

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

"Caracterización funcional de los factores de transcripción
HaWRKY10 y HaWRKY76 de girasol y OsWRKY47 de arroz.
Aplicaciones biotecnológicas"

Jesica Raineri

Directora de Tesis : Karina F. Ribichich

Codirectora de Tesis : Raquel L. Chan

Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

CONICET/UNL

2015

A los mejores ejemplos, Laura y Horacio

Al amor de mi vida, Fede

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a muchísima gente que estuvo presente en mayor o menor medida durante el transcurso lento, rápido, dramático, feliz, triste, vertiginoso, tortuoso, alegre, EMOCIONANTE y ENRIQUECEDOR al fin... de esta Tesis.

.... Si he logrado ver más lejos es porque he subido a hombros de gigantes... (Isaac Newton)

A las Instituciones

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y a sus autoridades por abrirme las puertas de esta Casa de Estudios de la que formo parte hace más de diez años.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET/UNL), que con tanto gusto vi gestarse y plasmarse en un espacio físico en el que da más gusto trabajar.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por haberme otorgado las becas de posgrado que me permitieron desarrollar esta Tesis.

A la ANPCyT, CONICET y a la Universidad Nacional del Litoral por la financiación a lo largo de los años de trabajo que dio sustento económico a este trabajo.

A mis directoras y compañeros de trabajo

En primer lugar quiero agradecer profundamente a mis dos directoras, por su gran dedicación y por el esfuerzo y empeño que depositaron en este trabajo de Tesis y en su corrección sobre la marcha y en el presente manuscrito. Por todos los conocimientos que de forma tan generosa compartieron conmigo y por su aporte en mi formación académica.

A Raquel, que una vez más me brindó la posibilidad de trabajar en su laboratorio. Por estar presente desde el inicio en mis primeros pasos en la investigación. Por su total entrega a la Ciencia, por su dedicación, vocación y entusiasmo. Por su incansable perseverancia y tenacidad que permitieron que el IAL se genere, se gestione y tenga un espacio físico ideal para la investigación y el intercambio académico.

A Kari, por su gran capacidad analítica, por estar siempre en cada detalle, por considerar mi opinión y objeciones en las discusiones, por su predisposición en todo momento, por su paciencia, entrega y templanza. Muchas gracias.

A Juli, por su inmensa contribución a mi formación, por las discusiones científicas, por su sencillez, por brindarme su amistad desde el primer día, por los recreítos, por las conversaciones respecto a... todo!, por ser una gran guía....

A Agus, por su gran compañerismo, por estar tan presente en mi formación desde el principio, por los datos curiosos, por todas las charlas compartidas, por su espíritu analítico, por estar siempre ahí para todo.

A Toto, por estar dispuesto en todo momento a solucionar problemas de los más variados, por su compañerismo y sus análisis críticos, por su generosidad.

A Delfi, por su optimismo y su afecto, por brindar su ayuda en cada situación, por su calma y templanza casi imperturbables que tanto admiro, por su buen humor, por los congresos y las discusiones constructivas.

A Mati, por las charlas respecto a de todo, por su constante buena onda, por estar siempre al tanto de fechas y formalidades y comunicármelas, por su esfuerzo y empeño contagiosos.

A Vero, por oficiar de mamá en más de una ocasión, por su inmensa ayuda diaria en temas de los más variados, por ser cable a tierra muchas veces, por las risas, las charlas y los recreítos.

A Pame, por su buen humor, por su humildad, por su constancia, por su responsabilidad y por su entusiasmo e interés contagiosos.

A Cele, por todas las charlas, por las risas y carcajadas compartidas, por su ocurrencia, por estar siempre disponible para colaborar en todo, por su predisposición, por su empatía.

A Charles, por su generosidad para transmitir sus vastos conocimientos, por sus sinceridades, por su buen humor y por su gran aporte a mi formación.

A Fede Ariel, por su alegría, por acompañarme en las pavadadas, por ser una persona clave en mi “formación proteica”, por su creatividad, por las valiosas charlas, por los gustos compartidos.

A Guille, por imprimir su impronta particular todos los días en el último tramo del doctorado, por su buen humor, sus ocurrencias alocadas y las charlas constructivas.

A Javi, por intentar mejorar el manejo del laboratorio y su perseverancia en este cometido, por su buena onda y sus críticas constructivas.

A Pablo M., por estar siempre dispuesto a ayudar, transmitir su experiencia y en el medio de esto hacer un chiste.

A Mabel y Maxi, que siempre están abiertos a impartir conocimientos, a ser visitados y a reírse un rato.

A todos los “peques” y a los no tan peques Ariel, Flor, Virginia, Carlos y Aquiles, por aportar frescura al laboratorio, por sus ansias de aprender y por el entusiasmo con el que trabajan día a día.

A todo el grupo del Dr. Daniel González, especialmente a Elina, Ivana, Nori, Gabriel y Leandro que me brindaron su ayuda y me allanaron el camino en muchos ensayos, explicándome con lujo de detalles cada paso. Por su buena predisposición en todo momento ante cualquier duda o consulta.

Al grupo del Dr. Alberto Iglesias, en particular a Mati H. por su increíble entusiasmo, buena onda y experiencia, nunca me imaginé que medir actividad podría ser tan divertido.

A Luli, Caro A., Marta y Grace por hacer que los trabajos prácticos sean tan amenos, por compartir sus conocimientos de manera tan generosa, por su calidez y alegría.

A Songhu Wang, Zvi Peleg y a Eduardo Blumwald por su gran aporte al Capítulo III de esta Tesis.

A Seba, Manuel y Pablo O. por su colaboración y asistencia constantes en problemas técnicos de todo tipo, por su total predisposición y buena onda.

A mi familia y amigos...

A mis papás Laura y Horacio, por ser un constante ejemplo de respeto, honestidad, cariño, responsabilidad, perseverancia... Por su amor, porque en todo momento y bajo cualquier circunstancias dieron y dan lo mejor de sí mismos. Por el empuje, por dejar de lado los dramas y enfrentar todo con una sonrisa. Por la confianza que depositaron en mí y por apoyarme siempre. Por intentar comprender qué es lo que hago en el laboratorio. Por creer en que puedo y por tantísimas otras cosas más...

A mi hermana, Maricel por ser un pilar fundamental en mi vida, por empujarme a dar siempre lo mejor, por enseñarme entre tantas otras cosas a coser, por estar en todo momento, por sus consejos, por su complicidad y por su entrega.

A mi sobrino, Facu, por su inocencia, por su frescura, sus protestas, por las cosquillas, los juegos, las risas y los chistes malos, por su increíble léxico y uso del lenguaje, que espero algún día me contagie.

A mi madrina Silvia, por su buen humor constante, por estar siempre al tanto de todo, por tenerme siempre presente, por las visitas, por las malcriadas.

A mi padrino Sergio, por sus locas ocurrencias, por las risas, por los paseos, por estar siempre presente, por su humildad y por su cariño.

A la nona Beba, por su imperturbable buen humor, por sus delicias culinarias, por aceptar a todos tal cual son y comprender todos los puntos de vista, por el gusto de los viajes, por consentirme, por estar siempre tan predispuesta a todo.

A mi cuñado Luisma, mi tío Viti, mis tías Chichi y Miriam, mis primos Dariel, Floren, Juanma y Flopy, por su cariño, por estar siempre que los necesité, por las críticas constructivas, por las risas y las comidas.

A toda mi familia nueva. A Nely y Nando, por integrarme desde el primer momento, por estar siempre disponibles ante cualquier cosa, por su cariño y entrega y por las riquísimas comidas que compartimos. A Eri, Darío, Diego, Lucho, Marce y Nati, por las charlas sobre cualquier cosa, por los debates, por ser confluencia de nuevas ideas y pensamientos, por luchar por lo que quieren. A los más pequeños de la familia, o al menos los que eran más pequeños hace cinco años... a Mila, Emi, Luci, Juli, Andrés, Sofi y Valen por sus salidas disparatadas, por las increíbles habilidades que cada uno tiene, por ser niños/adolescentes geniales, por la alegría que contagian siempre.

A mis amigos de la facultad, con quienes tuve el inmenso gusto y privilegio de compartir mi carrera de grado, por ser grandes personas y profesionales. A Emi, por su amistad, por ser cable a tierra, por todas las cosas que vivimos juntos, por los viajes matutinos, vespertinos y nocturnos, por su ayuda incansable en todo momento para todo, por su paciencia y templanza, por sus raptos de sinceridad. A Ana y Ceci por todos los momentos vividos y compartidos, por su amistad, por su buen humor y la alegría que me contagian siempre. A Iván por todas las anécdotas, por las ñoñadas, por integrarme, por las risas, las caminatas y bicicleteadas, gracias. A Rodri, por estar siempre presente, por su colaboración en los ensayos de SELEX, por su buen humor. Al chino, por su amistad, por estar disponible, por compartir sus conocimientos. A Benchi, Pauli, Mechi, Joha, Mili B., Mili Q, Tefi, Lisi y Meli, por todas las cosas que pasamos juntas estos años, por sus consejos, por las juntadas, por las risas y las experiencias que nos unen.

A mis amigas y amigos de la vida. A Lucy, por tooodas las cosas que vivimos, por los sincericidios, por su cariño y amistad, por su perseverancia y por la responsabilidad y el amor con los que enfrenta todo lo que hace. A Romi, por su amistad, por tener

siempre el punto de vista que me falta, por los concejos certeros, por su pasión contagiosa, por ser auténtica. A ambas por prestarme sus cabezas para pensar de otra forma, por cuidarme y tenerme siempre en cuenta.

A Maxi, Luquitas y Leti, por las salidas, los animé, las meriendas y cenas, las pelis malas (y las malísimas...), por alegrarme tantos días. ¡Gracias a los tres por estar tan presentes!

A Luci, Tella, Nacho, Naquio, Diego y Ger, por estar siempre cerca, sin importar el tiempo o las distancias, por todo el trecho de vida que compartimos y las vivencias de todo tipo acumuladas, por su cariño, por su amistad pura... Los quiero mucho!

Finalmente, quiero agradecerle a Fede, sin quien esta Tesis no sería lo que es y yo no sería tan feliz como soy. Gracias Fede por tu amor, por tu paciencia, por tu tolerancia, por tu genialidad, por pensar siempre e incansablemente en mí, por soportarme, por animarme, por creer en mí y por miles de cosas más... gracias por SER y ESTAR... ¡Te amo!

Sacar belleza de este caos, es virtud (Gustavo Cerati)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ANTECEDENTES	8
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	15
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN GENERAL	22
<i>I– La plasticidad de las plantas</i>	22
<i>II – La seguridad alimentaria y la productividad en el futuro</i>	23
<i>III – Los cultivos mejorados y su evolución en el tiempo</i>	24
<i>IV – Los transgénicos en Argentina</i>	26
<i>V – El desarrollo de las plantas</i>	29
<i>VI – Factores de transcripción de plantas</i>	30
<i>VII – Los Factores de transcripción de tipo WRKY</i>	32
<i>VIII – Procesos biológicos en los que participan los factores de transcripción de la familia WRKY</i>	33
<i>IX – Factores de transcripción WRKY y fitomejoramiento</i>	36
<i>X – Factores de transcripción WRKY en cultivos de girasol y arroz</i>	37
<i>X.I – El cultivo del girasol en Argentina</i>	39
<i>X.II – El cultivo de arroz en Argentina</i>	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	48
<i>I– Plásmidos</i>	48
<i>I.I – Vectores de clonado</i>	48
<i>I.II – Vectores de expresión</i>	48
<i>I.II.I – Vectores de expresión en bacterias</i>	48
<i>I.II.II – Vectores de expresión en plantas (Vectores binarios)</i>	48
<i>II – Cepas Bacterianas</i>	49
<i>III – Técnicas utilizadas en la obtención de construcciones genéticas</i>	50
<i>III.I – Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	50
<i>III.II – Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	50

III.III – Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	51
III.IV – Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....	51
III.V – Ligación de moléculas de ADN.....	52
III.VI – Transformación de bacterias: electrotransformación de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> ...	52
III.VII – Minipreparación de ADN plasmídico	52
III.VIII – Determinación de la secuencia de moléculas de ADN	53
III.IX – Análisis de las secuencias	53
IV – Construcciones genéticas.....	54
IV.I – P_{35S} : <i>HaWRKY76</i>	54
IV.II – P_{35S} : <i>HaWRKY10</i>	54
IV.III – P_{Ub} :: <i>OsWRKY47</i>	55
IV.IV – P_{35S} : <i>OsWRKY47</i>	55
IV.V – Promotores completos, fragmentos de los promotores y promotores mutados de los genes de arroz que codifican la proteína de unión a calmodulina (<i>CaPU</i>) y la proteína con repeticiones ricas en cisteínas (<i>PRRC</i>).....	56
IV.V.I – Construcciones de los promotores completos y mutados utilizados para transformación transitoria	56
IV.V.I.I Promotores completos	56
P_{CaPU} :: <i>GUS</i> y P_{PRRC} :: <i>GUS</i>	56
IV.V.I.II Promotores mutados.....	56
$P_{CaUP\Delta wbox}$:: <i>GUS</i>	57
$P_{PRRC\Delta wbox}$:: <i>GUS</i>	57
$P_{CaUPC\rightarrow T}$	58
IV.V.II – Fragmentos de los promotores utilizados para ensayos en geles de retardo	58
V.I – Especies y variedades vegetales utilizadas	58
V.II – Desinfección y cultivo in vitro de semillas de <i>Arabidopsis</i> y girasol	59
V.III – Cultivo de plantas de arroz, <i>Arabidopsis</i> , girasol y tabaco	60
V.IV – Transformación de plantas.....	61
V.IV.I – Transformación transitoria de <i>N. benthamiana</i>	61
V.IV.II – Obtención de plantas de arroz mutantes de <i>OsWRKY47</i>	62
V.IV.III – Transformación estable de <i>Arabidopsis</i>	62
V.V – Selección de transformantes	63
V.VI – Selección de las plantas transformadas que contienen la inserción deseada	63
V.VII – Clasificación de las líneas homocigotas de acuerdo a su nivel de expresión	64
VI – Ensayos realizados en plantas de <i>Arabidopsis</i> y girasol.....	64

VI.I – Tratamientos químicos	64
VI.II – Generación de estrés abiótico	65
VI.II.I – Generación de estrés hídrico	65
VI.II.I.I Estrés hídrico severo	65
VI.II.I.II Estrés hídrico leve–moderado	66
VI.II.II – Generación de estrés por exceso de agua.....	67
VI.II.II.I Estrés por inundación completa	67
VI.II.II.II Estrés por anegamiento e inundación parcial: sistema radicular/roseta de la planta sumergida	67
VII – Análisis de los fenotipos de las plantas en condiciones normales y en los ensayos de estrés	68
VII.I – Cuantificación de clorofila	68
VII.II – Estabilidad de membranas	68
VII.III – Uso y manejo del agua	69
VII.III.I – Consumo de agua en estrés hídrico	69
VII.III.II – Pérdida de agua de hojas escindidas	69
VII.IV – Cuantificación del contenido de sustancias de reserva.....	70
VII.IV.I – Cuantificación de lípidos.....	70
VII.IV.II – Separación de gotas de aceite (GdA).....	71
VII.IV.III – Cuantificación de carbohidratos (glucosa, sacarosa y almidón).....	71
VII.V – Determinación de la biomasa radicular.....	72
VII.VI – Medida del daño por estrés oxidativo	72
VII.VII – Estudios histológicos: análisis morfológico y de formación de aerénquima	73
VIII – Extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos	73
VIII.I – Extracción y purificación de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	73
VIII.II – Extracción y purificación de ARN total	74
VIII.III – Cuantificación de ácidos nucleicos.....	75
IX – Análisis de expresión génica	76
IX.I – Cuantificación de transcritos por transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real	76
X – Determinaciones de actividad enzimática	77
X.I – Ensayo histoquímico para determinar actividad β -glucuronidasa (GUS)	77
X.II – Medición de la actividad enzimática de PEPCCK.....	78
XI – Ensayos de unión proteína–ADN	78
XI.I – Cuantificación de proteínas	78

<i>XI.II – Expresión de las proteínas recombinantes en E. coli</i>	78
<i>XI.III – Electroforesis de proteínas</i>	79
<i>XI.IV – Purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad</i>	80
<i>XI.V – Selección de sitios de unión específicos (SELEX)</i>	81
<i>XI.VI – Síntesis y amplificación de oligonucleótidos doble hebra</i>	81
<i>XI.VII – Electroforesis en geles de poliacrilamida y purificación de los fragmentos de ADN amplificados</i>	82
<i>XI.VIII – Marcación radioactiva de oligonucleótidos doble hebra obtenidos por PCR</i>	82
<i>XI.IX – Clonado molecular de los oligonucleótidos seleccionados</i>	82
<i>XI.X – Obtención de oligonucleótidos sintéticos doble hebra y marcación radioactiva de los mismos</i>	83
<i>XI.XI – Ensayos de retardo en geles</i>	84
<i>XI.XII – Ensayos de competencia</i>	84
XII – Soluciones de trabajo utilizadas	84
XIII – Tabla de oligonucleótidos empleados	88
CAPÍTULO I: HaWRKY76 le confiere a las plantas características agronómicas deseables en condiciones de crecimiento normales y mayor tolerancia al estrés por exceso o defecto de agua	
	93
INTRODUCCIÓN	93
<i>I – Las plantas y el estrés</i>	93
<i>II – Las vías de respuesta de las plantas frente a estrés</i>	94
<i>III – El estrés por falta de agua: sequía</i>	95
<i>III.I – La respuesta fisiológica y morfológica de las plantas</i>	96
<i>III.I.I – El desarrollo diferencial de la raíz</i>	98
<i>III.II – Las vías de señalización</i>	99
<i>IV – Fitomejoramiento para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés hídrico</i>	100
<i>V – El estrés por exceso de agua: plantas sometidas a anegamiento y a inundación total y parcial</i>	101
<i>V.I – La respuesta de la planta al exceso de agua</i>	102
<i>V.II – Plantas inundadas</i>	105
<i>V.III – Plantas en anegamiento</i>	106
<i>V.IV – Recuperación del estrés por exceso de agua</i>	108
RESULTADOS	110
<i>I – HaWRKY76 une una secuencia de ADN diferente de la caja W</i>	110

II – HaWRKY76 se expresa en raíces, hipocotilos y achenios en formación y su expresión es regulada por diferentes factores de estrés abiótico	112
III – Las plantas transgénicas que expresan HaWRKY76 de forma ectópica y constitutiva presentan mayor biomasa de raíz y aérea y mayor producción que sus pares salvajes	117
IV – Las plantas HaWRKY76 toleran mejor que sus pares salvajes el estrés por exceso y defecto de agua	124
IV.I – El fenotipo diferencial en estrés hídrico	124
IV.II – Las vías moleculares en las que podría estar involucrado HaWRKY76 en estrés hídrico	130
IV.III – Estrés por exceso de agua	133
IV.III.I – Inundación de la planta completa	134
IV.III.II – Recuperación del estrés por inundación total	140
V.III.III – Anegamiento e inundación parcial	142
DISCUSIÓN	145
I – El factor de transcripción HaWRKY76 une una secuencia de ADN diferente a la canónica unida por los factores de transcripción WRKY	145
II – La regulación de HaWRKY76 en raíces y su posible función específica en asteráceas y la relación con el fenotipo de las plantas HaWRKY76 de Arabidopsis.....	146
III – HaWRKY76 un WRKY “trabajador” en pos del fitomejoramiento.....	148
IV – HaWRKY76 y la respuesta al estrés abiótico	149
IV.I – Déficit de agua	149
IV.I.I – HaWRKY76, sus homologos y la regulación por estrés abiótico.....	149
IV.I.II – HaWRKY76 y el fenotipo que les confiere a las plantas de Arabidopsis que lo expresan de forma ectópica y constitutiva.....	151
IV.I.II – ¿Qué papel tendría en la tolerancia a estrés hídrico de las plantas HaWRKY76 su desarrollo radicular diferencial?.....	155
IV.II – Exceso de agua	156
IV.II.I – Las plantas HaWRKY76 y su fenotipo frente a estrés por inundación y anegamiento	156
V – HaWRKY76 como herramienta para mejorar cultivos	160
CAPÍTULO II: HaWRKY10 está involucrado en la acumulación de sustancias de reserva y tiene un papel en la germinación de las semillas	163
INTRODUCCIÓN.....	163
I – El ciclo de vida de las plantas y la transición entre sus estadios.....	163
II – La dormancia de la semilla: ¿por qué es tan importante?.....	163
III – La semilla y su germinación	166

IV – El rol de las hormonas en la germinación.....	167
IV.I – ABA: un regulador positivo de la inducción de la dormancia y un regulador negativo de la germinación	169
IV.II – GAs: reguladoras positivas de la germinación	172
V – Sustancias de reserva en germinación	173
VI – ¿Cómo se acumulan las sustancias de reserva en las semillas?.....	176
VI.I – El papel de los factores de transcripción en la acumulación de reservas en las semillas.....	177
VI.II – Los factores de transcripción WRKY y las semillas	179
VII – Biotecnología y fitomejoramiento de la mano: plantas oleaginosas como biofábricas de materia prima para la industria	179
RESULTADOS	182
I – HaWRKY10 se expresa diferencialmente en la germinación de semillas de girasol y es regulado por ABA y GA.....	182
II – HaWRKY10 y su relación con el consumo de las sustancias de reserva	186
III – HaWRKY10 se expresa diferencialmente en el llenado de achenios	190
IV – Las semillas de plantas transgénicas que expresan HaWRKY10 constitutivamente son más susceptibles al ABA en la germinación y en el establecimiento de la línea.....	192
V – Algunos genes de las vías de ABA y GAs están regulados diferencialmente en las semillas HaWRKY10	194
VI – Las semillas HaWRKY10 contienen más lípidos y proteínas y menos carbohidratos que las salvajes	196
VII – Las semillas HaWRKY10 consumen más lípidos y menos carbohidratos durante su germinación y en el establecimiento de la línea	199
DISCUSIÓN	202
I – HaWRKY10 y sus homólogos.....	203
II – HaWRKY10 en semillas en germinación y su relación con ABA	204
III – HaWRKY10 y la movilización de las sustancias de reserva de la semilla	206
IV – ¿Cuál sería la conexión entre ABA, la movilización de sustancias de reserva y el FT HaWRKY10?.....	207
V – HaWRKY10 durante el desarrollo de las semillas	209
CAPÍTULO III: OsWRKY47 y la respuesta de las plantas de arroz frente a estrés hídrico.....	215
INTRODUCCIÓN	215
I – Las citoquininas y el desarrollo de las plantas	215

<i>II – Las citoquininas y el estrés.....</i>	<i>216</i>
<i>IV – La expresión de IPT en relación a la tolerancia al estrés y la productividad</i>	<i>219</i>
<i>I – La expresión de OsWRKY47 se induce en las plantas IPT estresadas</i>	<i>222</i>
<i>II – Genes que podrían estar regulados por OsWRKY47</i>	<i>227</i>
<i>III – OsWRKY47 regula la expresión de los genes que codifican la proteína de unión a calmodulina y la proteína con repeticiones ricas en cisteínas</i>	<i>233</i>
<i>IV – OsWRKY47 juega un papel en la respuesta a estrés hídrico de las plantas de arroz..</i>	<i>238</i>
DISCUSIÓN	243
<i>I – OsWRKY47, sus homólogos y su relación con el fenotipo de las plantas IPT.....</i>	<i>243</i>
<i>II – OsWRKY47 y las secuencias de ADN que une</i>	<i>245</i>
<i>III – OsWRKY47 y sus genes blancos</i>	<i>247</i>
CONCLUSIONES FINALES	254
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	262

ANTECEDENTES

El trabajo de investigación que se describe en esta Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas ha sido realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL). Los resultados que se presentan en esta tesis han sido dados a conocer en forma parcial en las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos:

Patente y publicaciones relacionadas directamente al trabajo de Tesis:

Raineri, J., Giacomelli, J. y Chan, R.L. (2014). *Transcription factor genes and proteins from Helianthus annuus, and transgenic plants including the same*. CONICET-Universidad Nacional del Litoral. Número de patente en trámite.

Raineri, J., Wang, S., Peleg, Z., Blumwald, E. y Chan, R.L. (2015). *The rice transcription factor OsWRKY47 is a positive regulator of the response to water deficit stress*. Plant Molecular Biology. En prensa.

Raineri, J., Ribichich, K.F. y Chan, R.L. (2015). *The sunflower divergent transcription factor HaWRKY76 confers drought and flood tolerance to Arabidopsis plants and increased yield in standard and stress conditions*. En revisión.

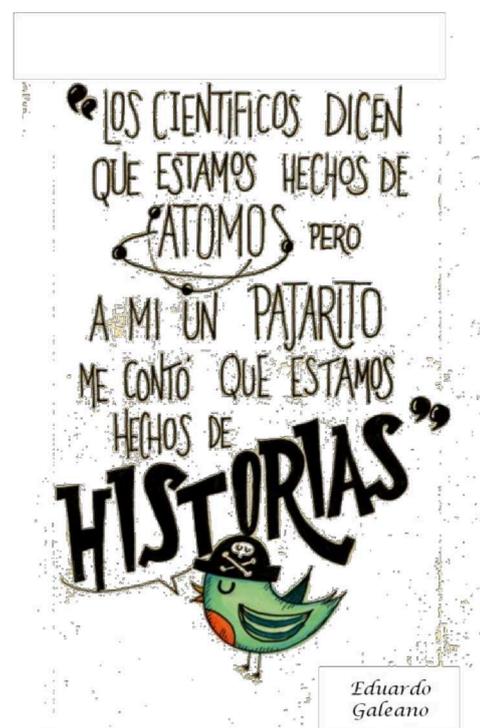
Presentaciones en congresos directamente relacionadas con el trabajo de Tesis:

Raineri, J., Chan, R.L. y Ribichich, K.F. (2012). *El factor de transcripción de girasol HaWRKY10 jugaría un papel en la germinación regulando la respuesta a ABA y a etileno*. Reunión Argentina de Fisiología Vegetal 2012 Mar del Plata, Argentina.

Raineri, J., Ribichich K.F. y Chan R.L. (2013). *Obtención de plantas transgénicas de Arabidopsis con tolerancia aumentada a estrés abiótico y mayor productividad*. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología REDBIO Argentina 2013. Mar del Plata, Argentina.

Raineri, J., Ribichich, K.F. y Chan R.L.(2014). *Obtención de plantas transgénicas de Arabidopsis con tolerancia aumentada a estrés abiótico*. Reunión Argentina de Fisiología Vegetal 2014. Mar del Plata, Argentina.

Abreviaturas



ABREVIATURAS

µg	microgramos
µl	microlitros
µM	micromolar
°C	grados centígrados
ABA	ácido abscísico
Abs	absorbancia
Ac	acetato
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
APS	persulfato de amonio
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BR	brasinoesteroides
CaMV35S ó 35S	promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor
CaPU	proteína de unión a calmodulina
Caja W	motivo de unión de las proteínas WRKY, TTGAT/C
Ci	curie
col.	colaboradores
CQ	citoquininas
DO	densidad óptica

dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
Da	daltons
dpi	días pos inoculación
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen-diamino tetra-acético
EROs	especies reactivas del oxígeno (de sus siglas en inglés <i>reactive oxygen species</i>)
EST	etiquetas de secuencias expresadas (del inglés, <i>Expressed Sequence Tags</i>)
FAA	formaldehído-ácido acético-alcohol-agua
FT(s)	factor(es) de transcripción
g	fuerza centrífuga por aceleración de gravedad
GdA	gotas de aceite
GM	genéticamente modificado
GST	glutación S-transferasa
<i>GUS</i>	gen que codifica la enzima β -glucuronidasa de <i>Escherichia coli</i>
GUS	enzima β -glucuronidasa
Ha	<i>Helianthus annuus</i>
ha/s	hectárea/s
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[2-etanosulfónico]

hs	horas
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IRGA	analizador infrarojo de gases (del inglés, <i>Infrared Gas Analyser</i>)
l	litro
LB	medio de cultivo caldo de lisogenia (del inglés <i>Lysogeny broth</i>)
M	molar
min	minuto(s)
mM	milimolar
mmol	milimoles
MS	medio de Murashige y Skoog
NBT	nitrozul de tetrazolio
ng	nanogramos
nm	nanometros
OGM	O rganismo G enéticamente M odificado
Os	<i>Oryza sativa</i>
p/v	peso en volumen
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino (del inglés phosphate buffer saline)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PRRC	proteína con repeticiones ricas en cisteínas
qRT-PCR	transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real (del inglés, <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>)
rpm	revoluciones por minuto
PMSF	fenilmetil sulfonil fluoruro
poly(dI-dC)	ácido polidesoxiinosínico/polidesoxicitidínico
SA	ácido salicílico
SDS	dodecil sulfato de sodio
SELEX	evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
U	unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de 1 μmol /minuto
UV	ultravioleta
V	voltios
v/v	volumen en volumen

Resumen/Abstract



RESUMEN

Dado el aumento continuo de la población mundial es necesario incrementar la producción de los cultivos que aseguren la alimentación de esta población. La Agrobiotecnología y la Biología Molecular pueden aportar al desarrollo de cultivares con mayor rendimiento de semillas o de tejido vegetativo tanto en condiciones normales de crecimiento como frente a condiciones estresantes. Para lograr este objetivo es fundamental conocer el funcionamiento integral de las plantas y sus mecanismos de respuesta a estímulos de distintos tipos.

En estas respuestas intervienen factores de transcripción (FTs), proteínas que regulan la expresión de genes blanco y desencadenan cascadas de señalización cuyas consecuencias llevan o no a la adaptación de las plantas al medio en el que se encuentran.

En este trabajo de Tesis, se eligieron como objeto de estudio tres FTs, dos de girasol y uno de arroz. A través la caracterización funcional de estos FTs se obtuvo información relevante para la mejor comprensión de los mecanismos de respuesta de estas especies vegetales frente al estrés por exceso y falta de agua y sobre algunos aspectos del desarrollo. El resultado de estos estudios permitió postular a estas tres proteínas como potenciales herramientas biotecnológicas para el fitomejoramiento.

HaWRKY76 es un FT de girasol, divergente del grupo IId, que presenta cambios no conservativos en su dominio WRKY de unión a ADN. Debido a esto se estudió la secuencia de unión de este FT *in vitro* y se observó que esta proteína regularía secuencias en *cis* diferentes a las descritas hasta el momento para los FT de tipo WRKY. En girasol, *HaWRKY76* presentó mayores niveles en raíces e hipocotilos y su expresión fue regulada por estrés por escasez y exceso de agua y en desarrollo del capítulo y del embrión. Se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, que expresan *HaWRKY76* de forma constitutiva. Estas plantas desarrollaron sus raíces diferencialmente, y generaron mayor biomasa de roseta y mayor producción que las plantas salvajes en condiciones normales. Cuando fueron expuestas a estrés hídrico,

las plantas transgénicas fueron más tolerantes a este estrés que las salvajes, sin detrimento en la producción de semillas. La respuesta diferencial en estas plantas se debió a un menor consumo de agua, menor pérdida de agua por mayor velocidad de cierre estomático y menor daño celular, en la que probablemente intervino una regulación diferencial de la expresión de genes de las cascadas de señalización dependiente e independiente de ABA. Frente a exceso de agua, las plantas HaWRKY76 fueron más tolerantes que las salvajes y produjeron levemente más semillas después de sufrir anegamiento o inundación total. Esto fue producto del uso conservativo de sus recursos energéticos, mediado por la regulación de la expresión diferencial de genes del metabolismo primario, de las características fenotípicas iniciales de las plantas transgénicas (en biomasa y reservas metabólicas) más propensas a tolerar el estrés, de los cambios fisiológicos producidos (más aerénquima, menor daño del tejido fotosintético causado por estrés oxidativo) y de su mejor recuperación respecto de las salvajes.

HaWRKY10 es un FT de girasol de tipo WRKY perteneciente al grupo IId, cuya expresión está regulada específicamente en semillas en germinación y en embriones en desarrollo. También se regula por ABA y GA pero exclusivamente en cotiledones, órganos en los que se acumulan las reservas del embrión. Del análisis de los perfiles de movilización de reservas durante la germinación, se concluyó que hay una relación inversamente proporcional entre los niveles de transcripto de *HaWRKY10* y el consumo de lípidos. Además, el comportamiento de sus transcriptos en aquenios en desarrollo se asemejó al patrón de los genes de *Arabidopsis* vinculados con la reserva de lípidos en semillas durante el desarrollo de las mismas. Para ahondar en el estudio de este FT se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* que expresan *HaWRKY10* en forma constitutiva. Las semillas de estas plantas contuvieron mayor cantidad de lípidos y fueron más susceptibles al ABA durante la germinación. En el mismo sentido, la expresión de genes de biosíntesis de GA y señalización de ABA mostró una regulación diferencial en las plantas transgénicas. Además, en el establecimiento de líneas, las plántulas consumieron mayor cantidad de lípidos y menos carbohidratos que las salvajes. En ese mismo orden, los niveles del transcripto de SPD1, una lipasa clave

durante la germinación, y la actividad de PEPC, una enzima clave en la gluconeogénesis, aumentaron en las plantas transgénicas.

OsWRKY47 es un FT de arroz que aparece regulado diferencialmente en las plantas *P_{SARK}::IPT*. Las plantas *P_{SARK}::IPT* presentaron un aumento en el contenido de citoquininas en estrés hídrico y fueron más tolerantes a estrés hídrico y produjeron mayor cantidad y calidad de semillas que las salvajes en el mismo tratamiento. Se obtuvo la proteína OsWRKY47 recombinante en bacterias y a través de ensayos de SELEX se determinó que esta proteína es capaz de unir *in vitro* la secuencia GTTGACC/T (caja W47) de forma específica y con elevada afinidad. Tanto en ensayos de unión *in vitro* como en transformaciones transitorias en hojas de tabaco, OsWRKY47 unió las cajas W47 presentes en los promotores de los genes que codifican una proteína de unión a calmodulina (CaPU) y una proteína con repeticiones de cisteína (PRRC). Los niveles de transcritos de *OsWRKY47*, *CaPU* y *PRRC* se incrementaron en las plantas de arroz transformadas con la construcción *P_{SARK}::IPT* cuando fueron sometidas a estrés en comparación con plantas salvajes bajo el mismo tratamiento. Para investigar si la regulación diferencial de *OsWRKY47* y sus genes blanco en las plantas *P_{SARK}::IPT* juega un papel en las características de esas plantas frente al estrés hídrico, se realizó un trabajo de colaboración con el grupo de E. Blumwald y se obtuvieron y caracterizaron plantas de arroz mutantes y sobreexpresantes de *OsWRKY47*. Las plantas de arroz sobreexpresantes fueron más tolerantes al estrés y produjeron más semillas que las salvajes, mientras que las mutantes *Oswrky47* presentaron los fenotipos opuestos. De esta forma se determinó que OsWRKY47 tiene un papel positivo en las respuestas de tolerancia a estrés hídrico. Además la expresión de *CaPU* y *PRRC* se indujo en las sobreexpresantes y se redujo en las mutantes de *OsWRKY47* con respecto a las plantas salvajes, indicando su condición de blancos de OsWRKY47 y su participación en el fenotipo generado por la sobreexpresión de este FT. Tanto las plantas sobreexpresantes como las mutantes produjeron menor cantidad de semillas que las salvajes en condiciones normales de crecimiento, indicando la necesidad de una regulación fina de los niveles de los transcritos de OsWRKY47.

ABSTRACT

Given the increasing world population it is necessary to produce more food for human consumption. Agrobiotechnology and molecular biology provide useful tools for the development of cultivars with higher yield and increased tolerance to stressful conditions without consuming more resources than their predecessors under standard or stressful conditions. To achieve this goal it is essential to gain insights about the mechanisms taking place in plants to deal with different environmental conditions.

Transcription factors (TFs) are proteins that regulate the expression of their target genes and trigger signaling cascades leading or not to the plant adaptation to the environment.

In this Thesis work we studied three TFs belonging to the WRKY family. Through this study relevant information was obtained for a better understanding of plant response mechanisms, in particular responses to abiotic stress caused by excess and lack of water. Moreover, the involvement of these TFs in some developmental stages was also investigated. To a greater or lesser extent, these three proteins are potential biotechnological tools for crop improvement.

HaWRKY76 is a sunflower TF, divergent from the group IIId, which has non conservative changes in the DNA binding domain. Due to the divergence in the DNA binding sequence, HaWRKY76 binding capacity was evaluated *in vitro* and we identified that this protein recognizes non-canonical *cis* sequences. In sunflower, *HaWRKY76* showed higher expression levels in roots and hypocotyls than in other organs and regulation by water stress (excess and scarcity) and development. Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants that express HaWRKY76 controlled by a constitutive promoter developed their roots and rosette differentially, generating higher biomass and yield than wild type plants under normal conditions. When exposed to water stress, transgenic plants were more tolerant than wild type plants, without compromising seed production. The differential response in these plants was stated through less water consumption and less leaves water loss probably due to faster stomatal closure and less cell damage. A differential regulation of gene expression of the ABA-dependent and ABA-independent

signaling cascades was also observed. Under water excess, HaWRKY76 plants were more tolerant than controls and produced slightly more seeds when water hardly saturated the soil or completely covered the plants. The phenotypical characteristics leading to the beneficial traits exhibited by the transgenic plants include metabolic and physiological differences with controls. Among the metabolic is significant the contribution of a conservative use of energy resources, mediated by the differential expression of primary metabolism genes. Considering the physiological traits, the initial phenotypical characteristics (biomass and metabolic reserves), more aerenchyma development, lower photosynthetic tissue damage caused by oxidative stress and their improved recovery compared with wild type plants.

HaWRKY10 is a sunflower WRKY TF belonging to IId group whose expression is regulated specifically in germinating seeds and in developing embryos. ABA and GA treatments also regulate this TF expression but exclusively in cotyledons of imbibed seeds. Through the analysis of lipids and carbohydrates mobilization profiles during germination, it was detected an inverse relationship between levels of *HaWRKY10* transcripts and consumption of lipids. Moreover, the *HaWRKY10* expression pattern in developing achenes resembled the Arabidopsis genes linked to seed lipid reserves accumulation during development, which suffer an increment before the lipid storage is produced. Arabidopsis transgenic seeds that express HaWRKY10 under a constitutive promoter contained more lipids and were more susceptible to ABA in germination than wild type seeds. Similarly, expression of GA biosynthetic and ABA signaling genes was differentially regulated in the transgenic plants compared to wild type plants. Furthermore, HaWRKY10 seedlings during the first week of development consumed more lipids and fewer carbohydrates than wild type ones. In concordance with this differential reserve mobilization, the transcript levels of *SPD1*, a key lipase in germination, and the PEPC activity, a key enzyme in gluconeogenesis, were increased in transgenic plants compared to wild type, which suggested a role for HaWRKY10 in stored reserves mobilization.

OsWRKY47 is a rice WRKY TF that binds *in vitro* specifically and with high affinity the sequence GTTGACC/T, named the W47box). OsWRKY47 binds the W47 boxes present in the promoters of genes encoding a calmodulin binding protein (CaPU) and a protein

with cysteine repeats (PRRC), triggering their expression activation. *OsWRKY47*, *Capu* and *PRRC* expressions increased in plants transformed with the $P_{SARK}::IPT$ construct and subjected to water stress compared with wild type plants under the same treatment. $P_{SARK}::IPT$ plants have increased cytokinin levels under drought, are more tolerant to water stress and produce more and better seeds than wild type plants under the same treatment. To determine whether the induction of *OsWRKY47* (and its target genes) in $P_{SARK}::IPT$ plants has implication in some of its features under stress, we carried out a collaborative project with E. Blumwald's group. Rice mutant and overexpressing *OsWRKY47* plants were obtained and their phenotype assessed. Overexpressing plants were more tolerant to drought stress and produced more seeds than wild type plants, while *OsWRKY47* mutants showed the opposite characteristics. These results suggested that *OsWRKY47* has a role in rice plants responses to drought stress. In addition *CaPU* and *PRRC* were induced in *OsWRKY47* overexpressing plants and repressed in *OsWRKY47* mutants, suggesting that they are direct targets of this TF. Both genotypes (overexpressor and mutant) produced fewer seeds than wild type plants in normal growth conditions, indicating a role of *OsWRKY47* in this process and the need of a fine regulation of the levels of their transcripts.

Introducción General

CAMBIA
...TU FORMA DE...
VER LAS COSAS
...Y LAS COSAS...
CMBIARÁN.

Anónimo

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas, según define la Real Academia Española, son seres vivos autótrofos y fotosintéticos, cuyas células poseen una pared compuesta principalmente de celulosa y carecen de capacidad locomotora. Estos organismos increíbles junto con las bacterias fotosintéticas son los únicos seres vivos capaces de transformar energía lumínica en energía química y además, generar oxígeno en este proceso. La vida del ser humano no sería posible sin ellas.

I– La plasticidad de las plantas

La vida en la tierra depende de la energía proveniente del sol. La fotosíntesis es el único proceso de importancia biológica que es capaz de usar esta energía y transformarla en energía química. El término “FOTOSÍNTESIS” significa literalmente “sintetizar usando luz”. Las plantas, como organismos fotosintéticos, usan energía solar para producir compuestos carbonados; estos fotosintatos son utilizados finalmente para distintos procesos celulares en las plantas y sirven como fuente de energía para todas las formas de vida.

Las plantas son organismos sésiles y no pueden reubicarse en ambientes que les resulten más favorables. Entonces, para sobrevivir poseen una sorprendente colección de características relevantes que van desde distintos aspectos de su morfología y fisiología hasta su anatomía, el tiempo de desarrollo y floración y los patrones de crecimiento de su descendencia (Sultan, 2000).

La expresión fenotípica es el resultado de interacciones complejas entre los genes del organismo y el medioambiente. De esta manera, un genotipo puede presentar diferentes fenotipos en distintas condiciones medioambientales. Esta propiedad fundamental de los organismos es conocida como plasticidad fenotípica. La habilidad de un organismo para mostrar diferentes fenotipos en ambientes heterogéneos le confiere beneficios adaptativos sobre el resto de los individuos. Hace poco tiempo que la plasticidad ha sido reconocida como una forma importante de diversidad fenotípica. Ligado a esto, se acepta que la plasticidad tiene implicancias respecto a cómo se

desarrollan, funcionan y evolucionan en sus ambientes los organismos (Pham y McConnaughay, 2013; Sultan, 2000; Trewavas y Malho, 1997)

Comprender las respuestas plásticas de las plantas es crucial para predecir y manejar los efectos del cambio climático en las especies nativas y en plantas de interés económico, que son la fuente de alimentación básica de la población mundial.

II – La seguridad alimentaria y la productividad en el futuro

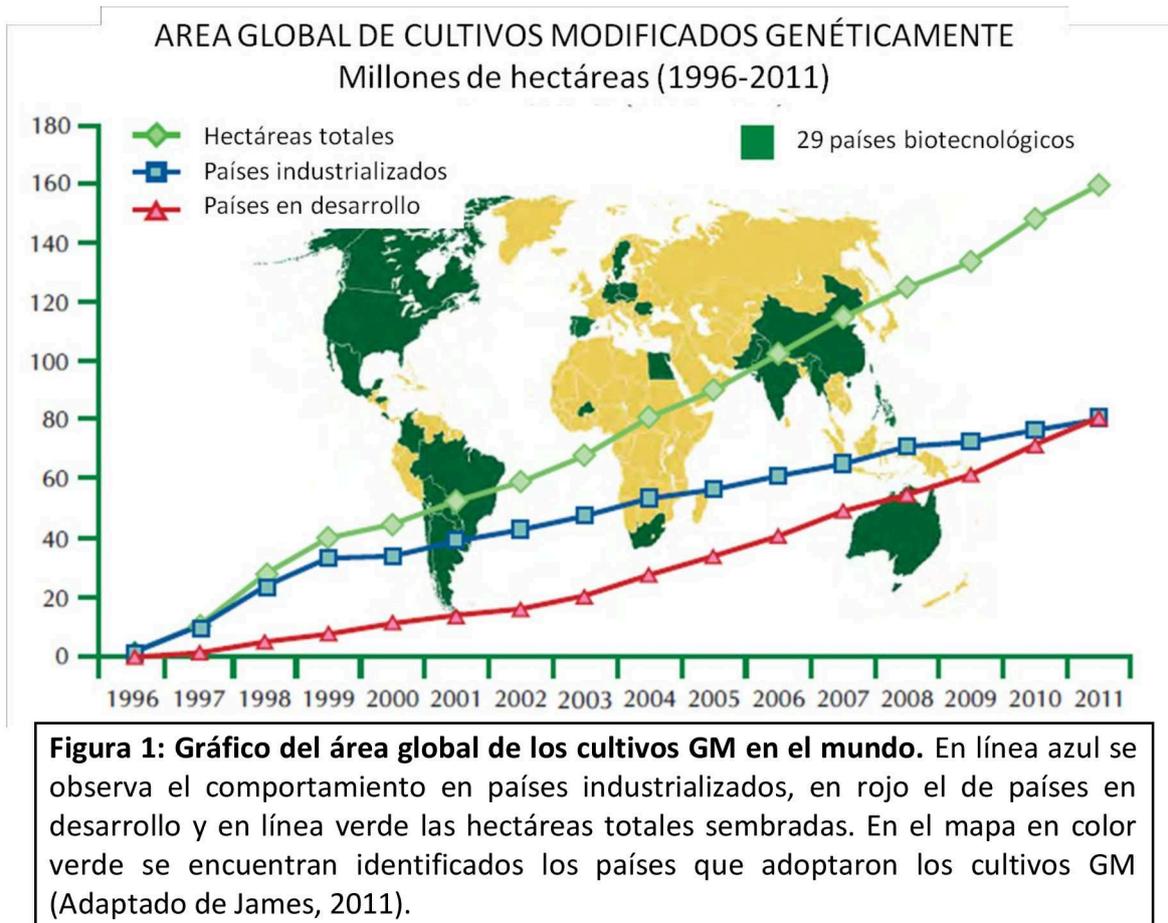
Los pronósticos indican que en el año 2050 la población mundial se incrementará alrededor de un 34 %. Para alimentar a esta población la producción de alimentos (excluyendo los empleados en la producción de biocombustibles) deberá aumentar al menos un 70 %. A su vez, este incremento procedería principalmente del aumento del rendimiento y la intensidad de los cultivos, dado que actualmente se están aprovechando la mayoría de las tierras cultivables (FAO, 2009). Incluso la mayor producción de alimentos podría provenir de tierras anteriormente no destinadas a la agricultura como parte del bosque nativo, de los humedales y del área ganadera (Anguiano y de D'Angelo, 2007). Si se hace una proyección hacia el 2050 tomando como base el incremento del rendimiento de los últimos años de algunos de los cultivos más importantes, se espera que la productividad aumente entre un 35 y un 68 %. Estos valores se encuentran muy por debajo de los requeridos para satisfacer la demanda (Ray y col., 2013). Frente a esta realidad se plantea la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que permitan incrementar la productividad, acortando la brecha entre el rendimiento potencial y el rendimiento real de los cultivos y, a su vez, incrementando el rendimiento máximo de los mismos (Godfray y col., 2010).

Para lograr estas metas, es necesario conocer cómo funcionan integralmente las plantas, describir su fisiología y morfología, los parámetros que determinan su rendimiento y las vías moleculares implicadas en definir fenotipos deseables. Además, dado que se producen grandes pérdidas en la producción a causa de diferentes agentes externos de origen biótico como plagas, pestes, herbívoros y de tipo abiótico como salinización, regímenes extremos de agua y temperaturas extremas, es

importante dilucidar los mecanismos involucrados en la tolerancia, resistencia y escape.

III – Los cultivos mejorados y su evolución en el tiempo

La domesticación de las plantas puede ser considerada como la primera manipulación genética de los organismos vivos, está asociada con el origen de la agricultura y representa la mayor contribución de la biotecnología al desarrollo del hombre (Melgarejo y col., 2014). Los cruzamientos genéticos, la selección de mutantes generadas de manera artificial y la transgénesis son las técnicas principales en el fitomejoramiento. El mejoramiento vegetal tradicional utiliza como herramientas para la modificación génica el cruzamiento, la mutagénesis al azar y la hibridación somática. Estas técnicas permiten introducir o mutar de forma aleatoria secuencias de ADN relacionadas con características deseables en las especies compatibles (cruzamiento) o no compatibles (hibridación somática). La hibridación somática genera problemas de esterilidad y en muchos casos las plantas no se regeneran. Debido a las barreras en el cruzamiento y las dificultades en la especificidad de las secuencias que tienen que transmitirse, el mejoramiento clásico requiere el cultivo y selección de muchas generaciones, lo que demanda mucho tiempo. Con el advenimiento de la Ingeniería Genética se introdujo el mejoramiento por medio de transgénesis, que permite seleccionar de manera relativamente sencilla y rápida las plantas que adquirieron la característica deseable. La transgénesis usa técnicas de clonado molecular para identificar o sintetizar genes de interés (Hou y col., 2014). Por medio de la Ingeniería Genética se insertan uno o varios genes que codifican proteínas que les confiere a las plantas características determinadas. Un organismo generado de esta manera es un organismo genéticamente modificado (OGM). Esta tecnología permite que fenotipos difíciles o imposibles de lograr anteriormente puedan ser alcanzados en la actualidad (Qaim, 2009).



Las técnicas básicas de Ingeniería Genética de plantas se desarrollaron a principio de 1980 y el primer cultivo genéticamente modificado (GM) se comercializó a mediados de los noventa (Brookes y Barfoot, 2014; Castle y col., 2006). Desde entonces, la adopción por parte de los agricultores se incrementó rápidamente. En la Figura 1 se puede observar la evolución de las hectáreas de cultivos GM sembrados en el mundo desde 1996 hasta 2011.

La primera generación de cultivos genéticamente modificados comenzó a comercializarse en el año 1996 y continúa actualmente (Figura 2). Estos primeros productos están basados principalmente en características agronómicas simples, como tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos. Estas plantas modificadas se convirtieron en herramientas útiles para mejorar la productividad/hectárea y preservar los suelos (Arce y col., 2008; Castle y col., 2006). La segunda generación de cultivos GM involucra una diversidad de cualidades reguladas por grupos de genes, entre las que se cuentan los que generan fenotipos de calidad incrementada, como por ejemplo,

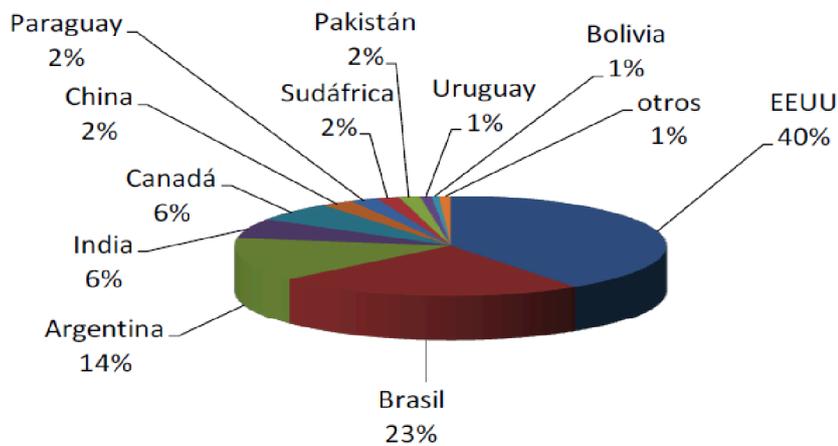
granos con mayores aportes nutricionales. La tercera generación incluye plantas diseñadas para producir sustancias específicas para propósitos farmacéuticos o industriales (Qaim, 2009), que podrían provenir de la construcción y comprensión de redes de genes reguladores (Century y col., 2008; Grotewold, 2008). En la actualidad del total de cultivos GM sembrado por año, la mayor proporción corresponde a cultivos de primera generación (Marshall, 2010).

IV – Los transgénicos en Argentina

Muchas publicaciones identifican a Argentina como el tercer productor mundial de cultivos transgénicos (James, 2010; Marshall, 2010; Trigo, 2011). Según el último informe del Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas, (ISAAA, según sus siglas en inglés), Argentina aportó en 2013 el 14 % de los cultivos GM producidos en el mundo (Figura 2).

El proceso de cambios en los cultivos empleados y en la manejo de los mismos, denominado por muchos “la revolución verde” tuvo a Argentina como un protagonista principal. Hay varios motivos por los cuales los hechos se dieron de esta manera. La Comisión Nacional Asesora de Bioseguridad Agropecuaria, CONABIA, se creó en 1991, el primer cultivo GM ingresó a nuestro país a mediados de los años noventa y la legislación que enmarcó el proceso comenzó a gestarse a principios de esta década (Trigo, 2011; Trigo y Cap, 2004).

Área global cultivada con OGM, por país (sobre 175 millones de hectáreas)



Fuente: ISAAA, 2013

Otros: Filipinas, Australia, Burkina Faso, Myanmar, España México, Colombia, Sudán, Chile, Honduras, Portugal, Cuba, República Checa, Costa Rica, Rumania, Eslovaquia. Total: 27

Figura 2: Área global cultivada con cultivos GM por país en el año 2013. Los resultados corresponden a 175 millones de hectáreas sembradas. Se muestran los porcentajes correspondientes a cada país. (Fuente: *International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA)*).

En la adopción de los cultivos GM fue muy importante el hecho de que los transgenes se encontraran en variedades que adaptaron su desarrollo perfectamente a las condiciones agrícolas generadas en la región y la existencia, al momento de la aparición de estas innovaciones, de una infraestructura de servicios tecnológicos consolidada capaz de llevar con rapidez y eficacia las nuevas variedades a los productores (Trigo y Cap, 2006; Trigo y col., 2002; Trigo y Cap, 2004).

Hasta el año 2014 en Argentina se han aprobado 22 eventos transgénicos para su siembra, consumo y comercialización. De la totalidad, la mayor proporción de cultivos corresponde a plantas de maíz y minoritariamente de algodón y soja. Todos los cultivos pertenecen a OGM de primera generación y la característica introducida es tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos o combinaciones de estas últimas (Fuente: Argenbio <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=712>).

Uno de los motivos por el que los eventos que corresponden a OGM de segunda o tercera generación todavía no se encuentran en el mercado de forma masiva, es el tiempo y la inversión que requiere llegar desde el descubrimiento hasta los ensayos finales y la certificación. Como el desarrollo de OGM de segunda o tercera generación es posterior respecto a los de primera generación, éstos últimos han logrado superar las fases regulatorias necesarias para su comercialización antes que los de segunda y tercera generación (Figura 3).

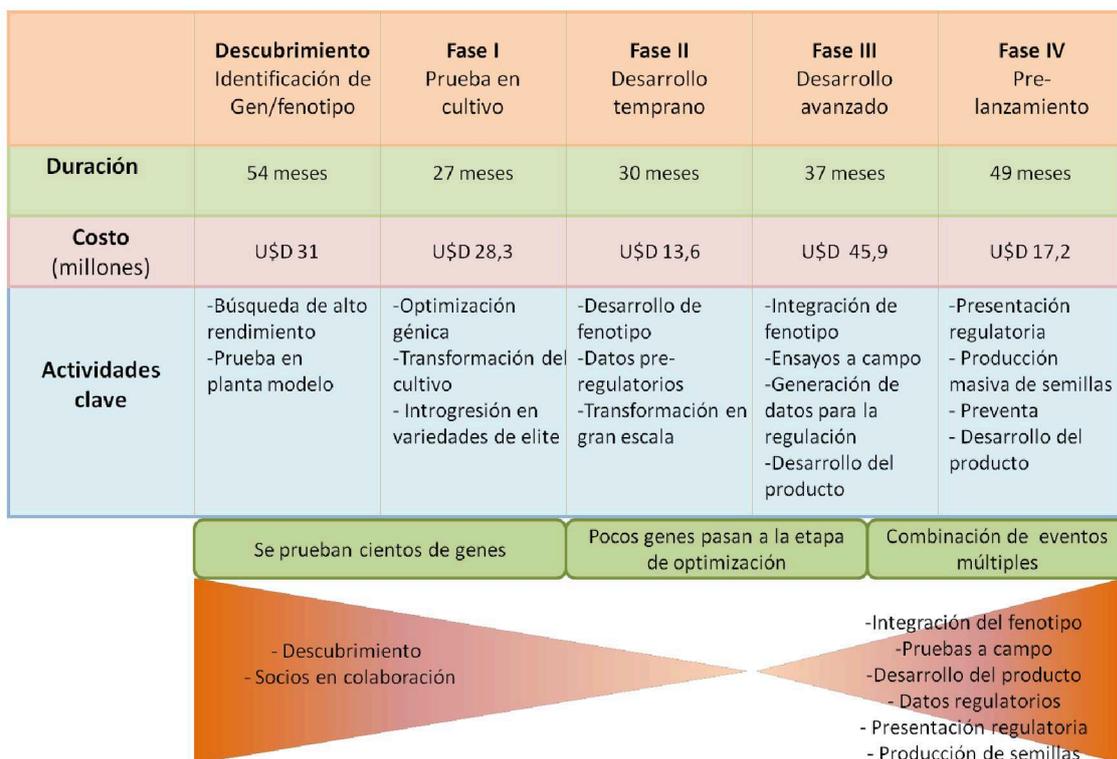


Figura 3: Resumen del proceso de desarrollo de un cultivo transgénico. Se muestran las actividades y su duración y costos. Las duraciones y costos son promedios industriales (McDougall, 2011). Como algunas actividades se solapan, el total de cada fase no refleja la duración real de todo el proceso de desarrollo e investigación. U\$D dólares (adaptado de Prado y col., 2014).

El descubrimiento o proceso de investigación que da principio a todo desarrollo, incluye la identificación de una secuencia genética que pueda ser utilizada para conferir una actividad biológica nueva o alterada o para suprimir la expresión de genes nativos de una vía metabólica (McDougall, 2011). La identificación del gen o de los

genes que se desea/n manipular es el resultado de los avances que se hacen en la descripción y discernimiento de las vías de señalización molecular, de los procesos metabólicos y de las rutas de respuesta a estrés, y cuyo objetivo mayor es la comprensión del funcionamiento integral de las plantas. Sumado a esto, la introducción de genes del mismo organismo u organismos cercanos evolutivamente o que no demanden el uso de agroquímicos constituye una ventaja adicional. En consecuencia, el desarrollo de esta segunda generación de OGMs tiene perspectivas prometedoras por la multiplicidad de fenotipos que pueden ser alterados y las menores exigencias en cuanto al uso de agroquímicos que requeriría su introducción a campo, respecto de los de primera generación debido a que en principio los desarrollos podrían demandar menos fertilizantes o insecticidas, por ejemplo.

V – El desarrollo de las plantas

El desarrollo de los organismos incluye el crecimiento y aumento ordenado de la masa celular, y la diferenciación celular que da origen a los diferentes tejidos y órganos. A su vez, la diferenciación celular está orquestada por los patrones temporales y espaciales de expresión génica (Lodish y col., 2008).

Las plantas poseen células meristemáticas que son capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular y les permiten adaptarse al medio, desarrollándose en función de las condiciones en las que se encuentran. Las plantas captan la situación de su entorno y a nivel molecular se producen una serie de procesos que desencadenan cascadas de señalización. Estas cascadas culminan en la expresión de proteínas específicas en lugares indicados que otorgan al organismo características fenotípicas como consecuencia del medio ambiente en el que crece en ese momento (Taiz y Zeiger, 2006). Por esto mismo, es muy importante que esta serie de pasos esté muy regulada, dado que de esto depende que las plantas se adapten a su entorno y sobrevivan. El control a nivel transcripcional es uno de los mecanismos principales por los que los organismos regulan su expresión génica (Eulgem, 2005). En este proceso tienen un rol

fundamental las proteínas denominadas Factores de Transcripción (FTs, Taiz y Zeiger, 2006).

VI – Factores de transcripción de plantas

Los FTs son proteínas reguladoras que actúan en *trans* uniéndose de forma específica a elementos en *cis*, que son secuencias cortas de ADN en las regiones regulatorias de genes cuya expresión es, de esta forma, inhibida o activada (Taiz y Zeiger, 2006).

En general los FTs tienen estructuras modulares y exhiben al menos dos tipos de dominios: un dominio de unión a ADN y un dominio de interacción proteína-proteína que hace de intermediario, directa o indirectamente, de la activación o represión de la transcripción (Brivanlou y Darnell, 2002). Los FTs de plantas se clasifican en familias y grupos principalmente por la conservación de sus dominios de unión a ADN (Figura 4), y también por la presencia de otros dominios conservados, las características estructurales de los genes, su función, los procesos biológicos en los que están involucrados, y las vías de transducción de señales a las cuales están asociados (Ribichich y col., 2013; Riechmann, 2002). De esta forma se clasifican en familias como NAC, ERF/AP2, Dedos de Zinc, DOF, b-Zip, WRKY, MYB y HD-Zip (Ariel y col., 2007; Chan y col., 1998; Du y col., 2009; Riechmann y col., 2000).

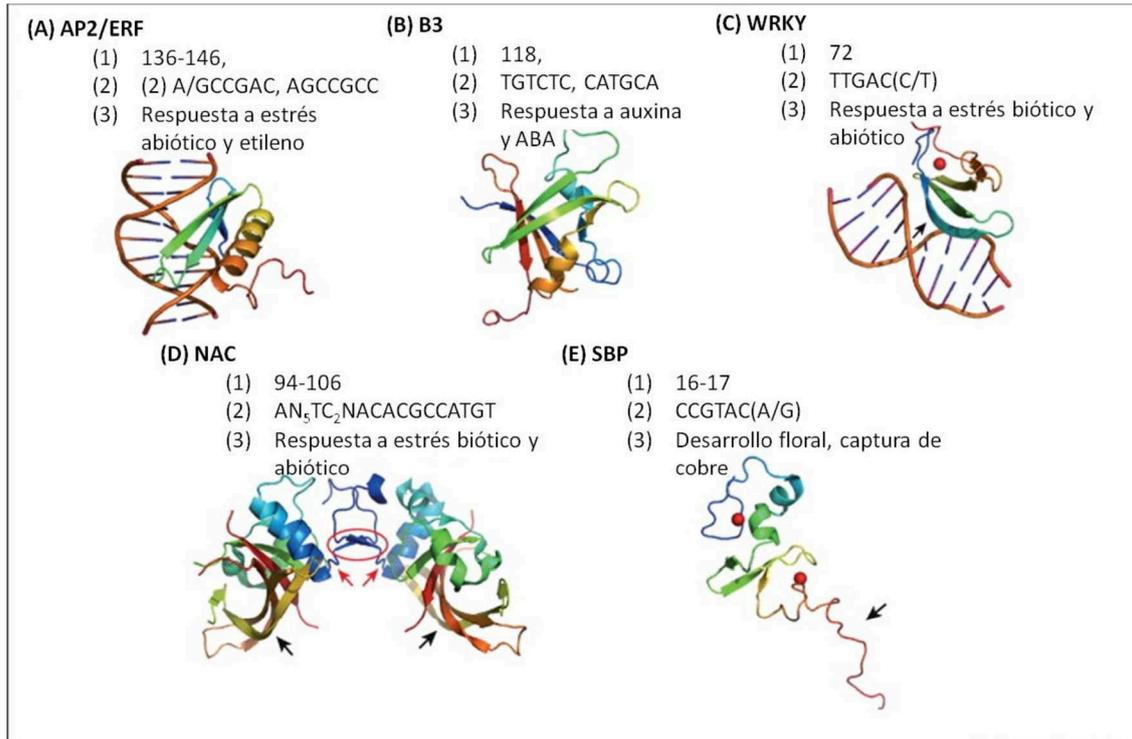


Figura 4: Estructura de los dominios de unión a ADN de algunas familias de FTs de plantas. En C y E las esferas rojas muestran iones de Zn. En C y D las flechas negras indican la localización de las secuencias WRKYGQK y WKATGXDK[K/R], respectivamente. Se muestra información sobre (1) el número de proteínas predichas en *Arabidopsis*, (2) secuencias de reconocimiento representativas, (3) funciones conocidas. Las proteínas se muestran en colores del arcoíris desde el azul (N-terminal) hasta el rojo (C-terminal, adaptado de Yamasaki y col., 2013).

Luego de la publicación del genoma completo de *Arabidopsis thaliana*, se identificaron alrededor más de 2000 FTs putativos que pertenecen a 30 familias aproximadamente (Guo y col., 2005; Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009; Riechmann y col., 2000). La mitad de estas familias son consideradas específicas de plantas, dado que no hay miembros descritos en otros linajes eucariotas. Estos FTs específicos de plantas incluyen a AP2/ERF, NAC, SBP, TCP y HD-Zip que poseen dominios de unión a ADN exclusivos de estas familias y las familias ABI3/VP1 y ARF que comparten la estructura de estos dominios y se clasifican en la superfamilia B3, entre otras (Yamasaki y col., 2013). La familia WRKY, si bien no es exclusiva, está muy expandida en plantas, algunos autores continúan considerándola como tal y la gran mayoría de la investigación existente, está relacionada a WRKYs de estos organismos (Chen y col., 2012; Zhang y Wang, 2005). En

la Figura 4 se muestran las estructuras de algunos de los dominios de unión a ADN de los FTs específicos de plantas y algunas características de los mismos.

VII – Los Factores de transcripción de tipo WRKY

El origen de estos FTs data de los primeros organismos eucariotas y hay miembros de la familia en protozoarios y algas, además de las plantas terrestres que incluyen musgos y helechos (Glöckner y col., 2002; Pan y col., 2009; Ülker y Somssich, 2004). A través de análisis bioinformáticos, se fueron identificando FTs WRKY putativos en diferentes especies de plantas, lo que sirvió para entender la dimensión de la expansión de la familia en el grupo. En *Arabidopsis* esta familia cuenta con 72 miembros (Seki y col., 2002); en arroz, la familia de FTs WRKY está compuesta por 102 genes en la variedad *indigo* y 98 genes en la variedad *japonica* (Ross y col., 2007); en pepino (*Cucumis sativus*), una búsqueda por el genoma completo arrojó como resultado la presencia de 55 FTs de tipo WRKY (Ling y col., 2011); en *Populus* se identificaron 100 *PtWRKY* (Jiang y col., 2014) y en girasol se identificaron 97 FTs de tipo WRKY (Giacomelli y col., 2010). La mayoría de estos FTs tienen función desconocida.

Los miembros de esta familia se caracterizan principalmente por la presencia de un motivo de 60 aminoácidos muy conservado que contiene en forma central los cuatro aminoácidos WRKY y un motivo de dedos de Zinc. Estas proteínas pertenecen a la superfamilia WRKY-GCM1, que evolucionó de transposasas de tipo Mule (del inglés *Mutator*, o *Mutator like*, Babu y col., 2006). La gran mayoría de los factores de transcripción de tipo WRKY descritos hasta el momento unen la secuencia de ADN (C/T)TGAC(T/C), también denominada “caja W” (Eulgem y col., 2000).

Los FTs WRKY se clasifican en tres grupos (I, II, III) en base al número de dominios WRKY presentes por molécula y al patrón definido del motivo dedo de Zinc (Figura 5, izquierda). El grupo I posee dos dominios WRKY, mientras que los grupos II y III poseen sólo uno. El grupo II se divide a su vez en cinco subgrupos (IIa, IIb, IIc, IId, IIe). Estos distintos grupos presentan características particulares específicas como cierres de leucina, motivos de unión a calmodulina y otros dominios conservados de función desconocida hasta el momento (Figura 5, arriba). Los grupos I y II poseen un motivo de

dedos de Zinc de tipo C₂-H₂ mientras que el grupo III contiene un motivo dedo de cinc de tipo C₂-HC (Eulgem y col. 2000, Park y col. 2005).

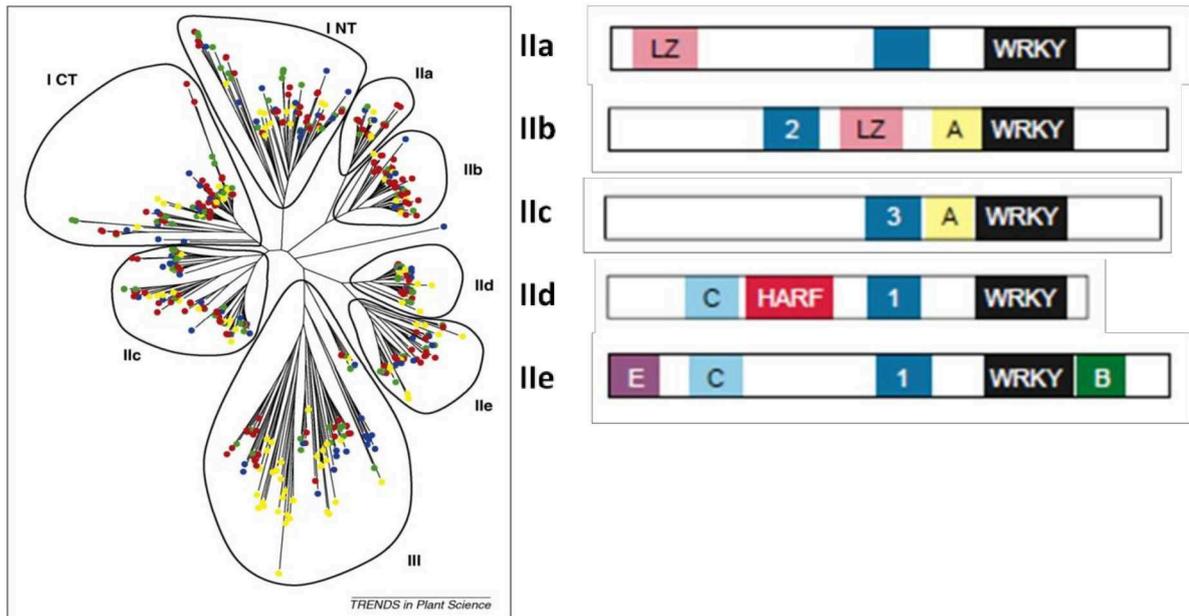


Figura 5: Clasificación de los factores de transcripción WRKY. Izquierda: árbol filogenético de la familia WRKY en plantas superiores. Se consideraron para la construcción del árbol los dominios WRKY de todos los genes de esta familia pertenecientes a soja (puntos rojos), arroz (amarillo), Arabidopsis (azul) y *Populus trichocarpa* (verde) (Adaptado de Rushton y col., 2010). Derecha: representación esquemática de miembros típicos del grupo II. Los dominios WRKY están indicados por cajas negras. Se indican cajas con distintos motivos conservados (adaptado de Eulgem y col., 2000).

VIII – Procesos biológicos en los que participan los factores de transcripción de la familia WRKY

Los FTs de la familia WRKY han sido ampliamente descritos como participantes en respuestas a estrés biótico (Agarwal y col., 2011; Eulgem y col., 2000; Eulgem y Somssich, 2007; Pandey y Somssich, 2009), a estreses abióticos, y procesos asociados a diferentes etapas del desarrollo, como senescencia, dormancia y germinación, entre otros (Agarwal y col., 2011; Dong y col., 2003; Eulgem y col., 2000; Rushton y col., 2012; Rushton y col., 2010). En ese sentido, uno o varios FTs WRKY cambian su

expresión de forma específica en la inflorescencia principal (Huang y col., 2014), en semillas en desarrollo (Lagacé y Matton, 2004; Luo y col., 2005; Sun y col., 2003; Johnson y col., 2002), y en el estadio vegetativo y reproductivo (Le y col., 2010).

Además, muchos genes *WRKY* se inducen o reprimen rápidamente por hormonas, como el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GAs), las citoquininas (CQs) y el etileno entre otras, que intervienen en distintas respuestas, incluyendo las provocadas por diversos factores como frío, salinidad y sequía, causantes de estrés abiótico (Giacomelli y col., 2010; Jiang y col., 2014; Kayum y col., 2014; Ling y col., 2011; Ramamoorthy y col., 2008; Seki y col., 2002). En la

Tabla 1 Tabla 1 se ilustran ejemplos de algunos genes *WRKY* caracterizados a través del análisis de sus respectivas mutantes y sobreexpresantes y su posible función en estrés abiótico.

Estos estudios indicaron que la expresión de estos FTs está regulada por las condiciones mencionadas lo que sugiere que podrían tener una función regulatoria en las cascadas de señalización asociadas (Chen y col., 2012).

Gen	Estrés abiótico que lo induce	Función en estrés abiótico	Referencia
<i>AtWRKY2</i>	NaCl, manitol	Regulador negativo de la señalización de ABA	(WenBo y DiQiu, 2009)
<i>AtWRKY6</i>	H ₂ O ₂ , metil viológeno, acumulación de Pi and B	Regulador negativo en estrés por bajos niveles de Pi y regulador positivo en bajos niveles de B	(Chen y col., 2009; Kasajima y col., 2010)
<i>AtWRKY18</i>	ABA	Señalización de ABA, tolerancia a NaCl y manitol	(Ren y col., 2010; Shang y col., 2010)
<i>AtWRKY22</i>	H ₂ O ₂ , oscuridad	Participa en la transducción de señales desencadenada por senescencia inducida por oscuridad	(Zhou y col., 2011)
<i>AtWRKY26</i>	Estrés térmico	Regulador de la respuesta a estrés térmico (en conjunto con <i>AtWRKY26</i> y <i>AtWRKY33</i>)	(Li y col., 2011)
<i>OsWRKY08</i>	H ₂ O ₂ , ABA, sequía, salinidad	Regulador de la respuesta a estrés osmótico por medio de la vía independiente de ABA	(Song y col., 2009)
<i>OsWRKY11</i>	Estrés térmico e hídrico	Tendría un papel en la respuesta a estrés térmico e hídrico	(Wu y col., 2009)
<i>OsWRKY72</i>	Calor, ABA, salinidad, reserva de azúcares	Regulador negativo en señalización de ABA y reserva de azúcares	(Song y col., 2010)
<i>GmWRKY13</i>	Sal, sequía	Regulador putativo de la formación de raíces laterales y respuesta a estrés abiótico	(Zhou y col., 2008)
<i>GmWRKY21</i>	Sal, sequía, frío	Regulador putativo de la respuesta a frío	(Zhou y col., 2008)
<i>TcWRKY53</i>	Salinidad, frío sequía	Regulador negativo de estrés osmótico	(Wei y col., 2008)
<i>HvWRKY46</i> (<i>SUSIBA2</i>)	Azúcar	Regulador de la señalización de azúcares	(Hammargren y col., 2008; Mangelsen y col., 2010)

Tabla 1: FTs WRKY y estrés abiótico. Se muestra el nombre del gen, la condición por la que se induce su expresión y su función propuesta en estrés abiótico. En la última columna se detallan las referencias (Adaptado de Chen y col., 2010).

IX – Factores de transcripción WRKY y fitomejoramiento

Como demuestran los estudios citados anteriormente, el tipo de respuestas en el que están involucrados los FTs WRKY y su regulación específica, permite plantear que estos FTs podrían ser herramientas biotecnológicas para el mejoramiento vegetal. En la Tabla 2 se muestran ejemplos de FTs WRKY que les confieren características deseables sin causar efectos significativamente indeseables a las plantas que los expresan de forma diferencial.

Nombre del Gen	Origen del gen	Mejoramiento	Número de patente/ Referencia
Quimera de dos dominios WRKY	<i>Oryza Sativa</i> y <i>Zea mays</i> (entre otros)	Mayor rendimiento	WO2006079655 (Frankard, 2007)
GmWRKY	<i>Glycine Max</i>	Tolerancia a sal y/o sequía	WO2012110853 (Ali y col., 2012)
CaWRKYd	<i>Capsicum annum</i>	Tolerancia a patógenos	US20110321201 (Paek y col., 2011)
WRKY	<i>Zea Mays</i>	Tolerancia a estrés salino, térmico e hídrico	(CN102268443B, 2013)
GmWRKY40	<i>Glycine Max</i>	Tolerancia a sequía	(CN102911263, 2013)
ZmWRKY58	<i>Zea Mays</i>	Tolerancia a sal y sequía	(CN103224550A, 2013)
AtWRKY30	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerancia a estrés oxidativo y salino	(Scarpeci y col., 2013)
AtWRKY28 y AtWRKY75	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerancia a ácido oxálico y a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	(Chen y col., 2013)
AtWRKY75	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mejoramiento en el sistema radicular y en la disponibilidad de Pi	(Devaiah y col., 2007)
BhWRKY1	<i>Boea hygrometrica</i>	Tolerancia a estrés hídrico	(Wang y col., 2009b)
HvWRKY38	<i>Hordeum vulgare</i>	Tolerancia a estrés hídrico	(Xiong y col., 2010)
MusaWRKY71	<i>Musa spp.</i>	Tolerancia a estrés térmico, hídrico, salino, y oxidativo	(Shekhawat y col., 2011)
OsWRKY11	<i>Oryza Sativa</i>	Tolerancia a estrés térmico e hídrico	(Wu y col., 2009)
OsWRKY30	<i>Oryza Sativa</i>	Tolerancia a sequía	(Shen y col., 2012)
OsWRKY89	<i>Oryza Sativa</i>	Tolerancia a radiación UV-b	(Wang y col., 2007a)
TaWRKY19	<i>Triticum aestivum</i>	Tolerancia a estrés hídrico, salino y térmico	(NIU y col., 2012)

Tabla 2: Aplicaciones biotecnológicas de los FT WRKY. Se muestra el nombre del gen, el organismo del que proviene, el mejoramiento que le confiere a las plantas que lo expresan de forma diferencial y la referencia bibliográfica o patente, según corresponda.

X – Factores de transcripción WRKY en cultivos de girasol y arroz

El girasol y el arroz son algunos de los principales cultivos de grano en Argentina (Cruzate y Casas, 2009). Pese a la relevancia del cultivo de girasol y a la diversidad en número y función potencial de las proteínas WRKY, hay pocos estudios de FTs WRKY en esta especie. En arroz también aún se está muy por debajo de un conocimiento amplio sobre el tema a pesar del gran esfuerzo y recursos destinados al estudio de esta planta, principalmente de países que la tienen como su fuente principal de alimentación.

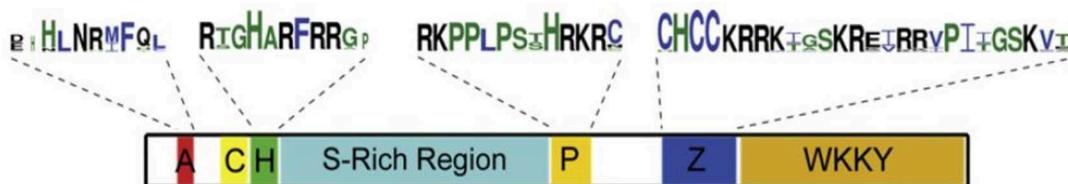


Figura 6: Representación esquemática de las proteínas de tipo WRKY que contienen un dominio de tipo “WKKY”. Las proteínas alineadas corresponden a grupos de EST provenientes de *Helianthus spp.* y *Lactuca spp.* (adaptado de Giacomelli y col., 2010).

En nuestro laboratorio se realizó una caracterización *in silico* de todos los FTs de tipo WRKY de *Helianthus annuus sp.* a partir de información disponible en bases de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST, del inglés, *Expressed Sequence Tags*). De esta forma, se encontraron 97 miembros putativos de esta familia. El árbol filogenético construido con los 97 FTs de la familia WRKY resolvió los siete grupos descritos anteriormente (I, II a-e, III) y mostró la aparición de un nuevo clado dentro del grupo II d con características específicas de la superfamilia *Asteraceae* (Giacomelli y col., 2010, Figura 6). Este nuevo clado conserva características del grupo II d como el dominio de unión a calmodulina y el dominio HARF, y presenta otros que hacen que diverja del mismo grupo. Entre éstos los miembros del nuevo clado tienen un dominio rico en prolina, un extremo amino terminal conservado y probablemente su

característica más relevante es el cambio de dos aminoácidos conservados del dominio WRKY:



Giacomelli y sus colaboradores seleccionaron un gen representativo de cada subfamilia para estudiar su regulación y observaron que estos genes se encuentran regulados por estrés biótico, abiótico y también por hormonas asociadas al estrés (Giacomelli y col., 2010).

En arroz, hay muchos trabajos que contribuyeron a la anotación de los FTs de tipo WRKY (Ross y col., 2007; Ryu y col., 2006; Xie y col., 2005; Zhang y Wang, 2005). El análisis exhaustivo de su estructura y secuencia permitió identificar alrededor de 100 *WRKY* putativos en la variedad *japonica* y 102 en la variedad *indica* (Ross y col., 2007; Zhang y Wang, 2005). Uno de estos análisis dio origen a un árbol filogenético que resolvió a los FTs WRKY de arroz en 5 grupos, manteniendo los grupos I, IIc y III descritos, y juntando los subgrupos IIa y IIb, y II d y IIe, respectivamente. Además, los autores observaron que si bien el motivo WRKYGQK característico de los FTs de tipo WRKY está muy conservado, aparecen nueve variantes del mismo, muchos de ellos pertenecientes al grupo III y IIc y que los dominios WRKY de los FTs de arroz contienen patrones de dedos de zinc que no habían sido informados en la literatura hasta ese momento (Zhang y Wang, 2005). Un análisis posterior dio origen a un nuevo árbol filogenético que dividió a los WRKY en cuatro grupos, manteniendo los grupos I, II y III descritos por Eulgem y colaboradores en el año 2000 y agregando el grupo IV, que contiene proteínas de tipo WRKY que contienen un motivo de dedos de zinc incompleto. El análisis de los dominios WRKY conservados y la localización de los genes *WRKY* en los cromosomas permitió la identificación de posibles genes *WRKY* duplicados y perdidos entre estas dos subespecies relacionadas de forma cercana (Ross y col., 2007).

Respecto a los FTsWRKY en arroz, del mismo modo que sucede con girasol y otras plantas descritas anteriormente en este texto, hay numerosos estudios que sugieren y/o concluyen que estas proteínas serían actores principales en la regulación del

desarrollo y de la respuesta de las plantas frente al estrés (Narsai y col., 2013; Ramamoorthy y col., 2008; Sharma y col., 2013; Zhou y col., 2010).

En el presente trabajo de Tesis se caracterizaron funcionalmente FTs de tipo WRKY provenientes de girasol (*Helianthus annuus*, Capítulo I y II) y de arroz (*Oryza sativa*, Capítulo III). El resultado del estudio funcional de estas proteínas permitió proponer su potencial uso como herramientas biotecnológicas, por lo que a continuación se expondrán brevemente las particularidades de cada especie y de su cultivo en el país.

X.I – El cultivo del girasol en Argentina

Helianthus annuus L., o girasol domesticado, es la especie más conocida y de mayor importancia económica del género, que pertenece a la Familia *Asteraceae* (Stevens, 2001). Esta familia representa el 10 % de las Angiospermas (plantas con flores) y sus miembros se caracterizan por poseer flores dispuestas en forma sécil sobre un receptáculo ensanchado, que constituye el capítulo. El capítulo es una inflorescencia especializada indeterminada que puede contener centenares de flores individuales (Harris, 1995; Raven y Axelrod, 1974).

El girasol es nativo del continente americano y su cultivo se remonta a miles de años atrás en México (Blackman y col., 2011; Lentz y col., 2008). En muchas culturas amerindias, el girasol fue utilizado como un símbolo que representaba a la deidad del sol. A comienzos del siglo XVI los españoles llevaron a Europa figuras de oro de la flor y semillas. Desde allí se extendió su cultivo al resto del mundo (Putt, 1997). Las primeras referencias sobre girasol en la República Argentina se remontan al siglo XIX, cuando los colonos de origen hebreo establecidos en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires realizaron introducciones de la semilla para consumo interno. La primera información estadística oficial del área sembrada data de la campaña 1928/29 con 400 has. Veinte años después, tuvo lugar el primer récord de superficie sembrada con 1.800.000 has. El descubrimiento de la androesterilidad genética en 1968 y la androesterilidad citoplásmica en 1970, hicieron posible la producción y difusión de

los primeros híbridos en escala comercial. De esta forma, de las 0,8 toneladas/ha de fines de la década del setenta, el rendimiento medio se duplicó hasta alcanzar 1,6-1,8 toneladas/ha con potenciales reales de producción para los mejores híbridos superiores a 3 toneladas/ha. En la actualidad, Rusia, Ucrania y Argentina producen en conjunto la mitad de la cosecha mundial de girasol. Esto ubica a nuestro país como el tercer productor más importante de esta semilla (Quiroga y Pérez Fernández, 2008). En Argentina, como se puede observar en el Figura 7, a lo largo de los años se ha logrado mejorar la producción y el rendimiento del girasol. Sin embargo, su cultivo ha sido desplazado de su zona de siembra originaria por la soja.

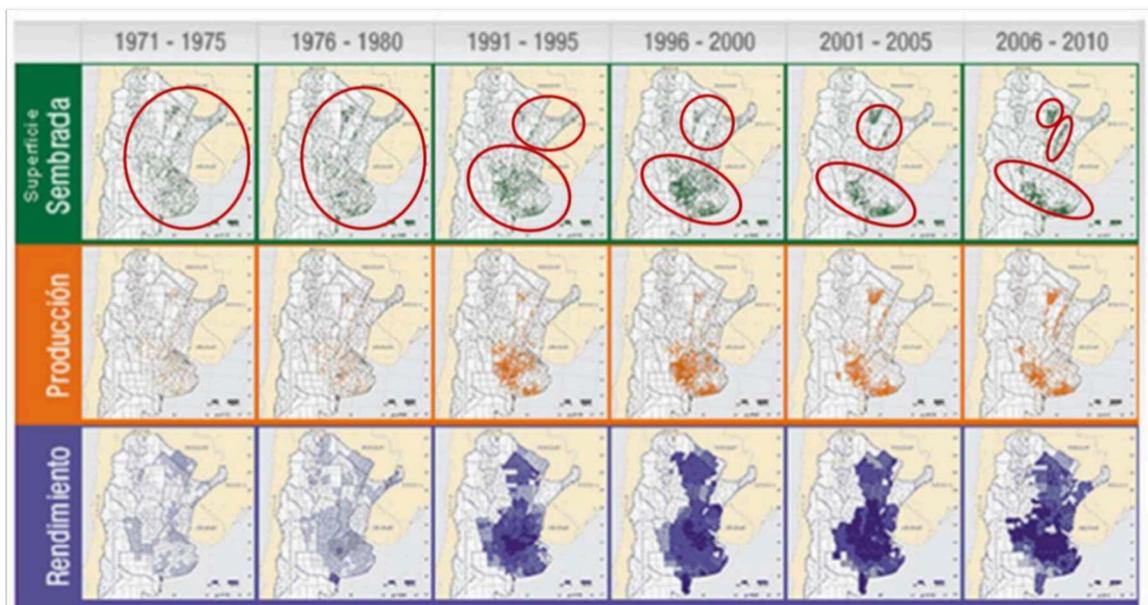


Figura 7: Evolución del cultivo de girasol en Argentina. Se muestran en el mapa de nuestro país: región sembrada, su producción y rendimiento a lo largo del tiempo. En círculos colorados se destacan las áreas sembradas y el desplazamiento del cultivo. Fuente: La Argentina en mapas CONICET, (http://www.imhichu-conicet.gov.ar/ARGENTINAenMAPAS/caste/cu_ol_gira.htm).

