

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“Caracterización funcional de los factores de  
transcripción vegetales pertenecientes a la familia  
HD-Zip que participan en los mecanismos de  
respuesta al estrés”

Lic. Delfina Adela Ré

Director: Dr. Gustavo Bonaventure  
Co-Directora: Dra. Raquel Lía Chan

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

-2014-

*A mi familia  
y amigos*

*Quisiera utilizar las primeras páginas para agradecer a todos aquellos que me acompañaron y enseñaron durante el proceso que llevó a la presentación de esta Tesis de Doctorado.*

*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 y permitirme realizar mi carrera de grado, iniciarme en la Docencia y realizar el presente trabajo de Tesis.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL/CONICET) porque desde su creación ha fortalecido la interacción entre los diferentes grupos de investigación que lo forman.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por haberme otorgado las becas de posgrado para poder realizar mis estudios.

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

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por becarme para trabajar en el Instituto Max Planck de Ecología Química (MPI-CE) de Jena, Alemania.

Al Instituto Max Planck de Ecología Química (MPI-CE) por la posibilidad de trabajar allí y de conocer otras tecnologías.

*A mis directores y compañeros de trabajo*

A la Dra. Raquel Chan, por haberme recibido en su laboratorio y dirigirme durante el doctorado. Por su energía infinita y vocación. Por su entusiasmo y paciencia con mi trabajo, y por todas sus enseñanzas.

Al Dr. Gustavo Bonaventure, por guiarme durante todo el trabajo realizado en Alemania. Por su dedicación y enseñanzas.

Al Dr. Ian Baldwin, por permitirme trabajar en su laboratorio y por la riqueza de sus conocimientos y discusiones científicas.

Al Dr. Daniel Gonzalez y al Dr. Alberto Iglesias, por sus comentarios constructivos y el apoyo en las solicitudes de becas.

A las Técnicas del MPI-CE: Antje, Susi y Wipke, por su colaboración en la transformación de plantas y en el ensayo de microarreglos.

A los chicos del LBV:

Por la armonía de trabajo y el ambiente relajado que compartimos. Por la convivencia diaria, los almuerzos y *after labs*. Por la confianza, las enseñanzas mutuas, las risas y discusiones.

A Mati, con quien compartimos muchos ensayos, aprendimos técnicas y también nos frustramos, lo cual se torna más liviano si es de a dos. Por la compañía, por escucharme, y bancarme en cada etapa de estos cinco años.

A Jesi, Juli y Vero, encargadas de alegrarme cada día de trabajo con discusiones, charlas, oídos, opiniones y música. Gracias por estar siempre de buen humor, con alguna anécdota divertida. También por todas las técnicas y consejos transmitidos.

A Toto, siempre dispuesto a escucharme, ayudarme y a solucionar lo que sea. Porque sin sus mates y su ayuda incondicional nada hubiera sido lo mismo.

A Agus, por las charlas y discusiones tan interesantes. Por ayudarme siempre que lo necesité.

A Kari, Cele y Pame, por estar siempre para hablar y discutir de tantos y tan diversos temas y por ayudarme en lo que necesité.

A Javi y Guille, porque aunque hace poco nos encontramos, siempre están de buen humor, dispuestos a cualquier discusión.

A los chicos que encontré en el MPI-CE:

Pao por su generosidad inmensa para enseñarme dentro y fuera del lab. Por acompañarme y hacerme sentir como en casa.

Michi, Mariana, Vari, Dani, Merry, Felipe, Alex, Mario, Arjen y Arne, por la ayuda en el lab, por los paseos, las reuniones *after lab* y los cafecitos y mates durante los *breaks* en la terraza.

Todos los demás *PhD students* y *post-docs* que me enseñaron tanto, y los técnicos y *gardeners* que me ayudaron y facilitaron tantas tareas. En especial a Danny Kessler por enseñarme sobre las flores de *Nicotiana* y por las hermosas fotos que toma.

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

A las chicas de Paraná, Juli, Luli, Anto y Agus por los increíbles años en “la facu”, cursando y estudiando; por seguir entendiéndonos y apoyándonos durante nuestros posgrados y nuestras vidas.

A Charles, por su amistad, su compañía, y sus enseñanzas, en Alemania y en Argentina. Por sus sabios consejos, tanto en el lab como en la vida misma.

A Pablo, mi director de Tesina y tío postizo en mis viajes a Alemania. Por ayudarme en mis inicios en la ciencia y en los viajes. Por sus consejos y compañía.

A Fede, ex compañero del lab y amigo de circo. Por todo lo compartido, por enseñarme sobre tantos temas, por estar siempre de buen humor y con energía.

A los chicos del LBM y del LEM. Eli, Luli, Nori, siempre dispuestas a ayudarme con lo que necesité y a charlar de la vida. Vane y Mati H, por su ayuda, por las charlas, las comidas, los viernes de tragos y los viajes a Paraná.

A los docentes de la cátedra de Biología Celular y Molecular, por los momentos y clases compartidas.

*A mi familia y mis amigos*

A mis viejos, Elsu y Luis, por estar absolutamente siempre y acompañarme y apoyarme en todo lo que he emprendido. Por enseñarme a ser lo que soy.

A mis hermanos, Micu y Santi por estar siempre, bancarme y apoyarme.

A mis amigas de la vida, Mari, Tuti, Joki. Porque pasa el tiempo y siguen incondicionales. Por darme tanta felicidad y acompañarme desde hace más de 15 años. Y porque aunque pasemos tiempo sin vernos seguimos siendo las mismas.

A las chicas de casa, Vicky, Flo y Valen. Por aprender juntas a crecer, compartir y mil cosas más.

A Euge y Vero, por la compañía, las salidas, las charlas y las comidas siempre divertidas.

A las chicas de circo, aunque hace un tiempo ya no entrenamos juntas el grupo continúa, Gabi, Debo, Vale. Y a los demás chicos de circo y profes, por hacerme tan feliz compartiendo una actividad que me fascina.

A mis amigos, por todo lo compartido. Guille, incondicional siempre acompañándome. Agu, Facu y Flaco por hacerme reír tanto. Juan, Tincho, Mirko y Pepo, por las reuniones, las comidas y las charlas siempre interesantes; y por acercarme al barrio.

**ÍNDICE, ANTECEDENTES,  
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA**

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>NOMENCLATURA DE PLANTAS TRANSGÉNICAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>15</b>
1- El crecimiento y desarrollo vegetal.....	16
2- El estrés.....	17
3- Las hormonas vegetales.....	19
4- Los compuestos volátiles.....	20
5- Las flores.....	21
6- Los compuestos volátiles de las flores.....	23
7- Relación entre las flores y el estrés.....	26
8- Las plantas y el agua.....	28
9- Los estomas.....	29
10- Fotosíntesis y senescencia.....	30
11- Producción: biomasa y semillas.....	32
12- Regulación de la expresión génica en plantas.....	34
13- Factores de transcripción vegetales.....	34
14- La familia HD-Zip.....	37
15- La subfamilia HD-Zip I.....	39
15.1- Aspectos funcionales.....	39
15.2- Características estructurales y análisis filogenético.....	40
15.3- Características particulares del subgrupo Ic.....	42
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
1- Plásmidos.....	48
2- Cepas bacterianas.....	49
3- Construcciones genéticas.....	49
4- Material vegetal y condiciones de cultivo.....	50
4.1- Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	50
4.2- Cultivo de <i>Nicotiana attenuata</i> .....	51
5- Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	51
6- Transformación transitoria de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	51
7- Transformación de plantas de <i>Nicotiana attenuata</i> .....	52
7.1- Transformación transitoria-VIGS.....	52

7.2- Transformación estable.....	52
8- Tratamientos a plantas de <i>Nicotiana attenuata</i> .....	53
8.1- Infección por patógenos.....	53
8.2- Daño mecánico.....	53
8.3- Aplicación de hormonas en hojas.....	53
8.4- Aplicación de hormonas en flores.....	53
8.5- Estrés hídrico severo.....	53
8.6- Estrés salino.....	54
9- Tratamiento a plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	54
9.1- Estrés hídrico moderado.....	54
9.2- Estrés osmótico.....	54
10- Cuantificación de transcritos por transcripción reversa y PCR en tiempo real.....	54
10.1- Extracción de ARN total.....	54
10.2- Transcripción reversa seguida de PCR (qRT-PCR).....	55
11- Análisis del transcriptoma de <i>N. attenuata</i> mediante un ensayo de microarreglos.....	55
12- Extracción y cuantificación de fitohormonas.....	56
13- Cuantificación de la hormona etileno.....	56
14- Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios.....	56
15- Cuantificación de la emisión de acetona de bencilo (BA).....	57
16- Ensayo histoquímico para determinar actividad glucuronidasa (GUS).....	57
17- Análisis de crecimiento de raíces.....	58
18- Análisis del consumo de agua.....	58
19- Ensayo de producción de semillas.....	58
20- Determinación del área foliar.....	59
21- Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	59
22- Cuantificación del intercambio de agua y de CO <sub>2</sub> .....	59
23- Ensayos de pérdida de agua.....	59
24- Análisis de estomas.....	60
25- Soluciones utilizadas.....	60
26- Secuencias de oligonucleótidos utilizados. Tabla M1. ....	60
<b>CAPÍTULO 1: NaHD20 regula el desarrollo de flores, su apertura y la emisión de compuestos volátiles .....</b>	<b>62</b>
<b>C1- Introducción.....</b>	<b>63</b>
1- <i>Nicotiana attenuata</i> como modelo de estudio.....	63
2- Los factores de transcripción HD-Zip I de <i>Nicotiana attenuata</i> .....	64
<b>C1- Resultados.....</b>	<b>65</b>
1- Identificación de factores de transcripción HD-Zip I de <i>Nicotiana attenuata</i> cuya expresión se induce por múltiples condiciones de estrés.....	65
2- El gen <i>NaHD20</i> de <i>N. attenuata</i> .....	65
3- Los transcritos de <i>NaHD20</i> son abundantes en corolas.....	69



4- NaHD20 es un regulador positivo de la transición del estadio vegetativo al reproductivo, y de la diferenciación de las flores en condiciones normales de crecimiento.....	70
5- Respuestas de las plantas <i>VIGS-irHD20</i> a diferentes tratamientos.....	71
6- Obtención de plantas transformadas establemente silenciando al gen <i>NaHD20</i> .....	74
7- NaHD20 actúa como un regulador positivo de la emisión de BA desde las flores de <i>Nicotiana attenuata</i> .....	75
8- Los cambios en los niveles de ABA en corolas se correlacionan con cambios en la emisión de BA durante la apertura de la corola.....	77
9- El silenciamiento de <i>NaHD20</i> en la corola afecta la expresión de diversos genes.....	79
<b>C1- Discusión.....</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO 2: AtHB12 y AtHB7 se regulan entre sí y coordinan eventos del desarrollo y de respuestas al estrés hídrico en Arabidopsis.....</b>	<b>89</b>
<b>C2- Introducción.....</b>	<b>90</b>
1- El estrés abiótico.....	90
2- Los factores de transcripción AtHB12 y AtHB7.....	92
<b>C2- Resultados.....</b>	<b>95</b>
1- <i>AtHB12</i> y <i>AtHB7</i> tiene diferentes perfiles de expresión en Arabidopsis.....	95
2- <i>AtHB7</i> y <i>AtHB12</i> se regulan mutuamente dependiendo del tejido y del estadio de desarrollo.....	96
3- La expresión del gen reportero <i>GUS</i> dirigida por el promotor de <i>AtHB12</i> o el de <i>AtHB7</i> indica que el primero es activo en estadios tempranos y el segundo en estadios tardíos del desarrollo vegetal.....	99
4- <i>AtHB12</i> induce la elongación de la raíz principal.....	100
5- <i>AtHB12</i> y <i>AtHB7</i> regulan el desarrollo foliar en forma dependiente del estadio de desarrollo de la planta.....	101
6- <i>AtHB7</i> y <i>AtHB12</i> participan en el control de los niveles de pigmentos fotosintéticos y de la fotosíntesis.....	102
7- <i>AtHB7</i> controla la pérdida de agua promoviendo el cierre estomático.....	103
8- <i>AtHB7</i> y <i>AtHB12</i> afectan la conductancia estomática, el consumo de agua y la producción de semillas.....	104
<b>C2- Discusión.....</b>	<b>106</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>110</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>128</b>

## ANTECEDENTES

El trabajo de investigación que se describe en este trabajo de 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) ubicado en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y en el Departamento de Ecología Molecular del Instituto Max Planck de Ecología Química (MPI-CE) ubicado en la ciudad de Jena, Alemania. Los resultados han sido dados a conocer parcialmente en las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos.

Publicaciones directamente relacionadas con el trabajo de Tesis:

- **Ré DA**, Dezar CA, Chan RL, Baldwin I, Bonaventure G (2011). Nicotiana attenuata NaHD20 plays a role in leaf ABA accumulation during water stress, benzylacetone emission from flowers, and the timing of bolting and flower transitions. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 155-66.
- **Ré DA**, Raud B, Chan RL, Baldwin I, Bonaventure G (2012). RNAi-mediated silencing of the HD-zip gene HD20 in Nicotiana attenuata affects benzyl acetone emission from corollas via ABA levels and the expression of metabolic genes. *BMC Plant Biology*, 12:60.
- **Ré DA**, Capella M, Bonaventure G, Chan RL. AtHB12 and AtHB7 regulate each other by positive and negative feedback loops during Arabidopsis development and limiting water conditions. En revisión.

Publicaciones relacionadas con el trabajo de Tesis:

- Dezar CA, Giacomelli JI, Manavella PA, **Ré DA**, Alves-Ferreira M, Baldwin I, Bonaventure G, Chan RL (2011). HAHB10, a sunflower HD-Zip II transcription factor, participates in the induction of flowering and in the control of phytohormone-mediated responses to biotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 1061-76.
- Capella M, **Ré DA**, Arce AL, Chan RL (2014). Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB. *Plant Cell Reports*, DOI 10.1007/s00299-014-1576-9.

Presentaciones en Congresos y Disertaciones:

- **Ré DA**, Capella M, Chan RL. AtHB12 y AtHB7 regulan finamente el desarrollo de arabidopsis frente al estrés. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología-RedBio. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 18-22 Noviembre de 2013.
- Capella M, **Ré DA**, Ribone P, Arce AL, Cabello JV, Giacomelli JI, Mora C, Moreno JE, Chan RL. Secrets of the plant family of transcription factors homeodomain-leucine zipper I. Reunión Anual (SAIB), Buenos Aires, Argentina, 6 y 7 Noviembre de 2013.

- **Ré DA**, Bonaventure G, Chan RL. Los factores de transcripción AtHB7 y AtHB12, pertenecientes a la familia HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*, se regulan entre sí para controlar la respuesta de las plantas al estrés abiótico y a ABA. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 11-20 Septiembre de 2012.
- **Ré DA**, Bonaventure G, Chan RL. Functional characterization of the Arabidopsis AtHB12, an HD-Zip type I transcription factor. XLVI Reunión Anual (SAIB), Puerto Madryn, Chubut, Argentina, 30 de Noviembre – 3 de Diciembre, 2010.
- Arce AL, Cabello JV, **Ré DA**, Raineri J, Capella M, Chan RL. Mecanismos moleculares puestos en juego en la adaptación de las plantas al medioambiente. El caso particular de los factores de transcripción de tipo hd-zip. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, La Plata, Buenos Aires, Argentina, 26-29 de Septiembre, 2010.
- Dezar CA, Giacomelli JI, **Ré DA**, Manavella PA, Alves-Ferreira M, Baldwin I, Bonaventure G, and Chan RL. HAHB10 sunflower transcription factor is involved in phytohormone mediated response to biotic stress. XLV Reunión Anual (SAIB), Tucumán, Argentina, 10-13 de Noviembre, 2009.
- **Ré DA**. The role of HD-Zip transcription factors in the interaction of plant development and biotic responses. Ringberg Symposium MPI-CE, Tegernsee, Alemania, 8-11 Noviembre de 2009.
- Dezar CA, Giacomelli JI, Bonaventure G, Manavella PA, **Ré DA**, Alves-Ferreira M, Baldwin I and Chan RL ¿Crosstalk between flowering and defense mediated by the sunflower transcription factor HAHB10? XLIV Reunión Anual (SAIB), Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 8-11 de Noviembre, 2008.
- **Ré DA**, Dezar CA, Manavella PA y Chan RL ¿El factor de transcripción hahb10 regula las respuestas mediadas por ácido salicílico y ácido jasmónico en girasol? XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Rosario, Santa Fe, Argentina, 21-24 de Septiembre, 2008.

## ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico (del inglés, <i>Abscisic Acid</i> )
ABRE	elemento de respuesta a ABA (del inglés, <i>Abscisic Acid Responsive Element</i> )
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AHA	aminoácidos <u>A</u> romáticos- <u>H</u> idrofóbicos grandes- <u>A</u> cídicos
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BA	acetona de bencilo (del inglés, <i>Bencil Acetone</i> )
BAE	brotos florales abiertos y elongados
BF	brotos florales
BFA	brotos florales abiertos
BFC	brotos florales cerrados
CaMV35S o 35S	promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor
col.	colaboradores
CTR	región carboxilo-terminal
dNTP	desoxinucleótidos-trifosfato
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
EH	estrés hídrico
EHL	estrés hídrico leve
ES	estrés salino
EST	etiquetas de secuencias expresadas (del inglés, <i>Expressed Sequence Tags</i> )
ET	etileno
EV	vector vacío (del inglés, <i>Empty Vector</i> )
FAC	conjugados de ácidos grasos y aminoácidos (del inglés <i>Fatty acid-Aminoacid Conjugates</i> )
FCA	flores con corola abierta
FT(s)	factor(es) de transcripción
GC-MS	cromatografía gaseosa-espectrometría de masas
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GO	ontología génica
GUS	$\beta$ -GLUCURONIDASA
g	fuerza centrífuga por aceleración de gravedad
HD	homeodominio
HD-Zip	homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas (del inglés, <i>Homeodomain-Leucine Zipper</i> )
hs	horas
IRGA	analizador infrarojo de gases (del inglés, <i>Infrared Gas Analyser</i> )
JA	ácido jasmónico (del inglés, <i>Jasmonic Acid</i> )
JA-Ile	ácido jasmónico-isoleucina
LB	medio de cultivo de Luria-Bertani
min	minuto(s)
MS	medio de cultivo formulado por Murashige y Skoog
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
qRT-PCR	transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real (del inglés, <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> )
rpm	revoluciones por minuto

SA	ácido salicílico (del inglés, <i><u>S</u>alicylic <u>A</u>cid</i> )
VIGS	silenciamiento génico mediado por virus (del inglés, <i><u>V</u>irus <u>I</u>nduced <u>G</u>ene <u>S</u>ilencing</i> )
VOC(s)	compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) (del inglés, <i><u>V</u>olatile <u>O</u>rganic <u>C</u>ompounds</i> )
v/v	volumen en volumen
X-Gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido

**Nomenclatura de las plantas transgénicas y mutantes obtenidas y caracterizadas en este trabajo**

- WT:** plantas salvajes, de *Nicotiana attenuata* en el Capítulo 1 y de *Arabidopsis thaliana* en el Capítulo 2.
- EV:** plantas de *Nicotiana attenuata* transformadas mediante VIGS con un vector vacío, utilizadas como control.
- irHD20:** plantas de *Nicotiana attenuata* silenciadas en *NaHD20* mediante VIGS.
- irHD20-1** e **irHD20-2:** líneas estables homocigotas de plantas de *Nicotiana attenuata* silenciadas en *NaHD20*.
- AT12:** plantas estables homocigotas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *35S::AtHB12*.
- AT7:** plantas estables homocigotas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *35S::AtHB7*.
- athb12:** plantas homocigotas de *Arabidopsis* mutantes insercionales en el gen *AtHB12*.
- athb7:** plantas homocigotas de *Arabidopsis* mutantes insercionales en el gen *AtHB7*.
- at12/7:** plantas homocigotas de *Arabidopsis* silenciadas dobles, en *AtHB12* y *AtHB7*, obtenidas por transformación con un mircoARN artificial.

## **RESUMEN**

*Lo importante es no dejar de cuestionarnos,  
la curiosidad tiene su propia razón para existir  
(Albert Einstein)*

**RESUMEN**

Las plantas son organismos que se enfrentan constantemente a cambios del ambiente en el que se encuentran. Como no pueden trasladarse en busca de nutrientes o de mejores condiciones, deben adaptarse continuamente a estas modificaciones. Para desarrollarse correctamente necesitan de un fino control de sus moléculas efectoras y de sus respuestas a señales externas e internas. En este proceso de control intervienen fundamentalmente los factores de transcripción (FTs), proteínas que reconocen secuencias específicas de ADN y regulan la expresión génica de sus blancos. Éstas modifican el transcriptoma vegetal, generando respuestas rápidas a los cambios externos. La familia de FTs HD-Zip es exclusiva de plantas, por lo que resulta particularmente interesante su estudio en el contexto del desarrollo vegetal y de las respuestas moleculares a las condiciones externas. Esta familia se divide en cuatro subfamilias: Los miembros de la subfamilia I han sido relacionados con los procesos moleculares vinculados al estrés.

En este trabajo de Tesis nos planteamos caracterizar funcionalmente tres FTs de la subfamilia HD-Zip I. Dos de éstos, de *Arabidopsis thaliana*, de los cuales se tenía información sobre su regulación por condiciones de estrés hídrico, *AtHB12* y *AtHB7*. El tercero, *NaHD20*, era hasta el momento de este estudio un miembro desconocido de *Nicotiana attenuata* que comparte una alta similitud de secuencia con los dos primeros.

En primer lugar se hicieron estudios para determinar los patrones de expresión de los tres genes elegidos. Dado que una de las estrategias experimentales más apropiada para hacer estudios funcionales consiste en obtener plantas en las cuales el gen en cuestión esté silenciado o sobreexpresado, se obtuvieron distintos genotipos de plantas transgénicas y mutantes, a saber: plantas de *N. attenuata* silenciadas en el gen *NaHD20*, plantas mutantes de *Arabidopsis* en los genes *AtHB12*, *AtHB7* y silenciadas para ambos genes, y también plantas que sobreexpresan ectópicamente *AtHB12* o *AtHB7*. Éstas fueron utilizadas en estudios fenotípicos y moleculares que ayudaron a comprender la funcionalidad de los tres FTs.

La expresión de *NaHD20* se indujo por el tratamiento con las hormonas ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido abscísico (ABA) y por estrés hídrico. Este FT se expresa fuertemente en las flores, particularmente en la corola, de *N. attenuata*. Se realizaron ensayos fenotípicos de desarrollo de tallos y flores en condiciones normales y en condiciones de estrés hídrico. Esos estudios permitieron demostrar que *NaHD20* controla el aumento de los niveles de ABA de las hojas cuando las plantas se encuentran en condiciones de deshidratación y regula la producción y apertura de flores tanto en condiciones normales como de estrés hídrico severo.



NaHD20 también induce el desarrollo y la apertura de las flores, controlando los niveles de la hormona ABA. Durante la apertura de la corola, este FT regula positivamente la emisión del compuesto volátil floral, acetona de bencilo, responsable de atraer a los polinizadores de esta especie.

Respecto de *AtHB12* y *AtHB7*, observamos que su una expresión es dependiente del estadio de desarrollo de la planta. *AtHB12* se expresa especialmente en estadios tempranos, controlando el desarrollo foliar y radicular durante el estadio vegetativo. *AtHB7* aumenta su expresión cuando la planta pasa al estadio reproductivo, y allí en ese estadio induce el desarrollo foliar, la producción de clorofila y la fotosíntesis. Ambos FTs se regulan entre sí, afectado la expresión de su parálogo.

Cuando las plantas deben enfrentar limitaciones en la disponibilidad de agua, estos FTs se inducen fuertemente aunque actúan cada uno de manera diferente. *AtHB12* regula el consumo mientras que *AtHB7* controla la pérdida de agua a través del cierre estomático. *AtHB12* tiene un efecto positivo en la producción de semillas en situación de estrés hídrico leve. Ninguno de los dos FTs es indispensable para la supervivencia a las condiciones de estrés hídrico pero la expresión de al menos uno de ellos es necesaria para la correcta producción final de semillas.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis nos permiten concluir que NaHD20, *AtHB12* y *AtHB7* participan en mecanismos relacionados al estrés hídrico y a la hormona ABA. Las tres proteínas regulan mecanismos del desarrollo vegetal ligados a estrés de tipo abiótico. NaHD20 participa particularmente en los mecanismos de desarrollo floral y respuestas a estrés hídrico. *AtHB12* tiene funciones en raíces y hojas en estadios tempranos, y en la producción de semillas en plantas sometidas a estrés. *AtHB7* tiene funciones en hojas de plantas de estadios tardíos. En cuanto a *AtHB12* y *AtHB7*, considerados duplicaciones génicas, se puede concluir que ambos afectan la expresión de su parálogo, coordinando finamente la regulación de los procesos en los que están involucrados; ambos intervienen en procesos muy similares y cercanos pero cada uno en un momento distinto del desarrollo, no superponiéndose en sus funciones.

## **ABSTRACT**

The important thing is not to stop questioning;  
curiosity has its own reason for existing  
(Albert Einstein)

**ABSTRACT**

Plants are sessile organisms continuously dealing with environmental changes. For proper development, plants need to finely control the responses to internal and external changes. Transcription factors (TFs) are proteins able to bind DNA regulating the expression of numerous target genes. They can rapidly modify the transcriptome of plants in response to stressful environmental conditions. Plant TFs are divided in families and subfamilies according to structural and functional features. Among these families, the HD-Zip I is unique to plants, turning to be of great interest in the study of plant development and plant responses. This family is divided in four subfamilies, among them, members of subfamily I have been associated to stress responses.

In this work we planned to characterize three TFs from the HD-Zip I family. The *Arabidopsis thaliana* AtHB12 and AtHB7 are paralogues, known to be involved in water stress responses. The third one, NaHD20 from *Nicotiana attenuata* was unknown so far and presents high sequence similarity with the first two.

Aiming to contribute to the understanding of HD-Zip I functionality and mechanisms in which these TFs are involved, expression patterns of these genes were determined and transgenic plants were obtained as follows: *N. attenuata* silenced in *NaHD20*, *Arabidopsis* single mutants and double silenced plants for *AtHB7* and *AtHB12* as well as plants ectopically expressing these genes. The phenotype of these plants was deeply analysed in different developmental stages as well as under stressing conditions.

*NaHD20* expression was induced by fitohormones like jasmonic acid, salicylic acid and abscisic acid (ABA), and by water stress. This TF was highly expressed in flowers, especially at the corolla. Shoot and flower development during control and water stress conditions of growth were analysed. NaHD20 controls ABA levels in leaves during water stress and also regulates flowers production and opening in both control and stress conditions. NaHD20 also regulates flowers development and opening, by controlling ABA levels in corollas. During the opening of the corolla, NaHD20 regulates the release of the volatile compound, bencyl acetone, responsible for pollinators attraction.

AtHB7 and AtHB12 present 68 % amino acid identity. The expression patterns of these genes were analysed throughout development and under different water availability conditions. *AtHB12* expression was high during early developmental stages whereas *AtHB7* expression was low at these stages but increased at later stages, during flowering and senescence. AtHB12

controls root and leaf development in seedlings under standard growth conditions and water uptake and seed production in water-stressed plants. On the other hand, AtHB7 controls leaf development, stomatal conductance, chlorophyll levels and photosynthesis only in mature plants as well as senescence processes in standard growth conditions. Importantly, the results of expression analyses in mutant and transgenic plants indicated that AtHB7 and AtHB12 are part of a feedback loop that regulates each other expression either positively or negatively, depending on the developmental stage of the plant and environmental conditions, probably involving other factors. The results suggested that *AtHB7* and *AtHB12* diverged along the evolution to fine tune processes associated with development and responses to water stress.

We can conclude that these three TFs participate in mechanisms involved in water stress and ABA responses. NaHD20 acts primarily in flowers development, AtHB12 in roots and leaves growth in early developmental stages while AtHB7 in advanced developmental stages. All these genes take part of water stress responses. Regarding AtHB12 and AtHB7, considered as gene duplications, a feed-back loop allows them to regulate each other expression finely coordinating the functions in which they are involved.

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

*El universo está lleno de cosas mágicas que esperan pacientemente  
que se agudice nuestra inteligencia  
(Eden Phillpotts)*

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En nuestro planeta se conoce la existencia de más de 250.000 especies del reino vegetal. Las plantas son los organismos pluricelulares complejos más antiguos del planeta tierra. Su importancia en nuestro ecosistema radica en la capacidad única de transformar la energía lumínica del sol en energía química, utilizable por el resto de los organismos (Taiz y Zeiger, 2002).

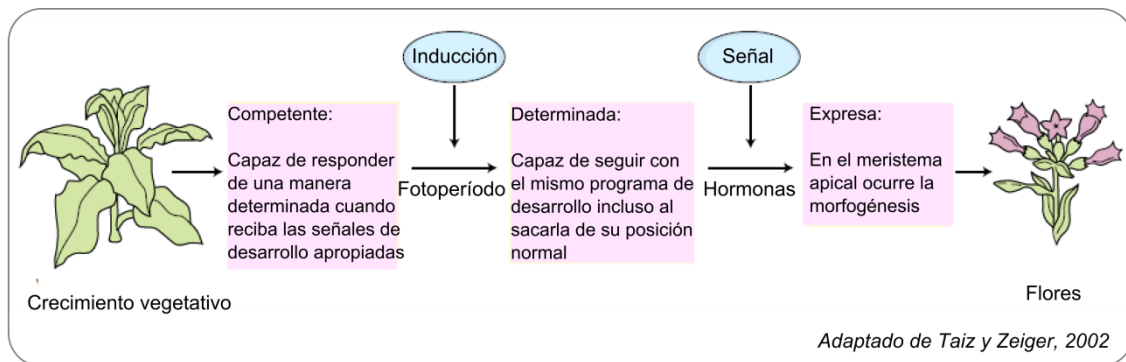
### 1- El crecimiento y desarrollo vegetal

Una de las principales metas de los biólogos que estudian el desarrollo de los seres vivos es comprender cómo se regulan los eventos que llevan al crecimiento y la diferenciación celular a nivel bioquímico, celular y molecular. Tal entendimiento también incluye develar los programas genéticos espaciales y temporales (Taiz y Zeiger, 2002). El crecimiento de las plantas se da por incrementos de la masa seca, del volumen, y del largo o área, lo cual resulta de la división, expansión y diferenciación de las células. Estos incrementos no siempre coinciden temporalmente; por ejemplo, las hojas y raíces se expanden espacialmente durante la noche cuando toda la planta sufre una disminución en su peso seco por el consumo de carbohidratos para la respiración. Hablar de crecimiento es complejo; por ejemplo, la división celular usualmente inicia el crecimiento, pero es insuficiente para causar crecimiento *per se* ya que para esto las células además de dividirse deben alargarse e incorporar masa en su citoplasma y paredes celulares para aumentar su volumen (Lambers y col., 2008).

El crecimiento de una planta puede analizarse de diferentes maneras, dependiendo el factor de crecimiento que se elija como parámetro (Lambers y col., 1989). Existen especies que crecen más lentamente que otras; habitualmente las plantas de crecimiento lento utilizan un gran porcentaje del carbono asimilado en la respiración, principalmente en las raíces mientras que las plantas de crecimiento rápido utilizan la mayoría del carbono asimilado en nuevos crecimientos, principalmente en el crecimiento de hojas nuevas. En estas últimas, los niveles de fotosíntesis por área foliar son mayores que en las plantas de crecimiento lento (Evans, 1989).

El desarrollo de una planta comienza con la germinación. En esta etapa, se interrumpe la dormancia de las semillas, éstas absorben agua, comienza a crecer el embrión y la radícula sale de la cápsula. Luego de la germinación las plántulas crecen rápidamente pero también son muy vulnerables a los cambios ambientales. Cuando hay una alta densidad de plántulas en crecimiento, y una elevada competencia por la luz y el suelo, uno o dos días de ventaja en la

germinación pueden ser cruciales (Harper, 1977). Luego, las plántulas pasan a un estadio juvenil o vegetativo durante el cual obtienen recursos de defensa y de almacenamiento. Después de determinados días de la germinación, ocurre un cambio drástico hacia el estadio reproductivo (Lambers y col., 2008). En las plantas de *Arabidopsis thaliana*, crecidas en condiciones de día largo (16 hs de luz) a 20-24 °C, el pasaje al estadio reproductivo ocurre entre los 18 y 23 días post-germinación aproximadamente. En este proceso se da la elongación del tallo junto con la aparición del primer botón floral en el extremo del tallo en crecimiento (Figura 1).



**Figura I. 1. Modelo simplificado de floración.** Para iniciar el desarrollo floral las células del meristema deben volverse competentes. Un meristema vegetativo competente es aquel que puede responder a un estímulo de floración (inducción) y pasa a ser floralmente determinado (comprometido a producir flores). Para que el estado determinado se exprese, usualmente se requiere de una señal adicional (Taiz y Zeiger, 2002).

Los pasajes de un estadio de desarrollo a otro están regulados fuertemente por fitohormonas y señales internas, así como también por señales externas del ambiente en el que se encuentran las plantas. Estas señales externas pueden ser leves modificaciones del ambiente o cambios extremos que comprometen la continuidad de la vida de la planta. Estos cambios son captados por las células vegetales; las cuales van a activar y reprimir cascadas de señalización que llevarán al desarrollo óptimo de las plantas.

## 2- El estrés

El estrés es definido como un factor externo que tiene una influencia negativa sobre el organismo. Produce una reacción fisiológica en la que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante o de demanda incrementada. La respuesta al estrés es natural y necesaria para la supervivencia (Taiz y Zeiger, 2002).

Para las plantas, los factores que producen estrés suelen dividirse en dos grandes grupos, los de tipo biótico y los de tipo abiótico. El estrés biótico es producido por organismos o microorganismos que atacan o infectan a la planta, ya sean insectos, hongos o bacterias patógenas. El estrés abiótico involucra todas las condiciones ambientales desfavorables, cambios de temperatura, disponibilidad de agua, de sales o de luz.

El estrés provoca una alteración en el metabolismo celular, afectando fuertemente el desarrollo y desempeño de las plantas. En la agricultura esto limita la producción y causa grandes pérdidas en la cantidad y calidad de las cosechas. Desde el punto de vista ecológico, el estrés abiótico también puede causar fuertes desequilibrios, ya que la pérdida de una especie vegetal desencadena grandes cambios en la supervivencia de los otros organismos del ecosistema.

