

ÍNDICE

ANTECEDENTES	13
Publicaciones	13
Publicaciones relacionadas con el trabajo de Tesis:	13
Capitulos de libros:	13
Presentaciones en congresos:	14
Presentaciones en talleres:	15
ABREVIATURAS	16
I – INTRODUCCIÓN GENERAL	20
I.1 – Los factores de transcripción que intervienen en la respuesta de las plantas a las condiciones medioambientales desfavorables	21
I.2 – Proteínas que contienen homeodominios.	22
I.2 – La familia HD-Zip.	24
I.3 – La subfamilia HD-Zip I.	26
I.4 – El factor de transcripción HAHB4.....	29
II - Objetivos	32
III - MATERIALES Y MÉTODOS	35
III.1 – Plásmidos	36
III.1.1 - Vectores de clonado	36
III.1.2 - Vectores binarios	36
III.2 - Cepas de bacterias.....	39
III.3 - Obtención y análisis de los clones	39
III.3.1 - Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
III.3.2 - Electroforesis de ADN en geles de agarosa	40
III.3.3 - Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	41
III.3.4 - Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	41
III.3.5 - Ligación de moléculas de ADN	41
III.3.6 - Transformación de bacterias	42
III.3.6.1 - Electrotransformación de E. coli.	42
III.5.6.2 - Transformación de Agrobacterium tumefaciens.....	42
III.3.7 - Minipreparación de ADN plasmídico	42
III.3.8 - Determinación de la secuencia de moléculas de ADN	43
III.3.9 - Análisis de las secuencias	43
III.4 – Construcciones utilizadas para transformar plantas.....	44

III.4.1 – Construcciones de expresión del gen HAHB4.....	44
III.4.2 - Fragmentos del promotor del gen HAHB4 fusionados al gen reportero GUS	44
III.4.3 - Quimeras del promotor de HAHB4 fusionadas al gen reportero GUS	44
III.4.4 - Mutaciones del promotor de HAHB4 fusionadas al gen reportero GUS	45
III.5 – Material vegetal y condiciones de cultivo.....	46
III.5.1 - Especies y variedades utilizadas	46
III.5.2 – Desinfección y cultivo in vitro de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> , girasol y maíz.....	46
III.5.3 – Cultivo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> , girasol y maíz.	47
III.5.4 - Transformación de plantas.....	47
III.5.4.1 - Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
III.5.4.2 - Transformación de <i>Zea mays</i>	48
III.5.4.3 - Transformación transitoria de <i>Helianthus annuus</i>	48
III.5.4.4 - Selección de transformantes	49
III.6 – Ensayos realizados en plantas de girasol, maíz y <i>Arabidopsis</i>	50
III.6.1 – Tratamientos químicos.	50
III.6.2 – Tratamientos y generación de estrés abiótico.	50
III.6.2.1 – Generación de estrés hídrico.	50
III.6.2.2 – Tratamientos de oscuridad.	51
III.6.2.3 – Generación de heridas mecánicas.	51
III.6.3 – Generación de estrés biótico.	52
III.6.4 – Bioensayos con insectos.....	52
III.7 – Extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos.	53
III.7.1 – Extracción y purificación de ADN genómico de girasol y maíz.	53
III.7.2 – Extracción y purificación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
III.7.3 – Extracción y purificación ARN total.....	54
III.7.4 - Cuantificación de ácidos nucleicos.....	55
III.8 – Análisis de expresión génica.....	55
III.8.1 – Cuantificación de transcritos por transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real.	55
III.8.2 – Análisis de expresión por northern blot.	56
III.8.2.1 - Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes	56