Este desplazamiento, ha llevado a que el girasol se sembrase en zonas áridas. Como consecuencia, surgió la necesidad de que estos cultivos fuesen tolerantes a diferentes tipos de estrés abiótico a los que no se enfrentaban en las otras zonas de cultivo (Fernandez y col., 2008). En este sentido, se han realizado diferentes aproximaciones, para identificar o mejorar cultivares adaptados a los nuevos ambientes. Como aporte de la Biología Molecular, algunos genes previamente aislados fueron objeto de estudios intensivos por la capacidad de conferir tolerancia a estrés hídrico, salino,

oxidativo o térmico cuando eran expresados como transgenes en otras especies (Almoguera y col., 2012; Blanco y col., 2011; Cabello y col., 2012; Cabello y col., 2014; Dezar y col., 2005; Personat y col., 2014). A pesar de no contar con la secuencia completa del genoma de girasol, los bancos de datos de ESTs disponibles constituyeron una valiosa fuente de investigación (Giacomelli y col., 2010; Heesacker y col., 2008; Pashley y col., 2006). Para identificar masivamente genes y proteínas que estuvieran relacionados con la productividad y la tolerancia del girasol a los distintos tipos de estrés, se ha comparado la expresión génica en plantas de diferentes variedades y en ausencia de estrés con plantas sometidas a distintos tratamientos (Fernandez y col., 2008; Fernández y col., 2003; Fernandez y col., 2012; Fulda y col., 2011; Hewezi y col., 2008; Kiani y col., 2007; Moschen y col., 2014; Roche y col., 2007). En muchos de estos trabajos, se observó que numerosos FTs (algunos de ellos de tipo WRKY) cambian su expresión en las distintas condiciones.

En el presente trabajo de Tesis se estudiaron dos FTs WRKY de girasol miembros del grupo IId, uno de ellos perteneciente al nuevo clado descubierto.

X.II – El cultivo de arroz en Argentina

Oryza sativa L., comúnmente llamado arroz, es una especie perteneciente a la familia de las gramíneas (*Poaceae*). Las gramíneas son la quinta familia con mayor riqueza de especies dentro de las angiospermas y las más importantes a nivel económico. Debido a su enorme diversidad morfológica, fisiológica y reproductiva y por las asociaciones mutualísticas que son capaces de hacer con otros organismos, las gramíneas han conquistado la mayoría de los nichos ecológicos del planeta (Bouchenak-Khelladi y col., 2010). Las plantas de arroz son anuales y presentan tallos de entre 40 cm y 1,5 m de alto y sus inflorescencias se desarrollan en forma de panícula (Juliano y Aldama, 1937). Las semillas de las plantas de arroz son comestibles y constituyen la base de la dieta de casi la mitad de la población mundial (Khush, 2005). Por este motivo, la domesticación del arroz es uno de los desarrollos más importantes en la historia. Los cultivos de arroz domesticados tienen un origen evolutivo único y datan de 8.200–13.500 años atrás. Luego de muchos años de controversia respecto al lugar donde sucedió su domesticación, un estudio reciente demostró que fue en China, en la región central del

río Perla y que la variedad domesticada fue *japonica* tomando con fuente la salvaje *rufipogon* (Huang y col., 2012). En Argentina, el arroz con cáscara ocupa el número 13 en los bienes de consumo del país, representa un 5,2 % del total de la producción de granos y un 0,6 % de los cultivos primarios.

Si bien Argentina es uno de los países que consume menos arroz *per capita* en el mundo y este grano no es de los principales productos por los que ingresan al país divisas, su producción, área cosechada y rendimiento se han incrementado notablemente en los últimos años (Figura 8). Sumado a esto, nuestro país exporta alrededor de un 60 % del arroz que produce, por lo que tiene un papel relevante en el mercado internacional, especialmente entre los países del Mercosur. En el año 2009, Argentina fue el segundo exportador de arroz con cáscara después de Estados Unidos (Maclean y col., 2013).

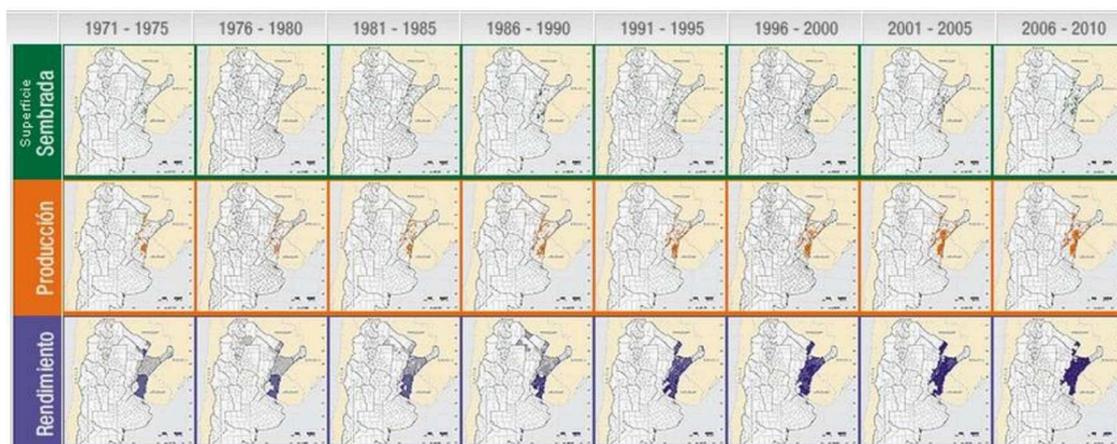


Figura 8: Evolución del cultivo de arroz en Argentina. Se muestran en el mapa de nuestro país la región sembrada, su producción y rendimiento a lo largo del tiempo. Fuente: La Argentina en mapas. CONICET, (http://www.imhichu-conicet.gov.ar/ARGENTINAenMAPAS/caste/cu_ol_gira.htm).

A diferencia de lo que ocurre con girasol, el genoma de arroz está secuenciado (International Rice Genome Sequencing, 2005) y hay muchas bases de datos con información respecto de la estructura de sus genes (promotores, secuencias codificantes), los niveles de transcritos producidos en distintas condiciones y los patrones de coexpresión de los mismos (Hamada y col., 2011; Lee y col., 2009). También hay disponibles bases de datos de intreracciones proteína-proteína y de plantas mutantes (Krishnan y col., 2009).

Dada la importancia de este cultivo a nivel mundial se han realizado vastos estudios para intentar obtener nuevas variedades con diferentes tipos de características deseables, incluyendo tolerancia a estreses como el causado por diferentes regímenes de agua a los que particularmente se ve sometido este cultivo.

Las estrategias que se han utilizado van desde el análisis de locus de un carácter cuantitativo (QTLs, del inglés *quantitative trait loci*), ensayos de expresión diferencial, selección asistida por marcadores moleculares y recientemente la incorporación de las “ómicas” y la bioinformática. Todas estas herramientas permitieron comenzar a describir con mayor precisión la regulación de la expresión génica, en plantas crecidas en condiciones estándar y sometidas a distintos tipos de estrés. Por medio de las estrategias mencionadas anteriormente se ha logrado describir con mayor precisión la estructura del ADN y su metilación, pasando por su transcripción, la traducción en proteínas siguiendo por las vías de señalización hasta llegar a la producción de metabolitos (Ahmed y col., 2013; Bai y col., 2012; Cui y col., 2014; Cheng y col., 2007; Hu y col., 2013; Li y Zhang, 2013; Mochida y col., 2009; Mochida y Shinozaki, 2011; Swamy y Kumar, 2013; Yano y Sasaki, 1997). Varios FTs (entre ellos FTs WRKY) están involucrados en uno o más de estos procesos.

En este trabajo de Tesis, se trabajó con OsWRKY47, un miembro divergente de la familia III que posee el motivo WRKYGQK y el patrón de dedos de zinc canónico.

Hipótesis y Objetivos

SI EL PLAN
no funciona
CAMBIA
EL PLAN
pero no cambies
LA META

Anónimo

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

La hipótesis general de este trabajo de Tesis es que los factores de transcripción de la familia de WRKY de *Helianthus annuus* y *Oriza Sativa* están involucrados en la regulación de procesos biológicos clave en el desarrollo y en los mecanismos desencadenados durante las respuestas de estas especies frente a situaciones de estrés abiótico. A partir de esta hipótesis general y de observaciones experimentales preliminares se plantearon tres hipótesis particulares:

- 1- HaWRKY76 participa en las respuestas de tolerancia a sequía e inundación (estrés por falta y por exceso de agua) en *Helianthus annuus*;
- 2- HaWRKY10 regula la movilización de las sustancias de reserva de las semillas en *Helianthus annuus*;
- 3- OsWRKY47 está involucrado en las respuestas a estrés hídrico en *Oryza sativa*.

Objetivos:

En esta Tesis se tomaron como objeto de estudio tres factores de transcripción de la familia WRKY. Dos de *Helianthus annuus* (HaWRKY76, HaWRKY10) y uno de *Oriza sativa* (OsWRKY47).

Los objetivos generales de este trabajo de Tesis pueden clasificarse según los aspectos que abordan:

- Enfoque básico: realizar una contribución a la caracterización funcional y bioquímica de estos FTs para comprender mejor las complejas redes de señalización en las que participan.
- Enfoque aplicado: utilizar estos factores de transcripción como herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de cultivos utilizando como sistema de análisis la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

- Identificar qué factores causantes de estrés abiótico u hormonales regulan la expresión de *HaWRKY76* y *HaWRKY10* en semillas y plantas de girasol.
- Identificar la secuencia de unión a ADN *in vitro* de *HaWRKY76*, dada las diferencias amino acídicas presentes en su dominio de unión respecto de las de los factores WRKY canónicos.
- Evaluar la expresión de *HaWRKY76* y *HaWRKY10* en diferentes órganos/tejidos y fases del ciclo de vida de girasol así como los fenotipos que acompañen su expresión diferencial (particularmente, respuesta al estrés por sequía e inundación para *HaWRKY76* y balance de las sustancias de reserva para *HaWRKY10*).
- Obtener plantas transgénicas de Arabidopsis que expresen de forma ectópica y constitutiva *HaWRKY76* y *HaWRKY10*, y analizar sus fenotipos en condiciones estándar de cultivo basándonos en los estudios de su regulación en girasol.
- Caracterizar la respuesta fisiológica, morfológica y bioquímica de las plantas *HaWRKY76* de Arabidopsis frente al estrés abiótico y de las plantas *HaWRKY10* durante la germinación y la formación y maduración de los frutos en comparación con las plantas salvajes.
- Identificar sitios de unión putativos al ADN de *OsWRKY47* (cajas W y el entorno) mediante ensayos de SELEX seguidos de EMSA.
- Con base en las secuencias definidas en el punto anterior, identificar los posibles genes blanco de *OsWRKY47* mediante un análisis *in silico*.
- Determinar si *OsWRKY47* une de forma específica las cajas W de los promotores blanco putativos, previamente identificados *in vitro* (por SELEX/EMSA) e *in vivo* (por ensayos transitorios de interacción *in planta*).
- Dilucidar cuál es la participación de *OsWRKY47* en la tolerancia a sequía que presentan las plantas *P_{SARK}::IPT*.

Materiales y Métodos

SI BUSCAS
RESULTADOS
DISTINTOS
NO HAGAS SIEMPRE
Lo mismo
Albert Einstein

MATERIALES Y MÉTODOS

I – Plásmidos

I.I – Vectores de clonado

El plásmido *pGEM-T Easy* (Promega) se utilizó para el clonado de productos provenientes de reacciones de amplificación en cadena (PCR) hechos con la enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), que agrega un nucleótido de adenina en los extremos 3' del producto. El vector se provee digerido, con el agregado de un nucleótido de timina en los extremos 5', para permitir la ligación con los fragmentos de PCR obtenidos. Para clonar en el mismo vector fragmentos amplificados con la enzima *Pfu* ADN polimerasa (Fermentas), que genera extremos romos, se incluyó en la mezcla inicial 0,3 U de *Taq* ADN polimerasa. Este plásmido presenta un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección y la secuencia codificante de la subunidad α de la enzima β -galactosidasa como marcador de inserción.

I.II – Vectores de expresión

I.II.I – Vectores de expresión en bacterias

Las proteínas se expresaron como productos de fusión a la glutation-S-transferasa (GST) en el N-terminal, en los vectores de la línea pGEX. Este plásmido presenta un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección (Smith y Johnson, 1988).

I.II.II – Vectores de expresión en plantas (Vectores binarios)

El plásmido pBI121 (Jefferson y col., 1987) es un derivado del vector binario pBIN19. Este plásmido contiene el gen *GUS*, que codifica la enzima β -glucuronidasa de *Escherichia coli*, junto con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS), clonados corriente abajo de un fragmento de 800 pb que contiene al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen *NPTII*, codificante de la neomicina fosfotransferasa tipo II que confiere resistencia a kanamicina en

plantas. Otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *RK2*. El plásmido pBI122 es equivalente a pBI121 con modificaciones en el sitio de múltiple clonado que permite el corte con un mayor número de enzimas de restricción (Capella y col., 2014). El plásmido pBI121 se utilizó para la expresión ectópica y constitutiva del ADNc del gen *HaWRKY76* de *Helianthus annuus* (girasol) y el plásmido pBI122 para la expresión ectópica y constitutiva de *HaWRKY10* de girasol y *OsWRKY47* de arroz en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas en forma estable y en discos de hojas de girasol y tabaco transformados en forma transitoria.

Para el análisis de promotores se utilizó el vector binario *pKGWFS7*, que contiene los genes reporteros *GFP* y *GUS* fusionados corriente abajo del sitio de clonado del promotor correspondiente (<http://www.psb.ugent.be/gateway/index.php>; (Karimi y col., 2002). De estos genes reporteros, se utilizó el gen *GUS*, cuya actividad es detectable por reacciones histoquímicas.

II – Cepas Bacterianas

Escherichia coli, DH10B: F⁻ *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr- hsdRMS- mcrBC) λ-* (Grant y col., 1990); BL21λ(DE3) F-*ompT hsdS* (rB- mB-) *dcm gal λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]*, Hattab y col., 2014); BL21λ(DE3) Codon Plus BL21 *dcm + TetR λ(DE3) endA Hte [argU proL CamR]*, (Hattab y col., 2014).

Agrobacterium tumefaciens, LBA4404: Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomicina, que se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 de la cepa salvaje Ach5 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina (Ooms y col., 1982).

III – Técnicas utilizadas en la obtención de construcciones genéticas

III.I – Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos: $MgCl_2$ 2 mM; dNTPs 0,2 mM c/u y 0,1 μM de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se incorporó una dilución apropiada del ADN molde y luego se le agregaron 0,3 U de enzima *Taq* ADN polimerasa o la misma cantidad de *Pfu* ADN polimerasa por cada 10 μl de volumen de reacción. En los casos en los cuales se utilizó *Pfu*, el $MgCl_2$ fue reemplazado por $MgSO_4$ a la misma concentración. Los volúmenes de reacción fueron de 20 o 50 μl . Finalmente se procedió con la reacción de amplificación según los objetivos del experimento.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) y en general se utilizó el siguiente programa, en el que la temperatura de hibridización (Ta) se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados.

Programa: 1 ciclo de 30 segundos a 94 °C + 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1,5 minutos a Ta, 1 a 2 minutos a 72 °C*+ 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C.

* El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de la *Taq* ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 minuto por cada 1000 pb a amplificar. Cuando la polimerasa utilizada fue *Pfu*, el tiempo fue de 2 minutos por cada 1000 pb.

III.II – Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para el análisis de fragmentos de ADN en geles de agarosa se empleó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 1988). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2 % (p/v), según el tamaño de los fragmentos que se deseaban separar.

Los geles fueron preparados en solución TAE 1 x con una concentración de 1 µg/ml de GelRed. A cada muestra se le agregó 1/10 vol. de solución de siembra. La separación electroforética se llevó a cabo en solución TAE 1 x, empleando voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. Para la visualización del ADN en el gel se empleó un transiluminador de luz UV *UV/White Dark Room (UVP laboratory products)*.

En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se empleó como marcador de tamaño molecular una muestra de ADN del bacteriófago λ digerida previamente con la enzima *HindIII*. Esta digestión genera fragmentos de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

III.III – Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

El aislamiento de fragmentos de digestión enzimática o productos de PCR se realizó a través de la electroforesis descrita en el punto III.II, seguida por la identificación y visualización de las bandas en un transiluminador, la escisión con un bisturí de las bandas de interés y la purificación utilizando el *kit* comercial *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)*.

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

III.IV – Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores. En todos los casos se utilizaron de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

III.V – Ligación de moléculas de ADN

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

III.VI – Transformación de bacterias: electrotransformación de *E. coli* y *A. tumefaciens*

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

III.VII – Minipreparación de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico a partir de células transformadas de *E. coli* y *A. tumefaciens* se realizó según el método de lisis alcalina (Bimboim y Doly, 1979). Las células transformadas se cultivaron, a 37 °C o a 28 °C dependiendo del genotipo empleado, hasta saturación (aproximadamente 16 horas para *E. coli* y 48 horas para *A. tumefaciens*) en tubos de ensayo conteniendo 2 ml de medio de cultivo LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Para cada preparación, se centrifugaron 1,5 ml del cultivo saturado a 5000 g durante 5 minutos y el sedimento

celular fue resuspendido en 100 µl de solución I de minipreparación. Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se adicionaron 200 µl de solución II de minipreparación; los tubos fueron agitados por inversión e incubados en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 150 µl de acetato de potasio 3 M (pH 5,2), y la mezcla se incubó nuevamente en hielo durante 5 minutos antes de ser centrifugada a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y se le realizó una extracción con fenol:cloroformo (1:1). El ADN plasmídico presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol. La mezcla fue incubada a -20 °C durante 30 minutos y luego centrifugada a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 µl de etanol 70 % (v/v) y luego se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente fue resuspendido en 20 µl de agua bidestilada estéril.

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas en las reacciones de determinación de secuencia y en la purificación de vectores de clonado y binarios, se realizaron empleando kits comerciales como *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor.

III.VIII – Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio provisto por *Macrogen Sequencing System* en Seúl, Corea. Para utilizar este servicio fueron enviados 10 µl de plásmido (100 ng/µl) junto con 10 µl de un oligonucleótido específico (100 pmoles/µl). Las muestras fueron procesadas por un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados en forma electrónica.

III.IX – Análisis de las secuencias

Para la identificación general de secuencias se consultaron las bases de datos del EMBL, GenBank y SwissProt utilizando el programa BLAST (Altschul y col., 1997) a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

IV – Construcciones genéticas

IV.I – P_{35S}:HaWRKY76

La secuencia de *HaWRKY76* ya se encontraba disponible en el laboratorio (cedida por la Dra. K. Ribichich en el vector pGEX 4T-3). Utilizando como molde el vector provisto, se clonó esta secuencia codificante en pBI121 utilizando como herramienta los oligonucleótidos HaW76ADNc-F y HaW76ADNc-R. Éstos contienen en su secuencia sitios *SpeI* y *BglII*, respectivamente. El ADNc de *HaWRKY76* amplificado con estos oligonucleótidos, se cortó con las enzimas correspondientes y se clonó en el vector pBI121 en los sitios compatibles *XbaI* y *BamHI*.

IV.II – P_{35S}:HaWRKY10

Cuando se comenzó el trabajo de Tesis no estaba disponible la secuencia completa de *HaWRKY10*, por lo cual, la obtención del ADNc se realizó en dos etapas. Primero, se identificó la secuencia nucleotídica correspondiente a *HaWRKY10* en la base de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST, del inglés, *Expressed Sequence Tags*) de Heliagene (<https://www.heliagene.org/>) y del NCBI y se diseñaron los oligonucleótidos W10ADNc-F y W10 DEG-R (Tabla 1) para aislar un fragmento de 831 pb a partir de ADNc y corroborar la secuencia correspondiente al extremo 5' de la región codificante descrita en las bases de datos. Debido a que en esta secuencia no se localizaron codones de terminación, se decidió obtener el resto de la secuencia codificante de *HaWRKY10*. En una segunda etapa, por medio de una amplificación aleatoria del extremo 3' seguida de PCR (3' RACE PCR) con los oligonucleótidos W10RACE-F y poly-TV (Tabla 1) utilizando como molde ADNc, se logró obtener la secuencia hacia el extremo 3' que corresponde a los 316 pb restantes de la secuencia codificante de *HaWRKY10* (Frohman y col., 1988).

Programa para 3'RACE-PCR: 1 ciclo de 30 segundos a 94 °C + 5 ciclos de 0,5 minutos a 94 °C, 0,5 minutos a 55 °C (con el oligonucleótido poly-TV), 3 minutos a 72 °C*+ 25 ciclos de 0,5 minutos a 94 °C, 0,5 minutos a 55 °C (adicionando el oligonucleótido W10RACE), 2 minutos a 72 °C*+ 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C.

Finalmente con la información de ambas secuencias: la secuencia correspondiente al extremo 5' obtenida por medio de PCR, la información de bases de datos de EST y la secuencia obtenida a partir de los ensayos de 3'RACE-PCR, se obtuvo la secuencia completa del ADNc de *HaWRKY10* utilizando los oligonucleótidos HaW10ADNc-F y HaW10ADNc-R (Tabla 1). *HaWRKY10* se clonó en pBI122 corriente abajo del promotor 35S CaMV en los sitios *Bam*HI y *Sall*.

IV.III – P_{Ub}::OsWRKY47

Para sobreexpresar *OsWRKY47* en arroz, el Dr. Songhu Wang construyó el vector binario *pH7m24GW-Ub::OsWRKY47* mediante clonado por medio del sistema Gateway (Life Technologies). Se clonó el promotor de ubiquitina de maíz del vector pCAMBIA-pMUb-CtHSR en el vector pDONRP4P1r. Por otro lado, la secuencia codificante de *OsWRKY47* se clonó por medio de RT-PCR en el vector pDONR207. Ambos vectores, conteniendo la región promotora y codificante de interés se recombinaron con el vector *pH7m24GW*. El vector resultante fue *pH7m24GW-Ub:OsWRKY47* y se transformó con el mismo la cepa de *A. tumefaciens* EHA105.

IV.IV – P_{35S}::OsWRKY47

La secuencia correspondiente al ADNc de *OsWRKY47* (LOC_Os07g48260) fue provista en el vector pENTR/D-TOPO (Trabajo hecho en colaboración con el equipo del Dr. E. Blumwald, Universidad de California-Davis, EEUU). Por medio de los oligonucleótidos OsW47ADNc-F y OsW47ADNc-R utilizando como molde este vector, conteniendo la secuencia de ADN de *OsWRKY47*, se obtuvo la secuencia codificante completa de este factor de transcripción. Luego se clonó en el vector pBI122 corriente abajo del promotor 35S CaMV.

IV.V – Promotores completos, fragmentos de los promotores y promotores mutados de los genes de arroz que codifican la proteína de unión a calmodulina (CaPU) y la proteína con repeticiones ricas en cisteínas (PRRC)

IV.V.I – Construcciones de los promotores completos y mutados utilizados para transformación transitoria

Los segmentos de ADN correspondientes a los promotores completos de los genes *CaPU* (LOC_Os12g36110) y *PRRC* (LOC_Os03g16950) se obtuvieron por PCR utilizando como molde ADN genómico de la variedad *Japónica* y los oligonucleótidos que se indican en la Tabla 1.

IV.V.I.I Promotores completos

$P_{CaPU}::GUS$ y $P_{PRRC}::GUS$

Las regiones promotoras de *CaPU* y *PRRC*, identificadas en la base de datos OSIRIS (http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Osiris/cgi/datamine_select.pl) se amplificaron utilizando ADN genómico proveniente de hojas de plantas de arroz de 45 días con los oligonucleótidos *CaPU*-F y *CaPU*-R, y *PRRC*-F y *PRRC*-R, respectivamente. Los fragmentos amplificados, de 1450 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción en el caso de *CaPU* y 668 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción para *PRRC* se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Una vez secuenciados, los fragmentos se liberaron por digestión con las enzimas *Xho*I y *Xba*I y se clonaron en los sitios *Sal*I y *Xba*I del vector pKGWFS7. En las construcciones resultantes, los promotores P_{CaPU} y P_{PRRC} dirigen la expresión de *GUS*.

IV.V.I.II Promotores mutados

Con el fin de obtener mutantes por eliminación o sustitución en las cajas W47 (sitios en *cis* de reconocimiento de OsWRKY47) de los promotores en estudio, se utilizaron como moldes los clones de los promotores enteros descritos en el párrafo anterior.

P_{CaUPΔwbox}::GUS

La caja W completa del promotor *CaPU* se eliminó siguiendo la técnica descrita por Ho en 1989 (Ho y col., 1989). Se procedió de la siguiente manera: se amplificaron por PCR las dos regiones que flanquean la región a ser mutada, usando como molde el promotor *CaPU* salvaje y dos pares de oligonucleótidos: CaPU-F y CaPUdel-R y CaPUdel-F y CaPU-R, respectivamente (Tabla 1). Los oligonucleótidos centrales CaPUdel-F y CaPUdel-R poseen 18 pb complementarias entre sí. Tras una primera amplificación se procedió a la purificación de los fragmentos como se describió en III.III. Luego se llevó a cabo una PCR corta para unir y extender los extremos de la quimera. Con este objetivo se preparó una mezcla con 7,5 μl de cada fragmento purificado más 1 μl de dNTPs 20 mM, 1 μl MgCl₂ 50 mM, 2,5 μl solución amortiguadora, 0,2 μl *Taq* polimerasa y agua hasta 25 μl y se la colocó en un termociclador siguiendo el siguiente protocolo: (94 °C, 30 segundos; 62 °C, 1,5 minutos; 72 °C, 2 minutos) por 10 ciclos más 15 minutos adicionales a 72 °C. Luego se realizó una PCR estándar usando 5 μl del producto obtenido anteriormente y los oligonucleótidos que se hibridizan a los extremos de la construcción, CaPU-F y CaPU-R (Tabla 1). El producto se purificó como se describió en III.III y digirió con las enzimas *XhoI* y *XbaI* y se clonó en los sitios *Sall* y *XbaI* del vector pKGWFS7 según se describió en III. En la construcción resultante el promotor *P_{CaUPΔwbox}* dirige la expresión de *GUS*.

P_{PRRCΔwbox}::GUS

El promotor *PRRC* mutado se obtuvo de la misma forma que el promotor *CaPU* mutado, utilizando como molde el promotor *PRRC* salvaje completo y los oligonucleótidos *PRRC*-F y *PRRC*del-R y *PRRC*del-F y *PRRC*-R, respectivamente (Tabla 1). La secuencia del promotor *PRRC* mutado se digirió con las enzimas *XhoI* y *XbaI* y se clonó en los sitios *Sall* y *XbaI* del vector pKGWFS7 según se describió en III. En la construcción resultante el promotor *P_{PRRCΔwbox}* dirige la expresión del gen reportero *GUS*.

$P_{CaUPC \rightarrow T}$

El promotor *CaPU* con la sustitución en la posición 1460 (dentro de la caja W) se obtuvo por medio del mismo procedimiento descrito para la construcción $P_{CaUP\Delta wbox::GUS}$, utilizando como molde el promotor *CaPU* salvaje completo y los oligonucleótidos CaPU-F y CaPUsust-R y CaPUsust-F y CaPU-R, respectivamente (Tabla 1). La secuencia del promotor *CaPU* conteniendo la sustitución se digirió con las enzimas *XhoI* y *XbaI* y se clonó en los sitios *Sall* y *XbaI* del vector pKGWFS7 según se describió en III. En la construcción resultante el promotor $P_{CaUPC \rightarrow T}$, dirige la expresión del gen reportero *GUS*.

IV.IV.II – Fragmentos de los promotores utilizados para ensayos en geles de retardo

Los fragmentos parciales de los promotores se obtuvieron por PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 1), utilizando como molde a los promotores completos. Las secuencias se clonaron directamente en el vector pGEM-T Easy.

Fragmento del promotor de *CaPU*: se utilizaron los oligonucleótidos CaPUfrag-F y CaPUfrag-R sobre el molde del promotor completo. La secuencia obtenida es de 142 pb y se encuentra 545 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Fragmento del promotor de *PPRC*: se utilizaron los oligonucleótidos PPRCfrag-F y PPRCfrag-R sobre el molde del promotor completo. La secuencia obtenida tiene 147 pb y se encuentra 145 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción.

V – Material vegetal y condiciones de cultivoV.I – Especies y variedades vegetales utilizadas

Para los estudios en girasol se emplearon semillas de *Helianthus annuus* L. del cultivar CF31 (Advanta).

Para los estudios en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. se utilizaron semillas del ecotipo Columbia-0 (Col-0) adquiridas en Lehle Seeds y multiplicadas en la cámara de cultivo del Instituto.

Para los estudios en arroz con plantas salvajes se emplearon semillas de *Oryza sativa Japonica cv Kitaake*. Las plantas que expresan $P_{SARK}::IPT$ son las descritas por Peleg y sus colaboradores en 2011 (Peleg y col., 2011).

V.II – Desinfección y cultivo in vitro de semillas de Arabidopsis y girasol

Las semillas de Arabidopsis fueron desinfectadas mediante lavados con etanol 70 % (v/v) durante 5 minutos, lavandina 10 % durante 30 minutos y finalmente 3 lavados con agua bidestilada estéril. En el caso de tratarse de semillas pertenecientes a una F1 para seleccionar transformantes, se utilizó un volumen de aproximadamente 300 µl de semillas mientras que para filiales posteriores se utilizaron entre 20 y 30 semillas por genotipo. Luego de los 3 lavados con agua, las semillas F1 y las filiales posteriores fueron resuspendidas en 1 ml o 100 µl de agar 0,1 % estéril, respectivamente. Las semillas fueron sembradas en placas de Petri de 150 mm de diámetro que contenían medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y 1 % de agar suplementado con el antibiótico kanamicina (50 µg/ml). La desinfección de las semillas fue realizada en condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo de aire horizontal (Forma Scientific, Inc.). Las esterilizaciones del medio de cultivo se hicieron en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

Las placas ya sembradas fueron mantenidas en la heladera durante 2 días con el objetivo de romper la dormancia de las semillas (en el caso de semillas en selección) o directamente transportadas (en el caso de los ensayos de germinación con semillas homocigotas) a una cámara de cultivo con luz y temperatura controladas (16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 22 °C),

Para los cultivos de semillas de girasol, las semillas se colocaron directamente en bandejas de plástico con papel absorbente saturado en agua. Las semillas no se desinfectaron debido a que las semillas se encuentran cubiertas de un producto antifúngico aplicado por el proveedor. Las bandejas fueron transportadas a una cámara de cultivo con luz y temperatura controladas (16 horas de luz a 24 °C y 8 horas

de oscuridad a 22 °C). Las semillas para ensayos de plantas de más de siete días se sembraron directamente en tierra.

V.III – Cultivo de plantas de arroz, Arabidopsis, girasol y tabaco

Para el cultivo de arroz se trataron las semillas con calor: durante 5 días se incubaron a 50 °C para romper la dormancia. Luego, se desinfectaron las semillas con lavandina 10 % durante 5 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada. Las semillas se mantuvieron en el último lavado de agua durante toda la noche a 25 °C y se incubaron a 28 °C para favorecer la germinación. Luego, las semillas se pasaron a potes con 8 kilos de suelo (80 % arena y 20 % turba). Las macetas se colocaron en bandejas con agua y las semillas se cubrieron con una fina capa de suelo. Las plantas crecieron con un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a 22-24 °C y se irrigaron con solución de Hoagland 0,5 x.

Para el cultivo de Arabidopsis, girasol y tabaco, en los casos en los cuales se utilizaron plantas en estadios de desarrollo avanzados, éstas se cultivaron en macetas conteniendo una mezcla de vermiculita– perlita– turba– tierra (1:1:1:3) procediendo de alguna de las siguientes maneras:

A – Las semillas se hicieron germinar directamente sobre la capa superficial de tierra usando macetas de 8 cm x 7 cm (diámetro x altura). En el caso de Arabidopsis fueron sembradas en la superficie (aproximadamente de 3 a 7 semillas /maceta) y luego raleadas para dejar de 1 a 4 plantas por maceta. Las macetas fueron colocadas en bandejas de 40 x 40 x 20 cm³ (ancho x largo x altura) sub irrigadas y recubiertas con film autoadherente hasta la germinación para mantener las condiciones necesarias de elevada humedad.

B – Cuando fue necesario seleccionar las plántulas de Arabidopsis por su resistencia a un antibiótico, las semillas se hicieron germinar en placas de Petri conteniendo medio MS–agar como se describe en el punto V.II y luego fueron trasplantadas a y crecidas en la mezcla vermiculita– perlita– turba– tierra.

C – En el caso de las semillas de girasol, se germinaron directamente en macetas con tierra luego de enterrarlas 2 cm aproximadamente. El tamaño de las macetas fue de 8 cm x 7 cm para ensayos en plántulas de hasta dos semanas y de 36 cm x 30 cm cuando se requerían muestras de un estadio de desarrollo más avanzado.

La tierra utilizada fue provista por la empresa Terrafertil (plantas de interior, Terrafertil®, <http://www.terrafertil.com/lineaterrafertil.html>). Sus componentes son: turba musgo *Sphagnum*, acícula de pino, resaca de río y perlita.

En todos los casos las plantas se cultivaron en un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 22–24 °C, solución de Hoagland 0,5 x para el riego, que aumenta macroelementos y microelementos (excepto para los ensayos de suelos poco fértiles) e intensidad lumínica de $\sim 150 \mu\text{E} / \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$.

V.IV – Transformación de plantas

V.IV.I – Transformación transitoria de *N. benthamiana*

Se cultivaron células de *A. tumefaciens* transformadas con las construcciones en estudio, una construcción que codifica para p19 y los controles de transformación pBI101.3 y pBI121 en frascos independientes (uno para cada construcción) conteniendo 10 ml de medio LB suplementado con rifampicina 25 mg/l, estreptomicina 10 mg/l y kanamicina 50 mg/l o espectinomicina 100 mg/l, dependiendo el vector utilizado durante 24 horas a 28 °C con agitación. Luego se cosecharon las células por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en una DO final a 600 nm de 0,5 en 50 ml de la solución amortiguadora de infiltración, para después incubarlas 4 horas a temperatura ambiente y con agitación de 100 rpm. Finalmente, se infiltró la cara abaxial de las hojas de tabaco valiéndose de una jeringa.

Las plantas ya infiltradas se cultivaron durante 3-4 días más y en este momento se tomaron las muestras en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

V.IV.II – Obtención de plantas de arroz mutantes de OsWRKY47

Las plantas mutantes las obtuvo el Dr. Songhu Wang en la Universidad de California-Davis. Las semillas mutantes de *OsWRKY47* (denominadas plantas wrky47) corresponden a la línea RdSpm6084I_3.1, se obtuvieron de la librería de líneas indexadas de secuencias de arroz con inserciones de transposones (<http://www.plb.ucdavis.edu/Labs/sundar/projects/riceGenomics.html>). Se asumió que las inserciones eran estables, dado que la transposasa segregó de forma diferencial respecto de las líneas que contienen la inserción.

V.IV.III – Transformación estable de Arabidopsis

El método utilizado para transformar plantas de *Arabidopsis* fue el de *floral dip* (Clough y Bent, 1998). Para ello se prepararon 8 macetas como se describió en la sección V.III. Las plantas se cultivaron hasta la floración (aproximadamente 4 semanas) en un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 24–22 °C. Cuando los pedúnculos florales crecieron lo suficiente como para separarse de su yema axilar próxima, se cortaron las inflorescencias sin dañar las hojas caulinares y yemas axilares cercanas. Entre los 2 y 3 días posteriores al corte surgieron nuevas inflorescencias de las yemas axilares, las cuales se cortaron nuevamente teniendo los cuidados antes mencionados. Se repitió el procedimiento anterior entre 2 y 3 veces. En este estadio las plantas fueron utilizadas en los ensayos de transformación.

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron células de *A. tumefaciens* durante 16 horas a 28 °C con agitación, en frascos que contenían 10 ml de medio de cultivo LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, 50 µg/ml de rifampicina y 100 µg/ml de estreptomicina. Estos cultivos se utilizaron para inocular 500 ml del mismo medio suplementado con los mismos antibióticos contenidos en un Erlenmeyer. Las células fueron cultivadas hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas, a 28 °C, con agitación). Luego fueron centrifugadas a 4500 g durante 20 minutos. Los sedimentos fueron resuspendidos en 1 litro de una solución de sacarosa 5 % que contenía 300 µl del detergente Silwet L-77 (OSI Specialities, Inc.) y esta suspensión se colocó en un

vaso de precipitado sobre un agitador magnético. Las plantas se sumergieron durante 1 minuto, tratando de evitar que el líquido entrara en contacto con la tierra y las hojas de la roseta. Luego, las macetas fueron ubicadas en posición horizontal en una bandeja, tapadas con papel de nylon y transportadas a la cámara de cultivo. Al día siguiente, las macetas se colocaron en posición vertical y se cultivaron las plantas hasta el momento de la cosecha (aproximadamente a 6–8 semanas de la siembra).

Cuando las vainas se secaron y se tornaron de un color marrón claro, se colectaron las semillas y fueron guardadas en la heladera para su posterior análisis.

V.V – Selección de transformantes

Las semillas cosechadas del experimento de transformación estable de *Arabidopsis* descrito en la sección V.IV.I se desinfectaron y se sembraron en placas de Petri que contenían el medio MS–agar suplementado con el antibiótico correspondiente, según se detalla en el punto V.II.

Durante las primeras horas en la cámara de cultivo la mayor parte de las semillas germinaron. Aproximadamente a los 7 días, los cotiledones de las plantas sensibles se fueron tornando amarillos. Las placas se mantuvieron en la cámara durante 3–5 días adicionales. En ese período sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas, mientras que las no transformadas se tornaron cada vez más pálidas, hasta que finalmente murieron. Sólo las plantas resistentes, que mostraron tener una raíz de tamaño adecuado, fueron trasplantadas a macetas para su multiplicación o utilizadas en ensayos preliminares.

V.VI – Selección de las plantas transformadas que contienen la inserción deseada

Una vez seleccionadas las transformantes y pasadas a macetas con vermiculita–perlita– turba–tierra, se eligieron las 15 plantas de mejor aspecto para realizar una extracción de ADN de las hojas de roseta. Mediante la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos, se realizaron amplificaciones del ADN para evaluar la

inserción del gen de interés. Finalmente, con las plantas que dieron positivas en el análisis de PCR, se continuó la propagación de las filiales hasta obtener líneas homocigotas.

V.VII – Clasificación de las líneas homocigotas de acuerdo a su nivel de expresión

Se tomaron plantas de las líneas homocigotas y se les realizó una extracción de ARN para luego medir la expresión de cada gen de interés. De acuerdo con los niveles obtenidos, relativos a la línea de menor expresión, se las clasificó en líneas de baja, media y alta expresión.

VI – Ensayos realizados en plantas de *Arabidopsis* y girasol

VI.I – Tratamientos químicos

Los tratamientos con hormonas en girasol se realizaron con plantas de 5 días de vida. Las plantas se traspasaron a vasos plásticos con medio de cultivo MS líquido suplementado, según el ensayo, con ACC, MetJA, IAA, ABA, GA o NaCl en las concentraciones especificadas en cada figura e incubadas en cámara de cultivo durante los tiempos requeridos en cada experimento antes de su recolección y congelamiento en nitrógeno líquido para posteriores análisis. En todos los casos, las plantas utilizadas como controles fueron tratadas de la misma manera, en medio de cultivo MS líquido sin suplementar.

En el caso del ensayo de germinación en presencia de ABA, las placas luego de ser sembradas se pasaron directamente a la cámara de cultivo. Luego, se realizó un seguimiento periódico a lo largo del cual se cuantificaron las semillas germinadas, considerando como tales aquellas que desarrollaron cotiledones verdes.

Para los ensayos de desarrollo en presencia de ABA se tomaron dos caminos. Por un lado se realizó un seguimiento de las plántulas que habían germinado en ABA y a las dos semanas se fotografiaron las plantas y se observaron las diferencias macroscópicas. Por otro lado, se germinaron las semillas en medio MS sin

suplementar, luego se las transfirieron a un medio con ABA y después de dos-tres semanas se realizó un recuento de las plantas que habían desarrollado su segundo par de hojas.

En el caso de las semillas de girasol, la siembra se realizó como se indica en el apartado V.II, en las primeras horas del ciclo lumínico. El agua con la que se saturaron los papeles absorbentes se suplementó con las concentraciones de hormonas indicadas en las figuras. Las muestras se tomaron en nitrógeno líquido en los tiempos también indicados en las figuras.

VI.II – Generación de estrés abiótico

VI.II.I – Generación de estrés hídrico

VI.II.I.I Estrés hídrico severo

Para generar estrés hídrico en plántulas de girasol de 5 días, se las colocó sobre papel de filtro seco y se las dejó deshidratar hasta que se observó claramente una pérdida de turgencia en los cotiledones (alrededor de 30 minutos).

Los ensayos de estrés hídrico de plantas de girasol sembradas en tierra comenzaron a los 12 días de vida. Se realizó un riego a saturación y se eliminó el excedente de agua. Las plantas se rotaron en forma periódica y se tomaron muestras en los tiempos indicados en las figuras hasta la muerte de las plantas. Esto último se determinó aislando un individuo representativo en cada punto del ensayo, irrigándolo y observando su supervivencia al día siguiente.

Los ensayos en *Arabidopsis* se realizaron con al menos 16 macetas de 8 cm x 7 cm que contenían la misma cantidad de tierra (100-120 g) y de 1 a 4 plantas por maceta, dependiendo del ensayo. Para los ensayos en período vegetativo, las plantas se regaron por única vez hasta saturación antes de ser colocadas en la cámara de cultivo para crecer en las condiciones descritas previamente. Para los ensayos en período reproductivo, las plantas crecieron en condiciones normales de luz, riego y temperatura durante 21 días, luego se regaron hasta saturación y se retiró el agua sobrante para luego continuar el cultivo en las mismas condiciones que para el ensayo

en período vegetativo. Se procuró generar una deshidratación paulatina y pareja de la tierra, girando periódicamente las macetas. Se esperó hasta observar el efecto de estrés hídrico (aproximadamente 15 días desde la saturación) como una pérdida notoria de turgencia en las hojas y, en ese momento, las plantas fueron rehidratadas. Se esperó el tiempo necesario para la recuperación de las plantas (aproximadamente 48 horas) y se visualizó el fenotipo.

VI.II.I.II Estrés hídrico leve–moderado

Para plantas de *Arabidopsis* este ensayo se realizó en los estadios vegetativo y reproductivo. En el caso de plantas en estadio reproductivo, aproximadamente 5 días luego del pasaje a este estadio, se saturaron las macetas de agua y se eliminó el excedente. Los días siguientes a este tratamiento hasta el final del ciclo de vida de las plantas, las macetas se pesaron periódicamente y se las llevó a todas a un mismo peso final, para mantener un mismo contenido de agua estimativo, dado que las macetas se habían llenado con la misma cantidad de tierra. Así, dependiendo de la intensidad del estrés, las plantas se llevaron a 70 (estrés moderado) o a 100 (estrés leve) gramos totales finales y este peso fue mantenido durante el resto del ciclo de vida. Esto corresponde aproximadamente al 58 y 83 % del peso de las macetas en condiciones normales, respectivamente. En el caso de las plantas sometidas a estrés hídrico durante el estadio vegetativo, las macetas se regaron en el momento en que se sembraron las semillas y luego de 15 días de no irrigarlas se comenzó a suplementarlas con 2 ml de agua cada dos días hasta el período reproductivo, momento en el que se incrementó el volumen de agua agregado a 3-5 ml por día hasta el final del ciclo de vida. En ambos tratamientos, las bandejas se rotaron periódicamente para lograr una mayor homogeneidad.

El Dr. Wang de la Universidad de California-Davis realizó ensayos de estrés hídrico en arroz en dos estadios de desarrollo correspondientes a preantesis y posantesis. Las plantas crecieron como se indicó previamente y se las privó de agua durante 3, 4 y 5 días. Las plantas fueron reirrigadas en función de la aparición de síntomas de estrés visibles a nivel macroscópico (por ejemplo, el enrollado de las hojas). Las mediciones se realizaron en los momentos que se indican en las figuras.

VI.II.II – Generación de estrés por exceso de agua

VI.II.II.I Estrés por inundación completa

Para plántulas de girasol de 5 días, el estrés se aplicó sumergiendo la plántula completa en solución MS por el período de tiempo indicado en la figura correspondiente.

Para las plantas de girasol de 15 días, en las primeras horas de luz se saturaron de agua las macetas hasta el nivel de la tierra. Hacia el final del ciclo lumínico se agregó agua hasta sumergir completamente la planta. Las muestras se tomaron en los momentos subsiguientes que se indican en la figura correspondiente.

En plantas de Arabidopsis en estadio reproductivo, el estrés se aplicó de la misma manera que a las plantas de girasol de 12 días. Las muestras fueron tomadas hacia el final del ciclo lumínico en los tiempos indicados en las figuras correspondientes. Los tratamientos se realizaron por períodos de 5 días. Luego de ese lapso, las plantas se removieron de la bandeja en la que estaban sumergidas y se traspasaron a bandejas secas para observar su recuperación.

VI.II.II.II Estrés por anegamiento e inundación parcial: sistema radicular/roseta de la planta sumergida

El estrés por anegamiento se aplicó en plantas de Arabidopsis en estadio reproductivo. A mediados del ciclo lumínico se saturaron las macetas con agua hasta el nivel del suelo. El nivel de agua se mantuvo sin tapar las rosetas pero cubriendo el sustrato durante los 6 a 7 días que duró el ensayo. Las muestras se tomaron en los momentos que indican las figuras a mediados del ciclo lumínico.

Para realizar los ensayos de generación de aerénquima se inundaron parcialmente las plantas. El tratamiento se realizó de la misma manera que se describió con anterioridad pero el nivel de agua se mantuvo 1 cm por encima de la roseta durante 5 días. La muestra se tomó al final del tratamiento e inmediatamente se sumergió en

solución fijadora FAA (ver sección XII) y se trató como se indica más adelante en la sección VII.VII.

VII – Análisis de los fenotipos de las plantas en condiciones normales y en los ensayos de estrés

VII.I – Cuantificación de clorofila

Se pesaron 100 mg de hojas de plantas de diferentes edades según se indica en las figuras. El tejido se trituró en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y el polvo obtenido se pasó a un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml. A cada tubo se le agregó 1,5 ml de acetona 80 %. Los tubos se dejaron en oscuridad durante 30 minutos, tiempo en el cual los sólidos de la mezcla decantaron. Luego se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 645 y 663 nm, utilizando un espectrofotómetro. La concentración de clorofila total se calculó aplicando la siguiente fórmula (Chory y col., 1994):

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g/ml}) = 20,2 * \text{Abs}_{645} + 8,02 * \text{Abs}_{663}$$

VII.II – Estabilidad de membranas

Dependiendo de los parámetros a medir, las hojas se sometieron a estrés hídrico o a estrés por exceso de agua. Para cuantificar la estabilidad de las membranas se utilizó la técnica de *ion leakage* o liberación de electrolitos, que aumentan la conductividad del medio circundante (Sukumaran y Weiser, 1972). La técnica se basa en el hecho de que las membranas pierden su semi-permeabilidad cuando las células están dañadas. Los tejidos dañados liberan de forma proporcional gran cantidad de electrolitos al agua que los rodea y de esta forma el resultado es que a mayor conductividad, menor estabilidad de las membranas. La medición de la estabilidad se realizó en los tiempos estipulados en la leyenda de cada figura. Las hojas enteras se colocaron en 15 ml de agua destilada y se agitaron a 25 °C durante 3 horas. En ese período, las hojas liberaron al medio electrolitos proporcionales al daño sufrido por sus membranas y la conductividad (C_1) se midió en el medio acuoso. Los extractos se colocaron a 65 °C

durante 16 horas y luego se volvieron a agitar a 25 °C durante 1 hora. La conductividad final (C_2) se midió después de este tratamiento en el que todos los electrolitos son liberados al medio. El índice de daño se calculó según la siguiente ecuación: $L = C_1/C_2$. Los valores de L mayores a 0,5 indican daños severos (Sukumaran y Weiser, 1972).

VII.III – Uso y manejo del agua

VII.III.I – Consumo de agua en estrés hídrico

Las plantas se sometieron a estrés por déficit de agua como indica el apartado VI.II.I.II. El consumo de agua se cuantificó como los ml de agua totales (equivalente a los g de agua) que debieron ser agregados a las macetas para mantener un peso constante a lo largo del tratamiento de estrés (entre 60 y 83 % del peso inicial, aproximadamente). De esta forma, las plantas que consumían más agua, debían ser más irrigadas para alcanzar el peso establecido. Del mismo modo, aquellas que presentaban un menor consumo requerían un menor agregado de agua.

VII.III.II – Pérdida de agua de hojas escindidas

Este tipo de ensayo se realizó en plantas en estadio reproductivo, entre 5 días y una semana luego del pasaje a este estadio, crecidas en condiciones estándar y sometidas a estrés según indica la figura. Se tomó una planta completa, se escindieron las hojas de la roseta y se pesaron (P_0). En los n tiempos que indican las figuras estas mismas hojas se volvieron a pesar (P_n). La pérdida de agua se cuantificó como el porcentaje del peso de las hojas respecto al inicial:

Peso de las hojas (% respecto del inicial) = $(P_n/P_0) * 100$

VII.IV – Cuantificación del contenido de sustancias de reserva

VII.IV.1 – Cuantificación de lípidos

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

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

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

VII.IV.II – Separación de gotas de aceite (GdA)

Las GdA se separaron por el método de centrifugación y flotación (Van Rooijen y Motoney, 1995) con algunas modificaciones. Se molieron 20 mg de semillas de Arabidopsis en 1 ml de solución de extracción de GdA (ver sección XII) y el extracto se centrifugó 5 minutos a 2300 g. Se separaron las GdA, que flotan en la fase superior y se lavaron una vez con una solución astringente (ver sección XII) y dos veces con agua. Las proteínas asociadas a las GdA se analizaron como se indica en el punto XI.III.

VII.IV.III – Cuantificación de carbohidratos (glucosa, sacarosa y almidón)

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

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

Finalmente se determinó el contenido de glucosa en ambas muestras por un método enzimático colorimétrico (Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe). En la muestra sin tratar con invertasa se midió la concentración de glucosa como $Gluc_1$ (µg glucosa/mg muestra). En la muestra tratada con invertasa se determinó el contenido de glucosa $Gluc_2$ (µg glucosa/mg muestra) que incluye la glucosa proveniente de la muestra antes

de ser tratada más la liberada por la hidrólisis de la sacarosa. La concentración de sacarosa se midió indirectamente y se calculó como $\text{Gluc}_2 - \text{Gluc}_1$.

La interfase insoluble, que contiene el almidón, se lavó con etanol absoluto y se secó en estufa a 70 °C durante una hora aproximadamente. Luego se resuspendió en 250 μl de hidróxido de sodio 0,1N. Una vez que el precipitado se disolvió, se agregaron 75 μl de ácido acético 0,5 N (pH 5,1). Finalmente se tomaron 50 μl y se trataron durante toda la noche a 37 °C con 2,5 U de amiloglucosidasa (Roche), que cataliza la hidrólisis de los enlaces $\alpha(1,4)$ y $\alpha(1,6)$, liberando glucosa, cuya concentración se midió como se indicó previamente.

VII.V – Determinación de la biomasa radicular

Las semillas se cultivaron como se indica en V.III pero en potes utilizando sólo arena como sustrato (Céccoli y col., 2012). Los mismos fueron contruidos con un tubo de acetato con malla por debajo para evitar el escape del sustrato. Una vez que las plantas alcanzaron la edad deseada, los potes se desarmaron, las raíces se enjuagaron cuidadosamente para eliminar la arena, se secaron meticulosamente, y se determinó el peso de las mismas así como el de la región aérea de las plantas.

VII.VI – Medida del daño por estrés oxidativo

Para medir el estrés oxidativo se utilizó nitroazul de tetrazolio (NBT), que es un indicador de la presencia de anión superóxido, que se traduce como una coloración azul de intensidad proporcional a la concentración de las especies reactivas del oxígeno (Weydert y Cullen, 2010). En los tiempos que se indican en la figura, las muestras de hojas se tomaron y se sumergieron directamente en una solución de 0,1 mg/ml de NBT en solución amortiguadora de reacción (ver sección XII). A continuación, se infiltraron durante 15 minutos con vacío y se incubaron 1 hora a 37 °C en oscuridad. Luego se retiró el sustrato por volcado, se agregó etanol al 80 % y las muestras se hirvieron durante 10 minutos para extraer los pigmentos, luego de lo cual se dejaron

enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente, se cambió el etanol y las hojas se escanearon. Sobre estas imágenes, se determinó la concentración de superóxido de forma indirecta midiendo la intensidad relativa por densitometría, utilizando como herramienta el programa ImageJ (Schneider y col., 2012).

VII.VII – Estudios histológicos: análisis morfológico y de formación de aerénquima

Las muestras se fijaron con FAA durante 48 horas, se pasaron a etanol 70 % (v/v) y luego se deshidrataron por pasajes a través de una serie etanólica (80 %, 90 %, 95 % y 100 % v/v). Luego, se hicieron sucesivos pasajes a soluciones en concentraciones crecientes de xilol hasta llegar a xilol puro y finalmente se incluyeron en parafina. Por medio de un micrótopo de rotación (Leica), se obtuvieron cortes transversales de 10 μ m. Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos, se desparafinaron y se tiñeron con los colorantes que se indican en las figuras. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon montada sobre un microscopio Eclipse E200 (Nikon) con la amplificación indicada en la/s figura/s.

VIII – Extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos

VIII.I – Extracción y purificación de ADN genómico de Arabidopsis

Para analizar mediante la técnica de PCR la población de plantas de Arabidopsis transformadas, se realizaron preparaciones de ADN genómico empleando un método rápido de extracción (Li y Chory, 1998). Se colocó una hoja joven en un tubo y se maceró durante 15 segundos. Después de agregar 700 μ l de solución de extracción de ADN (ver sección XII), se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos. Se tomaron 600 μ l del sobrenadante y se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo. Los tubos fueron centrifugados a 10000 g durante 10 minutos. Se tomaron 600 μ l del sobrenadante, se le agregó un volumen de cloroformo y se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos. Se tomaron 500 μ l del sobrenadante y se les adicionó un volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3

M (pH 5,2). Luego de mezclar, las muestras se dejaron a - 20 °C durante 1 hora, luego se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos y se lavaron con 500 µl de etanol al 70 % (v/v). El precipitado obtenido se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril.

VIII.II – Extracción y purificación de ARN total

Las extracciones de ARN fueron realizadas utilizando el reactivo Trizol[®] (Invitrogen™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los ensayos de rutina se realizaron con una versión casera del reactivo previamente mencionado. Para dichas extracciones entre 50-100 mg de tejido vegetal se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero estéril y el polvo obtenido se transfirió a un tubo de tipo Eppendorf al cual se agregó 1 ml del reactivo de Trizol casero. Luego de mezclar por inversión varias veces, los tubos se incubaron a temperatura ambiente 10 minutos, luego se agregaron 200 µl de cloroformo y se incubaron 3 minutos adicionales a temperatura ambiente. Se centrifugaron 15 minutos a 12000 g a 4 °C y la fase acuosa fue posteriormente precipitada con un volumen de isopropanol incubando los tubos durante 30 minutos a - 20 °C. Pasado el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C y luego fueron lavados con etanol 70 % v/v. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente para luego ser disuelto en 30 µl de agua bidestilada estéril.

En el caso de extracciones de ARN de silicuas de Arabidopsis y semillas de Arabidopsis y girasol, las muestras se trataron como describe Oñate-Sánchez (Oñate-Sánchez y Vicente-Carbajosa, 2008). Las muestras se procesaron en nitrógeno líquido para lograr un polvo uniforme y este polvo se transfirió a tubos de tipo Eppendorf que contenían 550 µl de solución amortiguadora de extracción de ARN (ver sección XII) y 550 µl de cloroformo. Los tubos se agitaron 10 segundos, se mantuvieron en hielo hasta que se culminó con el procesamiento de todas las muestras y se centrifugaron a 16000 g 3 minutos a 4 °C. Luego, el sobrenadante se transfirió a tubos de 1,5 ml, se agregaron 500 µl de fenol ácido, los tubos se agitaron nuevamente, se agregaron 200 µl de

cloroformo y se centrifugó a 16000 g, 3 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo con 1/3 del volumen de LiCl 8M y se agitó. Se dejó precipitar a – 20°C durante 1 hora, luego se centrifugó a 11000 g durante 30 minutos a 4 °C y se realizó un lavado con etanol 70 % (v/v). Para limpiar el ARN de impurezas, como carbohidratos, se hizo una precipitación diferencial, para lo que se agregaron 470 µl de agua bidestilada, 7 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 250 µl de etanol absoluto, se mezcló bien y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g 4°C. Luego, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml y se agregaron 43 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 750 µl de etanol absoluto, se mezcló para homogeneizar y se incubó a – 20 °C durante 1 hora. Luego, se centrifugó para precipitar el ARN. Finalmente, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70 % (v/v).

En todos los casos, se realizó una segunda precipitación del ARN con LiCl 1 M, para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico, y se incubó 1 hora a –20 °C. Se centrifugó a 16000 g por 1 hora y se lavó el precipitado dos veces con 1 ml de etanol 70 % (v/v). Luego, el ARN se resuspendió en el volumen apropiado para la cantidad de precipitado observada.

Para las muestras utilizadas en los ensayos de microarreglos, se utilizó el *kit* de purificación de ARN de plantas “RNeasy[®] Plant Mini Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

VIII.III – Cuantificación de ácidos nucleicos

Las concentraciones de ADN y ARN en solución se calcularon a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que una DO (260 nm) = 1 equivale a 50 µg/ml de ADN o a 40 µg/ml de ARN. También se midió la absorbancia a 280 nm, pico máximo de absorción de las proteínas, y se descartaron aquellas muestras con una relación de Abs_{260}/Abs_{280} inferior a 1,7 por considerarlas con una contaminación de proteínas no aceptable para los ensayos subsiguientes.

Las concentraciones de ADN y de ARN cuantificadas por espectrofotometría se confirmaron con la visualización directa de los productos purificados de geles de agarosa corridos en condiciones nativas y desnaturalizantes, respectivamente.

En las preparaciones de vectores e insertos para los clonados moleculares, la cantidad a utilizar se estimó en forma visual, comparando las bandas observadas en los geles con patrones de concentración conocida.

IX – Análisis de expresión génica

IX.1 – Cuantificación de transcriptos por transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real

Las reacciones de transcripción reversa (RT) se llevaron a cabo con el siguiente protocolo de dos pasos:

1– En un volumen final de 5 μ l se colocó 1 μ g de ARN junto con 0,1 μ M de oligonucleótidos poly-TV (consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos de timina). Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 70 °C para luego ser colocada inmediatamente en hielo (este tratamiento permite desarmar las estructuras secundarias del ARN)

2– Terminado el primer paso se le adicionan a la mezcla 3 μ l de solución amortiguadora, 1 μ l de dNTP 20 mM, 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se completa el volumen hasta 15 μ l con agua bidestilada estéril. Esta mezcla se incubó 1,5 horas a 42 °C y luego la enzima se inactiva a 80 °C durante 5 minutos seguidos de 30 segundos a 94 °C.

La PCR en tiempo real fue llevada a cabo utilizando un termociclador PTC-200TM (MJ Research Inc). Este equipo tiene acoplado un detector de fluorescencia Chromos 4 (MJ Research Inc). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 2 μ l SyBr green (1/20); 0,1 μ l dNTP 20 mM; 0,4 μ l de cada oligonucleótido específico (20 pmol/ μ l); MgCl₂ 3 mM; 10 μ l de una dilución 1/50 del producto de la RT previamente descrita y 0,05 μ l de *Taq* Platinum (Invitrogen, Inc.). La fluorescencia fue registrada

continuamente durante 40 ciclos. Los oligonucleótidos específicos para cada gen fueron diseñados usando las bases de datos disponibles en <http://www.arabidopsis.org> y <http://frodo.wi.mit.edu/primer3> y sus secuencias se encuentran detalladas a en la Tabla 1.

Los niveles de expresión de los genes *ACTINA2* y *ACTINA8*, previamente evaluados (Charrier y col., 2002), se usaron para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés de cada muestra de ARN de Arabidopsis. Para normalizar las muestras de ARN de girasol, se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados en base a secuencias de ESTs que codifican *ACTINA2* y *ACTINA8* putativas de esta especie, similares a las actinas de Arabidopsis. La secuencia de cada oligonucleótido se detalla en la Tabla 1.

Todas las cuantificaciones fueron realizadas con triplicados/cuadruplicados biológicos. Los valores de cuantificación se expresan en forma relativa a un control al cual se le asigna arbitrariamente el valor de 1.

Los ensayos de RT-PCR en tiempo real fueron realizados por el Dr. Songhu Wang. La transcripción reversa se realizó con el kit comercial kitQuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) y para la PCR en tiempo final se siguió el protocolo descrito por Peleg (Peleg y col., 2011). Los valores se normalizaron utilizando el factor de elongación de arroz (ID: LOC_Os03g08010).

X – Determinaciones de actividad enzimática

X.1 – Ensayo histoquímico para determinar actividad β -glucuronidasa (GUS)

Los ensayos de actividad de GUS *in situ* se realizaron siguiendo la metodología descrita por Jefferson y col. (1987). Los tejidos fueron sumergidos en la solución amortiguadora de histoquímica (ver sección XII) y luego de 5 minutos de infiltración por vacío se incubaron toda la noche a 37 °C. Para una mejor visualización, los tejidos se clarificaron con etanol al 70 % (v/v). Una vez que las muestras fueron decoloradas, se fotografiaron utilizando una cámara digital Nikon montada sobre un microscopio Eclipse E200 (Nikon) o sobre una lupa binocular SMZ800 (Nikon).

X.II – Medición de la actividad enzimática de PEPCK

Para analizar la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) en el sentido de carboxilación, se germinaron las semillas durante 30 horas. En ese momento se recolectó la muestra y se procesaron alrededor de 200 mg en un mortero pre-enfriado en presencia de 500 μ l de solución amortiguadora de extracción de PEPCK (ver sección XII). Luego, la mezcla se colocó en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm (Malone y col., 2007). Inmediatamente, la actividad carboxilasa de PEPCK se midió en una alícuota del sobrenadante que se agregó al medio de reacción de PEPCK mantenido a 37 °C (Walker y Chen, 2002). La oxidación del NADH por la enzima malato deshidrogenasa fue seguida a 340 nm utilizando un lector Multiskaner ascent (Thermo). Una unidad de actividad de PEPCK es aquella que produce un μ mol de producto/minuto a 25 °C.

XI – Ensayos de unión proteína-ADN

XI.I – Cuantificación de proteínas

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

XI.II – Expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*

Para expresarlo en forma recombinante en bacterias, el dominio WRKY extendido de OsWRKY47 se escindió con *Xho*I y *Sal*I del vector pENTR/D-TOPO, Oswrky47cd (provisto por el grupo del Dr. E. Blumwald, Universidad de California, Davis, Estados Unidos) y se clonó en fase con la proteína de fusión GST en el vector pGEX-4T-3 (Smith y Johnson, 1988).

En el caso de HaWRKY76, la secuencia que codifica la proteína completa se clonó en fase con la proteína de fusión GST en el vector pGEX-4T-3 y las construcciones plasmídicas se usaron para transformar la cepa *E. coli* BL21 (DE3, GE Healthcare).

Las células transformadas con la construcción se hicieron crecer hasta saturación en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina, a 37 °C y con agitación. Una dilución 1/100 en el mismo medio se incubó a 37 °C con agitación, hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,8$. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó mediante la adición de IPTG 0,3 mM (concentración final). El cultivo fue incubado a 28 °C, en el caso de OsWRKY47, y a 23 °C, en el caso de HaWRKY76 con agitación durante 3 horas adicionales. Posteriormente, las células fueron cosechadas centrifugándolas a 5000 g durante 10 minutos a 4 °C y se resuspendieron en 1/20 volúmenes de solución amortiguadora de columna, respecto del volumen de medio de cultivo procesado. A continuación se agregó el inhibidor de proteasas PMSF en una concentración final de 0,1 mM. Se rompieron las células aplicando de 5 a 7 pulsos de ultrasonido de 10 segundos cada uno, separados por intervalos de 10 segundos en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra-CellTM VCX-600, Sonics & Materials). Los lisados celulares se clarificaron centrifugando a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C y las fracciones sobrenadante y precipitada fueron recolectadas y conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

Se tomaron alícuotas de ambas fracciones, las cuales fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

XI.III – Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se llevó a cabo en geles verticales. Se utilizó una relación de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8. El gel de separación se preparó con una concentración final de acrilamida del 12 o 15 % (p/v) y el gel de concentración con una del 6 % (p/v). La separación electroforética se realizó en solución amortiguadora de corrida 1 x (Laemmli, 1970), aplicando un voltaje constante de 100 V al principio de la corrida, y de 150 o 200 V constantes luego de que

el frente de corrida atravesó el gel de apilamiento de 6 % (p/v). Las muestras a sembrar fueron previamente desnaturalizadas mediante el agregado de un volumen de solución de siembra e incubación de 3 minutos en baño a 100 °C.

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron visualizadas en el gel por tinción con una solución de Azul Brillante de Coomassie R- 250 (Sigma) 1 % (p/v) en una mezcla de etanol:ácido acético:agua (50:10:40). El gel se incubó en un baño de esta solución durante algunas horas en una estufa a 65 °C. Una vez teñido, el gel se decoloró con una mezcla etanol:ácido acético:agua (25:10:65) hasta que recobró la transparencia y sólo se visualizaron las bandas de proteínas. Como marcador de masa molecular se usó el *LMW Calibration Kit for SDS* (Amersham Biosciences) que contiene polipéptidos con bandas de los siguientes tamaños: 97 kDa (1,005 µg), 66 kDa (1,245 µg), 45 kDa (2,2 µg), 30 kDa (1,245 µg), 20 kDa (1,2 µg) y 14,4 kDa (1,74 µg).

XI.IV – Purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad

Una vez verificada su expresión en forma soluble, se procedió a purificar la proteína recombinante expresada en *E. coli* como producto de fusión a la proteína glutathion S-transferasa (GST, Kaelin y col., 1992). El procedimiento que se siguió fue el descrito por GST *Gene Fusion System* (Pharmacia Biotech). El sobrenadante resultante de la centrifugación de los lisados celulares (de entre 10 y 30 ml, aproximadamente) se incubó con resina de glutathion–agarosa (Glutathione Sepharosa 4B, GE Healthcare), previamente equilibrada con PBS 1 x. Se empleó aproximadamente 1 ml de matriz (acorde con la capacidad de unión de la resina) para un volumen de partida de medio de cultivo de 100 ml. La purificación se llevó a cabo por un sistema continuo, por el cual el extracto proteico soluble se incubó alrededor de cuatro horas con la resina a 4 °C y con agitación leve para lograr una eficiencia de unión máxima a la fase sólida. Posteriormente, la resina se lavó con 8 volúmenes de PBS 1 x. La proteína unida fue eluida en fracciones de 200 µl, empleando una solución de glutatió reducido (Sigma-Aldrich) 10 mM (concentración inicial) en Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Las fracciones eluidas fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

XI.V – Selección de sitios de unión específicos (SELEX)

Para seleccionar las moléculas de ADN reconocidas específicamente por OsWRKY47 y HaWRKY76 *in vitro*, se aplicó la técnica de selección de oligonucleótidos de secuencia al azar, también conocida como SELEX (del inglés, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*)(Oliphant y col., 1989). Para ello se siguió el procedimiento descrito por Blackwell que hace modificaciones sobre el original de Oliphant y col. (Blackwell y Weintraub, 1990). La separación de los oligonucleótidos unidos a la proteína de los que no lo fueron se logró sembrando la mezcla de unión en un gel en condiciones nativas que permite separar, de acuerdo a su movilidad electroforética, el ADN libre (de mayor movilidad) de los complejos ADN–proteína (de movilidad menor). Para esta técnica se utilizó un oligonucleótido doble hebra de 52 pb denominado Selex 12N (Tabla 1), marcado radioactivamente con [α -³²P]dATP. El mismo fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos Selex A y Selex B (Tabla 1). Las reacciones de unión y la electroforesis se llevaron a cabo como se describió previamente utilizando la proteína de fusión GST–OsWRKY47 o GST–HaWRKY76 purificada. Luego del revelado de las placas autorradiográficas, se escindieron del gel seco las zonas de migración de los complejos ADN–proteína con la ayuda de un bisturí. Los oligonucleótidos se eluyeron empleando 1 ml de solución de elución, durante 6 horas a 37 °C. Luego, la mezcla se sometió a extracción con fenol/cloroformo, y el ADN fue precipitado en presencia de 2,5 µg ARNt y 2 volúmenes de etanol absoluto. Luego de un lavado con etanol al 70 %, el ADN se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada.

XI.VI – Síntesis y amplificación de oligonucleótidos doble hebra

Tanto el oligonucleótido simple hebra utilizado como el ADN unido y eluido de los geles de retardo se amplificaron por PCR empleando 1 µl de molde y los oligonucleótidos Selex A y Selex B (Tabla 1), por acción de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega). La PCR consistió de 18 ciclos de 1 minutos a 94 °C, 1 minuto a 53 °C y 1 minuto a 72 °C. El número de ciclos fue de 12 desde la cuarta ronda de SELEX. Posteriormente, los oligonucleótidos amplificados fueron purificados en geles de poliacrilamida nativos al 15 % (p/v) y la mezcla se sometió a nuevos ciclos de selección y amplificación.

XI.VII – Electroforesis en geles de poliacrilamida y purificación de los fragmentos de ADN amplificados

Para los geles de poliacrilamida (ver preparación en apartado XII) se usó como soporte del gel al equipo Miniprotean III (Bio-Rad Laboratoies Inc., USA). Las corridas electroforéticas se realizaron en TBE 1 x a 20 mA constantes. Una vez finalizadas, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0,3 µg/ml durante 20 minutos. Las bandas fueron visualizadas sobre transiluminador de luz UV y escindidas del gel para su elución. Ésta se realizó en las mismas condiciones que en el caso de la selección de sitios de unión específicos.

XI.VIII – Marcación radioactiva de oligonucleótidos doble hebra obtenidos por PCR

Los oligonucleótidos doble hebra se mezclaron con 400 ng del oligonucleótido SELEX A o SELEX B. La mezcla se colocó en un baño a 75 °C durante 5 min, que se dejó llegar lentamente a la temperatura ambiental. De esta forma, se disociaron los oligonucleótidos doble hebra y se favoreció el anillado de las hebras simples con los oligonucleótidos SELEX A o SELEX B. La mezcla se incubó en presencia de 10 µCi [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM c/u, solución amortiguadora 1 x suministrada por los proveedores de la enzima, y 1,5 unidades de la enzima Klenow (Promega). La reacción de marcación se llevó a cabo durante 16 horas a temperatura ambiente y el [α -³²P]dATP no incorporado se eliminó en columnas con Sephadex G-50 (Amersham) según la técnica de Penefsky (Ausubel y col., 1987)

XI.IX – Clonado molecular de los oligonucleótidos seleccionados

El clonado de los oligonucleótidos se hizo en el vector comercial *pGEM-T Easy* y la transformación de *E. coli* se realizó como se indicó previamente. La suspensión conteniendo células transformadas se sembró en placas con medio sólido LB agar suplementado con 100 µg/ml de antibiótico ampicilina, X-GAL e IPTG para la identificación de las colonias de células transformadas con el plásmido y el inserto deseado. Se hicieron repiques de 20 colonias blancas aisladas en medio LB fresco suplementado con ampicilina en la misma concentración, y los cultivos se dejaron

crecer durante 16 horas. Se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico de todos los cultivos y, para constatar la presencia de inserto de tamaño apropiado en los clones, se llevó a cabo un corte con la enzima de restricción *EcoRI* (Promega), cuyos sitios de reconocimiento flanquean el sitio de inserción en el vector utilizado. El producto de la digestión enzimática fue sembrado en geles de poliacrilamida al 15 % (p/v), sometido a electroforesis y teñido de igual manera que en la técnica descrita en el apartado XI.VII.

XI.X – Obtención de oligonucleótidos sintéticos doble hebra y marcación radioactiva de los mismos

Las hebras de cada uno de los oligonucleótidos utilizados en el Capítulo III fueron obtenidos por síntesis química en forma separada (Tabla 1, Alpha DNA <http://www.alphadna.com/>). Para todos los oligonucleótidos doble hebra, las secuencias fueron idénticas en el centro y presentan una hibridación de forma tal que quedan 4 nucleótidos desapareados en ambos extremos, que son los que van a servir de molde para la marcación por extensión con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, como se describe a continuación.

La hibridación de las hebras complementarias se llevó a cabo mezclando 400 ng de cada una de ellas en un volumen de 20 μl finales de agua. La solución se mantuvo durante 5 minutos a una temperatura de 85 °C, dejando luego que ésta baje gradualmente hasta alcanzar las condiciones ambientales. Dos μl de la solución de oligonucleótido doble hebra fueron incubados en un volumen final de 50 μl , en presencia de 10 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3000 Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM c/u, 1,5 U de Klenow (Promega) y solución amortiguadora 1 x suministrada por el proveedor de la enzima. La reacción de marcación se llevó a cabo durante 16 horas a temperatura ambiente y el $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ no incorporado se eliminó como se indicó en la sección XI.VIII.

XI.XI – Ensayos de retardo en geles

Los ensayos de retardo en geles fueron realizados según el protocolo descrito (Sessa y col., 1993). Se incubaron aproximadamente entre 20 y 50 ng de proteína de fusión purificada (GST–OsWRKY47 y GST–HaWRKY76), en presencia de ADN doble hebra marcado radioactivamente con [α -³²P]dATP (5000 μ Ci/calle) en un volumen final de solución de unión de 20 μ l. Después de incubar durante 20 minutos a 4 °C, se adicionó ficoll hasta 2,5 % (p/v) final, y las mezclas de unión se sembraron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante previamente precorrido a 100 V constantes durante 90 minutos. La solución de corrida utilizada fue TBE 0,5 x. La siembra se hizo con la corriente encendida a la misma diferencia de potencial que durante la precorrida y luego se modificó a 120 V constantes. La electroforesis se dejó transcurrir aproximadamente 1,5 horas. Posteriormente el gel se secó y se expuso a una placa radiográfica con pantalla intensificadora a –80 °C, durante 16 horas.

XI.XII – Ensayos de competencia

Para una identificación inequívoca de la secuencia que es unida específicamente por la proteína *in vitro*, se hicieron ensayos de competencia en geles de retardo, agregando a cada mezcla de reacción un exceso molar de 20 veces de cada oligonucleótido competidor sin marcar, antes de agregar el oligonucleótido marcado. Luego, se procedió con la incubación de la mezcla y demás pasos del ensayo descrito en la sección anterior.

XII – Soluciones de trabajo utilizadas

SSC 6 x: NaCl 0,9 M, citrato de sodio 0,09 M

TBE 1x: Tris-HCl 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 20 mM

TAE 1 x: Tris–acetato 20 mM (pH 8,5), EDTA 1 mM

Denhardt 100 x: Polivinilpirrolidona 2 % (p/v), albúmina sérica bovina 2 % (p/v), ficoll 2 % (p/v).

FAA: Etanol 50 % (v/v), ácido acético glacial 5 % (v/v), formaldehído 3,7 % (v/v), se completa con agua bidestilada.

Gel nativo (para ensayos de retardo): Acrilamida 30 % (p/v) 6,5 ml, bisacrilamida 2 % (p/v) 1,6 ml, TBE 10 x 2 ml, glicerol 50 % (p/v) 2 ml, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) 30 % (p/v) 150 μl , TEMED 44 μl , agua bidestilada 40 ml.

HEPES 1 x: HEPES 20 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM. Se lleva a pH con NaOH.

Medio de cultivo LB (Luria Bertani): Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l (pH 7), Para preparar el medio sólido se añade 15 g/l de agar.

Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962): KNO_3 1,9 g/l, NH_4NO_3 1,65 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,37 g/l, KH_2PO_4 0,17 g/l, Na_2EDTA 37,3 mg/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3 mg/l, H_3BO_3 6,2 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,6 mg/l, KI 0,83 mg/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añade 8 g/l de agar.

Medio de reacción de PEPCK: HEPES 100 mM (pH 7,5), β -mercapto etanol 5 mM; KHCO_3 100 mM, PEP 20 mM, ADP 0,3 mM, NADH 0,25 mM, MgCl_2 5 mM, MnCl_2 1 mM, malato deshidrogenasa 1U.

PBS: NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 1,44 g/l, KH_2PO_4 0,24 g/l. Se ajusta a pH 7,4 usando HCl.

Solución I de Minipreparación: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM.

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

Solución III de Minipreparación: KAc 5 M (pH 4,2).

Solución amortiguadora de infiltración: MgCl_2 10 mM y 150 μM de acetosiringona

Solución amortiguadora de extracción de ARN: LiCl 400 mM, Tris-HCl 200 mM (pH 8), EDTA 25 mM, SDS 1 % (p/v)

Solución amortiguadora de histoquímica: X-Gluc 1 mM; NaH₂PO₄ 100 mM (pH 7), Tritón X-100 0,1 %

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

Solución amortiguadora de extracción de PEPCK: Bicina-KOH 200 mM (pH 9), DTT 25 mM

Solución amortiguadora de reacción: HEPES 25mM (pH 7,6), Tritón X-100 0,05 %

Solución de corrida Laemmli 10 x (Laemmli, 1970): Tris 250 mM, glicina 2,5 M, SDS 1 % (p/v)

Solución astringente: urea 8 M, Na₂CO₃ 100 mM (pH 10,0)

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

Solución de extracción de GdA: sacarosa 0,4 M, NaCl 0,5M, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0)

Solución de siembra en geles de agarosa: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilencianol FF 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)

Solución de siembra en geles de retardo: Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), glicerol 20 % (v/v), SDS 4 % (p/v), β-mercaptoetanol 10 % (p/v), azul de bromofenol 0,01 % (p/v)

Solución de unión en geles nativos (para ensayos de retardo): HEPES 20 mM (pH 7,5), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM

Solución OLB: Mezcla de las soluciones A, B y C en una relación 100:250:150

Solución A: 1 ml de solución O (Tris-HCl 1,25 M (pH 8,0), MgCl₂ 125 mM), 18 µl β-mercaptoetanol, 5 µl dCTP, 5 µl dGTP, 5 µl dTTP 100 mM c/u.

Solución B: HEPES 2 M (pH 6,6).

Solución C: Hexanucleótidos de secuencia al azar (dN6) de concentración 90 DO/ml

Solución de prehibridización: SSC 5 x, SDS 0,5 % (p/v), solución de Denhardt 5 x

TRIZOL casero:

Preparación de fenol ácido

- Se fundió el fenol (guardado en congelador a – 20 °C) en un baño a 68 °C
- Se adicionó 0,1 % de hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor de ARNasas) y agua bidestilada para saturar. Se dejó descansar un día. Se extrajo el agua de la fase superior y se le adicionó agua nueva. Estos dos últimos pasos se repitieron dos veces más. Se fraccionó en frascos, se rotuló y se guardó en heladera. De esta forma el fenol es estable entre 8 a 10 meses.

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

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes:

Para la preparación del gel de separación 12 % (p/v): Acrilamida/Bisacrilamida 30:0,8 1,6 ml, Tris-HCl 8 x (pH 8,9) 0,48 ml, SDS 10 % (p/v) 40 µl, agua destilada 4 ml, APS 10 % (p/v) 26,6 µl y TEMED 5,6 µl.

Para la preparación del gel de concentración: Acrilamida/Bisacrilamida 30:0,8 0,41 ml, Tris-HCl 8x (pH 6,8) 0,25 ml, SDS 10 % (p/v) 20 µl, Agua destilada 2 ml, (NH₄)₂S₂O₈ (APS) 10 % (p/v) 20 µl y TEMED 2 µl.

