyzer
JA	ácido jasmónico
JAs	jasmonatos
JA-Ile	jasmonil-isoleucina
JA-Me	metil jasmonato
JAZ	zim de jasmonato
KDa	kilodaltons

MQ	Agua miliQ
NBT	nitroblutetrazolium
kpb	kilopares de bases
KO	Knock out
LB	Luria-Bertani
LOX2	lipooxigenasa 2
M	Molar
mA	miliamper/s
MDA	malondialdehído
MeSA	metil salicílico
min	minuto
mL	mililitro/s
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimoles
MOPS	ácido3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
MU	4-metilumbeliferona
MUG	4-metilumbeliferil- β ,D-glucurónido
MV	Metiolviológeno, Paraquat.
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADH	dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido
NBT	Nitroblue tetrazolium
NDs	NAD(P)H deshidrogenasas

nm	nanómetros
NPR1	no relacionada con la patogénesis1
$O_2^{\bullet-}$	ión superóxido
1O_2	singulete de oxígeno
OPDA	12-oxo fitodienoico
OPR3	OPDA reductasa 3
PAMPs	patrones asociados a moléculas de patógenos
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PCD	muerte celular programada
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDF1.2	defensina vegetal 1.2
PM	peso molecular
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
PRs	proteínas relacionadas con la patogénesis
PR-1,3,5	proteína relacionada con la patogénesis-1, 3 y 5
PXs	peroxidasas
PSI, PSII	fotosistema I, fotosistema II
PTI	respuesta inmune disparada por PAMPs
Q	Ubiquinona
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SA	ácido salicílico

SAR	resistencia sistémica adquirida
SCF ^{COI1}	complejo SKP1-CUL
SDS	dodecil sulfato de sodio
SOD	superóxido dismutasa
TCA	ácido tricarbóxico
TEMED	N,N,N',N',-tetrametilendiamina
TLDc	del inglés, <i>TBC, LysM Domain containing</i>
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
U	unidad/es
UNL	Universidad Nacional del Litoral
UV	ultravioleta
V	volts
3'-UTR	del inglés 3'- <i>untranslated region</i>
5'-UTR	del inglés 5'- <i>untranslated region</i>

Abreviaturas para aminoácidos

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteina	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ácido glutámico	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptófano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

Nomenclatura para genes y proteínas

AtOXR Gen *OXR* salvaje de *Arabidopsis thaliana*.

- Δoxr Gen mutante (knock-out o knock-down) en *AtOXR* de *A. thaliana*.
- AtOXR* Proteína OXR de *A. thaliana*.
- 35S::AtOXR* Genotipo que contiene un gen OXR cuya expresión se ve dirigida por el promotor *35S**CaMV*.

Las primeras dos letras indican la especie de a la cual pertenece el gen o la proteína.

3. RESUMEN

3.1. Resumen.

Los genes de la familia OXR (del inglés *Oxidation Resistance*) fueron descubiertos en una búsqueda de genes capaces de revertir el fenotipo de estrés oxidativo en levaduras. Desde los primeros hallazgos en el año 2000, se han reportado múltiples estudios en distintos organismos tales como ratones, *Drosophila melanogaster*, mosquitos y humanos. En levaduras existe un único gen representante de la familia, mientras que en mamíferos se han reportado 5 genes que pueden transcribirse a su vez en distintas variantes de *splicing*. En levaduras se demostró una localización mitocondrial y una fuerte inducción frente a estrés oxidativo para la proteína ScOXR1. En mamíferos se han demostrado localizaciones en mitocondria, citosol y núcleo para HsOXR1 y NCOA7, así como también expresión diferencial en distintos tejidos. En *Drosophila*, el primer miembro identificado de la familia OXR se nombró L82, al que se le atribuyó un rol central en el desarrollo. En otro modelo de insecto, en el mosquito *Anopheles gambiae*, se demostró un vínculo estrecho entre la expresión de *OXR1* y la tolerancia al estrés biótico. En todos los casos se demostró que estas proteínas ejercen su rol mediante alteraciones en la respuesta al estrés oxidativo. Sin embargo, nada se sabe sobre la función que estos genes podrían estar desarrollando en el reino vegetal. Por este motivo, en este trabajo de Tesis nos propusimos estudiar la familia OXR en *Arabidopsis thaliana*.

Esta familia está constituida por 5 miembros, los cuales denominamos AtOXR1, AtOXR2, AtOXR4, AtOXR5 y At5g06260. Comenzamos con el estudio de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* ya que presentaron mayor identidad de secuencia con los previamente estudiados *HsOXR1* y *ScOxr1*. Utilizando un sistema de bacterias mutantes incapaces de evitar o reparar el daño en el ADN, observamos que las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 tienen un efecto de protección contra el daño oxidativo en esta cepa de bacterias. Además, cuando se complementaron levaduras mutantes en el gen *ScOxr1* observamos una reversión en el fenotipo de sensibilidad al estrés oxidativo. Estos resultados sugieren que las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 podrían cumplir un rol en la reparación del ADN o en su protección contra el daño oxidativo, tal como se ha sugerido previamente para sus homólogos en levaduras y humanos. Los resultados obtenidos en

bacterias y levaduras sugieren que AtOXR2 y AtOXR4 podrían tener un rol similar en plantas y participar en la respuesta al estrés oxidativo.

Los estudios de localización subcelular en plantas transformantes estables de *Arabidopsis* demostraron que AtOXR2 y AtOXR4 se localizan en mitocondrias de células de raíz, en plantas crecidas en condiciones normales. Además, las proteínas quiméricas AtOXR24 y AtOXR42, desarrolladas en este trabajo de Tesis, también comparten esa localización subcelular.

Por otro lado, el estudio de las regiones promotoras de los genes codificantes para AtOXR2 y AtOXR4 reveló un perfil de expresión similar. Ambos promotores dirigen la expresión en plantas recién germinadas principalmente en meristemas; posteriormente en cotiledones, luego en el primer par de hojas, y conforme pasa el tiempo la expresión disminuye. Cuando la planta florece, ambos promotores dirigen la expresión de *GUS*, la cual se incrementa hasta llegar a polen maduro. La expresión de *AtOXR2* y de *AtOXR4* se incrementa ante distintas condiciones de estrés, tanto cuando la expresión se evaluó mediante actividad del gen reportero *GUS* como mediante Northern Blot o RT-qPCR. Para el caso de *AtOXR2* observamos un aumento de la expresión, tanto del transcripto como del gen reportero, en condiciones que producen ROS como luz prolongada, calor, UV-B y 3-AT. Para el gen *AtOXR4* observamos un incremento en los niveles de expresión tanto en el gen reportero como en los niveles de transcripto en presencia de SA. Los resultados de expresión así como de inducción diferencial para ambos genes, enfatizan en una posible especialización en la función para las proteínas AtOXR2 y AtOXR4.

Las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* (*35S::AtOXR2*) tienen una estructura radicular más compleja, mientras que plantas deficientes en dicho gen mostraron el fenotipo opuesto. En condiciones de estrés severo, las plantas *35S::AtOXR2* desarrollan una raíz principal de mayor longitud. Las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* llegan a tener 3 veces más biomasa que sus pares salvajes. Mediante la caracterización fenotípica detectamos que estas plantas presentan diferencias de tiempo en el pasaje al estadio reproductivo, las cuales podrían explicar las diferencias en el desarrollo foliar. Así, estas plantas tienen mayor tiempo para invertir la

energía capturada en el desarrollo foliar; mientras que una vez que realizaron el cambio metabólico a la etapa reproductiva, cuentan con una maquinaria capaz de captar más cantidad de energía lumínica. Parte del incremento en la lámina foliar se debe a un aumento en el tamaño celular, mientras que el resto se corresponde con un aumento en el número de células. Este último proceso, podría ser la consecuencia de iniciar el arresto celular a tiempos posteriores. En la misma dirección, encontramos que el patrón de áreas foliares es similar en plantas *35S::AtOXR2* y en plantas salvajes. Además, es probable que tengan una pared celular menos rígida, lo cual les permitiría a estas plantas crecer más.

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila indican que las plantas *35S::AtOXR2* son más eficientes en el uso de luz capturada. Esta característica se ve acompañada de una tasa de transporte de electrones incrementada, posiblemente por una capacidad de restauración del estado redox aumentada. En coincidencia, los resultados de intercambio gaseoso de plantas *35S::AtOXR2* demuestran que estas plantas son capaces de fijar más CO₂ que sus pares salvajes. Todas estas características, mayor fijación de CO₂, mayor tasa de transferencia de electrones y mayor lámina foliar, dan como resultado un organismo con mayor aptitud y eficiencia a la hora de convertir la luz en energía química. Así, estas plantas son capaces de producir mayor cantidad de semillas.

Las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* retienen el agua con mayor avidez, mientras que las plantas $\Delta oxr2$ muestran el comportamiento contrario. Estas diferencias serían consecuencia de un cierre estomático acelerado en plantas *35S::AtOXR2*. Plantas *35S::AtOXR2* de 6 semanas tienen alterado su contenido de ABA, posiblemente de forma dependiente de los niveles de *AtOXR2*. Por otro lado, las semillas *35S::AtOXR2* demostraron germinar y establecerse bajo condiciones de estrés osmótico y concentraciones de ABA que inhiben el crecimiento en plantas WT.

El análisis del transcriptoma de plantas que sobreexpresan *AtOXR2* nos permitió determinar que tienen un perfil transcripcional basal similar al de plantas de *Arabidopsis* que están siendo sometidas a situaciones de estrés. Además, demostramos que las plantas *35S::AtOXR2* tienen mayor concentración de ROS basales, mayores niveles de peroxidación

lipídica, así como mayores niveles de las moléculas antioxidantes ascorbato y glutatión total. En línea con las observaciones de fluorescencia de la clorofila, las plantas *35S::AtOXR2* demostraron ser tolerantes al estrés por alta intensidad lumínica.

De acuerdo con nuestros resultados, es probable que estas plantas estén mejor preparadas para enfrentar el estrés biótico. Estas plantas tienen mayor concentración de la fitohormona SA respecto de plantas salvajes. Frente a la infección con *P. syringae*, las plantas *35S::AtOXR2* son capaces de montar una respuesta de defensa con mayor velocidad que las plantas salvajes, pudiendo eliminar al patógeno en menor tiempo.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información novedosa sobre la función de proteínas de la familia OXR en plantas y sientan las bases para futuras investigaciones. Debido a la mejora en las propiedades de interés agronómico que presentan las plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, es posible pensar en el uso de este gen como una herramienta novedosa y útil para el desarrollo de nuevas tecnologías.

3.2. Summary.

OXR (*Oxidation Resistance*) family genes were discovered during a search of genes capable of revert oxidative stress phenotype. From its discovery to date multiple studies in yeast, humans and mosquitoes have been published. Yeast genome contains only one gene representing the family, while in mammalian previous studies reported 5 members that are able to be spliced into different isoforms. In yeast, *ScOXR1* gene is located in mitochondria and is strongly induced by oxidative stress. While in mammals previous studies reported mitochondrial, cytosolic and nuclear localization for *HsOXR1* and *NOCA7*, as well as differential expression on different tissues. A role in development was previously described for *L82*, the first *Drosophila melanogaster* reported OXR gene. In another insect model, *Anopheles gambiae*, it was shown a link between *OXR1* expression and biotic stress tolerance. Altogether, these studies, showed correlation between OXR genes expression and oxidative stress response modification. However, nothing is known about the function of this family gene could be carrying out on the plant kingdom. For this reason, in this Thesis work we focused on *Arabidopsis thaliana* OXR protein family.

Arabidopsis OXR family is composed by 5 members, which we named AtOXR1, AtOXR2, AtOXR4, AtOXR5 and At5g06260. We started our work studying AtOXR2 and AtOXR4, whose sequence identity was the highest, when compared it to HsOXR1 and ScOXR1. By means of a mutant bacterial system, we showed that AtOXR2 and AtOXR4 are able to exert a protective effect on such sensitive bacteria, by protecting or repairing the damage of DNA exerted by oxidative stress growing conditions. Moreover, when *ScOXR1* mutant yeast were complemented with a yeast mitochondrial-targeted version of AtOXR2 and AtOXR4, we found a reversion on the oxidative stress sensitivity phenotype. These results suggests that AtOXR2 and AtOXR4 may play a role in preventing or repairing DNA against oxidative stress, as previously been reported for its yeast and mammalian homologues. Furthermore, these results suggests that AtOXR2 and AtOXR4 may have a role in oxidative stress response in plants.

We demonstrated that AtOXR2 and AtOXR4 are localized in mitochondria of root cells, when plants were grown on normal conditions. Furthermore, chimeric proteins AtOXR24 and

AtOXR42 developed in this Thesis work, are localized on mitochondria of root cells too on stable Arabidopsis transgenic plants. Moreover, studies on expression patterns conferred by promoter regions of both genes revealed a similar expression profile. Both promoters direct expression on newly germinated plants mainly in meristems; later on cotyledons, and then in the first couple of leaves, and as time goes on reporter gene expression disappears. When the plant blooms, both promoters drive the expression of reporter gene *GUS*, which increases as time goes on until pollen reaches mature stage.

In this work, we showed that expression of *AtOXR2* and *AtOXR4* is increased under different stress conditions, measured by GUS activity of both promoters as well as by Northern Blot or RT-qPCR. When we studied *AtOXR2* we detected induction of both transcripts and reporter gene, under conditions that stimulate ROS production such as lengthened photoperiod, heat, UV-B and 3-AT. When we studied *AtOXR4*, an increase of the expression levels of transcript as well as reporter gene was detected under presence of salicylic acid (SA). Results of expression patterns and differential induction upon different stimulus, emphasizes our hypothesis of gene specialization and distinctive roles for *AtOXR2* and *AtOXR4*.

Plants overexpressing *AtOXR2* (*35S::AtOXR2*) show a more complex root structure, while we detected that Arabidopsis plants deficient in *AtOXR2* ($\Delta oxr2$) exhibit the opposite phenotype. Under severe stress conditions, *35S::AtOXR2* plants are able to develop a main root larger than WT roots. When plants overexpressing *AtOXR2* grow up they reach three fold more biomass than WT plants. By means of phenotypic characterization we detected that these plants switch to reproductive stage later than WT plants. This would allow *35S::AtOXR2* plants convert more light energy into leaves; while once they switched to reproductive stage, they developed a machinery capable of capture more light. A portion of the increase in leaf size is due to a slight increase in cell size, while a major cause of leaf size is due to an increase in cell quantity. This could be consequences of starting cellular arrest to later times. In the same direction, we found that pattern of leaf size is similar in plants overexpressing *AtOXR2* and WT plants. Additionally, *35S::AtOXR2* plants may have a less rigid cell wall which would allow these plants to grow up with less constraint.

By measuring chlorophyll fluorescence parameters, we detected that *35S::AtOXR2* plants are more efficient in the use of captured light. This characteristic is accompanied with an increased electron transport chain, possibly by an improved redox state restoration. Gas exchange experiments showed that *35S::AtOXR2* plants are able to fix more CO₂ than WT plants. Altogether, these characteristics, increased CO₂ fixation, improved electron transport chain and increased leaf size, give rise to an organism with major aptitude to convert light into chemical energy. Thus, these plants are capable to produce more seeds.

Plants overexpressing *AtOXR2* hold water stronger than WT plants, while $\Delta oxr2$ plants shows the opposite behavior. These differences could be due to an accelerated stomata closure in *35S::AtOXR2* plants. When these plants reaches six weeks of age, they have altered ABA content, possibly in an *AtOXR2* dependent-dose manner. Moreover, *35S::AtOXR2* seeds showed different germination and establishment rates under osmotic stress conditions and under ABA concentrations that inhibits growing of WT plants.

Transcriptional analysis of plants overexpressing *AtOXR2* allowed us to determine that these plants possess a transcriptional profile similar to Arabidopsis plants exposed to stress conditions. Moreover, we showed that *35S::AtOXR2* plants have increased ROS concentration, increased lipid peroxidation levels, as well as increased scavengers molecules Ascorbate and Gluthation. Likely, these plants are better prepared to face biotic stress.

In accordance with chlorophyll fluorescence determinations, *35S::AtOXR2* plants showed more tolerance to high light stress. Moreover, these plants have more SA concentration than WT plants. When *35S::AtOXR2* plants were challenged with *P. syringe*, these plants are capable to mount a faster response than WT plants, producing pathogen elimination in less time.

Results obtained in this Thesis work brings newly information about the functions of proteins from OXR family on plants, providing new clues to understand the role of these proteins and establishing a basis for future studies. Due to improving in properties of

agronomic interest that present plants overexpressing *AtOXR2*, is possible to think about using this gen as a new tool useful to develop new technologies.

4. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

4.1. Generación de especies reactivas del oxígeno, consideraciones generales.

El oxígeno, esencial para la vida aerobia, cumple roles que van más allá de su función como simple aceptor de electrones al final de la cadena respiratoria. La estructura electrónica de la molécula de O_2 lo convierte en una especie susceptible a la formación de radicales libres altamente reactivos (Dickinson y Chang, 2011). Así, el pasaje de electrones a través de la cadena respiratoria genera intermediarios donde el oxígeno, ávido de electrones, acepta más electrones de los que puede estabilizar, y esta inestabilidad lo vuelve miles de veces más reactivo que la molécula diatómica en estado basal presente en la naturaleza (Bhattacharjee, 2010). Estas especies inestables conocidas como ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*), que pueden actuar como moléculas señalizadoras, constituyen en exceso verdaderas moléculas perjudiciales para la célula (Durand y col., 2007; Murphy, 2009; Volkert y col., 2000). Una vez que la molécula de O_2 captura el primer electrón, este se convierte en el radical anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ y cualquier situación que incremente la concentración celular de O_2 contribuirá a la producción de ROS. El radical $O_2^{\bullet-}$ es una de las especies más inestables junto con el estado singulete de O_2 , por lo que estas dos son las especies más reactivas. Sin embargo, debido a la abundancia electrónica en los alrededores de la cadena respiratoria, el estado excitado singulete de oxígeno (1O_2) se transforma rápidamente en radical superóxido. De esta manera, el radical superóxido termina siendo la molécula más peligrosa de entre toda la variedad de ROS presentes dentro de la célula.

Para evitar el daño oxidativo, la célula ha desarrollado mecanismos de protección. Las enzimas protectoras se pueden clasificar en dos grandes categorías: aquellas que previenen el daño oxidativo del ADN, y aquellas que reparan el daño causado como consecuencia de la acumulación de las ROS. Las proteínas con funciones protectoras y que previenen el daño celular incluyen un amplio grupo de enzimas tales como Catalasas (CAT), Superoxido Dismutasas (SOD), Peroxidasas (PX) y proteínas que contienen grupos tioles que detoxifican ROS (Gill y col., 2010; Gupta, 2010; Hackenberg y col., 2013; Li y col.,

2015; Mhamdi y col., 2010). A su vez, moléculas pequeñas como β -carotenos, Licopenos, Vitaminas A y E y diversos metales como el Selenio y el Manganeso pueden actuar como antioxidantes (Foyer y Noctor, 2011; Matros y col., 2015; Pandey y col., 2013).

Además, algunos metabolitos como el Glutati3n y el Ascorbato (Vitamina C), tienen sus correspondientes enzimas del tipo Reductasas y Peroxidasas en la c3lula. Estas enzimas contribuyen a la detoxificaci3n y permiten el ajuste fino de niveles de ROS. La acci3n del Glutati3n y el Ascorbato se debe exclusivamente a su capacidad para donar equivalentes de reducci3n y, al reaccionar r3pidamente con las ROS, evitan la oxidaci3n de otras mol3culas con funciones vitales (Foyer y Noctor, 2011; Zagorchev y col., 2013). Esta barrera de acci3n, le permite a la c3lula transformar $O_2^{\bullet-}$ en otras especies menos reactivas, comenzando por el per3xido de hidr3geno, seguido por el radical hidroxilo, y por 3ltimo convirtiendo las ROS en H_2O (Durand y col., 2007; Murphy y Volkert, 2012). En la Figura 4-1 se pueden observar las diferentes especies qu3micas que puede adoptar la mol3cula de O_2 con sus electrones y los mecanismos que la c3lula utiliza para detoxificar ROS.

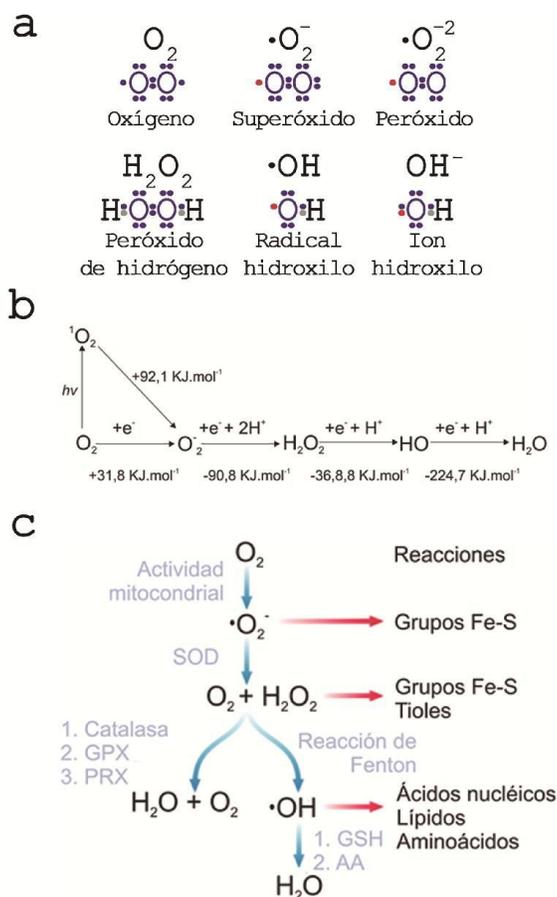


Figura 4-1 | Estructura electrónica de las ROS, orden de reactividad y mecanismos de detoxificación. **a-** Distribución electrónica de los orbitales p de la molécula de O_2 y las distintas moléculas reactivas que se pueden formar. **b-** Niveles de energía acumulados y orden de reactividad de las ROS. **c-** Vías de generación y detoxificación de ROS (SOD: Superóxido Dismutasa, GPX: Glutatión Peroxidasa; PRX: Peroxiredoxina, GSH: Glutatión reducido, AA: Ascorbato). Esta figura fue modificada de Merksamer y colaboradores (2013) y de Rodriguez y Reedman (2005).

Cuando se pierde el balance redox, ocurre una situación de estrés oxidativo y el exceso de ROS puede causar daño a los componentes celulares; entre ellos, al ADN, a las proteínas y a los lípidos. Las lesiones al ADN se producen cuando las ROS reaccionan con el ADN o con las reservas de nucleótidos y producen la oxidación de bases o azúcares. La gravedad de este daño radica en sus efectos mutagénicos, los cuales son minimizados por las enzimas encargadas de reparar dichas lesiones. En la figura 4-2 se muestran los mecanismos de reparación del ADN que ocurren a través de la acción de las familias de

enzimas reparadoras de ácidos nucleicos Mut y Fpg. Estos mecanismos se conservan tanto en procariontas como en eucariotas (David y col., 2007).

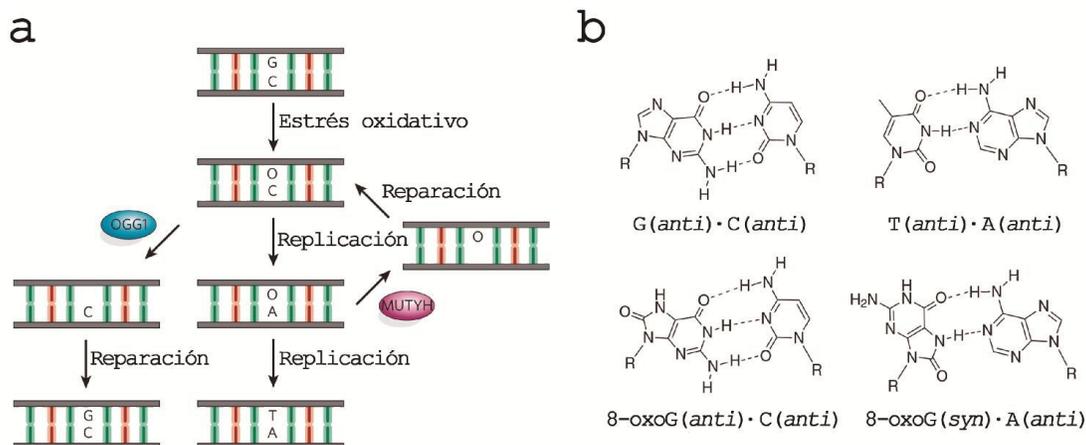


Figura 4-2 | Mecanismos de reparación del ADN y estructuras de pares de bases. **a-** Vía de reparación de las enzimas MutY y Fpg. **b-** Estructuras estabilizadas por puente de hidrógeno. Dichas estructuras pueden interactuar en su forma *syn* o en su forma *anti*. La base nitrogenada 8-oxoG en su conformación *anti* puede interactuar con la adenina en su conformación *anti*. Esta figura fue modificada de David y colaboradores (2007).

El estrés oxidativo puede originarse ya sea por una exposición a agentes oxidantes exógenos que incrementen las ROS, por una disminución en la velocidad de los mecanismos de reparación, o por ambos eventos en simultáneo (Uttara y col., 2009). Durante un pico de estrés oxidativo aumentan los niveles de ROS y se originan más lesiones al ADN de las que pueden ser procesadas por las enzimas reparadoras. Estas mutaciones están fuertemente relacionadas con la aparición de cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas, hipertensión y envejecimiento (Murphy y Volkert, 2012). De la misma manera que ciertos organismos son más susceptibles al estrés oxidativo, ciertos tejidos también lo son. El cerebro, por ejemplo, es particularmente sensible al estrés oxidativo, y el daño producido por ROS es una característica común entre las principales patologías neurodegenerativas, incluyendo esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson (Oliver y col., 2011). Esta alta correlación entre el estrés oxidativo, las modificaciones ejercidas sobre el ADN y los procesos celulares aberrantes (cáncer, envejecimiento, enfermedades, etc.) despertó el

interés de muchos investigadores, dedicados a entender cómo prevenir o aliviar estos procesos, tanto a nivel celular como molecular.

4.2. Especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo en plantas.

En los inicios de su carrera, Otto Warburg observó que la fertilización de erizos de mar producía un rápido incremento en el consumo de oxígeno. En su momento, Otto pensó que el consumo de oxígeno era dinámico y parecía estar vinculado a la proliferación celular, algo que posteriormente sería adoptado y sostenido por muchos científicos. Poco más de dos décadas pasaron hasta que fue galardonado con el premio Nobel por el descubrimiento de la "naturaleza y modos de acción de la enzima respiratoria". Sin embargo, casi 100 años más tarde, se comprobó que el objeto del aumento del consumo de oxígeno no era más que la materia prima necesaria para producir mayores cantidades de superóxido. Esta onda de peróxido de hidrógeno no daña el organismo naciente, sino que es utilizada como parte de una reacción enzimática que sirve para el desarrollo de una capa protectora alrededor del joven huevo fertilizado. Estas observaciones están en consonancia con una creciente ola de evidencia que sugiere que las ROS pueden ser generadas y direccionadas con el fin de regular una diversa gama de procesos fisiológicos así como también bajo distintos procesos de estrés (Finkel, 2011).

Las plantas son organismos sésiles, y como tales debieron desarrollar mecanismos que les permitieran adaptarse a los cambios que ocurren en su entorno. En función de la intensidad, del tipo de estímulo y la duración, dichos cambios pueden transformarse en estreses medioambientales. Así, temperaturas extremas, salinidad, sequía, concentraciones elevadas de metales pesados, herbicidas y patógenos impactan fuertemente en el metabolismo vegetal y la productividad (Mittler y Blumwald, 2010). Para sobrevivir, las plantas han desarrollado una compleja red de señalización que involucra diferentes reguladores de crecimiento endógeno que detectan y protegen del estrés medioambiental. Una de las respuestas comunes a diferentes situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico, es la generación acelerada de ROS. La acumulación de ROS puede ocasionar estrés oxidativo, exacerbando el daño celular (Bhattacharjee, 2012; Gill y Tuteja, 2010). Sin embargo, se considera apropiado asumir que las plantas tendrían mecanismos que regulan la concentración de ROS de acuerdo a sus necesidades celulares (Bhattacharjee, 2012). Por ejemplo, la señalización retrógrada por autopropagación de ondas de ROS provenientes de organelas tales como cloroplastos o mitocondrias al núcleo

han sido propuestas como mediadoras de la percepción a estrés abiótico y respuesta sistémica (Miller y col., 2009).

Como se mencionó más arriba, cuando ocurre un desbalance redox, las células tienen dos tipos de barreras de protección contra las especies reactivas del oxígeno; por un lado, enzimas cuya actividad es capaz de desactivar las ROS, y por otro lado, metabolitos capaces de “absorber” esa carga oxidativa evitando que se dañen otros componentes celulares más importantes. Dentro de las barreras enzimáticas, las células poseen enzimas como la SOD, CAT, PX, enzimas del ciclo ascorbato-glutación (AsA-GSH) tales como ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR) (Noctor y Foyer, 1998). Estas enzimas catalizan reacciones en diferentes compartimentos subcelulares y responden de manera orquestada cuando las células son expuestas a estrés oxidativo. En la Tabla 4-1 se resumen las situaciones de estrés que involucran a las enzimas antes mencionadas diferenciándolas en función de la especie vegetal estudiada (Sharma y col., 2012).

ESTRÉS	ENZIMA ANTIOXIDANTE	ESPECIE VEGETAL
Sequía	SOD, GPX, APX, MDHAR, DHAR Y GR	<i>Oriza sativa</i>
	SOD, CAT y GPX	<i>Beta vulgaris</i>
	SOD, APX y GR	<i>Triticum sativum</i>
Salinidad	SOD, CAT, GPX, APX y GR	<i>Oriza sativa</i>
	CAT, SOD y GR	<i>Olea europaca</i>
	GPX	<i>Oriza sativa</i>
Frío	APX, MDHAR, DHAR, GR y SOD	<i>Zea mays</i> <i>Frigaria xananassa</i>
	SOD, GPX y APX	<i>Oriza sativa</i> <i>Glycine max</i>
Níquel	SOD, GPX y APX	<i>Oriza sativa</i>
Arsénico	SOD, GPX y APX	<i>Oriza sativa</i>
Manganeso	SOD, GPX, APX y GRX	<i>Oriza sativa</i>
	SOD, APX, CAT y GPX	<i>Picea asperata</i>
UV-B	GPX y APX	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	GPX y CAT	<i>Linun isitatissimum</i>
<i>Bean yeallow mosaic</i> (virus)	POD, CAT, APX y SOD	<i>Vicia faba</i>

Tabla 4-1 | Enzimas antioxidantes en plantas. La tabla muestra las enzimas que son activadas en respuesta a estrés oxidativo inducido por diferentes situaciones de estrés. *Esta tabla fue modificada de Sharma y colaboradores (2012).*

Por otro lado, dentro de aquellos metabolitos que carecen de actividad enzimática, pero que tienen el poder de disminuir la gravedad del daño celular, podemos mencionar a los componentes principales del sistema amortiguador redox celular: ascorbato (AsA) y glutatión (GSH), así como también a los tocoferoles, carotenoides, y compuestos fenólicos. Existen numerosos reportes donde se demuestra que mutantes con contenidos disminuidos de estos antioxidantes no enzimáticos son hipersensibles a diferentes situaciones de estrés (Gao y Zhang, 2008; Semchuk y col., 2009).

Cuando las barreras que impone el sistema de defensa celular antioxidante no son suficientes para detoxificar las ROS generadas, se desencadena el daño celular como consecuencia de las reacciones entre las ROS y las diferentes biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN). Estas reacciones pueden alterar propiedades intrínsecas de las membranas como la fluidez y el transporte de iones, la pérdida de actividad enzimática, el entrecruzamiento proteico, la inhibición de síntesis de proteínas y el daño al ADN. Como consecuencia de estas modificaciones puede ocurrir la muerte celular. En la Figura 4-3 resumen las moléculas blanco y los posibles mecanismos de reacción de las ROS en altas concentraciones:

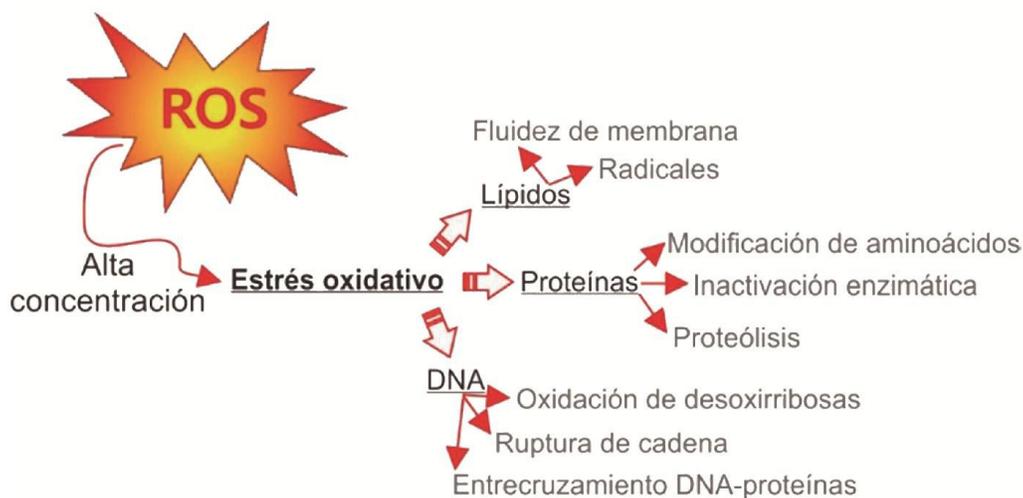


Figura 4-3 | Eventos moleculares durante el daño oxidativo mediado por ROS. Las especies reactivas del oxígeno pueden generar daños a lípidos, proteínas y ADN. El daño generado sobre cada grupo de moléculas responde a la reactividad que presentan los grupos químicos funcionales frente al oxígeno. *Esta figura fue modificada de Sharma y colaboradores (2012).*

A continuación se detallan procesos relevantes que ocurren sobre las biomoléculas como consecuencia de la acción de las ROS en células vegetales:

Peroxidación de lípidos. Cuando los niveles de ROS sobrepasan cierto nivel, el fenómeno de peroxidación lipídica transcurre tanto en membranas organelares como en la membrana celular y esto afecta el normal funcionamiento celular (revisado en (Chmielowska-Bak y col., 2015). La peroxidación lipídica exacerba el estrés oxidativo mediante la producción de radicales lipídicos que pueden reaccionar entre sí o dañar ADN y proteínas. La cuantificación de los niveles de peroxidación lipídica se pueden utilizar para evaluar el daño a las membranas celulares mediado por ROS bajo condiciones de estrés. La peroxidación incrementada de lípidos ha sido reportada en plantas crecidas bajo diferentes situaciones de estrés (Biswas y Mano, 2015).

Oxidación de proteínas. El ataque de ROS en las proteínas podría causar modificación de proteínas en una variedad de vías, algunas son directas y otras indirectas (Biswas y Mano, 2015). La modificación directa involucra la modulación de la actividad de una proteína a través de la nitrosilación, carbonilación, formación de puentes disulfuros, y glutationilación. Además, ciertos aminoácidos pueden reaccionar con el MDA y de esta manera, un exceso de MDA puede dar lugar a proteínas conjugadas (Yamauchi y col., 2008). El oxígeno activado puede oxidar los grupos sulfhidrilo (-SH) y transformarlos en grupos sulfénicos (S-OH), o en sulfínicos (SOOH) o incluso, bajo condiciones de sobrepoblación de ROS, en grupo sulfónico (SOOOH). Además, el oxígeno activado también puede reaccionar con Metionina para dar lugar a derivados de sulfóxido de Metionina. Por otro lado, los tejidos dañados por estrés oxidativo generalmente contienen concentraciones elevadas de proteínas carboniladas, y es justamente este tipo de proteínas el que se utiliza como marcador de oxidación proteica (Møller y Kristensen, 2004). Esta reacción se da principalmente sobre residuos de Arginina, Treonina, Lisina y Prolina.

Daño al ADN. Las ROS son la mayor fuente de daño al ADN (Vanderauwera y col., 2011). Estas moléculas pueden causar daños no sólo al ADN nuclear, sino también al

mitocondrial y al cloroplastídico. El ataque oxidativo al ADN genera la oxidación de la desoxiribosa, la ruptura de hebras, la remoción de nucleótidos, una variedad de modificaciones en las bases orgánicas de los nucleótidos, y entrecruzamiento de ADN y proteínas. En plantas expuestas a estrés salino y metálico se ha observado un incremento en la degradación del ADN (Liu y col., 2000; Meriga y col., 2004).

4.2.1. Sitios de producción de ROS en plantas.

Es probable que el sitio de producción de ROS sea parte del tipo de respuesta que se generará en la planta frente a diferentes estímulos (Koffler y col., 2014; Mittler y col., 2011; Ozgur y col., 2014; Zechmann, 2014). En este punto podemos postular dos alternativas que contemplen aquellas situaciones que generen ROS en un compartimento celular particular debido a la naturaleza del disturbio, o situaciones de estrés podrían generar respuestas menos específicas y, probablemente, la generación de ROS ocurriría en diferentes compartimentos celulares a la vez. Por ejemplo, el sitio de generación de ROS debido a un estrés por alta intensidad lumínica es principalmente el cloroplasto, mientras que se ha sugerido que durante una situación de estrés biótico la mitocondria sería la principal organela generadora de ROS (Colombatti y col., 2014; Gleason y col., 2011a; Zhang y col., 2014). A continuación se resumen los distintos compartimentos intracelulares en los que se puede ocurrir la producción de ROS en plantas durante una situación de estrés.

Cloroplastos: Cuando la organela involucrada es el cloroplasto, las reacciones de Mehler son las encargadas de proveer electrones desapareados (Asada, 2006). La saturación de NADP^+ en el fotosistema 1 (PS1) debido a un desbalance redox, ocasiona la salida de electrones hacia el oxígeno aumentando la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Como se muestra en la figura 4, la contribución principal de $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido in vivo proviene de la cesión de electrones desde la Ferredoxina (Fd) reducida al O_2 . Los radicales superóxido sufren dismutación tanto espontáneamente como facilitada por la enzima Cu/Zn SOD. Esto centraría a la molécula de O_2 como un mediador importante en el proceso de

fotoprotección y aclimatación fotooxidativa. Las plantas han desarrollado diferentes estrategias para acoplar los mecanismos de defensa antioxidantes de las vías fotosintéticas con las rutas normales utilizadas durante una situación de estrés oxidativo (Kim y col., 2012; Mubarakshina y col., 2010; Sharma y col., 2012).

Otro proceso capaz de generar ROS en los cloroplastos es la clororespiración. Este proceso tiene la potencialidad de reducir el oxígeno molecular a través de una NADPH deshidrogenasa (complejo NDH) y una oxidasa terminal (IMMUTANS) en cloroplasto que compite con la cadena de transporte de electrones por equivalentes de reducción (Apel y Hirt, 2004; Bhattacharjee, 2012; Nixon, 2000).

Peroxisomas: Los peroxisomas probablemente sean el sitio de mayor producción de H₂O₂ intracelular, como resultado de su metabolismo esencialmente oxidativo (Figura 4-4). Los principales procesos metabólicos responsables de la generación de H₂O₂ en diferentes tipos de peroxisomas son: la reacción catalizada por la Glicolato oxidasa, la β -oxidación de los ácidos grasos, la reacción enzimática de Flavin Oxidasas, y la desproporción de radicales O₂^{•-} (del Río y col., 2006). En la mayor parte de las plantas C₃, las ROS pueden ser generadas durante la oxidación del glicolato a través del ciclo de oxidación del carbono fotosintético (PCOC) (Bhattacharjee, 2012). Durante la fotorrespiración, la oxidación del glicolato contribuye con la mayor parte de la producción de H₂O₂ (Noctor y col., 2002). Al igual que la mitocondria y los cloroplastos, los peroxisomas también producen O₂^{•-} como consecuencia de su metabolismo normal. En los peroxisomas de hojas de arveja se han reportado al menos 2 sitios de generación de O₂^{•-}. Uno se encuentra en la matriz de los peroxisomas, el sistema de generación XOD, el cual cataliza la oxidación de xantina o hipoxantina a ácido úrico y produce O₂^{•-} en el proceso (Reunov, 2014). Por otro lado, la membrana de los peroxisomas contiene una pequeña cadena transportadora de electrones compuesta de una flavoproteína, NADH y un *citocromo b*. Actualmente se han identificado tres polipéptidos peroxisomales integrales de membrana involucrados en la producción de O₂^{•-}. Mientras que dos pueden utilizar NADH como donante de electrones, la tercer proteína identificada es claramente

dependiente de NADPH y es capaz de reducir el citocromo c con NADPH como donante de electrones (Linka y Theodoulou, 2013; López-Huertas y col., 1999). El $O_2^{\bullet-}$ producido es subsiguientemente oxidado hacia H_2O_2 por la enzima SOD peroxisomal.

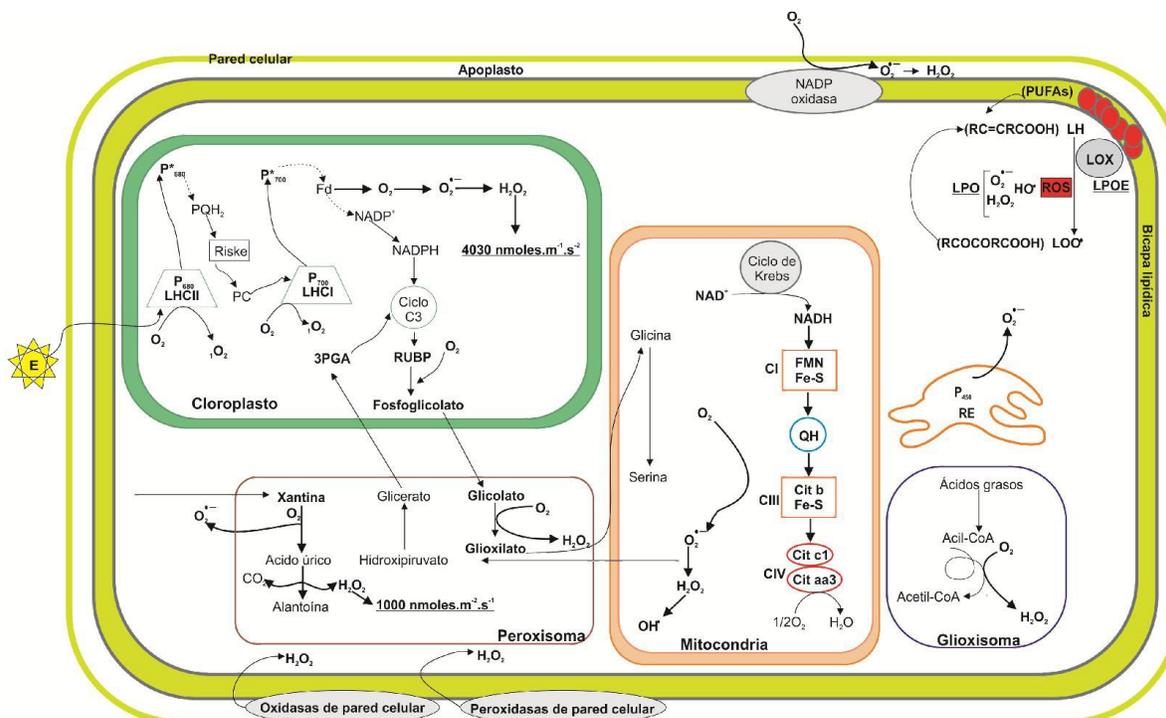


Figura 4-4 | Compartimentos subcelulares en los que ocurre la generación de ROS en células vegetales. En el **cloroplasto** la generación de ROS ocurre como consecuencia de la reducción de la Ferredoxina (Fd). La dismutación del oxígeno deriva en la formación de aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y finalmente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, el oxígeno en estado singulete (1O_2) es generado continuamente como consecuencia del exceso de energía en los fotosistemas I ($P_{700}LHCI$) y II ($P_{680}LHCII$). En plantas C3, la reacción de oxigenación de ribulosa 1,5-bifosfato (RUBP) por la Rubisco deriva en la formación de glicolato, el cual es trasladado hacia los peroxisomas. La oxidación del glicolato y la formación de alantoína contribuyen a la formación de H_2O_2 en el **peroxisoma**. La producción de ROS en el cloroplasto y en el peroxisoma es entre 100 y 30 veces mayor a la que se observa en la mitocondria ($< 260 \text{ nmoles.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$). En la **mitochondria** la producción de ROS está asociada al transporte de electrones a través de los complejos respiratorios. Las Flavoproteínas del complejo I (CI) puede catalizar la formación de $O_2^{\bullet-}$. El incremento en el pool de Ubiquinona reducida (QH_2) es considerada la principal fuente de producción de $O_2^{\bullet-}$ en la mitocondria. La dismutación de los $O_2^{\bullet-}$ deriva en la formación de H_2O_2 . *Esta figura fue modificada de Sharma y colaboradores (2012).*

Pared celular: Las paredes celulares también son reconocidas como sitios activos de producción de ROS (Figura 4-4). En la pared celular de las células vegetales se encuentra un grupo de enzimas denominadas Peroxidasas, capaces de oxidar NADH y

catalizar la formación de $O_2^{\bullet-}$ en el proceso. Para esto, la enzima utiliza H_2O_2 que le permite catalizar la oxidación de $NADH$ a NAD^+ , el cual en cambio reduce O_2 a $O_2^{\bullet-}$. Esta reacción es estimulada por monofenoles, especialmente el alcohol coniferílico (Wang y col., 2013). En este caso, la enzima malato deshidrogenasa demostró ser la única proveedora de cofactores $NADH$ (Lin y Kao, 2001). A su vez, este tipo de peroxidasas han demostrado tener un rol activo durante la respuesta hipersensible (HR) así como también durante un estrés por deficiencia de potasio en *Arabidopsis* (Kim y col., 2010). Además de las $NADH$ peroxidasas existen $NADH$ oxidasas y diamino oxidasas, que también están involucradas en la producción de oxígeno activado utilizando diaminas o poliaminas (putrescina, espermidina, cadaverina, etc.) como sustrato para reducir una quinona que posteriormente se autooxida para dar lugar a peróxido (Lin y Kao, 2001).

Retículo endoplasmático: En esta organela existe una cadena de transporte de electrones dependiente de $NAD(P)H$ que involucra al citocromo P450 y produce $O_2^{\bullet-}$ (Mittler, 2002) (Figura 4-4). Los sustratos orgánicos, RH , reaccionan primero con citocromo P450 y luego son reducidos por una flavoproteína para formar un radical intermediario (cit P450R \cdot). El estado triplete de oxígeno puede reaccionar fácilmente con este radical ya que cada uno tiene un electrón desapareado. Este complejo oxigenado (cit P450ROO \cdot) podría ser reducido por el citocromo *b*, u ocasionalmente el complejo podría descomponerse y liberar $O_2^{\bullet-}$. Se ha demostrado que las ROS generadas en esta organela regulan la respuesta antioxidante en *Arabidopsis* durante una situación de estrés (Ozgur y col., 2014).

Mitocondrias: La cadena transportadora de electrones es una fuente potencial de ROS (Figura 4-4). Como resultado de la actividad respiratoria, las mitocondrias son organelas productoras de ROS (mtROS). El transporte de electrones mediante los complejos I, III y IV puede generar aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) dado que los electrones que se transportan tienen suficiente energía libre para reducir directamente el oxígeno molecular. Los aniones $O_2^{\bullet-}$ generados luego serán dismutados a peróxido de hidrógeno como consecuencia de la actividad de la enzima MnSOD (Moller, 2001). Esta isoforma se ha localizado en la matriz mitocondrial (Kliebenstein y col., 1998). Luego, parte del H_2O_2

producido en la matriz podría ser detoxificado por enzimas del sistema de peroxirredoxinas (PRX) o por enzimas del ciclo AsA-GSH (Dietz y col., 2006; Locato y col., 2009). Además, el H_2O_2 puede reaccionar con cationes Fe^{2+} o Cu^+ para producir radicales aún más tóxicos. Dada la falta de polaridad del H_2O_2 , esta molécula puede atravesar las membranas mitocondriales, abandonar la mitocondria y salir al citosol (Moller y Sweetlove, 2010; Morgan y col., 2008).

La producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en la mitocondria se incrementa cuando la organela no produce ATP, ya que entonces la diferencia de potencial es elevada y las relaciones NADH/NAD^+ y Ubiquinona reducida/oxidada (QH_2/Q) se incrementan (Blokhina y Fagerstedt, 2010; Cvetkovska y col., 2013; Navrot y col., 2007). Los electrones de la QH_2 formados entre el Complejo I (CI) y el Complejo III (CIII) son altamente reactivos y pueden atacar el oxígeno molecular (Moller, 2001). Este principio se ha demostrado en mitocondrias aisladas, donde la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se incrementa de una manera dependiente de sustrato y en presencia de inhibidores del Complejo IV y de la AOX en plantas (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2012; Moreno-Sanchez y col., 2013). Además, en células de mamífero se ha postulado que la actividad del Complejo II es la determinante de la producción de mtROS (Moreno-Sanchez y col., 2013). En condiciones normales de funcionamiento, la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ es mínima y no hay evidencias de que bajo estas condiciones las mtROS generen algún tipo de daño (Sena y Chandel, 2012). Sin embargo, cuando los niveles de mtROS se incrementan, estos pueden generar daño a nivel del ADN mitocondrial (mtADN), de los complejos mitocondriales y de los lípidos que constituyen las membranas (Kristensen y col., 2004; Millar y Leaver, 2000; Rhoads y col., 2006; Rurek, 2014). El daño o la alteración en la función mitocondrial podría originar una cascada de consecuencias que incluyen la modificación de la transcripción (comunicación retrógrada) e incluso la muerte celular (Schwarzlander y col., 2012; Simon y col., 2000). Sin embargo, las mtROS, podrían actuar como moléculas de señalización sin generar un daño y transmitiendo el estado oxidativo de los diferentes compartimentos de la célula (Hamanaka y Chandel, 2010).

La implicancia de las ROS producidas en la célula durante la repuesta a estrés en plantas ha sido ampliamente demostrada (revisado en Sharma y col., 2012). Como se describe en la siguiente sección (4.2.2), su función no se restringe a la respuesta a estrés sino que actúan como reguladores de distintos procesos celulares (Considine y Foyer, 2014; Gapper y Dolan, 2006; Karkonen y Kuchitsu, 2014; Lu y col., 2014). Se ha demostrado que, en células de la raíz, las mitocondrias son las principales productoras de ROS tanto en condiciones adecuadas de crecimiento como en presencia de ácido salicílico (Colombatti y col., 2014; Gleason y col., 2011b). Además, la disminución de la actividad del CII disminuye los niveles de H₂O₂ mitocondriales, generando plantas incapaces de activar la expresión del gen *GST8* (*GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE 8*). La falta de expresión de *GST8* o la falta de señalización mediada por H₂O₂ mitocondrial genera plantas más sensibles al ataque por patógenos fúngicos (Gleason y col., 2011b). En línea con esta idea, un estudio reciente en el cual analizan las mtROS mediante microscopia sugiere que la generación de aniones superóxido en la mitocondria es una señal necesaria para que se desencadene la respuesta hipersensible en plantas de tabaco infectadas con *Pseudomonas syringae* incompatible pv. *Maculicola* (Colombatti y col., 2014; Cvetkovska y Vanlerberghe, 2012). En forma contraria a lo observado en las plantas deficientes en el CII, las plantas mutantes en *AOX1a* aumentan los niveles de las mtROS pero presentan una respuesta hipersensible retardada luego de la infección con *P. syringae* incompatible pv. *Maculicola*. Los niveles de AOX en plantas determinan la magnitud de la producción de aniones superóxido en la mitocondria y la magnitud de la respuesta hipersensible (Colombatti y col., 2014; Cvetkovska y Vanlerberghe, 2013).

4.2.2. El mensaje de las especies reactivas del oxígeno.

4.2.2.1. ROS como moléculas señalizadoras.

Existen numerosos reportes que sugieren que las ROS, especialmente H₂O₂, son moléculas señalizadoras activas y que su acumulación lleva a una variedad de respuestas celulares mediante sensores redox (del Río y col., 2006; Halliwell, 2006). De hecho, la respuesta a las ROS en plantas resulta ser dosis dependiente. Altas concentraciones de

ROS generan daño celular o incluso muerte celular (Bhattacharjee, 2012; Colombatti y col., 2014), mientras que bajas concentraciones de ROS funcionan como señales de desarrollo, controlando varios aspectos de la biología vegetal. Además, se ha comprobado que la preexposición a situaciones de estrés biótico y abiótico que inducen un “estallido oxidativo” (*oxidative burst*), puede desencadenar una función protectora o incluso inmunizar plantas contra diferentes estreses medioambientales, y de esta manera tener una participación en la tolerancia al estrés (Bhattacharjee, 2012; Dat y col., 2000).

Las ROS pueden transmitir un mensaje específico, por ejemplo mediante el cambio del estado redox de quinasas como es el caso de JNK, o bien uno inespecífico mediante la propagación a través de moléculas intermediarias. En un primer caso, las ROS, principalmente el H₂O₂, son las encargadas de activar los genes de defensa, participando directamente en la respuesta (Bhattacharjee, 2012; Colombatti y col., 2014). Sin embargo, otra importante vía de señalización asociada a las ROS está vinculada con la producción de varios productos de peroxidación lipídica. Dichas moléculas se conocen como “señales biológicas”, las cuales no necesitan ser precedidas por genes de activación (Spiteller y col., 2001). Distintas especies radicales generadas como resultado del daño oxidativo de membranas (radicales alcoxi, radicales peroxi) así como los productos que generan estas moléculas (2,4-dienos; 2,4-decadienos; etc.) podrían iniciar eventos de señalización y; en última instancia, inducir la muerte celular programada, reacción hipersensible, etc. (Bhattacharjee, 2012).

A concentraciones bajas o moderadas las especies reactivas del oxígeno actúan como mensajeras implicadas en procesos tales como el cierre estomático (Djebbar y col., 2012; Mittler y col., 2011; Neill y col., 2002; Yan y col., 2007), gravitropismo (Joo y col., 2001) y adquisición de tolerancia tanto a estrés biótico como abiótico (Baxter y col., 2013; Borges y col., 2014; Pastor y col., 2013; Suzuki y col., 2012). Las plantas transforman esta señal en un respuesta celular mediante la participación de proteínas sensibles al estado redox (Sharma y col., 2012), movilización de calcio (Mittler y col., 2011), fosforilación de proteínas (Cheng y Song, 2006) y, finalmente, modificando la expresión génica (Bhattacharjee, 2012; Djebbar y col., 2012; Finkel, 2011a; Mittler y col., 2011). A su vez, la

forma en que las células modulan este mensaje, está fuertemente relacionada con el estado redox de la misma. En la figura 4-5, se resumen los procesos fisiológicos en los cuales el evento detonante fue la interacción ROS-hormona.



Figura 4-5 | Participación de las ROS en distintos procesos vegetales que involucran a hormonas. Las ROS actúan como mensajeros en las respuestas de plantas mediadas por hormonas incluyendo la muerte celular, el proceso de germinación, la determinación del gravitropismo de la raíz, la biosíntesis de lignina, la respuesta hipersensible y el cierre estomático. *Esta figura fue modificada de Sharma y colaboradores (2012).*

Las especies reactivas del oxígeno, en especial el peróxido de hidrógeno, son consideradas como segundos mensajeros en la vía de traducción del ácido absícico (ABA) en células de la guarda (Yan y col., 2007). Esta señal es una mediadora esencial en el cierre estomático que reduce la pérdida de agua mediante la activación de canales permeables a calcio en la membrana plasmática. Sin embargo, en el año 2011 Jannat y colaboradores observaron que la elevación del H_2O_2 citosólico inducido por ABA induce el cierre estomático, mientras que un incremento constitutivo de H_2O_2 no genera este efecto protector. Por otro lado, se sabe que la gravedad induce el movimiento asimétrico de auxinas, las cuales estimulan la producción de ROS, mediadores del gravitropismo (Joo y col., 2001). Contrariamente, si se reducen los niveles de ROS mediante la utilización de antioxidantes tales como N-acetilcisteína, ácido ascórbico o Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametil cromán-2-carboxílico) se inhibe el gravitropismo. En granos de cebada en dormancia se demostró que el ácido giberélico (GA) y el contenido de ROS son bajos,

mientras que la señalización por ABA es alta. La aplicación de H₂O₂ exógeno no parecería alterar ni la biosíntesis ni la señalización de ABA; sin embargo, tiene un efecto pronunciado en la señalización por GA, induciendo un cambio en el balance hormonal que produce la germinación (Bahin y col., 2011). El efecto combinado de las ROS y hormonas en cebada no sólo se ha limitado a estos procesos, sino que también se ha demostrado la participación de estos metabolitos en el proceso de muerte celular programada (PCD) en células de la aleurona (Bethke y Jones, 2001; Fath y col., 2002). Aoki y colaboradores (2014) demostraron que las ROS producidas en respuesta a GA estimulan indirectamente la PCD en células de la aleurona de cebada. A esta conclusión se abordó mediante la utilización de mutantes DELLA (plantas que no pueden traducir los cambios dependientes de GA), las cuales no se vieron afectadas significativamente por el tratamiento con GA, a pesar de que el tratamiento incrementó los niveles de ROS (Aoki y col., 2014). En general, las GA sintetizadas en embriones durante la germinación inducen la producción de ROS en células de la aleurona. Estas ROS estarían involucradas tanto en la activación metabólica de hidrólisis, como en PCD, a través de la regulación de señalización de GA tales como GAMyB en vez de ejercer mediante la oxidación directa de macromoléculas celulares en células de la aleurona de cebada.

Las plantas han desarrollado un complejo sistema regulatorio que les permite mediar la respuesta a diferentes situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico, basado en la síntesis y remoción de ROS, así como también en la señalización por ROS. La producción transitoria de ROS puede detectarse en los eventos tempranos de las interacciones planta-patógeno y juegan un rol de señalización importante en la regulación de traducción de señales de la patogénesis (Colombatti y col., 2014; Nanda y col., 2010). La producción del estallido oxidativo podría ser considerada como una señal específica durante el proceso de interacción (Nanda y col., 2010). Durante la respuesta hipersensible (HR), el ácido salicílico (SA) modula la señalización por ROS (Klessig y col., 2000b; Xu y Brosche, 2014). Las ROS han demostrado actuar como segundos mensajeros de la inducción de genes de defensa en plantas de tomate, en respuesta al daño mecánico (Orozco-Cárdenas y col., 2001b). En este caso las ROS fueron generadas cerca de las

paredes celulares de las células de los haces vasculares de las hojas de tomate en respuesta al daño mecánico, y el peróxido resultante de la polygalacturonasa inducible por daño actuó como segundo mensajero para la activación de genes de defensa en células del mesófilo (Orozco-Cárdenas y col., 2001b).

La lignina es un componente fundamental de la respuesta de las plantas hacia las diferentes situaciones de estrés medioambiental. Dennes y colaboradores (2011) caracterizaron una red genética que les permite a las plantas regular la biosíntesis de lignina en respuesta al daño a la pared celular a través de interacciones dinámicas entre el ácido jasmónico (JA) y las ROS. Las especies reactivas del oxígeno han demostrado jugar roles importantes en situaciones de estrés osmótico, bajas temperaturas, y en la traducción de señales de metales pesados (Xiong y col., 2002; Yeh y col., 2007). Se ha demostrado que los genes involucrados en la señalización por estrés osmótico se incrementan con un aumento de los niveles de ROS, incluyendo el factor de transcripción DREB2A y una histidin-quinasa (Desikan y col., 2001). En células de cultivo de *Arabidopsis*, se ha reportado que MAPK AtMPK6 pueden ser activadas por bajas temperaturas; estrés osmótico, así como también por estrés oxidativo (Yuasa y col., 2001). Borsani y colaboradores (2001) sugirieron que la tolerancia aumentada hacia estrés osmótico de *Arabidopsis* transgénicas que expresan el gen de la salicilato hidroxilasa (NahG), podría ser el resultado de una generación disminuida de ROS mediada por SA (Borsani y col., 2001). Por otro lado, se sabe que las ROS son mediadores importantes en la síntesis de ABA inducida por sequía en plantas y se cree que podrían mediar las señales que utiliza la planta para percibir la condición de sequía (Zhao y col., 2001). A su vez, utilizando distintos inhibidores farmacológicos, se ha demostrado que los metales Cd^{2+} y Cu^{2+} inducen la activación de MAP quinasa a través distintos sistemas de generación de ROS (Yeh y col., 2007).

4.2.2.2. Sobreproducción de ROS en condiciones de estrés: La cara perjudicial de las ROS.

La producción de ROS en plantas bajo condiciones normales de crecimiento es pequeña. Sin embargo, en respuesta a diferentes situaciones de estrés, las especies reactivas del oxígeno se incrementan drásticamente en plantas, alterando el balance de $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, y H_2O_2 en el medio intracelular (Atkinson y Urwin, 2012; Ramegowda y Senthil-Kumar, 2015; Sharma y col., 2010). Los efectos de situaciones tales como estrés por sequía, salinidad, enfriamiento, toxicidad por metales, radiación UV-B, alta intensidad lumínica, y ataque por patógenos se discuten brevemente en los siguientes párrafos.

Estrés por sequía. Bajo estas condiciones, la producción de ROS se ve incrementada mediante diferentes vías. La inhibición de la asimilación de CO_2 , acoplada con cambios en la actividad fotosintética genera como consecuencia una producción de ROS vía la reacción de Mehler en los cloroplastos (Asada, 1999). Durante el estrés por sequía la fijación de CO_2 es limitada debido al cierre estomático, el cual, lleva a una regeneración de $NADP^+$ insuficiente a través del ciclo de Calvin. Debido a la carencia de aceptores de electrones, ocurre una sobrerreducción de la cadena transportadora de electrones fotosintética, lo cual lleva, en última instancia a una mayor tasa de “escape” de los electrones al O_2 . Biehler y Fock (Biehler y Fock, 1996) reportaron hasta un 50% más de escapes de electrones provenientes de la cadena de transporte fotosintética hacia la reacción de Mehler en plantas de trigo expuestas a la sequía, comparado con plantas sin estresar. La actividad fotosintética es inhibida en tejidos vegetales debido a un desbalance entre la captura de luz y su utilización durante estrés hídrico (Foyer y Noctor, 2000). La disipación del exceso de energía en el PSII y en la antena lleva a la generación de ROS, los cuales son potencialmente peligrosos bajo condiciones de estrés hídrico. Bajo estas condiciones, la ruta fotorrespiratoria también se ve incrementada, especialmente cuando la oxigenación de RUBP es máxima debido a la limitación en la fijación de CO_2 (Noctor y col., 2002). Noctor y colaboradores (2002) han estimado que la fotorrespiración es la causa de, probablemente, un 70% del total de H_2O_2 bajo condiciones de estrés hídrico. Para proteger la homeostasis celular, principalmente redox, las plantas ponen en juego su

repertorio de enzimas y metabolitos protectores. La actividad aumentada de enzimas del sistema de defensa antioxidante ha sido reportada en distintas especies vegetales (Mittler y Blumwald, 2010; Sharma y Dubey, 2005). En general, los estudios de respuesta antioxidante entre genotipos sensibles y tolerantes a sequía, revelan mayor capacidad antioxidante en los genotipos tolerantes (Cruz de Carvalho, 2008; Moussa, 2008; Wang y col., 2012a).

Estrés por salinidad. Esta condición genera cantidades excesivas de ROS (Apse y Blumwald, 2002; Tanou y col., 2009). Elevadas concentraciones salinas alteran el transporte electrónico celular dentro de diferentes compartimentos subcelulares tales como cloroplastos y mitocondrias, e inducen rutas metabólicas tales como la fotorrespiración. A su vez, este tipo de estrés puede llevar al cierre estomático, el cual reduce la disponibilidad de CO₂ en las hojas e inhibe la fijación de carbono. Este fenómeno favorece la exposición de cloroplastos a energía de excitación excesiva, lo cual lleva a la sobrerreducción de la cadena de transporte de electrones fotosintética, llevando una sobreproducción de ROS y en una instancia posterior, estrés oxidativo. Bajas relaciones de CO₂/O₂ también favorecen la fotorrespiración, dando lugar una producción exacerbada de ROS, especialmente H₂O₂ (Hernández y col., 2000). Al igual que para los casos de estrés por sequía, a la fecha existen numerosos reportes que vinculan la respuesta estrés salino con la inducción de mecanismos de defensa contra ROS (Mishra y col., 2013; Sekmen y col., 2007; Valderrama y col., 2006).

Estrés por frío. Este es uno de los factores medioambientales limitantes del crecimiento y la productividad de las plantas de interés agronómico. El estrés por frío lleva a la sobreproducción de ROS mediante un desbalance exacerbado entre la absorción de luz y la utilización mediante la inhibición de la actividad del ciclo de Calvin-Benson (Logan y col., 2006). Esto aumenta el flujo de electrones al O₂ y causa una sobrerreducción de la cadena de transporte de electrones respiratoria (Hu y col., 2008). El estrés por frío también causa una reducción significativa en los transcriptos *rbcl* y *rbcs*, el contenido de RUBISCO así como la actividad de esta enzima, lo cual lleva a un mayor flujo de electrones hacia el O₂ (Zhou y col., 2006). La acumulación de H₂O₂ en cloroplastos está

negativamente correlacionada con la actividad inicial de RUBISCO y la tasa fotosintética (Zhou y col., 2006). Una de las huellas digitales del estrés por frío es el incremento en la actividad lipoxigenasa así como también la peroxidación lipídica. Cuando la planta es sometida a bajas temperaturas, la peroxidación mediada por lipoxigenasa de los lípidos de membrana contribuye al daño oxidativo (Fryer y col., 1998). Además, cuando las temperaturas disminuyen debajo del punto de congelación, y el estrés por enfriamiento se convierte en estrés por congelación, entonces se activan otros mecanismos. Bajo estas condiciones, los antioxidantes de bajo peso molecular, especialmente el ácido ascórbico reducido, ha sido postulado como un componente importante en la defensa de las células vegetales (Radyuk y col., 2009). Diversos estudios comparativos utilizando genotipos tolerantes y sensibles han demostrado una mayor capacidad antioxidante en especies tolerantes al estrés por frío (Guo y col., 2006; Huang y Guo, 2005).

Estrés por contaminación con metales. Los crecientes niveles de metales en el medioambiente afectan drásticamente el crecimiento vegetal y el metabolismo, y en última instancia, lleva a pérdidas severas en la producción vegetal (Mishra y col., 2005). Una de las consecuencias de la presencia de metales tóxicos dentro de los tejidos vegetales es la formación de ROS, la cual puede ser iniciada directa o indirectamente por metales, y consecuentemente, llevar a daño oxidativo de diferentes constituyentes celulares (Keunen y col., 2011; Maheshwari y Dubey, 2009; Muradoglu y col., 2015; Sharma y Dubey, 2007). Bajo condiciones de estrés por metales, disminuye la fotosíntesis debido al daño que se le produce al metabolismo fotosintético, incluyendo la cadena transportadora de electrones fotosintéticos (Vinit-Dunand y col., 2002). Los metales que poseen actividad redox tales como hierro, cobre y cromo, sufren ciclos redox productores de ROS, mientras que los metales que carecen de esta propiedad como plomo, cadmio, mercurio y otros, envenenan los principales antioxidantes celulares, particularmente aquellos que contienen grupos tioles. Si la producción de ROS inducida por metales no es contrarrestada adecuadamente por antioxidantes celulares, entonces ocurre el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Giannakoula y col., 2010; Sandalio y col., 2009; Sharma y Dietz, 2009). Si bien existen numerosos reportes de actividad antioxidante

(GPX, SOD, APX, MDHAR, DHAR, y GR) incrementada en plantas sometidas a estrés por metales (Cakmak y Horst, 1991; Meriga y col., 2004; Shah y col., 2001), estos mismos resultados sugieren que la actividad antioxidante no es suficiente para conferir tolerancia al estrés por acumulación por metales.

Estrés biótico. Una de las primeras respuestas celulares que ocurren luego de un reconocimiento de patógeno exitoso es un estallido oxidativo. El reconocimiento de una variedad de patógenos lleva a la generación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Fones y col., 2013; Orozco-Cárdenas y col., 2001a; Vellosillo y col., 2010). Estas ROS pueden provenir de distintos compartimentos subcelulares tales como mitocondrias (Colombatti y col., 2014) y cloroplastos, así como también de espacios extracelulares como el apoplasto. La cantidad de ROS producidas durante esta condición está íntimamente vinculada con la aparición de necrosis en los cultivares (Abdollahi y Ghahremani, 2010). La regulación diferencial de enzimas antioxidantes, en parte mediadas por SA, podría contribuir al incremento de ROS y activación de defensas luego de la infección (Klessig y col., 2000a). Al igual que las otras situaciones generadores de estrés mencionadas previamente, no sólo se han reportado actividades antioxidantes incrementadas luego de someter a plantas a estrés biótico, sino que también, se ha demostrado su importancia en aquellas variedades que presentan mayor tolerancia.

4.3. La Familia de proteínas OXR (Oxidation Resistance).

A partir de la utilización de esta cepa de *E. coli* mutante en las enzimas reparadoras del ADN (*fpg⁻mutY⁻lacZ⁻*), Volkert y colaboradores (2000) lograron identificar un gen de mamífero con capacidad de revertir el fenotipo mutante. Este nuevo gen con capacidad de revertir el daño oxidativo producido en la bacteria recibió el nombre de *Oxr1* (por Oxidation resistance 1) (Volkert y col., 2000). A partir de la búsqueda de homólogos en otros organismos, los autores concluyeron que no existían homólogos al gen *Oxr1* en procariontes (Volkert et al., 2000). A su vez, demostraron que el mayor porcentaje de

homología de secuencia con los posibles candidatos encontrados estaba en el dominio carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína, y que el único gen homólogo estudiado hasta ese momento era uno perteneciente a *Drosophila melanogaster* (Volkert y col., 2000). El gen *Oxr* de *D. melanogaster* había sido identificado previamente, durante el análisis y la identificación de líneas de moscas mutantes con problemas en el desarrollo (Stowers y col., 1999). Por estos motivos, se propuso que las proteínas codificadas por los genes *Oxr* podrían estar probablemente involucradas en diversos procesos celulares, además de su rol como proteínas protectoras/aliviadoras frente al estrés oxidativo a nivel celular. Además, se demostró que las levaduras mutantes en el gen *Oxr1* (Δ *scoxr1*) eran mucho más sensibles frente a situaciones generadoras de estrés oxidativo que las cepas de levadura salvaje (Volkert y col., 2000).

Posteriormente, estudios bioinformáticos direccionados al estudio de dominios en secuencias nucleotídicas previamente cargadas en bases de datos, agruparon 30 proteínas con dominios similares a aquel que se encontrara conservado en la fracción C-terminal de las proteínas OXR. Debido a que era frecuente encontrar a este nuevo dominio OXR asociado a los dominios TBC (Richardson y Zon, 1995; Zhang y col., 2005) y LysM (Bateman y Bycroft, 2000) en otras proteínas, se lo bautizó como dominio TLDC (*TBC*, *LysM* *Domain containing*) (Doerks y col., 2002).

4.4. Desarrollo, respuesta a hormonas y estrés: Diferentes funciones de una familia de genes relacionadas con las ROS.

4.4.1. Desarrollo.

El ajuste fino de los niveles de ROS en la célula asegura que existan niveles tolerables de estos metabolitos secundarios y de esta manera actúen como mensajeros que modulan diferentes respuestas celulares. En *Drosophila sp.* el desarrollo celular está dado por pulsos de concentración de la hormona esteroidea 20-hidroxiecdisona (Ou y King-Jones, 2013). Estos pulsos median distintos eventos específicos de desarrollo, como por ejemplo, el cambio de larvas a la metamorfosis adulta (Buszczak y Segreaves, 1998). En

este estadio de metamorfosis diferentes tejidos responden de manera diferente a la señal hormonal (Schweddes y Carney, 2012). En dípteros, la expresión de genes inducidos por la hormona ecdisona se puede observar como regiones de descondensación cromosomal o *puffs* (Stowers y col., 1999). Así, la ecdisona, a través de receptores, activa los genes de formación temprana de *puffs* y reprimen la mayoría de los genes de formación tardía. Muchos de los genes de formación temprana son factores de transcripción que activan la expresión de genes de *puffs* tardíos e inhiben la transcripción de genes de *puffs* tempranos (Stowers y col., 1999). En el año 1999, Stowers y colaboradores publicaron un trabajo en el cual detectaron siete isoformas de un gen que denominaron *L82* (por *late gen at 82*) dado que podía prevenir la formación de un *puff* específico denominado 82F. Los tamaños de las siete isoformas varían desde 197 hasta 1270 aminoácidos y fueron nombradas desde L82A hasta L82F. Las isoformas tenían en común los últimos 192 aminoácidos del dominio C-terminal, correspondientes a lo que luego se conoció como dominio TLDC (Figura 4-6).

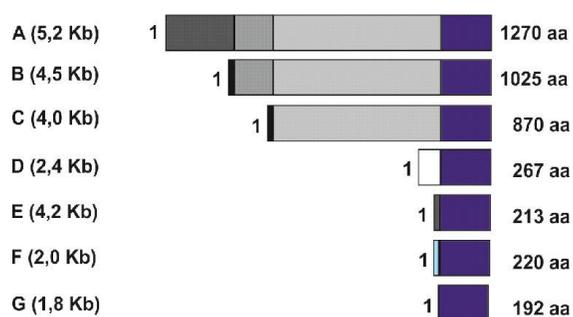


Figura 4-6 | Isoformas del *puff* 82F detectadas en *D. melanogaster*. Mientras que la porción N-terminal difiere en todas las isoformas, el dominio C-terminal se mantiene igual en todos los transcritos. aa: aminoácidos; 1: refiere al primer aminoácido de la proteína; rectángulos de colores: Azul, dominio TLDC; en tonos de grises se muestran regiones similares entre las isoformas de la proteína L82. Blanco y Celeste, regiones que no se repiten en otra isoforma. *Esta figura fue modificada de Stowers y colaboradores (1999).*

Los autores demostraron que cada isoforma cumplía un rol particular en distintos procesos celulares y todas las mutantes viables mostraron retrasos en el desarrollo (Stowers y col., 1999).

De acuerdo con lo observado en *Drosophila sp.*, se detectó la inducción del gen *RnC7* con dominio TLDC durante el proceso de adhesión celular en ratas (*Rattus norvegicus*) (Fischer y col., 2001). La secuenciación del gen *RnC7* permitió la posterior detección de tres de sus cuatro isoformas, así como también la búsqueda de homólogos en otros organismos. Los genes de la familia *L82* de *Drosophila* (*DmL82*) presentaron una identidad de secuencia elevada y un comportamiento similar (Figura 4-7). Esto es, tanto los genes *DmL82* como los genes *RnC7* se expresan en niveles elevados y en distintos tejidos inmaduros durante el desarrollo, mientras que la expresión se pierde a medida que se llega a la adultez. A su vez, la rata adulta muestra sus mayores niveles de expresión de *RnC7* en cerebro y testículos (Fischer y col., 2001).

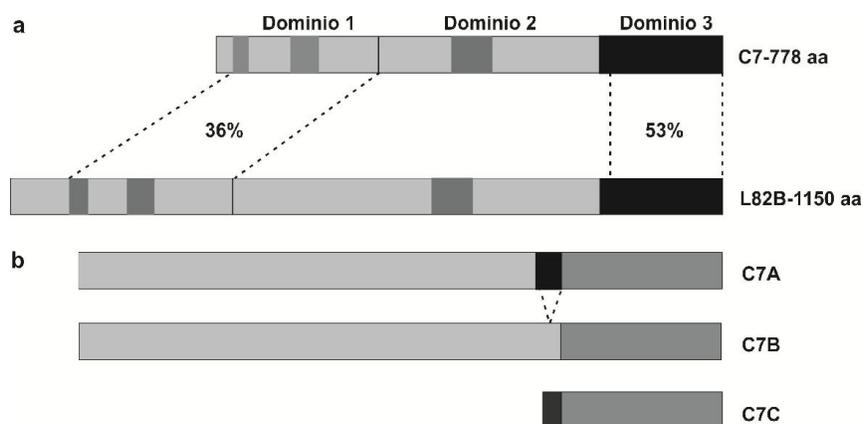


Figura 4-7 | Comparación entre genes *Oxr* de rata y de *Drosophila sp.* **a-** Similitud estructural y presencia de dominios proteicos comunes entre las diferentes porciones de las proteínas C7 de rata y L82B de *Drosophila*. Negro, dominio 3. Gris claro, dominio 1 y dominio 2. Las áreas grises oscuras en el dominio 1 y en el dominio 2 indican subdominios de alta conservación. Los porcentajes indican la identidad de secuencias entre el dominio 3 y 1 de las proteínas C7 de rata y L82B de *Drosophila*. **b-** Esquema de las diferentes isoformas obtenidas mediante *splicing* alternativo del gen *RnC7*. Gris claro, regiones conservadas entre las isoformas; gris oscuro, región presente únicamente en C7C; negro región presente únicamente en C7A. *Esta figura fue modificada de Fisher y colaboradores (2001).*

La expresión de *RnC7* se detectó principalmente en nucléolo, y un poco en citoplasma (Fischer y col., 2001). Una de las funciones principales del nucléolo es el procesamiento del ARN primario. Además, las proteínas secuestradoras del nucléolo desarrollan actividades en los puntos de control del ciclo celular (Fischer y col., 2001). Esto

último coincide con la función mediante la que se detectó originalmente el transcripto, aquellas relacionadas con la diferenciación y proliferación celular (Fischer y col., 2001).

4.4.1.1. Desarrollo neuronal.

La evidencia de participación de los genes *OXR* en el desarrollo del sistema nervioso, fundamentada principalmente por los elevados niveles de expresión en tejido cerebral, llevó al estudio de estas proteínas con dominio TLDc. Debido a su alta actividad metabólica, combinado con una concentración relativamente baja de antioxidantes, el cerebro parecería más vulnerable a las ROS que otros órganos. De hecho, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial están asociadas en la mayoría de los desórdenes neurodegenerativos, incluyendo esclerosis lateral amiotrópica (ALS), enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Oliver y col., 2011).

La aparición de tumores sólidos en la infancia temprana, puntualmente aquellos neuroblastomas que provienen de las crestas neuronales provenientes de la línea simpatoadrenal presentan diferentes pronósticos en función del desarrollo neuronal del paciente (Arai y col., 2008). Uno de los marcadores moleculares detectados en los neuroblastomas con buen pronóstico es la proteína NBLA10993, la cual es codificada por una variante de *splicing* del transcripto para el gen *hsERAP140/hsNCOA7* presente en mamíferos (*NUCLEAR RECEPTOR COACTIVATOR 7*) (Arai y col., 2008).

Otro de los genes ortólogos en humanos, que contiene el dominio TLDc, se conoce como *TBC1D24*. Este gen también posee un dominio TBC en su porción N-terminal (Falace y col., 2010). Mediante el estudio de una población que padecía epilepsia mioclónica infantil familiar, se encontró que la mutación en dos residuos, una en el dominio TBC y otra en el dominio TLDc (Figura 4-8), generaba este complejo desorden neuronal (Falace y col., 2010).

Falace y colaboradores (2010) demostraron la interacción de hTBC1D24 con la proteína ARF-6 (small GTPase *ADP ribosylation factor 6*). ARF-6 está involucrada en la

regulación del tráfico de membrana entre la membrana plasmática y el compartimento endocítico a través de la activación de una fosfolipasa D y una fosfatidil-inositol-4-fosfato 5-quinasa. En este trabajo se informó por primera vez, que la mutación A509V (cambio de valina por alanina en el residuo 509 de la proteína TBC1D24) dentro del dominio TLDC interfería con las funciones de TBC1D24 mediadas por ARF-6. Así, una alteración en la secuencia proteica dentro del dominio TLDC demostró alterar severamente el tamaño de las neuronas así como también su cantidad de intersecciones y la longitud de sus neuritas (Falace y col., 2010).

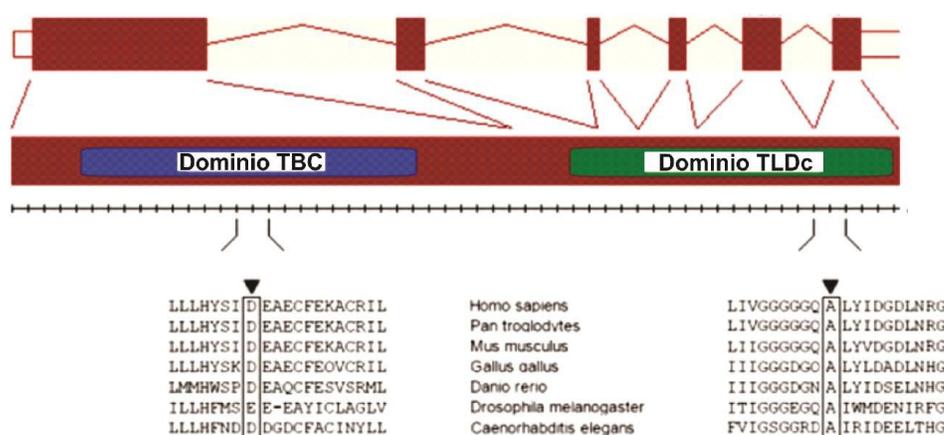


Figura 4-8 | Esquema de la estructura del gen *hstBC1D24* y localización de los dominios TBC y TLDC. Se muestran los dos dominios principales de la proteína *hstBC1D24* (dominio TBC en azul y dominio TLDC en verde) y las mutaciones que producen epilepsia mioclónica infantil. Los aminoácidos responsables de las mutaciones se encuentran enmarcados y señalados por una punta de flecha. El esquema del gen está en la parte superior, Rectángulos vacíos: 5'UTR, rectángulos rojos: exones, líneas finas: intrones. *Esta figura fue modificada de Falace y colaboradores (2010).*

El análisis de ratones modelos (*bel*) utilizados para el estudio de alteraciones humanas del movimiento y ataxia, develó que el gen *mmOXR1* es esencial para el desarrollo del sistema nervioso central en la etapa postnatal (Oliver y col., 2011). Los ratones *bel* tienen una deleción cromosomal que afecta el gen *OXR1* y su fenotipo de alteración neuronal puede revertirse mediante la expresión del gen *OXR1*. La proteína *OXR1* demostró controlar la susceptibilidad de células de la granulosa hacia el estrés oxidativo, y los ratones *bel* demostraron tener más ADN oxidado en el núcleo de estas células. Esto llevó a justificar por qué los ratones *bel* contenían un mayor número de

células apoptóticas en su cerebro (Olivet y col., 2011). Además, se encontró que tejido proveniente de médula espinal de pacientes con Alzheimer tenían inducidos altos niveles de proteína OXR1 en contraste a lo que ocurría con el tejido control (Oliver y col., 2011).

Más recientemente, Murray y colaboradores (2013) demostraron que en condiciones de retinopatía diabética se induce la expresión del micro ARN *miR-200b*. Utilizando células de Müller como modelo experimental (MIO-M1), encontraron que el blanco de este micro ARN es el transcripto del gen *OXR1*. Estos resultados son consistentes con lo hallado previamente por Oliver y colaboradores (2011). Así, una mayor cantidad de OXR1 disminuye significativamente el daño al ADN y esto hace que el número de células apoptóticas descienda. Como conclusión se postula que durante el desarrollo de la patología diabética, se induce un incremento de *miR-200b* y la subsecuente represión de OXR1; proceso que contribuye al daño retinal y finalmente a la retinopatía diabética (Murray y col., 2013).

4.4.2. Respuesta a hormonas.

Estudiando la estructura exón-intrón de los dos genes con dominio TLDc de humanos *HsOXR1* y *HsNCOA7*, parece razonable concluir que estos genes tienen un origen evolutivo común (Torres y col., 2006). Contrariamente a lo que ocurre con *HsOXR1*, cuya localización es mitocondrial, *HsNCOA7* parecería tener una doble localización, nuclear y citoplasmática en situaciones normales de crecimiento. Luego del estímulo hormonal de células MCF-7 con β -estradiol se observó acumulación de *HsNCOA7* en el núcleo de estas células. Esta diferencia sustancial sugería la posibilidad de que cada gen se haya especializado frente a estímulos diferentes (Durand y col., 2007). Dicha hipótesis fue confirmada cuando se demostró que *HsNCOA7* no es inducido por peróxido, algo que sí ocurría con *HsOXR1* y con *ScOXR1*. De esta manera, se postula que el dominio TLDc se fusionó al dominio N-terminal de *HsNCOA7*, evento que le confirió la especificidad de respuesta pero sin alterar la función de la proteína. Dicha especificidad se encuentra en el exón 8 de *HsNCOA7*, donde se encuentra codificado el sitio de unión al receptor de

estrógeno (Durand y col., 2007). Si bien *HsNCOA1* presenta una fuerte inducción luego del tratamiento con estrógenos, el mensajero de este gen también se ha detectado en grandes cantidades en el cerebro (Durand y col., 2007).

En ratón (*Mus musculus*), se demostró que el gen *NCOA7* presenta una variante de *splicing*, denominada *NCOA7B* que se induce fuertemente mediante un pico en la concentración hormonal. Fue justamente durante un análisis de transcritos inducidos por estrógenos que se detectó esta nueva variante. La proteína mmNcoa7B carece del sitio de unión al receptor de estrógeno, en cambio, posee un dominio N-terminal único, que posiblemente le confiera su alta especificidad de respuesta (Figura 4-9; Shkolnik y col., 2008).

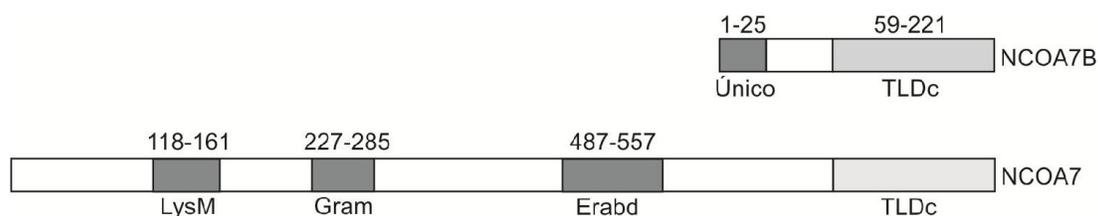


Figura 4-9 | Representación de las estructuras proteicas codificadas por los genes *NCOA7* y *NCOA7B* con sus dominios. Rectángulos blancos: región proteica no asociada a un dominio, rectángulos grises claros, TLDc; rectángulos grises oscuros, dominio único de NCOA7B y dominios LysM, Gram y Erab en NCOA7. *Esta figura fue modificada de Shkolnik y colaboradores (2008).*

Luego de estudiar distintos tejidos de ratón se concluyó que, a diferencia de *mmNCOA7*, el mensajero de la variante de *splicing* más corta es prácticamente indetectable en cerebro, ojos, hígado y testículos. Sin embargo, 5 horas después de un estímulo por gonadotropina coriónica humana, los niveles del mensajero de *mmNCOA7B* se incrementan en gran medida en ovarios (preovulatorios) así como también en útero (Torres y col., 2006).

4.4.3. Estrés.

4.4.3.1. Estrés oxidativo.

Como se mencionó antes, la función de las proteínas OXR durante una situación de estrés oxidativo se detectó utilizando bacterias deficientes en los mecanismos de detoxificación y reparación del ADN mediados por ROS (Volkert y col., 2000). Así fue como se identificó el gen *HsOXR1* (Volkert y col., 2000). Entre los homólogos, se observaron proteínas con una identidad de secuencia similar en *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *pombe* (CeOXR1, ScOXR1 y SpOXR1 respectivamente). De manera similar a lo observado previamente en *Drosophila*, la mayor identidad de secuencia se encontraba en la porción C-terminal, identificada como dominio proteico TLDc (Doerks y col., 2002; Stowers y col., 1999; Volkert y col., 2000).

Los genes *HsOXR1* y *ScOXR1* difieren en su estructura en una presecuencia de localización mitocondrial, presente sólo en el gen ortólogo perteneciente a levaduras. Sin embargo, ambas proteínas mostraron tener localización mitocondrial (Elliot y Volkert, 2004). Además, mediante experimentos de complementación de levaduras mutantes, se demostró que la cepa $\Delta scOxr1$ era 10 veces más sensible al estrés oxidativo que las levaduras salvajes. Además, el fenotipo de sensibilidad era revertido cuando se complementaban las células con el gen *HsOXR1* dirigido a la mitocondria (Elliot y Volkert, 2004). Esto sugeriría que para que la proteína OXR1 lleve a cabo su función protectora en la vía de respuesta a estrés oxidativo, debía estar localizada en el compartimiento mitocondrial (Elliott y Volkert, 2004).

Además de determinar la localización mitocondrial de las proteínas ScOXR1 y HsOXR1 en células HeLa, Hep2 y en células COS de mono, Elliot y Volkert (2004) estudiaron las variaciones transcripcionales y traduccionales de estos genes bajo estrés oxidativo y estrés por calor. Tanto en levaduras como en células HeLa, se observó una inducción a nivel transcripcional que se correlacionaba con una mayor cantidad de proteínas en los respectivos compartimientos mitocondriales (Elliott y Volkert, 2004).

Por otro lado, Elliot y Volkert (2004) también estudiaron la expresión de las diferentes variantes de *splicing* del mensajero *HsOXR1* en distintos tejidos. En todos los tejidos estudiados encontraron la expresión de dos isoformas, una de 2,9 y otra de 4,9 kb excepto en tejido cerebral el cual expresa una versión de 5,1 kb excepcional, y la otra isoforma de 2,9 kb. Si bien en todos los tejidos estudiados se detectaron ambos transcritos del gen *HsOXR1*, los niveles de expresión diferían de tejido en tejido, siendo la isoforma más pequeña la que presentaba mayor variabilidad. Además, aquellos tejidos con mayor actividad metabólica aeróbica como el corazón, músculo esquelético y el cerebro, poseían niveles más altos de ARN mensajero de *HsOXR1*. Esta información llevó a la conclusión de que las proteínas OXR de mamíferos y de levaduras debían estar cumpliendo alguna función en alguna vía novedosa, no reportada hasta el momento, que; al menos en humanos no era específica de tejido (Elliott y Volkert, 2004).

4.4.3.1.1. TLDc, un dominio proteico que confiere protección frente al estrés oxidativo.

Mediante la utilización del sistema de expresión heterólogo en células de *E. coli* y el ensayo de papilación se concluyó que en el exón 8 de la secuencia del gen *HsOXR1* radicaba la capacidad de tolerancia al estrés oxidativo (Volkert y col., 2000). Dentro de este exón, se predice un estructura *in silico* del tipo hélice-loop-hélice, que parecería concentrar gran parte de la actividad de protección frente a estrés oxidativo (Murphy y Volkert, 2012). Como conclusión final, Murphy y Volkert plantearon un modelo que consiste de dos funciones separadas involucradas en la resistencia oxidativa, donde existe un dominio C-terminal que tiene un rol regulatorio en la inducción de funciones de resistencia oxidativa frente al daño oxidativo, y una región interna de la proteína, codificada por el exón 8, que posee una función antimutagénica, reparadora del daño sufrido por el ADN debido a la generación de ROS (Murphy y Volkert, 2012).

4.4.3.2. Estrés Biótico.

Los niveles de ROS son críticos para orquestar y coordinar la respuesta inmune en plantas, animales e insectos (Torres, 2010; Yang y col., 2013). Por ejemplo, el estudio de mosquitos tolerantes a ciertas infecciones demostró que estos insectos producen elevados niveles de ROS, y de esta manera potencian la encapsulación de sus patógenos (Kumar y col., 2003). Esta encapsulación no sólo impide la diseminación del patógeno, sino que también agrega una especie de “cartel señalador” para que las células del sistema inmune eliminen rápidamente al supuesto intruso (Kumat y col., 2003). A continuación se detalla la relación demostrada entre las proteínas con dominio TLDc, y el sistema inmune de insectos.

4.4.3.2.1. TLDc y estrés biótico en insectos.

El mosquito es vector de múltiples enfermedades. En nuestro país la enfermedad del Dengue es transmitida por el agente portador *Aedes aegypti*; mientras que los mosquitos anofelinos, vectores de la Malaria, transmiten dicha enfermedad a más de 300 millones de personas por año (Estallo y col., 2013). Gran parte de lo que conocemos hoy en día sobre el sistema inmune de mosquitos, está basado en análisis que fueron realizados sobre otro insecto perteneciente a la familia de los dípteros, la mosca de la fruta *D. melanogaster*. La similitud entre *D. melanogaster* y *Anopheles gambiae* ha permitido el análisis directo de genes que previamente demostraron participar en el sistema inmune de *Drosophila sp.* en el mosquito *A. gambiae* (Brandt y col., 2008).

La infección de distintas líneas de moscas con mutaciones puntuales en diferentes genes y la posterior recuperación de microorganismos infecciosos permitió la detección de mutantes sensibles a los patógenos utilizados. Una de las mutantes sensibles resultó tener niveles alterados del transcrito del gen *DmL82F* (Brandt y col., 2008). Como se mencionó anteriormente *DmL82F* es homólogo a *ScOXR1*. Estos resultados se validaron posteriormente en una población de *Anopheles* alimentados con animales infectados con *Plasmodium berghei*. Estas pruebas demostraron que mosquitos del tipo *A. gambiae*

mutantes, con niveles de transcripto del gen *DmL82F* menores al 15% respecto de la población salvaje, eran tolerantes a infecciones provenientes de *P. berghei* (Brandt y col., 2008). Posteriormente, se observó mayor supervivencia del parásito *P. berghei* en mosquitos de *A. gambiae* con niveles disminuidos del transcripto de *DmL82F* (Jaramillo-Gutierrez y col., 2010). En el mismo trabajo, los autores proponen que la expresión de *DmL82F* es inducida a través de la vía mediada por quinasas Jun-N (JNK) y su inducción deriva en el aumento de la expresión de las enzimas del sistema de detoxificación CAT y GPX (Jaramillo-Gutierrez y col., 2010) (Figura 4-10). Dentro de esta cascada de señalización, se ha demostrado que las JNK y el factor nuclear NF- κ B son activados por H₂O₂ en presencia de estrés oxidativo (Zhou y col., 2001).

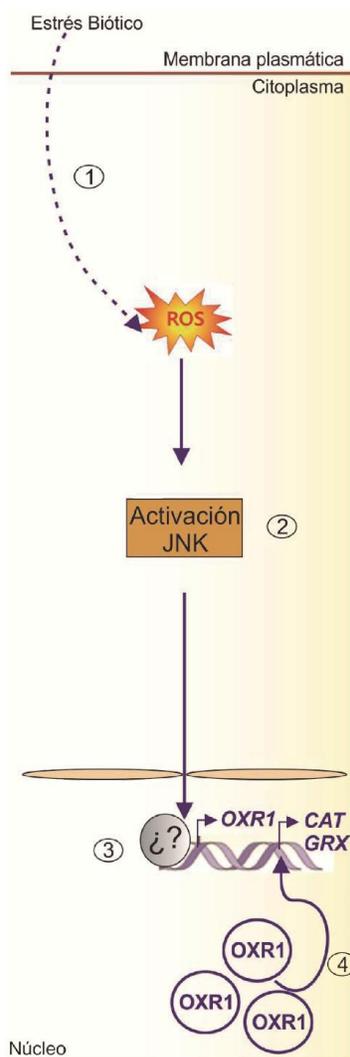


Figura 4-10 | Papel de OXR1 en *A. gambiae*. (1) La infección por parásitos en *A. gambiae* deriva en el incremento de ROS. (2) En particular, el H₂O₂ podría activar la cascada de señales mediada por JNK. (3) JNK activa la transcripción de *OXR1*. (4) El incremento de *OXR1* deriva en el aumento de la expresión de CAT y GRX.