En la naturaleza, las distintas condiciones estresantes pueden darse en un mismo momento. Las plantas disparan vías de respuestas específicas para hacer frente al estrés; éstas vías en ocasiones se cruzan o interaccionan, resultando en respuestas sinérgicas o antagónicas. Las vías de respuesta a varios factores abióticos como por ejemplo frío, sequía y salinidad, están conectadas, existiendo un cruce e interacción sinérgica de genes y moléculas efectoras (Zhu, 2001; Mittler y Blumwald, 2010). En cambio, con respecto a la relación estrés abiótico/biótico, se considera que las vías de respuesta son generalmente antagónicas (Fujita y col., 2006). Un ejemplo de efectos negativos de interacción de respuestas es el caso en el que un aumento sustancial de la temperatura puede afectar la resistencia a la infección por bacterias, virus y hongos (Sharma y col., 2007). Sin embargo, existen ejemplos de interacciones positivas entre estrés biótico y abiótico. Un ejemplo es la sequía y la infección por nematodos en arroz; ambas condiciones tienen efectos negativos en el crecimiento de la planta de arroz, pero si ocurren simultáneamente los efectos son menores. Esto puede explicarse por el hecho de que las plantas infectadas por nematodos utilizan menos agua, reduciéndose el efecto negativo de la sequía (Atkinson y Urwin, 2012).

El concepto de “estrés” está fuertemente asociado con el de “tolerancia al estrés”, el cual es el estado de la planta para poder enfrentar las condiciones ambientales desfavorables (Taiz y Zaiger, 2002). Como mencionamos en el caso del estrés biótico, para el estrés abiótico existen numerosos mecanismos de señalización que permiten que la planta detecte cambios externos, como por ejemplo la falta de agua. Frente a esta condición, mediante moléculas de señalización y cambios transcripcionales, la planta modifica y transporta hormonas, metabolitos y nutrientes, modificando el crecimiento de raíces y hojas en un intento por tolerar ese estrés. No es tanto la percepción del estrés como si lo es la variación en las



respuestas de las plantas lo que les da plasticidad o amplitud ecológica y mayor competencia respecto de las plantas con menor capacidad de respuesta (Aphalo y Ballaré, 1995).

### **3- Las hormonas vegetales**

Las hormonas vegetales son moléculas encargadas de transmitir señales de una célula a otra, de un tejido a otro e incluso de un organismo a otro. Por definición las hormonas tienen la propiedad de ser mensajeros químicos, mediante los cuales la actividad de un órgano se coordina con la de otro (Went y Thimann, 1937). Existen nueve hormonas vegetales descritas hasta el momento (Santner y col., 2009; Westfall y col., 2013). En el momento en el que los receptores celulares específicos detectan la presencia de estas hormonas, se activan las cascadas de señalización que llevan a la activación y represión de determinados genes que dan respuesta al estímulo inicial.

Hay hormonas que actúan principalmente en el desarrollo y otras en respuestas a distintos tipos de estrés. Los niveles de cada hormona dependen del órgano y estadio de desarrollo de la planta y actúan como determinantes cruciales del crecimiento y de la expansión de cada órgano. Se sabe que las auxinas, las giberelinas y los brasinoesteroides promueven la elongación celular en el tallo (Santner y col., 2009) y en el caso de los brasinoesteroides también la del tubo polínico (Szumlanski y Nielsen, 2009). Las estringolactonas se encuentran principalmente en las raíces, vinculadas a la interacción con los hongos y las bacterias del suelo; también se las encuentran en el tejido aéreo, donde inhiben la ramificación y la elongación de las ramificaciones junto con las auxinas (Umehara y col., 2008; Brewer y col., 2009). El etileno (ET) participa en la maduración de los frutos y las flores y también en la senescencia (Burg y Burg, 1962; Azad y col., 2008); en flores insensibles al ET se cree que el ácido abscísico (ABA) es la hormona que induce la senescencia (Tripathi y Tuteja, 2007).

Otras hormonas se conocen principalmente por mediar la respuesta de las plantas al estrés biótico, como el ácido jasmónico (JA) que junto con el ET son fundamentales para la defensa al ataque de los insectos (Penninckx y col., 1998; Lorenzo y col., 2003; Zhu y col., 2011). El ácido salicílico (SA) es esencial en la respuesta al ataque de los organismos patógenos (Raskin, 1992). A su vez, el JA es fundamental para el desarrollo, la maduración y la dehiscencia del polen (Feys y col., 1994; McConn y Browse, 1996; Sanders y col., 2000); y el SA induce tanto la floración como la senescencia (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011).

Todas estas hormonas cumplen diferentes funciones en el desarrollo, dependiendo de los diferentes estadios vegetales y de las condiciones de crecimiento. A su vez, dependiendo del

tejido, cada hormona tiene efectos diferentes. Por ejemplo, refiriéndonos nuevamente al ABA, éste juega un papel fundamental en la abscisión de hojas y frutos, y en la maduración y germinación de semillas (Nakashima y col., 2009). El ABA también participa en las respuestas al estrés generado por la salinidad, la sequía y/o el frío, y a su vez también actúa como regulador del desarrollo (McCourt y Creelman, 2008).

#### 4- Los compuestos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (VOC, del inglés *Volatile Organic Compounds*) son sustancias químicas del metabolismo secundario vegetal, sintetizadas a partir de ácidos grasos, en los distintos órganos y en determinadas condiciones (Matsui, 2006). Por su naturaleza química, los VOCs son liberados de las células vegetales al ambiente. Estas moléculas volátiles participan en múltiples funciones de interacción entre plantas, entre plantas y microorganismos y entre plantas e insectos.

Los VOCs de las hojas (GLV, del inglés *Green Leaf Volatiles*) forman parte de las respuestas indirectas de defensa frente al ataque de herbívoros (Turlings y col., 1995; Baldwin, 2001), de patógenos (Croft y col., 1993; Shiojiri y col., 2006) y al estrés abiótico (Gouinguéné y Turlings, 2002; Brill y col., 2011). Los VOCs, cuya biosíntesis se desencadena por diferentes condiciones, son particulares para cada condición que los induce y cumplen funciones específicas.

Las secreciones orales de los herbívoros, que ingresan en las heridas de las plantas cuando estos organismos las atacan, proporcionan información a la planta sobre qué organismo la está atacando. De esta manera, esta planta puede activar mecanismos de defensa particulares, incluyendo la emisión de VOCs específicos (Allmann y Baldwin, 2010). La composición del grupo de VOCs emitidos varía según la especie de planta y de herbívoro que la ataca, también depende de las condiciones abióticas del entorno y del tiempo que transcurre. Los terpenoides son compuestos liberados por toda la planta luego de varias horas de iniciado el ataque por herbívoros, a veces incluso un día después. Debido a esta demora, y a que son liberados sistémicamente por toda la planta, estos compuestos tendrían la función de atraer insectos predadores que se encuentren a largas distancias. En cambio, otros compuestos como aldehídos de seis carbonos, alcoholes y ésteres, se liberan inmediatamente luego del ataque a través de la herida generada por el herbívoro, originando una respuesta rápida sobre el lugar exacto del ataque (Allmann y Baldwin, 2010).

Recientemente se han asociado a los compuestos volátiles isoterpenoides con ciertas respuestas a estrés abiótico, particularmente a estrés oxidativo (Vickers y col., 2009). La capacidad antioxidante de estos volátiles ayuda a las plantas en situaciones en las que las

especies reactivas de oxígeno aumentan a causa de estrés de tipo abiótico. En la Figura 2 se representa la emisión de VOCs desde las hojas, originada por diversos factores bióticos y abióticos (Scala y col., 2013).

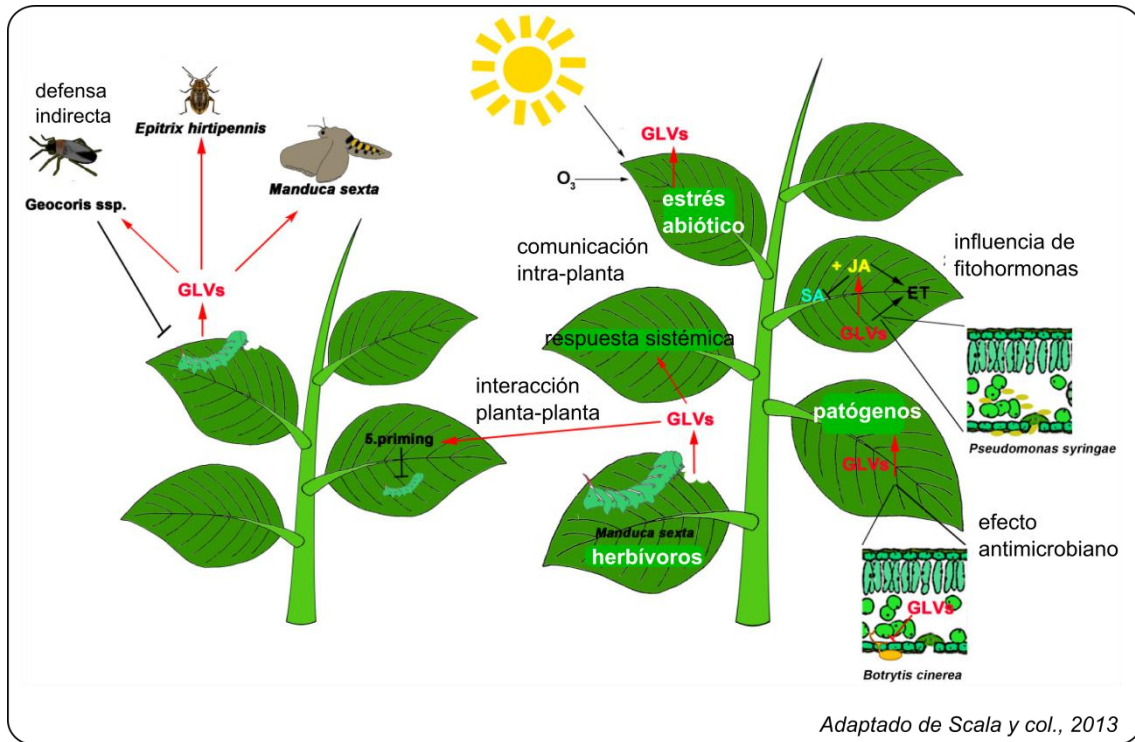


Figura 1. 2.Representación de la emisión de compuestos volátiles de las hojas (GLVs, del inglés *Gree Leaf Volatile*). Figura adaptada de la publicada por Scala y col., 2013.

## 5- Las flores

En angiospermas, la floración es un proceso clave del desarrollo (Taiz y Zeiger, 2002). Todas las fitohormonas participan en cierta medida en el pasaje de las plantas al estadio de floración (Davis 2009). Este pasaje, llamado en inglés “*bolting*”, es el momento en que aparece el botón floral, es decir cuando las plantas pasan del estadio vegetativo al reproductivo. En este momento ocurren grandes cambios en el transcriptoma del meristema apical, y comienza la elongación del tallo principal, con el primer brote floral en el extremo apical (Domagalska y col., 2010). Se conocen múltiples genes de identidad de los órganos florales que son regulados finamente durante el proceso de floración (O’Maoileidigh y col., 2013).

La transición del estadio vegetativo al reproductivo es controlada por factores ambientales como el fotoperíodo, la temperatura y la disponibilidad de agua. La sequía muchas veces retrasa el desarrollo (Trewavas y Jones, 1991); este retraso disminuye la asimilación y traslocación de carbohidratos y nutrientes, la biosíntesis de proteínas, y al mismo tiempo aumenta la proteólisis (Fox, 1990).

Este pasaje al estadio reproductivo también es controlado claramente por factores endógenos como los niveles hormonales de la planta. Las giberelinas inducen la elongación del tallo y la floración a través de la regulación de los genes *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *LEAFY (LFY)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). El SA induce la floración (Jin y col., 2008), y las auxinas, presentes en el meristema apical también participan en este proceso (Vanneste y Friml, 2009). El JA es fundamental para el correcto desarrollo de estambres y estilos. Se ha demostrado que las mutantes *coi1 (CORONATIVE INSENSITIVE 1)* de *Arabidopsis* y *Nicotiana attenuata*, que son insensibles al JA, presentan defectos en la maduración del polen, la dehiscencia de anteras y la elongación de los filamentos (Song y col., 2011). En plantas de tomate, por ejemplo, las mutantes *coi1* son estériles a nivel del desarrollo ovárico (Li y col., 2004). Respecto del efecto del ABA sobre los procesos relacionados a la reproducción, la información disponible es escasa; hay estudios que indican que esta hormona retrasaría la floración y otros estudios muestran que una vez iniciada la floración el ABA acelera el proceso e induce la senescencia (Trewavas y Jones, 1991). Un ejemplo es en *Arabidopsis*, donde ABI5 media el efecto inhibitorio del ABA sobre la transición floral (Wang y col., 2013). En *Iris hollandica*, el ABA junto con el JA producen un leve efecto negativo en la apertura de los capullos florales (van Doorn y col., 2013). Una vez desarrollada la flor, en *Lilium spp.*, la senescencia de ésta es inducida por un aumento de ABA endógeno y también por la aplicación de ABA exógeno (Arrom y Munné-Bosch, 2012).

La flor es el órgano responsable de la proliferación de las 250.000 angiospermas que se conocen en el mundo. Particularmente para las flores de *N. attenuata*, se sabe que durante el crecimiento de la flor y elongación de la corola, los niveles de JA disminuyen (Oh y col., 2013). Al igual que lo que ocurre en otras especies, las flores de *N. attenuata* en el momento de ser polinizadas presentan un aumento en la producción de ET (van Doorn y Woltering, 2008). Muchos de los cambios en las flores se dan como consecuencia de la polinización; como la senescencia y la abscisión de los pétalos y las anteras, o la maduración de los ovarios. En especies como *Petunia spp.* y *Nicotiana spp.*, el ET producido tras la polinización es traslocado desde el estigma hacia los pétalos por el estilo y el ovario, induciendo a su vez en los pétalos los genes que codifican enzimas de la biosíntesis de ET (Kaushal Tripathi y Tuteja, 2007).

Las flores de *N. attenuata* comparten características fisiológicas con muchas otras especies como las petunias y las dalias pertenecientes a la familia *Solanaceae*, pero aún se sabe poco respecto a la regulación de este proceso a nivel molecular. El desarrollo y el número de flores en petunia están afectados por el gen *FZY*, que codifica una enzima de la vía de los flavonoides (Tobeña-Santamaria y col., 2002). Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales derivados del metabolismo de la fenilalanina y el acetato y cumplen diversas funciones en las

plantas (Burbulis y Winkel-Shirley 1999). Los flavonoides son fuertes antioxidantes; algunas de sus funciones son de protección ante la alta intensidad lumínica, las bajas temperaturas o la falta de nutrientes (Dixon y Paiva, 1995; Chalker-Scott, 1999). También participan en las situaciones de ataque por patógenos o herbívoros (Schaefer y Rolshausen, 2006), y en las flores y los frutos dan el color y el aroma, funcionando como atrayentes de polinizadores y como distribuidores de semillas (Gould y Lister, 2006).

## 6- Los compuestos volátiles de las flores

Cada especie angiosperma tiene un conjunto específico de moléculas, provenientes de las vías de flavonoides y fenilpropanoides, que le dan el color y el aroma a sus flores (Raguso y col., 2003). En las flores, los compuestos volátiles cumplen una función determinante para la polinización, ya que atraen polinizadores a larga distancia, principalmente mariposas y polillas, que van hacia las flores durante la noche (Dudareva y Pichersky, 2000; Raguso, 2004). Esta interacción es fundamental para la reproducción de las plantas. Los aromas florales son importantes en la determinación de la producción de las semillas y los frutos en plantas no-auto-polinizadas y también en el cruzamiento entre plantas. Por lo tanto, la producción y liberación de estas moléculas volátiles tiene mucha importancia desde los puntos de vista ecológico y agronómico. *N. attenuata* en su ambiente natural produce más del 30 % de sus semillas por polinización cruzada oportunista, gracias a los polinizadores (Sime y Baldwin, 2003). Con el fin principal de atraer estos polinizadores específicos, las flores de esta especie emiten compuestos volátiles determinados. Los mecanismos moleculares de este proceso son objetos de estudio hace varios años; sin embargo aún se cuenta con pocos datos respecto de las regulaciones y mecanismos moleculares, que recién están comenzando a ser comprendidos (Verdonk y col., 2005; Spitzer-Rimon y col., 2010).