XIII – Tabla de oligonucleótidos empleados

OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA PCR EN TIEMPO REAL		
ID/NOMBRE DEL GEN	NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5' → 3')
AT3G18780	AtACT-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
	AtACT-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
AT5G67030	ABA1-F	GACCGATAACGAAGGAAGAAGATA
	ABA1-R	TTCGGAGTTTTCTGATTACTTTC
AT1G52340	ABA2-F	CTAGGCTTGACTAGGAGTGTTGCAG
	ABA2-R	AGCAAAATTCCTGAAACCAACAAAT
AT4G26080	ABI1-F	AAAGAAGATGATTGTCTGATTTTGG
	ABI1-R	TATGTTGTCTTTGCTTCCTCTCTG
AT5G57050	ABI2-F	AGTGATGGTCTTTGGGATGTAATGA
	ABI2-R	TTTCCTTATTCCCTTCAAATCAACC
AT3G24650	ABI3-F	ACGTCAGCAGGTGGTACCAG
	ABI3-R	GGCAAGTGTGTCTCAGCTTC
AT2G40220	ABI4-F	ACAAGGAGGAAGTGGGTGTAATAA
	ABI4-R	TGGGATCAATAAAATCCCAAATAC
AT2G36270	ABI5-F	GAAGAGAATGCGCAGCTAAA
	ABI5-R	TTGTGCCCTTGACTTCAAAC
AT1G77120	ADH1-F	GGGTACTTTCTTCGGGAACACTACAAA
	ADH1-R	CTCTCTCCCTTCAGCATGTAATCAA
AT5G19550	ASP2-F	TCTGTCCGTACATTTGTTGCTGAT
	ASP2-R	TACTAGCCACATCTGCTGACTTGC
AT4G00360	ATT1-F	ATCTATTCCCTTGCCTTACCTTC
	ATT1-R	GAAGGCGTTTGCAGTAGAAATTGT
AT2G42540	COR15a-F	GAAAGCGAAAGACTACGTTGTTGAA
	COR15a-R	AGACCCTACTTTGTGGCCTCCTTAG
AT2G40170	EM6-F	GAAAGGAGCAGTTAGGAACTGAAGG
	EM6-R	ATATTACATCCGTGTGGGGAAGTTT
AT1G78440	GA2OX ₁ -F	CGTTTCCGCAGAGCTAGTCTCTG
	GA2OX ₁ -R	AGTGGACCCGAACCGGAATCATG

AT5G07200	GA200X ₃ -F	GCGGTGGTGAACAGCGAGAG
	GA200X ₃ -R	GTGAGCCAATCTGAAAAGGCTTGGA
AT1G15550	GA3OX ₁ -F	CCCAACATCACCTCAACTACTGC
	GA3OX ₁ -R	ACTTGTAGACCGGCGGTATTGTT
AT4G33070	PDC1-F	AAGCCATTGAAGTGTGAATCAAGAG
	PDC1-R	CATCCTTTTGGCAGCTTTAGTTTT
AT1G43890	RAB18-F	GAGGAGGAAGAAGGGAATAACACAA
	RAB18-R	AAGCTTTTCCTTGATCTTGCCATC
AT5G52310	RD29a-F	AGAAGTTTGCTTCAATGCTAGGTT
	RD29a-R	CTACCCGACACACTTTTATCTTCC
AT5G52300	RD29b-F	GAGGAGAGAAGAAGACAACGGCTAC
	RD29b-R	AAGTGATTGTGGAGACTTTCAACG
AT5G04040	SDP1-F	CAGCTAAGCTCGCGCATCTA
	SDP1-R	CCTTCCCACTCCTGAGCAA
AT5G20830	SUS1-F	AAGAAGCCGATTCTTTCACAATG
	SUS1-R	TTGTCCTTTGACTCTTTCCTCTG
AT3G43190	SUS4-F	CTTGACATTGACTGGTGTCTACGG
	SUS4-R	CACTTTCATGAGCAAGAGGAACA
HaACTINA2/8	HaACT-F	GGTAACATCGTGCTCAGTGGTGG
	HaACT-R	AACCACCTTGATCTTCATGCTGC
HaWRKY10	W10q-F	GAATAAGGTGTATTGTCCAACGCC
	W10q-R	GCGCGGGAGAGTACGTGAAAC
HaWRKY76	W76q-F	GTTCCAGTTATTAAGTCACGATTTAAACG
	W76q-R	CACTCGTTTTGTACAAACGAAGTCG
LOC_Os07g48260	W47q-F	ACTACGCGAACCTCATCAGC
	W47q-R	CAGTACCGGAGAGTGGCAGT
LOC_Os01g01369	Isom-F	ACCTCCCTCTTCTCTCTCT
	Isom-R	GACAAAGGTTCCCTCGATGA
LOC_Os02g06290	Rodan-F	CAACAAGAAGGAGCTGGAAGC
	Rodan-R	GTAGGAAATGTTGCGAGCACC
LOC_Os03g29850	MetCat- F	GCTACGTCTCACCATGCTC
	MetCat- R	TGTGCTGCTCAGCTTACCCT
LOC_Os12g36110	CaBP-F	CCAAGCAACAGCGAGAATTT
	CaBP-R	GCTGATCACATGAGCTGGAGT
LOC_Os03g01210	Cis-F	GAATTCTCCATGTGACCCTTGC
	Cis-R	TCTGCCATGCTCATCTCTTGC
LOC_Os06g36270	Recqin-F	GAAGCTCAACTCGCTCAACC
	Recqin-F	CAAATCGGCAGGTATGTCTG
LOC_Os06g46149	Serep-F	TCAGCTGCGCCTTGCCC
	Serep-R	GAGGAGGAGGACGGGAAGT
LOC_Os04g57130	DIR-F	CTCCTTGTCTCTGCCTCCT
	DIR-R	CGACGAGTTCCGGTGAAG
LOC_Os03g16950	PRRC-F	AGGATCAGTACACGCCGTTT
	PRRC-R	CGCAGTATTGACCGAACCTT
LOC_Os05g25350	FER-F	GATTGAGACGCTGTCCAAGG
	FER-F	GTAATGGTGGCCTCTTGGTG

OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA CLONADOS		
USO	NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')
RT-PCR y 3' RACE	PolyT-V	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
ADNc de HaWRKY76 completo	HaW76ADNc-F	GCGACTAGTATGGCGGTTGATTTTCGTC
	HaW76ADNc-R	GCGAGATCTTCACTTTGGCTCACCATA
Obtención del EST de HaWRKY10	W10DEG-R	GGRATRTCAGCCAGCTTCATACTAATTGC
Obtención del extremo 3' de HaWRKY10	W10RACE-F	GCAATTAGTATGAAGCTGGCTGAYATYCC
ADNc completo de HaWRKY10	HaW10ADNc-F	GGGGGATCCCATGGCAGTAGATCTCATA ACCGG
	HaW10ADNc-R	GGGGTTCGACCCTTACCAAATTTCACTAC CG
ADNc completo de OsWRKY47	OsW47ADNc-F	CCCAGATCTCCATGGCGTCTCCTGATGGTG GCG
	OsW47ADNc-R	CCCGGTACCTTAAGGATCGAAGCCAAACA TGTCG
Promotor completo de OsCaPU	CaPU-F	GGGTCTAGATACGTGCATGGTTGGTTTGA GCG
	CaPU-R	GGGCTCGAGAGGAGAGGCATGGTTGCGG
Promotor completo de OsCaPU	PRRC-F	GGGTCTAGACACAAGGCTTTTGCTTATTCT GGTCA
	PRRC-R	CCCCTCGAGCTGGGGAGGAATGGTTGGAT C
Fragmento de promotor de OsCaPU	CaPUfrag-F	TGTGAATAATCAAATGCTACCACA
	CaPUfrag-R	CGCACAGATACTCATTCACTACG
Fragmento de promotor de OsPRRC	PRRCfrag-F	TCCCTGTTAGTCGTTGTGGA
	PRRCfrag-R	TATTGCTGAGTCGGACATGG
Promotor de	CaPUdel-F	ATCAAATGCTACCACAATAAAACCATATAT

OsCaPU con caja W47 delecionada	CaPUdel-R	TCCGTTTTTAAATATATATGGTTTTATTGTG
Promotor de OsCaPU con caja W47 sustituida	CaPUst-F	CCACAATAAAAGTCAATACCATAT
	CaPUst-R	ATATGGTATTGACTTTTTATTGTGG
Promotor de OsPRRC con caja W47 delecionada	PRRCdel-F	TAACCGAGTCAAATATAACTGACTCGTAG
	PRRCdel-R	CTGCTTGCTACGAGTCAGTTATATT
OLIGONUCLEÓTIDOS PARA ENSAYOS EN GELES DE RETARDO		
USO	NOMBRE	SECUENCIA (5' → 3')
Selex	Selex 12N	GATGAAGCTTCTGGACAAT(12N)GCAGT CACTGAAGAATTCT
Selex	Selex A	GATGAAGCTTCTGGACAAT
Selex	Selex B	CAGAATTCTACAGTGGCTGC
EMSA	Oligo 1F	AATTGAGATTAAGTCAACTGACAG
EMSA	Oligo 1R	GATCCTGTCAGTTGACTTAATCTC
EMSA	Oligo 2F	AATTGAGATTAGGTCAACTGACAG
EMSA	Oligo 2R	GATCCTGTCAGTTGACCTAATCTC
EMSA	Oligo 3F	AATTGAGATTAAGTCAATTGACAG
EMSA	Oligo 3R	GATCCTGTCAATTGACTTAATCTC
EMSA	Oligo 4F	AATTGAGATTAGGTCAATTGACAG
EMSA	Oligo 4R	GATCCTGTCAATTGACCTAATCTC

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados
--

Capítulo 1

· PARA ALCANZAR ALGO ·
· QUE NUNCA HAS TENIDO ·
TENDRÁS QUE HACER ALGO
· QUE NUNCA HICISTE ·

Anónimo

CAPÍTULO I: *HaWRKY76 le confiere a las plantas características agronómicas deseables en condiciones de crecimiento normales y mayor tolerancia al estrés por exceso o defecto de agua*

INTRODUCCIÓN

I – Las plantas y el estrés

Frecuentemente, el entorno genera estrés sobre las plantas afectando su desarrollo. El estrés se genera como producto de un factor externo, biótico o abiótico, de influencia negativa sobre el organismo. El estrés abiótico es producido por condiciones ambientales que reducen el crecimiento y rendimiento de la planta por debajo de niveles óptimos. Mientras que algunos factores ambientales tienen la capacidad de generar este efecto en pocos minutos (por ejemplo, temperatura del aire), para otros son necesarios días o semanas (por ejemplo, sequía) e incluso meses (por ejemplo, falta de nutrientes). Un medio o factor estresante para una especie, puede no serlo para otra, y de esta manera el suelo y el clima limitan la distribución de las diferentes especies vegetales (Taiz y Zeiger, 2006).

Un 96,5 % del área rural mundial está afectada por factores que producen estrés abiótico. En estudios sobre estimaciones del impacto de distintos tipos de estrés abiótico, sobre la producción de cultivos de interés agronómico, se muestra que el déficit de agua se da en un 16 % y las inundaciones en un 10 % del área arable. El estrés por frío se da en un 26 % del área cultivada y el 39 % de las zonas aptas para la agricultura presentan estrés por falta de nutrientes o por falta de minerales (Cramer y col., 2011).

En condiciones de crecimiento a campo las plantas se enfrentan a combinaciones complejas de distintos tipos de estrés biótico y abiótico (Mittler, 2006). En la Figura 1 se muestra un modelo esquemático de la respuesta de la planta a este último tipo de estrés.

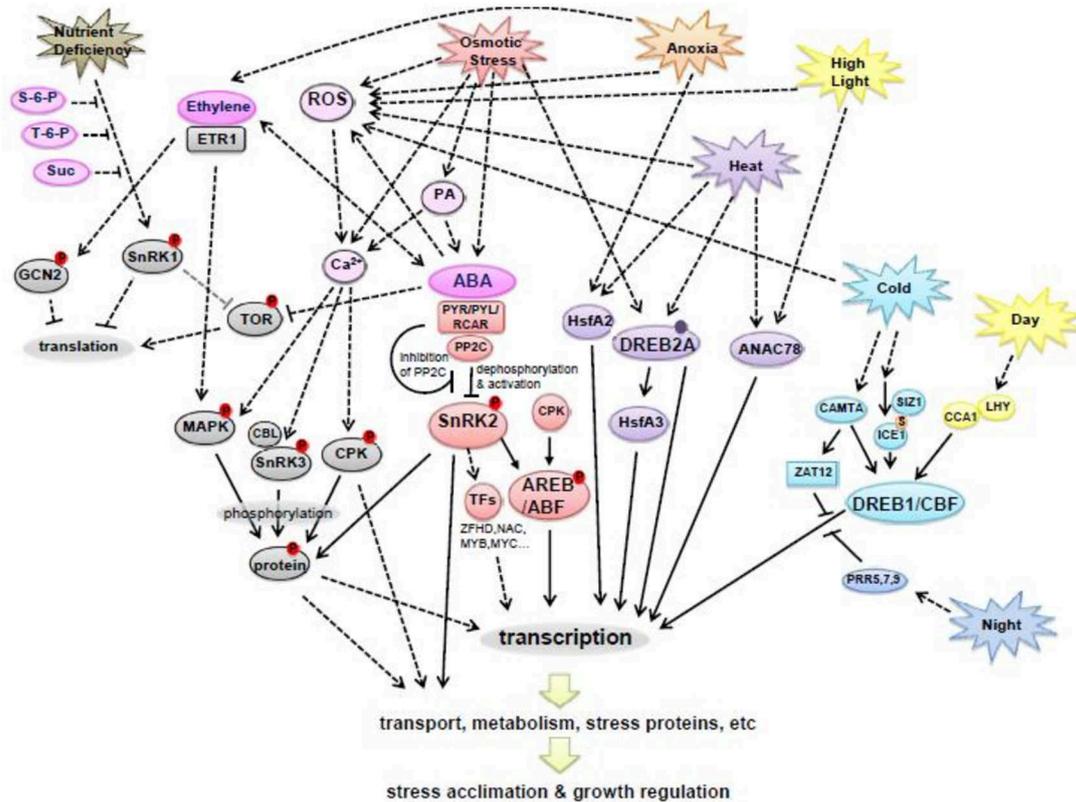


Figura 1: Modelo de las vías de señalización de respuesta de la planta frente a estrés abiótico. Los óvalos representan proteínas, metabolitos o procesos. Las líneas sólidas representan conexiones directas, las líneas punteadas representan conexiones indirectas (por medio de moléculas mediadoras). La línea gris indica que esta reacción no ha sido descrita en plantas. En este diagrama no se muestran todos los detalles del efecto del estrés y de las hormonas con el fin de simplificar el modelo (tomado de Cramer 2011).

II – Las vías de respuesta de las plantas frente a estrés

Las respuestas moleculares de las plantas frente a estrés abiótico incluyen interacciones y regulaciones cruzadas entre muchas vías moleculares (Rabbani y col., 2003; Seki y col., 2002; Takahashi y col., 2004). Una de las señales más tempranas en muchos estreses de tipo abiótico incluye a las especies reactivas de oxígeno (EROs) y también a las especies reactivas del nitrógeno. Estas moléculas modifican la actividad enzimática y la regulación de la expresión génica, formando parte de un proceso de señalización en el que interactúan con distintas hormonas (Mittler y col., 2011; Molassiotis y Fotopoulos, 2011; Wilkinson y Davies, 2010). Las hormonas son reguladores muy importantes de la respuesta a estrés y particularmente el ABA y el

etileno, son las dos hormonas que más injerencia tienen en este tipo de respuestas (Goda y col., 2008). Además, muchos estreses de tipo abiótico afectan directa o indirectamente la síntesis, concentración, metabolismo, transporte y almacenamiento de los carbohidratos. Los azúcares solubles actúan como señales, interactuando con luz, nitrógeno y factores de estrés abiótico para regular el desarrollo de la planta y su crecimiento. En *Arabidopsis*, un 10 % de los genes responden a tratamientos con azúcares (Kang y col., 2010; Obertello y col., 2010; Osuna y col., 2007). El análisis de mutantes reveló que hay elementos pertenecientes a la vía de señalización de azúcares que interaccionan con etileno, ABA, citoquininas y luz (Arenas-Huertero y col., 2000; Finkelstein y Gibson, 2001; Franco-Zorrilla y col., 2005; Zhou y col., 1998). Todas estas evidencias son claros ejemplos de la complejidad de las vías de señalización y de la interconexión y regulación cruzada de sus componentes.

III – El estrés por falta de agua: sequía

Las plantas están constituidas por 80-95 % de agua que es fundamental, entre otras cosas, para poder realizar la fotosíntesis. Por cada gramo de materia orgánica que se sintetiza por este proceso, 500 gramos de agua deben ser transportados por el sistema vascular y el tejido vegetativo de la planta y, lo que no es utilizado, egresar finalmente por los estomas. Mantener un balance entre flujo, absorción y pérdida de agua es tan complejo como fundamental para la subsistencia de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006).

Las especies vegetales pueden sobrevivir a la sequía durante períodos limitados gracias a distintos mecanismos de adaptación. Algunas especies mantienen el funcionamiento celular con un alto potencial hídrico (y en consecuencia, con los tejidos hidratados) y otras logran lo mismo con un bajo potencial hídrico (funcionan aún con una elevada deshidratación). Un tercer grupo escapa a la deshidratación provocada por las sequías cumpliendo su ciclo reproductivo sólo en los períodos de lluvia (Taiz y Zeiger, 2006).

La respuesta de las plantas al estrés es modulada por la intensidad, duración y tasa de progresión del mismo. Sin embargo, en líneas generales, las plantas dejan de

desarrollar las láminas y el tallo frente a la carencia de agua. Además, los tallos disminuyen su área por la pérdida de presión de turgencia y, dependiendo de la severidad del estrés, entran en senescencia. Por otra parte, el tejido radicular crece para lograr alcanzar zonas del suelo más profundas aún húmedas, e inmediatamente los estomas se cierran para evitar perder agua por evaporación. A nivel celular se produce un aumento en la síntesis de proteínas y solutos osmoprotectores para proteger a las macromoléculas y a las estructuras celulares de las EROs, generadas como consecuencia de la rotura de la homeostasis celular (Bray, 2004; Finkelstein y Rock, 2002; Hjellström y col., 2003; Hoekstra y col., 2001; Miller y col., 2010; Munné-Bosch y Alegre, 2004; Peng y col., 1996; Taiz y Zeiger, 2006, Figura 2, derecha).

III.1 – La respuesta fisiológica y morfológica de las plantas

Las plantas, en pos de su adaptación frente al estrés, desencadenan respuestas que afectan su morfología y la fisiología de sus tejidos. Las hojas de la planta sometida a estrés hídrico sufren un decaimiento en el potencial hídrico y se genera la inducción del cierre estomático. Además, se incrementa la producción de EROs (comparado con los niveles imperantes durante las condiciones de irrigación adecuada), que afectan la estabilidad de la membrana plasmática. (Figura 2, izquierda, Osakabe y col., 2014).

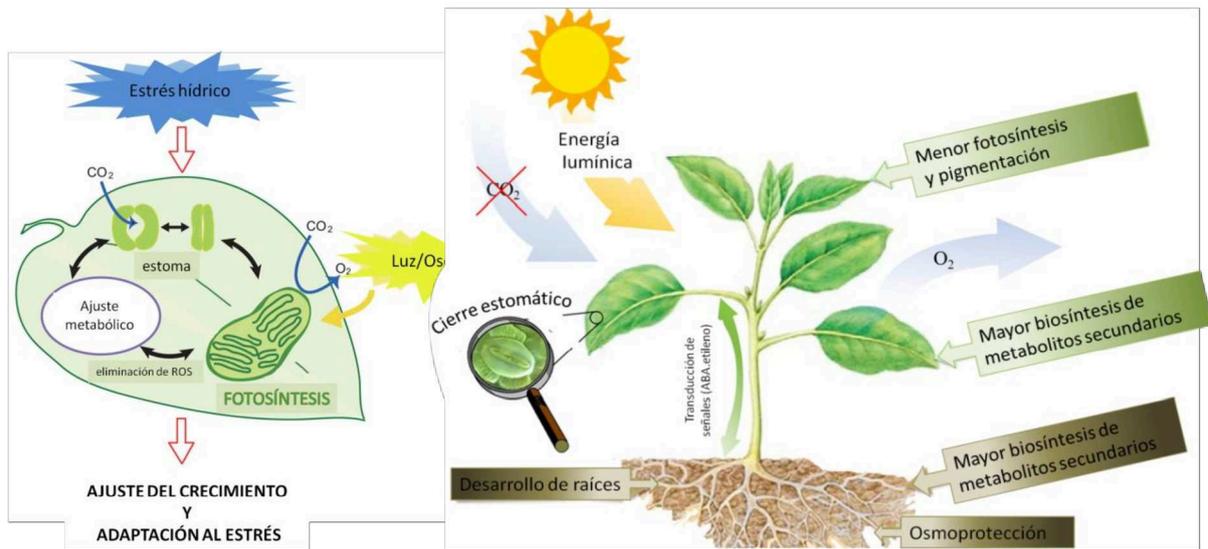


Figura 2: La respuesta de la planta al estrés hídrico. Ilustración de la respuesta de las plantas al estrés hídrico a nivel general en toda la planta (adaptado de Zingaretti 2013, derecha) y de la hoja (adaptado de Osakabe 2014, izquierda).

La concentración de ABA en hojas puede incrementarse más de 50 veces en condiciones de estrés hídrico, siendo éste el cambio de concentración más dramático informado para cualquier hormona en respuesta a un cambio medioambiental (Taiz y Zeiger, 2006). Tanto la redistribución de ABA como su biosíntesis son muy efectivas en causar el cierre estomático, y su acumulación en hojas estresadas juega un papel importante en la reducción de la pérdida de agua por transpiración en condiciones de estrés hídrico (Cui y col., 2008; Radin, 1981). Este cierre estomático trae aparejado un menor intercambio gaseoso y una reducción del suministro de CO_2 , que junto con el agua son sustratos necesarios para la fotosíntesis (Figura 2). Entonces la fotosíntesis y el nivel de carbohidratos de la hoja se ven alterados directamente por el déficit de agua o indirectamente por el menor crecimiento de las hojas producido por la adaptación al estrés (Pinheiro y Chaves, 2011). Las reservas de sacarosa son continuamente ajustadas como resultado del desbalance entre el suministro y la utilización del carbono en toda la planta y por la partición alterada almidón-sacarosa, que es regulada a su vez por muchos factores, incluyendo la sequía (Chaves, 1991). El desbalance entre la absorción del carbono en las fuentes y el uso de fotoasimilados por los sumideros, hace que las reservas de azúcar se alteren en distintos compartimentos de la planta. Por ejemplo, la concentración de azúcares solubles en

hojas puede verse incrementada (en el inicio de estrés de tipo moderado), mantenerse constante o disminuir (en estrés intenso, Pinheiro y Chaves, 2011).

III.1.1 – El desarrollo diferencial de la raíz

La elongación de la raíz en suelos secos está limitada generalmente por una combinación de impedancia mecánica (impedimento en la penetración en el suelo) y el estrés hídrico en sí (Bengough y col., 2011). La toma de agua de la planta en estrés hídrico depende del tipo de suelo y su estructura, de los espacios de aire entre el suelo y la raíz, y de la conductancia hidráulica de la raíz (que es la facilidad con la que la raíz deja pasar agua a través de ella por unidad de área transversal a la dirección del flujo). Este último factor es más importante al principio del estrés, pero cuando la carencia de agua se hace más pronunciada, los dos primeros comienzan a tener un papel fundamental (Aroca y col., 2012).

La pregunta que surge a la hora de buscar un mejoramiento frente al estrés hídrico modificando el sistema radicular es: ¿qué característica de la raíz sería más útil modificar y en qué condiciones de estrés le sería más útil a la planta?

Hay varias características morfológicas de la raíz asociadas a que la planta mantenga su productividad cuando sufre estrés hídrico. Por ejemplo, para los cereales en ambientes con déficit de agua tardíos, un menor diámetro de las células del xilema en raíces adventicias seminales resulta en mayor rendimiento. En cambio, la capacidad de generar elevada densidad de raíces que crezcan en profundidad y con mayor diámetro de las células del xilema puede mejorar la absorción cuando el agua está disponible en capas profundas del suelo. La capacidad de reanudar rápidamente el crecimiento luego de la riego podría mejorar la productividad de las plantas en zonas con sequías intermitentes (Comas y col., 2013).

El éxito de estos fenotipos dependerá de los sistemas de cultivo considerados y de las propiedades específicas de cada suelo. En la agricultura moderna, la alta densidad de siembra es un aspecto muy importante a tener en cuenta, dado que la competencia

entre los individuos puede regular el ángulo de las raíces y su desarrollo, afectando toda su arquitectura (Meister y col., 2014).

III.II – Las vías de señalización

El ABA es un regulador central de muchas respuestas de las plantas frente a estreses de tipo medioambiental, especialmente el generado por sequía (Chinnusamy y col., 2008; Hubbard y col., 2010). Su señalización puede ser muy rápida, sin la necesidad de involucrar en su respuesta actividad transcripcional. Un claro ejemplo de esto es el control de la apertura estomática mediado por ABA a través de regulaciones bioquímicas de iones y transporte de agua (Kim y Maik, 2010). La expresión de muchos genes de respuesta al estrés se inducen además por la aplicación de ABA (Bray, 1993; Cramer y col., 2011; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Skriver y Mundy, 1990). En muchos casos esta inducción es debida a que estos genes contienen en sus promotores una secuencia en *cis* de seis nucleótidos que se conoce como *ABA Responsive Element* (ABRE, Guiltinan y col., 1990; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Sin embargo, el análisis de la expresión de los genes de respuesta a estrés en mutantes deficientes en o insensibles al ABA indican que algunos de los genes de respuesta a estrés están regulados de forma independiente al ABA (Gilmour y Thomashow, 1991; Gosti y col., 1995; Nordin y col., 1991). En sus promotores, estos genes presentan secuencias en *cis* denominadas DRE del inglés *Dehydration Responsive Element* (Stockinger y col., 1997; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994) que responden al estrés osmótico o por frío pero no al ABA. Los miembros de la familia de FTs EREBE/AP2 unen el elemento en *cis* DRE y los miembros de la familia b-Zip regulados por ABA unen la caja ABRE (Hirayama y Umezawa, 2010; Xiong y col., 2002). De esta forma, las vías de señalización dependiente e independiente del ABA pueden funcionar de forma paralela para mediar la respuesta frente a estrés (Gosti y col., 1995; Stockinger y col., 1997; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994, 2006).

IV – Fitomejoramiento para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés hídrico

La eficiencia del uso del agua, es un parámetro importante en el fitomejoramiento, ya que da una idea de la calidad y aptitud de un cultivo en déficit hídrico (Osakabe y col., 2014).

Gracias a todos los mecanismos de respuesta que las plantas desencadenan frente al estrés, las células en si mismas generalmente no experimentan deshidratación en el rango del déficit de agua descrito en situaciones agrícolas de estrés hídrico. Por otro lado, la respuesta a estrés hídrico severo mediada por cierre estomático tiene como consecuencia una menor eficiencia fotosintética que afecta el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Es por eso que las estrategias biotecnológicas que utilizan genes que confieren tolerancia a desecación o estrés hídrico severo mediada por cierre estomático son poco atractivas (Skirycz y col., 2011; Tardieu, 1996).

Por esto es muy importante definir qué es estrés hídrico y tolerancia a estrés hídrico para cada cultivo en particular, teniendo en cuenta su desempeño y discutiendo los escenarios a los que se vería expuesto en cuanto a clima, suelo y prácticas de manejo de suelo. A su vez, es necesario evaluar qué tan frecuentemente un dado escenario de estrés hídrico afecta a una población en particular en un determinado ambiente. También hay que tener en cuenta que excelentes resultados obtenidos en un escenario de estrés, pueden resultar poco interesantes para mejorar la seguridad alimenticia en otras áreas geográficas con escasez de agua (Tardieu, 2011). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de características de los cultivos y sus ventajas/desventajas dependiendo del lugar en el que se desarrolla el cultivo en cuestión.

Característica	Variable para fenotipado	Efectos positivos	Desventajas	Mejor Escenario	Peor Escenario
Cultivo de ciclo corto	Ciclo de vida ($^{\circ}\text{Cd}$)	Escape	Menor acumulación de fotosintatos en el ciclo de vida	Año muy seco	Fin del ciclo con condiciones favorables
Escape vía cierre estomático	Aspecto, biomasa, intercambio gaseoso	Mantener el agua del suelo, \downarrow gradientes hidráulicos	\downarrow fotosíntesis, \uparrow temperatura de la hoja	Estrés severo al fin del ciclo	Fin del ciclo con condiciones favorables
Eficiencia del uso del agua	relación biomasa/traspiración	\uparrow cultivo por volumen de agua, escape	\downarrow fotosíntesis	Estrés severo al final del ciclo	Fin del ciclo con condiciones favorables
Mantenimiento del estado vegetativo	Índice de vegetación de diferencia normalizada, proxy detección	\uparrow biomasa	\uparrow riesgo de estrés al final del ciclo	Estrés medio/moderado	Estrés severo al final del ciclo
Mayor crecimiento radicular	Medir profundidad de raíz y toma de agua	\uparrow toma de agua	Competencia por fuente de C, \uparrow riesgos de estrés al final del ciclo	Agua de napa disponible	Suelo poco profundo

Tabla 1: Síntesis del efecto de distintas características introducidas en los cultivos en diferentes escenarios de clima, suelo y manejo de suelos. Abreviaturas: $^{\circ}\text{Cd}$ (tiempo térmico); C (carbono, adaptado de Tardieu 2011).

V – El estrés por exceso de agua: plantas sometidas a anegamiento y a inundación total y parcial

El exceso de agua tiene un efecto negativo severo en la producción de cultivos de interés agronómico dado que la mayoría de las variedades que se siembran no han sido seleccionadas para lidiar con este tipo de estrés (Setter y Waters, 2003). El Panel Intergubernamental del Cambio Climático, conocido por el acrónimo en inglés IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) informó que el cambio climático inducido por las actividades del hombre generó un incremento en las precipitaciones fuertes y en la actividad de los ciclones y se estima que esto provocará que las llanuras

lindantes a ríos y tierras arables se vean sometidas más frecuentemente a estrés por exceso de agua (Arnell, 2004).

Algunas especies de plantas tienen una capacidad sorprendente de sobrellevar el estrés por exceso de agua y otras pueden incluso crecer vigorosamente. La variación interespecífica tiene un fuerte impacto en la abundancia y distribución de las especies en ecosistemas propensos a inundación (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

La observación de que algunas plantas pueden enfrentar el estrés por exceso de agua y otras no, inmediatamente genera la pregunta sobre cuándo un ambiente con exceso de agua es estresante y para qué planta.

Hay especies que crecen en ambientes con frecuentes episodios de estrés por exceso de agua y no son tolerantes a este tipo de estrés. Estas especies han desarrollado diferentes estrategias de escape. Algunas completan su ciclo de vida entre dos eventos de estrés y durante los períodos de estrés por exceso de agua sobreviven en estado durmiente. Las plantas también pueden usar las llamadas estrategias de escape o bien estrategias de retraso de la actividad metabólica, desarrollando distintos tipos de características morfológicas y anatómicas que se describirán más adelante (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

V.1 – La respuesta de la planta al exceso de agua

En líneas generales, la principal causa del estrés sufrido por las plantas cuando hay exceso de agua es la reducción del intercambio de gases. La difusión del oxígeno en el agua es 10.000 veces más lenta que en el aire y el flujo de O₂ en el suelo es 320.000 veces menor cuando los poros del suelo están llenos de agua en lugar de gas (Armstrong y Drew, 2002; Colmer y Flowers, 2008). De esta manera, los niveles de O₂ en las células pueden decaer a valores restrictivos para la respiración celular. Del mismo modo, se ve afectada la difusión del CO₂ y del etileno (Mommer y Visser, 2005). La concentración de la hormona etileno aumenta en tejidos rodeados de agua. Esta acumulación activa cascadas de señales específicas de respuesta a estrés por exceso

de agua en pos de la adaptación (Bailey-Serres y Voeselek, 2008). Sumada a la menor difusión de los gases, la flora del suelo consume rápidamente el oxígeno disponible (esto acelera la deficiencia) y se producen sustancias tóxicas para la planta (como por ejemplo H_2S). Además, dependiendo de la profundidad y la transparencia del agua, el pasaje de la luz se ve afectado en diferentes medidas, haciendo que la fotosíntesis de plantas sumergidas sea más ineficiente (Bailey-Serres y Voeselek, 2008; Nishiuchi y col., 2012).

Para aclimatarse al estrés las células se valen de una regulación fina de la producción y el consumo de ATP, la acidificación limitada del citosol y el control de las EROs (Bailey-Serres y Voeselek, 2008). La disponibilidad reducida del O_2 como aceptor final en la cadena de electrones mitocondriales media una reducción rápida de la relación ATP:ADP (Gibbs y Greenway, 2003). Las células enfrentan esta situación por medio del aumento (al menos al inicio del estrés) de la glicólisis y la fermentación, para generar ATP y regenerar NAD^+ , respectivamente (Bailey-Serres y Voeselek, 2008). La fermentación se inicia con el catabolismo de sacarosa, para lo cual las plantas tienen dos vías independientes: la vía bidireccional de la sacarosa-sintasa dependiente de UDP y la de la invertasa unidireccional. En anoxia la ruta de la sacarosa sintasa (SUS) está regulada de manera positiva al principio del estrés (Geigenberger, 2003; Koch, 2004). La sacarosa es catabolizada a glucosa, que ingresa en glicólisis y rinde piruvato. El piruvato puede seguir tres vías de fermentación diferentes que rinden NAD^+ , necesario para reincorporarse en la glicólisis y generan en ese proceso lactato, etanol o alanina más 2-oxoglutarato. La producción de etanol, si bien tiene un intermediario tóxico como el acetaldehído (que puede formar complejos con proteínas y ADN), es relativamente benéfica para la célula dado que este producto difunde hacia el medio extracelular sin generar daño (si bien en alta concentración puede acumularse). La generación de lactato es desfavorable para la célula dado que acidifica el citosol, a menos que sea expulsado de la célula de forma activa, con gasto energético. Por otro lado, la generación de alanina y 2-oxoglutarato conservaría el carbono y facilitaría la producción de ATP (Bailey-Serres y col., 2012b; Bailey-Serres y Voeselek, 2008).

A grandes rasgos, hay dos tipos de estrés por exceso de agua con respuestas particulares muy caracterizadas: uno de ellos es inundación de la planta completa y el

otro es anegamiento. A modo de ejemplo la Figura 3 resume los mecanismos de respuesta que desarrollan distintas variedades de arroz que son tolerantes a estos tipos de estrés.

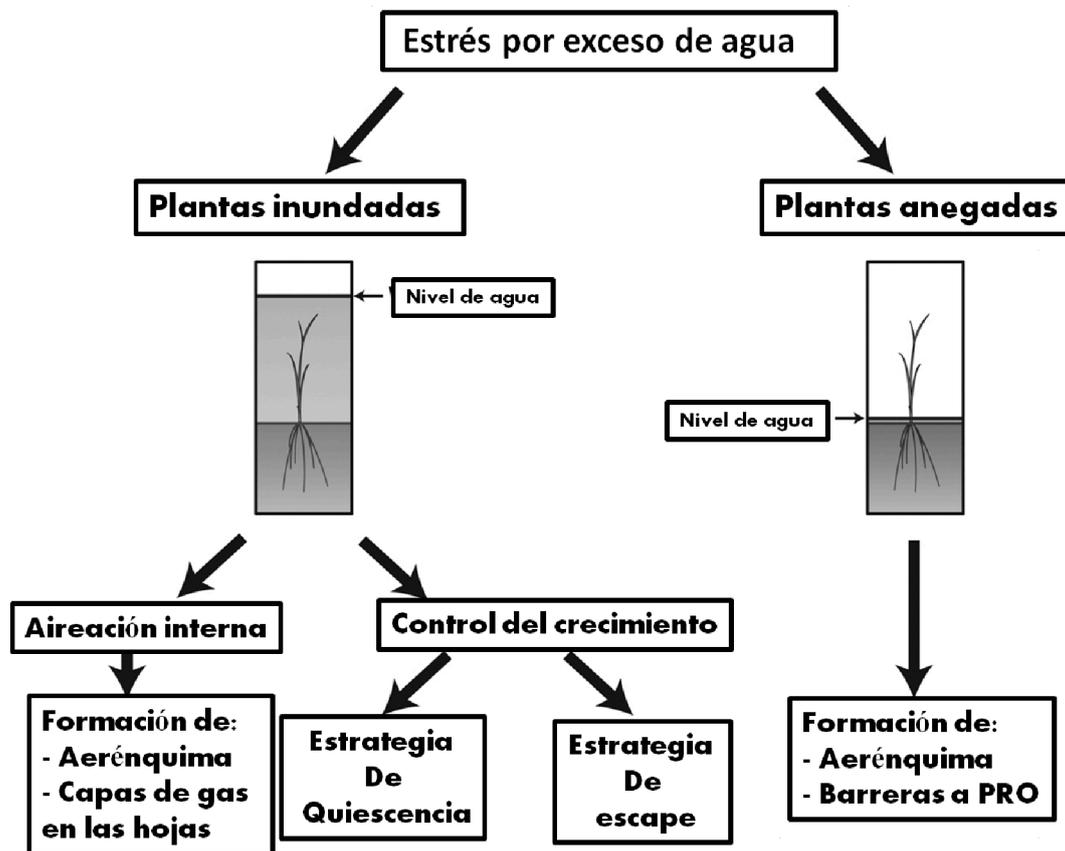


Figura 3: estrategias de adaptación a estrés por exceso de agua en plantas de arroz (adaptado de Nishiuchi y col., 2012).

Como el principal efecto generado por el estrés por exceso de agua es la anoxia, la mayoría de las respuestas están dirigidas a facilitar la difusión del oxígeno disponible a la planta o por la planta.

Una manera de facilitar este proceso es la formación de un tejido especializado llamado “aerénquima” (Figura 4). El aerénquima está constituido por conductos de gases interconectados presentes en tallos, pecíolos y raíces. Estos conductos pueden ser constitutivos, inducidos por el estrés o formados en la generación de raíces adventicias. En general, el aerénquima se puede clasificar en dos tipos (Evans, 2004):

- Aerénquima esquizogénico, desarrollado como resultado de la separación de las células
- Aerénquima lisogénico, producido por muerte celular

En las raíces, el aerénquima lisogénico se forma en el córtex, mientras que en el tallo se forma en el córtex y en la médula (Armstrong, 1979).

En los siguientes apartados se ahondará más en la respuesta particular frente a distintos tipos de estrés por exceso de agua.

V.II – Plantas inundadas

El estrés por inundación (EPI) es un estrés producido cuando la región aérea de la planta se encuentra total o parcialmente cubierta de agua (Bailey-Serres y col., 2012a). El EPI puede ser clasificado según su duración y profundidad del agua en EPI rápido y EPI profundo. El EPI rápido dura poco tiempo (días) y es causado por lluvias copiosas que generan que la planta quede sumergida pocos centímetros. El EPI profundo dura muchos meses, se da en la temporada de lluvias y la profundidad que alcanza el agua llega a varios metros. Dependiendo de la estrategia de adaptación de cada planta, ésta podría sobrevivir a uno u otro tipo de estrés (Bailey-Serres y col., 2012a; Nagai y col., 2010).

Cuando la planta se encuentra inundada, y por lo tanto sus órganos no tienen acceso al O₂ del aire, en tallos se dan dos estrategias adaptativas opuestas: elongación (escape) e inhibición de la elongación y del metabolismo en general (quiescencia). Ambas respuestas están reguladas por factores de respuesta al etileno (ERF, de sus siglas en inglés *ethylene response factor*), que son FTs que actúan corriente abajo del etileno modulando el crecimiento del tallo mediado por la hormona giberelina (Bailey-Serres y Voesenek, 2010).

La estrategia de quiescencia es útil para la supervivencia en EPS rápido, dado que la planta reduce al mínimo su actividad metabólica y reserva la energía disponible en estos recursos para recuperarse cuando pase la situación estresante. Sin embargo, esta estrategia no es útil para EPS prolongados, dado que la planta corre el riesgo de

quedarse sin reservas energéticas antes de que acabe la situación adversa y morir. De manera opuesta, la estrategia de escape es útil en los EPS profundos y/o prolongados, dado que la planta logra llegar a la superficie y enviar oxígeno a los tejidos en anoxia, lo que le permite sobrellevar mejor el estrés. Sin embargo, si el EPS es rápido, las plantas que desarrollan la estrategia de escape consumen sus recursos en elongar el tallo y cuando pasa la situación estresante, muchas veces mueren (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Bailey-Serres y Voesenek, 2010; Nagai y col., 2010).

En general las hojas de plantas en EPS desarrollan un grosor menor, con cutículas y paredes celulares más finas y reorientan los cloroplastos hacia la superficie. Estos mecanismos reducen la resistencia de la difusión del CO₂ y el O₂ y entonces mejoran la fotosíntesis y el metabolismo aeróbico, respectivamente (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

Durante el EPS, en algunas plantas como *Oryza sativa*, *Melilotus siculus* y *Spartina ánglica* se forman además capas finas de aire atrapado entre las hojas sumergidas y el agua de su alrededor, lo que favorece la aireación, la protección frente a sustancias tóxicas y la tolerancia del cultivo (Bailey-Serres y Colmer, 2014; Nishiuchi y col., 2012; Teakle y col., 2014; Winkel y col., 2011).

V.III – Plantas en anegamiento

El anegamiento es otro factor ambiental que genera estrés en las plantas. En esta situación el nivel de agua cubre el suelo (Bailey-Serres y col., 2012a). El anegamiento genera anoxia en la parte radicular de la planta, ante lo cual, el organismo tiene varios mecanismos de respuesta (Bailey-Serres y Colmer, 2014; Bailey-Serres y col., 2012a; Bailey-Serres y col., 2012b; Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Nishiuchi y col., 2012, Figura 4):

- Formación de aerénquima en raíces
- Generación de barreras que evitan la pérdida de oxígeno radial
- Deposición de suberina en las paredes celulares y lignina en la epidermis
- Generación de raíces adventicias
- Crecimiento hiponástico

La difusión longitudinal del oxígeno hacia el ápice de la raíz es más eficiente si se genera una barrera que evite la pérdida de oxígeno radial, dado que minimiza la pérdida de O₂ desde la raíz al ambiente. Además, esta barrera impide que ingresen a la raíz sustancias tóxicas acumuladas debido al mismo anegamiento (Armstrong, 1979; Colmer, 2003; Nishiuchi y col., 2012; Watanabe y col., 2013). Si bien no se sabe con exactitud la composición de esta barrera apoplástica, la lignina y la suberina que son componentes naturales de algunas paredes, forman parte de la misma y se acumulan más en condiciones de anegamiento que en suelos no anegados (Nishiuchi y col., 2012; Watanabe y col., 2013).

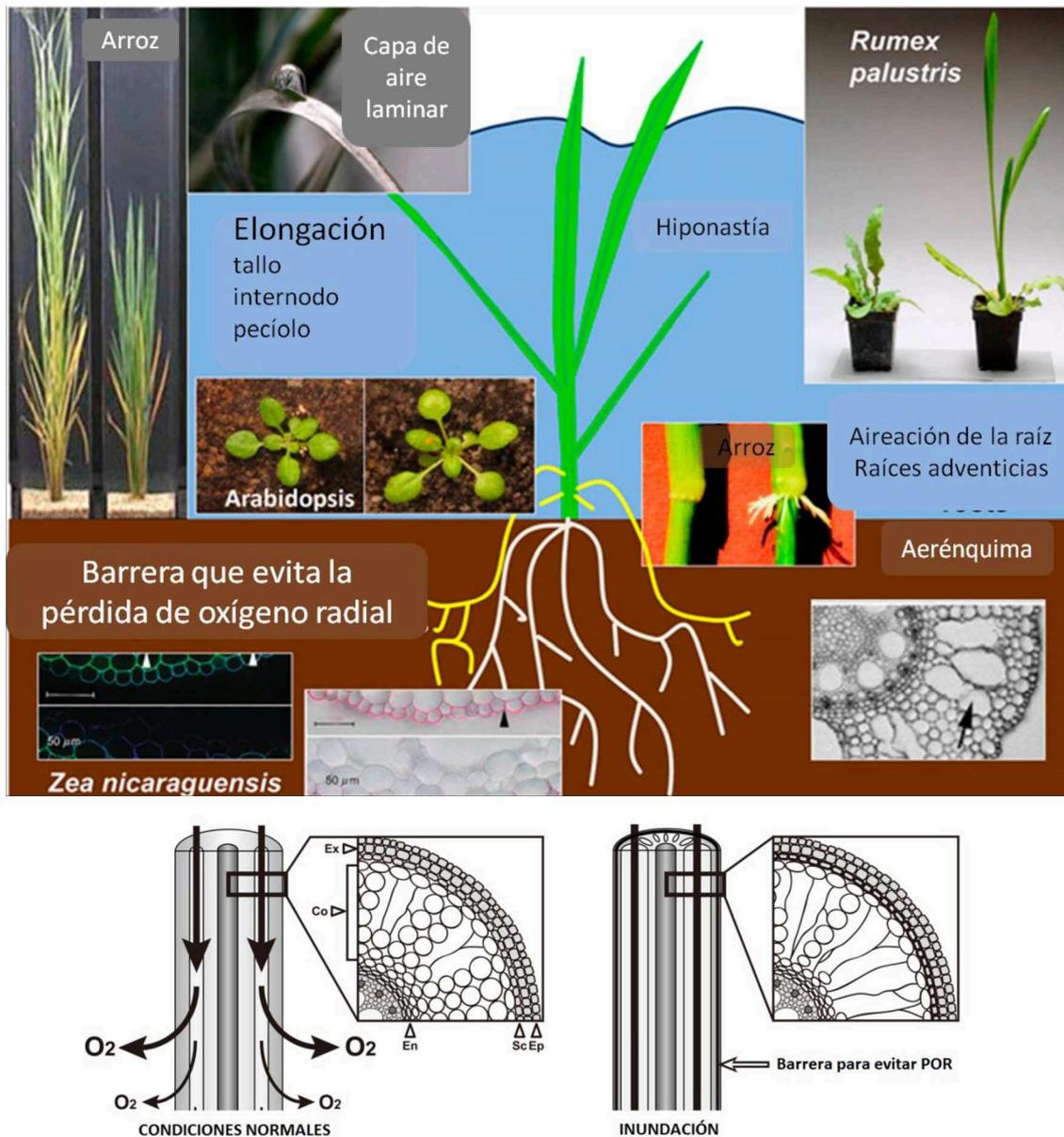


Figura 4: Respuesta de las plantas al estrés por exceso de agua. Arriba: Ejemplos de características desarrolladas en estrés por exceso de agua (adaptado de Bailey-Serres y col., 2012). Abajo: ejemplo del cambio de la morfología de raíces inundadas. El grosor de las flechas indica la cantidad de oxígeno disponible. Las cabezas de flechas indican las distintas capas celulares en la raíz. Abreviaturas: Co (córteX); Ex (exodermis); Ep (epidermis); En (endodermis); Sc (esclerénquima, adaptado de Nishiuchi v col., 2012).

V.IV – Recuperación del estrés por exceso de agua

El daño que sufren las plantas cuando se encuentran sometidas a estrés por exceso de agua se puede intensificar cuando el agua retorna a niveles normales y los tejidos quedan expuestos nuevamente a la atmósfera (Sarkar y col., 2006). El incremento

repentino de O₂ después de que el estrés por exceso de agua cesa, exacerba el estrés que sufren las plantas dado que genera una producción excesiva de acetaldehído, EROs y productos tóxicos en las diferentes células de los distintos órganos, que culminan en la oxidación de las membranas lipídicas, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos (Bailey-Serres y Chang, 2005; Blokhina y col., 2003; Blokhina y col., 2000; Sarkar y col., 2001). La luz directa del sol también amenaza la integridad de las hojas adaptadas a la poca luz que recibían debajo del agua, generando fotoinhibición de la fotosíntesis (Baker y Bowyer, 1994; Luo y col., 2011).

La capacidad de la planta para readaptarse rápidamente a las condiciones aeróbicas de crecimiento a nivel fisiológico y morfológico es una variable muy importante en tolerancia a estrés por exceso de agua (Gibbs y Greenway, 2003). Esta habilidad de la planta de recuperarse del estrés que genera la hipoxia/anoxia de forma exitosa subyace en su capacidad para mantener o incrementar los mecanismos de defensa contra el daño por estrés oxidativo y por acetaldehído (Luo y col., 2012).

Paradójicamente, luego de que las plantas son reoxigenadas también sufren de estrés hídrico debido a los cambios morfológicos y fisiológicos que han sufrido y por la variación abrupta de las condiciones de crecimiento. Entonces deben ser capaces de readaptarse para soportar la deshidratación (Setter y col., 2010) y, en consecuencia, desarrollan características fenotípicas asociadas a ese estrés.

Hay algunos trabajos en los que se correlaciona la capacidad de supervivencia directamente con los niveles de carbohidratos que restan inmediatamente luego del período de anoxia (Das y col., 2005; Ismail y col., 2013). Teniendo este último dato en consideración, las plantas que toleran estrés por exceso de agua por el mecanismo de quiescencia estarían mejor preparadas para tolerar la reoxigenación, dado que presentan mayores niveles de carbohidratos ya que durante el período de anoxia disminuyen su actividad metabólica. Las plantas que escapan del estrés por elongación del tallo y consumen en este proceso sus reservas energéticas se ven desfavorecidas en la recuperación (Luo y col., 2011).

RESULTADOS

I – HaWRKY76 une una secuencia de ADN diferente de la caja W

Como ya mencionamos en la Introducción General, los FTs de tipo WRKY unen ADN por medio del dominio denominado WRKY, una región de 60 aminoácidos definida por el motivo conservado de aminoácidos WRKYGQK. HaWRKY76 (*Helianthus annuus* **WRKY76**) es un miembro de la familia IId de girasol, perteneciente a un nuevo clado, aparentemente exclusivo de Asteráceas, cuya característica más distintiva es el cambio del motivo WRKYGQK, ampliamente descrito, por WKKYGEK. En la posición dos hay un cambio de arginina por lisina y en la posición seis hay un cambio de glutamina por glutámico, lo que suscitó que renombramos a los FTs de este clado como FTs WKKY. Aunque una de estas substituciones es conservativa, la capacidad de unión del FT a las secuencias en *cis* canónicas podría verse afectada, como ya fue observado para otro FT del tipo WRKY (Ciolkowsky, 2008).

Una de las primeras preguntas que surgió es si los FTs de tipo WKKY unirían las mismas secuencias en *cis* que los FTs WRKY.

Para comenzar a responder esa pregunta, se aisló la secuencia codificante de HaWRKY76 y se expresó la proteína completa de manera recombinante en *E. coli*. Luego, se realizaron ensayos de retardo en geles y se observó que HaWRKY76 une la caja W consenso con muy baja afinidad (Figura 5, calle 4).

Notoriamente, la misma cantidad de proteína que se utilizó en la calle 4, en la calle 1 generó una banda de retardo de mayor intensidad que la observada con la caja W, correspondiente a la unión de HaWRKY76 con el oligonucleótido que posee 12 bases de secuencia azarosa.

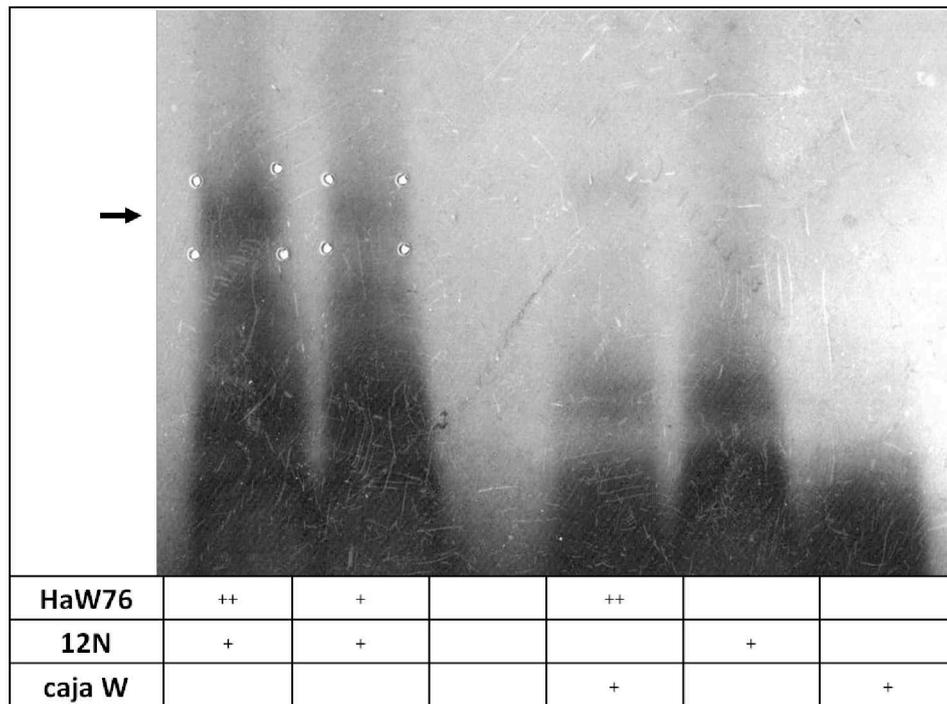


Figura 5: HaWRKY76 no une con alta afinidad la secuencia consenso (C/T)TGAC(T/C), reconocida por los FT de tipo WRKY. Se realizó un gel de retardo como se detalla en M&M. Se indica en la fotografía de la placa la banda de retardo correspondiente a la unión de HaWRKY76 con el ADN. En la tabla inferior se indican las mezclas utilizadas en cada calle. **HaWRKY76** corresponde a la proteína HaWRKY76; **12N** hace referencia al oligonucleótido con 12 bases al azar y **caja W** hace referencia a un oligonucleótido sintético que contiene la secuencia correspondiente a la caja W.

Para intentar determinar qué secuencias son unidas por HaWRKY76, se realizó un ensayo de SELEX. Tras siete rondas de SELEX seguidas por geles de retardo, se clonaron los oligonucleótidos seleccionados con mayor afinidad y se secuenciaron. En la Figura 6 se muestra la secuencia consenso obtenida a partir de ocho clones alineados.

Como se puede observar, en la posición 1 de la caja W canónica presenta C/T y la secuencia consenso para HaWRKY76 muestra la presencia de G o A. La posición 3 parece estar muy conservada entre ambos dominios, de la misma manera que las posiciones 4, 5 y 6. Sin embargo, la posición 7, cuya relevancia no está descrita en los FTs WRKY convencionales, sería importante para que HaWRKY76 reconozca y una ADN, dado que en ella se seleccionó preferentemente la base A.

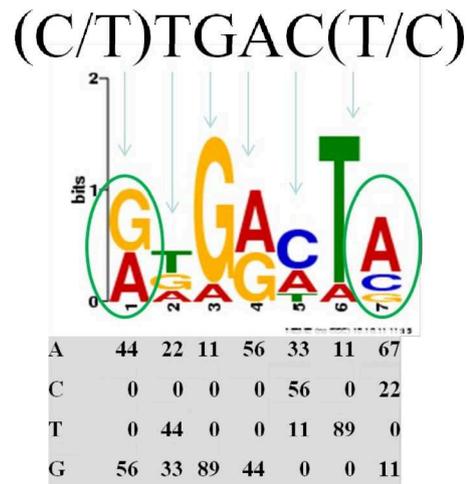


Figura 6: HaWRKY76 une una secuencia diferente al motivo consenso reconocido por los FT de tipo WRKY. Se muestra en la parte superior la secuencia consenso de la caja W. En letras de colores, según su tamaño se expresa la abundancia de cada base en la posición indicada. Abajo una tabla representa la abundancia de cada base en forma numérica.

II – HaWRKY76 se expresa en raíces, hipocotilos y aquenios en formación y su expresión es regulada por diferentes factores de estrés abiótico

Se asume que las proteínas codificadas por genes que se transcriben de forma diferencial en ciertas condiciones o ciertos órganos, podrían tener una relevancia en la respuesta de la planta o en el desarrollo del órgano en cuestión. Para investigar la función de HaWRKY76 en girasol, inicialmente se realizaron ensayos de expresión génica en diferentes órganos de plántulas y en plántulas con diferentes tratamientos.

La Figura 7 muestra que la expresión de *HaWRKY76* es mayor en raíces e hipocotilos que en cotiledones. Además, los niveles de transcripción de *HaWRKY76* se incrementan en capítulos y en embriones de aquenios en desarrollo. En capítulo en desarrollo la expresión de *HaWRKY76* aumenta paulatinamente hasta llegar a R3¹ y a partir de R4¹ comienza a disminuir. En R5¹ continúa disminuyendo hasta R5.6¹. En embriones,

¹ Estadios de desarrollo del capítulo de girasol, descritos por Schneiter y colaboradores en 1981. A partir de R1 se observa el capítulo, que se va desarrollando hasta llegar a R5, en el que la inflorescencia de girasol se abre y expone a las flores fértiles para que sean polinizadas. De R5 en adelante, se desarrollan los aquenios.

HaWRKY76 se expresa más desde R5.6 hasta R6¹ y decae cuando el proceso de llenado de semillas culmina en R8¹.

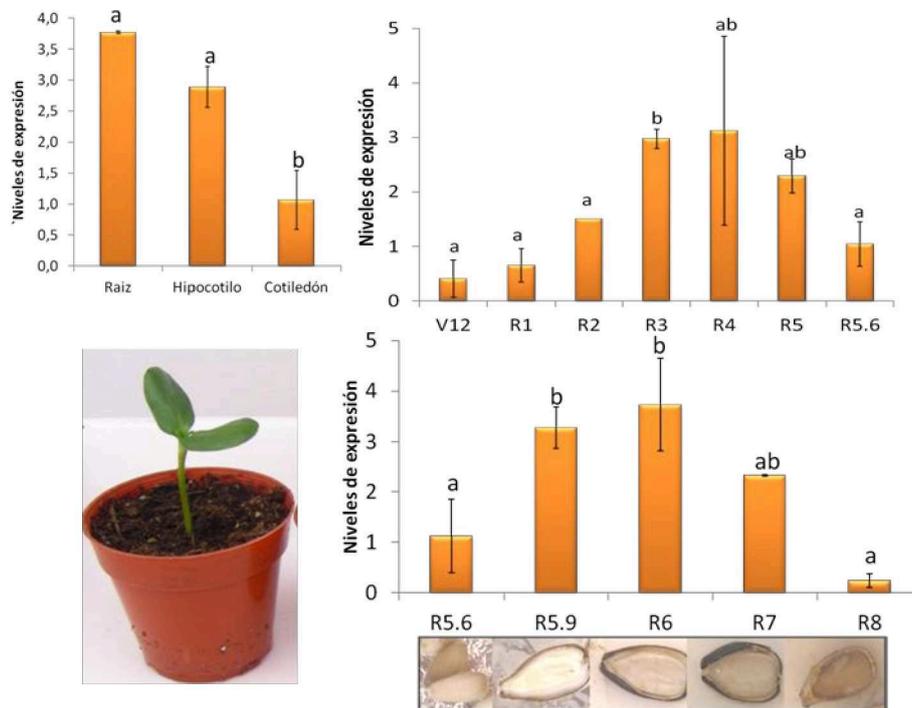


Figura 7: *HaWRKY76* se expresa más en raíces e hipocotilos que en cotiledones e incrementa sus niveles de transcripto en capítulos y achenios en desarrollo. Izquierda: arriba, niveles de expresión de *HaWRKY76* en órganos de plántulas de 5 días de girasol. Abajo, fotografía de una plántula de 5 días. Derecha: arriba, nivel de expresión de *HaWRKY76* en capítulos en formación. Abajo, niveles de expresión de *HaWRKY76* en achenios de girasol en desarrollo y fotografías ilustrativas de los mismos. Los niveles de expresión se midieron por RT-qPCR, se normalizaron respecto de los de actina y se relativizaron a los valores de la expresión en cotiledones y en capítulos en estadio R5.6, considerados arbitrariamente 1. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

Dados los objetivos planteados al inicio del trabajo de Tesis, se quiso determinar qué factores provocan que *HaWRKY76* se exprese de forma diferencial. Entonces se tomaron plántulas de 5 días y se las sometió a distintos tratamientos hormonales y de estrés abiótico (Figura 8). También se observó cómo se comportaban los niveles de transcripto de *HaWRKY76* en los órganos de las plántulas en condiciones de estrés hídrico (Figura 9).

Como se desprende de los resultados, *HaWRKY76* está regulado mayormente por estrés hídrico, cloruro de sodio y exceso de agua. Particularmente en estrés hídrico esta regulación sería específica en raíces, dado que *HaWRKY76* no varía su expresión en hipocotilos o cotiledones sometidos a esta condición. Por otro lado, ninguno de los tratamientos hormonales utilizados o las heridas estarían regulando la expresión de este FT en raíces.

Si bien el tipo de ensayos realizados que se muestran en las Figuras 8 y 9 es útil para realizar una primera aproximación general, las condiciones son muy diferentes de las del medioambiente y por este motivo, muchas veces los resultados que arrojan estos ensayos no se condicen con lo que sucede en plantas sometidas al estrés a campo. Entonces, se eligieron dos tratamientos en los que *HaWRKY76* cambia su expresión, estrés hídrico e inundación, y se realizaron ensayos en individuos de 15 días, intentando emular las condiciones de estrés que sufren las plantas en climas áridos (estrés hídrico severo) y EPS rápido seguido de recuperación por retiro del agua (desinundación).

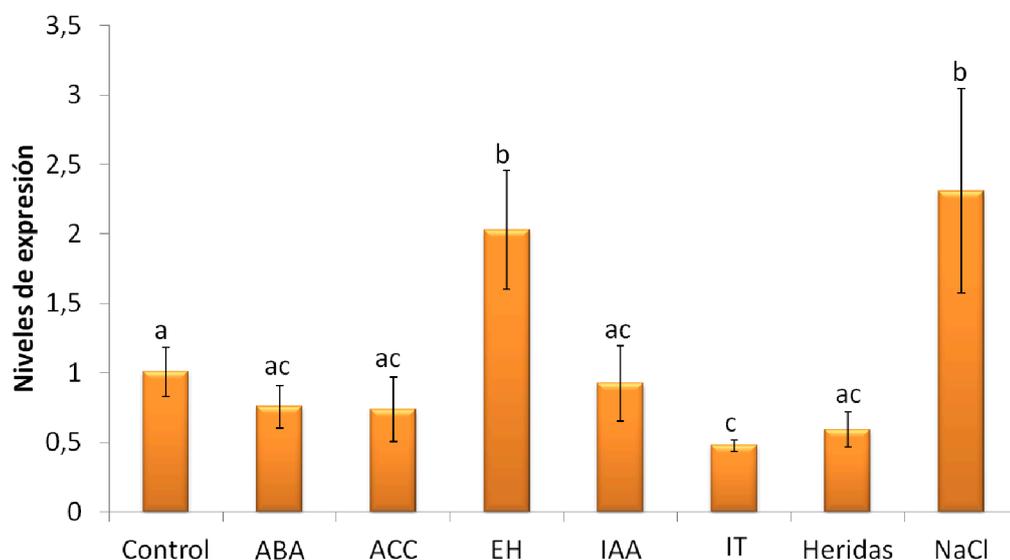


Figura 8: *HaWRKY76* incrementa su expresión en ensayos de estrés hídrico y NaCl.

El ensayo se realizó con plántulas de girasol de 5 días. Las plántulas se incubaron en MS 0,5 x para las condiciones control y suplementado con 100 μ M de ABA, 20 μ M de ACC, 100 μ M de IAA y 200 mM de NaCl durante dos horas. Estrés hídrico (EH), inundación total (IT). Las plantas sometidas a heridas fueron dañadas de forma mecánica con una pinza. Los niveles de expresión se midieron por RT-qPCR. Se le asignó arbitrariamente el valor 1 a los niveles de transcritos en condiciones control. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.



Figura 9: *HaWRKY76* aumenta su expresión en raíces de plántulas sometidas a estrés hídrico. Se trataron plántulas de cinco días como se indica en M&M durante dos horas. Los niveles de expresión se midieron por RT-qPCR. Se le asignó arbitrariamente el valor 1 a los niveles de transcritos de cotiledón en condiciones control. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

Las Figuras 10 y 11 muestran que *HaWRKY76* cambia su expresión de manera específica frente a estrés hídrico severo y luego de un día de recuperación del estrés por sumergimiento (cuando las plantas experimentan también estrés hídrico), respectivamente. En la Figura 10 se observa que a medida que el estrés se torna más severo para la planta, *HaWRKY76* aumenta su expresión hasta 15 veces antes de que la planta muera al día 16. En la Figura 11 se puede observar que los niveles de transcritos de *HaWRKY76* no varían de forma significativa durante el estrés por agua en exceso en sí, pero se ven incrementados más de diez veces luego de que la planta pasó una hora en recuperación.

Estos resultados indican que *HaWRKY76* podría jugar un papel en la respuesta de la planta frente a la deshidratación, dado que su inducción se da específicamente cuando las plantas se encuentran sometidas de una u otra forma a estas condiciones.

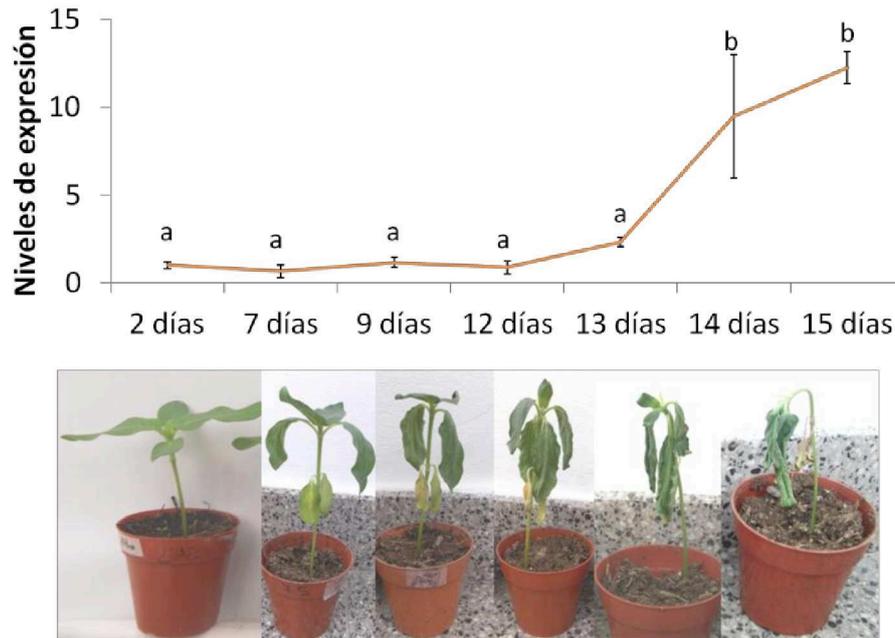


Figura 10: *HaWRKY76* se induce de forma abrupta en los estadios finales de la planta en estrés hídrico severo. Plantas de 15 días sometidas a estrés como se describe en M&M. Los niveles de expresión se midieron por RT-qPCR. Se le asignó arbitrariamente el valor 1 a los niveles de transcritos a los días de iniciado el tratamiento. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

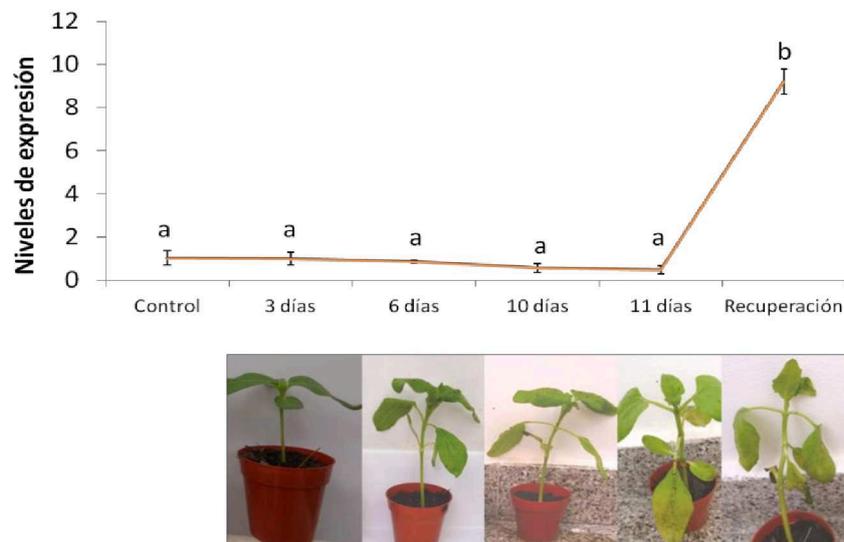


Figura 11: *HaWRKY76* tiene un pico de expresión en la recuperación post-inundación. Plantas de 15 días sometidas a estrés por inundación como se describe en M&M. Al día 11 las plantas se dejaron recuperar una hora y se tomó una muestra adicional. Los niveles de expresión se midieron por RT-qPCR. Se le asignó arbitrariamente el valor 1 a los niveles de transcritos en condiciones control. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

III – Las plantas transgénicas que expresan HaWRKY76 de forma ectópica y constitutiva presentan mayor biomasa de raíz y aérea y mayor producción que sus pares salvajes

Para continuar con la caracterización de HaWRKY76 se decidió expresar de forma ectópica y constitutiva su secuencia codificante bajo el control del promotor 35S del virus CaMV en *A. thaliana*, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. De esta forma, los factores de transcripción, de expresión normal muy baja, se clonan bajo el control de un promotor fuerte con el fin de inducir su expresión y disparar las vías de respuesta en forma visible, ya sea por características morfológicas o fenotípicas de cierta notoriedad.

Se obtuvieron distintas líneas homocigotas, que presentaron diferentes niveles de expresión y se seleccionaron tres líneas de acuerdo a su nivel de expresión para continuar con los análisis, dos de mayor expresión relativa, nombradas como A y B y una línea denominada C de menor expresión (Figura 12). A partir de este momento, las plantas transgénicas se denominarán, en general, plantas HaWRKY76, y las líneas, A, B y C, respectivamente. En las figuras se utilizarán las denominaciones W76-A, W76-B y W76-C en el caso de las distintas líneas de las plantas HaWRKY76 y WT para referirse al genotipo salvaje.

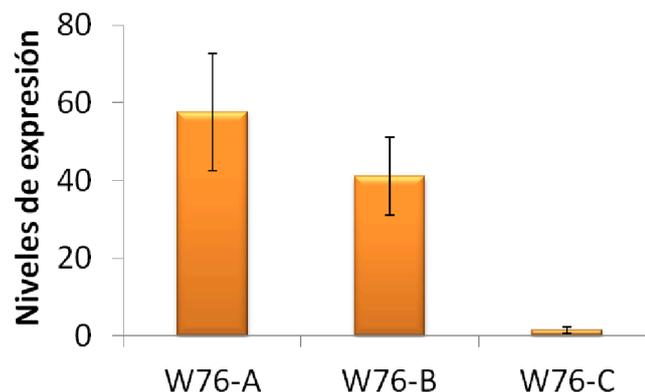


Figura 12: Niveles de expresión de *HaWRKY76* en plantas homocigotas que expresan constitutivamente *HaWRKY76*. La expresión de *HaWRKY76* fue medida por RT-PCR en tiempo real en tres líneas homocigotas nombradas A-C. Los niveles de expresión se obtienen de forma arbitraria como múltiplos de la expresión detectada en la línea C. Se le asignó arbitrariamente el valor 1 a los niveles de transcritos de la línea W76-C. Las barras de error corresponden a triplicados biológicos.

Luego, se prosiguió caracterizando las plantas en condiciones normales de crecimiento, como se describe en M&M. Se midieron diferentes parámetros como el momento del pasaje del estadio vegetativo al reproductivo, número y forma de las hojas, largo del tallo en el ciclo de vida y duración del ciclo de vida. En la Figura 13 se muestran los resultados de las mediciones de algunos de estos parámetros y como se puede observar, no se detectaron diferencias significativas entre las plantas transgénicas y las salvajes.

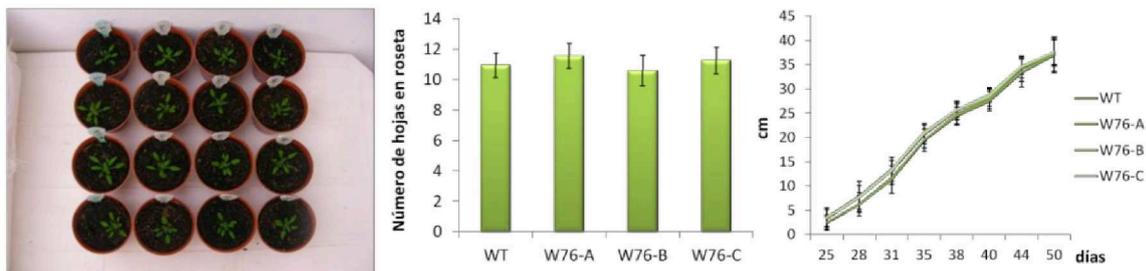


Figura 13: Las plantas HaWRKY76 no presentan diferencias con las salvajes en la morfología de la parte aérea. Izquierda: plantas de 18 días crecidas en condiciones normales. Centro: número de hojas en roseta en el pasaje del estadio vegetativo al reproductivo. Derecha: longitud del tallo principal en el ciclo de vida de las plantas. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos.

Este primer resultado no fue sorprendente debido a que, incluso en plantas mutantes para distintos FTs WRKY individuales, es relativamente raro detectar fenotipos diferenciales, principalmente por la redundancia funcional de los FTs WRKY (Eulgem y Somssich, 2007; Rushton y col., 2010). Por ejemplo, fue necesario trabajar con mutantes dobles y triples para identificar fenotipos asociados a la ausencia de *AtWRKY11* y *AtWRKY17*, y de *AtWRKY18*, *AtWRKY40* y *AtWRKY60*, respectivamente, y así dilucidar las posibles funciones de los mismos (Journot-Catalino y col., 2006; Xu y col., 2006).

Dado que *HaWRKY76* se expresa mayormente en raíces de girasol (Figura 7), se decidió evaluar las características de las raíces de las plantas transgénicas. Se realizaron ensayos para medir la longitud de raíces de plantas crecidas en placas y la biomasa radicular en plantas crecidas en arena regadas con solución de Hoagland 0,5 x.

Además, se midió el diámetro de las raíces en condiciones normales de crecimiento y se realizaron cortes histológicos para observar la anatomía de las raíces.

En la Figura 14 se puede observar que las plantas HaWRKY76 presentan raíces más largas cuando son crecidas en placas tanto a la semana como a los 14 días de sembradas. Si bien este ensayo es útil para evaluar el sistema radicular en estadios tempranos del desarrollo, las condiciones de crecimiento que se dan en la placa luego de las dos semanas de vida resultan estresantes para las plantas. Para evaluar qué sucede con el sistema radicular en plantas de mayor edad, se realizaron ensayos de biomasa radicular en arena con riego fertilizado. La arena es un sustrato inerte que permite crecer a las plantas y que, a diferencia del sustrato usado en el resto de los ensayos, puede ser separado del sistema radicular en el momento de la evaluación. En la Figura 15 se muestra que las raíces de las plantas HaWRKY76 presentan mayor biomasa que las de sus pares sin transformar, con un incremento que varía entre 40 % y 60 % con respecto a la de las salvajes. Además, las raíces de plantas crecidas en condiciones normales presentan un diámetro mayor. Dadas las diferencias que se encontraron entre las plantas transgénicas y las de tipo salvaje se decidió ahondar más en la estructura radicular. En un principio se realizaron cortes histológicos de plántulas de siete días para observar si había algún tipo de diferencia en las células que dan origen a la raíz y no se observaron cambios (resultados no presentados). Luego, se decidió evaluar la anatomía de la raíz en plantas de mayor edad. En la Figura 16 se muestran cortes histológicos de raíces de tres semanas de vida que indican que las raíces de las plantas HaWRKY76 presentan un xilema de menor diámetro que el de las raíces de las plantas salvajes.

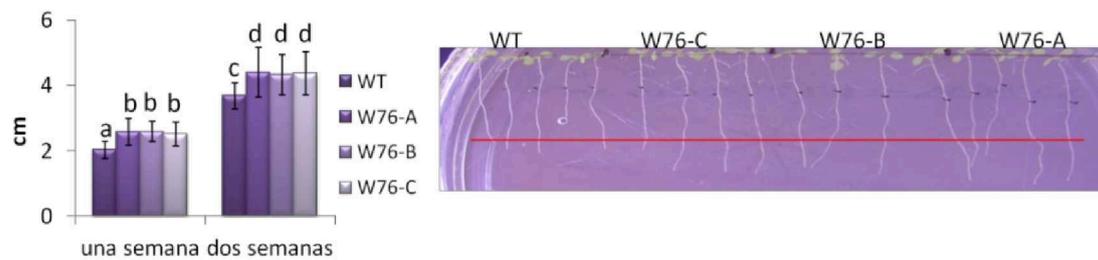


Figura 14: Las plántulas HaWRKY76 desarrollan raíces más largas a los 7 y 14 días que las plantas salvajes. Izquierda: longitud de raíces de plantas de una y dos semanas de edad. Las placas se prepararon como se indica en M&M. Se midió la longitud de las raíces a los 7 y 14 días de sembradas. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

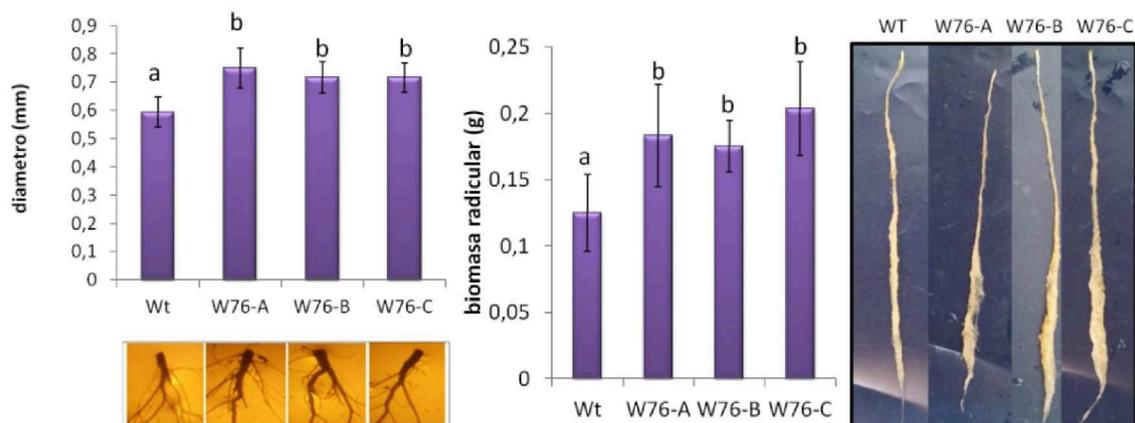


Figura 15: Las plantas HaWRKY76 tienen raíces más anchas y mayor biomasa radicular. Izquierda, arriba: promedio del diámetro de raíces de plantas de 5 semanas crecidas en condiciones normales. Izquierda, abajo: fotografía ilustrativa del diámetro de las raíces de cada genotipo. Centro: promedio de la biomasa radicular de plantas de 5 semanas crecidas en arena. Derecha: fotografía ilustrativa de una raíz representativa de cada genotipo. Se usaron 4-6 plantas por ensayo. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

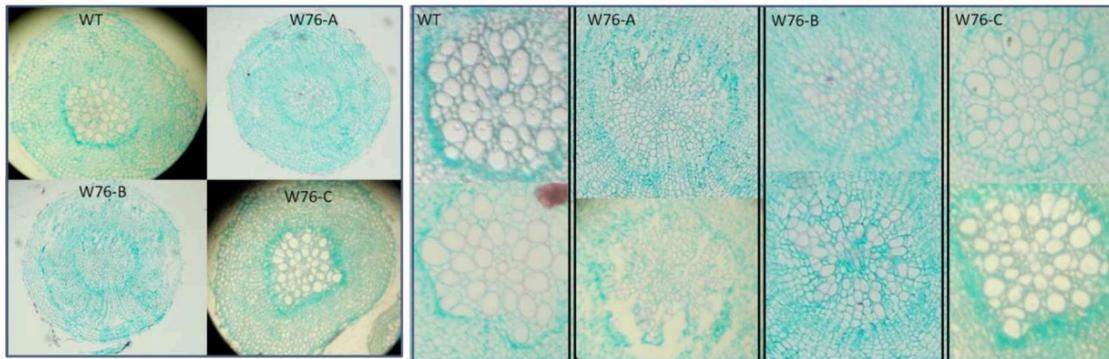


Figura 16: Las raíces de las plantas HaWRKY76 tienen células xilemáticas de menor diámetro que las de sus pares salvajes. Raíces de plantas crecidas en condiciones normales durante tres semanas. A la izquierda se observan cortes histológicos transversales de raíces y la derecha el detalle del cilindro vascular. Las raíces fueron teñidas con safranina-verde rápido.

Estos resultados nos motivaron a evaluar si la expresión diferencial de *HaWRKY76* observada en capítulo en desarrollo de girasol tenía alguna relación con cambios de la inflorescencia, en el llenado de vainas o en la producción de las plantas HaWRKY76 respecto de las plantas salvajes. Como la biomasa aérea generada durante el desarrollo de la planta es muy importante para la producción, también se evaluó esta característica. Las condiciones de cultivo fueron condiciones normales (consideradas como las óptimas de crecimiento para estos ensayos) según se detalló en M&M.

A simple vista las inflorescencias y las varas florales no presentaron diferencias entre las plantas salvajes y las transformadas. Además, la longitud de las vainas o el número de semillas por vaina es equivalente en todos los genotipos (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando se midió la producción, quedó en evidencia que las plantas HaWRKY76 tuvieron mayor rendimiento en peso de semillas en condiciones normales de crecimiento. Por otra parte, este incremento se vio acompañado de un aumento en la biomasa del tejido aéreo en las plantas HaWRKY76 (Figura 17). Además observamos la arquitectura de las plantas HaWRKY76 comparada con la de las plantas salvajes, la morfología de sus tallos y el contenido proteico de sus semillas. En estadios tardíos del desarrollo las plantas HaWRKY76 se diferenciaron de sus pares salvajes en la cantidad de ramificaciones, con una media del 44 % más en las líneas de mayor expresión (Figura 18).

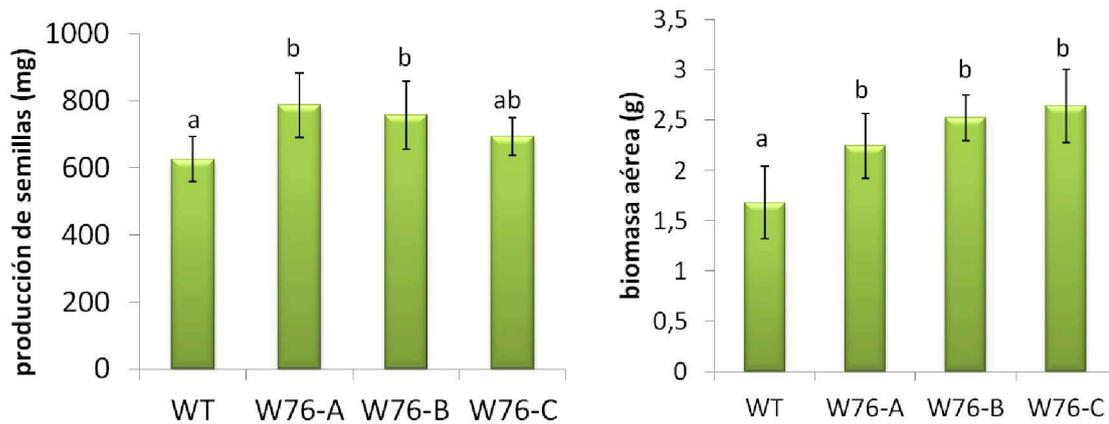


Figura 17: Las plantas HaWRKY76 tienen mayor producción de semillas y mayor biomasa aérea. Izquierda: producción total de las plantas crecidas individualmente. Se cosecharon todas las semillas y se las pesó. Derecha: biomasa aérea de plantas de cinco semanas. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

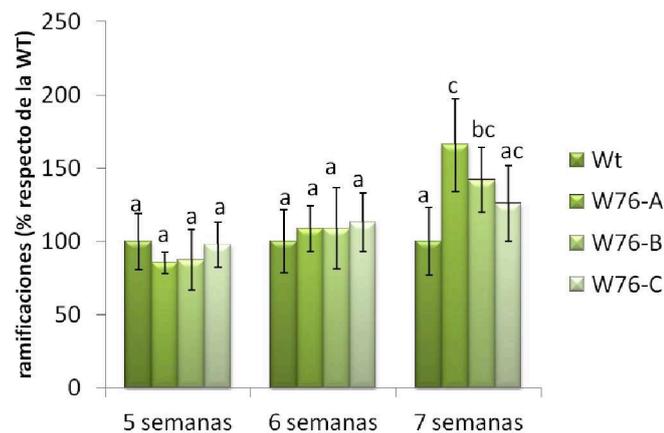


Figura 18: Las plantas HaWRKY76 presentarían más ramificaciones al final del ciclo de vida. Se contaron el número de tallos primarios y secundarios. No se incluyeron como ramificaciones a las vainas. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

El hecho de que las plantas HaWRKY76 generaran mayor biomasa aérea sirvió para plantear si estas plantas mostrarían esta diferencia a lo largo de su desarrollo o alguna otra característica que pudiera asociarse con el fenotipo de mayor producción, como distinto contenido de clorofila o de proteínas totales.

El análisis que se muestra en la Figura 19 indicó que, en las plantas HaWRKY76, la concentración de proteínas es mayor que la de las plantas salvajes de 29 días de edad

mientras que la biomasa de la roseta es similar en ambos genotipos durante el desarrollo para diferenciarse en las transgénicas a los 35 días. Por otra parte, el contenido de clorofila por unidad de peso no difirió entre las plantas transgénicas y las salvajes (resultados no presentados).

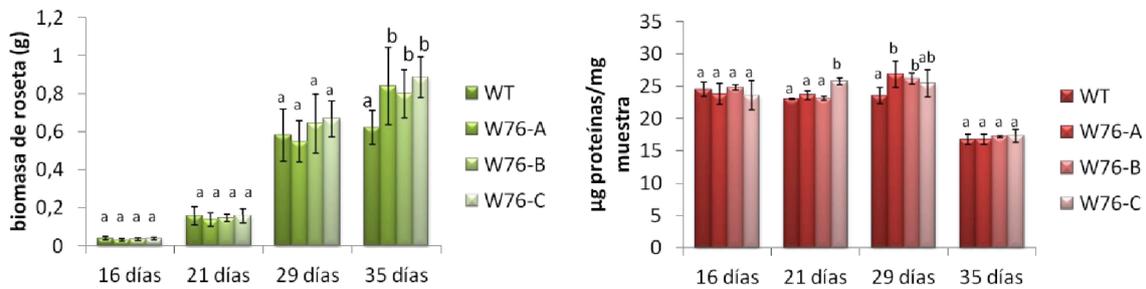


Figura 19: Las plantas HaWRKY76 desarrollan más biomasa hacia el final de su ciclo de vida y presentan una variación en el contenido de proteínas en su desarrollo. Las plantas crecieron en condiciones normales y las muestras se tomaron en los momentos que se indican en las figuras. Izquierda: cinética del peso de la biomasa de la roseta. Derecha: determinación de la concentración de proteínas en la roseta a lo largo del tiempo. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

A continuación nos preguntamos cómo sería la tasa de fotosíntesis de estas plantas y la partición de sus carbohidratos respecto a las de las plantas salvajes.

En condiciones normales de crecimiento las plantas HaWRKY76 presentaron igual contenido de glucosa y almidón, pero mayor contenido de sacarosa que las plantas salvajes (Figura 20). La medición de diferentes parámetros fotosintéticos utilizando como herramienta el equipo LI-6400XT² no arrojó resultados que indiquen diferencias significativas entre las líneas de HaWRKY76 y las plantas utilizadas como controles. Tampoco se observaron diferencias en la morfología de los tallos ni en el contenido proteico de las semillas de los distintos genotipos (resultados no presentados).

² LI-6400XT es un sistema de medición de fotosíntesis portable que se vale de la diferencia del flujo de CO₂ y agua en la hoja para calcular diferentes parámetros como fotosíntesis neta, transpiración y conductividad de CO₂

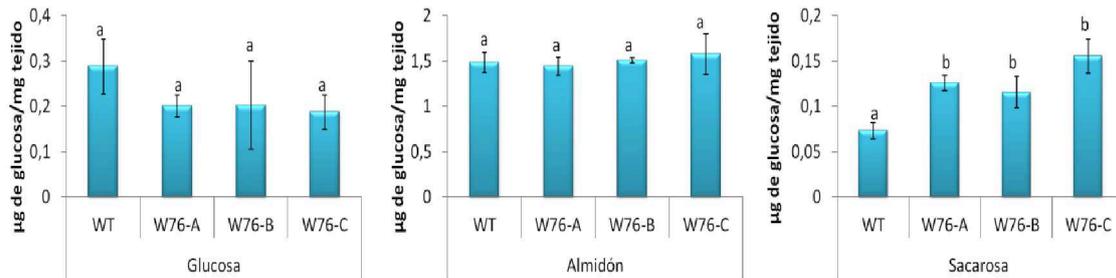


Figura 20: Las plantas HaWRKY76 tienen mayor contenido de sacarosa que sus pares salvajes a las 4 semanas de vida. Se midieron carbohidratos solubles e insolubles de plantas de tres semanas como se describe en M&M. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

IV – Las plantas HaWRKY76 toleran mejor que sus pares salvajes el estrés por exceso y defecto de agua

IV.1 – El fenotipo diferencial en estrés hídrico

Teniendo en cuenta el aumento de expresión de HaWRKY76 en estrés hídrico en plántulas de girasol de cinco días y plantas de trece días de edad (Figuras 8 a 10), se decidió investigar el comportamiento de las plantas transgénicas de Arabidopsis en condiciones de estrés semejantes.

Se realizaron ensayos en los que se aplicó estrés hídrico severo por falta de riego a plantas en estadio vegetativo o reproductivo. Cuando las plantas mostraron un deterioro grave visible por la falta de turgencia e inicio de necrosis, se irrigaron nuevamente y se contabilizaron las sobrevivientes una semana después del regado.