Posteriormente, utilizando *Vibrio cholerae* como patógeno modelo de *Drosophila*, se llevaron a cabo diferentes estudios que permitieron dilucidar parcialmente los mecanismos que involucran al dominio TLDC de la mosca de la fruta con el sistema inmune. En un estudio de genética directa se aislaron mutantes que demostraron ser mejor hospedero para *V. cholerae*, denotando una vía IMD (*immune deficiency*) alterada. Estas mutantes resultaron tener interrumpido el locus *I(3)82Fd^{EY04695}*, que los autores rebautizaron como *mustard (MTD)*. De esta manera, el gen *DmL82F* pasó a llamarse *Mustard* (Wang y col., 2012b). Las moscas mutantes *mtd^{EY04695}* tienen una susceptibilidad a la infección por *V. cholerae* comparable la observada en las moscas control. Sin embargo, son menos susceptibles a la infección en dosis letales. Las moscas mutantes en *Mustard* se conocen como tolerantes a la infección (Wang y col., 2012b).

4.5. ¿POR QUÉ ESTUDIAR PROTEÍNAS CON DOMINIO TLDC EN PLANTAS?

Las proteínas OXR parecen cumplir un rol fundamental asociado a su dominio TLDC. En el transcurso de la evolución fueron adquiriendo dominios que les permitieron la especialización así como también nuevas funciones, sin perder aquella esencial confinada al dominio TLDC. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que en organismos superiores como en *Drosophila* o mamíferos, este gen se expresa hasta en 20 variantes distintas, muchas de ellas con funciones puntuales y distintivas. Además, es posible que las diferentes isoformas se localicen en diferentes compartimentos subcelulares y lleven a cabo distintas funciones.

A la fecha no existen reportes de los homólogos de proteínas con dominio TLDC en plantas. El desconocimiento de la posible relación entre las proteínas con dominio TLDC y el metabolismo de las ROS, y una posible localización mitocondrial en plantas, potenciaron nuestro interés en el tema. Así, nos embarcamos en el estudio de la familia de proteínas OXR en *Arabidopsis*, su posible rol en el desarrollo y en la defensa frente al estrés oxidativo en plantas.

5. OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Las plantas están sometidas a cambios constantes en el ambiente que las rodea. A menudo, las condiciones de crecimiento en las que deben desarrollarse constituyen verdaderas situaciones de estrés que provocan alteraciones severas y cambios en la homeostasis celular llegando incluso hasta la muerte. Las mitocondrias no sólo constituyen una fuente para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), sino que además son el principal sitio de producción de daño oxidativo en condiciones de estrés biótico y abiótico; perturbando de esta manera el aporte de energía celular global. Por esto, una de las primeras líneas de defensa y/o de prevención del daño celular estaría constituida por una serie de proteínas de localización mitocondrial. Un aumento en los mecanismos de defensa mitocondriales al estrés oxidativo producirá plantas mejor adaptadas para sobrellevar condiciones ambientales adversas.

El objetivo general de este trabajo de tesis es identificar y estudiar proteínas mitocondriales relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes situaciones generadoras de estrés oxidativo, y proteínas con funciones protectoras o reparadoras del daño sufrido por el ADN celular durante estos procesos. Se analizarán sus modos de acción a nivel molecular y se estudiarán las posibles funciones de las mismas en *Arabidopsis thaliana*. En un futuro, esta información podría trasladarse a plantas de valor comercial, permitiendo mejorar la capacidad de crecimiento y supervivencia de las mismas frente a situaciones de estrés.

5.2. Objetivos específicos.

5.2.1. Obtener plantas de *Arabidopsis thaliana* con diferentes niveles de expresión de las proteínas AtOXR2 y AtOXR4.

5.2.2. Analizar a nivel molecular el comportamiento de las distintas transformantes frente a condiciones de crecimiento generadoras de estrés biótico y abiótico.

5.2.3. Estudiar los patrones de expresión de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* en *Arabidopsis* y los factores que regulan los mismos, en condiciones normales de crecimiento y frente a distintas situaciones de estrés.

5.2.4. Analizar la localización celular de estas proteínas mediante la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con construcciones que tengan fusiones de las mismas a la proteína reportera RFP (*Red Fluorescent Protein*).

5.2.5. Analizar plantas de *Arabidopsis thaliana* con inserciones de T-DNA en los genes de interés.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Materiales.

6.1.1. Material vegetal.

En este trabajo de tesis se empleó la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) como organismo de estudio. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyhn. ecotipo Columbia (Col-0) se obtuvieron de Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyhn. Ecotipo Landsberg erecta (Ler), las semillas de plantas mutantes con inserciones de T-DNA de líneas FLAGdb/FST y Jhon Innes Center(JIC)-active (Alonso y col., 2003; Robinson y col., 2009; Samson y col., 2002; Tissier y col., 1999) fueron obtenidas del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Ohio State University).

La presencia de la inserción de T-DNA en las plantas mutantes en los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* fue confirmada mediante PCR empleando un oligonucleótidos específico para el gen mutado y el oligonucleótido específico para el T-DNA (Tabla 1, Anexo I). Las plantas mutantes en *AtOXR2* corresponde a la colección FLAGdb/FST mientras que las mutantes en *AtOXR4* corresponden a la colección de mutantes JIC. Estas mutantes fueron generadas usando Tn113 (Ds línea de partida) X Tn25(Ac línea con transposon activado).

6.1.2. Cepas utilizadas.

Las construcciones utilizadas en esta tesis fueron replicadas utilizando la cepa de *Escherichia coli* DH5 α [supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1^r) thi-1 relA1)] (Hanahan, 1983).

Las transformaciones de *Arabidopsis* se realizaron empleando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404. Esta cepa presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg.L⁻¹) y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomicina (300 mg.L⁻¹)) en la cepa Ach5 (Ooms y col., 1982).

Los ensayos de capacidad antimutagénica se realizaron en la cepa de *E. coli* pMV4709 [*fpg⁻ mutY lacZ*], gentilmente cedida por el Doctor Michael Volkert de la universidad de Masachussets, y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (salvaje) y en la variante Y11096 (mutante en *OXR1*) obtenidas del *European Saccharomyces Cerevisiae Archive for functional Analysis* ([EUROSCARF](#)).

El patógeno elegido para los ensayos de estrés biótico fue *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. Se empleó la cepa Pst DC 3000. Esta cepa presenta resistencia cromosómica a rifampicina (50 mg.L⁻¹) y contiene el plásmido pVSP61 vacío, el cual le confiere resistencia a kanamicina (50 mg.L⁻¹). Se utilizó una variante avirulenta de esta cepa, la cual contiene el gen *avrRpm1* en el plásmido pVSP61 (ambas cepas, virulenta y avirulenta, fueron provista por la Dra. María Elena Álvarez, CIQUIBIC, Universidad Nacional de Córdoba).

6.1.3. Vectores utilizados.

pTrc99A. Este vector fue empleado como vector de expresión de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* en la cepa de *E. coli* pMV4709 para los ensayos de capacidad antimutagénica. Incluye además el gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación bacteriano derivado del pBR322 (RepW).

pMV611. Este plásmido se utilizó como vector de expresión en *S. cerevisiae* BY4742 y en la variante Y11096 para realizar los ensayos de complementación con las proteínas *AtOXR2* y *AtOXR4*. Este plásmido porta el gen *LEU* del pBRS315 y el promotor del GPD del p426-GPD. Este vector fue gentilmente cedido por el Doctor Michael Volkert de la universidad de Masachussets.

pENTR-3C. Este plásmido se utilizó como vector de entrada (Entry vector) para el sistema Gateway (Life Technologies). Este vector permite el clonado de la secuencia de ADN de interés entre los sitios denominados *attI* y su posterior recombinación entre los sitios *attR* del vector de destino (Destination Vector). El vector de entrada genera resistencia a cloranfenicol (50 µg.mL⁻¹) y kanamicina (100 µg.mL⁻¹) en bacterias. Las

secuencias de ADN de interés clonadas en este vector fueron amplificadas mediante PCR empleando oligonucleótidos específicos para el vector denominados AHL1 y AHL2 (Tabla 2, Anexo I). El producto de PCR obtenido fue utilizado para la reacción de recombinación.

pEarlygate100. Este plásmido se utilizó como vector de destino para el sistema Gateway. La característica principal de este vector es que permite la expresión del gen de interés en plantas bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Genera resistencia a estreptomycin (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) y espectinomycin (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) en bacterias y a herbicida BASTA (Bayer; glufosinato de amonio) en plantas.

pGWB554. Este plásmido se utilizó como vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente monomérica (mRFP) bajo el control del promotor 35SCaMV. En bacterias, genera resistencia a estreptomycin (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) y espectinomycin (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) mientras que en plantas genera resistencia a higromicina (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Nakagawa y col., 2007).

pGWB553. Este plásmido se utilizó como vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés como fusión a la secuencia codificante de la mRFP bajo el control de un promotor de un gen de interés. En bacterias, genera resistencia a estreptomycin (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) y espectinomycin (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) mientras que en plantas genera resistencia a higromicina (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Nakagawa y col., 2007).

pBI121. El plásmido pBI121 es un derivado del vector pBI101 que contiene un fragmento de 800 pb del promotor 35SCaMV frente al gen que codifica para la enzima β -glucuronidasa de *E. coli* (*GUS*) (Jefferson y col., 1987).

pBI101.3. Derivado del vector binario pBIN19, este vector contiene el gen *GUS* con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (nos) clonados tras una secuencia múltiple de clonado en la misma disposición que en el vector pUC119. Dentro de la región de movilización del ADN, necesaria para la transformación de plantas, se encuentra el gen

nptII que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Incluye además el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano RK2.

pGEX-4T3. Este plásmido permite expresar la secuencia codificante de la proteína de interés como fusión a la proteína GST (GE Healthcare).

6.1.4. Secuencias utilizadas.

Todas las secuencias nucleotídicas utilizadas para el diseño de oligonucleótidos en este trabajo se obtuvieron de la base de datos proporcionada por el TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). Los estudios de búsqueda de secuencias se realizaron utilizando el programa BLAST (blastn o blastp, Altschul y col., 1990) mientras que para los alineamientos múltiples se empleó el programa ClustalO 1.0.2 (Sievers y col., 2011; www.ebi.ac.uk/Tools/mhsa/clustalo/) (Thompson y col., 1994). El diseño de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR se realizó con el programa Primer BLAST (Ye y col., 2012).

6.2. Métodos.

6.2.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Las reacciones de amplificación para obtener fragmentos de ADN para su posterior clonado se realizaron en un volumen final de 50 μ L. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PxE 0,2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) utilizando los programas apropiados para cada caso y en donde la temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$]. En cada reacción se empleó solución amortiguadora, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos específicos (500 ng) y 1,5 U de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen). Finalmente, se adicionó el ADN molde y se procedió a la reacción de amplificación.

Las reacciones de amplificación en las que se utilizó como molde ADN procedente de colonias de bacterias tomadas directamente desde la placa de Petri se realizaron en un volumen final de 15 μ L, conservando las proporciones de todos los reactivos.

Los productos de amplificación se separaron y visualizaron en geles de agarosa (ver el siguiente inciso).

6.2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Los productos de PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (Sambrook, 1989). Brevemente, se preparó agarosa en buffer TAE 1x (ver Anexo II) en la concentración correspondiente al tamaño del ADN que debía separarse. Los productos de amplificación se diluyeron en buffer de siembra de ADN conteniendo el agente intercalante Syber Green (ver Anexo II). Se sembraron en la matriz de agarosa y se corrieron a 80 V durante 20 minutos. Como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN se empleó ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Finalizada la corrida electroforética, se procedió a la visualización del ADN mediante exposición a luz UV.

6.2.3. Purificación de fragmentos de ADN, digestión con endonucleasas de restricción y ligación de moléculas de ADN.

Los fragmentos de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa, empleándose el reactivo comercial GFXTM PCR DNA y Gel Purification (AXYGEN, USA). Luego de la purificación se procedió a la digestión con enzimas de restricción en las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas entre 1 y 3 U de enzima por cada μ g de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 30 μ L, dependiendo de la concentración de ADN. Finalizado el tiempo de corte se purificaron los productos como se describió anteriormente y se procedió a la ligación de los mismos. La ligación de fragmentos de ADN se realizó empleando 1 U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega) en un volumen final de

reacción de 10 μ L. En la mezcla de reacción se incorporaron la solución amortiguadora y los fragmentos a ligar en las proporciones sugeridas por el fabricante.

6.2.4. Transformación de bacterias de *E. coli* con ADN plasmídico.

Se prepararon células de *E. coli* competentes para transformación por electroporación se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Luego del pulso eléctrico, las células se recuperaron en 1 mL de medio LB (ver Anexo II) y se incubaron durante 1h a 37°C. Se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 μ L de medio LB y se sembró en placas de Petri con LB-agar (ver Anexo II) suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron toda la noche (o hasta la aparición de colonias) a 37°C. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR en colonia como se describió en el inciso 1.2.1. Cuando la PCR fue positiva (presencia de un amplicón del tamaño adecuado) se procedió al repique de la colonia correspondiente para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico.

6.2.5. Transformación de bacterias de *A. tumefaciens* con ADN plasmídico.

Se prepararon células competentes de *A. tumefaciens* siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación para *E. coli*, modificando la solución amortiguadora en la que se conservan las bacterias (Glicerol 10% en solución amortiguadora Hepes). Luego de la electroporación las bacterias se recuperaron en 1 mL de LB (ver Anexo II) y se incubaron durante 2 horas a 28°C. Se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 μ L y se sembró en placas de Petri con LB-agar (ver Anexo II) suplementado con estreptomina (300 μ g.mL⁻¹), rifampicina (50 μ g.mL⁻¹) y el antibiótico correspondiente al plásmido con el que se procedió a la transformación.

6.2.6. Mini-preparación de ADN plasmídico.

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *E. coli* transformadas se realizaron empleando el kit comercial Mini-preps DNA Purification (AXYGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2.7. Clonados.

Durante el desarrollo experimental de este trabajo de Tesis se realizaron diferentes clonados con el objetivo de obtener construcciones que permiten expresar AtOXR2 y AtOXR4 en bacterias y levaduras para ensayos de capacidad anti-mutagénica y de complementación

Luego se obtuvieron construcciones que permiten expresar el gen *GUS* bajo el control del promotor de *AtOXR2* y de *AtOXR4* y construcciones para sobreexpresar AtOXR2 (At2g05590) y AtOXR4 (At4g39870) en plantas salvajes (WT). Además, se obtuvieron construcciones que permitieron sobreexpresar AtOXR1 (At1g32520), AtOXR2, AtOXR4 y AtOXR5 (At5g39590) como proteínas de fusión a la proteína fluorescente roja monomérica (mRFP) bajo el control del promotor *35SCaMV*.

A continuación se detallan cada uno de estos clonados:

Construcción AtOXR2/pTrc99A. Esta construcción permite expresar AtOXR2 en un sistema bacteriano. Para el clonado de AtOXR2 se utilizó ADNc (ADN copia) como molde en una reacción de PCR empleando los oligonucleótidos OXR2-Nco-F y GateOXR2STOP-3 Sal-R (Tabla 2, Anexo I). El fragmento obtenido (908 pb) fue clonado entre los sitios NcoI y SalIII del vector pTrc99A. El clon obtenido se empleó para la transformación de la cepa de *E. coli* pMV4708.

Construcción AtOXR4/pTrc99A. Esta construcción permite expresar AtOXR2 en un sistema bacteriano. Para el clonado de AtOXR4 se utilizó ADNc como molde en una reacción de PCR empleando los oligonucleótidos OX4-Nco-F y GateOX2STOP-3 Sal-R (Tabla 2, Anexo I). El fragmento obtenido (1195 pb) fue clonado entre los sitios NcoI y SalIII del

vector pTc99A. El clon obtenido se empleó para la transformación de la cepa de *E. coli* pMV4708.

Construcción MnSODAtOXR2/pMV611. Esta construcción permite expresar AtOXR2 en levaduras. Para el clonado de AtOXR2 se utilizó ADNc como molde en una reacción de PCR empleando los oligonucleótidos OX2Y5-BgIII-F y GateOX2STOP-3 Sal-R (Tabla 2, Anexo I). El oligonucleótido *forward* introduce el MTS (de sus siglas en inglés *Mitochondrial Terminal Sequence*) de la enzima mitocondrial MnSOD. El fragmento obtenido (908 pb) fue clonado entre los sitios *BgIII* y *SalIII* del vector pMVG11. El clon obtenido se empleó para la transformación de las cepas BY4742 y Y11096.

Construcción MnSODAtOXR4/pMV611. Esta construcción permite expresar AtOXR4 en levaduras. Para el clonado de AtOXR4 se utilizó ADNc como molde en una reacción de PCR empleando los oligonucleótidos OX4Y5-BgIII-F y GateOX4STOP-3 Sal-R (Tabla 2, Anexo I). El oligonucleótido *forward* introduce el MTS (de sus siglas en inglés *Mitochondrial Terminal Sequence*) de la enzima mitocondrial MnSOD. El fragmento obtenido (1195 pb) fue clonado entre los sitios *BgIII* y *SalIII* del vector pMVG11. El clon obtenido se empleó para la transformación de las cepas BY4742 y Y11096.

Construcción pAtOXR2:GUS. Esta construcción permite la expresión de *GUS* bajo el control de la región promotora de *AtOXR2*. Para el clonado de la región promotora se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos *forwards* OXR2-Hind1200-F, OXR2-Hind940-F y el oligonucleótido OXR2-BamHI-R como reverso (Tabla 2, Anexo I). Esto permite el aislamiento de tres fragmentos de 1252 pb y 959 pb, respectivamente, corriente arriba del codón de inicio de la traducción (el oligonucleótido *reverse* es complementario a la región comprendida entre -25 y -4 del gen). Los fragmentos fueron clonados en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

Construcción pAtOXR4:GUS. Esta construcción permite la expresión de *GUS* bajo el control de la región promotora de *AtOXR4*. Para el clonado de la región promotora se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos OXR4-Hind-F y OXR4-Bgl-II-R (Tabla 2, Anexo I). Esto permite el aislamiento de un fragmento de 1638 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (el

oligonucleótido *reverse* es complementario a la región comprendida entre -23 y -5 del gen). Los fragmentos fueron clonados en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

Construcción 35S::AtOXR2. Esta construcción permite expresar el gen *AtOXR2* bajo el control del promotor *35SCaMV*. Para obtener esta construcción se procedió a la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* como se describe en el inciso 6.2.11. Usando este ADN como molde se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 908 pb usando oligonucleótidos específicos que incorporan los sitios de restricción *BglII/SalI* (GateOXR2-5 *BglII*-F y GateOX2-3STOP *Sal*-R; Tabla 2, Anexo I). El oligonucleótido GateOX2-3STOP *Sal*-R incluye un codón de finalización de la traducción. Una vez purificado y digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pENTR-3C. Este clon se utilizó como molde para una PCR utilizando oligonucleótidos específicos del vector (AHL1 y AHL2; Tabla 2, Anexo I) que permiten amplificar el inserto de interés adicionando los sitios de recombinación del sistema Gateway. El producto de esta PCR fue purificado y se recombinó empleando 1 U de la enzima Gateway LR Clonase (Invitrogen), solución amortiguadora provista por el fabricante, buffer TE 1x pH 8 (ver Anexo II), 50 ng del vector de destino y 100 ng del producto de amplificación en un volumen final de 10 μ L. La reacción se incubó a 25°C durante 2 horas, se diluyó 50 veces y se transformaron células DH5 α como se describió en el inciso 1.2.6. Como vector de destino para esta construcción se utilizó el vector pEarlygate-100 (Earley y col., 2006). Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis* como se describe en el inciso 6.2.9.

Construcción 35S::AtOXR4. Esta construcción permite expresar el gen *AtOXR2* bajo el control del promotor *35SCaMV*. Para obtener esta construcción se procedió a la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* como se describe en el inciso 6.2.11. Usando este ADN como molde se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 1195 pb usando oligonucleótidos específicos que incorporan los sitios de restricción *XhoI/SalI* (GateOX4-5 *XhoI*-F y GateOX4-3STOP *Sal*-R; Tabla 2, Anexo I). El oligonucleótido GateOX4-3STOP *Sal*-R incluye un codón de finalización de la traducción. Una vez purificado y

digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pENTR-3C. Este clon se utilizó como molde para una PCR utilizando oligonucleótidos específicos (AHL1 y AHL2; Tabla 2, Anexo I) del vector que permiten amplificar el inserto de interés adicionando los sitios de recombinación del sistema Gateway. El producto de esta PCR fue purificado y se recombinó empleando 1 U de la enzima Gateway LR Clonase (Invitrogen), solución amortiguadora provista por el fabricante, buffer TE 1x pH 8 (ver Anexo II), 50 ng del vector de destino y 100 ng del producto de amplificación en un volumen final de 10 μ L. La reacción se incubó a 25°C durante 2 horas, se diluyó 50 veces y se transformaron células DH5 α como se describió en el inciso 1.2.6. Como vector de destino para esta construcción se utilizó el vector pEarlygate-100 (Early y col., 2006). Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de Arabidopsis como se describe en el inciso 6.2.9.

Construcción 35S::AtOXR2-RFP. Esta construcción permite expresar el gen *AtOXR2* bajo el control del promotor *35SCaMV* y como fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP en plantas. Para obtener esta construcción se procedió a la extracción de ADN genómico de Arabidopsis como se describe en el inciso 6.2.11. Usando este ADN como molde se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 908 pb con oligonucleótidos específicos que incorporan los sitios de restricción *BglII/SalI* (GateOX2-5 BglII-F y GateOX2-3 Sal-R; Tabla 2, Anexo I). Una vez purificado y digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pENTR-3C. Este clon se utilizó como molde para una PCR utilizando oligonucleótidos específicos (AHL1 y AHL2; Tabla 2, Anexo I) del vector que permiten amplificar el inserto de interés adicionando los sitios de recombinación del sistema Gateway. El producto de esta PCR fue purificado y se recombinó según las condiciones descritas en el inciso anterior. Como vector de destino para esta construcción se utilizó el vector pGWB554 (Nakagawa y col., 2007). Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de Arabidopsis como se describe en el inciso 6.2.9.

Construcción 35S::AtOXR4-RFP. Esta construcción permite expresar el gen *AtOXR4* bajo el control del promotor *35SCaMV* y como fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP en plantas. Para obtener esta construcción se procedió a la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* como se describe en el inciso 6.2.11. Usando este ADN como molde se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 1195 pb con oligonucleótidos específicos que incorporan los sitios de restricción *XhoI/SalI* (GateOX4-5 *XhoI*-F y GateOX4-3 *SalI*-R; ver Tabla 2, Anexo I). Una vez purificado y digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pENTR-3C. Este clon se utilizó como molde para una PCR utilizando oligonucleótidos específicos (AHL1 y AHL2; Tabla 2, Anexo I) del vector que permiten amplificar el inserto de interés adicionando los sitios de recombinación del sistema Gateway. El producto de esta PCR fue purificado y se recombinó según las condiciones descritas en el inciso anterior. Como vector de destino para esta construcción se utilizó el vector pGWB554 (Nakagawa y col., 2007). Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis* como se describe en el inciso 6.2.9.

Además se generaron construcciones que permiten expresar proteínas quimeras entre las proteínas *AtOXR2* y *AtOXR4* pertenecientes a la familia OXR de *Arabidopsis*. Se realizaron clonados con genes quiméricos que contemplaban el dominio C-terminal de un gen con el dominio N-terminal de otro. Los oligonucleótidos empleados para este clonado se listan en la Tabla 2 del Anexo I. Para obtener los genes quiméricos se realizaron dos PCRs independientes (PCR#1 y PCR#2; Tabla 3, Anexo I) con oligonucleótidos que permiten amplificar el extremo N-terminal de uno de los genes de interés y el extremo C-terminal del otro gen de interés. El oligonucleótido *forward* de la PCR#1 y el oligonucleótido *reverse* de la PCR#2 son complementarios (Tabla 3, Anexo I). Los productos de amplificación obtenidos en cada una de estas reacciones se empelaron en la PCR#3 incorporando oligonucleótidos complementarios desde el codón ATG del primer gen de interés y del codón STOP del segundo gen de interés (Tabla 3, Anexo I). Estos oligonucleótidos incluyen los sitios de restricción necesarios para el clonado del gen quimérico (Tabla 2, Anexo I). Los fragmentos quiméricos obtenidos fueron clonados en el

vector pBI121. Este vector permite expresar los genes de interés bajo el control del promotor *35SCaMV*.

6.2.8. Condiciones generales de crecimiento de Arabidopsis.

Las plantas de Arabidopsis fueron cultivadas en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (21-23°C durante el día y 15-19°C durante la noche), humedad (50-64% durante el día y 80-100% durante la noche) y luz (flujo de fotones fotosintéticos 84-100 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Las condiciones de iluminación fueron logradas con una combinación de lámparas fluorescentes blancas frías y de tipo GroLux (Silvania, Vinhedo, SP, Brasil). En función del estudio realizado se simuló un fotoperiodo de “día largo” (LD) o de “día corto” (SD). El fotoperiodo LD consistió en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad mientras que el fotoperiodo SD consistió en 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad.

Crecimiento en sustrato. Las condiciones anteriores fueron consideradas como condiciones “control” para plantas sembradas y crecidas en sustrato. El sustrato se preparó mezclando vermiculita, perlita y turba (1:2:1) y se cubrió con tierra fértil previamente esterilizada. Las plantas crecidas de esta forma fueron regadas con agua por sub-irrigación tres veces por semana y fertilizadas con 0,375 g/L del fertilizante Hakaphos rojo cada 7 días en un volumen de 1L cada 16 macetas.

Crecimiento en placa. Las semillas de Arabidopsis empleadas para crecimiento en placa de Petri fueron desinfectadas durante 5 min en etanol absoluto, durante 15 minutos con solución de desinfección (HClO 5% y SDS 1%) y lavadas en $\text{H}_2\text{O}_{(d)}$ tres veces. Luego, se resuspendieron en solución estéril de agar 0,1% y se sembraron por punto (empleando un tip amarillo cortado) en medio Murashige y Skoog (MS) 0,5x (MS519, SIGMA) suplementado con agar 0,8%. Las placas se dispusieron de manera horizontal en cámara de cultivo con fotoperiodo LD. Cuando el objetivo del ensayo era cuantificar el largo de la raíz, las placas se dispusieron de manera vertical.

6.2.9. Transformación de plantas de Arabidopsis.

La transformación de plantas de Arabidopsis se realizó siguiendo el método de inmersión floral (*floral dip*) descrito por Clough y Bent (1998). Para cada transformación se prepararon 8 macetas con tierra en las que se sembraron aproximadamente 11 semillas. Las semillas se cultivaron en cámara bajo las condiciones antes descritas hasta el momento de la floración (aproximadamente 4 semanas). En ese momento, se procedió a cortar las inflorescencias para obtener un mayor número de flores al momento de transformar. Luego de tres cortes se procedió a la inmersión floral en solución de transformación.

La solución de transformación se preparó a partir del pellet de un cultivo de *A. tumefaciens* previamente transformado (ver inciso 6.2.5) crecido hasta una $DO_{600}=0.5$. Para obtener este cultivo se preparó un pre-inóculo en 30mL de medio Luria-Bertani (LB) con rifampicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), estreptomomicina ($300 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y el antibiótico marcador de selección para la construcción de interés. El pre-inóculo se cultivó hasta saturación durante 24 h a 28°C y una agitación de 160 rpm. Este cultivo se diluyó 50 veces en Erlenmeyer con 600 mL de medio LB suplementado con los mismos antibióticos que el pre-inóculo. Este cultivo se creció hasta alcanzar la fase estacionaria (12-14 hs, a 28°C y 160 rpm). Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos. El pellet se resuspendió en 1 L de solución de sacarosa 5%. Una vez resuspendidas las células, se adicionaron 500 μL de detergente a la suspensión (Silwet L-77, OSI Specialties, Inc.). La solución se llevó a agitación y se procedió a la inmersión de las inflorescencias de plantas de Arabidopsis durante 1 min aproximadamente. Finalmente, las plantas se incubaron en posición horizontal durante 24 hs en cámara de cultivo (condiciones control). Finalizado el tiempo de incubación, las plantas se colocaron en posición vertical, se fertilizaron y regaron con agua hasta la observación de la formación de las vainas (pleno desarrollo de las semillas, 4-5 semanas aproximadamente). Una vez formadas las vainas, se suspendió el riego. Al finalizar el ciclo de vida de Arabidopsis se colectaron las vainas, se purificaron las semillas y éstas se conservaron a 4°C para su posterior análisis.

6.2.10. Selección de plantas transformadas.

Las semillas provenientes del proceso de transformación se desinfectaron como se explicó anteriormente. Las plantas que fueron transformadas con el vector pEarlygate-100 (ver inciso 1.1.3), que otorga resistencia al herbicida BASTA, fueron seleccionadas en tierra. Brevemente, las semillas purificadas y vernalizadas fueron sembradas en alta densidad en sustrato y se regaron con BASTA una vez cada 7 días durante los primeros 20 días de crecimiento (momento en el cual se observa clorosis y muerte celular en las plantas no transformadas).

Luego, se extrajo ADN genómico (ver en el siguiente inciso) de las plantas que resistieron el proceso de selección. El ADN obtenido se utilizó como molde para evaluar mediante PCR la presencia del transgén (Tabla 1, Anexo I).

6.2.11. Mini-preparación de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.

La extracción de ADN genómico se realizó según el método descrito por Li y Chory (1998). Una hoja de roseta fue disgregada durante 15 segundos con un pilón plástico a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 700 μ L de solución de extracción (ver Anexo II), se mezcló en vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó con 600 μ L de isopropanol y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet con el ADN genómico se secó y se disolvió en 50 μ L de H₂O-MQ estéril.

6.2.12. Análisis de las plantas transformadas.

Para verificar la presencia de la inserción del ADN de interés en las plantas resistentes al marcador de selección se realizó una PCR empleando como molde ADN genómico de las mismas. En las reacciones de amplificación se emplearon oligonucleótidos específicos para cada una de las inserciones de interés (ver Tabla 2, Anexo I). Las plantas que presentaron la inserción de interés se dejaron crecer hasta maduración de las vainas, se recuperaron las semillas y se proliferaron hasta obtener plantas homocigotas. Con estas líneas se realizaron los ensayos descritos en este trabajo.

6.2.13. Extracción de ARN de Arabidopsis.

Las extracciones de ARN se realizaron con Trizol[®] comercial (Molecular Probes), de acuerdo a las especificaciones del fabricante con mínimas modificaciones. Luego de la precipitación con isopropanol absoluto sugerida por el fabricante, se procedió a la resuspensión del pellet con LiCl 2M. Esta solución se incubó a 4°C durante 12 horas, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 300 µL de H₂O-MQ estéril y se precipitó con 30 µL de Acetato de sodio 2M pH 5 y 783 µL de etanol absoluto. Se incubó durante 5 minutos a -80°C y se centrifugó durante 20 minutos a 15000 rpm. El pellet obtenido se lavó dos veces con etanol 80%, se centrifugó nuevamente y se dejó secar. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 µL de H₂O-MQ estéril tratada con luz UV-B durante 30 minutos.

6.2.14. Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes.

Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes Para realizar la corrida electroforética de ARN en condiciones desnaturalizantes se sembraron 20 mg de ARN por carril (cuantificado por lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm). Antes de sembrar, las muestras fueron desnaturalizadas mezclando 1 vol de ARN en solución acuosa y 3 vol de solución de desnaturalización (formamida 66% (v/v); HEPES 1,3X y formaldehído 8% (p/v)) e incubando esta mezcla a 65°C durante 5 min. Los geles en condiciones desnaturalizantes se prepararon con agarosa 1,5% (p/v) en solución amortiguadora HEPES 1X (pH 7,8) y formaldehido 6% (p/v) según Ausubel y col. (1987). A cada muestra a sembrar se le agregaron 1/10 vol de solución de siembra (ver anexo II) y 2,5 a 5 mg de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en solución de HEPES 1X en forma submarina y a intensidad de corriente constante de 40 mA. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

6.2.15. Técnica de Northern blot.

Los geles de separación de ARN por electroforesis descritos en el punto anterior se transfirieron por capilaridad en medio SSC 6X (ver anexo II) a membranas de nylon

(Hybond-N+, Amersham Biosciences). Las membranas fueron secadas y fijadas por exposición a radiación ultravioleta ($\lambda=310$ nm) durante 3-5 min. Luego fueron hibridizadas con las sondas apropiadas, lavadas y expuestas a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS. Para analizar los niveles de ARN transferido, los filtros fueron hibridizados con una sonda de ARNr 25S de *Vicia faba* a 68°C.

6.2.16. Hibridización de membranas de nylon.

Las membranas de nylon a las cuales se fijaron los ARN o ADN fueron prehibridizadas a 65°C en horno de hibridización durante por lo menos 2 h en solución SSC 5X, Denhardt 5X (ver anexo II) y SDS 0,2% (p/v). La hibridización se realizó en las mismas condiciones pero con el agregado de la sonda marcada correspondiente y durante toda la noche. Luego de la hibridización, los filtros a los que se habían transferido los ARN se lavaron 3 veces a 65°C durante 15 min con SSC 2X. Las membranas que contenían fragmentos de ADN se lavaron con SSC 2X, SDS 0,1% a 65°C (2 veces), con SSC 1X, SDS 0,1% a 65°C (2 veces), con SSC 0,5X, SDS 0,1% a 65°C (2 veces) y con SSC 0,5X a 65°C (1 vez). Luego de los lavados se secaron y expusieron a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS según cada caso.

6.2.17. Transcripción reversa.

La cuantificación de los niveles de transcritos de los genes de interés fue realizada mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). El ADNc se obtuvo mediante transcripción reversa. Dicha reacción se realizó utilizando como molde 1-1,5 μ g de ARN de Arabidopsis. En un primer paso se procedió a la desnaturalización del ARN en agua durante 5 minutos a 70°C e incubación en hielo durante 5 minutos. Luego, se adicionó la mezcla de reacción con solución amortiguadora provista por el fabricante (Promega), 0,5 U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega), dNTPs 0,05 mM y oligo(dT)₁₈ 0,1mM, considerando un volumen final de 15 μ L de reacción. Esta mezcla se incubó durante 60 minutos a 37°C. Finalmente la enzima se inactivó a 85°C durante 5 minutos.

6.2.18. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en los termocicladores StepOne™ Real Time PCR System (LifeTechnologies™) y Chromo4 (MJ-Research). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL con buffer de reacción provisto por el fabricante (5x, 4µL), 0,15 U de enzima Phire II ADN polimerasa (Thermo), dNTPs 62,25 µM, SYBR Green (10x, 1µL), oligonucleótidos específicos (Tabla 4, Anexo I) y 10 µL de la dilución del producto de la retrotranscripción descrita en el inciso anterior. Para normalizar la cantidad de ADN en cada reacción se emplearon los oligonucleótidos ACTIN-F y ACTIN-R que amplifican fragmentos de los genes *ACTIN2* y *ACTIN8* previamente descritos (Charrier y col., 2002; Tabla 6, Anexo I). Cuando el nivel de expresión de los genes fue inferior a un Ct (*threshold cycle*) promedio entre 25 y 27, para normalizar la cantidad de ADN en cada reacción se emplearon los oligonucleótidos PP2AF y PP2AR que amplifican un fragmento del gen *PP2A3* (Czechowski y col., 2005; Tabla 4, Anexo I). La intensidad de fluorescencia se midió a 72°C durante 40 ciclos y los niveles de transcritos relativos se calcularon mediante el método del Ct comparativo (O'Connell, 2002). Los resultados presentados corresponde a replicados biológicos y técnicos de una línea independiente siempre que hayan sido obtenidos resultados similares al menos con tres líneas independientes. Los datos fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y cuando fue necesario se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples. Las pruebas aplicadas se mencionan en el epígrafe de cada figura. Los oligonucleótidos empleados en RT-qPCR se listan en la Tabla 4 del Anexo I.

6.2.19. Análisis de la expresión génica en forma global utilizando microarreglos de ADN.

Muestras de ARN obtenidas como se describió previamente (inciso 1.2.15) provenientes de rosetas completas crecidas durante seis semanas en condiciones de LD provenientes de la línea *35S::AtOXR2-A* y de plantas salvajes fueron hibridadas en un chip Agilent Arabidopsis (G2519F-021169 ARABIDOPSIS; V4) 4x44K empleando marcación recíproca a dos colores. La marcación, hibridación, escaneo y extracción de datos fueron

realizados en el Ontario Cancer Institute Genomic Centre (<http://www.ocigc.ca/ocigc/>) de acuerdo con los protocolos sugeridos por el fabricante del chip. El ensayo se realizó por duplicado (dos chips). El procesamiento de los datos fue realizado empleando el programa libre de estadística R (R Core Team, 2013) y el paquete estadístico *Linear Models for Microarray Data* (Limma) descargado desde *Bioconductor project* (Gentleman y col., 2004).

En primer lugar se realizó el control de calidad del ensayo de microarreglos sin aplicar procesamiento mediante el comando `FeatureExtraction`. Las figuras 6-1 a 6-4 muestran representaciones en falso color las distribuciones espaciales de las intensidades. Lo usual es que los *spots* están distribuidos de manera aleatoria en los dos chips, con lo cual se debe observar una distribución uniforme en todo el chip, tal como se ve en este caso.

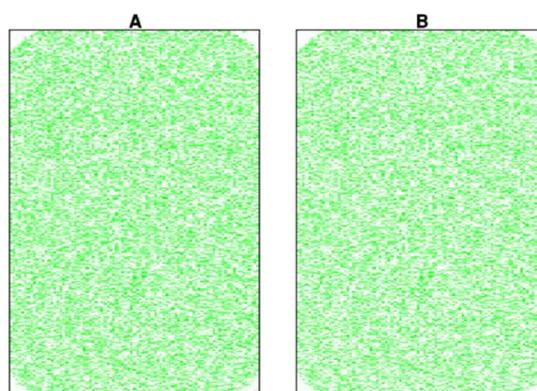


Figura 6-1 | Intensidades del canal verde.

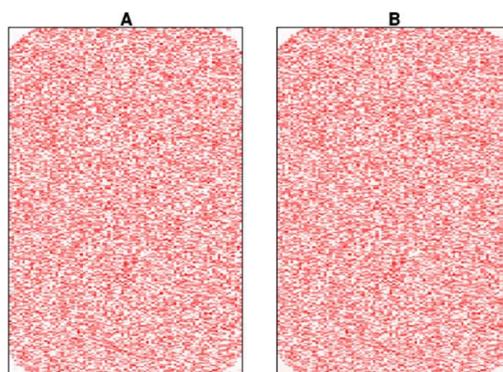


Figura 6-2 | Intensidades del canal rojo.

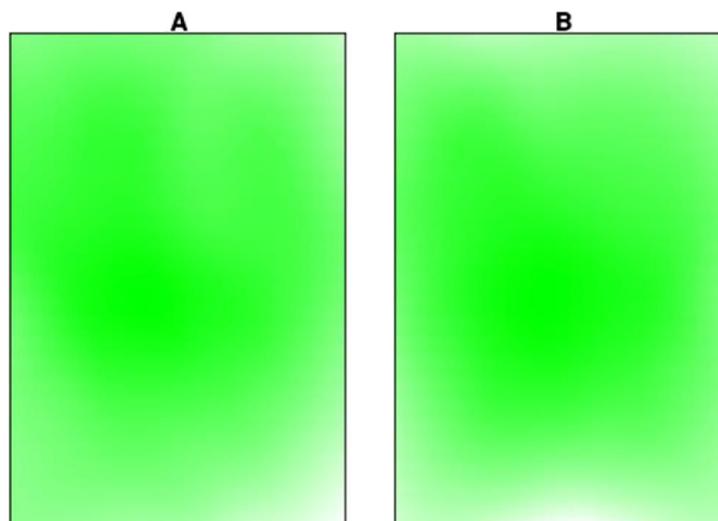


Figura 6-3 | Intensidades del ruido (*background*) para el canal verde.

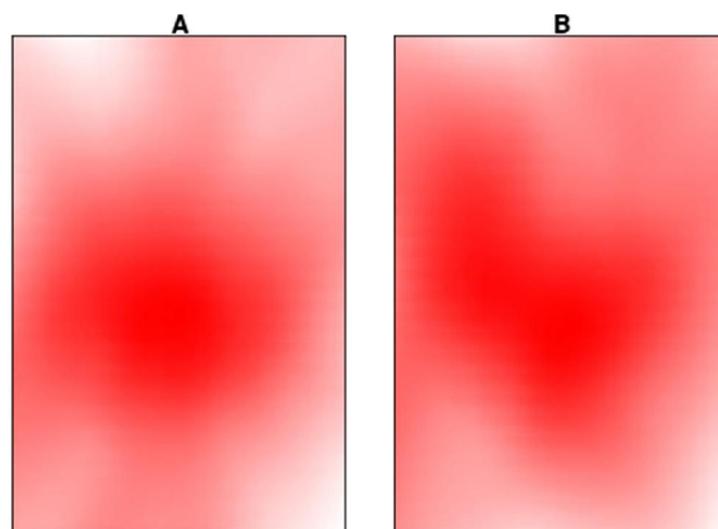


Figura 6-4. Intensidades del ruido (*background*) para el canal rojo.

En la figura 6-5 se muestran los diagramas de cajas (boxplots) que representan un resumen de la distribución de las intensidades de señal de los chips. Cada caja corresponde a un chip. Se espera que las cajas tengan altura y posición similar. Si la distribución de un chip es muy diferente de la otra, puede ser un indicio de que existe un problema en el experimento. En las figuras es posible observar que los chips obtenidos en este experimento son muy similares entre sí con lo cual no sería necesaria una normalización adicional. Además, se observa que las cajas de los controles negativos (que

indican el “cero” del nivel de expresión del experimento) se encuentran por debajo de las cajas de la señal.

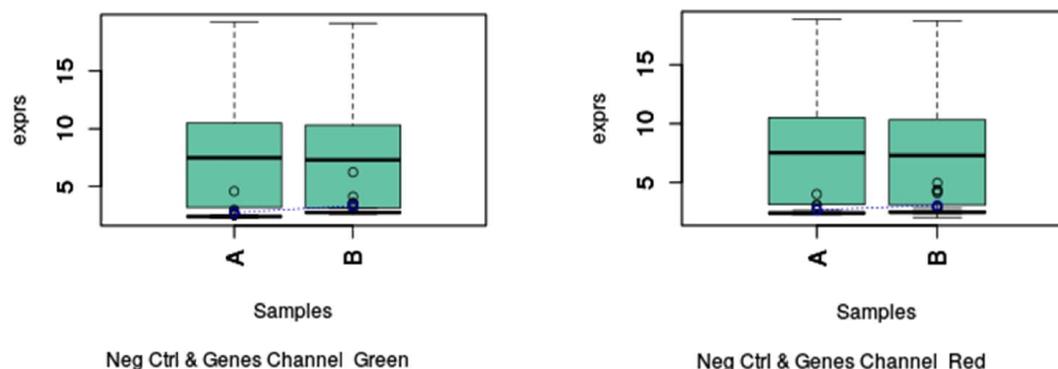


Figura 6-5 | Boxplots de la señal y de los controles negativos.

Luego de evaluar la calidad de los datos recuperados se procedió a procesar los datos mediante FeatureExtraction. La figura 6.6 muestra el MA plot para los datos crudos. M y A son definidas como:

$$M = \log_2(R) - \log_2(G)$$

$$A = 0,5 (\log_2(R) + \log_2(G))$$

donde R es la intensidad del canal rojo y G la del canal verde. Se espera que la mayor parte de la distribución en un MA plot se concentre alrededor del eje $M = 0$, y que no exista ninguna tendencia en M con respecto a A. Si existe una tendencia en el rango inferior de A, puede indicar que los chips tienen diferentes intensidades de ruido de fondo (*background*); esto puede ser solucionado mediante una corrección del ruido de fondo. Una tendencia en el rango superior de A puede indicar saturación en las mediciones; en casos leves, esto puede ser solucionado mediante una normalización no lineal (por ej. normalización por cuantiles). En el caso de este experimento las gráficas se encuentran dentro de lo esperable.

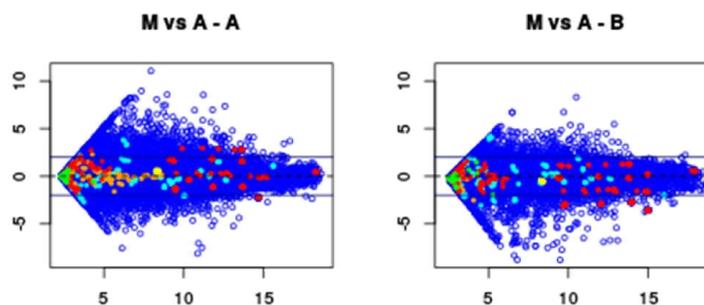


Figura 6-6 | M vs A de los datos procesados por FeatureExtraction. Se encuentran resaltadas las sondas de control.

Luego de haber aplicado el filtro MA se procedió a la evaluación diferencial de la expresión de los genes entre las plantas control (Col-0) y las plantas 35S::AtOXR2-A. Para ello utilizamos una prueba t moderada que permite comparar las condiciones entre sí. La implementación utilizada se encuentra en el paquete Limma (Smyth, 2004). Para el diseño experimental del presente estudio se ha ajustado un modelo lineal por cada gen de la forma:

$$y_i = t_i + e_i$$

donde y_i es el nivel de expresión del *i-ésimo* gen; t_i es la media de la diferencia de expresión entre las muestras con sobreexpresión de 35S::AtOXR2-A y las muestras control para el *i-ésimo* gen y e_i es el término de error del *i-ésimo* gen con distribución normal de media cero y varianza .

Como resultado de este análisis se obtiene una tabla donde se incluye información sobre los genes, valores de expresión y estadísticos como el valor p y el valor p ajustado que dan una idea de la significancia estadística del gen.

6.2.20. Determinación de Ontologías en el grupo de genes regulados diferencialmente en las plantas *35S::AtOXR2*.

El análisis de ontologías es una de las principales etapas de los experimentos actuales en genómica y proteómica de alto rendimiento. Usualmente se busca relacionar los genes o proteínas diferencialmente expresados con términos biológicamente relevantes, identificando funciones y/o rutas metabólicas enriquecidas dentro del experimento. *Gene Ontology* (GO, www.geneontology.org) es la ontología más popular y está estructurada como tres grafos dirigidos acíclicos (molecular function [MF], biological process [BP] y cellular component [CC]). El análisis de ontologías se realizó utilizando la herramienta *Multi-Reference Contrast Method* (MRCM; Fresno y col., 2012).

6.2.21. Construcción de árboles filogenéticos.

Con el fin de intentar comprender la historia evolutiva de estos genes en las especies vegetales, decidimos confeccionar un árbol filogenético para cada gen en estudio y sus homólogos en distintas especies vegetales. Nuestro procedimiento fue el siguiente:

- | | | |
|----------------------------|---|---|
| 1-BLAST | } | Pasos realizados con el software
MEGA 6 (Tamura y col., 2013). |
| 2-Alineamiento múltiple | | |
| 3-Curado de las secuencias | | |
| 4-Ajuste de modelos | | |
| 5-Construcción del árbol | | |
| 6-Chequeo del árbol | | |
| 7-Representación gráfica | | |

El primer paso para una correcta reconstrucción filogenética es obtener un grupo de secuencias curadas (no repetidas) con un *score* razonable que sustente la suposición de homología de secuencias. La búsqueda se realizó sobre la base de datos del clado *Viridiplantae* (taxid:33090) del NCBI. Con el conjunto de datos curados (sin secuencias idénticas) y alineadas mediante el algoritmo MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison with Log Expectation*) (Edgar, 2004), se procedió al ajuste de modelos para verificar aquel que

mejor se adaptaba a nuestros datos (Shapiro y col., 2006). Una vez seleccionado el modelo se inició la construcción del árbol filogenético y posterior chequeo del mismo (Hall, 2013). Finalmente se realiza una representación gráfica del árbol. Dado que en este caso siempre se trabajó con *Maximum Likelihood* y *bootstrap*, en los nodos se muestran los valores de *bootstrap* que fueron superiores al 70%.

6.2.22. Caracterización fenotípica de Arabidopsis.

La caracterización fenotípica de Arabidopsis se realizó siguiendo las recomendaciones sugeridas por Boyes y colaboradores (2001) en condiciones de día largo. Se midió el radio de la roseta, el número de hojas, el área foliar y la altura del tallo en función del tiempo. Las mediciones se realizaron cada 48 horas y las plantas fueron crecidas en condiciones de LD. Para evaluar la producción de semillas se contaron y se pesaron 200 semillas de cada una de las líneas de interés. Luego se recuperaron todas las semillas de plantas crecidas durante ocho semanas, se pesaron y se referenciaron según el peso obtenido para 200 semillas.

6.2.23. Curva de deshidratación.

Para evaluar de manera indirecta la apertura estomática se realizaron curvas de deshidratación en hojas de rosetas de plantas crecidas en condiciones de LD. Se cortaron las rosetas y se pesaron cada 5 minutos durante los primeros 30 minutos. Luego, se pesaron cada 15 minutos durante los siguientes 60 minutos y, finalmente, se pesaron cada 30 minutos hasta alcanzar 240 minutos para plantas ecotipo Col-0 y 390 para plantas genotipo WS. El ensayo se realizó empleando, al menos, cinco rosetas completas para cada línea estudiada.

6.2.24. Crecimiento de Arabidopsis en condiciones de alta intensidad de luz (AIL).

Plantas de Arabidopsis fueron cultivadas en condiciones de SD como se describió previamente (inciso 6.2.8). Luego de 7 días de crecimiento se homogeneizaron las

macetas dejando 4 plantas por maceta. Diez días antes de someter las plantas al estrés por AIL, las plantas se aclimataron a un fotoperíodo de día corto, las muestras tomadas al final de este periodo fueron consideradas como tiempo 0 ($t=0$). Transcurrido el período de adaptación las plantas fueron irradiadas durante 8 horas con $600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación PAR (AIL). Al final del ciclo de luz del tercer día se tomó la muestra considerada como estrés por AIL. Se obtuvo ARN de cada una de las muestras descritas, el que se utilizó para análisis de la expresión mediante RT-qPCR. El ensayo se repitió tres veces. Las muestras correspondientes a $t=0$ y a distintos tiempos entre fueron, además, utilizadas para extracción y cuantificación de antocianinas (ver inciso 6.2.34) en dos ensayos distintos. Las mediciones de parámetros fotosintéticos se realizaron en muestras distintas sometidas al mismo tratamiento. Esta cuantificación se repitió dos veces.

6.2.25. Tratamiento de plantas de Arabidopsis con ácido abscísico (ABA).

Plantas de Arabidopsis fueron cultivadas en placas de Petri como se describió previamente durante 6 días en un fotoperíodo de LD, momento en el cual se las incubó durante 60 minutos en 6 mL de MS 0,5x. Transcurrido este tiempo, se adicionaron a la solución 12 μL de ABA 125 μM . Se tomaron muestras luego de 30, 60 y 180 minutos de incubación.

6.2.26. Apertura estomática.

Para la cuantificación de la apertura estomática se tomaron hojas de roseta pertenecientes al sexto par, de plantas crecidas durante 6 semanas. Las hojas fueron incubadas en alta intensidad lumínica (180 μE) durante 3 horas. Finalizada esta incubación se adicionó ABA hasta obtener una concentración final de 5 μM y el material vegetal se incubó durante 1 hora. Luego del tratamiento, se obtuvieron muestras de hoja utilizando la técnica de la impresión de la epidermis con breves modificaciones (Bastos Segatto y col., 2004). Para tal fin, se colocó sobre adhesivo universal la cara abaxial de las hojas y se presionó a cada lado de la nervadura principal durante aproximadamente 1 min para facilitar la adhesión. Luego, se separó la hoja del adhesivo y la impresión se colocó sobre

un portaobjeto que contenía 50 μL de azul de toluidina 0,1% (p/v). Los estomas se observaron utilizando microscopio óptico. A partir de las imágenes obtenidas se cuantificó la amplitud de la apertura estomática utilizando el programa Image J v 1.41 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Se analizaron al menos 5 hojas de 3 plantas distintas para cada genotipo, de las cuales se observaron cuatro campos seleccionados al azar. Los datos fueron procesados y analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA), usando el test de Tukey para la separación de medias ($P < 0,05$).

6.2.27. Germinación y desarrollo de la raíz en presencia de ABA.

Para evaluar la germinación, las semillas de los genotipos de interés fueron desinfectadas y vernalizadas durante 3 días a 4°C. Luego se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS 0,5x, glucosa 2% y ABA 0,3 μM . La placa de Petri se dividió por la mitad y siempre se sembró la línea de interés y su control en la misma placa (2 líneas por placa). El proceso de germinación se evaluó en la lupa cada 4 horas. El desarrollo de la raíz se realizó en placa de Petri conteniendo medio MS 0,5x, glucosa 2% y ABA 0,3 μM . Las placas se dispusieron en posición vertical y la longitud de la raíz se evaluó cada 2 días empleando el programa libre Rootdetection (www.labutilis.de).

6.2.28. Cuantificación de hormonas mediante cromatografía líquida de alta *performance* acoplada a espectrometría de masas.

En este trabajo de Tesis se cuantificaron los niveles de auxinas, ácido salicílico (SA), ABA y ácido jasmónico (JA). En todos los casos se empleó el protocolo de extracción descrito Durgbanshi y colaboradores (2005) para la determinación de ácido indol-3-acético (Auxinas, IAA¹). Brevemente, plantas crecidas durante 15 días en medio MS 0,5 x suplementado con agar 0,8% fueron cosechadas y liofilizadas. El material liofilizado se conservó se congeló en nitrógeno líquido y se procesó en mortero. Luego, se agregaron 5 mL de H₂O-MQ y la mezcla se procesó en un homogeneizador de tejido (Ultraturrax). Estándares deuterados de IAA ([2H5] ácido indol-3-acético), de SA ([2H5] ácido salicílico),

¹ La naturaleza química de las auxinas las define como ácido indol-3-acético (IAA).

de ABA ([2H5] ácido abscísico y JA ([2H5] ácido jasmónico) se agregaron a cada uno de las muestras procesadas. Luego de la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se llevó a pH 3 con ácido acético. La solución obtenida fue particionada dos veces en éter etílico y una vez combinadas las dos fases orgánicas se procedió a la evaporación a 33°C en vacío. El residuo seco se resuspendió en metanol, se mezcló en vortex y se filtró en un casete de celulosa. El extracto recuperado se secó mediante centrifugación en presencia de vacío (Spped-Vac). El residuo seco se resuspendió en 50 µL de metanol (calidad grado HPLC) y se tomaron 10 µL para su inyección en el sistema de HPLC Alliance 2695 (Watters, Milford, MA). Las hormonas fueron separadas en una columna C18 empleando metanol 0,02% como solvente. El sistema de HPLC se acopló a un espectrómetro de masa con un triple cuadrupolo (Quattro Ultima, Micromass). El cuadrupolo se operó en ESI (Electro Spray Injection) negativo con sistema de detección de en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring).

6.2.29. Cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. tomato para ensayos de estrés biótico.

Las células de la cepa virulenta Pst DC3000 y de la cepa avirulenta Pst DC 3000 (avrRpm1) se cultivaron durante 48 horas o hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6 en medio King's (ver Anexo II) en presencia de rifampicina 50 mg.L⁻¹ y kanamicina 50 mg.L⁻¹ a 28 °C con agitación. A partir de este cultivo se realizó una dilución 1:50 en medio King's fresco suplementado con antibióticos y se dejó crecer durante toda la noche o hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. Se cosecharon las células por centrifugación y el pellet celular se lavó con MgCl₂ 10 mM. El sedimento final fue resuspendido en MgCl₂ 10 mM e incubado durante 1 hora para activar la virulencia. La solución final presentaba una DO_{600} de 0,3 que corresponde, para *P. syringae* pv. tomato, aproximadamente a 1×10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro de cultivo (UFC.mL⁻¹).

6.2.30. Tratamiento de hojas de roseta de *Arabidopsis* con *P. syringae* pv. tomato.

Los ensayos de estrés biótico se realizaron en plantas crecidas durante 3 semanas en condiciones de LD. Las bacterias patogénicas de la cepa Pst DC 3000, virulenta y avirulenta, se cultivaron y recuperaron como se describió en el inciso anterior. A las bacterias resuspendidas en MgCl_2 10 mM en una DO_{600} de 0,3 se les adicionó Tween 0,05%. Esta suspensión se utilizó para la inoculación de hojas de rosetas de *Arabidopsis*.

Para la inoculación se recurrió a dos métodos: infiltración y aspersion. En el primer caso se introduce el inóculo bacteriano en la cara abaxial de las hojas por presión mecánica, usando una jeringa de 1 mL sin aguja ([The Arabidopsis Book, Infiltración](#)). La ventaja de este método es la rapidez con la que se obtiene el síntoma de la infección. Sin embargo, este método posee como desventaja que al introducir el inóculo bacteriano se rompen todas las barreras físicas de la planta. En el segundo método, cada roseta fue asperjada utilizando un atomizador conteniendo 10 mL de la suspensión bacteriana. Este método de inoculación es el que se asemeja más a lo que ocurre en la naturaleza, ya que las bacterias solo pueden ingresar al mesófilo por los estomas ([The Arabidopsis Book, Aspersion](#)).

Diferentes concentraciones bacterianas se utilizaron según el método de inoculación: 10^6 UFC.mL⁻¹ para infiltración ($\text{DO}_{600} = 0,02$) y 10^8 UFC.mL⁻¹ ($\text{DO}_{600} = 0,2$) para aspersion. Se recolectaron muestras para extracción de ARN a distintos tiempos. Independientemente de la técnica de inoculación empleada, las macetas con plantas tratadas se cubrieron con nylon previamente asperjado con H_2O_d estéril para mantener la humedad y favorecer el desarrollo de los síntomas.

6.2.31. Medición de la población bacteriana en hojas de roseta de *Arabidopsis*.

Inoculación por infiltración. Luego de 72 horas de tratamiento con las bacterias patogénicas se cortaron las hojas de las rosetas sin el pecíolo y se sumergieron en una solución de MgCl_2 10 mM y las células se liberaron a la solución mediante

homogeneización con un mortero plástico estéril. Posteriormente diluciones seriadas de la suspensión se crecieron en placas de Petri con medio King's en presencia de antibióticos para estimar el tamaño total de la población bacteriana (endofítica y epifítica) ([The Arabidopsis Book, Cuantificación de bacterias](#))

6.2.32. Cuantificación de lípidos peroxidados.

La generación de lípidos peroxidados como consecuencia de la producción de radicales libres se evaluó de forma indirecta mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA) (Hodges y col., 1999). Rosetas de Arabidopsis (100-150 mg) se congelaron con N₂ líquido y se procesaron en mortero hasta obtener un polvo fino. Este polvo se trasvasó a un tubo de 1,5 mL y se homogeneizó en 800 µL de solución de ácido tricloroacético (TCA) 6% fría. Se centrifugó a 10000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recuperaron 700 µL del sobrenadante. El sobrenadante se fraccionó en partes iguales en dos tubos de 1,5 mL. Una de las fracciones se diluyó en solución de ácido tiobarbitúrico (ver Anexo II) y la segunda fracción se diluyó en solución control (ver Anexo II). Las dos fracciones se incubaron 30 minutos a 95°C. Transcurrida la incubación las fracciones se centrifugaron a 6000 x g durante 10 minutos y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la lectura. Las lecturas se realizaron a 440², 532³ y 600⁴ nm. La concentración de MDA se calculó aplicando un factor de calibración proveniente de una curva de calibrado. Se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de MDA:

$$1) [(Abs_{532}+TBA)-(Abs_{600}+TBA)] - [(Abs_{532}-TBA-Abs_{600}-TBA)] = A$$

$$2) [(Abs_{440}+TBA)-(Abs_{600}+TBA) 0.0571]= B$$

$$3) MDA \text{ equivalentes (nmol} \cdot \text{mL}^{-1}) = (A-B/157\ 000) 10^6$$

² Corrección por lectura proveniente de azúcares en la muestra.

³ Lectura que corresponde al pico de absorbancia máxima del MDA

⁴ Corrección por lectura proveniente de antocianinas y polifenoles en la muestra.

6.2.33. Cuantificación de clorofila.

Los valores de concentración de clorofila se obtuvieron según la técnica descrita por Porra (2002). Rosetas completas o plantas cultivadas en placa se congelaron en nitrógeno líquido y se procesaron en mortero. El polvo obtenido se extrajo durante 12 horas a 4°C con solución de acetona amortiguada a pH 7,8. Se centrifugó, y el sobrenadante se leyó en espectrofotómetro a 663 nm, 647 nm y 537⁵ nm. Los cálculos se realizaron según la ecuación reportada por Simmons y Gamon (2002).

$$\text{Clorofila } a = 0.01373 A_{663} - 0.000897 A_{537} - 0.003046 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 0.02405 A_{647} - 0.004305 A_{537} - 0.005507 A_{663}$$

6.2.34. Determinación de antocianinas en Arabidopsis.

Se pesaron rosetas completas de Arabidopsis y se incubaron de a una en 10 mL de solución ácida de extracción (ver Anexo II) durante 24 horas a 4°C. Finalizado el tiempo de extracción, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó el contenido de antocianinas leído a 520 nm y a 700⁶ nm. Para cada línea de interés se procesaron 5 rosetas completas.

Los resultados se expresaron como como equivalentes de cianidina-3-glucósido en mg/L según un factor de calibración sugerido por la bibliografía (Lee, 2005; Lee y col., 2008), según la ecuación:

$$\text{Pigmentos de antocianina (equivalentes)} = \frac{A \times PM \times D \times 10e3}{a \times d}$$

En donde,

A: $(A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$

PM: 449,2 g.mol⁻¹

D: factor de dilución

10e3: conversión de g a mg

a: coeficiente de extinción molar, 26900 L. mol⁻¹. cm⁻¹

⁵ Corrección por lectura proveniente de antocianinas presentes en la muestra.

⁶ Corrección por lectura proveniente de la turbidez.

6.2.35. Determinación de aniones superóxido en Arabidopsis.

La producción de aniones superóxido (O_2^-) en Arabidopsis se evaluó de manera cualitativa mediante histoquímica (Attallah y col., 2011). Para tal fin, se obtuvieron rosetas completas y se incubaron en solución de NBT 0,01% en Hepes 20 mM pH 7,8 conteniendo Tween 20 0,01%. Se aplicó vacío durante 5 minutos. Se tomaron fotografías a distintos tiempos a partir de la aparición de tinción azul. La reacción se detuvo luego de 24 horas y las plantas se decoloraron en etanol 80% durante 48 horas a 37°C.

6.2.36. Determinación de peróxido de hidrógeno en Arabidopsis.

La producción de H_2O_2 en Arabidopsis se evaluó de manera cualitativa mediante histoquímica (Kühn y col., 2015). Para tal fin, se obtuvieron rosetas completas u hojas correspondientes al sexto par y se incubaron en solución de DAB 5 mM en H_2O MQ pH 3. Luego de 4 horas (o hasta aparición de la tinción marrón) las rosetas fueron dispuestas en etanol 80% (v/v) e incubadas durante 48 horas para la eliminación de la clorofila.

6.2.37. Determinación de parámetros fotosintéticos en Arabidopsis.

Los parámetros fotosintéticos se evaluaron a través de la cuantificación de la fluorescencia de la clorofila y de la absorción del CO_2 empleando un equipo IRGA (del inglés *Infra Red Gas Analysis*) marca Li-COR modelo 6400XT. Se evaluaron los siguientes parámetros: $\phi PSII$ (transferencia de electrones a través del PSII), ϕCO_2 (fijación del CO_2), F_v/F_m (fluorescencia máxima de la clorofila en oscuridad) y F_v'/F_m' (fluorescencia máxima de la clorofila en presencia de luz (Baker y col., 2008). En el Anexo III se desarrollan los conceptos teóricos necesarios para la interpretación de los parámetros obtenidos mediante IRGA.

6.2.38. Pérdida de agua de rosetas escindidas.

Este ensayo se realizó en plantas en estadio reproductivo (6 semanas de crecimiento en las condiciones descritas en el inciso Se tomó la maceta y se escindió todo el tejido aéreo de la planta. Posteriormente se cortaron los tallos, y se pesaron las

rosetas a tiempo inicial (P0). En los n tiempos que indican las figuras estas mismas hojas se volvieron a pesar (Pn). La pérdida de agua se cuantificó como el porcentaje del peso de las hojas respecto al inicial:

$$\text{Peso de las hojas (\% respecto del inicial)} = (P_n/P_0) \cdot 100$$

6.2.39. Cortes histológicos de órganos de Arabidopsis.

Las muestras utilizadas para los análisis histológicos se colectaron en acetona fría para fijarlas, y a los 20 minutos se transfirieron a una solución de etanol 70%. A continuación, se realizaron los siguientes pasos sucesivos a fin de preparar las muestras para la formación del taco: etanol 80%, 90%, 95%, 15 minutos en cada solución; 2 pasajes sucesivos por etanol 100%, de 30 minutos cada uno; solución etanol 100% - xilol 3:1, etanol 100% - xilol 1:1 y etanol 100% - xilol 1:3, 30 minutos cada una, 3 pasajes por xilol puro, los dos primeros de 15 minutos y el tercero de 2 horas; mezcla xilol – parafina 3:1, xilol – parafina 1:1, xilol – parafina 1:3, de 30 minutos cada una; 3 pasajes sucesivos por parafina pura, de al menos 1 hora cada uno. Luego del último paso por parafina pura se procedió a la realización del taco. Las mismas se cortaron en láminas de 10 µm de ancho, se montaron en portaobjetos previamente tratados con polilisina y se secaron durante una noche a 28°C. Para proceder a la tinción de los cortes, se realizaron los siguientes pasos: 2 pasajes por xilol, de 5 minutos cada uno; etanol 100%, etanol 96%, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50%, agua desionizada, solución de azul de toluidina 0,1% en agua, durante 1 minuto cada uno; 3 lavados en agua desionizada de al menos 1 minuto cada uno. Luego de la tinción, se secaron las muestras a 28°C durante una noche y se montaron con Bálsamo de Canadá sintético.

6.2.40. Análisis de la expresión del gen reportero *GUS* en plantas transformadas mediante histoquímica.

La actividad β-glucuronidasa se analizó mediante reacción histoquímica en distintos órganos y tejidos de las plantas transformadas. Plántulas u órganos aislados fueron lavados con solución fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) durante algunos minutos

para eliminar restos de tierra o medio de cultivo y luego transferidos a una solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, Tritón X-100 0,1% y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido) 2 mM. A continuación, se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 2-16 h (Jefferson y col., 1987). 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 las muestras se guardaron en solución etanólica a 4°C hasta ser fotografiadas. Las imágenes se procesaron con el software Adobe Photoshop.

6.2.41. Análisis de la expresión del gen reportero *GUS* en plantas transformadas mediante fluorometría.

Plantas cultivadas durante 8-10 días en medio MS 0,5x se procesaron en mortero, agregándose 500 μ L de solución amortiguadora de extracción (ver Anexo II). La mezcla se transfirió a un tubo y se centrifugó a 13000 x g durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo en baño de hielo. La reacción fluorométrica se realizó según el método de (Jefferson y col., 1987). Se agregaron 2,5 μ L de extracto proteico a 100 μ L de una solución del sustrato MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido) 1 mM en metanol 40%. Con una alícuota de 25 μ L se realizó inmediatamente una medida fluorométrica a tiempo = 0. Los 75 μ L restantes se incubaron a 37°C en baño de agua y a los 10 min se extrajo una alícuota de 25 μ L y se realizó una segunda medida fluorométrica (tiempo = 10 min). Para detener la reacción enzimática se utilizaron 975 μ L de Na₂CO₃ 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmoles de MU (4-metilumbeliferona).min⁻¹.(mg de proteínas totales)⁻¹ de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de fluorescencia relativa) vs. concentración de producto 4-MU. Las proteínas totales se cuantificaron según el método de Bradford (ver inciso 1.2.34). 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. Las medidas fluorométricas se realizaron en un equipo Versa Fluor™ Fluorometer System de Bio-Rad (filtros EM 460/10 y EX 360/40) en cubetas de 1 mL.

6.2.42. Determinación del contenido de proteína total mediante el método de Bradford.

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método descrito por Mitra y col. (1994). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (ASB) cuya concentración se determinó espectrofotométricamente, considerando 0,667 unidades de absorbancia a 280 nm como 1 mg/ml de ASB en solución. Las determinaciones se realizaron con 5 μ l de extracto proteico en 100 μ l de NaCl 0,15 M y 900 μ l del reactivo de Azul Brillante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie G-250 10 mg%, etanol absoluto 5% (v/v) y ácido fosfórico 10% (v/v)). La absorbancia se determinó en espectrofotómetro a 595 nm.

6.2.43. Actividad superóxido dismutasa en geles nativos.

Para evidenciar la actividad de las isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se recurrió a la detección en gel de la actividad SOD como se describió en Weydert y col. (2010). Se obtuvieron extractos proteicos en solución de extracción SOD (ver Anexo II). Rosetas completas de plantas cultivadas en sustrato o en placas como se describió previamente se congelaron con N₂ líquido y se procesaron en mortero. El polvo fino obtenido se pesó hasta obtener 100-150 mg y se homogenizó en solución de extracción SOD en una relación 2:1 (extracto:solución de extracción). Los extractos se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 minutos y se recuperó el mismo volumen de sobrenadante para cada uno de los extractos. Los extractos así obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en el inciso 1.2.41. Finalizada la corrida electroforética el gel se incubó con agitación durante 15 minutos en solución de reacción sin sustratos (ver Anexo II). Transcurrido ese tiempo, se preparó la solución de reacción con riboflavina y nitrobluetetrazolium (NBT, ver Anexo II) y se incubó durante 15 minutos con agitación y en oscuridad. Finalmente, el gel se expuso a una fuente de luz blanca (75 W) hasta aparición de las bandas de actividad. La reacción se detuvo incubando el gel en agua MQ.

6.2.44. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS).

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida se realizó según el protocolo descrito por Laemmli (1970) utilizando un sistema vertical de geles (Miniprotean Bio-Rad). En todos los casos, en la matriz de poliacrilamida se empleó una relación acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8 (p:p). El gel de separación se preparó en solución Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1% (p/v), con una concentración de acrilamida final de 15-18% (p/v). El gel de concentración se preparó en solución Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% (p/v), con una concentración de acrilamida final de 4% (p/v). Las muestras se sembraron previa dilución en solución de siembra de proteínas (ver Anexo I) y desnaturalización durante 5 minutos a 96°C, excepto aquellas muestras en las que posteriormente debían detectarse COX17 o COX19 mediante western-blot. La separación electroforética se llevó a cabo en solución Laemmli 1x (ver Anexo II), aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel de separación.

6.2.45. Determinación de metabolitos mediante GC-MS.

Para la determinación de metabolitos, las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo en condiciones de LD. Al final de la noche (EON) y en la mitad del ciclo de luz (MD) se cosecharon hojas de rosetas sin pecíolo por cuadruplicado y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se procesaron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Las muestras se procesaron como fue descrito previamente por Fahnenstich y col. (2007). Brevemente, el polvo se pesó manteniendo las muestras congeladas hasta obtener 60-80 mg y se homogeneizó en 1,5 mL de solución de extracción alcohólica (ver Anexo II) con ribitol como control interno. El homogenizado se agitó en vórtex y se centrifugó durante 2 minutos a 2000 x g. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se agitó nuevamente en vórtex. Una alícuota de 25 μ L se trasvasó a un tubo nuevo y se secó a 4°C mediante aplicación de vacío. El pellet así obtenido se derivatizó con 10 μ L de hidrocloreuro de metoxiamina (MTFA) 20 mg.mL⁻¹ durante 30 minutos a 90°C con agitación continua. Luego, se adicionaron 90 μ L de MTFA y las muestras se incubaron durante 30 minutos a

37°C con agitación continua. Finalmente, se procedió a la inyección de 100 µL de la suspensión en el equipo de cromatografía (Agilent 7890A GC and Waters GCT Premier TOF/MS). La identificación de las sustancias se realizó mediante comparación con estándares. Las muestras para la determinación de metabolitos fueron procesadas en el Laboratorio de la Dra. Verónica Maurino perteneciente al instituto de Bioquímica de Plantas de la Universidad Henrich-Heine de Düsseldorf, Alemania en el marco de un proyecto de colaboración binacional. La determinación de metabolitos mediante GC-MS fue realizada por la Dra. Katrin Weber perteneciente al Center of Advanced imaging (CAI) de la misma universidad.

6.2.46. Localización subcelular de proteínas mediante microscopía confocal.

Los estudios de localización subcelular se realizaron mediante microscopía confocal, empleando un microscopio (C-Apochromat 10x/1.20 W Korr M27 or C-Apochromat 63x/1.20 W Korr M27). La localización se realizó en raíces de plantas *mt-gk* transformadas con las construcciones *35S::OXR1*, *35S::OXR2*, *35S::OXR4* y *35S::OXR5*. Las plantas fueron crecidas durante 8 días en medio MS 0,5x suplementado con higromicina 50 µg.mL⁻¹, se recuperaron las raíces y se colocaron en el microscopio como muestras frescas (entre porta objeto y cubre objeto en H₂O). El campo de interés fue irradiado con un láser de 488 nm y con un láser de 561 nm para obtener los espectros de emisión de GFP y mRFP respectivamente. La detección para GFP se realizó entre 491 y 552 nm y la detección de mRFP se realizó entre 587 y 631 nm. La emisión de GFP y mRFP de manera simultánea fueron obtenidas mediante barrido unidireccional modificando el canal de detección en cada línea. La apertura del *pinhole* fue mantenida siempre en una unidad de apertura. Las imágenes convertidas a 8-bit fueron analizadas empleando las herramientas Coloc2 y Colocalization threshold del programa Fiji (ImageJ).

6.2.47. Determinación de la capacidad antimutagénica en mutantes de *E. coli*.

La cepa de *E. coli* pMV4709 [*fpg⁻ mutY lacZ*], fue transformada con las construcciones AtOXR2/pTrc99A y AtOXR4/pTrc99A (ver inciso 6.2.7). Las bacterias

transformadas y las salvajes fueron crecidas en medio de cultivo descrito por Volkert y col. (2008, Anexo II) suplementado con glucosas o con lactosa a una concentración final de 0,2 % como fuente de carbono. Las placas se incubaron toda la noche (o hasta la aparición de colonias) a 37°C. Luego de la aparición de colonias, se procedió al recuento de las mismas. Los resultados se expresan como la relación entre el número de colonias que emplean lactosa para su crecimiento respecto del número de colonias que emplea glucosa.

6.2.48. Ensayo de complementación en levaduras mutantes.

Células de levaduras salvajes (BY4742) y mutantes (Y11096) transformadas con el vector vacío y con el gen de interés correspondiente fueron sometidas a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno para evaluar su tolerancia al estrés oxidativo.

6.2.49. Análisis estadísticos.

Los datos experimentales son expresados como medias de los valores obtenidos \pm el error estándar de la media (SD) del número indicado de mediciones independientes, excepto que se aclare lo contrario. Diferencias significativas entre dos grupos de datos cuyas varianzas eran iguales y la distribución de Gauss fue aplicable fueron analizadas mediante Prueba t de Student. Cuando las varianzas fueron diferentes se recurrió a la corrección mediante la Prueba de Welch (o Prueba t no pareada) y cuando no se cumplió el supuesto de normalidad entre dos grupos se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Diferencias significativas entre más de dos grupos de datos fueron analizadas empleando Análisis de la Varianza (ANOVA) combinado con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Cuando el ensayo fue desbalanceado (diferente número de muestras para cada grupo de datos comparado) o no se cumplió el supuesto de normalidad de los datos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico se realizó con el programa InfoStat Versión 2014 (Di Rienzo y col., 2011). El análisis estadístico de los ensayos de microarreglos se realizó como se describió en 6.2.19.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. CAPÍTULO I

**“Presentación de la familia de proteínas OXR en
Arabidopsis thaliana”**

CAPÍTULO I

7.1.1. Identificación de los miembros de la familia OXR en Arabidopsis.

A la fecha no existen reportes acerca de proteínas con dominio TLDC que hayan sido estudiadas en plantas. Sin embargo, este dominio está ampliamente distribuido en el reino vegetal. Inicialmente, para identificar los miembros de la familia OXR presentes en Arabidopsis ejecutamos el algoritmo BLAST (de sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando la secuencia proteica codificada por el gen de mamíferos *HsOXR1* como secuencia de referencia (Volkert y col., 2000). Este algoritmo arrojó como resultado al gen identificado con el número de AGI (*Arabidopsis Genome Initiative*) *At2g05590* así como también a su parálogo más cercano *At4g39870*.

En la figura 7.1-1 se muestra la secuencia de la proteína HsOXR1 y las secuencias de las proteínas identificadas en Arabidopsis. En rojo se destaca el dominio TLDC, previamente definido por Doerks y colaboradores (2002). Durante el desarrollo de este manuscrito, al gen *At2g05590* lo nombraremos como *AtOXR2* mientras que, siguiendo un razonamiento similar (el número asignado a la proteína indica el cromosoma en el cual se encuentra el gen codificante para la misma), al gen *At4g39870* lo llamaremos *AtOXR4*.

```
> HsOXR1|Oxidation resistance protein 1|Iso 1 (NP_060472)
MTKDKNSPGL KKKSQSVDIN APGFNPLAGA GKQTPQASKP PAPKTPPIIEE EQNNAANTQK
HPSRRSELKR FYTIDTGQKK TLDKKDGRRM SFQKPKGTIE YTVESRDSL N SIALKFDSTTP
NELVQLNKLF SRAVVTGQVL YVPDPEYVSS VESSPSLSPV SPLSPTSSEA EFDKTTNPDV
HPTEATPSST FTGIRPARVV SSTSEEEAF TEKFLKINCK YITSGKGTVS GVLLVTPNNI
MFDPHKNDPL VQENGCEEYG IMCPMEEVMS AAMYKEILDS KIKESLPIDI DQLSGRDFCH
SKKMTGSNTE EIDSRIRDAG NDSASTAPRS TEESLSEDFV TESELSPIRE ELVSSDELRO
DKSSGASSES VQTVNQAEVE SLTVKSESTG TPGHLRSDTE HSTNEVGTL C HKTDLNNLEM
AIKEDQIADN FQGISGPKED STSIKNSDQ DSFLHENS LH QEESQKENMP CGETAEFKQK
QSVNKGKQ GK EQNQDSQTEA EELRKLWKTH TMQQTQQRE NIQQVSQKEA KHKITSADGH
IESSALLKEK QRHRLHKFLC LRVGKPMRKT FVSQASATM Q QYAQRDCKHE YWFAVPQERT
DHLYAFFIQW SPEIYAEDTG EYTREPGFIV VKKIEESETI EDSSNQAAAR EWEVVSVAEY
HRRIDALNTE ELRTL CRRLQ ITTREDINSK QVATVKADLE SESFRPNLSD PSELLLPDQI
EKLT KHLPPR TIGYPWTLVY GTGKHGTS LK TLYRTMTGLD TPVLMVIKDS DGQVFGALAS
EPLKVS DGFY GTGETFVFTF CPEFEVFKWT GDNMFFIKGD MDSLAFGGGG GEFALWLDGD
LYHGRSHSCK TFGNRTL SKK EDFFIQDIEI WAFE

> At2g05590 - AtOXR2
MHALKDKVSQ KLSNLFADSP SQSASPRYSN SDSPKARLNS SVGKSLSSYF SFVVPQSGNE
EDSELCPPLP IRTESYECIE NCKSANGQAK AGTFISIGED KDCELRVSAK VEESGNDYFD
GVKKMRELTE SSVFITANLF EFLHASLPNI VRGCKWILLY STLKHGISLR TLLRRSGELP
```

```

GPCLLVAGDK QGAVFGALLE CPLQPTPKRK YQGTSQTFLF TTIYGEPRIF RPTGANRYYL
MCMNEFLAFG GGGNFALCLD EDLLKATSGP SETFGNECLA SSTEPFELKNV ELWGFahasq
YLS

```

```

> At4g39870 - AtOXR4
MGKHKSFRRK AVHFVTDLTA GLLNPISDKP SSAHPPPPLP DEEDESQRNQ LESTTAEQPK
DLVDEPDTSS FSAFLGSLLS SDPKDKRKDQ DPEDEEEDDEE DEEEDSEAET SDTSSSSANP
TRTMKETTSG GAAKKSFLSK YKQHFRNFYQ AVKFPGVKER KGNSDVIPDD EETEYDGLLE
MKPMQNNNVK EEVTVVVQAI IPEISEPSLL LSEQSRRSLY TSLPALVQGR KWILLYSTWR
HGISLSTLYR KSLLPGLSL LVVGDGRKGSV FGGLVEAPLI PTDKKYQGTN STFVFTNKSG
QPTIYRPTGA NRFYTLCSKE FLALGGGGRF ALYLDSELLS GSSAYSETYG NSCLADSQDF
DVKEVELWGF VYGSKYDEIL AHSKTMPEGL CRWS

```

Figura 7.1-1 | Proteínas con dominios TLDc. Se muestra la secuencia de proteína de HsOXR1 (NP_060472) empleada como secuencia de referencia para aplicar el algoritmo BLAST y las secuencias recuperadas desde el proteoma de Arabidopsis (Taxid 0742) correspondientes a los genes *At2g05590* y *At4g39870*. En rojo se indica el dominio TLDc.

El resultado del BLAST indica que la mayor identidad de secuencia se encuentra en el dominio TLDc de las proteínas. Luego se aplicó el algoritmo *pairwise alignment* del sitio web <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services> (McWilliam y col., 2013), pero en modo de alineamiento local teniendo en cuenta los dominios TLDc de las proteínas HsOXR1 y AtOXR2. El resultado obtenido (Figura 7.1-2) muestra que la similitud de secuencia entre la proteína humana y la de Arabidopsis alcanza un 55%, siendo la identidad del 36%. Si se ejecuta el mismo algoritmo para las proteínas completas AtOXR4 y HsOXR1, se obtiene una identidad y una similitud de secuencia menores porque existen porciones de AtOXR4 en el dominio N-terminal con baja similitud que impiden que el algoritmo restrinja el alineamiento local al dominio TLDc. Sin embargo, si se comparan los dominios TLDc_{AtOXR4}-TLDc_{HsOXR1}, entonces se obtiene un valor similar (40,4% de identidad y 54,4% de similitud) al obtenido para el alineamiento TLDc_{AtOXR2}-TLDc_{HsOXR1}.

```

#=====
# 1: HsOXR1
# 2: AtOXR2
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 169
# Identity:   67/169 (39.6%)
# Similarity: 93/169 (55.0%)
# Gaps:       4/169 (2.4%)
# Score: 277.5
#=====

```

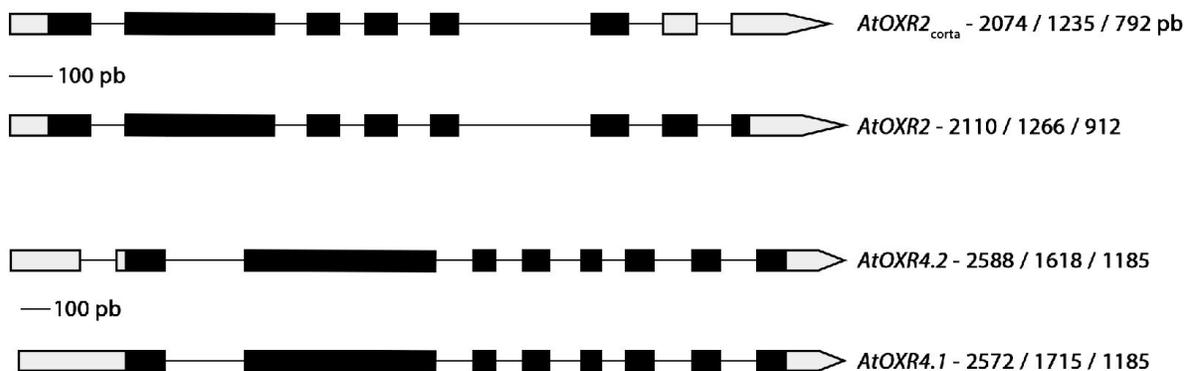



Figura 7.1-3 | Estructura exón-intrón de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*. Las regiones codificantes se muestran representadas por cajas negras mientras que los intrones se representan con líneas negras. Las regiones no codificantes (UTR) se representan en cajas grises. A la derecha de los nombres se informan las longitudes en pares de base (pb) del gen/ transcripto/ región codificante, para cada miembro en estudio.

Este trabajo de tesis se inició con el estudio de estas dos proteínas. Sin embargo, posteriormente, utilizando otros algoritmos de BLAST más complejos como el PSI-BLAST (Altschul y col., 1997), en el genoma de *Arabidopsis* encontramos otros genes codificantes para proteínas que contenían el dominio TLDC. Así, identificamos los genes *At1g32520*, *At5g39590* y *At5g06260*. Debido a que al momento de iniciar el estudio, el último de los miembros identificados parecía estar siendo estudiado por otro grupo (Domoki, 2005), avanzamos sólo con el estudio de los otros dos miembros restantes a los que llamamos *AtOXR1* y *AtOXR5*, por encontrarse en los cromosomas 1 y 5 de *Arabidopsis*, respectivamente.

En la figura 7.1-4 se muestran las secuencias proteicas de *AtOXR5* y *AtOXR1*. El dominio TLDC (resaltado en rojo) de la proteína *AtOXR1* es el más divergente entre las proteínas de *Arabidopsis*.

```
> At5g39590 - AtOXR5
MGASSSTDDK ESSEKREIES LAASTGALPL LKRSFSKLVD SQTNTVPFQS LKQSFGLSYD
TITTEGEQKV SDLFPKLEH LGSSLVDLFF VPDKEGLSWV EFASGYVKCC GRMSNSMSFN
TLRLVYYVTA KNAGFSPKLE FESDEADCKI NGSISVSELL VFLWMCWTMS WDGRSSKAAE
MKGCLFLPDI SHLILSAVVS CTDSESGNSL DVWETDVSGE ELELPIGKFL TWALMTVPCL
TECLSHFCNS RLQNV TSAED GSGPSKSTAV DDSASKTSEN TLLTCGRAWA ISLTSKSTIS
EEILSSCFPG NSGEPNEHLL YRSYYHGKGM NRLWSNVEGY HAPILVIISA SCKVEHEATS
SERKWWIGAI LQQGFENRDA FYGSSGNLFS ISPVFHAFSS SGKEKNFAYS HLHPAGGVYD
AHPKPVGIGF GGTGNERIF IDEDFAKITV RHHAVDKTYQ SGSLFPNQGY LPVEALVLDI
EAWGLGGNKA REIQQYQKR EELFTNQRRK IDLKTFTNWE DSPEKMMMDM MGNPNAPRKE
```

ER

```
> At1g32520 - AtOXR1
MASCAISNSF HTVTFKTLKR ISPYNLSFGW NSGKKIDNIR PPQQPAYHDD VEIPFSLSMV
NKTFLKGREL KCCYKASIDG FGATKHERC DFKGPCVIAA YTKDKSFKFG GFSPEGYRST
DDYYDTFDAF LFYWLEDCDD PIVLPKVGGS GAALFDYARG GPQFGADGLL IGPPLAPVMG
GFAGPDTNSG IGDLRVAKSR LGLSYAKRKD GKESIFGDEN KVSLDDVLVF CSPYIASLY
```

Figura 7.1-4 | Proteínas con dominios TLDC en Arabidopsis. Se muestra la secuencia de proteína de AtOXR5 y de AtOXR1. En rojo se indica el dominio TLDC.

A modo comparativo, en la figura 7.1-5 se muestran las estructuras exón-intrón de los genes *AtOXR1*, *AtOXR5* y *At5g06260*.

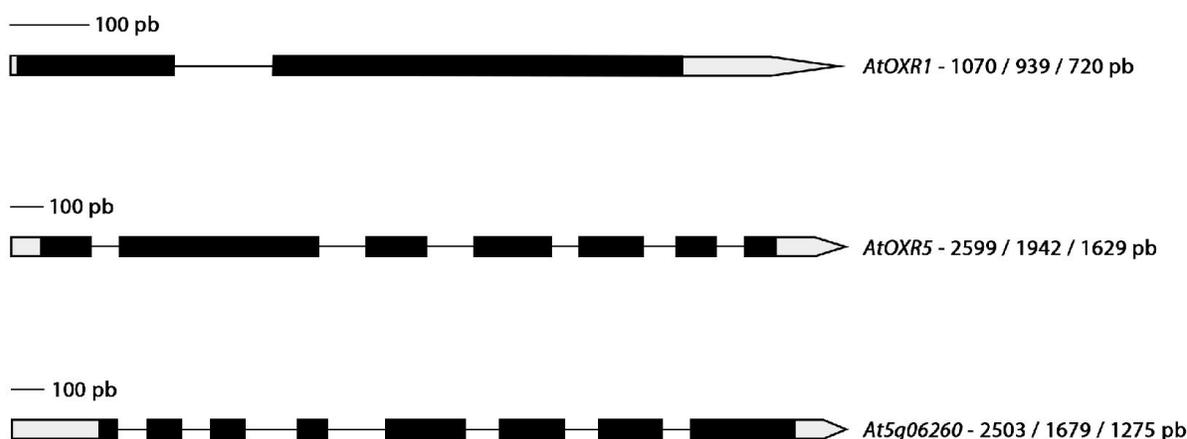


Figura 7.1-5 | Estructura exón-intrón de los genes *AtOXR1*, *AtOXR5* y *At5g06260*. Las regiones codificantes se muestran representadas por cajas negras mientras que los intrones se representan con líneas negras. Las regiones no codificantes (UTR) se representan en cajas grises.

Es notorio que en todos los genes de la familia OXR de Arabidopsis, excepto en *At5g06260*, encontramos un exón inicial y un segundo exón de mayor tamaño. Considerando la estructura génica, los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* parecen ser los más similares de la familia. Se ha postulado que la posición de los intrones o la estructura exón-intrón puede asociarse con un origen evolutivo común (Rogozin y col., 2005). Ambos genes poseen 8 exones y 7 intrones, sin embargo difieren significativamente en sus regiones no codificantes.

En la figura 7.1-6 se muestra un resumen de la estructura de las proteínas de la familia OXR de Arabidopsis, señalando los dominios proteicos incluidos en la base de datos InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) que han sido identificados en las mismas.

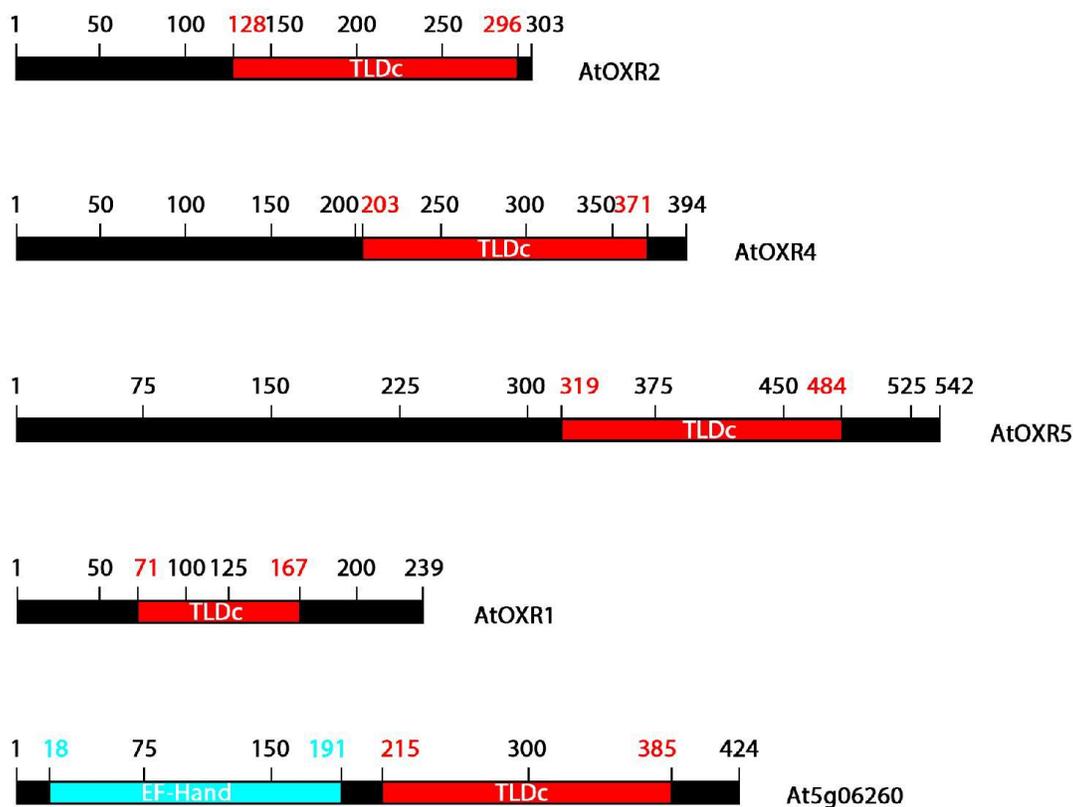


Figura 7.1-6 | Familia OXR de Arabidopsis. Estructuras de las proteínas OXR, con los dominios destacados según se notifican en la base de datos InterPro. En la gráfica se muestran las longitudes de las proteínas, así como también del dominio y los residuos de inicio y finalización del dominio.

En la figura 7.1-6 se puede apreciar que el dominio TLDC comprende entre 165 y 170 aminoácidos en 4 de las 5 proteínas de la familia. Sin embargo, el dominio TLDC de AtOXR1 consta de 96 aminoácidos. Esta disminución en el dominio TLDC deriva en un menor porcentaje de identidad, y como consecuencia, AtOXR1 es la proteína más divergente de la familia. Además, la proteína codificada por el gen At5g06260 posee un dominio EF-hand en su porción N-terminal.