III.8.2.2 - Transferencia del ARN a membranas de nylon.....	57
III.8.2.3 – Marcación y purificación de sondas.....	57
III.8.2.4 - Hibridación de membranas de nylon	58
III.8.3 – Análisis de transcriptoma por microarreglo.	58
III.9 – Determinaciones de actividad enzimática.....	59
III.9.1 – Ensayo histoquímico para determinar actividad glucuronidasa (GUS).....	59
III.9.2 – Determinaciones de actividad de inhibidores de tripsina.....	60
III.9.3 – Determinaciones de actividad de lipoxigenasas e hidroperoxido liasa.	60
III.10 – Microscopia confocal y análisis de imágenes.	61
III.11 – Medición del contenido de clorofila y de otros pigmentos.	61
III.12 – Ensayos de unión proteína-ADN.	61
III.12.1 – Preparación de los extractos de proteínas nucleares.	61
III.12.2 – Obtención y marcación de oligonucleótidos doble hebra.	62
III.12.3 – Ensayos de retardo en geles.	63
III.13 – Análisis de intercambio gaseoso.	63
III.14 – Secuencias de oligonucleótidos utilizados.	63
III.15 – Soluciones de trabajo usadas (ordenadas alfabéticamente).	68
IV - CAPÍTULO 1	72
IV.1 – Introducción.....	73
IV.2 – Resultados y discusión.....	76
IV.2.1 – La expresión de HAHB4 genera cambios significativos en el transcriptoma de Arabidopsis thaliana.	76
IV.2.2 – CAAT(A/T)ATTG, la secuencia unida in vitro por HAHB4 está más representada en las regiones promotoras de los genes que cambian su expresión como consecuencia de la presencia del transgén que en el conjunto del genoma.	79
IV.2.3 – Los resultados obtenidos en el ensayo de microarreglos se confirman en estudios por RT-PCR cuantitativa.....	80
IV.2.4 – El análisis funcional de los genes regulados por HAHB4 indica la participación de este gen en ciertas vías metabólicas.....	84
V - CAPÍTULO 2	87
V.1 – Introducción.	88
V.1.1 – El etileno.....	88
V.1.2 – Biosíntesis y percepción del etileno.	90
V.1.2.1 – La síntesis.....	90
V.1.2.2 – La percepción.	92
V.1.3 – Principales funciones del etileno.....	94

V.1.4 – El etileno y el estrés hídrico	97
V.1.5 – HAHB4 y el etileno	97
V.2 – Resultados.	98
V.2.1 – HAHB4 reprime la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y percepción de etileno en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
V.2.2 – Las plantas transgénicas que expresan HAHB4 presentan un marcado retraso en la entrada en senescencia.	102
V.2.3 – Las plantas transgénicas que expresan HAHB4 son insensibles a los efectos del etileno.	104
V.2.4 – El etileno activa la expresión de HAHB4.	106
V.2.5 – La expresión de los genes de girasol homólogos a los identificados como blancos en <i>Arabidopsis</i> se co-regula junto con HAHB4.	109
V.3 – Discusión.	112
VI - CAPÍTULO 3	116
VI.1 – Introducción.	117
VI.1.1 – El sistema de respuesta a heridas de las plantas.	117
VI.1.2 – El ácido jasmónico.	117
VI.1.2.1 – La biosíntesis de JA	119
VI.1.3 – El ácido jasmónico y el etileno.	121
VI.1.4 – Los mecanismos de defensa de las plantas.	123
VI.1.4.1 – Los mecanismos de defensa directa.	124
VI.1.4.2 – Los mecanismos de defensa indirecta.	124
VI.1.4.3 – Los mecanismos de evasión.	124
VI.1.5 – HAHB4 y los mecanismos de defensa.	125
VI.2 – Resultados.	125
VI.2.1 – La expresión de HAHB4 se activa local y sistémicamente tanto por el tratamiento con ácido jasmónico como al producirse una herida mecánica o mordida de insecto.	125
VI.2.2 – Tanto el etileno como el ácido jasminico inducen en forma independiente la expresión de HAHB4, pero sus efectos son cooperativos.	129
VI.2.3 – En hojas de girasol HAHB4 induce la expresión de genes involucrados en la respuesta de defensa.	132
VI.2.4 – HAHB4 aumenta la concentración de los inhibidores de tripsina y enzimas involucradas en la biosíntesis de JA y GLV.	135
VI.2.5 – HAHB4 activa los mecanismos de defensa contra insectos en plantas de <i>Arabidopsis</i> y maíz.	137
VI.2.6 – El mecanismo de defensa desatado por HAHB4 está conservado entre especies.	141