Durante todo el transcurso y al final del tratamiento fue notoria a simple vista la mayor tolerancia de las plantas HaWRKY76 (Figura 21).

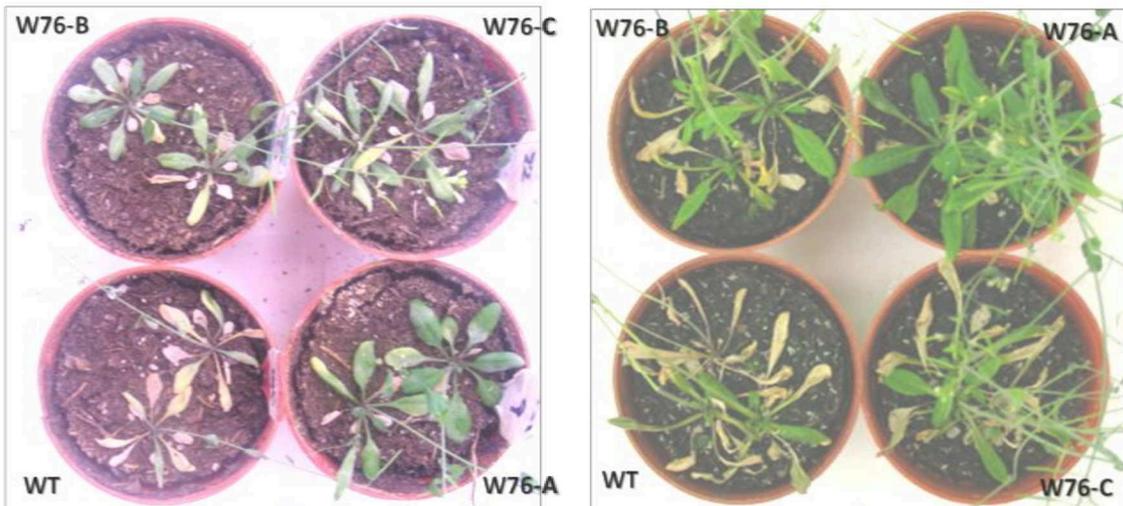


Figura 21: Las plantas HaWRKY76 son más tolerantes a estrés hídrico severo que las salvajes en los estadios vegetativo y reproductivo. Plantas sometidas a estrés hídrico severo en estadio vegetativo (izquierda) y reproductivo (derecha). Se muestran fotografías representativas de los distintos genotipos.

Las plantas sometidas a estrés hídrico severo sufren senescencia foliar anticipada y daño celular por estrés oxidativo (Munné-Bosch y Alegre, 2004; Osakabe y col., 2014; Tardieu, 1996). Con el fin de caracterizar más detalladamente la respuesta de las plantas frente a estrés hídrico severo, se realizaron medidas del contenido de clorofila y de la conductividad en hojas de plantas sometidas a este tipo de estrés durante el estadio reproductivo. La medida de clorofila permite cuantificar el estado de clorosis de las plantas y la conductividad relativa de las hojas es una manera de determinar el nivel de daño causado en las láminas por el estrés.

Como se observa en la Figura 22, las plantas HaWRKY76 contenían entre 40 y 80 % más de clorofila que las plantas salvajes a los 8 días de iniciado el estrés hídrico severo. En igual sentido, sus hojas presentan entre 45 y 86 % menos conductividad relativa que las hojas de plantas salvajes, tanto siete como ocho días más tarde de iniciado el tratamiento. Estos datos en conjunto indicarían que las plantas HaWRKY76 sufren menos el estrés por falta de agua que las salvajes.

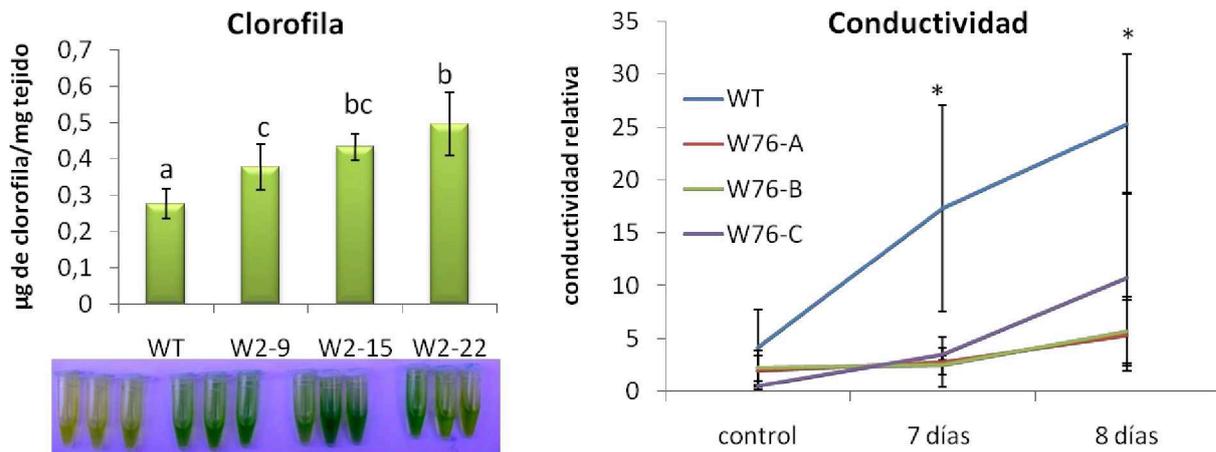


Figura 22: Las plantas HaWRKY76 tienen mayor contenido de clorofila y mayor estabilidad de membranas después de sufrir estrés hídrico severo. Las plantas de 28 días se sometieron a estrés hídrico severo como se detalla en M&M. Izquierda: contenido de clorofila en hojas de roseta de plantas en estadio reproductivo sometidas a estrés hídrico severo durante 8 días, abajo se muestra una fotografía ilustrativa de la extracción del pigmento. Derecha: conductividad relativa al inicio del tratamiento de hojas de plantas en estadio reproductivo sometidas a estrés hídrico severo. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras y las estrellas representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

En la introducción del presente Capítulo se mencionó que el estrés hídrico severo no es la situación más frecuente a campo (Tardieu, 2011). Con el objeto de evaluar las plantas transgénicas en una situación de estrés hídrico moderado se midió la productividad de las plantas después de sufrir este tipo de estrés. Este parámetro es muy importante ya que si las plantas son más tolerantes a expensas de su producción, en un sentido estrictamente agronómico no serían atractivas.

En la Figura 23 se observa que tanto transgénicas como salvajes sufrieron una pérdida muy importante de la productividad por el estrés aplicado respecto de la productividad medida en condiciones estándar (Figura 17). Además, las plantas que fueron sometidas a estrés en estadio vegetativo se vieron más afectadas que aquellas que sufrieron este estrés en el estadio reproductivo. En estadio vegetativo, en comparación con los controles, las plantas HaWRKY76 sometidas a estrés hídrico moderado produjeron un poco más de semillas después de sufrir el mismo tratamiento. Cuando el estrés fue aplicado en estadio reproductivo, salvajes y transgénicas presentaron una producción similar (Figura 23).

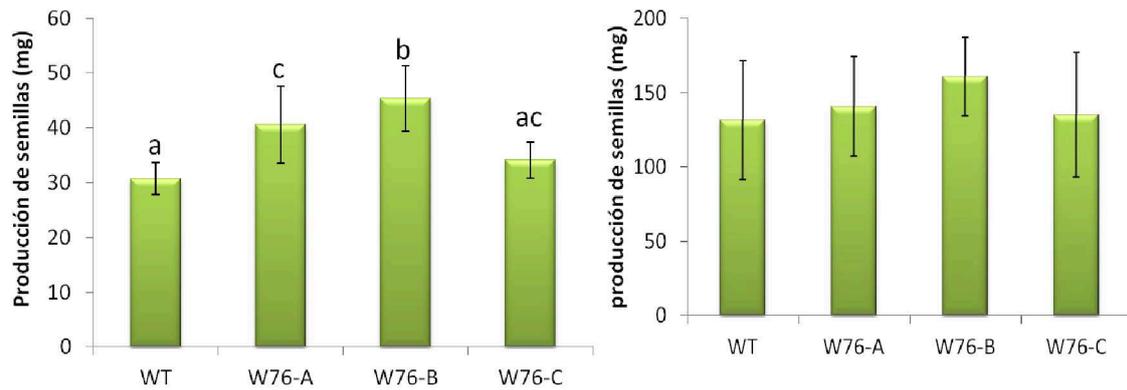


Figura 23: Las plantas HaWRKY76 toleran estrés hídrico sin penalidad en su productividad respecto de las salvajes. Una planta por maceta fue crecida en estrés hídrico moderado durante todo el resto de su ciclo de vida una vez iniciado el estrés, como se describe en M&M. En el momento en el que las primeras plantas maduraron sus vainas, se cosecharon las vainas de todas las plantas. Izquierda: el estrés se inició cuando las plantas se encontraban en estadio vegetativo. Derecha: el estrés se inició cuando las plantas se encontraban en estadio reproductivo. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las estrellas representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Para caracterizar mejor el comportamiento en estrés hídrico moderado de las plantas HaWRKY76, se hizo un ensayo en el que el estrés fue aplicado una vez iniciado el estadio reproductivo. Elegimos este estadio, dado que es durante este estadio cuando la planta consume más agua para el llenado de granos y por ende, puede afectar más el rendimiento de la misma. Las variables medidas en este ensayo fueron el contenido de clorofila y la conductividad de las hojas en roseta (como medidas del estado del clorénquima), y el consumo de agua de las plantas (como medida de la utilización del recurso agua).

En general, las plantas HaWRKY76 mostraron mejor respuesta que las plantas salvajes en las diferentes características evaluadas: presentaron mayor contenido de clorofila en etapas finales del estrés, menor daño celular (Figura 24) y consumieron menos cantidad de agua (Figura 25).

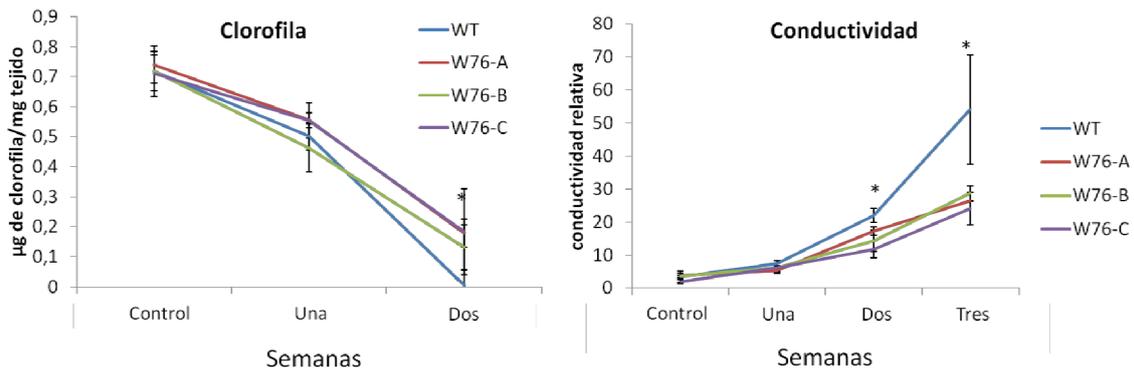


Figura 24: Las plantas HaWRKY76 tienen mayor contenido de clorofila y sufren menor daño celular en estrés hídrico moderado. Las plantas de 25 días (control) se sometieron a estrés hídrico moderado como se detalla en M&M y las muestras de hojas de roseta se tomaron en los puntos que indican las figuras. Izquierda: contenido de clorofila. Derecha: conductividad relativa al inicio del tratamiento. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las estrellas representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

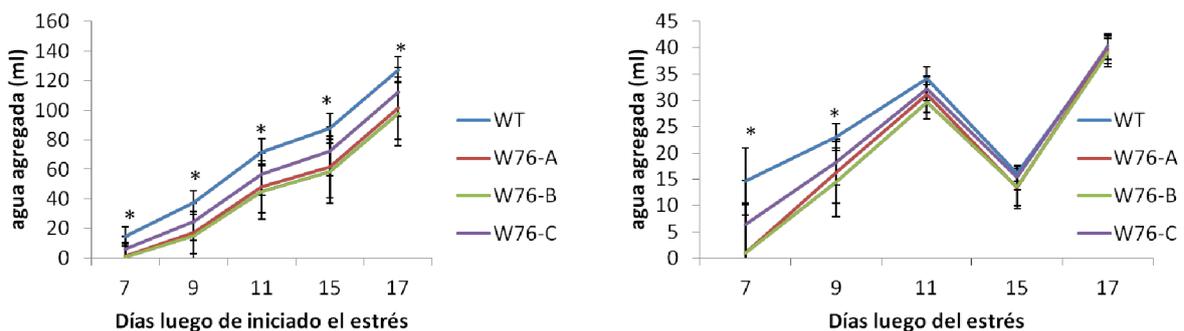


Figura 25: Las plantas HaWRKY76 consumen menos agua que sus pares salvajes cuando son sometidas a estrés hídrico moderado. Se trataron plantas en estadio reproductivo como se indica en M&M. Las medidas se tomaron en los tiempos que se indican en las figuras. Izquierda: suma acumulada del agua agregada a las macetas de los distintos genotipos a lo largo de todo el tratamiento. Derecha: cantidad de agua agregada en cada punto. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las estrellas y las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

El uso del agua se evaluó también en plantas crecidas en condiciones estándar y sometidas a estrés hídrico leve³. La evaluación se hizo por pérdida de agua de las hojas escindidas a lo largo del tiempo, como se describe en M&M. Tanto en condiciones control como de estrés, las hojas de las plantas HaWRKY76 perdieron menos agua que las salvajes una vez escindidas, como se puede notar en la Figura 26. Además, la tasa de pérdida de agua se vio afectada por el estado en el que se encontraban las plantas al inicio del ensayo. Las hojas de las plantas HaWRKY76 sometidas previamente a estrés hídrico leve se diferenciaron de las salvajes a los 40 minutos aproximadamente, mientras que las hojas de plantas crecidas en condiciones control recién se distinguieron de las salvajes a los 280 minutos.

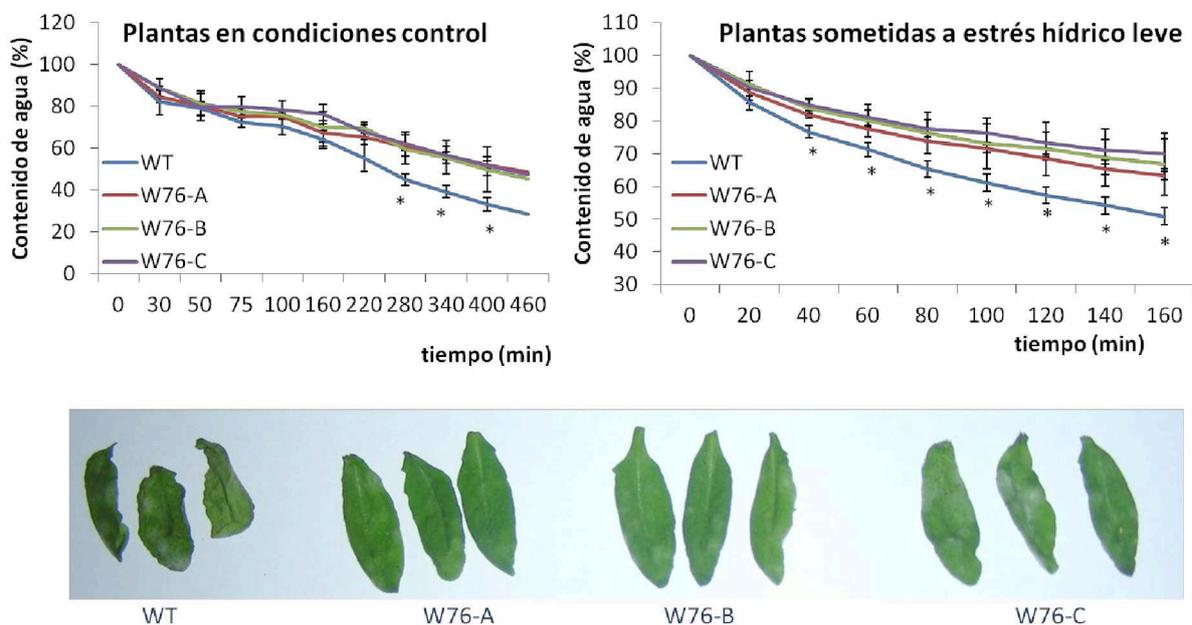


Figura 26: Las hojas escindidas de las plantas HaWRKY76 pierden menos agua que sus controles. Ensayos de pérdida de agua de hojas escindidas de plantas que crecieron durante cuatro semanas en condiciones control (izquierda) y que fueron expuestas a un estrés hídrico leve antes de comenzar el tratamiento (derecha). Las mediciones se realizaron en los tiempos indicados en las figuras. Abajo: fotografías ilustrativas de las hojas de los distintos genotipos de plantas sometidas a estrés previo a los 160 minutos de tratamiento. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las estrellas representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

³ Se utilizó como herramienta estrés hídrico leve dado que de haber utilizado estrés de tipo moderado la mayoría de los estomas estarían cerrados desde el principio del ensayo.

IV.II – Las vías moleculares en las que podría estar involucrado HaWRKY76 en estrés hídrico

Con el fin de dilucidar las vías moleculares que están implicadas en el fenotipo de las plantas HaWRKY76 se realizaron ensayos de expresión génica. Se cuantificó la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y respuesta a la hormona ABA. El ABA se induce 50 veces tras la exposición de las plantas al estrés hídrico y es la hormona que regula el cierre estomático, un proceso que estaría afectado en las plantas HaWRKY76 y podría ser un mecanismo fundamental en la respuesta de adaptación de estas plantas.

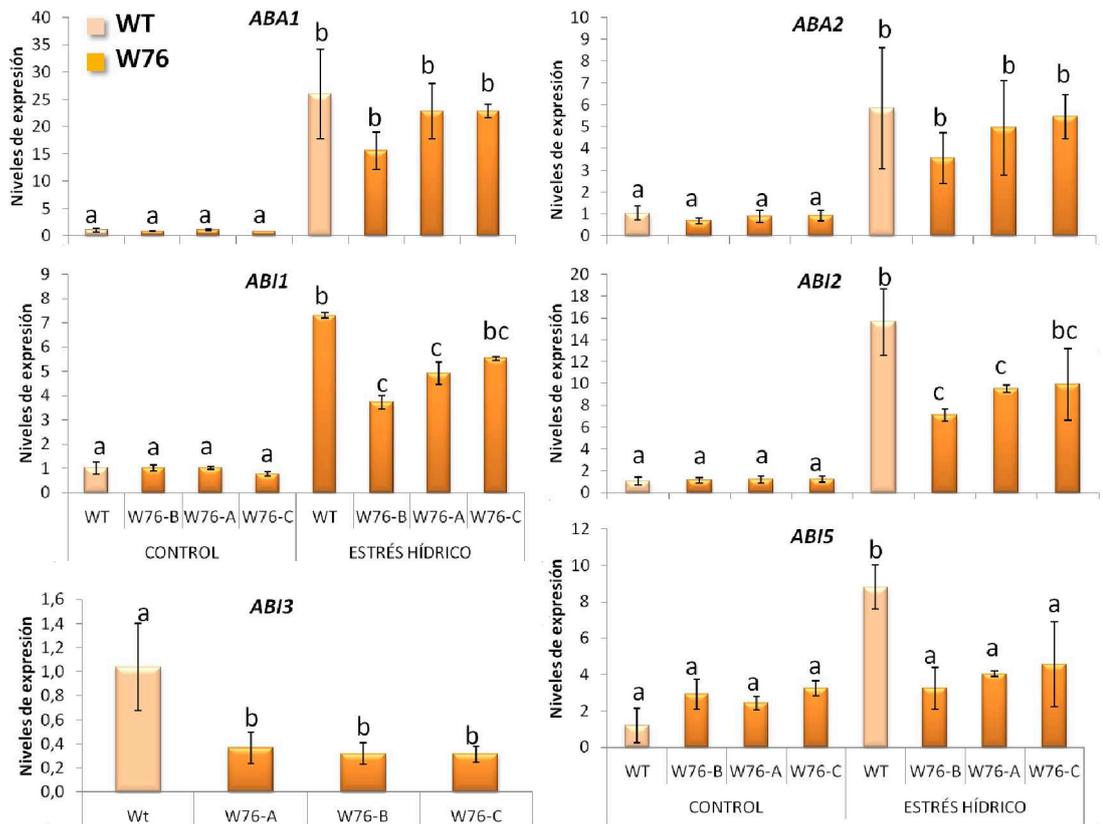
Para esta evaluación molecular se eligieron genes involucrados en la biosíntesis de ABA (*ABA1* y *ABA2*), en la señalización mediada por ABA (*ABI1*, *ABI2*, *ABI3* y *ABI5*), en la respuesta dependiente de ABA (*RD29A*, *RD29B*, *EM6*, *RAB18* y *ADH1*), en la independiente de ABA (*COR15A* y *COR47*) e inducidos en ambas vías (*RD29A* y *RAB18*).

Tanto *AtABA1* como *AtABA2* se expresan en forma ubicua en las plantas y están involucrados en la biosíntesis de ABA, en plástidos y en citosol respectivamente (Cheng y col., 2002; González-Guzmán y col., 2002; Rook y col., 2001; Wasilewska y col., 2008). *AtABI1* y *AtABI2* son reguladores negativos de la respuesta al ABA (Raghavendra y col., 2010), mientras que *AtABI3* y *AtABI5* son factores de transcripción de la familia B3 y b-Zip que regulan de manera positiva la respuesta al ABA (Finkelstein y col., 2002; Finkelstein y Lynch, 2000). Los genes involucrados en la vía de señalización dependiente de ABA (que incluyen a *RD29A*, *RD29B*, *EM6*, *RAB18* y *ADH1*) están regulados por *ABI5*, que reconoce y une los elementos ABRE presentes en sus promotores (Carles y col., 2002; Hirayama y Shinozaki, 2007).

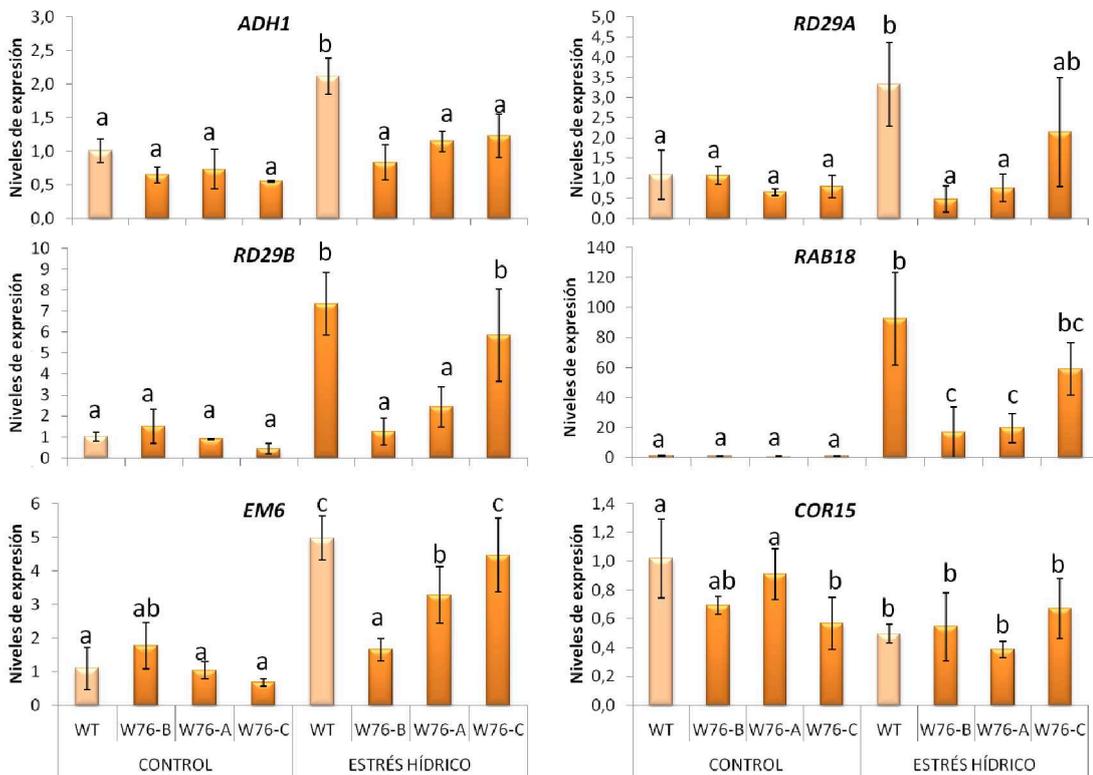
Como se observa en la Figura 27, la expresión de los genes de biosíntesis de ABA fue inducida por el estrés hídrico, lo cual está de acuerdo con la literatura en la que se informa que la biosíntesis de ABA aumenta a raíz el estrés. Independientemente del genotipo, los niveles de *ABA1* y de *ABA2* se incrementaron entre 6 y 25 veces cuando las plantas pasaron de condiciones control a sequía. Sin embargo, no hubo diferencias en los niveles de expresión de los genes entre las plantas HaWRKY76 y sus controles, lo que sugiere que no difieren en la cantidad producida de esta hormona.

Respecto a los mediadores de sus vías de señalización, *ABI1*, *ABI2* y *ABI5* están inducidos por el estrés en todas las plantas. Sin embargo, los niveles de expresión de *ABI1* y *ABI2* en las transgénicas en condiciones de estrés son alrededor de la mitad de los niveles medidos en las salvajes. Esto indicaría que la represión en la señalización de ABA mediada por *ABI1* y *ABI2* es menor en las plantas HaWRKY76 que en sus controles. *ABI3* y *ABI5* también están reprimidos en las plantas transgénicas en condiciones de estrés respecto de las salvajes, en concordancia con los niveles de *RD29A*, *RD29B*, *RAB18*, *EM6* y *ADH1*. Por su parte, los niveles de expresión de *COR15A*, de la vía independiente de ABA no presentaron diferencias entre los distintos genotipos en estrés hídrico. *COR47* tampoco varía entre los distintos genotipos (resultados no presentados).

SEÑALIZACIÓN DE ABA



VÍA DE RESPUESTA A ABA



IV.III – Estrés por exceso de agua

Como se mencionó en la Introducción del presente Capítulo, los mayores niveles de carbohidratos al inicio del estrés por anoxia, como el que ocurre durante las inundaciones, se correlacionan con mayor tolerancia a este estrés (Ram y col., 2002). Las plantas sufren de deshidratación inmediatamente luego del período de anoxia/hipoxia y para sobrevivir, tienen que superar la deshidratación que sufren a continuación. De los resultados mostrados hasta ahora, varios indicaron que las plantas HaWRKY76 podrían presentar tolerancia al anegamiento o inundación. Estas plantas contienen más sacarosa en condiciones de crecimiento normales (Figura 20), son más tolerantes al estrés hídrico que sus pares salvajes y la expresión endógena de *HaWRKY76* aumenta notablemente en hojas de plantas de girasol luego de una hora de recuperación tras un estrés por inundación de 11 días (Figura 11).

Para corroborar la hipótesis planteada, se decidió evaluar el desempeño de las plantas transgénicas frente al estrés por exceso de agua y durante la etapa de recuperación. Se evaluaron condiciones de inundación total de las plantas, inundación parcial y anegamiento.

Figura 27: Las plantas HaWRKY76 tienen reprimidos *ABI1* y *ABI2* y la vía de respuesta a ABA dependiente de ABA. Se midieron los niveles de transcritos de plantas de 28 días en condiciones control y sometidas a estrés hídrico moderado durante 10 días por RT-qPCR. Se tomó el genotipo WT en condiciones control y se le asignó el valor 1 de forma arbitraria. Se trabajó con hojas de roseta y las muestras en condiciones control se tomaron en plantas de cuatro semanas al inicio del tratamiento y las de estrés hídrico cuando se observó una notable pérdida de turgencia en las hojas. *ABA1*, *ABA2*, *ABI1*, *ABI2*, *ABI5*, *ADH*, *RD29A*, *RD29B*, *RAB18* y *COR15A* se midieron en condiciones control y de estrés hídrico. *ABI3* solo fue detectable en estrés hídrico. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

IV.III.1 – Inundación de la planta completa

Los primeros ensayos se hicieron sumergiendo las plantas durante 5 y 6 días para luego observar a nivel macroscópico el fenotipo desarrollado en estas condiciones. Como se observa en la Figura 36, las plantas HaWRKY76 serían más tolerantes que las salvajes a este tipo de estrés, dado que se ven menos afectadas que las salvajes luego de recuperarse durante una semana.

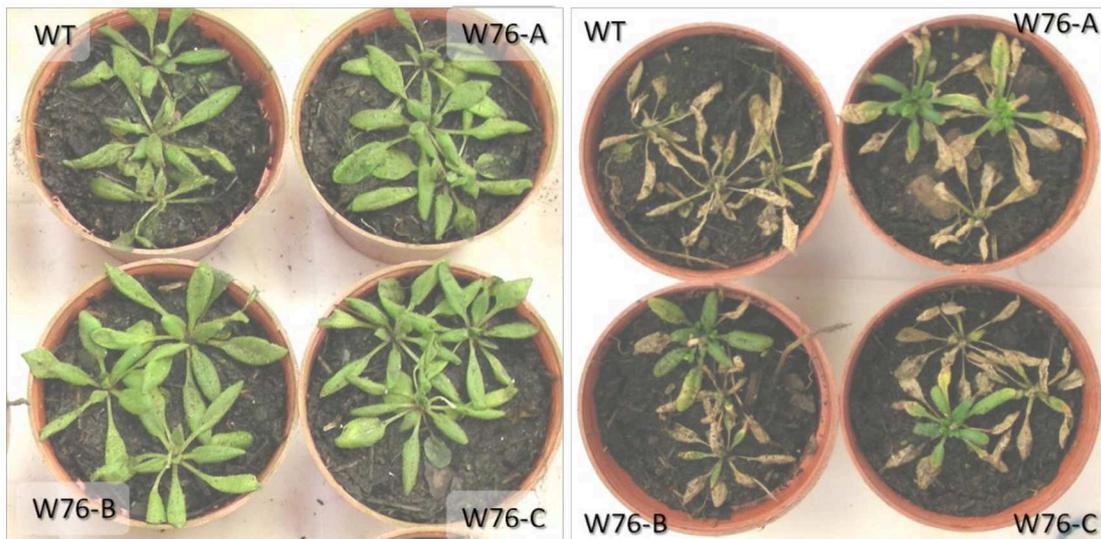


Figura 28: Las plantas HaWRKY76 son más tolerantes a estrés por inundación que sus pares salvajes. Plantas en estadio reproductivo sometidas a estrés por inundación. El ensayo se realizó como se describe en M&M. Izquierda: fotografía ilustrativa de la apariencia de las plantas inmediatamente después de quitar el exceso de agua luego de 5 días de inundación. Derecha: fotografía representativa de la apariencia de las plantas pertenecientes a cada genotipo una semana luego de que el estrés por exceso de agua finaliza.

Como mencionamos anteriormente, las plantas responden de dos maneras diferentes frente al estrés por inundación. Pueden escapar del estrés o disminuir a niveles basales su actividad metabólica.

Las plantas de *Arabidopsis* de tipo salvaje responden al estrés por inundación con diferentes niveles de tolerancia mediante el mecanismo de quiescencia (Vashisht y col., 2011). Para determinar qué mecanismo de tolerancia despliegan las plantas HaWRKY76 evaluamos distintos parámetros de crecimiento como peso de la roseta, contenido de clorofila de la misma y longitud del tallo.

Las plantas HaWRKY76 no crecieron de manera diferencial respecto de las salvajes. Tampoco presentaron diferencias en la biomasa que desarrollaron, en el contenido de clorofila o en la longitud del tallo principal (Figura 29). Este comportamiento se ajusta al mecanismo de tolerancia observado en plantas salvajes de Arabidopsis.

Dado el aumento de tolerancia observado en las plantas transgénicas respecto de sus controles, era de esperarse que sus tejidos estén más preservados del estrés oxidativo generado durante el tratamiento así como sus fuentes de carbono. Para analizar estos aspectos, se realizaron ensayos de determinación del nivel de daño sufrido por estrés oxidativo y del contenido y consumo de carbohidratos.

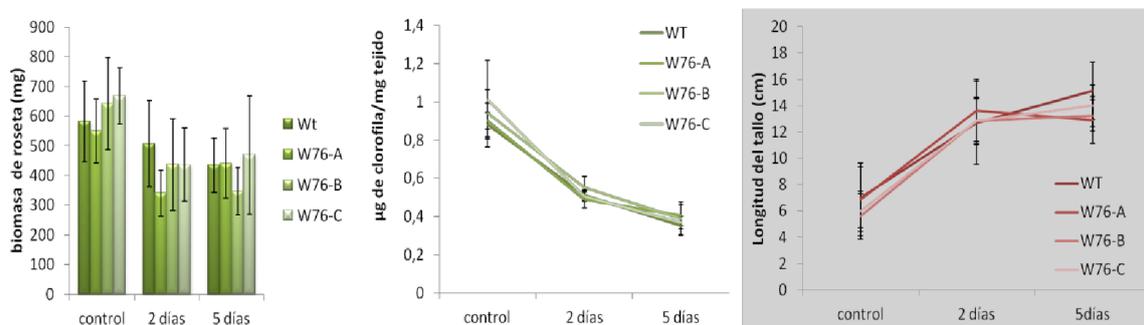


Figura 29: En condiciones de inundación total las plantas HaWRKY76 no presentan diferencias en su crecimiento comparadas con las salvajes. Las plantas en estadio reproductivo se sometieron a estrés por inundación total. Las medidas se realizaron en los tiempos que se indican en las figuras por cuadruplicado biológico. Izquierda: biomasa de la roseta completa. Centro: contenido de clorofila de las hojas en roseta. Derecha: longitud del tallo principal. Las barras de error corresponden a desviaciones estándar de cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*.

Las plantas HaWRKY76 mostraron un menor contenido de superóxido a los 5 días de estar sumergidas (Figura 30). Este contenido de EROs, 30 % menor al de las plantas salvajes, indicaría un menor daño por el estrés oxidativo en las plantas HaWRKY76.



Figura 30: Las rosetas de las plantas HaWRKY76 tienen menor contenido de superóxido que las rosetas de las plantas salvajes. Izquierda: figura ilustrativa del ensayo de inhibición de la reducción del NBT de plantas estresadas durante 5 días. Derecha: medida de densitometría proveniente de las hojas teñidas con NBT. Las barras de error corresponden a 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 $p < 0,05$.

Por otro lado, las cuantificaciones de carbohidratos plasmadas en la Figura 31 muestran que las plantas HaWRKY76 consumieron este recurso de forma racionalizada, comparadas con las salvajes. En el caso de la glucosa, las plantas HaWRKY76 tenían al comienzo del ensayo la misma concentración que las salvajes y durante el estrés consumieron menos cantidad de este carbohidrato: mientras que las plantas salvajes a lo largo del estrés consumieron el 90 % de la glucosa con la que contaban al inicio del tratamiento, las transgénicas consumieron en promedio el 80%. Respecto a la sacarosa, las plantas HaWRKY76 contaban con mayor contenido cuando comenzó el tratamiento estresante y lo consumieron en mayor medida al comienzo del mismo (control-2 días). Tanto las plantas salvajes como las transgénicas no mostraron una gran variación en el consumo de sacarosa entre los dos y los cinco días, lo que se condice con la estrategia de quiescencia adoptada por *Arabidopsis*. En cuanto al almidón, todas las plantas al inicio del tratamiento presentaron la misma cantidad y lo consumieron de la misma forma desde el inicio del tratamiento; sin embargo, al quinto día del tratamiento estresante, las plantas transgénicas tenían levemente más almidón que las salvajes. Vale destacar que las plantas no presentaron niveles diferenciales de las salvajes en cuanto al contenido proteico y a la concentración de clorofila a lo largo del estrés (resultados no mostrados).

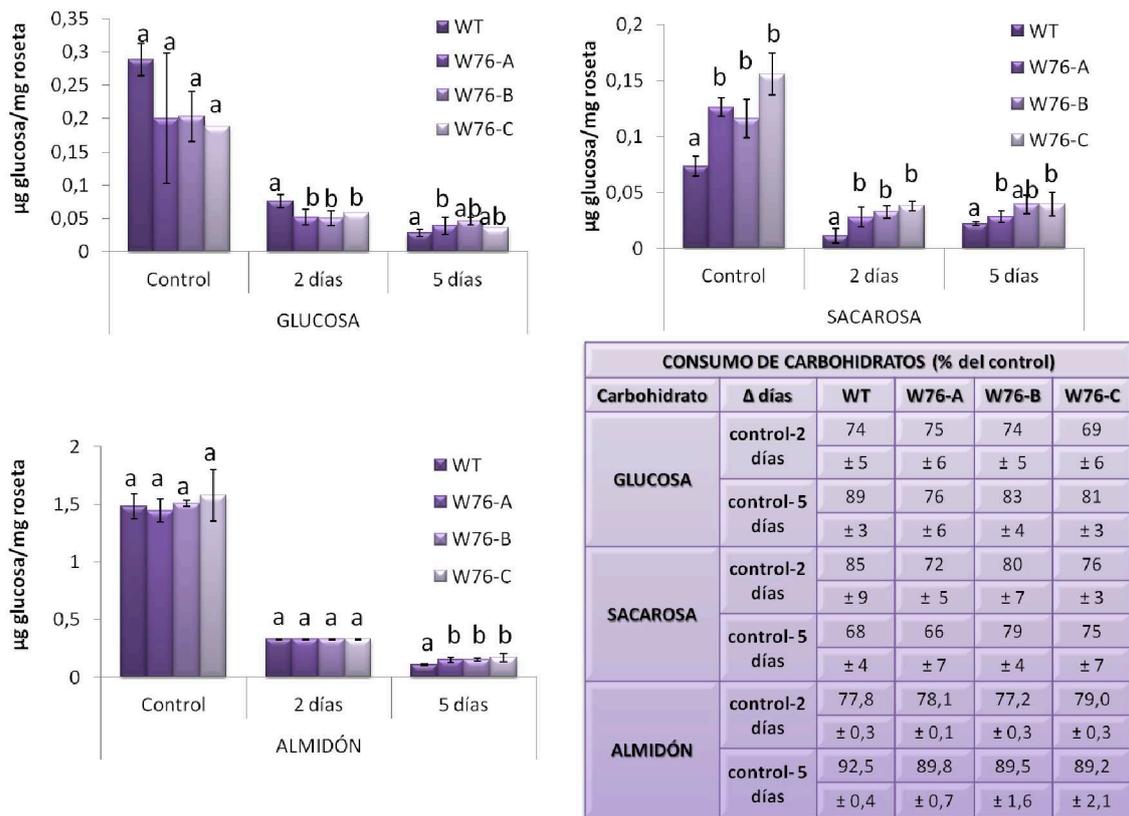


Figura 31: Las plantas HaWRKY76 presentan un consumo racional de los recursos energéticos de sus hojas de roseta cuando son sometidas a inundación total. Las plantas fueron sometidas a inundación como se indica en M&M. Las muestras de hojas de roseta se tomaron en los tiempos que se indican en la figura. Izquierda, arriba: contenido de glucosa. Derecha, arriba: contenido de sacarosa. Izquierda, abajo: contenido de almidón. Derecha, abajo: tabla que indica el consumo promedio de los diferentes carbohidratos a lo largo del tratamiento. Las barras de error corresponden a 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 $p < 0,05$.

Dado que el tallo es el órgano más cercano a la superficie y el encargado del transporte de fotosintatos, se decidió determinar el contenido de azúcares solubles en el mismo. En la Figura 32 se puede observar que no hay un comportamiento diferencial marcado a lo largo del tiempo en inundación de las plantas HaWRKY76 respecto de las salvajes.

Para comprender el mecanismo del consumo diferencial de carbohidratos de las plantas HaWRKY76, se realizaron ensayos de expresión génica. Se midió la expresión de genes que codifican enzimas clave en el metabolismo de hidratos de carbono en hipoxia/anoxia que se produce por una o más vías fermentativas, principalmente la etanólica o la aminoácida, que juntamente con la láctica forman las tres vías descritas. Se cuantificaron los niveles de transcritos de *SUS1* y *SUS4*, que codifican

enzimas que catalizan la ruptura de la molécula de sacarosa. Además se midió la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la fermentación de piruvato por la vía etanólica como piruvato decarboxilasa 1 y 2, alcohol deshidrogenasa-1 (*PDC1*; *PDC2* y *ADH1*) y de los genes que codifican la alanina amino transferasa y la aspartato amino transferasa-2 (*AAT1* y *ASP2*), enzimas claves en la fermentación aminoacídica, una de las vías de fermentación alternativa a la etanólica (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

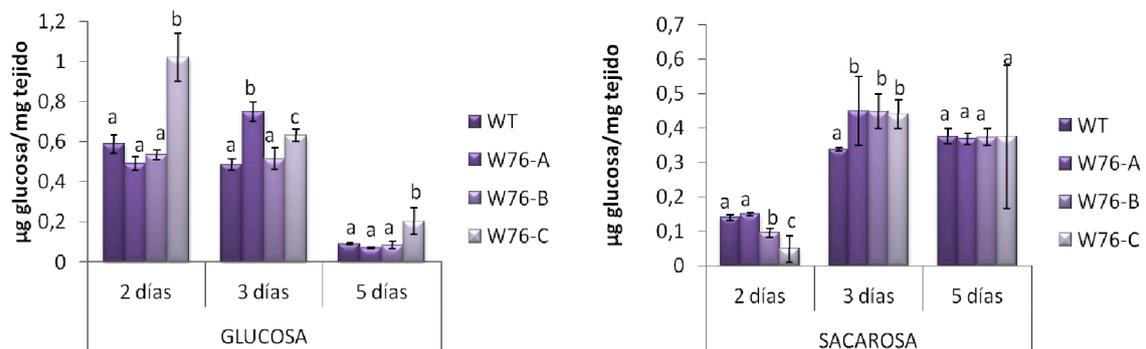


Figura 32: Las plantas HaWRKY76 no muestran un comportamiento diferencial de las plantas salvajes respecto a los contenidos de carbohidratos solubles en tallos al final del estrés. Las plantas fueron sometidas a inundación total como se indica en M&M. Las muestras de tallos se tomaron en los tiempos que se indican en las figuras. Izquierda: contenido de glucosa. Derecha: contenido de sacarosa. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$.

En general, el metabolismo de hidratos de carbono en plantas sometidas a inundación está reprimido (Figura 33). Los niveles de los transcriptos de las enzimas *SUS1*, *SUS4*, *PDC1* y *ADH1* están reprimidos en todas las plantas sometidas a estrés por exceso de agua. Por otro lado, los niveles de transcriptos de las enzimas *PDC2* y *ASP2*, no se vieron afectados por el estrés.

Además, las plantas transgénicas mostraron menores niveles de transcriptos de *SUS1* y *ADH1* respecto de las salvajes y no se observaron diferencias en el resto de los transcriptos que se midieron en este ensayo. Esto indicaría que, durante el estrés, se utilizó menos sacarosa en las plantas HaWRKY76 respecto de las salvajes, con lo cual se produciría menos piruvato. En concordancia con esto *ADH1* también se encontró

reprimida, lo que tiene sentido dado que, al haber menor cantidad de piruvato (por la menor degradación de sacarosa), la enzima ADH1 tendría menos sustrato para actuar (Figura 33).

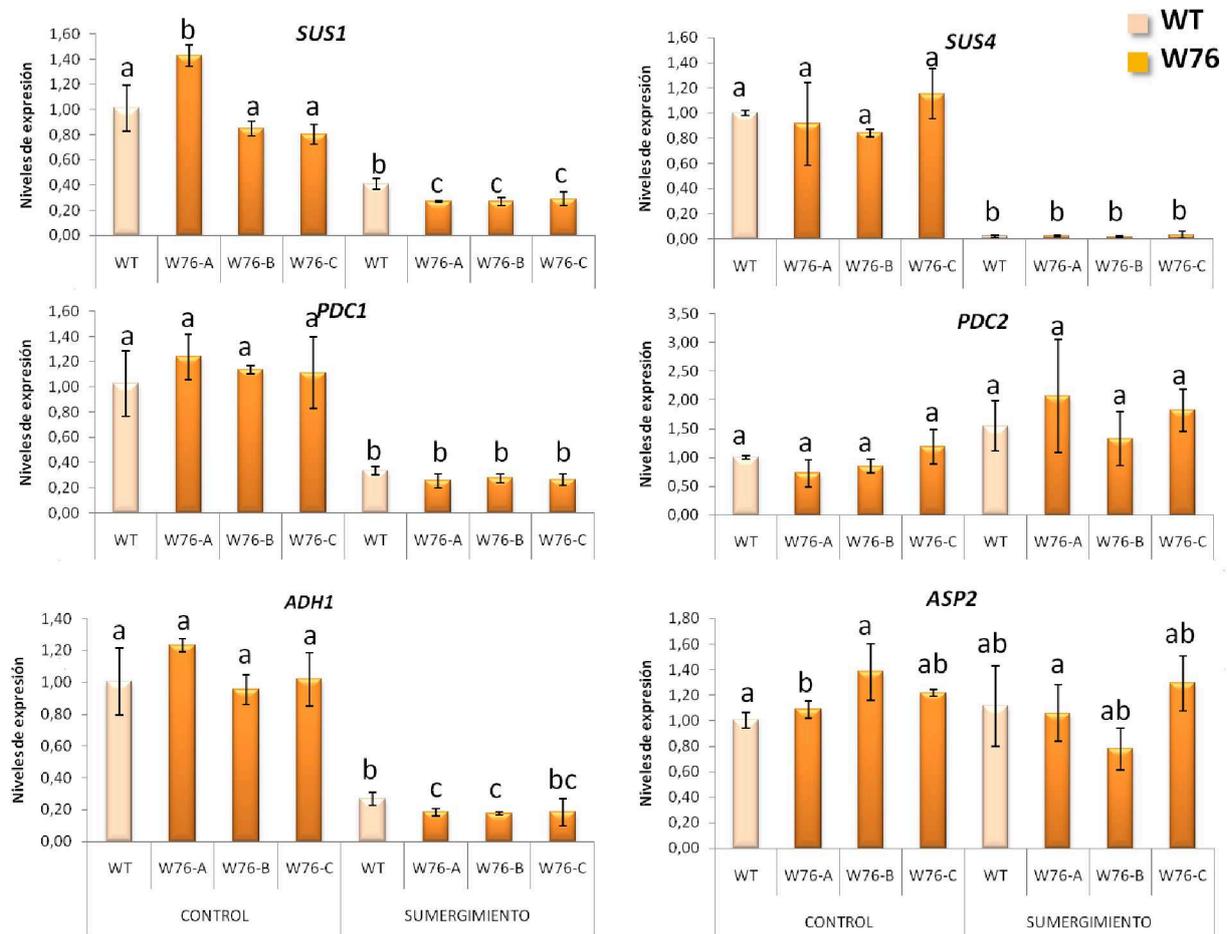


Figura 33: Las plantas HaWRKY76 sumergidas por tres días presentan reprimidos en comparación con las salvajes varios genes que codifican enzimas involucradas en el consumo de azúcares. Niveles de transcritos de genes que codifican enzimas involucradas en el consumo de carbohidratos en plantas crecidas en condiciones control y sumergidas por tres días. En la parte inferior de cada gráfico se encuentra el nombre abreviado del gen y la condición en la que se midió su expresión. Los niveles de expresión se midieron por RT-qPCR. Se tomó el genotipo WT en condiciones control y se le asignó el valor de 1 arbitrariamente. Las barras de error corresponden a desviaciones 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 $p < 0,05$. Abreviaturas: *SUS1* (Sacarosa sintasa 1); *SUS4* (Sacarosa sintasa 4); *PDC1* (Piruvato DeCarboxilasa 1); *PDC2* (Piruvato DeCarboxilasa 2); *ADH1* (Alcohol DesHidrogenasa 1); *ASP2* (ASPartato aminotranferasa 2).

IV.III.II – Recuperación del estrés por inundación total

Para comprender las características del mecanismo de tolerancia en esta fase, en la que la planta debe retomar su crecimiento y tolerar la deshidratación, se midieron las cantidades de distintos carbohidratos, se determinó la pérdida de agua de las hojas y el porcentaje de estomas abiertos. Las mediciones se hicieron un día luego de retirar a la planta del estrés por inundación.

Las plantas pertenecientes a las líneas de alta expresión de HaWRKY76 mostraron una acumulación de sacarosa levemente mayor a la de las plantas salvajes. No se observaron diferencias en el contenido de glucosa y almidón (Figura 34). Además, cuando se midió la respuesta frente a la deshidratación, luego de que se quitó el exceso de agua, se observó que las plantas HaWRKY76 perdieron menos agua que las salvajes. Esto pudo haberse debido, al menos en parte, a que cerraron sus estomas de manera anticipada (Figura 35).

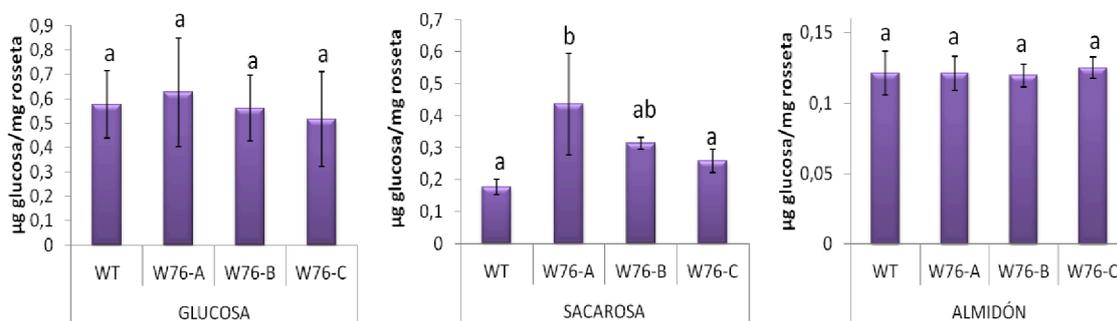


Figura 34: Las plantas HaWRKY76 muestran un leve incremento en sus niveles de carbohidratos en la roseta respecto de las salvajes tras un día de recuperación. Plantas recuperadas durante un día tras un estrés por inundación de cinco días. Se midieron los distintos carbohidratos como se indica en M&M. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de quintuplicados biológicos. Se realizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

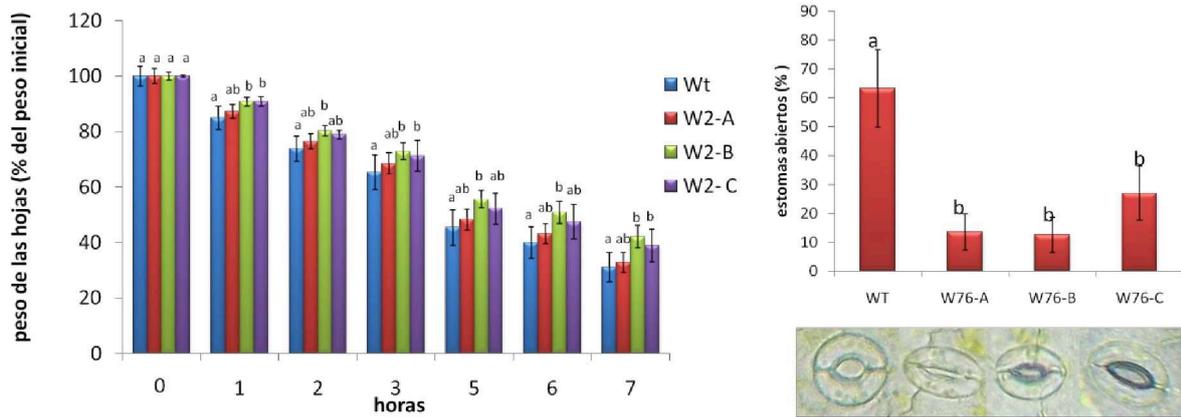


Figura 35: Las hojas de roseta escindidas de las plantas HaWRKY76 pierden menos agua que las de sus pares salvajes durante la recuperación de un estrés de cinco días de inundación. Ensayo de pérdida de agua de hojas de roseta escindidas. Las plantas se mantuvieron sumergidas durante 5 días. Inmediatamente tras quitar el excedente de agua se tomó la muestra inicial. El peso de las hojas en deshidratación se midió en los tiempos indicados en la figura y se refirió al peso inicial. Izquierda: cinética de deshidratación. Derecha, arriba: porcentaje de estomas abiertos a la hora de iniciado el estrés. Derecha, abajo: fotografía representativa de los estomas en el tiempo en que se tomó la medida. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de triplicados/cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguido por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Las características descritas anteriormente tienen incidencia en la recuperación de las plantas. Luego de que transcurre una semana de pasadas a condiciones de crecimiento normal, las plantas transgénicas se visualizan menos afectadas que las salvajes debido a que tienen menor número de hojas senescentes. El hecho de que hayan estado más saludables, luego se vio reflejado en un pequeño incremento en su producción. Mientras que las salvajes produjeron en promedio 144 mg, las transgénicas produjeron 200 mg, que equivale a un 40 % más en promedio. La línea de HaWRKY76 que más produjo en promedio alcanzó valores de 240 mg, que representan un 67 % de incremento en la producción comparado con el de las salvajes (Figura 36).

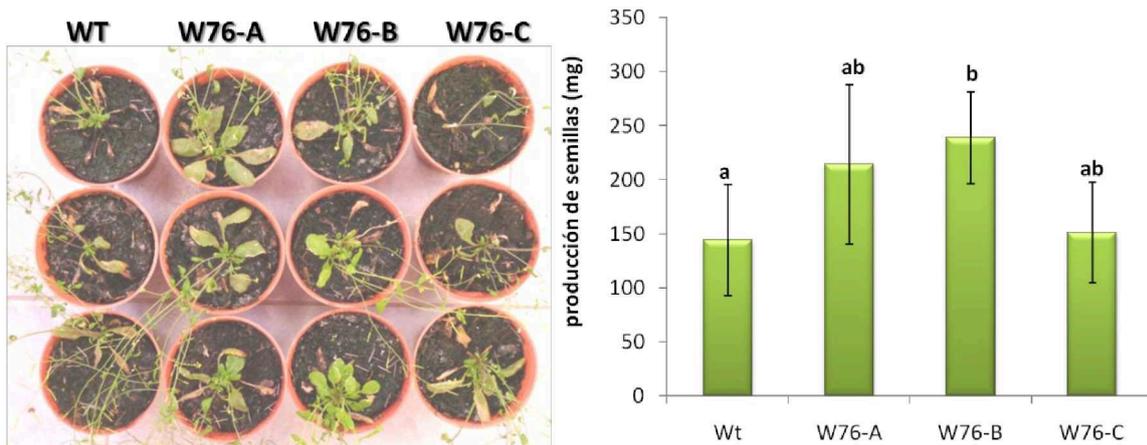


Figura 36: Las plantas HaWRKY76 se recuperan mejor que sus pares salvajes y producen levemente más semillas. Las plantas fueron sometidas a estrés por inundación durante 5 días, luego de ese tiempo se retiró el exceso de agua y se las dejó recuperar. Izquierda: figura ilustrativa de las plantas de los diferentes genotipos después de una semana de recuperación de un estrés por inundación de 5 días. Derecha: medida de la producción de semillas por planta. Las barras de error corresponden a 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 $p < 0,05$.

V.III.III – Anegamiento e inundación parcial

Muchas veces, las plantas que crecen en zonas que sufren estrés por exceso de agua se ven afectadas por anegamiento, que es una situación en las que el agua no supera el nivel del suelo, e inundaciones parciales, que se dan cuando el agua traspasa el nivel del suelo pero no cubre completamente a la planta. En este sentido, nos resultó interesante observar la respuesta de las plantas HaWRKY76 frente al estrés en estas dos condiciones.

Se aplicaron los tratamientos correspondientes y no se observaron diferencias entre transgénicas y salvajes en su aspecto general. Decidimos medir otros parámetros indicativos de la respuesta frente al estrés. Para evaluar si existía un crecimiento diferencial en condiciones de anegamiento, se midió el peso de la roseta y su contenido de proteínas y no se observaron diferencias (resultados no presentados). También se evaluó el daño celular por medio de ensayos de conductividad y se

determinó que las hojas de las plantas HaWRKY76 presentaban menos daño luego de 5 días de anegamiento (Figura 37).

Como se describió anteriormente, una estrategia muy importante para enfrentar el exceso de agua es el desarrollo de aerénquima, que es una estructura que favorece el intercambio gaseoso. Las plantas de *Arabidopsis* son capaces de generar aerénquima de tipo lisogénico. Se realizaron cortes histológicos para observar la morfología de los tallos de las plantas inundadas parcialmente. Las plantas HaWRKY76 fueron capaces de desarrollar entre tres y cinco veces más aerénquima lisogénico que las plantas salvajes en las médulas de sus tallos (Figura 37).

El menor daño celular y el mayor número de aerénquima les darían a las plantas HaWRKY76 una ventaja a la hora de tolerar el estrés. Por este motivo se decidió observar si esta mayor adaptación se veía reflejada en la producción.

Como muestra la Figura 38, las plantas HaWRKY76 produjeron más semillas que las salvajes luego de recuperarse tras estar sometidas a anegamiento. El incremento porcentual promedio de las transgénicas sobre las salvajes fue de alrededor de un 30 %. Mientras que la línea de HaWRKY76 que más produjo en esta condición superó en 50 % a la producción promedio de las salvajes.

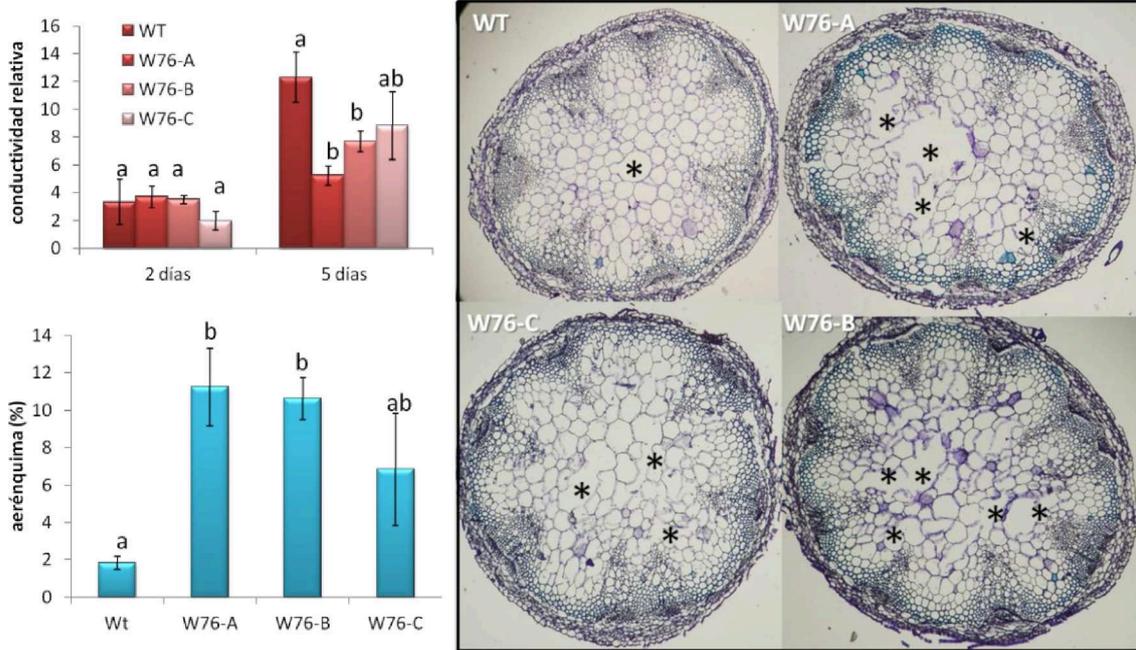


Figura 37: Las plantas HaWRKY76 presentan menor daño celular en anegamiento y mayor desarrollo de aerénquima en inundación parcial que las salvajes. Las plantas se sometieron a estrés por exceso de agua como se describe en M&M para cada ensayo en particular. Izquierda, arriba: Medida de conductividad de hojas de roseta de plantas anegadas durante 2 y 5 días. Izquierda, abajo: Cuantificación del contenido de aerénquima en los tallos de las plantas a los 5 días de iniciado el estrés por inundación. Derecha: fotografías representativas de cortes transversales de tallos de los distintos genotipos a los cinco días de iniciado el estrés. Los asteriscos indican la presencia de aerénquima lisogénica. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

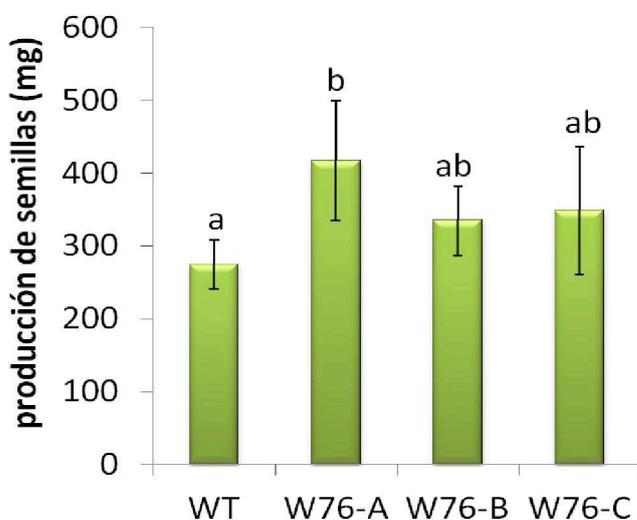


Figura 38: Las plantas HaWRKY76 producen más semillas que las salvajes tras un estrés por anegamiento de 5 días. Producción de plantas que fueron sometidas a estrés por anegamiento durante 5 días. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Uno de los medios a través de los cuales la evolución se abre camino son las mutaciones. Las mutaciones dan origen a gran parte de la variabilidad genética y fenotípica. Subyace en esta variabilidad la capacidad de las plantas a adaptarse a los cambios del ambiente y a tolerar distintos tipos de estrés.

I – El factor de transcripción HaWRKY76 une una secuencia de ADN diferente a la canónica unida por los factores de transcripción WRKY

HaWRKY76 posee dos mutaciones por sustitución en el dominio WRKY, en lugar del motivo **WRKYGQK**, ampliamente descrito y muy conservado, presenta el novedoso motivo **WKYGEK**. A raíz de esto, surgió la hipótesis de que este FT podría unir una secuencia diferente a la secuencia canónica (C/T)TGAC(T/C). Para corroborar este postulado se realizaron ensayos de retardo en geles que indicaron fehacientemente que HaWRKY76 no une la caja W descrita como unida por los FTs de tipo WRKY con preferencia sobre una secuencia al azar (Figura 5), y en consecuencia resultó muy interesante determinar la secuencia de ADN que une este FT. Como se observa en la Figura 6, se mantiene relativamente el *core* TGAC de la caja W canónica, pero la relevancia en la conservación de las bases es diferente respecto a la caja W. Si bien es tentador relajar un análisis a partir de estas ocho secuencias, debemos ser estrictos dado que el SELEX no está terminado. Habría que lograr obtener la proteína recombinante funcional de forma reproducible nuevamente, dado que por algún motivo desconocido en las purificaciones posteriores a la ronda 4 de SELEX, aunque se lograba purificar HaWRKY76, ésta muchas veces no era capaz de unir ADN. A pesar de variados intentos que incluyeron suplementación del medio de cultivo con Zn, diferentes tiempos de inducción e incubación con la columna y formas de conservación una vez purificada la proteína, no se logró lograr nuevamente un protocolo robusto y reproducible para obtener HaWRKY76 funcional.

II – La regulación de HaWRKY76 en raíces y su posible función específica en asteráceas y la relación con el fenotipo de las plantas HaWRKY76 de Arabidopsis

Como primera aproximación para caracterizar la posible función de HaWRKY76 en girasol, se determinó en qué partes de las plantas se expresa este FT. En plántulas de 5 días *HaWRKY76* se expresó mayormente en raíces e hipocotilos (Figura 7). En relación con estos resultados de expresión génica, en la bibliografía está informado que algunos FTs de tipo WRKY podrían estar involucrados en el desarrollo de la raíz por lo que sería posible que HaWRKY76 también cumpliera una función en este órgano. El análisis del mapa transcriptómico en raíces de *Arabidopsis* indicó que numerosos FT WRKY se expresan en zonas específicas de la raíz sustentando la posibilidad de una función especializada en esas células (Birnbaum y col., 2003). También en maíz, un análisis de expresión realizado en diferentes órganos indicó un enriquecimiento de FTs de tipo WRKY expresados diferencialmente en este órgano (Jiang y col., 2012). Por otro lado, hay ejemplos de FTs de tipo WRKY que cuando son sobreexpresados les confieren a las plantas fenotipos radiculares que difieren de las salvajes como el de las plantas de arroz que sobreexpresan *OsWRKY31* que tienen raíces más cortas y menor formación de raíces laterales (Zhang y col., 2008). Indicando una función opuesta, pero también en raíces, las plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresan el FT WRKY de soja *GmWRKY13* desarrollaron mayor cantidad de raíces laterales (Zhou y col., 2008) y las mutantes de *Arabidopsis* en el gen *AtWRKY75* presentaron un incremento en el número y longitud de sus raíces laterales y en el número de pelos radiculares (Devaiah y col., 2007).

Las plantas de *Arabidopsis* que expresaban de forma ectópica y constitutiva *HaWRKY76*, presentaron raíces más largas a las dos semanas y mayor biomasa radicular en estadios más avanzados de desarrollo, así como también un mayor diámetro (Figuras 14 y 15). Además se determinó que las células del xilema de la raíz primaria de estas plantas tendrían menor diámetro que los de las salvajes (Figura 16). Todo estos resultados se correlacionan con la expresión diferencial de *HaWRKY76* en

raíces de girasol, aunque no hay que dejar de lado que estos podrían ser un artefacto, producto de la expresión ectópica de este FT.

Dado que la raíz es la interfase entre la planta y el complejo ambiente terrestre, tiene un papel esencial en la absorción de agua y minerales del suelo que se utilizan finalmente para la producción de semillas. Además, se sabe que la modificación de su arquitectura afecta la respuesta de las plantas ante los distintos tipos de estrés (Meister y col., 2014) Las características diferenciales que la expresión de *HaWRKY76* le confiere a las raíces de plantas transgénicas podrían ser aprovechadas para mejorar la productividad y la tolerancia a estrés, siempre que estas características diferenciales se conserven al transformar cultivos de interés agronómico.

Como el clado al que pertenece *HaWRKY76* es hasta el momento exclusivo de las asteráceas y la característica en común más relevante que presentan estas plantas es su inflorescencia, decidimos observar si la expresión del gen variaba a medida que se desarrolla el capítulo y los aquenios. *HaWRKY76* mostró dos picos de expresión, uno durante el desarrollo de los capítulos en sí y el otro en el llenado de semillas y desarrollo de los embriones (Figura 7). Estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada: las proteínas del clado WKKY estarían involucradas en vías de desarrollo y morfogénesis específicas de las asteráceas, como lo es el capítulo y sus aquenios. *HaWRKY76* no sería el primer FT de tipo WRKY descrito como involucrado en parte de este proceso. *AtWRKY10* de *Arabidopsis*, regula el tamaño de la semilla (Luo y col., 2005) y *AtWRKY44* está encargado de regular la síntesis de tanino y mucílago en la cubierta seminal (Johnson y col., 2002). Además, *OsWRKY78* regula el desarrollo de semillas en arroz (Zhang y col., 2011), *GaWRKY1* regula la maduración de frutos en algodón (Xu y col., 2004) y *ScWRKY1* regula el desarrollo del embrión en papa (Lagacé y Matton, 2004).

En *Arabidopsis*, si bien las plantas *HaWRKY76* no presentaron cambios en la morfología de su inflorescencia ni de sus vainas y tampoco difirieron de las salvajes en cuanto a su largo, grosor y número de semillas por vaina sí tuvieron una mayor producción de semillas.

III – HaWRKY76 un WRKY “trabajador” en pos del fitomejoramiento

La problemática del incremento de la población y la creciente demanda de alimentos se ha tornado un tema central en los debates de distintas organizaciones mundiales. Un trabajo del 2013 indicó que el incremento proyectado en el rendimiento de los cultivos de mayor importancia económica no satisfaría la demanda mundial de alimentos para el año 2050 (Ray y col., 2013). La mayor producción de semillas que la alta expresión de HaWRKY76 le confiere a las plantas de Arabidopsis es una característica muy interesante que habilita a la postulación de este FT como herramienta biotecnológica para colaborar a enfrentar esta situación.

Resulta atractivo que las plantas HaWRKY76 logren mayor producción, aún cuando su ciclo de vida es idéntico al de las salvajes. Este hecho motivó los ensayos para intentar explicar el motivo de este incremento en la producción respecto de las plantas salvajes que permitieron determinar que las diferencias más notables entre plantas salvajes y transgénicas se encuentran al final del ciclo. A las siete semanas de vida las plantas HaWRKY76 tienen más ramificaciones que las salvajes (Figura 18). El seguimiento de la biomasa de su roseta indica que cuando las plantas salvajes dejan de crecer al día 29, las plantas transgénicas continúan creciendo, y de esta forma al día 35 se diferencian de las salvajes. También se midió la cantidad de proteínas presentes en las hojas de las rosetas y se observó que hasta el día 21 no había diferencias entre las plantas salvajes y las transgénicas, pero sí se detectan diferencias el día 29, las cuales desaparecen el día 35. Esto podría estar relacionado en parte con el incremento de la biomasa de las transgénicas entre el día 29 y el día 35. En el día 35, todas las plantas tienen menor concentración de proteínas en la roseta que en estadios anteriores, dado que ya están en estadio reproductivo y las hojas de la roseta pasan a ser fuente de fotosintatos para la estructura reproductiva de las plantas (Figura 19). Además, en el día 29 las plantas HaWRKY76 tienen en promedio un 80 % más de sacarosa que las salvajes (Figura 20). Sumado a estos datos hay que considerar que a las 5 semanas de vida las plantas HaWRKY76 tienen mayor biomasa radicular y sus raíces son más anchas que las de las

plantas salvajes (Figura 15). Todas estas características en conjunto podrían estar aportando para lograr una mayor producción de las plantas HaWRKY76.

IV – HaWRKY76 y la respuesta al estrés abiótico

IV.1 – Déficit de agua

Las diferentes condiciones medioambientales adversas como la sequía, las altas temperaturas, la salinidad, las inundaciones y los elevados niveles de CO₂ afectan el crecimiento y la productividad de las plantas y plantean una amenaza creciente a la agricultura sustentable. A estas consecuencias por si mismas negativas, se suma la preocupación por los efectos de la intensificación de las condiciones mencionadas, experimentada en las últimas décadas, en la seguridad alimentaria y la biodiversidad de los cultivos. Entonces, la adaptación de las plantas a los distintos tipos de estrés es un tema clave que merece ser investigado en profundidad (Ahuja y col., 2010). La tolerancia a sequía en las plantas podría contribuir a incrementar la producción, mejorando el uso de suelos ya degradados, y reducir la utilización de agua por parte de la agricultura (Warwick y col., 2009).

IV.1.1 – HaWRKY76, sus homólogos y la regulación por estrés abiótico

Según ensayos previos realizados en hojas y discos de hojas de girasol, la expresión de *HaWRKY76* es reprimida por citoquininas, giberelinas, auxinas, manitol, ACC y JA e inducida por SA (Giacomelli y col., 2010).

Sabiendo que la expresión de *HaWRKY76* presenta un pico en raíces de plántulas de 5 días, se realizó una evaluación de la respuesta a otras variables en plántulas de esta edad. Las plántulas completas fueron enfrentadas a tratamientos hormonales y a distintos tipos de estrés abióticos. Se concluyó que *HaWRKY76* está regulado por estrés hídrico, salino y por anegamiento en raíces. Ninguno de los tratamientos hormonales cambió el nivel de la expresión de este FT de forma significativa, a diferencia de lo observado anteriormente (Figura 8). Estas diferencias se pueden deber

al sistema de trabajo usado en las dos oportunidades. En el trabajo de 2010, se utilizaron hojas de plantas de 13 días y los ensayos se realizaron pincelando las láminas o cortando discos de las mismas e infiltrándolos con soluciones conteniendo los diferentes tratamientos. En el presente trabajo, se utilizaron plántulas completas y los tratamientos se realizaron por subirrigación. Además de estas importantes consideraciones, la diferencia más significativa entre los dos trabajos es que en esta oportunidad, la expresión se evaluó en las raíces.

Se investigaron las posibles funciones de los FTs homólogos de HaWRKY76 en el grupo IId, hermano del clado WKKY y algunos de los datos de expresión diferencial obtenidos para *HaWRKY76* se condicen con el comportamiento de sus posibles homólogos más próximos. En *Arabidopsis* AtWRKY11 está descrito como un regulador negativo de la resistencia basal frente a *Pseudomonas syringae* (Journot-Catalino y col., 2006), pero su expresión también se incrementa en estrés hídrico (Ding y col., 2013) y por anoxia (Mustroph y col., 2009), por lo que podría estar interviniendo en respuestas a estrés abiótico. En asteráceas, HaWRKY76 presenta una alta identidad de secuencia con CmWRKY3 y CmWRKY12 de crisantemo. Los niveles de transcritos de los genes que codifican estas proteínas aumentan como consecuencia de la infección con áfidos y de tratamientos con polietilenglicol y bajas temperaturas. *CmWRKY3* además es reprimido en tratamientos con metil jasmónico y *CmWRKY12* se induce también en raíces crecidas condiciones de alta salinidad (Song y col., 2014).

Los ensayos de estrés abiótico severo en estadios tempranos del desarrollo resultan útiles como un indicador preliminar de función, pero las condiciones en las que se realizaron los mismos pueden mejorarse. Por este motivo, elegimos dos condiciones en las que *HaWRKY76* se expresara de forma diferencial y sometimos plantas de girasol a estrés hídrico por déficit o exceso, diseñando las condiciones para que fueran más parecidas a las que las plantas enfrentan en el campo.

Se realizaron ensayos de alrededor de dos semanas de duración en los que las plantas de girasol fueron sometidas a estrés severo y se tomaron muestras a lo largo del tiempo. Se eligió en un principio estrés severo como tratamiento, aunque como hemos descrito en la Introducción del presente Capítulo no sea el más habitual porque

influye de forma más notable la expresión de genes asociados a estrés hídrico y entonces era más probable poder evaluar el momento del estrés en el que el FT en estudio era regulado. Las pequeñas fluctuaciones en el nivel de estrés hídrico, que suelen producirse en los prolongados ensayos de estrés moderado, hubieran dificultado esta medición. De esta manera, se determinó que *HaWRKY76* es regulado por estrés hídrico en las etapas finales del mismo y su pico de expresión se da un día antes de que las plantas mueran (Figura 10). De forma semejante, los transcritos de *AtWRKY11*, que codifica la proteína de Arabidopsis con la que *HaWRKY76* presenta mayor identidad de secuencia, también se inducen en etapas tardías del estrés hídrico (Ding y col., 2013).

IV.1 .II – *HaWRKY76* y el fenotipo que les confiere a las plantas de Arabidopsis que lo expresan de forma ectópica y constitutiva

Muchos FTs de tipo WRKY confieren tolerancia a sequía a las plantas que los expresan diferencialmente, ya sea por sobreexpresión o represión de sus transcritos, según los casos (Niu y col., 2012; Shen y col., 2012; Wang y col., 2009b; Xiong y col., 2010). En ese mismo sentido, la expresión ectópica y constitutiva de *HaWRKY76* en plantas de Arabidopsis les confiere una mayor tolerancia a estrés hídrico. Las plantas *HaWRKY76* fueron más tolerantes que las salvajes a estrés hídrico severo cuando el mismo comenzó en estadio vegetativo o reproductivo (Figura 21) y mostraron mayor contenido de clorofila y menor daño celular tanto en estrés hídrico severo como moderado (Figuras 22 y 24). Además, a lo largo del estrés hídrico moderado, las plantas *HaWRKY76* consumieron menos agua que las plantas salvajes principalmente al comienzo del tratamiento (Figura 25). Los datos de medición de pérdida de agua en hojas escindidas sugieren que las plantas *HaWRKY76* en condiciones estándar sintieron el estrés antes y cerraron sus estomas más rápido que las plantas salvajes. Esta característica se exacerbó en hojas de plantas sometidas previamente a estrés hídrico leve, dado que la diferencia entre las plantas transgénicas y las salvajes se hizo estadísticamente significativa en tiempos de tratamiento más cortos que en condiciones estándar (Figura 26). Esto indica una correspondencia de esta

característica (menor pérdida de agua) con la tolerancia de las plantas al estrés. Como el cierre estomático inhibe la fotosíntesis (Cornic, 2000) hay numerosos estudios que plantean una correlación directa entre la tolerancia al estrés por cierre estomático y la menor productividad de las plantas que se adaptan de esta forma a dicho estrés (Brodrribb y Holbrook, 2003; Ghannoum, 2009; Jung y col., 2008; Price y col., 2002). De hecho, los genotipos de alto rendimiento de algodón, trigo y arroz tienen mayor conductancia estomática y transpiran más en estrés hídrico (Araus y col., 2002; Blum y col., 1982; Izanloo y col., 2008; Sanguineti y col., 1999). Entonces a la hora de pensar a HaWRKY76 como una herramienta biotecnológica, el hecho de que uno de los mecanismos probables por los que tolere el estrés sea el cierre estomático plantea una controversia. Sin embargo, las plantas HaWRKY76 no presentaron detrimento en la producción en distintos niveles de estrés hídrico medio/moderado e incluso presentaron un leve incremento en la producción con respecto a sus controles cuando el estrés hídrico comenzó en el estadio vegetativo (Figura 24 y resultados no presentados). Además, las medidas de transpiración e intercambio gaseoso en condiciones de estrés hídrico leve no tuvieron diferencias significativas entre las plantas salvajes y las transgénicas (resultados no presentados). El conjunto de estas observaciones nos llevó a la pregunta clara de cómo es posible que estas plantas disparen el mecanismo de cierre estomático para tolerar estrés hídrico pero al mismo tiempo no presenten la esperada pérdida de productividad de estos casos. La respuesta no es simple y serán necesarios estudios posteriores para poder completarla.

Con el fin de describir el mecanismo por el cual las plantas HaWRKY76 toleran mejor que sus pares salvajes el estrés hídrico, se evaluaron los niveles de transcritos de distintos genes involucrados en la biosíntesis y señalización de la hormona ABA. Los resultados que arrojaron estos ensayos indicaron que en las plantas HaWRKY76 la biosíntesis de ABA no estaría afectada de forma diferencial respecto de las salvajes, pero sí lo estarían las vías de señalización. *ABI1*, *ABI2*, *ABI3* y *ABI5* se indujeron menos por estrés hídrico en las plantas transgénicas que en las salvajes. *ABI1* y *ABI2* son reguladores negativos de la respuesta a ABA, que se inducen por estrés y las mutantes en estos genes presentan problemas en el cierre estomático y muestran un

fenotipo de marchitez (https://www.arabidopsis.org/abrc/catalog/mutant_seed_1.html). *ABI3* y *ABI5* son reguladores positivos de la respuesta a ABA (Carles y col., 2002; Hirayama y Shinozaki, 2007; Leung y col., 1994; Schroeder y col., 2001). A su vez, *RD29A*, *RD29B*, *RAB18*, *EM6* y *ADH*, que son regulados directamente por *ABI5*, también se indujeron menos por estrés hídrico en las transgénicas que en las salvajes. Los genes exclusivos de la respuesta independiente de ABA, *COR47* y *COR15A*, no mostraron diferencias de expresión entre transgénicas y salvajes (Figura 28). Nos sorprendió que tanto los reguladores negativos como los positivos se indujeran en menor medida en las plantas HaWRKY76 que en las salvajes. Estas observaciones concuerdan con la complejidad descrita para las vías de señalización de ABA; si bien hay muchos trabajos que describen parcialmente estas vías (Nakashima y col., 2014; Pinheiro y Chaves, 2011; Raghavendra y col., 2010; Roychoudhury y col., 2013; Umezawa y col., 2010) el escenario general comprendiendo todas ellas no está detallado en ninguno de forma completa. Un claro ejemplo de esta complejidad está representado por *RD29A* y *RAB18* que pertenecen a las dos vías de señalización de ABA, la dependiente y la independiente (Roychoudhury y col., 2013).

Por otro lado, *ABI1* y *ABI3* están regulados en situaciones de escasez de agua en *Arabidopsis* y cebada independientemente del tipo de estrés (agudo o crónico) y su intensidad y hay evidencias que plantean que están involucrados en la relación entre sequía y fotosíntesis (Parcy y Giraudat, 1997; Pinheiro y Chaves, 2011). Durante la deshidratación se produce el cierre estomático, cuya función es reducir la evaporación de agua a través de las hojas (Finkelstein y Rock, 2002; Sirichandra y col., 2009). Este mecanismo, mediado por la fitohormona ABA, evita que las plantas pierdan agua por evapotranspiración pero reduce la fotosíntesis concomitantemente con la reducción del intercambio gaseoso (Finkelstein y col., 2002; Taiz y Zeiger, 2006). Además las mutantes *abi1* son menos sensibles al ABA e incapaces de regular el cierre de sus estomas de forma correcta y por este motivo transpiran más (Parcy y Giraudat, 1997). Estas evidencias son notorias, dado que las plantas HaWRKY76 son más tolerantes que las salvajes a sequía posiblemente porque pierden menos agua debido a que cierran sus estomas más rápidamente que las salvajes y, sin embargo, presentan menores

niveles de transcritos de *ABI1*. De todas formas, hay que tener en cuenta que *ABI1* no es el único transcrito cuya expresión está afectada y que el fenotipo de las plantas HaWRKY76 puede estar dado por la regulación diferencial en conjunto de la vía de respuesta a ABA.

A partir de los nuestros datos experimentales podemos concluir que la vía de señalización de ABA en general está menos inducida en las plantas HaWRKY76 que en las plantas de tipo salvaje, a diferencia de lo que ocurre en otras plantas tolerantes a sequía (Figura 27). Esto puede tener origen en que todos estos genes son regulados por ABI5 y la expresión de *ABI5* no varía en las plantas transgénicas sometidas a estrés comparadas con los controles. Sin embargo, no hay que dejar de lado que puede haber otros factores que influyan en el fenotipo de tolerancia. A su vez, una modulación en la regulación diferencial de estos genes en las plantas HaWRKY76 podría explicar su mayor producción y contenido de clorofila en estrés, si se le suman las características fenotípicas favorables que estas plantas desarrollan normalmente y las posicionan mejor frente al estrés como tamaño, longitud y diámetro de la raíz.

Desde el punto de vista biotecnológico la regulación de los niveles de ABA es muy importante para las plantas en función de tolerar el estrés hídrico, sobrevivir, y no perder en productividad (Govind y col., 2011; Sreenivasulu y col., 2012). La expresión diferencial de los genes medidos en las plantas HaWRKY76 podría ser parte de una respuesta de homeostasis de ABA distinta a la que tienen las plantas salvajes, indicando la existencia de mecanismos de respuesta a estrés diferentes. Sin embargo sería importante definir si las plantas HaWRKY76 están poniendo en juego otras vías desconocidas aún para generar el fenotipo diferencial .

Los FTs de tipo WRKY son componentes clave en la señalización de ABA (Rushton y col., 2012). *AtWRKY40*, *AtWRKY18* y *AtWRKY60*, pertenecientes al grupo IIa han sido descritos como reguladores negativos de la señalización de esta hormona (Shang y col., 2010). La mutante en *AtWRKY63*, miembro del grupo III, es hipersensible a ABA en estadios tempranos del desarrollo y presenta, de forma contraria, menor sensibilidad a ABA en el cierre estomático y menor tolerancia a estrés hídrico (Ren y col., 2010). *AtWRKY2* es un regulador negativo del mantenimiento de la dormancia por ABA (Jiang

y Yu, 2009). Estos datos sumados a muchos otros presentes en la literatura demuestran que los FT WRKY constituyen múltiples nodos en las redes de señalización de ABA. En girasol, a través de un análisis de microarreglos hecho a partir de plantas crecidas a campo y sometidas a estrés hídrico se mostró curiosamente que sólo un FT WRKY cambió su nivel de expresión en el genotipo en estudio y éste correspondía a un homólogo de AtWRKY40 (Roche y col., 2007).

IV.1 .II – ¿Qué papel tendría en la tolerancia a estrés hídrico de las plantas HaWRKY76 su desarrollo radicular diferencial?

Sumado a las características que se desarrollaron en respuesta a la escasez de agua, no hay que dejar de lado que las plantas HaWRKY76 estaban mejor preparadas para enfrentar el estrés al presentar mayor biomasa radicular, mayor diámetro de raíz primaria y, aparentemente, células xilemáticas de la raíz de menor diámetro que el de las salvajes (Figuras 15 y 16).