Con el conjunto completo de proteínas con dominios TLDC de Arabidopsis procedimos a realizar un alineamiento múltiple de secuencias para visualizar aquellas

regiones de mayor conservación por fuera del dominio TLDc (Figura 7.1-7). Considerando los valores de identidad y similitud de secuencia que se muestran en la matriz de identidad son bajos es difícil sugerir un origen evolutivo común entre estas proteínas.

```

AtOXR1 -----
AtOXR5 MGASSSTDD--KESSEKREIESLAASTGALPLLKRS-----FSKLVDSQTNTVPFQSLKQ
At5g06260 MGNSNSSSVDRHFISASRAFT-----QKKLDDLKSL-----FVSLASN-----
AtOXR2 -----MHALKDKVSKLNSLNFADSPSQSASPR-Y--
AtOXR4 MGK-----HKSFR-----SKAVHFVTDL-TAGLLNPI SDKPSSAHPPPLPD

AtOXR1 -----
AtOXR5 SFGL----SYDTITT-EGEQKV----SDLFPKLEHLGSSLVDLFFVPDKEG-----
At5g06260 -----SQSNDQYVSYP--VFQYFGLSGSLGERMFDMVTQRRKDDKMTY-
AtOXR2 -----SNSDSPKARLNSVVGKSLSSYFSFVVPQS-----GN-----
AtOXR4 EEDESKRNQLESTTAEQPKDLVDEPDTSSSFAFLGSLSSD-----PKDKRKDQDPEDE

AtOXR1 -----
AtOXR5 -----LSWVEFASGYVKCCGRMSNSMSFNTLLRVYYVTAKNAGFSPKLEFESDEADC
At5g06260 -----EDLVI AKATYEKGT DDEIAEFIYQTL-----D--V
AtOXR2 -----EEDSEL-----CPPLPIRTESEYECI-----ENCK
AtOXR4 EDEEEDEEEDSEAETS DTSSSSANPTRM-----K--E

AtOXR1 -----MASC AISNSFH
AtOXR5 KINGSISVSELLVFLWMCWTMSWDGRSSKAEMKGCLFLPDISHLILSAVV SCTDSESGN
At5g06260 NGNGVLSRSDLESFLVVIKSVFSTESSDAESSD---YKRMVDALLNAATFSKSDDGSEK
AtOXR2 SANGQA---KAGTFI-----SI---GED-----KDCELR
AtOXR4 TTSGGA---AKKSFL-----SK---YKQHF RNFYQAVKFPGVKERKGN
. . .

AtOXR1 TV-----TFKTLKRISPYNLSFGWNSG-----KKIDNIRPPQQP
AtOXR5 SLDVWETDVSGLELELPIGKFLT WALMTVPCLTECLSHFCNSRLQNV TSAEDGSGPSKST
At5g06260 -----GMSFEDFRSWCSFV-PTIRKFLGSLMPPST-----VRPGYQV
AtOXR2 -----VSAKVE-ESGNDYFDGVKK-----
AtOXR4 -----SDVIPD-DEETEYDGL EMKPMQNN-----NVKEEVTV

AtOXR1 AYHD---D-----VEIPFSLSMVN-----KTFLKGREL KCCYKASIDG
AtOXR5 AVDD-SASKTSENTLLTCGRAWAISLTSKSTISEEILSSCFPGNSGEPNEHLLYRSYYHG
At5g06260 PHLLYEDSVSSDRLL LKKEYAWH-----IGGALP-HHELVEWKLLYHSSVHG
AtOXR2 -----MRELTESSVFITANLFEF-----LHASLPNIVRGCKWILLYSTLKHG
AtOXR4 VVQAIPEISEPSLL LSEQSRRS-----LYTSLPALVQGRKWILLYSTWRHG
. . . . .
: * : .*

AtOXR1 FGATK FHERCD--FKGPCV I IAY-----TKDKSFKFGGFSPEGYRST--DDYYDT
AtOXR5 KGMNRLWSNVEGYH-APILV I ISASCKVEHEATSSERKWVIGAILQQGFENR--DAFYGS
At5g06260 QSFNTFLGHTSNTGMSASV L I I-----KDTEGYVYGGYASQPWERY--SDFYGD
AtOXR2 ISLRTLLRRSG-ELPGPCLLVA-----GDKQGA VFGALLECLPQPTPKRKYQGT
AtOXR4 ISLSTLYR KSL-LWPGLS L LVV-----GDRKGSVFGGLVEAPL IPTD-KKYQGT
. : . . : : . . * . :

AtOXR1 FDAFLFYWLEDCDDPIVLPKVGGSGAALFDYAR---GGPQFGAD-----G
AtOXR5 SGNL-ESI-SPV--FHAFSSSGKE--KNFAYSHLHPAGGVYDAHPKPVGIGFGGTLGNER
At5g06260 MKSFLEQL-NPK--AAIYRPTGAN--TNIQWC-----ATNFTSENI PNGIGFGKINHFG
AtOXR2 SQTFLFTTIYGE--PRIFRPTGAN--RYYLMC-----MNEFLA-----FGG-GGNFA
AtOXR4 NSTFVETNKSGQ--PTIYRPTGAN--RFYTLC-----SKEFLA-----LGG-GGRFA
: * : . . : :

```

```

AtOXR1  LLIGPPLAPVMGGFAGPD TNSGIGDTRVA-----KSRLGLSYAKRKDG-----
AtOXR5  IFIDEDFAKITVRHHAVDKTYQSGSLFPNQGYLPVEALVLDIEAWGLGGNKAR-EIQQKY
At5g06260 LFI SASFDQGGTF---ECTTFGSPSLSKTSRI-----QPEVIECWGIVQASNEQDTKHN-
AtOXR2  LCLDEDLLKATSG---PSETFGNECLASSTEF-----ELKNVELWGFHAHASQYLS-----
AtOXR4  LYL DSELLSGSSA---YSETYGN SCLADSQDF-----DVKEVELWGFVYGSKYDEILAH S
          : : : . * . * : .

AtOXR1  --KESIFGDENKVS LDDVLFVCS----PYIASLY-----
AtOXR5  QKREELFTNQRRKI--DLKTFTNWEDSPEK-MMMDDMMGNPNAPRKEER
At5g06260 -----AM--KGTVLERFKEDRNMLKLVGMAGNSND-----
AtOXR2  -----
AtOXR4  -----KT--MEPGLCRWS-----

```

Matriz de porcentaje de identidad

	AtOXR1	AtOXR5	At5g06260	AtOXR2	AtOXR4
1: AtOXR1	100.00	17.54	17.86	17.83	15.30
2: AtOXR5	17.54	100.00	22.41	16.78	16.99
3: At5g06260	17.86	22.41	100.00	22.02	23.48
4: AtOXR2	17.83	16.78	22.02	100.00	43.20
5: AtOXR4	15.30	16.99	23.48	43.20	100.00

Figura 7.1-7 | Alineamiento de proteínas de la familia OXR en Arabidopsis. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos de TAIR. El alineamiento se realizó mediante el programa Clustal 12.1. En amarillo se indican los residuos similares y en verde los residuos idénticos. Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos están señaladas con un asterisco, aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados están identificadas con uno o dos puntos, de acuerdo al grado de conservación. Se muestran los porcentajes de identidad entre los miembros de la familia OXR de Arabidopsis en forma matricial.

Uno de los pasos que ejecuta la rutina de Clustal es la confección de árbol filogenético básico que le permite derivar la relación evolutiva existente entre las secuencias (McWilliam y col., 2013). Una vez determinada esta relación, el software procede al alineamiento de secuencias, partiendo de la premisa de que conoce cuál es el miembro más lejano de la familia y cuáles son los más similares. El árbol obtenido se muestra en la figura 7.1-8.



Figura 7.1-8 | Árbol filogenético para las proteínas con dominio TLDc en Arabidopsis. La relaciones filogenéticas fueron calculadas y graficadas mediante Clustal 12.1 utilizando las secuencias que se muestran en la figura 7.1-7.

La primera conclusión a la que se aborda luego de analizar el alineamiento múltiple de la familia OXR de Arabidopsis, es que el mayor porcentaje de similitud de secuencia se encuentra en el dominio TLDc y, por lo tanto, este análisis tiene tanta información que nubla aquella que se pretende rescatar. Como se anticipó previamente, AtOXR1 es la proteína más divergente de la familia debido al tamaño de su dominio TLDc. Con el fin de recuperar más información, se realizó un análisis sólo con el dominio TLDc de las proteínas OXR de Arabidopsis, excluyendo el dominio divergente de la proteína AtOXR1 (Figura 7.1-9).

La primera observación para destacar es la presencia de dos tríadas de aminoácidos neutros, LLY perfectamente conservados (en verde, al comienzo del dominio) y L(V)L(V)L(V) muy conservados (amarillo, comienzo del dominio, figura 7.1-9). Luego, se observa una secuencia de siete glicinas conservadas sobre 17 residuos conservados (verde y negrita, figura 7.1-9). Se observa conservación en el número de aminoácidos hidrofóbicos (7 sobre 17). Tan sólo 3 residuos polares se encuentran dentro de los conservados: E, H y T (uno sin carga neta, uno con carga positiva, y otro con carga negativa).

```

AtOXR5      -----LLYRSYYHCKGMNRLWSNVEGY-HAPILV
At5g06260   -----RLLLKKEYAWHIGGALP-HHELVEWKLLYHSSVHCQSFNFLGHTSNTGMSASVL
AtOXR2      -LTESSVFITANLFEFLHASLPNIVRGCKWILLYSTLKHGICSLRLLRRSG-ELPGPCLL
AtOXR4      EISEPSLLLSEQSRRLSRLTSLPALVQGRKWILLYSTWRHGISLSTLYRKSL-LWPGLSLL
                *** : ** .: : . . : :

AtOXR5      IISASCKVEHEATSSERKWIIGAILQQGFENR--DAFYSSGNL--FS-ISPVFHAFSSSG
At5g06260   II-----KDTEGYVYGGYASQPWERY--SDFYQDMKSLFQ-LNPKAAIYRPTG
AtOXR2      VA-----GDKQGANFGALLECLQPTPKRKYQCTSQTFLFTTIYGEPRIFRPTG
AtOXR4      VV-----GDRKGSVFGGLVEAPLIPTD-KKYQCTNSTFVETNKSGOPTIYRPTG
                : . . * * . . : * .: * : : *

AtOXR5      KEKNFAYSHLHPAGGVYDAHPKPVGIGFGGTLGNERIFIIDEDFAKITVRHHAVDKTYQSG
At5g06260   ANTNIQWC-----ATNFTSENI PNGIGFGCKINHFLFI SASFDQGQTF---ECTTFGSP
AtOXR2      ANRYLLMC-----MNEFLAF-----GG-GGNFALCDEDLLKATSG---PSETFGNE
AtOXR4      ANRFYTLT-----SKEFLAL-----GG-GGRFALYLDSELLSGSSA---YSETYGNS
                : . : : ** . : : . : * : .

AtOXR5      SLFPNQGYLPVEALVLDIFANGLI-
At5g06260   SLSKTSRI-----QPEVIECNIGIV-
AtOXR2      CLASSTEF-----ELKNVLLWGFV-
AtOXR4      CLADSQDF-----DVKEVLLWGFV-
                . * . : * ** :

```

Matriz de porcentaje de identidad generada

	AtOXR5	At5g06260	AtOXR2	AtOXR4
1: AtOXR5	100.00	26.57	24.81	19.55
2: At5g06260	26.57	100.00	25.47	28.57
3: AtOXR2	24.81	25.47	100.00	57.14
4: AtOXR4	19.55	28.57	57.14	100.00

Figura 7.1-9 | Alineamiento del dominio TLDC de las proteínas de la familia OXR en Arabidopsis. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos de TAIR. El alineamiento se realizó mediante el programa Clustal 12.1. En amarillo se indican los residuos similares y en verde los residuos idénticos. Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos están señaladas con un asterisco, aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados están identificadas con uno o dos puntos, de acuerdo al grado de conservación. Se muestran los porcentajes de identidad para los dominios TLDC entre los miembros de la familia OXR de Arabidopsis en forma matricial.

7.1.2. Reconstrucción filogenética de genes homólogos a *AtOXR2* y *AtOXR4* en plantas.

Con el fin de intentar comprender la historia evolutiva de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* en las especies vegetales, decidimos confeccionar un árbol filogenético para cada gen en estudio y sus homólogos en distintas especies vegetales.

De acuerdo con lo reportado por Volkert y col. (2000), la familia OXR sólo se encuentra en organismos eucariotas. Debido a la similitud que presentan las proteínas OXR2 y OXR4 en plantas, decidimos realizar una única reconstrucción filogenética considerando ambos genes. Para la reconstrucción se utilizaron 165 secuencias curadas, provenientes del clado *Viridiplantae* de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dichas secuencias se ajustaron mejor a un modelo JTT+G (Jia y col., 2014; Jones y col., 1992; Yang, 1993, 1994). Para obtener este modelo se empleó el software MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>) y este mismo software fue utilizado para la reconstrucción filogenética (Hall, 2013; Tamura y col., 2013). La calidad del árbol se evaluó mediante *bootstrap*. Luego de aplicar sistemáticamente cada uno de estos pasos a los genes *AtOXR4* y *AtOXR2* se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 7.1-10.

Al inspeccionar el árbol se puede observar que el mismo se encuentra enraizado en el clado *Clorofita*, al cual pertenecen las algas verdes. Además, puede inferirse que *AtOXR2* y *AtOXR4* se generaron en un evento de diversificación ancestral que afectó al

clado de las *Embriofitas* o plantas terrestres. Mientras que las *Gimnospermas* parecen haber recibido una sola copia de este ancestro, las angiospermas en su mayoría poseen copias de *OXR2* y *OXR4* en su genoma. Además, en aquellas especies con genomas poliploides, como por ejemplo *Camelina sativa* que es hexaploide (Kagale y col., 2014), cada gen (*OXR2* y *OXR4*) se encuentra triplicado. También puede observarse que los genes *OXR* no tienen representantes dentro de los musgos (*Briofitas*), a excepción de las copias que existen en *Physcomitrella patens*. Esto podría deberse quizás a la existencia de genomas secuenciados parcialmente en la base de datos.

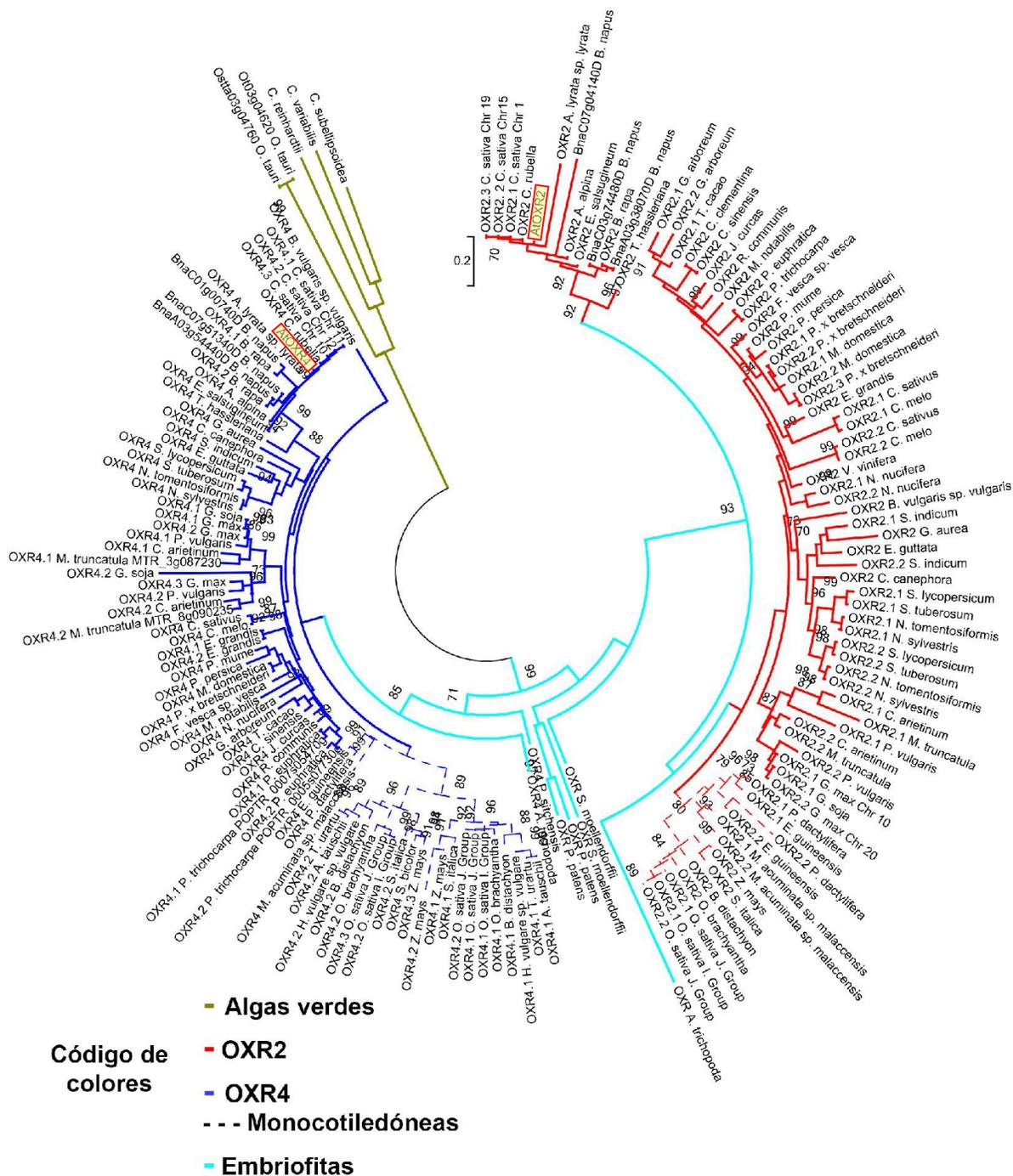


Figura 7.1-10 | Representación gráfica de la reconstrucción filogenética realizada sobre el clado *Viridiplantae*. En la representación se observa que el árbol se encuentra enraizado en el clado de las algas verdes. Inmediatamente después, el árbol desarrolla aquellas secuencias pertenecientes a las *Embriofitas*. Dentro de las *Embriofitas* se observa como el árbol se divide en *AtOXR4* (en azul) y *AtOXR2* (en rojo). Con estos colores se puede identificar, con línea continua a aquellas secuencias pertenecientes al clado de las *Dicotiledóneas*, mientras que en línea de puntos a las *Monocotiledóneas*. Los valores de *bootstrap* superiores al 70% se colocan próximos a cada nodo, aquellos valores más pequeños no se reportan como se realiza habitualmente en las publicaciones.

Las secuencias utilizadas para la reconstrucción filogenética del clado *Viridiplantae* fueron enviadas al servidor de MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*) (Bailey y Elkan, 1994). A fin de encontrar posibles regiones conservadas dentro del dominio que ayuden a dilucidar la estructura del mismo, hasta ahora desconocida, se realizó una búsqueda de los dominios conservados. Inicialmente detectamos la presencia de tres regiones conservadas dentro del dominio TLDc. Este hallazgo nos lleva a entender el dominio TLDc vegetal como un dominio con tres motivos: un motivo cargado positivamente (que se encuentra C-terminal), un dominio enriquecido en cisteínas y un dominio ácido (que se encuentra N-terminal). Sin embargo, si se amplía la búsqueda a 6 motivos conservados aparece un dominio en la región N-terminal de la proteína que no había sido reportado previamente. Además, aparece un dominio que se encuentra fuera del dominio TLDc, aunque muy cerca hacia el extremo N-terminal. En la figura 7.1-11 se muestra la estructura de los dominios detectados en las proteínas OXR2 y OXR4 del clado *Viridiplantae* por MEME y se comparan dichos dominios entre las dos proteínas.

Existen en la base de datos algunas pocas secuencias proteicas en donde el dominio N-terminal inicial se encuentra desplazado hacia el C-terminal. Incluso en estas versiones, se mantiene el orden de los dominios. Por otro lado, en aquellas versiones del gen en el que falta algún dominio, se sigue respetando el orden. Esta información podría sugerir que el orden de los dominios estaría condicionando la estabilidad proteica. Además, esto podría modificar la funcionalidad ya que es probable que el dominio N-terminal cumpla un rol en las modificaciones postraduccionales. En este sentido hemos recopilado información de distintos servidores donde existe posibilidad de miristoilación. Esto incrementaría la estabilidad proteica en caso de que deba anclarse a membrana.

homóloga a la proteína NCOA7 de humanos, perteneciente a *Danio rerio* (*Dr*, zebrafish). Los autores la llamaron OXR2, y su número de identificación en Genbank es JQ649325. La estructura del cristal se encuentra depositada en la base de datos de PDB (del inglés, *Protein Data Bank*) asociada al código 4ACJ (Blaise y col., 2012). Así, la estructura del dominio TLDc es globular. El dominio TLDc perteneciente al homólogo de la familia presente en zebrafish está compuesto de una estructura tipo β -sandwich formada por dos láminas beta antiparalelas rodeadas por 4 α -hélices, dos hélices bien definidas y dos hélices pequeñas. Cada lámina β está compuesta por seis y cuatro hebras. La primera lámina está formada por las hebras S1, S10, S2, S3, S4, y S5, mientras que la S10 está ubicada entre S1 y S2. Las hebras S6 a S9 forman la segunda lámina. Las dos láminas se organizan como un dominio β -sandwich “pseudo” ortogonal e interactúan entre ellas solamente mediante interacciones hidrofóbicas (Blaise y col., 2012).

Para detectar la identidad a nivel de secuencia y explorar la posibilidad de realizar un modelado estructural, se realizó una nueva búsqueda empleando como motor de búsqueda CBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cblast/cblast.cgi>). Este motor de búsqueda es un BLAST que utiliza la base de datos MMDB (*Molecular Modelling Data Base*) del NCBI, la cual está basada en las estructuras curadas de la base de datos PDB. En la tabla 7.1-1 se resumen los resultados de estructura para las proteínas de la familia OXR de Arabidopsis.

Búsqueda en CBLAST				
	Identidad (%)	Similitud (%)	Valor E	Estructura identificada
AtOXR2	38	53	$1 e^{-26}$	4ACJ_A
AtOXR4	38	53	$8 e^{-25}$	4ACJ_A
AtOXR5	22	40	0,5	4ACJ_A
At5g06260	31	46	$2 e^{-16}$	4ACJ_A
AtOXR1	36	47	2,6	1FAQ_A

Tabla 7.1-1 | Cálculo del valor E y estructuras identificadas apropiadas para el modelado de proteínas pertenecientes a la familia OXR de Arabidopsis. Las estructuras se obtuvieron mediante el algoritmo CBLAST del NCBI.

A partir de los datos mostrados en la tabla 7.1-1 podemos inferir que la estructura resuelta (4ACJ) podrá servir como plantilla sólo para las proteínas AtOXR2, AtOXR4 y At5g06260; y difícilmente los resultados sean aplicables a AtOXR5 y AtOXR1. Si bien AtOXR5 posee un buen porcentaje de identidad y de similitud, el valor E resulta ser poco apropiado. Esto es consecuencia de los “*gaps*” o espacios que debe introducir el algoritmo para alinear adecuadamente ambas secuencias. En la Figura 7.1-12 se muestra un alineamiento múltiple realizado con ClustalO y sobre los datos la estructura secundaria que adoptarían según el modelo propuesto. A fin de facilitar la visualización entre las proteínas AtOXR2, AtOXR4 y DrOXR2, la secuencia de At5g06260 se observa por encima de las otras. Debido a que At5g06260 presenta una extensión en lo que podría llegar a ser la lámina β número 7, se genera la apertura de un “*gap*” en las otras 3 secuencias que no lo poseen. Este tipo de aperturas es lo que generó que AtOXR5 tenga un valor “*p*” muy bajo durante los alineamientos de CBLAST.

Algo característico de la estructura del dominio TLDc de DrOXR2 es que la última lámina β presenta una orientación que cambia hacia el final de la proteína. Es decir, la hebra 10 presenta un quiebre entre los residuos VQ (Figura 7.1-12) que hace que la hebra se reoriente hacia el final de la proteína. El residuo aminoacídico Q es uno de aquellos que presenta conservación en la estructura, siendo un residuo cargado positivamente para el caso de AtOXR2 y AtOXR4, y negativamente en el caso de At5g06260.

En la figura 7.1-12 también se observa que no existe un patrón espacial de conservación en los residuos conservados. Mientras algunos residuos se encuentran sobre estructuras secundarias como hélices α , otros sobre láminas β , y otros sobre bucles o *loops*. Se puede ver que las láminas 6 y 9 son las más divergentes de la estructura. Probablemente, estas sean las que le confieren la especificidad de sustrato a cada proteína. Entre estas láminas se encuentran la 7 y la 8, ambas totalmente hidrofóbicas.

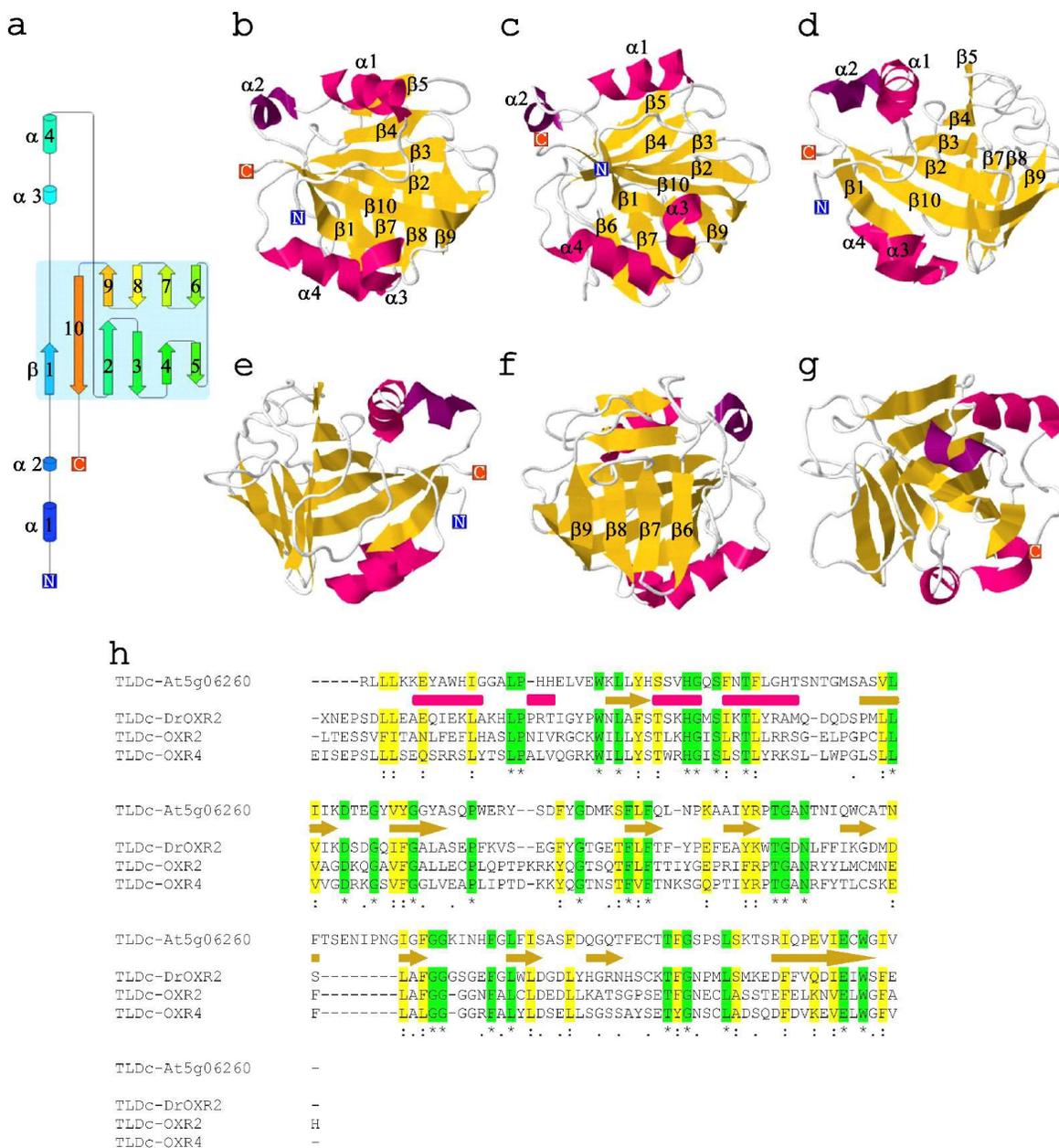


Figura 7.1-12 | Información estructural del dominio TLDC. **a-** Topología de estructura secundaria obtenida mediante el servidor Pro-Origami (Stivala y col., 2011), utilizando la secuencia cristalizada 4ACJ. **b y c-** Estructuras del dominio TLDC orientadas para facilitar la visualización de las hélices alfa ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, y $\alpha 4$); $\alpha 2$ y $\alpha 3$ son pequeñas, y no todos los algoritmos de visualización de estructuras las reconocen como tales. **d,** **e,** **f y g-** Imágenes de la estructura del dominio TLDC visualizadas desde distintos ángulos. **h-** Estructura primarias de las proteínas AtOXR2, AtOXR4, At5g06260 y DrOXR2 (*Danio rerio* OXR2), con las estructuras secundarias destacadas en la parte superior de la secuencia DrOXR2. El alineamiento se realizó con Clustal12.1, y las estructuras secundarias fueron adaptadas de Blaise y col., (2012). Rectángulos redondeados: Hélices α ; Flechas marrones: Láminas β .

Muchas de las observaciones realizadas hasta el momento radican únicamente en un alineamiento de secuencias. Para profundizar la discusión se enviaron las secuencias de las proteínas AtOXR2, AtOXR4 a modelar mediante “*threading*” (o modelado estructural) al servidor de I-TASSER (Yang y col., 2015; <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). A modo de resumen, en la figura 7.1-13 se compilan los datos relevantes obtenidos luego del procesamiento a través de este servidor.

Si bien a nivel de los residuos era previsible, luego del modelado hay evidencia estructural de que el dominio TLDC es principalmente hidrofóbico (Figura 7.1-13 b y g, residuos resaltados en violeta y rosado). Debido a esto, es esperable que el dominio esté involucrado en el procesamiento de moléculas hidrofóbicas o bien que interaccione con proteínas que contengan dominios hidrofóbicos. La estructura globular de AtOXR2 probablemente dificulte el acceso de otras proteínas (Figura 7.1-13 c-e), mientras que la estructura tipo cilindro de AtOXR4 le permitiría de interactuar con otro tipo de proteínas (Figura 7.1-13 h-j). Es interesante mencionar que entre las dos últimas láminas β del dominio TLDC, tanto de AtOXR2 como de AtOXR4, debe existir una región de 4 aminoácidos expuestos al solvente, que antecede inmediatamente la última lámina β . Dada la particularidad, esto podría suponerse como un requisito estructural.

de un buen modelo). Este valor “C” permite confeccionar una lista con los mejores modelos obtenidos. Para el caso de AtOXR2 el mejor modelo obtuvo un valor de -2,85 (Figura 7.1-13 c, d y e); mientras que para el caso de AtOXR4 este valor es de 0,04 (Figura 7.1-13 h, i y j). Con estos modelos se pueden buscar estructuras similares en la base de datos del PDB. El hecho de haber obtenido un mejor modelo para AtOXR4 también permite suponer que la búsqueda estructural arrojará mejores resultados. En este caso la estructura que más se parece al modelo obtenido para AtOXR4 es la de una Serralisina de *Pseudomonas spp.*, cuyo código de ingreso al PDB es 1G9K (Aghajari y col., 2003). Las Serralisinas son metaloendoproteasas, en su mayoría extracelulares, que utilizan metales y agua para catalizar la proteólisis (Buckley y Jessen, 2015). Reforzando esta hipótesis, 1G9K no es la única serralisina que apareció en el listado de proteínas estructuralmente similares al modelo de AtOXR4. Además, aparecieron 1KAP (Baumann y col., 1993), 1SMP (Baumann y col., 1995), 1K7I (Hege y Baumann, 2001), 3HBV (Oberholzer y col., 2009) y 1SAT (Baumann, 1994). Todas estas proteínas presentan estructuras de serralisinas. Por otro lado, si bien el modelo indica que AtOXR4 tiene una estructura similar a la serralisina, la proteína de Arabidopsis no presenta los residuos de histidina que median la interacción con Zn^{2+} , ni los residuos de aspartato, asparagina y valina que median la interacción con Ca^{2+} (Aghajari y col., 2003). Esto implica que AtOXR4 no tendría actividad serralisina, sin embargo, se puede inferir que AtOXR4 podría interactuar con proteínas que son sustratos de las serralisinas, o bien con sus productos enzimáticos.

Para el modelo de AtOXR2, la estructura más parecida que aparece en el PDB forma parte de un complejo que se encuentra cargado con el código 4V7F (Leidig y col., 2014). Este complejo se corresponde con una pre-partícula ribosomal. Sin embargo, debido a los bajos valores que se observan en los indicadores de I-TASSER, ($TM-score^1$ y $RMSD^2$), es difícil sostener esta apreciación.

¹ *Template Modeling score*, permite cuantificar la calidad de las plantillas de estructura proteica predicha (Zhang y Skolnick, 2004).

² *Root Mean Square Deviation*, es un valor que permite calcular la distancia entre dos átomos que se corresponden entre sí en dos proteínas distintas.

7.1.4. Caracterización de las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 mediante la utilización de sistemas heterólogos.

7.1.4.1. Sistemas procariotas: Bacterias.

La respiración de organismos aerobios produce ROS como subproductos. El oxígeno activado, inestable y reactivo, es capaz de modificar lípidos, proteínas y ADN (ver Introducción 4.1 y 4.2), pudiendo generar daños irreversibles y heredables a nivel celular. Foster y col. (1987) publicaron el desarrollo de un sistema de detección que, a través de variaciones fenotípicas en una cepa de bacterias genéticamente modificada, era capaz de identificar aquellas mutaciones en el ADN bacteriano que producían la transversión CG - AT.

Al poco tiempo, Cupples y Miller (1989) desarrollaron un sistema similar para detectar distintas reversiones en el código genético. Los autores utilizaron la actividad de la enzima β -galactosidasa, codificada por el gen *LacZ* de *E. coli* para detectar los mutantes (Cupples y Miller, 1989). Dado que esta enzima es la encargada de catalizar la reacción que hidroliza los β -galactósidos en monosacáridos, aquellas células que producen esta enzima en forma activa, son capaces de utilizar lactosa como fuente de carbono. El Glu-461 es un aminoácido esencial para la actividad de la enzima. De esta manera, los autores generaron seis cepas con mutaciones puntuales en el codón del ácido glutámico, todas *Lac⁻*. Cada cepa puede revertir su fenotipo *Lac⁻* sólo si se da la reversión requerida (Tabla 7.1-2). Este sistema presentaba una ventaja respecto al desarrollado con la β -lactamasa. Dado que las bacterias se siembran en un medio sin antibiótico, la selección es menos agresiva y como consecuencia el método es más sensible. Esta sensibilidad le confiere al sistema la capacidad de detectar tasas de sustitución de bases extremadamente lentas. En la tabla 7.1-2 se muestran las transversiones posibles en este sistema.

		β-galactosidasa		
Residuo		459 460	461	462 463
Secuencia		GGG AAT-	GAG	- TCA GGC
CC101	A . T →	C . G	TAG ↓ G	AMBER ↓ Glu
CC102	G . C →	A . T	GGG ↓ A	Gly ↓ Glu
CC103	G . C →	C . G	CAG ↓ G	Gln ↓ Glu
CC104	G . C →	T . A	CAG ↓ G	Ala ↓ Glu
CC105	A . T →	T . A	GTG ↓ A	Val ↓ Glu
CC106	A . T →	G . C	AAG ↓ G	Lys ↓ Glu

Tabla 7.1-2 | Secuencia nucleotídica del gen de la β-galactosidasa y los diferentes codones que codifican el residuo Glu-461 en las diferentes cepas. Cada cepa posee un episoma distinto, que las convierte en una herramienta de detección de mutaciones puntuales específicas. En todos los casos, la cepa portadora de los distintos plásmidos es derivada de la cepa P90C [*araΔ(lac proB)_{XIII}*] con mutaciones en los genes *mutY* y *mutT*, portando un episoma F *lacI⁻ Z⁻ proB⁺*. (Cupples y Miller, 1989).

Utilizando sistemas de esta naturaleza, Cheng y col. (1992), lograron identificar la lesión más común bajo estrés oxidativo; la transversión GC – TA. Para ese entonces ya se conocían las funciones específicas de los genes bacterianos *MUTY* y *MUTM* (Michaels y col., 1991). Mutaciones en ambos genes llevaban a una tasa acelerada de transversiones GC – TA, sin embargo, cada gen tiene un rol distinto. *MUTY* codifica una glucosilasa que se encarga de remover las adeninas mal aparejadas de los pares GA. Por su parte, *MUTM* es una ADN-formamidopirimidina glicosilasa (en inglés, *Fapy-DNA glycosilase*), que se encarga de remover las guaninas oxidadas; mejor conocidas como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanina (Michaels y col., 1991). Posteriormente, esta enzima se denominó FPG (*Fapy-DNA glicosilasa*) por su actividad enzimática (David y col., 2007). Como se mencionó

en el capítulo introductorio de esta tesis, MutM/Fpg pertenecen a una gran familia de enzimas reparadoras, con capacidad de remover las bases oxidadas del ADN. Además, este grupo también incluye los miembros de la familia MutY, los cuales pueden eliminar los residuos de adenina (A) que son incorporados en la hebra complementaria que sufrió oxidación de guanina, durante la replicación. Una tercera clase de enzimas antimutagénicas son las proteínas pertenecientes a la familia MutT, la cual reacciona con los nucleótidos trifosfato oxidados impidiendo su incorporación al ADN durante la replicación (Durand y col., 2007).

7.1.4.1.1. Cuantificación de la capacidad antimutagénica de AtOXR2 y AtOXR4 en bacterias mutantes.

Volkert y col. (2000) aislaron y caracterizaron el primer gen perteneciente a la familia OXR utilizando un modelo experimental basado en una mutante de *E. coli* que presenta capacidad reducida para reparar el daño oxidativo al ADN. En este trabajo de tesis, hemos utilizado esta misma cepa (pMV4709 *fpg⁻ mutY⁻ lacZ⁻*; Volkert y col., 2000; Volkert y col., 2008), gentilmente cedida por el Dr. Michael Volkert. Esta cepa sensible al estrés oxidativo, es capaz de mutar espontáneamente y en dicho proceso revertir de *LacZ⁻* a *LacZ⁺*. Esta reversión le permite metabolizar lactosa. Por lo tanto, si células de *E. coli* pMV4709 se siembran en placas que contienen lactosa como fuente de carbono, sólo crecerán aquellas células que hayan mutado. Es decir, aquellas mutantes que hayan adquirido la capacidad para utilizar este azúcar. De esta manera, creciendo las cepas transformadas con el vector pTrc99A vacío (Volkert y col., 2000; Volkert y col., 2008), o con el gen de interés en medios con lactosa y glucosa, se puede calcular la relación entre las UFC crecidas en lactosa respecto de las crecidas en glucosa. Este valor puede entenderse como un número empírico que mide la tasa a la que mutan ambas cepas (la cepa que fue transformada con el vector vacío, y aquella que fue transformada con el gen de interés) y compararlas.

En este trabajo de tesis se transformó la cepa pMV4709 *fpg⁻ mutY⁻ lacZ⁻*, con el plásmido pTrc99A vacío o conteniendo la secuencia codificante de AtOXR2 o de AtOXR4

(Materiales y Métodos 6.2.7). Las bacterias mutantes transformadas fueron crecidas en medio conteniendo lactosa o glucosa y se contaron las UFC (Figura 7.1-14 a y b).

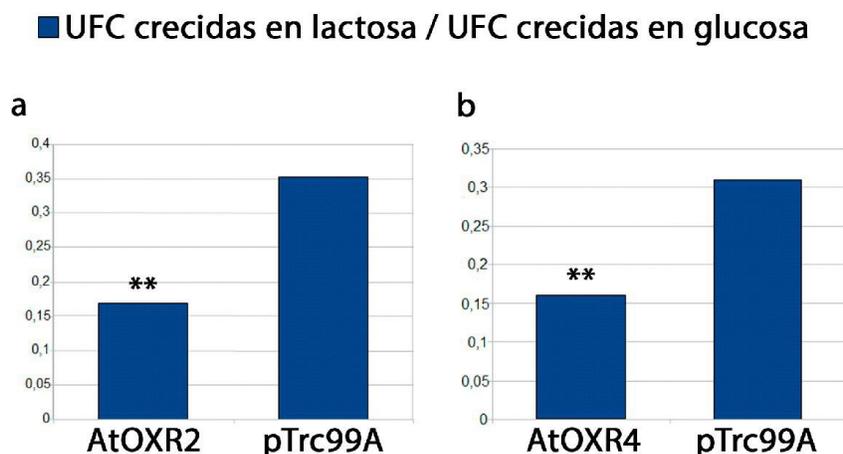


Figura 7.1-14 | Capacidad antimutagénica de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*. a- Resultados obtenidos luego de transformar células pMV4709 con la construcción que permite la expresión de *AtOXR2* o con el vector pTrc99A vacío. b- Resultados obtenidos luego de transformar células pMV4709 con la construcción que permite la expresión *AtOXR4* o con el vector pTrc99A vacío (** = $p < 0,01$).

Las cepas transformadas con *AtOXR2* (Figura 7.1-14 a) o con *AtOXR4* (Figura 7.1-14 b) tienen una tasa de mutación mucho menor que la cepa transformada con el vector vacío. Esto sugiere que la similitud en la secuencia, y posiblemente estructural con HsOXR1, también se extiende a la funcionalidad de las proteínas de Arabidopsis. Aquellas células capaces de sobreexpresar el gen *AtOXR2* o el gen *AtOXR4*, sufren mutaciones espontáneas a una tasa menor (aproximadamente a la mitad) de lo que ocurre con aquellas células transformadas con el vector vacío. Una interpretación alternativa, sugiere que de cada 100 células pMV4709, 35 sufren mutaciones espontáneas si están transformadas con el vector pTrc99A vacío; mientras que 16 células sufren mutaciones espontáneas cuando el vector pTrc99A contiene el gen *AtOXR2*. Para el caso de *AtOXR4*, aproximadamente 17 de cada 100 células mutan cuando tienen el gen de interés dentro del vector, mientras que el control arrojó valores de 31 células cada 100. Esto significa, que a pesar de que ambos genes son capaces de conferir protección contra las mutaciones espontáneas inducidas por estrés oxidativo, la sobreexpresión de *AtOXR2* genera un mayor efecto protector que *AtOXR4* ($16/35 < 17/31$).

7.1.4.2. Sistemas eucariotas: Levaduras.

7.1.4.2.1. Ensayo de complementación en levaduras mutantes.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la sobreexpresión de *AtOXR2* y de *AtOXR4* en un sistema eucariota, se optó por estudiar el efecto de la alteración en los niveles de estos genes en levaduras. Se llevó a cabo un ensayo de complementación y estrés oxidativo en levaduras mutantes en el único gen *OXR* de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScOXR*) (Euroscarf YPL196w (*OXR1*)), cuyo genotipo es el siguiente: BY4742; MAT α ; *ura3* Δ 0; *leu2* Δ 0; *his3* Δ 1; *lys2* Δ 0; YPL196w::*kanMX4*. La complementación se realizó utilizando el vector de expresión en levaduras pMV4614 (Volkert y col., 2004; Figura 7.1-15 a).

Volkert y colaboradores (2004) sugieren que la transcripción del gen *ScOXR* se activa sólo en situaciones de estrés. Coincidente con lo reportado por este grupo, no existen diferencias en el crecimiento de las levaduras mutantes cuando estas son crecidas en condiciones control (Figura 7.1-15 a). Para demostrar una diferencia en el crecimiento se debería someter a las células mutantes a una situación en la cual sea necesaria la activación de su sistema de reparación celular. Una forma de poner a prueba la maquinaria de tolerancia a estrés oxidativo, es exponer la célula a la acción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El ensayo consiste en someter diluciones seriadas de un caldo concentrado de levaduras salvajes (BY4742), levaduras mutantes Y11096 transformadas con el vector vacío y de levaduras mutantes Y11096 transformadas con el plásmido pMV4614 conteniendo la secuencia codificante de los genes de interés (Materiales y Métodos 6.2.48) a concentraciones crecientes de H_2O_2 . Para cuantificar el fenotipo de las levaduras, las diluciones seriadas se sembraron en placas (Figura 7.1-15 b) y se midió la turbidez en medio líquido (Figura 7.1-15 c).

Cuando las levaduras salvajes y las levaduras mutantes en *ScOXR1* son tratadas con 100 y 150 mM de H_2O_2 la diferencia en el crecimiento entre las levaduras mutantes y las salvajes se vuelven notorias. La mutante Y11096 transformada con el vector pMV4614 vacío es más sensible que el genotipo BY4742 transformado con el mismo plásmido

cuando se aplica 100 mM y 150 mM de H_2O_2 (Figura 7.1-15 b y c). Cuando la misma mutante se transforma con el vector conteniendo la secuencia codificante de *AtOXR2* fusionado a la presecuencia de localización mitocondrial de la Superóxido Dismutasa mitocondrial (SOD2), se produce la complementación y se restaura el fenotipo de la cepa salvaje BY4742 (Figura 7.1-15 b y c). Resultados similares fueron obtenidos cuando la complementación se realizó con el plásmido conteniendo la secuencia codificante de *AtOXR4* (Figura 7.1-15 c).

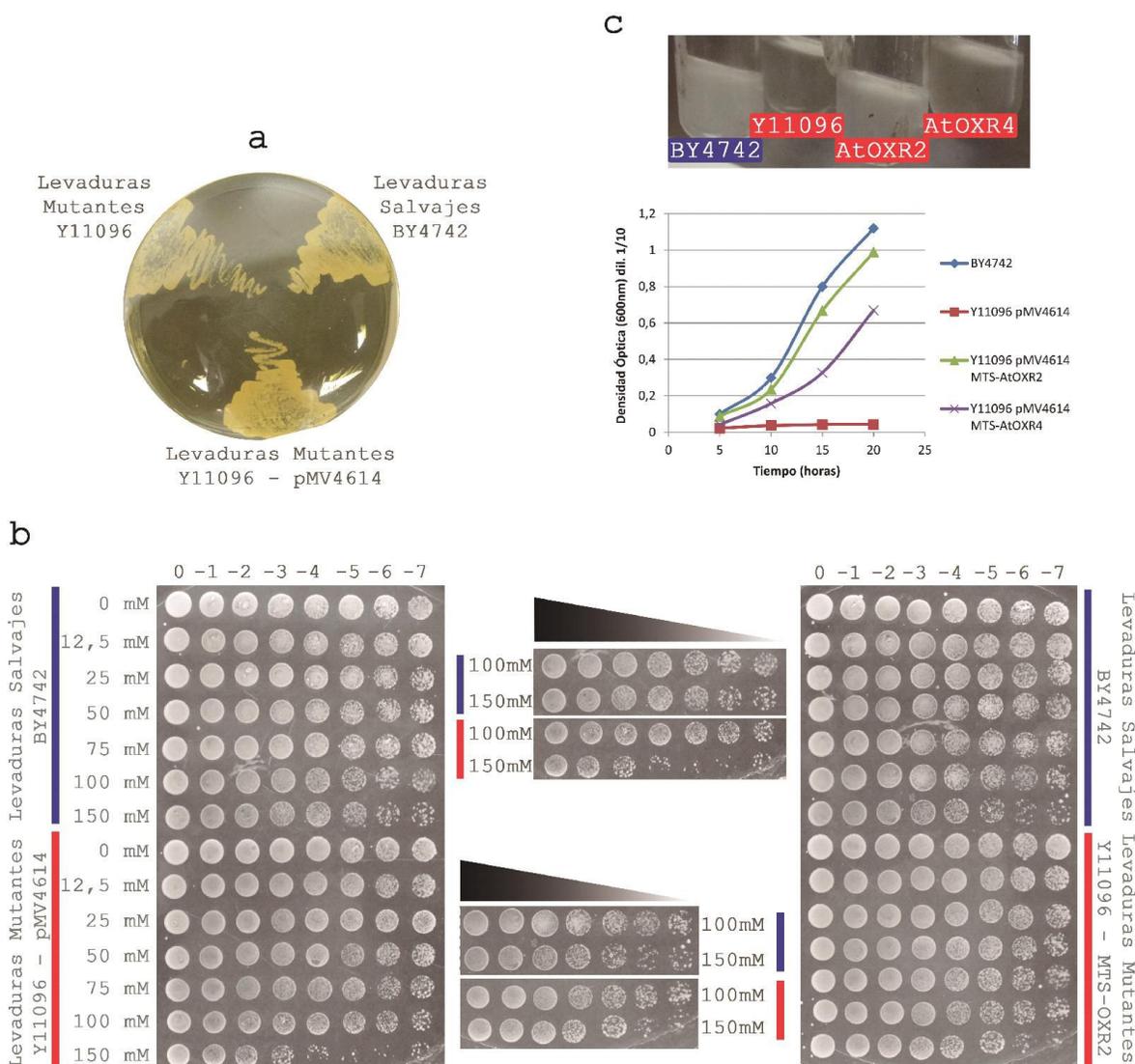


Figura 7.1-15 | Resultados de ensayo de complementación en levaduras. **a-** Placa con estrias crecidas en condiciones control, donde se muestra que no existe diferencia en el crecimiento, tanto de las levaduras salvajes (BY4742), como así también de las levaduras mutantes (Y11096) y de las levaduras mutantes transformadas con el vector vacío (pMV4614). **b-** Placas obtenidas luego de tratar 100 μ L de cultivo de

levaduras con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno durante una hora, y sembrar 10 μ L. Arriba se muestra el log₁₀ del factor de dilución, y los rótulos verticales corresponden a la concentración de H₂O₂ a la cual se sometió el cultivo. En el centro de la figura; arriba, una comparación entre las condiciones de 100 y 150mM de H₂O₂ entre la cepa salvaje y la cepa mutante transformada con el vector vacío. Abajo, comparación de las mismas condiciones sólo que esta vez entre la cepa salvaje y la cepa mutante transformada con AtOXR2 conteniendo un presecuencia de localización mitocondrial (MTS). c- Si se toman 50 μ L provenientes del cultivo utilizado para armar las placas descritas en b, y se repican en 4,95mL de medio fresco, entonces luego de incubar este caldo y medir la densidad óptica, se obtienen los resultados que se muestran en las gráficas. La imagen muestra la diferencia en crecimientos luego de haber transcurrido 20 horas. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

7.1.5. Conclusiones.

Se identificaron por primera vez todos los miembros de la familia OXR de Arabidopsis. Esta familia está compuesta por 5 miembros (AtOXR1, AtOXR2, AtOXR4, AtOXR5 y At5g06260). El miembro más divergente de la familia es *At1g32520*, gen que nosotros hemos denominado como *AtOXR1* dado que está codificado en el cromosoma 1. AtOXR1 contiene un dominio TLDC truncado que se encuentra en el centro de la proteína y es la proteína más pequeña de la familia. Dos miembros se encuentran en el cromosoma 5, *AtOXR5* (*At5g39590*) que codifica la proteína de mayor tamaño de la familia y *At5g06260*, que codifica una proteína que posee un dominio de unión a Ca²⁺. AtOXR2 y AtOXR4 son los miembros con mayor similitud de secuencia entre sí, tal es así que filogenéticamente puede inferirse que tienen un ancestro común. Estas proteínas están representadas en el clado *Viridiplantae*, y en las especies poliploides se respeta el número de copias. Cuando se buscan dominios en las proteínas de AtOXR2 y AtOXR4 del clado *Viridiplantae* se identifican una serie de dominios C-terminal dentro del dominio TLDC, así como también en el comienzo de la proteína. Para el caso de AtOXR2, este motivo N-terminal marca no sólo el comienzo de la proteína, sino también lo que probablemente sea la hélice α más grande de la misma. Cuando se buscan motivos conservados en la proteína AtOXR4 también se encuentra un dominio N-terminal, pero, a diferencia de lo que ocurre con AtOXR2, es probable que este motivo contenga una pequeña lámina β .

Si se modelan las proteínas OXR2 y OXR4 de Arabidopsis tomando como referencia el dominio TLDC de Zebrafish, los modelos dejan el dominio TLDC poco accesible al agua.

Esto se debe a la hidrofobicidad de los residuos que constituyen el dominio. Además, si estos modelos se utilizan para buscar proteínas estructuralmente similares, se obtiene un resultado aceptable sólo para el caso de AtOXR4. En este caso, se puede corroborar que el modelo de AtOXR4 tiene una similitud estructural elevada con las enzimas serralisinas. Sin embargo, no posee los residuos que le conferirían la actividad catalítica.

Finalmente, cuando se complementan bacterias mutantes sensibles al estrés oxidativo, con la secuencia codificante de *AtOXR2* y *AtOXR4* se revierte el fenotipo de sensibilidad. Este resultado sugiere que las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 tendrían un rol en la reparación del ADN o en su protección contra el daño oxidativo, como se ha sugerido previamente (Durand y col., 2007; Elliott y Volkert, 2004; Jaramillo-Gutierrez y col., 2010; Murphy y Volkert, 2012; Oliver y col., 2011; Shkolnik y col., 2008; Volkert y col., 2000; Volkert y col., 2008). La función de las proteínas OXR de *Arabidopsis* durante el estrés oxidativo se ve reforzada con los resultados obtenidos en el sistema eucariota. Las levaduras mutantes en *ScOXR1* son menos sensibles al tratamiento con H₂O₂ cuando se complementan con los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* de *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos en bacterias y levaduras sugieren que AtOXR2 y AtOXR4 podrían participar en la respuesta al estrés oxidativo en plantas.

7.2. CAPÍTULO II

“Estudio y caracterización de los genes que codifican para proteínas AtOXR en Arabidopsis”

CAPÍTULO II

7.2.1. Localización subcelular de las proteínas AtOXR en Arabidopsis.

La localización de proteínas con dominios TLDC no ha sido reportada en plantas. El empleo de predictores informáticos para los distintos miembros de la familia de proteínas AtOXR sugiere una localización mitocondrial, citosólica o cloroplastídica. Sin embargo, en muchos casos el indicador de la predicción RC (de sus siglas en inglés *Reliability Class*) no resulta confiable ya que arroja un valor mayor a 1 (Tabla 7.2-1). Dado que el estudio de la función de cualquier proteína requiere establecer apropiadamente su localización subcelular, nos propusimos determinar la localización de cada uno los miembros de la familia AtOXR mediante ensayos de microscopía láser confocal.

Proteína	AGI_gen	Predictor					
		Plant-mPloc		TargetP 1.1		SloX	
		Localización	Score	Localización	Score	Localización	Score
AtOXR1	At1g32520	Citosol	NA	Cloroplasto	RC 5	Cloroplasto	RC 1
AtOXR2	At2g05590	Núcleo	NA	Cloroplasto	RC 2	Citosol	RC 1
AtOXR4	At4g39870	Núcleo	NA	sin predicción	RC 4	Citosol	RC 2
AtOXR5	At5g39590	Núcleo	NA	sin predicción	RC 5	Membrana	RC 1

Tabla 7.2-1 | Predicción de la localización de proteínas de la familia AtOXR. Se indican los predictores empleados y los niveles de confiabilidad (RC) para la predicción. Para cualquiera de los predictores utilizados un valor de RC mayor a 1 se considera una mala predicción. Plant-mPloc (Chou y Shen, 2010); TargetP 1.1 (Emanuelsson y col., 2000); SloX (Ryngajillo y col., 2011). NA; No se informa el valor de confiabilidad por ser alto.

Considerando la localización mitocondrial de proteínas con dominios TLDC previamente reportada en mamíferos y levaduras (Durand y col., 2007; Elliott y Volkert, 2004), los estudios en Arabidopsis se realizaron empleando una línea de plantas previamente transformadas con una construcción que dirige la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP, de sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) como marcador de localización mitocondrial (plantas conocidas con el nombre de *mt-gk*, Nelson y col., 2007; Steinebrunner y col., 2014). Las plantas *mt-gk* fueron transformadas con diferentes construcciones que permiten expresar las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 fusionadas a la proteína fluorescente roja (RFP, de sus siglas en inglés *Red Fluorescent Protein*) bajo el

control del promotor constitutivo fuerte del virus del mosaico de la coliflor (*35SCamV*) (Materiales y Métodos 6.1.3). Las raíces provenientes de cuatro líneas independientes de plantas transformadas crecidas durante 7 días, fueron analizadas en el microscopio confocal para la realización de las medidas de localización (Materiales y Métodos 6.2.46).

En la figura 7.2-1 se muestran imágenes representativas de los campos observados en al menos 10 células de cada una de las líneas transgénicas evaluadas. En la columna de la izquierda (mt-GFP) se muestra la expresión de la proteína reportera GFP presente en las mitocondrias de células de raíz de plántulas de *Arabidopsis* de 7 días cuando el tejido es irradiado con luz de una longitud de onda de 488 nm. En la columna central se observa la expresión de las proteínas de fusión AtOXR2-RFP y AtOXR4-RFP, cuando el tejido es irradiado con luz de una longitud de onda de 561 nm. En la columna de la derecha se muestra una superposición de ambas imágenes (Materiales y Métodos 6.2.46). Como puede observarse, la señal de RFP colocaliza con la señal de GFP en todos los casos evaluados. Este resultado sugiere que las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 se localizan en la mitocondria de células de raíz de *Arabidopsis*. Para evaluar el grado de colocalización se calcularon las frecuencias de localización superpuesta para cada una de las emisiones, mediante distintos métodos basados en la intensidad de los píxeles en los dos canales de detección (Dunn y col., 2011).

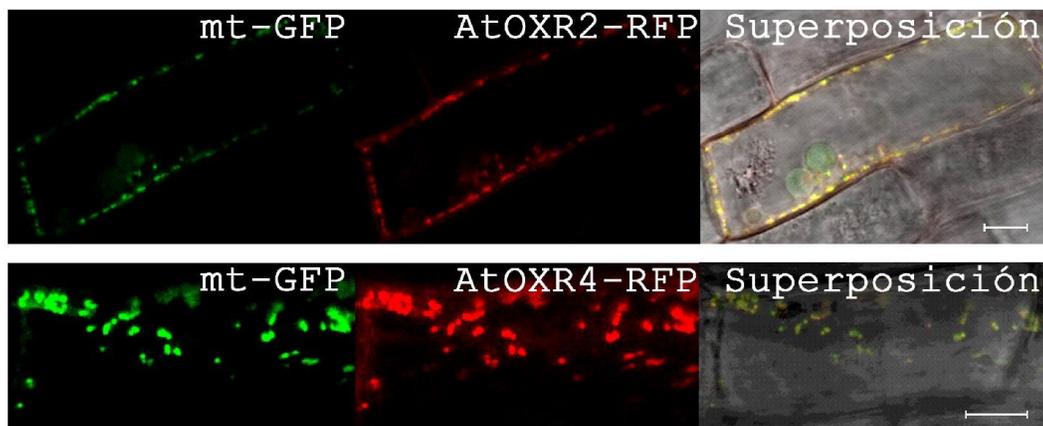


Figura 7.2-1 | Las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 se localizan en la mitocondria de células de raíz de *Arabidopsis*. Raíces de plantas de 7 días que sobreexpresan GFP en la mitocondria (mt-GFP) y AtOXR-mRFP fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Se muestran campos representativos. La imagen de colocalización representa la superposición de los canales de detección de la fluorescencia emitida por GFP y RFP y la luz blanca transmitida. La señal amarilla indica colocalización de igual intensidad entre las señales verde (GFP) y roja (mRFP). Escala = 5 μ m.

En la figura 7.2-2 se muestra el resultado obtenido al graficar los valores de frecuencia para la emisión de GFP en función de los valores de frecuencia para la emisión de RFP, para cada proteína en estudio. Se observa un alto grado de colocalización para las proteínas AtOXR2 y AtOXR4, dado que los coeficientes de correlación de Pearson (CP) obtenidos son mayores a 0,7 considerando un coeficiente igual a 1 a una colocalización perfecta.

Es importante aclarar que el cálculo del CP requiere que las intensidades de los dos canales sean similares. Dado que la expresión de RFP es muy baja respecto del valor de corte del canal de GFP se decidió calcular los coeficientes de correlación de Mendelson (MC) que no consideran la proporción de las intensidades sino la co-ocurrencia de la señal de un mismo pixel en dos canales diferentes. Los coeficientes obtenidos ($MC_{GFP} = 0.959$ y $MC_{RFP} = 0.171$) indican que más del 90% de la señal de GFP colocaliza con la señal de RFP.

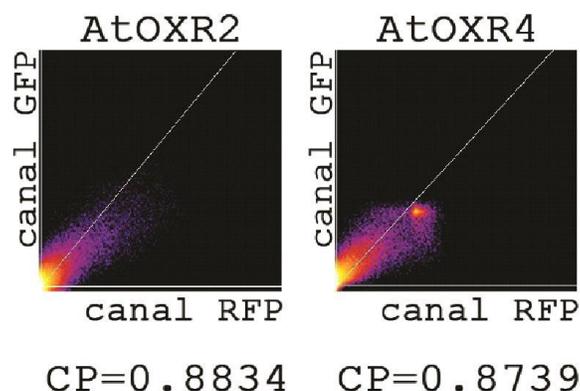


Figura 7.2-2 | Significancia de la colocalización. Las imágenes presentadas en la figura 7.1-1 fueron analizadas con el programa libre Fiji para calcular la significancia de la colocalización mediante un gráfico de dispersión a través de la herramienta *Coloc2*. Se grafican las intensidades detectadas para GFP (eje y) en función de las intensidades detectadas para RFP (eje x). Los valores de corte para las intensidades fueron ajustados automáticamente por el programa de análisis. Se asume colocalización cuando los píxeles provenientes de ambos canales se agrupan a lo largo de una línea recta con un coeficiente de Pearson (CP) mayor a 0,5.

Los resultados obtenidos sugieren que las proteínas AtOXR2 y AtOXR4 se localizan en la mitocondria de plantas de *Arabidopsis*, en coincidencia con la localización reportada para los homólogos de levaduras y humanos (Elliott y Volkert, 2004). Las proteínas con dominios TLDC cumplirían una función durante el estrés oxidativo en estos organismos (Durand y col., 2007; Elliott y Volkert, 2004; Murphy y Volkert, 2012; Volkert y col., 2000). La expresión mitocondrial de estos miembros de la familia AtOXR en *Arabidopsis* contribuye con la idea de que estas proteínas participan en la regulación de la respuesta a estrés en plantas. La importancia tanto de la actividad mitocondrial como de la regulación del estado redox de esta organela durante situaciones de estrés biótico y abiótico ha sido ampliamente demostrada (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2013; Li y col., 2013; Shigeoka y Maruta, 2014; Zsigmond y col., 2008)

Es necesario profundizar los estudios de localización con el objetivo de determinar la localización en los distintos compartimentos mitocondriales. Como se mencionó previamente, el análisis bioinformático no permite predecir una localización dentro de la mitocondria. En general, la importación de proteínas a la mitocondria es un proceso complejo que comienza con la síntesis en el citosol, el reconocimiento por parte de

receptores en la superficie de la membrana y posterior traslocación a través de una o de las dos membranas mitocondriales (Dudek y col., 2013; Murcha y col., 2014). Aproximadamente el 70% de las proteínas mitocondriales de codificación nuclear son sintetizadas con una presecuencia en el extremo N-terminal que se caracteriza por la presencia de aminoácidos cargados positivamente, Arg y Leu mayoritariamente, cuya estructura secundaria de α -hélice es importante (Huang y col., 2009). Estas proteínas son ancladas en la membrana interna mitocondrial o traslocadas hacia la matriz. La mayoría de las presecuencias son clivadas en la matriz por la acción de peptidasas (Teixeira y Glaser, 2013). Si bien no hemos podido obtener anticuerpos que nos permitan evaluar los pesos moleculares aparentes de las proteínas con dominios TLDC en Arabidopsis, en el análisis de las secuencias de las proteínas AtOXR en estudio no se detectaron presecuencias con dichas características. Sin embargo, no podemos descartar esta posibilidad para las proteínas en estudio ya que se han identificado proteínas de la matriz mitocondrial, como la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), que es importada sin la presencia de ninguna presecuencia (Huang y col., 2009). Además, las proteínas que no se sintetizan con precursores clivables pueden insertarse en la membrana externa si su estructura secundaria es β -barrel (Dudek y col., 2013). Finalmente, las proteínas ricas en cisteínas cuyo destino es el espacio intermembrana son importadas a través del sistema de óxido-reducción Mia40/Erv1 (Hell, 2008; Onda, 2013). Considerando que la predicción de estructura de la proteína AtOXR2 (y AtOXR4 en menor medida, Figura 7.1-13) sugiere la presencia de regiones con dominios β -barrell y estructuras en α -hélice en la región N-terminal, es posible pensar una localización en la membrana externa de la mitocondria. Con respecto al transporte mediado por Mia40/Erv1, sólo AtOXR2 presenta cisteínas en la región N-terminal, pero no cumplirían con la estructura CX₉C o CX₃C requerida para el reconocimiento (Sideris y col., 2009).

7.2.2. Relevancia del dominio TLDC en la localización subcelular.

La relevancia del dominio TLDC en la función de las proteínas que lo contienen, como el caso OXR1 de *Drosophila* (Stowers y col., 1999), nos lleva a la suposición lógica de que la o las funciones de las proteínas AtOXR pueden estar determinadas por las particularidades de sus dominios TLDC. Debido a la hidrofobicidad del dominio, otra alternativa sugiere que estas proteínas podrían estar interaccionando con proteínas de la membrana mitocondrial. Así, podría ser que lo que defina las funciones de las proteínas AtOXR no sean las diferencias en el dominio TLDC, sino que sean las regiones N-terminal de cada proteína (ver Figura 7.1-7, 7.1-11 y 7.1-13). Teniendo en cuenta estas hipótesis, se generaron dos proteínas quiméricas, combinando los dominios N-terminal de uno de los miembros de la familia AtOXR con el dominio TLDC de otra de las proteínas. En todos los casos se generaron fusiones a RFP (Figura 7.2-3). Para esto, nos basamos en las dos proteínas en estudio que presentaron la localización mitocondrial AtOXR2 y AtOXR4. Para el diseño de las quimeras se conservó la longitud de la proteína que codifica el dominio N-terminal de la quimera (Figura 7.2-4).



Figura 7.2-3 | Esquema de la combinación de dominios utilizadas para construir las quimeras. Las quimeras llevan como primer número el de la proteína AtOXR que aporta su región N-terminal y como segundo número el correspondiente a la AtOXR que aporta el dominio TLDC. Así, la proteína quimérica AtOXR24 contiene la región N-terminal de AtOXR2, y el dominio TLDC de AtOXR4. Todas las construcciones quiméricas se realizaron bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV. A la izquierda, esquemas de las construcciones quiméricas utilizadas para evaluar la sobreexpresión, y a la derecha, esquema de las construcciones utilizadas para evaluar colocalización.

AtOXR24

> AtOXR2-TLDC_{AtOXR4} - 319 aa - Proteína salvaje = 303 aa - Δaa = 16 aa

MHALKDKVVSQ KLSNLFADSP SQSASPRYSN SDSPKARLNS SVGKSLSSYF
 SFVVPQSGNE EDSELCPPPLP IRTESYECIE NCKSANGQAK AGTFISIGED
 KDCELRVSAK VEESGNDYFD GVKKMRE*** **EISEPSLL LSEQSRRSLY
 TSLPALVQGR KWILLYSTWR HGISLSTLYR KSLLPGLSL LVVGDRKGSV
 FGGLVEAPLI PTDKKYQGTN STFVFTNKSG OPTIYRPTGA NRFYTLCSKE
 FLALGGGGRF ALYLDSELLS GSSAYSETYG NSCLADSQDF DVKEVELWGF
 VYGSKYDEIL AHSKTMEPGL CRWS

AtOXR42

> AtOXR4-TLDC_{AtOXR2} - 378 aa - Proteína salvaje = 394 aa - Δ aa = 16 aa

```

MGKHKSFRSK AVHFVTDLTA GLLNPISDKP SSAHPPPPLP DEEDESQRNQ
LESTTAEQPK DLVDEPDTSS FSAFLGSLLS SDPKDKRKDQ DPEDEEDEEE
DEEEDSEAET SDTSSSSANP TRTMKETTSG GAAKKSFLSK YKQHFRNFYQ
AVKFPQVKER KGNSDVIPDD EETEYYDGLE MKPMQNNNVK EEVTVVVQAI
IP*****LTE SSVFITANLF EFLHASLPNI VRGCKWILLY STLKHGISLR
TLLRRSGELP GPCLLVAGDK QGAVFGALLE CPLQTPKRK YQGTSQTFLF
TTIYGEPRIE RPTGANRYYL MCMNEFLAFG GGGNFALCLD EDLLKATSGP
SETFGNECLA SSTEFEKKNV ELWGFAHASQ YLS

```

Figura 7.2-4 | Secuencia de las quimeras obtenidas. Para el desarrollo de las quimeras se intentó conservar la longitud de la proteína que aportaba el dominio N-terminal. De esta manera, las longitudes de las quimeras se mantuvieron dentro del 5% de variación. Por ejemplo, para el caso de la quimera AtOXR42, la proteína tiene una longitud de 378 aminoácidos, y la proteína salvaje (AtOXR4) 394 aminoácidos. La diferencia entre ambas proteínas, mostrada en la figura como Δ aa, es de 16 aminoácidos, un valor que apenas supera el 4% ($16/394 = 0,0406$).

Con las construcciones obtenidas se transformaron de manera estable plantas de *Arabidopsis mt-gk*. Se evaluó la expresión y la localización subcelular de las quimeras mediante microscopía confocal (Figura 7.2-5). Los resultados obtenidos sugieren que las quimeras obtenidas son estables en diferentes generaciones de plantas y se localizan en la mitocondria (Figura 7.2-5). De esta manera, la combinación de los dominios no afectó la localización mitocondrial, permitiendo el estudio de la relevancia funcional del TLDC en la organela donde la proteína salvaje se expresa naturalmente.

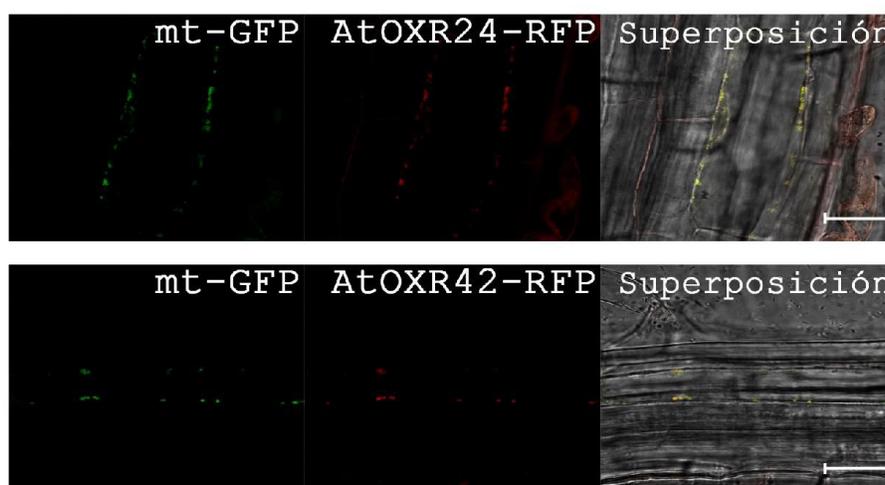


Figura 7.2-5 | La combinación de los dominios de las proteínas AtOXR no modifica la localización mitocondrial. Raíces de plantas de 7 días que sobreexpresan GFP en la mitocondria (mt-GFP) y AtOXR-mRFP fueron visualizadas mediante microscopía láser confocal. Se muestran campos representativos. La imagen

de colocalización representa la superposición de los canales de detección de la fluorescencia emitida por GFP y RFP y la luz blanca transmitida. La señal amarilla indica colocalización de igual intensidad entre las señales verde (GFP) y roja (mRFP). Escala = 5 μ m.

7.2.3. Caracterización del patrón de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4*.

La duplicación de genes es una herramienta que permite la especialización de la función de un gen mediante la generación de isoformas de una proteína, las cuales presentan diferentes propiedades o diferentes patrones de expresión. En lo que respecta a las proteínas *AtOXR2* y *AtOXR4*, estas presentan elevada conservación en la región correspondiente al dominio TLDc; sin embargo, ambas proteínas presentan grandes diferencias en la región N-terminal. Esto, sumado a la similitud en ubicación subcelular, nos sugiere que los cambios ocurridos luego de la duplicación pueden haber generado una alteración de los patrones de expresión. A fin de analizar los correspondientes patrones de expresión de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*, aislamos las regiones promotoras de cada uno de ellos a partir de ADN genómico de *Arabidopsis*.

Para el caso de *AtOXR2* se realizaron dos construcciones, una de 1252 pb y otra de 959 pb. La decisión de analizar estos fragmentos dentro de la región promotora se debió a la existencia de un elemento regulador en *cis* de unión al factor de transcripción MYB4, en el intervalo comprendido entre ambas construcciones (Figura 7.2-6.a). La proteína MYB4 está involucrada en la respuesta a UV-B (Jin y col., 2000), así como también en la respuesta a patógenos (Cheong y col., 2002) y es considerado un represor negativo (Jin y col., 2000). Podríamos especular que la unión de MYB4 a esta caja reguladora presente en el promotor podría estar disminuyendo la transcripción de *AtOXR2*. Ambos fragmentos contenían la región 5' no codificante.

Utilizando la misma estrategia se clonaron 1638 pb del promotor del gen *AtOXR4*. Debido a que la región intergénica entre *AtOXR4* y su gen antecesor es menor a 450 pb, incorporamos un fragmento del gen contiguo para estudiar en mayor profundidad el patrón de expresión de *AtOXR4*.

Todos los fragmentos fueron clonados en el vector binario pBI101.3 fusionados a la

región codificante del gen reportero *GUS*. Los clones obtenidos se utilizaron para generar plantas transgénicas mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transformadas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina. Estas plantas fueron analizadas también a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *GUS* (por detalles ver Materiales y Métodos, sección 6.2.7).

Un resumen de los resultados del estudio *in silico* de las regiones promotoras se muestran en la figura 7.2-6.

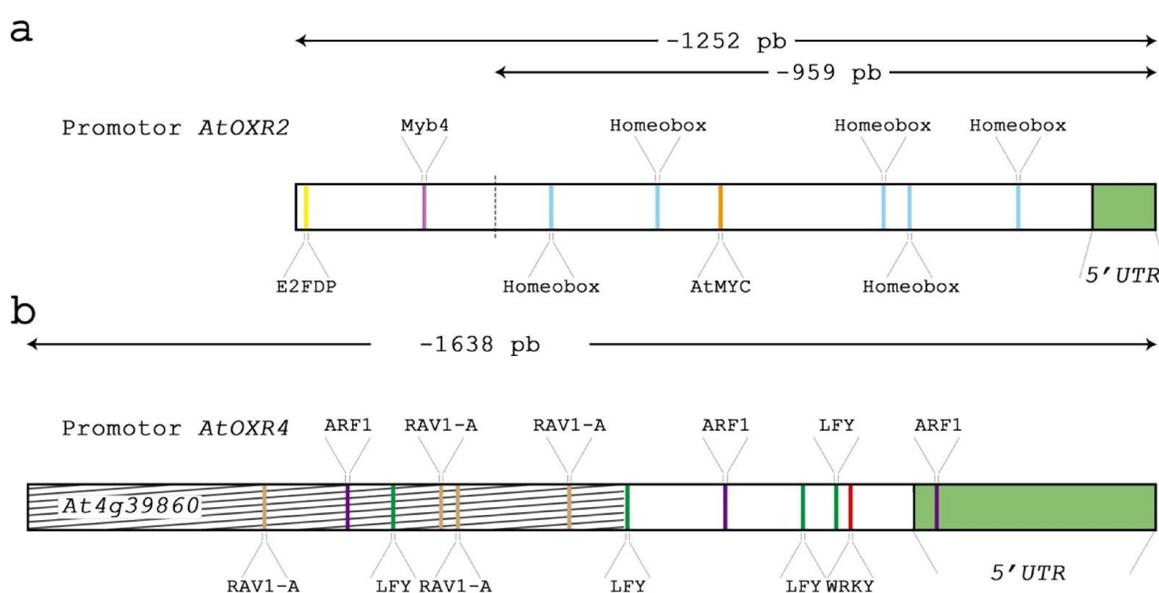


Figura 7.2-6 | Representaciones gráficas de las regiones promotoras de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*. Se muestran las regiones 5' no codificantes, así como también los motivos o cajas conteniendo elementos reguladores propuestos por distintos servidores que ofrecen análisis *in silico* de promotores de genes eucariotas. **a-** Para el caso de *AtOXR2*, las cajas sobrerrepresentadas corresponden a las de *Homeobox* (aaattaa), *AtMYC* (catgtg), *MYB4* (gttagtt) y *E2FDP* (tttcccgc). En línea de puntos se muestra el corte que diferencia las dos construcciones estudiadas en este trabajo de tesis. **b-** Las cajas sobrerrepresentadas en el promotor de *AtOXR4* son *LFY* (ccaNtg) donde N puede ser cualquier nucleótido, *ARF1* (tgtctc), *WRKY* (ttgact), *RAV1-A* (caaca). El análisis *in silico* de las regiones promotoras fue realizado utilizando la información disponible en la base de datos *TAIR*.

7.2.3.1. Caracterización de la región promotora del gen *AtOXR2* mediante histoquímica.

A fin de analizar la expresión en diferentes tejidos del gen reportero *GUS*, dirigida

por las regiones promotoras del gen *AtOXR2*, realizamos un seguimiento de los patrones de expresión de 10 líneas independientes para cada construcción. Para tal fin realizamos reacciones histoquímicas sobre las plantas utilizando el sustrato X-gluc y determinamos las zonas de expresión de GUS en distintos estadios de desarrollo de las mismas. En primer lugar, analizamos el patrón de expresión del gen *GUS* generado por la región promotora de *AtOXR2*. En la figura 7.2-7 se puede observar la expresión de *GUS* en las raíces de plántulas de 8 días, crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X (Figura 7.2-7 e, f, l y m). Observamos expresión en los meristemas, tanto el meristema apical (Figura 7.2-7 b, i, j), como el meristema radical. Además, en las raíces desde etapas tempranas del desarrollo, localizándose en todos los tejidos que la componen. En los cotiledones se observaron signos débiles de actividad GUS, principalmente en el tejido vascular, y también en la lámina de los mismos y hasta las 7-9 días, momento en que la expresión comienza a apagarse (Figura 7.2-7 j) hasta llegar a la mínima expresión en los ápices de los cotiledones. En ese momento comienzan a desarrollarse los primordios de las hojas (Figura 7.2-7 b y c), tejido donde detectamos actividad GUS, principalmente en la vasculatura. Debemos destacar que la actividad en estos órganos se evidencia luego de una incubación más prolongada con el sustrato cromogénico respecto de la coloración evidenciada en las raíces, lo cual nos sugiere que la actividad GUS es mayor en estas últimas. En los hipocotilos sólo se detecta una tinción suave en el cilindro vascular. En plantas adultas, crecidas en tierra, observamos actividad GUS en polen maduro e inmaduro (pero luego de alcanzar cierto estadio de maduración), mientras que tallos y hojas no presentan signos de coloración. El patrón de expresión prácticamente no sufrió variaciones entre las construcciones realizadas (-1252 y -959), excepto la aparición de tinción en los sépalos para el genotipo conteniendo la construcción -959. Se podría mencionar un cambio sutil en la intensidad de la coloración entre ambos grupos de transformantes, siendo más intensa aquella que fue transformada con el fragmento -959. Sin embargo, esto podría atribuirse no sólo a alguno de los elementos en *cis* que se localizan en las regiones corriente arriba de -959, sino también a las diferencias existentes entre distintas líneas (distintos genotipos).

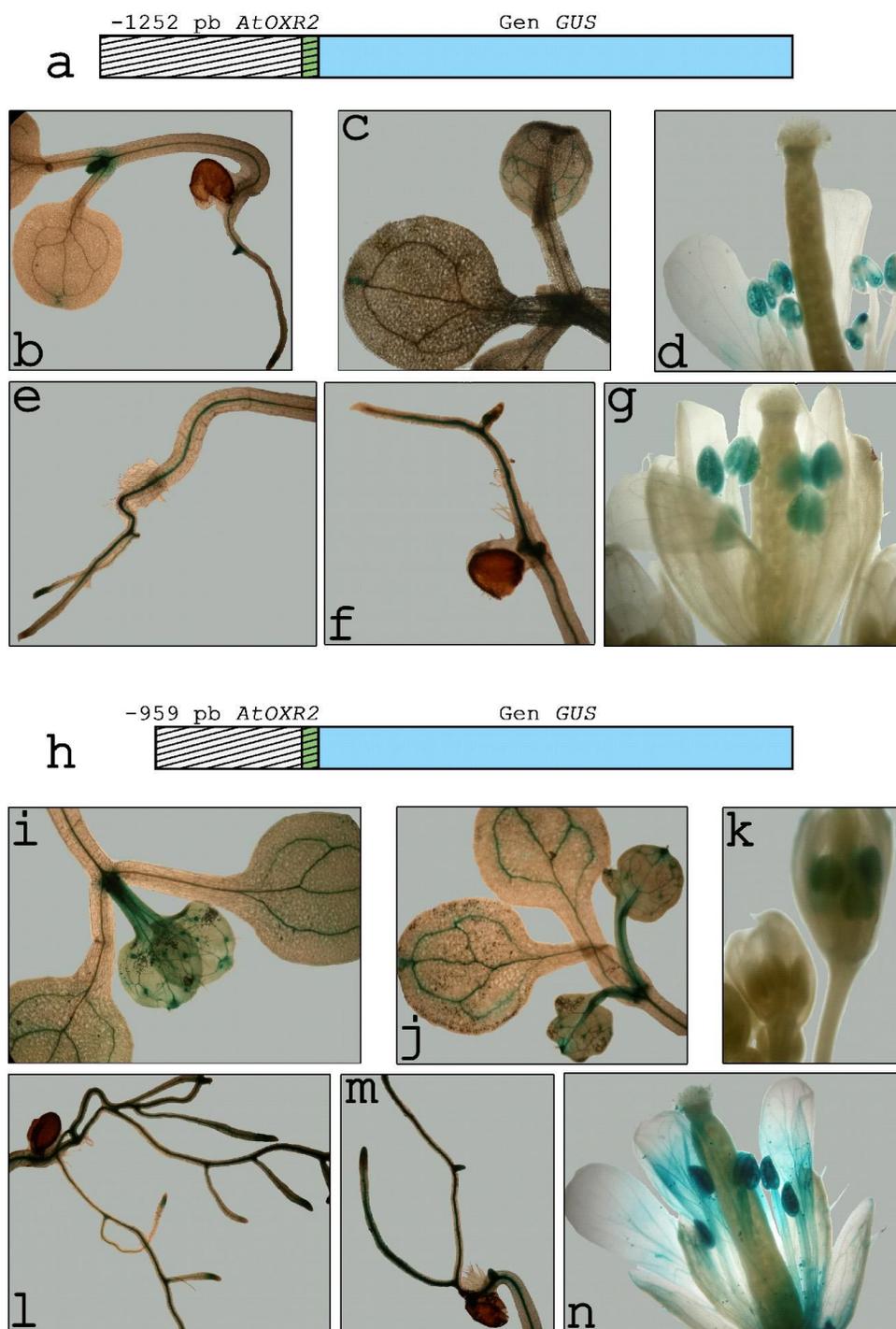


Figura 7.2-7 | Representaciones de las construcciones evaluadas y resultados de las histoquímicas. a y h - Representación gráfica de las construcciones -1252 y -959. **b, c, d, e, f y g** – Fotografías tomadas con microscopio (4x) de tinciones histoquímicas que reportan la expresión del reportero en distintos tejidos en plántulas de distintos estadios para la construcción -1252. **i, j, k, l, m y n** – Fotografías tomadas con microscopio (4x) de tinciones histoquímicas en tejidos donde se detectó expresión del reportero para la construcción -959.

7.2.3.2. Estudio del patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtOXR4* mediante reacciones histoquímicas.

El gen que codifica la proteína *AtOXR4* está ubicado en el cromosoma 4 de *Arabidopsis* y está flanqueado por extremos 5' de 226 o 356 pb y 3' no codificantes de 191 pb. Debido a que la región promotora no ha sido anteriormente estudiada, decidimos tomar para tal fin una secuencia de 1638 pb ubicada corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. La misma contiene una región intergénica de 424 pb, así como el extremo 3' de la secuencia del gen *At4g39860*, ubicado en orientación sentido respecto de *AtOXR4*. Un esquema de la región promotora se puede observar en la figura 7.2-6 mientras que la representación gráfica de la construcción se muestra en la figura 7.2-8.

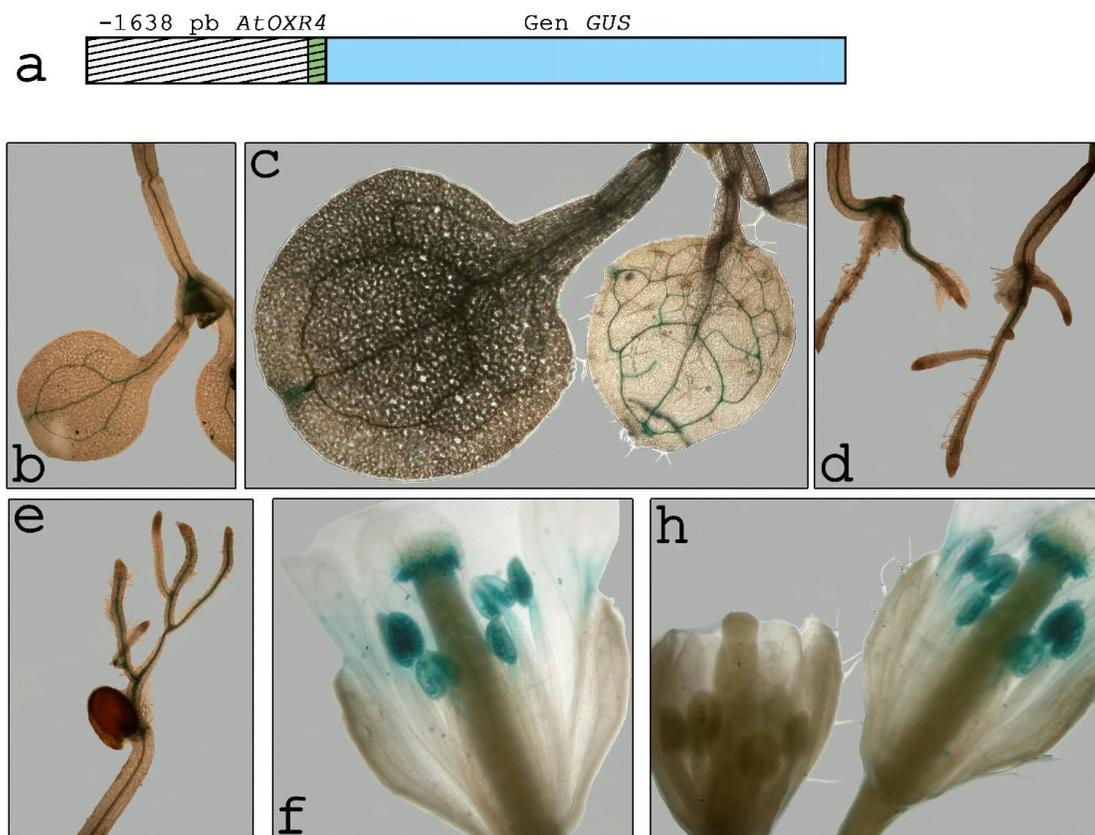


Figura 7.2-8 | Esquema de la construcción realizada para evaluar el patrón de expresión de la proteína *AtOXR4* y resultados histoquímicos. a- Representación de la construcción. **b, c, d, e, f y g -** Fotografías de tomadas con microscopio (40X) de tinciones histoquímicas.

7.2.3.3. Análisis de los niveles de expresión mediante reacciones fluorométricas.

Con la finalidad de estimar los niveles de expresión relativa producidos por las regiones promotoras de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*, realizamos ensayos fluorométricos de la actividad GUS. Para este análisis, preparamos extractos proteicos totales de diferentes órganos y procedimos como se detalla en la sección 6.2.41 del capítulo de Materiales y Métodos. Determinamos que ambos fragmentos promotores producen una baja expresión en hojas y tallos, en relación a la expresión en raíces y flores (Figura 7.2-9).

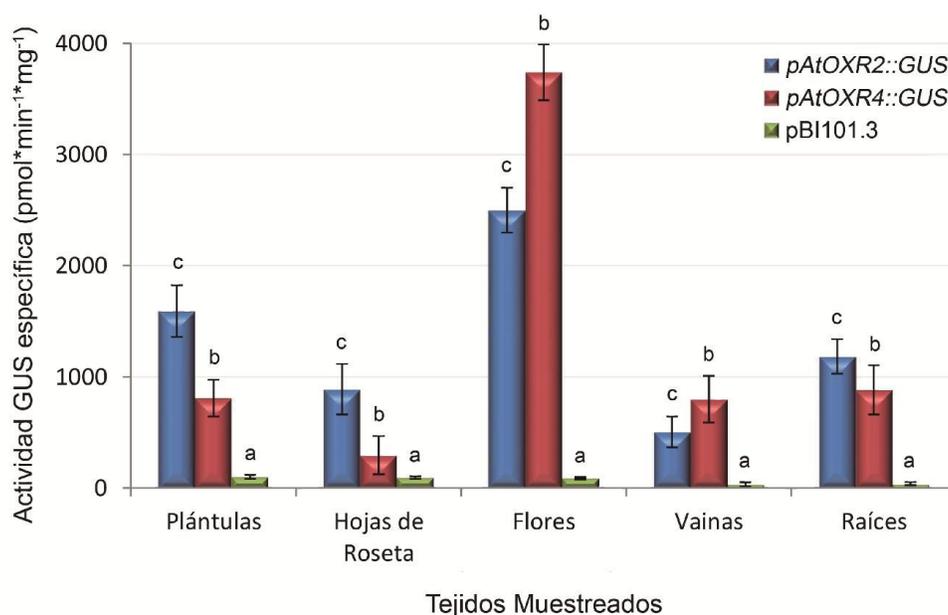


Figura 7.2-9 | Análisis de la actividad GUS en extractos proteicos totales en diferentes órganos de plantas transformadas con las regiones promotoras de *AtOXR2* (construcción -1252) y *AtOXR4* fusionadas al gen reportero *GUS*. Se analizaron extractos proteicos de dos líneas independientes. Además, se determinó la actividad GUS en extractos de plantas transformadas con el gen *GUS* sin promotor (pBI101.3). Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$. Se obtuvieron resultados similares utilizando seis líneas diferentes de cada construcción.

Estos resultados coinciden con los ensayos histoquímicos de actividad GUS descritos anteriormente. Las reacciones fluorométricas nos permitieron cuantificar la mayor expresión dirigida por la región promotora de *AtOXR2* respecto de *AtOXR4*. De esta manera, determinamos que el fragmento promotor de *AtOXR2* genera de 1,3 a 3 veces mayor actividad GUS en tejidos vegetativos, en ensayos realizados con 6 líneas

independientes.

Algo que ya podía apreciarse en los ensayos de histoquímica era la mayor intensidad que presentaba la actividad GUS en flores de plantas transformadas con el promotor del gen *AtOXR4*, cuando se la comparaba con la intensidad producida por *AtOXR2*. En los ensayos fluorométricos se corroboró esta tendencia, y en tejidos reproductivos tales como flores y vainas se observó, aproximadamente un 30% más actividad GUS en plantas transformadas con la región promotora de *AtOXR4*.

Los resultados revelados por el ensayo nos demuestran una clara tendencia en cuanto a que las proteínas AtOXR en estudio se localizarían en tejidos diferentes. Lo que se pudo observar tanto para *AtOXR2* como para *AtOXR4* es que ambos genes se expresan fuertemente durante los primeros estadios de la planta, desde su germinación hasta el día 14. A partir de ahí la expresión comienza a disminuir hasta niveles prácticamente nulos. Esta tendencia se revierte únicamente en órganos florales donde la expresión se puede observar en polen para ambos genes.

7.2.3.4. Estudio de la incidencia de factores de estrés en la regulación de la expresión de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Debido a que los genes *AtOXR* se descubrieron por su participación durante una situación de estrés oxidativo en humanos, levaduras e insectos (Elliott y Volkert, 2004), decidimos estudiar la respuesta a estrés de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*. Como se mencionó previamente, en rosetas de plantas de 4 semanas la expresión de ambos genes es prácticamente nula. Por este motivo, decidimos realizar los ensayos en los tejidos que componen la roseta. De esta manera, las diferencias de expresión serían más notorias debido a una línea basal de expresión baja.

Con respecto a las condiciones de cultivo o crecimiento a las que fueron desafiadas las plantas, se buscaron aquellos tratamientos que generen aumentos naturales en la producción de ROS en el interior de las células, evitando la exposición directa a H₂O₂ agregado de manera exógena. De esta manera, se sometieron a las plantas a la exposición

a ciclos prolongados de luz, a luz UV-B y al tratamiento con el reactivo inhibidor de la enzima catalasa, 3-aminotriazol (3-AT). Además, las plantas fueron tratadas con la hormona ácido salicílico (SA). La exposición al SA se fundamentó en las dos funciones atribuidas a esta hormona. Por un lado, es una de las hormonas más relevantes en la respuesta al estrés abiótico juntamente con el ácido absísico (ABA) (Herrera-Vásquez y col., 2015). Por otro lado, tiene un papel ampliamente reconocido en las repuestas al estrés biótico (Vlot y col., 2009). Además, parte de estas funciones se ven interrelacionadas dependiendo de los niveles de ROS intracelulares (Herrera-Vásquez y col., 2015; Vlot y col., 2009).

En la figura 7.2-10 se muestran los resultados obtenidos mediante fluorimetría luego de exponer plantas de 4 semanas a diferentes condiciones de estrés. Estos dejan en evidencia la expresión diferencial para *AtOXR2* y *AtOXR4* en situaciones de estrés, algo que afianza la hipótesis inicial de especialización. Para el caso de *AtOXR2* se observa una clara inducción por luz y 3-AT, mientras que luz UV-B y SA parecerían no tener efecto sobre la expresión. Cuando se estudió el promotor de *AtOXR4*, la situación parece más acotada, y dentro las condiciones ensayadas, sólo se observó una inducción muy sutil cuando la planta se expuso al SA.

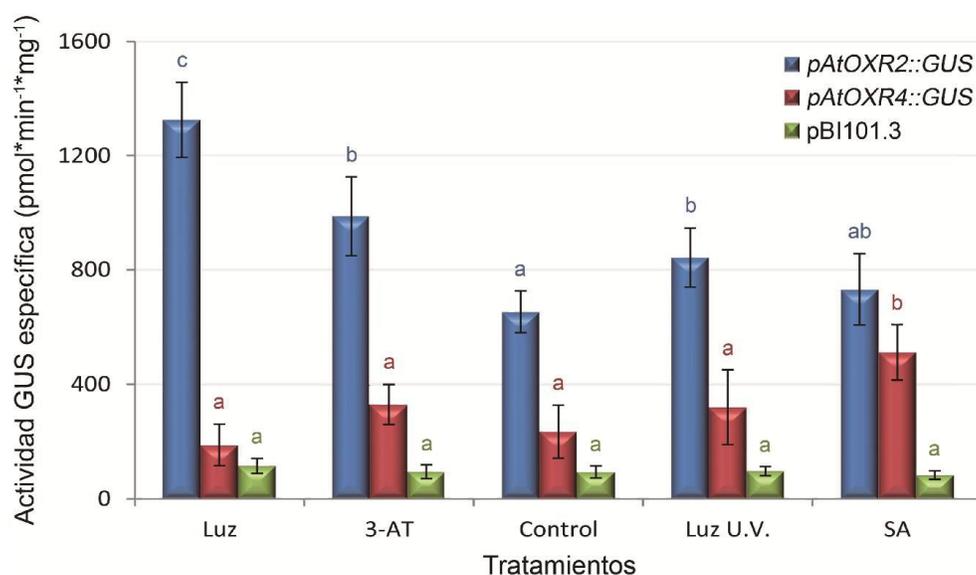


Figura 7.2-10 | Inducción del gen *GUS* dirigida por las regiones promotoras de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* en presencia de factores de estrés. Se analizaron extractos proteicos de tres líneas independientes de

plantas (que presentaban niveles de expresión similares) de 4 semanas cuyas hojas se incubaron en soluciones MS 0,5X y posteriormente se sometieron a distintos tratamientos. **Luz:** Hojas de roseta incubadas en MS 0,5X, sometidas a luz continua durante 38 hs. **3-AT:** 24hs en una solución de incubación 3-aminotriazol (3-AT) 4mM. **Control:** Hojas de roseta incubadas en MS 0,5X en ciclo de luz de día largo. **Luz U.V.:** Plantas expuestas a luz U.V. durante 30 minutos cuya determinación de actividad GUS se realizó 2 horas posteriores a la finalización de la exposición. **SA:** Plantas incubadas en ácido salicílico (SA) 1mM durante 3 horas. Las barras de error representan la desviación estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas dentro de un mismo grupo (constituidos por distintos genotipos que contienen la misma construcción) con un valor $p < 0,05$.