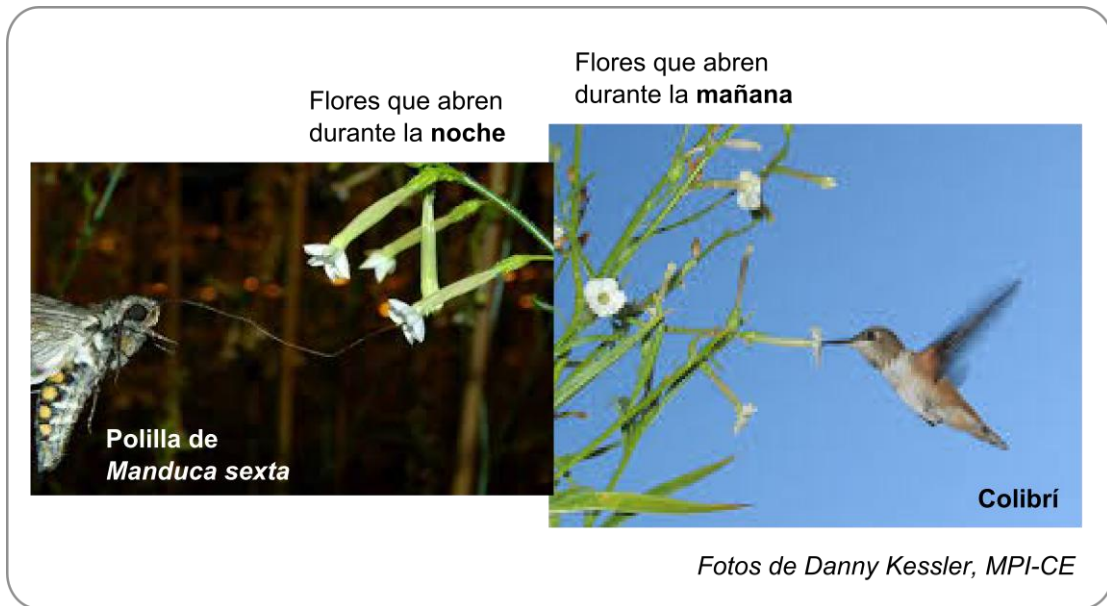
Los aromas florales son mezclas complejas de pequeñas moléculas volátiles, siendo las más relevantes los monoterpenoides, sesquiterpenoides, fenilpropanoides, bencenoides y derivados de compuestos aromáticos (Dudareva y Pichersky, 2000). Los compuestos volátiles florales pueden ser emitidos desde diferentes partes de las flores o desde alguna parte específica (Pichersky y Dudareva, 2007). La expresión de genes que codifican enzimas de la biosíntesis de estos compuestos está regulada espacial y temporalmente durante el desarrollo de la flor (Dudareva y col., 2003; Verdonk y col., 2005; Pichersky y Dudareva, 2007; Spitzer-Rimon y col., 2010). En la mayoría de los casos estudiados hasta el momento, la expresión de estos genes se correlaciona directamente con la emisión del compuesto volátil correspondiente, indicando que estas moléculas son sintetizadas *de novo* y no almacenadas

(Martin y Gerats, 1993; Dudareva y col., 2004; Schuurick y col., 2006). De estos informes se podría inferir que la producción y emisión de estos compuestos está regulada, al menos en forma parcial, a nivel transcripcional.

Se cree que la selección de los rasgos florales pudo darse como una evolución conjunta dependiente del polinizador y también de asociaciones con enemigos específicos (Raguso 2004). Los pétalos de *Petunia hybrida* emiten durante la noche, como componentes principales, benzaldehído, fenilacetaldehido y bencilbenzoato. Estos compuestos son sintetizados desde las vías de la fenilalanina (Verdonk y col., 2005; Boatright y col., 2011). Las flores de *Brunfelsia calycina* al abrirse emiten como compuesto benzoico principal el bencilalcohol (Bar-Akiva y col., 2010). Las flores de *N. attenuata* que abren durante la noche emiten como volátil principal la acetona de bencilo (4-fenil-2-butanona; BA, del inglés *Bencil Acetone*), un compuesto aromático fenólico de la vía de síntesis de los flavonoides (Euler y Baldwin 1996).

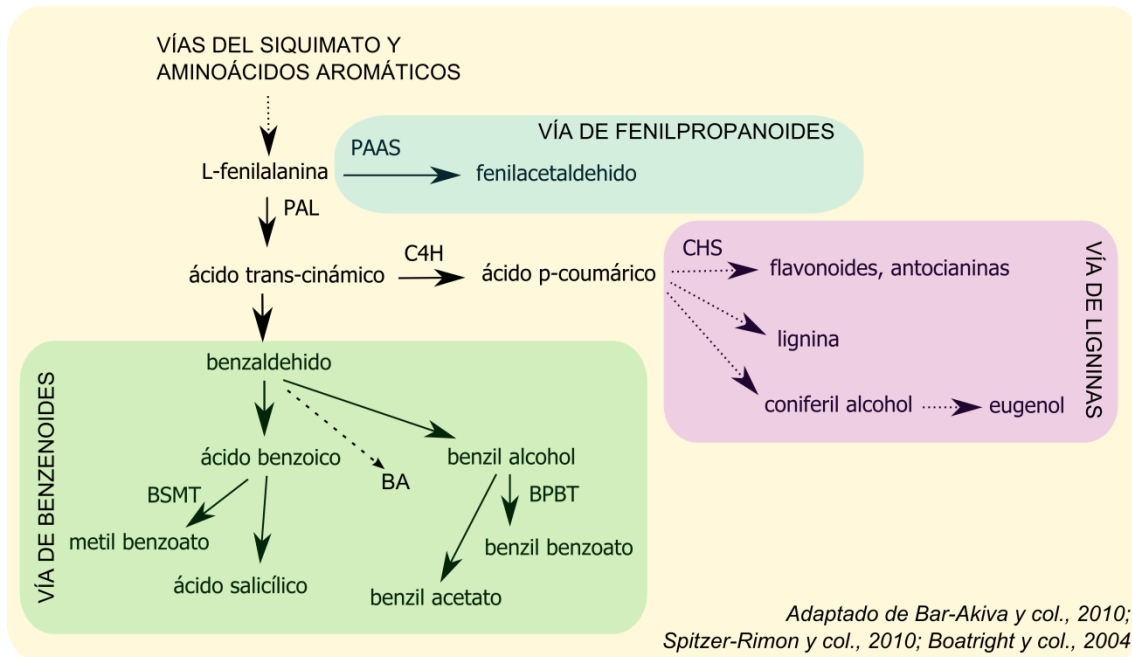
La producción de compuestos volátiles usualmente tiene un patrón rítmico, limitado normalmente a determinado período del día. En *Petunia axillaris*, la producción de volátiles florales tiene un ritmo nocturno, y se ha demostrado que es controlado tanto por el reloj circadiano como por las condiciones de luz (Underwood y col., 2005; Verdonk y col., 2005; Schuurink y col., 2006). En *N. attenuata* la BA es fundamental para la atracción de polinizadores nocturnos como la mariposa de *Manduca spp.* (Kessler y col., 2008). Este compuesto es sintetizado en las flores (labios de la corola) de *N. attenuata* y liberado lentamente en el momento en que la corola se abre, entre las 16 hs y las 12 hs de la noche, para atraer a los insectos polinizadores en el momento óptimo (Kessler y col., 2008).

Muchas especies controlan la manera en que son polinizadas no sólo por los VOCs emitidos desde las flores sino también por el momento del año y también del día en el que las flores están preparadas para ser polinizadas. Se ha demostrado que *N. attenuata*, entre otras especies, abre el 60-70 % de sus flores durante la noche y el 30-40 % restante durante la mañana siguiente. La emisión de BA, que atrae particularmente a *M. sexta*, es específica de las flores que abren por la noche (flores nocturnas o *night flowers*). Las flores que abren por la mañana no emiten BA, y no son polinizadas por *M. sexta* sino por colibríes (Kessler y col. 2008; Figura 3).



**Figura I. 3. Fotografías de flores de *N. attenuata* siendo polinizadas en su ambiente natural. Durante la noche (izquierda) y durante la mañana (derecha).**

Respecto de las vías de biosíntesis de volátiles florales, en *N. attenuata* la BA es emitida desde el borde de la corola de las flores nocturnas (Baldwin y col., 1997; Kessler y col., 2008). Las vías de biosíntesis de BA están poco claras aún; pero se cree que el esqueleto químico deriva de la vía del siquimato (Dudareva y Pichersky, 2000), ya que plantas de *N. attenuata* con expresión reducida de *CHALCONA SINTASA (CHAL1)* son deficientes en la emisión de BA (Kessler y col., 2008). Aún así, se conoce muy poco del mecanismo de síntesis de BA. En la Figura 4 se esquematiza la vía del siquimato y de los compuestos aromáticos y volátiles, pero hasta el momento no se ha logrado ubicar a BA en este esquema.



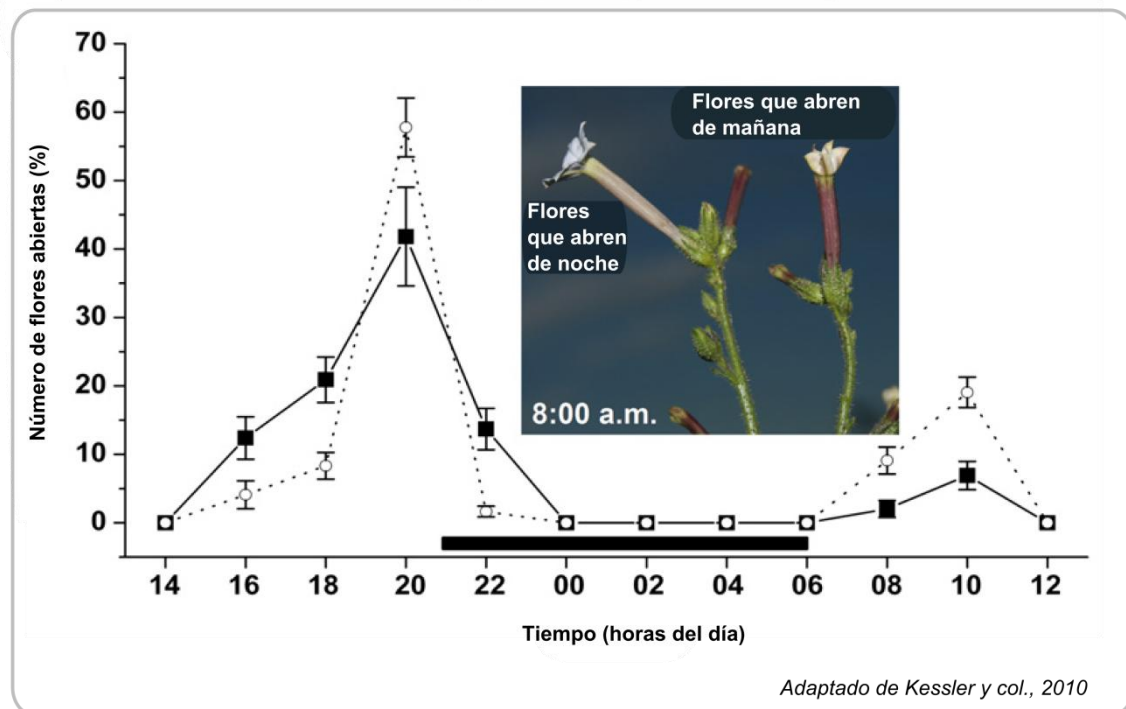
**Figura I. 4. Esquema de la información disponible sobre las vías de síntesis desde el siquimato y aminoácidos aromáticos a los benzenoides.** Se cree que la biosíntesis de la acetona de bencilo (BA) se encuentra dentro de estas vías.

Tanto las hormonas como los compuestos volátiles de hojas y flores tienen papeles fundamentales en diversos mecanismos fisiológicos vegetales. Este tipo de moléculas es esencial para el desarrollo normal y reproducción de las plantas, y también para la supervivencia a numerosos factores bióticos y abióticos estresantes que afectan a las plantas.

## 7- Relación entre las flores y el estrés

La floración, un evento crítico en el ciclo de vida de las plantas, es el camino fundamental hacia la polinización y perpetuación de la especie (Bernier, 1988). Podemos pensar que existe una vinculación entre el desarrollo floral, la polinización y los factores que generan estrés. Kessler y col. en su trabajo del 2010 demostraron que *N. attenuata* modifica el momento de apertura de sus flores para la polinización si la planta es atacada por insectos. Es decir, este estudio de la regulación del desarrollo o comportamiento frente al ataque de herbívoros muestra que las flores de *N. attenuata* que se abren durante la noche dejan de hacerlo si las plantas son atacadas por larvas de *Manduca spp.* y abren durante la mañana; la relación flores nocturnas/flores matinales cambia de 60/40 % a 40/60 % (Kessler y col., 2010). Como ya se mencionó, las flores matinales no emiten BA y atraen colibríes como polinizadores (Kessler y col., 2010). En la Figura 5 se muestra el cambio en el número de flores abiertas a lo largo de 24 horas, como consecuencia del ataque de larvas de *M. sexta*.





**Figura I. 5. Representación del porcentaje de flores abiertas respecto del total de flores listas para abrirse en un mismo día, a lo largo del día.** Línea de puntos, las plantas crecidas en condiciones normales; línea continua, las plantas que son atacadas por larvas de *M. sexta*. La foto fue tomada a las 8 de la mañana, mostrando flores que abrieron a la noche (totalmente abiertas) y flores que abren a la mañana (comenzando a abrir la corola). Figura adaptada de la publicada por Kessler y col. (2010).

Otro ejemplo que conecta a una situación de estrés con el comportamiento floral es el presentado por Diezel y col. (2011). Estos autores mostraron que cuando las plantas son atacadas por herbívoros entrando en la etapa de floración, los niveles de JA y ET producidos cambian. Es decir, los niveles hormonales de defensa desencadenados por herbívoros son menores a medida que avanza el desarrollo de la planta; una planta joven responde al ataque con mayores niveles de JA y ET que una planta adulta (Diezel y col., 2011). En el mismo sentido, cuando las plantas de *Arabidopsis* sufren ataque de herbívoros o daños en sus hojas, la producción de flores y semillas disminuye (Akiyama y Agren, 2012).

Como último ejemplo podemos nombrar el del estrés hídrico (Jorgensen y Arathi, 2013; Jin y col., 2013). La limitación de recursos, como el agua, puede tener un fuerte efecto sobre el desarrollo floral. Si la planta aún no hizo el *bolting* en el momento que siente la falta de agua, retrasa este evento, ya que para alargar el tallo y desarrollar flores necesita de mucha energía y recursos. Existen modificaciones epigenéticas asociadas tanto a la iniciación y desarrollo de flores como a las condiciones de estrés (Yaishi y col., 2011). Si la limitación de recursos ocurre cuando la planta se encuentra en estadio reproductivo, ésta va a orientar toda su energía

disponible para madurar las flores que ya desarrolló, sin aumentar el número, y a completar el desarrollo de los óvulos fertilizados para finalizar el ciclo y alcanzar el objetivo principal que es el de producir semillas maduras para así perpetuar la especie (Taiz y Zeiger, 2002).

El ABA es la principal hormona que actúa cuando la planta sufre estrés abiótico como el hídrico (McCourt y Creelman, 2008). Respecto de la floración, ya mencionamos que existen evidencias controvertidas, lo cual nos lleva a pensar que esta vía de regulación es compleja y depende de la especie evaluada. En *N. attenuata* no hay informes bibliográficos que aporten a la comprensión del desarrollo y maduración de las flores relacionados con la fitohormona ABA.

A pesar de los numerosos estudios que caracterizan la plasticidad fenotípica de las plantas, como en los ejemplos mencionados, muchos de los mecanismos moleculares que ocurren en estos procesos son desconocidos.

## 8- Las plantas y el agua

Mencionamos que entre las condiciones ambientales que afectan a las plantas están las de origen no biológico. Dentro de éstas encontramos al exceso de sales y al exceso o falta de agua. La limitación en la disponibilidad de agua limita la productividad y el estado o *fitness* de plantas individuales y de ecosistemas completos. Pero, ¿por qué es tan esencial el agua?

La importancia del agua para las plantas radica en el papel fundamental que cumple esta molécula en todos los procesos fisiológicos, y en las grandes cantidades que se la necesita. El agua conforma entre el 70 % y el 95 % de la biomasa vegetal, dependiendo del tejido. A nivel celular es el mayor medio de transporte de metabolitos, y a nivel del organismo transporta nutrientes, carbohidratos y fitohormonas necesarios para el desarrollo (Lambers y col., 2008).

Ya que las plantas no cuentan con un esqueleto como los animales, éstas se basan en la turgencia que les da el agua en su interior para mantener su estructura. Las plantas de gran tamaño además utilizan la lignina como soporte estructural. Cuando las hojas pierden la turgencia y se marchitan también disminuyen o detienen ciertos procesos, incluso la fotosíntesis. Los períodos prolongados de marchitez llevan a la muerte del tejido y también de la planta toda (Lambers y col., 2008).

Dado que el agua es el recurso esencial para las plantas, éstas han desarrollado un sistema complejo de captación y distribución, las raíces. Las plantas terrestres absorben una gran cantidad de agua a través de sus raíces, pero sólo el 1 % de ésta es retenida, el resto se pierde por transpiración. Esta ineficiencia en el uso del agua es un efecto colateral inevitable de la fotosíntesis (Lambers y col., 2008).