Las características fenotípicas mencionadas no generan necesariamente una ventaja adaptativa en todos los ambientes en los que hay sequía. Sin embargo, la mayor biomasa radicular podría estar colaborando a que las plantas HaWRKY76 tomen agua del suelo de forma más eficiente que las plantas salvajes. Las raíces de diámetro pequeño con mayor largo de raíz específico⁴ les permiten a las plantas incrementar la eficiencia de conductancia hidráulica aumentando el área de la superficie en contacto con el suelo y el volumen de suelo que puede ser explorado en busca de agua (Comas y col., 2012; Hernández y col., 2010; Leung y col., 1994; Rieger y Litvin, 1999; Solari y col., 2006). En este sentido, el menor diámetro de las raíces ha sido propuesto como una característica favorable para incrementar la adquisición de agua y la productividad de las plantas en sequía (Wasson y col., 2012). Las plantas HaWRKY76 por su parte tienen mayor diámetro en su raíz primaria al final de su ciclo de vida (Figura 15). Nos proponemos en un futuro realizar ensayos para investigar qué sucede con la abundancia y el diámetro de las raíces secundarias de las plantas HaWRKY76 en comparación con las salvajes con el objeto de determinar si el origen de la diferencia

⁴ El largo de raíz específico es el largo de raíz/masa radicular

en la biomasa radicular entre salvajes y transgénicas está dado por diferencias en el grosor o número de las raíces secundarias ya que el largo total es igual (resultados no presentados). Además del diámetro de la raíz, el diámetro de los vasos del xilema también afecta la conductividad hidráulica y puede afectar la productividad de las plantas en sequía (Tyree y col., 1994; Zimmermann, 1983). En general, las plantas con mayor diámetro de vasos xilemáticos tienen mayor conductividad hidráulica pero presentan un uso del agua poco conservativo y además corren mayores riesgos de sufrir de cavitación⁵ que aquellas con vasos de menor diámetro (Alder y col., 1996; Gallardo y col., 1996; Richards, 2006; Sperry, 2011; Tyree y col., 1994). La columna de agua presente en las raíces termina saliendo de la planta por la evaporación en la superficie de las hojas, cuando la fuerza de tensión que empuja al agua es mayor que la fuerza que mantiene a las moléculas de agua unidas, la columna de agua se rompe y el aire ocupa su lugar. En estrés hídrico es más probable que esto suceda, dada la escasez de agua. Hay pocas especies con diámetros de vasos anchos que se adaptan a ambientes secos (Pockman y Sperry, 2000). Por otro lado, si pensamos en esta característica como una herramienta para el fitomejoramiento nos encontramos con que está descrito que una disminución general en el diámetro de los vasos puede limitar el potencial de crecimiento máximo de las plantas (Passioura, 1972). Sin embargo, las plantas HaWRKY76 no muestran un detrimento en el crecimiento ni en la productividad; por lo contrario, en condiciones normales de crecimiento, producen más semillas que las salvajes.

IV.II – Exceso de agua

IV.II.I – Las plantas HaWRKY76 y su fenotipo frente a estrés por inundación y anegamiento

En la Figura 11 se ve claramente que los niveles de transcritos de *HaWRKY76* no variaron significativamente a lo largo del ensayo de inundación de la planta completa pero sí mostraron un pico luego de que las plantas se recuperaron durante una hora. Sin embargo, *HaWRKY76* expresado de forma ectópica y constitutiva en *Arabidopsis*,

⁵ La cavitación es el llenado de una traqueida o elemento del vaso con aire.

les confirió a estas plantas mayor tolerancia a estrés por exceso de agua. Las plantas HaWRKY76 sobrevivieron más que las salvajes cuando fueron sometidas a inundación durante 5 ó 6 días (Figura 36). Como estas plantas no mostraron un crecimiento diferencial respecto de las salvajes al estar inundadas es lógico sugerir que se adaptan por medio del mecanismo de quiescencia y no el de escape (Figura 29).

El suplemento con sacarosa (y no con glucosa) incrementa la tolerancia a estrés por anoxia de las plantas sometidas a este tipo de estrés (Germain y col., 1997; Loreti y col., 2005). También el mayor contenido de azúcares está correlacionado directamente con una mayor tolerancia al estrés por exceso de agua, posiblemente por proveer la energía necesaria para mantener el metabolismo mediante la respiración anaeróbica (Das y col., 2005; Sarkar y col., 1996; Vriezen y col., 2003). Las plantas HaWRKY76 presentaron mayor concentración de sacarosa en sus hojas de roseta al comienzo del estrés y además consumieron sus reservas de carbohidratos de manera conservativa (Figura 31). Estas características estarían colaborando al fenotipo de tolerancia.

Para profundizar en la caracterización de este fenotipo, se midió la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los hidratos de carbono y la fermentación. Todas las plantas a los tres días de iniciado el estrés tuvieron reprimidos los transcritos de *SUS1*, *SUS4*, *PDC1* y *ADH1* respecto de sus niveles en condiciones estándar. Sin embargo, los niveles de transcritos de *PDC2* y *ASP2*, no se vieron afectados por la anoxia/hipoxia (Figura 33). Esto fue llamativo en un principio, dado que está ampliamente descrito que, apenas se inicia el estrés por hipoxia, las plantas incrementan los transcritos de genes que codifican enzimas involucradas en la fermentación de los hidratos de carbono disponibles como SUS, ADH y PDC, entre otras (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Banti y col., 2013; Klok y col., 2002; Loreti y col., 2005). Al principio del tratamiento estresante las plantas deben adaptarse al mismo y sería esperable que tengan que fermentar carbohidratos en este proceso. Sin embargo, cuando el estrés se prolonga y las plantas desencadenan el mecanismo de quiescencia, disminuyendo a niveles basales su metabolismo, la fermentación de sus hidratos de carbono se ve reprimida preservando las reservas (Loreti y col., 2005). A los tres días de estrés, las plantas HaWRKY76 presentaron reprimida la expresión de *SUS1* y *ADH1* comparada con la de las salvajes, lo que podría explicar su consumo

restrictivo de carbohidratos. Al ingresar menos sacarosa a la vía por represión de *SUS1*, se produce menos piruvato para fermentar en las plantas HaWRKY76 y podría ser el motivo de la represión de *ADH1*. A su vez, ninguna otra vía fermentativa está favorecida en las plantas transgénicas dado que *AAT* (alanina amino transferasa, resultados no presentados), *ASP1* y *ASP2* no mostraron niveles de expresión diferenciales entre los distintos genotipos (Figura 33).

La recuperación es un parámetro muy importante a la hora de evaluar el desempeño de una variedad frente a estrés por exceso de agua. De nada sirve que la planta tolere el estrés si cuando éste cesa el organismo muere. Es paradójico en apariencia, pero las plantas sufren deshidratación luego de que el estrés por exceso de agua culmina (Fukao y col., 2011; Setter y col., 2010). Además cuando se exponen nuevamente al medio, los niveles de EROs se incrementan de forma notoria. En concordancia con esto, se puede incrementar la tolerancia a la deshidratación mediante la manipulación de genes que codifican proteínas relacionadas con la detoxificación de EROs y sus reguladores (Badawi y col., 2004; Davletova y col., 2005; Lu y col., 2007; Mittler, 2006; Wang y col., 2005; Wu y col., 2008).

Las plantas HaWRKY76 mostraron un menor contenido de EROs a los 5 días de estar sumergidas (Figura 30) y además se deshidrataron menos (perdieron menos agua) en la recuperación, posiblemente porque el cierre estomático fue más rápido que en las salvajes (Figura 35), lo que señala a HaWRKY76 como un intercomunicador en los mecanismos de respuesta a la falta y al exceso de agua.

Este menor contenido de EROs, y probablemente el menor daño celular a los cinco días del estrés, podrían colaborar a una mejor recuperación de las plantas cuando los niveles de EROs se incrementan. Sumando a esto la menor pérdida de agua explicaría, al menos en parte, la mayor supervivencia de las plantas HaWRKY76 al estrés por inundación.

Las plantas que contienen mayores niveles de carbohidratos cuando el estrés por exceso de agua cesa, muestran mejor recuperación (Das y col., 2005; Ismail y col., 2013; Luo y col., 2011). Las plantas HaWRKY76 tenían un poco más de sacarosa que las salvajes tras recuperarse durante un día (Figura 34) pero no presentaron diferencias en

el contenido de proteínas de sus hojas (resultados no presentados). Luego de una semana de recuperación de la inundación completa, las plantas HaWRKY76 se vieron más saludables y lograron producir levemente más semillas que las salvajes (Figura 36). En el mismo sentido, produjeron más semillas tras estar sometidas a inundación por seis días (Figura 38).

El estrés por anegamiento suele ser menos severo para las plantas que el estrés por inundación total de la planta, esto se ve reflejado en que las plantas de todos los genotipos producen menos semillas luego de ser sometidas a estrés por inundación de la planta completa que cuando se enfrentan a anegamiento. Las plantas anegadas no se encuentran completamente cubiertas de agua. Entonces tienen la posibilidad de transportar oxígeno desde la zona en normoxia a la que se encuentra en anoxia. Las plantas tienen mecanismos para favorecer este transporte de oxígeno de forma tal que sea más eficiente. Uno de estos mecanismos, es la generación de aerénquimas (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Mühlenbock y col., 2007; Parlanti y col., 2011). Las plantas de *Arabidopsis* tanto salvajes como transgénicas generaron aerénquima lisogénica en la médula de los tallos en condiciones de inundación parcial pero las transgénicas lo hicieron en mayor medida (Figura 37). Esta diferencia no se observó en raíces de plantas anegadas, ni en tallos de plantas sumergidas (resultados no presentados). Además, a los cinco días presentaron menor daño celular que sus pares salvajes, lo que podría estar relacionado con un mejor control de las EROs. Parlanti y col (2011) presentaron datos con los que correlacionaron el mecanismo de tolerancia frente a inundación con la manera en la que se desencadena la formación de aerénquima. Está descrito que las plantas que toleran inundación total por el mecanismo de quiescencia generan aerénquima dependiendo principalmente de las especies reactivas del oxígeno, mientras que en las plantas que escapan del estrés elongando el tallo, la formación de aerénquima estaría gobernada principalmente por la acumulación de etileno (Parlanti y col., 2011).

En la literatura, se han informado sólo dos FTs de tipo WRKY denominados MtSTP de *Medicago truncatula* y su homólogo de *Arabidopsis* AtWRKY12, relacionados con la anatomía del tallo. La mutación de este FT en *Arabidopsis* genera crecimiento de pared celular secundaria ectópica en la médula, lo que sugiere que su función sería mantener

las células de la médula en su estado parenquimatoso (Wang y col., 2010). Por otro lado, se sabe que AtWRKY22, AtWRKY29 y AtWRKY30 incrementan su expresión en plantas de Arabidopsis sometidas a anoxia durante 12 horas. En particular AtWRKY22 estaría relacionado con la mayor tolerancia a infecciones de plantas de Arabidopsis luego de que el período de inundación total termina (Hsu y col., 2013).

V – HaWRKY76 como herramienta para mejorar cultivos

Muchos factores de transcripción producen fenotipos complejos cuando son expresados constitutivamente en las plantas (Cabello y col., 2012; Dubouzet y col., 2003; Manavella y col., 2008). Los FTs de tipo DREB1/CBF, DREB2, AREB/ABF y NAC regulan la expresión de genes asociados con la aclimatación al estrés osmótico (Dubouzet y col., 2003; Hossain y col., 2010; Matsukura y col., 2010; Nakashima y col., 2000). La sobreexpresión de estos genes incrementa la tolerancia de las plantas a muchos estreses, incluyendo sequía, salinidad y bajas temperaturas en arroz y Arabidopsis. SUB1A es un FT de tipo ERF cuya expresión define que la planta de arroz desarrolle el mecanismo de quiescencia. Las plantas de arroz que sobreexpresan SUB1A tienen mayor tolerancia a inundaciones y toleran mejor la deshidratación que se produce luego de sufrir aquel estrés y además son más tolerantes a estrés hídrico (Fukao y col., 2011). Por el contrario, GhWRKY17, un FT de tipo WRKY de algodón perteneciente al grupo IIId, hace más susceptibles al estrés hídrico y salino a las plantas de tabaco que lo expresan de forma constitutiva (Yan y col., 2014).

HaWRKY76 se encuentra dentro de este amplio grupo de FTs que produce fenotipos complejos cuando son expresados de forma ectópica y/o constitutiva en plantas. Las plantas de Arabidopsis HaWRKY76 muestran un fenotipo diferencial en condiciones normales de crecimiento en cuanto a la arquitectura de sus raíces, la biomasa radicular y foliar y la producción. Cuando son expuestas a escasez y al exceso de agua generan un fenotipo de tolerancia, en algunos casos incluso con mayor producción. Todas estas respuestas en Arabidopsis se pueden correlacionar con los patrones de expresión de HaWRKY76 en girasol y con la inducción de este FT en plantas tratadas con exceso de agua y deshidratación. Si bien para cada característica diferencial mencionada

anteriormente se plantearon mecanismos por los cuales HaWRKY76 podría estar regulando estas respuestas, quedan muchos interrogantes a responder para lograr describir con mayor precisión el lugar que ocupa este FT en las vías moleculares. Cuando el genoma de girasol se encuentre disponible en forma procesada sería muy interesante buscar “cajas WKKY” en los promotores de genes que estén regulados diferencialmente en las vías de interés. Además, un mayor conocimiento sobre la expresión de *HaWRKY76* y sus genes blanco nos permitirá dilucidar qué fenotipos son artefactos generados por su expresión ectópica y cuáles podrían relacionarse con mecanismos conservados en plantas.

El conjunto de resultados presentados en este capítulo indica que HaWRKY76 podría ser utilizado como una herramienta biotecnológica con potencial para el mejoramiento de cultivos tanto en condiciones de crecimiento normales como bajo condiciones de estrés abiótico por exceso o defecto de agua.

Capítulo 11



CAPÍTULO II: HaWRKY10 está involucrado en la acumulación de sustancias de reserva y tiene un papel en la germinación de las semillas

INTRODUCCIÓN

I – El ciclo de vida de las plantas y la transición entre sus estadios

El ciclo de vida de las plantas comienza con la germinación, que permite la generación de tejidos y órganos, sigue con la fase vegetativa y finalmente la reproductiva. La duración de cada etapa varía ampliamente entre las especies y el momento en el que estas transiciones ocurren está muy regulado. Esta regulación asegura que las fases más vulnerables del ciclo ocurran en condiciones ambientales favorables y en la temporada adecuada. Dos de los mecanismos que controlan las transiciones en las distintas etapas del desarrollo están asociados a la dormancia (Graeber y col., 2012). La dormancia de brotes previene su crecimiento en plantas perennes en invierno (Rohde y Bhalerao, 2007; Suttle, 2004) y la dormancia de las semillas previene la germinación de éstas aún si son viables, están intactas y en condiciones favorables (Bewley, 1997).

II – La dormancia de la semilla: ¿por qué es tan importante?

En forma general, la dormancia de la semilla puede definirse como un estado de quiescencia, si bien hay diferentes tipos de dormancia entre las especies de plantas. Este estado puede ser a su vez clasificado en dormancia fisiológica, morfológica, morfo-fisiológica, física y combinaciones de fisiológica y física. La dormancia fisiológica, dada por la pérdida de agua y la quiescencia metabólica y génica, es la que prevalece en plantas como *Arabidopsis*, girasol, lechuga, tabaco y muchos cereales. Esta forma de dormancia se divide a su vez en tres tipos: profunda, intermedia y no profunda. La última es la más común y se caracteriza porque el embrión inmaduro, escindido de la

semilla, puede generar una plántula normal, cuando naturalmente la dormancia se pierde por la estratificación o maduración completa de la semilla (Baskin y Baskin, 2004; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Graeber y col., 2012; Kucera y col., 2005).

Además, la dormancia que se instala en la fase de maduración de la semilla es denominada dormancia primaria. No obstante, en algunas especies, el bloqueo a la germinación se establece luego de la dispersión de la semilla y es inducido por ciertas condiciones de estrés o por un ambiente desfavorable a la germinación, caracterizando otro tipo de dormancia, denominada secundaria (Bewley, 1997; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

La dormancia va disminuyendo a medida que pasa el tiempo desde que la semilla termina de formarse. En este proceso decae la concentración de ABA y se incrementa la sensibilidad a GA o su requerimiento y puede ocurrir que el rango de temperatura en el que la semilla pueda germinar se amplíe y se den otros cambios específicos de la especie (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Por ejemplo, en girasol, este proceso está asociado con la oxidación de ARN mensajeros, lo que altera su traducción. Esta oxidación sería selectiva y tiene como blancos transcritos que jugarían papeles específicos en la dormancia de la semilla (Bazin y col., 2011).

La dormancia de la semilla es una propiedad innata que define las condiciones medioambientales en las que las semillas pueden germinar (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). A su vez, está determinada por factores genéticos y es muy influenciada por el ambiente en que se desarrollaron las plantas madres, además de ser una forma de adaptarse a los distintos hábitats. El estado durmiente (o el nivel de dormancia) de las semillas es un factor importante en el desempeño de las plantas (Donohue y col., 2010; Huang y col., 2010). Las semillas poco durmientes pueden germinar antes de las condiciones ambientales favorables, con riesgo de no sobrevivir. Por otro lado, las semillas que presentan dormancia incrementada demoran en germinar, con lo que la duración de la temporada de crecimiento favorable para la planta se ve reducida.

Una de las características agronómicas buscadas en las semillas es que sean capaces de germinar rápidamente, dado que es el agricultor quien define el momento de germinación de las semillas al sembrarlas en condiciones favorables para el proceso. De hecho, durante la domesticación se han seleccionado semillas con menores niveles de dormancia y germinación sincronizada (Kilian y col., 2009). Por otro lado, semillas muy poco durmientes generan una reducción en la calidad de la semilla para sembrar y pérdidas en la productividad, como es el caso de semillas vivíparas de los cereales que pueden brotar antes de separarse de la planta madre (Gubler y col., 2005). Entonces, es necesario un balance apropiado entre las condiciones que determinan el nivel de dormancia de la semilla.

Debido a la plasticidad fenotípica (Introducción General), las características con las que se desarrollan las plantas dependen de las condiciones en las que germinaron las semillas. En *Arabidopsis*, por ejemplo, las rosetas son más grandes y la reproducción ocurre en mayor medida cuando las semillas germinan en otoño que cuando lo hacen en primavera. (Donohue, 2003; Donohue y col., 2005; Korves y col., 2007). Otro claro ejemplo se da en girasol: cuando las semillas son tratadas con campos magnéticos⁶ se ve un incremento en la velocidad de germinación, en el largo, área y volumen de la raíz de la planta y en el peso seco de la misma al mes de vida (Vashisth y Nagarajan, 2010). El momento de germinación también puede influir sobre el tiempo de floración, como ocurre en el caso de *Campanula (strum) americanum*, en el que la temporada en la que germina define si el ciclo de vida de la planta es anual o bianual (Galloway, 2001). Como consecuencia, todos estos fenotipos tienen un impacto directo en la productividad de los cultivos.

⁶Tratamiento con campos magnéticos: tratamiento físico de la semilla que se postula como tecnología para el incremento del vigor de la plántula y el establecimiento del cultivo.

III – La semilla y su germinación

La mayoría de las plantas con flores se reproducen por semillas. Las semillas de las dicotiledóneas contienen en su interior un embrión que presenta cuatro estructuras bien definidas:

- la radícula o raíz embrionaria, órgano que crece, protruye a través del tegumento, fija la planta al sustrato y absorbe agua y sales minerales,
- dos cotiledones u hojas embrionarias, órganos que en la germinación de semillas (como las de girasol y Arabidopsis) contribuyen principalmente al almacenamiento de sustancias de reserva,
- el hipocotilo, eje caulinar, muy corto, entre cotiledones y radícula, y
- la plúmula, ápice del vástago portador de los primordios foliares.

El éxito en la germinación de la semilla y en el establecimiento de la plántula son características determinantes para la propagación de una especie. Debido a la gran vulnerabilidad al daño que la semilla tiene en germinación, a enfermedades y a estreses medioambientales, la germinación es considerada la fase más crítica en el ciclo de la planta. Cuando las semillas germinan se generan muchas situaciones de transición: pasan de ser organismos heterótrofos a autótrofos, de estar protegidos por la cubierta seminal a encontrarse expuestos al ambiente y de ser quiescentes a convertirse en fisiológicamente activas (Donohue y col., 2010). Es por esto que muchas plantas han evolucionado germinando solamente en condiciones ambientales muy particulares o secuencias muy específicas de estas condiciones. Hay muchos factores que regulan la germinación de las semillas (Bentsink y Koornneef, 2008), entre los que se destacan la luz (cantidad y calidad), la temperatura y las hormonas ABA y GA (Figura 1, arriba). Recientemente, se han comenzado a identificar nuevos reguladores de este proceso como modificaciones exigénicas, ARN de interferencia pequeños y ARN no codificantes largos (Nonogaki, 2014).

La germinación comienza cuando la semilla seca se embebe y sigue por la expansión del embrión. La toma de agua es trifásica, presenta una toma inicial rápida (Fase I), seguida por una fase estacionaria (Fase II) y un incremento final (Fase III) cuando el embrión elonga su eje y protruye su envoltura para completar la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006, Figura 1, abajo).

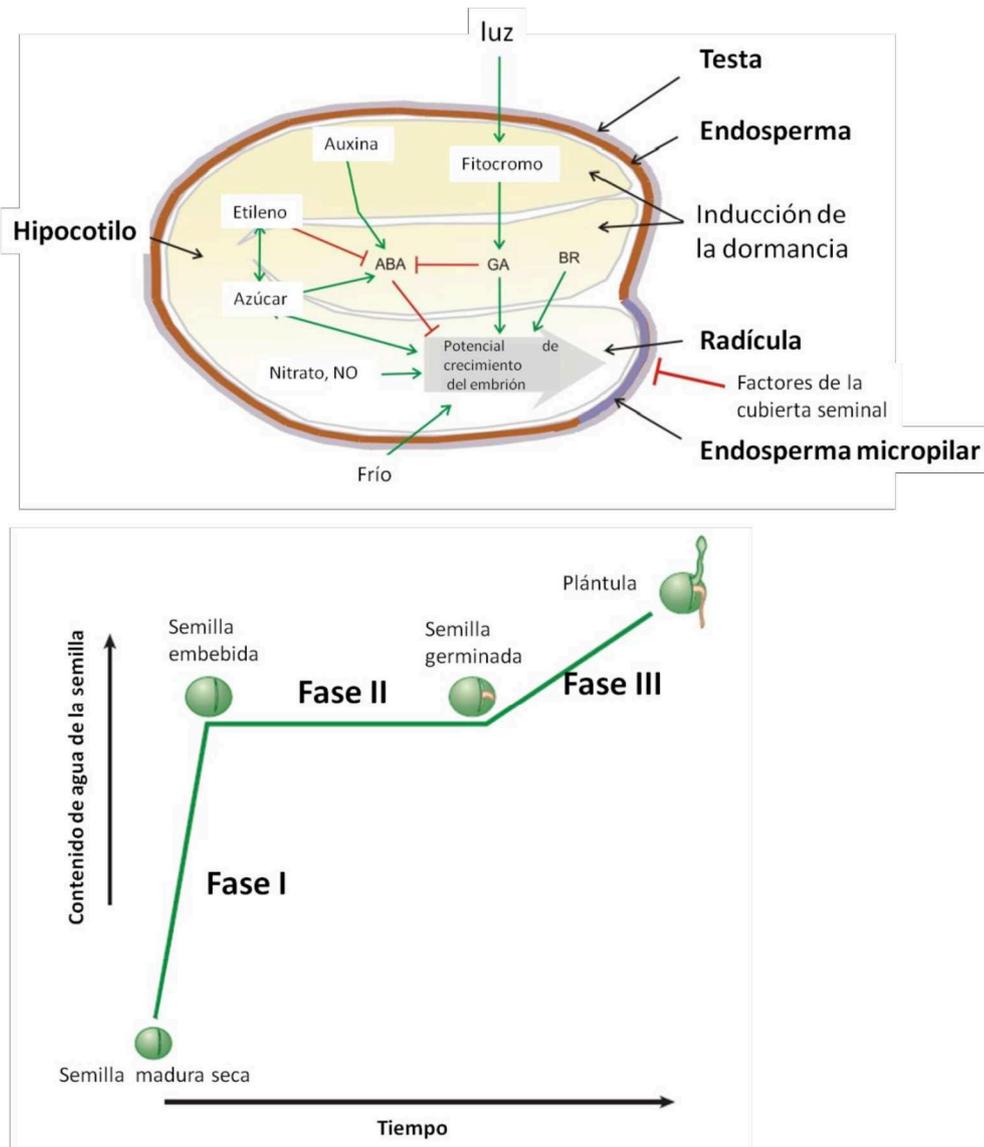


Figura 1: Regulación general de la semilla en germinación y toma de agua. Arriba: Representación esquemática de los factores que afectan la germinación en *Arabidopsis*. Los promotores del desarrollo están indicados con flechas verdes y los represores con flechas rojas (adaptado de Bentsink y col., 2008). Abajo: se grafica el contenido de agua de la semilla versus el tiempo. En color verde se representa lo que sucede cuando es embebida en agua (adaptado de Rajjou y col., 2014).

El botánico alemán Julius von Sachs fue el primero en proponer la existencia de las hormonas al postular en la segunda mitad del siglo XIX que las plantas producían, transportaban y percibían “sustancias formadoras de órganos”, responsables de la formación y el crecimiento de los órganos. Las hormonas son mensajeros químicos y permiten la comunicación entre las células, tejidos y órganos de las plantas superiores. El contenido, la señalización y las interacciones hormonales tienen un papel muy importante en determinar el estado fisiológico de las semillas y en regular el proceso de germinación. Las hormonas ABA, GA, etileno, brasinosteroides, auxinas, citoquininas y otras moléculas señalizadoras tienen efectos profundos en el desarrollo de la planta aún en concentraciones casi indetectables por métodos modernos. En la Figura 2 se muestra un resumen de la acción de las principales hormonas en la germinación de semillas de tabaco.

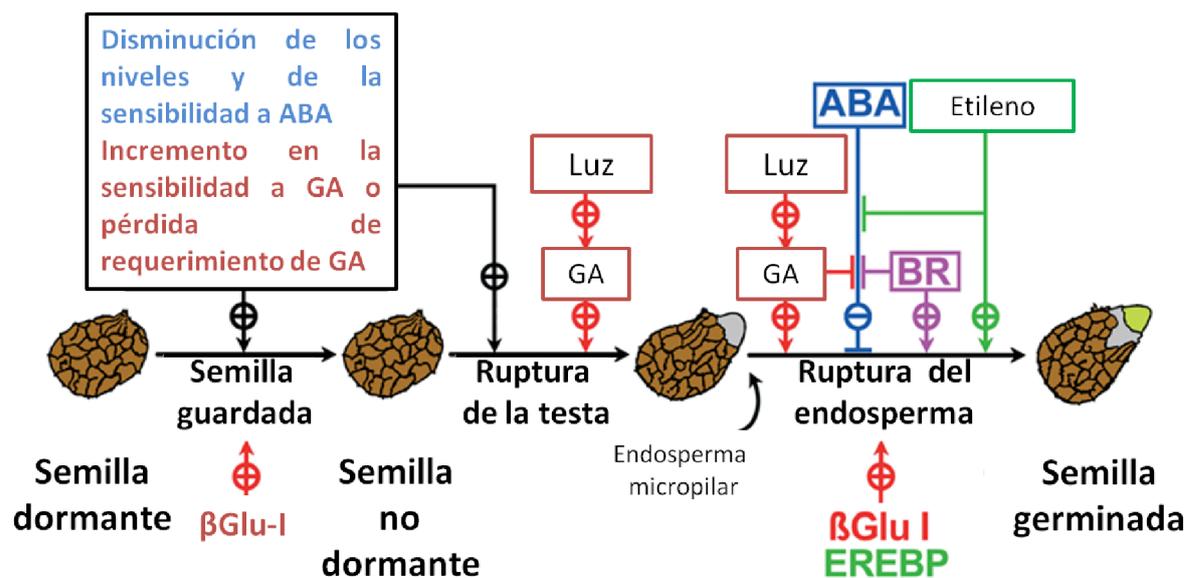


Figura 2: Interacciones hormonales durante la regulación de la ruptura de la dormancia de la semilla de tabaco. Abreviaturas: $\beta\text{Glu-I}$ (glucanasanas β -1,3 de clase I), EREBP (proteína de unión a un elemento de respuesta a etileno, adaptado de Finch-Savage y col., 2006).

IV.1 – ABA: un regulador positivo de la inducción de la dormancia y un regulador negativo de la germinación

La fitohormona ABA es un compuesto sesquiterpeno resultante del clivaje de carotenoides, que se sintetiza en plástidos, pasa al citosol y se transporta mayoritariamente a través del floema. El ABA regula muchos aspectos del desarrollo de la semilla y etapas tempranas posteriores a este estadio, que son muy importantes a nivel agronómico. Tiene un rol 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 col., 2002; Kucera y col., 2005; Nambara y col., 2010).

El ABA acumulado en semillas en dormancia decae a valores relativamente bajos luego de que la semilla es embebida debido al catabolismo por hidrolasas específicas de la familia citocromo P450 CYP707A. (Finkelstein y col., 2008; Okamoto y col., 2006). En muchas especies el nivel de ABA endógeno determina la inducción y probablemente el mantenimiento del estado de dormancia (Hilhorst, 1995; Koornneef y col., 2002; Kucera y col., 2005; Nambara y Marion-Poll, 2003). Además, la sobreexpresión de genes de biosíntesis de ABA o la aplicación exógena de la hormona lleva al incremento del contenido de ABA y conjuntamente de la dormancia de la semilla o del atraso de su germinación (Frey y col., 1999; Nambara y Marion-Poll, 2003; Thompson y col., 2000). En el mismo sentido, la deficiencia de ABA durante el desarrollo de la semilla está asociada con la ausencia de la dormancia primaria en la semilla madura y las semillas que no presentan la dormancia inducida por ABA son capaces de germinar sin GA (Bentsink y Koornneef, 2008; Finkelstein y Gibson, 2001; Nambara y Marion-Poll, 2003). Por otro lado, el ABA aportado por el tejido materno o la aplicación exógena de ABA durante el desarrollo de la semilla que no es capaz de sintetizar esta hormona no logra inducir la dormancia, lo que implica que se trata de un proceso dependiente de la biosíntesis de ABA por parte del embrión en cuestión (Kucera y col., 2005)

El ABA no inhibe la toma inicial de agua, el crecimiento extensivo inicial del embrión o la ruptura de la testa. Como se observa en la Figura 2, el ABA inhibe la ruptura del

endosperma. Además, esta hormona inhibe la expresión de los genes que codifican las glucanasas β -1,3 de clase I (β Glu-I) que están inducidos en el endosperma micropilar inmediatamente antes de su ruptura. La luz, las giberelinas y el etileno promueven la expresión de β Glu-I y la ruptura del endosperma, mientras que el ABA, la alta concentración osmótica y la oscuridad la inhiben (Kucera y col., 2005).

Se han identificado muchas proteínas involucradas en la respuesta a ABA, incluyendo los Factores de Transcripción ABI3, ABI4 y ABI5, que fueron descubiertos por los fenotipos que presentan las plantas mutantes en estos genes.

Las mutantes *abi3*, *abi4* y *abi5* muestran expresión reducida de varios genes involucrados con la maduración de semillas, pero sólo las mutantes de *abi3* son no durmientes e intolerantes a la desecación. Las mutantes *abi4* y *abi5* no muestran dormancia diferencial ni fenotipos asociados a la maduración de la semilla pero son insensibles a ABA (Finkelstein y col., 2008; Finkelstein y Lynch, 2000; Nambara y col., 1992). Los genes que codifican estos dos FTs se expresan mayormente en semillas en desarrollo y maduras, y son reguladores positivos de la señalización de ABA (Penfield y col., 2006).

ABI4, al que le vamos a prestar especial atención por su participación clave en la movilización de reservas en semillas, es un FT de la familia AP2/ERF (del inglés, **APETALA2/Ethylene-Responsive element binding Factor**). Los miembros de esta familia unen de forma específica los elementos ABRE (del inglés, **ABA Responsive Element**) en los promotores de los genes que regulan (Mizoi y col., 2012). Como se muestra en la Figura 3, mientras los otros genes ABI (*ABI3* y *ABI5*) se expresan en el endosperma, *ABI4* se expresa en el embrión, su expresión decae en plántulas en desarrollo y luego tiene otro pico de expresión en la siguiente generación de semillas en maduración (Wind y col., 2013).

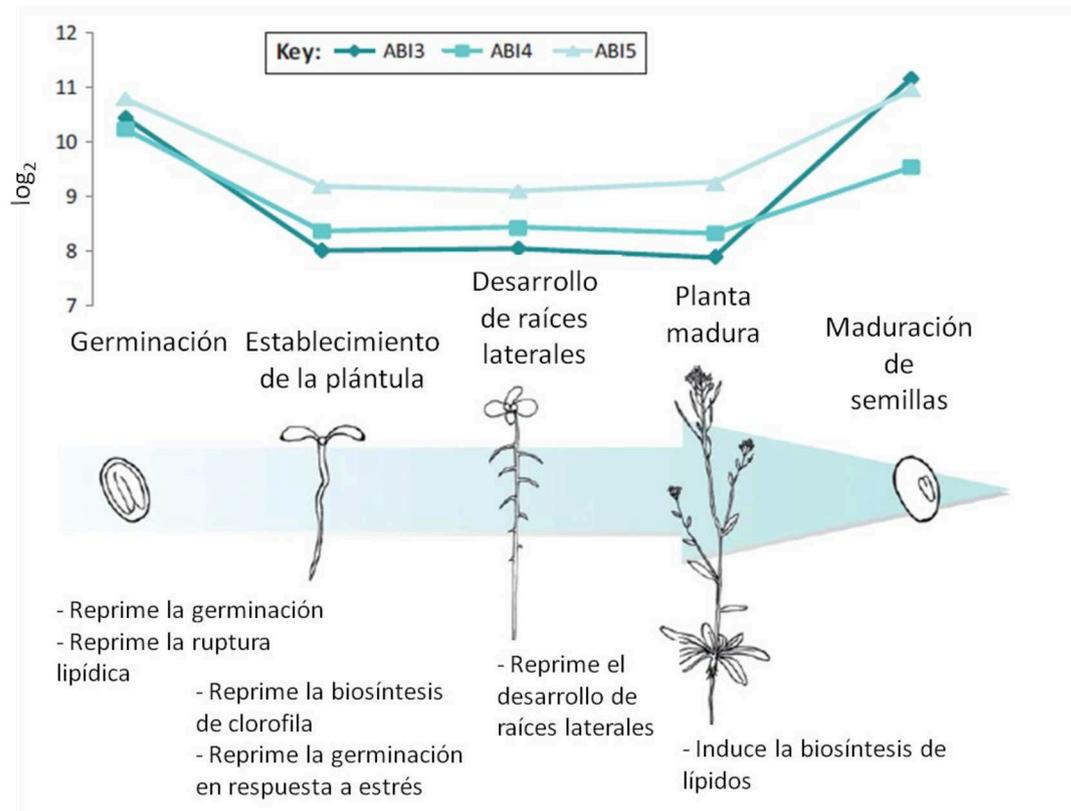


Figura 3: Expresión y función de ABI4 en el ciclo de vida de la planta. *ABI4* se expresa en germinación y desarrollo de semillas. Se muestra también la expresión de *ABI3* y *ABI5* en el desarrollo de la planta y se ve la coexpresión con *ABI4*. Se indican además los roles de *ABI4* en los distintos estados del desarrollo (adaptado de Wind y col., 2013).

En semillas en germinación, *ABI4* reprime la ruptura de lípidos y regula su movilización en el embrión (Penfield y col., 2006). En esta fase, los TAGs son movilizados y usados en la vía de la gluconeogénesis para proveer al embrión la energía necesaria hasta el momento en que pueda fotosintetizar. *ABI4* es inducido en el embrión por ABA y su expresión determina la sensibilidad de la semilla a esta hormona en la movilización de lípidos de reserva (Wind y col., 2013). *ABI4* también se induce fuertemente por glucosa (Arenas-Huertero y col., 2000; Cheng y col., 2002). En este sentido, se han caracterizado distintas mutantes involucradas en el metabolismo de azúcares que se postularon como alelos de *ABI4*. Esto sería consistente con una regulación cruzada entre la señalización de ABA y azúcares o con un papel de ambos en vías paralelas (Finkelstein y Gibson, 2001; León y Sheen, 2003; Wind y col., 2013).

IV.II – GAs: reguladoras positivas de la germinación

El efecto inhibitorio de ABA tiene que ser contrarrestado para que la semilla pueda germinar. En este proceso son claves las hormonas GAs. Las GAs son diterpenos tetracíclicos sintetizados principalmente en plástidos de tejidos apicales del vástago, que sufren un procesamiento hasta su forma activa en retículo endoplasmático y luego en citosol, y son transportadas vía floema. Las Gas regulan de manera negativa proteínas que reprimen la germinación y son esenciales en la activación de este proceso (Rajjou y col., 2012). Las mutantes deficientes en GA son incapaces de germinar sin el agregado de GAs exógenas y la síntesis *de Novo* de GA es necesaria en la imbibición. Además, la relación ABA/GA regula la transición metabólica necesaria para la germinación (Rajjou y col., 2012).

Los niveles de GA son inducidos en fases tempranas de la germinación por la madurez de las semillas, el frío y la luz. Estos factores afectan la regulación de la expresión de genes involucrados en su biosíntesis, los cuales codifican enzimas denominadas giberelina-oxidasas o GAox. GA3ox y GA20ox son enzimas clave en la biosíntesis de GA bioactiva, mientras que GA2ox es la enzima encargada de catalizar el pasaje de GA bioactiva a su forma inactiva. Los niveles relativos de expresión de estos genes determinan el predominio de una u otra forma de la hormona (Yamaguchi, 2008).

En la germinación de cereales, la GA es secretada desde los embriones a las células de la aleurona para promover la expresión de enzimas hidrolíticas como la α -amilasa. Estas enzimas son necesarias para la utilización de los carbohidratos de reserva almacenados en el endosperma de las semillas, para su germinación y en el establecimiento de la línea (Lovegrove y Hooley, 2000; Ritchie y Gilroy, 1998). Está descrito que en *Arabidopsis* la capa de células de la aleurona responden a GA y ABA y, aunque no hay descriptos mecanismos claros de regulación, esta capa es necesaria y suficiente para establecer la dormancia (Bethke y col., 2007).

Las evidencias obtenidas de estudios hechos en *Arabidopsis*, tabaco y tomate indican que la GA producto de la biosíntesis *de novo* reprime la expresión de genes represores

de la germinación, como por ejemplo *RGL2*⁷ de Arabidopsis (Wen y Chang, 2002), y al mismo tiempo induce la expresión de enzimas hidrolíticas de tipo β -1-3-glucanasas (Leubner-Metzger y Meins, 2000), endo- β -manaza (Nonogaki y col., 2000), distintas expansinas (Chen y col., 2001), xiloglucano-endotransglicosilasa (Chen y col., 2002) y AtEPR1, una proteína de tipo extensina de Arabidopsis (Dubreucq y col., 2000). Esta regulación culmina en la modificación de la pared celular y el debilitamiento del endosperma, lo que facilita la germinación (Lee y col., 2002; Peng y Harberd, 2002).

V – Sustancias de reserva en germinación

Una vez que la germinación se desencadena, los embriones deben lograr establecerse como plántulas. Antes de poder realizar la fotosíntesis estos organismos utilizan sustancias de reserva como fuente de energía. En su desarrollo, las semillas acumulan en general tres tipos de sustancias de reserva: proteínas, carbohidratos (sacarosa o almidón) y lípidos (en general triacilglicéridos o TAGs). Las distintas especies de plantas muestran grandes variaciones en las proporciones de carbohidratos, aceites y proteínas que acumulan en sus semillas. Por ejemplo, la mayoría de los cereales contienen alrededor de 85% de almidón, mientras las leguminosas como la soja contienen alrededor del 40% del peso seco de sus semillas ocupado por proteínas y muchas de las oleaginosas como Arabidopsis y girasol producen entre 50 y 70% de aceite (Eastmond y Graham, 2001; Lehner y col., 2006; Li-Beisson y col., 2013; Pfeiffer y Kutschera, 1996; Siloto y col., 2006; Theodoulou y Eastmond, 2012). En estas especies el almacenamiento eficiente de lípidos en las semillas es esencial para el establecimiento de la línea, que a su vez es de importancia fundamental para el desempeño de la planta en el campo. En la Figura 4 se muestran esquemas de las semillas de girasol y Arabidopsis, objeto de estudio de esta Tesis.

⁷RGL2: es una proteína de tipo DELLA, reguladora negativa de respuesta a GA

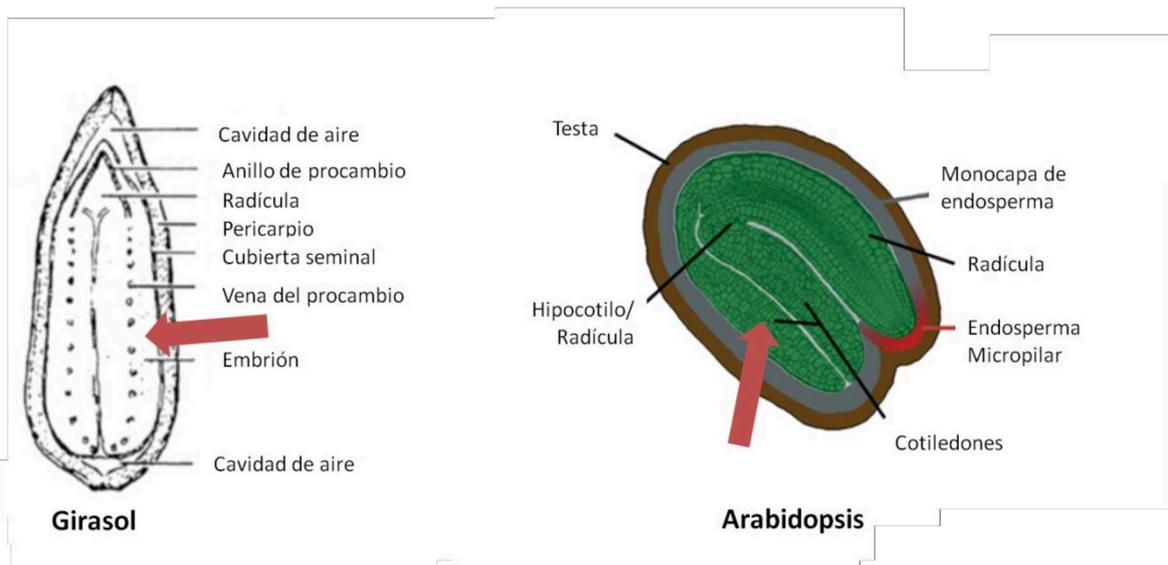


Figura 4: Morfología de las semillas de girasol y de Arabidopsis. Izquierda, se detallan las partes de una semilla de girasol. Derecha, se indican las estructuras de una semilla de Arabidopsis (adaptado de Finch-Savage y col., 2006).

Las sustancias de reserva son generalmente compuestos insolubles que tienen la propiedad de permanecer intactos aún cuando la semilla se encuentra seca por períodos prolongados. En la germinación deben ser movilizadas y convertidas rápidamente en metabolitos solubles disponibles para que la planta logre establecerse antes de que se agoten (Graham, 2008).

En semillas oleaginosas durante las primeras horas de embebidas, el embrión obtiene la energía que necesita principalmente de la degradación de carbohidratos de reserva. Luego de la germinación, comienza a consumir en mayor medida lípidos, que son principalmente TAGs (Chia y col., 2005; Eastmond, 2006; Eastmond y Graham, 2001; Graham, 2008; Penfield y col., 2005).

Los TAGs son ésteres derivados de una molécula de glicerol y tres ácidos grasos que se sintetizan en el retículo endoplasmático y se encuentran empaquetados en “gotas de aceite” (GdA). Las GdA provienen del retículo endoplasmático y están rodeadas por una monocapa de fosfolípidos con proteínas asociadas. Estas proteínas se denominan oleosinas y están involucradas en determinar el tamaño de las GdA (Huang, 1992; Siloto y col., 2006). La movilización de los TAGs contenidos en las GdA involucra la inducción coordinada de distintas rutas metabólicas en diferentes localizaciones subcelulares (Figura 5). El primer paso en la ruptura de TAGs es realizado por lipasas

(EC: 3.1.1.3), que catalizan la hidrólisis de los TAGs liberando ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos ingresan en los glioxisomas, donde la β -oxidación los convierte en acetil-CoA que luego se condensa en un compuesto de 4 carbonos por medio del ciclo delglioxilato. Este compuesto de 4 carbonos es transportado a la mitocondria, convertido a oxalacetato vía malato y puede seguir dos caminos: ser transportado al citosol donde será sustrato de la gluconeogénesis o eventualmente seguir la vía de la respiración, aunque este último proceso está desfavorecido en semillas en germinación. Si se utiliza en gluconeogénesis, la enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) cataliza la conversión de oxalacetato en PEP como primer paso de la vía que culmina en la producción de sacarosa (Figura 5, Eastmond y Graham, 2001; Graham, 2008; Kelly y col., 2011; Li-Beisson y col., 2013; Penfield y col., 2005; Quettier y Eastmond, 2009).

Este proceso es muy importante principalmente en el crecimiento posgerminativo de la plántula. Las mutantes de *Arabidopsis* en una lipasa clave en este estadio denominada “dependiente de azúcar 1” (*SDP1*, del inglés Sugar DePendent 1) no logran establecer la línea regularmente sin el agregado de sacarosa exógena dado que no son capaces de consumir los TAGs de reserva. Asimismo, las plantas que tienen silenciado el gen codificante de PEPCK necesitan del agregado exógeno de sacarosa para lograr establecerse normalmente como plántulas. Estas líneas tienen comprometida su habilidad para utilizar los lípidos y las proteínas de reserva en la producción de azúcares solubles por medio de la gluconeogénesis (Eastmond, 2006; Rylott y col., 2003).

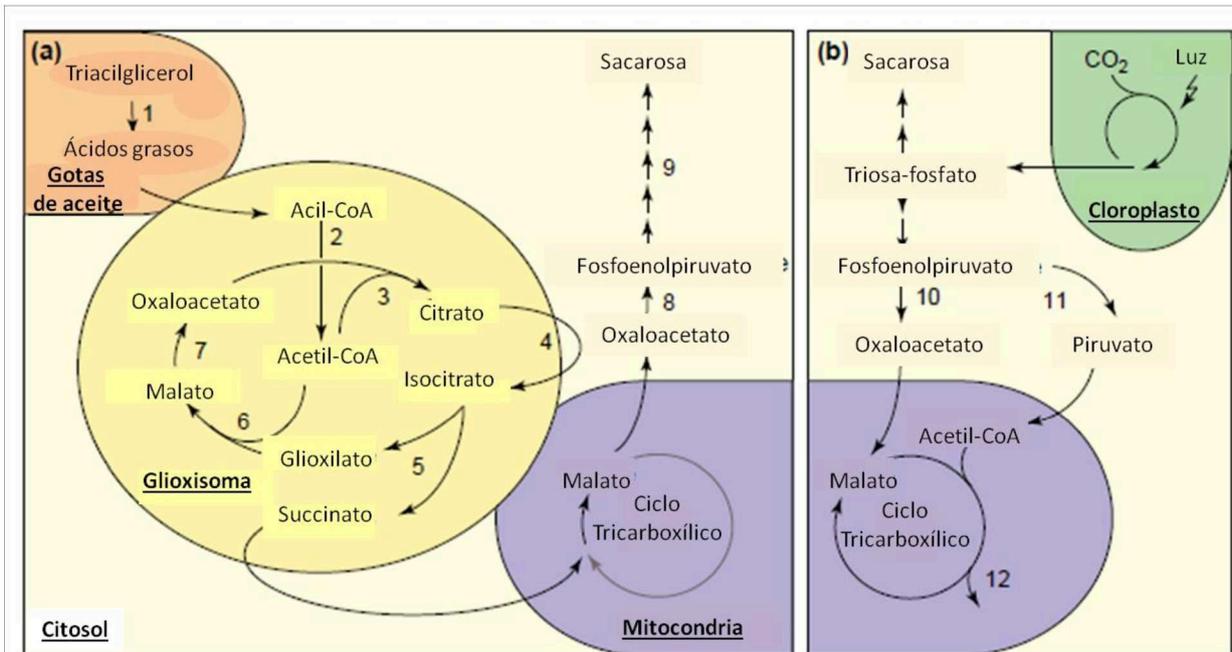


Figura 5: Transición metabólica de crecimiento heterótrofo a autótrofo en una semilla oleaginosa durante el crecimiento posgerminativo. En la figura se muestra el cambio del metabolismo en las células de un embrión heterótrofo (a) a autótrofo (b). Los números representan enzimas y reacciones catalizadas por las mismas: **1** (triacilglicerol-lipasa); **2** (enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos); **3** (citrato-sintasa); **4** (aconitasa); **5** (isocitrato-liasa); **6** (malato-sintasa); **7** (malato-deshidrogenasa); **8** (PEPCK: fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa); **9** (gluconeogénesis); **10** (fosfoenolpiruvato-carboxilasa); **11** (piruvato-quinasa); **12** (rutas biosintéticas por ejemplo, aminoácidos, purinas, clorofila, etc; adaptado de Eastmond y col., 2001) .

VI – ¿Cómo se acumulan las sustancias de reserva en las semillas?

El desarrollo de la semilla se divide en dos etapas sucesivas aunque levemente solapadas, la morfogénesis del embrión y la maduración de la semilla. En la fase de maduración se acumulan las sustancias de reserva y se induce la dormancia mediante la adquisición de la tolerancia a la desecación y finalmente de la quiescencia metabólica (Graeber y col., 2012; Graham, 2008). En la Figura 6 se muestra el perfil de acumulación de las distintas sustancias de reserva a lo largo del desarrollo de la semilla.

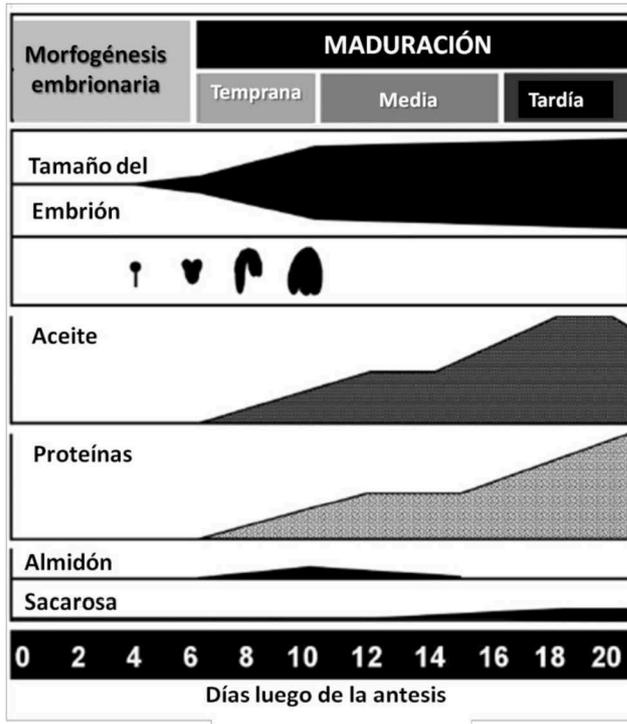


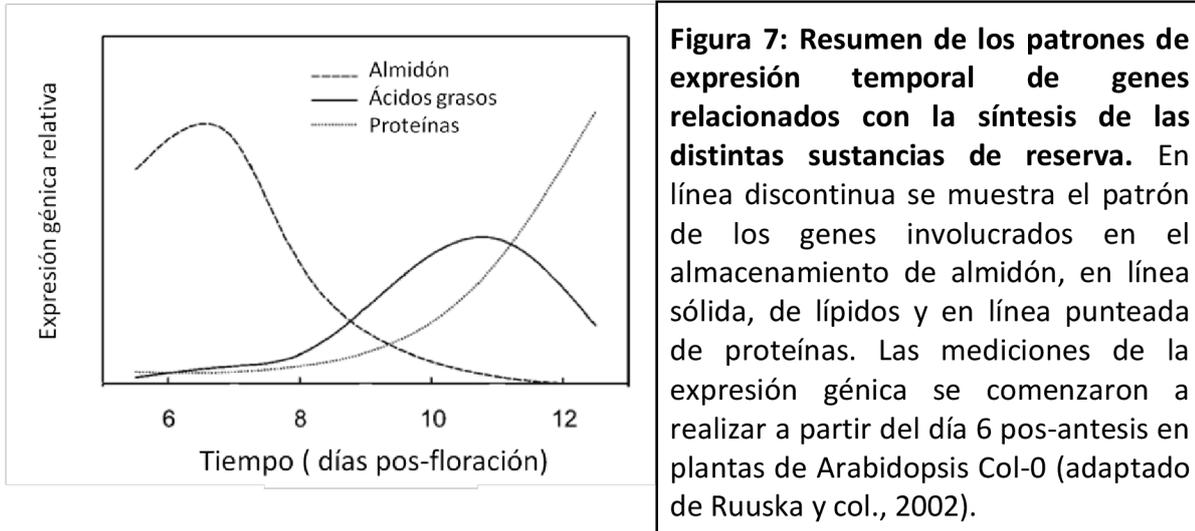
Figura 6: Acumulación de sustancias de reserva en el desarrollo de la semilla. Los datos corresponden a semillas de Arabidopsis ecotipo WS. Se muestran las etapas de desarrollo, el tamaño del embrión y una imagen representativa de la morfología del embrión en distintos estadios. Más abajo se ve el perfil del contenido de las sustancias de reserva: aceites (como TAGs); proteínas y carbohidratos (sacarosa y almidón). En la parte inferior se muestran los días transcurridos a partir de la antesis (adaptado de Baud y col., 2008).

Las rutas metabólicas por las que se sintetizan los compuestos de reserva son ampliamente conocidas pero los factores que determinan las proporciones relativas en las que se sintetizan no han sido descritos íntegramente. La acumulación de las distintas sustancias de reserva requiere la coordinación de muchos genes que codifican las enzimas de cada vía (Baud y col., 2008; Ruuska y col., 2002). Dado que las plantas oleaginosas, acumulan más TAGs que cualquier otra sustancia de reserva y que, para este capítulo, la acumulación y movilización de los TAGs es de relevancia, se describirá a seguir el rol que los FTs tienen en la acumulación de los TAGs en la semilla.

VI.1 – El papel de los factores de transcripción en la acumulación de reservas en las semillas

Los programas de expresión génica relacionados con el proceso de acumulación de sustancias de reserva se activan en la fase de maduración de las semillas y se apagan en las fases vegetativas del desarrollo de las plantas (Baud y Graham, 2006; O'Hara y col., 2002). En la Figura 7 se muestran los datos de un estudio de microarreglos en el que se determinaron los niveles de ARNm en semillas de Arabidopsis en formación y, a

través de sus resultados, se infirió el patrón de expresión de genes involucrados en la síntesis de sustancias de reserva durante el llenado de semillas (Ruuska y col., 2002). Estos resultados sugieren que diferentes redes génicas regulan estas vías de síntesis separadamente.



A través de los resultados de otros estudios genéticos realizados en maíz y Arabidopsis, se identificaron tres FTs que son clave en el control de los programas de expresión génica que acompañan la maduración de la semilla: LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1), LEC2, y FUSCA3 (FUS3), todos ellos con un dominio de unión a ADN "B3". Estos activadores interactúan con otros FTs como PICKLE, ABI5 y WRI1 que participan en el desarrollo de las semillas y en la acumulación de las sustancias de reserva y también están involucrados en las vías de señalización de azúcares y hormonas (Baud y Lepiniec, 2010; Graeber y col., 2012; Santos-Mendoza y col., 2008). En general, mutantes con pérdida de funcionalidad de estos genes presentan defectos severos en la acumulación de lípidos (Bäumlein y col., 1994; Focks y Benning, 1998; Meinke y col., 1994; Stone y col., 2001).

VI.II – Los factores de transcripción WRKY y las semillas

Los FTs de la familia WRKY son reguladores claves en el desarrollo de las semillas, en su germinación y en el crecimiento posgerminativo. En cebada, un FT del grupo I de la familia WRKY denominado SUSIBA2 regula la síntesis de almidón en el endosperma (Sun y col., 2003). Otras proteínas de tipo WRKY regulan la embriogénesis (Lagacé y Matton, 2004), el tamaño de la semilla (Luo y col., 2005) y el desarrollo de la envoltura seminal (Johnson y col., 2002).

Además, se encuentran disponibles muchos trabajos que vinculan a los FT de tipo WRKY con la respuesta/señalización hormonal en germinación y desarrollo posgerminativo (Chen y col., 2012; Ren y col., 2010; Rushton y col., 2012; Shang y col., 2010; Xie y col., 2006). Por ejemplo, en avena silvestre las proteínas de tipo WRKY, ABF1 y ABF2 se unen a una caja en el promotor de la α -amilasa (una enzima clave en el clivaje de los carbohidratos usados para germinar), que también es regulado por GA (Rushton y col., 1995). En cebada, HvWRKY38 actúa como un represor transcripcional de los genes de respuesta a GA en las células de la aleurona y es regulado por GA, ABA y SA (Xie y col., 2007; Zou y col., 2008). OsWRKY71 y OsWRKY51 de arroz se reprimen por GAs y se inducen por ABA en las células de la aleurona, y la sobreexpresión conjunta de estos FTs inhibe la expresión de la α -amilasa (Xie y col., 2006; Zhang y col., 2009). AtWRKY2 de Arabidopsis es una proteína de respuesta a ABA que media el bloqueo de la germinación y del desarrollo posgerminativo provocado por esta hormona (Jiang y Yu, 2009).

VII – Biotecnología y fitomejoramiento de la mano: plantas oleaginosas como biofábricas de materia prima para la industria

Los TAGs son utilizados para alimentación indispensable de animales y como potenciales reemplazos sustentables de los combustibles fósiles para aplicarlos en áreas que van desde lubricantes, polímeros, pinturas y solventes a tintas, colorantes, cosméticos y surfactantes (Graeber y col., 2012; Graham, 2008; Jaworski y Cahoon, 2003; Metzger y Bornscheuer, 2006). Además, sumados a los de las microalgas, los

aceites derivados de las plantas también están siendo utilizados en la producción de biodiesel (Durrett y col., 2008; Hill y col., 2006; Lu y col., 2011).

Como las plantas producen en total más de 500 tipos de ácidos grasos con distintas características, se plantean oportunidades para lograr, por medio de la biotecnología, una nueva generación de cultivos oleaginosos (Cahoon y col., 2007; Graham y col., 2007; Napier, 2007; Somerville y Bonetta, 2001). Sin embargo, el abastecimiento de estos compuestos ricos en energía es limitado por los rendimientos actuales y la disponibilidad de tierras arables (Weselake y col., 2009).

La pregunta que surge inmediatamente es ¿cómo producir más aceite? En general el flujo a vías metabólicas particulares se puede controlar incrementando el abastecimiento de sustratos, es decir, incrementando los sustratos que sirven de fuente, o bien, aumentando la demanda del sumidero cuando es insuficiente para aprovechar los fotosintatos producidos en la fuente (Bates y col., 2013).

En un principio, se aplicó el método clásico de selección de filiales provenientes de cruzamientos y, más recientemente, se ha sumado la genética molecular y la ingeniería metabólica. Hasta el momento, los mejores resultados buscados a través de los últimos métodos surgieron de la expresión diferencial individual de la secuencia codificante de distintas enzimas del metabolismo de los TAGs. Sin embargo, hay estudios recientes en los que se modifica la expresión de más de un gen, entre ellos algunos que codifican FTs, con resultados favorables y hasta sorprendentes (Tabla 1).

Otra aproximación para suplir la demanda creciente de aceites vegetales es introducir cultivos nuevos o subutilizados, que sean capaces de crecer en climas áridos o semiáridos o en suelos menos fértiles y no aptos para los cultivos tradicionales, como la soja o la colza. También existe la posibilidad de aplicar la ingeniería metabólica a cultivos oleaginosos no comestibles con el fin de crear nuevas composiciones de aceites para aplicaciones industriales (Sanjaya y col., 2011).

Gen que se sobreexpresa	Proceso biológico en el que participa	Planta en la que se observó el fenotipo	Incremento en el contenido de aceite respecto del control	Bibliografía
Acetil-CoACarboxilasa	Metabolismo	Arabidopsis	6,25%	(Roesler y col., 1997)
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	Metabolismo	<i>B. napus</i>	Entre 32 y 50%	(Vigeolas y col., 2007)
Glicerol-3-fosfato aciltransferasa	Metabolismo		Entre 7 y 22 %	(Jain y col., 2000)
DGAT1	Metabolismo	Maíz, Arabidopsis, <i>B. napus</i>	Entre 5 y 8 %	(Jako y col., 2001; Weselake y col., 2007; Zheng y col., 2008)
DGAT2	Síntesis de TAGs	Soja	Entre 11 y 13%	(Lardizabal y col., 2008)
WRI1	Transcripción	Arabidopsis	Entre 10 y 20%	(Cernac y Benning, 2004)
FT de tipo DOF	Transcripción	Arabidopsis	Entre 5.3 y 9.1%,	(Wang y col., 2007b)
LEC1	Transcripción	Maíz	48%	(Shen y col., 2010)
LEC1 + WRI1	Transcripción	Maíz	17-31% (dependiendo del promotor)	(Shen y col., 2010)
AGPRNAi-WRI1	Metabolismo (AGPR) Transcripción (WRI1)	Arabidopsis	5 veces más	(Sanjaya y col., 2011)
DGAT-WRI1	Metabolismo (DGAT) Transcripción (WRI1)	Tabaco	Casi 100 veces más (hojas)	(Vanhercke y col., 2013)

Tabla 1: Genes que confieren a las plantas que los expresan de forma diferencial mayor contenido de aceite de reserva respecto a las plantas no transformadas. Se muestran en la tabla los genes en cuestión, su relación con la acumulación de lípidos, la especie en la que se observa el fenotipo, el incremento respecto de su control salvaje y la bibliografía de la que se tomaron los datos.

En este Capítulo nos propusimos caracterizar a HaWRKY10 (*Heliantus annuus* **WRKY10**), un FT de girasol de tipo WRKY que pertenece a la familia IId pero que, a diferencia de HaWRKY76, presenta un dominio de unión a ADN típico.

RESULTADOS

I – HaWRKY10 se expresa diferencialmente en la germinación de semillas de girasol y es regulado por ABA y GA

Para comenzar la caracterización de HaWRKY10 se decidió determinar su patrón de expresión, para lo que se realizaron ensayos usando muestras de distintos órganos y estadios de desarrollo. Las plántulas de girasol de siete y trece días no mostraron una expresión diferencial de HaWRKY10 entre los diferentes órganos. También se realizaron ensayos en plántulas de una semana de vida sometidas a tratamientos hormonales y de estrés abiótico y no se observaron diferencias significativas en la regulación de *HaWRKY10* en ninguna de las condiciones ensayadas (resultados no presentados).

En consecuencia, se exploraron otros estadios y órganos. A continuación, se determinó el patrón de expresión de *HaWRKY10* en semillas en dormancia y en semillas germinadas al cabo de un día. *HaWRKY10* se encontró reprimido en semillas un día luego de embebidas, comparadas con aquellas en dormancia (Figura 8).

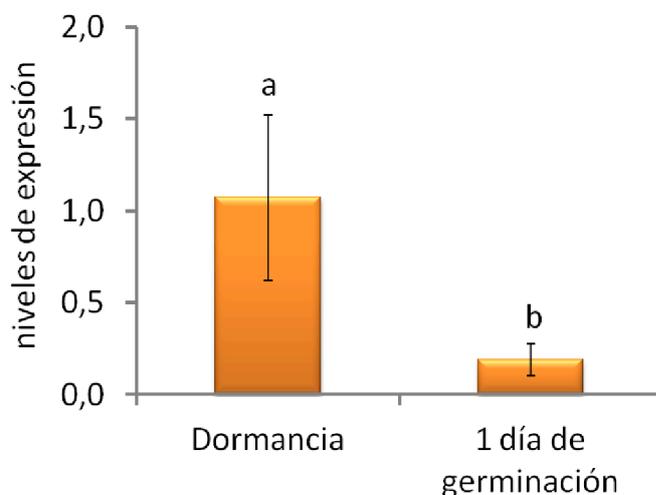


Figura 8: *HaWRKY10* es regulado en germinación. Niveles de transcritos de *HaWRKY10* en embriones de semillas en dormancia y germinadas durante un día. Se le asignó arbitrariamente el valor 1 a los niveles de transcritos en dormancia. Las barras de error corresponden a triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Como al día de estar embebidas las radículas ya logran protruir a través del tegumento, y por lo tanto se producen cambios fisiológicos significativos, se decidió evaluar el patrón de expresión de *HaWRKY10* en semillas en germinación, desde la imbibición de la semilla hasta la emergencia de la radícula. Como el ensayo planteado requería tomar muestras a intervalos previos a la observación directa de cualquier fenotipo evidente, fue necesario recurrir a una variable que permitiera estimar que todas las semillas estuvieran en el mismo estadio fenológico. Para eso, se utilizó como herramienta la absorción de agua trifásica que presentan las semillas, ilustrada en la Figura 1. De esta forma, se consideró que los individuos que incorporasen el mismo porcentaje de agua, relativo al peso inicial de la semilla, germinarían en forma semisincronizada y estarían en el mismo estadio fenológico.

Se evaluaron distintas líneas de girasol que presentaron variabilidad en los porcentajes de agua absorbida (Figura 9) y en los tiempos de germinación (resultados no presentados). Las semillas del genotipo CF31 mostraron valores de toma de agua menos fluctuantes que los de los genotipos HA89 y CF33. Aún así se distinguieron dos grupos, uno que presentó una tasa baja de incorporación de agua y otro grupo que tomó más rápidamente agua y germinó antes. Por esta razón, se trabajó con este último grupo y todos los ensayos con girasol detallados a continuación se realizaron con el genotipo CF31.

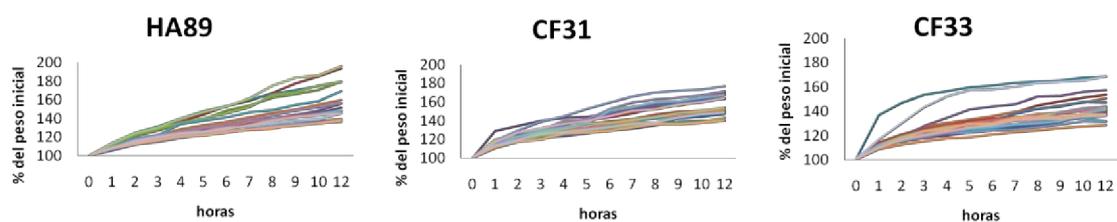


Figura 9: La variedad CF31 presenta un comportamiento más parejo en la toma de agua que las variedades CF33 y HA89. Peso de treinta semillas a lo largo del tiempo expresado como porcentaje del peso inicial. Las semillas se pesaron antes de embeberse y se continuaron pesando a lo largo del tiempo en los momentos indicados en los gráficos. Cada curva representa el comportamiento de una semilla individual.

En la Figura 10 se muestra que *HaWRKY10* presentó un pico de expresión a las nueve horas de embebida la semilla y luego decayó una vez que la radícula había protruido a través del tegumento a las 24 horas. Estos resultados muestran una tendencia de disminución de la expresión de *HaWRKY10* al día de germinadas las semillas, que se condice con lo observado en la Figura 8.

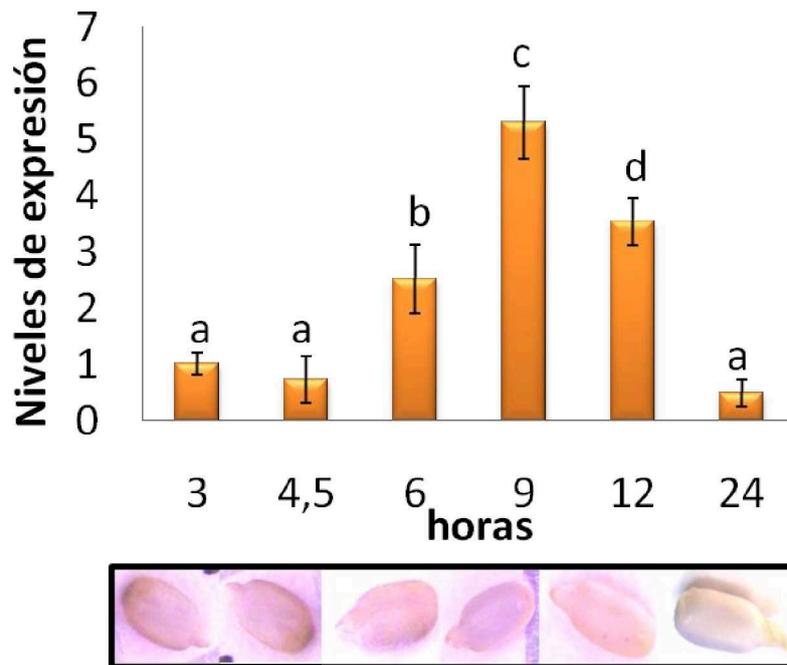


Figura 10: *HaWRKY10* tiene un pico de expresión a las 9 horas de embebida la semilla. Arriba: niveles de expresión de *HaWRKY10* en embriones germinados durante las horas que indica la figura, medidos por RT-qPCR. A la muestra de tres horas se le asignó valor 1 de forma arbitraria. Abajo: fotografía de los embriones al momento de la toma de muestra. Las barras de error son 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 $p < 0,05$.

Con la información de que *HaWRKY10* presentó un pico de expresión aproximadamente a las nueve horas de embebida la semilla, se decidió determinar el impacto del tratamiento con hormonas. Se eligieron para el ensayo GA y ABA que son las hormonas vinculadas a la regulación de la germinación con más información acumulada al respecto. A su vez, se decidió evaluar si la expresión del gen era diferencialmente regulada en los órganos del embrión: radícula o raíz embrionaria (junto con el hipocotilo) y cotiledones (junto con la plúmula).

Como se observa en la Figura 11, en condiciones control los niveles de los transcritos de *HaWRKY10* no difirieron entre raíces y cotiledones a las nueve horas de embebida la semilla. Sin embargo, cuando las semillas fueron tratadas con 10 ó 100 μM de ABA se observó una clara represión exclusivamente en los cotiledones. De la misma manera, cuando las semillas se trataron con 100 μM de GA se observó una inducción de alrededor de 8 veces en los cotiledones de los embriones comparados con los cotiledones control. Esto indica que la expresión de *HaWRKY10* está regulada durante la imbibición de la semilla y por las hormonas ABA y GA, específicamente en cotiledones.

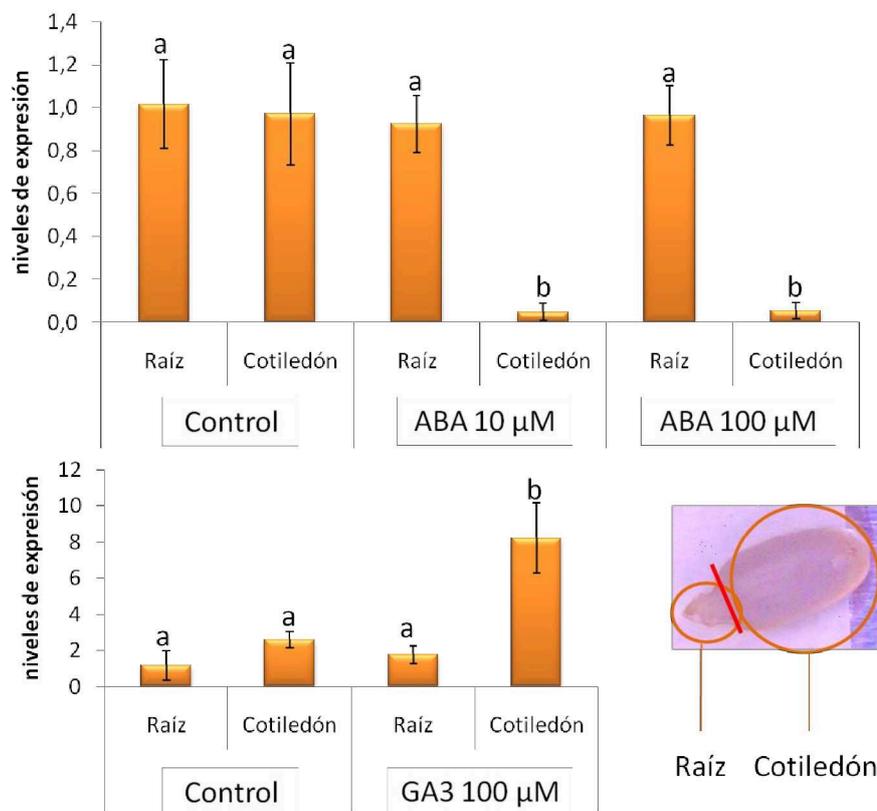


Figura 11: *HaWRKY10* está regulado por las hormonas ABA y GA. Expresión de *HaWRKY10* en semillas germinadas durante nueve horas en los distintos tratamientos que se indican en la figura. Arriba: control y tratamiento con ABA 10 μM y ABA 100 μM . Abajo: control y tratamiento con GA₃ 100 μM (GA bioactiva). En ambos casos los niveles de transcritos se relativizaron a los de raíz en condiciones control, que se tomaron como 1 arbitrariamente. Se separaron los embriones en raíces y cotiledones como se ilustra en la fotografía (abajo a la derecha). Las barras de error son 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 $p < 0,05$.

II – HaWRKY10 y su relación con el consumo de las sustancias de reserva

Como el cotiledón es el órgano que, en especies como el girasol, tiene por función esencial acumular las sustancias de reserva y *HaWRKY10* está regulado de forma específica en este órgano, se planteó que *HaWRKY10* podría participar en funciones asociadas con la acumulación, movilización o consumo de sustancias de reserva. En consecuencia, se realizaron cinéticas de la germinación y del crecimiento posgerminativo en condiciones estándar de cultivo. Durante la germinación se midieron los niveles de carbohidratos, de lípidos y de proteínas totales en los embriones. Durante el crecimiento posgerminativo, se midieron los niveles de carbohidratos, de lípidos y también de clorofila, cuyo incremento marca la transición entre hetetrofismo y autotrofismo. Los niveles de proteínas no se cuantificaron durante el crecimiento posgerminativo debido a que en la bibliografía no se describe su importancia en el establecimiento de las líneas de semillas oleaginosas.

En la Figura 12 se muestran las curvas obtenidas durante la germinación. Si se analizan las curvas en forma global y se las compara con los niveles de expresión de *HaWRKY10*, se concluye que, sólo en el caso de los lípidos, la reserva a lo largo de las horas disminuyó de forma inversamente proporcional a la expresión de *HaWRKY10* ($\rho^8 = -1$ $p < 0,05$). Por otra parte, las curvas pueden analizarse en tres períodos. Entre las tres y las siete horas de embebida la semilla se consumieron principalmente los azúcares solubles (70 % de la reserva de glucosa y 25 % de la de sacarosa en promedio), aunque también hubo una movilización importante de lípidos (26 %) y de proteínas (16 %). Entre las siete y las nueve horas se movilizaron las reservas de almidón (24 % en promedio) y continuaron movilizándose las de lípidos (23 %). Los niveles de glucosa y de sacarosa se mantuvieron probablemente por su consumo inmediato. Entre las nueve y las doce horas el consumo de sacarosa se vio reflejado en la caída de sus niveles (se consumió en promedio en este tiempo el 28 % de la sacarosa). En este período el resto de las sustancias de reserva no mostraron cambios mayores.

⁸ ρ : coeficiente de correlación de Spearman

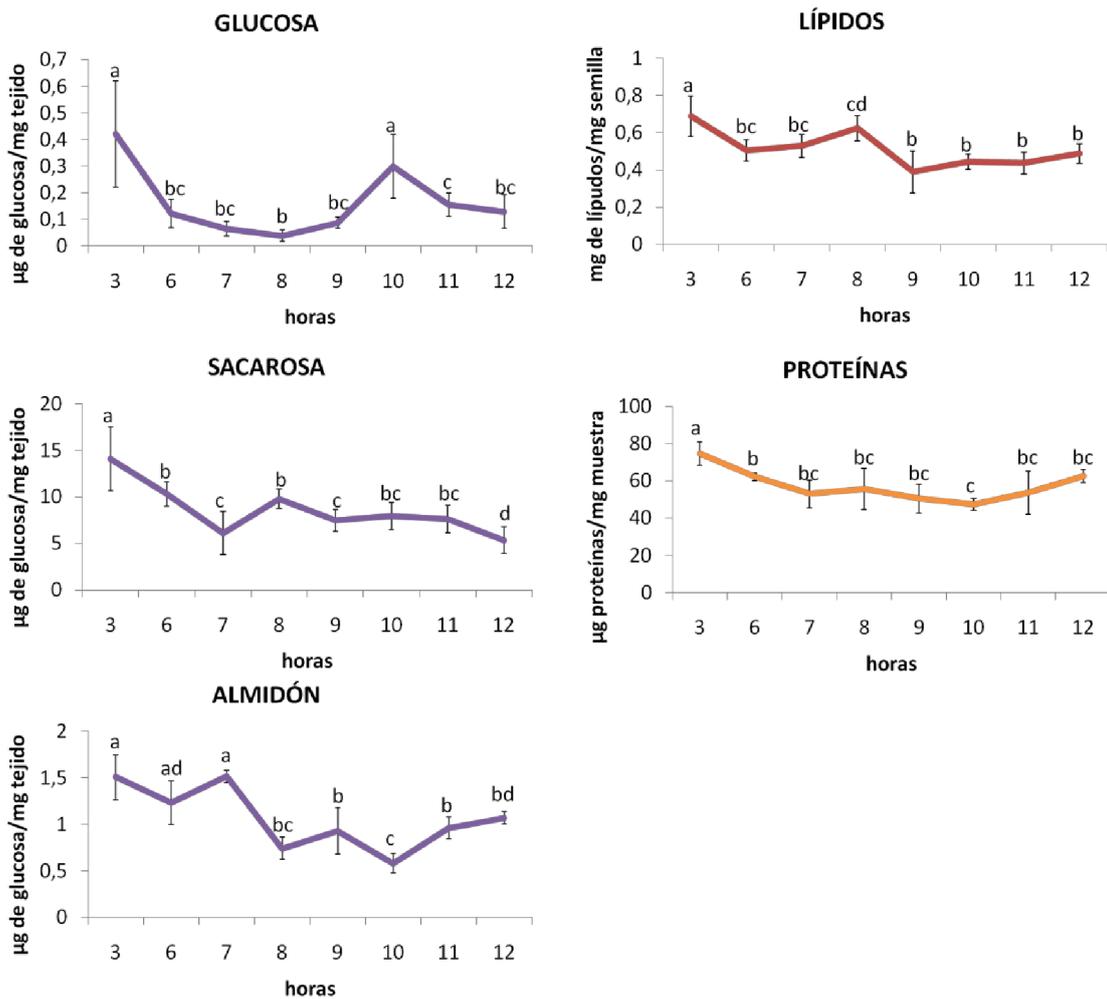


Figura 12: Los embriones utilizan lípidos y carbohidratos como fuente de energía para germinar. Se realizó una cinética del contenido de sustancias de reserva durante las doce primeras horas de germinación. Las semillas se embebieron en agua y se cuantificó el contenido de glucosa, sacarosa y almidón (violeta), proteínas (anaranjado) y lípidos (colorado) en los tiempos que se indican en las figuras. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de triplicados/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 Figura 13 muestra el patrón de expresión de *HaWRKY10* en el desarrollo posgerminativo. El incremento en la expresión de este FT fue notable a los 4 días y se mantuvo al menos hasta el día 7. Un análisis global nuevamente reveló que las reservas de lípidos variaron con el tiempo siguiendo un patrón inversamente proporcional al aumento de los niveles de transcritos de *HaWRKY10* ($\rho=-0,94$ $p<0,05$). En cuanto a los carbohidratos, en los primeros 2 días se consumió principalmente sacarosa (39 %) que luego se mantuvo constante. La glucosa fue aumentando lentamente, posiblemente con el aumento de clorofila y la capacidad de fotosintetizar de la planta. El almidón no registró cambios.

Todos estos datos sugirieron que *HaWRKY10* tendría un papel en el proceso de germinación y en el crecimiento posgerminativo, asociado a la movilización diferencial de sustancias de reserva, particularmente lípidos.

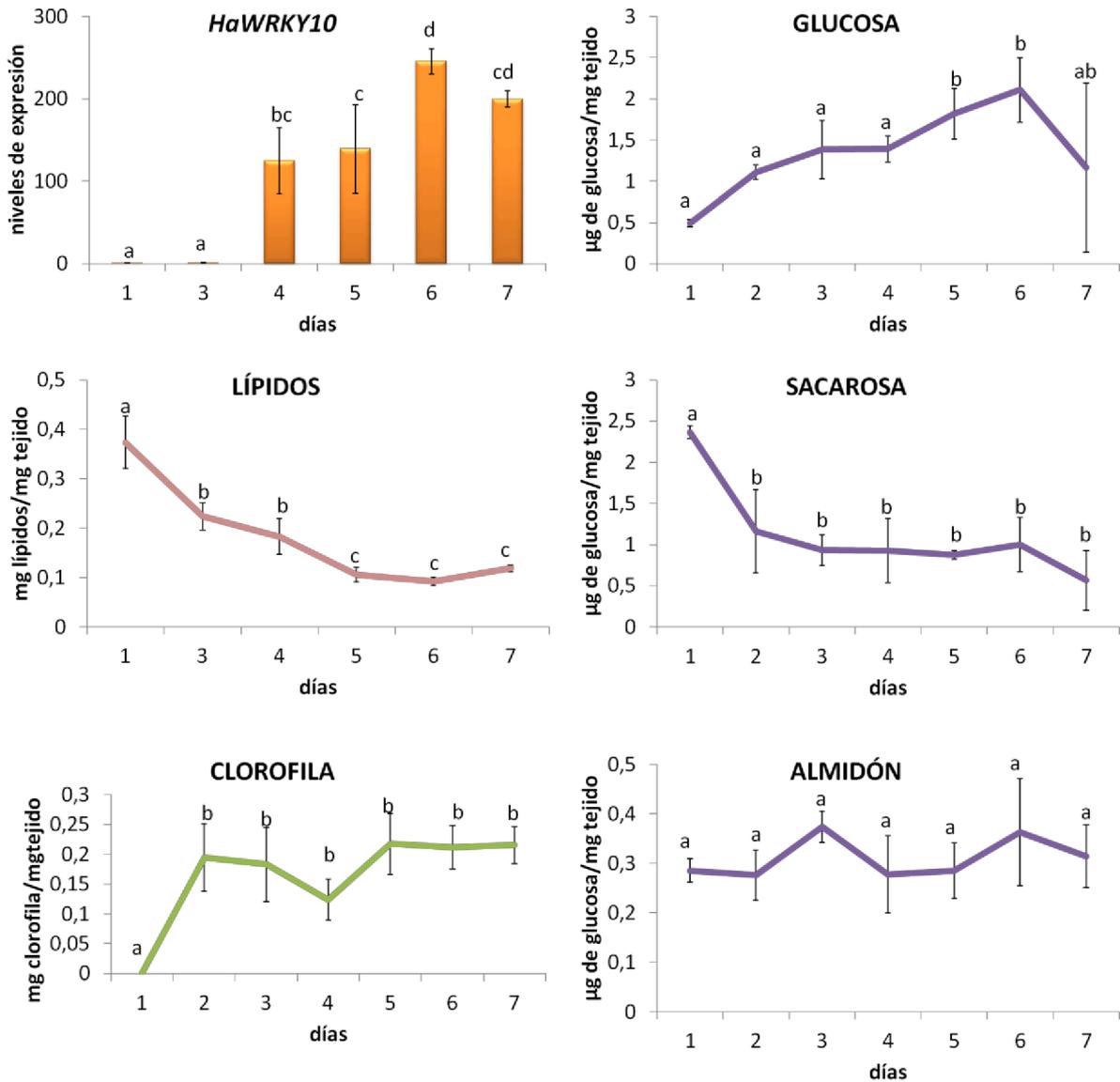


Figura 13: El patrón de expresión de *HaWRKY10* es inversamente proporcional al perfil de utilización de lípidos. Niveles de expresión de *HaWRKY10* medidos por RT-qPCR en los días indicados en la figura. Se tomó arbitrariamente el día 3 y se le asignó el valor de 1 (barras anaranjadas). Cinética de medición de carbohidratos (línea violeta), lípidos (línea colorada) y clorofila (línea verde) durante los 7 días siguientes a embeber la semilla. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados/cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

III – HaWRKY10 se expresa diferencialmente en el llenado de achenios

Debido a que las sustancias de reserva se acumulan durante el llenado de semillas hacia el final del ciclo de vida de plantas como las de girasol, se midió el comportamiento de *HaWRKY10* y la acumulación de sustancias de reserva durante el desarrollo de la inflorescencia desde el estadio R5 al R9 y luego en el embrión, durante su formación desde el estadio R5.6 al R5.9 (Schneiter y Miller, 1981).

Como se observa en la Figura 14, *HaWRKY10* tuvo un pico de expresión en los achenios en la primera fase del desarrollo (R5.6), cuando las sustancias de reserva comenzaron a acumularse. Tanto los niveles de almidón como de glucosa aumentaron poco después (R5.9), si bien los de glucosa cayeron abruptamente y se mantuvieron en niveles basales una vez que el llenado de achenios comenzó, lo que podría deberse a su inmediata utilización. En cambio, los niveles de almidón cayeron paulatinamente. Los lípidos siguieron una trayectoria inversa: se incrementaron hasta R7, se mantuvieron estables hasta R8 y luego cayeron levemente en R9, como consecuencia del gasto energético necesario para terminar de definir la dormancia de la semilla (Baud y col., 2008).