La relación entre la exposición prolongada a luz y el estrés oxidativo se encuentra ampliamente estudiada (Apel y Hirt, 2004; Mittler y col., 2004; Van Breusegem y col., 2008). También es ampliamente conocida la relación entre intensidad lumínica y estrés oxidativo (Tripathy y Oelmüller, 2012). Mientras que la luz es una fuente de ROS intracelular (debido a que el cloroplasto libera más electrones de los que puede absorber, y estos electrones van a parar al O_2), el compuesto 3-AT inhibe la enzima catalasa y al impedir la detoxificación de peróxido de hidrógeno se incrementa la concentración de esta especie (Havir, 1992). La diferencia es clara, cuando se trata de exceso de luz aumentan varias especies reactivas del oxígeno, principalmente H_2O_2 y 1O_2 , aunque hay otras especies que se generan además de estas. Así, la diferencia en la composición de las especies reactivas del oxígeno requiere montar diferentes respuestas para contrarrestar el daño potencial que podrían causar estos metabolitos tóxicos.

7.2.4. Estudio de la regulación de la expresión de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* a nivel transcripcional.

Nuestro interés en los genes *AtOXR* de *Arabidopsis* se originó debido a los resultados obtenidos en otros organismos, en experimentos donde se determinó su rol frente al estrés oxidativo. En sintonía con lo observado, detectamos un aumento en la expresión del gen reportero *GUS* frente a situaciones generadoras de estrés oxidativo, principalmente cuando su expresión era dirigida por el promotor del gen *AtOXR2* (Figura

7.2-10). Así es que nos preguntamos ¿qué ocurriría a nivel transcripcional?

Con este fin, analizamos diferentes condiciones de crecimiento productoras de estrés para las plantas y se cosechó el material vegetal. Posteriormente se realizó una extracción de ARN total y se analizaron los niveles de transcripto mediante la técnica de Northern Blot. Cuando se mide la inducción indirecta del gen mediante un gen reportero como es el caso del gen *GUS*, se está evaluando la actividad de la proteína β -glucuronidasa cuya expresión es dirigida por el promotor. De esta forma, sería posible detectar el ARN mensajero (ARNm) que codifica el gen *GUS* tiempo antes de traducirse y plegarse en la forma activa de la proteína en cuestión. Siguiendo esta línea de razonamiento, los tratamientos para analizar los niveles de transcripto mediante ensayos de Northern blot se realizaron a tiempos intermedios a los utilizados para la detección de la actividad *GUS*.

7.2.4.1. Análisis de los transcritos para el gen *AtOXR2*.

Los experimentos de detección del ARNm son coincidentes con lo demostrado anteriormente para la actividad del promotor. Los resultados mostrados en la figura 7.2-11 fueron obtenidos mediante ensayos realizados en plantas de 4 semanas. En el caso de incubación en presencia de SA no se observó inducción, algo que ya se había detectado en los experimentos con el gen reportero *GUS*. Cuando el agente causal de estrés fue la luz UV-B, se observó inducción a los 15 minutos posteriores al tiempo de exposición (la planta se expuso durante 30 minutos, y se extrajo ARN a los 45 minutos). En los experimentos con el gen reportero *GUS*, a las 2 horas posteriores a la inducción se observó actividad del reportero similar a las que arroja el promotor en condiciones control.

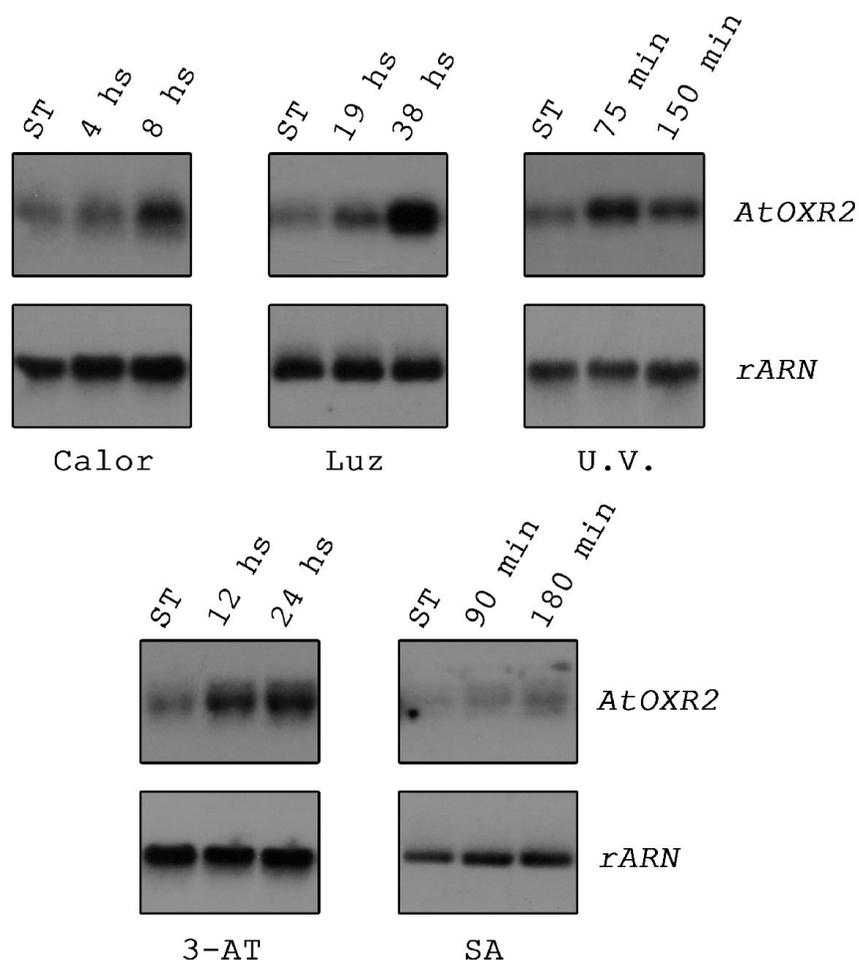


Figura 7.2-11 | Determinación de los niveles de transcripto del gen *AtOXR2* a distintos tiempos, luego de someter plantas salvajes (WT) de *Arabidopsis* a situaciones de estrés. Se analizaron los niveles de ARNm codificante para *AtOXR2* en rosetas de 4 semanas. Las hibridaciones correspondientes a calor, luz y luz UV-B, fueron realizadas con plantas en tierra, mientras que aquellas en las que se indujo estrés por 3-AT y SA se realizaron incubando las hojas de roseta en las distintas soluciones. **Calor:** Plantas crecidas en condiciones de día largo fueron expuestas a una temperatura de 37°C sin limitante de agua. **Luz:** Las rosetas fueron expuestas a un ciclo extendido de luz. **U.V.:** Las plantas fueron expuestas a 30 minutos de luz U.V. **3-AT:** Rosetas enteras se incubaron en 4mM de 3-aminotriazol en MS 0,5X durante 24 hs. **SA:** Las rosetas cortadas se incubaron en solución de SA 1mM en MS 0,5X durante 3hs. **ST:** plantas crecidas en condición control o Sin Tratamiento. Como gen normalizador, se utilizó una sonda que hibrida con el ARN mensajero para la subunidad ribosomal 25S de *Vicia faba*.

De modo similar a lo observado al evaluar la actividad *GUS*, el transcripto de *AtOXR2* se incrementa sustancialmente en condiciones de estrés por sobreexposición a la luz, así como también por 3-AT. El efecto es similar al que ocurre cuando las plantas son sometidas a calor, a mayor tiempo de exposición mayor inducción del transcripto. El

factor común de estas exposiciones es la elevada producción de ROS, aunque la composición de estas especies varía con cada estrés. Como se mencionó previamente, el compuesto 3-AT envenena la enzima Catalasa, incrementando así la concentración de peróxido de hidrógeno. El estrés por calor impacta tanto en la mitocondria como en los cloroplastos (Elliott y Volkert, 2004), generando un espectro variado de especies reactivas del oxígeno (Hasanuzzaman y col., 2013). La sobreexposición a la luz impacta directamente sobre el funcionamiento de los cloroplastos. En estas organelas la generación de ROS se da a través de los fotosistemas, que introducen una cantidad excesiva de electrones a la cadena de transporte de electrones cloroplastídica (Apel y Hirt, 2004; Mullineaux y Karpinski, 2002).

7.2.4.2. Análisis de los transcritos para el gen *AtOXR4*.

Cuando se evaluó la respuesta transcripcional de *AtOXR4* frente a distintas situaciones de estrés, los tratamientos más relevantes resultaron ser 3-AT y SA. Las medidas de los niveles de transcritos para la proteína *AtOXR4* en presencia de SA coinciden con lo observado para las inducciones del gen reportero *GUS*. Sin embargo, para 3-AT, observamos un aumento de los niveles de transcritos que no se condice con lo observado al medir la actividad β -glucuronidasa. Esto nos sugiere que podría existir alguna regulación a nivel postranscripcional. Los resultados se muestran en la figura 7.2-12.

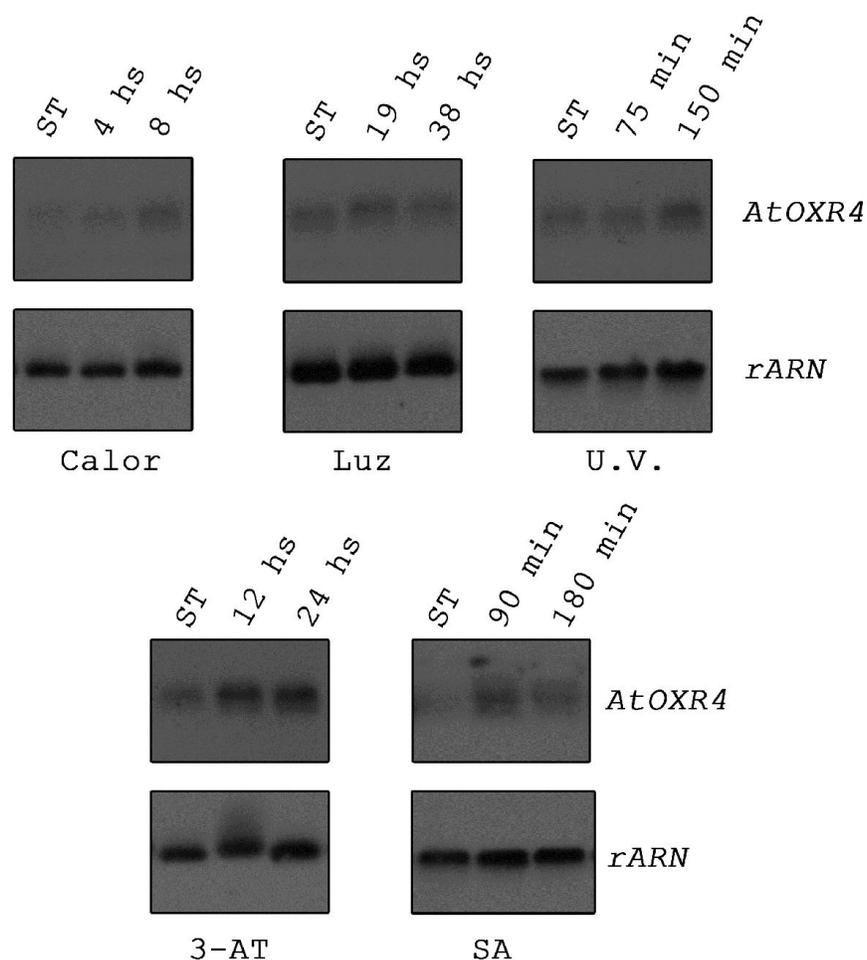


Figura 7.2-12 | Determinación de los niveles de transcritos del gen *AtOXR4* a distintos tiempos, luego de someter plantas salvajes (WT) de *Arabidopsis* a situaciones de estrés. Se analizaron los niveles de ARNm codificante para *AtOXR4* en rosetas de 4 semanas. Las hibridaciones correspondientes a calor, luz y luz UV-B, fueron realizadas con plantas en tierra, mientras que aquellas en las que se indujo estrés por 3-AT y SA se realizaron incubando las hojas de roseta en las distintas soluciones. **Calor:** Plantas crecidas en condiciones de día largo fueron expuestas a una temperatura de 37°C sin limitante de agua. **Luz:** Las rosetas fueron expuestas a un ciclo extendido de luz. **U.V.:** Las plantas fueron expuestas a 30 minutos de luz U.V. **3-AT:** Rosetas enteras se incubaron en 4mM de 3-aminotriazol en MS 0,5X durante 24 hs. **SA:** Las rosetas cortadas se incubaron en solución de SA 1mM en MS 0,5X durante 3hs.

7.2.5. Evaluación de la información disponible en bases de datos.

Finalmente, los datos obtenidos experimentalmente fueron contrastados con la información disponible en bases de datos públicas. Pudimos observar que nuestros resultados coinciden con los datos publicados en la base de datos de la página web del sitio *Bio-Analytic Resource (BAR) for Plant Biology* (<http://bar.utoronto.ca/>), los cuales se

resumen en la figura 7.2-13. Utilizando la función *expression angler* ofrecida en este sitio web, se obtuvieron los datos de “*heatmap*” mostrados en la parte de la figura 7.2-13, los que fueron normalizados con la expresión del gen *AtOXR2*. En la misma se pueden apreciar dos grandes bloques de datos: aquellos que corresponden a diferentes tejidos y los que corresponden a tratamientos específicos, realizado en distintos tejidos o tipos celulares y/o en genotipos particulares. Se observa una expresión leve en tejidos para los transcritos de *AtOXR2* y *AtOXR4*, excepto aquel valor que sobresale en *AtOXR4* que corresponde a la expresión de este gen en polen maduro. Además, se observa que el gen *AtOXR5* es el que presenta niveles de expresión, en general, más elevados en todos los tejidos. Dentro del bloque correspondiente a tratamientos, los genes que más parecen responder son *AtOXR5* y *AtOXR2*.

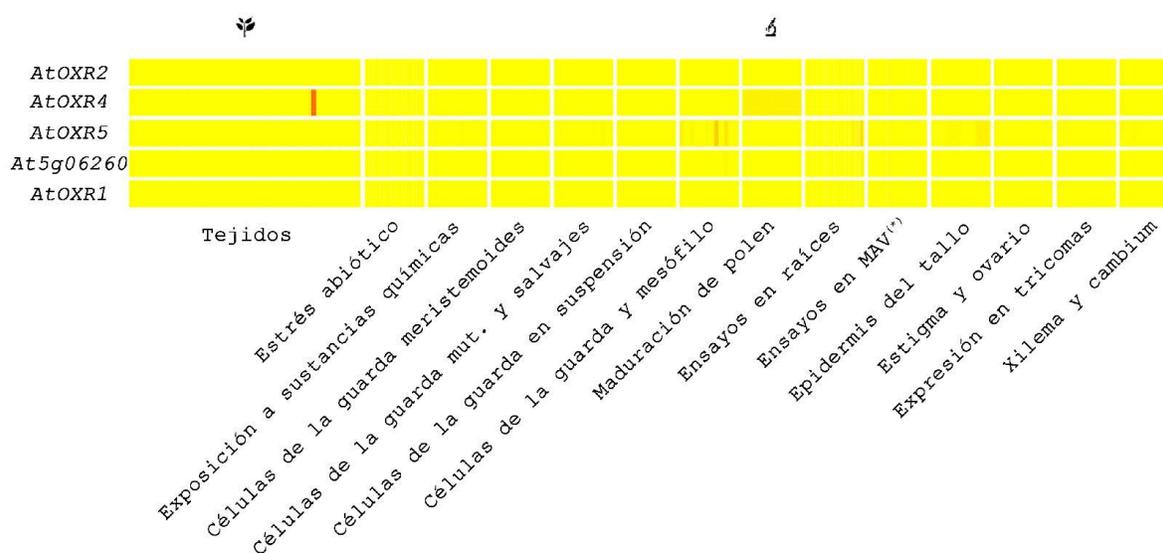


Figura 7.2-13 | Perfil de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en distintas condiciones obtenidos de la página web *Bio-Analytic Resource (BAR) for Plant Biology*. Datos de *heatmap* normalizado con la expresión del gen *AtOXR2*, obtenidos mediante la función *expression angler* de la página web del BAR (<http://bar.utoronto.ca/ExpressionAngler/>).

En la figura 7.2-14 se representan mediante una pictografía electrónica de fluorescencia, los niveles transcripcionales de *AtOXR2* (Figura 7.2-14 a) y *AtOXR4* (Figura 7.2-14 b) en los distintos estadios y tejidos. Similar a lo observado para el caso del estudio de las regiones promotoras, se observa una fuerte expresión en estadios tempranos que

disminuye conforme la planta se desarrolla. Se observa un incremento en la expresión recién cuando la planta florece, y es este órgano precisamente donde se concentra la expresión transcripcional, la cual se enfatiza aún más en polen, hasta obtener su máximo en polen maduro.

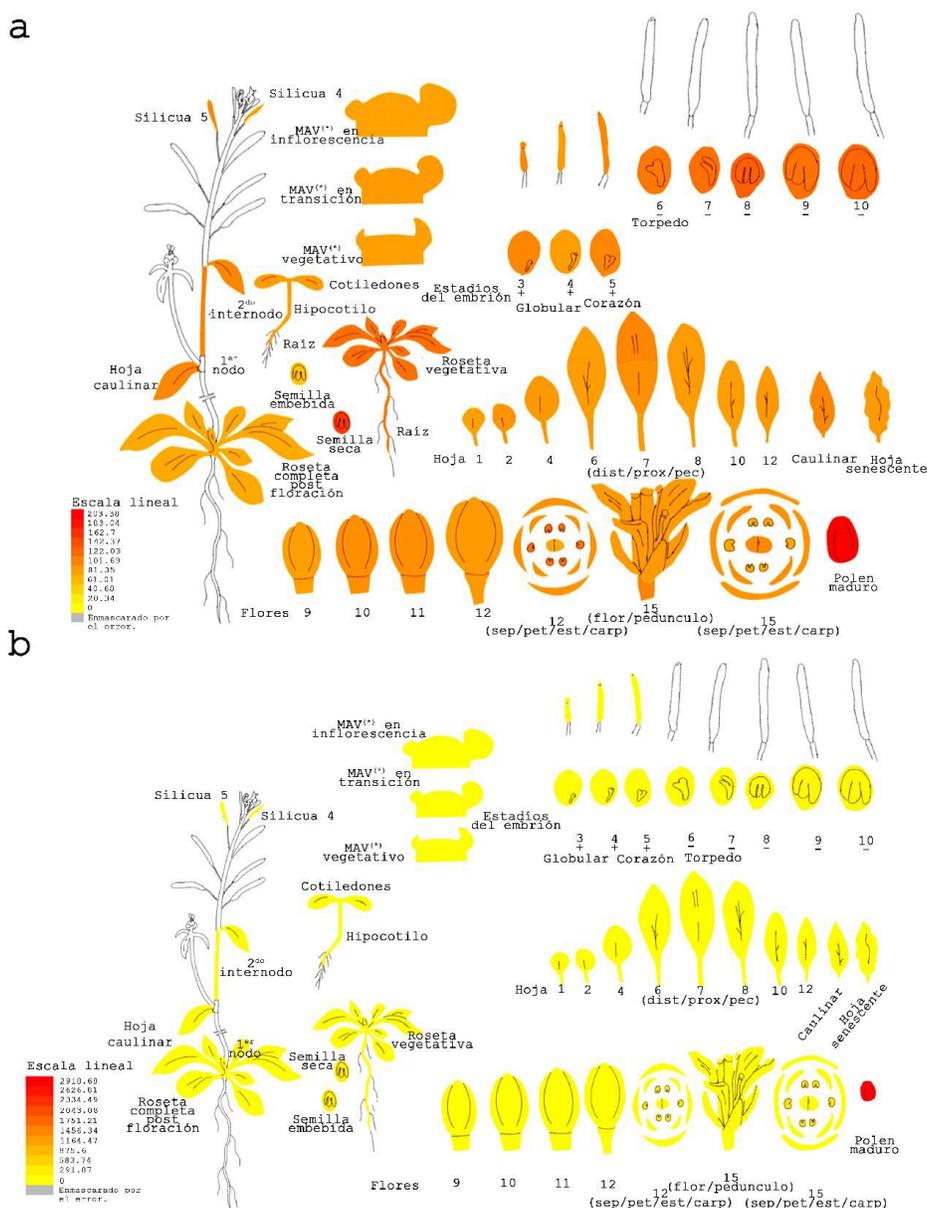


Figura 7.2-14 | Perfil de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en distintos estadios de desarrollo obtenidos de la página web *BAR for Plant Biology*. a- Imágenes electrónicas, representativas de los niveles de fluorescencia de los transcritos de *AtOXR2* en distintos estadios y tejidos. **b-** Imágenes electrónicas, representativas de los niveles de fluorescencia de los transcritos de *AtOXR4* en distintos estadios y tejidos. Los patrones de expresión están basados en los datos presentes en Schmid y col. (2005), el AtGenExpress Consortium data (Estrés abiótico, Biótico y series de tratamientos con hormonas y agentes químicos; Kilian y col., (2007)). Las

imágenes se adaptaron de la página web de BAR, y fueron creadas como se describe en Winter y col. (2007). (*) MAV= Meristema Apical del Vástago, dist/prox/pec = distal/proximal/pecíolo, sep/pet/est/carp = sépalo/pétalo/estambre/carpelo.

Los datos obtenidos, sumados a los datos representativos de más de 350 microarreglos compilados en la página web del BAR, nos permitieron generar el modelo de expresión propuesto en la figura 7.2-15.

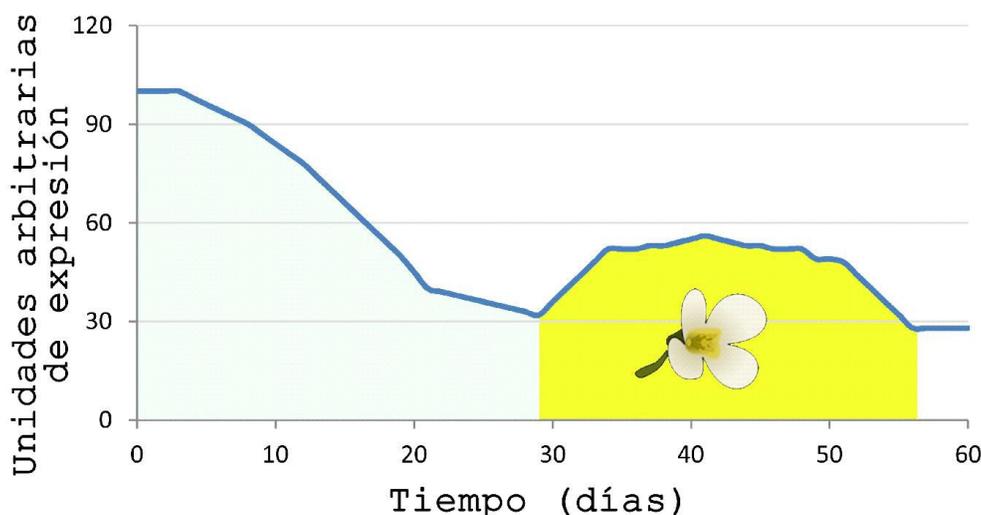


Figura 7.2-15 | Modelo de expresión propuesto para los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*. En el eje y se grafican las unidades de expresión relativas obtenidos de los datos de la base de datos del BAR (<http://bar.utoronto.ca/>). En el eje x se contempla el tiempo, representado por los días posteriores a la germinación en plantas de *Arabidopsis* crecidas en un fotoperíodo de día largo (16hs luz/8 hs oscuridad).

En el eje de la ordenada se toma como valor máximo el valor de expresión asignado al gen *AtOXR2* en semillas secas; es decir un estadio previo a la germinación y que ha demostrado ser el valor más alto si se lo divide por unidad de masa. De esta forma se obtiene un valor arbitrario de expresión por unidad de masa. A medida que la planta crece y la expresión disminuye, este cociente disminuye con mayor velocidad hasta acercarse a un valor de expresión basal, el cual se da aproximadamente en la mitad del ciclo de vida de *Arabidopsis*. Cuando la planta comienza a florecer el transcripto se vuelve detectable nuevamente durante el período completo de floración. Cuando la planta deja de dar flores, es cuando nuevamente se llega a un nivel similar al basal obtenido en la

mitad del ciclo de vida. Esta curva está pensada para el transcrito de *AtOXR2*, aunque bien podría aplicarse a *AtOXR4*. Es probable que en este último caso, las pendientes de descenso sean mayores, e incluso el nivel basal a la mitad del ciclo sea inferior al mostrado en la gráfica, y que en la segunda mitad el incremento sea aún mayor, ya que como hemos visto, *AtOXR4* se expresa en flores con mayor intensidad que *AtOXR2*.

7.2.6. Conclusiones.

Se determinó la localización de las proteínas *AtOXR2* y *AtOXR4* en raíces de plantas de *Arabidopsis mt-gk* de 7 días de edad. Para esto, se diseñaron construcciones fusionando la región C-terminal a la proteína fluorescente roja (RFP). Para ambas proteínas en estudio se confirmó localización mitocondrial.

Con el fin de estudiar la relevancia de los dominios TLDC y de la región N-terminal, se diseñaron 2 quimeras combinando las porciones N-terminal y los dominios TLDC de las distintas proteínas *AtOXR*. Así, se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes para las proteínas quiméricas Q42 y Q24, las que se encuentran en estudio actualmente en el grupo de trabajo. A su vez, se generaron plantas sobreexpresantes fusionadas a la proteína RFP en el genotipo *mt-gk*, para determinar localización subcelular de las mismas. Ambas quimeras demostraron colocalización en mitocondrias en las condiciones ensayadas. La generación de estas proteínas quiméricas resulta de gran importancia, ya que permitirá estudiar la función diferencia (si es que la hay) de los distintos dominios de estas proteínas *AtOXR* en estudio.

Se estudiaron las regiones promotoras de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* fusionando fragmentos de ADN correspondientes a los promotores putativos de cada uno de los genes en estudio al gen reportero codificante para la enzima β -glucuronidasa. Se determinó que ambos promotores dirigen la expresión en plantas recién germinadas principalmente en meristemas; posteriormente en cotiledones, luego en el primer par de hojas, y conforme pasa el tiempo la expresión disminuye. Cuando la planta florece, ambos

promotores reactivan la expresión, la cual se incrementa hasta llegar a polen maduro. Nuestros resultados, son comparables con los datos disponibles en las bases de datos de análisis de la expresión génica, en los que también se observa una expresión fuerte en polen maduro.

En relación con la regulación de los niveles de expresión por situaciones de estrés y en respuesta a distintos estímulos, observamos un ligero aumento en los niveles de transcripción para el gen *AtOXR4* en respuesta al tratamiento con SA y con el compuesto 3-AT. Por otro lado, cuando analizamos la regulación de la expresión del gen *AtOXR2*, detectamos un mayor aumento en los niveles de transcripción frente a condiciones de crecimiento que generan ROS. Esto es, tratamientos prolongados con luz, calor, 3-AT y exposición a luz UV-B. Estos resultados enfatizan nuestra hipótesis acerca de la existencia de una posible especialización en la función de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* de *Arabidopsis*.

7.3. CAPÍTULO III

“Estudio de plantas sobreexpresantes y mutantes de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*”

CAPÍTULO III

7.3.1. Obtención de plantas de *Arabidopsis* con niveles alterados de *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Con el fin de avanzar hacia la comprensión de las funciones que podrían desempeñar los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* en plantas de *Arabidopsis*, decidimos realizar estudios de pérdida o ganancia de función, generando plantas con niveles alterados de los transcritos de estos genes. Para ello, obtuvimos plantas que expresan constitutivamente mayores niveles de transcritos de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*, y adquirimos semillas de plantas mutantes insercionales en estos genes de interés.

7.3.1.1. Obtención de plantas con mayores niveles de expresión.

Para llevar adelante nuestra estrategia realizamos dos construcciones expresando los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* bajo el control del promotor constitutivo *35SCaMV*. Para sobreexpresar *AtOXR2*, clonamos una región de 912 pb que representa el ADNc completo, en el vector pEarlyGate-100 (Karimi y col., 2002). Así, obtuvimos la construcción *35S::AtOXR2* con la que transformamos plantas de *Arabidopsis* Col-0. Se obtuvieron distintas líneas homocigotas, de las cuales se seleccionaron las líneas en estudio en este trabajo de tesis a las que señalamos como A, B, C, D y E. Utilizando una estrategia similar, clonamos un fragmento de 1185 pb correspondientes a la región codificante de *AtOXR4* en el mismo vector binario, obteniéndose así la construcción *35S::AtOXR4*. De las plantas transformadas con esta construcción se seleccionaron las líneas A, B, C y D. Una vez seleccionadas las líneas, analizamos los niveles de expresión para ambos transgenes tanto mediante ensayos de Northern Blot como de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los resultados se muestran en la figura 7.3-1.

Los niveles de expresión obtenidos para las plantas *35S::AtOXR2* (Figura 7.3-1 a y b) fueron en general mayores a los obtenidos para las plantas *35S::AtOXR4* (Figura 7.3-1 c y d).

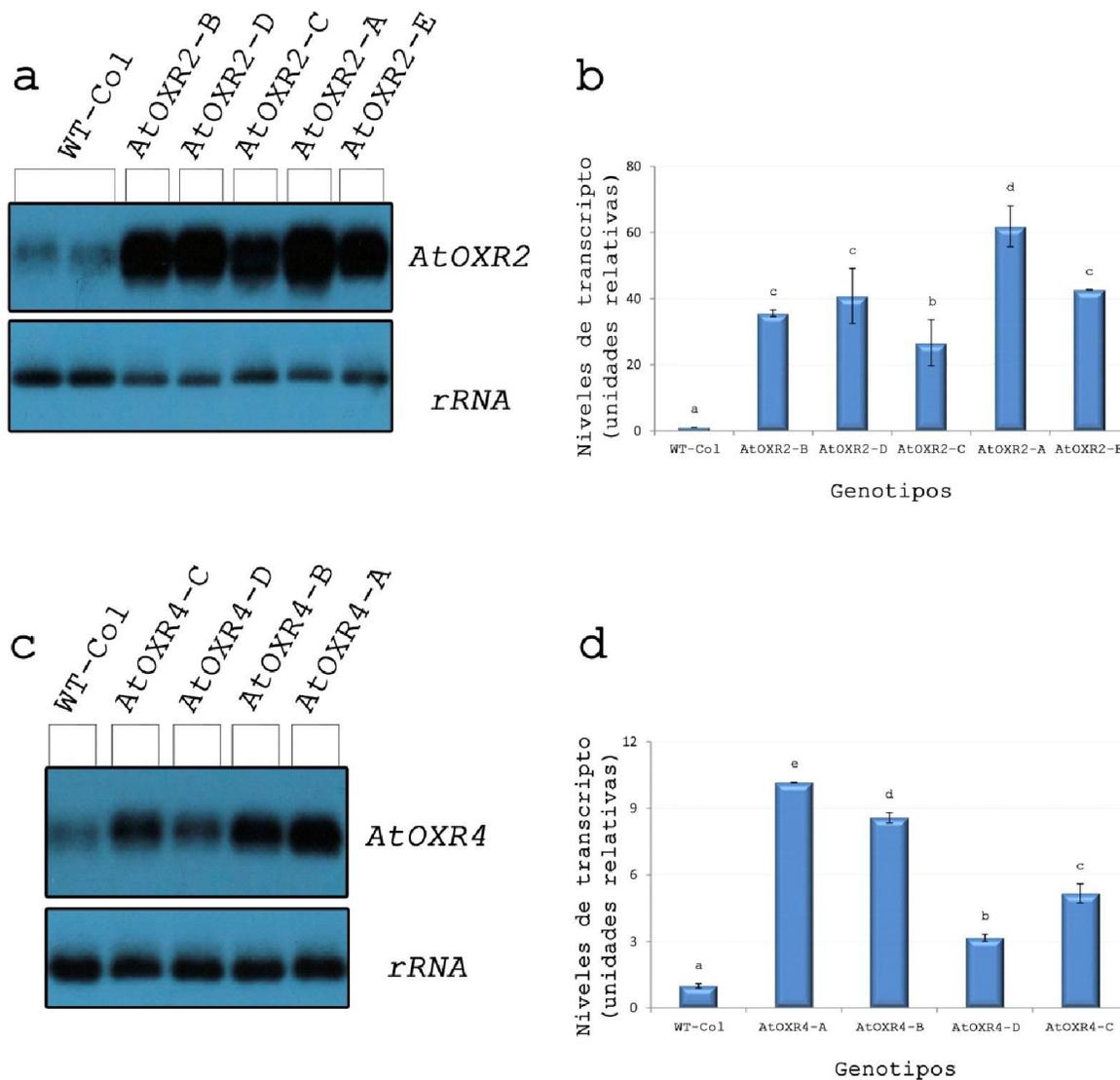


Figura 7.3-1 | Niveles de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en plantas homocigotas *35S::AtOXR2* y *35S::AtOXR4*. Se extrajo ARN de plantas homocigotas de 3 semanas y se procedió a su análisis por distintas técnicas. **a-** Niveles de expresión de *AtOXR2* medidos mediante northern blot. **b-** Niveles de expresión de *AtOXR2* medidos mediante RT-qPCR. **c-** Niveles de expresión de *AtOXR4* medidos mediante northern blot. **d-** Niveles de expresión de *AtOXR4* medidos mediante RT-qPCR. Los resultados de RT-qPCR se expresan en unidades relativas a los niveles de expresión en plantas WT (WT= 1). Las barras de error representan la desviación estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

7.3.1.2. Obtención de plantas con niveles disminuidos de *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Para la obtención de plantas con niveles disminuidos, o que no expresen los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*, se adquirieron semillas en el banco de semillas del sitio ABRC (del inglés,

Arabidopsis Biological Resource Center; <https://abrc.osu.edu/>). En la figura 7.3-2 a y b se observan los esquemas a escala de la estructura exón-intrón de ambos genes y se señala la posición de la inserción de T-DNA para ambas mutantes $\Delta oxr2$ y $\Delta oxr4$. Como se observa en la figura 7.3-2 c, los niveles de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* se encuentran significativamente disminuidos en las respectivas mutantes. La información de los oligonucleótidos utilizados para la identificación y el análisis de las plantas mutantes insercionales se encuentran en el ANEXO I de este manuscrito de tesis.

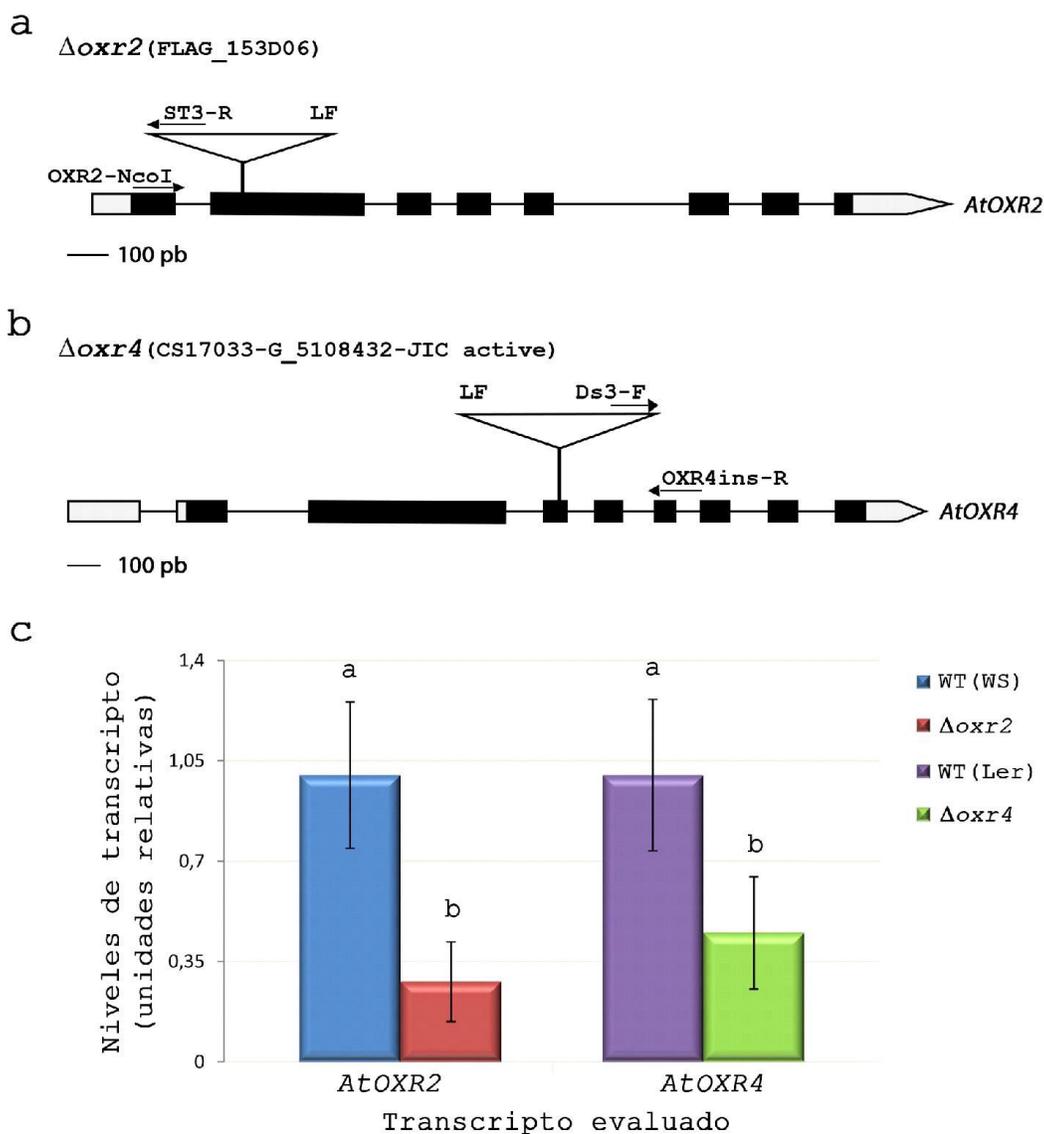


Figura 7.3-2 | Esquema de la inserción de T-DNA en las plantas $\Delta oxr2$, $\Delta oxr4$ y niveles de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4*. a- Esquema de la inserción de T-DNA en el genoma de plantas $\Delta oxr2$. Dichas plantas son ecotipo *Wassilewskija* (WS). Se señalan los oligonucleótidos utilizados para identificar la inserción (OXR2-NcoI y ST3-R) b-

Esquema de la inserción de T-DNA en el genoma de plantas $\Delta oxr4$. Las plantas son del ecotipo *Landsberg erecta* (Ler). Se señalan los oligonucleótidos utilizados para identificar la inserción (DS3-F y OXR4ins-R) c- Cuantificación de los niveles de transcripto de *AtOXR2* en plantas WT (WS) y $\Delta oxr2$; y detección de niveles de expresión de *AtOXR4* en plantas WT (Ler) y $\Delta oxr4$. En ambos casos se tomó como valor unitario el valor correspondiente a expresión de cada gen en las respectivas plantas salvajes. Las barras de error representan la desviación estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$. La información acerca de las secuencia de los respectivos oligonucleótidos se encuentra en el ANEXO I.

7.3.2. Caracterización fenotípica de plantas con niveles alterados de *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Con el objetivo de comprender los mecanismos en los que podrían participar los genes en estudio, decidimos realizar una caracterización fenotípica de las plantas transgénicas obtenidas. La misma contempló la medición de parámetros tales como longitud de raíces de plántulas crecidas en placas verticales, número de hojas de la roseta, área foliar, radio máximo de la roseta, tiempo de floración, producción de semillas, largo del tallo entre otros parámetros sugeridos por Boyes y col. (2001). Adicionalmente, se midieron parámetros relacionados al balance del estado redox celular, los que se detallarán en el próximo capítulo (ver sección 7.4.3). Entre estos parámetros podemos citar: tinción con DAB y NBT para detección directa de ROS, peroxidación lipídica como detección indirecta de ROS y determinación de ascorbato y glutatión (moléculas que participan en la detoxificación de ROS conocidas como “scavengers” de ROS).

7.3.2.1. Determinación de longitud de raíces en plántulas.

Para evaluar la longitud de raíces de plántulas, se sembraron semillas de plantas sobreexpresantes en placas con medio MS, y se hicieron crecer en forma vertical. La longitud de las raíces se cuantificó a los 4, 6, 9 y 11 días luego de la siembra, utilizando el programa libre RootDetection 3.0 (Materiales y Métodos 6.2.27). En las condiciones de crecimiento evaluadas no se observaron diferencias significativas entre el largo de las raíces de las plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y las plantas WT (Figura 7.3-3 a, curvas bordó, azul y verde, respectivamente).

Por otro lado, debido a que distintos miembros de la familia OXR fueron aislados debido a su capacidad de actuar frente a situaciones de crecimiento generadoras de estrés oxidativo (Elliott y Volkert, 2004; Volkert y col., 2000), decidimos evaluar qué ocurría con este parámetro en plantas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de estrés oxidativo. Para esto, realizamos ensayos de crecimiento en medio MS0.5X con el agregado del herbicida Metilviológeno (MV). El MV es capaz de inducir la producción de ROS debido a su capacidad para generar $O_2^{\bullet-}$ como consecuencia de la oxidación de los fotosistemas (Han y col., 2014) o a nivel del PSI (Kim y Lee, 2003). En función de lo reportado en la bibliografía (Kim y Lee, 2003), se evaluaron dos concentraciones de MV 0,05 μ M (Figura 7.3-3 a) y 0,1 μ M (Figura 7.3-3 b). En la Figura 7.3-3 c se observa una imagen del fenotipo observado en las plantas en estudio, a modo de ejemplo.

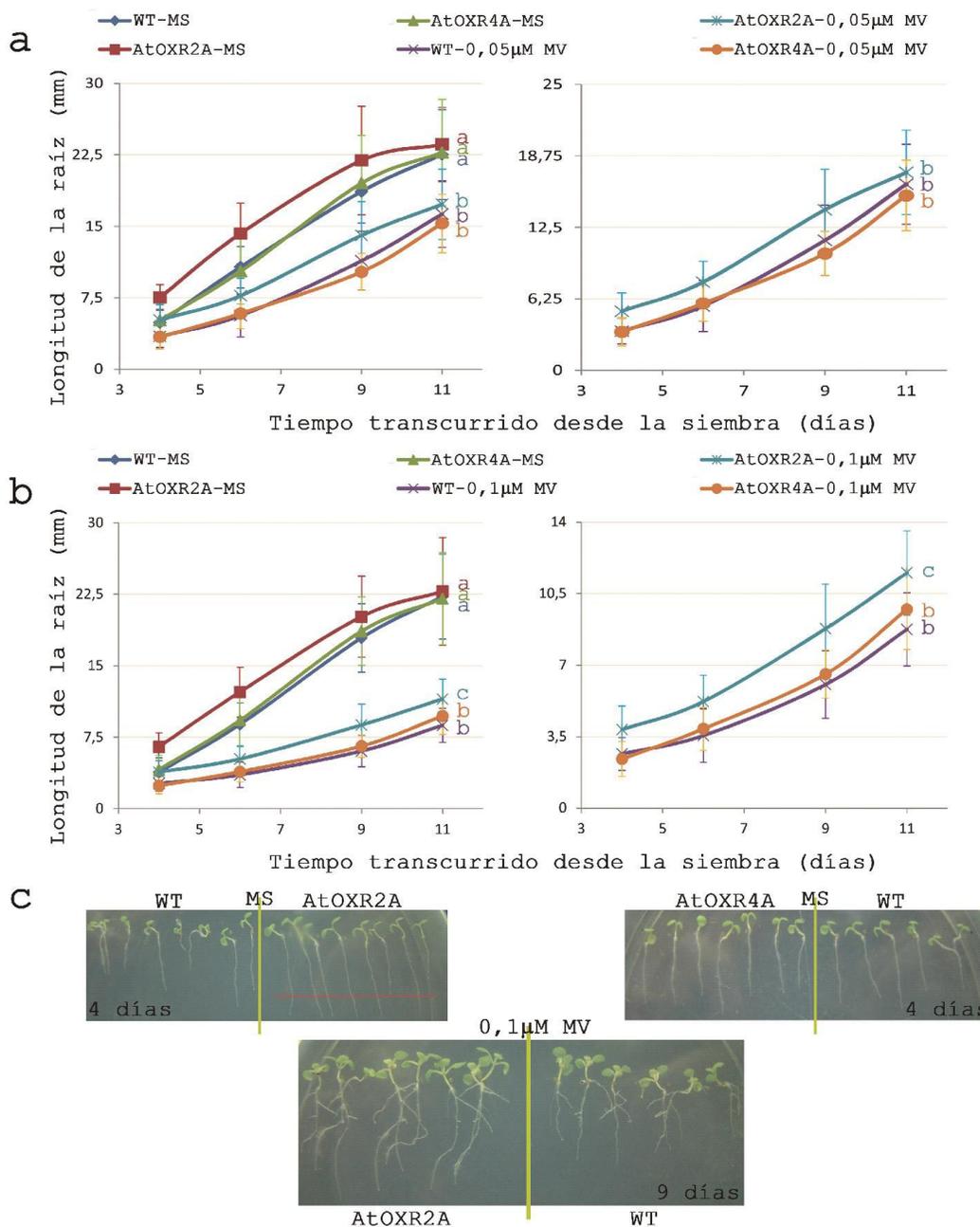


Figura 7.3-3 | Largo de raíces de plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT. Las semillas de los tres genotipos fueron sembradas en MS 0,5X y en el mismo medio conteniendo MV 0,05 μM y 0,1 μM . Se midió la longitud de raíces a los 4, 6, 9 y 11 días luego de la siembra. **a-** Longitud de las raíces en condiciones control MS y en presencia de MV 0,05 μM . La diferencia entre las curvas (MS vs. MV) indica que el tratamiento fue efectivo. Sin embargo, los 3 genotipos respondieron de manera similar. **b-** Longitud de las raíces cuando las semillas fueron germinadas en presencia de MV 0,1 μM . Cuando el estrés oxidativo es mayor, las curvas obtenidas para las plantas tratadas se separan en mayor medida de las plantas control. Similar a lo observado en **a**, las curvas de tratamiento son distintas a las de crecimiento en condiciones control. Sin embargo, en esta condición, *AtOXR2-A* produce raíces más largas que los genotipos WT y *AtOXR4-A*. A la derecha se muestran las mismas curvas que en el gráfico izquierdo pero haciendo un cambio de escala para mostrar con más claridad las diferencias obtenidas. **c-** Imágenes representativas del fenotipo de raíces obtenido para los tres genotipos evaluados. Las barras de error representan

la desviación estándar. Las curvas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado). Ensayo $0,05 \mu\text{M}$ MV: $n_{\text{WT-MS}} = 76$; $n_{\text{AtOXR2A-MS}} = 53$; $n_{\text{AtOXR4A-MS}} = 47$; $n_{\text{WT-0,05}\mu\text{M}} = 78$; $n_{\text{AtOXR2A-0,05}\mu\text{M}} = 48$; $n_{\text{AtOXR4A-0,05}\mu\text{M}} = 42$. Ensayo $0,1 \mu\text{M}$ MV: $n_{\text{WT-MS}} = 79$; $n_{\text{AtOXR2A-MS}} = 47$; $n_{\text{AtOXR4A-MS}} = 45$; $n_{\text{WT-0,1}\mu\text{M}} = 73$; $n_{\text{AtOXR2A-0,1}\mu\text{M}} = 48$; $n_{\text{AtOXR4A-0,1}\mu\text{M}} = 46$.

La presencia de MV en el medio de crecimiento de *Arabidopsis* disminuye la tasa de crecimiento de las raíces a partir del día 4 de crecimiento en todos los genotipos estudiados. Este efecto es directamente proporcional a la concentración del agente oxidante (comparar las Figuras 7.3-3 a, b y c). No se observaron diferencias significativas entre la longitud de las raíces de las plantas *AtOXR2-A*, *AtOXR4-A* y WT (Figura 7.3-3 a, curva celeste, curva naranja y curva violeta, respectivamente) cuando las plantas son crecidas en presencia de MV $0,05 \mu\text{M}$. Sin embargo, las plantas *AtOXR2-A* presentan raíces más largas respecto de las plantas WT cuando son crecidas en presencia de MV $0,01 \mu\text{M}$ (Figura 7.3-3 b, curva celeste vs. curva violeta y Figura 7.3-3 c). Este ensayo se repitió posteriormente con cuatro genotipos diferentes (*AtOXR2-B*, *AtOXR2-C*, *AtOXR4-B*, y *AtOXR4-C*) obteniéndose resultados similares.

Estos resultados nos permiten sugerir que la sobreexpresión de *AtOXR2* genera una ventaja en el desarrollo de la raíz principal cuando en el medio de cultivo se generan ROS.

En función de este resultado nos preguntamos si la expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* es regulada por MV. Se evaluó la expresión de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4* en plántulas completas en cada punto de la curva de crecimiento en presencia de MV $0,05 \mu\text{M}$ y $0,1 \mu\text{M}$ (Figura 7.3-4). La presencia de MV genera un aumento en los niveles de transcripto tanto para *AtOXR2* como para *AtOXR4*. Sin embargo, tanto la cinética como los máximos de expresión son diferenciales, siendo la expresión de *AtOXR2* significativamente mayor que la de *AtOXR4* ($6,32 \pm 0,642$ vs. $2,26 \pm 0,186$; en los correspondientes puntos de máxima expresión). La inducción de la expresión de *AtOXR2* parece ser sostenida a largo del tiempo mientras que la inducción de *AtOXR4* disminuye significativamente con el tiempo.

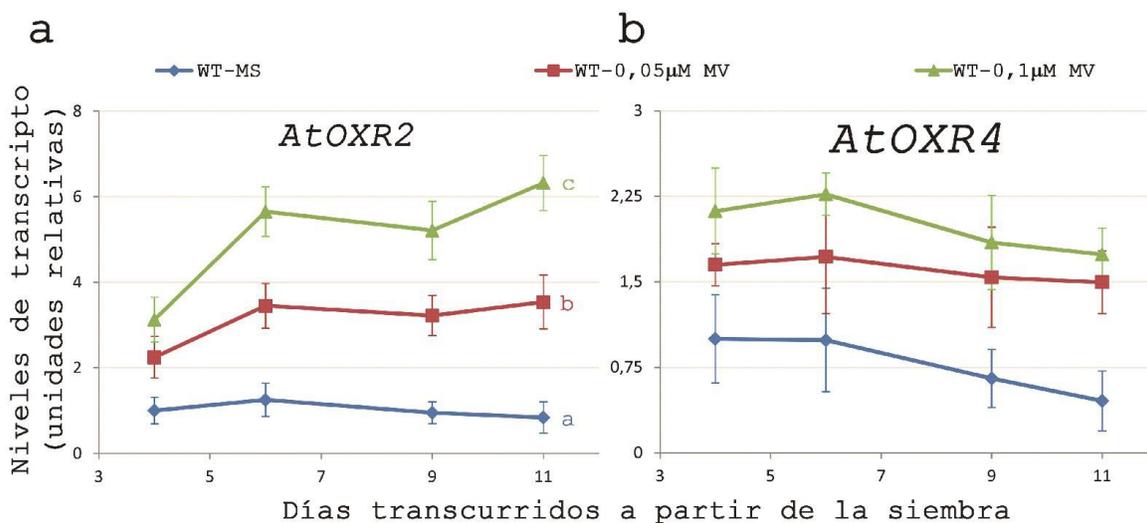


Figura 7.3-4 | Niveles de expresión de *AtOXR2* y *AtOXR4* en plantas salvajes utilizadas en el ensayo de evaluación de la raíz en condiciones de estrés oxidativo. La extracción de ARN se realizó sobre plántulas completas; es decir, se utilizó tejido radicular y tejido aéreo. Se tomaron entre 30-40 plántulas por determinación. Luego de extraer el ARN el extracto se fraccionó en 3 grupos. **a-** Niveles de expresión de *AtOXR2*. **b-** Niveles de expresión de *AtOXR4*. Se tomó arbitrariamente el valor de *AtOXR2* o de *AtOXR4* del día 4 en MS 0,5X como valor unitario, y en base a ese valor se calcularon los restantes valores. Las barras de error representan la desviación estándar de los 3 grupos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Si bien la expresión de ambos genes se induce en presencia de MV, la diferencia en el perfil de expresión y el incremento de longitud de la raíz principal en plantas *35S::AtOXR2* en condiciones de estrés, podría reflejar funciones distintas entre *AtOXR2* y *AtOXR4* frente a situaciones de estrés que generen aniones $O_2^{\bullet -}$ y ROS en general o una diferencia jerárquica en sus funciones.

Con el objetivo de reflejar una función diferencial entre *AtOXR2* y *AtOXR4* en el desarrollo de la raíz principal durante situaciones de estrés, realizamos el mismo ensayo pero empleando las plantas $\Delta oxr2$ y $\Delta oxr4$. En los ensayos de determinación de la longitud de la raíz mostrados previamente se determinó que las mediciones de la longitud de la raíz en placas verticales no se pueden realizar luego del noveno día de crecimiento. Este número no es arbitrario, sino que se correlaciona directamente con un valor de 20 mm de longitud de la raíz.

En condiciones control no se observaron diferencias entre la longitud de la raíz principal (Figura 7.3-5). Sin embargo, la longitud de la raíz principal de las plantas $\Delta oxr2$ es menor que las

de las plantas WT cuando fueron tratadas con el herbicida MV (Figura 7.3-5). Este resultado sugiere que las plantas $\Delta oxr2$ presentan menor tolerancia al estrés oxidativo que las plantas WT (WS). Además y contrario a lo observado con las plantas sobreexpresantes, las pendientes de crecimiento para las curvas de longitud de la raíz principal son notoriamente distintas entre $\Delta oxr2$ y WT (WS) (detalle de la Figura 7.3-5, derecha). Esto significa que si bien podrían existir diferencias durante la germinación, uno de los factores que afectan a la diferencia radicular es la menor tasa de crecimiento de las plantas $\Delta oxr2$ respecto de las plantas WT (WS). Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre las plantas deficientes en *AtOXR4* y las plantas WT (datos no mostrados).

Estos resultados nos permiten sugerir que la expresión de *AtOXR2* es necesaria para que la planta pueda mantener el desarrollo de la raíz principal frente a una situación estrés. Además, el incremento de los niveles de *AtOXR2* por encima de los niveles fisiológicos en las plantas sobreexpresantes *35S::AtOXR2* refuerza la acción beneficiosa de esta proteína.

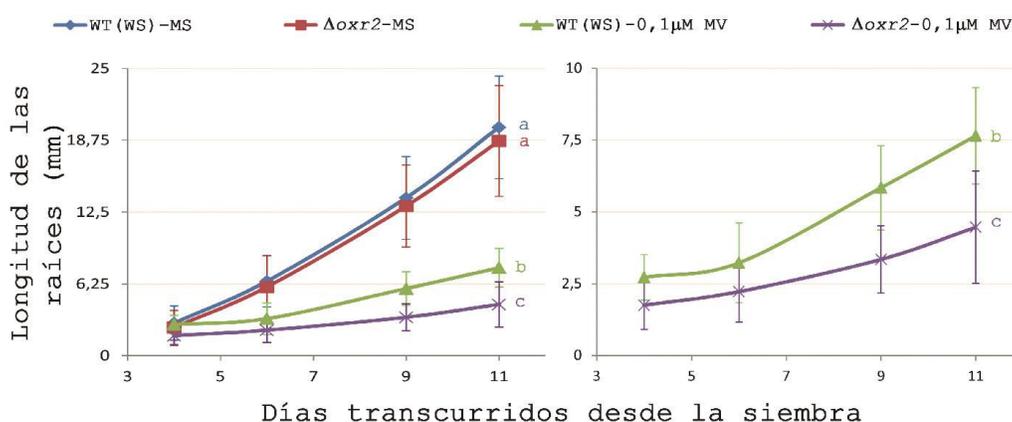


Figura 7.3-5 | Longitud de la raíz primaria en plantas $\Delta oxr2$ y WT (WS). Las semillas de los dos genotipos fueron sembradas en MS 0,5X y en el mismo medio conteniendo MV 0,1 μ M. Se midió la longitud de la raíz principal a los 4, 6, 9 y 11 días luego de la siembra. Se muestra la longitud de raíces de plantas crecidas en condiciones control y bajo estrés oxidativo generado mediante la aplicación de 0,1 μ M de MV. En el panel derecho se aplica un cambio de escala para observar con claridad las curvas. Las barras de error representan la desviación estándar. Las curvas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado). $n_{WT(WS)-MS} = 43$; $n_{\Delta oxr2-MS} = 41$; $n_{WT(WS)-0,1\mu M MV} = 39$; $n_{\Delta oxr2-0,1\mu M MV} = 36$.

Los resultados diferenciales obtenidos en la longitud de la raíz principal en plantas con niveles alterados de los genes *AtOXR* nos plantearon el interrogante de la función de estas proteínas en la arquitectura del sistema radicular. Llamativamente, cuando se evaluó el número de raíces laterales en plantas *35S::AtOXR2* y *35S::AtOXR4* en condiciones control, ambos genotipos presentaron un mayor número de raíces laterales que el observado en plantas WT (Figura 9.3-1, Anexo III). Sin embargo solo las plantas $\Delta oxr2$ mostraron el comportamiento opuesto (Figura 9.3-2, Anexo III) mientras que las plantas $\Delta oxr4$ no mostraron diferencias respecto de sus pares salvajes (datos no mostrados). En presencia de MV 0,1 μ M, todos los genotipos estudiados muestran la misma tasa de crecimiento sin bien las plantas *35S::AtOXR2* siempre muestran un mayor número de raíces laterales (Figura 9.3-1, Anexo III) y las plantas $\Delta oxr2$ un menor número de raíces secundarias (Figura 9.3-2, Anexo III). Este resultado nos permite sugerir que *AtOXR2* podría contribuir al desarrollo de las raíces secundarias. La función de *AtOXR4* en este proceso requiere un estudio mayor dado que la deficiencia de este gen no genera alteraciones en las raíces laterales.

7.3.2.2. Estudio de parámetros de crecimiento de tejidos aéreos de plantas con niveles alterados de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*.

Las diferencias en la morfología de las raíces nos permitió suponer que podrían existir diferencias en los tejidos aéreos de las plantas *35S::AtOXR2*. Esto es debido a que el tejido radicular es el encargado de transportar nutrientes y agua desde el suelo hacia la parte aérea, de esta manera parecía razonable esperar alguna alteración en el desarrollo de las inflorescencias, el llenado de vainas o en la producción de tejido foliar. Debido a la importancia agronómica de la biomasa aérea (principalmente en plantas forrajeras) también evaluamos esta característica. Las condiciones de cultivo fueron las detalladas en Materiales y Métodos 6.2.8.

Para el seguimiento del fenotipo se tomó como base el estudio publicado por Boyes y col. (2001). En las figuras 7.3-6 y 7.3-7 se muestran dos genotipos representativos, si bien todos los experimentos se realizaron con cuatro genotipos para el caso de las plantas *35S::AtOXR2* y tres genotipos para el caso de las plantas *35S::AtOXR4*. Para las plantas que sobreexpresan el

gen *AtOXR2* se muestran los genotipos de mayor y de menor expresión, A y C respectivamente. Cuando el gen en estudio fue *AtOXR4*, las figuras se confeccionaron con los datos de la línea de mayor expresión y otra línea de media expresión, A y B respectivamente. Esto último se debe a los menores niveles de sobreexpresión obtenidos para *AtOXR4* en las plantas *35S::AtOXR4*.

7.3.2.2.1. Determinación del número de hojas.

Una evaluación sencilla, pero que puede arrojar mucha información respecto del desarrollo del tejido aéreo de la planta es el seguimiento del número de hojas a lo largo del tiempo. Las plantas WT y *35S::AtOXR4* mostraron entre 10 y 12 hojas de roseta al día 41 de crecimiento, mientras que las plantas *35S::AtOXR2* presentaron 16 hojas en promedio (Figura 7.3-6 a). A los 30 días, las plantas *35S::AtOXR2* tienen 2 pares más de hojas respecto de las plantas WT, e incluso el genotipo de mayor expresión, *AtOXR2-A*, tiene la primera hoja del séptimo par (Figura 7.3-6 b). Al día 38 de crecimiento, se observa que las rosetas de plantas *AtOXR2-A* y *AtOXR-B* aún conservan su primer par de hojas, mientras que sus pares salvajes ya las perdieron (Figura 7.3-6 b).

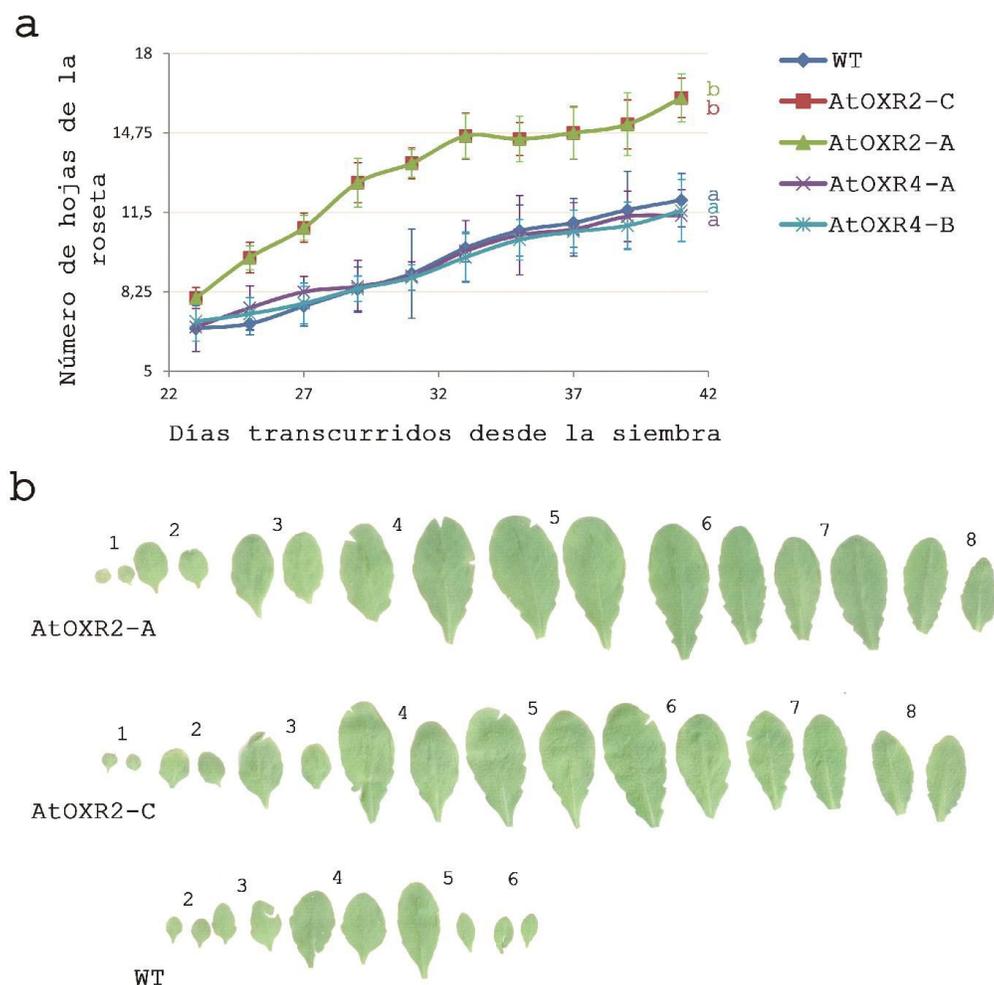


Figura 7.3-6 | Número de hojas y composición de la roseta de plantas *35S::AtOXR2* y WT al día 38. Las determinaciones se realizaron sobre los genotipos WT, y plantas con expresión ectópica y constitutiva de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*. **a-** Las curvas muestran el número de hojas durante 42 días de crecimiento. Las barras de error representan la desviación estándar de cada tiempo evaluado. **b-** Composición de la roseta de plantas *35S::AtOXR2* y WT al día 38 de crecimiento. Los números indican el par de hojas. Las curvas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado). $n_{WT} = 37$; $n_{AtOXR2-A} = 34$; $n_{AtOXR2-C} = 36$; $n_{AtOXR4-A} = 32$; $n_{AtOXR4-B} = 33$.

La dehiscencia de las hojas de la roseta refleja la edad de la planta y la ocurrencia de la senescencia (Fischer, 2012; Lim y col., 2007). De esta forma, nuestras observaciones sugieren que en las plantas WT se desarrolla el proceso de senescencia mientras que en las plantas *35S::AtOXR2* el meristema aún da lugar al desarrollo de nuevas hojas de roseta. La senescencia es un proceso que depende de la edad de la hoja y esta genéticamente relacionado con la expresión de una familia de genes denominados *SAGs* (del inglés, *SENESCENCE-ASSOCIATED*

GENEs) (Breeze y col., 2011; Lim y col., 2007; Yoshida, 2003). De acuerdo con esto, en el ensayo de análisis del transcriptoma realizado al día 38 de crecimiento en rosetas de plantas *35S::AtOXR2*, se observa una reducción significativa de la expresión del marcador de senescencia *SAG12* respecto de las plantas WT (ver sección 7.4.2 y tabla 9.3.2, ANEXO III). *SAG12* codifica una proteasa de cisteína vacuolar y su expresión está estrictamente asociada a la presencia de tejidos senescentes y es mínima en hojas jóvenes (Noh y Amasino, 1999). Este gen es ampliamente usado como un marcador de senescencia (Buchanan-Wollaston y col., 2005; Vogelmann y col., 2012). Este resultado sugiere que la sobreexpresión de *AtOXR2* retrasa el desarrollo, tal vez retrasando el pasaje al estado reproductivo, que es una de las señales (el cambio en la relación tejido fuente-tejido receptor) fuentes hacia el comienzo de la senescencia (van Doorn, 2008). Dado que la disminución de la expresión de distintos genes reguladores de la senescencia (*AtWRKY6*, *ATWRKY53*, *AHK3*, *PAD4*, *EDS1*, *SAUL1*, *SGT1* entre otros; Lee y col., 2016; Vogelmann y col., 2012; Zentgraf y col., 2010) no es estadísticamente significativa no es posible sugerir que la acción de *AtOXR2* esté directamente vinculada al proceso de senescencia.

Por otro lado, un mayor número de hojas implica mayor superficie fotosintética, algo que se traduce como una mayor captación de energía y que podría servirle a la planta para incrementar el número de semillas, o podría almacenar energía para futuras situaciones en donde dicha energía sea relevante, entre otros usos (Long y col., 2006; Sinclair y col., 2004). Sin embargo, el incremento no sólo es en el número de hojas, sino también en el radio máximo de la roseta de las plantas *35S::AtOXR2* respecto a las plantas WT (Figura 7.3-7). El incremento en este parámetro podría estar relacionado con pecíolos más largos, o con un mayor área foliar, o con ambas cosas. La diferencia, mediante simple inspección visual, radica en el tamaño de las hojas. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon las plantas *35S::AtOXR4* y WT (Figura 7.3-7).

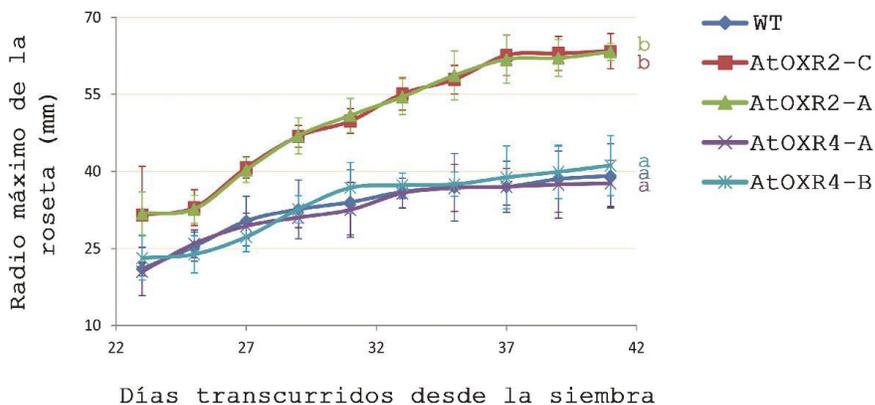


Figura 7.3-7 | Radio máximo de la roseta en plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT. Las determinaciones se realizaron sobre los genotipos WT, y plantas con expresión ectópica y constitutiva de los genes *AtOXR2* y *AtOXR4*. Las barras de error representan la desviación estándar de cada tiempo evaluado. Las curvas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado). $n_{WT} = 37$; $n_{AtOXR2-A} = 34$; $n_{AtOXR2-C} = 36$; $n_{AtOXR4-A} = 32$; $n_{AtOXR4-B} = 33$.

7.3.2.2.2. Cálculo del área foliar, del número de aserramientos y del coeficiente de circularidad.

Como se mencionó en la sección anterior, a simple vista se puede observar la diferencia en el área de las hojas de plantas *35S::AtOXR2* en comparación con la de las plantas *35S::AtOXR4* y WT. Para cuantificar esta variable, decidimos utilizar la herramienta informática LAMINA (<http://sourceforge.net/projects/lamina/>; Bylesjö y col., 2008). El software requiere que el usuario escanee las hojas de las plantas sobre un fondo con color distinto al verde (en nuestro caso utilizamos hojas blancas tipo A4), y además se confeccionó un cuadrado de relleno color azul cuya longitud es conocida y que el programa utilizó para calibrar. Con esta información, LAMINA genera un fondo azul para distinguir las hojas del fondo de la imagen. Luego, filtra la imagen y determina bordes, los cuales permiten inferir cavidades, aserramientos de las hojas y circularidad de las mismas, entre otros parámetros. En la figura 7.3-8 se muestran los resultados obtenidos para plantas de 24, 30 y 38 días de crecimiento.

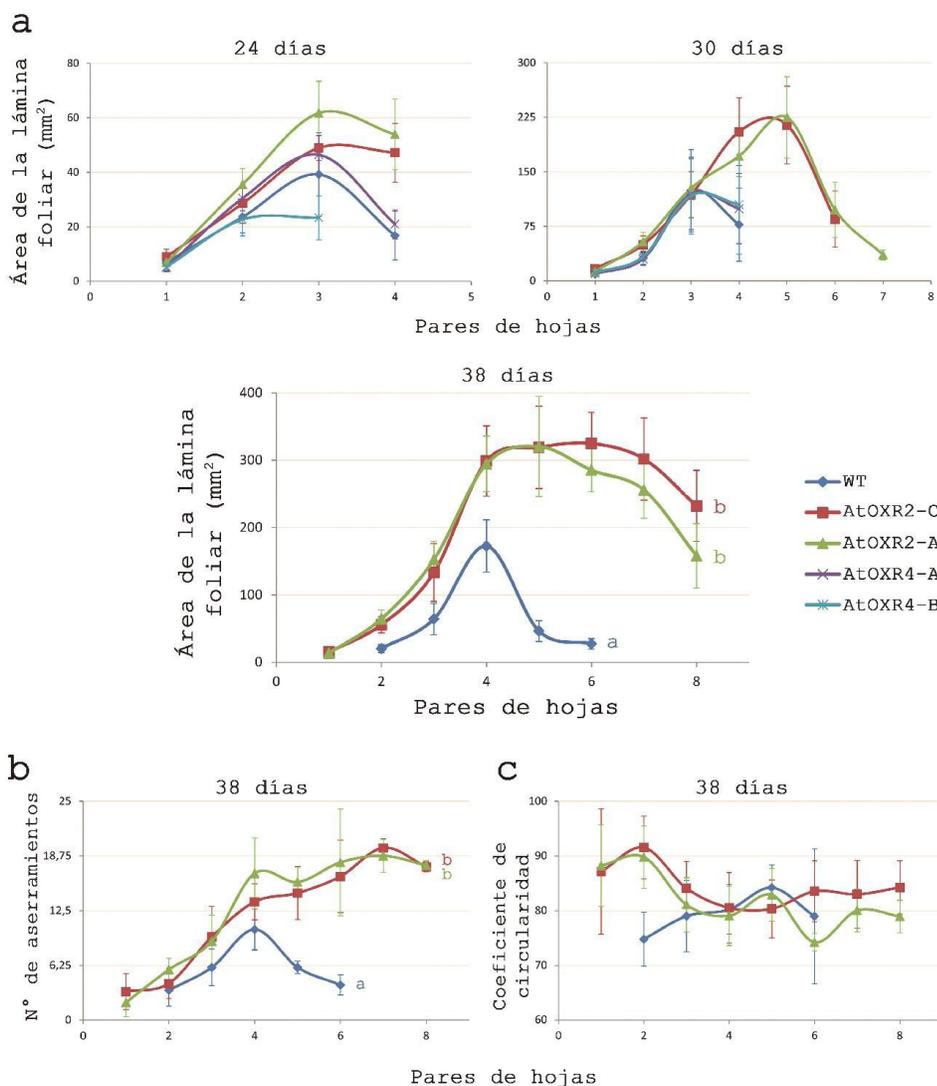


Figura 7.3-8 | Área foliar, número de aserramientos y coeficiente de circularidad en plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT. Rosetas de 5-7 plantas de 24, 30 y 38 días se analizaron utilizando el programa LAMINA. **a-** Se muestra el área foliar de plantas crecidas durante 24, 30 y 38 días. Para el análisis se separaron las hojas de la roseta de a pares. De esta manera, el análisis se realizó sobre el primer par de hojas, segundo par de hojas, y así sucesivamente. A los 38 días transcurridos desde la siembra, los resultados demostraron valores casi idénticos para WT y para los genotipos AtOXR4-A y AtOXR4-B. Por este motivo, en las curvas correspondientes a 38 días posteriores a la siembra sólo se muestran los resultados para los genotipos WT, AtOXR2-A y AtOXR2-B. **b-** Número de aserramientos. **c-** Coeficiente de circularidad de las hojas estudiadas a 38 días (100 es un círculo perfecto, y desde ese valor hacia abajo significa que la hoja es más alargada). Las barras de error representan la desviación estándar de cada tiempo evaluado. Las curvas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado).

Consistente con lo observado para los parámetros número de hojas y radio máximo de la roseta (Figuras 7.3-6 y 7.3-7), el área de las plantas que expresan ectópica y

constitutivamente el gen *AtOXR4* no muestra diferencias significativas con las plantas WT (Figura 7.3-8 a). En cambio, el área foliar de las plantas *35S::AtOXR2* es mayor que el de las plantas WT (Figura 7.3-8 a). Si bien a los 24 días después de la siembra, las plantas *35S::AtOXR2* ya tienen mayor área foliar en el cuarto par de hojas, esta diferencia se incrementa con el pasar de los días. A los 38 días todas las hojas de las plantas *35S::AtOXR2* son más grandes que las hojas de las plantas salvajes (Figura 7.3-8 a).

Por otro lado, al evaluar la información mostrada en las figuras 7.3-6 b y 7.3-8 b, se puede deducir que las plantas *35S::AtOXR2* presentan mayor cantidad de aserramientos que las plantas WT en el cuarto, quinto y sexto par de hojas. Sin embargo, esto no es más que una correlación con el tamaño de la lámina. Es decir, a mayor tamaño de la lámina foliar, mayor cantidad de aserramientos. Esto es fácil de notar, ya que las curvas para el área foliar (Figura 7.3-8 a) así como las de número de aserramientos (Figura 7.3-8 b) tienen una forma similar. Para el caso del coeficiente de circularidad (Figura 7.3-8 c), se observa que las curvas de todos los genotipos evaluados alcanzan una asíntota aproximadamente en el mismo valor (valor 85 de dicho coeficiente). Aunque es destacable, que el segundo par de hojas de las plantas *35S::AtOXR2* es más circular que el segundo par de hojas de plantas salvajes (Figura 7.3-8 c).

Finalmente, se puede mencionar que la forma de las curvas es similar entre las plantas transgénicas y las salvajes (Figura 7.3-8 c). Esto podría significar que el programa de desarrollo foliar no se altera por la sobreexpresión de *AtOXR2* o *AtOXR4*, sino parece haber ocurrido una prolongación en la ventana de tiempo durante el cual se produce el desarrollo foliar o vegetativo en las plantas *35S::AtOXR2* respecto de las plantas WT.

7.3.2.2.3. Evaluación de la biomasa de las rosetas.

Los resultados obtenidos con respecto al aumento en el número de hojas y al incremento del área foliar de las plantas *35S::AtOXR2* nos hizo preguntarnos cuál sería el cambio generado en la biomasa de estas plantas. Para evaluar este parámetro, se cortaron y pesaron 5 rosetas de plantas de cada genotipo crecidas durante 4 y 6 semanas (Figura 7.3-9 a, izquierda y derecha respectivamente). A las 4 semanas las plantas *35S::AtOXR2* tienen el doble

de biomasa que la planta WT mientras que a las seis semanas la biomasa de estas plantas triplica el de las plantas WT (Figura 7.3-9 b). Por otro lado, la biomasa de las plantas que sobreexpresan *AtOXR4* es similar a la de las plantas WT (Figura 7.3-9 b).

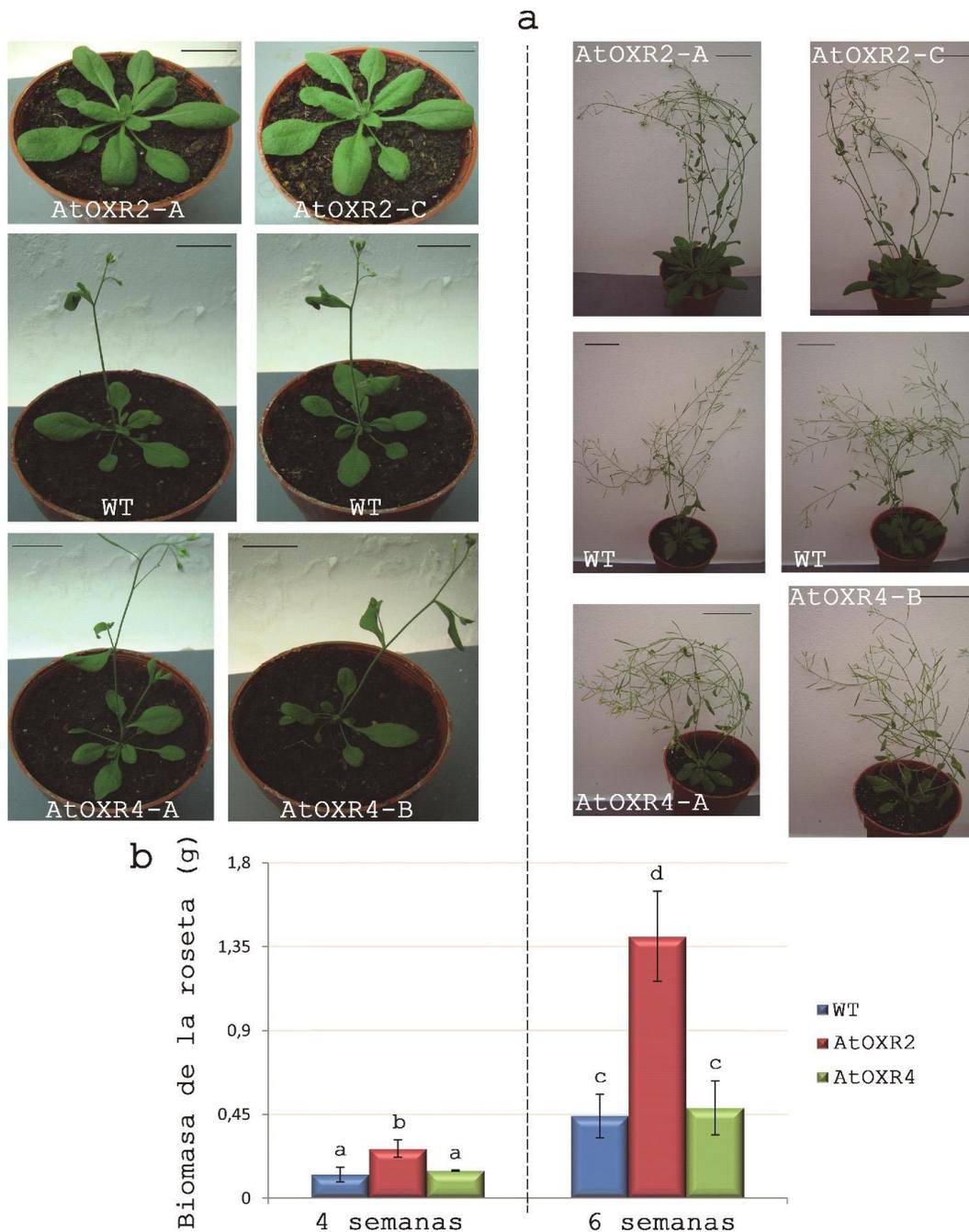


Figura 7.3-9 | Biomasa de la roseta de plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT crecidas durante 4 y 6 semanas.
a- A la izquierda, se muestran fotos de plantas de 4 semanas y a la derecha fotos de plantas de 6 semanas. En el grupo de 4 semanas las barras de calibrado indican una longitud de 3 cm., mientras que en plantas de 6 semanas indican una longitud de 6 cm. **b-** Se muestra un gráfico de barras con los resultados obtenidos para las biomásas de

las rosetas de los distintos grupos. Dada la similitud de los valores se optó por juntar los genotipos AtOXR2 (A y C) y AtOXR4 (A y B) y graficar el grupo como AtOXR2 y AtOXR4. Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas denotan que las medias entre las muestras son distintas ($p < 0,05$, análisis de la varianza (ANOVA); prueba de Tukey para comparaciones múltiples). $n_{WT} = 5$, $n_{AtOXR2} = 10$, $n_{AtOXR4} = 10$.

Las imágenes mostradas la figura 7.3-9 sugieren que las plantas *35S::AtOXR2* requieren más tiempo (días) para pasar al estadio reproductivo que el requerido por las plantas WT. Cuando las plantas de *Arabidopsis* elongan su tallo, gran parte de la energía capturada por las hojas es utilizada para mantener estructuras reproductivas como flores y vainas. Plantas que demoran más tiempo en elongar el tallo o en comenzar el tiempo de floración pueden producir más hojas en el lapso diferencial de tiempo (ejemplo, mutantes en el gen inductor de la floración *LEAFY* o plantas *35S::miR156*; Grandi y col., 2012; Huijser y Schmid, 2011; Ohto y col., 2001;). Por este motivo, decidimos cuantificar la altura del tallo a diferentes tiempos.

7.3.2.2.4. Determinación de la longitud del tallo principal.

Se determinó el tiempo de elongación y la longitud del tallo. Las diferencias en el tiempo de elongación del tallo fueron apreciables fácilmente mediante inspección visual (Figura 7.3-10).



Figura 7.3-10 | Fenotipo de las líneas AtOXR2-A, AtOXR2-B y WT crecidas durante 4 semanas. Se puede observar la diferencia en el tiempo de elongación del tallo entre los tres genotipos estudiados.

Las plantas *35S::AtOXR2* retrasan 10 días el tiempo de elongación del tallo principal respecto de las plantas WT (Figura 7.3-11 a; curvas bordó y verde vs. curva azul). No se observaron diferencias significativas entre plantas *35S::AtOXR4* y WT (Figura 7.3-11 a, curvas violeta y celeste vs. curva azul). A los 36 días posteriores a la siembra, las plantas que expresan ectópicamente y constitutivamente *AtOXR2* presentan tallos que tienen entre 120 mm y 170 mm de longitud, mientras que las plantas WT tienen tallos que miden entre 190 mm y 250 mm de largo (Figura 7.3-11 a y b). En la foto comparativa de los tallos pueden apreciarse dos características, por un lado, las plantas *35S::AtOXR2* tienen un mayor número de ramificaciones a pesar de presentar menor altura (Figura 7.3-11 c) y, por otro, los tallos eran visiblemente más gruesos que las plantas WT (Figura 7.3-11 d y e).

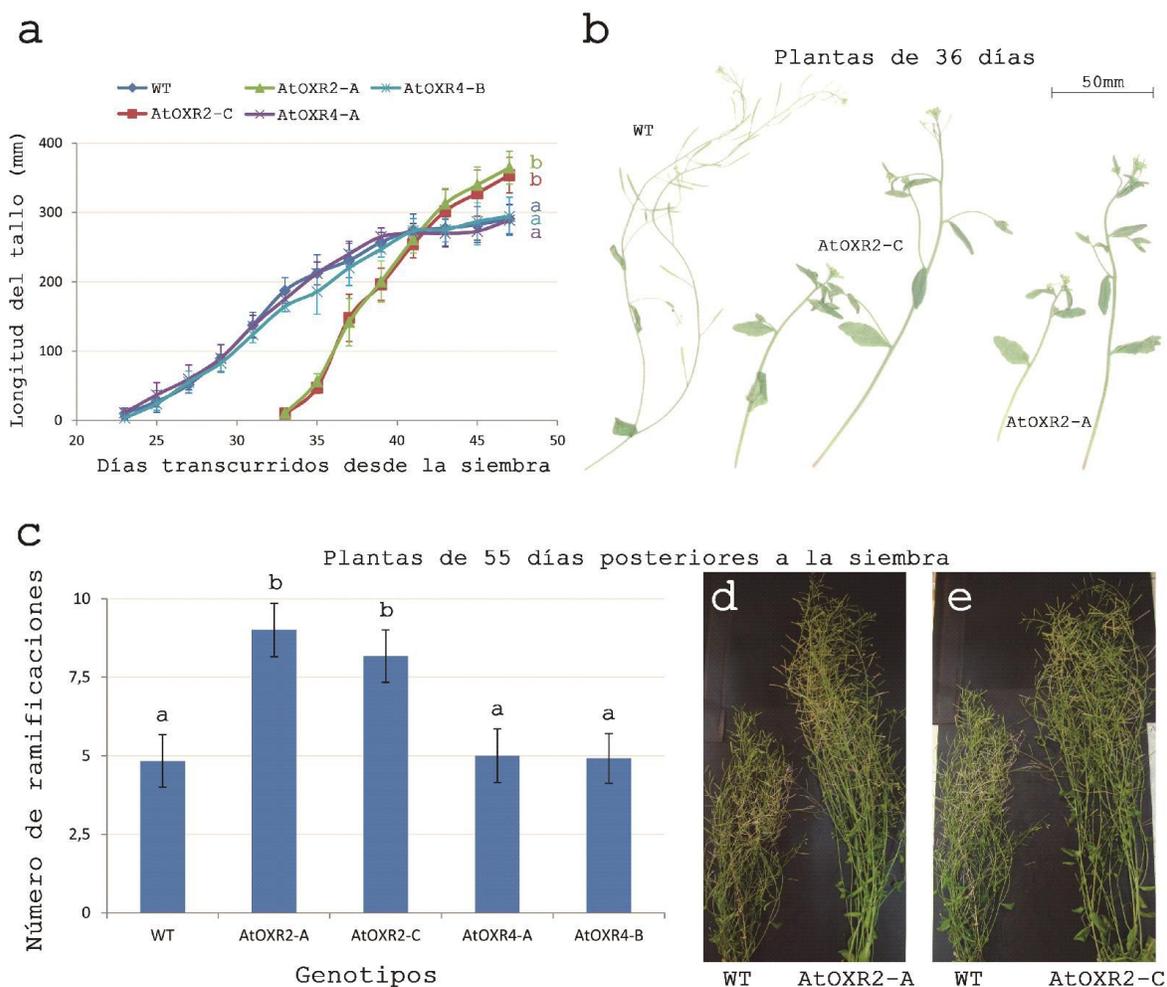


Figura 7.3-11 | Longitud del tallo principal y ramificaciones de plantas WT, *35S::AtOXR2* y *35S::AtOXR4*. a- Longitud del tallo en función del tiempo. **b-** Foto de los tallos de plantas de 36 días. **c-** Número de ramificaciones

en función del genotipo a los 55 días posteriores a la siembra. **d** y **e**- Fotos comparativas de plantas WT y plantas AtOXR2-A y AtOXR2-C. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas denotan que las medias entre las muestras son distintas ($p < 0,05$, análisis de la varianza (ANOVA); prueba de Tukey para comparaciones múltiples). $n_{WT} = 34$; $n_{AtOXR2-A} = 33$; $n_{AtOXR2-C} = 35$; $n_{AtOXR4-A} = 31$; $n_{AtOXR4-B} = 33$.

Las observaciones realizadas sobre el grosor del tallo nos llevaron a realizar cortes histológicos sobre las plantas *35S::AtOXR2* y WT. El análisis histológico se realizó sobre tallos de plantas de 6 semanas que se cortaron a una altura de entre 140 mm y 150 mm desde la base del tallo (Figura 7.3-12 a). Los cortes histológicos nos permitieron cuantificar el área de los tallos a la altura a la que se realizaron los cortes. Se analizaron tres cortes histológicos con el software ImageJ® para calcular el área. De esta forma determinamos que las plantas que expresan de manera ectópica y constitutiva *AtOXR2* tienen tallos que superan en un 60-80% el área de los tallos de plantas WT (Figura 7.3-12 b y c).

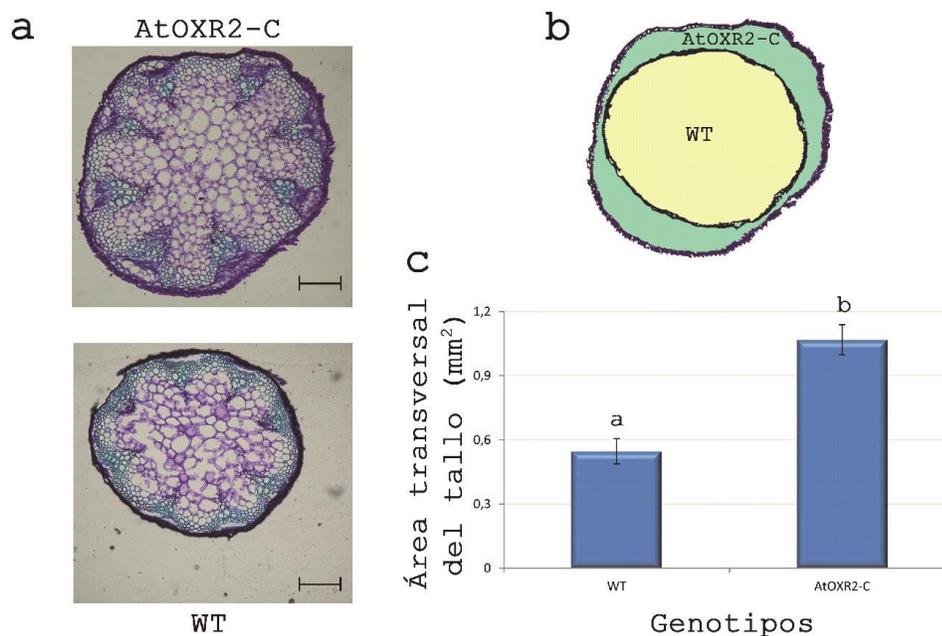


Figura 7.3-12 | Cortes histológicos de tallos de plantas *35S::AtOXR2* y WT crecidas durante 6 semanas. **a**- Cortes histológicos de plantas salvajes y *AtOXR2-C* (Escala: 200µm). **b**- Superposición de las áreas ocupadas por los cortes mostrados en **a**. **c**- Áreas cuantificadas con el software ImageJ®. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Lamentablemente, la calidad obtenida en los preparados histológicos no nos permitió realizar inferencias respecto de la extensión del *procambium* de las plantas. La región del *procambium* es particularmente interesante dado que es una fuente de células totipotenciales que pueden determinar la estructura de la planta (Jouannet y col., 2015).

Si bien no se cuantificó para plantas *35S::AtOXR2*, las plantas *35S::AtOXR42* (plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la construcción quimérica Q42, ver obtención de genes quiméricos en el Capítulo 7.2 de esta tesis) no sólo tienen mayor área transversal en los tallos, sino que también tendrían mayor área de xilemas (Welchen y col., 2015). Este resultado probablemente pueda ser extensivo a las plantas *35S::AtOXR2*. El hecho de tener mayor capacidad de transporte de solutos le podría permitir a la planta sustentar, no sólo mayor cantidad de hojas como se demostró para plantas *35S::AtOXR2*, sino también mayor cantidad de flores, vainas y semillas.

7.3.2.2.5. Determinación del número de flores y de la producción de semillas.

En plantas *35S::AtOXR2* observamos que el meristema da lugar a un mayor número de inflorescencias que las plantas WT y esto podría resultar en la producción de mayor cantidad de vainas por plantas. Bajo este razonamiento, decidimos investigar la producción de semillas de plantas *35S::AtOXR2*. De esta manera, observamos que las plantas *35S::AtOXR2* producen mayor cantidad de semillas por planta (Figura 7.3-13). Para calcular la cantidad de semillas por plantas se pesaron inicialmente 200 semillas de cada planta y se obtuvo el valor del peso promedio (μg) de cada semilla. Para las plantas salvajes el peso promedio fue de $16,5 \mu\text{g}$ por semilla, mientras que para las plantas *35S::AtOXR2* el valor fue $16,8 \mu\text{g}$. Esta relación nos permitió deducir que la diferencia en el peso total de la cantidad de semillas producidas por las plantas *35S::AtOXR2* respecto de las plantas salvajes se debía a un número mayor de semillas por plantas (Figura 7.3-13 a y b). Por otro lado, el número de semillas por vainas resultó ser similar para ambos genotipos ($53,8 \pm 4,35$ para plantas WT y $55,4 \pm 3,27$ para plantas *35S::AtOXR2*; resultados no mostrados). Este resultado, sumado al fenotipo de las inflorescencias observado en las plantas *35S::AtOXR2* (Figura 7.3-13 c), nos permitiría concluir

que la mayor producción de semillas de las plantas con mayores niveles de *AtOXR2* se debería a un mayor número de vainas en estas plantas. Esto es consistente con lo observado para el caso de tallos secundarios en la figura 7.3-11 b. Por otro lado, para las plantas *35S::AtOXR4* los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos en plantas salvajes (resultados no mostrados).

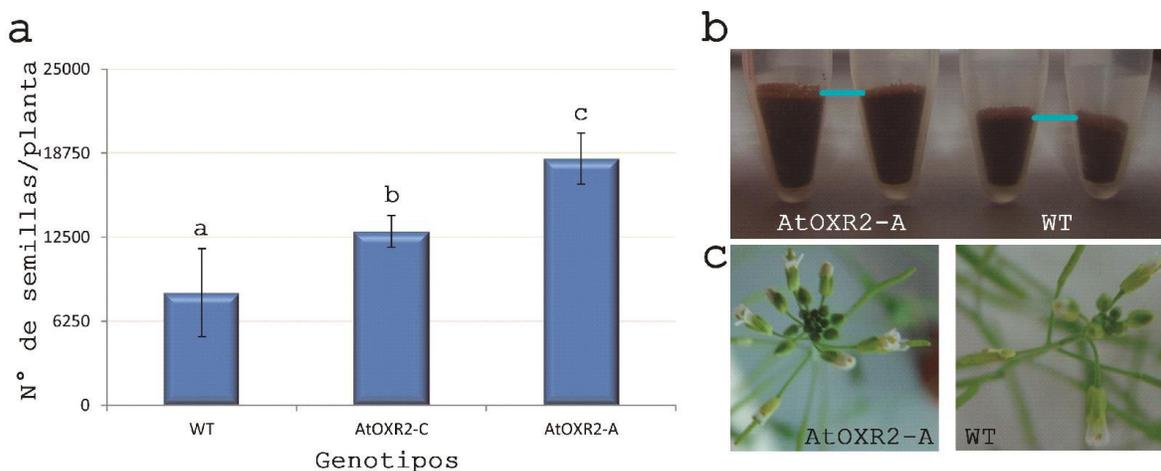


Figura 7.3-13 | Producción de semillas en plantas *35S::AtOXR2* y WT. a- Productividad de semillas por planta. Las barras de error representan la desviación estándar de sextuplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. b- Foto representativa de las cantidades de semillas producidas por plantas WT y *AtOXR2-A*. c- Foto representativa de las inflorescencias por meristema floral en plantas *35S::AtOXR2*.