## **9- Los Estomas**

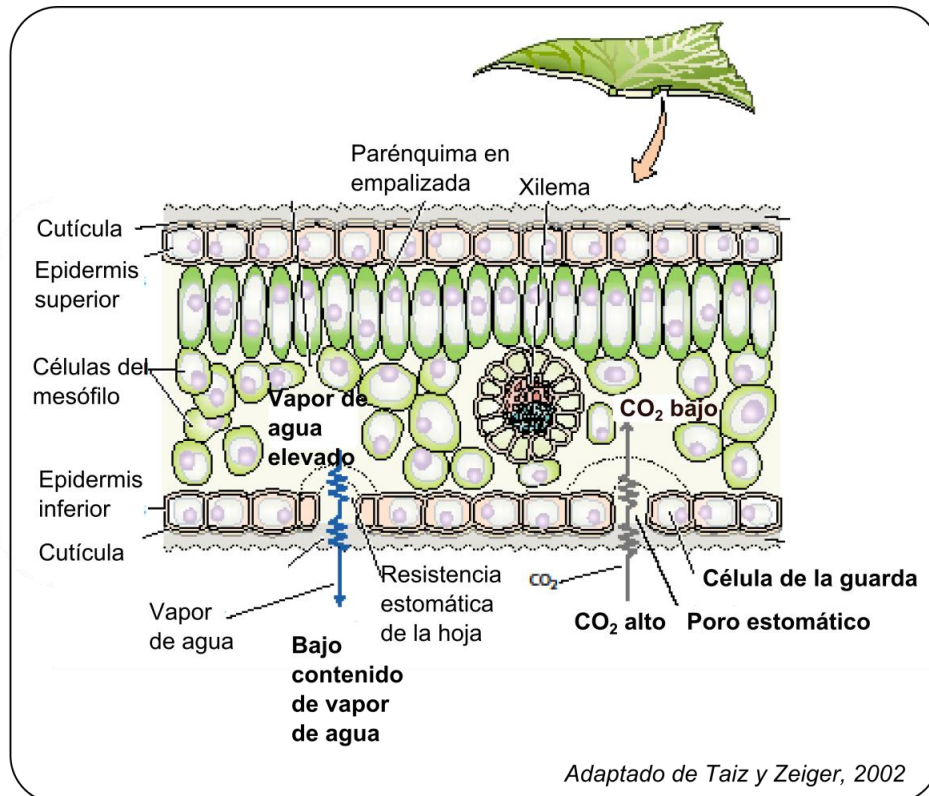
La transpiración, a pesar de disminuir la eficiencia de uso del agua, también tiene su aspecto positivo. Cuando el vapor de agua sale de las hojas, éstas se enfrían; sin la transpiración la temperatura foliar aumentaría rápidamente a valores letales. Además, la transpiración genera una presión hidrostática negativa que empuja al agua a través del xilema y facilita de esta forma el transporte de los nutrientes (Lambers y col., 2008). Así el agua llega a las hojas a través del xilema de los haces vasculares que se ramifican en finas venas a lo largo de las hojas para llegar a todas las células (Taiz y Zeiger, 2002).

Se estima que sólo el 5 % de la pérdida de agua de las hojas ocurre a través de la cutícula; ésta es una barrera física que protege a las hojas de la deshidratación. El mayor porcentaje de la pérdida de agua se da a través de la difusión de vapor de agua por los estomas (Taiz y Zeiger, 2002; Figura 6).

Los estomas vegetales son poros originados por el movimiento de las células de la guarda, que pueden modificar su tamaño o forma para abrir o cerrar el espacio que queda entre ellas (Taiz y Zeiger, 2002). Están presentes en la superficie de hojas y tallos. Los poros estomáticos son una vía de baja resistencia para la difusión de gases en la hoja (Figura 6). Los cambios en la resistencia estomática son fundamentales para la regulación de la pérdida de agua y la tasa de incorporación de CO<sub>2</sub>, necesaria para la fijación de éste por fotosíntesis.

Los factores ambientales como la intensidad lumínica, la temperatura, la humedad relativa y las concentraciones intracelulares de CO<sub>2</sub> son captados por las células de la guarda. Estas señales se reflejan en respuestas estomáticas definidas (Taiz y Zeiger, 2002). Éste es un mecanismo que está muy relacionado a las respuestas al estrés. A través de los estomas las plantas no sólo pierden agua y pueden responder al estrés hídrico, sino que también participan del estrés de tipo biótico, ya que a través de ellos pueden ingresar organismos patógenos que infectan la planta (Dixon, 2001).

Cuando las condiciones de crecimiento son óptimas y hay agua en abundancia, las plantas regulan la apertura estomática de manera temporal, abren los estomas durante el día para incorporar el CO<sub>2</sub> y los cierran durante la noche para no perder agua innecesariamente. Por otro lado, cuando hay escasez de agua, se activa una cascada de señales que llevan al cierre estomático para evitar la deshidratación. Esta respuesta es dependiente de la hormona ABA (Filkenstein y Rock, 2002; Lambers y col., 2008). Cuando las plantas detectan la escasez de agua, aumentan los niveles de ABA y ésta induce rápidamente el cierre estomático (Shinozaki y col., 2003).



**Figura I. 6. Esquema del corte transversal de una hoja.** Se observa el intercambio de gases a través de los poros estomáticos.

El dilema que origina la dualidad de tomar CO<sub>2</sub> de la atmósfera y no perder demasiada agua es una situación con la que deben lidiar las plantas continuamente. Al cerrar completamente los estomas para no perder agua, se origina una disminución drástica en la incorporación del CO<sub>2</sub> necesario para la fotosíntesis.

## 10- Fotosíntesis y senescencia

La fotosíntesis es definida por Lodish y col. (2002) como un “complejo conjunto de reacciones que se llevan a cabo en los cloroplastos de algunas bacterias y de las plantas, por el cual se utiliza la energía de la luz para generar hidratos de carbono a partir de CO<sub>2</sub>, por lo general con consumo de agua y formación de O<sub>2</sub>”. La fotosíntesis es un proceso bioquímico que involucra la captura de fotones por los receptores que se encuentran en los cloroplastos y la excitación de las moléculas de clorofila. En este proceso es esencial el papel que juega el intercambio gaseoso que ocurre mayoritariamente en las células del mesófilo de las hojas. A través de los poros estomáticos ingresa el CO<sub>2</sub> necesario y sale el O<sub>2</sub> producido, además de agua (Taiz y Zeiger, 2002). La incidencia de la luz también es uno de los factores claves e indispensables en

estos procesos, como así lo es la disponibilidad de moléculas de clorofila capaces de captar energía lumínica.

Las células del mesófilo de las hojas tienen gran cantidad de cloroplastos que producen una cantidad importante de pigmentos fotosintéticos, las clorofilas. Estas moléculas son capaces de captar la energía fotosintética proveniente de la luz y dirigirla a los fotosistemas de los cloroplastos (Taiz y Zeiger, 2002).

La senescencia, o muerte celular programada, es un proceso natural, dependiente de energía y controlado hormonalmente. Las hojas están genéticamente programadas para morir, pero su senescencia puede iniciarse también en forma adelantada por factores ambientales (Taiz y Zeiger, 2002).

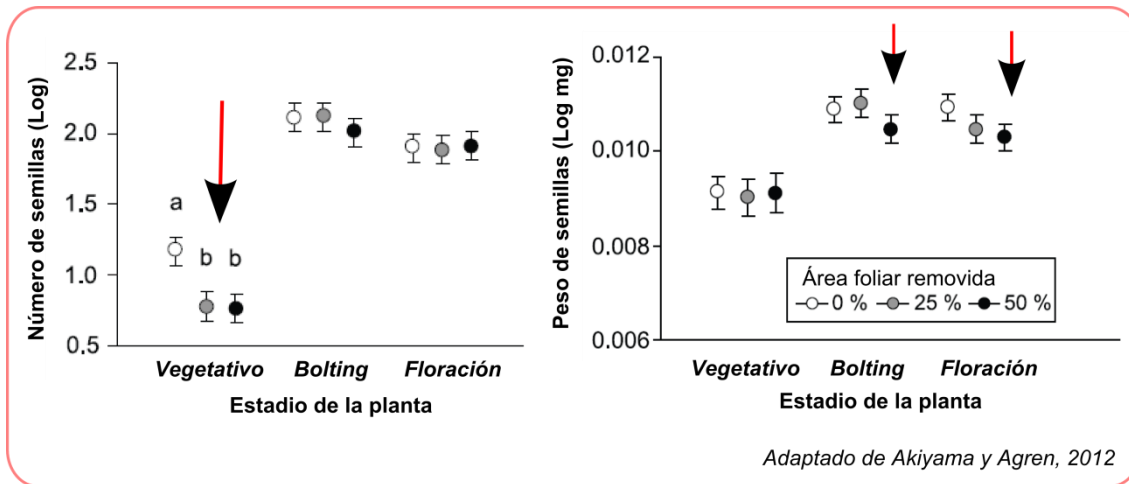
Existen diferentes tipos de senescencia: monocárpica (muerte de la planta completa luego de un ciclo reproductivo exitoso), de las hojas, del tejido aéreo completo, de los frutos. La senescencia, codificada a nivel genético, sigue un curso de eventos celulares particulares. Las proteínas cloroplastídicas, incluida la enzima RuBisCO, son hidrolizadas por enzimas proteolíticas durante la senescencia. Por ello, uno de los primeros síntomas visibles de la senescencia es la aparición de color amarillo en las hojas, debido a la pérdida de clorofila (Gan y Amasino, 1997). Algunas organelas son destruidas mientras que otras permanecen intactas; los cloroplastos son los primeros en deteriorarse, en cambio el núcleo permanece estructuralmente intacto y funcionalmente activo hasta el último momento. Esto tiene cierta lógica, ya que los procesos catabólicos que ocurren durante la senescencia requieren la síntesis de enzimas específicas como proteasas, nucleasas, lipasas y de la degradación de la clorofila; y todo ello requiere justamente de la activación y represión de genes específicos en el núcleo (Taiz y Zeiger, 2002).

Durante la senescencia se recupera una porción de los recursos energéticos que la planta invirtió para formar las hojas. Las enzimas hidrolíticas rompen proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Los componentes, aminoácidos, azúcares y nucleósidos que se producen en esta hidrólisis, junto con minerales, se transportan hacia el resto de la planta a través del floema (Taiz y Zeiger, 2002). Frente a condiciones de estrés, en las que puede desencadenarse la senescencia de manera temprana, estos recursos, junto con las hormonas y los co-factores de señalización, son transportados a los tejidos que aún se encuentran viables. La dirección y velocidad de movilización de estos recursos y señales dependen de las ramificaciones, las conexiones entre los tejidos, la distancia, la proximidad y la fuerza de las regiones de reserva y de los reguladores del floema. El movimiento de recursos y señales a través del xilema no se comprende aún, pero se cree que estaría dirigido por la transpiración (Lambers y col., 2008).

## 11- Producción: biomasa y semillas.

La producción de semillas es el proceso final y el objetivo fundamental del ciclo de vida de las plantas. A través de las semillas se originan nuevos individuos y así se perpetúa la especie. Para llegar a este punto del desarrollo deben ocurrir ciertos eventos de manera coordinada y eficiente, para dar un buen rendimiento. Si esto no ocurre, las plantas pueden originar semillas con baja calidad nutricional, en baja cantidad o con una baja tasa de germinación. El desarrollo de las flores y la correcta polinización es fundamental para obtener una buena producción de semillas. También lo es una buena hidratación e incorporación de nutrientes, por ello el estrés hídrico causa deficiencias en la producción de semillas; dependiendo de su intensidad y también de la etapa de desarrollo de la planta en la que ésta se encuentre. En condiciones de estrés, las plantas pueden no tener una disponibilidad de nutrientes y agua suficientes para desarrollar las flores correctamente o para el llenado de granos (Lambers y col., 2008). Las plantas que sufren falta de agua durante la antesis tienen una marcada disminución de la producción de semillas, dando granos más pequeños (Reguera y col., 2013). Ante una disminución de nutrientes o agua, las plantas de especies más rústicas usualmente responden con una disminución de la expansión celular de hojas y dirigen sus recursos al crecimiento de raíces. Esto lleva a la senescencia de las hojas y al transporte de nutrientes de estas hojas viejas hacia tejidos nuevos. En cambio, las especies que están de alguna manera adaptadas a crecer en condiciones de escasos recursos, disminuyen su producción de nuevos tejidos y sufren un efecto menos drástico en la senescencia de las hojas (Lambers y col., 2008).

A su vez, el daño en las hojas (por herbívoros o daño mecánico) también afecta la producción final de semillas. La tolerancia a la defoliación es menor en las plantas que se encuentran en estadio vegetativo respecto a las que se encuentran en estadio reproductivo, si el daño foliar ocurre antes de que ocurra el *bolting* el número de semillas se reduce drásticamente comparando con que el daño ocurra cuando las plantas se encuentran en la etapa de floración (Akiyama y Agren, 2012; Figura 7).



**Figura I. 7. Efectos de la defoliación y el estadio de la planta en la producción de semillas de una población natural de *Arabidopsis thaliana* en Suecia.** El número de semillas producidas depende del área foliar durante la etapa vegetativa (izquierda). La producción (en mg) de semillas depende del área foliar existente en las etapas de *bolting* y floración, pero no durante la etapa vegetativa (derecha). Las plantas con 0 % de área foliar removida de estadio vegetativo produjeron menos semillas que las de 0 % de plantas en *bolting* o en floración porque, al tratarse de un ensayo con una población natural, se encontraron en condiciones ambientales diferentes al momento de producir las semillas. Figura extraída y adaptada de Akiyama y Agren, 2012.

Luego de la floración, los nutrientes son movilizados desde las raíces y hojas senescentes por el floema hacia los frutos en desarrollo para dar origen a semillas sanas y maduras (Lambers y col., 2008). Existe una dualidad entre el tamaño de las semillas producidas y su número. Generalmente, las especies que crecen en ambientes muy poblados vegetativamente producen semillas más grandes, que serán competitivamente más fuertes al momento de germinar y pasar a la etapa de plántula (Lambres y col., 2008). En ciertas ocasiones, los nutrientes en vez de distribuirse por el tallo a lo largo de las vainas en formación, se quedan en las hojas, originando una mayor biomasa. Este efecto se busca en la Agricultura para algunas especies forrajeras, pero no es beneficioso para otras en las que el hombre tiene más interés por los granos.

La producción de semillas, al igual que los demás procesos fisiológicos de las plantas como el desarrollo foliar, la toma y pérdida de agua, o la senescencia, están regulados a nivel molecular. Las plantas son organismos sésiles, incapaces de desplazarse para escapar de las condiciones adversas o para conseguir nutrientes cuando estos escasean. Por lo cual, su capacidad para captar luz y nutrientes o sobrellevar condiciones de estrés depende de la eficiencia con la que se adapten a las condiciones del ambiente en el que se encuentran (Mahajan y Tuteja, 2005; Shao y col., 2007). La regulación de la expresión génica es un paso clave en la coordinación del desarrollo y las respuestas de las plantas, desde la formación de las semillas y la germinación, hasta la senescencia.

## **12- Regulación de la expresión génica en plantas**

Como todos los organismos pluricelulares, las plantas se desarrollan de acuerdo a un programa muy preciso que determina la secuencia y el momento en que ocurren cada uno de los eventos necesarios para conformar su estructura tridimensional. Este programa está contenido en la información genética. Dado que todas las células somáticas provienen de una única célula original y como consecuencia, todas poseen la misma información genética, la clave para conseguir la especialización estructural y funcional de las células es la expresión diferencial de grupos de genes. Esta expresión diferencial suele estar gobernada, directa o indirectamente, por genes de control que regulan la actividad de otros genes en forma coordinada. Esa coordinación es lo que permite el funcionamiento apropiado de las macromoléculas celulares que van a dar forma a cada célula y también van a permitir la interacción entre estas células para dar origen a los tejidos y conformar el organismo.

Ya hemos mencionado que las plantas, además de desarrollarse, deben enfrentarse a condiciones de estrés. Éstas han adquirido evolutivamente la capacidad de modificar eventos específicos del desarrollo en respuesta a condiciones externas de modo de optimizar sus recursos disponibles y asegurar su reproducción. Ejemplos de la plasticidad fenotípica de las plantas son: la elongación del tallo en respuesta a la sombra, el crecimiento de las raíces en respuesta a la humedad del suelo, las modificaciones del área y grosor foliar en respuesta al flujo y la densidad de fotones, y los cambios en el tiempo de floración en respuesta a condiciones desfavorables de crecimiento (Callahan y col., 1997; Bell y Sultan, 1999; Sultan, 2000; Nicotra y col., 2008). Estos procesos ocurren mediante la regulación a nivel temporal y espacial de la expresión de genes específicos, un punto clave en las respuestas de las plantas al estrés (Rushton y Somssich, 1998; Riechmann y col., 2000). De esa manera éstas pueden contar con las proteínas que son necesarias en cada condición y se deshacen de las innecesarias que sólo originarían un gasto energético.