VI.2 – Discusión.....	142
VII - CAPITULO 4	148
VII.1 – Introducción.....	149
VII.2 – Resultados.....	153
VII.2.1 – La expresión de HAHB4 aumenta en oscuridad.....	153
VII.2.2 – La activación de HAHB4 por oscuridad ocurre solamente en tejidos fotosintéticos.....	156
VII.2.3 – Un elemento de regulación en cis, localizado entre los nucleótidos -400 y -300 del promotor de HAHB4, es responsable de la activación de este gen en oscuridad.....	157
VII.2.4 – Un elemento GT localizado en la posición -320/-315 sería el responsable de la regulación por las condiciones de iluminación de HAHB4.....	159
VII.2.5 – HAHB4 reprime la transcripción de genes involucrados en la biogénesis de la maquinaria fotosintética.....	162
VII.2.6 – Los genes de girasol, homólogos a los identificados en Arabidopsis como reprimidos por HAHB4, presentan un comportamiento similar.....	165
VII.2.7 – Consecuencias fisiológicas de la represión de la biogénesis de componentes fotosintéticos mediada por HAHB4.....	167
VII.1 – Discusión.....	169
VIII – DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES	173
VIII.1 – Discusión.....	174
VIII.1.1 – La sequía y las vías en las que participa el ácido jasmónico.....	174
VIII.1.2 – La sequía y el etileno.....	176
VIII.1.3 – La sequía y la fotosíntesis.....	177
VIII.1.4 – El ácido jasmónico y el etileno.....	178
VIII.1.5 – El ácido jasmónico y la oscuridad.....	179
VIII.1.6 – El etileno y la fotosíntesis.....	180
VIII.1.7 – Consideraciones finales.....	181
VIII.2 – Conclusiones.....	182
IX - RESUMEN	184
X - ABSTRACT	187
XI - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	190

ANTECEDENTES

El trabajo de investigación que se describe en esta Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas ha sido realizado en la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los resultados han sido dados a conocer parcialmente en las siguientes publicaciones científicas y presentaciones en congresos:

Publicaciones:

Manavella P.A.; Arce A.L.; Dezar C.A.; Bitton F.; Renou J.P.; Crespi M. y Chan R.L. (2006) Cross-Talk between ethylene and drought signaling pathways is mediated by the sunflower HAHB4 transcription factor. *Plant J* 48(1):125-137.

Manavella P.A.; Dezar C.A.; Ariel F.D. y Chan R.L. Sunflower *HAHB4* promoter exhibits independent *cis*-acting elements involved in different signal transduction pathways (Enviado para su publicación).

Manavella P.A.; Dezar C.A.; Ariel F.D.; Drincovich M.F. y Chan R.L. The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up regulated in darkness acting as a repressor of the transcription of photosynthesis-related genes (Enviado para su publicación).

Publicaciones relacionadas con el trabajo de Tesis:

Cabello J.V.; Dezar C.A.; Manavella P.A. y Chan R.L. (2007) The intron of the *Arabidopsis thaliana* COX5c gene is able to improve the drought tolerance conferred by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Planta* 226(5):1143-1154.

Ariel F.D.; Manavella P.A.; Dezar C.A.; y Chan R.L. (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* 12(9):419-426.

Ariel F.D.; Manavella P.A.; Giacomelli J.I.; y Chan R.L. (2007) HD-Zip I and II, transcription factors involved in the adaptive response to environmental stress. *Plant Stress* 1(2): 189-196.

p

Capítulos de libros:

Manavella P.A. y Chan R.L. (2006) Development of tissue-specific promoters for plant transformation. En "Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues (1st Edición)". Editado por el Prof. J. Teixeira Da Silva, Global Science Books, Japan. Vol. 2, Pag. 21-25.