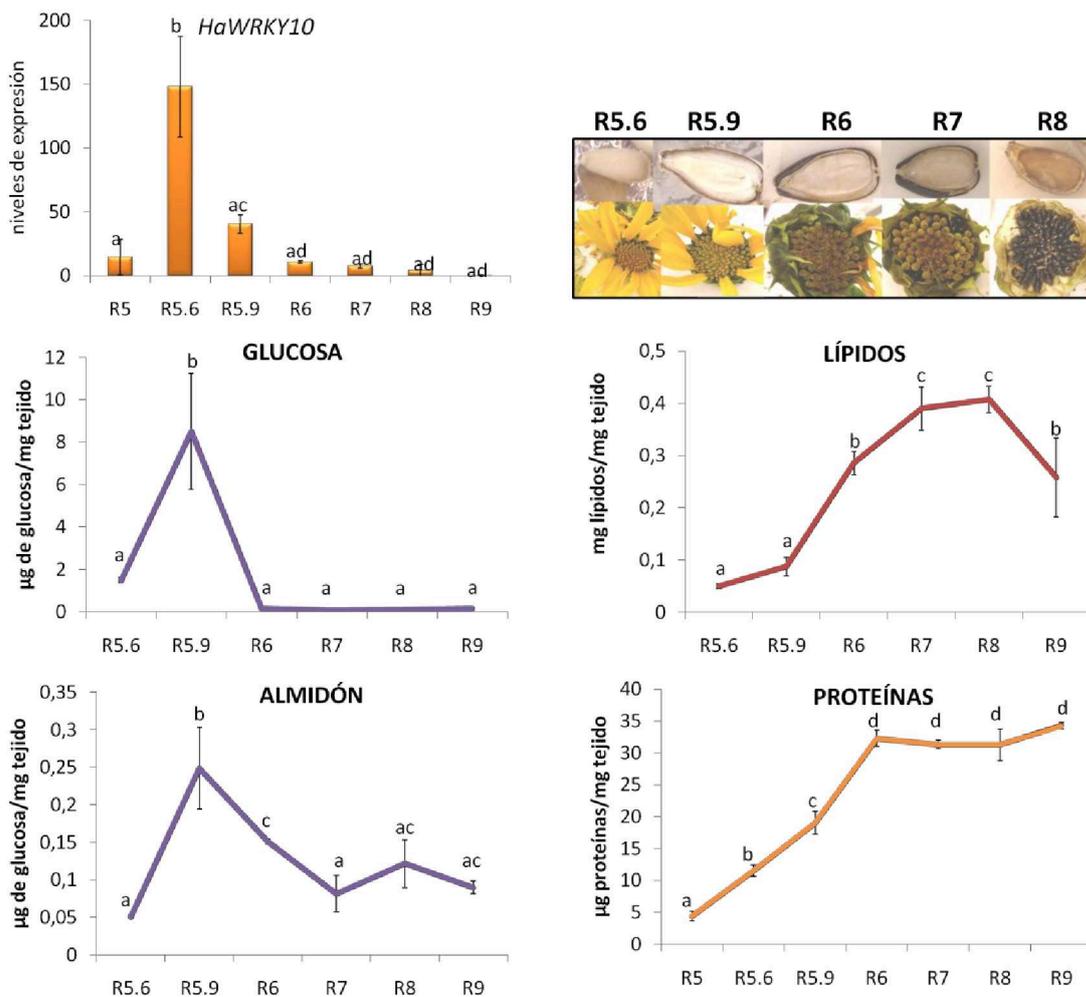


Figura 14: *HaWRKY10* tiene un pico de expresión en aquenios al inicio del desarrollo. Las muestras se tomaron en los momentos que se indican en la figura. En la parte superior centrada de cada gráfico se indica la sustancia de reserva cuantificada. Izquierda, arriba: Se muestra la expresión de *HaWRKY10* medidos por RT-qPCR en los estadios de desarrollo indicados en la figura. Se tomó arbitrariamente el estadio R9 y se le asignó el valor de 1 (barras naranjas). Derecha, arriba: fotografías ilustrativas del estadio de desarrollo de un corte longitudinal del aquenio y del capítulo en cada punto de muestreo. También se midieron los carbohidratos (líneas violetas), las proteínas (líneas anaranjadas) y los lípidos (líneas coloradas). Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados/cuadruplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

IV – Las semillas de plantas transgénicas que expresan HaWRKY10 constitutivamente son más susceptibles al ABA en la germinación y en el establecimiento de la línea

Con el fin de ahondar en el estudio de la función de HaWRKY10 en girasol, se generaron líneas transgénicas de Arabidopsis cuyos fenotipos fueron caracterizados. Primeramente, como la secuencia completa del ADNc de *HaWRKY10* no estaba disponible en bases de datos, se obtuvo la región codificante desconocida por 3' RACE y luego se clonó el ADNc de *HaWRKY10* completo, bajo el control del promotor 35S. Entre las distintas líneas obtenidas correspondientes a inserciones independientes del transgén se eligieron tres que presentaron niveles de expresión elevados pero diferentes entre sí (las líneas 1, 16 y 30) y con ellas se continuaron los ensayos (Figura 15). A partir de este momento, las plantas transgénicas se denominarán, en general, plantas HaWRKY10, y las líneas, A, B y C, respectivamente. En las figuras se utilizarán las denominaciones W10-A, W10-B y W10-C en el caso de las distintas líneas de las plantas HaWRKY10 y WT para referirse al genotipo salvaje.

Con el fin de caracterizar estas plantas se midieron diferentes parámetros de crecimiento como el tamaño de la roseta y el número de hojas que presentaban en el desarrollo, el momento del pasaje del estadio vegetativo al reproductivo, la longitud de la vara floral y la de su raíz principal. Las plantas HaWRKY10 no mostraron diferencias con las plantas salvajes en ninguna de estas cualidades (resultados no presentados).

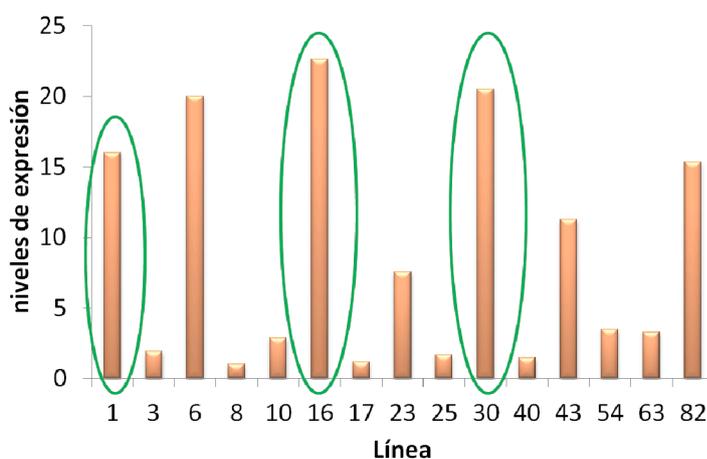


Figura 15: Las plantas de Arabidopsis HaWRKY10 muestran líneas con expresión diferencial. Se presentan los niveles de transcritos de *HaWRKY10* en 15 líneas independientes de plantas HaWRKY10. Para continuar con los ensayos se eligieron las líneas rodeadas por un óvalo verde. Se relativizaron todos los valores a la línea 8, a la que se le asignó arbitrariamente el valor 1.

Dado que *HaWRKY10* se expresó diferencialmente en embriones de semillas de girasol, se decidió evaluar algunas características de las semillas, como el tamaño, la producción total de semillas por planta y su porcentaje de germinación en condiciones normales de crecimiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas transgénicas y salvajes en ninguno de estos parámetros (resultados no mostrados). Dado que habíamos observado que el ABA regula la expresión de *HaWRKY10* en semillas en germinación de girasol, se realizaron ensayos de germinación de semillas y de crecimiento posgerminativo de plántulas en presencia de ABA.

Las semillas de las plantas *HaWRKY10* resultaron más susceptibles en su etapa de germinación a tratamientos con ABA. Como se observa en la Figura 16, mientras que las semillas salvajes germinaron casi en su totalidad tras un tratamiento con ABA 1 μ M, solo el 60% en promedio de las semillas transgénicas germinaron.

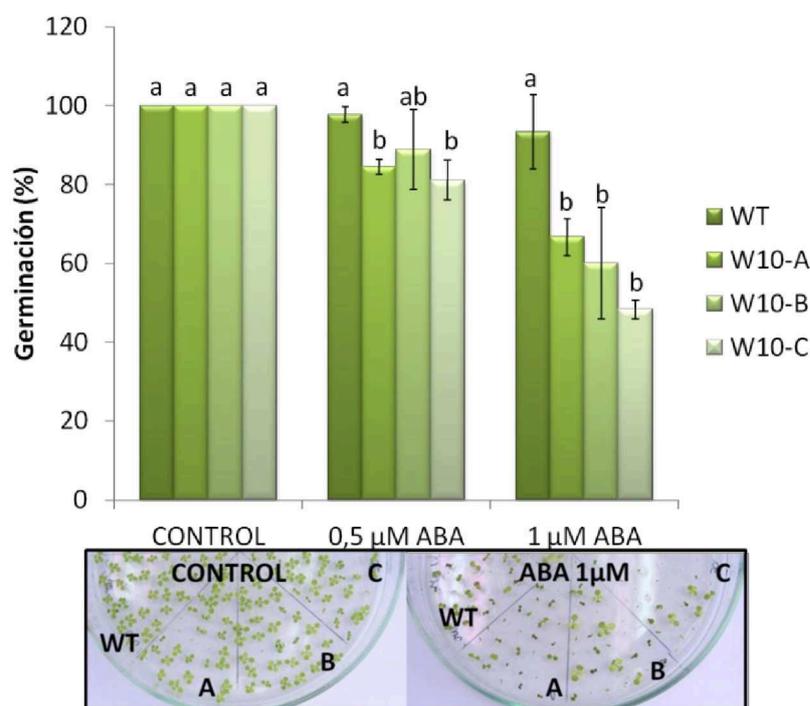


Figura 16: Las semillas de plantas *HaWRKY10* son más susceptibles a ABA que las salvajes. Arriba, porcentaje de semillas germinadas a los dos días en las condiciones que se indican en la figura. Abajo: fotografía representativa de placas en condiciones control y tratadas con ABA 1 μ M a los cinco días. Se trabajó con placas en condiciones control, 0,5 y 1 μ M de ABA. 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 $p < 0,05$.

En la Figura 17 se observa que las plántulas HaWRKY10 expuestas a ABA desde la germinación presentaron un desarrollo más afectado en comparación con las plántulas salvajes. Este efecto fue evidente en la expansión incompleta de sus cotiledones y en el menor desarrollo del primer par de hojas de estas plántulas expuestas a ABA 1 y 2 μM . Un resultado semejante al del ensayo anterior fue observado en plántulas expuestas a ABA luego de germinadas (resultados no presentados).

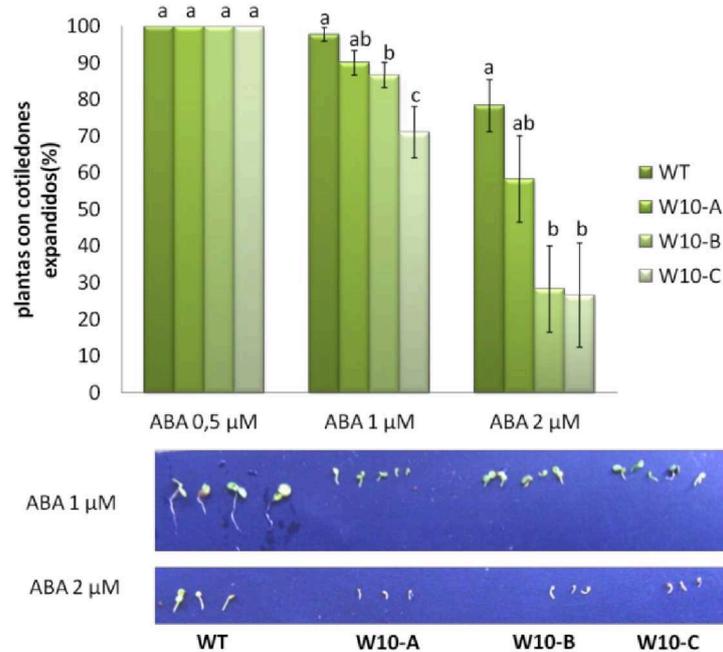


Figura 17: Las plántulas HaWRKY10 muestran mayor sensibilidad a ABA durante el crecimiento posgerminativo. Las plantas fueron germinadas y crecidas en las concentraciones indicadas en la figura. Arriba: se muestra el porcentaje de plantas que expandieron completamente sus cotiledones. Abajo: fotografías ilustrativas del fenotipo de las plántulas. 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 $p < 0,05$.

V – Algunos genes de las vías de ABA y GAs están regulados diferencialmente en las semillas HaWRKY10

Como consecuencia de los resultados de respuesta diferencial a ABA se decidió medir los niveles de transcritos de genes de las vías de ABA y GA, como hormonas de acción antagónica en el proceso de germinación. Para este fin se utilizaron semillas germinadas durante dos días en condiciones estándar.

Los genes *ABA2* (biosíntesis de ABA), *ABI1*, *ABI3* y *ABI5* (señalización positiva de ABA) no mostraron variaciones estadísticamente significativas entre las plantas transgénicas y las salvajes (resultados no presentados). Sin embargo, *ABI4*, que también está involucrado en la señalización positiva de ABA, mostró una reducción de entre 20 y 35% en las plantas transgénicas respecto a las salvajes (Figura 18). Curiosamente, los niveles de transcritos de *GA2ox* (que codifica una enzima encargada de pasar GA a su forma inactiva) aumentaron alrededor de 30% en las plantas HaWRKY10 y los niveles de *GA20ox* y *GA3ox* (que codifican enzimas clave en la biosíntesis de GA activa) disminuyeron o tendieron a disminuir en las plantas transgénicas comparadas con las salvajes (Figura 18).

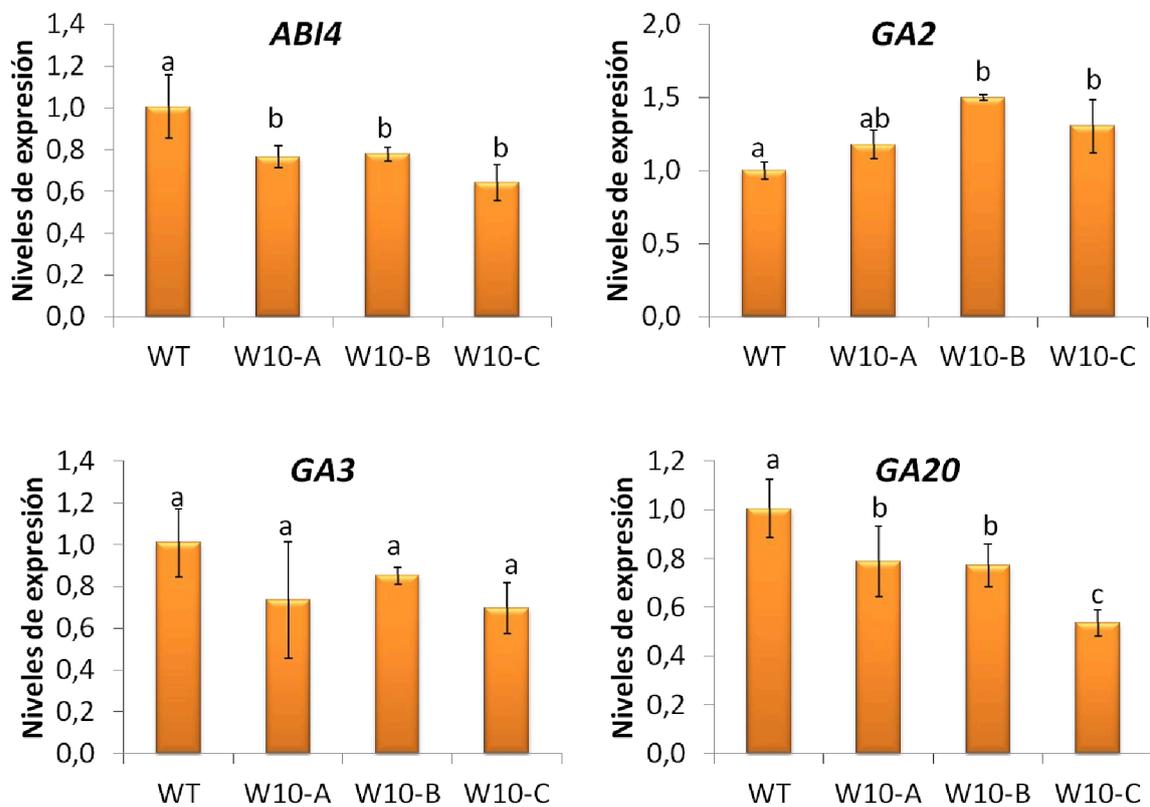


Figura 18: La biosíntesis de GA y la señalización de ABA están reguladas de forma diferencial en las semillas de las plantas HaWRKY10. Se midieron por medio de RT-qPCR los niveles de transcritos de los genes indicados en la parte superior de cada gráfico. Se tomó arbitrariamente el genotipo WT y se le asignó el valor de 1. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba de Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

VI – Las semillas HaWRKY10 contienen más lípidos y proteínas y menos carbohidratos que las salvajes

Los genes regulados de forma diferencial que se visualizan en la Figura 18 están involucrados en la movilización de las sustancias de reserva en semillas. Este hecho, sumado a la relación entre la expresión de *HaWRKY10* y el consumo de reservas en girasol, nos llevó a determinar primeramente el contenido de sustancias de reserva de las semillas HaWRKY10 como así también de las semillas salvajes.

Todas las líneas de las plantas HaWRKY10 presentaron mayor contenido lipídico en sus semillas que las salvajes (5 % en promedio). Sólo dos líneas de las plantas HaWRKY10 presentaron niveles proteicos significativamente mayores a los de las semillas salvajes. Por otro lado, las semillas HaWRKY10 mostraron menor contenido de sacarosa y almidón a las dos horas de embebidas⁹ (Figura 19).

⁹No fue posible detectar glucosa en muestras de semillas en dormancia o en vainas en estadios avanzados de desarrollo con el kit utilizado.

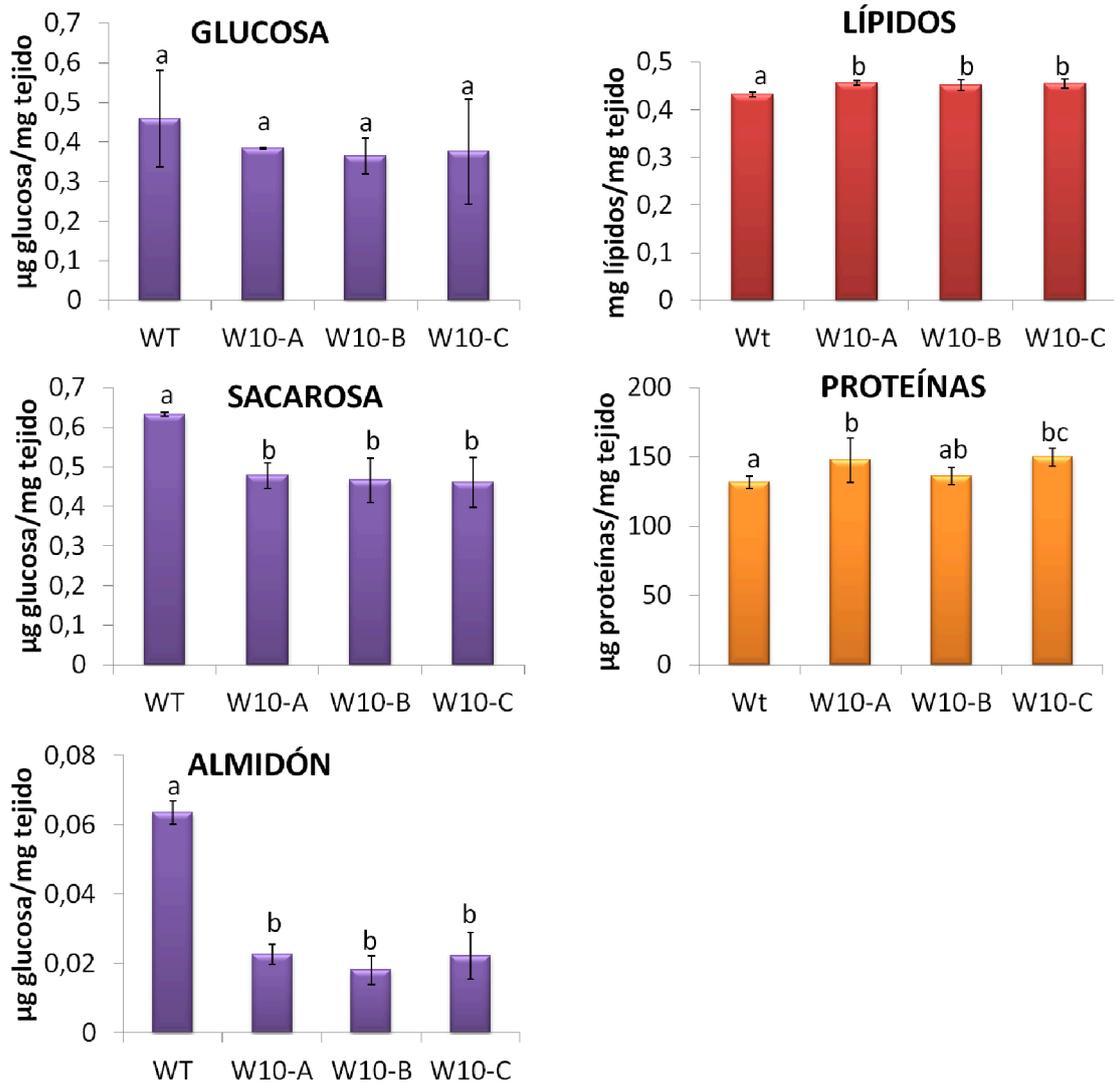


Figura 19: Las semillas de las plantas HaWRKY10 tienen mayor cantidad de lípidos y proteínas y menor contenido de carbohidratos que las salvajes. Medidas correspondientes a semillas de plantas inmediatamente luego de cosechadas en dormancia (lípidos y proteínas) y de semillas embebidas dos horas (carbohidratos). Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba de Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

Debido al creciente interés en la cantidad y calidad de los aceites de las plantas oleaginosas y a que las semillas presentaron mayor contenido de lípidos, se decidió estudiar el perfil proteico de las oleosinas de estas semillas y además observar por medio de microscopía confocal las características morfológicas de las mismas. En el mismo sentido se realizaron determinaciones del perfil de ácidos grasos de las semillas de las plantas salvajes y transgénicas.

En la Figura 20 se observa que las semillas de las plantas HaWRKY10 no presentaron diferencias en el perfil de oleosinas ni en la proporción de los diferentes ácidos grasos que componen sus TAGs. Además, a través del análisis de la proporción de cada uno de los 15 ácidos grasos medidos se concluyó que no hubo un enriquecimiento diferencial en ninguno de ellos (resultados no presentados). Por otro lado, el análisis por medio de microscopía confocal no reveló diferencias notorias entre las plantas salvajes y las transgénicas (resultados no presentados).

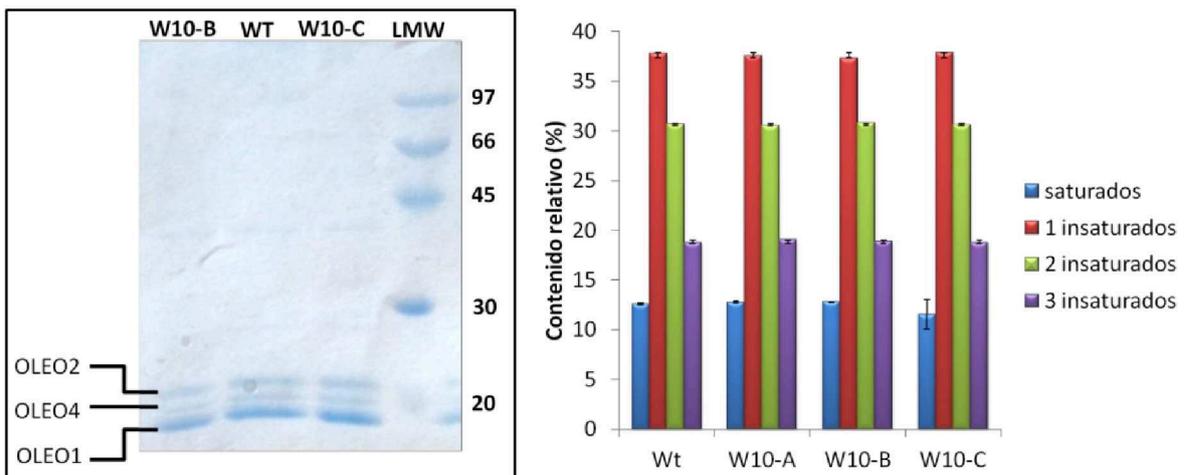


Figura 20: Las plantas HaWRKY10 no presentan diferencias con las salvajes en su perfil de oleosinas ni en su contenido relativo de los distintos ácidos grasos. Izquierda: gel de proteínas SDS-PAGE en el que se sembró el extracto de oleosinas provenientes de semillas de los genotipos indicados en la parte superior de las calles. Se indican en el gel las bandas correspondientes a oleosina 1, 2 y 4 (OLEO 1, 2 y 4, respectivamente). Derecha: contenido relativo de ácidos grasos saturados (correspondiente a los ácidos palmítico, esteárico, araquídico, behénico y tetracosanoico), con 1 insaturación - 1 saturados - (correspondiente a los ácidos oleico, octadecenoico, eicosenoico C11 y docosaenoico), 2 insaturaciones - 2 saturados - (correspondiente a linoleico y eicosadienoico) y 3 insaturaciones - 3 saturados - (correspondientes a linolénico y eicosatrienoico). Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos.

VII – Las semillas HaWRKY10 consumen más lípidos y menos carbohidratos durante su germinación y en el establecimiento de la línea

Dado que la proporción relativa de las sustancias de reserva está alterada en las semillas HaWRKY10, se decidió determinar el consumo de carbohidratos y lípidos durante la germinación y el crecimiento posgerminativo.

Mientras que en dormancia las semillas HaWRKY10 presentaron alrededor de 5% más lípidos que las salvajes, los niveles en las plántulas de 2 días fueron similares en todos los genotipos y se mantuvieron al menos hasta los 4 días de vida (Figura 21). A su vez, los niveles de sacarosa de las plántulas transgénicas de 2 y 4 días de vida no variaron de forma significativa respecto de las semillas embebidas 2 horas¹⁰. En cambio, las salvajes consumieron sacarosa durante todo el período. Se observaron resultados similares en la curva de consumo de almidón con el adicional de que las plantas HaWRKY10 mostraron una tendencia a acumularlo (Figura 21). Por otra parte, los niveles de glucosa no presentaron diferencias entre los genotipos a lo largo de la cinética (resultados no presentados).

¹⁰No fue posible detectar glucosa en muestras de semillas en dormancia o en vainas en estadios avanzados de desarrollo con el kit utilizado.

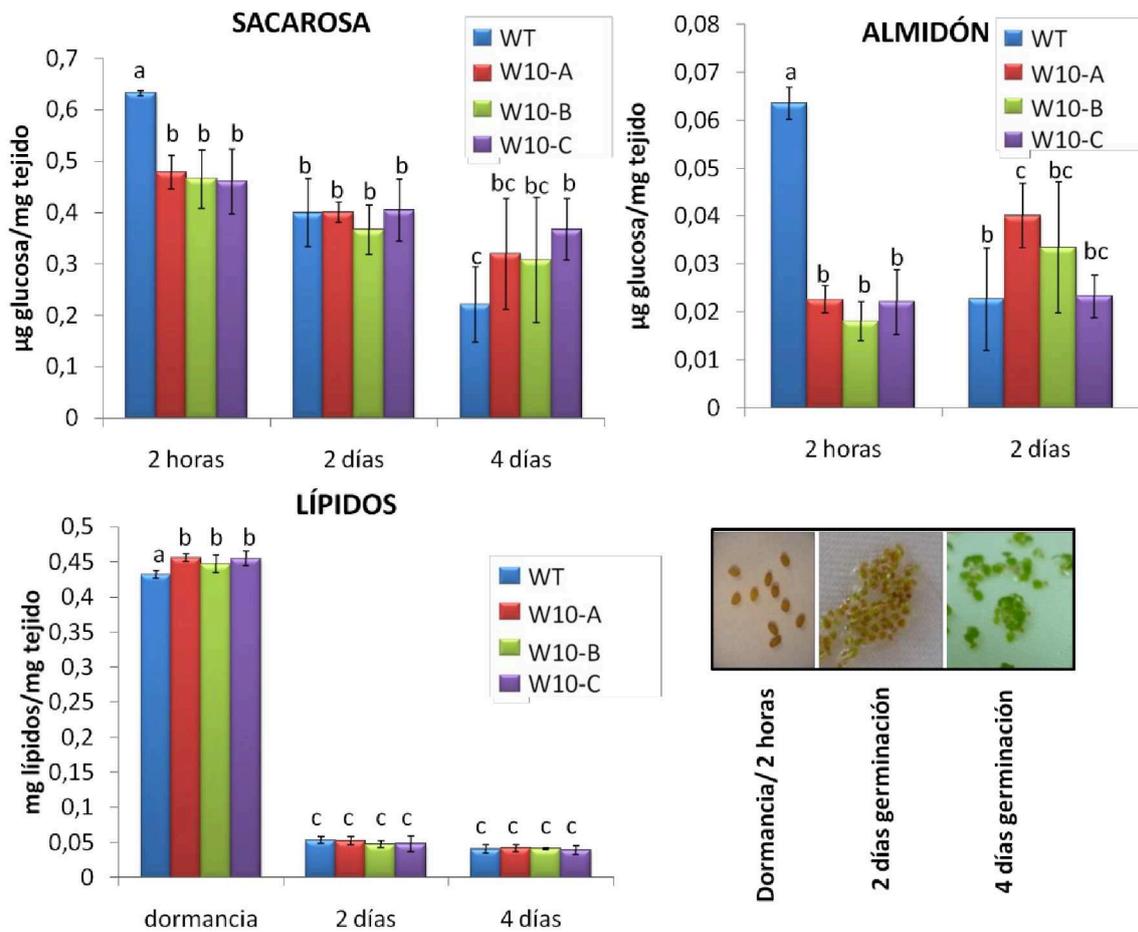


Figura 21: Las plántulas HaWRKY10 consumen más lípidos y menos carbohidratos que sus pares salvajes en la germinación. Las muestras se tomaron en los momentos que indican las figuras. Arriba, izquierda: cinética del contenido de sacarosa. Arriba, derecha: cinética del contenido de almidón. Abajo, izquierda: cinética del contenido lipídico. Abajo, derecha: fotografía ilustrativa de la apariencia de las semillas en dormancia/2 horas de germinación y luego de germinar durante 2 y 4 días. 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 $p < 0,05$.

El mayor consumo de lípidos por sobre el de carbohidratos en las plántulas HaWRKY10 respecto de las salvajes, condujo a la hipótesis de que la vía de la gluconeogénesis podría estar favorecida en las transgénicas. De esta forma, el consumo de lípidos podría suplir la demanda energética que no sería abastecida en por el uso de los carbohidratos de reserva (sacarosa y almidón) en las plántulas HaWRKY10 debido al menor consumo de éstos que presentan respecto a las salvajes.

Por este motivo se midieron los niveles de transcritos de *SDP1*, una lipasa clave en el clivaje de los TAGs en semillas, cuyos constituyentes son sustratos para la

gluconeogénesis. También se midió la actividad de la PEPCK, que es una de las enzimas clave en la gluconeogénesis dado que está involucrada en catalizar el pasaje unidireccional de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, utilizado en la síntesis de glucosa (Figura 5).

En la Figura 22 se observa que la actividad de la enzima PEPCK fue 32 veces mayor en semillas HaWRKY10 en germinación que en las salvajes en el mismo estadio. También estuvieron incrementados los niveles de transcritos de *SPD1*.

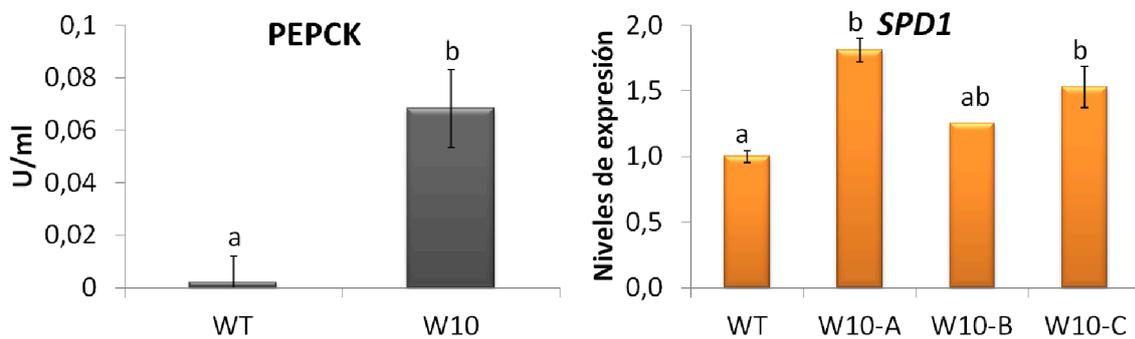


Figura 22: Las semillas HaWRKY10 muestran mayor actividad de la enzima PEPCK y mayores niveles de transcritos de la lipasa SPD1 que las semillas de las plantas salvajes. Izquierda: actividad de la enzima PEPCK a las 36 horas de germinadas las semillas. Derecha: niveles de transcritos de *SPD1* medidos por RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos para la medición de PEPCK y triplicados biológicos para la medición de *SPD1*. Se realizó una prueba ANOVA seguida por una prueba Fisher LSD *post-hoc*. Las letras representan diferencias significativas con un valor $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los primeros estudios de expresión de *HaWRKY10* fueron realizados hace algunos años por Giacomelli y sus colaboradores (Giacomelli y col., 2010). En ese trabajo previo se observó que la expresión de *HaWRKY10* se regulaba en hojas de plantas de 21 días con diversos tratamientos, entre ellos varias hormonas. Esos resultados no guardan relación con los obtenidos de los experimentos de este Capítulo. Las diferencias observadas pueden atribuirse en parte a que los estudios que se presentan en este Capítulo se llevaron a cabo con plantas más jóvenes o en estadio reproductivo. Además, los ensayos de Giacomelli y sus colaboradores se realizaron pincelando las láminas e infiltrando discos de hojas, mientras que en los ensayos de tratamientos hormonales realizados en esta Tesis, se usaron plantas o embriones enteros.

A raíz de la inducción de *HaWRKY10* observada en semillas en dormancia y en germinación, se propuso investigar el posible papel del FT en estos estadios.

La calidad de las semillas es un punto clave a tratar en la problemática de la seguridad alimentaria dado que son alimentos concentrados y ricos en nutrientes, fáciles de conservar y no requieren de mayores cuidados en su transporte. En esta Tesis se hizo hincapié en que, para alcanzar la seguridad alimentaria, es importante el trabajo conjunto de la biotecnología y el fitomejoramiento. Mejorar el conocimiento en bioquímica y metabolismo de los aceites de las semillas es útil para el desarrollo de cultivares oleaginosos capaces de producir mayores rendimientos y de mejor calidad (Graham, 2008). La caracterización funcional de *HaWRKY10* no sólo contribuye a dilucidar el papel que este FT tiene en girasol sino también a comprender el metabolismo de las sustancias de reserva, principalmente de los aceites, en semillas.

I – HaWRKY10 y sus homólogos

Una vez aislada la secuencia codificante de *HaWRKY10* se buscaron en las bases de datos otras con elevada identidad de secuencia, junto con la información bibliográfica que pudiera ser de utilidad a la discusión sobre la función de *HaWRKY10*.

Dentro de las Asteráceas, la proteína con mayor identidad de secuencia localizada por alineamientos fue *CmWRKY14*, un FT de crisantemo con el que *HaWRKY10* presenta 72 % de identidad de secuencia. *CmWRKY14* se expresa en elevados niveles en hojas, a diferencia de *HaWRKY10*, y se reprime por tratamientos con ABA, en forma similar a como se comporta *HaWRKY10* en semillas (Song y col., 2014).

En *Arabidopsis* las proteínas con las que presenta mayor identidad de secuencia *HaWRKY10* son *AtWRKY7* (47 % de identidad de secuencia), *AtWRKY11* (46 % de identidad de secuencia) y *AtWRKY15* (45 % de identidad de secuencia). Sin embargo, aunque hay varios estudios realizados sobre estas proteínas, no hay información que las vincule con las funciones de *HaWRKY10* que se han estudiado en la presente Tesis.

En arroz, *OsWRKY51* es la proteína más semejante a *HaWRKY10*, con la que comparte 41 % de identidad de secuencia. *OsWRKY51* y *OsWRKY71* (con elevada identidad de secuencia con *HaWRKY2*, otro FT de tipo WRKY de girasol) se reprimen por GA y se inducen por ABA, de forma opuesta a *HaWRKY10*. La sobreexpresión de estos FTs de arroz en conjunto inhibe la expresión de la α -amilasa, una enzima clave en la utilización de los carbohidratos para germinar (Xie y col., 2006; Zhang y col., 2009). Estos resultados podrían ser comparables con los obtenidos para *HaWRKY10*, dado que la expresión de este FT en *Arabidopsis* genera que se consuman menos carbohidratos, si bien la regulación de *OsWRKY51* por GA y ABA es opuesta a la regulación de *HaWRKY10* por estas hormonas.

II – HaWRKY10 en semillas en germinación y su relación con ABA

HaWRKY10 está regulado de forma específica en etapas tempranas de la germinación. Mostró un pico de expresión a las nueve horas de embebida la semilla y cuando la raíz protruyó sus niveles de transcritos decayeron (Figura 10). Durante el pico de expresión, el tratamiento con ABA reprimió y el tratamiento con GA indujo la expresión de este FT (Figura 11). Sumado a este hecho, las plantas *HaWRKY10* de *Arabidopsis* fueron más susceptibles a ABA en la germinación (Figura 16) y también en el establecimiento de la línea (Figura 17). Esto sugiere que *HaWRKY10* tendría un papel en la regulación hormonal de la germinación e indica que, de algún modo, *HaWRKY10* intensifica la respuesta a ABA en *Arabidopsis*. Una causa podría ser que las semillas transgénicas presentaran mayor concentración de esta hormona que las salvajes, o que sus vías de señalización se encontrasen reguladas de forma positiva. Si las plantas transgénicas tuvieran una mayor concentración de ABA, esperaríamos que germinaran más tarde que las salvajes pero, aunque se observó una tendencia en este sentido, no hubo diferencias significativas. Además, tampoco se observaron diferencias significativas entre las plantas *HaWRKY10* y las salvajes en los niveles de transcritos de *ABA2*, un gen que codifica una enzima importante en la biosíntesis de ABA. Por otro lado, los niveles de expresión de los genes de la vía de regulación positiva de ABA, *ABI1*, *ABI3* y *ABI5*, no presentaron cambios, mientras que los de *ABI4*, se encontraron reprimidos en aparente controversia con lo propuesto (sobre este tema se ahondará más adelante, Figura 18). Otra hipótesis es que *HaWRKY10* fuese un regulador negativo de la germinación, pero queda descartada al no haberse observado que las semillas transgénicas germinaran con retraso respecto de las salvajes en condiciones estándar. Una cuarta hipótesis es que haya otro regulador de este proceso (sobre esto también se volverá más adelante).

La respuesta a ABA de las semillas transgénicas podría explicarse también por el balance ABA/GA. Las hormonas GA y ABA son antagonistas en la germinación. En las semillas de *Arabidopsis HaWRKY10*, *GA2* se encontró inducido y *GA20*, reprimido (Figura 18). Las enzimas que codifican estos genes están involucradas en el pasaje de GA bioactiva a inactiva y en la biosíntesis de GA, respectivamente. Por lo tanto, las

semillas HaWRKY10 podrían tener menor concentración de GA bioactiva que las salvajes, lo cual generaría mayor sensibilidad a ABA en la germinación.

En las plantas de *Arabidopsis* salvajes está descrito que el ABA decae al final de la maduración de las semillas y durante la imbibición de las mismas debido a su catabolismo por 8'-hidroxilasas. Las proteínas P450 constituyen una superfamilia de enzimas, con al menos 272 miembros en *Arabidopsis* (Werck-Reichhart y col., 2002), que catalizan la oxidación de varios compuestos de bajo peso molecular. Las proteínas de la familia CYP707A, pertenecientes a la superfamilia P450, codifican 8'-hidroxilasas de ABA y se expresan en distintos estadios de maduración de la semilla y las plantas mutantes de distintos miembros muestran acumulación de ABA (Okamoto y col., 2006). A través de ensayos de microarreglos en los que se compararon los perfiles de expresión génica de discos de hojas de girasol transformados con la construcción 35S:*HaWRKY10* en pBI121 y con el plásmido vacío, se identificaron varios genes regulados diferencialmente en los discos sobreexpresantes de *HaWRKY10* (resultados no presentados). Los niveles de transcritos de una de las proteínas de la superfamilia P450, cuyo homólogo putativo de *Arabidopsis* es CYP76C7, se encontraron reprimidos. La información disponible en bases de datos indica que CYP76C7 en *Arabidopsis* se expresa en semillas en maduración y secas exclusivamente (Winter y col., 2007). Si CYP76C7 estuviera asociada al catabolismo de ABA y la represión del gen se tradujera en menor actividad, las semillas HaWRKY10 podrían tener mayor concentración de ABA que las salvajes al momento de la germinación por tener menor degradación de la hormona. En consecuencia, los niveles de ABA podrían caer lo suficiente para permitir la germinación pero no en la medida de evitar una mayor sensibilidad al agregado de ABA exógeno. Para esclarecer el papel de HaWRKY10 en la germinación y el establecimiento de la línea y su relación con las hormonas sería necesario además medir el contenido de ABA y GA de las semillas en dormancia y durante su desarrollo.

III – HaWRKY10 y la movilización de las sustancias de reserva de la semilla

En girasol los cotiledones son los órganos en los que se deposita la mayor proporción de sustancias de reserva (Lehner y col., 2006) y la expresión de *HaWRKY10* cambia específicamente en este órgano frente al tratamiento con hormonas asociadas a la germinación, a la movilización de las reservas y al crecimiento posterior. Esta relación nos estimuló a estudiar el balance de las sustancias de reserva en semillas de girasol y de *Arabidopsis* que expresan de forma constitutiva *HaWRKY10* durante la germinación y el crecimiento posgerminativo en condiciones estándar. Sumado a esto, se determinó el perfil de expresión de *HaWRKY10* en esos estadios.

El aumento en los niveles de expresión de *HaWRKY10* en girasol fue proporcional al consumo de lípidos (Figura 13), durante las primeras horas de germinación y durante el crecimiento posgerminativo. Además, las semillas *HaWRKY10* de *Arabidopsis* consumieron más lípidos que las salvajes durante el establecimiento de la línea (Figura 21), pero menos sacarosa y almidón (Figura 21), sin presentar ningún cambio fenotípico significativo (el único efecto que observamos fue que las plántulas *HaWRKY10* son levemente más pequeñas los primeros días de vida, resultados no presentados). El agregado de azúcares exógenos retarda la utilización de los lípidos de reserva (Dekkers y col., 2004; To y col., 2002) y en el mismo sentido, la menor cantidad de carbohidratos en las semillas *HaWRKY10* comparadas con las salvajes podría desencadenar un consumo anticipado de los lípidos al principio de la germinación.

Como ya se mencionó, las semillas *HaWRKY10* de *Arabidopsis* presentaron niveles reducidos de *ABI4* a los dos días de germinadas comparadas con las salvajes. *ABI4* inhibe la ruptura lipídica (Penfield y col., 2006), por lo que su represión favorecería el mayor consumo de lípidos por parte de las plantas transgénicas. El consumo de lípidos se inicia con la actividad de las lipasas sobre los cuerpos de aceite, entonces se midió la expresión de *SDP1*, que codifica una lipasa clave en el establecimiento de la línea. Los niveles de *SDP1* se encontraron incrementados 50 % en promedio en las semillas germinadas transgénicas respecto de las salvajes. Si la inducción a nivel transcripcional

se refleja en mayor cantidad de SDP1 funcional, las semillas HaWRKY10 podrían utilizar más lípidos que las salvajes.

A partir de estos resultados y de que la conversión de lípidos en carbohidratos usados como fuente de energía es predominante en oleaginosas, se planteó la hipótesis de que las plántulas HaWRKY10 utilizarían preferentemente la vía de la gluconeogénesis y por este motivo consumirían carbohidratos en menor medida. El producto principal de la gluconeogénesis es sacarosa que es transportada a la parte axial del embrión donde es usada durante la germinación y en el establecimiento de la línea en semillas oleaginosas (Rylott y col., 2003). Sin embargo, el hecho de que ingresen más lípidos al metabolismo no necesariamente implica que estos recursos sean destinados a gluconeogénesis, dado que otros productos son sintetizados en cotiledones a partir de catabolitos lipídicos y usados para el mantenimiento y diferenciación en órganos fotosintéticos (Trelease y Doman, 2013). Por este motivo se midió la actividad de PEPC, que cataliza el pasaje del oxaloacetato, proveniente del ciclo del ácido tricarbónico, a fosfoenolpiruvato. La actividad PEPC se encontró incrementada unas 32 veces en promedio en las semillas germinadas transgénicas respecto de las salvajes en las mismas condiciones, lo que indicaría que esta vía es más activa en las plantas HaWRKY10 que en las salvajes.

IV – ¿Cuál sería la conexión entre ABA, la movilización de sustancias de reserva y el factor de transcripción HaWRKY10?

Hay varios estudios que describen la conexión entre hormonas, especialmente el ABA, con la señalización de azúcares (Finkelstein y col., 2002; Gazzarrini y McCourt, 2001; León y Sheen, 2003). Los niveles bajos de azúcar inhiben la actividad de ABA en la germinación, por lo que los menores niveles de azúcar medidos en las semillas HaWRKY10 respecto de las salvajes podrían permitir la germinación normal de esas semillas en condiciones estándar, contrarrestando el efecto de los mayores niveles de ABA propuestos. Por otra parte, Pritchard y colaboradores (2002) realizaron

experimentos de germinación con semillas de *Arabidopsis* tratadas con 10 μ M de ABA exógeno y evaluaron la movilización de las reservas a lo largo de varios días. A los tres días, detectaron que en las semillas tratadas se acumulaba sacarosa proveniente de gluconeogénesis en lugar de utilizarse como en las semillas no tratadas (Pritchard y col., 2002), lo que concuerda con el menor consumo de sacarosa registrado en las plántulas HaWRKY10. Además, los autores registraron un menor consumo de lípidos en las semillas tratadas en comparación con las semillas no tratadas a los seis días de embebidas lo que es en principio diferente de lo observado en este trabajo. Sin embargo, los autores confirmaron que la rotura de los TAGs continuaba ocurriendo y el consumo de ácidos grasos se producía aunque en forma reducida. Por lo tanto, el agregado de ABA, aun en concentraciones de 10 μ M, no bloqueó la movilización de lípidos. Si las semillas HaWRKY10 tuvieran niveles mayores de ABA respecto de las salvajes por disminución de su degradación, la concentración endógena (que está en el orden de 100 pmol/g peso fresco, Shu et al. 2013) sería muy inferior a la agregada en forma exógena en el estudio citado (en el orden de 10 nmol/g peso fresco). Hay que considerar también que las semillas tendrían atenuado el efecto de ABA por la menor concentración de azúcar que se detectó al inicio de la germinación. Por lo tanto, el efecto sobre el metabolismo lipídico también sería menor, particularmente al inicio de la germinación y crecimiento posgerminativo, cuando se registró el mayor consumo de lípidos de las transgénicas.

ABI4 también está involucrado en el metabolismo de azúcares. Este FT es inducido por glucosa y sacarosa y su sobreexpresión confiere hipersensibilidad a glucosa, frenándose la fotosíntesis. En el mismo sentido, las mutantes en *abi4* son insensibles al azúcar de forma tal que varios genes asociados a la fotosíntesis no son reprimidos (Finkelstein y Gibson, 2001; Huijser y col., 2000; Laby y col., 2000; Ramon y col., 2007; Rook y col., 2001). Las semillas HaWRKY10 podrían presentar niveles reducidos de *ABI4* respecto de las salvajes debido a que mostraron menor contenido de sacarosa al inicio de la germinación respecto de las salvajes. Por otro lado, el metabolismo diferencial de los azúcares de estas plantas podría deberse, al menos en parte, a la expresión diferencial de *ABI4* en las semillas de las transgénicas. Esto genera una “referencia

circular” que indica la necesidad de más experimentos que brinden datos para establecer con mayor claridad el mecanismo de respuesta de las semillas HaWRKY10.

Por otro lado, las GA juegan un papel antagónico a ABA y en los cereales estas hormonas están involucradas con la utilización del almidón de reserva en la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein y col., 2008; Finkelstein y col., 2002; Graeber y col., 2012; Linkies y col., 2009). En el mismo sentido, en Arabidopsis, tomate y tabaco la hormona GA está asociada con la modificación de la pared celular y el debilitamiento del endosperma (Chen y col., 2001; Lee y col., 2002; Leubner-Metzger y Meins, 2000; Peng y Harberd, 2002). Las semillas provenientes de plantas HaWRKY10 tuvieron inhibida la expresión de *GA2Ox* e inducida la de *GA20Ox*, lo que podría haber llevado a menores niveles de GA. En consecuencia, los efectos antagónicos de la hormona GA sobre el ABA serían menores en las semillas transgénicas que en las salvajes.

V – HaWRKY10 durante el desarrollo de las semillas

El proceso de desarrollo tiene un gran impacto en las condiciones con las que va a germinar la semilla. En el llenado de vainas, se define la dormancia y se acumulan las sustancias de reserva que va a utilizar la semilla para germinar y establecer la línea. Por ese motivo se observó el patrón de expresión de *HaWRKY10* durante el llenado de los aquenios de girasol. Como se observa en la Figura 14, *HaWRKY10* presentó un pico luego de la polinización (R5.6) y después comenzó a decaer hasta R9. Esto fue llamativo dado que, como las semillas HaWRKY10 de Arabidopsis presentaron mayor contenido lipídico, lo esperado era que los transcriptos de *HaWRKY10* tuvieran una curva similar a la de acumulación de lípidos. Sin embargo, varios estudios indican que los genes que codifican proteínas que participan en la acumulación de lípidos en semillas de oleaginosas, aumentan su expresión tempranamente con un patrón similar al de *HaWRKY10* (Ruuska y col., 2002; Troncoso-Ponce y col., 2011).

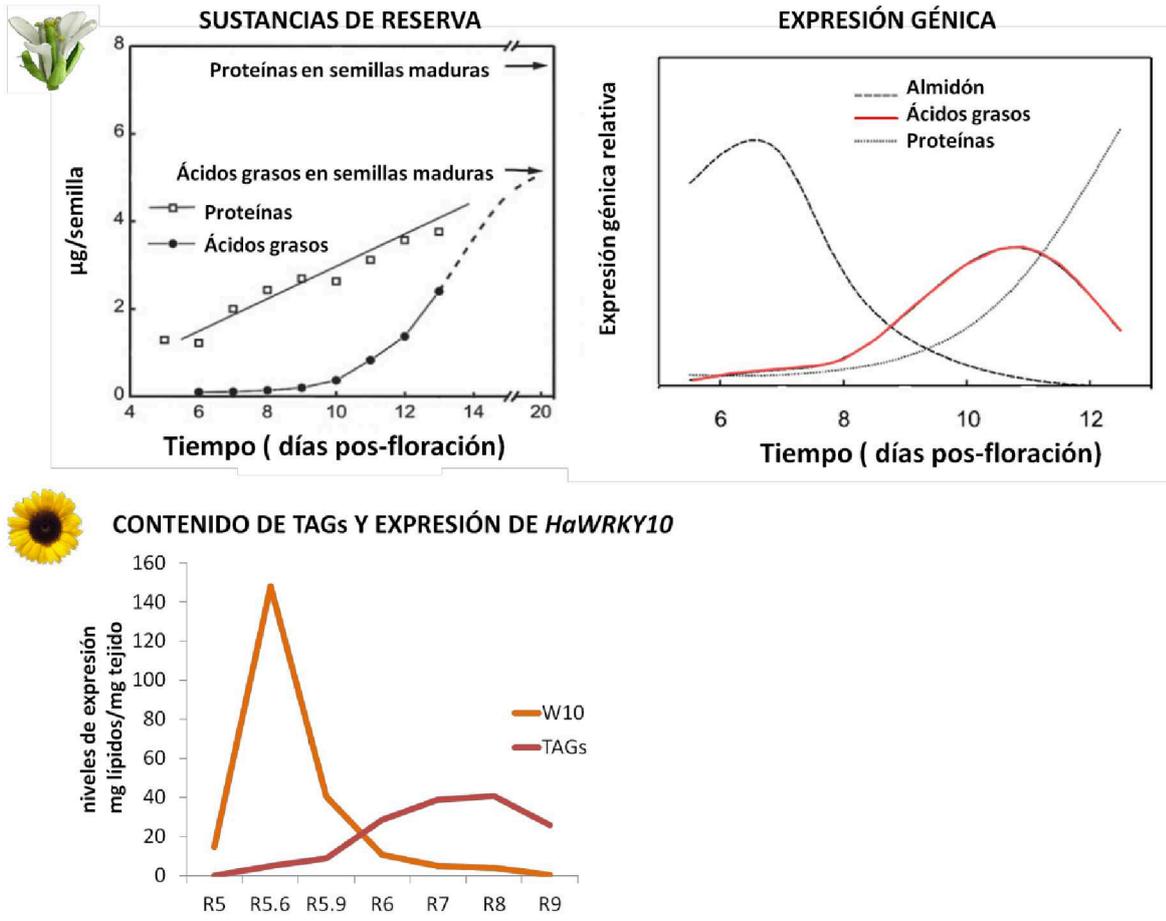


Figura 23: *HaWRKY10* presentaría un perfil de expresión similar al de los genes de *Arabidopsis* que codifican proteínas que participan en la síntesis de lípidos. Arriba, izquierda: cinética de acumulación de proteínas y ácidos grasos en el llenado de vainas de *Arabidopsis*. Arriba, derecha: cinética de expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la acumulación de lípidos (línea sólida), almidón (línea entrecortada) y proteínas (línea punteada, adaptado de Ruuska y col., 2002). Abajo: gráfico ilustrativo de las cinéticas de expresión de *HaWRKY10* y de la acumulación de lípidos en aquenios de girasol.

En la Figura 23 se observa que en las semillas salvajes de *Arabidopsis* los lípidos comienzan a acumularse a partir de los días 10 a 12 luego de que ocurre la floración. En ese momento, los genes que codifican las proteínas que están involucradas en la síntesis de lípidos presentan su pico de expresión, que disminuye a medida que los lípidos se acumulan. El patrón de expresión de *HaWRKY10* y el de acumulación de lípidos en girasol son similares a los descriptos.

Para determinar si este comportamiento en girasol se correlaciona con lo que sucede en semillas de Arabidopsis de HaWRKY10 se realizó una curva de acumulación de lípidos. En la cinética se observó que recién hacia el final del desarrollo las vainas HaWRKY10 mostraron una inclinación a acumular más lípidos que las salvajes (Figura 24). Esta diferencia se hizo significativa cuando las semillas alcanzaron su madurez total y fueron cosechadas. Por su parte, la concentración de almidón a los siete días fue levemente menor en las vainas transgénicas que en las salvajes. A los quince días esta diferencia aumentó y se mantuvo en las semillas en dormancia, según lo indicó un ensayo en semillas germinadas durante dos horas (Figuras 19 y 24). HaWRKY10 no sería el primer FT de tipo WRKY involucrado con el metabolismo de azúcares, como ya se mencionó en la Introducción del presente Capítulo, SUSIBA2 de cebada y OsWRKY51 y OsWRKY71 tienen un papel en este proceso (Sun y col., 2003; Xie y col., 2006; Zhang y col., 2009).

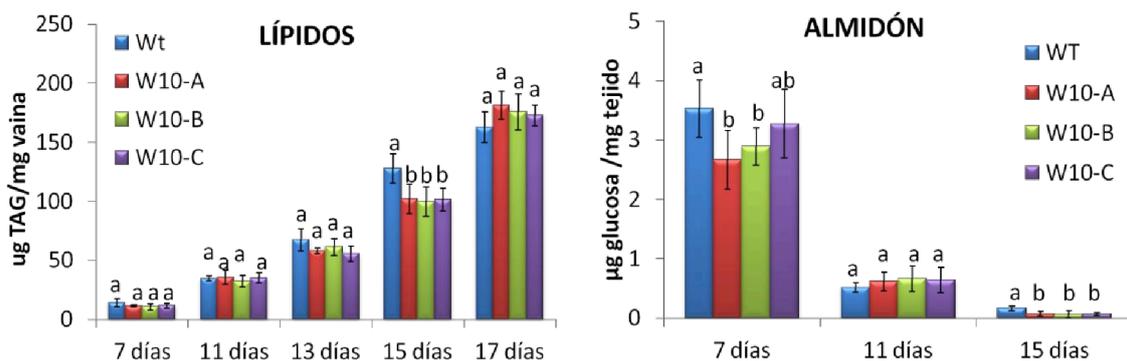


Figura 24: Las semillas de Arabidopsis en desarrollo acumulan lípidos y consumen almidón. Se realizaron cinéticas en el desarrollo de las semillas de Arabidopsis de los distintos genotipos. Las muestras se tomaron en los tiempos posfloración que se indican en la figura. Izquierda: cinética de contenido de lípidos. Derecha: cinética del contenido de almidón. 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 $p < 0,05$.

¿Podrían las semillas HaWRKY10 de Arabidopsis acumular más lípidos a expensas de las reservas de almidón? En la literatura hay ejemplos que relacionan la acumulación de una sustancia respecto de la otra y ejemplos en sentido contrario. Las mutantes *wri1* (Focks y Benning, 1998) acumulan más carbohidratos a expensas del contenido lipídico y de la misma forma lo hacen las mutantes *lec2* (Angeles-Núñez y Tiessen,

2011). Por el contrario, cuando se sobreexpresa la enzima glicerol 3-fosfatodeshidrogenasa se observa un incremento en el contenido de lípidos y no se ve afectado el contenido de almidón de reserva (Vigeolas y col., 2007). Del mismo modo, la sobreexpresión de un FT de maíz similar a WRI1, ZmWri1a, genera incremento en el contenido lipídico sin variación en el contenido de almidón (Pouvreau y col., 2011).

El 5 % de incremento en el contenido lipídico promedio de las semillas de HaWRKY10 de *Arabidopsis* respecto de las salvajes es comparable con los obtenidos por la sobreexpresión de distintas proteínas involucradas en diferentes procesos biológicos (Tabla 1). Enzimas involucradas en el metabolismo lipídico como acetil-CoA-carboxilasa y glicerol-3-fosfato-aciltransferasa generan un incremento en el contenido lipídico de entre 6 % y 7-22 %, respectivamente (Jain y col., 2000; Roesler y col., 1997). La sobreexpresión de la enzima diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT), involucrado en el metabolismo de los TAGs, también confiere un fenotipo de mayor contenido lipídico correspondiente al 5-8 % más que sus pares salvajes (Jako y col., 2001; Weselake y col., 2007; Zheng y col., 2008). El FT de tipo DOF genera un aumento en el contenido de TAGs en semillas del 5-9 % (Wang y col., 2007b).

El contenido lipídico de los aquenios de girasol varía ampliamente según el cultivar y aunque se conozca en detalle cómo afectan a la producción y a la acumulación de las sustancias de reserva distintos aspectos fisiológicos y factores como la temperatura, la radiación y el momento de siembra, poco se sabe de los factores genéticos que determinan el rendimiento de semillas y el contenido y calidad de los TAGs (Aguirrezábal y col., 2003; Aguirrezábal y col., 1996; de la Vega y Hall, 2002; Dosio y col., 2000; Izquierdo y col., 2013; León y col., 2003; López Pereira y col., 1999; Mandel y col., 2014; Martínez y col., 2012; Rondanini y col., 2003). Por este motivo es muy atractivo ahondar en los mecanismos por los que HaWRKY10 le confiere a las plantas de *Arabidopsis* que lo expresan de forma constitutiva su fenotipo diferencial. Se planea investigar en las etapas finales del desarrollo de las vainas la expresión de distintos genes que codifican proteínas involucradas en la acumulación de sustancias de reserva como *LEC1*, *LEC2*, *WRI1*, *ABI3*, *ABI4* y *ABI5*, entre otros, para dilucidar la vía que podría estar regulada por HaWRKY10.

Un dato interesante es que tanto a los seis meses como al año de estar guardadas, las semillas HaWRKY10 presentaron menor contenido lipídico que las salvajes, lo que indica que las semillas consumen lípidos durante el almacenamiento (resultados no presentados). Además los niveles de transcritos de la lipasa SDP1 están incrementados en las semillas transgénicas almacenadas respecto de las salvajes (resultados no presentados). Por otro lado, en girasol *HaWRKY10* disminuye sus niveles de transcritos de forma dramática en estadios avanzados de desarrollo del embrión (Figura 14). Esto podría estar indicando que es necesario que este FT esté reprimido durante el almacenamiento para evitar el consumo de las sustancias de reserva.

Todos los resultados en conjunto indican que HaWRKY10 juega un papel en el llenado de semillas, en la dormancia de las mismas, en la germinación y en el crecimiento posgerminativo de las plántulas. Sin embargo, es necesario desarrollar más estudios y coleccionar mayor cantidad de datos que permitan esclarecer el sitio de HaWRKY10 dentro de las redes de regulación génica.

Capítulo III

SI
PIENSAS QUE LA
Aventura ES PELIGROSA,
PRUEBA LA Rutina
ES
Mortal!

Anónimo

CAPÍTULO III: OsWRKY47 y la respuesta de las plantas de arroz frente a estrés hídrico

INTRODUCCIÓN

I – Las citoquininas y el desarrollo de las plantas

Las fitohormonas regulan numerosos procesos biológicos, incluyendo la respuesta a distintos tipos de estrés medioambientales por medio de redes complejas de señalización. Entre estas fitohormonas, las citoquininas (CQs) cumplen muchas funciones de gran relevancia en el desarrollo de las plantas y en su adaptación al medio (Taiz y Zeiger, 2006).

Las CQs se producen principalmente en las raíces, son derivados de adenina sustituidos en el nitrógeno seis y en su síntesis se utiliza AMP como sustrato (Åstot y col., 2000; Kakimoto, 2001; Taiz y Zeiger, 2006). El paso limitante en la biosíntesis de estas hormonas es catalizado por la enzima isopentil-transferasa (IPT); su acción consiste en la N-prenilación de la adenosina 5'-fosfato (AMP, ADP, o ATP) en N⁶ con dimetilalil-difosfato o hidroximetilbutenil-difosfato (Kakimoto, 2003; Taiz y Zeiger, 2006). La desactivación de las CQs se lleva a cabo por la degradación ejercida por la actividad de las CQ-dehidrogenasas o por la conjugación con azúcares. Este último proceso es utilizado por la planta como una forma de almacenamiento (Kakimoto, 2003; Sakakibara, 2006; Werner y col., 2006).

La modulación de las CQs afecta la respuesta al ácido abscísico (ABA), tanto de la vía dependiente como de la independiente y viceversa. Esta interacción entre las vías de respuesta a ABA y a CQs es fundamental en la adaptación de las plantas a condiciones medioambientales adversas (Nishiyama y col., 2011; Tran y col., 2010; Wang y col., 2011). Las CQs también participan en la regulación del desarrollo de las semillas así como el flujo y acumulación de nutrientes y promueven la división celular durante la

embriogénesis. Las plantas mutantes en CQ-deshidrogenasas, incapaces de degradar las CQs, presentan inflorescencias y meristemas florales más grandes, sobreproducción de óvulos y mayor rendimiento, confirmando el papel esencial de las CQs en la regulación del desarrollo reproductivo y la producción de semillas (Bartrina y col., 2011). A su vez, el transporte de CQs es controlado por señales endógenas y medioambientales que contribuyen a la traslocación de nutrientes, la fuerza de la fuente y el rendimiento de granos (Kudo y col., 2010).

II – Las citoquininas y el estrés

Los cambios en el contenido endógeno de CQs alteran la tolerancia al estrés abiótico de las plantas. Para comprender el papel que juegan las CQs en la respuesta a estrés, hay que considerar todas las funciones fisiológicas que tienen estas hormonas; entre ellas el incremento de la división celular que demanda mucha energía, la inducción de la fotosíntesis y la estimulación de la movilización de nutrientes hacia las hojas. Estos distintos efectos determinan si para la planta es conveniente incrementar o reducir los niveles de esta hormona dependiendo de la condición externa en la cual esté. Es por eso que las CQs están reguladas de forma dinámica en condiciones estresantes (Nishiyama y col., 2011; Rivero y col., 2007; Werner y col., 2010). Cuando el estrés es de tipo moderado o de corta duración se produce un incremento transitorio de los niveles de CQs o de su señalización (Havlová y col., 2008), mientras que cuando el estrés es severo o prolongado, las CQs se reprimen dado que este tipo de estrés está normalmente asociado con una reducción en el crecimiento y relocalización de los recursos energéticos limitados (Nishiyama y col., 2011). Los estreses provocados por la sequía y la elevada salinidad de los suelos, reprimen la producción y el transporte de CQs desde las raíces. La aplicación exógena de CQs es capaz de producir un incremento de la apertura estomática y de la transpiración y promover la actividad fotosintética (Ha y col., 2012).

III – Las citoquininas y la agrobiotecnología

Los conocimientos de las vías de síntesis y de regulación de las CQs, así como sus funciones frente al estrés, despertaron el interés de manipular por medio de la biotecnología su biosíntesis, degradación y señalización con el objetivo de aumentar la tolerancia y productividad de las plantas (Ferreira y Kieber, 2005; Kakimoto, 2001; Takei y col., 2001; Takei y col., 2004, Figura 1).

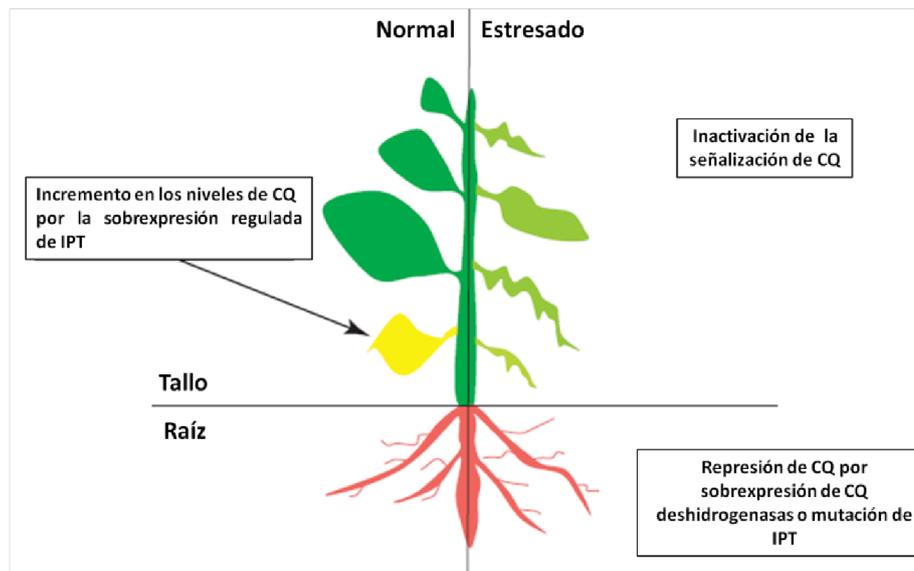


Figura 1: Estrategias para el desarrollo de plantas tolerantes a estrés por medio de la manipulación de CQ (adaptado de Ha y col., 2012).

En este sentido trabajaron varios grupos de investigadores en el mundo. Una de las estrategias de manipulación fue la fusión al gen *IPT* de *Agrobacterium tumefaciens* con promotores que dirigen su expresión específicamente en semillas. En plantas de tabaco transformadas con construcciones de este tipo, se produjo un incremento del peso seco de las semillas y su contenido de proteínas (Ma y col., 2002; Ma y col., 2008; Ma y col., 1998).

Otra estrategia para manipular los niveles de CQs fue la de mutar las múltiples copias de *IPT* y a su vez sobreexpresar la enzima CQ-deshidrogenasa. Las plantas de *Arabidopsis* resultantes fueron más tolerantes al estrés hídrico y presentaron una mayor sensibilidad al ABA; esta hipersensibilidad explicaría su mejor adaptación a las

condiciones de estrés hídrico (Nishiyama y col., 2011). Por otro lado, la sobreexpresión constitutiva de genes involucrados en la degradación de CQs generó plantas de *Arabidopsis* y tabaco con mayor biomasa radicular y menor desarrollo del tallo (Werner y col., 2010). Esta penalidad se pudo atemperar expresando las CQ-deshidrogenasas específicamente en raíces; las plantas transgénicas así obtenidas presentaron una mayor biomasa radicular que estaría ayudando a la supervivencia frente a estrés hídrico y a la falta de nutrientes. Además, estas plantas no presentaron penalidades en la biomasa aérea (Werner y col., 2010). En contraste, la expresión constitutiva de *IPT* en tabaco generó plantas con un fenotipo de menor crecimiento radicular y mayor susceptibilidad al estrés hídrico (Smigocki y Owens, 1989).

Varios tipos de estrés, entre ellos el generado por sequía disparan mecanismos de senescencia foliar. Este proceso también se da en condiciones de crecimiento normales cuando los tejidos envejecen y se caracteriza por la pérdida de clorofila, lípidos, proteínas y ARNm (Gan y Amasino, 1997). La senescencia tiene un gran impacto en la productividad de las plantas dado que genera la re-movilización de nutrientes desde los tejidos vegetativos hacia los órganos reproductivos, donde se desarrollan las semillas (Oh y col., 1997). A su vez, la senescencia foliar implica que el tejido que desencadena este mecanismo deje de ser fuente de fotoasimilados, dado que deja de hacer fotosíntesis.

Se ha logrado reducir la senescencia foliar en estrés aumentando los niveles de CQs en forma controlada con la ayuda de promotores inducibles por el mismo estrés dirigiendo la expresión de genes que participan en la síntesis de estas fitohormonas. Esta expresión controlada aumentó la capacidad de reciclaje de las especies reactivas del oxígeno (EROs) permitiendo el mantenimiento de la actividad fotosintética en condiciones de estrés (Merewitz y col., 2010; Qiu y col., 2012; Rivero y col., 2007; Xu y col., 2010; Xu y col., 2009). Esta estrategia de expresión inducible permitió además mantener el balance entre los niveles de CQs y de otras hormonas en condiciones controladas de crecimiento, tanto en mono como en dicotiledóneas, ya que las plantas sólo expresaron el transgén en condiciones estresantes, evitando de esta forma los efectos pleiotrópicos. En concordancia con esto, los autores de estos trabajos obtuvieron evidencias experimentales que sugirieron que el incremento de CQs justo

antes del inicio de la senescencia aumenta la longevidad de las hojas y la capacidad fotosintética en condiciones de estrés hídrico y térmico. Finalmente, el fenotipo de tolerancia de estas plantas se caracterizó por no tener penalidades en la productividad (Merewitz y col., 2010; Peleg y col., 2011; Qin y col., 2011; Rivero y col., 2010; Rivero y col., 2007; Rivero y col., 2009; Xu y col., 2010).

IV – La expresión de IPT en relación a la tolerancia al estrés y la productividad

La utilización del promotor P_{SAG12} , específico de senescencia, para dirigir la expresión de *IPT* ha tenido resultados exitosos retrasando la senescencia foliar en distintas especies vegetales como *Arabidopsis*, lechuga, petunia y tabaco (Gan y Amasino, 1995; Ma y col., 2008).

Otra herramienta que se ha utilizado es P_{SARK} , un promotor que se induce durante la maduración y la senescencia. P_{SARK} es el promotor de un gen que codifica un receptor de quinasa asociado al proceso de senescencia y además se induce por estrés abiótico (Hajouj y col., 2000). El análisis bioinformático de su secuencia sugirió que este promotor presenta múltiples elementos en *cis* con los que interaccionarían diferentes FTs y que en su modulación también estarían participando distintas hormonas (Delatorre y col., 2012).

Las plantas de tabaco transformadas con la construcción $P_{SARK}::IPT$ (de ahora en adelante, denominadas plantas IPT) mostraron tolerancia a estrés hídrico. En estas condiciones algunos genes de la vía de biosíntesis de ABA están reprimidos, algunos genes de la biosíntesis de brasinoesteroides (BR) están inducidos y las plantas presentaron mayor capacidad fotosintética (Rivero y col., 2010; Rivero y col., 2009). En plantas de algodón crecidas en invernáculo (Kuppu y col., 2013) y en plantas de maní sembradas en el campo (Qin y col., 2011) transformadas con la construcción $P_{SARK}::IPT$ se observó una protección de la maquinaria fotosintética contra el deterioro que generó el estrés y de esta forma, se lograron mayores tasas fotosintéticas y mayor producción luego del estrés por falta de agua.

En las plantas de arroz que expresan *IPT* bajo el control del promotor P_{SARK} , *IPT* se indujo significativamente en estadios avanzados del desarrollo durante la senescencia natural. Además, durante episodios de sequía, los niveles de transcritos de *IPT* también se fueron incrementando durante el período de estrés, no sólo en las hojas más viejas sino también en hojas jóvenes, panículas y raíces, lo que confirma que P_{SARK} responde de forma específica tanto a la senescencia como al estrés. Estas mismas plantas, transformadas con la construcción $P_{SARK}::IPT$, presentaron menor senescencia y desarrollaron síntomas típicos del estrés aplicado de forma tardía comparadas con las salvajes tanto cuando el tratamiento se aplicó antes o después de la antesis. En ambos casos toleraron mejor el estrés hídrico que sus pares salvajes. La tolerancia se hizo evidente en una mayor biomasa y producción de semillas. En condiciones normales de crecimiento no se observaron diferencias significativas con las plantas salvajes en el fenotipo morfológico o de desarrollo (Peleg y Blumwald, 2011, Figura 2).

Entre las características de las plantas de arroz transformadas con la construcción $P_{SARK}::IPT$, se destacó que la asimilación de carbono y nitrógeno no se vio afectada, aún en estrés, mientras que en las plantas salvajes estas vías se afectaron seriamente en estas condiciones. En el mismo sentido, las plantas transgénicas en condiciones de sequía no modificaron su capacidad fotosintética respecto a las condiciones normales de crecimiento y el contenido de sacarosa en sus hojas bandera fue mayor que en las hojas bandera de las plantas salvajes (Reguera y col., 2013). Otra diferencia fenotípica entre las plantas de arroz *IPT* y sus pares salvajes fue el incremento de los niveles de transcritos de genes relacionados con la regulación y señalización de BR y la disminución de los relacionados con las vías de JA. Estos cambios hormonales se relacionan con la movilización de recursos que se produce en una situación de estrés y se reflejan en el metabolismo de carbono y nitrógeno, resultando en la modificación de la relación fuente/sumidero. Esta modificación se hizo evidente en el mayor rendimiento de semillas, su mejor calidad, contenido de hierro y de zinc, así como de almidón observado en las plantas *IPT* (Peleg y col., 2011).

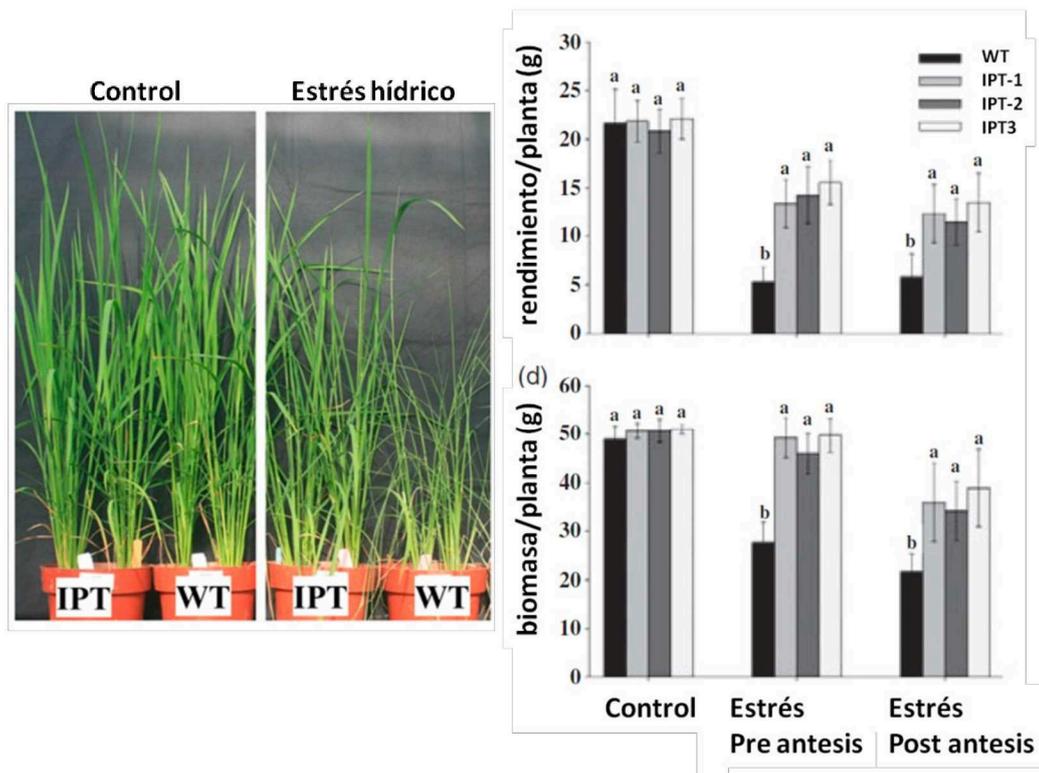


Figura 2: Fenotipo de las plantas salvajes y $P_{SARK}::IPT$ en condiciones control y de estrés. Izquierda: fotografía ilustrativa del fenotipo de las plantas en condiciones estándar o sometidas a estrés. Derecha: Producción de semillas y biomasa de las plantas en condiciones normales o sometidas a estrés hídrico, antes y después de la antesis (adaptado de Peleg y col., 2010 y de Reguera y col., 2013).

Con el objeto de dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales la expresión de *IPT* en estrés hídrico genera ventajas biotecnológicas en las plantas de arroz sin penalidad en el en condiciones control, los autores compararon los transcriptomas de hojas bandera de plantas de arroz transformadas y plantas salvajes, tanto en condiciones control como en estrés hídrico. Los resultados de estos análisis pusieron en evidencia que, además de otros genes regulados, varios factores de transcripción cambiaron su expresión. Entre estos factores de transcripción nos interesamos particularmente por *OsWRKY47*, que pertenece a la familia WRKY, presenta características estructurales divergentes y se expresa muy poco en hojas bandera de plantas salvajes. Notoriamente, la expresión de *OsWRKY47* aumenta considerablemente en las hojas bandera de plantas IPT sometidas a estrés.

RESULTADOS

Los factores de transcripción (FTs) son proteínas modulares que reconocen secuencias específicas en las regiones regulatorias de sus genes blanco, se unen a ellas a través de sus dominios de unión y de esa forma, y en combinación con la maquinaria basal de transcripción, activan o reprimen vías de señalización completas. OsWRKY47 es el único FT de tipo WRKY que presenta una regulación diferencial en el análisis transcriptómico de las plantas IPT. Las diferencias de expresión se detectaron tanto al comparar las plantas transgénicas IPT con las salvajes en condiciones de estrés hídrico como cuando se compararon las mismas plantas IPT con condiciones estándar con respecto a las condiciones de estrés hídrico. Es de hacer notar que no se observaron diferencias de expresión en las plantas salvajes sometidas a estrés hídrico con respecto a las mismas en condiciones normales, de lo que se deduce que este gen estaría respondiendo específicamente a la presencia del transgén sólo en condiciones de estrés. Estas observaciones llamaron nuestra atención y nos llevaron a analizar y determinar si OsWRKY47 estaría cumpliendo un papel importante en el desarrollo de alguna de las características fenotípicas de las plantas IPT.

I – La expresión de OsWRKY47 se induce en las plantas IPT estresadas

Antes de iniciar un análisis pormenorizado de las posibles funciones de OsWRKY47, decidimos validar los datos del ensayo de microarreglos que indicaban una regulación diferencial de este FT en las plantas IPT con dependencia de las condiciones de crecimiento estresantes. Se midieron los niveles de transcritos de *OsWRKY47* por medio de RT-qPCR y los resultados de estos ensayos indicaron que *OsWRKY47* se indujo alrededor de seis veces, tres días después de aplicar estrés hídrico y la inducción decayó a partir del cuarto día de estrés en las plantas IPT (Figura 3), de forma similar al comportamiento de los niveles de transcritos de *IPT* en estas plantas (Peleg y col., 2011). A pesar de este decaimiento, los niveles de transcritos de *OsWRKY47* fueron

más altos en las plantas estresadas que en las que se dejaron en condiciones de buena irrigación. Cuando las plantas sometidas a estrés hídrico fueron reirrigadas, los niveles de transcritos de *OsWRKY47* volvieron a los valores observados en condiciones control. No se observaron diferencias significativas en la expresión de este FT entre las plantas salvajes y las transgénicas en condiciones control, ni en las plantas salvajes sometidas a los distintos tratamientos, indicando que de *OsWRKY47* estaría regulado de alguna forma por IPT en condiciones de estrés (Figura 3).

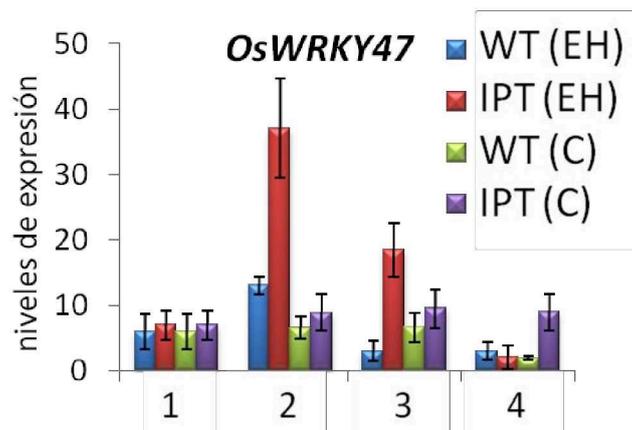


Figura 3: La expresión de *OsWRKY47* se induce por estrés hídrico en las plantas de arroz transformadas con $P_{SARK}::IPT$. Niveles de expresión de *OsWRKY47* en hojas bandera de plantas salvajes y transgénicas medidos por RT-qPCR. Las plantas se sometieron a estrés hídrico (EH) y se tomaron muestras cuando se inició el tratamiento (1), a los 3 días (2), a los 4 días (3) y luego de reirrigar a las plantas (4). Los valores se normalizaron utilizando el factor de elongación de arroz como control interno (ID: LOC_Os03g08010). Los valores representan el promedio de seis muestras y su desviación estándar.

II– *OsWRKY47* une preferencialmente la secuencia GTTGACC in vitro

Continuando con la caracterización de *OsWRKY47* y con el objeto de develar cuáles serían los genes regulados por este FT, se abordó como estrategia de estudio la identificación de la secuencia de ADN unida por *OsWRKY47*, utilizando técnicas *in vitro*.

Se realizó un ensayo de selección de sitios de unión asistida por PCR (SELEX) para el cual, se expresó el dominio de unión a ADN de OsWRKY47 en *E. coli* como fusión con GST y la proteína recombinante expresada, se purificó por cromatografía de afinidad. Se realizaron rondas de SELEX enfrentando la proteína purificada a un oligonucleótido que contiene 12 pb aleatorias en el centro y dos brazos conservados que permiten su amplificación y clonado posterior. Luego de la séptima ronda no se observaron mejoras en la afinidad y por ese motivo, se clonaron los productos de PCR. Se eligieron 14 clones individuales para determinar su secuencia. Las secuencias se alinearon y este alineamiento resultó en un consenso de 7 pb (G/A)**TTGAC**(T/C) o su secuencia complementaria, (A/G)**GTCAA**(T/C). Estas secuencias seleccionadas por OsWRKY47 contenían la caja W canónica (T)**TGAC**(C/T), (Figura 4). Fue notorio además, que las posiciones -4, -5, 9 y 10 mostraran una elevada conservación de A, lo que enriqueció la información obtenida de este análisis.

Con el fin de resolver la incertidumbre en las posiciones que flanquean la secuencia consenso central, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos doble hebra variando las posiciones inciertas: 1 (**GTTGACT**), 2 (**GTTGACC**), 3 (**ATTGACT**) y 4 (**ATTGACC**). Los mismos se marcaron radioactivamente y se enfrentaron a la proteína recombinante. Se realizaron ensayos de retardo en geles (EMSA, del inglés *Electroforetic Mobility Shift Assay*) con y sin oligonucleótidos competidores (Figura 5).

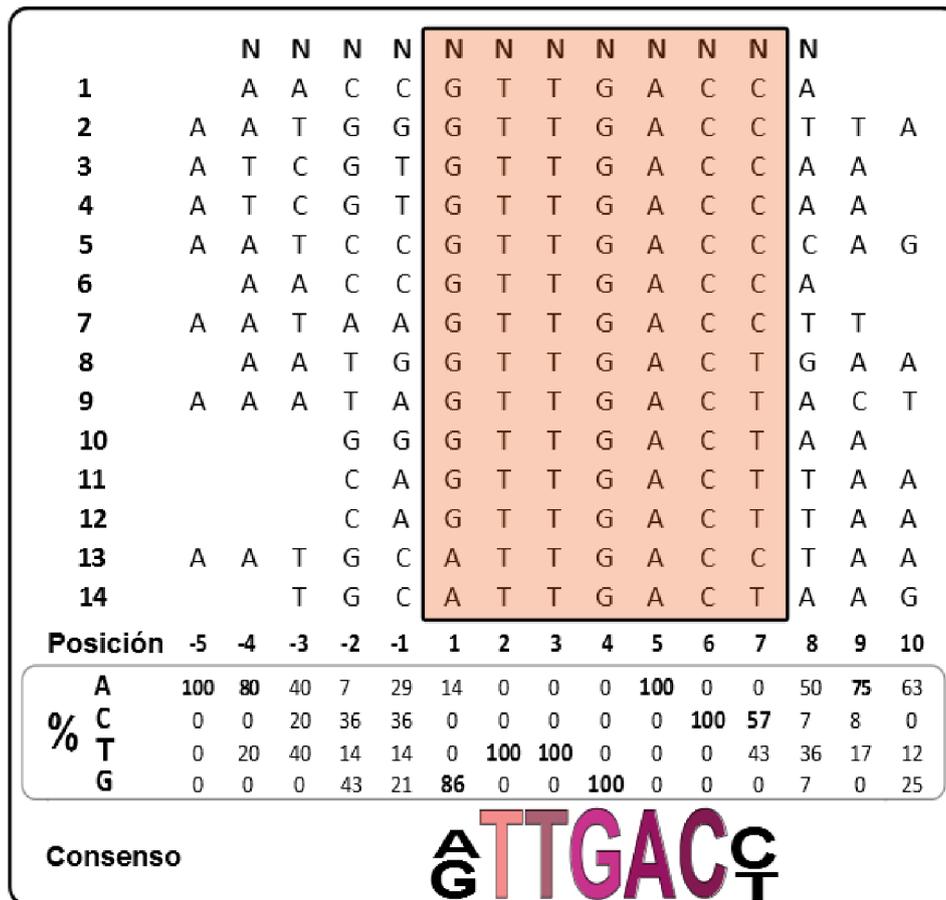


Figura 4: OsWRKY47 une *in vitro* la secuencia (G/A)TTGAC (T/C) que contiene la caja W canónica. Se muestra la alineación de las secuencias de 14 clones independientes correspondientes a los oligonucleótidos seleccionados provenientes de la última ronda de SELEX. En la parte inferior se observa una tabla que muestra la frecuencia de cada nucleótido en las posiciones indicadas y la secuencia consenso derivada de este análisis.