## **13- Factores de transcripción vegetales**

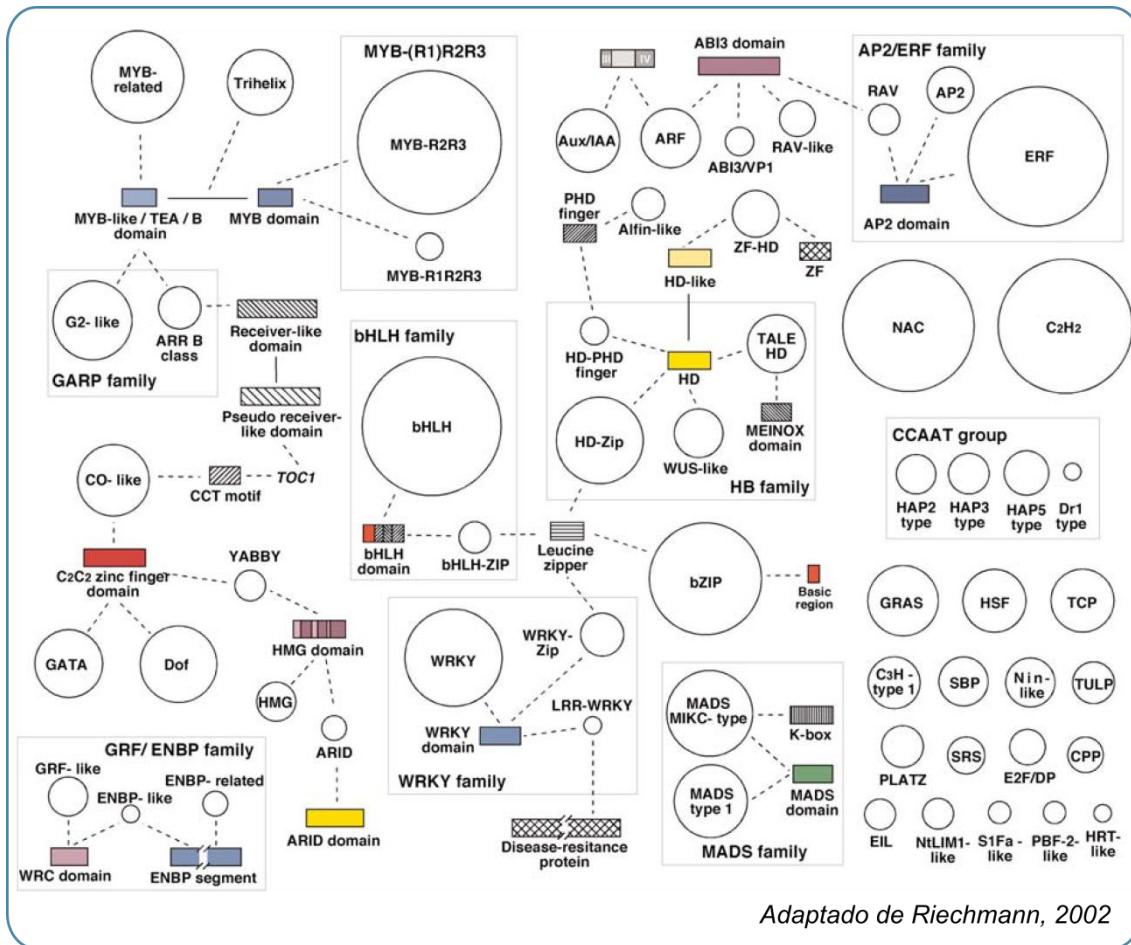
Como ya hemos dicho, percibir y responder de manera rápida y precisa a los cambios desfavorables del ambiente es fundamental para que las plantas enfrenten lo mejor posible las condiciones adversas. Para esto, las cascadas de señalización y la actividad de las moléculas efectoras deben estar muy bien controladas, de manera que las respuestas se activen en el



momento preciso en que son necesarias. Existen diferentes tipos de mecanismos que controlan la expresión de genes y proteínas, mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales.

En plantas, una de las vías de control más importante es la de la regulación transcripcional. En *Arabidopsis* se han identificado más de 2000 factores de transcripción (FTs; Riechmann y col., 2000). Los FTs son elementos fundamentales en la regulación del desarrollo y de las respuestas a modificaciones endógenas y exógenas de las plantas. Al regular la expresión de muchos genes pueden activar o inactivar vías completas de respuesta y así las células vegetales se adaptan muy rápidamente a los cambios. Los FTs son proteínas que tienen dominios de unión a ADN capaces de identificar secuencias específicas del ADN, conocidas como elementos en *cis*. Además, estas proteínas tienen otros dominios: de interacción con otras proteínas, de dimerización, de activación o represión (Figura 8). Los FTs pueden interactuar directamente con diferentes componentes de la maquinaria transcripcional basal, con co-activadores y con complejos modificadores de la cromatina (Riechmann, 2002).

Los FTs regulan la expresión génica y a su vez su expresión es regulada por cambios endógenos y exógenos. Esta regulación puede darse a nivel transcripcional, por elementos en *cis* en sus promotores o también por mecanismos post-transcripcionales. Se han encontrado diversos motivos de fosforilación, sumoilación o ubiquitinación en múltiples FTs (Miura y Hasegawa, 2010; Zhai y col., 2013). Cuando los FTs están activos en las células, actúan reconociendo secuencias específicas en las regiones regulatorias de sus genes blanco. Al unirse a estas regiones pueden inducir o reprimir la expresión de estos genes. Los transcriptos van a dar lugar a las proteínas efectoras encargadas de la respuesta celular. De esta manera, los FTs generan cambios morfológicos y del crecimiento durante el desarrollo de la planta, y también generan respuestas de adaptación o defensa a estímulos externos.

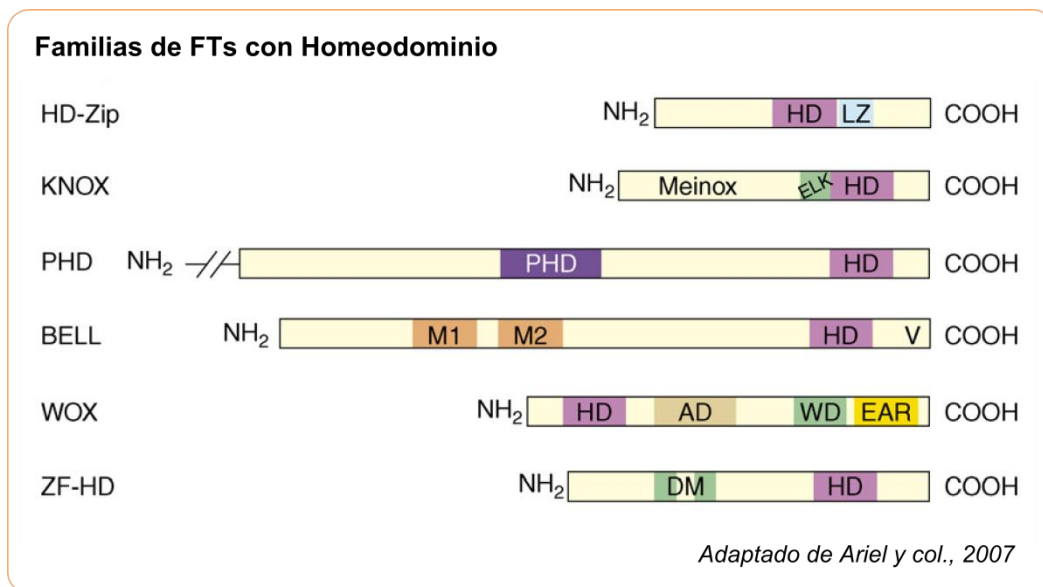


**Figura I. 8. Factores de transcripción de Arabidopsis.** Las familias están representadas en círculos, de tamaño proporcional al número de miembros de cada familia. En rectángulos se indican los dominios que se repiten en las diferentes familias, unidos por línea de puntos; los rectángulos son de tamaño proporcional al tamaño del dominio. Los dominios de unión a ADN se encuentran coloreados, los demás con líneas negras. Figura adaptada de Riechmann, 2002.

Los factores de transcripción se clasifican en grandes familias, dependiendo principalmente del dominio de unión a ADN que contienen (Figura 8). Dentro de estas familias, se cuenta la familia HD, cuyos miembros presentan homeodominios (HD). Este tipo de FTs fue identificado inicialmente en *Drosóphila melanogaster* (Garber y col., 1983) y se nombró “homeodominio” dado que una mutación puntual en algunos de estos genes con HD producía el reemplazo completo de un segmento corporal por otro, fenómeno conocido como homeosis. Por ejemplo la mutante en el gen denominado *ANTENNAPEIDIA* presenta patas en el lugar de las antenas. Con el transcurso del tiempo se han identificado genes con HD en organismos de otros reinos, incluyendo hongos y plantas (Chan y col., 1998).

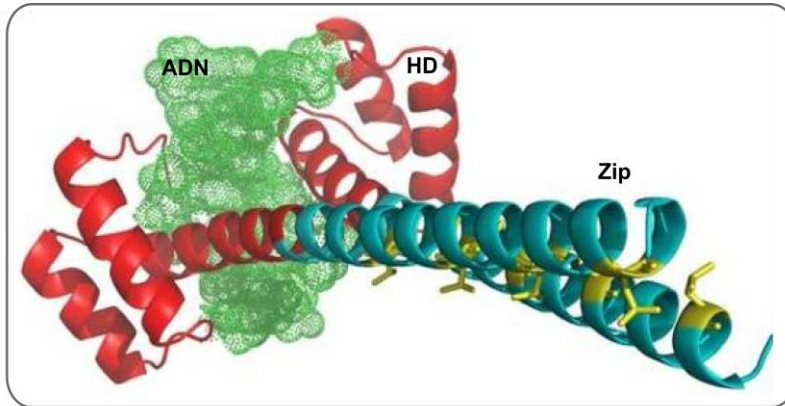
14- La familia HD-Zip

En plantas, existen seis familias de proteínas con HD (HD-Zip, PHD-finger, BELL, ZF-HD, WOX, KNOX; Ariel y col., 2007a), divididas según la conservación de secuencias dentro y fuera del dominio, la asociación con otros dominios, el tamaño proteico y la estructura génica (Figura 9). El homeodominio está formado por tres hélices  $\alpha$  unidas por una vuelta y un rulo, siendo la hélice III la que interacciona con el ADN (Kissinger y col., 1990; Gehring y col., 1994).



**Figura I. 9. Clasificación de las familias de FTs con homeodominio.** Abreviaturas: AD, dominio ácido; DM, motivo de dimerización; EAR, motivo de represión; ELK, motivo nombrado por los aminoácidos conservados que lo conforman Glutamina, Leucina y Lisina; HD, homeodominio; LZ, cierre de leucinas; M1 y M2 forman el Meinox (asociación entre los dominios MEIS y KNOX); MID, dominio de interacción; PHD, homeodominio de plantas; V, caja 'VSLTLGL'; WD, dominio WUS. Adaptado de la figura publicada en Ariel y col., 2007a.

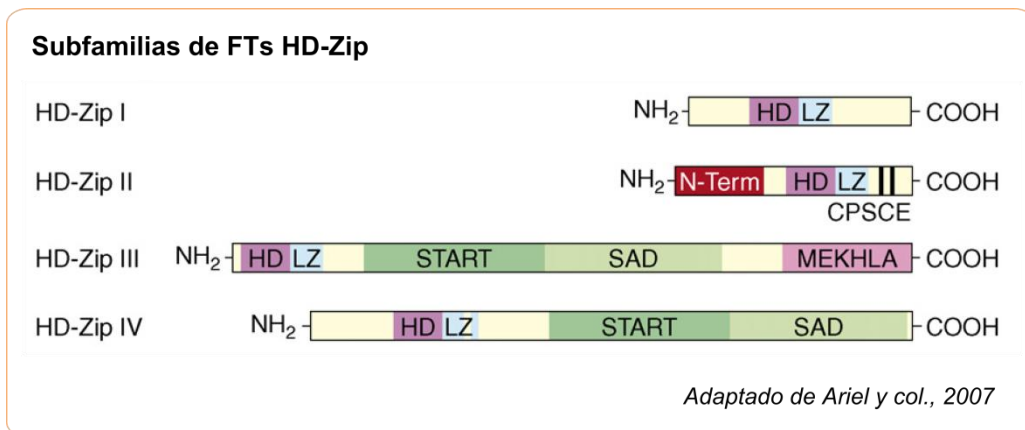
Las proteínas que presentan la asociación del HD a un cierre de leucinas (Zip, del inglés *Leucine Zipper*) son miembros de la familia HD-Zip. El cierre de leucinas forma una hélice  $\alpha$  con residuos de leucina en cada séptima posición sobre el mismo lado de la hélice. Las proteínas HD-Zip cuentan con el HD encargado de unir la secuencia de ADN de sus genes blanco y con el cierre de leucinas que actúa como dominio de dimerización. Esto permite la hetero- u homodimerización a través de interacciones hidrofóbicas entre dos polipéptidos (Landschulz y col., 1988; Sessa y col., 1993; González y col., 1997; Figura 10).



**Figura I. 10. Estructura tridimensional del dominio HD-Zip en interacción con el ADN.** Extraído de Ariel y col., 2007b.

La asociación de estos dos dominios (HD y Zip) se ha encontrado exclusivamente en el reino vegetal (Ruberti y col., 1991; Ariel y col., 2007a), por lo cual esta familia génica resulta particularmente interesante para la biología molecular vegetal, especialmente si se aborda la regulación de la expresión génica exclusiva de las plantas en relación con su adaptación al medio ambiente (Schena y Davis, 1992).

De acuerdo a su estructura génica, tamaño y presencia de diversos motivos, los HD-Zip han sido clasificados en cuatro subfamilias, I, II, III y IV (Ariel y col., 2007a; Figura 11). Se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que las proteínas de las subfamilias I y II reconocen la secuencia pseudopalindrómica CAAT(N)ATTG (Palena y col., 2001; Tron y col., 2001; Ariel y col., 2010).



**Figura I. 11. Clasificación de los FTs de la familia HD-Zip.** Los miembros de esta familia se dividen en cuatro subfamilias. Abreviaturas: MEKHLA, dominio nombrado por los aminoácidos conservados Metionina, Glutamina, Lisina, Leucina, Alanina; N-term, región amino-terminal conservada; SAD, dominio adyacente a START; START, dominio de proteína esteroideogénica reguladora relacionada a la transferencia de lípidos. Adaptado de Ariel y col., 2007a.

Numerosos estudios muestran que las proteínas HD-Zip están involucradas en regulaciones del desarrollo y de respuesta a factores externos (Ariel y col., 2007a). Los miembros de la subfamilia IV han sido asociados a la regulación del desarrollo de raíces y tricomas (Nakamura y col., 2006); los miembros de la subfamilia III cumplen funciones en la regulación de la embriogénesis, del desarrollo de meristemas y sistemas vasculares, entre otras (Ariel y col., 2007a); las proteínas de la subfamilia II regulan principalmente las respuestas a distintas condiciones de iluminación, y las de la subfamilia I regulan el desarrollo en condiciones de estrés abiótico (Ariel y col., 2007a).

## 15- La subfamilia HD-Zip I

### 15.1- Aspectos funcionales

El análisis de plantas que sobreexpresan o expresan ectópicamente FTs de la familia HD-Zip I, de plantas mutantes, así como los estudios transcriptómicos han aportado significativamente a la comprensión de la función de estas proteínas. *HaHB4* de girasol es uno de los miembros mejor caracterizados. Cuando es expresado constitutivamente en *Arabidopsis* provoca un arresto y retraso en el crecimiento pero a su vez confiere tolerancia a la falta de agua y al exceso de sales (Dezar y col., 2005; Cabello y col., 2007); también confiere mayor tolerancia al ataque de insectos, regulando los niveles de ácido jasmónico y etileno (Manavella y col., 2008). Otro HD-Zip I de girasol es *HaHB1*, cuya expresión constitutiva en *Arabidopsis* ocasiona una mayor tolerancia a las bajas temperaturas, activando genes que codifican proteínas PR (relacionadas a patógenos) e impidiendo la formación de cristales dentro de las células (Cabello y col., 2012). *HaHB1* junto con *AtHB13*, su homólogo de *Arabidopsis*, participan también en los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico y en la producción de semillas en estas condiciones (Cabello y Chan, 2012a; Cabello y Chan, 2012b). *MtHB1* de *Medicago truncatula* cumple un rol importante en la regulación de la arquitectura radicular a través del control de la expresión de proteínas LBD (del inglés, *Lateral Organ Boundaries Domain*), entre otras (Ariel y col., 2010). *AtHB12* y *AtHB7* de *Arabidopsis* son los más caracterizados de esta especie; la expresión de estos genes es inducida por estrés hídrico y existen evidencias de su participación en el control de la morfología de las hojas, el tallo, las flores y en el pasaje al estadio reproductivo (Olsson y col., 2004). Cuando se expresa ectópicamente *AtHB5* las plantas transformadas mostraron un retraso en el crecimiento (Johannesson y col., 2003). El estudio de plantas que sobreexpresan *AtHB1*, *3*, *12*, *20* o *23* sugieren que estos FTs participan en la regulación del desarrollo de cotiledones y hojas, y *AtHB13* sería un potencial mediador de la

señalización de azúcares (Aoyama y col., 1995; Hanson y col., 2001). AtHB6 es un regulador negativo de las respuestas a ABA, que es marcado por los receptores MATH/BTB CRL3 para su degradación en respuestas dependientes de ABA (Lechner y col., 2011). En arroz, la expresión de *Oshox22* es inducida por estrés hídrico, salino y ABA y este gen regula a su vez la biosíntesis de ABA (Zhang y col., 2012). Un estudio realizado con los 17 HD-Zips I de maíz, mostró que la expresión de todos estos se induce por el estrés hídrico (Zhao y col., 2011). El gen de tomate *LeHB-1* está involucrado en la organogénesis floral y en el desarrollo de sépalos and pétalos (Lin y col., 2008). En la especie *Craterostigma plantagineum*, los transcriptos de *CpHB6* y *CpHB7* aumentan mientras que los de *CpHB3*, 4 y 5 disminuyen durante la deshidratación, tanto en hojas como raíces (Deng y col., 2002). Las plantas de tabaco y *Arabidopsis* transformadas con *CpHB7* muestran una menor sensibilidad al ABA durante la germinación de semillas y el cierre estomático; estas plantas también presentan múltiples genes de respuesta a ABA con su expresión alterada (Deng y col., 2006).