7.3.2.2.6. Evaluación del número de hojas y parámetros foliares en plantas $\Delta oxr2$.

En función de las diferencias observadas en las plantas *35S::AtOXR2* se cuantificaron algunos de estos parámetros en las plantas $\Delta oxr2$ y $\Delta oxr4$.

El número de hojas por planta resultó ser similar entre plantas $\Delta oxr2$ y WT (WS) (Figura 7.3-14 a). Sin embargo, el radio máximo de la roseta de las plantas deficientes en *AtOXR2* es significativamente menor que el de sus pares salvajes (Figura 7.3-14 b). Esta diferencia deriva en una menor producción de biomasa aérea, determinada como el peso de la roseta (Figura 7.3-14 c). Considerando estos resultados se cuantificó el área, el grado de aserramiento y la circularidad de las hojas de plantas $\Delta oxr2$ y WT (WS), obteniéndose diferencias en el área y la circularidad. Las plantas $\Delta oxr2$ tienen menor área foliar y son menos circulares que las plantas WT (WS) (Figura 7.3-14 d y f). En dicha figura se puede observar que el quinto par de hojas es

notablemente más alargado en las plantas mutantes que en las plantas salvajes. Cabe destacar que en todos los parámetros evaluados las diferencias entre mutantes y plantas salvajes, es menor que la observada entre sobreexpresantes y plantas salvajes.

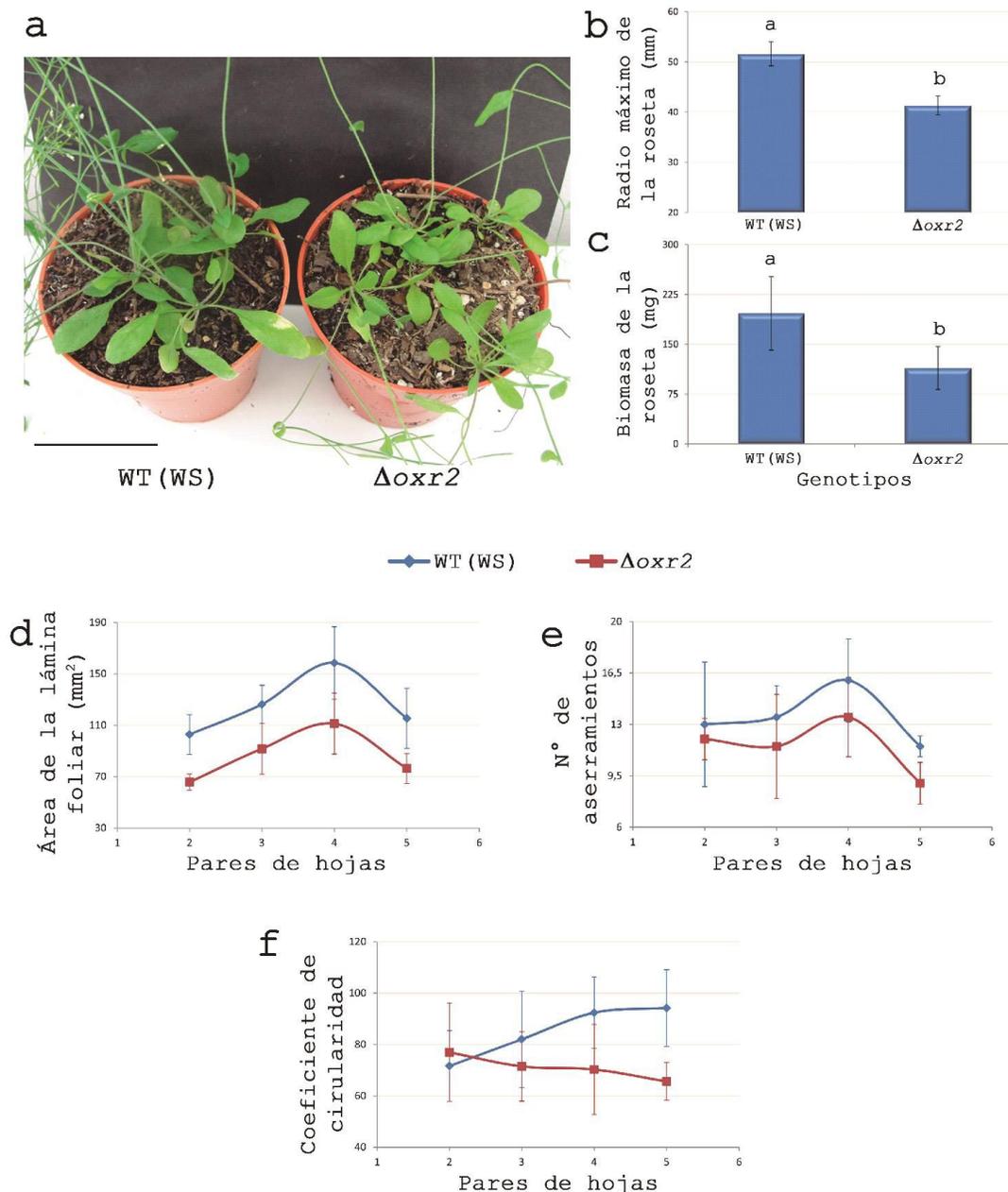


Figura 7.3-14 | Parámetros foliares de plantas $\Delta oxr2$ y WT(WS) en rosetas de plantas de 5 semanas. **a-** Foto de plantas de 5 semanas de edad (Escala: 6cm). **b** y **c-** Radio máximo y biomasa de las rosetas de plantas WT (WS) y $\Delta oxr2$. **d**, **e** y **f-** Parámetros foliares: área foliar, número de aserramientos y coeficiente de circularidad. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de sextuplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

No se observaron diferencias significativas en cuanto al tiempo de elongación del tallo o a la morfología del mismo, así como tampoco en lo que respecta a la producción de semillas (datos no mostrados).

El ciclo de vida de plantas de *Arabidopsis* ecotipo WS presenta diferencias respecto del genotipo Col-0 (Chan y col., 2013; Massonnet y col., 2010). A pesar de esto, en condiciones normales de crecimiento, las diferencias entre las plantas salvajes y las plantas con niveles alterados de *AtOXR2* se observan en ambos ecotipos a partir de la quinta semana de crecimiento. De manera opuesta a lo que ocurre con plantas *35S::AtOXR2*, las plantas $\Delta oxr2$ presentan menor radio de la roseta y menor área foliar; parámetros que, finalmente se traducen en una menor biomasa de la roseta. Además, detectamos diferencias en cuanto a la forma de las hojas, siendo las hojas de las plantas $\Delta oxr2$ más alargadas. Este hecho se ve reflejado en el coeficiente de circularidad de las mismas, el cual se muestra en la figura 7.3-14 f. En dicha figura se puede observar que el quinto par de hojas es notablemente más alargado en las plantas mutantes que en las plantas salvajes. Esto podría ser consecuencia de la carencia de *AtOXR2* en este estado de la planta.

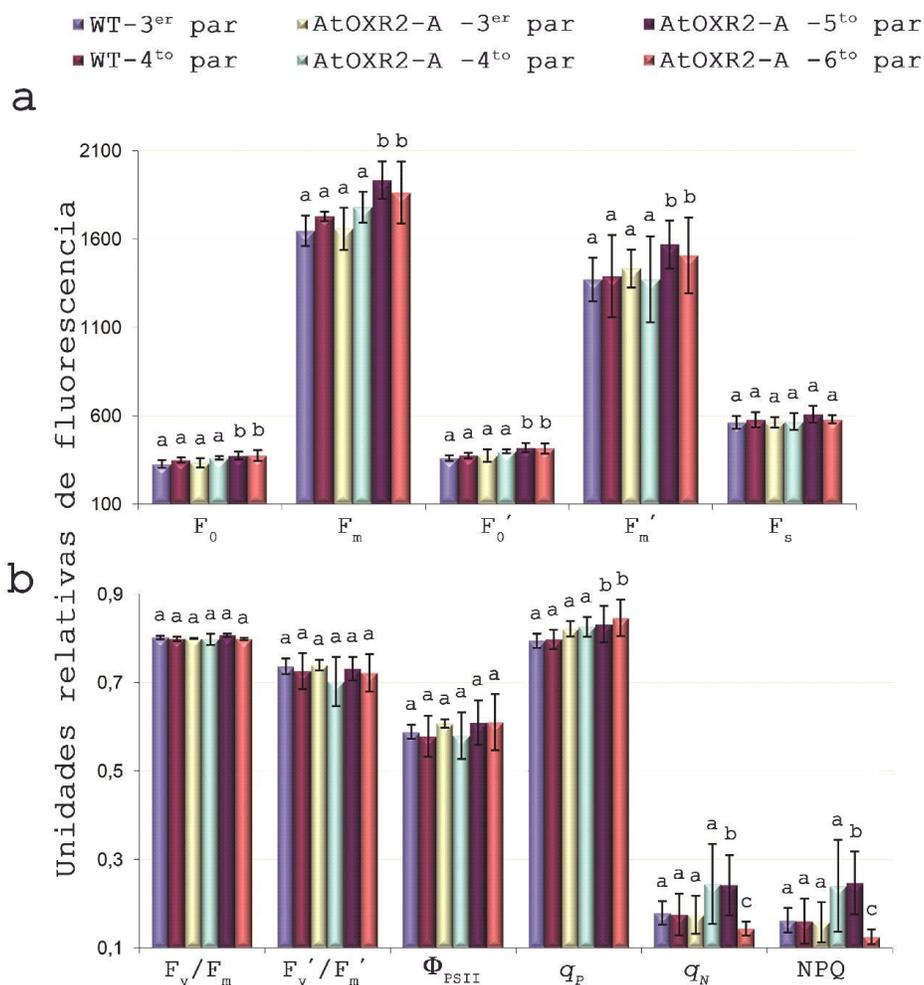
Con el fin de dilucidar los mecanismos por los cuales las plantas *35S::AtOXR2* podrían producir mayor cantidad de biomasa, nos propusimos realizar determinaciones de los parámetros fotosintéticos de las plantas.

7.3.3. Determinación de parámetros fotosintéticos.

La medición de los diferentes parámetros fotosintéticos se realizó con un equipo denominado IRGA *Li-Cor* 6400XT (sigla que deriva de su nombre en inglés: *Infra Red Gas Analyzer*). En la sección 9.3-2 del Anexo III se desarrollan conceptos básicos en relación al uso de este equipo y los fundamentos teóricos de los parámetros que arroja.

7.3.3.1. Medidas de fluorescencia de la clorofila.

Los experimentos se iniciaron con plantas de 4 semanas, edad en que se observan cambios fenotípicos en las plantas *35S::AtOXR2*. Debido a la sensibilidad de la determinación de parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila, decidimos desglosar las determinaciones por “pares de hojas” de manera similar a como se realizaron las determinaciones de área foliar (Figuras 7.3-7 y -8). Inicialmente se trabajó con plantas de 4 semanas, momento en el cual las plantas *35S::AtOXR2* tienen aproximadamente el doble de biomasa que sus pares salvajes. Fijamos las determinaciones sobre el tercer y cuarto par de hojas de plantas WT y *35S::AtOXR4* y, sobre el tercer, cuarto, quinto y sexto par de hojas de plantas *35S::AtOXR2*. Los valores obtenidos en las plantas *35S::AtOXR4* no mostraron diferencias significativas respecto de lo observado en plantas salvajes (datos no mostrados). Para el caso de plantas *35S::AtOXR2*, se encontraron diferencias en parámetros tales como F_0 , F_m , F_0' , F_m' en el quinto y sexto par de hojas (Figura 7.3-15 a). Sin embargo, las diferencias se cancelaron entre sí cuando se generaron las relaciones F_v/F_m , F_v'/F_m' y Φ_{PSII} ; pero se mantuvieron en los parámetros q_p , q_N y NPQ (Figura 7.3-15 b). La diferencia más destacable se observó en el sexto par de hojas, en donde el q_p es mayor que en plantas WT y el parámetro q_N es menor que en sus pares salvajes (Figura 7.3-15 b). Estos resultados indicarían que el sexto par de hojas de las plantas *35S::AtOXR2* tiene mayor *performance* fotosintética.



Parámetros de fluorescencia de la clorofila

Figura 7.3-15 | Parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila obtenidos en plantas 35S::AtOXR2 y WT crecidas durante de 4 semanas. **a-** Parámetros de fluorescencia medios en condiciones normales de crecimiento. **b-** Valores obtenidos de los nuevos coeficientes luego de combinar matemáticamente los parámetros obtenidos. Se muestran las diferencias significativas obtenidas en los parámetros q_p , q_N y NPQ. Las barras representan las desviaciones estándar de quintuplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$. Se obtuvieron resultados similares con los genotipos AtOXR2-B y C.

La detección de diferencias en el sexto par de hojas en plantas de 4 semanas nos llevó a realizar determinaciones sobre los mismos pares de hojas, pero en plantas de 6 semanas. Esta vez las diferencias las encontramos en los parámetros F_m , F_0' y F_m' (Figura 7.3-16 a). Nuevamente, no observamos diferencias para el parámetro F_s .

Este es un resultado que simplifica el estudio, ya que implica que las hojas de las plantas *35S::AtOXR2* en estado estacionario absorben energía en la misma forma que lo hacen las hojas de plantas WT (Figura 7.3-16 a). Esto último nos permite realizar comparaciones entre hojas WT y *35S::AtOXR2* sin el riesgo de cometer sesgos debido a otros pigmentos que estén absorbiendo o emitiendo luz en el rango de longitudes de onda en el que se realizan las determinaciones (Baker, 2008; Murchie y Lawson, 2013).

En plantas *35S::AtOXR2* de 6 semanas todos los parámetros de fluorescencia de la clorofila se encuentran aumentados, incluso aquellos relacionados con la extinción no fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila (q_N y NPQ; Figura 7.3-16 b). Los incrementos observados en los parámetros de fluorescencia máxima (F_m y F_m') fueron muy superiores a los obtenidos para F_0' (Figura 7.3-16 a), esto derivó en cambios en los parámetros F_v/F_m , F_v'/F_m' , Φ_{PSII} , q_P , q_N y NPQ. Considerando los parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila, las plantas *35S::AtOXR2* son más saludables que las plantas WT. Es posible proponer dos explicaciones a este estado: o bien las plantas *35S::AtOXR2* tienen más clorofila, o transportan con mayor velocidad los electrones captados por el PSII (F_m , F_m' , F_v/F_m , F_v'/F_m' , Φ_{PSII} y q_P).

En función de los resultados obtenidos decidimos cuantificar el contenido de clorofila de estas plantas, pero no encontramos diferencias significativas (resultados no presentados). Por este motivo se cuantificó la tasa de transferencia de electrones (ETR) de las plantas en estudio. Así, detectamos que la ETR de plantas *35S::AtOXR2* es mayor que la de plantas WT (Figura 7.3-16 c). El incremento en la ETR, puede implicar que en condiciones de estrés por alta intensidad lumínica las plantas *35S::AtOXR2* tendrían una ventaja sobre sus pares salvajes, ya que podrían transportar los electrones capturados a mayor velocidad (Essemine y col., 2012; Munekage y col., 2001). Para cuantificar esto, realizamos la determinación del parámetro ETR en función de la intensidad lumínica de radiación fotosintéticamente activa PAR (por sus siglas en inglés *Photosynthetically Active Radiation*). Nuevamente, observamos que las dos líneas de plantas analizadas *AtOXR2-A* y *AtOXR2-C* muestran una mayor velocidad de transferencia de electrones (ETR) en todas las intensidades lumínicas en las que se midió el parámetro (Figura 7.3-16 d). El

valor aumenta y es máximo alrededor de los 1000 μE ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) de intensidad de luz y luego se mantiene constante.

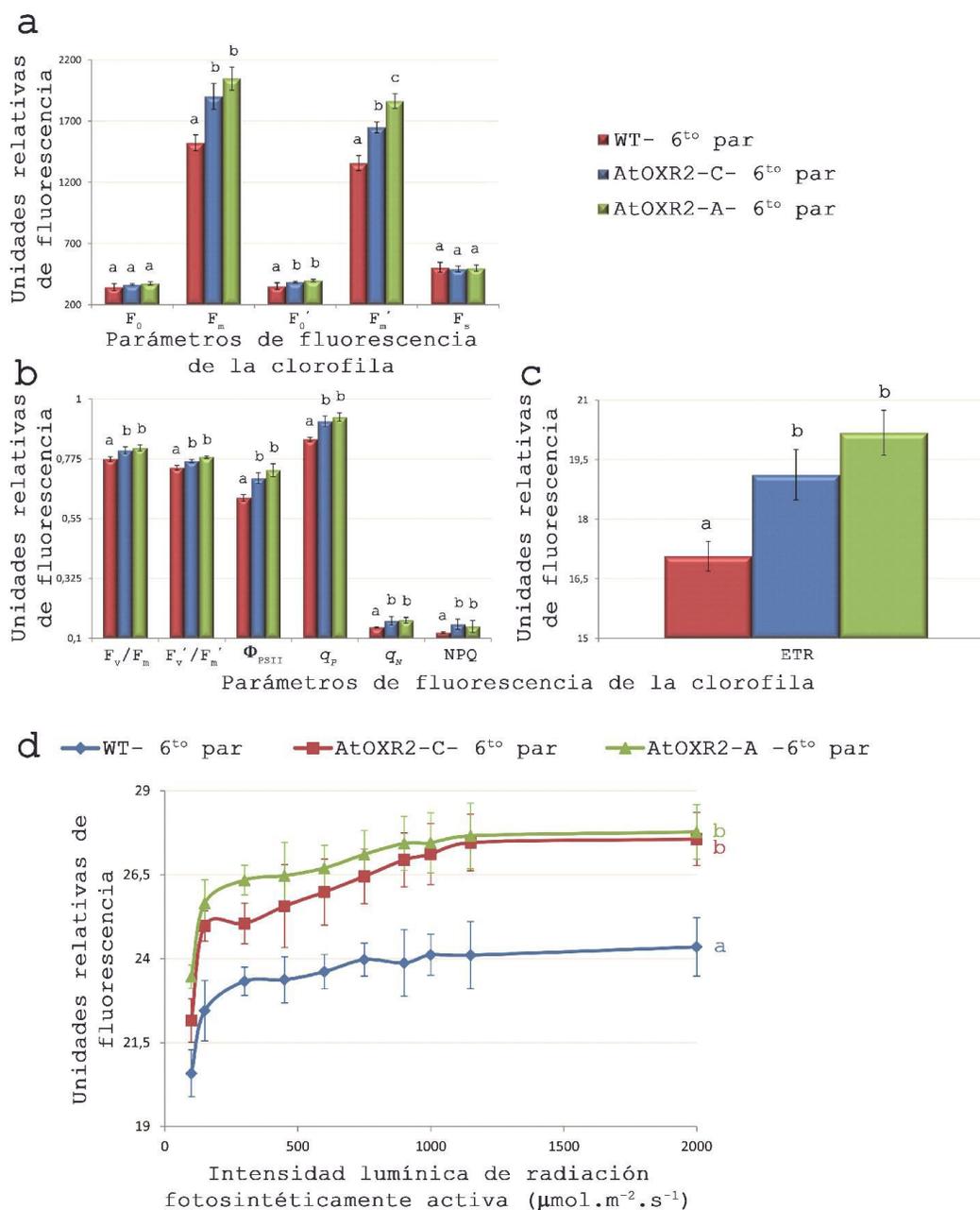


Figura 7.3-16 | Parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila obtenidos en plantas 35S::AtOXR2 y WT crecidas durante de 6 semanas. a y b- Parámetros proporcionados por el equipo LiCor6400XT y coeficientes calculados a partir de los mismos. **c-** Tasa de transporte de electrones determinada a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR. **d-** Valores de ETR obtenidos variando la intensidad de la radiación PAR. Las barras representan las desviaciones estándar de quintuplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

7.3.3.2. Parámetros de intercambio gaseoso en el sexto par de hojas de plantas de 6 semanas.

Las diferencias observadas en los parámetros de fluorescencia de la clorofila permiten inferir cambios en la tasa de fijación de CO_2 . Se midió la fijación de CO_2 (denominada A) y la transpiración de las hojas (denominada E). Estos parámetros se utilizaron para calcular la eficiencia del uso del agua (A/E). Las plantas *35S::AtOXR2* fijan CO_2 a una tasa mayor a la que lo hacen las plantas WT y, como contrapartida, evaporan menos agua en el proceso (Figura 7.3-17). De esta manera, el indicador de uso del agua resulta en un valor mayor para las plantas *35S::AtOXR2* respecto de las plantas WT (Figura 7.3-17). Este indicador es una manifestación de la tasa acelerada del transporte de electrones (ETR) que tienen las plantas *35S::AtOXR2* respecto de las plantas salvajes.

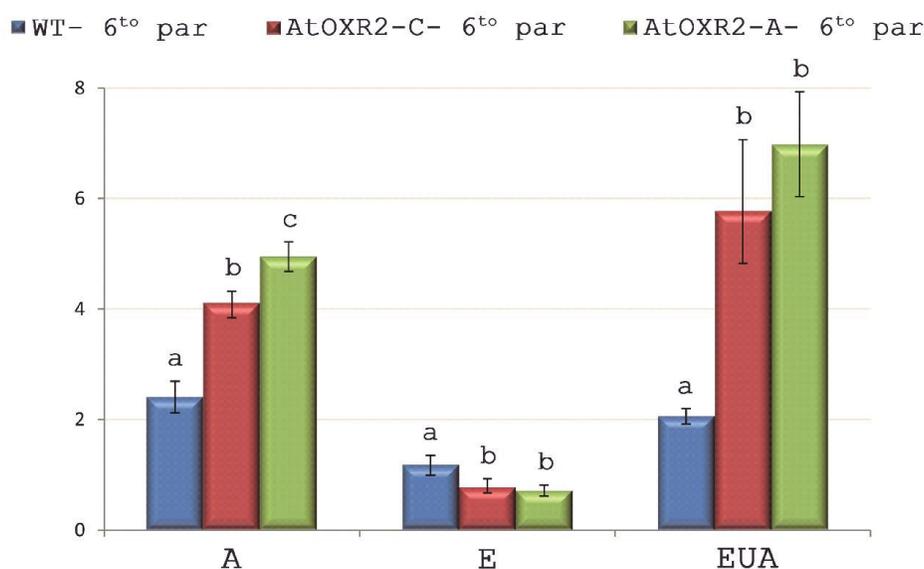


Figura 7.3-17 | Parámetros asociados el intercambio gaseoso en plantas *35S::AtOXR2* y WT crecidas durante 6 semanas. Las mediciones se realizaron en el sexto par de hojas de plantas de 6 semanas. Las barras representan la desviación estándar de quintuplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$. A= Tasa total de asimilación ($\mu\text{molCO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); E= Transpiración ($\text{molH}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); EUA= Eficiencia del uso del agua ($\text{mmolCO}_2/\text{molH}_2\text{O}$).

Los parámetros obtenidos con el equipo IRGA nos permiten concluir que la sobreexpresión de *AtOXR2* genera una disminución en la transpiración (E), un incremento en la eficiencia del uso del agua (EUA) y un aumento en la fijación de CO_2 . Estas características están

de acuerdo con el incremento de la biomasa en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT. En el proceso de intercambio de gases las plantas incorporan a su biomasa carbono de la atmósfera y en simultáneo se produce la transpiración de vapor de agua desde la planta a la atmósfera. Así, la eficiencia en el uso del agua puede entenderse como el volumen de agua que las plantas necesitan consumir para incorporar a su biomasa una determinada cantidad de carbono proveniente de la atmósfera (Franks y col., 2015). Las características de las plantas *35S::AtOXR2* podrían ser beneficiosas durante situaciones de estrés (Des Marais y col., 2014; Franks y col., 2015). En función de estos resultados en el capítulo siguiente se presentarán resultados que aportan información sobre el rol de *AtOXR2* durante distintas situaciones de estrés.

7.3.4. Determinación del perfil metabólico de plantas *35S::AtOXR2* y WT en condiciones normales de crecimiento.

El incremento en la biomasa de las plantas *35S::AtOXR2* y en la fijación de CO₂ debe generar cambios en la tasa de generación o degradación de los fotoasimilados. Para evaluar esto, se cuantificaron 47 metabolitos en plantas *35S::AtOXR2* y WT, crecidas durante seis semanas¹ en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de noches (día largo). Las muestras se tomaron al final de la noche (EON; *del inglés end of night*) y a la mitad del día (MOD; *del inglés mid of day*). La extracción para la determinación de metabolitos en muestras de hoja se realizó como se describe en la sección 6.2.48 de Materiales y Métodos.

La sobreexpresión de *AtOXR2* modifica significativamente los niveles ácido fumárico, sacarosa y glucosa (negrita, Tabla 7.3-1). La sacarosa se encuentra disminuida a la mitad del día mientras que los niveles de glucosa son menores al final de la noche, coincidente con la disminución de la enzima *AtSPS2* (At1g05610) encargada de la fosforilación de glucosa-1-fosfato.

¹ El material, roseta completa, se cosechó en la semana sexta de con el objetivo de igualar las muestras tomadas para el ensayo de microarreglos presentado en el capítulo 7.4.

Metabolito	Descripción	MOD	EON
Ac. Aspártico	Relacionado a AA Familia del aspartato	0.16423	-0.5267
Treonina	Relacionado a AA Familia del aspartato	-0.2555	0.05511
GABA	Relacionado a AA Familia del glutamato	0.49267	0.68075
Ácido glutámico	Relacionado a AA Familia del glutamato	0.38341	0.10705
Prolina	Relacionado a AA Familia del glutamato	0.6674	0.54972
Ornitina	Relacionado a AA Ciclo de la úres	0.51348	-0.3842
Fenilalanina	Relacionado a AA Familia del shikimato	0.05038	0.23412
Shikimato	Relacionado a AA Familia del shikimato	-0.325	0.19785
Triptofano	Relacionado a AA Familia del shikimato	-1.5038	1.25722
Tirosina	Relacionado a AA Familia del shikimato	-1.6424	-0.2728
Glicina	Relacionado a AA Fotorespiración	-0.0533	-0.5407
Serina	Relacionado a AA Fotorespiración	0.05175	-0.2139
Isoleucina	Relacionado a AA Familia del piruvato	0.04035	0.32221
Leucina	Relacionado a AA Familia del piruvato	0.4395	-0.0365
Valina	Relacionado a AA Familia del piruvato	-0.3111	-0.0691
Fructosa	Relacionado a CH Azúcares libres	-0.4605	-1.8467
Glucosa	Relacionado a CH Azúcares libres	0.22457	-1.1775
Maltosa	Relacionado a CH Azúcares libres	-0.3805	-0.0129
Manosa	Relacionado a CH Azúcares libres	-0.3269	-0.5356
Rafinosa	Relacionado a CH Azúcares libres	-1.3098	1.25529
Sacarosa	Relacionado a CH Azúcares libres	-0.4344	-0.1025
Xilosa	Relacionado a CH Azúcares libres	-0.5406	0.00408
Manitol	Relacionado a CH Azúcar alcohol	0.61792	0.68793
Mioinositol	Relacionado a CH Sugar alcohols	-0.0438	0.27824
Sorbitol	Relacionado a CH Sugar alcohols	-0.9013	-0.2715
α -cetoglutarato	Ac. Orgánico Ciclo del Krebs	0.27048	0.23525
Ac. Málico	Ac. Orgánico Ciclo del Krebs	0.27652	0.13394
D-a-hidroxyglut	Ac. Orgánico Ciclo del Krebs	-0.0455	-0.015
Ac. Fumárico	Ac. Orgánico Ciclo del Krebs	-0.2349	-0.3301
Ac. Succínico	Ac. Orgánico Ciclo del Krebs	-0.2791	-0.2852
Ac. Iso-cítrico	Ac. Orgánico Ciclo del Krebs	0.38184	0.25867
Ac. Glicérico	Ac. Orgánico Fotorespiración	0.27048	0.23525
Ac. Glicólico	Ac. Orgánico Fotorespiración	-0.118	-0.6578
Lactato	Ac. Orgánico Fermentación	0.07028	-0.2473
Ac. málico	Ac. Orgánico Ac. Dicarbolxílico	0.31361	0.32118
Ac. Malónico	Ac. Dicarboxílico Metabolismo de Ac. Gra	0.17955	-0.0589
Glicerol	Lípidos complejos Triglicéridos	-0.2683	-0.2151

Tabla 7.3-1 | Niveles relativos de distintos metabolitos cuantificados en plantas 35S::AtOXR2. Los valores se expresan como $\log_2(\text{metabolitos } 35\text{S::AtOXR2}/ \text{metabolitos WT})$. En negrita y en subrayado se indican los metabolitos que muestran un cambio significativo según ANOVA y prueba *pots-hoc* LSD Fisher ($p < 0,05$). Los niveles de metabolitos Prolina, Manitol y Rafinosa también muestran diferencias significativas pero no se discuten en el texto de esta tesis. Código de colores rojo es aumento, verde es disminución y la gama de colores está de acuerdo con la escala de los niveles de expresión.

Con respecto al ácido fumárico, los niveles están disminuidos a lo largo del día. La disminución de la sacarosa podría ser consecuencia de la disminución de la actividad sacarosa sintasa ya que los niveles transcripcionales de la subunidad menor de esta enzima (AtSPS4F/At4g10120) se encuentran disminuidos en el ensayo de microarreglos. AtSPS4 participaría de la síntesis de sacarosa-6-fosfato a partir de fructosa-6-fosfato y UDP-glucosa (Figura 7.3-18).

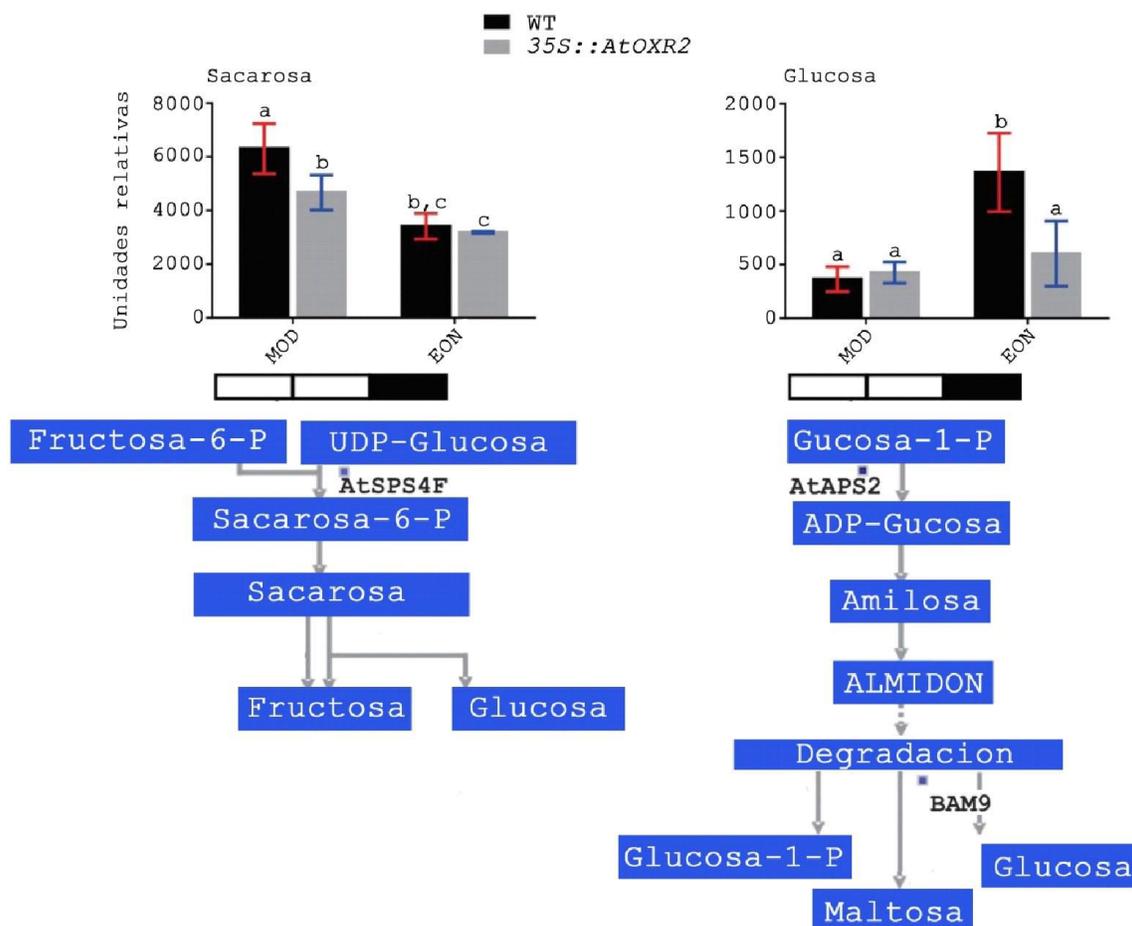


Figura 7.3-18 | Rutas metabólicas modificadas en plantas 35S::AtOXR2. Se muestran las dos rutas metabólicas modificadas según la intersección de los resultados obtenidos mediante transcriptómica y metabolómica en plantas 35S::AtOXR2. Color azul implica disminución de la expresión del gen de interés en plantas 35S::AtOXR2 respecto de plantas WT.

De acuerdo con esta hipótesis, Volkert y col. (2014) demostraron que plantas mutantes en enzimas con actividad sacarosa fosfato sintasa disminuyen la síntesis de sacarosa y además limitan la degradación del almidón durante la noche sin alterar la partición del carbono durante

la fotosíntesis. La disminución de los niveles de glucosa al final de la noche está de acuerdo con una disminución en la degradación del almidón, con menos disponibilidad de sacarosa para degradar en la noche o con el requerimiento de mayor cantidad de glucosa para el crecimiento nocturno.

A nivel transcripcional no hemos obtenido evidencia de una disminución en las enzimas encargadas de la fosforilación y posterior hidrólisis de los glucanos del almidón, a excepción de una β -amilasa-9 cloroplastídica (BAM9/At2g32290, Smith y col., 2004), cuya relevancia aún no ha sido probada (Figura 7.3-18). Sin embargo, dado que los niveles de maltosa (principal producto de la degradación del almidón en el cloroplasto) son normales al final de la noche (Tabla 7.3-1), esta hipótesis no parece ser probable.

La disminución de los niveles de sacarosa durante el día explican la disminución de los niveles de glucosa y, si bien no es significativo, los niveles de fructosa durante la noche (Tabla 7.3-1). Con respecto al mayor requerimiento de azúcares para sostener el exceso de biomasa, no hemos evaluado si las plantas *35S::AtOXR2* incrementan su biomasa como consecuencia de una elevada síntesis de proteínas, lípidos o carbohidratos. La escasa disponibilidad de ácido fumárico supondría que hay una prevalencia en la acumulación de carbohidratos como reserva de carbono. Se ha postulado que *Arabidopsis* acumula ácido fumárico como reserva de carbono de una manera similar a como lo reserva en el almidón (Pracharoenwattana y col, 2010; Chia y col., 2000). Por otro lado, si bien nos es estadísticamente significativo, es llamativo que los metabolitos relacionados a la síntesis de proteína (ácido aspártico, GABA, ácido glutámico, leucina, ornitina y prolina) estén aumentados en la mitad del ciclo de luz. Las plantas deficientes en la fumarasa citosólica *AtFUM2*, las cuales no pueden convertir malato en fumarato, disminuyen la síntesis de aminoácidos (Pracharoenwattana y col, 2010). Considerando que los niveles de *AtFUM2* no se modifican por la sobreexpresión *AtOXR2*, las plantas *35S::AtOXR2* podrían derivar el ácido fumárico hacia la síntesis de aminoácidos para mantener los niveles de proteína.

7.3.5. Discusión y conclusiones parciales.

7.3.5.1. Desarrollo radicular y potencial agrobiotecnológico.

Los resultados mostrados en este capítulo sugieren una estructura radicular de mayor complejidad para plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, así como una menos compleja para las plantas $\Delta oxr2$ deficientes en dicho gen. Las diferencias observadas en la longitud de la raíz principal de plantas con niveles alterados del transcrito de *AtOXR2* podrían deberse a diferencias en la percepción del estrés, a una tasa de germinación diferencial o a una combinación de ambos fenómenos. Para completar este análisis, en el capítulo 7.4 (sección 7.4.4.3) se muestran los resultados de evaluación de la germinación bajo condiciones de estrés.

El desarrollo diferencial de la raíz marca una diferencia crucial en el crecimiento posterior de la planta. Determina el comportamiento de la planta frente a condiciones de estrés así como el comportamiento en condiciones normales de crecimiento. La elongación de la raíz está limitada por una combinación de resistencia mecánica (impedimento en la penetración del suelo), y por el estrés hídrico que la matriz puede o no generar a la planta (Bengough y col., 2011). Diferentes estudios señalan que alteraciones en la morfología de la raíz y en la arquitectura radicular se traducen en variaciones en la capacidad de toma de agua a través de la raíz, lo que podría ser de utilidad para la planta a la hora de enfrentar distintas situaciones de estrés abiótico (Aroca y col., 2001; Hattori y col., 2008; Matsuo y col., 2008). La importancia de la capacidad de toma de agua de la raíz radica en la capacidad que este parámetro le confiere a las plantas para superar la deshidratación inducida por estrés abiótico (Aroca y col., 2011). Generalmente, ante una condición de deshidratación, las plantas cierran sus estomas. Sin embargo, bajo ciertas condiciones medioambientales o en determinados genotipos, la modificación de la capacidad de toma de agua de las raíces juega un rol importante comparado con el cierre estomático cuando la planta intenta evitar la reducción del crecimiento inducida por este estrés (Aroca y col., 2001; Bouchabke-Coussa y col., 2008; Matsuo y col., 2008).

Mientras que la elongación de la raíz es un componente importante de la arquitectura de la raíz, la gran variedad en el desarrollo observado en diferentes plantas se debe ampliamente a la formación de raíces laterales. Mediante la modificación del número y la

posición de estas raíces laterales, la arquitectura de una planta individual puede ser esculpida para acomodarse a las condiciones medioambientales y a sus vecinos (Harris, 2015).

En este trabajo determinamos que cambios en los niveles de expresión de *AtOXR2* generan plantas que modifican el número de raíces secundarias o laterales bajo condiciones control. Dado que el desarrollo de este tipo de raíces está regulado por estímulos medioambientales como biodisponibilidad de nutrientes y disponibilidad de agua (Lopez-Bucio y col., 2003; Malamy, 2005), esto podría indicar que las plantas *35S::AtOXR2* tienen un mayor requerimiento de nutrientes o de agua. Por otro lado, ABA y auxinas condicionan el desarrollo de las raíces laterales. Por ejemplo, localizaciones puntuales de hierro promueven el crecimiento de raíces laterales mediado por un incremento en la acumulación de auxinas en los ápices de la raíz (Duan y col., 2013). Mientras que el ABA tiene un efecto opuesto cuyo mecanismo de inhibición se ha demostrado en el estadio de post-emergencia de la raíz secundaria (De Smet y col., 2003; Signora y col., 2001). De esta manera la percepción de ABA por la planta, inducirá el cierre estomático en las hojas, y la inhibición del desarrollo de raíces secundarias en la raíz. Es probable que esto último fuerce a la planta a elongar la raíz principal en busca de mayor cantidad de agua, lo que le permitirá mantener el estado de hidratación necesario para sobreponerse al estrés que generó el incremento en la concentración hormonal (Harris, 2015). El efecto del ABA sobre plantas con niveles alterados de *AtOXR2* será desarrollado en la sección 7.4.4.

7.3.5.2. Desarrollo vegetativo y producción de semillas.

La capacidad de producción aumentada de las plantas *35S::AtOXR2* respecto a sus pares salvajes, tanto a nivel de hojas como de semillas, puede justificarse con todos los resultados descritos previamente. Estas plantas tienen una arquitectura radicular más compleja, que les permitiría captar y transportar más nutrientes desde el suelo hacia la parte aérea (Den Herder y col., 2010; Rosas y col., 2013). El incremento de la raíz principal y de las raíces laterales ha sido ampliamente documentado como una respuesta adaptativa a la deficiencia nutricional (Giehl y col., 2013; Gruber y col., 2013; Kellermeier y col., 2014). Esto se complementa con la capacidad

para captar mayor cantidad de luz, característica que se ve reflejada en el mayor número de hojas y en la mayor superficie expuesta por hojas. En este sentido, plantas de arroz que sobreexpresan el gen *HARDY*, un factor de transcripción de la familia AP2-ERF-Like, aumentan su biomasa y el uso del agua como consecuencia de un incremento en la tasa fotosintética. Los autores proponen que dicho incremento en la fotosíntesis es sostenido por el incremento del área foliar y del número de cloroplastos (Karaba y col., 2007). El radio de la roseta es un parámetro que tiene en cuenta cuánto se expande la planta; sin embargo, no tiene en cuenta cuál es la superficie fotosintética. Las plantas *35S::AtOXR2* no sólo tienen mayor radio máximo de la roseta, sino también mayor área foliar. En conjunto, generan un organismo con mayor aptitud a la hora de captar la luz. Si bien se han reportado plantas con mayor biomasa como consecuencia de una mejora en la actividad y eficiencia fotosintética (Karaba y col., 2007; Kebeish y col., 2007; Kurek y col., 2007), *35S::AtOXR2* es la primera planta con incremento en la biomasa radicular, incremento en la biomasa área e incremento en la producción de semillas sin incrementar el consumo de agua ni retrasar el tiempo de obtención de la semilla.

Entre las estrategias que se han aplicado para obtener un incremento en la biomasa y en la producción de semillas podemos señalar aquellas que tienden a incrementar la fotosíntesis (o disminuir la fotorespiración) y aquellas que tienden a modificar el metabolismo del carbono (Liu y col., 2016; Long y col., 2006; Sinclair y col., 2004). De esta forma se han obtenido plantas de *Arabidopsis* con mayor biomasa y mayor producción de semillas como consecuencia de la expresión de enzimas ramificadoras del almidón provenientes de *Zea mays* (Liu y col., 2016). Considerando esto, es de interés a futuro medir el contenido de almidón durante al final de la noche en las plantas *35S::AtOXR2*. De acuerdo con esta hipótesis, las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* presentan menores niveles de azúcares solubles al final de la noche (tabla 7.3-1 y figura 7.3-18). Por otro lado, la mayor producción de fotosintatos, así como también la mayor captación de agua y oligoelementos por parte de las raíces de plantas *35S::AtOXR2* debe ser transportada hacia las flores. Para esto, las plantas *35S::AtOXR2* tendrían que desarrollar un sistema vascular más complejo que el de plantas salvajes. El incremento del área transversal de los tallos de estas plantas podría ser parte de esa estructura radicular compleja.



7.4. CAPÍTULO IV

“*AtOXR2* y su rol en la respuesta a estrés en *Arabidopsis*”

CAPÍTULO IV

7.4.1. *AtOXR2* y su rol en la respuesta a estrés en *Arabidopsis*.

Los resultados presentados en el Capítulo 7.3 nos permiten suponer que la proteína *AtOXR2* podría estar involucrada en la respuesta a estrés. Esto surge de la observación del mayor crecimiento de raíces de plantas *35S::AtOXR2* frente a condiciones generadoras de estrés oxidativo, lo que podría sugerir una tolerancia incrementada a estas situaciones (sección 7.3.2.1). También observamos tallos con mayor área en plantas *35S::AtOXR2*, lo que podría estar indicando la posibilidad de una mayor tasa de transporte de fotosintatos y oligoelementos desde y hacia los tejidos fuente (Figura 7.3-11 y 7.3-12). Además, las plantas que expresan ectópica y constitutivamente *AtOXR2* mostraron parámetros fotosintéticos tales como Φ_{PSII} , q_P y q_N que, en relación con los de sus pares salvajes, podrían ser interpretados como indicadores de plantas que se encuentran creciendo en mejores condiciones o que están “menos estresadas” (secciones 7.3.3.2 y 7.3.3.3).

Estas evidencias, sumadas al el interesante fenotipo mostrado por las plantas con altos niveles de expresión de *AtOXR2* (mayor biomasa aérea, mayor área foliar, mayor productividad de semillas y arquitectura radicular más compleja), nos motivaron a realizar un análisis del transcriptoma de plantas *35S::AtOXR2*, con el fin de obtener información global que nos permita entender cuáles serían los cambios a nivel de expresión génica responsables del fenotipo y/o comportamiento observado.

7.4.2. Análisis del transcriptoma de plantas *35S::AtOXR2*.

La sobreexpresión de *AtOXR2* genera en *Arabidopsis* fenotipos pleiotrópicos; relacionados con el incremento de la biomasa, retraso en la senescencia, mayor producción de semillas e incremento de la eficiencia fotosintética. En función de estos resultados nos pareció interesante realizar una inspección global del transcripoma de plantas con mayores niveles de *AtOXR2* utilizando microarreglos y ARN proveniente de

rosetas completas de plantas *35S::AtOXR2* crecidas durante seis semanas en tierra (consultar sección 6.2.19 de Materiales y Métodos).

7.4.2.1. Análisis de las categorías ontológicas enriquecidas.

Los resultados obtenidos fueron procesados como se describió en las secciones 6.2.16 y 6.2.17 de este trabajo de Tesis. Este primer análisis indica que la sobreexpresión de *AtOXR2* regula de manera diferencial 908 genes considerando un valor de significancia p menor a 0,01 y un cambio en la expresión, expresado como \log_2FC^1 , mayor a 1,5. Dentro de este grupo de genes encontramos 440 genes cuya expresión se encuentra disminuida en las plantas *35S::AtOXR2* mientras 468 genes mostraron niveles de expresión superiores a los observados en las plantas WT. Estos dos grupos de genes fueron utilizados para el análisis de enriquecimiento (SEA, del inglés *Set Enrichment Analysis*) considerando las ontologías GO (de sus siglas en inglés *Gene Ontology*; www.geneontology.org). Empleando el programa MRCM, se analizaron los tres grafos de GO: Función Molecular (MF), Procesos Biológicos (BP) y Componente Celular (CC).

7.4.2.1.1. Procesos biológicos.

Las categorías enriquecidas entre los genes regulados diferencialmente en las plantas *35S::AtOXR2* involucran la respuesta inmune y la respuesta a estímulo. La confluencia de estas categorías deriva en el enriquecimiento de las categorías de respuesta inmune innata, respuesta a cambios en los niveles de nutrientes y la respuesta a hormonas (Figura 7.4-1 y tabla 7.4-1).

Con respecto a la categoría de modificación de la pared celular, las modificaciones están vinculadas específicamente con la abscisión de las hojas. Dentro de los procesos de muerte celular, la categoría de apoptosis se encuentra enriquecida. Dentro de la categoría de procesos biosintéticos las categorías no redundantes enriquecidas son: biosíntesis de

¹ FC; des sus siglas en inglés *fold change*, representa el cociente de los niveles de expresión de plantas *35S::AtOXR2* respecto de la expresión en plantas WT.

aminoácidos modificados, fenilpropanoides, biosíntesis de lípido A y biosíntesis de lipopolisacáridos. Además, la sobreexpresión de *AtOXR2* deriva en la regulación diferencial de genes que pertenecen a la categoría de movilización y transporte de lípidos y modificación de ácidos grasos (Figura 7.4-1 y tabla 7.4-1).

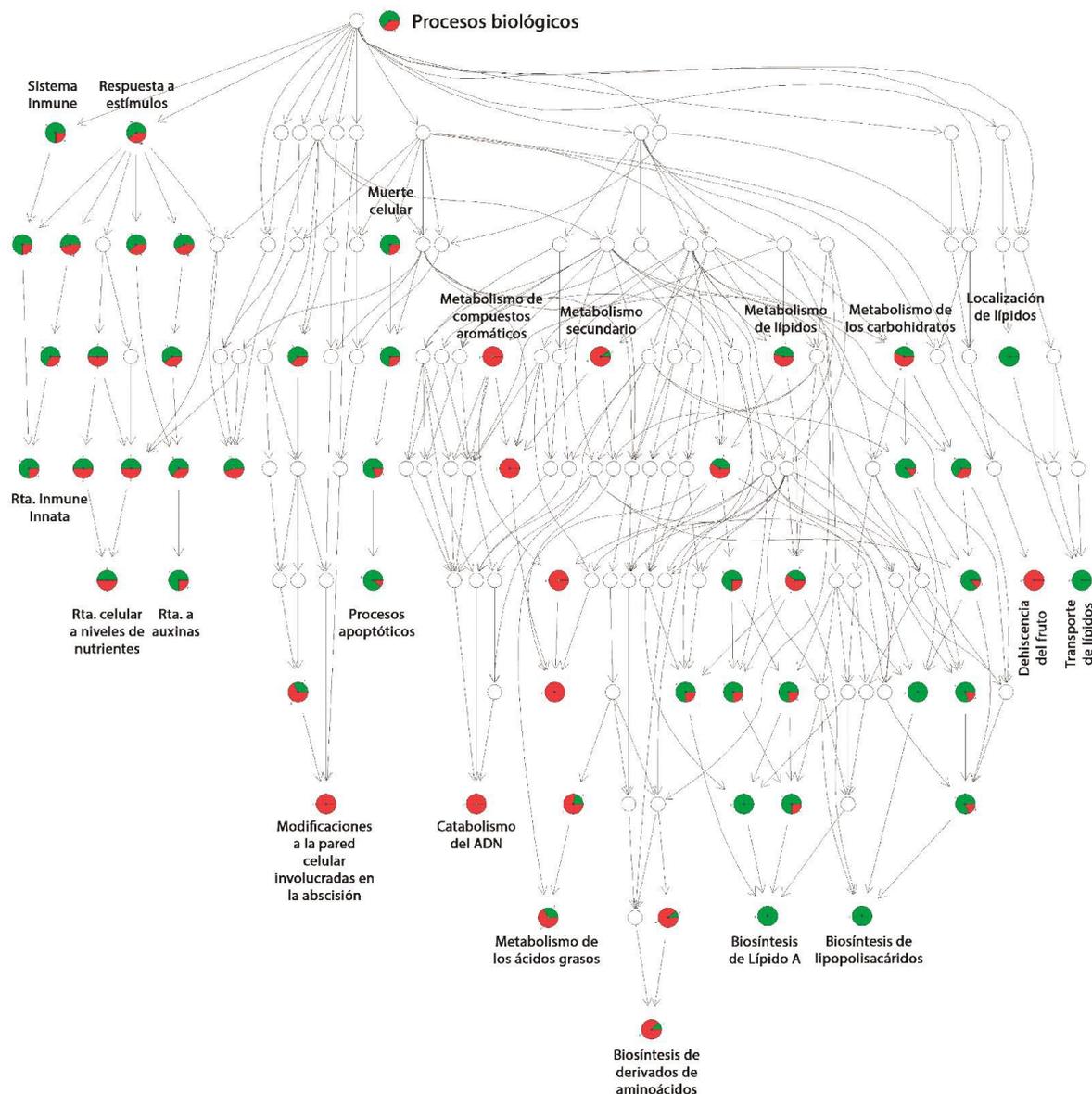


Figura 7.4-1 | Ontologías enriquecidas en los genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT según Procesos Biológicos de GO. La evaluación de las ontologías se realizó incluyendo el grupo completo de los genes (inducidos y reprimidos) mediante el software MCRM. En verde se indica la proporción de genes aumentados en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT en cada categoría GO mientras que en rojo se muestran los genes disminuidos.

Además de las categorías GO enriquecidas, en el mapa se indica el sentido de la expresión de los genes que corresponden a cada categoría. En verde se muestra la proporción de genes cuya expresión esta incrementada en las plantas *35S::AtOXR2* y en rojo la proporción de los genes cuya expresión esta disminuida en dichas plantas. Como puede apreciarse, el grupo de genes regulados positivamente esta incluido en las categorías respuesta inmune innata, respuesta a auxinas, procesos apoptóticos, biosíntesis del lípido A y transporte de lípidos.

Con respecto a los procesos que incluyen genes cuya expresión se encuentra disminuida en las plantas *35S::AtOXR2* encontramos las categorías modificación de la pared celular involucrada en la abscisión, procesos catabólicos del ADN, biosíntesis de fenilpropanoides y biosíntesis de aminoácidos modificados (Figura 7.4-1). Para mayor detalle, en la tabla 7.4-2 se muestran los genes para cada una de las categorías mencionadas.

Procesos Biologicos				
Identificador	Termino GO	valor - p	#Inducidos	#Reprimidos
GO:0050896	Respuesta a estimulo	<0.001	36	26
GO:0008219	Muerte celular	<0.001	8	3
GO:0016265	Muerte	<0.001	8	3
GO:0006915	Apoptosis	<0.001	8	1
GO:0009247	Biosintesis de glicolipidos	<0.001	3	1
GO:0012501	Muerte celular programada	<0.001	8	2
GO:0006869	Transporte de lipidos	0.001	8	0
GO:0009245	Biosintesis de Lipido A	0.001	3	0
GO:0046493	Metabolismo de Lipido A	0.001	3	0
GO:0006664	Metabolismo de glicolipidos	0.001	3	1
GO:0008653	Metabolismo de lipopolisacaridos	0.002	3	0
GO:0009103	Biosintesis de lipopolisacaridos	0.002	3	0
GO:0010876	Localizacion de lipidos	0.002	8	0
GO:0046467	Biosintesis de lipidos de membrana	0.002	3	1
GO:0009719	Respuesta a estimulo endogeno	0.005	13	8
GO:0042398	Biosintesis de derivados de aminoacidos	0.006	1	7
GO:0006643	Metabolismo de lipidos de membrana	0.007	3	1
GO:0044264	Metabolismo de polisacaridos	0.007	6	1
GO:0006950	Respuesta a estres	0.01	21	18
GO:0010033	Respuesta a sustancias organicas	0.01	14	9
GO:0009725	Respuesta a hormonas	0.012	12	7
GO:0006575	Metabolismo de derivados de aminoacidos	0.013	1	8
GO:0042221	Respuesta a estimulo quimico	0.014	19	14
GO:0019748	Metabolismo secundario	0.019	1	10
GO:0044262	Metabolismo de carbohidratos	0.028	8	4
GO:0031669	Respuesta a nutrientes	0.029	2	2
GO:0009830	Modificacion de la pared celular (absicion)	0.033	5	3
GO:0045087	Respuesta inmune innata	0.033	6	2
GO:0007047	Organizacion de la pared celular	0.034	5	3
GO:0006952	Respuesta de defensa	0.035	13	6
GO:0009698	Metabolismo de fenilpropanoides	0.037	0	6
GO:0045229	Encapsulacion externa	0.044	5	3
GO:0032787	Metabolismo de acidos monocarboxilicos	0.046	2	7

Tabla 7.4-1 | Ontologias reguladas diferencialmente en plantas 35S::AtOXR2 según Procesos Biologicos. Se muestran los terminos GO regulados diferencialmente en el ensayo de microarreglos realizado en plantas que sobreexpresan AtOXR2. Además de la categoría ontológica se muestran el valor de significancia p según la

prueba de Fisher y el número de genes (#) regulados positivamente (Inducidos) y regulados negativamente (Reprimidos) en plantas 35S::AtOXR2 respecto de plantas WT.

Procesos Biológicos		
Termino GO	Genes Inducidos	Genes Reprimidos
Respuesta a estímulo	AT5G43740, PAR1, AT5G43730, XTH6, PP2-A7, NIP6;1, ST2A, RAB18, AT1G73620, AT3G20340, AT1G36060, AT5G25190, AT4G30650, ATCSLA09, HR4, AT3G44630, AT5G18010, BT2, EXP3, AT5G51630, LCR66, AT3G03820, AT2G14900, IAA29, CML43, AT3G16670, ASN1, AT5G14920, AT5G63020, AT5G18050, AT4G24275, AT1G70880, AT1G15890, GER3, AT3G44670, AT5G46490, AT1G16850, AT5G18060, AT5G44920	SAG12, AT2G17660, AT1G73120, MYB90, AT5G42510, ATSDI1, RRTF1, AT5G26220, NAS2, GPX7, MGDC, SRO5, JMT, AT5G43570, TPS03, PAP1, FRO1, AT2G17060, RR17, DOX1, AT5G51470, AHP4, DR4, FT, ELI3-2, PEP7
Muerte celular	AT5G43740, AT3G44630, AT5G43730, AT1G15890, AT5G51630, AT3G44670, AT5G46490, AT5G63020	AT2G17060, ELI3-2, DOX1
Apoptosis	AT5G43740, AT3G44630, AT5G43730, AT1G15890, AT5G51630, AT3G44670, AT5G46490, AT5G63020	AT2G17060
Muerte celular programada	AT5G43740, AT3G44630, AT5G43730, AT1G15890, AT5G51630, AT3G44670, AT5G46490, AT5G63020	AT2G17060, ELI3-2
Transporte de lípidos	AT5G48490, AT1G55260, LTP2, ELP, LP1, AT3G53980, AT3G22142, AT2G10940	
Biosíntesis de lípido A	AT1G25141, AT1G24880, AT1G24793	
Metabolismo de lípidos	AT1G25141, AT1G24880, AT1G24793	MGDC
Localización lipídica	AT5G48490, AT1G55260, LTP2, ELP, LP1, AT3G53980, AT3G22142, AT2G10940	
Respuesta a estímulo endógeno	AT5G18010, BT2, EXP3, AT1G36060, AT3G03820, AT2G14900, AT5G25190, IAA29, ST2A, AT5G18060, RAB18, AT5G14920,	SAG12, PAP1, AT5G51470, AHP4, JMT, DR4, RR17, RRTF1
Metabolismo de derivados de aminoácidos	ACS8	DFR, AT1G09500, ELI3-2, NAS2, GPAT5, AT5G28237, PAP1
Metabolismo de lípidos de membrana	AT1G25141, AT1G24880, AT1G24793	MGDC
Metabolismo de polisacáridos	AT1G25141, AT1G24880, XTH6, XTH25, QQS, AT1G24793	APS2
Respuesta a estrés	AT5G43740, AT5G43730, AT3G44630, XTH6, AT5G51630, LCR66, PP2-A7, AT3G16670, ASN1, RAB18, AT5G63020, AT4G24275, AT1G70880, AT1G15890, GER3, AT3G44670, AT3G20340,	AT5G43570, TPS03, AT1G73120, PAP1, MYB90, FRO1, AT5G42510, ATSDI1, AT2G17060, RRTF1, GPX7, DOX1, MGDC, SRO5, JMT, DR4, ELI3-2, PEP7
Respuesta a sustancias orgánicas	AT5G18010, BT2, EXP3, AT1G36060, AT3G03820, AT2G14900, AT5G25190, IAA29, ST2A, AT5G18060, ASN1, RAB18, AT5G14920, AT5G18050	SAG12, DOX1, PAP1, AT5G51470, AHP4, JMT, DR4, RR17, RRTF1
Respuesta a hormonas	AT5G18010, BT2, EXP3, AT1G36060, AT3G03820, AT2G14900, AT5G25190, IAA29, AT5G18060, RAB18, AT5G14920, AT5G18050	SAG12, PAP1, AT5G51470, AHP4, DR4, RR17, RRTF1
Respuesta al estímulo químico	BT2, AT5G18010, XTH6, EXP3, AT3G03820, NIP6;1, AT2G14900, IAA29, CML43, AT3G16670, ST2A, ASN1, RAB18, AT5G14920,	AT2G17660, SAG12, AT1G73120, PAP1, RR17, AT5G26220, RRTF1, NAS2, GPX7, DOX1, AT5G51470,
Metabolismo de lípidos	AT1G25141, AT1G24880, ST2A, ADS1, AT1G24793	AO4, JMT, NCED2, DOX1, MGDC, TPS03, GPAT5
Metabolismo secundario	TGG2	AO4, DFR, AT1G09500, NCED2, ELI3-2, GSTU3, TPS03, AT1G20490, GPAT5, PAP1
Respuesta a nutrientes	ASN1, NIP6;1	ATSDI1, MGDC
Modificación de la pared celular (abscisión)		ADPG1, PGAZAT
Respuesta inmune innata	AT3G44630, AT5G51630, PP2-A7, AT3G44670, AT5G44920, AT5G46490	AT2G17060, ELI3-2
Organización de la pared celular	ATCSLA09, XTH6, EXP3, XTH25, LP1	AT1G11370, ADPG1, PGAZAT
Respuesta de defensa	AT5G43740, AT3G44630, AT5G43730, AT1G70880, AT5G51630,	AT5G43570, AT5G42510, AT2G17060, RRTF1, ELI3-2,
Metabolismo de carbohidratos	XTH6, XTH25, TGG2, QQS, AT1G24793, AT1G17160, AT1G25141,	AO4, ADPG1, MAN1, AT1G11730, APS2, BGLU47,
Metabolismo de fenilpropanoides		DFR, AT1G09500, ELI3-2, AT1G20490, GPAT5, PAP1
Encapsulación externa	ATCSLA09, XTH6, EXP3, XTH25, LP1	AT1G11370, ADPG1, PGAZAT
Metabolismo de ácidos monocarboxílicos	ST2A, ADS1	AO4, JMT, NCED2, DOX1, NAS2, MGDC, GPAT5

Tabla 7.4-2 | Genes regulados diferencialmente en plantas 35S::AtOXR2 según Procesos Biológicos. Se muestran los genes regulados diferencialmente para cada uno de los términos GO descritos en la tabla 9.3-2.

Los genes regulados positivamente en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT se muestran en la columna “Genes Inducidos” y los genes regulados negativamente se muestran en la columna “Genes Reprimidos”.

7.4.2.1.2. Función Molecular.

Las categorías enriquecidas entre los genes disminuidos en las plantas *35S::AtOXR2* están asociadas a la reparación y modificación de los ácidos nucleicos (Figura 7.4-2 y tabla 7.4-3). Entre ellas podemos nombrar la actividad endonucleolítica que repara falta de apareamientos T/G y la actividad exorribonucleasa ADN simple hebra (Figura 7.4-2, rojo). Con respecto al enriquecimiento de categorías entre los genes inducidos en plantas *35S::AtOXR2* podemos mencionar a la actividad desaturasa y de hidrolisis de los híbridos ARN-ADN y la actividad de receptores transmembrana (Figura 7.4-2, verde).

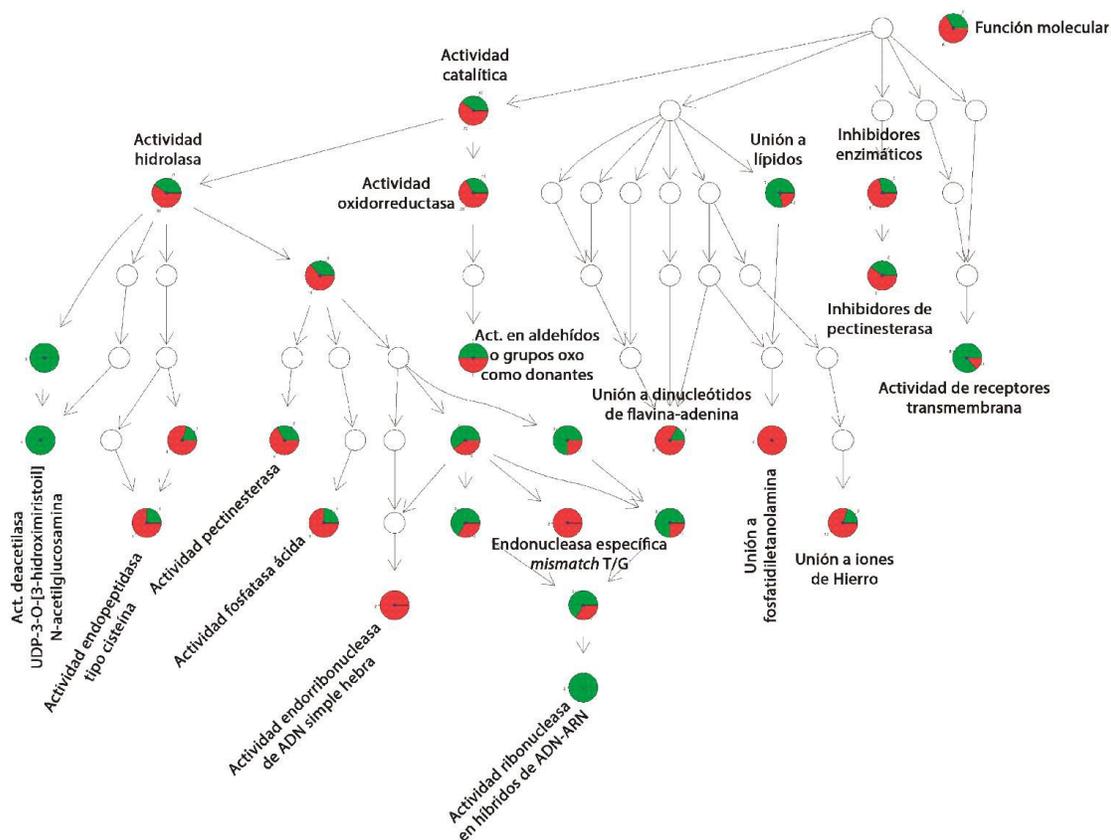


Figura 7.4-2 | Ontologías enriquecidas en los genes regulados diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT según Funciones Moleculares de GO. La evaluación de las ontologías se realizó incluyendo el grupo completo de los genes (inducidos y reprimidos) mediante el software MCRM. En verde

se indica la proporción de genes aumentados en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT en cada categoría GO mientras que en rojo se muestran los genes disminuidos.

El detalle de cada uno de los genes incluidos en las categorías GO mencionadas se muestran en las tablas 7.4-3 y 7.4-4.

Funcion Molecular				
Identificador	Termino GO	valor - p	#Inducidos	#Reprimidos
GO:0003824	Actividad catalitica	<0.001	47	72
GO:0008759	Actividad UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] N-acetylglucosamina desacetilasa	<0.001	3	0
GO:0016787	Actividad hidrolasa	0.002	21	31
GO:0016491	Actividad oxidoreductasa	0.002	10	20
GO:0016788	Actividad hidrolasa de uniones esteres	0.005	8	14
GO:0046910	Actividad inbhidora de pectinoestearasa	0.005	2	3
GO:0008289	Union a lipidos	0.006	7	2
GO:0003993	Actividad fosfatasa acida	0.013	1	3
GO:0004521	Actividad endoribonucleasa	0.015	3	1
GO:0004857	Inhibidor de enzimas	0.015	2	5
GO:0004519	Actividad endonucleasa	0.015	3	2
GO:0004197	Actividad endopeptidasa especifica de cisteina	0.021	1	3
GO:0019213	Actividad desacetilasa	0.022	3	0
GO:0004888	Actividad receptor transmembrana	0.024	6	1
GO:0030599	Actividad pectinoestearasa	0.025	2	4
GO:0005506	Union a hierro	0.03	3	12
GO:0050660	Union a grupos FAD	0.035	1	5
GO:0004091	Actividad estearasa de grupo carboxilo	0.041	3	6
GO:0016891	Actividad endoribonucleasa productora de 5' fosfomonoesteres	0.05	2	1

Tabla 7.4-3 | Ontologias reguladas diferencialmente en plantas *35S::AtOXR2* según Funcion Molecular. Se muestran los terminos GO regulados diferencialmente en el ensayo de microarreglos realizado en plantas que sobreexpresan *AtOXR2*. Ademas de la categoria ontologica se muestran el valor de significancia p según la prueba de Fisher y el numero de genes (#) regulados positivamente (Inducidos) y regulados negativamente (Reprimidos) en plantas *35S::AtOXR2* respecto de plantas WT.

Funcion Molecular		
Termino GO	Genes Inducidos	Genes Reprimidos
Actividad catalitica	XTH6, AT1G24793, AT1G17160, AT1G24880, ST2A, AT5G42965, AT3G48080, XTH25, AT1G25141, ATCSLA09, YUC8, AT2G16750, ACS8, AT5G44020, AT5G24240, AT3G44630, BT2, AT3G49340, TES, AT5G51630, TGG2, AT1G78480, AT1G12010, GER3, AT3G44670, AT5G48900, AT1G10000, AT1G62770, AT1G11280, AT3G29690, AT5G22460, AT5G20740, ADS1, TPX2, AT1G12160, AT5G59530, PLC8, ASN1, AT5G47590, HSD2, AT5G46490, UKL5, AT3G29670, AT5G41460, SEN2, HSD3, AT1G02020	AT1G49640, AT1G03495, DFR, AT1G30700, AT1G20380, AT3G57680, AT1G21110, AT1G11730, PAP16, AT5G46950, AT5G46940, AT1G57590, AT5G46960, SRO5, AT3G50940, PPCK2, AT3G48340, AT3G48480, AT5G28237, FRO1, GSTU3, GPAT5, AT3G62960, SKS2, CKX2, CYP71A25, AT5G51530, ARI14, MAN1, DOX1, SERAT3;2, DR4, AT3G46480, AT1G20490, CAMS1, AT1G11370, SAG12, AT3G44970, APS2, BGLU47, BGLU28, UF3GT, AT1G17710, NAS2, GCN2, GPX7, CYP94B3, BFN1, BST1, MGDC, CYP722A1, NUDT24, PAP20, JMT, AT3G47580, PAP22, PGAZAT, AT3G56060, AT1G20120, AT4G22870, TPS03, G6PD4, AT5G38780, BGLU27, AO4, ENDO2, ADPG1, AT1G09500, AHP4, NCED2, ELI3-2, AT5G50260
Actividad UDP-3-O-[3-hidroximiristoil] N-acetylglucosamina desacetilasa	AT1G25141, AT1G24880, AT1G24793	
Actividad hidrolasa	XTH6, AT1G62770, AT1G24793, AT1G24880, AT5G20740, AT5G42965, AT3G48080, XTH25, AT1G25141, AT5G44020, AT3G44630, TES, AT3G49340, AT5G51630, TGG2, PLC8, AT5G47590, AT3G44670, AT5G46490, SEN2, AT1G10000	AT1G11370, AT1G49640, SAG12, BGLU47, BGLU28, AT1G17710, AT1G20380, AT3G57680, GCN2, BST1, BFN1, AT5G46950, PAP16, AT5G46940, AT1G57590, AT5G46960, NUDT24, PAP20, AT3G50940, PAP22, PGAZAT, AT3G48340, AT1G20120, AT3G48480, BGLU27, AT5G51530, ENDO2, ADPG1, MAN1, DR4, AT5G50260
Actividad oxidoreductasa	AT1G12010, ADS1, TPX2, GER3, HSD2, AT1G12160, AT5G59530, YUC8, HSD3, AT1G02020	AT4G22870, AT3G44970, G6PD4, DFR, FRO1, AT1G30700, AT3G62960, AO4, SKS2, CKX2, CYP71A25, GPX7, CYP94B3, DOX1, CYP722A1, AT1G09500, NCED2, AT3G46480, ELI3-2, AT3G56060
Actividad hidrolasa de uniones esteres	AT3G48080, AT1G62770, PLC8, AT5G20740, AT5G44020, SEN2, AT1G10000, AT5G42965	AT1G20120, AT1G11370, AT5G51530, ENDO2, BFN1, BST1, PAP16, AT5G46950, AT5G46940, AT1G57590, AT5G46960, PAP20, PAP22, AT1G17710
Actividad inhibidora de pectinoestearasa	AT5G20740, AT1G62770	AT5G46950, AT5G46940, AT5G46960
Union a lipidos	AT5G48490, AT1G55260, LTP2, ELP, LP1, AT3G53980, AT2G10940	AT5G01300, FT
Actividad fosfatasa acida	AT5G44020	PAP20, PAP22, PAP16
Actividad endoribonucleasa	SEN2, AT1G10000, AT5G42965	BFN1
Inhibidor de enzimas	AT5G20740, AT1G62770	DR4, AT5G46950, AT5G43570, AT5G46940, AT5G46960
Actividad endonucleasa	SEN2, AT1G10000, AT5G42965	ENDO2, BFN1
Actividad endopeptidasa especifica de cisteina	AT3G49340	AT3G48340, SAG12, AT5G50260
Actividad desacetilasa	AT1G25141, AT1G24880, AT1G24793	
Actividad receptor transmembrana	AT3G44630, AT5G51630, PP2-A7, AT3G44670, AT5G44920, AT5G46490	AT2G17060
Actividad pectinoestearasa	AT5G20740, AT1G62770	AT1G11370, AT5G46950, AT5G46940, AT5G46960
Union a hierro	AT5G59530, AT1G12010, ADS1	AO4, AT5G45040, CYP71A25, CYP94B3, PAP16, DOX1, AT3G44970, CYP722A1, FRO1, PAP20, PAP22, AT3G46480
Union a grupos FAD	AT1G12160	AO4, FRO1, CKX2, AT1G30700, AT3G56060
Actividad estearasa de grupo carboxilo	AT3G48080, AT5G20740, AT1G62770	AT1G20120, AT1G11370, AT5G46950, AT5G46940, AT1G57590, AT5G46960
Actividad endoribonucleasa productora de 5' fosfomonoesteres	AT1G10000, AT5G42965	BFN1

Tabla 7.4-4 | Genes regulados diferencialmente en plantas 35S::AtOXR2 según Funcion Molecular. Se muestran los genes regulados diferencialmente para cada uno los terminos GO descritos en la tabla 9.3-4. Los genes regulados positivamente en plantas 35S::AtOXR2 respecto de plantas WT se muestran en la columna “Genes Inducidos” y los genes regulados negativamente se muestran en la columna “Genes Reprimidos”.

7.4.2.1.3. Componente celular.

La categoría de sistema de endomembranas es la única enriquecida en ambos grupos de genes empleando el programa MRCM (Figura 7.4-3). Sin embargo, la herramienta *BioMaps* del software *VirtualPlant* (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>) solo identifica sistema de endomembranas como categoría enriquecida en el grupo de genes cuya expresión esta incrementada en las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* respecto de la planta WT (datos no mostrados).

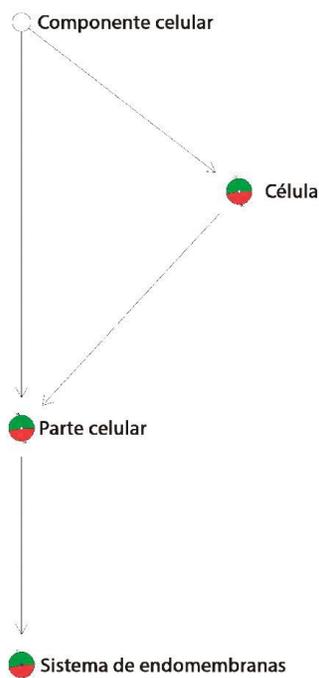


Figura 7.4-3 | Categorías ontológicas enriquecidas en los genes regulados diferencialmente en plantas 35S::AtOXR2 según Componente Celular. La evaluación de las ontologías se realizó incluyendo el grupo completo de los genes (inducidos y reprimidos) mediante el software MCRM. En verde se indica la proporción de genes aumentados en plantas 35S::AtOXR2 respecto de plantas WT en cada categoría GO mientras que en rojo se muestran los genes disminuidos.

En la tabla 7.4-5 se indican los genes incluidos en esta categoría.

Componente Celular						
Identificador	Termino GO	valor - p	#Inducidos	#Reprimidos	Genes Inducidos	Genes Reprimidos
GO:0012505	Sistema de endomembranas	<0.001	44	38	AT5G43740, AT5G43730, AT5G45095, AT3G29140, XTH6, CLE42, AT1G62770, AT1G11280, AT1G06980, M17, AT2G33850, AT5G20740, STOMAGEN, AT1G05835, GRP9, XTH25, ELP, AT5G44572, RANBP1, AT4G30650, AT2G16750, HR4, AT4G06534, EXP3, AT5G51630, LCR66, AT1G78480, AT2G14900, AT3G16670, AT3G43740, AT1G24145, ZW9, AT5G14920, TBL36, AT5G48900, HSD2, AT1G12845, AT3G53980, AT1G76960, AT3G13175, AT5G48490, AT5G44570, AT1G16850, HSD3	AT1G11370, AT3G44970, BGLU47, DFR, AT5G42510, AT1G70260, AT1G76530, AT1G30700, CYP94B3, BFN1, AT5G46950, AT5G46940, AT5G46960, CYP722A1, PAP20, AT3G50940, AT3G47580, AT1G17030, PAP22, PGAZAT, AT1G47395, AT3G56060, AT1G20120, AT1G78450, SAG29, AT5G20790, AT3G62960, AT4G09100, ENDO2, ADPG1, MAN1, DOX1, AT1G09500, DR4, AT3G20380, AT3G29970, AT1G62240, AT5G50260

Tabla 7.4-5 | Genes regulados diferencialmente en plantas 35S::AtOXR2 según Componente Celular. Se muestran los genes regulados diferencialmente para la única categoría de Componente Celular enriquecida significativamente (Sistema de endomembranas) en el ensayo de microarreglos realizado en plantas que sobreexpresan *AtOXR2*. Se indica el valor de significancia p según la prueba de Fisher y el número de genes (#) inducidos y reprimidos. Los genes regulados positivamente en plantas 35S::*AtOXR2* respecto de plantas WT se muestran en la columna “Genes Inducidos” y los genes regulados negativamente se muestran en la columna “Genes Reprimidos”.

7.4.2.2. Comparación del transcriptoma de plantas 35S::AtOXR2.

Como puede observarse del análisis de categorías ontológicas, la sobreexpresión de *AtOXR2* en *Arabidopsis* genera cambios en diversos procesos biológicos no relacionados. Nos pareció interesante buscar si el perfil de expresión de las plantas 35S::*AtOXR2* era similar a algún otro obtenido en *Arabidopsis*. Para evaluar esto se ingresaron los genes agrupados en la categoría según procesos biológicos, según componente celular y según función molecular en la base de datos de GENVESTIGATOR (<https://genevestigator.com/gv/>) y se compararon contra la base de datos completa depositada en este servidor (45568 microarreglos).

Este análisis reveló que el perfil de expresión obtenido para las plantas 35S::*AtOXR2* es similar al de plantas salvajes sometidas a tratamiento con patógenos pertenecientes al género *Golovinomices* y a distintos patovares de *Pseudomonas syringae* y tratamiento con hormonas como auxinas (Figura 7.4-4). Además, se observan similitudes con el perfil de expresión obtenido en plantas Col-0 cuando son crecidas en bajas

condiciones de luz y luego expuestas a alta intensidad de luz (datos no mostrados). Cabe destacar que si bien se obtuvieron resultados de similitud, la huella de comparación en todos los casos evaluados es débil, indicando que el perfil de expresión observado en las plantas *35S::AtOXR2* es particular y no presenta elevada similitud con ensayos de microarreglos depositados hasta el momento.

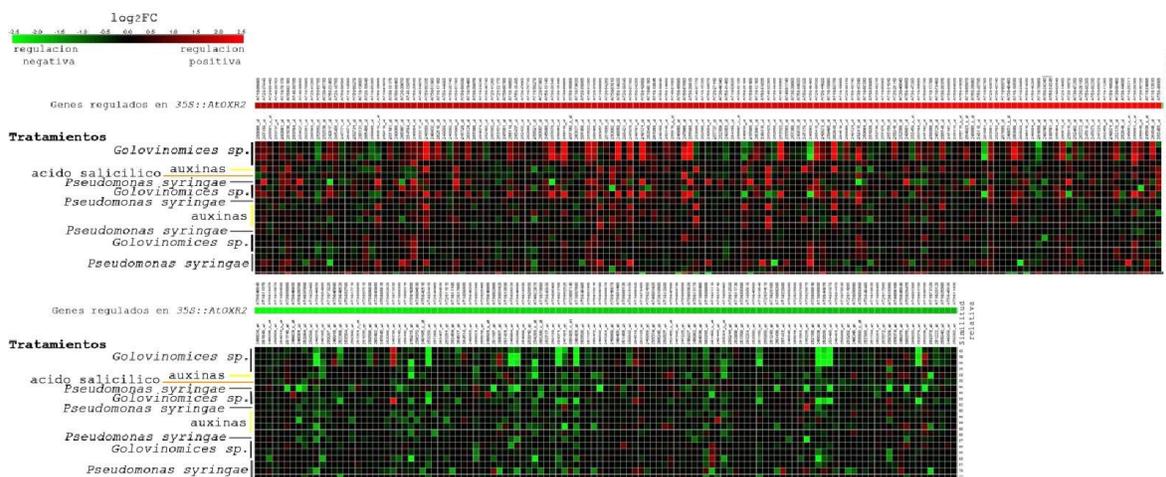


Figura 7.4-4 | Comparación del perfil transcripcional en plantas *35S::AtOXR2*. Se comparo la huella transcripcional (genes regulados positivamente y genes regulados negativamente respecto de plantas WT) en las plantas *35S::AtOXR2* con todos los microarreglos depositados en la base de datos del programa Genevestigator empleando la herramienta *Signature*. Se muestran los resultados de los 22 tratamientos más similares al generado por la sobreexpresión de *AtOXR2*. Resaltan los perfiles transcripcionales de plantas tratadas con hongos del género *Galovinomices*, con distintos patovares de las bacterias *Pseudomonas syringae* y con hormonas como auxinas y SA.

Además, se empleó la base de datos *AtGenExpress* (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_sample_angler.cgi) que permite la comparación de perfiles transcripcionales en función de microarreglos asociados a tratamientos con hormonas. Esta comparación indicó que el perfil transcripcional completo de las plantas *35S::AtOXR2* es similar a aquel observado en semillas de plantas Col-0 luego del tratamiento con ABA durante 24 horas (Figura 7.4-5). Los genes regulados por ABA en las plantas *35S::AtOXR2* están relacionados a la respuesta a estrés por deshidratación y a estrés biótico. En este grupo de genes regulados por ABA encontramos al gen *LEA7* (*LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 7*) involucrado en la tolerancia al estrés por deshidratación debido a su acción como inhibidor del agregado de enzimas (Popova y

col., 2015) y *PDF2.2* (*PLANT DEFENSIN2.2*) involucrado en la respuesta defensiva frente a patógenos fúngicos (Stotz y col., 2009). Otro gen regulado por ABA e involucrado en la respuesta defensiva cuya expresión resulto modificada es *TGG2* (*THIOGLUCOSIDE HYDROLASE 2*). *TGG2* es una β -tioglucosidasa que participa en la respuesta defensiva mediada por glucosinolatos y en el cierre estomático.

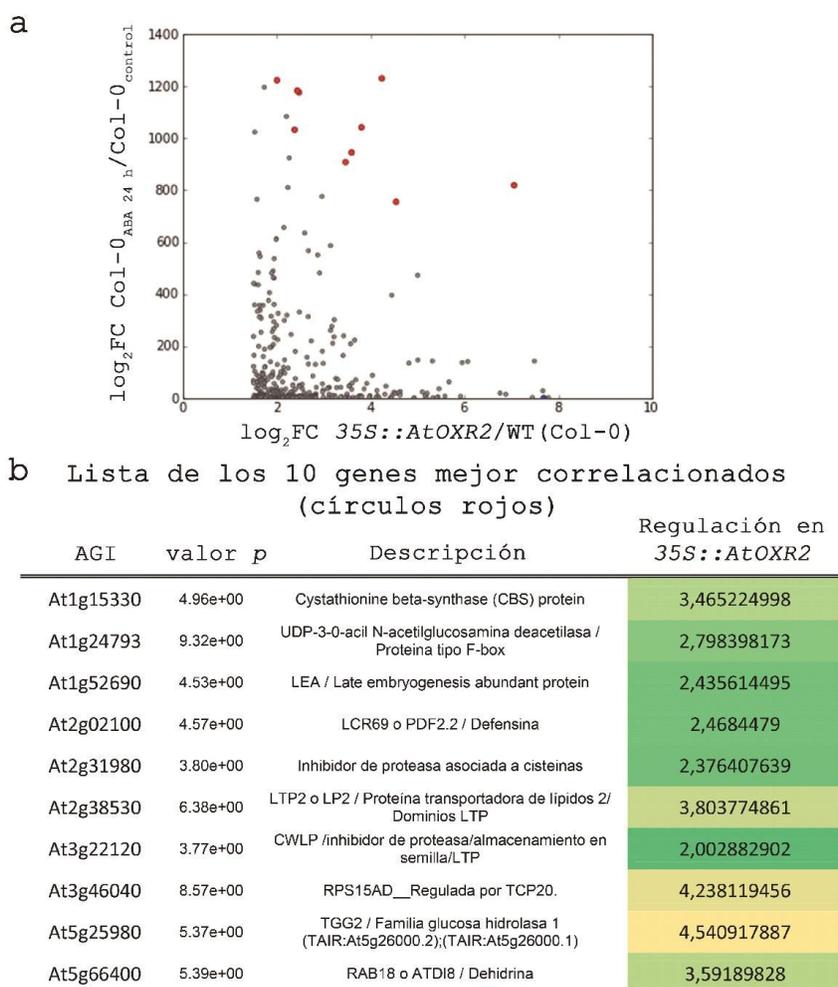


Figura 7.4-5 | La sobreexpresión de *AtOXR2* deriva en la inducción de genes de respuesta a ABA. a- *Scatter-plot* en el cual se indican los genes que se correlacionan de manera positiva con plantas WT (Col-0) tratadas con ABA. **b-** Listado de los 10 genes mejor correlacionados al comparar los dos perfiles transcripcionales analizados. Resultados obtenidos utilizando los datos públicos disponibles en la base de datos *AtGenesexpress* del sitio BAR de la Universidad de Toronto (http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_sample_angler.cgi).

Otro gen que se mostró desregulado y resultó de nuestro interés es el que codifica para la proteína CBS (*CISTATIONINA BETA SINTASA*) para la que se ha reportado una función en la regulación del estado redox del cloroplasto y de la mitocondria. Además, participa en la regulación de los niveles de H₂O₂ y la polimerización de lignina en las anteras (Yoo y col., 2011). Finalmente, se ha postulado que las proteínas con dominios CBS regulan la actividad de la familia de proteínas Tiorredoxinas del cloroplasto y su sobreexpresión acelera el crecimiento en medios deficientes de sacarosa (Ok y col., 2012; Yoo y col., 2011).

Finalmente, la sobreexpresión de *AtOXR2* en plantas modifica la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés abiótico y genes regulados por ABA. Además, se observa un cambio en la expresión de genes que participan en la respuesta a estrés biótico tanto regulados por ABA como así también genes de defensa no asociados a esta hormona. Estos resultados son coincidentes con la función de las proteínas OXR en otros organismos.

En el capítulo introductorio de este trabajo de Tesis se mencionó el rol de las proteínas de la familia OXR en la respuesta a estrés oxidativo en levaduras, ratones y humanos (Durand y col., 2007; Elliott y Volkert, 2004; Murphy y Volkert, 2012; Volkert y col., 2000; Volkert y col., 2008). En el mosquito *A. gambiae* se demostró que proteínas de la familia OXR participarían en la respuesta a estrés biótico (Jaramillo-Gutierrez y col., 2010).

Con el objetivo de evaluar cuáles de las vías asociadas a la respuesta frente a patógenos en *Arabidopsis* serían reguladas por la sobreexpresión de *AtOXR2* se analizaron los genes modificados en las plantas *35S::AtOXR2* en el contexto de la respuesta estrés biótico. En la figura 7.4-6 se muestran los genes agrupados en distintas categorías relacionadas a la respuesta a estrés por patógenos de acuerdo con el programa MapMan (Thimm y col., 2004). Como puede observarse, la sobreexpresión de *AtOXR2* modifica genes que codifican proteínas de la familia PATHOGENESIS RELATED (PR). En esta numerosa familia encontramos proteínas NBS-LRR (de las siglas en inglés *nucleotide-*

binding site leucine-rich repeat) que presentan un dominio de unión a nucleótidos y un dominio de repeticiones de leucina. Las proteínas NBS-LRR se diferencian en dos grandes grupos: las que presentan dominio *coiled-coil* (CC-NBS-LRR) y las que presentan dominio TIR (*Drosophila Toll-IL-1 receptor*; TIR-NBS-LRR). Ambos grupos participan en el reconocimiento de patógenos bacterianos, virales y fúngicos así como nematodos, oomicetos e insectos y en la activación de la resistencia a la enfermedad a través de la muerte celular programada (Qi y Innes, 2013).

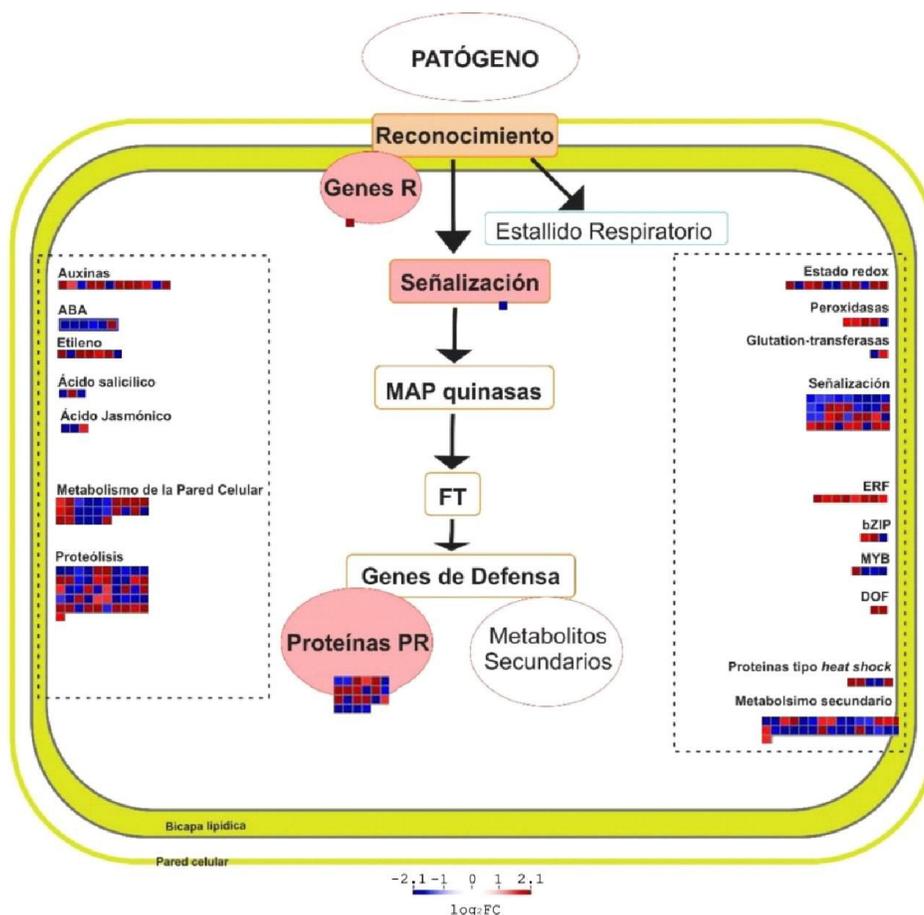


Figura 7.4-6 | Representación de los genes con niveles alterados en distintas vías celulares en plantas 35S::AtOXR2. En la imagen se representan distintas vías reguladas frente a un estrés biótico. En azul se muestran los genes que se encuentran disminuidos en y en rojo aquellos cuya expresión se encuentra incrementada en plantas que sobreexpresan *AtOXR2*. Esta figura fue obtenida con el software de análisis de transcripción MapMan, y modificada para su mejor interpretación.

Se sabe que la regulación de la respuesta frente a estrés biótico mediada a través de las distintas fitohormonas puede definir el éxito o el fracaso de un proceso de infección. Durante una situación de estrés biótico el cierre de los estomas es inducido por la acción del ABA y SA, mientras que los genes de respuesta a auxinas actuarían como antagonistas de esta respuesta (Melotto y col., 2006a; Piisila y col., 2015). La sobreexpresión de *AtOXR2* disminuye la expresión de genes cuya función putativa está vinculada a la síntesis de ABA (Figura 7.4-6). Entre ellos podemos mencionar al gen *AAO4* (*ARABIDOPSIS ALDEHYDE OXIDASE 4*) que codifica para una aldehído oxidasa y dos genes que codifican para dos isoformas de la 9-cis-epoxycarotenoide oxigenasa (*NCED2* y *NCED9*, *NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE*). La proteína AAO4 está involucrada en el último paso de la biosíntesis de ABA mientras que el paso catalizado por las enzimas NCED es el determinante de la regulación de la síntesis de dicha hormona. Por otro lado, el gen *TSPO2* (*OUTER MEMBRANE TRYPTOPHAN-RICH SENSORY PROTEIN*) se encuentra inducido en las plantas *35S::AtOXR2* y se ha reportado que su expresión se incrementa ante situaciones de estrés mediadas por ABA. La sobreexpresión de *TSPO2* genera hipersensibilidad a la inhibición del crecimiento por aplicación de ABA en semillas de *Arabidopsis* (Guillaumot y col., 2009). Recientemente se ha demostrado que la expresión de *TSPO2* durante el estrés contribuye con el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Hachez y col., 2014).

Los genes relevados por el programa MapMan para la interacción ABA-estrés biótico nos llevaron a profundizar en esta dirección. Por este motivo, en las secciones siguientes se desarrollarán los resultados obtenidos en el marco de la respuesta de plantas *35S::AtOXR2* cuando son sometidas a tratamientos que involucran efectores de esta naturaleza.

De acuerdo con el análisis efectuado por MapMan, la señalización mediada por auxinas resulta modificada en las plantas *35S::AtOXR2*, observándose 9 genes que codifican distintos miembros de la familia SAUR inducidos (Figura 7.4-6). Si bien la respuesta a auxinas podría estar exacerbada en estas plantas, el incremento de la expresión del gen *UGT74E2* (*URIDINE DIPHOSPHATE GLYCOSYLTRANSFERASE 74E2*)

sugiere que existiría una inhibición en la síntesis de esta hormona. Se ha postulado que UGT74E2 regularía la síntesis de auxinas a través de la regulación de los niveles de ácido indol-3-butírico en presencia de H₂O₂ (Spiess y Zolman, 2013; Tognetti y col., 2010).

Respecto de las vías que involucran al Acido Jasmónico (JA), las modificaciones transcripcionales asociadas a esta hormona en las plantas *35S::AtOXR2* implican muy pocos genes y solo indicarían una inhibición en la conversión del JA a metil-jasmonato (MeJa) por la enzima JMT (JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE, codificada por *At1g19640*) o una alteración en la biosíntesis debido a la disminución en los niveles de OPR2 (12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 2, codificada por *At1g76690*). Por el contrario, la vía del etileno (ET) asociada a la respuesta a estrés biótico consta de mayores elementos que dificultan su interpretación. Tanto la biosíntesis de ET, como la señalización mediada por factores de transcripción de la familia ERF podría estar inducida (Figura 7.4-6).

Por otro lado, la modificación de los metabolitos secundarios (terpenos, terpenoides, flavonoides, fenilpropanoides) es una respuesta característica y adaptativa de las plantas frente a distintas situaciones de estrés. La sobreexpresión de *AtOXR2* modifica el metabolismo secundario en *Arabidopsis*. En la figura 7.4-7 se muestra un esquema de los distintos procesos metabólicos modificados en plantas *35S::AtOXR2* en los que puede observarse la relevancia de las modificaciones en el metabolismo secundario.

Finalmente, los resultados más sobresalientes obtenidos en el ensayo de microarreglos realizado en plantas que sobreexpresan *AtOXR2* se resumen de la siguiente manera: las plantas *35S::AtOXR2* presentan una expresión diferencial de genes involucrados en la respuesta a patógenos, a la fitohormona ABA y en la homeostasis de los componentes de la pared celular. A esto hay que sumarle una alteración en el metabolismo lipídico y en el sistema de endomembranas, quizás como consecuencia de un perfil distinto de moléculas transportadas (tal vez debido a alteraciones en el metabolismo secundario), o debido a la expresión diferencial en proteínas involucradas en dicho transporte.