Ariel F.D.; Manavella P.A. y Chan R.L. (2007) Homeodomain-leucine zipper proteins participating in abiotic stress response in plants. En "Plant Stress and Biotechnology". Editado por Thangadurai D.; Tang W.; Song S.Q., Oxford Book Company, Jaipur, India. Pag. 1-11 (ISBN 978-81-89473-10-5).

Presentaciones en congresos:

Manavella P.A.; Dezar C.A. y Chan R.L. El promotor de *Hahb-4* de girasol. Caracterización funcional y posible utilización como herramienta biotecnológica.. III Congreso Argentino de Girasol – Asociación Argentina de Girasol (ASAGIR), Hilton Buenos Aires, Argentina., 31 de Mayo y 1 de Junio, 2005.

Manavella P.A.; Dezar C.A. y Chan R.L. Functional characterization of a stress-inducible/organ-specific sunflower transcription factor promoter. Simposio Internacional Alemania-Argentina organizado por ex becarios de la DAAD. Rosario, Santa Fe, Argentina, 3-8 de Octubre, 2005.

Manavella P.A.; Dezar C.A. y Chan R.L. Molecular characterization of the promoter region of *Hahb-4*, a member of the sunflower HD-Zip family. X Congreso de la Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology-(PABMB) y XLI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Pinamar, Bs.As., Argentina., 3-6 de Diciembre, 2005.

Dezar C.A.; Manavella P.A.; Arce A.L.; Drincovich M.F.; Renou J.P.; Crespi M. y Chan R.L. Transcriptional networks regulated by the sunflower *hahb-4* transcription factor to improve water stress tolerance. X Congreso de la Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology-(PABMB) y XLI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Pinamar, Bs.As., Argentina., 3-6 de Diciembre, 2005.

Dezar C.A.; Manavella P.A. y Chan R.L. El gen *Hahb-4* de girasol es regulado por las condiciones de iluminación a nivel transcripcional. XXVI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (RAFV), Chascomús, Bs.As., Argentina, 3-6 de Octubre, 2006.

Manavella P.A.; Dezar C.A.; Ariel F.D.; Drincovich M.F. y Chan R.L. The biogenesis of the photosynthetic apparatus is repressed by the transcription factor *Hahb-4*. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, Santa Fe, Argentina, 12-15 de Noviembre, 2006.

Cabello J.V.; Dezar C.A.; Manavella P.A. y Chan R.L. The intron of the *Cox5c* gene enhances the drought tolerance conferred by *Hahb-4* to transgenic plants. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, Santa Fe, Argentina, 12-15 de Noviembre, 2006.

Ariel F.D.; Gruber V.; Manavella P.A.; Crespi M. y Chan R.L. Characterization of root *Medicago truncatula* transcription factors involved in salt stress response. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, Santa Fe, Argentina, 12-15 de Noviembre, 2006.

Dezar C.A.; Manavella P.A. y Chan R.L. Identification of key sequences in the *Hahb-4* gene promoter for the regulation of its expression. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, Santa Fe, Argentina, 12-15 de Noviembre, 2006.

Ariel F.D.; Gruber V.; Manavella P.A.; Crespi M. y Chan R.L. A novel conserved motif is present in the HD-Zip I transcription factor MTHB1 from *Medicago truncatula*. VI European Conference on Grain Legumes, Lisboa, Portugal, 12-16 Noviembre de 2007.

Manavella P.A.; Dezar C.A. y Chan R.L. Crosstalk between jasmonic acid and ethylene pathways are mediated by the HAHB4 transcription factor. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 17-20 de Noviembre de 2007.

Dezar C.A.; Manavella P.A. y Chan R.L. Functional characterization of the *HAHB10* gene. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 17-20 de Noviembre de 2007.

Presentaciones en talleres:

Dezar, C.; Manavella, P. y Chan R. Rol funcional del gen *Hahb-4* en la respuesta adaptativa al estrés abiótico. Primer Taller Conjunto de Fisiología y Ecofisiología, Biotecnología y Mejoramiento Genético del Girasol. Mar del Plata, 28 y 29 de Abril de 2005.