En la Figura 5 se observa que el nucleótido en la primera posición es determinante para la unión a ADN de OsWRKY47 mientras que el nucleótido en la séptima posición pareciera tener menor importancia. El cambio de G por A en la posición 1 generó una disminución dramática de la unión mientras que el cambio de C por T en la posición 7 no produjo grandes variaciones. Para definir con más precisión la secuencia de unión preferida por OsWRKY47, se realizó un ensayo de competencia en geles de retardo. Como se ve en la Figura 5, tanto la secuencia GTTGACC, como la secuencia GTTGACT fueron unidas fuertemente por OsWRKY47. Sin embargo, la comparación indicó que la C en la posición 7 produjo una unión más fuerte. El conjunto de resultados indicó que la secuencia de unión preferida por OsWRKY47 es GTTGACC.

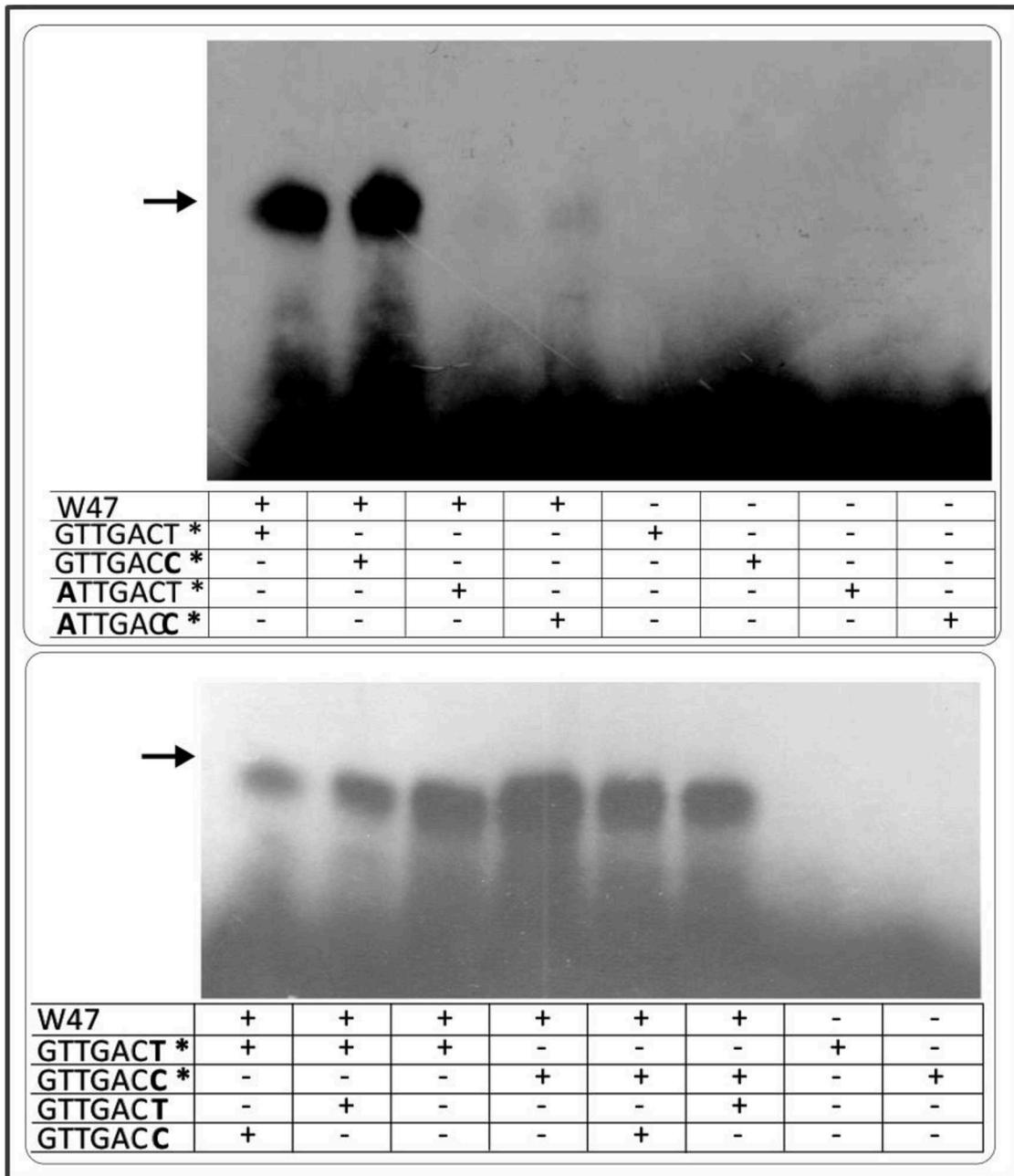


Figura 5: OsWRKY47 prefiere unir la secuencia GTTGACC. Arriba: ensayo de EMSA realizado con OsWRKY47 y con cuatro variantes que incluyen la secuencia consenso central. Abajo: ensayo de EMSA con oligonucleótidos sin marcar como competidores para determinar la afinidad de unión a ADN de OsWRKY47. En las tablas por debajo de las fotografías de las placas de los geles se indica qué combinación de oligonucleótidos fue sembrada en cada calle. Los ensayos se realizaron como se detalla en M&M y los oligonucleótidos competidores se agregaron en exceso, alrededor de cien veces, comparados con los oligonucleótidos marcados.

II – Genes que podrían estar regulados por OsWRKY47

Con el objetivo de detectar qué genes podrían estar regulados por OsWRKY47, una vez definida la secuencia de unión, se consideró la misma y los resultados del ensayo de microarreglos aplicando los criterios que se definen a continuación:

- 1) Genes cuya expresión fuera distinta en plantas IPT respecto a las plantas salvajes en condiciones de estrés
- 2) Genes cuya expresión fuera distinta en plantas IPT estresadas respecto a las crecidas en condiciones normales
- 3) Genes que posean en su región promotora la secuencia unida por OsWRKY47 *in vitro* determinada por los ensayos de SELEX
- 4) Genes co-expresados con *OsWRKY47* en plantas salvajes según lo recabado en bases públicas de datos

Las condiciones 1) y 2), se fijaron de esta manera dado que son las que se condicen con el patrón de expresión de *OsWRKY47* en plantas salvajes comparadas con plantas IPT. El objetivo fue el de filtrar los genes se regulen en las mismas condiciones que lo hace el FT en estudio. Al aplicar este filtro, no se excluyeron los genes que además de cumplir con las condiciones 1) y 2) variaron sus niveles de transcriptos en plantas salvajes sometidas a estrés comparadas con las crecidas en condiciones normales. Aunque los ensayos de microarreglos indicaron que *OsWRKY47* no se regularía por estrés en plantas salvajes, decidimos en una primera instancia, no descartar este grupo de genes.

La condición 3) fue el motivo por el que se hicieron los ensayos de SELEX. Esta condición intentó filtrar los genes que además de cumplir con las condiciones 1) y 2) tuvieran en su promotor la secuencia de unión que reconoce específicamente este FT. Entre éstos es posible encontrar blancos directos. Debido a que *OsWRKY47* presentó una elevada afinidad por las secuencias GTTGACC y GTTGACT y a pesar de que estrictamente unió con más fuerza la primera, no se hicieron distinciones entre estas dos secuencias en este paso de filtrado. La secuencia GTTGAC(C/T) y su complementaria serán denominadas como “caja W47” a partir de ahora.

Es pertinente aclarar que no se detectó ningún otro FT de tipo WRKY en el ensayo de microarreglos, que presente una expresión diferencial entre las plantas IPT y las salvajes sometidas a estrés y al mismo tiempo que se regule de forma distinta entre las plantas IPT estresadas con respecto a las mismas en condiciones estándar.

La condición 4) se estableció para filtrar los genes que naturalmente se expresen como lo hace *OsWRKY47* según las bases de datos (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>, <http://evolver.psc.riken.jp/seiken/OS/co-express.html>). La mayor concentración de CQs, debida a la expresión de IPT genera en hojas bandera la expresión de genes que normalmente no se expresan de manera significativa en ese órgano. Con el objetivo de encontrar blancos naturales de *OsWRKY47* en las plantas salvajes fue necesario aplicar este filtro.

En condiciones estándar, las plantas IPT comparadas con las salvajes, presentaron 7800 genes regulados de forma diferencial. En las condiciones de estrés hídrico aplicadas a estas plantas para el ensayo de microarreglos, 1070 genes se regularon de forma diferencial en las plantas IPT respecto de las salvajes. La intersección de estos dos grupos (356 genes) contiene los genes que se regulan de forma diferencial específicamente en las plantas IPT en condiciones de estrés. Las proteínas codificadas por estos 356 genes actuando en conjunto serían las responsables del fenotipo de las plantas IPT en estrés hídrico (Figura 6).

Se realizó un análisis de estos 356 genes con el programa Mapman, una herramienta bioinformática que ubica a los genes regulados en diagramas de vías metabólicas u otros procesos celulares. Si bien ninguna vía metabólica o proceso clasificado por este programa se vio afectado particularmente, sí se pudieron identificar genes que participan de diversos procesos. Se observó que muchos de estos 356 genes estaban relacionados con el metabolismo general de proteínas y se identificaron varios genes que participan del metabolismo secundario, de lípidos, de ARN y en señalización. Otros genes están involucrados en la síntesis, degradación y señalización de las hormonas ABA, CQs, auxinas, BR y etileno. Además se encontró regulado de forma diferencial el transporte, el metabolismo redox y una vía de respuesta a estrés biótico.

El análisis se continuó evaluando la presencia de la caja W47 en la región promotora de estos 356 genes (3ª condición). Luego de pasar por este filtro, quedaron 82 genes. Éstos serían putativamente genes regulados en forma directa por OsWRKY47 (Figura 6). Un análisis *in silico* por medio de Mapman arrojó resultados similares a los obtenidos en el análisis de los 356 genes; no se observaron vías particularmente enriquecidas.

Finalmente, se aplicó la condición 4). Dado que *OsWRKY47* se expresa naturalmente en raíces principalmente y muchos de los genes que podrían ser regulados por este FT tienen otros patrones de expresión en plantas salvajes, para identificar cuáles de ellos podrían ser blancos naturales, se hizo un análisis de co-expresión de estos 82 genes con *OsWRKY47*. Se utilizaron bases de datos que contienen información sobre la expresión génica en plantas de arroz de tipo salvaje en condiciones control y sometidas a distintos tipos de estrés: “*HanaDB-Os*” (<http://evolver.psc.riken.jp/seiken/OS/co-express.html>); “*Rice Oligonucleotide Array Database*” (<http://ricearray.org/>); “*Rice Genome Annotation Project*” (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) y procesos biológicos coexpresados (<http://webs2.kazusa.or.jp/kagiana/cop0911/>).

Este análisis *in silico* redujo los 86 genes a 26 (Figura 6). De estos 26 genes, 23 se coexpresan en una sola condición y tres se coexpresan en más de una condición con *OsWRKY47*. Estos tres correspondieron a una proteína de unión a calmodulina (LOC_Os12g36110), un receptor de tipo quinasa (LOC_Os06g36270) y una 3-beta-hidroxiesteroide-delta isomerasa (LOC_Os01g01369).

El análisis por medio de Mapman de los 26 genes seleccionados develó que la mayoría de ellos codifican proteínas del metabolismo redox, hormonal y de proteínas, también algunas de ellas involucradas en señalización, transporte y estrés de tipo biótico, manteniendo aproximadamente las proporciones que se observaron en los 356 genes al inicio del análisis.

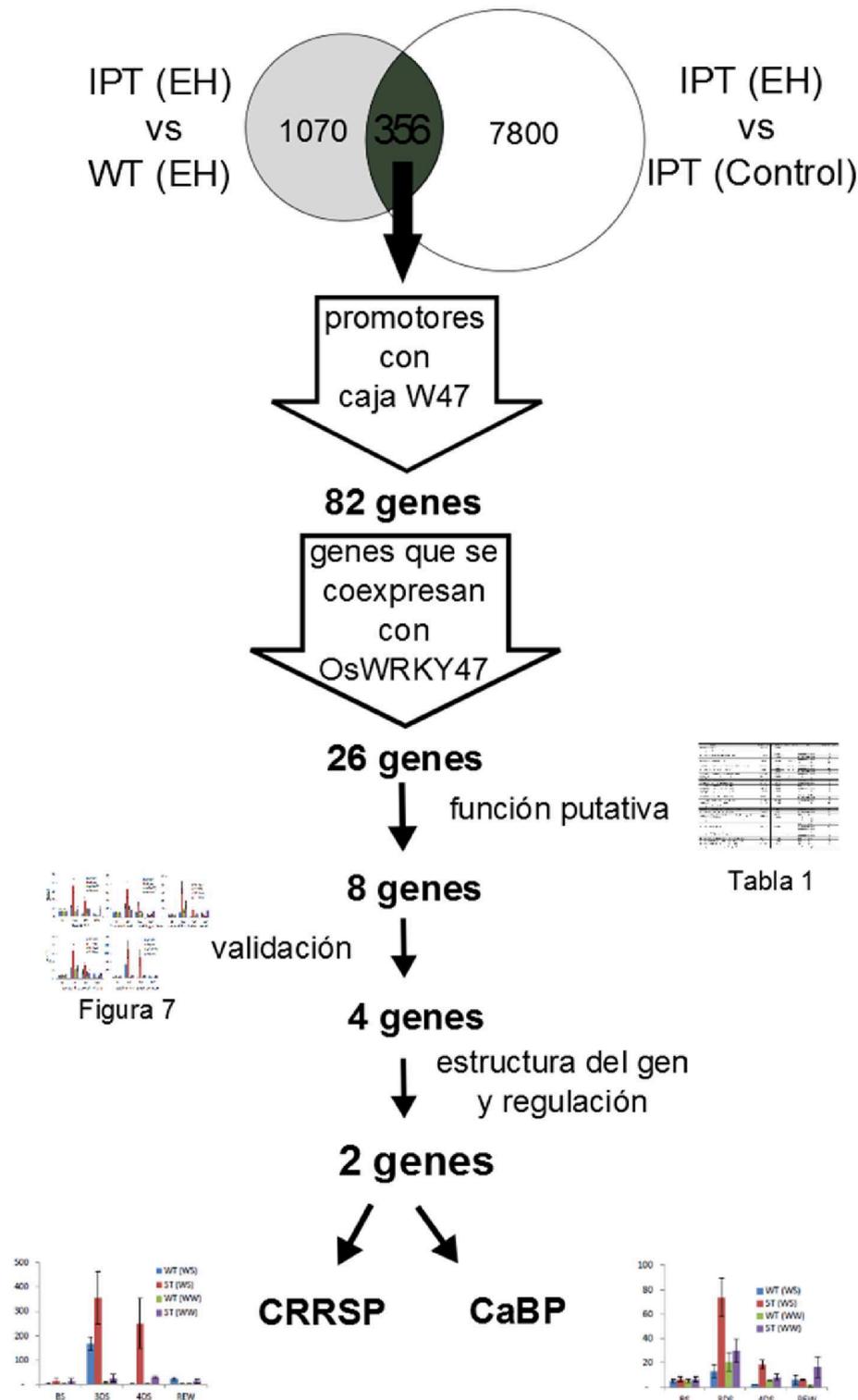


Figura 6: OsWRKY47 podría estar regulando la expresión de al menos cuatro genes involucrados en el fenotipo diferencial de las plantas IPT. Diagrama de flujo de los criterios de selección utilizados para seleccionar los genes blancos putativos de OsWRKY47.

Dado que el análisis ulterior de los putativos blancos no se podía encarar con tantos genes al mismo tiempo, se decidió elegir sólo dos para una primera etapa. Para esta elección se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: a) qué tipo de proteína codificaban, b) el nivel de la variación de su expresión en las distintas condiciones; c) en qué zona del promotor se encontraba/n la/s caja/s W47; d) si esta/s caja/s era/n la/s de mayor fuerza de unión (Tabla 1). Se detectaron varios genes que contenían en su región promotora más de una caja W47, entre ellos podemos mencionar a los genes que codifican una rodanasa, un transportador de metales y un transportador de fosfato inorgánico, una proteína de matriz repetitiva, FER, una proteína de función desconocida y una proteína rica en leucinas (Tabla 1).

También se consideró si los genes cambiaban su expresión en las plantas salvajes en condiciones control respecto a las condiciones de estrés (Tabla 1Tabla). Además se consideró la información bibliográfica respecto a la posible función de las proteínas codificadas por los genes blanco putativos, lo que contribuyó a la selección de ocho genes de los veintiséis, por resultar más interesantes para su posterior análisis. Estos se validaron por RT-qPCR (Figura 7).

El patrón de expresión de cinco de los ocho genes seleccionados se correspondió con el ensayo de microarreglos. Como se observa en la Figura 7 los genes que codifican la proteína rica en cisteínas, la proteína de unión a calmodulina, el receptor de tipo quinasa, la proteína con repeticiones ricas en cisteínas y BAK1 se comportaron de forma muy semejante a *OsWRKY47*. El gen que codifica la proteína con repeticiones ricas en cisteínas además se indujo en las plantas salvajes sometidas a estrés durante 3 días, si bien a los 4 días la variación se tornó imperceptible. Los genes que codifican el transportador de Zn, la rodanasa y la proteína de tipo serina/treonina quinasa se indujeron en las plantas IPT respecto de las salvajes en condiciones control y si bien se comportaron de forma similar a *OsWRKY47* a los 3 días de estrés como se había observado en los ensayos previos, a los 4 días de estrés no mostraron diferencias significativas entre las plantas IPT en condiciones control, comparadas con las condiciones de estrés. El patrón de expresión de estos tres genes fue diferente al observado en los ensayos de microarreglos y por lo tanto, fueron descartados para continuar con su análisis (Figura 7). Fue llamativo observar en estos ensayos que

OsWRKY47, cuyos niveles de transcripto se midieron nuevamente como control, estaría levemente inducido en plantas salvajes sometidas a estrés, comparadas con las crecidas en condiciones control (Figura 7).

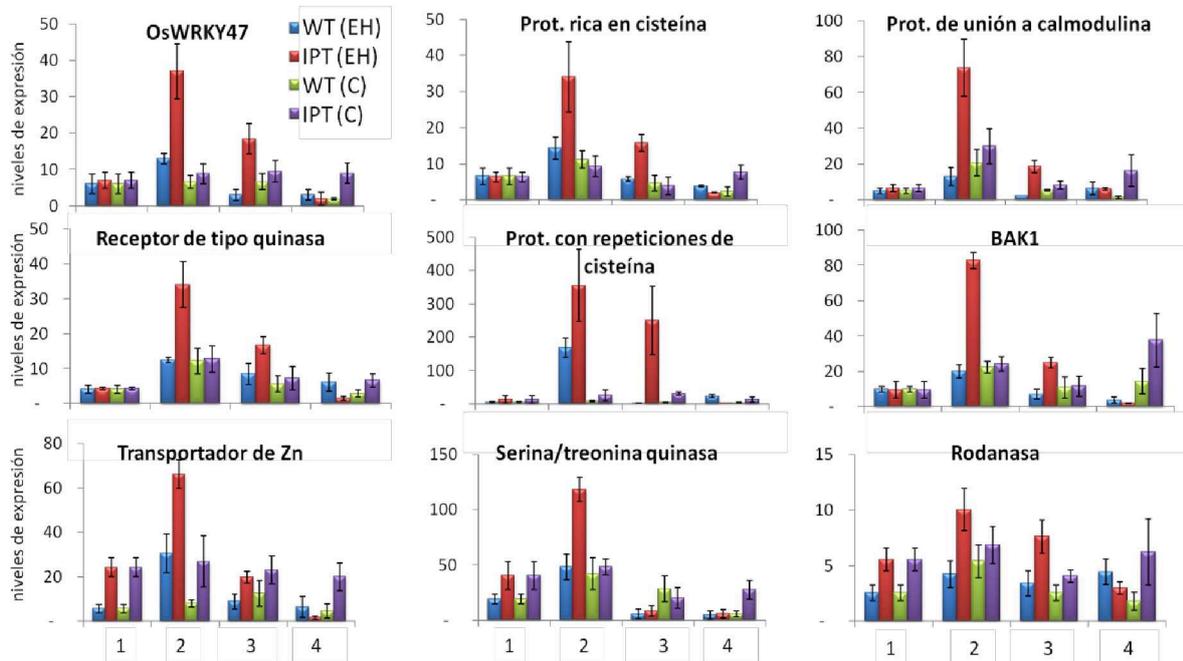


Figura 7: Cinco de los genes seleccionados validaron los resultados del ensayo de microarreglos. Niveles de transcriptos de los genes seleccionados dentro de los blancos putativos de *OsWRKY47* en hojas banderas de plantas salvajes (WT) y *P_{SARK}::IPT* (IPT) en condiciones control (C) y en estrés hídrico (EH). Las plantas se sometieron a estrés hídrico y se tomaron muestras cuando se inició el tratamiento (1), a los 3 días (2), a los 4 días (3) y luego de re-irrigar a las plantas (4). Los valores se normalizaron utilizando el factor de elongación de arroz como control interno (ID: LOC_Os03g08010). Los valores representan el promedio de seis muestras y su desviación estándar. En la parte superior de los gráficos se indican los nombres de las proteínas codificadas por los genes evaluados.

ID	Descripción de la proteína	1	2	3	Caja W47	Localización
LOC_Os07g48260	WRKY47	3,3	3,8			
LOC_Os01g01369	3-beta-hydroxysteroid-Delta-isomerasa	1,7	4,0		2	777
LOC_Os02g06290	rodanasa	1,5	2,1		1	54
			2,1		1	94
LOC_Os03g29850	transportador de metales catiónicos	3,2	4,0	1,9	1	672
					2	812
LOC_Os06g11740	adenosina 5'-fosfosulfato tipo reductasa OsAPRL2	1,8	4,3	1,9	1	1303
LOC_Os10g30770	transportador de fosfato inorgánico	1,7	0,3	0,5	1	193
			0,3		1	8449
LOC_Os03g01210	proteína con dominio rico en cisteína	1,4	3,2		1	558
LOC_Os11g34920	proteína de resistencia a la roya Yr10	2,8	4,8	1,7	1	1
LOC_Os12g36110	proteína de unión a calmodulina	3,5	4,0		1	641
LOC_Os11g45930	proteína de tipo NBS-LRR de resistencia a enfermedades	2,0	2,8		1	13
LOC_Os04g43340	proteína de defensa a enfermedades de tipo RPP13	2,0	2,4		2	73
LOC_Os06g36270	receptor de tipo proteína quinasa 5	2,2	3,3		1	56
LOC_Os04g42480	receptor de tipo proteína quinasa	1,5	1,8		2	1960
LOC_Os06g46149	proteína de matriz repetitiva serina/arginina	2,8	3,4		2	49
					1	256
LOC_Os06g46330	proteína con dominio tipo quinasa	2,0	1,9		1	64
LOC_Os04g57130	proteína involucrada en la estereoselectividad	3,2	3,2		2	522
LOC_Os01g42030	chaperona mitocondrial BCS1	1,7	2,5		2	380
LOC_Os03g16950	proteína con repeticiones ricas en cisteína	5,7	3,1		1	233
LOC_Os01g58400	proteína con dedos de zinc tipo C ₃ HC ₄	0,7	1,7		1	873
LOC_Os05g25350	receptor de tipo quinasa similar a FERONIA	1,8	2,0		2	733
			2,0		1	1390
LOC_Os08g07760	precursor del receptor quinasa asociado a insensible BR-1 (BAK1)	1,2	1,9		1	206
LOC_Os01g02130	proteína de función desconocida	3,9	3,1		2	55
					1	312
					1	1112
LOC_Os10g33140	proteína rica en leucina	3,8	4,2	2,3	2	51
					1	1317
LOC_Os03g17860	disulfuro- isomerasa (OsPDIL5-1)	1,6	1,8		2	897
LOC_Os11g12000	proteína de resistencia a enfermedades NBS-LRR	2,7	4,4		2	56
LOC_Os05g35410	canal de potasio AKT2/3	1,9	2,3		2	730
LOC_Os07g44110	citocromo P450 72A1	8,0	4,2		1	94

Tabla 1: Análisis de distintas características de los genes blancos putativos de OsWRKY47. Se muestra el código de identificación (ID), la descripción de la proteína. También se informan las veces de inducción en distintas condiciones: **1** corresponde a la diferencia en la expresión entre plantas IPT y salvajes, ambas sometidas a estrés hídrico; **2** corresponde a la diferencia de expresión en plantas IPT en estrés hídrico comparadas con las mismas en condiciones estándar; **3** corresponde a la diferencia de expresión en las plantas salvajes entre estrés hídrico y condiciones control. Se indica la caja W47 presente en su promotor, **1** corresponde a la secuencia GTTGACT y **2** corresponde a la secuencia GTTGACC. Se indica además la localización de la caja W47 en el promotor corriente arriba del sitio de inicio de transcripción (+1). En gris están sombreados los genes que se eligieron para su validación y en anaranjado los dos genes que se continuaron estudiando.

Para continuar con la caracterización de los posibles genes blanco de OsWRKY47, se eligieron entonces las siguientes proteínas:

- Proteína de unión a calmodulina (CaPU)
- Proteína con repeticiones ricas en cisteínas (PRRC)

Con el objeto de comprender mejor cuál sería el papel de OsWRKY47 en la definición del fenotipo de las plantas IPT, se decidió elegir dos de los genes blanco putativos para continuar el análisis molecular. Los genes que codifican la proteína de unión a calmodulina (CaPU) y la proteína con repeticiones ricas en cisteínas (PRRC) resultaron los más interesantes entre los validados, principalmente por la gran variación en su expresión concomitante con *OsWRKY47* y porque sus homólogos putativos de *Arabidopsis* fueron descritos como asociados a fenotipos con alguna similitud con el de las plantas IPT (Figura 7).

Es necesario considerar que el hecho de que estos genes se co-expresen con *OsWRKY47* y tengan en sus promotores la secuencia de ADN reconocida y unida por *OsWRKY47 in vitro*, no significa necesariamente que este FT se una a esta secuencia *in vivo* o que regule su expresión. Fue por este motivo es que nos propusimos en primera instancia, corroborar si *OsWRKY47* unía *in vitro* los segmentos de los promotores de *CaPU* y *PRRC* que contienen las cajas W47 putativas. Para este fin se tomaron segmentos de alrededor de 140 pb de promotor que contienen las cajas W47 putativas y se evaluó la capacidad de *OsWRKY47* de unirlos con elevada afinidad.

En la Figura 8 se observa que *OsWRKY47* une P_{CaPU} (calle 1) y P_{PRRC} (calle 9) *in vitro*. Para determinar si esta unión era específica se preincubó la proteína *OsWRKY47* con un exceso de un fragmento de ADN que contiene la secuencia TTTGACC, que presenta un cambio de G → T en la posición 1 y luego se agregaron los fragmentos marcados de los promotores en estudio. En las calles 2, 7 y 8 se observa que el fragmento competidor no fue capaz de desplazar los fragmentos de los promotores. Las calles 3, 4 y 6 corresponden a competencias realizadas de la misma forma pero con los fragmentos de los promotores sin marcar. Estos fragmentos, al estar en un gran exceso molar, desplazaron/diluyeron a los promotores marcados, indicando la especificidad de unión de *OsWRKY47*.

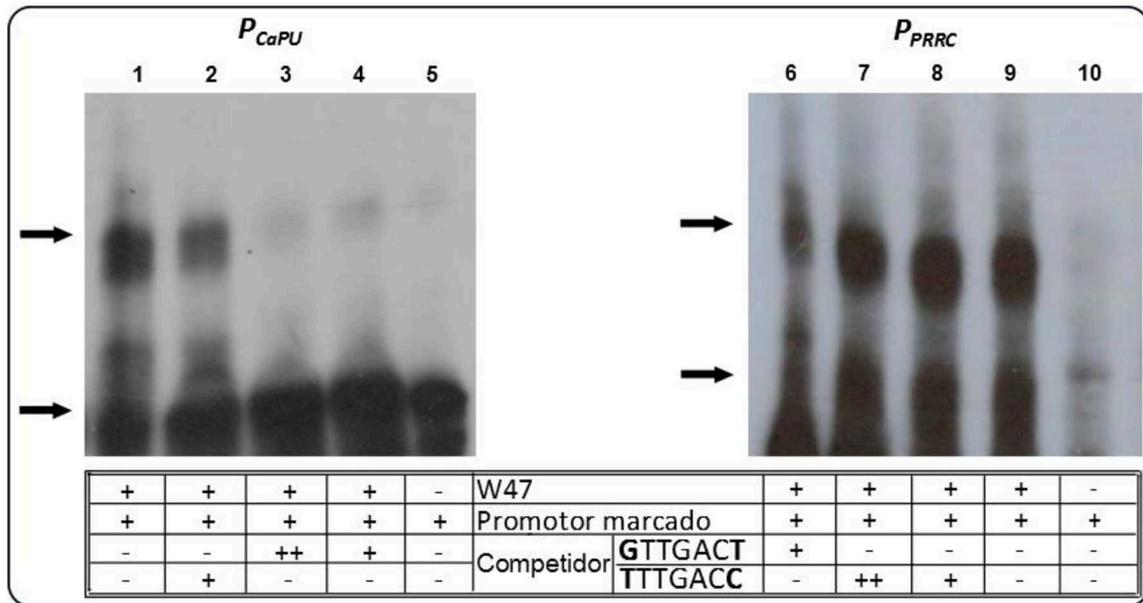


Figura 8: OsWRKY47 une con elevada afinidad *in vitro* los fragmentos de los promotores de *CaPU* y *PRRC*. EMSA con fragmentos de los promotores de *CaPU* (segmento de 142 pb, 545 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, izquierda) y *PRRC* (segmento de 137 pb, 145 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, derecha). Los ensayos se realizaron como se describió en M&M y las competencias se efectuaron con un exceso de 100 veces de fragmentos de ADN que contienen la secuencia específica de unión al ADN de OsWRKY47 (GTTGACT) y una secuencia con la posición 1 cambiada (TTTGACC).

Una vez corroborada la unión *in vitro*, se realizaron ensayos para determinar si OsWRKY47 era capaz de unir y regular los promotores en estudio en un sistema de transformación transitoria en hojas de tabaco. Se trabajó ahora con los promotores completos y con mutaciones en las cajas W47 de los mismos.

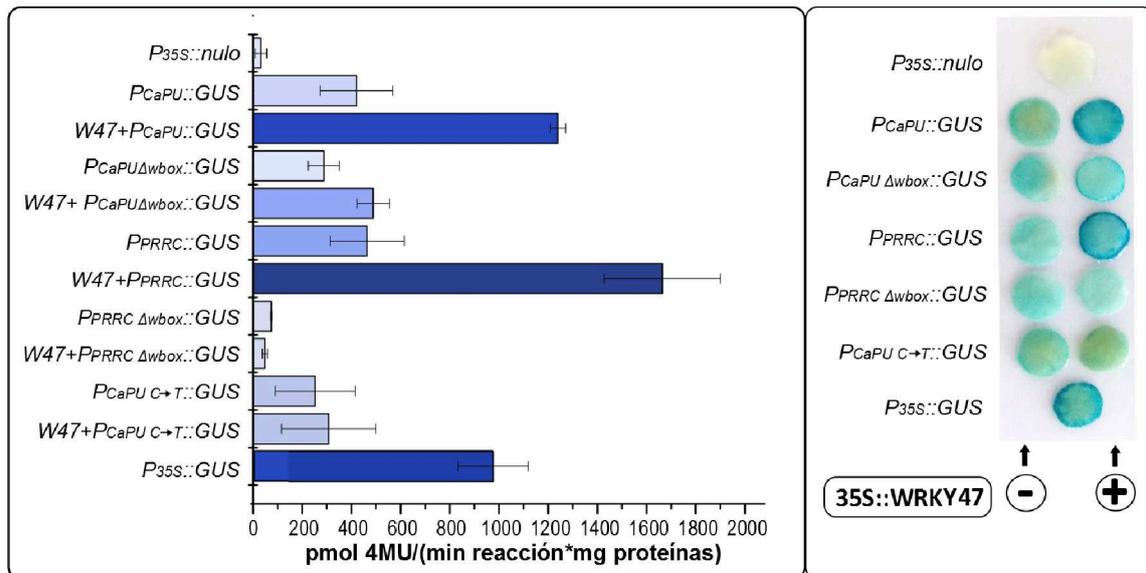


Figura 9: OsWRKY47 regula *in vivo* a los promotores de *CaPU* y *PPRC*. Expresión transitoria en discos de tabaco. Las plantas se transformaron como se indica en M&M con las construcciones detalladas a la izquierda de cada figura. Izquierda: medida de la actividad de GUS. Derecha, fotografía ilustrativa de los resultados del ensayo de histoquímica en discos de hojas transformadas. Abreviaturas: W47 (*P_{35S}::OsWRKY47*); Δwbox (caja W47 eliminada); C→T (mutación puntual dentro de la caja W47); *P_{35S}::nulo* (pBI101); *P_{35S}::GUS* (pBI121).

Cuando se transformaron las hojas de tabaco con las construcciones de los promotores dirigiendo la expresión de *GUS* se observó una actividad basal. Esta actividad aumentó entre tres y cuatro veces cuando se cotransformó con *P_{35S}::OsWRKY47* con las construcciones *P_{CaUP}::GUS* y *P_{PPRC}::GUS*. En el caso de las construcciones *P_{CaUPC→T}::GUS*, *P_{CaUP}Δwbox::GUS* y *P_{PPRC}Δwbox::GUS* Δwbox, en las cuales la caja W47 ha sido mutada o eliminada, la co-transformación con *P_{35S}::OsWRKY47* no generó variaciones en la actividad de GUS, como se observa de las medidas de actividad y de los ensayos de histoquímica (Figura 9). Estos resultados indicaron que OsWRKY47 es capaz de regular la expresión de *CaUP* y *PPRC* *in vivo* a través de las cajas W47 presentes en sus regiones promotoras.

El hecho de que OsWRKY47 haya inducido la expresión de estos dos genes *in vivo*, reforzó la hipótesis de que algunas características fenotípicas de las plantas de arroz IPT podrían deberse a la expresión diferencial de este FT.

Con el objetivo de determinar si *OsWRKY47* era responsable, al menos parcialmente, del fenotipo de las plantas IPT, se obtuvieron plantas mutantes y sobreexpresantes (*P_{Ubi}::OsWRKY47*) para *OsWRKY47* y se evaluó en estas plantas la expresión de *CaUP* y *PRRC* en condiciones control, de estrés y luego de re irrigadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10. Las plantas de arroz sobreexpresantes de *OsWRKY47* (a partir de ahora llamadas plantas *WRKY47*) presentan niveles de transcritos de este gen entre 600 y 1000 veces inducidos respecto de las salvajes en sus hojas bandera. Por otro lado, los niveles de transcritos de *OsWRKY47* en las plantas mutantes *Oswrky47* (de ahora en adelante denominadas plantas *wrky47*) están reprimidos a la mitad de los niveles de las plantas salvajes. Como se observa en la Figura 10, los niveles de *CaPU* fueron el doble en las dos líneas de plantas *WRKY47* comparadas con las salvajes tanto en condiciones control, como en estrés durante tres días y luego de re irrigadas. En las plantas *wrky47*, los transcritos de *CaPU* están reprimidos comparados con los de las plantas salvajes en condiciones control y a los tres días de estrés. Los niveles de *PRRC* son mayores en las plantas *WRKY47* y menores en las plantas *wrky47* en todas las condiciones ensayadas, comparados con los medidos en las plantas salvajes (Figura 10).

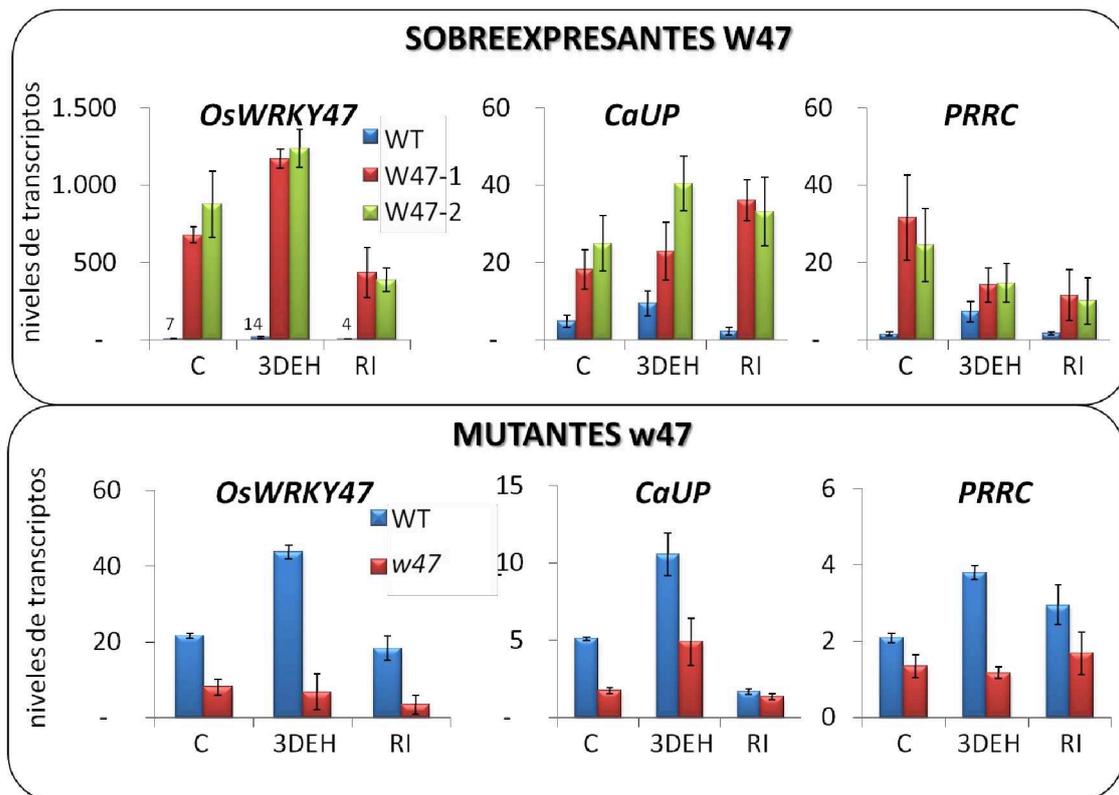


Figura 10: La expresión de *CaUP* y *PRRC* aumenta en las plantas que sobreexpresan *OsWRKY47* y disminuye en las mutantes *Oswrky47*. Se midió la expresión de *OsWRKY47*, *CaUP* y *PRRC* por medio de ensayos de RT-qPCR en hojas bandera de plantas mutantes y sobreexpresantes de *OsWRKY47*. En el panel superior se muestran los resultados de las plantas sobreexpresantes y en el inferior, de las mutantes. Las muestras se tomaron cuando se inició el tratamiento (C), a los 3 días (3DEH) y luego de re-irrigar (RI). Los valores se normalizaron utilizando el factor de elongación de arroz (ID: LOC_Os03g08010) como control interno. Los valores representan el promedio de seis muestras y su desviación estándar. En la parte superior de los gráficos se indican los nombres de los genes medidos. Abreviaturas: WRKY47 (líneas sobreexpresantes *P_{ubi}::OsWRKY47*); wrky47 (líneas mutantes de *OsWRKY47*).

IV – *OsWRKY47* juega un papel en la respuesta a estrés hídrico de las plantas de arroz

Las plantas mutantes y sobreexpresantes de *OsWRKY47* fueron caracterizadas en cuanto a su comportamiento frente a condiciones de estrés hídrico y comparadas con sus pares sin transformar. Además, se cuantificó el rendimiento de semillas en condiciones control y de estrés hídrico y el contenido de clorofila antes y después de sufrir estrés hídrico.

En la Figura 11 se observa que las plantas wrky47 luego de ser sometidas 4 días a estrés hídrico están levemente más afectadas que las salvajes. Esta diferencia fue más evidente tres días después de rehidatarlas y se reflejó en el contenido de clorofila. En condiciones control las plantas salvajes y las plantas wrky47 tenían el mismo contenido de clorofila. Sin embargo, cuando fueron sometidas a estrés hídrico, se observó que en ambos genotipos se redujo la clorofila en la misma medida. Luego de regarlas nuevamente, a los tres y seis días, las mutantes tenían menos clorofila que las salvajes. En el mismo sentido, las plantas wrky47 mostraron una disminución drástica de la producción en condiciones de estrés respecto a sus controles, tanto en condiciones de irrigación normal como después del tratamiento de estrés.

De forma opuesta a las mutantes, las plantas WRKY47 se vieron más saludables que las salvajes cuando fueron sometidas a estrés hídrico y luego de recuperarse con el riego. Además, produjeron mayor biomasa y semillas que las salvajes después del tratamiento de estrés. Sin embargo, en condiciones control las plantas WRKY47 tuvieron un rendimiento 20 % menor que las salvajes (Figura 11).

Estos resultados en conjunto indicaron que OsWRKY47 está involucrado en la tolerancia de las plantas frente a estrés hídrico y que las proteínas CaPU y PRRC podrían tener un rol en esta respuesta, dado que son reguladas de forma específica por OsWRKY47.

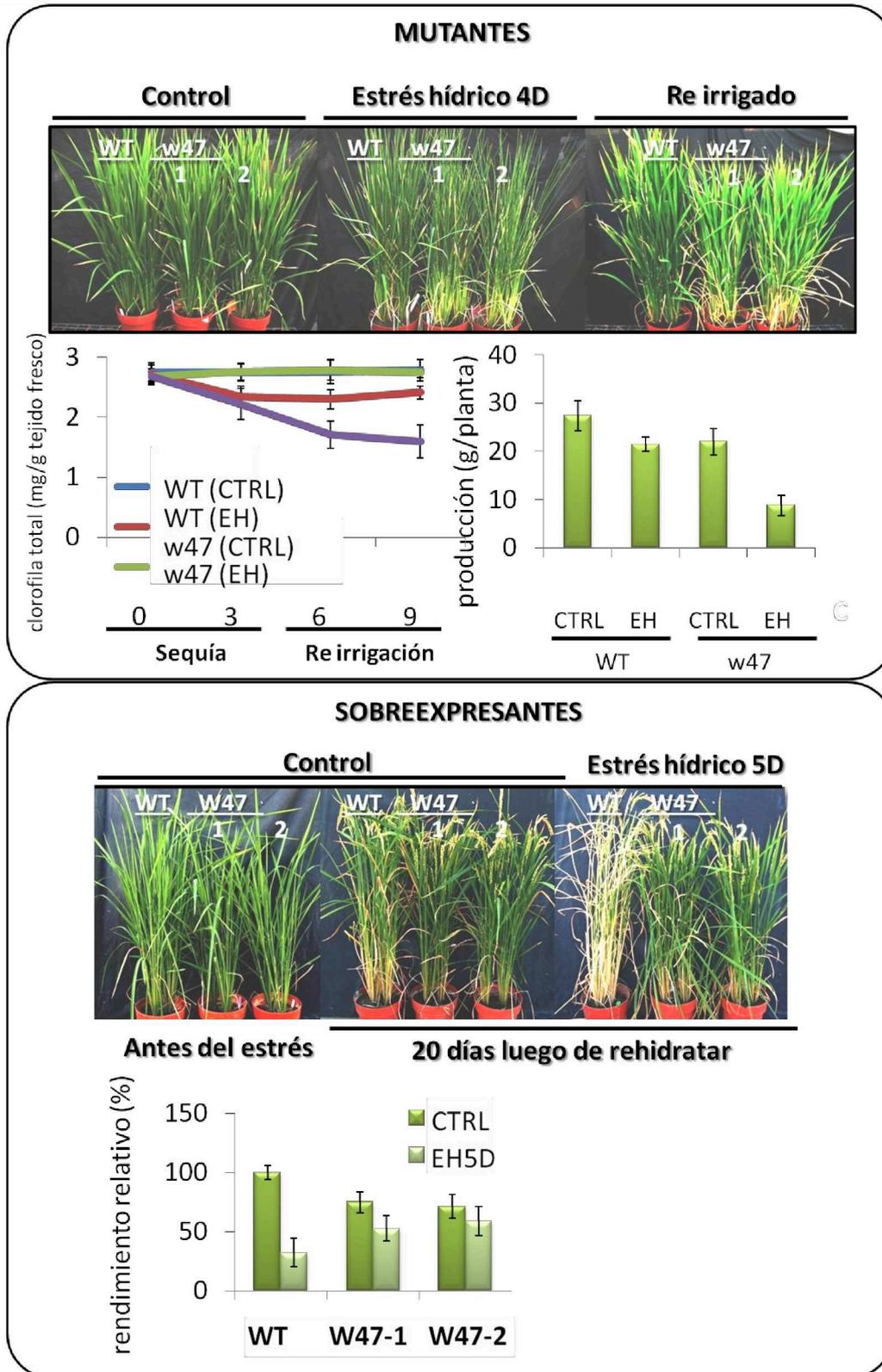


Figura 11: Las mutantes de *OsWRKY47* producen menos semillas que las salvajes cuando son sometidas a estrés hídrico y las sobreexpresantes producen más semillas que las salvajes luego de sufrir estrés hídrico por 5 días. En el panel superior se muestra una foto ilustrativa de plantas WRKY47, wrky47 y de tipo salvaje en condiciones control, sometidas a estrés hídrico (para wrky47, 4 días y para WRKY47, 5 días) y luego de ser regadas. En el panel inferior, se muestra una foto ilustrativa de las plantas sobreexpresantes, y su producción antes y después del tratamiento. En este último caso la producción se relativizó a la producción de las plantas salvajes en condiciones control, que se tomó como 100 %.

En forma paralela a la obtención de las mutantes y sobreexpresantes de *OsWRKY47* en arroz, se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* que expresan de forma ectópica y constitutiva *OsWRKY47*. El objetivo de estos experimentos fue principalmente evaluar este gen de arroz como herramienta biotecnológica. Si bien *OsWRKY47* no presenta elevada identidad de secuencia con proteínas de *Arabidopsis*, el hecho de que esta especie tenga un ciclo de vida más corto resultó atractivo para un estudio preliminar.

Se utilizó la construcción *35S::OsWRKY47* y se obtuvieron líneas homocigotas para realizar distintas evaluaciones, que llamaremos a partir de ahora plantas *OsW47*

Para determinar si las plantas *OsW47* presentaban un crecimiento diferencial respecto de las salvajes, se evaluaron los tejidos aéreos y las raíces. Se realizaron cinéticas del peso de roseta y del área de las mismas, así como del contenido de carbohidratos solubles e insolubles. Asimismo se estudió la arquitectura de las plantas y se realizaron cortes transversales de sus tallos y se midió la producción de las plantas *OsW47* y salvajes en condiciones normales de crecimiento. Como *OsWRKY47* en arroz se expresa en raíces principalmente, se midió la longitud de las raíces de las plantas crecidas en placa durante dos semanas, el peso de las raíces de plantas de seis semanas crecidas en arena como sustrato de soporte (para facilitar su aislamiento y análisis) y se realizaron cortes de las raíces para observar diferencias en su morfología. Ninguno de estos resultados mostró diferencias entre las plantas de *Arabidopsis* *OsW47* y las salvajes.

Además, las plantas *OsW47* de *Arabidopsis* fueron evaluadas en su desempeño en la producción frente a estrés hídrico leve, medio/leve, medio y fuerte. En ninguna de estas condiciones se observaron diferencias en la producción de estas plantas respecto de las salvajes. Tampoco se observaron diferencias entre transgénicas y controles en ensayos de pérdida de agua, en el consumo de agua durante el estrés ni en la arquitectura de las plantas sometidas a estrés hídrico (resultados no presentados).

Los únicos parámetros que estarían levemente afectados en las plantas *OsW47* comparadas con las salvajes fueron el contenido de proteínas en semillas y el desarrollo de la triple respuesta al etileno. Las plantas *OsW47* tienen mayor contenido

proteico que las salvajes y serían más insensibles al etileno (resultados no presentados).

El conjunto estos resultados indicó que la sobreexpresión de *OsWRKY47* no genera en *Arabidopsis* el mismo fenotipo que en las plantas de arroz y que su función no estaría conservada entre estas dos especies.

DISCUSIÓN

I – OsWRKY47, sus homólogos y su relación con el fenotipo de las plantas IPT

OsWRKY47 es un factor de transcripción (FT) de tipo WRKY que pertenece a la familia III (Ross y col., 2007). Los alineamientos realizados con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas indican que OsWRKY47 tiene elevada identidad de secuencia con HsWRKY4 de *Hordeum vulgare*, que también está clasificado en la familia III de FTs de tipo WRKY (Mangelsen y col., 2008), aunque lamentablemente esta proteína no ha sido caracterizada hasta el momento. Las proteínas de Arabidopsis más similares a OsWRKY47 son AtWRKY70, AtWRKY46 y AtWRKY54, pero la identidad de secuencia es muy baja. AtWRKY70 y AtWRKY54 son muy similares entre si y ambas han sido asociadas con la senescencia foliar en Arabidopsis (Besseau y col., 2012). Las mutantes *atwrky70* desarrollan un fenotipo de senescencia temprana y, a pesar de su elevada similitud de secuencia, las mutantes *atwrky54* no muestran cambios en la senescencia (Besseau y col., 2012; Ülker y col., 2007). Sin embargo, las mutantes dobles *atwrky54-atwrky70* desarrollan una senescencia más temprana que la de las mutantes *atwrky70*, lo que sugirió que AtWRKY70 y AtWRKY54 podrían interaccionar de forma sinérgica para regular de forma negativa el ingreso a la senescencia (Besseau y col., 2012). A pesar de la baja similitud de secuencia entre OsWRKY47 con AtWRKY70 y AtWRKY54, resultó interesante el hecho de que estas proteínas de Arabidopsis estén participando del proceso de senescencia que está alterado en las plantas IPT, lo que indicaría una cierta homología funcional.

Las plantas de arroz transformadas con $P_{SARK}::IPT$ presentan menor senescencia foliar inducida por sequía que las salvajes, producen más semillas y desarrollan mayor biomasa en estrés hídrico que sus pares salvajes, sin penalidades en condiciones normales de crecimiento (Figura 2, Peleg y col., 2011; Reguera y col., 2013). El análisis transcriptómico de las plantas de arroz IPT sometidas a déficit de agua mostró que 13 FTs de tipo WRKY cambiaron su expresión en estas plantas IPT cuando fueron

sometidas a estrés en comparación con las mismas irrigadas normalmente. Además, tres FTs WRKY cambiaron su expresión en pantas IPT respecto de las salvajes, ambas en condiciones de estrés. El conjunto de genes que cambian su expresión debido a la presencia de IPT en estrés serían los responsables del fenotipo de estas plantas en esta condición adversa. Estos genes están regulados diferencialmente por el estrés en las plantas transgénicas y no cambian su expresión o lo hacen de forma no detectable en las plantas salvajes sometidas al mismo tratamiento estresante. El único FT de tipo WRKY que cambió la expresión en ambos análisis es *OsWRKY47* (Peleg y col., 2011). Como en general los FTs regulan la expresión de muchos genes blanco corriente abajo en la cascada de señalización, el hecho de que un solo FT de tipo WRKY, *OsWRKY47*, cambie su expresión en este grupo de genes nos despertó el interés por determinar qué secuencias podría estar regulando y junto con esto, la función de este FT en la generación del fenotipo de las plantas IPT.

El análisis de microarreglos indicó que *OsWRKY47* no cambia su expresión en plantas salvajes sometidas a estrés comparadas con las crecidas en condiciones control, sin embargo, los ensayos subsiguientes de RT-qPCR mostraron que este FT es regulado por estrés en hojas bandera de plantas salvajes, dado que sus niveles se incrementaron al doble en este órgano cuando las plantas salvajes fueron sometidas a tres días de estrés hídrico. Esto se podría explicar si una inducción de dos veces fuera muy leve para pasar los filtros estadísticos de los ensayos de microarreglos. Otra explicación posible es que el experimento de varios años atrás para preparar los ARNs del ensayo de microarreglos hubiese sido hecho en condiciones levemente diferentes al llevado a cabo en este trabajo, probablemente con un estrés más leve. De la mano de la primer conjetura, la inducción de *OsWRKY47* en las plantas IPT fue de alrededor de cuatro veces. De todas formas, *OsWRKY47* se indujo más en plantas IPT que en plantas salvajes, ambas sometidas a estrés, por lo que es válido sugerir que esta proteína participaría con un papel significativo en el fenotipo de las plantas IPT.

El fenotipo de las plantas de arroz mutantes y sobreexpresantes de *OsWRKY47* confirmaron la hipótesis que planteamos: *OsWRKY47* está involucrado en la respuesta diferencial de las plantas IPT de arroz en condiciones de estrés hídrico. Si bien los

resultados de la caracterización fenotípica de las plantas WRKY47 en estrés hídrico fueron alentadores y la expresión constitutiva de *OsWRKY47* no afectó el tiempo de floración de las líneas transgénicas en condiciones de crecimiento estándar, sí produjo una reducción del 20 % del rendimiento en plantas irrigadas normalmente. Este tipo de penalidad es relativamente común cuando se utilizan promotores constitutivos, en lugar de inducibles, dirigiendo la expresión de genes claves en la regulación como son los FTs (Reguera y col., 2012; Smigocki y Owens, 1989). Por este motivo, sería interesante obtener plantas que expresen *OsWRKY47* bajo el control de un promotor inducible, como por ejemplo P_{SARK} y estudiar si con esta estrategia se logra obtener plantas tolerantes a estrés y que produzcan mayor cantidad de semillas después de este tratamiento, sin penalidades en condiciones estándar de crecimiento. Además se podría revisar el momento en el que se cosecharon las semillas, dado que las plantas WRKY47 presentan un retraso en su senescencia respecto de las plantas salvajes y todas las semillas se cosecharon al mismo tiempo. En este sentido, las panículas de las plantas WRKY47 podrían haber tenido la capacidad de desarrollar más semillas y esto podría generar que la menor producción de las plantas WRKY47 sea un artefacto debido al momento temprano (para las transgénicas) de la cosecha.

II – *OsWRKY47* y las secuencias de ADN que une

Los factores de transcripción de tipo WRKY participan en las respuestas de las plantas a efectores externos que generan estrés como la salinidad, las altas o bajas temperaturas, la falta o el exceso de agua, etc. (Tripathi y col., 2014). Si bien las funciones específicas en muchos casos aún no están totalmente claras, se sabe que contribuyen a la transducción de la señalización celular.

Los FTs WRKY unen la caja W (T)(T)TGAC(C/T), que tiene un centro conservado y secuencias que flanquean variables; este elemento en *cis* está presente en los promotores de los genes regulados por estos FTs (Rushton y col., 2010). Se ha demostrado que las secuencias que flanquean son importantes para determinar la especificidad de unión de estos FT al ADN. Por ejemplo, AtWRKY6 y AtWRKY11 unen

con mayor afinidad la secuencia **G**TTGACC que la secuencia **A**TTGACC, mientras que AtWRKY38, AtWRKY26 y AtWRKY43 prefieren la secuencia **A**TTGACC a **G**TTGACC.

Si bien las secuencias de unión a ADN de los FTs WRKY no han sido estudiadas exhaustivamente, sí hay en la literatura algunos ejemplos interesantes de estudios funcionales de algunos de estos FTs. AtWRKY18 fue caracterizado funcionalmente y participa en la señalización de ABA y en la tolerancia a sal; este FT une *in vitro* la secuencia (C/A)TTGAC(T/G) (Ren y col., 2010; Shang y col., 2010). AtWRKY6, caracterizado como un regulador de la respuesta a bajos niveles de fosfato inorgánico y de BR (Chen y col., 2009; Kasajima y col., 2010), une de forma específica GTTGACC, una secuencia similar a la unida por OsWRKY47 (Ciolkowski y col., 2008). El mismo elemento en *cis* que une OsWRKY47 es reconocido también por AtWRKY11 (Ciolkowski et al., 2008). Si bien su identidad de secuencia con OsWRKY47 es muy baja, es interesante que AtWRKY11 esté descrito como un regulador positivo de la respuesta a sequía (Wu y col., 2009).

Las bases de datos disponen de vasta información sobre los genes de arroz, sus secuencias, sus regiones promotoras, sus patrones de expresión, etc. y esto nos permitió identificar los genes blanco putativos de OsWRKY47. Utilizando como filtro la presencia de la caja W47 se analizaron las secuencias promotoras de los 356 genes (entre los que se encuentra *OsWRKY47*) que orquestados en conjunto le confieren a las plantas de arroz IPT su fenotipo diferencial.

Dentro de estos 356 genes, 116 genes además cambiaron su expresión en plantas salvajes sometidas a estrés en comparación con condiciones control, aunque su variación no fue tan exacerbada como en las plantas IPT. Los análisis de microarreglos indicaron que *OsWRKY47* no es un gen regulado por estrés hídrico en hojas bandera, ya que no cambió su expresión en las plantas salvajes sometidas o no a esta condición. Quedaron entonces 240 genes que mostraron un patrón de expresión similar al de *OsWRKY47*. El conjunto de estos 240 genes mostró un enriquecimiento en cajas W47 dentro de sus regiones promotoras con respecto al total y al grupo de los 116 genes que además varían su expresión en las plantas salvajes. El 27 % de estos 240 genes presenta al menos una caja W47 mientras que sólo el 13 % de los 116 genes tienen en su promotor la caja W47 (Figura 12). En total, 82 genes de los 356 presentan al menos

una caja W47 en su promotor (Figuras 6 y 12) si bien es claro que no todos ellos son necesariamente blancos directos de OsWRKY47.

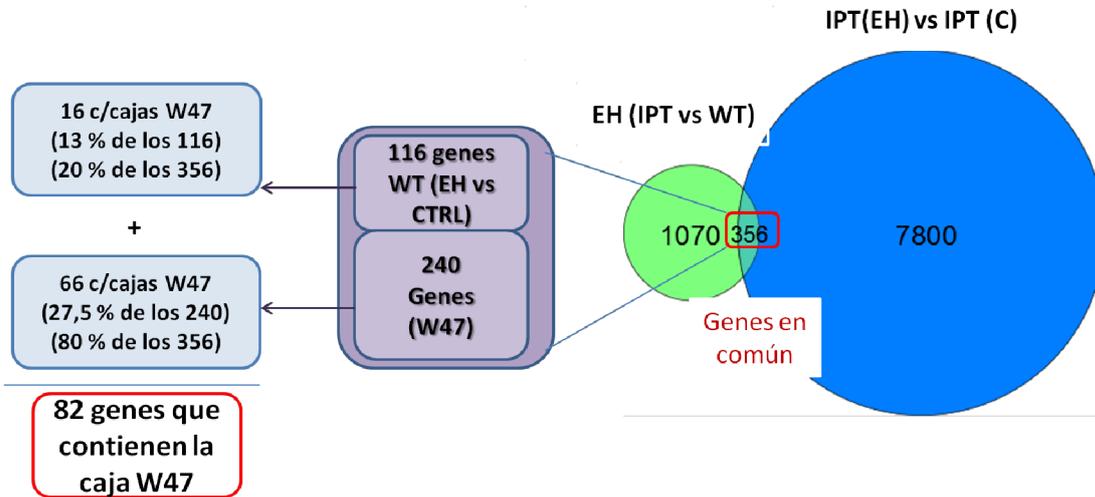


Figura 12: Análisis de la presencia de cajas W47 en las secuencias promotoras de los genes que se regulan en las mismas condiciones que OsWRKY47. Abreviaturas: EH (estrés hídrico), C (control), IPT: plantas IPT, WT: plantas de tipo salvaje.

III – OsWRKY47 y sus genes blancos

Luego de analizar la coexpresión de estos 82 genes con *OsWRKY47* quedaron 26 candidatos, de los cuales se seleccionaron algunos para validar sus niveles de transcritos.

Para continuar con su análisis se seleccionaron ocho genes. Los motivos de su elección se basaron principalmente en la información bibliográfica disponible respecto a sus posibles funciones y las vías en las que podrían estar implicados.

La validación descartó a tres candidatos, por lo que los posibles candidatos se redujeron a cinco. Estos genes se evaluaron con el objeto de seleccionar, en un principio, dos y profundizar el análisis de su regulación por parte de *OsWRKY47*.

- El receptor de tipo quinasa asociado a BAK1 (Insensible a BRI asociado a receptor quinasa (codificado por LOC_Os08g07760) está descrito como un receptor de tipo serina/treonina quinasa, miembro de la familia “*Somatic Embryogenesis Receptor*

Kinase" (SERK, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>). Opera como un coreceptor de BRI (insensible a BR de tipo I) en el desarrollo de la planta que depende de BR. La sobreexpresión de *OsBAK1* en arroz cambia rasgos de la arquitectura de la planta como la altura, qué tan erecta es la hoja, las cualidades morfológicas de la semilla y la respuesta frente a enfermedades (Li y col., 2009). *OsBAK1* está vinculado con las respuestas de la planta frente a patógenos y a herbívoros. *OsBAK1* se une a patrones moleculares asociados a patógenos/microbios (PAMPs/MAMPs), activa la proteína quinasa mitogénica 6 y desencadena la producción de especies reactivas del oxígeno (Yang y col., 2011). Su homólogo en *Arabidopsis* (50 % de identidad de secuencia) es *AtBAK1* (ID: AT4G33430), que es una proteína de tipo serina/treonina quinasa. Se demostró que su función está conservada con respecto a *OsBAK1* (Li y col., 2009) y se propuso una función en el control de la muerte celular que no dependería de los BR (Kemmerling y col., 2007). Esta información motivó a realizar la validación para este gen. Sin embargo elegimos no continuar con *BAK1* ya que se expresó muy poco en el día 4 del tratamiento estresante, mientras que *OsWRKY47* sí se expresa fuertemente en esa etapa (Figura 7). Además había sido informado en la literatura que las plantas sobreexpresantes del dominio intracelular truncado de esta proteína en arroz presentan penalidades como menor biomasa y menor peso de granos (Li *et al.* 2009), fenotipo opuesto al observado en las plantas IPT.

Los cuatro genes restantes fueron analizados con mayor detalle:

- La proteína rica en cisteínas tiene una homóloga en *Arabidopsis* con la que comparte un 63 % de identidad de secuencia. La expresión de *At2g45010* está inducida en plantas que sobreexpresan una b-hidroxiesteroide deshidrogenasa (*AtHSD*) que presentaron mayor biomasa y producción que las plantas control (tanto en *Arabidopsis* como en cebada). Este fenotipo es similar al de plantas que tienen niveles altos de BR o que son más sensibles a los BR (Li y col., 2007).

- El gen *LOC_Os12g36110* codifica una proteína de unión a calmodulina. La regulación del calcio y su homeostasis es fundamental para las plantas. El calcio es un catión fundamental no sólo en el metabolismo sino también en la señalización y en la regulación de la expresión génica y es fundamental para la respuesta estomática (Bush,

1995; Hepler y Wayne, 1985; Ruiz y col., 1993). Además hay una estrecha relación entre el calcio y el metabolismo de carbohidratos (Furuichi y col., 2001; Joham, 1957; Smeekens, 2000). Las proteínas de tipo calmodulina regulan la transducción de la señal de calcio en la célula y en esta cascada unen a las proteínas de unión a calmodulina. La expresión de la proteína de unión a calmodulina tiene un patrón de expresión similar a *OsWRKY47* en raíces infectadas con *Magnaporthe oryzae* (http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_trend_plot.shtml). La proteína con mayor identidad de secuencia en Arabidopsis tiene el código de identificación At4g31000, presenta 34 % de similitud y está regulada en respuesta a BR (Goda y col., 2004). Por otro lado, fue informado que CBP60g (At5g26920), otra proteína de unión a calmodulina de Arabidopsis que presenta 32 % de identidad de secuencia con la proteína de arroz en cuestión, está involucrada en la tolerancia a estrés hídrico. *CBP60g* se expresa en estomas y las sobreexpresantes de Arabidopsis *CBP60g* presentan hipersensibilidad al ABA y son más tolerantes a sequía que sus pares sin transformar (Wan y col., 2012). *CBP60g* no es la única proteína de unión a calmodulina relacionada con la respuesta a estrés hídrico, los niveles de transcripto de *CAMBP25* (At2g41010) se inducen frente a deshidratación (Perruc y col., 2004) y además fue informado que *CAMBP25* interacciona con distintos FTs de tipo WRKY (<http://thebiogrid.org/4038/summary/arabidopsis-thaliana/cambp25.html>). También se vio que la sobreexpresión de *CBP60* en Arabidopsis genera mayor resistencia de la planta frente a infecciones de con *Pseudomonas syringae* (Wan y col., 2012; Wang y col., 2009a). Del mismo modo, los niveles de transcripto de la proteína de unión a calmodulina de arroz están incrementados frente a infecciones con *Magnaporthe* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>). En relación con este último dato es interesante recordar que *OsWRKY47* juega un papel fundamental en la respuesta a frente a este patógeno (Wei y col., 2013). Más detalladamente, en las variedades de arroz resistentes al patógeno, *OsWRKY47* está inducido en comparación con las variedades no resistentes y las plantas de arroz que sobreexpresan *OsWRKY47* fueron más tolerantes al ataque de *Magnaporthe oryzae* que las plantas salvajes (Wei y col., 2013).

-El receptor de tipo quinasa (LOC_Os06g36270) tiene un posible homólogo en Arabidopsis al que le corresponde el código de identificación At3g4629. Este gen fue

asociado con la elongación celular durante el crecimiento vegetativo y está regulado por BR (Guo y col., 2009). Además, su expresión es regulada fuertemente en las plantas IPT y la caja W47 en su promotor es muy cercana al sitio de inicio de la transcripción.

-La expresión del gen que codifica la proteína con repeticiones ricas en cisteína tiene una elevada correlación con la de *OsWRKY47* en raíces, raíces tratadas con arsenato y hojas tratadas con CK (http://rice.plantbiology.msu.edu/analyses_search_trend_plot.shtml). Su proteína homóloga en *Arabidopsis* corresponde a una proteína de respuesta a karriquina relacionada con la familia de los receptores de tipo proteína quinasa (ID: At5g48540, 46 % de identidad de secuencia). Esta proteína de *Arabidopsis* aumenta su expresión en plantas mutantes *abi4* y *abi5* en comparación con la observada en plantas salvajes (Nakabayashi y col., 2005) y también en plantas salvajes sometidas a escasez de oxígeno en períodos de tiempo entre 4 y 20 horas, comparadas con las mantenidas en condiciones normales (Klok y col., 2002). Se puede remarcar que las mutantes de *abi4* tienen mayor biomasa que sus controles (Kerchev y col., 2011).

La correlación positiva entre estos cuatro genes, los conocimientos que sobre ellos se tiene y el fenotipo de las plantas mutantes y sobreexpresantes de sus homólogos, indicaron su posible contribución a la tolerancia a estrés hídrico observada en las plantas IPT (Peleg y col., 2011). Las plantas IPT presentaron mayor cantidad de BR, una mejor respuesta a estrés hídrico y ABA y mayor producción de biomasa y semillas (Peleg y col., 2011).

Todos ellos podrían ser posibles blancos de *OsWRKY47* según los resultados experimentales mostrados en esta Tesis. El estudio se continuó con un análisis más detallado de dos de los cuatro genes: la proteína de unión a calmodulina (*CaPU*) y la proteína con repeticiones ricas en cisteínas (*PRRC*).

Los análisis *in vitro* revelaron que *OsWRKY47* fue capaz de unir los promotores de *CaPU* y *PRRC* de forma específica (Figura 8). En el mismo sentido, los análisis *in vivo* por transformación transitoria de hojas de tabaco demostraron que *OsWRKY47* fue capaz de unir específicamente las cajas W47 de estos promotores y activar su expresión

(Figura 9). Además la caja W47 del promotor de *PRRC* podría ser reconocida por otros FT *in vivo* en plantas de tabaco dado que su mutación (correspondiente a la construcción $P_{PRRC\Delta wbox}::GUS$) produjo menores niveles basales de GUS que cuando se transformó con el promotor intacto (correspondiente a la construcción ($P_{PRRC}::GUS$)). Esto no fue sorprendente dado que la caja W47 contiene a la caja W canónica y si bien las bases adyacentes son importantes para determinar la afinidad, muchos otros FTs de tipo WRKY podrían unir esta secuencia, como se mencionó anteriormente en la discusión.

En concordancia con los datos de unión *in vitro* en geles de retardo e *in vivo* en las transformaciones transitorias, en las plantas de arroz *wrky47*, los niveles de *CaPU* y *PRRC* están reprimidos en condiciones normales, en estrés hídrico y en el caso de *PRRC*, también después de regar las plantas (Figura 10). En el mismo sentido, en las plantas de arroz sobreexpresantes de *OsWRKY47*, *CaPU* y *PRRC* se encuentran inducidos en todas las condiciones ensayadas (Figura 10). Se podría postular que la inducción de estos dos genes en las sobreexpresantes de *OsWRKY47* tiene una correlación directa con su inducción en las plantas IPT debida a la mayor expresión de *OsWRKY47*.

Los resultados presentados en conjunto, indicarían una función para *OsWRKY47* en la respuesta a estrés de las plantas y una implicancia de las proteínas *CaPU* y *PRRC* en las vías de señalización reguladas por este FT de tipo WRKY de arroz. Además, *OsWRKY47* sería una pieza fundamental en la respuesta de las plantas IPT al estrés hídrico.

Esto último plantea la posibilidad de utilizar a *OsWRKY47* como una herramienta biotecnológica. Las plantas de arroz que sobreexpresen este FT serían en principio más tolerantes a estrés hídrico y también a infecciones de *Magnaporthe oryzae* (Wei y col., 2013), lo que convierte a este FT en una herramienta muy versátil dado que resulta en fenotipos atractivos tanto frente a estrés biótico como abiótico.

No se debe dejar de lado que hay que considerar para tal fin la selección de promotores adecuados para evitar penalidades en el desarrollo y producción en

condiciones normales de crecimiento. Otra cuestión a tener en cuenta es la planta en la que se busca obtener el mejoramiento. Es importante recordar que en *Arabidopsis*, una dicotiledónea, la sobreexpresión de *OsWRKY47* no sólo no confirió tolerancia a estrés hídrico sino que en condiciones normales de crecimiento casi todos los parámetros medidos resultaron idénticos a los de las plantas salvajes. Estos resultados parecerían indicar que *OsWRKY47* no sería una herramienta útil para el fitomejoramiento de plantas dicotiledóneas, aunque es difícil concluir en forma tan general a partir de los estudios hechos sólo en *Arabidopsis*.

Conclusiones Finales

DESCUBRO
NUEVOS : MUNDOS
simultáneos y ajenos
.....
CADA VEZ SOSPECHO MÁS QUE
ESTAR DE ACUERDO
.....
es la Peor de las
ILUSIONES

CONCLUSIONES FINALES

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permite sacar las siguientes conclusiones generales:

HaWRKY76:

- HaWRKY76 es un factor de transcripción de girasol de tipo WRKY divergente que une con poca afinidad la caja W consenso. Este FT presenta mayor afinidad por la secuencia (G/A)D(G/A)(A/G)H(T/A)V.

- En el estadio vegetativo, HaWRKY76 se expresa mayormente en raíz e hipocotilo en plántulas de girasol de 5 días, mientras que en estadio reproductivo aumenta durante el desarrollo del capítulo y del embrión.

- El estrés possumergimiento y por carencia de agua generan un aumento de la expresión de HaWRKY76 en plantas de girasol.

-Las plantas de Arabidopsis que sobreexpresan HaWRKY76 tienen raíces más largas a las dos semanas de vida en el estadio vegetativo. En el estadio reproductivo tienen mayor biomasa radicular, mayor diámetro de la raíz principal y menor diámetro de las células del xilema a las cinco semanas de vida que sus pares salvajes.

- Las plantas HaWRKY76 generan mayor rendimiento de semillas y desarrollan mayor biomasa de roseta que las plantas salvajes hacia el final del ciclo de vida tanto en condiciones subóptimas como en condiciones estándar de crecimiento. Además, en estas últimas condiciones contienen más sacarosa por gramo de roseta que las salvajes.

- HaWRKY76 confiere mayor tolerancia al estrés hídrico a las plantas de Arabidopsis que lo expresan de forma ectópica y constitutiva, tanto en condiciones de tratamiento severas como moderadas. Durante el estrés, las plantas HaWRKY76 producen más clorofila, presentan mayor estabilidad de membranas, consumen y pierden menos

agua, y muestran una regulación diferencial de algunos genes de señalización de ABA. Después del tratamiento de estrés, las plantas HaWRKY76 producen igual o mayor cantidad de semillas que sus pares salvajes en el mismo tratamiento.

- Las plantas HaWRKY76 son más tolerantes al estrés por inundación total que las salvajes. Cuando están completamente inundadas, las plantas HaWRKY76 producen menos EROs, y consumen de forma más conservadora sus recursos energéticos en comparación con las salvajes, reprimiendo varios genes que codifican enzimas del metabolismo de fermentación de carbohidratos. Después del estrés, las plantas HaWRKY76 se recuperan mejor que las salvajes del estrés por inundación debido, al menos en parte, a un cierre estomático más rápido que las protege de la deshidratación. Además, estas plantas presentan mayor contenido de sacarosa que las salvajes luego de un día de recuperación y producen una cantidad levemente mayor de semillas.

- Luego de sufrir estrés por inundación o anegamiento, las plantas transgénicas producen mayor biomasa de semillas que las salvajes.

- Durante una inundación parcial, los tallos de las plantas HaWRKY76 desarrollan más aerénquima que los tallos de las plantas salvajes.

El conjunto de resultados se puede resumir en el modelo que se presenta en la siguiente figura:

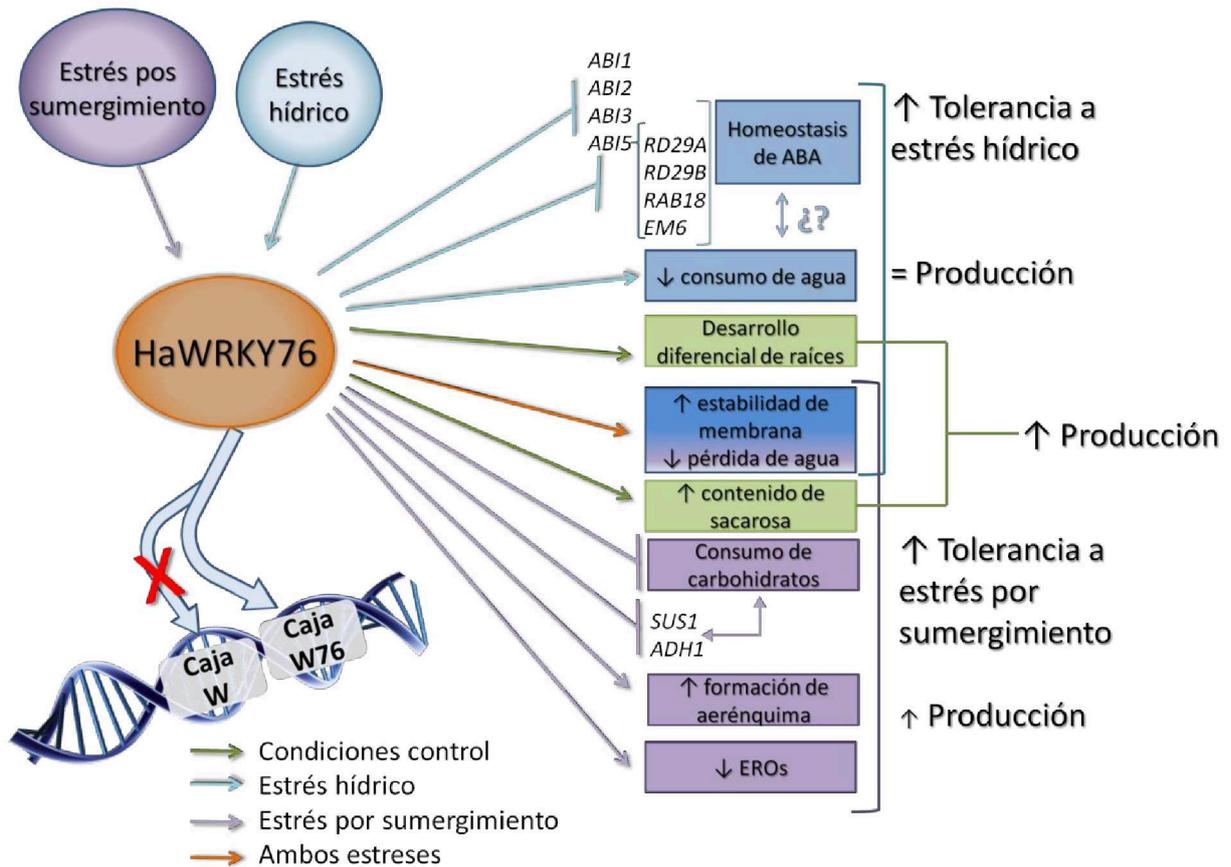


Figura 1: Representación esquemática del modelo de acción de HaWRKY76. Los signos ¿? Indican posibles conexiones y regulaciones cruzadas.

HaWRKY10:

- Es un factor de transcripción de girasol que está regulado de manera específica durante la germinación, el establecimiento de la línea y en el desarrollo del akenio en plantas de girasol.

- *HaWRKY10* se induce en cotiledones por la hormona GA (inductor de la germinación) y se reprime por la hormona ABA (represor de la germinación) durante la germinación de semillas de girasol. En los embriones y plántulas de girasol en estadios tempranos del desarrollo, el incremento de los transcritos de *HaWRKY10* es inversamente proporcional a la acumulación de los niveles de lípidos de reserva.

- Los patrones de expresión de *HaWRKY10* en embriones de girasol en desarrollo son similares a los que presentan los genes de *Arabidopsis* involucrados en la acumulación de lípidos en semillas en desarrollo.
- Las plantas de *Arabidopsis* que expresan de forma ectópica y constitutiva *HaWRKY10* no difieren en sus características morfológicas a nivel macroscópico de las salvajes.
- Las semillas de las plantas *HaWRKY10* son más susceptibles a ABA en germinación que las de las plantas salvajes y también se ven más afectadas por ABA que las plántulas salvajes durante el establecimiento de la línea que se produce en el crecimiento posgerminativo.
- La biosíntesis de GA y la señalización de ABA son reguladas de forma diferencial en las plantas *HaWRKY10* respecto de las salvajes.
- Las semillas *HaWRKY10* presentan entre 4 y 5 % más contenido de aceite en sus semillas que las salvajes cuando están recién cosechadas.
- En el establecimiento de línea las plántulas *HaWRKY10* consumen más lípidos y menos carbohidratos.
- Las semillas en desarrollo de las plantas *HaWRKY10* presentan un incremento de los transcritos correspondientes a la lipasa *SDP1* y mayor actividad de la enzima PEPCCK, involucrada en la gluconeogénesis cuando son comparadas con las salvajes.

El conjunto de resultados obtenidos durante la caracterización de este gen de girasol puede resumirse en el siguiente modelo:

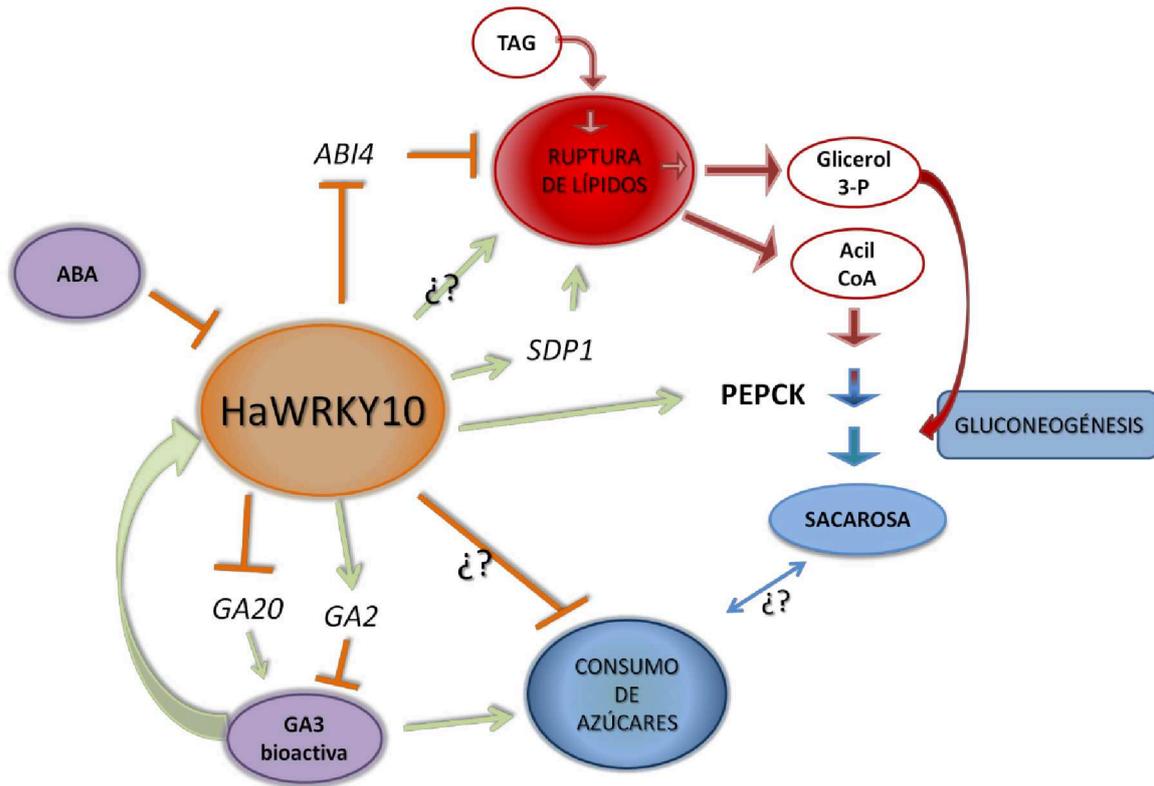


Figura 2: Representación esquemática del modelo de acción de HaWRKY10. Los signos ¿? Indican posibles conexiones y regulaciones cruzadas.

OsWRKY47:

- OsWRKY47 es un factor de transcripción de arroz de tipo WRKY cuya expresión se induce por sequía en las plantas *P_{SARK}::IPT*.
- OsWRKY47 une con mayor afinidad la secuencia GTTGACC (caja W47) *in vitro*.
- Dentro de los 356 genes (entre los que se encuentra *OsWRKY47*) regulados de forma diferencial en las plantas IPT en estrés, cuyos productos le confieren el fenotipo diferencial a las plantas *P_{SARK}::IPT*, 26 podrían ser blanco directo de este factor de transcripción dado que tienen en su promotor la caja W47.
- Los genes regulados de forma diferencial en las plantas *P_{SARK}::IPT* en condiciones de estrés que además no varían su expresión en las plantas salvajes en estrés presentan un enriquecimiento de cajas W47 en sus promotores.

- OsWRKY47 es capaz de unir *in vivo* los promotores de los genes que codifican la proteína de unión a calmodulina (CaPU) y la proteína con repeticiones de cisteína (PRRC) y de activar la expresión del gen reportero corriente abajo de estos promotores.
- Las plantas de arroz sobreexpresantes de *OsWRKY47* tienen inducidos en condiciones control y de estrés los transcritos de *CaPU* y *PRRC*. En el mismo sentido, las mutantes *Oswrky47* tienen reprimidos estos transcritos tanto en condiciones estándar, de estrés hídrico y luego de reirrigadas.
- OsWRKY47 juega un rol en la respuesta a estrés hídrico. Las plantas de arroz que sobreexpresan *OsWRKY47* son más tolerantes a estrés hídrico y las mutantes de arroz para este gen son más susceptibles a este estrés respecto de sus pares salvajes.
- Las plantas de arroz sobreexpresantes de *OsWRKY47* producen más semillas y las mutantes *Oswrky47* producen menos semillas que las salvajes cuando son sometidas a tratamientos de estrés hídrico.
- En condiciones control tanto las mutantes como las sobreexpresantes de *OsWRKY47* producen menos semillas que las salvajes.