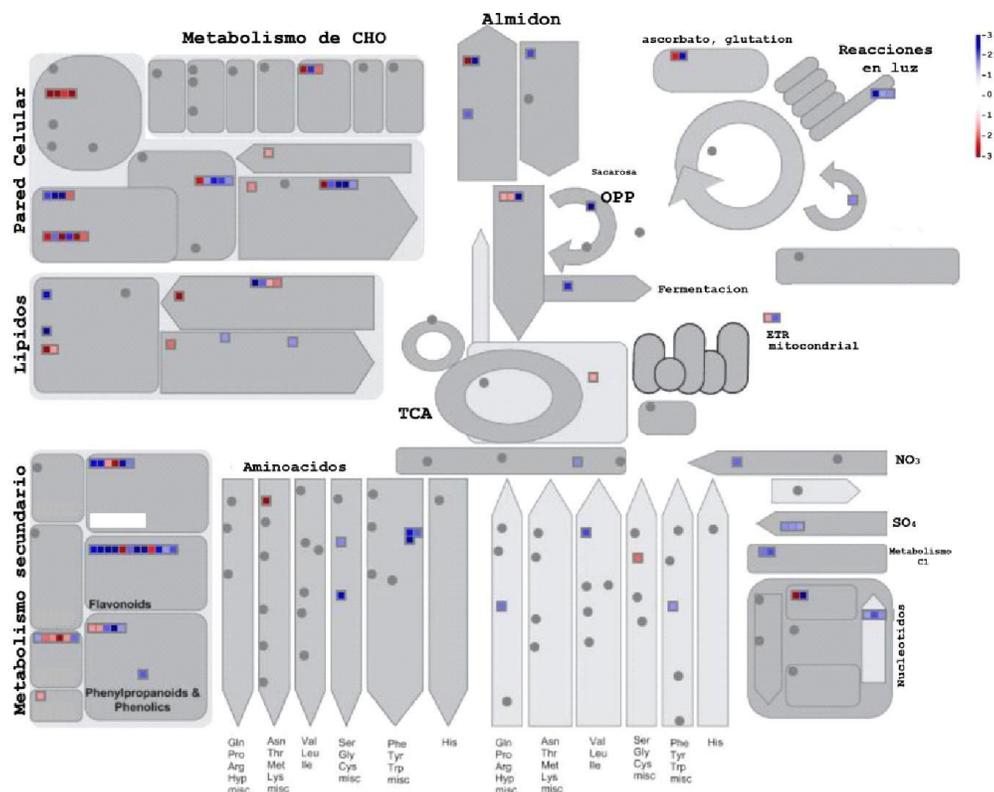


Figura 7.4-7 | Esquema de compartimentalización celular de procesos metabólicos. En la figura se detallan los distintos procesos metabólicos determinados por la base de datos de MapMan. Dentro del recuadro se agrupan los genes vinculados al metabolismo secundario. Esta figura fue obtenida con el software de análisis de transcripción MapMan, y modificada para su mejor interpretación.

En base a nuestros resultados nos preguntamos: ¿Qué factores podrían vincular todos estos procesos en simultáneo?. Parecería razonable suponer que si partimos de un gen cuya función se ha vinculado estrechamente a estrés oxidativo en otros organismos, parte del efecto observado en plantas podría deberse a variaciones en el estado redox celular. Entonces: ¿Podrían las ROS ser uno de los factores que estimulan estos procesos?.

Si bien el efecto depende del tejido en donde se presente esta interacción, la relación entre las ROS y el ABA está ampliamente documentada (Mittler y Blumwald, 2015). En general las ROS incrementan el efecto del ABA, el que a su vez produce la inhibición en los sistemas detoxificadores de ROS, tales como catalasa y SOD. Esto genera un incremento en las ROS que podrían actuar como mensajeros secundarios. Dentro de los efectos fisiológicos más conocidos que ocurren cuando se incrementan el ABA y las

ROS en un mismo tejido se puede citar el cierre estomático en hojas, la inhibición de la germinación en semillas y la determinación de la arquitectura de la raíz (Brady y col., 2003; Kang y col., 2015; Yoshida y col., 2002).

A nivel local las ROS son los principales efectores en la respuesta a patógenos, mientras que a nivel sistémico se comportan como moléculas mediadoras de dicha respuesta (Jones y Dangl, 2006). La respuesta a patógenos es conocida por alterar no sólo los niveles de ABA, sino también regular muchos procesos fisiológicos para sobrevivir al atacante.

Finalmente, las ROS son las determinantes del crecimiento de la pared celular. La polimerización de monolignoles en la pared ocurre mediante procesos de oxidación mediados por enzimas especializadas (Wang y col., 2013). La pared celular se modifica en presencia de patógenos, limitando la expansión de estos microorganismos (Colombatti y col., 2014).

7.4.3. Estrés oxidativo en plantas con niveles alterados de *AtOXR2*.

Los genes *OXR* de humanos y levaduras fueron identificados en un estudio donde se buscaba identificar genes capaces de revertir el fenotipo de estrés oxidativo de células de *E. coli* (Volkert y col., 2000). Desde que fueran primeramente aislados y descritos, se ha intentado establecer la ruta que vincula los genes *OXR* con el efecto que estos producen en diferentes organismos y sus mecanismos de acción a nivel molecular. Sin embargo, no se han reportado nuevas evidencias sobre la función de estas proteínas. En la sección 7.1.4 del presente trabajo de tesis, nosotros demostramos que dos de los genes *OXR* de *Arabidopsis* (*AtOXR2* y *AtOXR4*) son capaces de revertir el fenotipo de estrés oxidativo en cepas de *E. coli* y en levaduras mutantes. Es así que decidimos evaluar si variaciones en la cantidad de transcriptos del gen *AtOXR2* en plantas de *Arabidopsis* podrían causar modificaciones en el contenido de ROS. Esto podría orientarnos hacia el verdadero rol de esta proteína.

Para nuestra sorpresa, las plantas que expresan ectópicamente y constitutivamente *AtOXR2* resultaron tener mayores niveles de ROS (Figura 7.4-8 a), mientras que las plantas que tienen niveles disminuidos de este transcrito ($\Delta oxr2$) tienen niveles similares de ROS al de sus pares salvajes (Figura 7.4-8 d). Además de las tinciones con DAB (determinación de H_2O_2), se realizaron tinciones con NBT (determinación de $O_2^{\bullet-}$), y se obtuvieron resultados similares a los observados para la tinción con DAB (resultados no presentados). Esto indicaría que no podemos definir si existe una especie que se produzca diferencialmente.

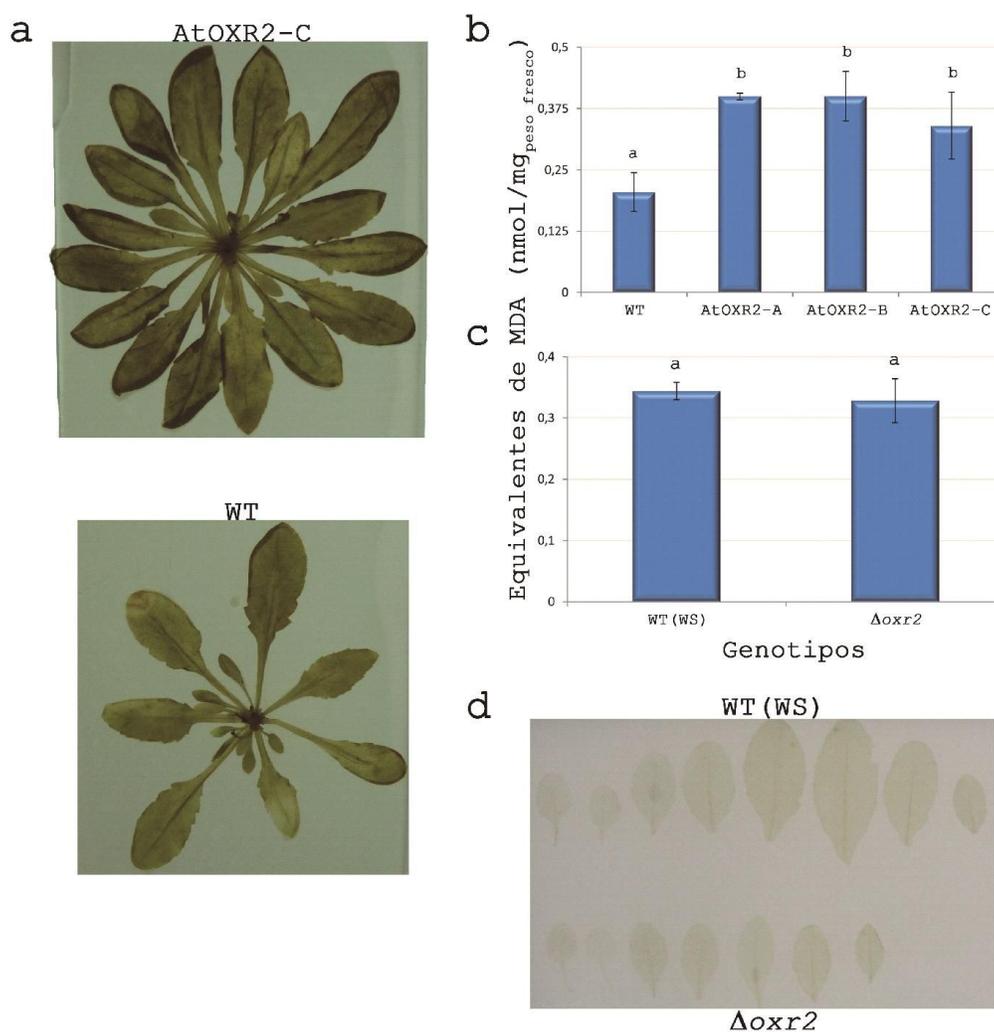


Figura 7.4-8 | Evaluación del contenido de ROS en plantas 35S:*AtOXR2* y $\Delta oxr2$. a- Tinción con DAB de rosetas de 6 semanas. b y c- Niveles de peroxidación lipídica evaluados como equivalentes de MDA. d- Tinción con DAB de hojas de roseta de plantas $\Delta oxr2$ y WT (WS). Las barras de error representan la desviación estándar de cuadruplicados biológicos de cada genotipo. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

La producción de lípidos peroxidados es una medición indirecta de los niveles de ROS dado que estos se generan como consecuencia de la reacción de los ácidos grasos poliinsaturados con los singuletes de oxígeno ($^1\text{O}_2$) o con el peróxido de hidrógeno. Entre los lípidos peroxidados generados, se produce en la célula malondialdehído (MDA). El MDA reacciona con ácido tiobarbitúrico produciendo un cromógeno rosado-rojo. En la figura 7.4-8 b y c se muestran los niveles de lípidos peroxidados, expresados como equivalentes de MDA. Cuando la determinación se realizó en plantas Δoxr2 y WT (WS) no se detectaron diferencias. Sin embargo, en plantas de 6 semanas crecidas en condiciones control, las plantas con mayores niveles de *AtOXR2* presentan mayores niveles de peroxidación lipídica que sus pares salvajes. Esto podría indicar que otros marcadores de estrés oxidativo podrían estar alterados en plantas *35S::AtOXR2*.

Debido a su naturaleza dual, las ROS generan distintas respuestas en distintos organismos. Es decir, existen diferentes reportes que indican que distintos organismos reaccionarían de manera diferencial a distintas concentraciones de ROS, y no necesariamente mayores niveles de ROS implican estrés (Kim y col., 2012). Sin embargo, está claro que debe existir un valor umbral, en donde la señalización se transforma en estrés. En el capítulo 7.3 se demostró que la sobreexpresión de *AtOXR2* genera plantas con mayor biomasa, mayor producción de semillas y mejor eficiencia fotosintética.

Los resultados presentados en 7.4-8 nos llevaron a evaluar otros marcadores de estrés oxidativo en plantas *35S::AtOXR2*. Se determinó actividad SOD, contenido de ascorbato y glutatión. Los resultados correspondientes a dichas determinaciones se muestran en la figura 7.4-9. De acuerdo con lo observado en el ensayo de microarreglos, no observamos diferencias en la actividad enzimática de SOD (Figura 7.4-9 a). Por otro lado, vimos que los niveles de ascorbato total y glutatión total se encuentran levemente aumentados (Figura 7.4-9 b y c). Para el caso del ascorbato, el incremento en la concentración se encuentra en el orden del 20% sobre el valor correspondiente a las plantas salvajes. Mientras que para el caso del glutatión, este valor promedio alcanza el 5% sobre el valor WT. Si bien las pruebas estadísticas arrojan diferencias significativas,

consecuencia de una desviación estándar pequeña (probablemente por utilizar la roseta completa), debemos plantearnos sobre la significancia biológica de esta significancia estadística. Por otro lado, es real que la concentración total de estos metabolitos es un simple indicador de cantidad, pero no del estado redox de la célula. Para esto, se deben cuantificar las especies oxidadas y reducidas de ambos metabolitos. Ciertas limitaciones en las técnicas espectrofotométricas nos impidieron determinar las especies mencionadas.

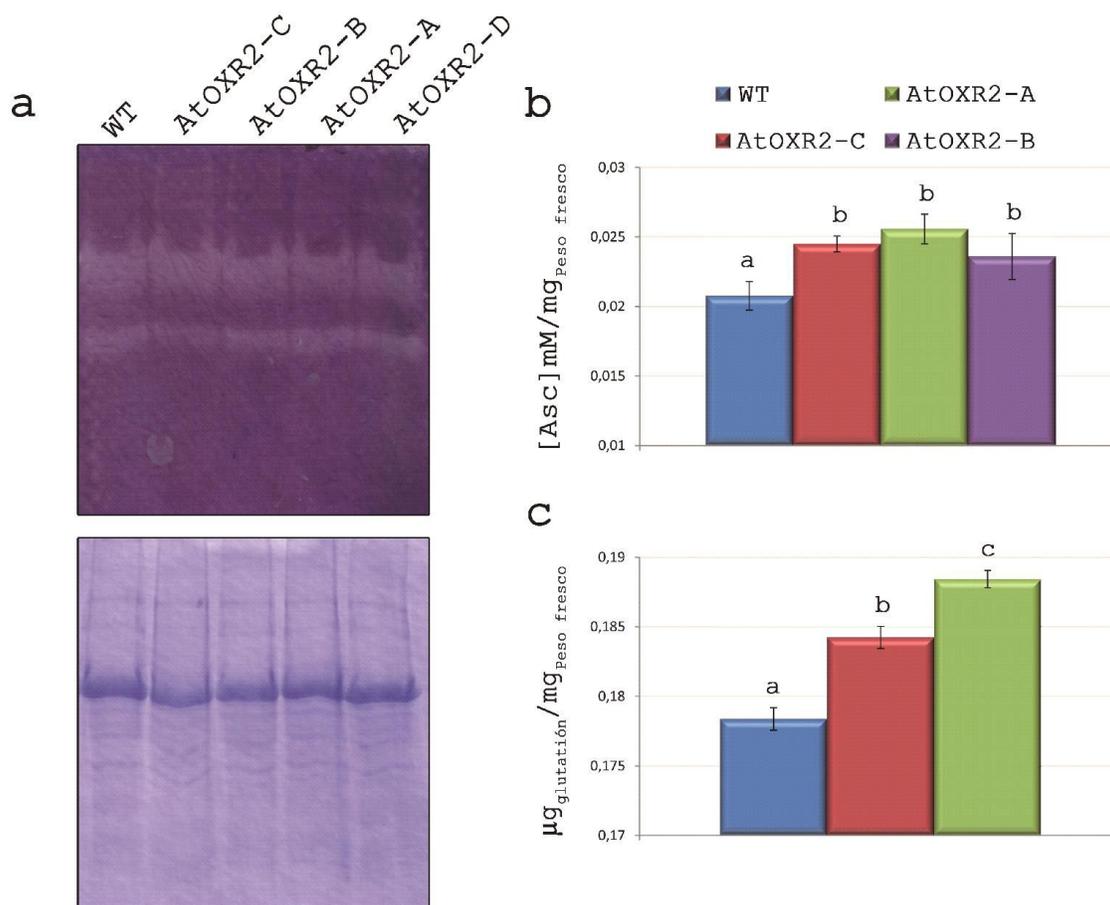


Figura 7.4-9 | Determinación del contenido de enzimas o compuestos detoxificadores de ROS en plantas 35S::AtOXR2 y WT. **a-** Determinación de la actividad SOD de rosetas de plantas de 6 semanas en geles de poliacrilamida. Arriba, decoloración que genera la actividad de la enzima SOD; abajo, contenido proteico en cada calle (*Coomasie blue*). **b-** Determinación de la concentración de ascorbato por método espectrofotométrico. **c-** Determinación del contenido de glutatión por método espectrofotométrico. Las barras de error representan la desviación estándar de quintuplicados biológicos de cada genotipo. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Los mayores niveles de ROS contrastan notablemente con la actividad SOD, la cual se encuentra balanceada en plantas que sobreexpresan *AtOXR2*. A excepción del ascorbato total, no observamos grandes cambios en los antioxidantes solubles. Sin embargo, el hecho de que haya más cantidad total y mayor contenido de ROS, probablemente signifique que existe un aumento en la oxidación del ascorbato

Los resultados mostrados hasta el momento nos generan los siguientes interrogantes: ¿podrían los niveles de ROS, en dosis similares a aquellas que producen las plantas *35S::AtOXR2*, ser beneficiosas para el desarrollo vegetal?, ¿Podrían ocurrir únicamente en un compartimento específico de las células?. Se ha demostrado que la respuesta a las ROS es dependiente de la dosis, y dadas las características fenotípicas demostradas en el capítulo 7.3, podríamos suponer que los niveles de ROS en plantas *35S::AtOXR2* son beneficiosos para el desarrollo. Existen diferentes reportes que indican que distintos organismos reaccionarían de manera diferencial a distintas concentraciones de ROS, y no necesariamente mayores niveles de ROS implican estrés (Kim y col., 2012). Alternativamente, el exceso de ascorbato podría estar protegiendo a las células del efecto nocivo de las ROS. Para responder el segundo interrogante, decidimos cuantificar los niveles de transcritos de genes relacionados con la regulación del estado redox celular en distintos compartimentos subcelulares. Los genes que decidimos evaluar por RT-qPCR fueron: *ASCORBATE PEROXIDASE (APX)*, *ASCORBATE OXIDASE (ASOX)*, *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D* y *E (RBOHD* y *RBOHF)*, *ALTERNATIVE OXIDASE1 α* (*AOX1 α*), *PEROXIREDOXIN IIF (PRXII)* y *CATALASE 3 (CAT)*. No detectamos diferencias en cuanto a los niveles de transcritos de *APX*, un gen cuyo producto proteico se localiza en el cloroplasto (Figura 7.4-10). Sin embargo, sí encontramos diferencias significativas para el gen de la *ASOX*, gen cuyo producto proteico se localiza en el cloroplasto (Figura 7.4-10).

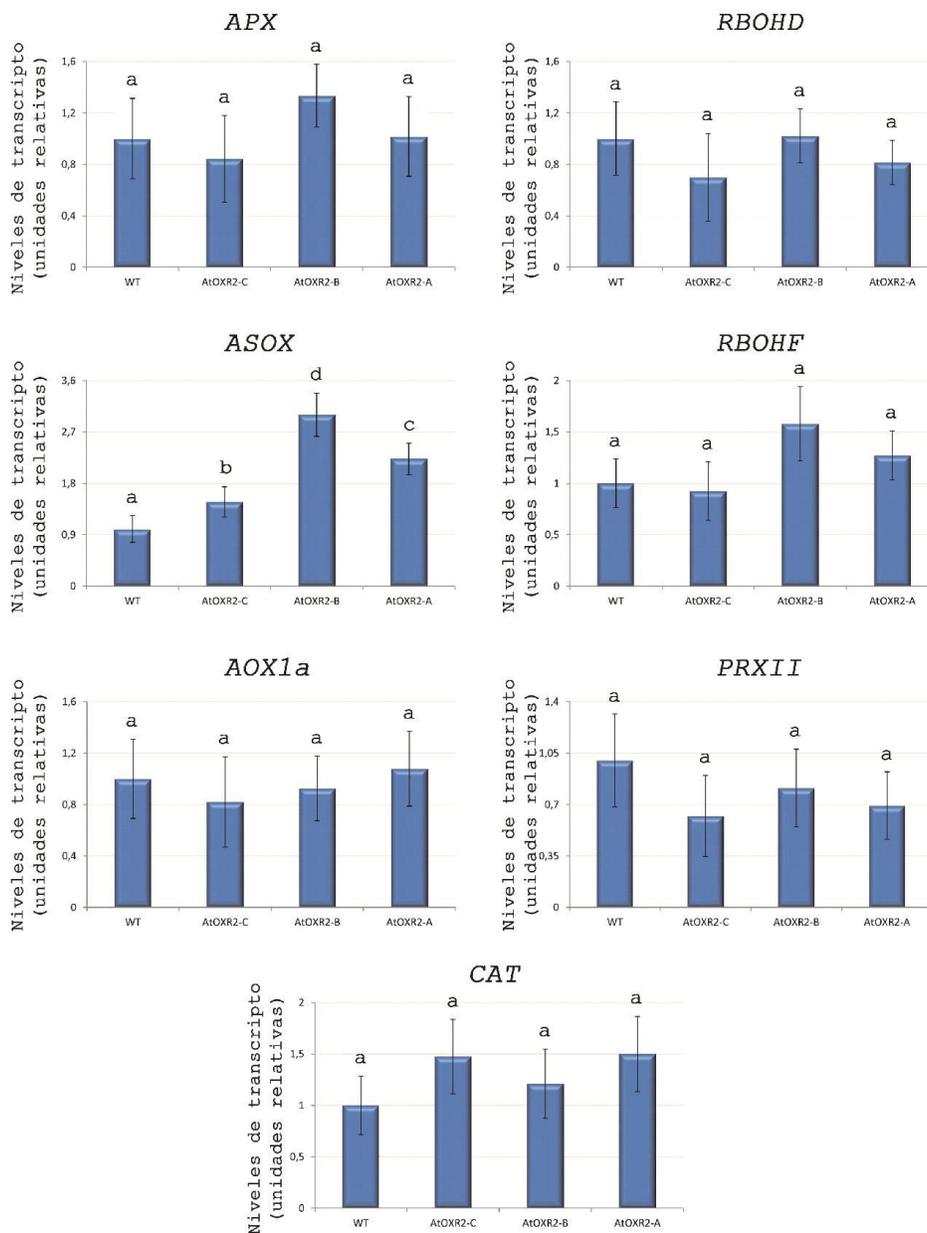


Figura 7.4-10 | Cuantificación de transcritos involucrados en el estado redox celular en rosetas de 6 semanas. El tejido aéreo de plantas de seis semanas fue utilizado por completo para la extracción de ARN que fue utilizado como molde en reacciones de RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos de cada genotipo. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Se sabe que las proteínas RBOHD y RBOHF son las encargadas de generar ROS en el apoplasto, consumiendo equivalentes reductores NADPH (Torres y col., 2002). Sin embargo, no detectamos diferencias significativas en estos genes en las plantas

35S::AtOXR2. Con respecto a los marcadores de estrés mitocondrial, *AOX1a* y *PRXII*, no detectamos diferencias. Resultados similares fueron observados para *CAT*, cuyo producto es ubicuo. Mientras que la *ASOX*, principalmente apoplástica, demostró tener un leve incremento en plantas que sobreexpresan *AtOXR2*.

Es interesante notar que las ROS pueden oxidar compuestos tanto de naturaleza polar como lipídica. Nuestros resultados indicarían que tenemos niveles similares de antioxidantes/detoxicantes polares (a excepción del ascorbato total) y niveles incrementados de peroxidación en fase lipídica. Esto puede significar que las plantas *35S::AtOXR2* tienen menor cantidad de antioxidantes en la fase lipídica (tocoferoles y tocotrienoles, isopreno, etc.) (Vickers y col., 2009), o existe una mayor oxidación en membranas quizás por proximidad de la fuente productora de ROS, o bien ambos fenómenos en simultáneo. En este sentido, el aumento de los niveles de transcripto para *ASOX* refuerza esta hipótesis y la idea de que el aumento de ascorbato total podría deberse a un incremento en la oxidación. El aumento de *ASOX* podría ser un factor que contribuye con el incremento en las ROS, ya que al oxidarse el ascorbato, se estarían quitando moléculas antioxidantes del sistema. De esta forma, el oxígeno activado tendría menos antioxidantes con los que reaccionar, y estas moléculas podrían reaccionar con otros componentes celulares. Así, podemos pensar que la mayor cantidad de ROS en las plantas *35S::AtOXR2* estaría en el apoplasto.

Las proteínas *AtRBOHD* y *AtRBOHF* son capaces de producir ROS en el espacio apoplástico, vía oxidación de NADPH (Torres y col., 2002). Si bien no detectamos una modificación en los niveles transcripcionales de *RBOHD* y *RBOHF*, estas no son las únicas enzimas con esta actividad. Este resultado implica que los mayores niveles de ROS en plantas *35S::AtOXR2* estarían siendo producidos por otras fuentes distintas a las NADPH oxidasas.

7.4.3.1. ROS y modificaciones en la pared celular: dos caras de la misma moneda.

Observando los resultados de microarreglos, aparecen 4 peroxidasas apoplásticas, tres de ellas putativas (At4g36430, At3g28200, At4g11290 y PRX32) que se encuentran incrementadas entre 1,7 y 2,3 veces en plantas *35S::AtOXR2*. Las peroxidasas pertenecen a una gran familia de enzimas que juegan roles críticos en la detoxificación de H₂O₂ (Tognolli y col., 2002; Valerio y col., 2004). Existen tres clases diferentes de peroxidasas que contienen grupos hemos (Smulevich y col., 2006).

La clase intracelular I que se conforma de ascorbato peroxidasas, citocromo c peroxidasas y catalasa-peroxidasas, las cuales son encontradas en organelas intracelulares, incluyendo el cloroplasto, peroxisoma y mitocondria. Dado que la clase I de peroxidasas se encuentra en la mayoría de los organismos, se cree que las otras dos clases se originaron a partir de la clase I. La clase II de peroxidasas generalmente se encuentra en hongos. Finalmente, todas las plantas terrestres poseen la familia multigénica de peroxidasas de clase III, las cuales son usualmente secretadas al espacio apoplástico, donde catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno con distintos donantes de electrones que incluyen compuestos fenólicos, precursores de lignina y varios metabolitos secundarios (Cosio y Dunand, 2009). En *Arabidopsis* se han reportado 73 genes que codifican peroxidasas de clase III. La mayoría de estos genes (66 de 73) se expresen en plantas de 6 semanas de edad (Valerio y col., 2004), mientras que los 7 restantes probablemente se expresen en condiciones específicas de estrés o estadios de desarrollo particulares (Kim y col., 2012).

Las peroxidasas son consideradas como proteínas PR de la subfamilia 9 (van Loon y col., 2006). Su expresión es útil para limitar la propagación celular de determinados patógenos. Esto lo logran a través de la formación de barreras estructurales y la generación de ambientes altamente tóxicos mediante la producción de ROS y RNS. Es así, que estas enzimas son capaces de producir el anión reactivo superóxido (O₂^{•-}) (Almagro y col., 2009) y sustratos para la lignificación de la pared celular (mediante la oxidación de compuestos fenólicos).

Peroxidasas como formadoras ROS. Uno de los eventos significativos en la respuesta al estrés biótico de las plantas es el estallido oxidativo, una respuesta temprana común de las plantas para atacar al patógeno. La generación por parte de las NADPH oxidasas, es uno de los mecanismos por las que se generan ROS en la membrana plasmática. Los otros tres posibles grupos proteicos restantes producen ROS a nivel de la matriz de la pared celular: las PRXs (Bolwell y col., 2002; Choi y col., 2007; Kawano, 2003), las poli(di)amino oxidasas y oxalato oxidasas, los cuales producen H_2O_2 directamente. Las PRXs catalizan la formación inicial de $O_2^{\bullet-}$, que rápidamente dismuta a H_2O_2 . Paradójicamente, las PRXs podrían producir ROS a pesar de que su función principal es la de oxidar sustratos fenólicos a expensas de H_2O_2 .

Es notorio el hecho de que no todas las ROS producidas por las PRXs están relacionadas al par $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$. Fry (1998) propuso que los polisacáridos de las plantas podrían estar sometidos a modificaciones no-enzimáticas in vivo, mediante la escisión por radicales hidroxilos OH (Fry, 1998).

La producción de superóxido producido por proteínas PRXs puede ser fácilmente distinguida de aquellas que provienen de las proteínas RBOH, ya que existen diferentes valores de K_m para el O_2 (Almagro y col., 2009). Esto implicaría que, independientemente de la molécula encargada de percibir el tipo de estrés, los efectos cuantitativos en las modificaciones de las actividades oxidante-antioxidante en distintos compartimentos celulares podrían ser responsables de los diferentes aspectos de un estrés particular. Esto se encuentra en línea con observaciones en donde se demuestran que pequeños incrementos en H_2O_2 permiten una mayor tolerancia al estrés; mientras que grandes incrementos en H_2O_2 disparan respuestas locales que inevitablemente llevan a la muerte celular programada (PCD) (Almagro y col., 2009; Kim y col., 2012). De hecho, se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno puede actuar como una señal difusible que desencadena la PCD localizada durante la HR (Levine y col., 1996), así como también su participación en redes de señalización sistémica (Alvarez y col., 1998). Estos estudios se acoplan a múltiples estudios donde se ha demostrado que el H_2O_2 modula la expresión génica durante la respuesta de defensa (Almagro y col., 2009; Desikan y col., 2000)

En este punto es importante destacar, nuevamente, la dualidad no sólo de las ROS, sino también, de aquellas moléculas encargadas de su metabolismo. El tipo de dicotomías presentadas en la producción de ROS mediada por las PRXs, es lo que dificulta la comprensión del ajuste fino de este tipo de especies (Almagro y col., 2009; Passardi y col., 2004).

Peroxidasas como formadores de pared celular. Las PRXs pueden crear una barrera física para limitar la invasión de los patógenos. Esto lo logran catalizando la reacción de entrecruzamiento de los componentes de la pared celular. Los procesos de rigidización de la pared celular pueden ser tanto dependientes como independientes del tipo celular. Es así como la extensión de la pared y el entrecruzamiento con ácido ferúlico constituyen eventos temporales y transitorios dentro del programa general de desarrollo de cualquier planta (Tenhaken, 2014; Wang y col., 2013). La lignificación y suberización son procesos terminales de un determinado y altamente diferenciado grupo de células capaces de formar paredes secundarias. (Bernards y col., 2004).

Si en un mismo tejido ocurre la formación de ROS, la expresión de *PRXs* y los precursores fenólicos (monolignoles), entonces ocurrirá el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular y se reforzarán las propiedades mecánicas de las paredes (Kieffer y col., 2000; Passardi y col., 2005; Wakabayashi y col., 2012). Cuando esto ocurre, debido a la rigidez y a la incapacidad para remodelar la pared, se detiene el crecimiento (MacAdam y Grabber, 2002; Uddin y col., 2014; Wakabayashi y col., 2012). Esto podría ser beneficioso para sobrellevar de manera más eficiente los cambios en la turgencia que ocurren durante el estrés osmótico (Fry, 1998; Renew y col., 2005; Schopfer, 2001),

7.4.3.2. Xiloglucano endotransglucosilasas/hidrolasas (XTH) y Expansinas (EXP).

Modificación de xiloglucanos, familia XTH. La remodelación de la pared celular por parte de las XTH ocurre debido a que los xiloglucanos actúan como polímeros de fijación entre las fibras de celulosa (Tenhaken, 2014). Una de las características del fenotipo vinculado a la pared celular en plantas estresadas osmóticamente es el aumento de la

expresión de expansinas y/o enzimas modificadoras de la pared celular (Rose y col., 2002). La sobre expresión de un gen XTH de *Capsicum annuum* (CaXTH) en plantas de tomate, no demostró un fenotipo apreciable, a menos que las plantas fueren sometidas a estrés salino (Choi y col., 2011). Choi y col. (2011) no pudieron determinar el modo exacto de acción. Sin embargo, sugirieron que podría ocurrir un refuerzo en las paredes celulares de las células del mesófilo, protegiéndolas de esta manera contra la pérdida excesiva de agua. Además, plantearon la posibilidad de un rol para la actividad XTH en la remodelación de la pared celular de los estomas, la cual impediría la pérdida excesiva de agua. Otros trabajos han encontrado correlaciones entre la expresión de distintos genes XTH y el estrés abiótico, como calor, frío, sequía y estrés osmótico (Chan y col., 2011; Tenhaken, 2014). Así, distintas condiciones de estrés abiótico llevan a un incremento en uno o unos pocos genes XTH. El patrón de expresión de los genes XTH y aquellos que se encuentran modificados en plantas *35S::AtOXR2* se muestra en la figura 7.4-11.

Expansinas, familia EXP. De manera similar a lo que ocurra con los genes XTH, los niveles de transcritos de las expansinas se ven aumentadas por condiciones de estrés abiótico. Han y col. (2012) sugirió que el mayor desarrollo radicular en plántulas de tabaco que sobreexpresan una expansina de trigo expuestas a estrés salino podría ser consecuencia de su mayor habilidad para retener agua. La sobreexpresión de la expansina A4 de rosa en *Arabidopsis* llevó a tasas de germinación aceleradas bajo condiciones de estrés salino, así como también raíces más largas y un incremento en el número de raíces laterales (Lu y col., 2013). Por otro lado, plantas de *Arabidopsis* que carecen del gen *AtEXLA2* tienen raíces más largas que las plantas WT bajo condiciones normales de crecimiento, pero sus raíces son más sensibles cuando las plantas se exponen al estrés salino (Abuqamar y col., 2013). Estos resultados se alinean con otros estudios donde se observa la necesidad de una actividad expansina “normal” para el crecimiento celular y la remodelación de la pared.

Por otra parte, las plantas de arroz detienen la elongación de las secciones entre los internodos bajo condiciones de estrés hídrico, lo cual lleva al desarrollo de fenotipo de plantas enanas. Todaka y col. (2012), realizaron una búsqueda de factores de transcripción

en respuesta a sequía en arroz, y se encontraron con *OsPIL1* (*Phytochrome interacting factor like 1*). Este factor de transcripción tipo bHLH disminuye sensiblemente sus niveles de transcripto en condiciones de estrés hídrico. Además, Todaka y col. (2012) demostraron que el factor de transcripción se coexpresa con la expansina *OsEXP4A*. La expresión ectópica de *OsPIL1* produce plantas con internodos más largos, mientras que la represión del gene produce plantas más cortas, lo cual sugiere que la expresión coordinada de expansinas junto con otros genes son los principales responsables de la longitud celular internodal (Todaka y col., 2012). De esta manera, estos genes estarían determinando la altura de la planta. Fue muy interesante encontrar que las plantas *35S::AtOXR2* tienen aumentado *AtPIL1* y una expansina de la familia A, sólo que en nuestro caso es *AtEXP3A*. Como se demostró en la sección 7.3.2.2.4 y en las figuras 7.3-10 a 12 las plantas *35S::AtOXR2* presentan una longitud del tallo incrementada respecto a sus pares salvajes.

En plantas, tanto las expansinas como los genes XTH están presentes como una familia de genes con 35 miembros para las expansinas y 33 miembros para XTH (Tenhaken, 2014). No todos los miembros de las familias están representados en el chip de microarreglos ATH-1. En la figura 7.4-11 se muestra que unos pocos miembros de cada familia responden a cada estrés, algo que demuestra la especificidad de las diferentes respuestas que ocurren tanto en raíces como en tejido aéreo. En la figura también se destacan (dentro de recuadros rojos o azules) los genes movidos en el ensayo de microarreglos realizado con plantas *35S::AtOXR2*.

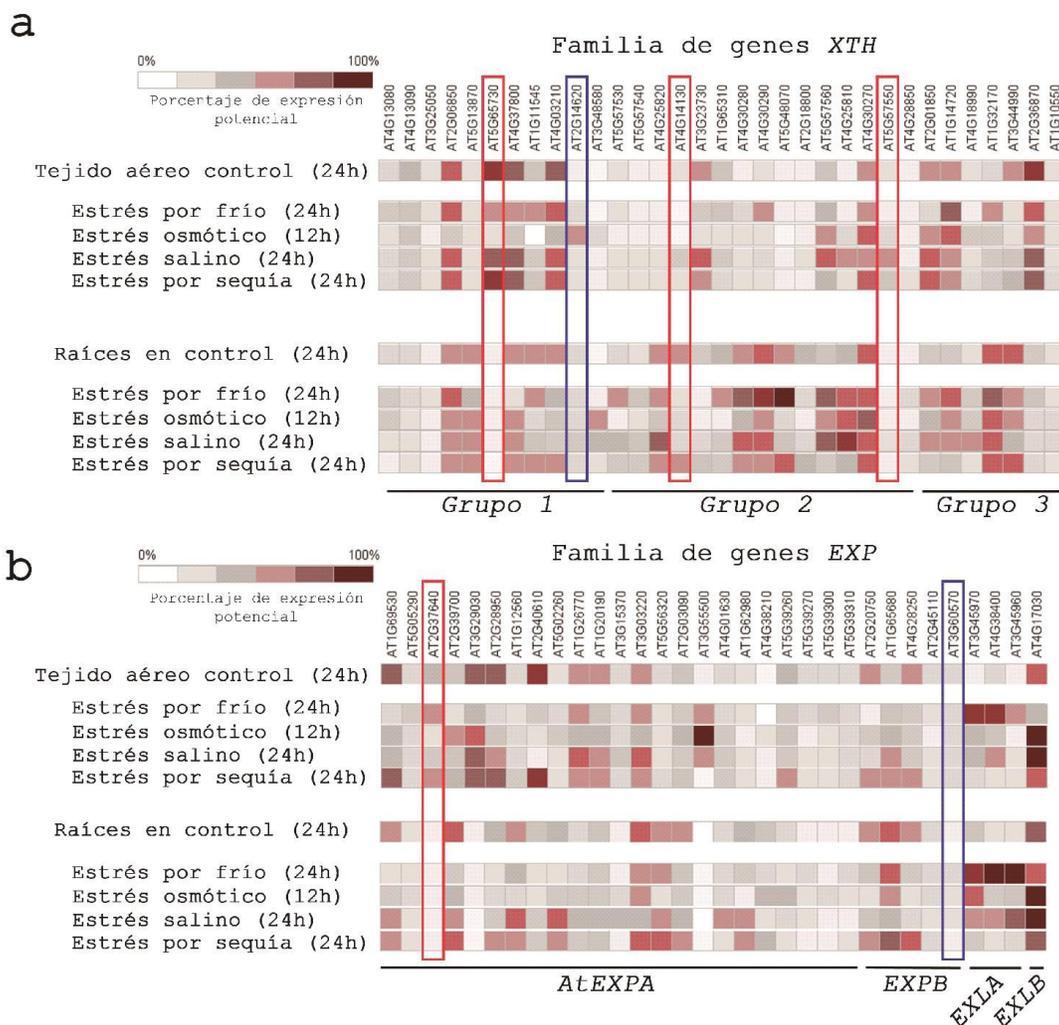


Figura 7.4-11 | Heat map de la expresión de genes *EXP* y *XTH* bajo condiciones de estrés abiótico. a- Expresión potencial de transcritos de la familia génica *XTH*. **b-** Expresión potencial de genes de la familia *EXP* en Arabidopsis. Los recuadros en rojo indican transcritos aumentados en plantas *35S::AtOXR2*, mientras que los recuadros en azul indican transcritos con niveles disminuidos en plantas *35S::AtOXR2*. Esta figura fue adaptado de Tenhaken, 2014.

El crecimiento de los órganos vegetales bajo estrés es la resultante entre la rigidización por parte de las peroxidases, y el debilitamiento de la misma pared que ocurre por las ROS, EXP y XTH. Un modelo simplificado del crecimiento de la pared bajo condiciones de estrés biótico se presenta en la figura 7.4-12.

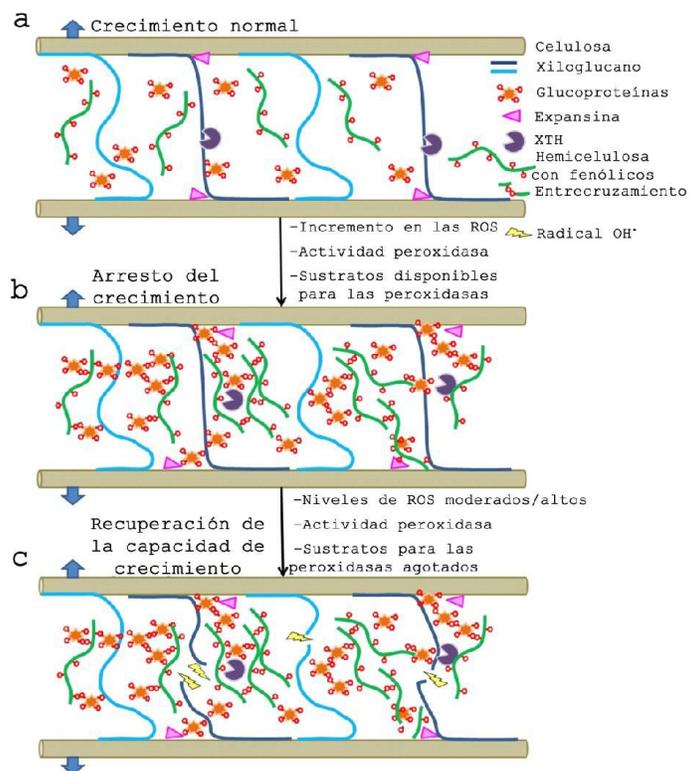


Figura 7.4-12 | Modelo de variaciones en la pared celular. a- Crecimiento de la pared celular en condiciones normales. b- Cuando se incrementan los niveles de ROS, se induce la expresión de peroxidasas y se las provee de sustratos, ocurre la lignificación de la pared. c- Si los niveles de ROS se mantienen constantes, o incluso aumentan, y se agotan los monolignoles necesarios para que las peroxidasas produzcan lignina, entonces nuevamente puede ocurrir el crecimiento de la pared celular. Adaptado de Tenhaken, 2014.

El arresto del crecimiento que normalmente se observa en condiciones de estrés biótico podría ser causado por el entrecruzamiento de glucoproteínas y fenólicos esterificados con polímeros de hemicelulosa. El entrecruzamiento resulta en una densa red que impide el acceso de expansinas y XTH a los xiloglucanos (Figura 7.4-12 b). Si la producción de ROS continúa y todos los sustratos fueron utilizados por la actividad de peroxidasas previamente, los elevados niveles de ROS podrían causar el corte mediado por radicales de la pared celular (Figura 7.4-12 c). Esto permitiría nuevamente el crecimiento, ya que el debilitamiento de la pared celular mediado por OH^\bullet es un proceso funcionalmente equivalente al crecimiento en plantas no estresadas, sólo que en este caso las encargadas de remodelar la pared son las EXP y las XTH (Tenhaken, 2014).

Las plantas 35S::AtOXR2 tienen transcritos de genes *PRX* alterados, pero también se encuentran alterados los niveles de *EXP*, *XTH* como se detalló en la figura 7.4-11. Sin embargo, estos no son los únicos transcritos alterados que tienen relación con modificaciones en la pared celular; también se encuentran disminuidos los niveles de transcritos de celulasas, de las pectinesterasas, y de poligalacturonasas. En contraste, encontramos aumentados los transcritos correspondientes a proteínas de arabinogalactanos. Los resultados obtenidos para los genes relacionados a la pared celular se muestran en la tabla 7.4-6.

Transcripto	Nombre común	Variación	Involucrado en
at3g46440	UXS5; UDP-glucuronate decarboxylase/ catalytic	1,6104124	Síntesis de precursores
at5g03760	ATCSLA09, CSLA09, ATCSLA9, CSLA9, RAT4 ATCSLA09; mannan synthase/ transferase, transferring glycosyl groups	2,5936928	
at4g23990	ATCSLG3, CSLG3 ATCSLG3; cellulose synthase/ transferase/ transferase, transferring glycosyl groups	-1,5547535	Síntesis de celulosa
at2g32530	ATCSLB03, CSLB03, ATCSLB3 ATCSLB03; cellulose synthase/ transferase/ transferase, transferring glycosyl groups	-2,3383124	
at2g33100	ATCSLD1, CSLD1 ATCSLD1; cellulose synthase/ transferase, transferring glycosyl groups	-2,154197	
at2g32610	ATCSLB01, CSLB01, ATCSLB1 ATCSLB01; cellulose synthase/ transferase/ transferase, transferring glycosyl groups	-1,6575221	
at2g47930	AGP26, ATAGP26 AGP26 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 26)	3,144686	Proteínas de arabinogalactanos
at1g55330	AGP21, ATAGP21	4,081293	
at5g60490	FLA12	2,256717	
at5g10430	AGP4, ATAGP4 AGP4 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 4)	2,9705174	
at3g47010	Hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	1,7078639	Gluconasa
at5g48900	Pectate lyase family protein	4,3014584	Degradación de la pared celular
at5g14650	Polygalacturonase, putative / pectinase, putative	-2,0172484	
at2g41850	PGAZAT, ADPG2 PGAZAT (POLYGALACTURONASE ABSCISSION ZONE A, THALIANA); polygalacturonase	-4,122671	
at3g57510	ADPG1 ADPG1; polygalacturonase 1	-4,231946	
at1g70500	Polygalacturonase, putative / pectinase, putative	-1,6118981	
at2g37640	ATEXPA3, ATEXP3, ATHEXP ALPHA 1,9, EXP3 EXP3	2,5295007	Genes de la familia EXP y XHT
at3g60570	ATEXPB5, EXPB5, ATHEXP BETA 1,3 ATEXPB5 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN B5)	-1,9007169	
at5g65730	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative	4,414084	
at2g14620	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative	-2,2474546	
at5g57550	XTR3 XTR3 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 3); hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase	3,4104447	
at4g14130	XTR7 XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase	1,9810731	
at3g06830	Pectinesterase family protein	-2,139526	Pectinesterasas
at1g11370	Pectinesterase family protein	-5,3002706	
at4g02330	ATPME41, ATPMEPCRB ATPMEPCRB; pectinesterase	2,0054433	
at1g57590	Carboxylesterase	-3,2511237	Acetilsterasa
at4g36430	Peroxidase, putative	1,7586122	Peroxidasas
at3g28200	Peroxidase, putative	1,6978579	
at3g32980	Peroxidase 32 (PER32) (P32) (PRXR3)	2,2828984	
at4g11290	Peroxidase, putative	1,9661373	
at2g41480	Electron carrier/ heme binding / peroxidase	-2,376822	

Tabla 7.4-6 | Genes involucrados en el metabolismo de la pared celular con expresión diferencial en plantas 35S::AtOXR2. En rojo se muestran los genes cuyos valores se encuentran aumentados en la roseta de plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, y en azul aquellos que se encuentran disminuidos en estas plantas.

Nuestro interés en la pared celular, no sólo se basó en los resultados mostrados en la tabla 7.4-6. Otro grupo de transcritos fueron detectados como expresados diferencialmente en plantas 35S::AtOXR2. Dicho grupo, se englobaba dentro del

metabolismo secundario, el cual engloba el metabolismo de los fenilpropanoides y biosíntesis de lignina (tabla 7.4-7).

Transcripto	Nombre común	Variación	Involucrado en
at1g78955	CAMS1 CAMS1 (Camelliol C synthase 1); beta-amyrin synthase	-2,5424874	Síntesis de Triterpenos
at3g21500	DXPS1 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	-2,4483442	Síntesis de ABA
at1g76490	HMG1, HMGR1 HMG1 (HYDROXY METHYLGLUTARYL COA REDUCTASE 1); hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	1,6399225	
at1g78480	Prenyltransferase/squalene oxidase repeat-containing protein	2,83315	Metabolismo de los terpenoides
at4g16740	ATTP503 ATTP503; (E)-beta-ocimene synthase/ myrcene synthase	-2,8981888	
at5g48110	Terpene synthase/cyclase family protein	-1,775309	
at4g31910	Transferase family protein	1,6144843	Síntesis de fenilpropanoides
at2g23910	Cinnamoyl-CoA reductase-related	1,600874	
at3g21230	4CL5 4CL5 (4-coumarate:CoA ligase 5); 4-coumarate-CoA ligase	-1,953869	Biosíntesis de lignina
at4g37990	ELI3-2, ELI3, ATCAD8, CAD-B2 ELI3-2 (ELICITOR-ACTIVATED GENE 3-2); aryl-alcohol dehydrogenase/ mannitol dehydrogenase	-4,6713686	
at2g21730	CAD2, ATCAD2 CAD2 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE HOMOLOG 2); binding / catalytic/ oxidoreductase/ zinc ion binding	-1,5886757	
at1g62570	FMO GS-OX4 FMO GS-OX4 (FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE 5-OXYGENASE 4); 4/8-methylthiopropyl glucosinolate 5-oxygenase	-1,5620052	Metabolismo de los glucosinolatos
at5g60890	ATMYB34, ATR1, MYB34 MYB34 (MYB DOMAIN PROTEIN 34); DNA binding / kinase/ transcription activator/ transcription factor	1,9336423	
at3g14210	ESM1 ESM1 (epithiospecifier modifier 1); carboxylesterase/ hydrolase, acting on ester bonds	1,7050436	
at5g25980	TGG2, BGLU37 TGG2 (GLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / thioglucosidase	4,540918	
at3g16390	NSP3 NSP3 (NITRILE SPECIFIER PROTEIN 3)	1,6391637	
at5g22300	NIT4 NIT4 (NITRILASE 4); 3-cyanoalanine hydratase/ cyanoalanine nitrilase/ indole-3-acetonitrile nitrilase/ nitrilase/ nitrile hydratase	-1,89696	Metabolismo de Antocianinas
at2g38240	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-2,465891	
at1g56650	PAP1, MYB75, SIAA1, ATMYB75 PAP1 (PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1); DNA binding / transcription factor	-2,76349	
at4g22870	Leucoanthocyanidin dioxygenase, putative / anthocyanidin synthase, putative	-3,4127078	
at1g03495	Transferase/ transferase, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	-2,8902419	
at3g29670	Transferase family protein	2,833761	
at3g29590	AT5MAT AT5MAT; O-malonyltransferase/ transferase	-1,913074	
at5g54060	UF3GT UF3GT (udp-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase); transferase, transferring glycosyl groups	-4,6583138	Metabolismo de las dihidroflavonoles
at5g42800	DFR, TT3, M318 DFR (DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE); dihydrokaempferol 4-reductase	-3,8917089	
at5g63580	FLS2 FLS2 (FLAVONOL SYNTHASE 2); flavonol synthase	2,3009586	Metabolismo de las flavonoles
at2g36790	UGT73C6 UGT73C6 (UDP-glucosyl transferase 73C6); UDP-glucosyltransferase/ UDP-glycosyltransferase/ quercetin 3/4/7-O-glucosyltransferase	-2,3880746	
at1g75300	Isoflavone reductase, putative	-1,5863072	Metabolismo de las Isoflavonoles
at1g75280	Isoflavone reductase, putative	-2,0532212	
at2g40370	LAC5 LAC5 (laccase 5); laccase	-1,9914608	Met. de Fenoles
at5g07850	Transferase family protein	1,5888705	

Tabla 7.4-7 | Genes involucrados en el metabolismo de los fenilpropanoides y lignina con expresión diferencial en plantas 35S::AtOXR2. En rojo se muestran los genes cuyos valores se encuentran aumentados en la roseta de plantas de seis semanas que sobreexpresan *AtOXR2*, y en azul aquellos que se encuentran disminuidos en dichas plantas. En negrita se destacan dos factores de transcripción de la familia MYB.

Al inspeccionar la tabla nos encontramos con que la síntesis de lignina está notoriamente disminuida, hecho que se ve reforzado con la disminución en *LAC5*. De esta forma, nos encontramos con que las plantas *35S::AtOXR2* tienen mayor cantidad de PRX, pero probablemente reciban menor cantidad de compuestos fenólicos para la síntesis de lignina. Parecería razonable esperar que las plantas *35S::AtOXR2*, debido a su mayor capacidad de crecimiento, produzcan menor cantidad de lignina. Dichos polímeros aportan rigidez estructural a la pared y la carencia de enzimas por parte de la célula vegetal hace que la remodelación sea dificultosa. Lo que no se explica por el fenómeno de mayor crecimiento, es el incremento en transcritos *PRX*. Si los transcritos *PRX* se

incrementaran como consecuencia de la mayor producción de ROS (siendo una consecuencia, en vez de la causa) entonces deberíamos encontrar mayor cantidad de precursores fenólicos, es decir monolignoles. Sin embargo, nos encontramos con que los transcritos encargados de producir estos precursores están disminuidos. Esto nos lleva a dos situaciones posibles: al momento de realizar el ensayo de microarreglos las plantas *35S::AtOXR2* se encontraban en la situación representada en la figura 7.4-11 c; o bien, dichas plantas simplemente tenían menor contenido de monolignoles porque era lo que el plan de desarrollo “les permitía crecer”. En este último caso, los mayores niveles de transcritos de *PRXs* en realidad eran la causa de las ROS, consecuencia de la expresión ectópica de *AtOXR2* en la roseta. Como se concluyó en la sección 7.2.5, la expresión de *AtOXR2* en rosetas salvajes es muy pequeña. No debemos dejar de mencionar que la mayoría de los transcritos *PRXs* incrementan sus transcritos en la sexta semana, es decir, justo el momento en el que se realizó el ensayo de microarreglos. Esto significa que los valores transcripcionales de *PRXs* de *WT* se incrementaron al momento del análisis, fenómeno que podría enmascarar los valores normales de sobreexpresión en las semanas previas, disminuyendo el valor de incremento en transcritos *PRXs* en plantas *35S::AtOXR2*.

La tabla 7.4-7 también revela que los transcritos que regulan la síntesis de antocianinas se encuentran disminuidos en las plantas que sobreexpresan *AtOXR2*. Sin embargo, en condiciones control, no detectamos cambios en la concentración de antocianinas cuantificados en condiciones normales de crecimiento (resultados presentados en sección 7.4.6). Los transcritos que regulan el metabolismo de los flavonoles también se encuentran disminuidos en plantas *35S::AtOXR2*. Además, en la tabla 7.4-7 observamos que los transcritos que participan en el metabolismo de los glucosinolatos están incrementados, al igual que aquellos transcritos que regulan la síntesis de fenilpropanoides. Los glucosinolatos (GSLs) constituyen una familia de compuestos secundarios ricos en azufre (S-glicósidos), que tienen en común una estructura central con anillo de β -D-glucopiranososa unido a una oxima. Los GSLs que se acumulan en el tejido vegetal tienen poca actividad biológica, pero luego de la ruptura

producida en los tejidos por el ataque de insectos o patógenos, entran en contacto con tioglucosidasas específicas, denominadas mirosinasas. Estas catalizan rápidamente la hidrólisis de los GLSs a isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos y epinitrilos (Ishida y col., 2014).

El ABA es un sesquiterpeno de 15 carbonos, y como tal, su síntesis proviene de la vía MEP de los plástidos, aunque se estima que algo podría sintetizarse en citosol. Cuando diagramamos en una misma imagen las vías de síntesis de terpenos, obtuvimos la figura 7.4-13, en la que observamos la alteración en las vías catalizadas por 5 transcritos diferentes. Es probable que la variación en estos transcritos genere desviaciones en el flujo metabólico, alterando así, el perfil metabólico de las plantas. Es sabido que la mayoría de los isoprenoides tienen un rango de funciones muy amplio en plantas, los cuales incluyen funciones fisiológicas caracterizadas en el metabolismo primario, tales como regulación del crecimiento (mediante hormonas), componentes fotosintéticos (cadenas laterales fitol en las clorofilas, y cadenas prenilo en las plastoquinonas), así como funciones estructurales. Dentro de las funciones secundarias se pueden citar a las relacionadas con la defensa de las plantas (fitoalexinas), y antioxidantes, como los tocoferoles y tocotreitoles (Vickers y col., 2009; figura 7.4-13).

Abraham y col. (2000) demostraron que debido a la elevada lipofilicidad de los monoterpenos, estos podrían actuar como desacopladores de la fosforilación oxidativa, y producir un desbalance en los niveles energéticos celulares (Abraham y col., 2000).

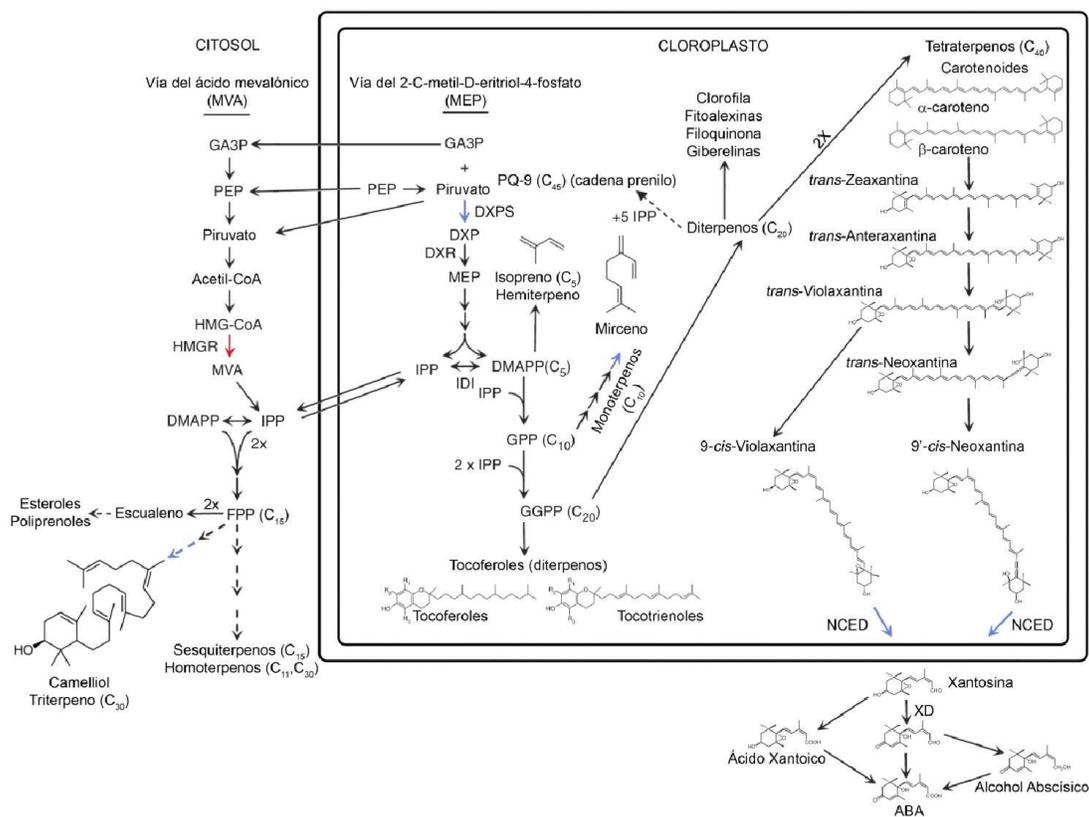


Figura 7.4-13 | Variaciones en las vías de síntesis de isoprenoides en plantas *35S::AtOXR2*. En plantas superiores existen dos vías biosintéticas de isoprenoides, las cuales se encuentran vinculadas: la vía del ácido mevalónico (MVA) en el citosol, y la vía del 2-metil-eritriol-4-fosfato en cloroplasto. Los bloques esenciales que se producen en estas vías son el isopentil-pirofosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalildifosfato (DMAPP). La interconversión entre las dos formas es catalizada por la isopentil-difosfato isomerasa (IDI). La vía MVA produce sesquiterpenos, triterpenos, homoterpenos, precursores esteroides y ubiquinona mediante el farnesil-difosfato (FPP). Mientras que la vía MEP produce el hemiterpeno isopreno, monoterpenos (vía geranil-difosfato, GPP), diterpenos, tetraterpenos e isoprenoides de orden superior (vía geranilgeranil-difosfato, GGPP). Las flechas rojas implican transcritos aumentados en plantas *35S::AtOXR2*, mientras que las flechas azules implican niveles disminuidos de transcritos. Dentro de la vía de MVA encontramos aumentado el transcritos correspondiente a la HMGR (hidroximetilglutaril-CoA-reductasa), así como CAMS1 (camelliol C sintasa 1). Desde el lado cloroplastídico nos encontramos con transcritos disminuidos para DXPS (1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa), así como la mirceno sintasa, las NCED2 y 9 (9-*cis*-epoxicarotenoide-dioxigenasa). Abreviaturas: ABA: Ácido Abscísico; DXP: 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato; GA3P: Gliceraldehído 3-fosfato, HMG-CoA: 3-hidroximetilglutaril-CoA; PEP: Fosfoenolpiruvato; PPI: Pirofosfato; PQ: Plastoquinona, XD: Xantosina deshidrogenasa.

Es destacable que las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* tengan disminuidos 2 de los genes *NCED*. La familia *NCED* de *Arabidopsis* está compuesta por 9 miembros. Es probable que la disminución en los niveles de sólo 2 de los genes involucrados en la síntesis de ABA no alcance a disminuir los niveles totales de ABA. Sin embargo, es claro

que debería estar marcando alguna condición para la planta. Por este motivo, decidimos evaluar la respuesta de plantas *35S::AtOXR2* frente al ABA. Por otro lado, los resultados obtenidos para el estado redox de la roseta, tanto como los resultados de intercambio gaseoso, indicarían que efectivamente la transpiración de las plantas *35S::AtOXR2* estaría alterada. Esto podría deberse a los mayores niveles de ROS en estas plantas. Para terminar de comprobar esta idea, decidimos cuantificar el número de estomas, y la habilidad de las plantas para cerrar o abrir sus estomas.

7.4.4. Respuesta a ABA en plantas *35S::AtOXR2*.

La fitohormona ABA es un sesquiterpeno proveniente de la oxidación de los carotenoides vegetales, que se sintetiza en plástidos por enzimas codificadas en el núcleo. El fitoeno se sintetiza a partir de la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl-difosfato (GGPP), y cada una de estas, proviene de la condensación de isopentenil-difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil-difosfato (DMAPP). El IPP puede ser sintetizado a partir de ácido mevalónico (MVA) por un vía citosólica y enviado a los plástidos. Otra vía es a partir de 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) la cual es sintetizada directamente en los plástidos a partir del piruvato y el gliceraldehído-3-fosfato, mediante la vía del metileritritol-fosfato. Todo los licopenos trans sintetizados a partir del fitoeno son convertidos en β -carotenos y zeaxantina, el primer precursor oxigenado del ABA. La zeaxantina se puede transformar en anteraxantina y trans-violoxantina mediante la acción de la enzima ZEP (zeaxantina epoxidasa). La totalidad de la trans-violaxantina es convertida en cis-9-violoxantina o en cis-9'-neoxantina, ambas moléculas carotenoides de 40C. Ambos compuestos son clivados en los plástidos para dar aldehído-xantosina (15C) y un compuesto de 25C. ZEP, también es conocido como ABA1, y su expresión es ubicua durante la maduración de la semilla en *Arabidopsis*. Sin embargo, su expresión se restringe a los embriones y al endosperma durante la desecación.

La enzima *NCED* cataliza el corte oxidativo de la cis-9-violaxantina o la cis-9'-neoxantina para producir cis-9-xantosina. La expresión de *NCED* en respuesta a estrés

medioambiental es tan rápida que la actividad de NCED es considerada como el paso limitante de la velocidad en la síntesis de ABA. Por otro lado, la enzima AtCCD1 cataliza el corte oxidativo de los dobles enlaces C9, C10 (o C9', C10') de sustratos carotenoides tales como β -caroteno. Los genes *NCED* no son regulados por ABA. A pesar de que los genes *NCED* han sido caracterizados en distintas especies, los datos de su expresión en semillas son limitados.

Se ha reportado que los miembros de la familia AtNCED podrían llevar a cabo distintos roles en la regulación de la síntesis de ABA durante el desarrollo de la semilla y la germinación, *AtNCED3* (principalmente expresado en la base de la semilla), *AtNCED5*, *AtNCED6* (ambos expresados en toda la semilla) y *AtNCED9*. Las mutantes de *AtNCED6* y *9* muestran menor contenido de ABA en semillas secas, y la emergencia de la radícula en estas mutantes no se ven afectadas por paclobutrazol. También se ha reportado dormancia reducida de semillas en mutantes *NCED6* y *NCED9*.

7.4.4.1. Ensayo de pérdida de agua de rosetas escindidas.

Los resultados obtenidos para el intercambio gaseoso de plantas *35S::AtOXR2* (mostrados en 7.3.3.3), principalmente aquellos de transpiración (E), acoplados a los detectados en el ensayo de microarreglos nos llevaron a verificar por otros ensayos qué estaba ocurriendo con las plantas *35S::AtOXR2*. Para esto, decidimos comenzar evaluando, por un ensayo gravimétrico sencillo, la evolución del contenido acuoso de rosetas cortadas (Materiales y Métodos sección 6.2.36).

Los resultados presentados en la figura 7.4-14 demuestran el comportamiento antagónico de plantas mutantes y plantas con niveles ectópicos y constitutivos del gen *AtOXR2*. Para el caso de plantas *35S::AtOXR2*, cuyo ecotipo es Col-0, las diferencias en el contenido de humedad relativo comienzan a observarse a los 60 minutos. En cuando al comportamiento de las plantas de ecotipo WS, las diferencias comienzan a manifestarse a los 210 minutos, y conforme pasa el tiempo se van magnificando.

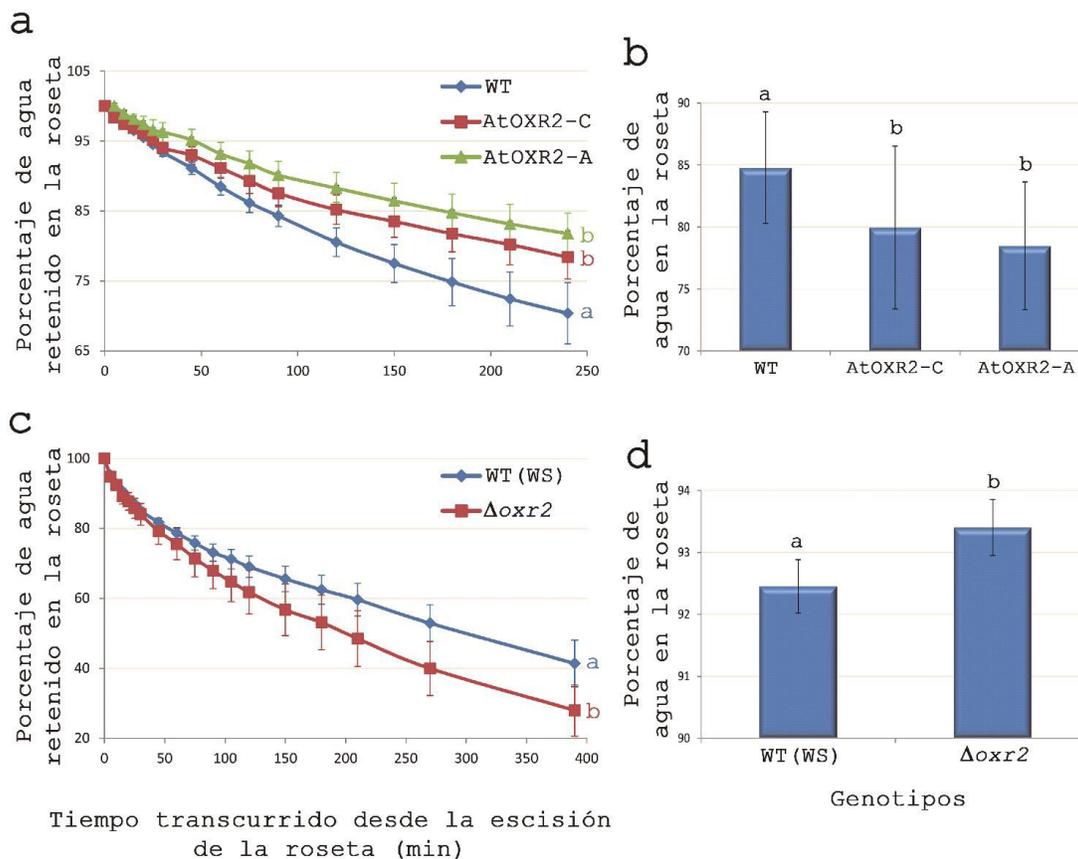


Figura 7.4-14 | Curvas de deshidratación obtenidas mediante el ensayo de pérdida de agua de rosetas escindidas y contenido de agua de las rosetas. a- Curvas obtenidas para plantas *35S::AtOXR2* y plantas WT. **b-** Contenido acuoso de rosetas de plantas de 6 semanas ($n_{WT}= 10$; $n_{AtOXR2C}= 14$; $n_{AtOXR2A}= 14$). **c-** Curvas obtenidas con plantas $\Delta oxr2$ y sus pares salvajes. **d-** Contenido acuoso de la roseta de plantas mutantes y salvajes de 6 semanas de edad ($n_{WT(WS)}= 8$, $n_{\Delta oxr2}= 8$). Las barras de error representan la desviación estándar (a y c: sextuplicados biológicos). Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$. Para el contraste WT/AtOXR2-C el valor p es 0,0464.

Las plantas *35S::AtOXR2* pierden menor cantidad de agua luego de haber sido escindidas. La misma determinación implica un estrés para la roseta, y el ensayo es un indicio de que durante estrés, las plantas *35S::AtOXR2* tienen mayor capacidad que sus pares salvajes para retener el agua disponible. De manera opuesta, las plantas $\Delta oxr2$, retienen menos agua que sus pares salvajes. Es importante mencionar que existe una diferencia crucial entre ambos ensayos, y es justamente el contenido acuoso de la roseta. Resulta consistente pensar que si las plantas tienen menor contenido de agua, tengan una tendencia a conservar este compuesto fundamental para la vida. Quizás, la pregunta más

importante, luego de conocer estos datos, sea determinar en qué momento del desarrollo ocurre el quiebre y se genera esta disrupción en el contenido acuoso y la velocidad de pérdida de agua.

Los resultados del ensayo de deshidratación nos llevaron a observar qué podría estar pasando a nivel estructural y fisiológico. Es decir, ¿podrían las plantas *35S::AtOXR2*, o las plantas $\Delta oxr2$, tener una densidad estomática distinta a la de sus contrapartes salvajes?. Para evitar la dispersión en los datos decidimos trabajar con dos pares de hojas, el sexto par de hojas y el cuarto par de hojas de plantas de 6 semanas. De esta manera, tomamos hojas que previamente demostraron ser muy distintas en plantas *35S::AtOXR2*, como el 6to par, y hojas que demostraron ser similares, como el 4to par (ver sección 7.3.3.1, figuras 7.3-15 y 7.3-16). Luego de realizar impresiones de epidermis concluimos que el número de estomas eran similares en todos los genotipos (Figura 7.4-15). Para el caso de los genotipos pertenecientes al ecotipo Col-0 encontramos en promedio 243 estomas/mm², mientras que para WS 231 estomas/mm² (resultados no presentados). Es probable que el menor número de estomas en el ecotipo WS sea el parámetro responsable del mayor tiempo requerido para observar diferencias en el ensayo de deshidratación de rosetas escindidas, ya que al tener menor cantidad de estomas, se limita la máxima tasa de transferencia de gases.

Durante las determinaciones de densidad estomática observamos que el área de las células de la epidermis era mayor en plantas *35S::AtOXR2* que en plantas WT. En promedio, las células del pavimento de estas plantas serían un 10% más grandes que las de sus pares salvajes. Para complementar la información de la epidermis, fuimos a ver qué estaba ocurriendo con las células del parénquima mediante microscopía Nomarsky y nos encontramos con que dichas células eran un 16% más grandes en plantas *35S::AtOXR2* (resultados no presentados). Obviamente, estas pequeñas variaciones en las células no equiparan la enorme variación en el área foliar. Es por esto que nuestra conclusión final respecto a la morfología de plantas *35S::AtOXR2* es que; si bien las células son un poco más grandes, en general lo que está aumentado es la reproducción celular. Estos

resultados se acoplan perfectamente a lo observado para el desarrollo foliar (sección 7.3.2.2.2, figura 7.3-9).

Luego de determinar que la única diferencia a nivel estructural era la relación entre el número de estomas y las células del pavimento, decidimos estudiar cómo influía el ABA sobre la apertura estomática. Debido a las diferencias en los valores de intercambio gaseoso que existen en condiciones basales, decidimos llevar a cabo un ensayo que estandarice la apertura estomática. Esto se realiza incubando las hojas en solución de apertura estomática a 180 μE de intensidad lumínica durante 3 horas. Transcurrido este período las hojas se incuban en una solución 1, 5 o 10 μM de ABA durante una hora. Se tomaron muestras a distintos tiempos, se realizó una impresión de la epidermis, y se cuantificaron las relaciones largo/ancho en 100 estomas. Debido a que existen infinitos valores, definimos arbitrariamente que para una relación largo/ancho menor a 1,35 el estoma se encontraba abierto, mientras que para valores mayores, el estoma se encuentra cerrado. A su vez, establecimos, que en el rango de 1 a 1,35 podíamos separar dos franjas, para estomas bien abiertos, cuya relación se encuentra entre 1-1,1 (era de esperar que relaciones cercanas 1 dieran como resultados estomas abiertos) y otra franja con estomas semiabiertos cuya relación se encuentra entre 1,11-1,34.

Como era de esperarse, en función de la concentración de ABA utilizada para lograr el cierre estomático, obtuvimos distintos resultados, transcurridas las dos horas de incubación. Las mayores diferencias en cuanto al cierre estomático las obtuvimos cuando incubábamos las plantas en 5 μM de ABA durante una hora. En esta condición, encontramos que las plantas *35S::AtOXR2* cierran sus estomas en mayor medida que sus pares salvajes (Figura 7.4-15).

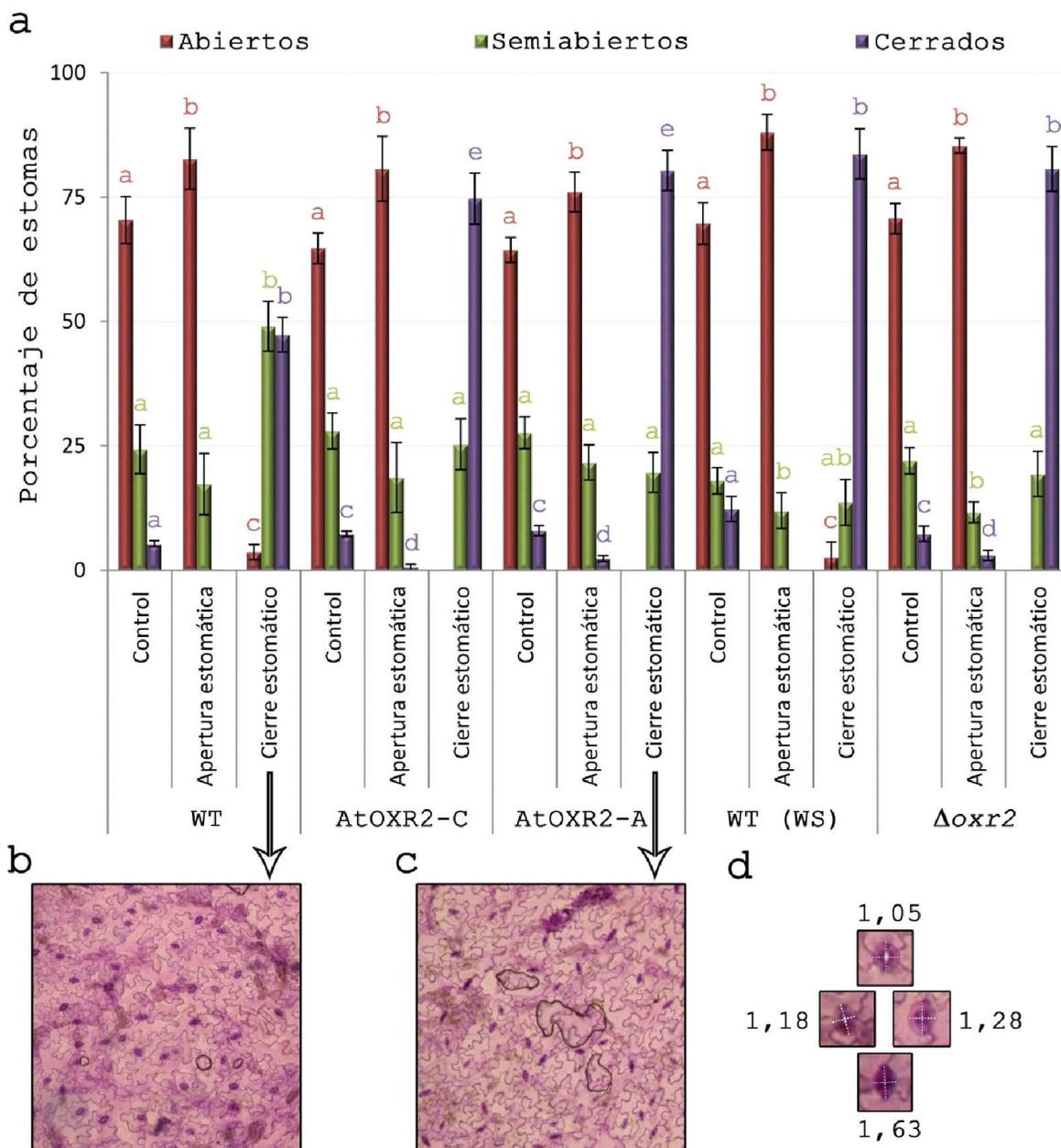


Figura 7.4-15 | Ensayo de respuesta estomática frente al ABA. a- Resultados obtenidos con el sexto par de hojas para el ecotipo Col, y quinto par de hojas en ecotipo WS en plantas de 6 semanas. b- Foto de epidermis post tratamiento de plantas WT, c- Fotos de epidermis luego del tratamiento de cierre estomático en AtOXR2-A. d- Imágenes de estomas en las tres situaciones con sus respectivos índices (largo/ancho): abiertos, semiabiertos, y cerrados. Las fotografías se tomaron de una impronta realizada con cinta adhesiva sobre la cara abaxial de las hojas, como se describe en la sección 6.2.32 de Materiales y Métodos. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$, dentro de un mismo grupo de estomas (abiertos, semiabiertos, o cerrados).

Durante los estadios tempranos del desarrollo de la hoja, las células de la epidermis del primordio foliar (conocido como células protodermicas/protodermales) se diferencian tanto en células del pavimento o se vuelven células madres meristemoides (*meristemoid mother cells*, MMCs) (Jewaria y col., 2013). Cada MMC se divide asimétricamente y produce una pequeña célula con forma triangular (meristemoide) y su célula hermana. El linaje celular iniciado por las MMC se conoce como linaje estomático. A su vez, cada meristemoide puede, posteriormente, sufrir una o dos rondas de división celular asimétrica, conocidas como divisiones amplificantes, las cuales resultan en otra célula meristemoide y su hermana. Eventualmente, la célula meristemoide se convierte en célula madre de la guarda, que se divide simétricamente y finalmente se transforma en estoma (Jewaria y col., 2013; Richardson y Torii, 2013).

En el ensayo de microarreglos realizado en rosetas de plantas de 6 semanas encontramos evidencia que sostiene las observaciones realizadas. Puntualmente, encontramos el gen *STOMAGEN* (conocido por regular positivamente la densidad estomática) (Sugano y col., 2010) aumentado 2,74 veces, y el gen *EPF1* (*EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1*) (Hara y col., 2007) aumentado 1,85 veces. Contrariamente a la función de *STOMAGEN*, *EPF1* regula negativamente la densidad estomática. De esta forma, tenemos incrementados genes fundamentales que regulan la densidad estomática. Los dos procesos, incremento en el tamaño de las células del pavimento (sostenido por el incremento de *EPF1*), y una densidad estomática similar (sostenida por el aumento de *STOMAGEN*), dan como resultado un pequeño incremento en la relación número de estomas/número de células del pavimento. Esta diferencia es pequeña, pero es probable que sea una parte de la causa por la cual los parámetros de intercambio gaseoso, presentados en la sección 7.3.3.2 de este trabajo de Tesis, se distinguen de aquellos obtenidos para sus pares salvajes.

Resumiendo los resultados obtenidos hasta el momento, las plantas *35S::AtOXR2* pierden menor cantidad de agua en condiciones control (parámetro E de intercambio gaseoso sección 7.3.3.2), y menor cantidad de agua cuando la roseta es escindida del resto de la planta. Es probable que esto se deba a que cierran sus estomas con mayor velocidad.

No detectamos diferencias significativas que avalen la menor pérdida de agua observada en el ensayo de rosetas escindidas para las mutantes. El cierre estomático está íntimamente ligado con la fitohormona ABA, y previamente se ha reportado el efecto sinérgico entre el ABA y las ROS. Además, el ABA cumple un rol esencial en el proceso de germinación de la semilla.

7.4.4.2. Rol del ABA durante el proceso de germinación.

El proceso de germinación inicia cuando la semilla seca se hidrata y el embrión se expande. Se ha reportado que la toma de agua se puede separar en tres etapas: una toma inicial rápida (conocida como Fase I), seguida por una fase estacionaria (Fase II) y una toma final de agua (Fase III; Rajjou y col., 2012). En esta última fase el embrión elonga su eje y protruye su envoltura para completar la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; figura 7.4-16).

Luego de la imbibición, la activación del metabolismo produce un incremento del estado redox, generando un rápido consumo de oxígeno que lleva a la formación de ROS (Kranner y col., 2010; Oracz y col., 2009; Wojtyla y col., 2006). Como consecuencia del incremento metabólico y de la impermeabilidad del oxígeno a la envoltura de la semilla, la concentración de oxígeno dentro de la semilla cae rápidamente, y las condiciones se transforman en hipóxicas. En estas condiciones se reprime la respiración y la forma de obtener energía por parte de la semilla es principalmente anaeróbica y fermentativa. Posteriormente, cuando la radícula protrusiona la envoltura de la semilla, se restaura el aporte de oxígeno y la disponibilidad de este valioso elemento genera nuevamente el cambio metabólico hacia la respiración. Es así, como de manera similar a la concentración de agua, podemos distinguir 3 fases: la Fase I con un consumo temprano de oxígeno durante las primeras horas posteriores a la imbibición que generan un aumento en las ROS; luego un estadio anaeróbico antes de que la radícula protrusione caracterizada por la producción de NO fermentativa y la reducción de nitritos y nitratos; y finalmente el metabolismo aeróbico luego de que la radícula protrusiona (Figura 7.4-16).

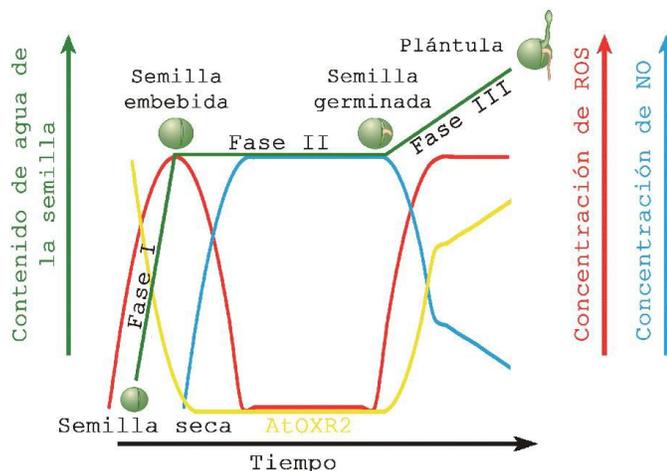


Figura 7.4-16 | Fases que atraviesa la semilla seca hasta convertirse en una plántula naciente. Como se detalla en el texto, la semilla atraviesa tres fases que concluyen en la elongación del eje del embrión y se protruya la envoltura de la semilla. Además del contenido de agua, también se ha planteado previamente el hecho de que exista una “ventana oxidativa”, necesaria para que ocurra la salida de la dormancia. En este sentido, se pueden detectar una fase temprana que evoluciona en paralelo con la imbibición, donde se produce un aumento de las ROS, una segunda fase caracterizada por hipoxia y procesos fermentativos cuya característica principal es el incremento de NO; y finalmente, cuando el embrión rompe la envoltura y el espacio se llena nuevamente de oxígeno se restaura nuevamente el metabolismo aeróbico y nuevamente se da un incremento en las ROS. En amarillo, una *estimación* de lo que ocurriría con el transcritto de *AtOXR2*, según figura 7.2-14. Esta figura fue modificada de *Rajjou y col., 2014*.

La formación de ROS en la fase temprana ocurre principalmente debido al restablecimiento del metabolismo y del aumento de NADPH oxidasas y peroxidasas, encargadas del estallido oxidativo durante la rehidratación (Colville y Kranner, 2010). Debido a los crecientes reportes que vinculan el incremento en las ROS con la capacidad de salir de la dormancia de las semillas, algunos autores desarrollaron el concepto de “ventana oxidativa” para escapar de la dormancia (Bailly y col., 2008). En esencia, lo que plantea esta hipótesis es que es necesaria una cierta cantidad de ROS para que las semillas puedan romper la dormancia. La hipótesis se sostiene con la creciente evidencia de que los mecanismos de defensa protegen a las semillas durante el estadio de dormancia e impiden su germinación, mientras que la ruptura de la dormancia se logra luego de la maduración cuando la acumulación de ROS modifica el estado redox y rompe estas barreras de control alterando las funciones de las proteínas mediante modificaciones oxidativas (Müller y col., 2009). Como consecuencia de la naturaleza de las ROS, si las

concentraciones sobrepasan ciertos límites, entonces estas mismas especies podrían llevar al daño celular irreversible. De hecho, se ha demostrado que ese es el mecanismo por el cual los monoterpenos (entre ellos el mirceno), ejercen sus efectos de inhibición en la germinación (Abraham y col., 2000).

El ABA regula muchos aspectos del desarrollo de la semilla y etapas tempranas posteriores a este estadio, que son muy importantes a nivel agronómico. Cumple un papel fundamental en la síntesis de proteínas y lípidos de reserva, en la tolerancia a la desecación de las semillas, en la dormancia, en la germinación y en el crecimiento de la plántula (Finkelstein y Rock, 2002; Kucera y col., 2005; Nambara y col., 2010). Además, se ha reportado que esta fitohormona disminuye su concentración cuando la semilla escapa de la dormancia, como consecuencia de su catabolismo por parte de hidrolasas específicas de la familia citocromo P450 CYO707A (Finkelstein y col., 2008; Okamoto y col., 2006). Esto se correlaciona perfectamente con lo observado para distintas especies, donde el nivel de ABA endógeno determina no sólo la inducción sino que probablemente el mantenimiento del estado de dormancia (Koornneef y col., 2002; Kucera y col., 2005; Nambara y Marion-Poll, 2003).

La sobreexpresión de genes de biosíntesis de ABA produce un aumento en el contenido de la fitohormona y un estado prolongado de dormancia caracterizado por un retraso en la germinación. Avalando la importancia del ABA en la dormancia, se ha demostrado que la deficiencia de ABA durante el desarrollo de la semilla está asociada con la ausencia de la dormancia primaria en la semilla madura. Además, las semillas que no presentan la dormancia inducida por ABA son capaces de germinar sin GA (Bentsink y Koornneef, 2008; Finkelstein y Gibson, 2002; Nambara y Marion-Poll, 2003). Finalmente, es destacable mencionar que Kucera y col., (2005) reportaron que los efectos mediados por el ABA se deben principalmente a la biosíntesis de la hormona por parte del embrión.

La función principal del ABA es la de inhibir la ruptura del endosperma. Una vía que tiene para generar esto, es mediante la represión de la expresión de genes que codifican las β -1,3-glucanasas de clase I (β Glu-I), los cuales se inducen en el endosperma

inmediatamente antes de su ruptura. La luz, las giberelinas (GA) y el ET promueven la expresión de β Glu-I, la ruptura del endosperma y el escape de la dormancia, mientras que el ABA, la alta concentración osmótica y la oscuridad la inhiben (Kucera y col., 2005).

7.4.4.3. Ensayos de germinación en placas con semillas de plantas *35S::AtOXR2* y WT.

En función de todos los efectos reportados para las ROS y el ABA sobre la germinación de la semilla, decidimos realizar ensayos de germinación bajo distintas condiciones que estimulan la dormancia de las semillas. Para esto, decidimos estudiar no sólo el efecto del ABA, sino también de glucosa. Previamente se ha reportado la capacidad de la glucosa para demorar la germinación de las semillas. La función de este azúcar como modulador del metabolismo y señalización hormonal (principalmente del ABA) (Zhu y col., 2011), se realiza a través de una alteración en la disminución del contenido de ABA una vez que la semilla es embebida. Con esta información decidimos ensayar el porcentaje de germinación de plantas *35S::AtOXR2*. En dicho ensayo, pudimos detectar que las mayores diferencias se apreciaban en el establecimiento de la plántula, y no en el porcentaje de germinación. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.4-17.

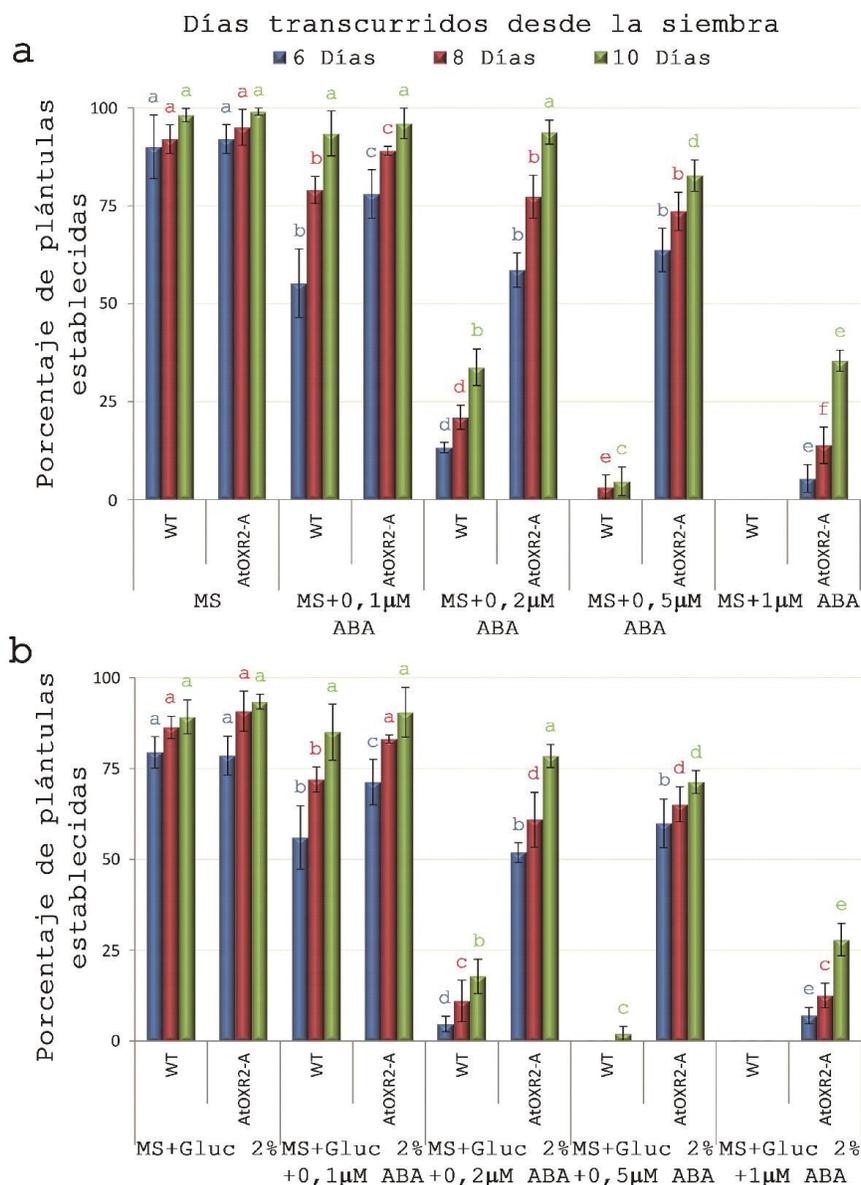


Figura 7.4-17 | Ensayo de establecimiento en medios conteniendo factores que reprimen el establecimiento de la plántula. a- Resultados obtenidos en el ensayo de germinación y establecimiento en medios conteniendo ABA a distintas concentraciones. **b-** Gráficos obtenidos cuando los medios conteniendo Glucosa al 2% (Gluc 2%) y ABA en concentraciones crecientes. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados experimentales. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$, dentro de un mismo grupo de tiempo de germinación (6, 8 o 10 días).

Los resultados mostraron una mayor tasa de establecimiento de las plantas *35S::AtOXR2* cuando se incrementa el estrés sobre las semillas. En la figura 7.4-18 se muestran imágenes representativas de este proceso postgerminativo.

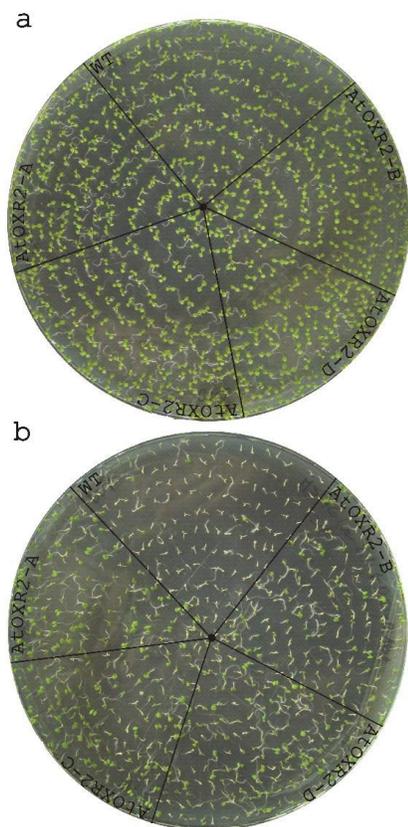


Figura 7.4-18 | Ensayo de germinación y establecimiento de distintos genotipos de plantas 35S::AtOXR2 en placas conteniendo MS 0,5X con Glucosa al 2%. a- Plantas crecidas en medio MS 0,5X suplementado con glucosa 2% (control). b- Plantas crecidas en medio MS 0,5x suplementado con glucosa 2% y ABA 0,5 μ M. Las fotografías fueron tomadas luego de 7 días de crecimiento. En cada región triangular de la placa se sembraron entre 100 y 120 semillas de cada genotipo en estudio.

Estos resultados nos alentaron a evaluar el impacto del manitol en el proceso de germinación y establecimiento. Similar a lo ocurrido con glucosa, cuando el medio se suplementaba solo con manitol, se observaron diferencias sutiles con respecto a la WT. Sin embargo, cuando el medio se suplementaba con manitol y ABA, entonces las diferencias se magnificaban (resultados no mostrados). La figura 7.4-19 muestra un resumen de lo observado cuando las semillas eran sembradas en placas con MS suplementado con ABA y manitol.

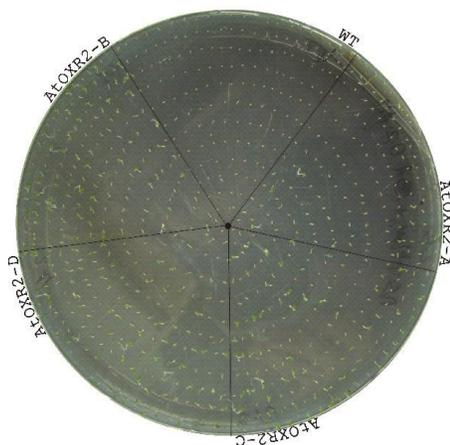


Figura 7.4-19 | Ensayo de germinación y establecimiento de distintos genotipos de plantas 35S::AtOXR2 en placas formuladas con MS 0,5X suplementado con manitol al 2% y ABA 0,2 μ M. La fotografía fue tomada luego de 7 días de crecimiento. En cada región triangular de la placa se sembraron entre 120 y 160 semillas de cada genotipo en estudio.

Teniendo en cuenta todo lo observado en relación al ABA y plantas *35S::AtOXR2*, nos preguntamos si estas plantas tenían un desbalance en el contenido de ABA. Para corroborar esto, decidimos cuantificar el contenido de esta fitohormona mediante espectrometría de masas.