La mayoría de los HD-Zip I participan en eventos del desarrollo en condiciones normales de crecimiento y también en respuesta al estrés, pero de acuerdo a los estudios fenotípicos y transcripcionales citados, cada una de estas proteínas estaría ejerciendo una función diferente.

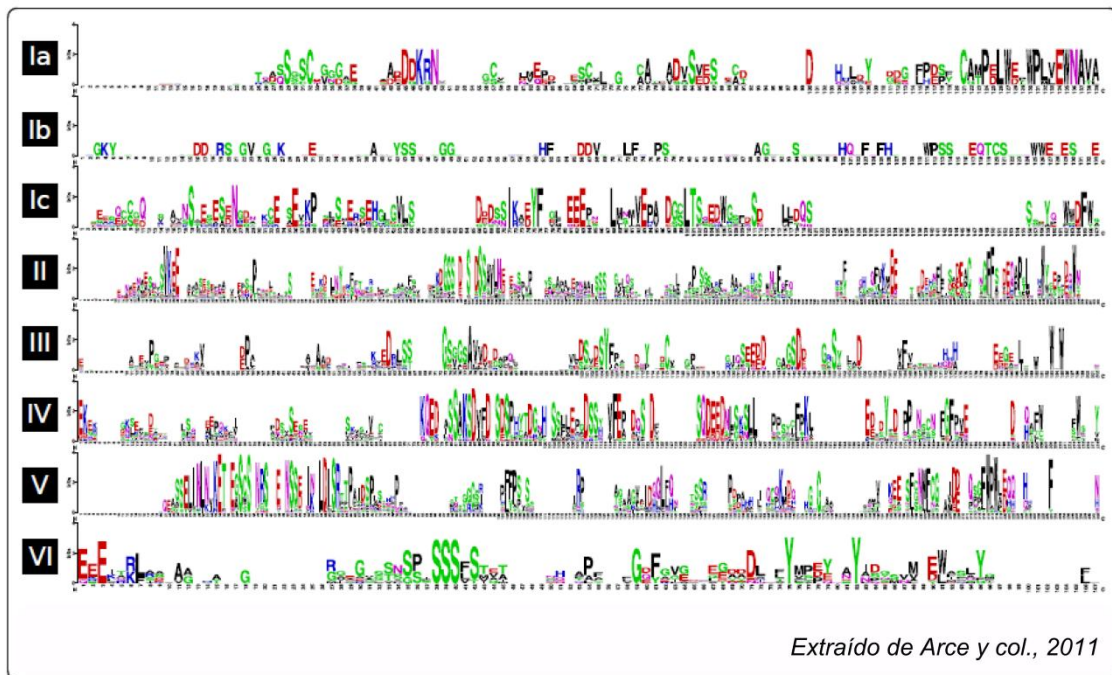
### 15.2- Características estructurales y análisis filogenético

Las proteínas de la subfamilia HD-Zip I no cuentan con dominios conocidos conservados fuera del HD y el cierre de leucinas (Ariel y col., 2007a). Originalmente, los 17 HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana* fueron clasificados en 6 grupos, de acuerdo a las relaciones filogenéticas entre estos genes y la distribución de intrones y exones. Estos grupos según Henriksson y col., (2005) son:  $\alpha$  (ATHB3, -20, -13 y -23),  $\beta$  (ATHB1, -5, -6 y -16),  $\gamma$  (ATHB7 y -12),  $\delta$  (ATHB21, -40 y -53),  $\epsilon$  (ATHB22 y -51) y  $\phi$  (ATHB52 y -54). Hasta hace poco tiempo, los análisis estructurales de los HD-Zip I no mostraban conexión entre ellos por fuera del homeodominio y el cierre de leucinas; experimentalmente sólo se había demostrado que AtHB12 tenía un dominio activador en el carboxilo terminal (Lee y col., 2001) y que AtHB6 interaccionaría con una fosfatasa a través de algún motivo localizado hacia el carboxilo del HD-Zip (Himmelbach y col., 2002). Se consideraba que los HD-Zip I sólo compartían un dominio HD-Zip conservado y que las regiones no conservadas fuera de este dominio podrían tener una función de activación o represión, o de traslocación al núcleo.

Reflexionando sobre lo expuesto en las secciones anteriores, resulta curioso que todos los HD-Zip I uniesen las misma secuencia pseudopalindrómica pero tuvieran funciones tan

diferentes, sabiendo que los patrones de expresión de los genes que los codifican presentan muchas similitudes, así como su regulación. En los últimos años ha aumentado exponencialmente la información disponible de genomas de diferentes especies además de los de las plantas modelo. Este aumento de información permite el análisis de un mayor número de secuencias, como las de los HD-Zip tipo I.

Un estudio informático realizado por compañeros de mi laboratorio utilizó los HD-Zip I de múltiples especies en conjunto para la búsqueda de motivos conservados por fuera de homeodominio y el cierre de leucinas (Arce y col., 2011). De esta forma, fueron identificados 178 genes que codifican HD-Zip I provenientes de más de 10 especies diferentes. Éstos se clasificaron en seis clados o grupos (I, II, III, IV, V y VI). El grupo I fue dividido a su vez en tres subgrupos (Ia, Ib y Ic), por la conservación de secuencia particularmente en la región carboxilo-terminal (CTR). Se realizó un segundo árbol filogenético, basado específicamente en la identificación y alineación de múltiples motivos hacia el CTR de los HD-Zip I (Arce y col., 2011). Se identificaron 20 motivos conservados distribuidos entre los miembros de distintos grupos de HD-Zip I (Figura 12).



**Figura I. 12. Logo de secuencias de los CTRs de HD-Zips I.** La altura de los residuos se correlaciona con la frecuencia con la que se encuentran en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los CTRs. A la izquierda se observan los nombres de los grupos asignados por Arce y col., 2011.

Para mencionar algunos ejemplos de Arabidopsis, AtHB13 y 23 (grupo V) tienen cinco motivos conservados en el CTR, AtHB6 (grupo II) tiene cuatro y AtHB16 (grupo II) tres motivos,

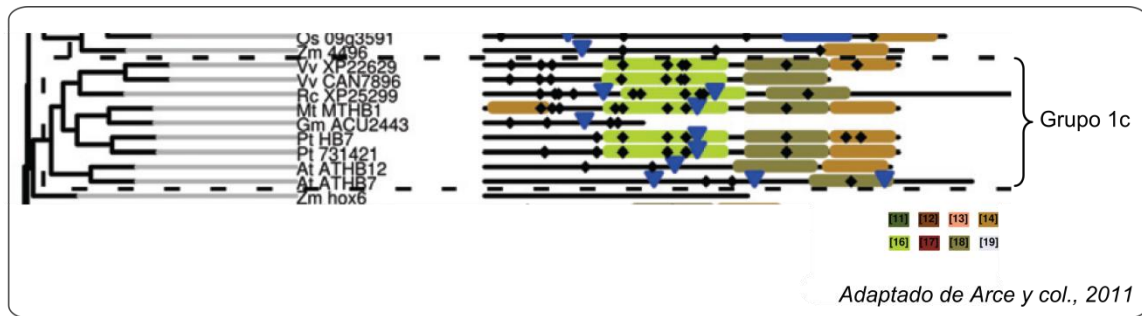
AtHB12 (grupo Ic) tiene dos motivos y AtHB7 (grupo Ic) sólo uno (Arce y col., 2011). Cabe destacar que la clasificación de Arce y col. (2011) separa a los HD-Zip I de Arabidopsis entre los grupos I and VI así como lo hace la clasificación de Henriksson y col., (2005) en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\phi$ . La nueva clasificación muestra que fuera del dominio HD-Zip existen numerosos motivos altamente conservados entre distintas especies, que diferenciarían entre sí a los miembros de cada grupo de la subfamilia HD-Zip I. La conservación de estos motivos lleva a pensar en su importancia o significado en la especificidad de las funciones de los HD-Zip I.

### 15.3- Características particulares del subgrupo Ic

Dentro del grupo I quedaron 28 de las 178 proteínas, entre ellas HaHB4, HaHB11, MthB1, AtHB12 y AtHB7. Las últimas tres se encuentran agrupadas en el subgrupo Ic, con un alto porcentaje de identidad de secuencias. *AtHB12* y *AtHB7* comparten un 68 % de similitud de secuencia aminoacídica. Entre los demás genes del grupo Ic se encuentran dos de *Vitis vinífera* (*Vv-XP22629* y *Vv-CAN7896*) y dos de *Populus trichocarpa* (*Pt-HB7* y *Pt-731421*). Los dos de *V. vinífera* tienen un muy alto porcentaje de identidad, pudiendo considerarlos como una duplicación muy reciente, al igual que los dos de *P. trichocarpa*. También se encuentra en este grupo el gen *MthB1*, único de este grupo en *Medicago truncatula* (Ariel y col., 2010; Arce y col., 2011).

Los miembros de este subgrupo comparten entre uno y tres motivos en el carboxilo terminal, señalados en la Figura 13. Observando las secuencias proteicas desde el CTR hacia el amino-terminal, AtHB7 tiene el motivo denominado número 18, AtHB12 tiene el denominado motivo 14 seguido del 18, MthB1 tiene los motivos 14, 18, 16 y 14 nuevamente. El motivo 14, hacia el extremo del carboxilo-terminal para los tres ejemplos mencionados, es un motivo de activación transcripcional tipo AHA, con aminoácidos Aromáticos-Hidrofóbicos grandes-Acídicos (Döring y col., 2000; Arce y col., 2011). Los motivos 16 y 18 no tienen una función conocida hasta el momento, pero su elevada conservación entre diferentes especies lleva a pensar que cumplirían una función determinada. Los otros miembros conocidos del grupo I, HaHB11 y HaHB4, no presentan ningún motivo conservado en su región carboxilo-terminal (Figura 13).





**Figura I. 13. AtHB12 y AtHB7 pertenecen al grupo 1c pero sus CTRs no son iguales.** Árbol filogenético donde se observan, AtHB12, AtHB7, MTHB1, Vv-XP22629, Vv-CAN7896, Pt-HB7 y Pt-731421 entre otros, con motivos similares pero no iguales. Rombos negros = sitios putativos de fosforilación, triángulos azules = sitios putativos de sumoilación, rectángulos de diferentes colores = motivos putativos conservados (marrón oscuro = motivo 17, marrón claro = motivo 14 o tipo AHA, verde = motivo 16). Adaptado de Arce y col., 2011.

Los motivos conservados encontrados en el CTR en la región amino terminal podrían ser parcial o totalmente responsables de las diferencias funcionales informadas para algunos FTs de la familia HD-Zip I. Para poder corroborar esta hipótesis decidimos seleccionar y estudiar tres miembros de la subfamilia I que se resuelvan en el mismo grupo filogenético y que presenten motivos conservados y diferentes (Arce y col., 2011 y observaciones personales).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

*Hay que celebrar el coraje y la apertura de los científicos, navegando hacia lo desconocido una y otra vez. Se necesita valor para ver algo ahí, diferente de lo esperado, usualmente más rico y extraño  
(Uri Alan)*

## Hipótesis

Como hipótesis general de trabajo planteamos que la duplicación génica de los HD-Zip I AtHB12 y AtHB7 llevó a una diversificación funcional y que ambos participan en eventos regulatorios relacionados al estrés abiótico. A su vez planteamos que la caracterización funcional de un tercer HD-Zip I del mismo grupo y otra especie, no conocido previamente, aportaría a la comprensión de las funciones de los miembros de esta subfamilia y la participación de los motivos del CTR en esas funciones.

## Objetivos

En la regulación de la expresión génica en plantas, los factores de transcripción son actores esenciales y protagónicos. Dentro de los numerosos FTs de plantas, aquellos que no tienen homólogos en otros reinos son los que resultan más interesantes para su estudio ya que intervendrían en procesos exclusivos de las plantas como las respuestas de adaptación a distintos tipos de estrés. En este sentido la familia de FTs HD-Zip resulta de particular interés. Como objetivo general nos planteamos contribuir a la comprensión de la funcionalidad de los FTs pertenecientes a la familia HD-Zip I y para este fin elegimos tres miembros, dos de *Arabidopsis* (AtHB7 y AtHB12) y uno de *Nicotiana attenuata* (NaHD20). Los dos miembros de *Arabidopsis* son duplicaciones mientras que el homólogo de *N. attenuata* es un miembro único. Todos pertenecen al mismo clado según los estudios filogenéticos.

El análisis funcional de los mismos nos permitiría comprender mejor su relación estructura-función. Nos propusimos asimismo estudiar los mecanismos en los que participan estos tres miembros de la subfamilia HD-Zip I y analizar su participación en las vías de respuestas de las plantas ante distintas condiciones de estrés.

Como **objetivos particulares** planteamos los siguientes:

- \* Analizar la expresión de genes HD-Zip I de *N. attenuata* en plantas crecidas en condiciones normales y sometidas a estrés hídrico o tratadas con hormonas relacionadas.
- \* Seleccionar un gen HD-Zip I de *N. attenuata* que presente un comportamiento diferencial en condiciones de estrés.
- \* Obtener plantas silenciadas mediante VIGS en el HD-Zip elegido para evaluar el fenotipo de desarrollo y de respuesta al estrés de las mismas. Realizar ensayos de estrés biótico (*Manduca sexta* y *Pseudomonas syringae*) y abiótico (sequía, salinidad). Evaluar las respuestas de plantas

silenciadas a estos tratamientos (análisis de desarrollo como *bolting*, tallo y flores; cuantificación de ARNm, de fitohormonas, de metabolitos secundarios, de compuestos volátiles).

- \* Obtener plantas silenciadas de forma estable en ese mismo HD-Zip para estudios más detallados de la funcionalidad del gen.

- \* Realizar un análisis transcritoómico que permita dilucidar las vías de señalización reguladas por el gen seleccionado.

- \* Obtener plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes y mutantes de *AtHB12* y *AtHB7*, así como plantas mutantes dobles para *AtHB12* y *AtHB7*.

- \* Cuantificar los niveles de transcritos de *AtHB12* y *AtHB7* en plantas de diferentes estadios de desarrollo, y evaluar si existe una relación entre sus niveles de expresión.

- \* Evaluar la expresión de estos genes en condiciones de estrés hídrico.

- \* Obtener plantas transformadas con los promotores de estos genes dirigiendo la expresión de genes reporteros para analizar el patrón de expresión de los mismos.

- \* Analizar en detalle el fenotipo de las líneas sobreexpresantes y mutantes obtenidas en condiciones óptimas de crecimiento.

- \* Analizar el desarrollo de las plantas sobreexpresantes y mutantes en condiciones de estrés abiótico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

*Se debe hacer todo tan sencillo como sea posible,  
pero no más sencillo  
(Albert Einstein)*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- Plásmidos

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

El plásmido pBI121 (Jefferson y col., 1987) es un derivado del vector binario pBIN19. Este plásmido contiene el gen que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli* (*GUS*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (NOS), clonados corriente debajo 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* (*neomicin phosphotransferase 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*. Este plásmido se utilizó para la expresión constitutiva del ADNc de los genes *AtHB12* y *AtHB7* en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas en forma estable y en hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas en forma transitoria.

El vector *pTV00* es un vector binario, con el gen que confiere resistencia a kanamicina (Ratcliff y col., 2001). Fue utilizado para clonar la construcción *irHD20*, que luego se utilizó para realizar *Virus Induced Gene Silencing* (VIGS) y silenciar de manera transitoria *NaHD20* en plantas de *Nicotiana attenuata*.

El vector binario *pSOL8* se utilizó para generar la construcción *irHD20* que luego se utilizó en la transformación estable de *N. attenuata* (Gase y col., 2011).

Para los análisis de promotor 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). El gen *GUS* codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli*, cuya actividad es detectable por reacciones histoquímicas.

El plásmido *pRS300* se utilizó como molde para el clonado del micro-ARN artificial (Schwab y col., 2006; <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Home;project=stdwmd>).

## 2- 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).

*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).

## 3- Construcciones genéticas

Las construcciones genéticas utilizadas son las siguientes:

\* *NaHD20 en pGEM t-easy*: se aisló la región codificante de *NaHD20* de muestras de ARN de hojas de *N. attenuata*, utilizando los oligonucleótidos HD20 F y HD20 R (tabla M1). Mediante RT-PCR se aisló y purificó un fragmento de 1.094 pb que se clonó en *pGEM T-easy*.

\* *irHD20-VIGS*: se amplificó un fragmento de 278 pb exclusivo del ARNm de *NaHD20* a partir de hojas de *N. attenuata* por PCR con los oligonucleótidos HD20-VIGS F y R (tabla M1), se cortó con las enzimas *BamHI* y *Sall*, y se insertó en el vector *pTV00* en antisentido (Saedler y Baldwin, 2004) para ensayos de VIGS.

\* *irHD20*: se amplificó por PCR un fragmento de 329 pb de la secuencia de ADNc *NaHD20* en el vector *pGEM T-easy* (desde el nucleótido 529 al 857), con los oligonucleótidos HD20ir F y HD20ir R, se clonó de manera invertida y repetitiva en el vector *pSOL8* para la transformación estable de *N. attenuata* (Krügel y col., 2002).

\* *35S:AtHB12*: el ADNc de *AtHB12* se amplificó por RT-PCR a partir de muestras de ARN de hojas de plantas de *A. thaliana* de 25 días tratadas con estrés hídrico, para obtener una mayor representación de los transcritos en las muestras a amplificar. Se utilizaron los oligonucleótidos AT12 cF y AT12 cR (tabla M1); el fragmento fue clonado en los sitios *XbaI/BamHI* del vector binario *pBI121*.