Manavella P.M.; Dezar C.A.; Chan R. Caracterización funcional del promotor del gen *Hahb-4* de girasol con fines biotecnológicos. Primer Taller Conjunto de Fisiología y Ecofisiología, Biotecnología y Mejoramiento Genético del Girasol. Mar del Plata, 28 y 29 de Abril de 2005.

ABREVIATURAS

13-HPOD	13-hidroperoxilínolénico
35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
aadA	Gen que codifica para la aminoglycoside-3'-adeniltransferasa (resistencia a espectinomicina y estreptomycin)
ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elemento de respuesta a ABA (del inglés, <i>Abscicic Acid Responsive Element</i>)
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AFLP	del inglés <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIB	Ácido α -aminoisobutírico
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ASA	Ácido acetyl salicílico
AT	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BAEE	N α -benzoyl-L-arginine ethyl ester
<i>bar</i>	Gen que codifica para la fosfinotricin N-acetyltransferasa (resistencia al herbicida Basta (glufosinato de amonio)).
c/u	Cada uno
CATMA	Microarreglo del transcriptoma completo de <i>Arabidopsis</i>
Ci	Curie
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia-0
col.	Colaboradores

cpm	Cuentas por minuto
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
g	Fuerza centrífuga por aceleración de gravedad
GO	del inglés <i>Gene Ontology</i>
GSTs	del inglés <i>Gene-specific Sequence Tags</i>
GUS	Enzima β -glucuronidasa
dATP	Desoxiadenosina 5' trifosfato
dNTP	Mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.
DO	Densidad óptica
EDTA	Sal sódica del ácido etilen diamino tetraacético
ET	Etileno
GA	Giberelinas
GLV	Volátiles de hoja verde, del inglés <i>Green Leaf Volatiles</i>
<i>HAHB4</i>	<i>Helianthus annuus</i> <u>H</u> omeo <u>B</u> ox 4
<i>HAHB4 ARNi</i>	Construcción usada para silenciar la expresión de <i>HAHB4</i> por ARN interferencia.
H4i	Plantas transformadas con la construcción que produce silenciamiento de <i>HAHB4</i> por ARN interferencia.
HA	<i>Helianthus annuus</i>
HB	Caja homeotica (del inglés <i>HomeoBox</i>)
HD	Homeodominio
HD-Zip	Homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietyl)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HPL	Enzima hydroperoxido lyasa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
JA	Ácido jasmónico
LA	Ácido linoleico
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
Ler-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Landsberg erecta
LNA	Ácido linolénico
LOX	Enzima lipoxigenasa
LZ	Cierre de leucinas
MetJA	Ácido metil jasmónico
MS	Medio de cultivo formulado por Murashige y Skoog

nos	Señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa
<i>nptII</i>	Gen que codifica para la neomicin fosfortransferasa II (resistencia a kanamicina)
ocs	Señal de poliadenilación de la octopina sintetasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEC	Forma alélica corta del promotor de <i>HAHB4</i>
PEL	Forma alélica larga del promotor de <i>HAHB4</i>
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
P/V	Peso en volumen
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de PCR
SAGE	Análisis serial de expresión genética
S	Plantas salvajes
S-D	Plantas salvajes sometidas a estrés hídrico
SA	Ácido salicílico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SPADS	del inglés <i>Specific Primer & Amplicon Design Software</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N',-tetrametiletildiamina
TG	Plantas transgénicas
TG-D	Plantas transgénicas sometidas a estrés hídrico
TGE	Tris-Glicina-EDTA
TI	Inhibidores de tripsina
Tm	Temperatura de fusión
Tris	N-tris-(hidroximetil)aminometano
U	Unidad/es de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
V/V	Volumen en volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactósido
X-GLUC	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -ácido glucurónico
ZM	<i>Zea mays</i>