7.4.4.4. Determinación de la concentración de ABA en distintos tejidos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.4-20.

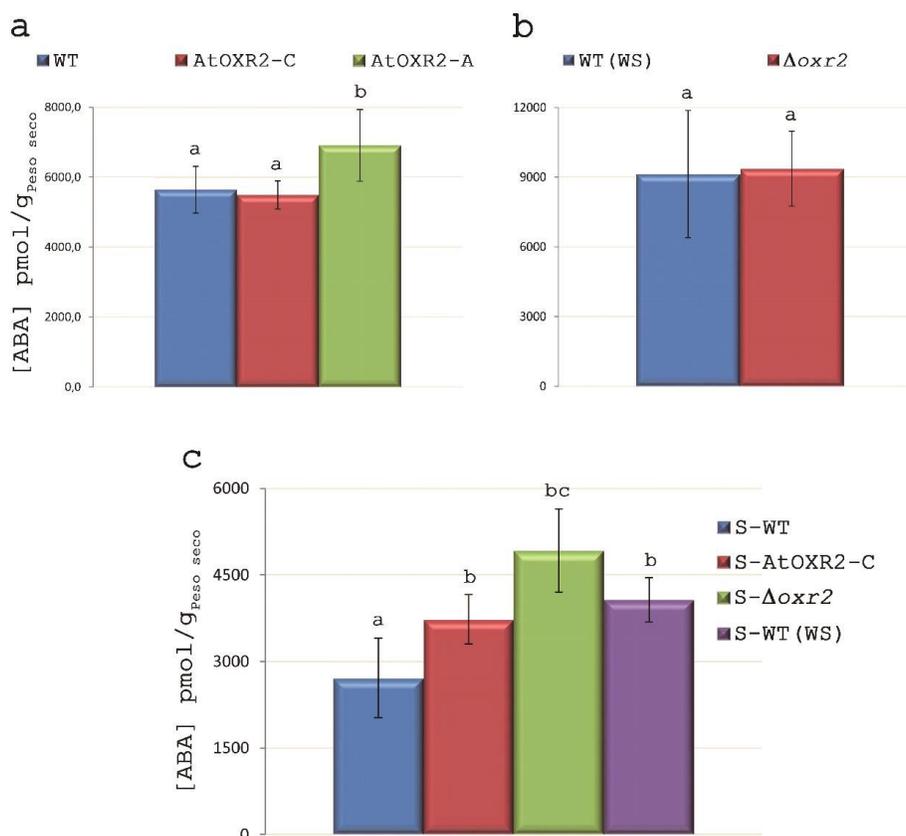


Figura 7.4-20 | Contenido de ABA en semillas y rosetas de plantas *35S::AtOXR2* y plantas mutantes. a y b- Concentración de ABA en rosetas de plantas de 6 semanas para el caso *35S::AtOXR2* y de 5 semanas para $\Delta oxr2$. **c-** Resultados de concentración de ABA obtenidos en semillas de plantas de distintos genotipos. Cuando la "S" se antepone a los nombres de los genotipos, es porque la determinación se realizó sobre semillas. Las barras de error representan la desviación estándar de: quintuplicados biológicos en **a**, cuadruplicados biológicos en **b**, y **c**. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$, dentro de un mismo grupo de tiempo de germinación.

Contrariamente a lo que hubiéramos esperado, el contenido de ABA en semillas con niveles ectópicos es superior al de sus pares salvajes. En las plantas *35S::AtOXR2* esta diferencia resulta estadísticamente significativa, mientras que en las mutantes se puede apreciar una tendencia. Esto significaría que las diferencias en el proceso de germinación no vienen dadas por las diferencias en el contenido de ABA, ya que al tener mayor contenido de ABA en las semillas, se esperaría un incremento en la dormancia de las semillas. A pesar de tener un 27% más de ABA en las semillas, las semillas de *AtOXR2-C* tienen una mejor performance en este proceso que sus pares salvajes. Como se mencionó previamente, la germinación es un proceso que es promovido por diferentes factores. Entre ellos, se pueden mencionar la ventana oxidativa, el contenido de ABA, GA, dureza de la envoltura, componentes externos como la luz, azúcares, presión osmótica del medio, etc. Debido a que el ABA está aumentado, es probable que las diferencias en la tasa de germinación sean consecuencia de factores promotores de la germinación. Los resultados del ensayo de microarreglos demostraron que podrían existir alteraciones en la formación de la pared celular. Además, vimos que plantas adultas *35S::AtOXR2* tienen mayores niveles de ROS, quizás, mediado por peroxidasas de la pared celular. Quizás una combinación sinérgica entre producción de ROS y una envoltura de la semilla más débil en la zona del endosperma micropilar, sean las causales de una mejor performance en la tasa de germinación.

Los resultados obtenidos para la concentración de ABA, en rosetas de plantas *35S::AtOXR2* indicarían una correlación directa entre los niveles de expresión y el contenido de la fitohormona. Así, las plantas *AtOXR2-C* (con menores niveles de sobreexpresión) tiene un contenido de ABA similar a las plantas salvajes, mientras que *AtOXR2-A* (el genotipo con mayores niveles de expresión), tiene; en promedio, un 18% más de ABA (Figura 7.4-20 a). A pesar de las diferencias en el contenido de ABA, las rosetas de los distintos genotipos *35S::AtOXR2* demostraron tener un comportamiento similar, en los distintos ensayos a los que fueron sometidos.

Por otro lado, las rosetas de plantas mutantes de 5 semanas de edad, mostraron un contenido similar de ABA al de sus pares salvajes. Con lo cual, las diferencias

reportadas hasta el momento para estas plantas no se deberían al contenido basal de ABA. Sí, en cambio, es probable que exista cierta disfuncionalidad en la traducción de las señales de esta hormona a largo plazo.

Como se puede apreciar en la figura 7.4-18 y 7.4-19, las semillas de los distintos genotipos germinan bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, las plantas *35S::AtOXR2* son capaces de establecerse y continuar con su plan su desarrollo, mientras que sus pares salvajes no son capaces de tolerar las condiciones ensayadas. Si bien existe un desfase en el proceso germinativo, este desfase termina igualándose con el tiempo. La diferencia más importante es en el paso determinante del establecimiento de la planta. Los resultados presentados en las figuras 7.4-18 y 7.4-19 denotan que la concentración de ABA en el medio, se encuentra en el orden de 150-200 veces la concentración en el interior de la semilla (500 nM en el medio, y 2,5-3 nM en la semilla seca). Cuando la raíz rompe la envoltura micropilar, la plántula entra en contacto con el medio y es en ese momento en el que el ABA con el que se suplementaron los medios comienza a interferir en el establecimiento de la plántula. En este estadio el ABA ha demostrado inhibir el crecimiento de la radícula, y esto se puede apreciar claramente en la figura 7.4-18 b. De esta manera, podríamos postular de un modo preliminar que las plántulas *35S::AtOXR2*, parecerían ser insensibles al efecto del ABA.

Finalmente, cuando se ejerce un efecto osmótico sobre las semillas (utilizando manitol) y se someten a la exposición al ABA, el porcentaje de germinación es mayor en semillas de plantas *35S::AtOXR2*. Esta vez, los mecanismos involucrados son diferentes a aquellos observados cuando el MS es suplementado con glucosa. Esto se debe a la diferencia química de ambos compuestos (glucosa y manitol) y por ende a sus rutas metabólicas y respuestas que generan en la planta. El manitol genera estrés osmótico que; debido a su lento metabolismo en la planta, perdura durante muchos días.

7.4.5. Metabolismo secundario.

7.4.5.1. Compuestos fenólicos y su rol en la respuesta a estrés.

La síntesis de los compuestos fenólicos tiene a la fenilalanina como sustrato de origen que se somete a distintas modificaciones. Así, la fenilalanina es transformada en ácido trans-cinámico por acción de la enzima PAL (de sus siglas en inglés *Phenylalanine Ammonia Lyase*). El ácido trans-cinámico es convertido posteriormente en p-cumaroil-CoA, un intermediario común a las distintas vías de síntesis de fenilpropanoides, tales como flavonoides, antocianinas, cumarinas y ligninas (Figura 7.4-21). A partir de este punto, la síntesis de los flavonoides y antocianinas se determina por la acción de la CHS (de sus siglas en inglés *Chalcone synthase*), encargada de la síntesis de chalcona. Mientras que si el flujo metabólico se dirige hacia la síntesis de lignina, entonces la primera enzima involucrada es la hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato transferasa (HCT), responsable de la síntesis de ácido ferúlico. Este último es un intermediario clave no sólo en la síntesis de lignina, sino también de cumarinas (Vogt, 2010). La polimerización deshidrogenativa de los monolignoles, es un proceso mediado por enzimas de la familia de las lacasas y las peroxidasas. Las lacasas utilizan O₂ como sustrato, mientras que las peroxidasas utilizan H₂O₂. En función de la disponibilidad de sustratos, así como de la presencia de cada enzima, la polimerización ocurre a través de una u otra enzima (Wang y col., 2013). En la figura 7.4-21 se muestra un esquema simplificado de las reacciones principales en la biosíntesis de compuestos fenólicos.

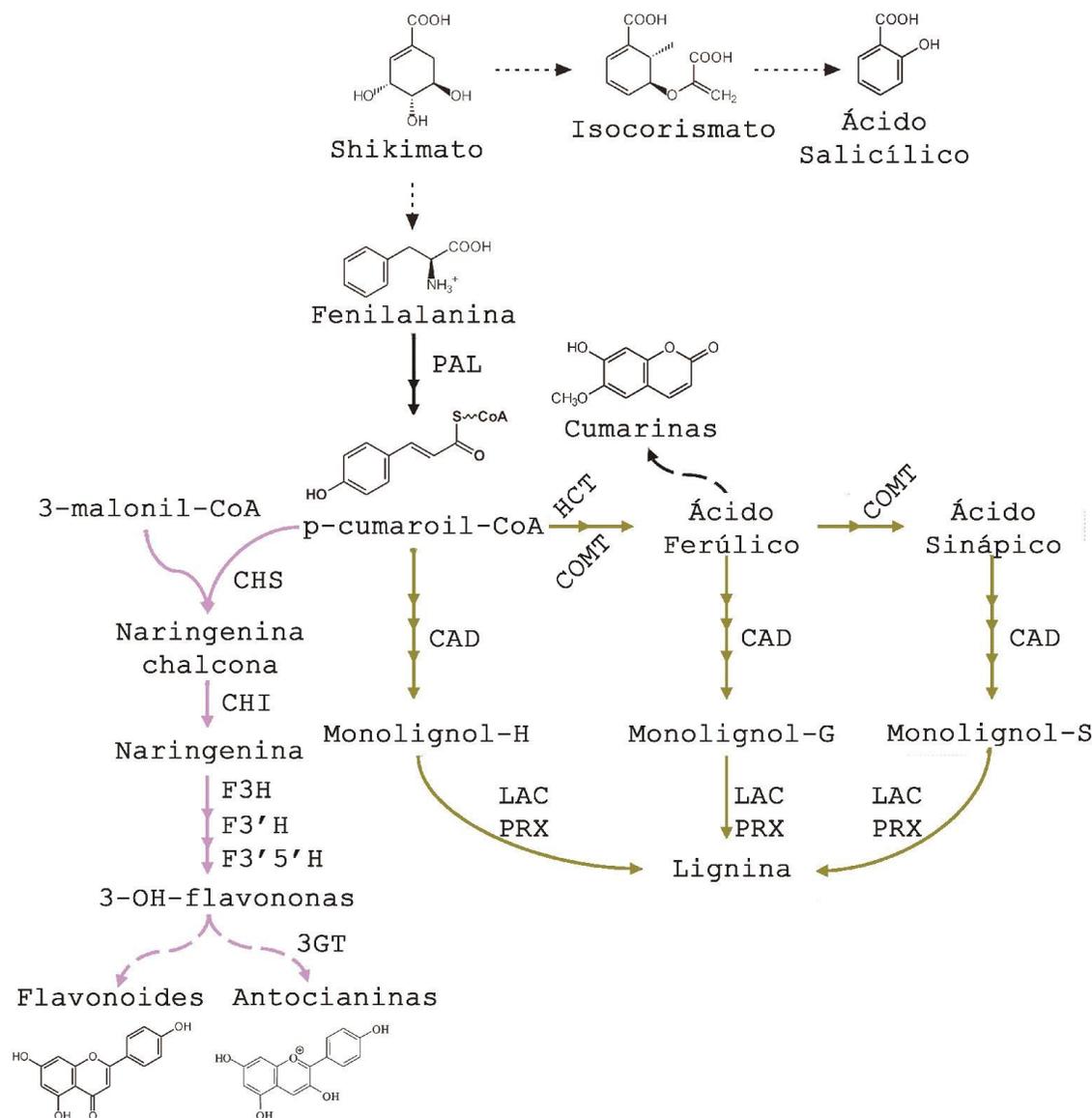


Figura 7.4-21 | Biosíntesis de compuestos fenólicos. Esquema resumido de las principales reacciones y enzimas involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos, tales como flavonoides y antocianinas (representado en verde) y lignina (representado en violeta). PAL, fenilalanina amonio liasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavonol 3-hidroxilasa; F3'H, flavonol 3'-hidroxilasa; 3GT1, antocianidina-3-O-glucosil-transferasa; HCT, hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato transferasa; COMT, cafeico O-metiltransferasa; CAD, cinamoil alcohol deshidrogenasa; LAC, lacasa.

Los flavonoides y las antocianinas constituyen un grupo importante dentro de los metabolitos secundarios en las plantas. Se encuentran implicados en diversas funciones como la protección frente a la radiación UV, la pigmentación de las flores para atraer a los polinizadores, la germinación de la semilla, la resistencia al ataque por microorganismos y

la defensa frente a insectos (Buer y col., 2010; Falcone Ferreyra y col., 2010; Mazza y col., 2000). Además, los flavonoides poseen un amplio rango de actividades bioquímicas y farmacológicas en mamíferos y otros sistemas biológicos, por lo que constituyen un grupo de potenciales agentes terapéuticos (Daglia, 2012).

Numerosos estudios han demostrado que la activación de la biosíntesis de compuestos fenólicos refuerza la respuesta inmune de las plantas. Por ejemplo, en *Nicotiana tabacum* la respuesta de defensa mediada por SA junto con la acumulación de compuestos fenólicos restringe la diseminación del virus ToRSV (del inglés, *tomato ringspot virus*) (Jovel y col., 2011). Asimismo, en cultivares de cítricos resistentes a *Xanthomonas citri* pv. *citri* (calamandin y kumquat), se determinó que durante la inducción de la respuesta de defensa se produce la acumulación de compuestos fenólicos en el sitio de inoculación (Chen y col., 2012).

La expresión diferencial de genes asociados a la biosíntesis de antocianinas como al metabolismo secundario en general, observada en el ensayo de microarreglos en plantas *35S::AtOXR2* (Tabla 7.4-7), así como los resultados obtenidos mediante IRGA (Sección 7.3.3), nos llevaron a evaluar la tolerancia de plantas sobreexpresantes al estrés por alta intensidad lumínica.

7.4.6. Respuesta de plantas *35S::AtOXR2* al estrés por alta intensidad lumínica.

Para determinar la respuesta de plantas *35S::AtOXR2* a la alta intensidad lumínica, decidimos exponer las plantas crecidas en fotoperíodo de día largo a 600 μE de intensidad lumínica durante 3 días. Este ensayo se llevó a cabo con plantas de 6 semanas de edad para el caso de plantas que sobreexpresan *AtOXR2* mientras que para plantas Δoxr2 y WT (WS) se trabajó con plantas de 5 semanas. Siguiendo un razonamiento similar al de las secciones anteriores, se trabajó con el quinto par de hojas de plantas Δoxr2 y WT (WS), y con el sexto par de hojas de plantas *35S::AtOXR2* y sus pares salvajes.

Durante la puesta a punto del estrés por alta intensidad lumínica, detectamos que el mismo causaba un daño menor al trabajar en fotoperíodos de día corto. Sin embargo, la gran mayoría de nuestros resultados fueron generados en fotoperíodos de día largo. Para disminuir este sesgo, decidimos adaptar las plantas al nuevo fotoperíodo 10 días antes comenzar el ensayo.

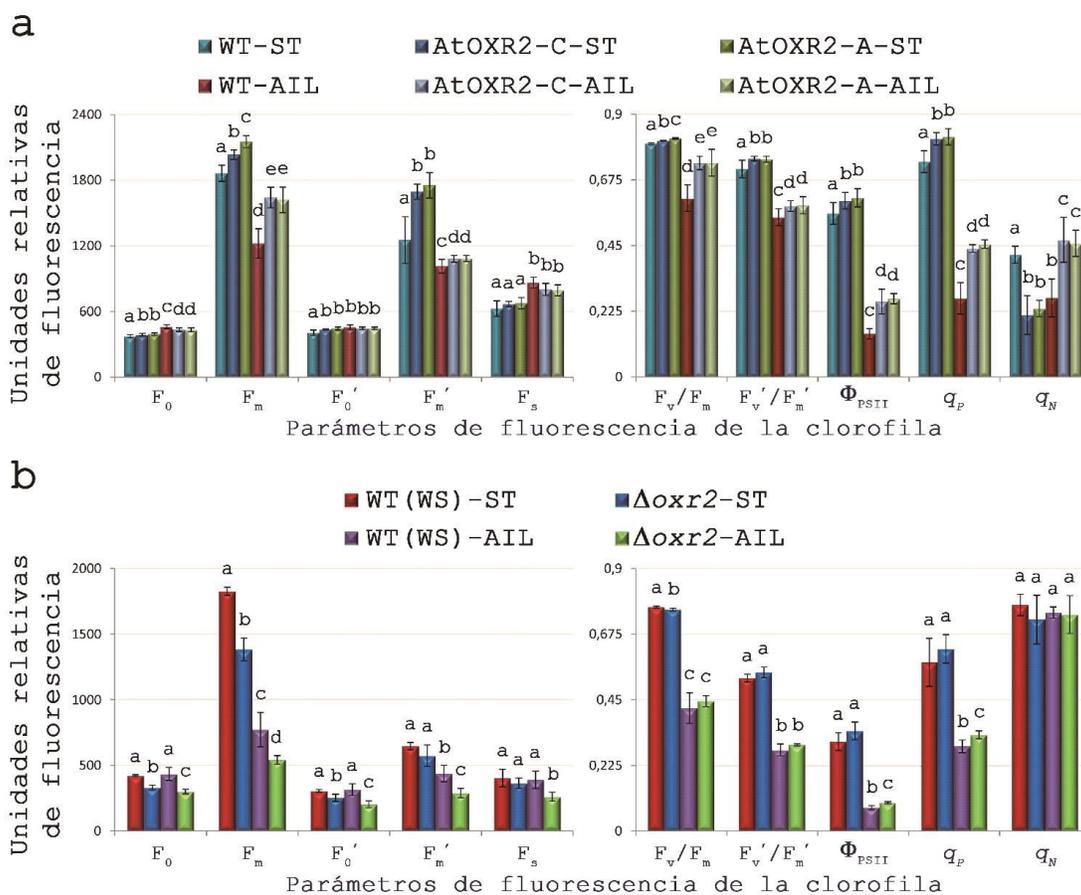


Figura 7.4-22 | Parámetros de fluorescencia de la clorofila en plantas sometidas a estrés por alta intensidad lumínica. a- Parámetros obtenidos para el sexto par de hojas de plantas de 6 semanas, al final del ciclo de luz del tercer día de exposición a 600 μE . b- Indicadores obtenidos para el contraste entre plantas WT(WS) y las mutantes Δoxr2 . En esta comparativa se utilizaron plantas de 5 semanas, y se evaluó el quinto par de hojas. Las barras de error representan la desviación estándar de quintuplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$, dentro de un mismo grupo de indicador. ST, sin tratamiento; AIL, Alta Intensidad Lumínica.

En la figura 7.4-22 a se puede observar el incremento del indicador F_s luego del tratamiento por alta intensidad lumínica (AIL). Cuando el estrés fue aplicado en plantas

WT y *35S::AtOXR2*, se observó un incremento en todos los genotipos. Si bien pareciera existir una tendencia de mayor incremento en plantas WT que en los genotipos que sobreexpresan *AtOXR2*, no existe una diferencia significativa ($p=0,063$). Al inicio del tratamiento, las plantas *35S::AtOXR2* presentaron un valor mayor que sus pares salvajes en el Φ_{PSII} . Este fenómeno podría deberse al pequeño descenso que sufrieron las plantas WT-col en el parámetro F_m' . Esto significa que al comienzo del estrés por AIL, las plantas WT-col presentaron mayor fotoinhibición que las plantas *35S::AtOXR2*, hecho que quedó evidenciado por un mayor valor en q_N . Sin embargo, esta relación se invirtió luego del estrés, donde se observa mayor fotoinhibición en las plantas *35S::AtOXR2*. Esto último acoplado a un mayor q_p y Φ_{PSII} , significaría que las plantas *35S::AtOXR2* tienen la capacidad de captar mayor cantidad de luz, lo que en definitiva significa menor daño en los fotosistemas y mayor cantidad de fotosistemas activos luego del estrés por AIL. En conclusión, las plantas *35S::AtOXR2* captan mayor cantidad de luz, y por este motivo se encuentran más fotoinhibidas que sus pares salvajes, luego de 3 días de estrés por AIL.

En la figura 7.4-22 b se muestran los resultados obtenidos con las plantas mutantes en *AtOXR2*. La exposición a AIL generó cambios distintivos en las propiedades ópticas de las hojas. Estos cambios quedaron evidenciados en el parámetro F_s , que luego del tratamiento es significativamente inferior en plantas $\Delta oxr2$ respecto de las plantas WT (WS). Luego del estrés por AIL se observa un descenso en Φ_{PSII} , así como también en F_v/F_m , F_v'/F_m' , y q_p . Lamentablemente, el cambio en F_s no permite realizar una comparación bajo las mismas condiciones, y los resultados obtenidos para la mutante luego del estrés por AIL deben ser cuidadosamente analizados (Baker, 2008).

Los cambios en las propiedades ópticas se deben en gran medida a cambios en los pigmentos que protegen los fotosistemas. Dentro de los pigmentos más relevantes se pueden citar los carotenos, carotenoides y antocianinas. Es ampliamente conocida la relación que existe entre la AIL y las antocianinas (Das y col., 2011; Misyura y col., 2012; Shi y Xie, 2014). Por este motivo decidimos cuantificar el contenido de antocianinas en las

plantas sometidas al estrés por AIL. La determinación se realizó por el método descrito en la sección 6.2.34. En la figura 7.4-23 se muestran los resultados obtenidos.

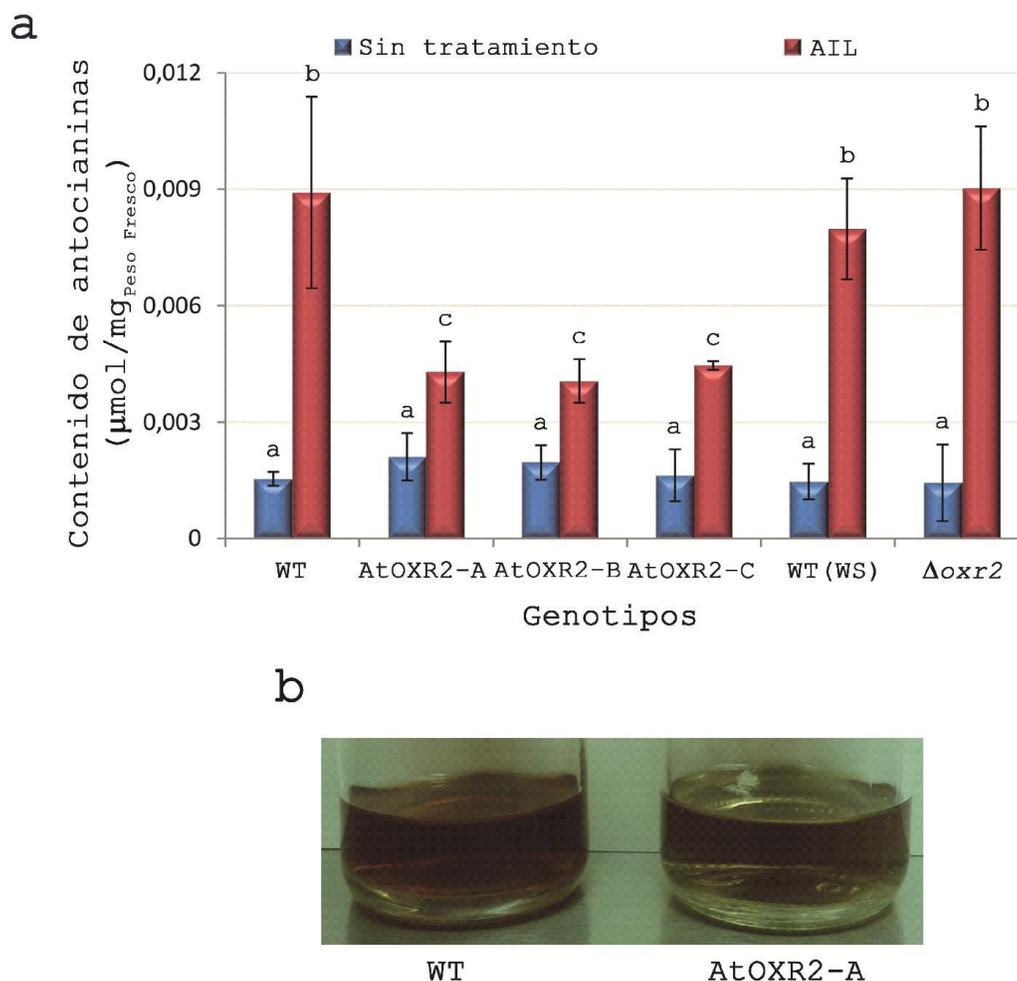


Figura 7.4-23 | Contenido de antocianinas en plantas sin tratar y en plantas sometidas a estrés por AIL. a- Resultados obtenidos para la cuantificación de antocianinas, antes y al final del estrés. Esto es, al final del ciclo de luz del tercer día de exposición a 600 µE. **b-** Foto de las soluciones obtenidas antes de la extracción realizada sobre plantas WT y AtOXR2-A. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$. AIL, Alta Intensidad Lumínica.

La determinación del contenido de antocianinas puso en evidencia lo que ya habíamos detectado previamente con la determinación de parámetros de fluorescencia de la clorofila. Es probable que parte de las diferencias observadas en el parámetro F_s en los distintos genotipos se deba a una tasa de producción de antocianinas diferencial. Es

importante mencionar que en condiciones control, hemos detectado en el ensayo de microarreglos, un patrón distintivo en los genes que se requieren para la síntesis de antocianinas (Tabla 7.4-7). Muchos de los genes involucrados en la síntesis de antocianinas se encontraban reprimidos en plantas *35S::AtOXR2*, en comparación con sus pares salvajes en el ensayo de microarreglos. Además de los genes de biosíntesis de antocianinas, también se detectaron reprimidos en plantas *35S::AtOXR2*, dos genes fundamentales en dicha vía biosintética, como son *PAP1* (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1*, o MYB75) y *PAP2* (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 2*, MYB90) (Ilk y col., 2015). Mientras *PAP1* se encontró 2,76 veces disminuido, *PAP2* disminuyó 3,93 veces en el ensayo de microarreglos.

Es probable que estos genes se mantengan reprimidos durante el estrés por AIL, e incluso que el valor de expresión relativo de otros transcritos relevantes en la síntesis de antocianinas, se expresen diferencialmente durante el estrés. Para corroborar esta hipótesis cuantificamos la expresión de dos genes marcadores de estrés por AIL, como son *PAL* y *CHS*. Además, evaluamos los niveles de expresión de *ASOX* como indicador del ciclo del ascorbato, y por ende del estado redox celular. En la figura 7.4-24 se muestran los resultados obtenidos.

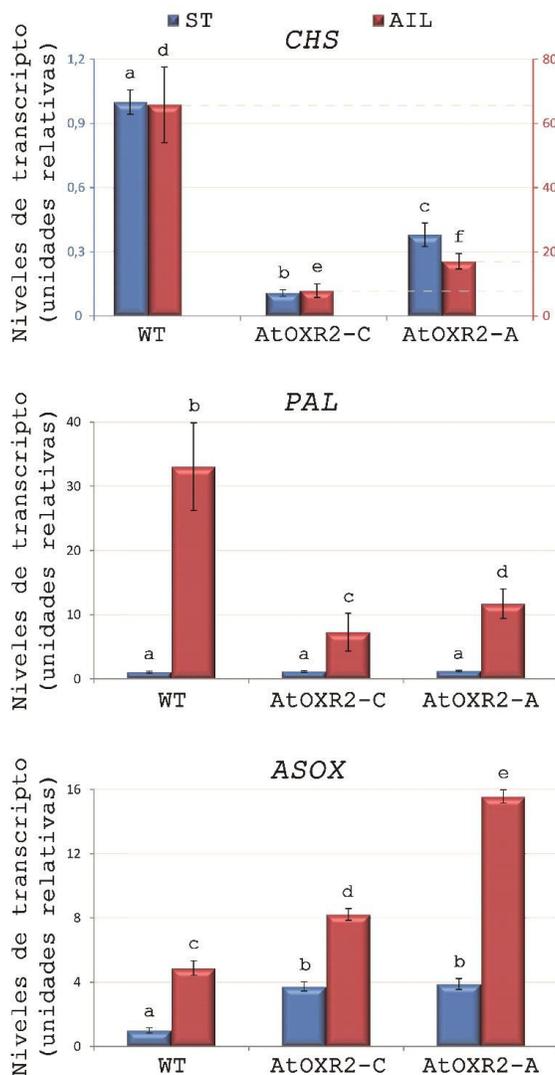


Figura 7.4-24 | Cuantificación de transcritos de genes marcadores de estrés por AIL. Los niveles de transcritos fueron medidos mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan como niveles relativos respecto a las plantas WT en condición ST. Debido al incremento en los valores obtenidos para el transcritos *CHS* en condiciones de estrés por AIL, la gráfica contiene dos ordenadas. En azul, los valores relativos de transcritos obtenidos para la condición ST, y en rojo la escala que facilita la visualización de los valores de *CHS* en estrés por AIL. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos de cada genotipo. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples). ST, Sin Tratamiento; AIL, Alta Intensidad Lumínica.

Los resultados obtenidos para los valores de transcritos indican que las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* perciben de manera diferencial el estrés por AIL. En resumen, los valores de fluorescencia de la clorofila, la menor producción de antocianinas, y los menores valores de *CHS* y *PAL* en comparación con sus pares salvajes, estarían denotando una menor percepción del estrés o un retraso en la respuesta por parte de las plantas *35S::AtOXR2*.

Durante los ensayos de estrés por AIL se realizaron determinaciones de clorofila por espectrofotometría, según el método descrito en la sección 6.2.33 (resultados no presentados). Si bien las diferencias no resultaron ser significativas, puede apreciarse una tendencia a la alta en plantas *35S::AtOXR2*. Acá se podría citar que las diferencias en

muchos de los valores de fluorescencia de clorofila se encuentran en torno al 10%, un valor de error común en las técnicas espectrofotométricas. Esto significa, que si la correlación entre concentración y valores de fluorescencia fueran cercanos a 1, entonces es probable que las diferencias queden enmascaradas por el error de la determinación.

Apoyando la idea de una mayor cantidad de PSII, y por ende de clorofila, están los resultados referidos a PC (plastocianina). A las 24 horas de estrés por AIL detectamos menor cantidad de proteína PC en plantas *35S::AtOXR2* que en sus pares salvajes.

7.4.7. Respuesta de plantas con niveles alterados de *AtOXR2* al estrés biótico.

7.4.7.1. Reprogramación metabólica durante la respuesta inmune en las plantas y rol de las fitohormonas en la respuesta de defensa a patógenos.

Bajo condiciones de estrés biótico se generan cambios en la concentración de las hormonas o la sensibilidad frente a las mismas, lo cual media la activación de un amplio rango de respuestas adaptativas en la planta (Pieterse y col., 2012). Las principales hormonas involucradas en las vías de señalización de respuesta de defensa ante estrés biótico incluyen al SA, y al JA. Sin embargo, estas vías hormonales se encuentran reguladas por otras hormonas tales como, el ABA, el ET y las auxinas. Por lo tanto, la respuesta de una planta no es el resultado de la activación de una única ruta de señalización hormonal, sino que es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. Diferentes estímulos provocan una activación asimétrica de esas redes de señalización complejas y el balance final de las interacciones entre las mismas determinará las respuestas específicas al estímulo inicial con el menor costo energético (Pieterse y col., 2012).

7.4.7.1.1. Señalización dependiente de SA.

El SA juega un rol crucial en la respuesta de defensa, principalmente frente a patógenos biotrofos y hemibiotrofos. Su acumulación es requerida para la inducción de la

PCD tipo HR (PCD-HR) y el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés *systemic acquired resistance*) de la planta luego de la infección de dichos patógenos (Pieterse y col., 2012).

El SA es un compuesto fenólico que se sintetiza a partir del corismato a través de dos vías enzimáticas, una que involucra la enzima PAL y otra la *isocorismato sintasa* (ICS) (Chen y col., 2009; Vlot y col., 2009). La señalización mediada por SA se encuentra controlada por la proteína reguladora NPR1 (del inglés, *non-expressor of PR-1*), y las proteínas adaptadoras NPR3 y NPR4, que regulan su interacción con NPR1 (Fu y Dong, 2013).

Para que se induzca la vía de señalización del SA, la célula vegetal debe sufrir cambios en el estado redox junto con un incremento en la concentración de SA. Estas condiciones promueven la monomerización de NPR1 (Figura 7.4-25 a). Elevadas concentraciones de SA en el sitio de infección favorecen la interacción de NPR1 con NPR3 y la degradación de NPR1 vía proteosoma, lo que conlleva al desarrollo de la ETI y la PCD-HR. Sin embargo, en las células vecinas, niveles intermedios de SA evitan la interacción entre NPR1 y NPR4, provocando una acumulación de NPR1 que interacciona con los factores de transcripción TGAs y promueve la expresión de los genes de respuesta a SA y el desarrollo de la SAR (Figura 7.4-25 a) (Fu y Dong, 2013). Uno de los principales grupos de genes modificados transcripcionalmente por SA es aquel que codifica para las proteínas PRs. Las PRs poseen diferentes actividades biológicas que pueden inhibir el crecimiento, multiplicación y/o dispersión del patógeno. En general, la señalización mediada por SA conduce a la inducción de las proteínas PR-1, PR-2, PR-4 y PR-5, siendo PR-1 uno de los marcadores de respuesta de SA más ampliamente utilizado (van Loon y col., 2006). Además de la inducción de PRs, varios factores de transcripción de la familia WRKY, tales como WRKY18, -53, y -70, entre otros, son inducidos por SA (Figura 7.4-25 a) (Eulgem y Somssich, 2007).

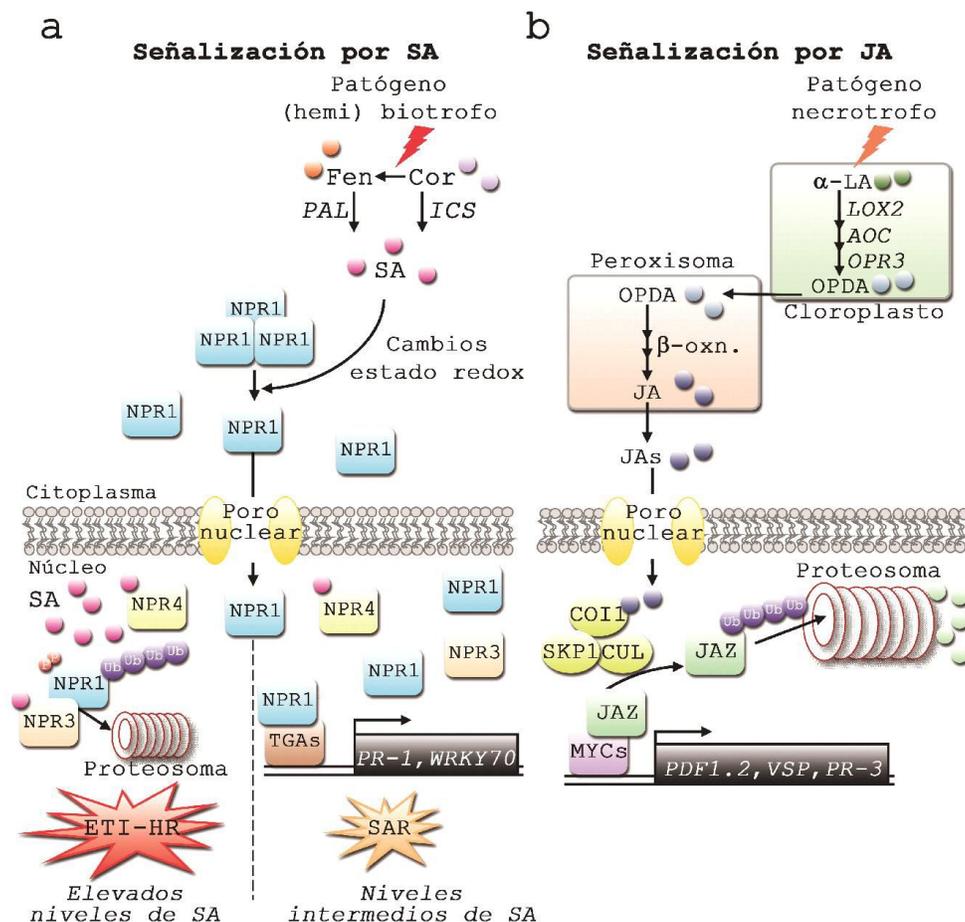


Figura 7.4-25 | Vías hormonales de respuesta de defensa mediadas por SA y JA. **a-** Biosíntesis del SA a través de las vías dependientes de las enzimas PAL e ICS. Los cambios en el estado redox celular, mediados por las ROS, activan NPR1 mediante la reducción de los oligómeros inactivos. Los monómeros activos de NPR1 son traslocados al núcleo; donde, en función de los niveles de SA presente en las células, desencadenarán diferentes respuestas. Elevados niveles de SA favorecen la interacción de NPR1 con NPR3, provocando la degradación por proteasoma de NPR1 y la inducción de la respuesta ETI-HR. Mientras que niveles intermedios de SA evitan la interacción de NPR1 con NPR4 favoreciendo su interacción con los factores de transcripción (TF) TGA. Estos TFs activan los genes de respuesta al SA, como WRKY70 y PR-1, genes conocidos por inducir una SAR. **b-** La biosíntesis de los JAs se produce a partir del ácido graso α -linolénico (α -LA). Los JAs derivados de esta ruta biosintética (JA, JA-Me, JA-Ile, OPDA) interaccionan con el complejo SCF^{COI1} (SKP1, COI1 y CUL), un tipo de ubiquitin ligasa E3, que degrada las proteínas represoras JAZ. Cuando los TFs tipo MYCs no están interaccionando con las proteínas JAZ, pueden inducir la expresión de genes de respuesta a JAs, tales como *PDF1.2*, *VSP* y *PR-3*. Fen, Fenilalanina; Cor, Corimato; β -oxn., β -oxidación; Ub, Ubiquitina; P, fostato. *Esta figura fue modificada de Pieterse y colaboradores (2012) y de Fu y Dong (2013).*

El desarrollo de la SAR requiere de una o más señales móviles a partir del sitio de infección hacia tejidos distales a través del sistema vascular. El análisis de plantas mutantes de *Arabidopsis* defectivas en el gen *DIR1* (del inglés, *defective induced resistance1*), las cuales son incapaces de desarrollar SAR, muestra una conexión entre dos posibles señales móviles: metil salicílico (MeSA, del inglés *methyl salicylate*) y un complejo formado entre la proteína de transferencia de lípidos DIR y glicerolípidos o derivados de lípidos (Liu y col., 2011). Particularmente la síntesis de MeSA ocurre a través de la enzima SA-carboxil-metiltransferasa (SAMT), la cual utiliza los sustratos ácido carboxílico y el grupo metilo de la S-adenosil metionina para adicionar un grupo metilo al salicílico. Luego de transportarse hacia regiones sistémicas, el MeSA se vuelve inefectivo en la inducción de la respuesta de defensa, y en consecuencia requiere de la enzima metil-esterasa SABP2 (del inglés, *salicylic acid binding protein2*) para su conversión nuevamente a SA (Kumar y Klessig, 2003).

7.4.7.1.2. Señalización dependiente de JA.

El JA está involucrado en diversos procesos biológicos y es importante en la respuesta de defensa de la planta frente a herbívoros y patógenos necrótrofos. Los jasmonatos (JAs) conforman un grupo de numerosos compuestos precursores o derivados del JA, que poseen actividad biológica, y por ser derivados de ácidos grasos poliinsaturados forman parte del grupo de las oxilipinas. Asimismo, constituyen el grupo de los octadecanoicos por ser derivados del ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA, del inglés *oxo-phytodienoic acid*). Los JAs más estudiados involucran al JA, metil-jasmonato (JA-Me), jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) y OPDA (Pieterse y col., 2012).

La síntesis de los JAs se inicia en los cloroplastos a partir de la oxigenación enzimática, mediada por la lipooxigenasa 2 (LOX2), del ácido α -linolénico (18:3) (Wasternack y Hause, 2013). Los hidroperóxidos generados por las lipoxigenasas son sustratos de la 13-oxido de aleno sintasa la cual genera óxidos de aleno inestables que son ciclados por la oxido de aleno ciclasa (AOC, del inglés *allene oxide cyclase*) para generar

OPDA, el cual es exportado a los peroxisomas. Este compuesto es reducido por la enzima peroxisomal OPDA reductasa (OPR3, del inglés OPDA reductase3) y posteriormente sufren una serie de β -oxidaciones, lo cual genera en última instancia al JA (Figura 7.4-25 b) (Wasternack y Hause, 2013).

La señalización mediada por JA se encuentra controlada por la proteína reguladora COI1 (del inglés, *coronatine insensitive1*). Junto con las proteínas represoras transcripcionales JAZ (del inglés, *jasmonate zim*), COI1 funciona como receptor de los JAs en el complejo SCF^{COI1} (complejo SKP1-CUL) (Figura 7.4-25 b). En ausencia de los JAs, las proteínas JAZ actúan como represores de los reguladores transcripcionales positivos de la señalización del JA, tales como MYC2, -3 y -4. En respuesta a los JAs, la interacción entre las proteínas JAZ y los activadores transcripcionales se desarma y se induce la transcripción de los genes de respuesta al JA, tales como *PDF1.2* (del inglés, *plant defensin1.2*), *VSP2* (del inglés, *vegetative storage protein2*) y PR-3 (Figura 7.4-25 b) (Derksen y col., 2013).

7.4.7.1.3. Regulación entre las vías del SA y JA.

El estudio de la interacción entre las vías de señalización del SA y JA, en el contexto de la resistencia inducida en plantas, es especialmente relevante para el estudio de las patologías vegetales y en la producción de cultivos sustentables. Las vías de defensa del SA y JA son mutuamente antagonistas, sin embargo, existen evidencias de interacciones sinérgicas entre ambas (Mur y col., 2006). En *Arabidopsis* el tratamiento con bajas concentraciones de JA y SA resulta en un efecto sinérgico en la inducción de los genes de respuesta *PDF1.2* y *PR-1*, respectivamente. Sin embargo, a altas concentraciones los efectos resultan antagónicos, lo cual sugiere que la relación entre ambas hormonas es dependiente de la concentración relativa de las mismas (Mur y col., 2006). Uno de los componentes más importantes de la vía de señalización del SA es el gen *NPR1*. Numerosos estudios han demostrado que *NPR1* y *WRKY70* son los encargados de regular el antagonismo que existe entre las vías del JA y SA. De manera recíproca, la señalización de

JA suprime las vías del SA, sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales ocurre esta regulación todavía son desconocidos (Pieterse y col., 2012).

La regulación entre las vías de señalización del SA y JA permite que se activen una u otra dependiendo de la naturaleza del patógeno y de su modo de patogenicidad, controlando la colonización del microorganismo. Sin embargo, en algunas situaciones, la interconexión positiva o negativa entre estas vías puede ser manipulada por el patógeno y favorecer el desarrollo de la enfermedad (Kazan y Lyons, 2014). En los últimos años, se han encontrado numerosos ejemplos de patógenos de plantas que manipulan las vías de señalización hormonales. Algunos lo hacen a través de la producción de hormonas similares a las del hospedador, otros utilizan factores de virulencia que afectan la biosíntesis o señalización hormonal (Kazan y Lyons, 2014). Por ejemplo, el patógeno necrótrofo *B. cinerea* produce un EPS (exopolisacárido) que actúa como un elicitador de las vías del SA/NPR1, suprimiendo la respuesta de defensa inducida por el JA en el hospedador tomate (El Oirdi y col., 2011). Por otro lado, el patógeno hemibiotrofo *P. syringae*, utiliza varios efectores tipo III, como HopI1, que se localizan en el cloroplasto y suprimen la biosíntesis del SA favoreciendo su colonización (Colombatti y col., 2014).

7.4.7.1.4. Moduladores de las hormonas SA y JA.

Varias hormonas, principalmente el ABA, el ET y las auxinas interactúan de manera sinérgica o antagónica con las vías de señalización SA-JA. El ABA es un regulador negativo y positivo de las vías de señalización dependientes del SA y JA, respectivamente. Se ha demostrado que la regulación negativa del ABA ocurre tanto sobre las vías de biosíntesis como de señalización del SA (Yasuda y col., 2008). Por el contrario, cuando el ABA se produce en combinación con el JA, por ejemplo en respuesta a herbívoros, actúa de manera sinérgica favoreciendo la expresión de los genes de respuesta al JA (Abe y col., 2003).

El ABA es la principal hormona involucrada en la compleja red de señalización que induce el cierre estomático (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). Melotto y col. (2006)

demonstraron que la señalización mediada por el ABA se induce en las primeras fases de la PTI, provocando el cierre de los estomas de *Arabidopsis* entre 1 y 2 h luego del reconocimiento de la bacteria *P. syringae*, impidiendo de esta manera su entrada. Sin embargo, la bacteria es capaz modular la reapertura de los estomas a través de la secreción de una toxina policétida. Análoga al JA, esta toxina conocida como coronatina (COR) inhibe la señalización mediada por SA y reprime la señalización mediada por ABA (Melotto y col., 2008; Melotto y col., 2006b). Recientemente, se ha demostrado que al menos dos efectores de *P. syringae*, (HopM1 y HopF2A), también estarían involucrados en este mecanismo de supresión del cierre estomático (Hurley y col., 2014; Lozano-Durán y col., 2014).

Por otro lado, el ET es una hormona gaseosa importante en la respuesta de defensa. El ET se sintetiza a partir de los precursores 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) y S-adenosil-metionina, e involucra las enzimas ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO) (Pieterse y col., 2012). Numerosos estudios han demostrado que el ET puede favorecer tanto las vías dependientes de SA como JA. Por ejemplo, en la respuesta a herbívoros en *Arabidopsis*, el ET potencia la expresión de *PR-1* y en tabaco es esencial para el desarrollo de SAR (De Vos y col., 2006). Además, se ha demostrado que los niveles elevados de ET modulan el antagonismo entre las vías del SA-JA independientemente de NPR1 (Leon-Reyes y col., 2009). Por otro lado, la interacción sinérgica entre el ET y el JA es necesaria durante el desarrollo de la respuesta a hongos necrotrofos, la cual favorece la inducción de los genes tales como *PDF1.2* (Zarei y col., 2011).

Las auxinas o IAA (del inglés, *indole-3-acetic acid*) son importantes en cada uno de los estadios de desarrollo de las plantas. Las auxinas se transportan de forma polar a los diferentes órganos, lo cual es mediado por dos familias de transportadores PIN y ABCB (Petrasek y col., 2006). La señalización mediada por auxinas depende principalmente de la familia de receptores TIR1/AFB (del inglés, *transport inhibitor response1/auxin signalling F-box*) y de las proteínas reguladoras negativas Aux/IAA (del inglés, *auxin/indole-3-acetic acid*). Estas proteínas junto con otras (ASK, CUL1, RBX) conforman el complejo de ligasa E3 (SCF^{TIR1}) que regula la señalización dependiente de auxinas. A bajos niveles de la hormona,

el regulador negativo Aux/IAA junto con el co-represor TPL (del inglés, *topless*) se unen al ADN y reprimen a los factores de transcripción regulados por auxinas (ARFs, del inglés *auxin responsive factors*) (Figura 7.4-26). Cuando los niveles de auxinas aumentan, ocurre la formación del complejo (TIR1/AFB)-auxinas-(Aux/IAA) el cual determina la ubiquitinización de Aux/IAA y la degradación por el proteosoma, permitiendo la expresión de los ARFs (Figura 7.4-25) (Ljung, 2013).

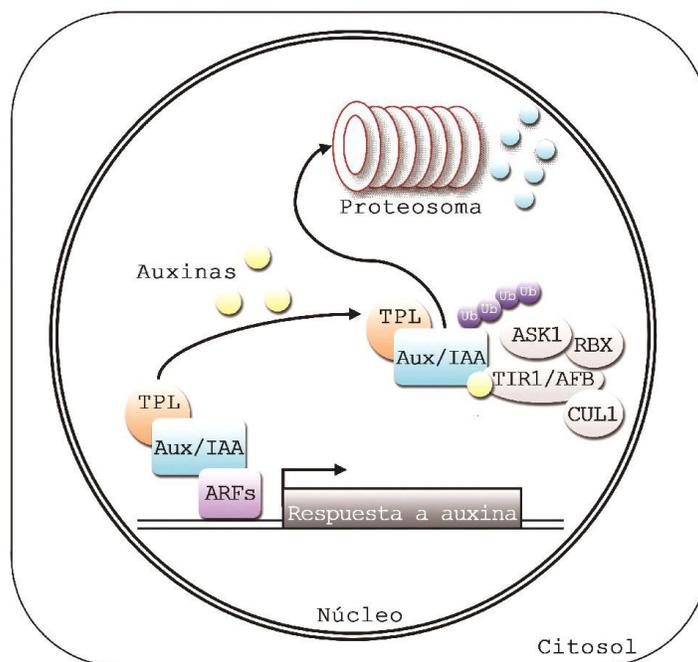


Figura 7.4-26 | Vía de respuesta de defensa mediada por auxinas. En el núcleo, las proteínas Aux/IAA interactúan con las proteínas TPL evitando que los ARFs inicien la transcripción. Cuando los niveles de auxina aumentan, la unión de la hormona a sus receptores TIR1/AFB induce la formación del complejo SCF^{TIR1} (TIR1/AFB, ASK1, CUL1 y RBX), provocando la ubiquitinización. Esta señal promueve la posterior degradación por proteosoma de Aux/IAA favoreciendo la expresión de los genes de respuesta a auxina.

Se ha demostrado que la señalización de auxinas suprime los niveles de SA. Esta interacción es aprovechada por ciertos patógenos hemibiotrofos, tales como *P. syringae* y *X. citri*, los cuales inducen las vías de señalización de auxinas para suprimir al SA y aumentar la susceptibilidad del hospedador (Cernadas y Benedetti, 2009; Chen y col., 2007). Asimismo, Cernadas y Benedetti (2009) demostraron que las auxinas inducen la expresión de las enzimas de mantenimiento de la pared celular, tales como EXP y XTH, favoreciendo la colonización de *X. citri* en *C. sinensis*. Otros estudios han demostrado que

diversos microorganismos pueden producir auxinas y manipular la señalización de las plantas interfiriendo con los procesos normales de desarrollo (Kazan y Manners, 2009).

7.4.7.2. Cuantificación del contenido de hormonas SA y Auxinas en plantas que presentan niveles alterados de *AtOXR2*.

Los resultados obtenidos con el ensayo de microarreglos nos llevaron a pensar en la posibilidad de que las plantas con niveles alterados de *AtOXR2* podrían tener niveles alterados de SA, y; como se desarrolló previamente (sección 7.4.7.1.4.), esto podría llevar a un desbalance de Auxinas. Para corroborar nuestra hipótesis realizamos determinaciones de hormonas por espectrometría de masas, tanto en tejido aéreo, como en semillas de plantas *35S::AtOXR2* y de plantas $\Delta oxr2$. Se utilizó el mismo material vegetal con el que se realizaron las determinaciones de ABA (sección 7.4.4.4., Figura 7.4-20).

De acuerdo con lo observado en el ensayo de microarreglos, las plantas *35S::AtOXR2* no sólo tienen los marcadores moleculares de estrés biótico inducidos (proteínas PRs, HSP y pared celular, entre otros) sino que esto viene de la mano de mayor cantidad de ácido salicílico (Figura 7.4-27).

Por otro lado, también se determinó la concentración de ácido indol-3-acético. Consistente con lo observado para SA, las plantas *35S::AtOXR2* tienen niveles de auxinas menores a los de sus pares salvajes (Figura 7.4-27 a vs. d). Si bien pareciera existir una tendencia en las plantas mutantes, con una concentración menor que sus pares salvajes, los grupos no se terminan de separar estadísticamente. Finalmente, cuando se determinaron los niveles de auxinas en las semillas, se encontró una diferencia entre las plantas WT (WS) y las plantas $\Delta oxr2$ (Figura 7.4-27). Estos resultados, sumados al patrón de expresión mostrados en la figura 7.2-14 sugieren un rol para la proteína *AtOXR2* en la biosíntesis de auxinas en las semillas.

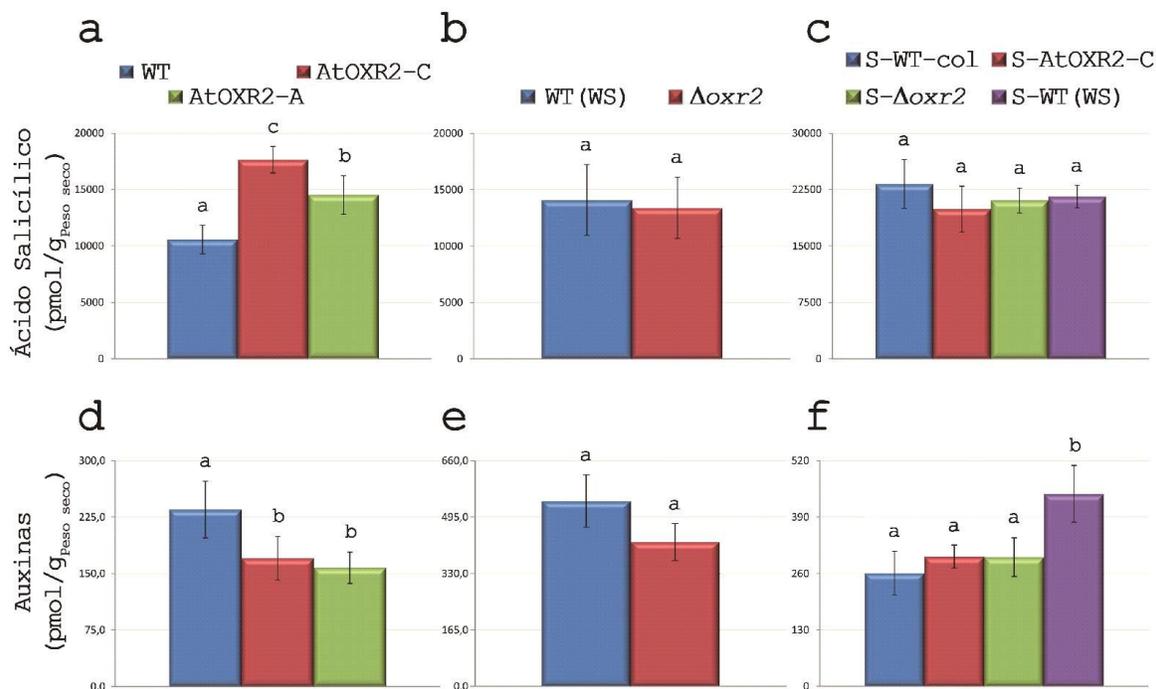


Figura 7.4-27 | Resultados de concentración de SA y auxinas en plantas con niveles alterados de *AtOXR2*. **a, b, c-** Concentración de SA en plantas: **a-** 35S::*AtOXR2* y WT-col; **b-** $\Delta oxr2$ y WT(WS), y **c-** en semillas de los mismos genotipos. **d, e, f-** Resultados obtenidos para concentración de Auxinas en los mismos tejidos que **a, b y c**. Las barras de error representan la desviación estándar de quintuplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

7.4.7.3. Estudios de la interacción 35S::*AtOXR2* / *Pseudomonas syringae* pv. tomato pst. DC3000.

Los resultados observados en el ensayo de microarreglos, acoplados a las determinaciones de hormonas realizadas, nos llevaron a evaluar los niveles de marcadores de estrés biótico. Para esto seleccionamos tres transcritos codificantes para proteínas PR: *PR-1*, *PR-3* y *PR-5*. *PR-1* y *PR-5* son marcadores de estrés biótico cuya inducción está mediada por SA, es decir que se inducen frente a patógenos hemibiotrofos (Figura 7.4-28 a). Por otro lado, *PR-3* se induce fuertemente en presencia de patógenos necrotrofos, y es uno de los genes que se inducen frente a JAs (Figura 7.4-28 b). Como se mencionó previamente, en general cuando se inducen los marcadores de SA, disminuyen los de JAs y viceversa.

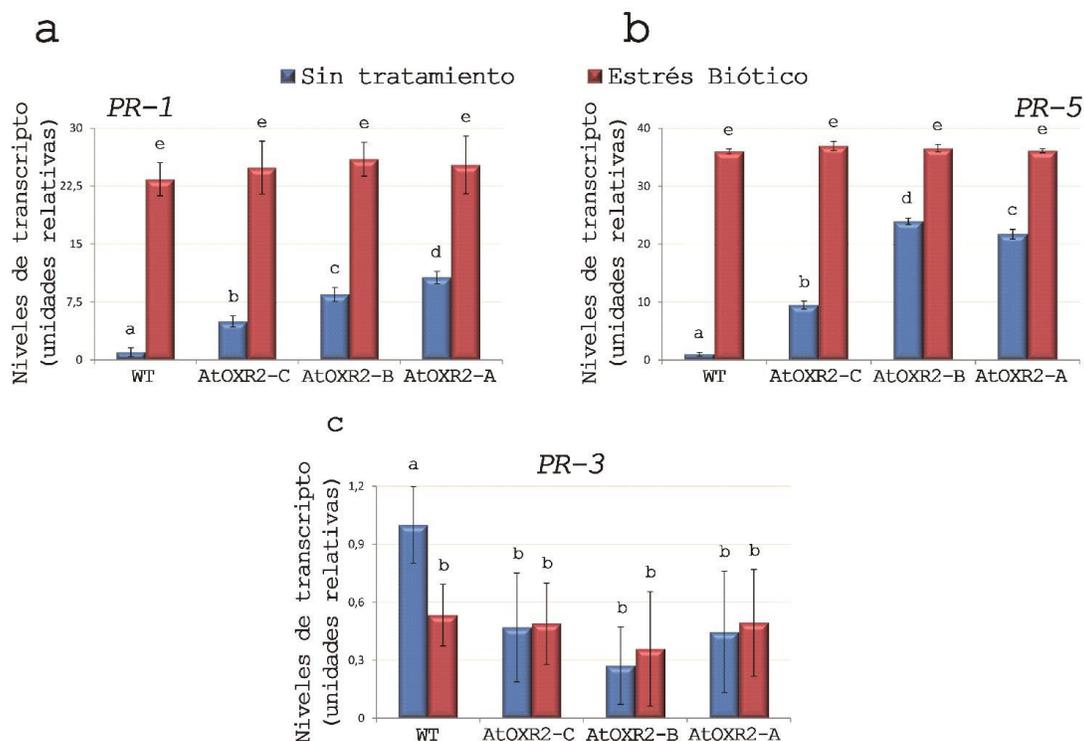


Figura 7.4-28 | Niveles de transcripción de marcadores de estrés biótico a las 24 horas post infección con la cepa virulenta de *P. syringae*. a- Niveles de transcripción de *PR-1* en hojas infectadas y sin tratamiento de plantas *35S::AtOXR2*. b- Niveles transcripcionales de *PR-5* en hojas infectadas de plantas que sobreexpresan *AtOXR2*. c- Niveles relativos de transcripción *PR-3*. En todos los casos se tomó a la WT en condiciones control como valor de 1. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Por otra parte, el hecho de haber detectado mayor cantidad de ROS, podría estar protegiendo a las plantas *35S::AtOXR2* frente a distintos patógenos. Una forma de determinar la respuesta de las plantas a un estrés biótico es mediante la infección y la posterior recuperación del patógeno. De esta forma, es fácil visualizar cuán apto es el patógeno para sobrevivir en el huésped. Para evaluar esta situación decidimos infectar plantas *35S::AtOXR2* con una dosis de $1,6-1,8 \cdot 10^4$ UFC. A las 24 horas luego de la infección con la cepa virulenta medimos los marcadores *PR-1*, *PR-3* y *PR-5*. Encontramos que las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* ya tenían incrementados los niveles de *PR-1* y *PR-5* respecto a sus pares salvajes, mientras que tenían disminuidos los niveles de *PR-3* (Figura 7.4-28). Además, realizamos un recuento de UFC de las cepas virulentas y avirulentas de *P. syringae* a las 72 horas posteriores a la infección (en agar King's B). La recuperación arrojó

resultados aproximadamente cuatro veces menores para *35S::AtOXR2* que para WT para la versión avirulenta de la cepa pst DC 3000. Sin embargo, cuando se recuperó la cepa virulenta, las plantas *35S::AtOXR2* demostraron una mayor performance contra el huésped (Figura 7.4-29).

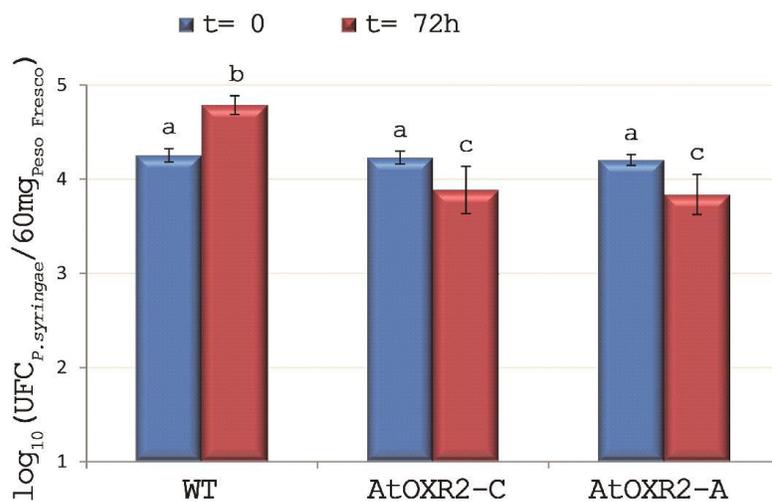


Figura 7.4-29 | Resultados obtenidos del recuento de *P. syringae* a las 72 h posteriores a la infección. Se realizó recuento de *P. syringae* en agar King's B, inmediatamente después de la infección, y a las 72 horas posteriores. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD post-hoc. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Es evidente que en las plantas *35S::AtOXR2* se ponen en juego distintos mecanismos que hacen que al tercer día de infección la carga bacteriana sea un orden menor. Es posible que esto sea consecuencia de montar una respuesta más rápida contra el patógeno, hecho que queda evidenciado en los niveles transcripcionales incrementados de *PR-1*, *PR-5* y disminuidos de *PR-3* en las plantas *35S::AtOXR2*. Si bien, para el caso exclusivo de los transcriptos evaluados en la figura 7.4-28, a las 24 horas parecieran equipararse los distintos genotipos, está claro que existen una multiplicidad de otros transcriptos que aquí no han sido evaluados. Algunos de estos transcriptos podrían requerir la presencia de algunos que ya se encuentran inducidos en las plantas *35S::AtOXR2*.

Para estudiar si la velocidad en la respuesta podía ser uno de los causantes de la mayor tolerancia a los patógenos en plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, decidimos evaluar la respuesta frente a SA. Para esto, tomamos plántulas de 15 días de edad, y las incubamos en una solución de SA 0,5 mM. Transcurridos 15, 30 y 120 minutos de incubación, se cosecharon las plántulas completas y se les realizó extracción de ARN.

Luego de una transcripción reversa se determinaron los niveles de *WRKY70*. De esta manera, demostramos que las plantas *35S::AtOXR2* presentan una respuesta aguda de corto tiempo, similar a un pulso, mientras que las plantas WT parecerían necesitar más tiempo para alcanzar el máximo. Esto hace suponer que las plantas WT requieren más tiempo para orquestar la misma respuesta que las plantas *35S::AtOXR2*. Se podría interpretar que las plantas WT también tienen una respuesta pulsante con amplitud similar, sólo que el pulso de *WRKY70* en este caso tiene un periodo más amplio que las plantas *35S::AtOXR2*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.4-30.

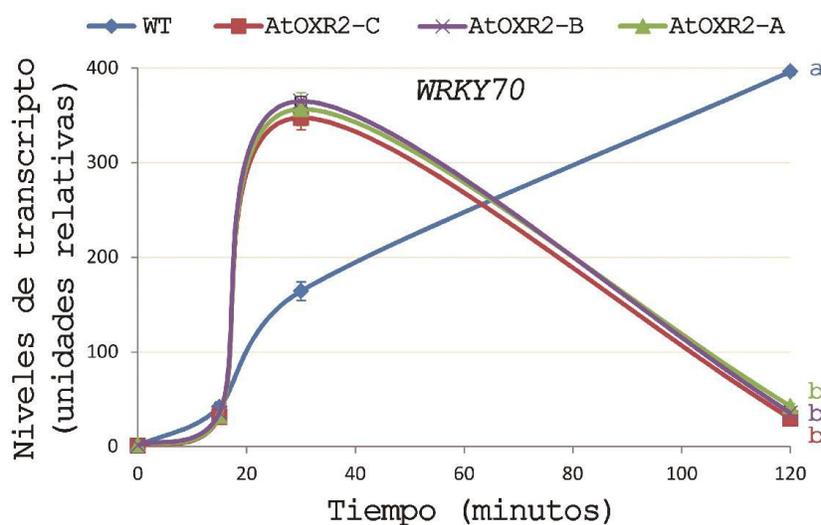


Figura 7.4-30 | Niveles del transcripción *WRKY70* en plantas de 15 días de edad incubadas en SA 0,5 mM. Se tomó el valor de WT a tiempo 0 como la unidad de referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Las curvas con diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples).

Como consecuencia del espacio experimental estudiado (4 puntos en 2 horas) pareciera que las plantas *35S::AtOXR2* disminuyen lentamente sus niveles de *WRKY70* entre los 30 minutos y las 2 horas. Sin embargo, es probable que niveles similares a los determinados a los 120 minutos, de hecho se alcancen en tiempos anteriores. De la misma manera, para observar el comportamiento completo de las plantas WT es probable que tengamos que estudiar tiempos posteriores a las 4 horas.

7.4.8. Conclusiones.

Los resultados del ensayo de microarreglos demuestran que las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* tienen un perfil transcripcional similar al de una planta que responde a estrés. Probablemente, el hecho de tener tantos niveles aumentados de los transcritos para proteínas del tipo PR, altere en mayor magnitud la respuesta de plantas *35S::AtOXR2* frente al estrés biótico que frente al abiótico. Las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* tienen mayor contenido de ROS a la sexta semana de crecimiento. El incremento en las ROS no sólo ha demostrado ser inocuo para las plantas *35S::AtOXR2*, sino que de acuerdo con nuestra hipótesis, las ROS serían en parte responsables de las características fenotípicas particulares observadas en las plantas *35S::AtOXR2*.

Es probable que parte de la producción/detoxificación diferencial de ROS, podría deberse al aumento de las enzimas PRXs como productoras de ROS y; entre otras, a ASOX como extintor de antioxidantes. En este sentido, nuestra hipótesis se ve reforzada, ya que en el ensayo de microarreglos observamos una modificación en la vía del metabolismo secundario. Concretamente vemos transcritos fuertemente disminuidos de genes involucrados en la producción de monolignoles, uno de los sustratos de las PRXs. Así, es difícil pensar que las PRXs estarían actuando como formadoras de pared celular, y en ese caso sólo resta pensar que su rol sería el de aportar ROS al apoplasto. En línea con la idea de una pared celular menos lignificada, y por lo tanto más flexible y más permisiva a la expansión, encontramos células con entre el 10% al 16% de incremento en el tamaño celular. En conjunto, todo esto estaría contribuyendo con el incremento en el área foliar.

Además de las modificaciones realizadas a la pared celular por parte de las PRXs, el ensayo de microarreglos dejó en evidencia alteraciones en transcritos de *EXPs* y *XTHs*, cuyos productos son relevantes a la hora de regular la homeostasis de la pared celular. Es así como las plantas *35S::AtOXR2* tendrían PRXs, EXPs y XTHs expresadas diferencialmente, algo que suele ocurrir cuando existen alteraciones de auxinas. Los niveles de auxinas en plantas que sobreexpresan *AtOXR2* se encuentran disminuidos a la sexta semana. Es posible que esto sea consecuencia de los valores aumentados de SA, lo

cual fuerza a la disminución de auxinas. Finalmente, las variaciones de auxinas, podrían estar colaborando con el fenotipo de mayor tamaño en plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, ya que su rol como moduladoras del crecimiento y desarrollo está ampliamente reportado en la bibliografía.

Finalmente, respecto a las alteraciones en la pared celular, es importante mencionar, que resultados que no presentados en esta tesis (comunicación personal Dra. Malena Álvarez) han demostrado que las plantas *35S::AtOXR2* son más susceptibles a patógenos necrotrofos como *Botrytis cinerea*. Esto sugeriría, que la pared celular de estas plantas es más fácil de degradar por estos patógenos, algo que es posible si existen menos depósitos de lignina, callosa, o ambos compuestos en la pared.

El metabolismo de la pared celular está íntimamente ligado al metabolismo secundario, y a su vez, estas rutas metabólicas convergen en precursores para la síntesis de algunas fitohormonas, como ABA y SA. Por este motivo, decidimos evaluar qué ocurría con plantas *35S::AtOXR2* en relación a estas hormonas. Para el caso del ABA, demostramos que las plantas *35S::AtOXR2* retienen el agua con mayor avidéz que sus pares salvajes. Esto, podría deberse, en parte, al cierre estomática acelerado que presentan las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* cuando se las expone al efecto del ABA. El ABA también ejerce su influencia sobre el proceso germinativo. Sin embargo, las semillas de plantas *35S::AtOXR2* demostraron tener mayor tolerancia a la prolongación de la dormancia por parte de la fitohormona. Como se demostró en la figura 7.4-20, las semillas de las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* tienen mayor contenido de ABA que sus pares salvajes. Todo esto, estaría apuntando en la dirección de un fenotipo de insensibilidad al ABA en las semillas. A nivel de las rosetas, el fenotipo es más complejo. Ya que si bien son más sensibles, el genotipo de mayor expresión, *AtOXR2-A* también ya cuenta con mayor contenido de ABA basal. Quizás este pequeño incremento se parte de la causa de la mayor sensibilidad al ABA. La diferencia en sensibilidades de plantas *35S::AtOXR2* frente al ABA en distintos estadios, podría deberse a su característico perfil transcripcional (*NCED* disminuidas, y transcriptos involucrados en mirceno, entre otros), así como también a las diferencias que existen entre los procesos en los que se estudió la

sensibilidad (germinación vs. cierre estomático). En cuanto a la germinación, podemos mencionar que *AtOXR2* es un transcripto que podría tener un rol en este proceso, ya que existen datos de variación de expresión de *AtOXR2* en semillas en las bases de datos (ver figuras 7.2-14 y 7.2-15). Esto significa que las proteínas *AtOXR2* podrían encontrarse con sus proteínas interactoras en las semillas, donde cumplen su rol naturalmente. Sin embargo, en hojas, los transcriptos de *AtOXR2* son muy pequeños, y quizás, no encuentren a todas sus proteínas interactoras, desencadenando la respuesta diferencial.

Los cambios en el metabolismo secundario, podrían estar produciendo cantidades diferenciales de pigmentos. Las antocianinas y otros pigmentos como los β -carotenos sirven como fotoprotectores. Si bien no detectamos diferencias en condiciones control en el contenido de antocianinas, luego de un estrés quedaron en evidencia las variaciones detectadas en el ensayo de microarreglos. Las plantas *35S::AtOXR2* no sólo presentan mejor *performance* fotosintética en condiciones normales de crecimiento, sino también bajo estrés por alta intensidad lumínica. Sin embargo, cuando las plantas se adaptaron a un fotoperiodo de día corto, se produjo un cambio fundamental en las plantas *35S::AtOXR2*, y es que las mismas disminuyen su q_N . Esto significa que en este nuevo régimen lumínico el mecanismo que utilizan las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* para aprovechar mejor la luz, es desviar la mayor cantidad del flujo energético hacia la fotosíntesis, disipando así, menos energía como calor. Captación mejorada de la energía, mediante la desviación enfocada hacia los procesos fotosintéticos es la reacción que tiene la planta, incluso frente a altas intensidades lumínicas. Además, esta idea se ve reforzada con la menor cantidad de producción de antocianinas, lo cual se justifica por menores niveles de *PAL* y *CHS*. Por otro lado, los elevados niveles de *ASOX* se sostienen en plantas *35S::AtOXR2* durante el estrés por AIL. Todo apunta a mantener el apoplasto con mayor de ROS en este compartimento extracelular.

Si bien no hemos podido determinar cómo las plantas *35S::AtOXR2* sostienen un ritmo fotosintético elevado bajo condiciones de estrés por AIL; es probable que el estado redox celular esté condicionando parte de esta respuesta, así como también la mayor asimilación de CO_2 (Figura 7.3-18). La mayor cantidad de ascorbato, junto con la mayor

disponibilidad de CO₂, disminuiría el daño por parte de las ROS así como también aportaría el aceptor final de electrones, respectivamente. En conjunto, esto impediría que la mayor cantidad de electrones captados dañe el cloroplasto. En tal caso, no hemos obtenido evidencia que permita explicar cuál es el fenómeno por el cual estas plantas pueden fijar CO₂ con mayor eficiencia.

Si bien demostramos que las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* responden de mejor forma al estrés por AIL y germinan mejor en condiciones que aumentan la concentración de ABA, condiciones de estrés abiótico; la figura 7.4-6 mostraba que estas plantas tenían marcadores de estrés biótico inducidos. En este sentido, no sólo detectamos transcritos incrementados de *PR-1* y *PR-5*, sino que también detectamos transcritos disminuidos de *PR-3*. Transcritos que están de acuerdo con el incremento en SA. A su vez, el alza en SA, justificaría la disminución en las auxinas detectadas en plantas de 6 semanas. Además, cuando realizamos el desafío de plantas *35S::AtOXR2* recuperamos menor cantidad de *P. syringae* cuando la cepa es virulenta, a las 72 horas posteriores a la infección. A su vez, cuando evaluamos los tiempos en los que responden plantas que sobreexpresan *AtOXR2* al SA, observamos que estas reaccionan más rápido que sus pares salvajes. De esta manera, podemos concluir que las plantas *35S::AtOXR2* estarían montando una respuesta con mayor velocidad que las plantas WT. Esta reprogramación acelerada le estaría confiriendo una ventaja a las plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, y dicha ventaja queda evidenciada en una eliminación más rápida del patógeno virulento.

8. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

En el presente trabajo de Tesis nos propusimos identificar y caracterizar los genes pertenecientes a la familia OXR de *Arabidopsis thaliana* y estudiar el papel de las proteínas AtOXR en la respuesta a estrés oxidativo.

Por tratarse de una nueva línea de trabajo en el laboratorio, comenzamos el estudio con la identificación de los miembros pertenecientes a esta familia a los que nombramos: *AtOXR1*, *AtOXR2*, *AtOXR4* y *AtOXR5*. Sin embargo, los objetivos propuestos para este trabajo de tesis abarcaron sólo el estudio de los dos genes *AtOXR2* y *AtOXR4* que presentaron una mayor identidad de secuencia con los genes *hOXR1* y *ScOxr1*, que fueron los primeros identificados y sobre los que se contaba con mayor información (Capítulo 7.1).

Los estudios de localización subcelular en plantas de *Arabidopsis* demostraron que *AtOXR2*, y *AtOXR4* tienen una clara localización mitocondrial en plantas crecidas en condiciones normales. A su vez, las proteínas quiméricas *AtOXR24*, *AtOXR42* también se localizan en mitocondrias de células de raíz de plantas de *Arabidopsis* transformadas en forma estable (Capítulo 7.2).

Observamos que las proteínas *AtOXR2* y *AtOXR4* tienen un efecto protector, o son capaces de reparar el daño oxidativo del ADN producido en una cepa de bacteria mutante con defectos del crecimiento. Además, cuando se complementaron levaduras mutantes en el gen *ScOxr1* observamos una reversión en el fenotipo de sensibilidad al estrés oxidativo. Estos resultados sugieren que las proteínas *AtOXR2* y *AtOXR4* podrían cumplir un rol en la reparación del ADN o en su protección contra el daño oxidativo, tal como se ha sugerido previamente para sus homólogos en levaduras y humanos. Los resultados obtenidos en bacterias y levaduras sugieren que *AtOXR2* y *AtOXR4* podrían participar en la respuesta al estrés oxidativo en plantas (Capítulo 7.1).

El estudio de las regiones promotoras de los genes codificantes para *AtOXR2* y *AtOXR4* reveló un perfil de expresión similar en plantas de *Arabidopsis* transformadas de

manera estable. Ambos promotores dirigen la expresión en plantas recién germinadas principalmente en meristemas; posteriormente en cotiledones, luego en el primer par de hojas, y conforme pasa el tiempo la expresión disminuye. Cuando la planta florece, ambos promotores reactivan la expresión, la cual se incrementa hasta llegar a polen maduro. Estos datos se condicen con lo publicado en la base de datos de la página web de *Bio-Analytic Resource (BAR) for Plant Biology* (Capítulo 7.2).

La expresión de *AtOXR2* y de *AtOXR4* se incrementa ante distintas condiciones de estrés, tanto cuando la expresión se evaluó mediante actividad GUS como mediante RT-qPCR en tiempo real. Para el caso de *AtOXR2* observamos inducción, tanto del transcripto como del gen reportero, en condiciones que producen ROS como luz prolongada, calor, U.V. y 3-AT. Para el caso de *AtOXR4* observamos un incremento en los niveles de expresión tanto en el gen reportero como en los niveles de transcripto en presencia de SA. Los resultados de expresión así como de inducción diferencial para ambos genes, enfatizan en una posible especialización en la función para las proteínas *AtOXR2* y *AtOXR4* (Capítulo 7.2).

Las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* tienen una estructura radicular más compleja, mientras que plantas deficientes en dicho gen mostraron el fenotipo opuesto. En condiciones de estrés severo, las plantas *35S::AtOXR2* desarrollan una raíz principal de mayor longitud (Capítulo 7.3).

Las diferencias de tiempo en el pasaje al estadio reproductivo en plantas con niveles alterados de *AtOXR2* podrían explicar las diferencias en el desarrollo foliar. Así, estas plantas tienen mayor tiempo para invertir la energía capturada en el desarrollo foliar; mientras que una vez que realizaron el cambio metabólico a la etapa reproductiva, cuentan con una maquinaria capaz de captar más cantidad de energía lumínica. Parte del incremento en la lámina foliar se debe a un aumento en el tamaño celular, mientras que el resto se corresponde con un aumento en el número de células. Este último proceso, podría ser la consecuencia de iniciar el arresto celular a tiempos posteriores. En la misma dirección, encontramos que el patrón de áreas foliares es similar en plantas *35S::AtOXR2* y

en plantas salvajes. Además, es probable que tengan una pared celular menos rígida, lo cual les permitiría a estas plantas crecer más (Capítulo 7.3).

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila indican que las plantas *35S::AtOXR2* son más eficientes en el uso de luz capturada. Esta característica se ve acompañada de una tasa de transporte de electrones incrementada, posiblemente por una capacidad de restauración del estado redox aumentada. En coincidencia, los resultados de intercambio gaseoso de plantas *35S::AtOXR2* demuestran que estas plantas son capaces de fijar más CO₂ que sus pares salvajes (Capítulo 7.3).

Las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* retienen el agua con mayor avidez, mientras que las plantas $\Delta oxr2$ muestran el comportamiento contrario. Estas diferencias serían consecuencia de un cierre estomático acelerado en plantas *35S::AtOXR2*.

Todas estas características, mayor fijación de CO₂, mayor tasa de transferencia de electrones y mayor lámina foliar, dan como resultado un organismo con mayor aptitud y eficiencia a la hora de convertir la luz en energía química. Así, estas plantas son capaces de producir mayor cantidad de semillas.

Plantas *35S::AtOXR2* de 6 semanas tienen alterado su contenido de ABA, posiblemente de forma dependiente de los niveles de *AtOXR2*. Por otro lado, las semillas *35S::AtOXR2* demostraron germinar y establecerse bajo condiciones de estrés osmótico y concentraciones de ABA que inhiben el crecimiento en plantas WT (Capítulo 7.4).

De acuerdo con un análisis del transcriptoma de plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, observamos que las mismas tienen un perfil transcripcional basal similar al de plantas de *Arabidopsis* que están siendo sometidas a situaciones de estrés (Capítulo 7.4).

Las plantas *35S::AtOXR2* tienen mayor concentración de ROS basales, mayores niveles de peroxidación lipídica, así como mayores niveles de las moléculas antioxidantes ascorbato y glutatión total. De acuerdo con nuestros resultados, es probable que estas plantas estén mejor preparadas para enfrentar el estrés biótico (Capítulo 7.4).

En línea con las observaciones de fluorescencia de la clorofila, las plantas *35S::AtOXR2* demostraron ser tolerantes al estrés por alta intensidad lumínica.

Las plantas que sobreexpresan *AtOXR2* tienen mayor concentración de la fitohormona SA respecto de plantas salvajes. Frente a la infección con *P. syringae*, las plantas *35S::AtOXR2* son capaces de montar una respuesta de defensa con mayor velocidad que las plantas salvajes, pudiendo eliminar al patógeno en menor tiempo.

El exceso de SA en plantas *35S::AtOXR2* a la sexta semana de crecimiento, podría ser el responsable de una baja en la concentración de auxinas en estas plantas (Capítulo 7.4).

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información novedosa sobre la función de proteínas de la familia OXR en plantas, sientan las bases para futuras investigaciones. Debido a la mejora en las propiedades de interés agronómico que presentan las plantas que sobreexpresan *AtOXR2*, es posible pensar en una herramienta novedosa y útil para el desarrollo de nuevas tecnologías.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I

“Oligonucleótidos”

9.1. ANEXO I

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para análisis genómico.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción	Dirección
OXR2-NcoI-F	<i>cgcccatga</i> ATGCTCTCAAGGACAAG	Complementario a la secuencia del primer exón (105 pb) del gen <i>AtOXR2</i>	sentido
ST3-R	CTGATACCAGACGTTGCCCGCATAA	Complementario a una región (108 bp) del borde derecho (RB) del transposón proveniente del plásmido pGKBS. Empleado en conjunto con el oligonucleótido OXR2-NcoI-F permite verificar la inserción del T-DNA en las plantas mutantes en <i>AtOXR2</i> . Se obtiene un producto de 360 pb.	antisentido
Ds3-F	ACCCGACCGGATCGTATCGGT	Complementario a una región (156 pb) del RB del transposón proveniente del plásmido pDs68.	antisentido
OXR4ins-R	GTGGGTTGCTCCTGATTTATTTGTGA	Complementario a la secuencia del quinto exón del gen <i>AtOXR4</i> . Empleado en conjunto con el oligonucleótido Ds3-F permite verificar la inserción del T-DNA en las plantas mutantes en <i>AtOXR4</i> . Se obtiene un producto de 368 pb.	antisentido
Gate100-R	CTCGCATATCTCATTAAAGCAGGAC	Amplifica un fragmento del vector pEarlegate. En combinación con los oligonucleótidos <i>forward</i> correspondientes permite evaluar la presencia del transgén de interés en el genoma de <i>Arabidopsis</i> .	antisentido
mCherryR1	AAGCGCATGAACTCCTTGAT	Complementario a un fragmento de la RFPm permitiendo verificar la fusión al gen de interés en la secuenciación. En combinación con los oligonucleótidos <i>forward</i> correspondientes permite evaluar la presencia del transgén de interés en el genoma de <i>Arabidopsis</i> .	antisentido

Nota: En cursiva y subrayado se muestra la secuencia de corte para enzimas de restricción; en mayúscula se muestra la secuencia que corresponde al gen de interés y en cursiva se muestran secuencias necesarias para la correcta expresión del gen o para la estabilidad del oligonucleótido. Las secuencias se indican en sentido 5'-3' independientemente de la posición del gen o de la inserción en el genoma

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para clonados.

A. Clonados en el vector pTrc99A para expresión en bacterias.			
Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción	Dirección
OXR2-NcoI-F	<i>cgccca^{aa}tg</i> ATGCTCTCAAGGACAAG	Amplificación del gen <i>AtOXR2</i> a partir de ADNc de plantas WT de Arabidopsis. Los oligonucleótidos incluyen los sitios NcoI y XhoI para el clonado.	en sentido
OX2Y-XhoI-R	<i>gccctca^{aa}g</i> TACAAAGATGCATGCTCTCAAGG		antisentido
OX4-NcoI-F	<i>cgcc^{aa}tg</i> GGAAACACAAATCTTT	Amplificación del gen <i>AtOXR4</i> a partir de ADNc de plantas WT de Arabidopsis. Los oligonucleótidos incluyen los sitios NcoI y XhoI para el clonado.	en sentido
OX4Y-XhoI-R	<i>gccctc^{aa}g</i> TACAAAGATGGGGAAACACAAATC		antisentido
B. Clonados en el vector pMV611 para expresión en levaduras.			
Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción	Dirección
OX2Y5-BglII-F	<i>aa^{aa}gattct</i> atgttgcgcaaaaacagcagctgctaa ^{aa} tttaaccaaga agggtgggtgttgcattgctctcccagctCATGCTCTCAAGGA CAAAGTCTC	Amplificación del gen <i>AtOXR2</i> a partir de ADNc de plantas WT de Arabidopsis. Los oligonucleótidos incluyen los sitios Bgl-II y XhoI para el clonado. El oligonucleótido incluye la señal de localización mitocondrial de la enzima MnSOD de levaduras.	en sentido
OX2Y-XhoI-R	<i>gccctca^{aa}g</i> TACAAAGATGCATGCTCTCAAGG		antisentido
OX4Y5'BglII	<i>aa^{aa}gattct</i> atgttgcgcaaaaacagcagctgctaa ^{aa} tttaaccaaga agggtgggtgttgcattgctctcca ^{aa} tgctGGGAAACACAAATC TTTCAGAAGC	Amplificación del gen <i>AtOXR2</i> a partir de ADNc de plantas WT de Arabidopsis. Los oligonucleótidos incluyen los sitios Bgl-II y XhoI para el clonado. El oligonucleótido incluye la señal de localización mitocondrial de la enzima MnSOD de levaduras.	en sentido
OX4Y-XhoI-R	<i>gccctc^{aa}g</i> TACAAAGATGGGGAAACACAAATC		antisentido
C. Clonados en el vector pBI101.3 para expresión en plantas y estudio de la actividad promotora.			
Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción	Dirección
OXR2-Hind1800-F	<i>ccc^{aa}gactt</i> CCAAAAAATAATTCGGCC	En conjunto con el oligonucleótido OXR2-BamHI-R permite amplificar 1876 pb corriente arriba del inicio de la traducción del gen <i>AtOXR2</i> .	en sentido
OXR2-Hind1200-F	<i>ccc^{aa}gactt</i> CCCTTGTAATCTATTTCCC	En conjunto con el oligonucleótido OXR2-BamHI-R permite amplificar 1876 pb corriente arriba del inicio de la traducción del gen <i>AtOXR2</i> .	en sentido
OXR2-Hind940-F	<i>ccc^{aa}gactt</i> GCAAAGGAACATACGAAAA	En conjunto con el oligonucleótido OXR2-BamHI-R permite amplificar 959 pb corriente arriba del inicio de la traducción del gen <i>AtOXR2</i> .	en sentido
OXR2-BamHI-R	<i>ccc^{aa}atcc</i> ATCAGAAAGGAATGTTTTTG	Oligonucleótido <i>reverse</i> complementario a la región comprendida entre -25 y -4 del gen <i>AtOXR2</i> .	antisentido
OXR4-Hind-F	<i>cg^{aa}gactt</i> CAGAAAGAATTGTTCAAGG	Amplificación de un fragmento de 1638 pb corriente arriba del inicio de la traducción del gen <i>AtOXR4</i> a partir de ADN genómico de Arabidopsis.	en sentido
OXR4-BglII-F	<i>cg^{aa}gattct</i> TCTTCTCTTTTTACTC		antisentido
D. Clonados en el vector pGate100 para expresión en plantas.			
Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción	Dirección
AHL1	TAGTTAGTACTTAAGCTCGGGC	Adición de los sitios de recombinación para el clonado empleando tecnología Gateway.	en sentido
AHL2	CAGAGCTGCAGCTGGATGGC		antisentido
GateOXR2-5 BglII-F	<i>ggc^{aa}gattct</i> GAAATGCATGCTCTCAAGGAC	Amplificación de un fragmento de 908 pb que corresponde a la región codificante de <i>AtOXR2</i> a partir de ADNc de	en sentido
GateOXR2-3 SalI-R	<i>ggc^{aa}tcac</i> GAGAGGTATTGAGCGCA		antisentido
GateOXR2-3STOP SalI-R	<i>ggc^{aa}tcac</i> TTACGAGAGGTATTGAGAC	En conjunto con el oligonucleótido GateOXR2-5-BglII-F permite la amplificación de un fragmento de 908 pb que corresponde a la región codificante de <i>AtOXR2</i> a partir de ADNc de Arabidopsis. Incluye codón de STOP.	antisentido
GateOX4-5 XhoI-F	<i>ggc^{aa}gattct</i> GAAATGGGGAAACACAAATC	Amplificación de un fragmento de 908 pb que corresponde a la región codificante de <i>AtOXR4</i> a partir de ADNc de	en sentido
GateOXR4-3-SalI-R	<i>ggc^{aa}ctcga</i> g GACCATCTGCAAGACCA		antisentido
GateOXR4-3STOP SalI-R	<i>ggc^{aa}tcaga</i> TTCATTTGGGTTTTCTTTATA	En conjunto con el oligonucleótido GateOXR2-5-BglII-F permite la amplificación de un fragmento de 908 pb que corresponde a la región codificante de <i>AtOXR4</i> a partir de ADNc de Arabidopsis. Incluye codón de STOP.	antisentido

Nota: En cursiva y subrayado se muestra la secuencia de corte para enzimas de restricción; en mayúscula se muestra la secuencia que corresponde al gen de interés y en cursiva se muestran secuencias necesarias para la correcta expresión del gen o para la estabilidad del oligonucleótido. Para los oligonucleótidos de la sección (D) el patrón mayúscula/minúscula indica en minúscula las regiones complementarias entre oligonucleótido en sentido y antisentido

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para clonados (continuación).

E. Clonados en el vector pBI121 para expresión de los genes quiméricos en plantas.			
Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción	Dirección
OXR5 Sal-R	cgc <u>gtcga</u> cCTTCATTCATTACCTCTCTCC	Oligonucleótidos empleados para amplificar la región C-terminal del gen quimérico <i>AtOXR25</i> en la PCR#2	antisentido
OXR25-F	GAagaagatgaggggaacttctaaccgctcATATTA		en sentido
OXR25-R	gagcggtagaagttggtcatcttctcCCC	En conjunto con el oligonucleótido GateOXR2-3 BglII-F permite la amplificación de la región N-terminal del gen quimérico <i>AtOXR25</i> en la PCR#1	antisentido
OXR24-F	gaagaagatgagggagaagaattcagaaccctCTTT	En conjunto con el oligonucleótido GateOXR4-3STOP SalI-R permite la amplificación de la región C-terminal del gen quimérico <i>AtOXR24</i> en la PCR#2.	antisentido
OXR24-R	gggtctgaaatttctccctcatcttctCACCC	En conjunto con el oligonucleótido GateOXR2-3 BglII-F permite la amplificación de la región N-terminal del gen quimérico <i>AtOXR24</i> en la PCR#1.	antisentido
OXR52-F	gaaccaaatagaacatttacagagactctgTG	En conjunto con el oligonucleótido GateOXR2-3STOP SalI-R permite la amplificación de la región C-terminal del gen quimérico <i>AtOXR52</i> en la PCR#2.	en sentido
OXR5 BamHI-F	gcc <u>gaatc</u> ATCATCTTCACCACTATGGGTGC	Oligonucleótidos empleados para amplificar la región n-terminal del gen quimérico <i>AtOXR52</i> en la PCR#1	en sentido
OXR52-R	cagagctctctgttaaagtgtcattggttCACCGC		antisentido

Nota: En cursiva y subrayado se muestra la secuencia de corte para enzimas de restricción; en mayúscula se muestra la secuencia que corresponde al gen de interés y en cursiva se muestran secuencias necesarias para la correcta expresión del gen o para la estabilidad del oligonucleótido. Para los oligonucleótidos de la sección (D) el patrón mayúscula/minúscula indica en minúscula las regiones complementarias entre oligonucleótido en sentido y reverso.

Tabla 3. Genes quiméricos obtenidos en este trabajo de Tesis.

Nombre del gen quimérico	Extremo N-terminal	Extremo C-terminal	Sitios de donado	Oligonucleótidos empleados		
				PCR#1	PCR#2	PCR#3
AtOXR25	AtOXR2	AtOXR5	Bgl-II/Sal-I	GateOXR2-5 BglII-F/OXR25-R	OXR25-F/OXR5 Sal-R	GateOXR2-5 BglII-F/OXR5 Sal-R
AtOXR24	AtOXR2	AtOXR4	Bgl-II/Sal-I	OXR2-5 BglII-F/OXR24-R	OXR25-F/OXR5 Sal-R	GateOXR2-5 BglII-F/GateOXR4-3 Sal-R
AtOXR52	AtOXR5	AtOXR2	BamHI/Sal-I	OXR5 Bam-F/OXR52-R	OXR52-F/GateOXR2-3 Sal-R	OXR5 Bam-F/GateOXR2-3 Sal-R
AtOXR42	AtOXR4	AtOXR2	Xho-I/Sal-I	GateOXR4-3 Xho-F/OXR42-R	OXR42-F/GateOXR2-3 Sal-R	GateOXR4-3 Xho-F/GateOXR2-3 Sal-R

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en RT-qPCR.