El conjunto de resultados se puede resumir en el modelo que se presenta en la siguiente figura:

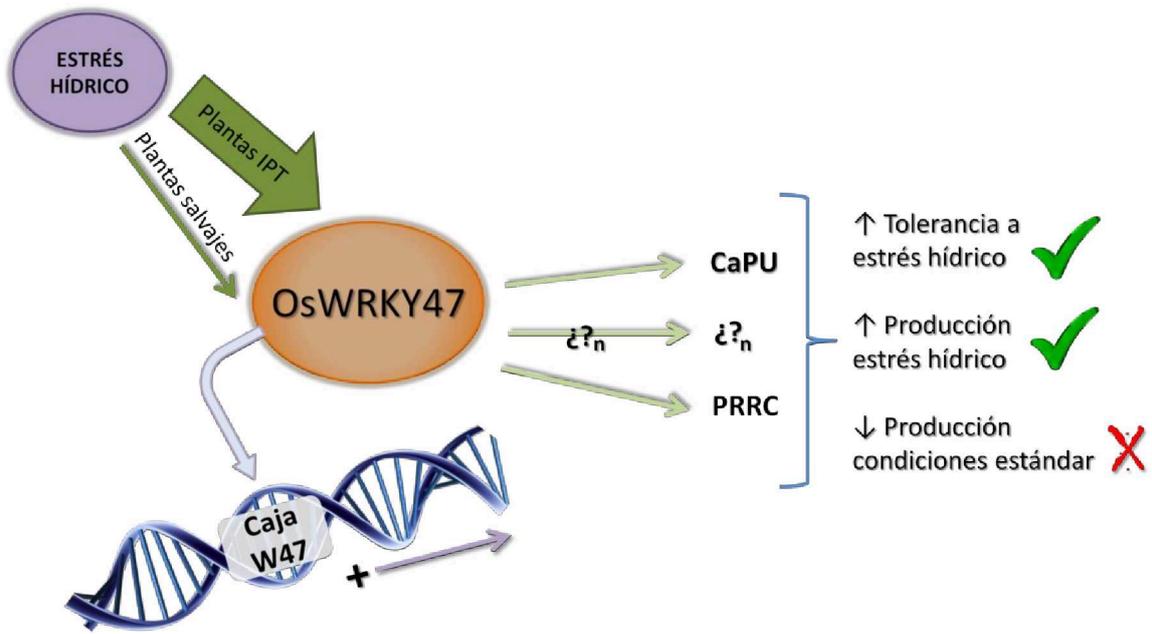


Figura 3: Representación esquemática del modelo de acción de OsWRKY47. Los signos $\zeta?_n$ indican posibles blancos directos de OsWRKY47. El grosor de las flechas verdes hace referencia al nivel de inducción de la expresión génica.

Referencias

Bibliográficas



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, P., Reddy, M.P. y Chikara, J. (2011). *WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants*. Molecular Biology Reports 38(6): 3883-3896.
- Aguirrezábal, L.A., Lavaud, Y., Dosio, G.A., Izquierdo, N.G., Andrade, F.H. y González, L.M. (2003). *Intercepted solar radiation during seed filling determines sunflower weight per seed and oil concentration*. Crop Science 43(1): 152-161.
- Aguirrezábal, L.A., Orioli, G.A., Hernández, L.F., Pereyra, V.R. y Miravé, J. (1996). *Girasol: Aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento*. Editorial Unidad Integrada Balcarce, Balcarce, Argentina.
- Ahmed, F., Rafii, M., Ismail, M.R., Juraimi, A.S., Rahim, H., Asfaliza, R. y col. (2013). *Waterlogging tolerance of crops: breeding, mechanism of tolerance, molecular approaches, and future prospects*. BioMed Research International. Article ID 963525, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/963525>
- Ahuja, I., de Vos, R.C., Bones, A.M. y Hall, R.D. (2010). *Plant molecular stress responses face climate change*. Trends in Plant Science 15(12): 664-674.
- Alder, N., Sperry, J. y Pockman, W. (1996). *Root and stem xylem embolism, stomatal conductance, and leaf turgor in Acer grandidentatum populations along a soil moisture gradient*. Oecologia 105(3): 293-301.
- Ali, Z., HE, X., HUANG, Y., MA, H., Xu, L., XU, Z. y col. (2012). *Gène transcriptionnel gmwrky et son utilisation dans l'amélioration de la tolérance d'un végétal au sel et/ou à la sécheresse*. WO2012110853.
- Almoguera, C., Prieto-Dapena, P., Personat, J.-M., Tejedor-Cano, J., Lindahl, M., Diaz-Espejo, A. y col. (2012). *Protection of the photosynthetic apparatus from extreme dehydration and oxidative stress in seedlings of transgenic tobacco*. PLoS One 7(12): e51443.
- 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.
- Angeles-Núñez, J.G. y Tiessen, A. (2011). *Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of Arabidopsis seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds*. Journal of Plant Physiology 168(16): 1891-1900.
- Anguiano, O. y de D'Angelo, A.P. (2007). *La Problemática de los Agroquímicos y sus Envases, la Incidencia en la Salud de los Trabajadores, la Población Expuesta y el Ambiente*. <http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/UniDA/File/LIBRO%20Agroquimicos.pdf>.
- Araus, J., Slafer, G., Reynolds, M. y Royo, C. (2002). *Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?*. Annals of Botany 89(7): 925-940.
- Arce, A.L., Cabello, J.V. y Chan, R.L. (2008). *Patents on plant transcription factors*. Recent Patents on Biotechnology 2(3): 209-217.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. y Leon, P. (2000). *Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar*. Genes and Development 14(16): 2085-2096.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A. y Chan, R.L. (2007). *The true story of the HD-Zip family*. Trends in Plant Science 12(9): 419-426.
- Armstrong, W. (1979). *Aeration in higher plants*. Advances in Botanical Research 7: 225-332.
- Armstrong, W. y Drew, M. (2002). *Root growth and metabolism under oxygen deficiency*. En: Plant Roots: The Hidden Half 3: 729-761.

- Arnell, N.W. (2004). *Climate change and global water resources: SRES emissions and socio-economic scenarios*. *Global Environmental Change* 14(1): 31-52.
- Aroca, R., Porcel, R. y Ruiz-Lozano, J.M. (2012). *Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions*. *Journal of Experimental Botany* 63(1): 43-57.
- Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T. y col. (2000). *An alternative cytokinin biosynthesis pathway*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(26): 14778-14783.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J., Smith, J.A. y col. (1988). *Current protocols in molecular biology*. Greene Pub. Associates, Wiley-Interscience, New York, pp. v.(loose-leaf).
- Babu, M.M., Iyer, L.M., Balaji, S. y Aravind, L. (2006). *The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons*. *Nucleic Acids Research* 34(22): 6505-6520.
- Badawi, G.H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kubo, A. y col. (2004). *Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit*. *Physiologia Plantarum* 121(2): 231-238.
- Bai, X., Wu, B. y Xing, Y. (2012). *Yield-related QTLs and Their Applications in Rice Genetic Improvement*. *Journal of Integrative Plant Biology* 54(5): 300-311.
- Bailey-Serres, J. y Colmer, T.D. (2014). *Plant tolerance of flooding stress—recent advances*. *Plant, Cell and Environment* 37(10): 2211-2215.
- Bailey-Serres, J. y Chang, R. (2005). *Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms*. *Annals of Botany* 96(4): 507-518.
- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Gibbs, D.J., Holdsworth, M.J., Lee, S.C., Licausi, F. y col. (2012a). *Making sense of low oxygen sensing*. *Trends in Plant Science* 17(3): 129-138.
- Bailey-Serres, J., Lee, S.C. y Brinton, E. (2012b). *Waterproofing crops: effective flooding survival strategies*. *Plant Physiology* 160(4): 1698-1709.
- Bailey-Serres, J. y Voesenek, L. (2008). *Flooding stress: acclimations and genetic diversity*. *Annual Review of Plant Biology* 59: 313-339.
- Bailey-Serres, J. y Voesenek, L.A. (2010). *Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding*. *Current Opinion in Plant Biology* 13(5): 489-494.
- Baker, N.R. y Bowyer, J.R. (1994). En: *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers..
- Banti, V., Giuntoli, B., Gonzali, S., Loreti, E., Magneschi, L., Novi, G. y col. (2013). *Low oxygen response mechanisms in green organisms*. *International Journal of Molecular Sciences* 14(3): 4734-4761.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T. y Schmölling, T. (2011). *Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 23(1): 69-80.
- Baskin, J.M. y Baskin, C.C. (2004). *A classification system for seed dormancy*. *Seed Science Research* 14(01): 1-16.
- Bates, P.D., Stymne, S. y Ohlrogge, J. (2013). *Biochemical pathways in seed oil synthesis*. *Current Opinion in Plant Biology* 16(3): 358-364.
- Baud, S., Dubreucq, B., Miquel, M., Rochat, C. y Lepiniec, L. (2008). *Storage reserve accumulation in Arabidopsis: metabolic and developmental control of seed filling*. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 6.
- Baud, S. y Graham, I.A. (2006). *A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of Arabidopsis using in situ histochemistry*. *The Plant Journal* 46(1): 155-169.
- Baud, S. y Lepiniec, L. (2010). *Physiological and developmental regulation of seed oil production*. *Progress in Lipid Research* 49(3): 235-249.

- Bäumlein, H., Miséra, S., Luerßen, H., Kölle, K., Horstmann, C., Wobus, U. y col. (1994). *The FUS3 gene of Arabidopsis thaliana is a regulator of gene expression during late embryogenesis*. The Plant Journal 6(3): 379-387.
- Bazin, J., Langlade, N., Vincourt, P., Arribat, S., Balzergue, S., El-Maarouf-Bouteau, H. y col. (2011). *Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening*. The Plant Cell 23(6): 2196-2208.
- Bengough, A.G., McKenzie, B., Hallett, P. y Valentine, T. (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.N. y Koornneef, M. (2008). *Seed dormancy and germination*. The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists 6.
- Besseau, S., Li, J. y Palva, E.T. (2012). *WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 63: 2667-2679.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G., Aoyama, N., Chung, Y.-Y., Still, D.W. y Jones, R.L. (2007). *The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy*. Plant Physiology 143(3): 1173-1188.
- Bewley, J.D. (1997). *Seed germination and dormancy*. The Plant Cell 9(7): 1055.
- Bimboim, H. y Doly, J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Research 7(6): 1513-1523.
- Birnbaum, K., Shasha, D.E., Wang, J.Y., Jung, J.W., Lambert, G.M., Galbraith, D.W. y col. (2003). *A gene expression map of the Arabidopsis root*. Science 302(5652): 1956-1960.
- Blackman, B.K., Scascitelli, M., Kane, N.C., Luton, H.H., Rasmussen, D.A., Bye, R.A. y col. (2011). *Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America*. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 108(34): 14360-14365.
- Blackwell, T.K. y Weintraub, H. (1990). *Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection*. Science 250(4984): 1104-1110.
- Blanco, N.E., Ceccoli, R.D., Segretin, M.E., Poli, H.O., Voss, I., Melzer, M. y col. (2011). *Cyanobacterial flavodoxin complements ferredoxin deficiency in knocked-down transgenic tobacco plants*. The Plant Journal 65(6): 922-935.
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K.V. (2003). *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. Annals of Botany 91(2): 179-194.
- Blokhina, O.B., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., Hoikkala, A., Wähälä, K. y Chirkova, T.V. (2000). *Antioxidant status of anoxia-tolerant and-intolerant plant species under anoxia and reaeration*. Physiologia Plantarum 109(4): 396-403.
- Blum, A., Mayer, J. y Gozlan, G. (1982). *Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat*. Field Crops Research 5: 137-146.
- Bouchenak-Khelladi, Y., Verboom, G.A., Savolainen, V. y Hodkinson, T.R. (2010). *Biogeography of the grasses (Poaceae): a phylogenetic approach to reveal evolutionary history in geographical space and geological time*. Botanical Journal of the Linnean Society 162(4): 543-557.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72(1): 248-254.
- Bray, E.A. (1993). *Molecular responses to water deficit*. Plant Physiology 103(4): 1035.
- Bray, E.A. (2004). *Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 55(407): 2331-2341.

- Brivanlou, A.H. y Darnell, J.E. (2002). *Signal transduction and the control of gene expression*. Science 295(5556): 813-818.
- Brodribb, T.J. y Holbrook, N.M. (2003). *Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits*. Plant Physiology 132(4): 2166-2173.
- Brookes, G. y Barfoot, P. (2014). *Economic impact of GM crops: the global income and production effects 1996–2012*. GM Crops and Food 5(1), 65-75.
- Bush, D.S. (1995). *Calcium regulation in plant cells and its role in signaling*. Annual Review of Plant Biology 46(1): 95-122.
- Cabello, J.V., Arce, A.L. y Chan, R.L. (2012). *The homologous HD-Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis-related and glucanase proteins*. The Plant Journal 69(1): 141-153.
- Cabello, J.V., Lodeyro, A.F. y Zurbriggen, M.D. (2014). *Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants*. Current Opinion in Biotechnology 26: 62-70.
- Cahoon, E.B., Shockey, J.M., Dietrich, C.R., Gidda, S.K., Mullen, R.T. y Dyer, J.M. (2007). *Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux*. Current Opinion in Plant Biology 10(3): 236-244.
- Capella, M., Ré, D.A., Arce, A.L. y Chan, R.L. (2014). *Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB*. Plant Cell Reports 33(6): 955-967.
- Carles, C., Bies-Etheve, N., Aspart, L., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., Echeverria, M. y col. (2002). *Regulation of Arabidopsis thaliana Em genes: role of ABI5*. The Plant Journal 30(3): 373-383.
- Castle, L.A., Wu, G. y McElroy, D. (2006). *Agricultural input traits: past, present and future*. Current Opinion in Biotechnology 17(2): 105-112.
- Céccoli, G., Eugenia Senn, M., Bustos, D., Ismael Ortega, L., Córdoba, A., Vegetti, A. y col. (2012). *Genetic variability for responses to short-and long-term salt stress in vegetative sunflower plants*. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 175(6): 882-890.
- Century, K., Reuber, T.L. y Ratcliffe, O.J. (2008). *Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products*. Plant Physiology 147(1): 20-29.
- Cernac, A. y Benning, C. (2004). *WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis*. The Plant Journal 40(4): 575-585.
- Ciolkowski, I., Wanke, D., Birkenbihl, R.P. y Somssich, I.E. (2008). *Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function*. Plant Molecular Biology 68(1-2): 81-92.
- Clough, S.J. y Bent, A.F. (1998). *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 16(6): 735-743.
- Colmer, T. (2003). *Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots*. Plant, Cell and Environment 26(1): 17-36.
- Colmer, T.D. y Flowers, T.J. (2008). *Flooding tolerance in halophytes*. New Phytologist 179(4): 964-974.
- Comas, L., Mueller, K., Taylor, L., Midford, P., Callahan, H. y Beerling, D. (2012). *Evolutionary patterns and biogeochemical significance of angiosperm root traits*. International Journal of Plant Sciences 173(6): 584-595.
- Comas, L.H., Becker, S.R., Von Mark, V.C., Byrne, P.F. y Dierig, D.A. (2013). *Root traits contributing to plant productivity under drought*. Frontiers in plant science 4.
- Cornic, G. (2000). *Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis*. Trends in Plant Science 5(5): 187-188.
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. y Shinozaki, K. (2011). *Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective*. BMC Plant Biology 11(1): 163.

- Cruzate, G.A. y Casas, R. (2009). *Extracción de nutrientes en la agricultura argentina*. Informaciones Agronómicas del Cono Sur 44: 21-26.
- Cui, F., Zhao, C., Ding, A., Li, J., Wang, L., Li, X. y col. (2014). *Construction of an integrative linkage map and QTL mapping of grain yield-related traits using three related wheat RIL populations*. Theoretical and Applied Genetics 127(3): 659-675.
- Cui, X.-H., Hao, F.-S., Chen, H., Chen, J. y Wang, X.-C. (2008). *Expression of the Vicia faba VfPIP1 gene in Arabidopsis thaliana plants improves their drought resistance*. Journal of Plant Research 121(2): 207-214.
- Chan, R.L., Gago, G.M., Palena, C.M. y Gonzalez, D.H. (1998). *Homeoboxes in plant development*. Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression 1442(1): 1-19.
- 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.
- Chaves, M. (1991). *Effects of water deficits on carbon assimilation*. Journal of Experimental Botany 42(1): 1-16.
- Chen, F., Dahal, P. y Bradford, K.J. (2001). *Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination*. Plant Physiology 127(3): 928-936.
- Chen, F., Nonogaki, H. y Bradford, K.J. (2002). *A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination*. Journal of Experimental Botany 53(367): 215-223.
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C. y Yu, D. (2012). *The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses*. Biochimica et Biophysica Acta 1819(2): 120-128.
- Chen, X., Liu, J., Lin, G., Wang, A., Wang, Z. y Lu, G. (2013). *Overexpression of AtWRKY28 and AtWRKY75 in Arabidopsis enhances resistance to oxalic acid and Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Cell Reports 32(10): 1589-1599.
- Chen, Y.-F., Li, L.-Q., Xu, Q., Kong, Y.-H., Wang, H. y Wu, W.-H. (2009). *The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in Arabidopsis*. The Plant Cell 21(11): 3554-3566.
- Cheng, S.-H., Zhuang, J.-Y., Fan, Y.-Y., Du, J.-H. y Cao, L.-Y. (2007). *Progress in research and development on hybrid rice: a super-domesticated in China*. Annals of Botany 100(5): 959-966.
- Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A. y col. (2002). *A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions*. The Plant Cell 14(11): 2723-2743.
- Chia, T.Y., Pike, M.J. y Rawsthorne, S. (2005). *Storage oil breakdown during embryo development of Brassica napus (L.)*. Journal of Experimental Botany 56(415): 1285-1296.
- Chinnusamy, V., Gong, Z. y Zhu, J.K. (2008). *Abscisic Acid-mediated Epigenetic Processes in Plant Development and Stress Responses*. Journal of Integrative Plant Biology 50(10): 1187-1195.
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T. y Brenner, M. (1994). *A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis (det mutants have an altered response to cytokinins)*. Plant Physiology 104(2): 339-347.
- Das, K.K., Sarkar, R.K. y Ismail, A.M. (2005). *Elongation ability and non-structural carbohydrate levels in relation to submergence tolerance in rice*. Plant Science 168(1): 131-136.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D.J., Coutu, J. y col. (2005). *Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis*. The Plant Cell 17(1): 268-281.
- de la Vega, A.J. y Hall, A.J. (2002). *Effects of planting date, genotype, and their interactions on sunflower yield*. Crop Science 42(4): 1191-1201.

- Dekkers, B.J., Schuurmans, J.A. y Smeekens, S.C. (2004). *Glucose delays seed germination in Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218(4): 579-588.
- Delatorre, C.A., Cohen, Y., Liu, L., Peleg, Z. y Blumwald, E. (2012). *The regulation of the SARK promoter activity by hormones and environmental signals*. *Plant Science* 193: 39-47.
- Devaiah, B.N., Karthikeyan, A.S. y Raghothama, K.G. (2007). *WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143(4): 1789-1801.
- Dezar, C.A., Gago, G.M., Gonzalez, D.H. y Chan, R.L. (2005). *Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants*. *Transgenic Research* 14(4): 429-440.
- Ding, Y., Liu, N., Virlouvet, L., Riethoven, J.-J., Fromm, M. y Avramova, Z. (2013). *Four distinct types of dehydration stress memory genes in Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 13(1): 229.
- Dong, J., Chen, C. y Chen, Z. (2003). *Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response*. *Plant Molecular Biology* 51(1): 21-37.
- Donohue, K. (2003). *Setting the stage: phenotypic plasticity as habitat selection*. *International Journal of Plant Science* 164(S3):S79-S92.
- Donohue, K., Dorn, L., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C.R. y col. (2005). *The evolutionary ecology of seed germination of Arabidopsis thaliana: variable natural selection on germination timing*. *Evolution* 59(4): 758-770.
- Donohue, K., Rubio de Casas, R., Burghardt, L., Kovach, K. y Willis, C.G. (2010). *Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41: 293-319.
- Dosio, G.A., Andrade, F.H. y Pereyra, V. (2000). *Solar radiation intercepted during seed filling and oil production in two sunflower hybrids*. *Crop Science* 40(6):1637-1644.
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X.-F., Yang, W.-J., Wu, Y.-M. y col. (2009). *Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family*. *Biochemistry (Moscow)* 74(1): 1-11.
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S. y col. (2003). *OsDREB genes in rice, Oryza sativa L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression*. *The Plant Journal* 33(4): 751-763.
- Dubreucq, B., Berger, N., Vincent, E., Boisson, M., Pelletier, G., Caboche, M. y col. (2000). *The Arabidopsis AtEPR1 extensin-like gene is specifically expressed in endosperm during seed germination*. *The Plant Journal* 23(5): 643-652.
- Durrett, T.P., Benning, C. y Ohlrogge, J. (2008). *Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels*. *The Plant Journal* 54(4): 593-607.
- Eastmond, P.J. (2006). *SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds*. *The Plant Cell* 18(3): 665-675.
- Eastmond, P.J. y Graham, I.A. (2001). *Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds*. *Trends in Plant Science* 6(2): 72-78.
- Eulgem, T. (2005). *Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome*. *Trends in Plant Science* 10(2): 71-78.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. y Somssich, I.E. (2000). *The WRKY superfamily of plant transcription factors*. *Trends in Plant Science* 5(5): 199-206.
- Eulgem, T. y Somssich, I.E. (2007). *Networks of WRKY transcription factors in defense signaling*. *Current Opinion in Plant Biology* 10(4): 366-371.
- Evans, D.E. (2004). *Aerenchyma formation*. *New Phytologist* 161(1): 35-49.
- FAO, U. (2009). *How to Feed the World in 2050*: FAO Rome. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf

- Fernandez, P., Di Rienzo, J., Fernandez, L., Hopp, H.E., Paniego, N. y Heinz, R.A. (2008). *Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis*. BMC Plant Biology 8(1): 11.
- Fernández, P., Paniego, N., Lew, S., Hopp, H.E. y Heinz, R.A. (2003). *Differential representation of sunflower ESTs in enriched organ-specific cDNA libraries in a small scale sequencing project*. BMC Genomics 4(1): 40.
- Fernandez, P., Soria, M., Blesa, D., DiRienzo, J., Moschen, S., Rivarola, M. y col. (2012). *Development, characterization and experimental validation of a cultivated sunflower (Helianthus annuus L.) gene expression oligonucleotide microarray*. PloS One 7(10): e45899.
- Ferreira, F.J. y Kieber, J.J. (2005). *Cytokinin signaling*. Current Opinion in Plant Biology 8(5): 518-525.
- Finch-Savage, W.E. y Leubner-Metzger, G. (2006). *Seed dormancy and the control of germination*. New Phytologist 171(3): 501-523.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. y Steber, C. (2008). *Molecular Aspects of Seed Dormancy*. Plant Biology 59(1): 387.
- Finkelstein, R. y Rock, C. (2002). *Abscisic Acid biosynthesis and signalling*. The Arabidopsis Book (Somerville, CR and Meyerowitz, EM, eds): 1.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S. y Rock, C.D. (2002). *Abscisic acid signaling in seeds and seedlings*. The Plant Cell 14(suppl 1): S15-S45.
- Finkelstein, R.R. y Gibson, S.I. (2001). *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 Lynch, T.J. (2000). *The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor*. The Plant Cell 12(4): 599-609.
- Focks, N. y Benning, C. (1998). *wrinkled1: a novel, low-seed-oil mutant of Arabidopsis with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism*. Plant Physiology 118(1): 91-101.
- Franco-Zorrilla, J.M., Martín, A.C., Leyva, A. y Paz-Ares, J. (2005). *Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3*. Plant Physiology 138(2): 847-857.
- Frankard, V. (2007). *Plants having increased yield and a method for making the same*. WO2006079655A2..
- Frey, A., Audran, C., Marin, E., Sotta, B. y Marion-Poll, A. (1999). *Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression*. Plant Molecular Biology 39(6): 1267-1274.
- Frohman, M.A., Dush, M.K. y Martin, G.R. (1988). *Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer*. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 85(23): 8998-9002.
- Fukao, T., Yeung, E. y Bailey-Serres, J. (2011). *The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice*. The Plant Cell 23(1): 412-427.
- Fulda, S., Mikkat, S., Stegmann, H. y Horn, R. (2011). *Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (Helianthus annuus L.)*. Plant Biology 13(4): 632-642.
- Furuichi, T., Mori, I.C., Takahashi, K. y Muto, S. (2001). *Sugar-induced increase in cytosolic Ca²⁺ in Arabidopsis thaliana whole plants*. Plant and Cell Physiology 42(10): 1149-1155.
- Gallardo, M., Eastham, J., Gregory, P. y Turner, N. (1996). *A comparison of plant hydraulic conductances in wheat and lupins*. Journal of Experimental Botany 47(2): 233-239.
- Galloway, L.F. (2001). *Parental environmental effects on life history in the herbaceous plant Campanula americana*. Ecology 82(10): 2781-2789.

- Gan, S. y Amasino, R.M. (1995). *Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin*. *Science* 270(5244): 1986-1988.
- Gan, S. y Amasino, R.M. (1997). *Making sense of senescence (molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence)*. *Plant Physiology* 113(2): 313.
- Gazzarrini, S. y McCourt, P. (2001). *Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways*. *Current Opinion in Plant Biology* 4(5): 387-391.
- Geigenberger, P. (2003). *Response of plant metabolism to too little oxygen*. *Current Opinion in Plant Biology* 6(3): 247-256.
- Germain, V., Raymond, P. y Ricard, B. (1997). *Differential expression of two tomato lactate dehydrogenase genes in response to oxygen deficit*. *Plant Molecular Biology* 35(6): 711-721.
- Ghannoum, O. (2009). *C4 photosynthesis and water stress*. *Annals of Botany* 103(4): 635-644.
- Giacomelli, J.I., Ribichich, K.F., Dezar, C.A. y Chan, R.L. (2010). *Expression analyses indicate the involvement of sunflower WRKY transcription factors in stress responses, and phylogenetic reconstructions reveal the existence of a novel clade in the Asteraceae*. *Plant Science* 178(4): 398-410.
- Gibbs, J. y Greenway, H. (2003). *Review: mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism*. *Functional Plant Biology* 30(3): 353-353.
- Gilmour, S.J. y Thomashow, M.F. (1991). *Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 17(6): 1233-1240.
- Glöckner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A., Bankier, A.T., Dear, P.H. y col. (2002). *Sequence and analysis of chromosome 2 of Dictyostelium discoideum*. *Nature* 418(6893): 79-85.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W. y col. (2008). *The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access*. *The Plant Journal* 55(3): 526-542.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y. y Yoshida, S. (2004). *Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134(4): 1555-1573.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F. y col. (2010). *Food security: the challenge of feeding 9 billion people*. *Science* 327(5967): 812-818.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R. y col. (2002). *The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde*. *The Plant Cell* 14(8): 1833-1846.
- Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N. y Giraudat, J. (1995). *Abscisic acid-dependent and-independent regulation of gene expression by progressive drought in Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics* 246(1): 10-18.
- Govind, G., Seiler, C., Wobus, U. y Sreenivasulu, N. (2011). *Importance of ABA homeostasis under terminal drought stress in regulating grain filling events*. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1228-1231.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G. y Soppe, W.J. (2012). *Molecular mechanisms of seed dormancy*. *Plant, Cell and Environment* 35(10): 1769-1786.
- Graham, I.A. (2008). *Seed storage oil mobilization*. *Annual Review of Plant Biology* 59: 115-142.
- Graham, I.A., Larson, T. y Napier, J.A. (2007). *Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates*. *Current Opinion in Biotechnology* 18(2): 142-147.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. y Hanahan, D. (1990). *Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 87(12): 4645-4649.

- Grotewold, E. (2008). *Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet?* Current Opinion in Biotechnology 19(2): 138-144.
- Gubler, F., Millar, A.A. y Jacobsen, J.V. (2005). *Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting.* Current Opinion in Plant Biology 8(2): 183-187.
- Guiltinan, M.J., Marcotte, W.R. y Quatrano, R.S. (1990). *A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element.* Science 250(4978): 267-271.
- Guo, A., He, K., Liu, D., Bai, S., Gu, X., Wei, L. y col. (2005). *DATF: a database of Arabidopsis transcription factors.* Bioinformatics 21(10): 2568-2569.
- Guo, H., Ye, H., Li, L. y Yin, Y. (2009). *A family of receptor-like kinases are regulated by BES1 and involved in plant growth in Arabidopsis thaliana.* Plant Signaling and Behavior 4(8): 784-786.
- Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. y Tran, L.-S.P. (2012). *Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses.* Trends in Plant Science 17(3): 172-179.
- Hajouj, T., Michelis, R. y Gepstein, S. (2000). *Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence.* Plant Physiology 124(3): 1305-1314.
- Hamada, K., Hongo, K., Suwabe, K., Shimizu, A., Nagayama, T., Abe, R. y col. (2011). *OryzaExpress: an integrated database of gene expression networks and omics annotations in rice.* Plant and Cell Physiology 52(2): 220-229.
- Hammargren, J., Rosenquist, S., Jansson, C. y Knorr, C. (2008). *A novel connection between nucleotide and carbohydrate metabolism in mitochondria: sugar regulation of the Arabidopsis nucleoside diphosphate kinase 3a gene.* Plant Cell Reports 27(3): 529-534.
- Harris, E.M. (1995). *Inflorescence and floral ontogeny in Asteraceae: a synthesis of historical and current concepts.* The Botanical Review 61(2-3): 93-278.
- Hattab, G., Suisse, A.Y., Ilioaia, O., Casiraghi, M., Dezi, M., Warnet, X.L. y col. (2014). *Membrane Protein Production in Escherichia coli: Overview and Protocols.* En: *Membrane Proteins Production for Structural Analysis* (Eds.:Springer): 87-106.
- Havlová, M., Dobrev, P.I., Motyka, V., ŠTORCHOVÁ, H., LIBUS, J., Dobrá, J. y col. (2008). *The role of cytokinins in responses to water deficit in tobacco plants over-expressing trans-zeatin O-glucosyltransferase gene under 35S or SAG12 promoters.* Plant, Cell and Environment 31(3): 341-353.
- Heesacker, A., Kishore, V.K., Gao, W., Tang, S., Kolkman, J.M., Gingle, A. y col. (2008). *SSRs and INDELS mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility.* Theoretical and Applied Genetics 117(7): 1021-1029.
- Hepler, P.K. y Wayne, R.O. (1985). *Calcium and plant development.* Annual Review of Plant Physiology 36(1): 397-439.
- Hernández, E., Vilagrosa, A., Pausas, J. y Bellot, J. (2010). *Morphological traits and water use strategies in seedlings of Mediterranean coexisting species.* Plant Ecology 207(2): 233-244.
- Hewezi, T., Léger, M. y Gentzbittel, L. (2008). *A comprehensive analysis of the combined effects of high light and high temperature stresses on gene expression in sunflower.* Annals of Botany 102(1): 127-140.
- Hilhorst, H.W. (1995). *A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy.* Seed Science Research 5(02): 61-73.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. y Tiffany, D. (2006). *Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels.* Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A 103(30): 11206-11210.
- Hirayama, T. y Shinozaki, K. (2007). *Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA.* Trends in Plant Science 12(8): 343-351.

- Hirayama, T. y Umezawa, T. (2010). *The PP2C–SnRK2 complex: the central regulator of an abscisic acid signaling pathway*. *Plant Signaling and Behavior* 5(2): 160-163.
- Hjellström, M., Olsson, A.S., Engström, P. y Söderman, E. (2003). *Constitutive expression of the water deficit-inducible homeobox gene ATHB7 in transgenic Arabidopsis causes a suppression of stem elongation growth*. *Plant, Cell and Environment* 26(7): 1127-1136.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. y Pease, L.R. (1989). *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. *Gene* 77(1): 51-59.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. y Buitink, J. (2001). *Mechanisms of plant desiccation tolerance*. *Trends in Plant Science* 6(9): 431-438.
- Hossain, M.A., Lee, Y., Cho, J.-I., Ahn, C.-H., Lee, S.-K., Jeon, J.-S. y col. (2010). *The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice*. *Plant Molecular Biology* 72(4-5): 557-566.
- Hou, H., Atlıhan, N. y Lu, Z.-X. (2014). *New biotechnology enhances the application of cisgenesis in plant breeding*. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Hsu, F.-C., Chou, M.-Y., Chou, S.-J., Li, Y.-R., Peng, H.-P. y Shih, M.-C. (2013). *Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25(7): 2699-2713.
- Hu, W., Wen, M., Han, Z., Tan, C. y Xing, Y. (2013). *Scanning QTLs for Grain Shape Using a Whole Genome SNP Array in Rice*. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology* 1(104): 2.
- Huang, A.H. (1992). *Oil bodies and oleosins in seeds*. *Annual Review of Plant Biology* 43(1): 177-200.
- Huang, X., Kurata, N., Wei, X., Wang, Z.-X., Wang, A., Zhao, Q. y col. (2012). *A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice*. *Nature* 490(7421): 497-501.
- Huang, X., Schmitt, J., Dorn, L., Griffith, C., Effgen, S., Takao, S. y col. (2010). *The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy*. *Molecular Ecology* 19(7): 1335-1351.
- Huang, Y., Shi, J., Tao, Z., Zhang, L., Liu, Q., Wang, X. y col. (2014). *Microarray Expression Analysis of the Main Inflorescence in Brassica napus*. *PLoS One* 9(7): e102024.
- Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D. y Schroeder, J.I. (2010). *Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions*. *Genes and Development* 24(16): 1695-1708.
- Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. y Smeekens, S. (2000). *The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses*. *The Plant Journal* 23(5): 577-585.
- International Rice Genome Sequencing, P. (2005). *The map-based sequence of the rice genome*. *Nature* 436(7052): 793-800.
- Ismail, A.M., Singh, U.S., Singh, S., Dar, M.H. y Mackill, D.J. (2013). *The contribution of submergence-tolerant (Sub1) rice varieties to food security in flood-prone rainfed lowland areas in Asia*. *Field Crops Research* 152: 83-93.
- Izanloo, A., Condon, A.G., Langridge, P., Tester, M. y Schnurbusch, T. (2008). *Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two South Australian bread wheat cultivars*. *Journal of Experimental Botany* 59(12): 3327-3346.
- Izquierdo, N., Aguirrezábal, L., Martínez-Force, E., Garcés, R., Paccapelo, V., Andrade, F. y col. (2013). *Effect of growth temperature on the high stearic and high stearic-high oleic sunflower traits*. *Crop and Pasture Science* 64(1): 18-25.
- Jain, R., Coffey, M., Lai, K., Kumar, A. y MacKenzie, S. (2000). *Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes*. *Biochemical Society Transactions* 28(6): 959-960.

- Jako, C., Kumar, A., Wei, Y., Zou, J., Barton, D.L., Giblin, E.M. y col. (2001). *Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight*. Plant Physiology 126(2): 861-874.
- James, C. (2010). En: *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010*. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) Ithaca, NY, USA.
- Jaworski, J. y Cahoon, E.B. (2003). *Industrial oils from transgenic plants*. Current Opinion in Plant Biology 6(2): 178-184.
- 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.
- Jiang, W. y Yu, D. (2009). *Arabidopsis WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid*. BMC Plant Biology 9(1): 96.
- Jiang, Y., Duan, Y., Yin, J., Ye, S., Zhu, J., Zhang, F. y col. (2014). *Genome-wide identification and characterization of the Populus WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses*. Journal of Experimental Botany 2(2), 87-101.
- Jiang, Y., Zeng, B., Zhao, H., Zhang, M., Xie, S. y Lai, J. (2012). *Genome-wide Transcription Factor Gene Prediction and their Expressional Tissue-Specificities in Maize*. Journal of Integrative Plant Biology 54(9): 616-630.
- Joham, H.E. (1957). *Carbohydrate distribution as affected by calcium deficiency in cotton*. Plant Physiology 32(2): 113.
- Johnson, C.S., Kolevski, B. y Smyth, D.R. (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor*. The Plant Cell 14(6): 1359-1375.
- Journot-Catalino, N., Somssich, I.E., Roby, D. y Kroj, T. (2006). *The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell 18(11): 3289-3302.
- Juliano, J.B. y Aldama, M.J. (1937). *Morphology of Oryza sativa Linnaeus*. Philippine Agriculturalist 26: 1-134.
- Jung, C., Seo, J.S., Han, S.W., Koo, Y.J., Kim, C.H., Song, S.I. y col. (2008). *Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis*. Plant Physiology 146(2): 623-635.
- Kaelin, W.G., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S. y col. (1992). *Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties*. Cell 70(2): 351-364.
- Kakimoto, T. (2001). *Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases*. Plant and Cell Physiology 42(7): 677-685.
- Kakimoto, T. (2003). *Biosynthesis of cytokinins*. Journal of Plant Research 116(3): 233-239.
- Kang, S.G., Price, J., Lin, P.-C., Hong, J.C. y Jang, J.-C. (2010). *The Arabidopsis bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding*. Molecular Plant 3(2): 361-373.
- Karimi, M., Inzé, D. y Depicker, A. (2002). *GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation*. Trends in Plant Science 7(5): 193-195.
- Kasajima, I., Ide, Y., Yokota Hirai, M. y Fujiwara, T. (2010). *WRKY6 is involved in the response to boron deficiency in Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum 139(1): 80-92.
- Kayum, M.A., Jung, H.-J., Park, J.-I., Ahmed, N.U., Saha, G., Yang, T.-J. y col. (2014). *Identification and expression analysis of WRKY family genes under biotic and abiotic stresses in Brassica rapa*. Molecular Genetics and Genomics: 1-17.

- Kelly, A.A., Quettier, A.-L., Shaw, E. y Eastmond, P.J. (2011). *Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157(2): 866-875.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Qamar, S.A. y col. (2007). *The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control*. *Current Biology* 17(13): 1116-1122.
- Kerchev, P.I., Pellny, T.K., Vivancos, P.D., Kiddle, G., Hedden, P., Driscoll, S. y col. (2011). *The transcription factor ABI4 is required for the ascorbic acid-dependent regulation of growth and regulation of jasmonate-dependent defense signaling pathways in arabidopsis*. *The Plant Cell* 23(9): 3319-3334.
- Khush, G.S. (2005). *What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030*. *Plant Molecular Biology* 59(1): 1-6.
- Kiani, S.P., Grieu, P., Maury, P., Hewezi, T., Gentzbittel, L. y Sarrafi, A. (2007). *Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (Helianthus annuus L.)*. *Theoretical and Applied Genetics* 114(2): 193-207.
- Kilian, B., Özkan, H., Pozzi, C. y Salamini, F. (2009). *Domestication of the Triticeae in the Fertile Crescent*. En: *Genetics and Genomics of the Triticeae* (Eds.: Muehlbauer, G.J. y Feuillet, C.). Springer US, p. 81-119.
- Kim, T.-H. y Maik, B. (2010). *Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling*. *Annual Review of Plant Biology* 61: 561.
- Klok, E.J., Wilson, I.W., Wilson, D., Chapman, S.C., Ewing, R.M., Somerville, S.C. y col. (2002). *Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures*. *The Plant Cell* 14(10): 2481-2494.
- Koch, K. (2004). *Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development*. *Current Opinion in Plant Biology* 7(3): 235-246.
- Koornneef, M., Bentsink, L. y Hilhorst, H. (2002). *Seed dormancy and germination*. *Current Opinion in Plant Biology* 5(1): 33-36.
- Korves, T.M., Schmid, K.J., Caicedo, A.L., Mays, C., Stinchcombe, J.R., Purugganan, M.D. y col. (2007). *Fitness effects associated with the major flowering time gene FRIGIDA in Arabidopsis thaliana in the field*. *The American Naturalist* 169(5): E141-E157.
- Krishnan, A., Guiderdoni, E., An, G., Yue-ie, C.H., Han, C.-d., Lee, M.C. y col. (2009). *Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses*. *Plant Physiology* 149(1): 165-170.
- 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.
- Kudo, T., Kiba, T. y Sakakibara, H. (2010). *Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins*. *Journal of Integrative Plant Biology* 52(1): 53-60.
- Kuppu, S., Mishra, N., Hu, R., Sun, L., Zhu, X., Shen, G. y col. (2013). *Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene IPT improves drought tolerance in cotton*. *PLoS one* 8(5): e64190.
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D. y Gibson, S.I. (2000). *The Arabidopsis sugar-insensitive mutants sis4 and sis5 are defective in abscisic acid synthesis and response*. *The Plant Journal* 23(5): 587-596.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lagacé, M. y Matton, D.P. (2004). *Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of Solanum chacoense*. *Planta* 219(1): 185-189.
- Lardizabal, K., Effertz, R., Levering, C., Mai, J., Pedroso, M., Jury, T. y col. (2008). *Expression of Umbelopsis ramanniana DGAT2A in seed increases oil in soybean*. *Plant Physiology* 148(1): 89-96.

- Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Pelletier, J. y col. (2010). *Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors*. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 107(18): 8063-8070.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A. y col. (2002). *Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition*. Genes and Development 16(5): 646-658.
- Lee, T.-H., Kim, Y.-K., Pham, T.T.M., Song, S.I., Kim, J.-K., Kang, K.Y. y col. (2009). *RiceArrayNet: a database for correlating gene expression from transcriptome profiling, and its application to the analysis of coexpressed genes in rice*. Plant Physiology 151(1): 16-33.
- Lehner, A., Corbineau, F. y Bailly, C. (2006). *Changes in lipid status and glass properties in cotyledons of developing sunflower seeds*. Plant and Cell Physiology 47(7): 818-828.
- Lentz, D.L., Pohl, M.D., Alvarado, J.L., Tarighat, S. y Bye, R. (2008). *Sunflower (Helianthus annuus L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico*. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 105(17): 6232-6237.
- León, A.J., Andrade, F.H. y Lee, M. (2003). *Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower*. Crop Science 43(1): 135-140.
- León, P. y Sheen, J. (2003). *Sugar and hormone connections*. Trends in Plant Science 8(3): 110-116.
- Leubner-Metzger, G. y Meins, F. (2000). *Sense transformation reveals a novel role for class I β-1, 3-glucanase in tobacco seed germination*. The Plant Journal 23(2): 215-221.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.-C., Guerrier, D., Cheddor, F. y Giraudat, J. (1994). *Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase*. Science 264(5164): 1448-1452.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D. y col. (2013). *Acyl-lipid metabolism*. The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists 8:e0133. doi:10.1199/tab.0133.
- Li, D., Wang, L., Wang, M., Xu, Y.Y., Luo, W., Liu, Y.J. y col. (2009). *Engineering OsBAK1 gene as a molecular tool to improve rice architecture for high yield*. Plant Biotechnology Journal 7(8): 791-806.
- Li, F., Asami, T., Wu, X., Tsang, E.W. y Cutler, A.J. (2007). *A putative hydroxysteroid dehydrogenase involved in regulating plant growth and development*. Plant Physiology 145(1): 87-97.
- Li, J. y Chory, J. (1998). *Preparation of DNA from Arabidopsis*. En: Arabidopsis Protocols (pp. 55-60). Humana Press.
- Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W. y Yu, D. (2011). *Arabidopsis thaliana WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance*. Planta 233(6): 1237-1252.
- Li, Z.-K. y Zhang, F. (2013). *Rice breeding in the post-genomics era: from concept to practice*. Current Opinion in Plant Biology 16(2): 261-269.
- Ling, J., Jiang, W., Zhang, Y., Yu, H., Mao, Z., Gu, X. y col. (2011). *Genome-wide analysis of WRKY gene family in Cucumis sativus*. BMC Genomics 12(1): 471.
- Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turečková, V., Wenk, M., Cadman, C.S. y col. (2009). *Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using Lepidium sativum and Arabidopsis thaliana*. The Plant Cell 21(12): 3803-3822.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P. y col. (2008). En: *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana.
- López Pereira, M., Sadras, V. y Trápani, N. (1999). *Genetic improvement of sunflower in Argentina between 1930 and 1995. I. Yield and its components*. Field Crops Research 62(2): 157-166.

- Loreti, E., Poggi, A., Novi, G., Alpi, A. y Perata, P. (2005). *A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in Arabidopsis seedlings under anoxia*. Plant Physiology 137(3): 1130-1138.
- Lovegrove, A. y Hooley, R. (2000). *Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone*. Trends in Plant Science 5(3): 102-110.
- Lu, C., Napier, J.A., Clemente, T.E. y Cahoon, E.B. (2011). *New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial applications*. Current Opinion in Biotechnology 22(2): 252-259.
- Lu, Z., Liu, D. y Liu, S. (2007). *Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic Arabidopsis*. Plant Cell Reports 26(10): 1909-1917.
- Luo, F.-L., Nagel, K.A., Scharr, H., Zeng, B., Schurr, U. y Matsubara, S. (2011). *Recovery dynamics of growth, photosynthesis and carbohydrate accumulation after de-submergence: a comparison between two wetland plants showing escape and quiescence strategies*. Annals of Botany 107(1): 49-63.
- Luo, F.-L., Thiele, B., Janzik, I., Zeng, B., Schurr, U. y Matsubara, S. (2012). *De-submergence responses of antioxidative defense systems in two wetland plants having escape and quiescence strategies*. Journal of Plant Physiology 169(17): 1680-1689.
- Luo, M., Dennis, E.S., Berger, F., Peacock, W.J. y Chaudhury, A. (2005). *MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 102(48): 17531-17536.
- Ma, Q.-H., Lin, Z.-B. y Fu, D.-Z. (2002). *Increased seed cytokinin levels in transgenic tobacco influence embryo and seedling development*. Functional Plant Biology 29(9): 1107-1113.
- Ma, Q.-H., Wang, X.-M. y Wang, Z.-M. (2008). *Expression of isopentenyl transferase gene controlled by seed-specific lectin promoter in transgenic tobacco influences seed development*. Journal of Plant Growth Regulation 27(1): 68-76.
- Ma, Q.-H., Zhang, R., Hocart, C.H., Letham, D.S. y Higgins, T.J. (1998). *Seed-specific expression of the isopentenyl transferase gene (ipt) in transgenic tobacco*. Functional Plant Biology 25(1): 53-59.
- Maclean, J., Hardy, B. y Hettel, G. (2013). En: *Rice Almanac: Source Book for One of the Most Important Economic Activities on Earth*. http://books.irri.org/0851996361_content.pdf.
- Malone, S., Chen, Z.-H., Bahrami, A.R., Walker, R.P., Gray, J.E. y Leegood, R.C. (2007). *Phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis: changes in gene expression, protein and activity during vegetative and reproductive development*. Plant and Cell Physiology 48(3): 441-450.
- Manavella, P.A., Dezar, C.A., Bonaventure, G., Baldwin, I.T. y Chan, R.L. (2008). *HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses*. The Plant Journal 56(3): 376-388.
- Mandel, J.R., McAssey, E.V., Nambeesan, S., Garcia-Navarro, E. y Burke, J.M. (2014). *Molecular evolution of candidate genes for crop-related traits in sunflower (Helianthus annuus L.)*. PloS one 9(6): e99620.
- Mangelsen, E., Kilian, J., Berendzen, K.W., Kolukisaoglu, Ü.H., Harter, K., Jansson, C. y col. (2008). *Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (Hordeum vulgare) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots*. BMC Genomics 9(1): 194.
- Mangelsen, E., Wanke, D., Kilian, J., Sundberg, E., Harter, K. y Jansson, C. (2010). *Significance of light, sugar, and amino acid supply for diurnal gene regulation in developing barley caryopses*. Plant Physiology 153(1): 14-33.
- Marshall, A. (2010). *2nd-generation GM traits progress*. Nature Biotechnology 28(4): 306-306.

- Martínez, R.D., Izquierdo, N.G., Belo, R.G., Aguirrezábal, L.A., Andrade, F. y Reid, R. (2012). *Oil yield components and oil quality of high stearic-high oleic sunflower genotypes as affected by intercepted solar radiation during grain filling*. *Crop and Pasture Science* 63(4): 330-337.
- Matsukura, S., Mizoi, J., Yoshida, T., Todaka, D., Ito, Y., Maruyama, K. y col. (2010). *Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes*. *Molecular Genetics and Genomics* 283(2): 185-196.
- McDougall, P. (2011). *The cost and time involved in the discovery, development and authorisation of a new plant biotechnology derived trait*. A consultancy study for Crop Life International. Midlothian, UK. <https://croplife.org/wp-content/uploads/2014/04/Getting-a-Biotech-Crop-to-Market-Phillips-McDougall-Study.pdf>.
- Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C. y Yeung, E.C. (1994). *Leafy cotyledon mutants of Arabidopsis*. *The Plant Cell* 6(8): 1049-1064.
- Meister, R., Rajani, M., Ruzicka, D. y Schachtman, D.P. (2014). *Challenges of modifying root traits in crops for agriculture*. *Trends in Plant Science*.
- Melgarejo, P., Romagosa, I. y Duran, N. (2014). *Biotecnología agrícola*. *Arbor* 190(768): a152.
- Merewitz, E.B., Gianfagna, T. y Huang, B. (2010). *Effects of SAG12-ipt and HSP18. 2-ipt expression on cytokinin production, root growth, and leaf senescence in creeping bentgrass exposed to drought stress*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135(3): 230-239.
- Metzger, J. y Bornscheuer, U. (2006). *Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(1): 13-22.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. (2010). *Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses*. *Plant, Cell and Environment* 33(4): 453-467.
- Mitsuda, N. y Ohme-Takagi, M. (2009). *Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 50(7): 1232-1248.
- Mittler, R. (2006). *Abiotic stress, the field environment and stress combination*. *Trends in Plant Science* 11(1): 15-19.
- 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.
- Mizoi, J., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). *AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses*. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* 1819(2): 86-96.
- Mochida, K., Furuta, T., Ebana, K., Shinozaki, K. y Kikuchi, J. (2009). *Correlation exploration of metabolic and genomic diversity in rice*. *BMC genomics* 10(1): 568.
- Mochida, K. y Shinozaki, K. (2011). *Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions*. *Plant and Cell Physiology* 52(12): 2017-2038.
- Molassiotis, A. y Fotopoulos, V. (2011). *Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree?* *Plant Signaling and Behavior* 6(2): 210-214.
- Mommer, L. y Visser, E.J. (2005). *Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity*. *Annals of Botany* 96(4): 581-589.
- Moschen, S., Luoni, S.B., Paniego, N.B., Hopp, H.E., Dosio, G.A., Fernandez, P. y col. (2014). *Identification of Candidate Genes Associated with Leaf Senescence in Cultivated Sunflower (Helianthus annuus L.)*. *PloS one* 9(8): e104379.
- Mühlenbock, P., Plaszczyc, M., Plaszczyc, M., Mellerowicz, E. y Karpinski, S. (2007). *Lysigenous aerenchyma formation in Arabidopsis is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1*. *The Plant Cell* 19(11): 3819-3830.

- Munné-Bosch, S. y Alegre, L. (2004). *Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress*. *Functional Plant Biology* 31(3): 203-216.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W. y col. (2009). *Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(44): 18843-18848.
- Nagai, K., Hattori, Y. y Ashikari, M. (2010). *Stunt or elongate? Two opposite strategies by which rice adapts to floods*. *Journal of Plant Research* 123(3): 303-309.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshihara, T., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2005). *Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed*. *The Plant Journal* 41(5): 697-709.
- Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K. y col. (2000). *Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression*. *Plant Molecular Biology* 42(4): 657-665.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2014). *The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat*. *Frontiers in Plant Science* 5:170.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2003). *ABA action and interactions in seeds*. *Trends in Plant Science* 8(5): 213-217.
- Nambara, E., Naito, S. y McCourt, P. (1992). *A mutant of Arabidopsis which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new abi3 allele*. *The Plant Journal* 2(4): 435-441.
- 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(2): 55.
- Napier, J.A. (2007). *The production of unusual fatty acids in transgenic plants*. *Annual Review of Plant Biology* 58: 295-319.
- Narsai, R., Wang, C., Chen, J., Wu, J., Shou, H. y Whelan, J. (2013). *Antagonistic, overlapping and distinct responses to biotic stress in rice (Oryza sativa) and interactions with abiotic stress*. *BMC Genomics* 14(1): 93.
- Nishiuchi, S., Yamauchi, T., Takahashi, H., Kotula, L. y Nakazono, M. (2012). *Mechanisms for coping with submergence and waterlogging in rice*. *Rice* 5(1): 1-14.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T. y col. (2011). *Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis*. *The Plant Cell* 23(6): 2169-2183.
- Niu, C.F., Wei, W., ZHOU, Q.Y., TIAN, A.G., HAO, Y.J., ZHANG, W.K. y col. (2012). *Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants*. *Plant, Cell and Environment* 35(6): 1156-1170.
- Nonogaki, H. (2014). *Seed dormancy and germination—emerging mechanisms and new hypotheses*. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Nonogaki, H., Gee, O.H. y Bradford, K.J. (2000). *A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds*. *Plant Physiology* 123(4): 1235-1246.
- Nordin, K., Heino, P. y Palva, E.T. (1991). *Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.* *Plant Molecular Biology* 16(6): 1061-1071.

- O'Hara, P., Slabas, A.R. y Fawcett, T. (2002). *Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis*. *Plant Physiology* 129(1): 310-320.
- Obertello, M., Krouk, G., Katari, M.S., Runko, S.J. y Coruzzi, G.M. (2010). *Modeling the global effect of the basic-leucine zipper transcription factor 1 (bZIP1) on nitrogen and light regulation in Arabidopsis*. *BMC Systems Biology* 4(1): 111.
- Oh, S.A., Park, J.H., Lee, G.I., Paek, K.H., Park, S.K. y Nam, H.G. (1997). *Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 12(3): 527-535.
- 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.
- Oliphant, A.R., Brandl, C.J. y Struhl, K. (1989). *Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 protein*. *Molecular and Cellular Biology* 9(7): 2944-2949.
- Oñate-Sánchez, L. y Vicente-Carbajosa, J. (2008). *DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques*. *BMC Research Notes* 1(1): 93.
- 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.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. y Tran, L.-S.P. (2014). *Response of plants to water stress*. *Frontiers in Plant Science* 5:86.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O.E., Höhne, M. y col. (2007). *Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings*. *The Plant Journal* 49(3): 463-491.
- Paek, K.H., Choi, L.M., Lee, G.J. y Lim, J.H. (2011). *CaWRKYd, a hot pepper transcription factor gene involved in plant defense and transgenic plants using the same*. US20110321201.
- Pan, Y.-J., Cho, C.-C., Kao, Y.-Y. y Sun, C.-H. (2009). *A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in Giardia lamblia*. *Journal of Biological Chemistry* 284(27): 17975-17988.
- Pandey, S.P. y Somssich, I.E. (2009). *The role of WRKY transcription factors in plant immunity*. *Plant Physiology* 150(4): 1648-1655.
- Parcy, F. y Giraudat, J. (1997). *Interactions between the ABI1 and the ectopically expressed ABI3 genes in controlling abscisic acid responses in Arabidopsis vegetative tissues*. *The Plant Journal* 11(4): 693-702.
- Parlanti, S., Kudahettige, N., Lombardi, L., Mensuali-Sodi, A., Alpi, A., Perata, P. y col. (2011). *Distinct mechanisms for aerenchyma formation in leaf sheaths of rice genotypes displaying a quiescence or escape strategy for flooding tolerance*. *Annals of Botany* 107(8): 1335-1343.
- Pashley, C.H., Ellis, J.R., McCauley, D.E. y Burke, J.M. (2006). *EST databases as a source for molecular markers: lessons from Helianthus*. *Journal of Heredity* 97(4): 381-388.
- Passioura, J. (1972). *The effect of root geometry on the yield of wheat growing on stored water*. *Crop and Pasture Science* 23(5): 745-752.
- Peleg, Z. y Blumwald, E. (2011). *Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants*. *Current Opinion in Plant Biology* 14(3): 290-295.
- Peleg, Z., Reguera, M., Tumimbang, E., Walia, H. y Blumwald, E. (2011). *Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress*. *Plant Biotechnology Journal* 9(7): 747-758.

- Penfield, S., Graham, S. y Graham, I. (2005). *Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: Arabidopsis as a model system*. *Biochemical Society Transactions* 33(2): 380-383.
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A.D., Graham, S. y Graham, I.A. (2006). *Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm*. *The Plant Cell* 18(8): 1887-1899.
- Peng, J. y Harberd, N.P. (2002). *The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination*. *Current Opinion in Plant Biology* 5(5): 376-381.
- Peng, Z., Lu, Q. y Verma, D. (1996). *Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants*. *Molecular and General Genetics* 253(3): 334-341.
- Perruc, E., Charpentreau, M., Ramirez, B.C., Jauneau, A., Galaud, J.P., Ranjeva, R. y col. (2004). *A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in arabidopsis thaliana seedlings*. *The Plant Journal* 38(3): 410-420.
- Personat, J.-M., Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C. y Jordano, J. (2014). *Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress*. *BMC Plant Biology* 14(1): 56.
- Pfeiffer, I. y Kutschera, U. (1996). *Sucrose metabolism and lipid mobilization during light-induced expansion of sunflower cotyledons*. *Journal of Plant Physiology* 147(5): 553-558.
- Pham, B. y McConnaughay, K. (2014). *Environmental Selection and Convergent Evolution of Plant Phenotypes*. En: *Ecology and the Environment* (Eds.: Monson, R.K.). Springer New York, p. 1-20.
- Pinheiro, C. y Chaves, M. (2011). *Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?* *Journal of Experimental Botany* 62(3): 869-882.
- Pockman, W.T. y Sperry, J.S. (2000). *Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation*. *American Journal of Botany* 87(9): 1287-1299.
- Pouvreau, B., Baud, S., Vernoud, V., Morin, V., Py, C., Gendrot, G. y col. (2011). *Duplicate maize Wrinkled1 transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis*. *Plant Physiology* 156(2): 674-686.
- Price, A.H., Cairns, J.E., Horton, P., Jones, H.G. y Griffiths, H. (2002). *Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses*. *Journal of Experimental Botany* 53(371): 989-1004.
- Pritchard, S.L., Charlton, W.L., Baker, A. y Graham, I.A. (2002). *Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis*. *The Plant Journal* 31(5): 639-647.
- Putt, E.D. (1997). *Early History of Sunflower*. En: *Sunflower Technology and Production* (Eds.: Schneiter, A.A.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, p. 1-19.
- Qaim, M. (2009). *The economics of genetically modified crops*. *Annual Review of Resource Economics* 1(1), 665-694.
- Qin, H., Gu, Q., Zhang, J., Sun, L., Kuppu, S., Zhang, Y. y col. (2011). *Regulated expression of an isopentenyltransferase gene (IPT) in peanut significantly improves drought tolerance and increases yield under field conditions*. *Plant and Cell Physiology* 52(11): 1904-1914.
- Qiu, W., Liu, M., Qiao, G., Jiang, J., Xie, L. y Zhuo, R. (2012). *An isopentenyl transferase gene driven by the stress-inducible rd29A promoter improves salinity stress tolerance in transgenic tobacco*. *Plant Molecular Biology Reporter* 30(3): 519-528.
- Quettier, A.-L. y Eastmond, P.J. (2009). *Storage oil hydrolysis during early seedling growth*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(6): 485-490.

- Quiroga, A. y Pérez Fernández, J. (2008). *El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana*. Publicación Técnica N° 72 EEA INTA.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y. y col. (2003). *Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses*. *Plant Physiology* 133(4): 1755-1767.
- Radin, J.W. (1981). *Water relations of cotton plants under nitrogen deficiency*. *Physiologia Plantarum* 51(1): 145-149.
- Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. y Grill, E. (2010). *ABA perception and signalling*. *Trends in Plant Science* 15(7): 395-401.
- 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.
- Ram, P., Singh, B., Singh, A., Ram, P., Singh, P., Singh, H. y col. (2002). *Submergence tolerance in rainfed lowland rice: physiological basis and prospects for cultivar improvement through marker-aided breeding*. *Field Crops Research* 76(2): 131-152.
- Ramamoorthy, R., Jiang, S.-Y., Kumar, N., Venkatesh, P.N. y Ramachandran, S. (2008). *A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments*. *Plant and Cell Physiology* 49(6): 865-879.
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J.M., Van Dijck, P. y Leyman, B. (2007). *ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown*. *Plant Molecular Biology* 63(2): 195-206.
- Raven, P.H. y Axelrod, D.I. (1974). *Angiosperm biogeography and past continental movements*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 539-673.
- Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C. y Foley, J.A. (2013). *Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050*. *PLoS One* 8(6): e66428.
- Reguera, M., Peleg, Z., Abdel-Tawab, Y.M., Tumimbang, E.B., Delatorre, C.A. y Blumwald, E. (2013). *Stress-Induced Cytokinin Synthesis Increases Drought Tolerance through the Coordinated Regulation of Carbon and Nitrogen Assimilation in Rice*. *Plant Physiology* 163(4): 1609-1622.
- Reguera, M., Peleg, Z. y Blumwald, E. (2012). *Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops*. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* 1819(2): 186-194.
- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q. y col. (2010). *ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis*. *The Plant Journal* 63(3): 417-429.
- Ribichich, K. F., Arce, A. L. and Chan, R. L. (2013) *Coping with Drought and Salinity Stresses: Role of Transcription Factors in Crop Improvement*. En: *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance* (eds N. Tuteja and S. S. Gill), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 641-684.
- Richards, R.A. (2006). *Physiological traits used in the breeding of new cultivars for water-scarce environments*. *Agricultural Water Management* 80(1): 197-211.
- Riechmann, J., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Keddie, J., Adam, L. y col. (2000). *Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes*. *Science* 290(5499): 2105-2110.
- Riechmann, J.L. (2002). *Transcriptional regulation: a genomic overview*. En: *The Arabidopsis Book* (eds C.R.Somerville and E.M.Meyerowitz). American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA. doi/10.1199/tab.0085.
- Rieger, M. y Litvin, P. (1999). *Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy*. *Journal of Experimental Botany* 50(331): 201-209.
- Ritchie, S. y Gilroy, S. (1998). *Gibberellins: regulating genes and germination*. *New Phytologist* 140(3): 363-383.

- Rivero, R.M., Gimeno, J., Van Deynze, A., Walia, H. y Blumwald, E. (2010). *Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing PSARK:: IPT prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought*. *Plant and Cell Physiology* 51(11): 1929-1941.
- Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S. y col. (2007). *Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 104(49): 19631-19636.
- Rivero, R.M., Shulaev, V. y Blumwald, E. (2009). *Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit*. *Plant Physiology* 150(3): 1530-1540.
- Roche, J., Hewezi, T., Bouniols, A. y Gentsbittel, L. (2007). *Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray*. *Planta* 226(3): 601-617.
- Roesler, K., Shintani, D., Savage, L., Boddupalli, S. y Ohlrogge, J. (1997). *Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds*. *Plant Physiology* 113(1): 75-81.
- Rohde, A. y Bhalerao, R.P. (2007). *Plant dormancy in the perennial context*. *Trends in Plant Science* 12(5): 217-223.
- Rondanini, D., Savin, R. y Hall, A. (2003). *Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (Helianthus annuus L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling*. *Field Crops Research* 83(1): 79-90.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C. y Bevan, M.W. (2001). *Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling*. *The Plant Journal* 26(4): 421-433.
- Ross, C.A., Liu, Y. y Shen, Q.J. (2007). *The WRKY gene family in rice (Oryza sativa)*. *Journal of Integrative Plant Biology* 49(6): 827-842.
- Roychoudhury, A., Paul, S. y Basu, S. (2013). *Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress*. *Plant Cell Reports* 32(7): 985-1006.
- Ruiz, L., Atkinson, C. y Mansfield, T. (1993). *Calcium in the xylem and its influence on the behaviour of stomata*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 341(1295): 67-74.
- Rushton, D.L., Tripathi, P., Rabara, R.C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A.K. y col. (2012). *WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling*. *Plant Biotechnology Journal* 10(1): 2-11.
- Rushton, P.J., Macdonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M. y Hooley, R. (1995). *Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of α -Amy2 genes*. *Plant Molecular Biology* 29(4): 691-702.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. y Shen, Q.J. (2010). *WRKY transcription factors*. *Trends in Plant Science* 15(5): 247-258.
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C. y Ohlrogge, J.B. (2002). *Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling*. *The Plant Cell* 14(6): 1191-1206.
- Rylott, E.L., Gilday, A.D. y Graham, I.A. (2003). *The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis is essential for seedling establishment*. *Plant Physiology* 131(4): 1834-1842.
- Ryu, H.-S., Han, M., Lee, S.-K., Cho, J.-I., Ryoo, N., Heu, S. y col. (2006). *A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response*. *Plant Cell Reports* 25(8): 836-847.
- Sakakibara, H. (2006). *Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation*. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449.
- Sanguineti, M., Tuberosa, R., Landi, P., Salvi, S., Maccaferri, M., Casarini, E. y col. (1999). *QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf*

- abscisic acid concentration in field-grown maize*. Journal of Experimental Botany 50(337): 1289-1297.
- Sanjaya, Durrett, T.P., Weise, S.E. y Benning, C. (2011). *Increasing the energy density of vegetative tissues by diverting carbon from starch to oil biosynthesis in transgenic Arabidopsis*. Plant Biotechnology Journal 9(8): 874-883.
- Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F., Caboche, M. y Lepiniec, L. (2008). *Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis*. The Plant Journal 54(4): 608-620.
- Sarkar, R., Das, S. y Ravi, I. (2001). *Changes in Certain Antioxidative Enzymes and Growth Parameters as a Result of Complete Submergence and Subsequent Re-aeration of Rice Cultivars Differing in Submergence Tolerance*. Journal of Agronomy and Crop Science 187(2): 69-74.
- Sarkar, R., De, R., Reddy, J. y Ramakrishnayya, G. (1996). *Studies on the submergence tolerance mechanism in relation to carbohydrate, chlorophyll and specific leaf weight in rice (Oryza sativa L.)*. Journal of Plant Physiology 149(5): 623-625.
- Sarkar, R., Reddy, J., Sharma, S. y Ismail, A.M. (2006). *Physiological basis of submergence tolerance in rice and implications for crop improvement*. Current Science 91(7): 899.
- Scarpeci, T.E., Zanol, M.I., Mueller-Roeber, B. y Valle, E.M. (2013). *Overexpression of AtWRKY30 enhances abiotic stress tolerance during early growth stages in Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 83(3): 265-277.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. y Eliceiri, K.W. (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature Methods 9(7): 671-675.
- Schneiter, A. y Miller, J. (1981). *Description of sunflower growth stages*. Crop Science 21(6): 901-903.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M. y Waner, D. (2001). *Guard cell signal transduction*. Annual Review of Plant Biology 52(1): 627-658.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y. y col. (2002). *Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray*. The Plant Journal 31(3): 279-292.
- Sessa, G., Morelli, G. y Ruberti, I. (1993). *The Athb-1 and-2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities*. The EMBO Journal 12(9): 3507.
- Setter, T. y Waters, I. (2003). *Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats*. Plant and Soil 253(1): 1-34.
- Setter, T.L., Bhekasut, P. y Greenway, H. (2010). *Desiccation of leaves after de-submergence is one cause for intolerance to complete submergence of the rice cultivar IR 42*. Functional Plant Biology 37(11): 1096-1104.
- Shang, Y., Yan, L., Liu, Z.-Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q. y col. (2010). *The Mg-chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition*. The Plant Cell 22(6): 1909-1935.
- Sharma, R., De Vleeschauwer, D., Sharma, M.K. y Ronald, P.C. (2013). *Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice*. Molecular Plant 6(2): 250-260.
- Shekhawat, U.K.S., Ganapathi, T.R. y Srinivas, L. (2011). *Cloning and characterization of a novel stress-responsive WRKY transcription factor gene (MusaWRKY71) from Musa spp. cv. Karibale Monthan (ABB group) using transformed banana cells*. Molecular Biology Reports 38(6): 4023-4035.
- Shen, B., Allen, W.B., Zheng, P., Li, C., Glassman, K., Ranch, J. y col. (2010). *Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 increases seed oil production in maize*. Plant Physiology 153(3): 980-987.

- Shen, H., Liu, C., Zhang, Y., Meng, X., Zhou, X., Chu, C. y col. (2012). *OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice*. *Plant Molecular Biology* 80(3): 241-253.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways*. *Current Opinion in Plant Biology* 3(3): 217-223.
- Siloto, R.M., Findlay, K., Lopez-Villalobos, A., Yeung, E.C., Nykiforuk, C.L. y Moloney, M.M. (2006). *The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18(8): 1961-1974.
- Sirichandra, C., Wasilewska, A., Vlad, F., Valon, C. y Leung, J. (2009). *The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action*. *Journal of Experimental Botany* 60(5): 1439-1463.
- Skirycz, A., Vandenbroucke, K., Clauw, P., Maleux, K., De Meyer, B., Dhondt, S. y col. (2011). *Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal*. *Nature Biotechnology* 29(3): 212-214.
- Skriver, K. y Mundy, J. (1990). *Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress*. *The Plant Cell* 2(6): 503.
- Smeeckens, S. (2000). *Sugar-induced signal transduction in plants*. *Annual Review of Plant Biology* 51(1): 49-81.
- Smigocki, A.C. y Owens, L.D. (1989). *Cytokinin-to-auxin ratios and morphology of shoots and tissues transformed by a chimeric isopentenyl transferase gene*. *Plant Physiology* 91(3): 808-811.
- Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988). *Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase*. *Gene* 67(1): 31-40.
- Solari, L.I., Pernice, F. y DeJong, T.M. (2006). *The relationship of hydraulic conductance to root system characteristics of peach (Prunus persica) rootstocks*. *Physiologia Plantarum* 128(2): 324-333.
- Somerville, C.R. y Bonetta, D. (2001). *Plants as factories for technical materials*. *Plant Physiology* 125(1): 168-171.
- Song, A., Li, P., Jiang, J., Chen, S., Li, H., Zeng, J. y col. (2014). *Phylogenetic and Transcription Analysis of Chrysanthemum WRKY Transcription Factors*. *International Journal of Molecular Sciences* 15(8): 14442-14455.
- Song, Y., Chen, L., Zhang, L. y Yu, D. (2010). *Overexpression of OsWRKY72 gene interferes in the abscisic acid signal and auxin transport pathway of Arabidopsis*. *Journal of Biosciences* 35(3): 459-471.
- Song, Y., Jing, S. y Yu, D. (2009). *Overexpression of the stress-induced OsWRKY08 improves osmotic stress tolerance in Arabidopsis*. *Chinese Science Bulletin* 54(24): 4671-4678.
- Sperry, J.S. (2011). *Hydraulics of vascular water transport*. En: *Mechanical integration of plant cells and plants* (Eds.:Springer, p. 303-327).
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C. y Kohli, A. (2012). *Contrapuntal role of ABA: does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress?* *Gene* 506(2): 265-273.
- Stevens, P. (2001). *Angiosperm phylogeny*. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. y Thomashow, M.F. (1997). *Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 94(3): 1035-1040.
- Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R.L. y col. (2001). *LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo*

- development*. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 98(20): 11806-11811.
- Sukumaran, N. y Weiser, C. (1972). *Freezing injury in potato leaves*. Plant Physiology 50(5): 564-567.
- Sultan, S.E. (2000). *Phenotypic plasticity for plant development, function and life history*. Trends in Plant Science 5(12): 537-542.
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Borén, M., Ahlandsberg, S. y Jansson, C. (2003). *A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter*. The Plant Cell 15(9): 2076-2092.
- Suttle, J.C. (2004). *Physiological regulation of potato tuber dormancy*. American Journal of Potato Research 81(4): 253-262.
- Swamy, B. y Kumar, A. (2013). *Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice*. Biotechnology Advances 31(8): 1308-1318.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). En: *Fisiología vegetal* (Volumen 1, eds: Universitat Jaume)
- Takahashi, S., Seki, M., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Narusaka, M. y col. (2004). *Monitoring the expression profiles of genes induced by hyperosmotic, high salinity, and oxidative stress and abscisic acid treatment in Arabidopsis cell culture using a full-length cDNA microarray*. Plant Molecular Biology 56(1): 29-55.
- Takei, K., Sakakibara, H. y Sugiyama, T. (2001). *Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in Arabidopsis thaliana*. Journal of Biological Chemistry 276(28): 26405-26410.
- Takei, K., Yamaya, T. y Sakakibara, H. (2004). *Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin*. Journal of Biological Chemistry 279(40): 41866-41872.
- Tardieu, F. (1996). *Drought perception by plants Do cells of droughted plants experience water stress?* Plant Growth Regulation 20(2): 93-104.
- Tardieu, F. (2012). *Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario*. Journal of Experimental Botany 63(1): 25-31.
- Teakle, N.L., Colmer, T.D. y Pedersen, O. (2014). *Leaf gas films delay salt entry and enhance underwater photosynthesis and internal aeration of Melilotus siculus submerged in saline water*. Plant, Cell and Environment 37(10): 2339-2349.
- Theodoulou, F.L. y Eastmond, P.J. (2012). *Seed storage oil catabolism: a story of give and take*. Current Opinion in Plant Biology 15(3): 322-328.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Symonds, R.C., Mulholland, B.J., Dadswell, A.R., Blake, P.S. y col. (2000). *Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid*. The Plant Journal 23(3): 363-374.
- To, J.P., Reiter, W.-D. y Gibson, S.I. (2002). *Mobilization of seed storage lipid by Arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars*. BMC Plant Biology 2(1): 4.
- Tran, L., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). *Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signalings*. Plant Signaling and Behavior 5(2): 148-150.
- Trelease, R.N. y Doman, D.C. (2013). *Mobilization of oil and wax reserves*. Seed physiology 2: 201-245.
- Trewavas, A.J. y Malho, R. (1997). *Signal perception and transduction: the origin of the phenotype*. The Plant Cell 9(7): 1181.
- Trigo, E. y Cap, E. (2006). *Diez años de cultivos genéticamente modificados en la agricultura argentina*. Buenos Aires, Argentina: ArgenBio. <http://www.argenbio.org/pdf/trigo.pdf>.
- Trigo, E., Chudnovsky, D., Cap, E. y López, A. (2002). En: *Los transgénicos en la agricultura argentina: una historia con final abierto*. Libros del Zorzal. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A9888E/A9888E.PDF>.

- Trigo, E.J. (2011). *Quince años de Cultivos Genéticamente Modificados en la agricultura argentina*. ArgenBio, Buenos Aires. http://www.argenbio.org/adc/uploads/15_anos_Estudio_de_cultivos_GM_en_Argentina.pdf.
- Trigo, E.J. y Cap, E.J. (2004). *The impact of the introduction of transgenic crops in Argentinean agriculture*. *AgBioForum* 6(3): 87-94.
- Tripathi, P., Rabara, R.C. y Rushton, P.J. (2014). *A systems biology perspective on the role of WRKY transcription factors in drought responses in plants*. *Planta* 239(2): 255-266.
- Troncoso-Ponce, M.A., Kilaru, A., Cao, X., Durrett, T.P., Fan, J., Jensen, J.K. y col. (2011). *Comparative deep transcriptional profiling of four developing oilseeds*. *The Plant Journal* 68(6): 1014-1027.
- Tyree, M. T., Davis, S. D., y Cochard, H. (1994). *Biophysical perspectives of xylem evolution: is there a tradeoff of hydraulic efficiency for vulnerability to dysfunction?* *IAWA journal*, 15(4), 335-360.
- Ülker, B., Mukhtar, M.S. y Somssich, I.E. (2007). *The WRKY70 transcription factor of Arabidopsis influences both the plant senescence and defense signaling pathways*. *Planta* 226(1): 125-137.
- Ülker, B. y Somssich, I.E. (2004). *WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function*. *Current Opinion in Plant Biology* 7(5): 491-498.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K. y col. (2010). *Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport*. *Plant and Cell Physiology* 51(11): 1821-1839.
- Van Rooijen, G.J. y Motoney, M.M. (1995). *Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins*. *Nature Biotechnology* 13(1): 72-77.
- Vanhercke, T., El Tahchy, A., Shrestha, P., Zhou, X.-R., Singh, S.P. y Petrie, J.R. (2013). *Synergistic effect of WRI1 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants*. *FEBS Letters* 587(4): 364-369.
- Vashisht, D., Hesselink, A., Pierik, R., Ammerlaan, J., Bailey-Serres, J., Visser, E. y col. (2011). *Natural variation of submergence tolerance among Arabidopsis thaliana accessions*. *New Phytologist* 190(2): 299-310.
- Vashisth, A. y Nagarajan, S. (2010). *Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (Helianthus annuus) seeds exposed to static magnetic field*. *Journal of Plant Physiology* 167(2): 149-156.
- Vigeolas, H., Waldeck, P., Zank, T. y Geigenberger, P. (2007). *Increasing seed oil content in oil-seed rape (Brassica napus L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter*. *Plant Biotechnology Journal* 5(3): 431-441.
- Vriezen, W.H., Zhou, Z. y Van Der Straeten, D. (2003). *Regulation of Submergence-induced Enhanced Shoot Elongation in Oryza sativa L.* *Annals of Botany* 91(2): 263-270.
- Walker, R. y Chen, Z.-H. (2002). *Phosphoenolpyruvate carboxykinase: structure, function and regulation*. *Advances in Botanical Research* 38: 93-189.
- Wan, D., Li, R., Zou, B., Zhang, X., Cong, J., Wang, R. y col. (2012). *Calmodulin-binding protein CBP60g is a positive regulator of both disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 31(7): 1269-1281.
- Wang, F.-Z., Wang, Q.-B., Kwon, S.-Y., Kwak, S.-S. y Su, W.-A. (2005). *Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase*. *Journal of Plant Physiology* 162(4): 465-472.
- Wang, H., Avci, U., Nakashima, J., Hahn, M.G., Chen, F. y Dixon, R.A. (2010). *Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 107(51): 22338-22343.

- Wang, H., Hao, J., Chen, X., Hao, Z., Wang, X., Lou, Y. y col. (2007a). *Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants*. *Plant Molecular Biology* 65(6): 799-815.
- Wang, H.W., Zhang, B., Hao, Y.J., Huang, J., Tian, A.G., Liao, Y. y col. (2007b). *The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants*. *The Plant Journal* 52(4): 716-729.
- Wang, L., Tsuda, K., Sato, M., Cohen, J.D., Katagiri, F. y Glazebrook, J. (2009a). *Arabidopsis CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathogens* 5(2): e1000301.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y.Q. y col. (2011). *Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of Arabidopsis by downregulating ABI5 expression*. *The Plant Journal* 68(2): 249-261.
- Wang, Z., Zhu, Y., Wang, L., Liu, X., Liu, Y., Phillips, J. y col. (2009b). *A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in Boea hygrometrica by binding to the W-box elements of the galactinol synthase (BhGolS1) promoter*. *Planta* 230(6): 1155-1166.
- Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C. y col. (2008). *An update on abscisic acid signaling in plants and more...* *Molecular Plant* 1(2): 198-217.
- Wasson, A., Richards, R., Chatrath, R., Misra, S., Prasad, S.S., Rebetzke, G. y col. (2012). *Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops*. *Journal of Experimental Botany* 63(9): 3485-3498.
- Watanabe, K., Nishiuchi, S., Kulichikhin, K. y Nakazono, M. (2013). *Does suberin accumulation in plant roots contribute to waterlogging tolerance?* *Frontiers in Plant Science* 4:178.
- Wei, T., Ou, B., Li, J., Zhao, Y., Guo, D., Zhu, Y. y col. (2013). *Transcriptional profiling of rice early response to Magnaporthe oryzae identified OsWRKYs as important regulators in rice blast resistance*. *PLoS One* 8(3): e59720.
- Wei, W., Zhang, Y., Han, L., Guan, Z. y Chai, T. (2008). *A novel WRKY transcriptional factor from Thlaspi caerulescens negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco*. *Plant Cell Reports* 27(4): 795-803.
- Wen, C.-K. y Chang, C. (2002). *Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses*. *The Plant Cell* 14(1): 87-100.
- WenBo, J. y DiQiu, Y. (2009). *Arabidopsis WRKY2 transcription factor may be involved in osmotic stress response*. *Acta Botanica Yunnanica* 31(5): 427-432.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S. y Paquette, S. (2002). *Cytochromes P450*. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 1.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K. y Schmölling, T. (2006). *New insights into the biology of cytokinin degradation*. *Plant Biology* 8(3): 371-381.
- Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U. y col. (2010). *Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco*. *The Plant Cell* 22(12): 3905-3920.
- Weselake, R., Shah, S., Taylor, D.C., Zou, J., Laroche, A., Moloney, M.M. y col. (2007). *Transformation of Brassica napus with diacylglycerol acyltransferase-1 results in increased seed oil content*. *Current Advances in the Biochemistry and Cell Biology of Plant Lipids*: 232-234.
- Weselake, R.J., Taylor, D.C., Rahman, M.H., Shah, S., Laroche, A., McVetty, P.B. y col. (2009). *Increasing the flow of carbon into seed oil*. *Biotechnology Advances* 27(6): 866-878.
- Weydert, C.J. y Cullen, J.J. (2010). *Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue*. *Nature Protocols* 5(1): 51-66.
- Wilkinson, S. y Davies, W.J. (2010). *Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community*. *Plant, Cell and Environment* 33(4): 510-525.
- Wind, J.J., Peviani, A., Snel, B., Hanson, J. y Smeeckens, S.C. (2013). *ABI4: versatile activator and repressor*. *Trends in Plant Science* 18(3): 125-132.

- Winkel, A., Colmer, T.D. y Pedersen, O. (2011). *Leaf gas films of Spartina anglica enhance rhizome and root oxygen during tidal submergence*. Plant, Cell and Environment 34(12): 2083-2092.
- 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.
- Wu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, X.-C. y Huang, R. (2008). *Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing*. Plant Physiology 148(4): 1953-1963.
- Wu, X., Shiroto, Y., Kishitani, S., Ito, Y. y Toriyama, K. (2009). *Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter*. Plant Cell Reports 28(1): 21-30.
- Xie, Z., Zhang, Z.L., Hanzlik, S., Cook, E. y Shen, Q.J. (2007). *Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene*. Plant Molecular Biology 64(3): 293-303.
- Xie, Z., Zhang, Z.L., Zou, X., Huang, J., Ruas, P., Thompson, D. y col. (2005). *Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells*. Plant Physiology 137(1): 176-189.
- Xie, Z., Zhang, Z.L., Zou, X., Yang, G., Komatsu, S. y Shen, Q.J. (2006). *Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells*. The Plant Journal 46(2): 231-242.
- 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.
- Xiong, X., James, V.A., Zhang, H. y Altpeter, F. (2010). *Constitutive expression of the barley HvWRKY38 transcription factor enhances drought tolerance in turf and forage grass (Paspalum notatum Flugge)*. Molecular Breeding 25(3): 419-432.
- Xu, X., Chen, C., Fan, B. y Chen, Z. (2006). *Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors*. The Plant Cell 18(5): 1310-1326.
- Xu, Y.-H., Wang, J.-W., Wang, S., Wang, J.-Y. y Chen, X.-Y. (2004). *Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A*. Plant Physiology 135(1): 507-515.
- Xu, Y., Gianfagna, T. y Huang, B. (2010). *Proteomic changes associated with expression of a gene (ipt) controlling cytokinin synthesis for improving heat tolerance in a perennial grass species*. Journal of Experimental Botany 61(12): 3273-3289.
- Xu, Y., Tian, J., Gianfagna, T. y Huang, B. (2009). *Effects of SAG12-ipt expression on cytokinin production, growth and senescence of creeping bentgrass (Agrostis stolonifera L.) under heat stress*. Plant Growth Regulation 57(3): 281-291.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1994). *A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress*. The Plant Cell 6(2): 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2006). *Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses*. Annual Review of Plant Biology 57: 781-803.
- Yamaguchi, S. (2008). *Gibberellin metabolism and its regulation*. The Annual Review of Plant Biology 59: 225-251.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Seki, M., Shinozaki, K. y Yokoyama, S. (2013). *DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution*. Trends in Plant Science 18(5): 267-276.

- Yan, H., Jia, H., Chen, X., Hao, L., An, H. y Guo, X. (2014). *The cotton WRKY transcription factor GhWRKY17 functions in drought and salt stress in transgenic Nicotiana benthamiana through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production*. Plant and Cell Physiology 55(12): 2060-2076.
- Yang, D.-H., Hettenhausen, C., Baldwin, I.T. y Wu, J. (2011). *The multifaceted function of BAK1/SERK3: Plant immunity to pathogens and responses 1 to insect herbivores*. Plant Signaling and Behavior 6(9): 1322-1324.
- Yano, M. y Sasaki, T. (1997). *Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice*. Plant Molecular Biology 35(1-2): 145-153.
- Zhang, C.-Q., Xu, Y., Lu, Y., Yu, H.-X., Gu, M.-H. y Liu, Q.-Q. (2011). *The WRKY transcription factor OsWRKY78 regulates stem elongation and seed development in rice*. Planta 234(3): 541-554.
- Zhang, J., Peng, Y. y Guo, Z. (2008). *Constitutive expression of pathogen-inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants*. Cell Research 18(4): 508-521.
- Zhang, Y. y Wang, L. (2005). *The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants*. BMC Evolutionary Biology 5(1): 1.
- Zhang, Z.L., Shin, M., Zou, X., Huang, J., Ho, T.H. y Shen, Q.J. (2009). *A negative regulator encoded by a rice WRKY gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells*. Plant Molecular Biology 70(1-2): 139-151.
- Zheng, P., Allen, W.B., Roesler, K., Williams, M.E., Zhang, S., Li, J. y col. (2008). *A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize*. Nature Genetics 40(3): 367-372.
- Zhou, L., Jang, J.-c., Jones, T.L. y Sheen, J. (1998). *Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant*. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 95(17): 10294-10299.
- Zhou, Q.Y., Tian, A.G., Zou, H.F., Xie, Z.M., Lei, G., Huang, J. y col. (2008). *Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, and GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis plants*. Plant Biotechnology Journal 6(5): 486-503.
- Zhou, X., Jiang, Y. y Yu, D. (2011). *WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in Arabidopsis*. Molecules and Cells 31(4): 303-313.
- Zhou, Y.-L., Xu, M.-R., Zhao, M.-F., Xie, X.-W., Zhu, L.-H., Fu, B.-Y. y col. (2010). *Genome-wide gene responses in a transgenic rice line carrying the maize resistance gene Rxo1 to the rice bacterial streak pathogen, Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. BMC Genomics 11(1): 78.
- Zou, X., Neuman, D. y Shen, Q.J. (2008). *Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells*. Plant Physiology 148(1): 176-186.