Nombre del primer	Gen	Locus	En sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
RTACTIN	<i>ACT2/ACT8</i>	At3g18780/At1g49240	GGTAACATTGTGC TCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCT TCATGCTGC
RTAOX1a	<i>AOX1a</i>	At3g22370	GGAGGCTTCCTGC TGATGCGACA	AGCTGGAGCTTCCT TTAGTTCACGACC
RTAPX	<i>APX2</i>	At3g09640	GGGTCGGTGCCAC AAGGAGC	AGAAGGCATCCTCA TCTGCAGCA
RTRBOHD	<i>RBOHD</i>	At5g47910	ACGGTGTGGATGT TGTGTCGGG	TCCTGGCATTCCAC AGTAGAAGACT
RTRBOHF	<i>RBOHF</i>	At1g6406	ACGTTTAGCTCCA CACGTTCTAGGT	CCCTGCAGCTGTAT TGCACTTC
RTCAT	<i>CAT3</i>	At1g20620	GGGCACCAGACAG GCAAGACA	CCAAGGATCGATCA GCCTGAGACCA
RTCHS	<i>CHS</i>	At5g13930	ACATGTCGAGCGC GTGCGTT	AGGAACGCTGTGC AAGACGACT
RTASOX	<i>L-AAO</i>	At4g39830	GGCTGGACGGCGT TGCGTTT	CCAGACTCGAACAC AATCCCCATTCCC
RTPAL	<i>PAL1</i>	At2g37040	AGCAGCAAGAGCA GCCTACG	GGAGCTCCGTTCCA CTCGTTG
RTPP2AA	<i>PP2AA3</i>	At1g13320	CCTGCGGTAATAA CTGCATCT	CTTCACTTAGCTCC ACCAAGCA
RTPR1	<i>PR1</i>	At2g15610	TCTGGCGTCTCCG CCGTGAAC	TTTGGCACATCCGA GTCTCACTGAC
RTPR3	<i>PR3</i>	At3g12500	GAGGAAGAAGGA GGTCGCCGC	CGTTTGCCAGATGC GCATGG
RTPR5	<i>PR5</i>	At1675040	GCCGTGGAGCTAA CGATAAGCCG	GCTCCGGTACAAGT GAAGGTGC
RTPRXII	<i>PRXIIIF</i>	At3g06050	CGGGCCACGGTCT GAGAGATGG	TGCCCCTGTAACCT TGAAGTCAGACG
RTOXR2larga	<i>AtOXR2</i>	At2g05590		CTTAGCAACACAA GCACTATCAT
RTOXR2corta	<i>AtOXR2</i>	At2g05590	GTTTAGACGAAGA TTTGTAAGGT	



9.2 ANEXO II

“Medios de cultivo y soluciones”

9.2 ANEXO II

A. Composición medios de cultivos.

Bacterias

Medio King's B: Proteosa peptona (OXOID N° 3) 20 g/L; glicerol 1% (p/v); K_2HPO_4 1,6 g/L. (pH 7,2). Para preparar medio King's B sólido se agrega agar al 1,5% (p/v).

Luria-Bertani (LB): Peptona de carne 10 g/L; NaCl 5 g/L; extracto de levadura 5 g/L. Para preparar medio LB sólido se agrega agar al 1,5% (p/v).

Medio para ensayo de capacidad antimutagénica (Volkert y col., 2008): Sales A 1X, $MgSO_4$ 1 mM, HCl-tiamine 5 μ g/mL, IPTG 0,5 mM, carbenicilina 50 μ g/mL. El medio solido se obtiene mediante el agregado de agar 2% (p/v).

Sales A 10X: K_2HPO_4 105 g/L; KH_2PO_4 45g/L; 10 g $(NH_4)_2SO_4$; $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2 H_2O$ 5 g/L.

Levaduras

Medio YPD: Peptona de carne 20 g/L; dextrosa 20 g/L; extracto de levadura 10 g/L. Para preparar medio YPD sólido se agrega agar al 1,5% (p/v).

Medio YEPG: Peptona de carne 20 g/L; extracto de levadura 10 g/L; glicerol 30 ml/L; etanol 20 mL/L. Para preparar medio YEPG sólido se agrega agar al 1,5% (p/v).

Plantas

Medio Murashige y Skoog: KNO_3 1,9 $g.L^{-1}$; NH_4NO_3 1,65 $g.L^{-1}$; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,44 $g.L^{-1}$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,37 $g.L^{-1}$; KH_2PO_4 17 $g.L^{-1}$; Na_2EDTA 37,3 $mg.L^{-1}$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 27,8 $mg.L^{-1}$; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 22,3 $mg.L^{-1}$; H_3BO_3 6,2 $mg.L^{-1}$; $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ 8,6 $mg.L^{-1}$; KI 0,83 $mg.L^{-1}$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,25 $mg.L^{-1}$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,025 $mg.L^{-1}$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,025 $mg.L^{-1}$. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añade 8 g/l de agar.

B. Composición de soluciones y reactivos generales.

Soluciones utilizadas en electroforesis de ADN en agarosa:

Solución TAE 1x: Tris-acetato 40 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM.

Solución de siembra de ADN en geles de agarosa: Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v), SyBr Green dilución 1:20.

Solución Stock de SyBr Green: El reactivo comercial se diluyó 1000 veces en agua H₂O-MQ.

Soluciones empleadas para mini preparación (Miniprep) de ADN plasmídico y ADN genómico de Arabidopsis:

Solución de Miniprep I: Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glucosa 50 mM y EDTA 10 mM

Solución de Miniprep II: NaOH 0,2 N y SDS 0,1 % (P/V)

Solución amortiguadora de extracción de ADN de Arabidopsis: Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%(P/P).

TE (Tris-EDTA): Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5.

Soluciones empleadas en Northern Blot:

Solución de SSC 1X: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M.

Solución de desnaturalización para membranas de nylon: NaOH 0,2 N; NaCl 1,5 M.

Solución de neutralización para membranas de nylon: Tris-HCl 0,4 M (pH 7,6);

Solución de Denhardt 100X: Polivinilpirrolidona 2% (p/v); albúmina sérica bovina 2%(p/v); Ficoll 2% (p/v).

Soluciones empleadas para la determinación de lípidos peroxidados:

Solución de BHT: BHT 10%(p/v) en TCA 6%(p/v).

Solución control: BHT 0,01%(p/v) en TCA 6%(p/v).

Solución positiva: BHT 0,01%(p/v) y ácido tiobarbitúrico 1%(p/v) en TCA 6%(p/v).

Soluciones empleadas para la determinación de antocianinas:

Solución de extracción ácida (pH 1): KCl 0.025 M, ajustar a pH 1 con HCl.

Solución de extracción ácida (pH 4,5): CH₃CO₂Na 0.4 M, ajustar a pH 4,5 con HCl.

Soluciones empleadas para la determinación de actividad SOD:

Solución de extracción: K₂PO₄ 10mM pH 7,5, PVP insoluble 10%, Tritón X-100 0,01%.

Solución de reacción incompleta: K₂PO₄ 10mM pH 7,5.

Solución de reacción completa: K₂PO₄ 10mM pH 7,5, 10 mM NBT y 25 mM de Riboflavina.

Soluciones empleadas en electroforesis de proteínas en poliacrilamida y western blot:

LAEMMLI 1X: Tris-HCl 25 mM pH: 8.3; glicina 192 mM; SDS 0,1 % (P/V).

Solución de siembra para proteínas en geles desnaturalizantes: Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 2 mM pH 8,0; SDS 2 % (P/V); β-mercaptoetanol 0,5% (P/V); azul de bromofenol 0,5 mg.mL⁻¹.

Solución de siembra para proteínas en geles nativos: Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 2 mM pH 8,0; azul de bromofenol 0,5 mg/ml.

Solución colorante de geles de proteínas: Coomasie Brilliant Blue R-250 1 % (P/V) en una mezcla de etanol:acético:agua 50:10:40.

Solución decolorante de geles de proteínas: mezcla etanol:ácido acético: agua 25:10:65.

Solución de transferencia: Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20 % (V/V).

Solución bloqueante: leche descremada 5 % (P/V) en TBS 1x.

Solución de TBS 1X: Tris 20 mM pH 7,6; NaCl 0,9 % (P/V).

TBS-Tween: TBS 1X, Tween-20 0.05 % (P/V).

TBS-Leche: TBS 1X, leche descremada 0,5%.

Solución amortiguadora de extracción de proteínas para prueba fluorométrica de ensayo de actividad β -glucuronidasa: Na₂HPO₄ 50 mM pH 7,0; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,1 % (p/v); β -mercaptoetanol 10 mM; Tritón X-100 1 % (v/v).

Solución alcohólica para extracción de metabolitos: H₂O:Metanol:CHCl₃ en proporción 1:2:5, conteniendo Ribitol 50 mM.



9.3 ANEXO III

ANEXO III

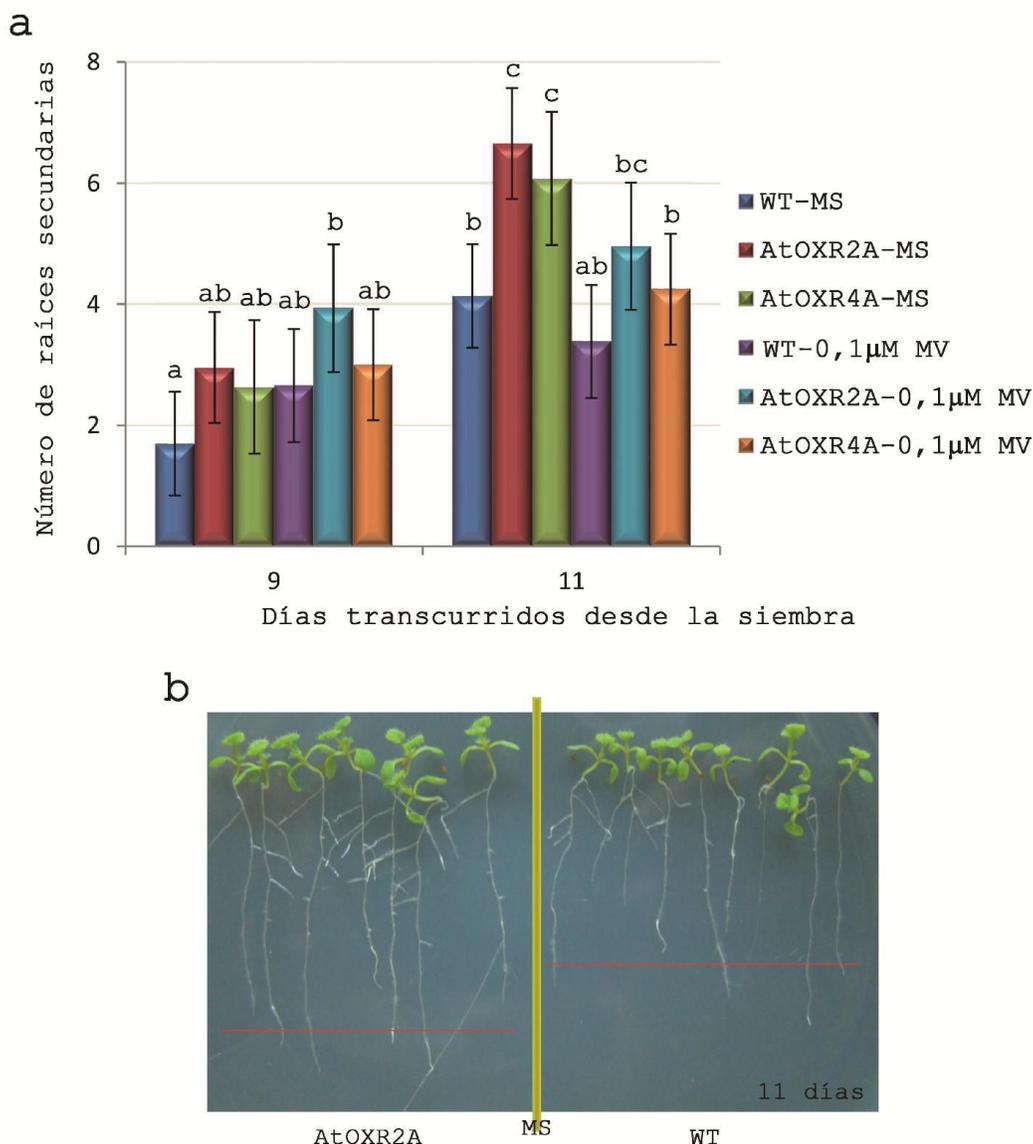
9.3.1. Numero de raíces laterales o secundarias en plantas con niveles alterados de *AtOXR2* o de *AtOXR4*.

Figura 9.3-1 | Número de raíces secundarias en plantas *35S::AtOXR2*, *35S::AtOXR4* y WT crecidas en condiciones de estrés oxidativo y en condiciones control. Plantas WT y sobreexpresantes de *AtOXR2* y *AtOXR4* crecidas MS 0,5x y en el mismo medio suplementado con MV 0,1 µM. **a-** se muestra el gráfico de barras que resume los resultados obtenidos durante este ensayo. **b-** Fotografía representativa de lo que se veía en placas al decimoprimer día, cuando las plantas eran crecidas en MS 0,5X. Las curvas con diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado). Ensayo 0,1 µM MV: $n_{WT-MS} = 79$; $n_{AtOXR2A-MS} = 47$; $n_{AtOXR4A-MS} = 45$; $n_{WT-0,1\mu M MV} = 73$; $n_{AtOXR2A-0,1\mu M MV} = 48$; $n_{AtOXR4A-0,1\mu M MV} = 46$.

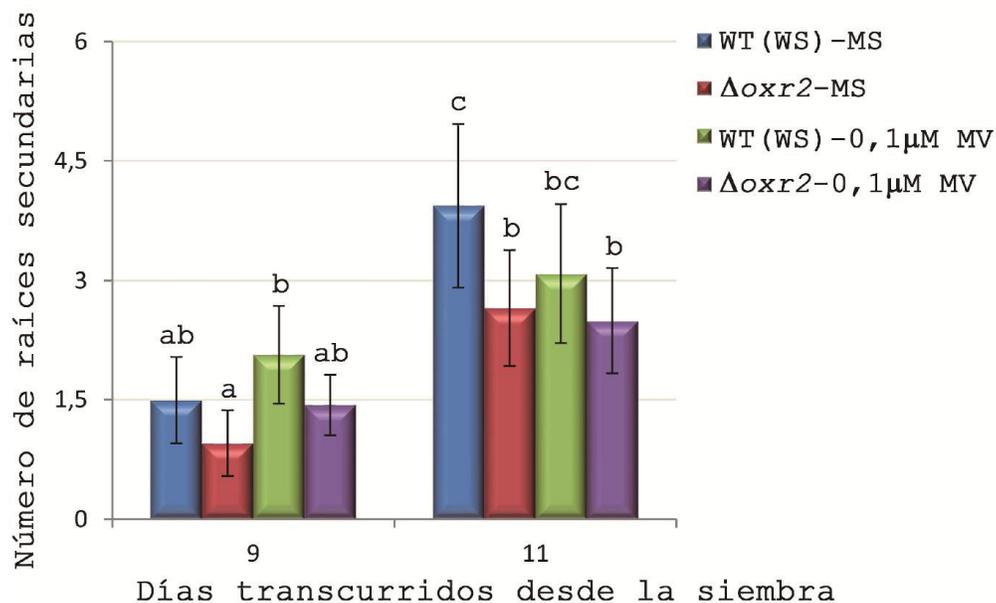


Figura 9.3-2 | Número de raíces secundarias en plantas $\Delta oxr2$ y WT (WS) crecidas en condiciones de estrés oxidativo y en condiciones control. Las semillas de los dos genotipos fueron sembradas en paralelo en MS 0,5X y en el mismo medio conteniendo MV 0,1 μ M. El número de raíces secundarias se midió al día 9 y 11 luego de la siembra. Número de raíces medido al noveno y al decimoprimer día posteriores a la siembra. Las barras de error representan la desviación estándar. Diferentes letras implican diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado). $n_{WT(WS)-MS} = 43$; $n_{\Delta oxr2-MS} = 41$; $n_{WT(WS)-0,1\mu M MV} = 39$; $n_{\Delta oxr2-0,1\mu M MV} = 36$.

9.3.2. Introducción a la fluorescencia de la clorofila.

El sistema de Li-Cor 6400XT permite realizar mediciones del consumo de gases, trabajando como sistema abierto, y además permite la determinación de parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila. El equipo Li-Cor 6400XT utilizado detecta en tiempo real el consumo de CO₂ y producción de H₂O, mediante el cálculo del diferencial existente entre el caudal de ingreso y el de salida de ambas corrientes. La detección se realiza tanto antes como después del ingreso de estos gases a la cámara donde se coloca la hoja a estudiar.

Parámetros vinculados a la fluorescencia de la clorofila. Cuando un fotón de luz es absorbido por una molécula de clorofila, toda la energía de la onda se transfiere a los electrones de valencia de la clorofila. Así es como la clorofila alcanza su estado de excitación energética. Posteriormente, los electrones regresan rápidamente a su estado basal liberando la energía absorbida en cualquiera de las siguientes formas: 1) fluorescencia, 2) calor, o 3) transporte de electrones asociado con la fotoquímica fotosintética (Figura 9.3-3 a). Esto significa que el total de la energía lumínica absorbida por los fotosistemas se disipa en distintos porcentajes, por cada una de las tres vías mencionadas. Matemáticamente, podríamos decir que $P + F + C = 1$, donde P= fracción de energía disipada en la fotosíntesis, F= fracción de energía disipada por fluorescencia, y C= fracción de energía disipada como calor. En esta ecuación, P, es el valor de energía que la planta puede transformar a posterior en energía química, por lo cual este valor también es conocido como eficiencia cuántica o producción cuántica. A medida que la luz que incide en una hoja se incrementa, P disminuye, mientras F y C aumentan. A intensidades de luz saturantes, no se observan incrementos en P con incrementos en la intensidad lumínica, y P tiende a cero. Cuando esto ocurre, F y C habrán alcanzado sus valores máximos F_m y C_m , respectivamente. De esta forma, la ecuación $P + F + H = 1$ se transforma en $0 + F + H = 1$. Desarrollando un poco la ecuación, se puede llegar a . Si se realizan dos medidas de fluorescencia, una en condiciones de luz no saturantes (F), y otra en condiciones de luz saturantes (F_m), entonces se puede resolver C y P, obteniéndose: $P = \frac{F_m - F}{F_m}$. Sin embargo, si la condición de luz no-saturante se lleva a cabo en oscuridad total, y la hoja se encuentra completamente adaptada a la oscuridad, la ecuación toma la siguiente forma:

$P_{osc} = \frac{F_m - F_0}{F_m} = \frac{F_v}{F_m}$; donde F_0 es conocido como la fluorescencia mínima, o el valor de fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad. P_{osc} es la fracción de fotones absorbidos que son utilizados para la fotoquímica de la hoja adaptada a oscuridad, y usualmente se la distingue como F_v/F_m . Para plantas saludables, este valor oscila entre 0,75 - 0,85. P_{osc} es conocido como la máxima producción cuántica o la producción cuántica óptima. En cambio, si la luz no-saturante tiene cierta intensidad, y la hoja que la recibe se encuentra completamente adaptada a la luz (fotosíntesis en estado estacionario), entonces la ecuación anterior se transforma en:

$$P_{luz} = \frac{F'_m - F_s}{F'_m} = \frac{\Delta F}{F'_m} = \Phi_{PSII}$$
 donde F_s es la fluorescencia en estado estacionario y F'_m es la fluorescencia máxima durante un pulso de luz saturante. P_{luz} o Φ_{PSII} es la fracción de fotones absorbidos que son utilizados por el PSII para las reacciones fotoquímicas en una hoja adaptada a la luz, y puede entenderse como la producción cuántica efectiva.

Una relación similar, que a veces se utiliza en la literatura es $\frac{F'_v}{F'_m} = \frac{F'_m - F'_0}{F'_m}$; que es la eficiencia de la energía cosechada por los centros de reacción del PSII, cuando estos se encuentran oxidados (abiertos). El cálculo requiere conocer F'_0 que es la fluorescencia mínima de una hoja adaptada a la luz que ha sido momentáneamente oscurecida (Figura 9.3-3 b) y F'_m que es la fluorescencia máxima (Figura 9.3-3 b).

La producción cuántica también se puede inferir a partir de medidas de intercambio gaseoso, y se conoce como Φ_{CO_2} . La ecuación que permite calcular este parámetro es:

$$\Phi_{CO_2} = \frac{A - A_{osc}}{I \alpha_{hoja}}$$
 donde A es la tasa de asimilación, A_{osc} es la tasa de asimilación en oscuridad (ambas con unidades de $\mu\text{mol}_{CO_2} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), I es la densidad del flujo de fotones incidentes ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y α_{hoja} es la absorbancia de la hoja. A_{osc} es de la misma magnitud, solo que de signo opuesto, a la tasa de respiración en oscuridad.

El flujo de fotones reales ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) que alcanzan el PSII puede ser inferido a partir de medidas de fluorescencia de la clorofila. Es conocido como tasa de transporte de electrones (Figura 7.3-17 b) o ETR (por sus siglas en inglés, *Electron Transport Rate*), y está dado por:

$$\text{ETR} = \left(\frac{F'_m - F_s}{F'_m} \right) f I \alpha_{hoja}$$
 donde f es la fracción de energía absorbida que es utilizada por el PSII, y que típicamente se asume con un valor de 0,4 para plantas C4 (Earl and Tollenaar, 1998).

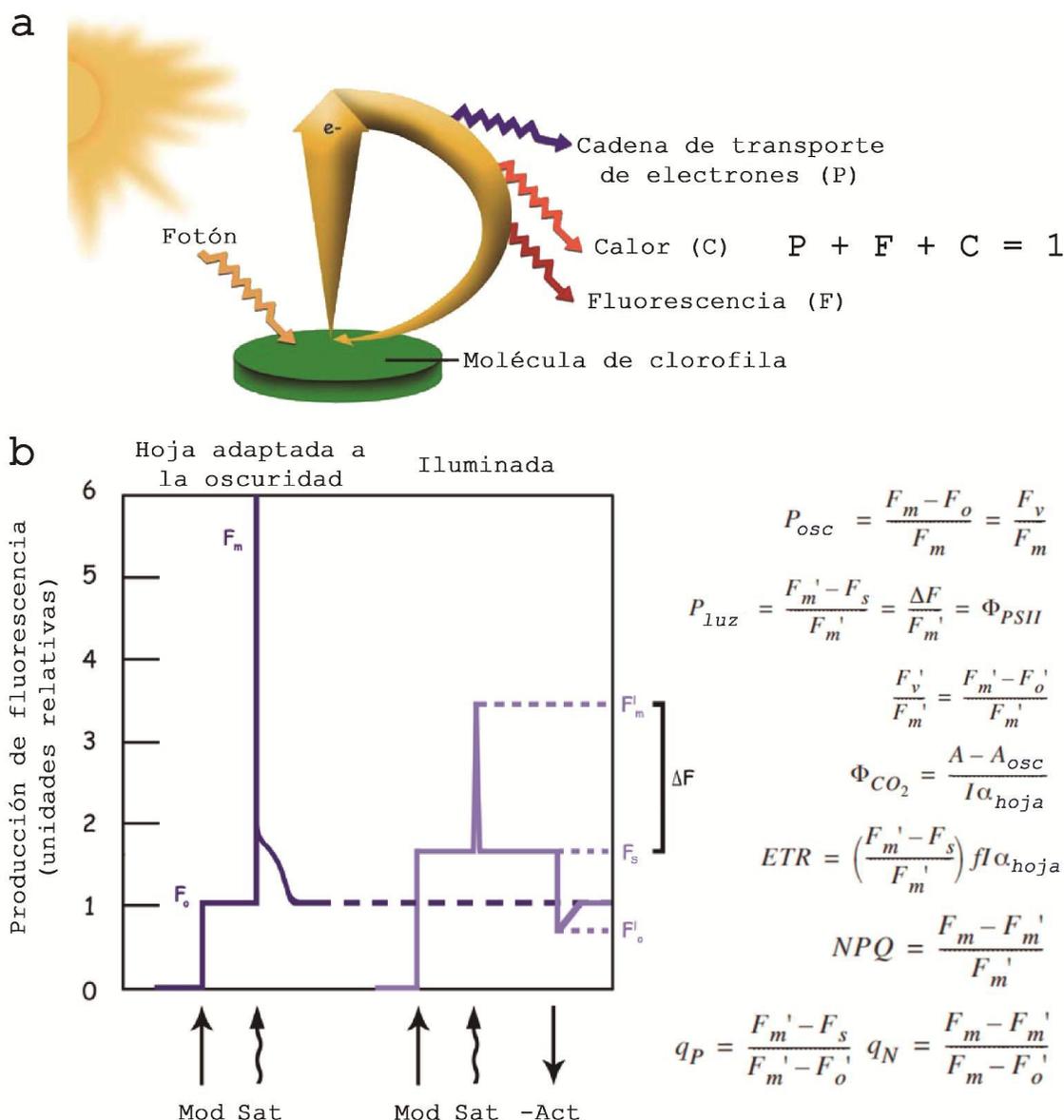


Figura 9.3-3 | Nociones básicas para comprender la fluorescencia de la clorofila. a- Captación de energía de la clorofila y disipación mediante los tres mecanismos planteados. b- Medidas básicas de fluorescencia. En hojas adaptadas a la oscuridad, se mide la fluorescencia mínima F_o (exponiendo la hoja a una baja densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos, PPF) y los valores máximos de fluorescencia, F_m . Una vez hechas las determinaciones en oscuridad, las hojas se exponen a la luz y; en hojas iluminadas se mide el valor de estado estacionario F_s , el máximo valor durante un pulso de luz saturante, F_m' , y el mínimo valor durante un pulso de oscuridad F_o' . Mod= Luz Modulada, Sat= Luz Saturante, -Act = Luz que se compone por longitudes de onda que están fuera del espectro actínico (aquella que puede ser absorbida por los fotosistemas).

Cuando una hoja se mantiene en oscuridad, la quinona asociada al PSII (Q_A) permanece en su estado “oxidado”, y se dice que los centros de reacción del PSII se encuentran abiertos,

esto significa que están receptivos a nuevos electrones, y por ende son capaces de realizar la reducción fotoquímica de Q_A . La exposición de una hoja adaptada a la oscuridad a un pulso débil de intensidad modulada, produce el mínimo nivel de fluorescencia, F_0' . La transferencia de electrones desde el centro de reacción del PSII (P680) a Q_A extingue la fluorescencia, un proceso conocido como “extinción fotoquímica” (q_P , de sus siglas en inglés *photochemical quenching*). La extinción fotoquímica incluye la fotosíntesis y la fotorespiración, y tiende a ser mayor en baja intensidad lumínica, dado que es esa la condición en que las hojas utilizan la luz más eficientemente. Mientras que incrementos en la tasa de pérdida por calor generan la extinción de la fluorescencia por medios no-fotoquímicos (q_N , por sus siglas en inglés *non-photochemical quenching*). A medida que se incrementa la intensidad lumínica, q_N aumenta, lo cual es un reflejo de los mecanismos de protección que tiene la planta para evitar la sobre carga de energía de las membranas tilacoides. Otra forma de reportar este indicador es mediante NPQ, cuya ecuación se describe en la figura 9.3-3 b.

10. BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA

- Abdollahi, H. y Ghahremani, Z. *The role of chloroplasts in the interaction between Erwinia amylovora and host plants*. XII International Workshop on Fire Blight 896215-221.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling*. The Plant Cell 15(1): 63-78.
- Abraham, D., Braguini, W.L., Kelmer-Bracht, A.M. y Ishii-Iwamoto, E.L. (2000). *Effects of Four Monoterpenes on Germination, Primary Root Growth, and Mitochondrial Respiration of Maize*. Journal of Chemical Ecology 26(3): 611-624.
- Abuqamar, S., Ajeb, S., Sham, A., Enan, M.R. y Iratni, R. (2013). *A mutation in the expansin-like A2 gene enhances resistance to necrotrophic fungi and hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana*. Molecular plant pathology 14(8): 813-827.
- Aghajari, N., Van Petegem, F., Villeret, V., Chessa, J.P., Gerday, C., Haser, R. y col. (2003). *Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases*. Proteins 50(4): 636-647.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A. y Pedreño, M.A. (2009). *Class III peroxidases in plant defence reactions*. Journal of experimental botany 60(2): 377-390.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P. y col. (2003). *Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana*. Science 301(5633): 653-657.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). *Basic local alignment search tool*. Journal of molecular biology 215(3): 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y col. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Research 25(17): 3389-3402.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. y Lamb, C. (1998). *Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity*. Cell 92(6): 773-784.
- Aoki, N., Ishibashi, Y., Kai, K., Tomokiyo, R., Yuasa, T. y Iwaya-Inoue, M. (2014). *Programmed cell death in barley aleurone cells is not directly stimulated by reactive oxygen species produced in response to gibberellin*. J Plant Physiol 171(8): 615-618.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annual review of plant biology 55: 373-399.
- Apse, M.P. y Blumwald, E. (2002). *Engineering salt tolerance in plants*. Current opinion in biotechnology 13(2): 146-150.
- Arai, H., Ozaki, T., Niizuma, H., Nakamura, Y., Ohira, M., Takano, K. y col. (2008). *ERAP140/Nbla10993 is a novel favorable prognostic indicator for neuroblastoma induced in response to retinoic acid*. Oncology reports 19(6): 1381-1388.
- Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J.M. (2011). *Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions*. Journal of experimental botany.
- Aroca, R., Tognoni, F., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M. y Pardossi, A. (2001). *Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity*. Plant Physiology and Biochemistry 39(12): 1067-1073.

- Asada, K. (1999). *The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons*. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 50: 601-639.
- Asada, K. (2006). *Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions*. Plant physiology 141(2): 391-396.
- Atkinson, N.J. y Urwin, P.E. (2012). *The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field*. Journal of experimental botany 63(10):3523-3543.
- Attallah, C.V., Welchen, E. y Gonzalez, D.H. (2007). *The promoters of Arabidopsis thaliana genes AtCOX17-1 and -2, encoding a copper chaperone involved in cytochrome c oxidase biogenesis, are preferentially active in roots and anthers and induced by biotic and abiotic stress*. Physiologia Plantarum 129(1): 123-134.
- Attallah, C.V., Welchen, E., Martin, A.P., Spinelli, S.V., Bonnard, G., Palatnik, J.F. y col. (2011). *Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis*. Journal of experimental botany 62(12): 4281-4294.
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbineau, F. y Leymarie, J. (2011). *Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley*. Plant, cell & environment 34(6): 980-993.
- Bailey, T.L. y Elkan, C. (1994). *Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers*. ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology 2: 28-36.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. y Corbineau, F. (2008). *From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology*. Comptes rendus biologiques 331(10): 806-814.
- Baker, N.R. (2008). *Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo*. Annual review of plant biology 59: 89-113.
- Barcelo, A.R. (1999). *Some properties of the H₂O₂/O₂- generating system from the lignifying xylem of Zinnia elegans*. Free radical research 31:147-154.
- Bateman, A. y Bycroft, M. (2000). *The structure of a LysM domain from E. coli membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD)*. Journal of molecular biology 299(4): 1113-1119.
- Baumann, U. (1994). *Crystal structure of the 50 kDa metallo protease from Serratia marcescens*. Journal of molecular biology 242(3): 244-251.
- Baumann, U., Bauer, M., Letoffe, S., Delepelaire, P. y Wandersman, C. (1995). *Crystal structure of a complex between Serratia marcescens metallo-protease and an inhibitor from Erwinia chrysanthemi*. Journal of molecular biology 248(3): 653-661.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M. y McKay, D.B. (1993). *Three-dimensional structure of the alkaline protease of Pseudomonas aeruginosa: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif*. The EMBO journal 12(9): 3357-3364.
- Baxter, A., Mittler, R. y Suzuki, N. (2013). *ROS as key players in plant stress signalling*. Journal of experimental botany.
- Bengough, A.G., McKenzie, B.M., Hallett, P.D. y Valentine, T.A. (2011). *Root elongation, water stress, and mechanical impedance: a review of limiting stresses and beneficial root tip traits*. Journal of experimental botany 62(1): 59-68.
- Bentsink, L. y Koornneef, M. (2008). *Seed Dormancy and Germination*. The Arabidopsis Book /

- American Society of Plant Biologists 6: e0119.
- Bernards, M.A., Summerhurst, D.K. y Razem, F.A. (2004). *Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection*. *Phytochemistry Reviews* 3(1): 113-126.
- Bethke, P.C. y Jones, R.L. (2001). *Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 25(1): 19-29.
- Bhattacharjee, S. (2010). *Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell*. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*: 1-30.
- Bhattacharjee, S. (2012). *The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants*. *Journal of Botany* 2012: 22.
- Biehler, K. y Fock, H. (1996). *Evidence for the Contribution of the Mehler-Peroxidase Reaction in Dissipating Excess Electrons in Drought-Stressed Wheat*. *Plant physiology* 112(1): 265-272.
- Biswas, M.S. y Mano, J. (2015). *Lipid peroxide-derived short-chain carbonyls mediate H₂O₂-induced and NaCl-induced programmed cell death in plants*. *Plant physiology*.
- Blaise, M., Alsarraf, H.M., Wong, J.E., Midtgaard, S.R., Laroche, F., Schack, L. y col. (2012). *Crystal structure of the TLDc domain of oxidation resistance protein 2 from zebrafish*. *Proteins* 80(6): 1694-1698.
- Blokhina, O. y Fagerstedt, K.V. (2010). *Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems*. *Physiol Plant* 138(4): 447-462.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L. y col. (2002). *The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system*. *Journal of experimental botany* 53(372): 1367-1376.
- Borges, A.A., Jiménez-Arias, D., Expósito-Rodríguez, M., Sandalio, L.M. y Pérez, J.A. (2014). *Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms*. *Frontiers in plant science* 5: 642.
- Borsani, O., Valpuesta, V. y Botella, M.A. (2001). *Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in Arabidopsis Seedlings*. *Plant physiology* 126(3): 1024-1030.
- Bouchabke-Coussa, O., Quashie, M.L., Seoane-Redondo, J., Fortabat, M.N., Gery, C., Yu, A. y col. (2008). *ESKIMO1 is a key gene involved in water economy as well as cold acclimation and salt tolerance*. *BMC Plant Biol* 8: 125.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. y col. (2001). *Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants*. *Plant Cell* 13(7): 1499-1510.
- Brady, S.M., Sarkar, S.F., Bonetta, D. y McCourt, P. (2003). *The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34(1): 67-75.
- Brandt, S.M., Jaramillo-Gutierrez, G., Kumar, S., Barillas-Mury, C. y Schneider, D.S. (2008). *Use of a Drosophila model to identify genes regulating Plasmodium growth in the mosquito*. *Genetics* 180(3): 1671-1678.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C. y col. (2011). *High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during Arabidopsis Leaf Senescence Reveals*

- a Distinct Chronology of Processes and Regulation*. The Plant Cell 23(3): 873-894.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G. y col. (2005). *Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis*. The Plant journal 42(4): 567-585.
- Buckley, J.J. y Jessen, J.R. (2015). *Matrix metalloproteinase function in non-mammalian model organisms*. Frontiers in bioscience (Scholar edition) 7: 168-183.
- Buer, C.S., Imin, N. y Djordjevic, M.A. (2010). *Flavonoids: new roles for old molecules*. Journal of integrative plant biology 52(1): 98-111.
- Buszczak, M. y Segraves, W.A. (1998). *Drosophila metamorphosis: the only way is USP?* Current biology : CB 8(24): R879-882.
- Bylesjö, M., Segura, V., Soolanayakanahally, R.Y., Rae, A.M., Trygg, J., Gustafsson, P. y col. (2008). *LAMINA: a tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters*. BMC Plant Biology 8: 82-91.
- Cakmak, I. y Horst, W.J. (1991). *Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (Glycine max)*. Physiologia Plantarum 83(3): 463-468.
- Cernadas, R.A. y Benedetti, C.E. (2009). *Role of auxin and gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by Xanthomonas axonopodis pv. citri*. Plant Science 177(3): 190-195.
- Chan, Z., Grumet, R. y Loescher, W. (2011). *Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant Arabidopsis thaliana indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes*. Journal of experimental botany 62(14): 4787-4803.
- Chan, Z., Loescher, W. y Grumet, R. (2013). *Transcriptional variation in response to salt stress in commonly used Arabidopsis thaliana accessions*. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale 73: 189-201.
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y. y Kreis, M. (2002). *Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Plant physiology 130(2): 577-590.
- Chen, P.-S., Wang, L.-Y., Chen, Y.-J., Tzeng, K.-C., Chang, S.-C., Chung, K.-R. y col. (2012). *Understanding cellular defence in kumquat and calamondin to citrus canker caused by Xanthomonas citri subsp. citri*. Physiological and Molecular Plant Pathology 79: 1-12.
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J. y col. (2007). *Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 alters Arabidopsis thaliana auxin physiology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(50): 20131-20136.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. y Fan, B. (2009). *Biosynthesis of salicylic acid in plants*. Plant Signaling & Behavior 4(6): 493-496.
- Cheng, Y. y Song, C. (2006). *Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells*. Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences 49(1): 1-11.
- Cheong, Y.H., Chang, H.-S., 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 physiology 129(2): 661-677.
- Chmielowska-Bak, J., Izbińska, K. y Deckert, J. (2015). *Products of lipid, protein and RNA*

- oxidation as signals and regulators of gene expression in plants*. *Frontiers in plant science* 6: 405.
- Choi, H.W., Kim, Y.J., Lee, S.C., Hong, J.K. y Hwang, B.K. (2007). *Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens*. *Plant physiology* 145(3): 890-904.
- Choi, J.Y., Seo, Y.S., Kim, S.J., Kim, W.T. y Shin, J.S. (2011). *Constitutive expression of CaXTH3, a hot pepper xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tolerance to salt and drought stresses without phenotypic defects in tomato plants (Solanum lycopersicum cv. Dotaerang)*. *Plant Cell Rep* 30(5): 867-877.
- Chou, K.C. y Shen, H.B. (2010). *Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization*. *PLoS One* 5(6): e11335.
- Colombatti, F., Gonzalez, D.H. y Welchen, E. (2014). *Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath?* *Mitochondrion* 19: 238-244.
- Colville, L. y Kranner, I. (2010). *Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols*. *Plant Growth Regulation* 62(3): 241-255.
- Considine, M.J. y Foyer, C.H. (2014). *Redox regulation of plant development*. *Antioxidants & redox signaling* 21(9): 1305-1326.
- Cosio, C. y Dunand, C. (2009). *Specific functions of individual class III peroxidase genes*. *Journal of experimental botany* 60(2): 391-408.
- Cruz de Carvalho, M.H. (2008). *Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling*. *Plant Signaling & Behavior* 3(3): 156-165.
- Csiszar, J., Galle, A., Horvath, E., Dancso, P., Gombos, M., Vary, Z. y col. (2012). *Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress*. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 52: 119-129.
- Cupples, C.G. y Miller, J.H. (1989). *A set of lacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of each of the six base substitutions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(14): 5345-5349.
- Curi, G.C., Chan, R.L. y Gonzalez, D.H. (2005). *The leader intron of Arabidopsis thaliana genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency*. *Journal of experimental botany* 56(419): 2563-2571.
- Cvetkovska, M., Alber, N.A. y Vanlerberghe, G.C. (2013). *The signaling role of a mitochondrial superoxide burst during stress*. *Plant Signaling & Behavior* 8(1): e22749.
- Cvetkovska, M. y Vanlerberghe, G.C. (2012). *Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide*. *The New phytologist* 195(1): 32-39.
- Cvetkovska, M. y Vanlerberghe, G.C. (2013). *Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species*. *Plant, cell & environment* 36(3): 721-732.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. y Scheible, W.R. (2005). *Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis*. *Plant physiology* 139(1): 5-17.
- Daglia, M. (2012). *Polyphenols as antimicrobial agents*. *Current opinion in biotechnology* 23(2):

- 174-181.
- Das, P.K., Geul, B., Choi, S.-B., Yoo, S.-D. y Park, Y.-I. (2011). *Photosynthesis-dependent anthocyanin pigmentation in arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 6(1): 23-25.
- Daszkowska-Golec, A. y Szarejko, I. (2013). *Open or Close the Gate – Stomata Action Under the Control of Phytohormones in Drought Stress Conditions*. *Frontiers in plant science* 4: 138.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. y Van Breusegem, F. (2000). *Dual action of the active oxygen species during plant stress responses*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57(5): 779-795.
- David, S.S., O'Shea, V.L. y Kundu, S. (2007). *Base-excision repair of oxidative DNA damage*. *Nature* 447(7147): 941-950.
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inze, D., Foyer, C.H. y Zhang, H. (2003). *An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 33(3): 543-555.
- De Vos, M., Van Zaanen, W., Koornneef, A., Korzelius, J.P., Dicke, M., Van Loon, L.C. y col. (2006). *Herbivore-Induced Resistance against Microbial Pathogens in Arabidopsis*. *Plant physiology* 142(1): 352-363.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M. y Barroso, J.B. (2006). *Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling*. *Plant physiology* 141(2): 330-335.
- Den Herder, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T. y De Smet, I. (2010). *The roots of a new green revolution*. *Trends in plant science* 15(11): 600-607.
- Denness, L., McKenna, J.F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M. y col. (2011). *Cell Wall Damage-Induced Lignin Biosynthesis Is Regulated by a Reactive Oxygen Species- and Jasmonic Acid-Dependent Process in Arabidopsis*. *Plant physiology* 156(3): 1364-1374.
- Derksen, H., Rampitsch, C. y Daayf, F. (2013). *Signaling cross-talk in plant disease resistance*. *Plant Science* 207: 79-87.
- Des Marais, D.L., Auchincloss, L.C., Sukamtoh, E., McKay, J.K., Logan, T., Richards, J.H. y col. (2014). *Variation in MPK12 affects water use efficiency in Arabidopsis and reveals a pleiotropic link between guard cell size and ABA response*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(7): 2836-2841.
- Desikan, R., Neill, S.J. y Hancock, J.T. (2000). *Hydrogen peroxide-induced gene expression in Arabidopsis thaliana*. *Free radical biology & medicine* 28(5): 773-778.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T. y Neill, S.J. (2001). *Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress*. *Plant physiology* 127(1): 159-172.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2011). *InfoStat*.
- Dickinson, B.C. y Chang, C.J. (2011). *Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses*. *Nature chemical biology* 7(8): 504-511.
- Dietz, K.-J., Jacob, S., Oelze, M.-L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M.N. y col. (2006). *The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism*. *Journal of experimental botany* 57(8): 1697-1709.
- Djebbar, R., Rzigui, T., Petriacq, P., Mauve, C., Priault, P., Fresneau, C. y col. (2012). *Respiratory complex I deficiency induces drought tolerance by impacting leaf stomatal and hydraulic*

- conductances*. *Planta* 235(3): 603-614.
- Doerks, T., Copley, R.R., Schultz, J., Ponting, C.P. y Bork, P. (2002). *Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions*. *Genome research* 12(1): 47-56.
- Domoki, M. (2005). *Oxidative stress tolerance and plant development: the functional characterization of the "oxprot" gene*. *Acta Biol. Szegediensis* 49(3-4): 45.
- Duan, L., Dietrich, D., Ng, C.H., Chan, P.M.Y., Bhalerao, R., Bennett, M.J. y col. (2013). *Endodermal ABA Signaling Promotes Lateral Root Quiescence during Salt Stress in Arabidopsis Seedlings*. *The Plant Cell* 25(1): 324-341.
- Dudek, J., Rehling, P. y van der Laan, M. (2013). *Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(2): 274-285.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M. y McDonald, J.H. (2011). *A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy*. *American journal of physiology. Cell physiology* 300(4): C723-742.
- Durand, M., Kolpak, A., Farrell, T., Elliott, N., Shao, W., Brown, M. y col. (2007). *The OXR domain defines a conserved family of eukaryotic oxidation resistance proteins*. *BMC Cell Biology* 8(1): 13.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J.V. y Gomez-Cadenas, A. (2005). *Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(22): 8437-8442.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. y col. (2006). *Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45(4): 616-629.
- Edgar, R.C. (2004). *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792-1797.
- El Oirdi, M., El Rahman, T.A., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M.C., Daayf, F. y col. (2011). *Botrytis cinerea Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato*. *The Plant Cell* 23(6): 2405-2421.
- Elliott, N.A. y Volkert, M.R. (2004). *Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans*. *Molecular and cellular biology* 24(8): 3180-3187.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. y von Heijne, G. (2000). *Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence*. *Journal of molecular biology* 300(4): 1005-1016.
- Essemine, J., Govindachary, S., Joly, D., Ammar, S., Bouzid, S. y Carpentier, R. (2012). *Effect of moderate and high light on photosystem II function in Arabidopsis thaliana depleted in digalactosyl-diacylglycerol*. *Biochimica et biophysica acta* 1817(8): 1367-1373.
- Estallo, E.L., Mas, G., Vergara-Cid, C., Lanfri, M.A., Luduena-Almeida, F., Scavuzzo, C.M. y col. (2013). *Spatial patterns of high Aedes aegypti oviposition activity in northwestern Argentina*. *PLoS One* 8(1): e54167.
- Eulgem, T. y Somssich, I.E. (2007). *Networks of WRKY transcription factors in defense signaling*. *Current opinion in plant biology* 10(4): 366-371.
- Falace, A., Filipello, F., La Padula, V., Vanni, N., Madia, F., De Pietri Tonelli, D. y col. (2010).

- TBC1D24, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy.* American journal of human genetics 87(3): 365-370.
- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S., Emiliani, J., Pourcel, L., Feller, A., Morohashi, K. y col. (2010). *Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase.* The Plant journal : for cell and molecular biology 62(1): 77-91.
- Fath, A., Bethke, P., Beligni, V. y Jones, R. (2002). *Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells.* Journal of experimental botany 53(372): 1273-1282.
- Finch-Savage, W.E. y Leubner-Metzger, G. (2006). *Seed dormancy and the control of germination.* The New phytologist 171(3): 501-523.
- Finkel, T. (2011). *Signal transduction by reactive oxygen species.* The Journal of cell biology 194(1): 7-15.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. y Steber, C. (2008). *Molecular aspects of seed dormancy.* Annual review of plant biology 59: 387-415.
- Finkelstein, R.R. y Gibson, S.I. (2002). *ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd?* Current opinion in plant biology 5(1): 26-32.
- Finkelstein, R.R. y Rock, C.D. (2002). *Abscisic Acid Biosynthesis and Response.* The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists 1: e0058.
- Fischer, A.M. (2012). *The Complex Regulation of Senescence.* Critical Reviews in Plant Sciences 31(2): 124-147.
- Fischer, H., Zhang, X.U., O'Brien, K.P., Kylsten, P. y Engvall, E. (2001). *C7, a novel nucleolar protein, is the mouse homologue of the Drosophila late puff product L82 and an isoform of human OXR1.* Biochem Biophys Res Commun 281(3): 795-803.
- Fones, H.N., Eyles, C.J., Bennett, M.H., Smith, J.A. y Preston, G.M. (2013). *Uncoupling of reactive oxygen species accumulation and defence signalling in the metal hyperaccumulator plant Noccaea caerulea.* The New phytologist 199(4): 916-924.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2000). *Tansley Review No. 112.* New Phytologist 146(3): 359-388.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2011). *Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub.* Plant physiology 155(1): 2-18.
- Franks, P.J., T, W.D.-A., Britton-Harper, Z.J. y Gray, J.E. (2015). *Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density.* The New phytologist 207(1): 188-195.
- Fresno, C., Llera, A.S., Girotti, R., Valacco, M.P., López, J.A., Podhajcer, O.L. y col. (2012). *The Multi-Reference Contrast Method: facilitating set enrichment analysis.* Computers in Biology and Medicine 42(2): 6.
- Fry, S.C. (1998). *Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals.* Biochemical Journal 332(Pt 2): 507-515.
- Fryer, M.J., Andrews, J.R., Oxborough, K., Blowers, D.A. y Baker, N.R. (1998). *Relationship between CO₂ Assimilation, Photosynthetic Electron Transport, and Active O₂ Metabolism in Leaves of Maize in the Field during Periods of Low Temperature.* Plant physiology 116(2): 571-580.
- Fu, Z.Q. y Dong, X. (2013). *Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense.* Annual review of plant biology 64: 839-863.
- Gao, Q. y Zhang, L. (2008). *Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc1 mutants of Arabidopsis thaliana.* Journal of

- plant physiology 165(2): 138-148.
- Gapper, C. y Dolan, L. (2006). *Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species*. Plant physiology 141(2): 341-345.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S. y col. (2004). *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome biology 5(10): R80.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T. y Yupsanis, T. (2010). *Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line*. Environmental and Experimental Botany 67(3): 487-494.
- Giehl, R.F.H., Gruber, B.D. y von Wirén, N. (2013). *It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals*. Journal of experimental botany. doi:10.1093/jxb/ert421.
- Gill, S.S. y Tuteja, N. (2010). *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale 48(12): 909-930.
- Gill, T., Sreenivasulu, Y., Kumar, S. y Singh Ahuja, P. (2010). *Over-expression of superoxide dismutase exhibits lignification of vascular structures in Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Physiology 167(9): 757-760.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L.F., Foley, R.C., Anderson, C.R., Carroll, A.J. y col. (2011). *Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(26): 10768-10773.
- Grandi, V., Gregis, V. y Kater, M.M. (2012). *Uncovering genetic and molecular interactions among floral meristem identity genes in Arabidopsis thaliana*. The Plant journal : for cell and molecular biology 69(5): 881-893.
- Gruber, B.D., Giehl, R.F.H., Friedel, S. y von Wirén, N. (2013). *Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies*. Plant physiology.
- Guillaumot, D., Guillon, S., Deplanque, T., Vanhee, C., Gumy, C., Masquelier, D. y col. (2009). *The Arabidopsis TSPO-related protein is a stress and abscisic acid-regulated, endoplasmic reticulum-Golgi-localized membrane protein*. The Plant journal : for cell and molecular biology 60(2): 242-256.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S. y Zhong, Q. (2006). *Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity*. Plant Physiology and Biochemistry 44(11-12): 828-836.
- Gupta, S.D. (2010). En: *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press Taylor and Francis Group. New York.
- Hachez, C., Veljanovski, V., Reinhardt, H., Guillaumot, D., Vanhee, C., Chaumont, F. y col. (2014). *The Arabidopsis abiotic stress-induced TSPO-related protein reduces cell-surface expression of the aquaporin PIP2;7 through protein-protein interactions and autophagic degradation*. 26(12): 4974-4990.
- Hackenberg, T., Juul, T., Auzina, A., Gwiżdż, S., Małolepszy, A., Van Der Kelen, K. y col. (2013). *Catalase and NO CATALASE ACTIVITY1 Promote Autophagy-Dependent Cell Death in Arabidopsis*. The Plant Cell Online.
- Hall, B.G. (2013). *Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA*. Mol Biol Evol

- 30(5): 1229-1235.
- Halliwell, B. (2006). *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life*. *Plant physiology* 141(2): 312-322.
- Hamanaka, R.B. y Chandel, N.S. (2010). *Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes*. *Trends in biochemical sciences* 35(9): 505-513.
- Han, H.J., Peng, R.H., Zhu, B., Fu, X.Y., Zhao, W., Shi, B. y col. (2014). *Gene expression profiles of Arabidopsis under the stress of methyl viologen: a microarray analysis*. *Molecular biology reports* 41(11): 7089-7102.
- Han, Y., Li, A., Li, F., Zhao, M. y Wang, W. (2012). *Characterization of a wheat (Triticum aestivum L.) expansin gene, TaEXPB23, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation*. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 54: 49-58.
- Hanahan, D. (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. *Journal of molecular biology* 166(4): 557-580.
- Hara, K., Kajita, R., Torii, K.U., Bergmann, D.C. y Kakimoto, T. (2007). *The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule*. *Genes & Development* 21(14): 1720-1725.
- Harris, J. (2015). *Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure*. *Plants* 4(3): 548.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M., Roychowdhury, R. y Fujita, M. (2013). *Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants*. *International Journal of Molecular Sciences* 14(5): 9643-9684.
- Hattori, T., Sonobe, K., Araki, H., Inanaga, S., An, P. y Morita, S. (2008). *Silicon Application by Sorghum Through the Alleviation of Stress-Induced Increase in Hydraulic Resistance*. *Journal of Plant Nutrition* 31(8): 1482-1495.
- Havir, E.A. (1992). *The in Vivo and in Vitro Inhibition of Catalase from Leaves of Nicotiana glauca by 3-Amino-1,2,4-Triazole*. *Plant physiology* 99(2): 533-537.
- Hege, T. y Baumann, U. (2001). *Protease C of Erwinia chrysanthemi: the crystal structure and role of amino acids Y228 and E189*. *Journal of molecular biology* 314(2): 187-193.
- Hell, K. (2008). *The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783(4): 601-609.
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P. y Sevilla, F. (2000). *Tolerance of pea (Pisum sativum L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences*. *Plant, cell & environment* 23(8): 853-862.
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P. y Holuigue, L. (2015). *Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression*. *Frontiers in plant science* 6: 171.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. y Prange, R.K. (1999). *Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds*. *Planta* 207(4): 604-611.
- Hu, W.H., Song, X.S., Shi, K., Xia, X.J., Zhou, Y.H. y Yu, J.Q. (2008). *Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling*. *Photosynthetica* 46(4): 581-

- 588.
- Huang, M. y Guo, Z. (2005). *Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity*. Biol Plant 49(1): 81-84.
- Huang, S., Taylor, N.L., Whelan, J. y Millar, A.H. (2009). *Refining the Definition of Plant Mitochondrial Presequences through Analysis of Sorting Signals, N-Terminal Modifications, and Cleavage Motifs*. Plant physiology 150(3): 1272-1285.
- Huijser, P. y Schmid, M. (2011). *The control of developmental phase transitions in plants*. Development (Cambridge, England) 138(19): 4117-4129.
- Hurley, B., Lee, D., Mott, A., Wilton, M., Liu, J., Liu, Y.C. y col. (2014). *The <italic>Pseudomonas syringae</italic> Type III Effector HopF2 Suppresses Arabidopsis Stomatal Immunity*. PLoS ONE 9(12): e114921.
- Ilk, N., Ding, J., Ichnatowicz, A., Koornneef, M. y Reymond, M. (2015). *Natural variation for anthocyanin accumulation under high-light and low-temperature stress is attributable to the ENHANCER OF AG-4 2 (HUA2) locus in combination with PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1 (PAP1) and PAP2*. The New phytologist 206(1): 422-435.
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T. y Morimitsu, Y. (2014). *Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables*. Breeding science 64(1): 48-59.
- Jannat, R., Uraji, M., Morofuji, M., Islam, M.M., Bloom, R.E., Nakamura, Y. y col. (2011). *Roles of intracellular hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells*. Journal of plant physiology 168(16): 1919-1926.
- Jaramillo-Gutierrez, G., Molina-Cruz, A., Kumar, S. y Barillas-Mury, C. (2010). *The Anopheles gambiae oxidation resistance 1 (OXR1) gene regulates expression of enzymes that detoxify reactive oxygen species*. PLoS One 5(6): e11168.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. (1987). *GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. The EMBO journal 6(13): 3901-3907.
- Jewaria, P.K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S. y col. (2013). *Differential effects of the peptides Stomagen, EPF1 and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level*. Plant & cell physiology 54(8): 1253-1262.
- Jia, F., Lo, N. y Ho, S.Y.W. (2014). *The Impact of Modelling Rate Heterogeneity among Sites on Phylogenetic Estimates of Intraspecific Evolutionary Rates and Timescales*. PLoS ONE 9(5): e95722.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J. y col. (2000). *Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis*. The EMBO journal 19(22): 6150-6161.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. y Madden, T.L. (2008). *NCBI BLAST: a better web interface*. Nucleic Acids Research 36(Web Server issue): W5-W9.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. y Thornton, J.M. (1992). *The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences*. Computer applications in the biosciences : CABIOS 8(3): 275-282.
- Jones, J.D. y Dangl, J.L. (2006). *The plant immune system*. Nature 444(7117): 323-329.
- Joo, J.H., Bae, Y.S. y Lee, J.S. (2001). *Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism*. Plant physiology 126(3): 1055-1060.

- Jouannet, V., Brackmann, K. y Greb, T. (2015). *(Pro)cambium formation and proliferation: two sides of the same coin?* Current opinion in plant biology 23: 54-60.
- Jovel, J., Walker, M. y Sanfacon, H. (2011). *Salicylic acid-dependent restriction of Tomato ringspot virus spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance.* Molecular plant-microbe interactions : MPMI 24(6): 706-718.
- Kagale, S., Koh, C., Nixon, J., Bollina, V., Clarke, W.E., Tuteja, R.y col. (2014). *The emerging biofuel crop Camelina sativa retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure.* Nat Commun 5.
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K.P., Lopez-Molina, L.y col. (2015). *Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination.* Nat Commun 6: 8113.
- Karaba, A., Dixit, S., Greco, R., Aharoni, A., Trijatmiko, K.R., Marsch-Martinez, N.y col. (2007). *Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(39): 15270-15275.
- Karimi, M., Inze, D. y Depicker, A. (2002). *GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.* Trends in plant science 7(5): 193-195.
- Karkonen, A. y Kuchitsu, K. (2014). *Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants.* Phytochemistry.
- Kawano, T. (2003). *Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction.* Plant Cell Rep 21(9): 829-837.
- Kazan, K. y Lyons, R. (2014). *Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors.* The Plant Cell 26(6): 2285-2309.
- Kazan, K. y Manners, J.M. (2009). *Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions.* Trends in plant science 14(7): 373-382.
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H.J., Rosenkranz, R.y col. (2007). *Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana.* Nature biotechnology 25(5): 593-599.
- Kellermeier, F., Armengaud, P., Seditas, T.J., Danku, J., Salt, D.E. y Amtmann, A. (2014). *Analysis of the Root System Architecture of Arabidopsis Provides a Quantitative Readout of Crosstalk between Nutritional Signals.* The Plant Cell 26(4): 1480-1496.
- Keunen, E., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J. y Cuypers, A. (2011). *Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria.* International Journal of Molecular Sciences 12(10): 6894-6918.
- Kieffer, F., Lherminier, J., Simon-Plas, F., Nicole, M., Paynot, M., Elmayan, T.y col. (2000). *The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension.* Journal of experimental botany 51(352): 1799-1811.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O.y col. (2007). *The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses.* The Plant journal : for cell and molecular biology 50(2): 347-363.
- Kim, B.H., Kim, S.Y. y Nam, K.H. (2012). *Genes encoding plant-specific class III peroxidases are responsible for increased cold tolerance of the brassinosteroid-insensitive 1 mutant.* Molecules and cells 34(6): 539-548.

- Kim, C., Meskauskiene, R., Zhang, S., Lee, K.P., Lakshmanan Ashok, M., Blajicka, K.y col. (2012). *Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway*. *Plant Cell* 24(7): 3026-3039.
- Kim, J.-H. y Lee, C.-H. (2003). *Mechanism for photoinactivation of PSII by methyl viologen at two temperatures in the leaves of rice (Oryza sativa L.)*. *Journal of Plant Biology* 46(1): 10-16.
- Kim, M.J., Ciani, S. y Schachtman, D.P. (2010). *A peroxidase contributes to ROS production during Arabidopsis root response to potassium deficiency*. *Molecular plant* 3(2): 420-427.
- Kim, Y.H., Kim, C.Y., Song, W.K., Park, D.S., Kwon, S.Y., Lee, H.S.y col. (2008). *Overexpression of sweetpotato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco*. *Planta* 227(4): 867-881.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D.y col. (2000). *Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16): 8849-8855.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D.y col. (2000). *Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(16): 8849-8855.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.-A. y Last, R.L. (1998). *Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization*. *Plant physiology* 118(2): 637-650.
- Koffler, B.E., Luschin-Ebengreuth, N., Stabentheiner, E., Müller, M. y Zechmann, B. (2014). *Compartment specific response of antioxidants to drought stress in Arabidopsis*. *Plant Science* 227(0): 133-144.
- Koornneef, M., Bentsink, L. y Hilhorst, H. (2002). *Seed dormancy and germination*. *Current opinion in plant biology* 5(1): 33-36.
- Kranner, I., Minibayeva, F.V., Beckett, R.P. y Seal, C.E. (2010). *What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science*. *New Phytologist* 188(3): 655-673.
- Kristensen, B.K., Askerlund, P., Bykova, N.V., Egsgaard, H. y Moller, I.M. (2004). *Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Phytochemistry* 65(12): 1839-1851.
- Kucera, B., Cohn, M.A. y Leubner-Metzger, G. (2005). *Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination*. *Seed Science Research* 15(04): 281-307.
- Kühn, K., Yin, G., Duncan, O., Law, S.R., Kubiszewski-Jakubiak, S., Kaur, P.y col. (2015). *Decreasing Electron Flux through the Cytochrome and/or Alternative Respiratory Pathways Triggers Common and Distinct Cellular Responses Dependent on Growth Conditions*. *Plant physiology* 167(1): 228-250.
- Kumar, D. y Klessig, D.F. (2003). *High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(26): 16101-16106.
- Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y.S., Meister, S.y col. (2003). *The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(24): 14139-14144.
- Kurek, I., Chang, T.K., Bertain, S.M., Madrigal, A., Liu, L., Lassner, M.W.y col. (2007). *Enhanced*

- Thermostability of Arabidopsis Rubisco Activase Improves Photosynthesis and Growth Rates under Moderate Heat Stress.* The Plant Cell 19(10): 3230-3241.
- Lee, I.H., Lee, I.C., Kim, J., Kim, J.H., Chung, E.H., Kim, H.J. y col. (2016). *NORE1/SAUL1 integrates temperature dependent defense programs involving SGT1b and PAD4 pathways and leaf senescence in Arabidopsis.* Physiol Plant.
- Lee, J. (2005). *Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study.* Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study 8(5): 9.
- Lee, J., Rennaker, C. y Wrolstad, R.E. (2008). *Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods.* Food Chemistry 110(3): 782-786.
- Leidig, C., Thoms, M., Holdermann, I., Bradatsch, B., Berninghausen, O., Bange, G. y col. (2014). *60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle.* Nat Commun 5: 3491.
- Leon-Reyes, A., Spoel, S.H., De Lange, E.S., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S. y col. (2009). *Ethylene Modulates the Role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in Cross Talk between Salicylate and Jasmonate Signaling.* Plant physiology 149(4): 1797-1809.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R. y Lamb, C. (1996). *Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response.* Current biology : CB 6(4): 427-437.
- Li, C.R., Liang, D.D., Li, J., Duan, Y.B., Li, H., Yang, Y.C. y col. (2013). *Unravelling mitochondrial retrograde regulation in the abiotic stress induction of rice ALTERNATIVE OXIDASE 1 genes.* Plant, cell & environment 36(4): 775-788.
- Li, J., Liu, J., Wang, G., Cha, J.-Y., Li, G., Chen, S. y col. (2015). *A Chaperone Function of NO CATALASE ACTIVITY1 Is Required to Maintain Catalase Activity and for Multiple Stress Responses in Arabidopsis.* The Plant Cell 27(3): 908-925.
- Lim, P.O., Kim, H.J. y Nam, H.G. (2007). *Leaf senescence.* Annual review of plant biology 58: 115-136.
- Lin, C. y Kao, C. (2001). *Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings.* Plant and Soil 230(1): 135-143.
- Linka, N. y Theodoulou, F.L. (2013). *Metabolite transporters of the plant peroxisomal membrane: known and unknown.* Sub-cellular biochemistry 69: 169-194.
- Liu, F., Zhao, Q., Mano, N., Ahmed, Z., Nitschke, F., Cai, Y. y col. (2016). *Modification of starch metabolism in transgenic Arabidopsis thaliana increases plant biomass and triples oilseed production.* Plant biotechnology journal 14(3): 976-985.
- Liu, P.-P., von Dahl, C.C., Park, S.-W. y Klessig, D.F. (2011). *Interconnection between Methyl Salicylate and Lipid-Based Long-Distance Signaling during the Development of Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis and Tobacco.* Plant physiology 155(4): 1762-1768.
- Liu, T., Van Staden, J. y Cress, W. (2000). *Salinity induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of soybean (Glycine max (L.)) roots.* Plant growth regulation 30(1): 49-54.
- Ljung, K. (2013). *Auxin metabolism and homeostasis during plant development.* Development 140(5): 943-950.

- Locato, V., de Pinto, M.C. y De Gara, L. (2009). *Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses*. *Physiol Plant* 135(3): 296-306.
- Logan, B.A., Kornyejev, D., Hardison, J. y Holaday, A.S. (2006). *The role of antioxidant enzymes in photoprotection*. *Photosynthesis research* 88(2): 119-132.
- Long, S.P., Zhu, X.G., Naidu, S.L. y Ort, D.R. (2006). *Can improvement in photosynthesis increase crop yields?* *Plant, cell & environment* 29(3): 315-330.
- Lopez-Bucio, J., Cruz-Ramirez, A. y Herrera-Estrella, L. (2003). *The role of nutrient availability in regulating root architecture*. *Current opinion in plant biology* 6(3): 280-287.
- López-Huertas, E., Corpas, F.J., Sandalio, L.M. y Del Río, L.A. (1999). *Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation*. *Biochemical Journal* 337(3): 531-536.
- Lozano-Durán, R., Bourdais, G., He, S.Y. y Robatzek, S. (2014). *The bacterial effector HopM1 suppresses PAMP-triggered oxidative burst and stomatal immunity*. *New Phytologist* 202(1): 259-269.
- Lu, D., Wang, T., Persson, S., Mueller-Roeber, B. y Schippers, J.H.M. (2014). *Transcriptional control of ROS homeostasis by KUODA1 regulates cell expansion during leaf development*. *Nat Commun* 5.
- Lu, P., Kang, M., Jiang, X., Dai, F., Gao, J. y Zhang, C. (2013). *RhEXPA4, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to Arabidopsis*. *Planta* 237(6): 1547-1559.
- MacAdam, J.W. y Grabber, J.H. (2002). *Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and p-coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades*. *Planta* 215(5): 785-793.
- Maheshwari, R. y Dubey, R.S. (2009). *Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings*. *Plant Growth Regulation* 59(1): 37-49.
- Maia, J.M., Voigt, E.L., Ferreira-Silva, S.L., V. Fontenele, A., Macêdo, C.E.C. y Silveira, J.A.G. (2013). *Differences in Cowpea Root Growth Triggered by Salinity and Dehydration are Associated with Oxidative Modulation Involving Types I and III Peroxidases and Apoplasmic Ascorbate*. *Journal of Plant Growth Regulation* 32(2): 376-387.
- Malamy, J.E. (2005). *Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture*. *Plant, cell & environment* 28(1): 67-77.
- Massonnet, C., Vile, D., Fabre, J., Hannah, M.A., Caldana, C., Lisec, J. y col. (2010). *Probing the Reproducibility of Leaf Growth and Molecular Phenotypes: A Comparison of Three Arabidopsis Accessions Cultivated in Ten Laboratories*. *Plant physiology* 152(4): 2142-2157.
- Matros, A., Peshev, D., Peukert, M., Mock, H.P. y Van den Ende, W. (2015). *Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 82(5): 822-839.
- Matsuo, N., Ozawa, K. y Mochizuki, T. (2008). *Genotypic differences in root hydraulic conductance of rice (Oryza sativa L.) in response to water regimes*. *Plant and Soil* 316(1): 25-34.
- Mazza, C.A., Boccalandro, H.E., Giordano, C.V., Battista, D., Scopel, A.L. y Ballare, C.L. (2000). *Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing*

- sunscreens in field-grown soybean crops*. *Plant physiology* 122(1): 117-126.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N. y col. (2013). *Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI*. *Nucleic Acids Research* 41(W1): W597-W600.
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J. y col. (2008). *A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interaction with the COI1 F-box protein*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55(6): 979-988.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. y He, S.Y. (2006). *Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion*. *Cell* 126(5): 969-980.
- Meriga, B., Reddy, B.K., Rao, K.R., Reddy, L.A. y Kishor, P.K. (2004). *Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (Oryza sativa)*. *Journal of plant physiology* 161(1): 63-68.
- Merksamer, P.I., Liu, Y., He, W., Hirschev, M.D., Chen, D. y Verdin, E. (2013). *The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link*. *Aging* 5(3): 144-150.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. y Noctor, G. (2010). *Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models*. *Journal of experimental botany* 61(15): 4197-4220.
- Michaels, M.L., Pham, L., Cruz, C. y Miller, J.H. (1991). *MutM, a protein that prevents G.C----T.A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase*. *Nucleic Acids Res* 19(13): 3629-3632.
- Millar, A.H. y Leaver, C.J. (2000). *The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria*. *FEBS letters* 481(2): 117-121.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V. y col. (2009). *The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli*. *Science signaling* 2(84): ra45.
- Mishra, P., Bhoomika, K. y Dubey, R.S. (2013). *Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (Oryza sativa L.) seedlings*. *Protoplasma* 250(1): 3-19.
- Mishra, S., and y Dubey, R.S. (2005). En: *Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants*. Fla, USA. p. 845–863. CRC Press, Taylor and Francis Publishing Company, Fla, USA, 2nd edition.
- Misyura, M., Colasanti, J. y Rothstein, S.J. (2012). *Physiological and genetic analysis of Arabidopsis thaliana anthocyanin biosynthesis mutants under chronic adverse environmental conditions*. *Journal of experimental botany*.
- Mitra, P., Pal, A.K., Basu, D. y Hati, R.N. (1994). *A staining procedure using Coomassie brilliant blue G-250 in phosphoric acid for detection of protein bands with high resolution in polyacrylamide gel and nitrocellulose membrane*. *Anal Biochem* 223(2): 327-329.
- Mittler, R. (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. *Trends in plant science* 7(9): 405-410.
- Mittler, R. y Blumwald, E. (2010). *Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives*. *Annual review of plant biology* 61: 443-462.
- Mittler, R. y Blumwald, E. (2015). *The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation*. *The Plant Cell* 27(1): 64-70.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. y Van Breusegem, F. (2004). *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends in plant science 9(10): 490-498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K. y col. (2011). *ROS signaling: the new wave?* Trends in plant science 16(6): 300-309.
- Moller, I.M. (2001). *Plant mitochondrial and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species*. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 52: 561-591.
- Møller, I.M. y Kristensen, B.K. (2004). *Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator*. Photochemical & Photobiological Sciences 3(8): 730-735.
- Moller, I.M. y Sweetlove, L.J. (2010). *ROS signalling--specificity is required*. Trends in plant science 15(7): 370-374.
- Moreno-Sanchez, R., Hernandez-Esquivel, L., Rivero-Segura, N.A., Marin-Hernandez, A., Neuzil, J., Ralph, S.J. y col. (2013). *Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I*. The FEBS journal 280(3): 927-938.
- Morgan, M.J., Lehmann, M., Schwarzländer, M., Baxter, C.J., Sienkiewicz-Porzucek, A., Williams, T.C.R. y col. (2008). *Decrease in Manganese Superoxide Dismutase Leads to Reduced Root Growth and Affects Tricarboxylic Acid Cycle Flux and Mitochondrial Redox Homeostasis*. Plant physiology 147(1): 101-114.
- Moussa, H.R.a.A.-A., S.M. (2008). *Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress*. Australian Journal of Crop Science 1(1): 31-36.
- Mubarakshina, M.M., Ivanov, B.N., Naydov, I.A., Hillier, W., Badger, M.R. y Krieger-Liszkay, A. (2010). *Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signalling*. Journal of experimental botany 61(13): 3577-3587.
- Müller, K., Carstens, A.C., Linkies, A., Torres, M.A. y Leubner-Metzger, G. (2009). *The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening*. New Phytologist 184(4): 885-897.
- Mullineaux, P. y Karpinski, S. (2002). *Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast*. Current opinion in plant biology 5(1): 43-48.
- Munekage, Y., Takeda, S., Endo, T., Jahns, P., Hashimoto, T. y Shikanai, T. (2001). *Cytochrome b(6)f mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in Arabidopsis*. The Plant journal : for cell and molecular biology 28(3): 351-359.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. y Wasternack, C. (2006). *The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death*. Plant physiology 140(1): 249-262.
- Muradoglu, F., Gundogdu, M., Ercisli, S., Encu, T., Balta, F., Jaafar, H.Z.E. y col. (2015). *Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry*. Biological Research 48(1): 11.
- Murcha, M.W., Kmiec, B., Kubiszewski-Jakubiak, S., Teixeira, P.F., Glaser, E. y Whelan, J. (2014). *Protein import into plant mitochondria: signals, machinery, processing, and regulation*. Journal of experimental botany 65(22): 6301-6335.
- Murchie, E.H. y Lawson, T. (2013). *Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications*. Journal of experimental botany 64(13): 3983-

- 3998.
- Murphy, K.C. y Volkert, M.R. (2012). *Structural/functional analysis of the human OXR1 protein: identification of exon 8 as the anti-oxidant encoding function*. BMC molecular biology 13: 26.
- Murphy, M.P. (2009). *How mitochondria produce reactive oxygen species*. The Biochemical journal 417(1): 1-13.
- Murray, A.R., Chen, Q., Takahashi, Y., Zhou, K.K., Park, K. y Ma, J.X. (2013). *MicroRNA-200b downregulates oxidation resistance 1 (Oxr1) expression in the retina of type 1 diabetes model*. Investigative ophthalmology & visual science 54(3): 1689-1697.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K. y col. (2007). *Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 71(8): 2095-2100.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2003). *ABA action and interactions in seeds*. Trends in plant science 8(5): 213-217.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M. y Kamiya, Y. (2010). *Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination*. Seed Science Research 20(02): 55-67.
- Nanda, A.K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N. y Dunand, C. (2010). *Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions*. Journal of integrative plant biology 52(2): 195-204.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. y Jacquot, J.-P. (2007). *Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria*. Physiologia Plantarum 129(1): 185-195.
- Neill, S., Desikan, R. y Hancock, J. (2002). *Hydrogen peroxide signalling*. Current opinion in plant biology 5(5): 388-395.
- Nixon, P.J. (2000). *Chlororespiration*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 355(1402): 1541-1547.
- Noctor, G. y Foyer, C.H. (1998). *Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control*. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 49: 249-279.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. y Foyer, C.H. (2002). *Drought and Oxidative Load in the Leaves of C(3) Plants: a Predominant Role for Photorespiration?* Annals of Botany 89(7): 841-850.
- Noh, Y.-S. y Amasino, R.M. (1999). *Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12*. Plant Molecular Biology 41(2): 181-194.
- Oberholzer, A.E., Bumann, M., Hege, T., Russo, S. y Baumann, U. (2009). *Metzincin's canonical methionine is responsible for the structural integrity of the zinc-binding site*. Biological chemistry 390(9): 875-881.
- O'Connell, J. (2002). *The basics of RT-PCR. Some practical considerations*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 193: 19-25.
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T. y Nakamura, K. (2001). *Effects of sugar on vegetative development and floral transition in Arabidopsis*. Plant physiology 127(1): 252-261.
- Ok, S.H., Yoo, K.S. y Shin, J.S. (2012). *CBSXs are sensor relay proteins sensing adenosine-containing ligands in Arabidopsis*. Plant Signal Behav 7(6): 664-667.

- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N. y col. (2006). *CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis*. *Plant physiology* 141(1): 97-107.
- Oliver, P.L., Finelli, M.J., Edwards, B., Bitoun, E., Butts, D.L., Becker, E.B. y col. (2011). *Oxr1 is essential for protection against oxidative stress-induced neurodegeneration*. *PLoS genetics* 7(10): e1002338.
- Onda, Y. (2013). *Oxidative Protein-Folding Systems in Plant Cells*. *International Journal of Cell Biology* 2013: 585431.
- Ooms, G., Hooykaas, P.J., Van Veen, R.J., Van Beelen, P., Regensburg-Tuink, T.J. y Schilperoort, R.A. (1982). *Octopine Ti-plasmid deletion mutants of agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region*. *Plasmid* 7(1): 15-29.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F. y Bailly, C. (2009). *The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination*. *Plant physiology* 150(1): 494-505.
- Orozco-Cárdenas, M.L., Narváez-Vásquez, J. y Ryan, C.A. (2001). *Hydrogen Peroxide Acts as a Second Messenger for the Induction of Defense Genes in Tomato Plants in Response to Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate*. *The Plant Cell* 13(1): 179-192.
- Ou, Q. y King-Jones, K. (2013). *What goes up must come down: transcription factors have their say in making ecdysone pulses*. *Current topics in developmental biology* 103: 35-71.
- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B. y Sekmen, A.H. (2014). *Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*.
- Pandey, M., Srivastava, A.K., D'Souza, S.F. y Penna, S. (2013). *Thiourea, a ROS scavenger, regulates source-to-sink relationship to enhance crop yield and oil content in Brassica juncea (L.)*. *PLoS One* 8(9): e73921.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. y Dunand, C. (2005). *Peroxidases have more functions than a Swiss army knife*. *Plant Cell Rep* 24(5): 255-265.
- Passardi, F., Penel, C. y Dunand, C. (2004). *Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall*. *Trends in plant science* 9(11): 534-540.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J. y Flors, V. (2013). *Primed plants do not forget*. *Environmental and Experimental Botany* 94(0): 46-56.
- Pechanova, O., Hsu, C.Y., Adams, J.P., Pechan, T., Vandervelde, L., Drnevich, J. y col. (2010). *Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar*. *BMC genomics* 11: 674.
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertova, D. y col. (2006). *PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux*. *Science* 312(5775): 914-918.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. y Van Wees, S.C. (2012). *Hormonal modulation of plant immunity*. *Annual review of cell and developmental biology* 28: 489-521.
- Piisila, M., Keceli, M.A., Brader, G., Jakobson, L., Joesaar, I., Sipari, N. y col. (2015). *The F-box protein MAX2 contributes to resistance to bacterial phytopathogens in Arabidopsis*

- thaliana*. BMC Plant Biol 15: 53.
- Popova, A.V., Rausch, S., Hundertmark, M., Gibon, Y. y Hinch, D.K. (2015). *The intrinsically disordered protein LEA7 from Arabidopsis thaliana protects the isolated enzyme lactate dehydrogenase and enzymes in a soluble leaf proteome during freezing and drying*. Biochimica et biophysica acta.
- Qi, D. y Innes, R.W. (2013). *Recent Advances in Plant NLR Structure, Function, Localization, and Signaling*. Frontiers in Immunology 4: 348.
- Radyuk, M.S., Domanskaya, I.N., Shcherbakov, R.A. y Shalygo, N.V. (2009). *Effect of low above-zero temperature on the content of low-molecular antioxidants and activities of antioxidant enzymes in green barley leaves*. Russ J Plant Physiol 56(2): 175-180.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C. y col. (2012). *Seed germination and vigor*. Annual review of plant biology 63: 507-533.
- Ramegowda, V. y Senthil-Kumar, M. (2015). *The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination*. Journal of Plant Physiology 176(0): 47-54.
- Ranjan, A., Pandey, N., Lakhwani, D., Dubey, N.K., Pathre, U.V. y Sawant, S.V. (2012). *Comparative transcriptomic analysis of roots of contrasting Gossypium herbaceum genotypes revealing adaptation to drought*. BMC genomics 13: 680.
- Renew, S., Heyno, E., Schopfer, P. y Liskay, A. (2005). *Sensitive detection and localization of hydroxyl radical production in cucumber roots and Arabidopsis seedlings by spin trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy*. The Plant journal : for cell and molecular biology 44(2): 342-347.
- Reunov, A.V. (2014). *Plant peroxisomes: The role in metabolism of reactive oxygen species and the processes they mediate*. Biol Bull Rev 4(4): 311-322.
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C. y Siedow, J.N. (2006). *Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling*. Plant physiology 141(2): 357-366.
- Richardson, L.G. y Torii, K.U. (2013). *Take a deep breath: peptide signalling in stomatal patterning and differentiation*. Journal of experimental botany 64(17): 5243-5251.
- Richardson, P.M. y Zon, L.I. (1995). *Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the tre-2 oncogene and the yeast cell cycle regulators BUB2 and cdc16*. Oncogene 11(6): 1139-1148.
- Robinson, S.J., Tang, L.H., Mooney, B.A., McKay, S.J., Clarke, W.E., Links, M.G. y col. (2009). *An archived activation tagged population of Arabidopsis thaliana to facilitate forward genetics approaches*. BMC Plant Biology 9(1): 1-15.
- Rodriguez, R. y Redman, R. (2005). *Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(9): 3175-3176.
- Rogozin, I.B., Sverdlov, A.V., Babenko, V.N. y Koonin, E.V. (2005). *Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes*. Briefings in bioinformatics 6(2): 118-134.
- Rosas, U., Cibrian-Jaramillo, A., Ristova, D., Banta, J.A., Gifford, M.L., Fan, A.H. y col. (2013). *Integration of responses within and across Arabidopsis natural accessions uncovers loci controlling root systems architecture*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110(37): 15133-15138.

- Rose, J.K., Braam, J., Fry, S.C. y Nishitani, K. (2002). *The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature*. *Plant & cell physiology* 43(12): 1421-1435.
- Rurek, M. (2014). *Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions*. *Mitochondrion* 19, Part B(0): 289-294.
- Ryngajllo, M., Childs, L., Lohse, M., Giorgi, F.M., Lude, A., Selbig, J.y col. (2011). *SLocX: Predicting Subcellular Localization of Arabidopsis Proteins Leveraging Gene Expression Data*. *Frontiers in plant science* 2: 43.
- Sambrook, J.F., E. y Maniatis, (1989). En: *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Pelletier, G.y col. (2002). *FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of Arabidopsis thaliana T-DNA transformants*. *Nucleic Acids Research* 30(1): 94-97.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Luis, A. y Romero-Puertas, M.C. (2009). *Reactive oxygen species and signaling in cadmium toxicity*. En: *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling* (Eds.:Springer, p. 175-189.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M.y col. (2005). *A gene expression map of Arabidopsis thaliana development*. *Nature genetics* 37(5): 501-506.
- Schopfer, P. (2001). *Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth*. *The Plant journal* 28(6): 679-688.
- Schwarzlander, M., Konig, A.C., Sweetlove, L.J. y Finkemeier, I. (2012). *The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses*. *Journal of experimental botany* 63(4): 1735-1750.
- Schwedes, C.C. y Carney, G.E. (2012). *Ecdysone signaling in adult Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology* 58(3): 293-302.
- Sekmen, A.H., Turkan, I. y Takio, S. (2007). *Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant Plantago maritima and salt-sensitive Plantago media*. *Physiol Plant* 131(3): 399-411.
- Semchuk, N.M., Lushchak, V., Falk, J., Krupinska, K. y Lushchak, V.I. (2009). *Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(5): 384-390.
- Sena, L.A. y Chandel, N.S. (2012). *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. *Molecular cell* 48(2): 158-167.
- Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S. y Dubey, R. (2001). *Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings*. *Plant Science* 161(6): 1135-1144.
- Shapiro, B., Rambaut, A. y Drummond, A.J. (2006). *Choosing Appropriate Substitution Models for the Phylogenetic Analysis of Protein-Coding Sequences*. *Molecular Biology and Evolution* 23(1): 7-9.
- Sharma, P. y Dubey, R. (2005). *Drought Induces Oxidative Stress and Enhances the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings*. *Plant Growth Regulation* 46(3): 209-221.
- Sharma, P. y Dubey, R. (2007). *Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum*. *Plant cell reports* 26(11): 2027-2038.

- Sharma, P., Jha, A., Dubey, R. y Pessaraki, M. (2010). *Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic stresses*. Handbook of Plant and Crop Stress: 89-138.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. y Pessaraki, M. (2012). *Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions*. Journal of Botany 2012: 26.
- Sharma, S.S. y Dietz, K.J. (2009). *The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance*. Trends in plant science 14(1): 43-50.
- Shi, M.-Z. y Xie, D.-Y. (2014). *Biosynthesis and Metabolic Engineering of Anthocyanins in Arabidopsis thaliana*. Recent Patents on Biotechnology 8(1): 47-60.
- Shigeoka, S. y Maruta, T. (2014). *Cellular redox regulation, signaling, and stress response in plants*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 78(9): 1457-1470.
- Shkolnik, K., Ben-Dor, S., Galiani, D., Hourvitz, A. y Dekel, N. (2008). *Molecular characterization and bioinformatics analysis of Ncoa7B, a novel ovulation-associated and reproduction system-specific Ncoa7 isoform*. Reproduction (Cambridge, England) 135(3): 321-333.
- Sideris, D.P., Petrakis, N., Katrakili, N., Mikropoulou, D., Gallo, A., Ciofi-Baffoni, S. y col. (2009). *A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding*. The Journal of cell biology 187(7): 1007-1022.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W. y col. (2011). *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Molecular systems biology 7: 539.
- Signora, L., De Smet, I., Foyer, C.H. y Zhang, H. (2001). *ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis*. The Plant journal : for cell and molecular biology 28(6): 655-662.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A. y Levi-Schaffer, F. (2000). *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis : an international journal on programmed cell death 5(5): 415-418.
- Šimonovičová, M., Huttová, J., Mistrík, I., Široká, B. y Tamás, L. (2004). *Peroxidase mediated hydrogen peroxide production in barley roots grown under stress conditions*. Plant Growth Regulation 44(3): 267-275.
- Sinclair, T.R., Purcell, L.C. y Sneller, C.H. (2004). *Crop transformation and the challenge to increase yield potential*. Trends in plant science 9(2): 70-75.
- Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E. y Obinger, C. (2006). *Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG)*. Journal of inorganic biochemistry 100(4): 568-585.
- Smyth, G.K. (2004). *Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology 3(1).
- Spieß, G.M. y Zolman, B.K. (2013). *Peroxisomes as a source of auxin signaling molecules*. Sub-cellular biochemistry 69: 257-281.
- Spiteller, P., Kern, W., Reiner, J. y Spiteller, G. (2001). *Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid*. Biochimica et biophysica acta 1531(3): 188-208.
- Stivala, A., Wybrow, M., Wirth, A., Whisstock, J.C. y Stuckey, P.J. (2011). *Automatic generation of protein structure cartoons with Pro-origami*. Bioinformatics 27(23): 3315-3316.

- Stotz, H.U., Thomson, J.G. y Wang, Y. (2009). *Plant defensins: Defense, development and application*. Plant Signaling & Behavior 4(11): 1010-1012.
- Stowers, R.S., Russell, S. y Garza, D. (1999). *The 82F late puff contains the L82 gene, an essential member of a novel gene family*. Developmental biology 213(1): 116-130.
- Sugano, S.S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M. y col. (2010). *Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis*. Nature 463(7278): 241-244.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. y Miller, G. (2012). *ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress*. Plant, cell & environment 35(2): 259-270.
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeno, A. y Ros, J. (2006). *Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast*. Anal Biochem 351.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. y Kumar, S. (2013). *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. Mol Biol Evol 30(12): 2725-2729.
- Tanou, G., Molassiotis, A. y Diamantidis, G. (2009). *Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity*. Environmental and Experimental Botany 65(2-3): 270-281.
- Team, R.C. (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing
- Teixeira, P.F. y Glaser, E. (2013). *Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1833(2): 360-370.
- Tenhaken, R. (2014). *Cell wall remodeling under abiotic stress*. Frontiers in plant science 5: 771.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P. y col. (2004). *MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes*. The Plant journal : for cell and molecular biology 37(6): 914-939.
- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.A., Murphy, G. y col. (1999). *Multiple Independent Defective Suppressor-mutator Transposon Insertions in Arabidopsis: A Tool for Functional Genomics*. The Plant Cell 11(10): 1841-1852.
- Todaka, D., Nakashima, K., Maruyama, K., Kidokoro, S., Osakabe, Y., Ito, Y. y col. (2012). *Rice phytochrome-interacting factor-like protein OsPIL1 functions as a key regulator of internode elongation and induces a morphological response to drought stress*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(39): 15947-15952.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I. y col. (2010). *Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance*. Plant Cell 22(8): 2660-2679.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H. y Simon, P. (2002). *Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana*. Gene 288(1-2): 129-138.
- Torres, M.A. (2010). *ROS in biotic interactions*. Physiol Plant 138(4): 414-429.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. y Jones, J.D. (2002). *Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(1): 517-522.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G. y Dangl, J.L. (2006). *Reactive Oxygen Species Signaling in Response to*

- Pathogens*. Plant physiology 141(2): 373-378.
- Tripathy, B.C. y Oelmüller, R. (2012). *Reactive oxygen species generation and signaling in plants*. Plant Signaling & Behavior 7(12): 1621-1633.
- Uddin, M.N., Hanstein, S., Faust, F., Eitenmuller, P.T., Pitann, B. y Schubert, S. (2014). *Diferulic acids in the cell wall may contribute to the suppression of shoot growth in the first phase of salt stress in maize*. Phytochemistry 102: 126-136.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. y Mahajan, R.T. (2009). *Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options*. Current Neuropharmacology 7(1): 65-74.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Gomez-Rodriguez, M.V., Chaki, M., Pedrajas, J.R. y col. (2006). *The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants*. Plant, cell & environment 29(7): 1449-1459.
- Valerio, L., De Meyer, M., Penel, C. y Dunand, C. (2004). *Expression analysis of the Arabidopsis peroxidase multigenic family*. Phytochemistry 65(10): 1331-1342.
- Van Breusegem, F., Bailey-Serres, J. y Mittler, R. (2008). *Unraveling the Tapestry of Networks Involving Reactive Oxygen Species in Plants*. Plant physiology 147(3): 978-984.
- van Doorn, W.G. (2008). *Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels?* Journal of experimental botany 59(8): 1963-1972.
- van Loon, L.C., Rep, M. y Pieterse, C.M. (2006). *Significance of inducible defense-related proteins in infected plants*. Annual review of phytopathology 44: 135-162.
- Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., van de Cotte, B., Morsa, S., Ravanat, J.L. y col. (2011). *Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(4): 1711-1716.
- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M. y Castresana, C. (2010). *Emerging Complexity in Reactive Oxygen Species Production and Signaling during the Response of Plants to Pathogens*. Plant physiology 154(2): 444-448.
- Vickers, C.E., Gershenzon, J., Lerdau, M.T. y Loreto, F. (2009). *A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress*. Nature chemical biology 5(5): 283-291.
- Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sossé, B. y Badot, P.-M. (2002). *Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants*. Plant Science 163(1): 53-58.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A. y Klessig, D.F. (2009). *Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease*. Annual review of phytopathology 47: 177-206.
- Vogelmann, K., Drechsel, G., Bergler, J., Subert, C., Philippar, K., Soll, J. y col. (2012). *Early senescence and cell death in Arabidopsis saul1 mutants involves the PAD4-dependent salicylic acid pathway*. Plant physiology.
- Vogt, T. (2010). *Phenylpropanoid biosynthesis*. Molecular plant 3(1): 2-20.
- Volkert, K., Debast, S., Voll, L.M., Voll, H., Schiessl, I., Hofmann, J. y col. (2014). *Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in Arabidopsis thaliana limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis*. Journal of experimental botany 65(18): 5217-5229.
- Volkert, M.R., Elliott, N.A. y Housman, D.E. (2000). *Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences

- of the United States of America 97(26): 14530-14535.
- Volkert, M.R., Wang, J.Y. y Elliott, N.A. (2008). *A functional genomics approach to identify and characterize oxidation resistance genes*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 477: 331-342.
- Wakabayashi, K., Soga, K. y Hoson, T. (2012). *Phenylalanine ammonia-lyase and cell wall peroxidase are cooperatively involved in the extensive formation of ferulate network in cell walls of developing rice shoots*. *J Plant Physiol* 169(3): 262-267.
- Wang, S., Liang, D., Li, C., Hao, Y., Ma, F. y Shu, H. (2012). *Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks*. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 51: 81-89.
- Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R. y Hawkins, S. (2013). *Plant cell wall lignification and monolignol metabolism*. *Frontiers in plant science* 4: 220.
- Wang, Z., Berkey, C.D. y Watnick, P.I. (2012). *The Drosophila protein mustard tailors the innate immune response activated by the immune deficiency pathway*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 188(8): 3993-4000.
- Wasternack, C. y Hause, B. (2013). *Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111(6): 1021-1058.
- Welchen, E., Gonzalez, D.H., Ceccoli, G. y Colombatti, F. (2015). *Oxidative resistance chimeric genes and proteins, and transgenic plants including the same*. Google Patents.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. y Provart, N.J. (2007). *An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets*. *PLoS ONE* 2(8): e718.
- Wojtyla, L., Garnczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L. y Jurga, S. (2006). *A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds*. *J Plant Physiol* 163(12): 1207-1220.
- Xiong, L., Schumaker, K.S. y Zhu, J.-K. (2002). *Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress*. *The Plant Cell* 14(suppl 1): S165-S183.
- Xu, E. y Brosche, M. (2014). *Salicylic acid signaling inhibits apoplastic reactive oxygen species signaling*. *BMC Plant Biol* 14: 155.
- Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., Toyoda, Y., Tanaka, K. y Sugimoto, Y. (2008). *Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants*. *Plant physiology and biochemistry* 46(8): 786-793.
- Yan, J., Tsuichihara, N., Etoh, T. y Iwai, S. (2007). *Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening*. *Plant, cell & environment* 30(10): 1320-1325.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. y Zhang, Y. (2015). *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction*. *Nature methods* 12(1): 7-8.
- Yang, Y., Bazhin, A.V., Werner, J. y Karakhanova, S. (2013). *Reactive oxygen species in the immune system*. *International reviews of immunology* 32(3): 249-270.
- Yang, Z. (1993). *Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites*. *Mol Biol Evol* 10(6): 1396-1401.
- Yang, Z. (1994). *Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable*

- rates over sites: approximate methods*. Journal of molecular evolution 39(3): 306-314.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T. y col. (2008). *Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in Arabidopsis*. The Plant Cell 20(6): 1678-1692.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. y Madden, T.L. (2012). *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC bioinformatics 13: 134.
- Yeh, C.M., Chien, P.S. y Huang, H.J. (2007). *Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots*. Journal of experimental botany 58(3): 659-671.
- Yoo, K.S., Ok, S.H., Jeong, B.C., Jung, K.W., Cui, M.H., Hyung, S. y col. (2011). *Single cystathionine beta-synthase domain-containing proteins modulate development by regulating the thioredoxin system in Arabidopsis*. Plant Cell 23(10): 3577-3594.
- Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J. y col. (2002). *ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis*. Plant & cell physiology 43(12): 1473-1483.
- Yoshida, S. (2003). *Molecular regulation of leaf senescence*. Current opinion in plant biology 6(1): 79-84.
- Yuasa, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T. y Shinozaki, K. (2001). *Oxidative stress activates ATMPK6, an Arabidopsis homologue of MAP kinase*. Plant & cell physiology 42(9): 1012-1016.
- Zagorchev, L., Seal, C.E., Kranner, I. y Odjakova, M. (2013). *A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress*. International Journal of Molecular Sciences 14(4): 7405-7432.
- Zarei, A., Korbes, A.P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A. y Memelink, J. (2011). *Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis*. Plant Mol Biol 75(4-5): 321-331.
- Zechmann, B. (2014). *Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress*. Frontiers in plant science 5: 566.
- Zentgraf, U., Laun, T. y Miao, Y. (2010). *The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of Arabidopsis thaliana*. European journal of cell biology 89(2-3): 133-137.
- Zhang, S., Apel, K. y Kim, C. (2014). *Singlet oxygen-mediated and EXECUTER-dependent signalling and acclimation of Arabidopsis thaliana exposed to light stress*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 369(1640): 20130227.
- Zhang, X.-M., Walsh, B., Mitchell, C.A. y Rowe, T. (2005). *TBC domain family, member 15 is a novel mammalian Rab GTPase-activating protein with substrate preference for Rab7*. Biochemical and Biophysical Research Communications 335(1): 154-161.
- Zhang, Y. y Skolnick, J. (2004). *Scoring function for automated assessment of protein structure template quality*. Proteins 57(4): 702-710.
- Zhao, Z., Chen, G. y Zhang, C. (2001). *Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings*. Functional Plant Biology 28(10): 1055-1061.
- Zhou, L.Z., Johnson, A.P. y Rando, T.A. (2001). *NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells*. Free radical biology & medicine

- 31(11): 1405-1416.
- Zhou, Y.H., Yu, J.Q., Mao, W.H., Huang, L.F., Song, X.S. y Nogues, S. (2006). *Genotypic variation of Rubisco expression, photosynthetic electron flow and antioxidant metabolism in the chloroplasts of chill-exposed cucumber plants*. *Plant & cell physiology* 47(2): 192-199.
- Zhu, G., Liu, Y., Ye, N., Liu, R. y Zhang, J. (2011). *Involvement of the abscisic acid catabolic gene CYP707A2 in the glucose-induced delay in seed germination and post-germination growth of Arabidopsis*. *Physiol Plant* 143(4): 375-384.
- Zsigmond, L., Rigó, G., Szarka, A., Székely, G., Ötvös, K., Darula, Z. y col. (2008). *Arabidopsis PPR40 Connects Abiotic Stress Responses to Mitochondrial Electron Transport*. *Plant physiology* 146(4): 1721-1737.