\* *35S:AtHB7*: el ADNc de *AtHB7* fue amplificado por RT-PCR de muestras de ARN de hojas de *A. thaliana* tratadas con estrés hídrico, para obtener una mayor representación de los transcritos en las muestras a amplificar. Se utilizaron los oligonucleótidos AT7 cF y AT7 cR (tabla M1); el fragmento fue clonado en los sitios *BamHI/SacI* en el vector *pBI121*.

\* *micro-ARN artificial 12/7*: construido con el vector *pRS300* como molde y los oligonucleótidos específicos (12y7miR-I, -II, -III, -IV, amiRNA-A y amiRNA-B; tabla M1), diseñados utilizando la herramienta web WMD3 (*Web MicroRNA Designer*) de Weigelworld

(<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Home;project=stdwmd>). Mediante PCRs encadenadas, utilizando la metodología descrita por Schwab y col., 2006, el producto final fue subclonado en *pGEM t-easy* y luego clonado en los sitios *BamHI/BamHI* en el vector binario *pBI121*.

\* *pAtHB12:AtHB12::GFP::GUS*: fue cedido generosamente por el Dr. Federico Ariel. Brevemente, se amplificó por PCR el gen completo *AtHB12* con los oligonucleótidos p12F y p12R (tabla M1) y se clonó por la tecnología *GATEWAY* en el vector binario *pKGWFS7*.

\* *pAtHB7:AtHB7::GFP::GUS*: fue cedido generosamente por el Dr. Ariel. Brevemente, se amplificó por PCR el gen *AtHB7* completo con los oligonucleótidos p7 F y R (tabla M1) y se clonó por la tecnología *GATEWAY* en el vector binario *pKGWFS7*.

Las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla M1.

#### 4- Material vegetal y condiciones de cultivo

##### 4.1- Cultivo de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*

Para los estudios en *Arabidopsis thaliana* se utilizaron semillas del ecotipo Columbia-0 (Col-0) adquiridas en Lehle Seeds y reproducidas posteriormente en cámara de cultivo según se indica más abajo. Las plantas mutantes en *AtHB12* (GK-174E09-013516) y en *AtHB7* (SALK\_086222) fueron obtenidas de ABRC (<http://www.arabidopsis.org/portals/mutants/findmutants.jsp>; *Arabidopsis Biological Resource Center*: centro que guarda, preserva, reproduce y distribuye semillas y otros stocks relacionados con *Arabidopsis thaliana*).

Para ensayos con plantas de *Nicotiana benthamiana* o de *Arabidopsis* en estado avanzado de desarrollo, éstas se cultivaron directamente en macetas con mezcla perlita: vermiculita: turba (1:2:2) y una capa superficial de 1.5 cm de tierra (Plantas de interior, Terrafértil), en macetas de 8 x 7 cm. Se sembraron en superficie entre 2 y 5 semillas según el ensayo, cubriéndose las macetas con film autoadherente hasta la germinación para evitar el secado.

Cuando fue necesario seleccionar las plántulas por su resistencia a un antibiótico, las semillas se hicieron germinar en placas de Petri (15 cm de diámetro) con medio MS-Agar y los antibióticos correspondientes para la selección, luego fueron trasplantadas y crecidas en tierra. Para germinar las semillas de *Arabidopsis thaliana* en placas, primero se desinfectaron con lavados de 5 min con etanol 70 % (v/v), 30 min de lavandina 10 % y finalmente, 4 veces con agua destilada estéril. Para la selección inicial de las T1 se utilizaron aproximadamente 100 µl de semillas, mientras que para las filiales posteriores se utilizaron alrededor de 50 semillas. Éstas fueron resuspendidas en Agar-Agar 0.1 % y sembradas en placas de Petri de 150 mm de



diámetro conteniendo Agar-Agar 0.8 %, medio MS 0.5x (Murashige y Skoog 1962) y 50 µg/ml de kanamicina. Luego de dos días de ruptura de la dormancia a 4 °C, las placas se trasladaron a la cámara de cultivo. El proceso anterior fue realizado en esterilidad utilizando una cabina de flujo de aire horizontal (Thermo). Los medios de cultivo fueron esterilizados mediante un esterilizador Ficoinox, con un programa de 134 °C durante 15 min. En todos los casos las plantas se cultivaron en un régimen de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad a 24-22°C.

#### **4.2- Cultivo de *Nicotiana attenuata***

Para los estudios en *N. attenuata* se utilizaron semillas de la generación número 30, provenientes originalmente de plantas salvajes del desierto del Gran Cañón en Estados Unidos, provistas por el Dr. Ian Baldwin del Departamento de Ecología Molecular del Instituto Max Planck de Ecología Química, en Jena, Alemania.

Las semillas de *N. attenuata* fueron germinadas en el medio Gamborg's B5-Agar (Duchefa, Alemania), suplementado con los antibióticos correspondientes en los casos en que las semillas provenían de transformaciones estables. Previo a su siembra, las semillas fueron tratadas con giberelinas (GA<sub>3</sub>) y con humo líquido (Krügel y col., 2002) para inducir su germinación. Diez días luego de la germinación, las plantas fueron pasadas a macetas con tierra, y se crecieron en invernáculo con lámparas de sodio de alta presión (200-300 µmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>) a 26-28 °C 16 hs / 22-24 °C 8 hs con un 45-55 % de humedad.

#### **5- Transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana***

La transformación de plantas fue realizada mediante la técnica de *floral dip* (Clough y Bent, 1998). Para esto se utilizaron células de la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 transformadas con el plásmido binario de interés. Las plantas transformadas fueron seleccionadas por la resistencia a kanamicina presente en el vector utilizado (*pBI121* o *pKGWFS7*). Las plantas que sobrevivieron al antibiótico fueron analizadas también por PCR con los oligonucleótidos correspondientes a la construcción a verificar. Se procedió con la selección con al menos 15 líneas independientes para obtener plantas homocigotas en las generaciones T3 y T4, con las cuales se realizaron los análisis fenotípicos.

#### **6- Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana***

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* crecidas en tierra durante 25 días para transformar sus hojas. Se aplicó la técnica que utiliza por *A. tumefaciens* e infiltración con jeringa (adaptado

de de Felippes y Weigel, 2012). Las bacterias se crecieron con agitación constante en medio LB a 28°C conteniendo el plásmido binario con la construcción genética correspondiente. Al llegar a saturación, las células se centrifugaron a 2000 g por 10 min y se resuspendieron en medio de infiltración. Se mantuvieron en agitación a 28 °C durante 5 hs, luego se les midió la DO y se las diluyó en medio de infiltración hasta llegar a una DO de 0,4. En todos los casos se agregó al mismo tubo una suspensión de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 (proteína p19) a una DO final de 0,1. P19 es una proteína supresora del silenciamiento mediado por ARNs pequeños, ya que captura ARNs de 21-25 nucleótidos, inhibiendo su función (Canto y col. 2006; Westhof, 2004). Esta suspensión bacteriana se utilizó para transformar las hojas de *N. benthamiana* en la cara abaxial mediante la ayuda de una jeringa plástica de 2 ml. Luego de 48 hs se cortaron discos de las hojas infiltradas y se congelaron en nitrógeno líquido para su análisis. Para determinar la eficiencia de infiltración y transformación, se cuantificaron los niveles de expresión del gen de resistencia a kanamicina, que se inserta simultáneamente con la construcción en estudio.

## **7- Transformación de plantas de *Nicotiana attenuata***

### **7.1- Transformación transitoria-VIGS**

Las plantas salvajes crecieron en tierra, en macetas de 1 litro a 19 °C, en períodos de 16 hs de luz ( $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y manteniendo la humedad en un 65 %. El vector *pTV00* con la construcción *irHD20* y el vector vacío (*EV*, como control) fueron utilizados para transformar *A. tumefaciens* LBA4404. Las hojas de plantas de *N. attenuata* de 20 días fueron infiltradas con jeringa como se detalló en el apartado anterior. La eficiencia de silenciamiento fue evaluada por cuantificación del ARNm de *NaHD20* por qRT-PCR.

### **7.2- Transformación estable**

Se generaron plantas de *N. attenuata* que, transformadas de manera estable, llevaron a la obtención de líneas silenciadas en *NaHD20*. Esto se realizó utilizando el método de transformación mediada por *A. tumefaciens* vía elongación del hipocotilo y regeneración de la plántula (Krügel y col., 2002). Se utilizó la construcción *irHD20* en el vector *pSOL8*. Las plantas de la generación T1 se analizaron por qRT-PCR y por *Southern blot* (como se describe en Gilardoni y col., 2011) para elegir las líneas de trabajo. Se analizó la segregación de las semillas T2 germinadas en medio con antibiótico higromicina (0,025 mg/ml). Se eligieron dos líneas para el análisis ulterior.

## 8- Tratamientos a plantas de *N. attenuata*

### 8.1- Infección por patógenos

La infección por patógenos se realizó utilizando *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Katagiri y Thilmony, 2002). Se utilizaron plantas en estadio de crecimiento vegetativo (tres días antes del momento de *bolting*). Éstas se rociaron con una suspensión de estas bacterias. Se repitió el mismo tratamiento cuatro días después. Las plantas se mantuvieron en condiciones de humedad elevada para facilitar la infección.

### 8.2- Daño mecánico

El daño mecánico se realizó girando una rueda metálica de 2 cm de diámetro con puntas en el borde sobre la superficie de las hojas. Para el tratamiento con FAC (del inglés *Fatty Acids Conjugates*; N-linolenoil-ácido glutámico, ácidos grasos derivados de la saliva de *Manduca spp.*), se agregaron a la herida generada por la rueda metálica, 10  $\mu$ l de una solución de FAC (N-linolenoil-ácido glutámico) 0,03  $\eta$ mol/ $\mu$ l en 0,02 % (v/v) de Tween-20/agua.

### 8.3- Aplicación de hormonas en hojas

El Etefón (Sigma) fue rociado sobre las hojas de las plantas a tratar a una concentración de 1 mM en un 40 % (v/v) agua y con 0,02 % de Tween-20. Las hormonas JA, SA y ABA se rociaron sobre las hojas a una concentración de 100, 300 y 300  $\mu$ M respectivamente. Las plantas utilizadas como controles se rociaron con una suspensión de Tween-20 al 0,02 %.

### 8.4- Aplicación de hormonas en flores

Las flores fueron rociadas con una solución de ABA 1  $\mu$ g/ml en Tween-20 0,02 % (v/v). Se utilizó 1 ml por flor. Luego, estas flores fueron utilizadas para medir la acetona de bencilo emitida.

En otro ensayo las flores fueron cortadas y colocadas en tubos de centrifuga de 1,7 ml destapados. Los tubos contenían 100  $\mu$ l de una solución de ABA 1  $\mu$ g/ml o agua como control. Los tubos conteniendo las flores fueron colocados en frascos de vidrio de 5 cm de alto cerrados con tapa a rosca para luego medir la acetona de bencilo emitida.

### 8.5- Estrés hídrico severo

Los ensayos de estrés hídrico severo se hicieron con plantas en estadio vegetativo (tres días antes del *bolting*) regadas hasta saturación. El exceso de agua fue retirado y se dejó de regar durante 18 días. Después de ese tiempo, se regaron nuevamente.

### 8.6- Estrés salino

El estrés salino se aplicó en plantas en estadio reproductivo. Las mismas fueron irrigadas día por medio con diferentes soluciones de NaCl en este orden: NaCl 75 mM dos veces, 150 mM tres veces y 300 mM cuatro veces. Al regarlas se dejó que las plantas absorbieran el volumen necesario de solución y luego se retiró el exceso de líquido.

## 9- Tratamientos a plantas de *A. thaliana*

### 9.1- Estrés hídrico moderado

El tratamiento de estrés hídrico moderado o leve (EHL) se aplicó a las plantas de *Arabidopsis* de 21 días saturadas de agua, justo después de pasar al estadio reproductivo. A partir de ese momento, las macetas se pesaron cada 3 días y se las regó con el agua suficiente para emparejar el peso de todas las macetas, tomando como patrón la de mayor peso en cada oportunidad. Siguiendo este protocolo, a los 10 días del tratamiento las macetas alcanzaron un peso de 70 g. A partir de ese momento las macetas se regaron para mantener ese peso y el grado de estrés. Las plantas se mantuvieron hasta la toma de muestras de las hojas o hasta la cosecha de las semillas, según el caso.

### 9.2- Estrés osmótico

Las semillas germinaron en placas de MS-Agar. A los 5 días fueron pasadas a placas de MS-Agar que contenían manitol 300 mM para generar estrés osmótico. Las plantas utilizadas como controles se pasaron a otra placa, sin manitol. Luego del tiempo indicado en las figuras correspondientes, se tomaron las muestras para procesar.

## 10- Cuantificación de transcritos por transcripción reversa y PCR en tiempo real

### 10.1- Extracción de ARN total

El ARN de las plantas fue preparado con el reactivo Trizol® según las instrucciones del fabricante (Invitrogen™) para muestras de *N. attenuata*, y con una versión casera del mismo reactivo para las muestras de *Arabidopsis*. Las extracciones se hicieron con 50-100 µg de tejido vegetal previamente pulverizado con nitrógeno líquido en un mortero estéril. El polvo fino se transfirió a un tubo de tipo Eppendorf en el cual se agregó 1 ml del reactivo Trizol. Tras mezclar por inversión varias veces, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min antes de agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar durante 15

min a 12.000 g a 4 °C. La fase acuosa fue precipitada con 1 volumen de isopropanol durante 10 min a -20 °C. Tras un lavado con etanol 70 % (v/v) y secado del precipitado, éste se lo disolvió en 60 µl de agua bidestilada estéril.

### 10.2- Transcripción reversa seguida de PCR (qRT-PCR)

La reacción de retrotranscripción (RT) fue realizada con 1 µg de ARN y la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega™). La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó en un termociclador Mx3005P (Stratagene, La Jolla, CA, USA), en un volumen final de 20 µl conteniendo 8 pmol de cada oligonucleótido específico (tabla M1), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µl de una dilución 1/20 de la reacción de RT y 0,05 µl de Platinum® Taq (Invitrogen™). La fluorescencia fue medida a 72 °C durante 40 ciclos de PCR. Como genes de referencia se usaron *ACTINA2* y *ACTINA8* para muestras de *Arabidopsis* (Charrier y col., 2002) y *Elongation factor* (NaeEF1A) para *N. attenuata* y *N. benthamiana* (Gilardoni y col., 2010). Se utilizó el método de  $\Delta\Delta C_t$  para expresar los valores obtenidos. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones se encuentran en la tabla M1.

### 11- Análisis del transcriptoma de *N. attenuata* mediante un ensayo de microarreglos

Para el ensayo de microarreglos se utilizaron las corolas de las plantas salvajes e *irHD20*. A las 12 del mediodía se tomaron las corolas de flores que abrirían esa noche. Se utilizaron 3 corolas por muestra y el ensayo se realizó con triplicados biológicos. Se extrajo el ARN total como se describe en la sección 10.1. Se trataron las muestras con ADNasa siguiendo las instrucciones del proveedor (Turbo DNase; Ambion, Europe). El ARN fue purificado utilizando columnas *RNeasy MinElute* (Qiagen, Hilden, Germany) y se controló su calidad con un kit comercial *RNA 6000* (Agilent, Santa Clara, CA) utilizando *Agilent 2100 Bioanalyzer*. El ARN total se utilizó para generar ADNc marcado con el kit *Quick Amp labeling* (Agilent). Se utilizó el kit *Gene Expression Hybridization kit* (Agilent) siguiendo las instrucciones del proveedor para hibridizar el ARNc marcado en el microarreglo de *N. attenuata* que contiene 43.533 secuencias (microarreglo Agilent custom-designed 44 K 60mer; Kallenbach y col., 2011; Gilardoni y col., 2011). El arreglo se escaneó con Agilent G2565BA. Los datos fueron tomados mediante el software *Agilent Feature Extraction* (version 9.5) y analizados con el software *SAM (Significance Analysis of Microarray)*, Tusher y col., 2001). Los cambios en la expresión génica fueron considerados significativos cuando el cociente o factor de diferencia (FC, del inglés *fold change*) fue igual o mayor a 1,9, o igual o menor a 0,6. La clasificación de genes regulados se realizó utilizando el

software Blast2GO (Conesa y col., 2005). Los datos del microarreglo se pueden consultar en Ré y col., 2012 (NCBI GEO: GSE33682, archivo adicional 5).

## 12- Extracción y cuantificación de fitohormonas

Para el análisis de las fitohormonas JA, JA-Ile, SA y ABA, se trituró 0,1 g de tejido congelado en nitrógeno líquido y luego se hizo una extracción con 1 ml de etil-acetato conteniendo 0,1 µg de [9,10-2H<sub>2</sub>]dihidro-JA, [13C<sub>6</sub>]JA-Ile, [2H<sub>4</sub>]SA, o [2H<sub>6</sub>]ABA. El homogenado se centrifugó durante 15 min a 4 °C, 13.200 g. La fase superior orgánica se separó en otro tubo y el precipitado se re-extrajo con 0,5 ml de etil-acetato. Se combinaron las fases orgánicas y se evaporaron hasta secarse en un rotor aplicando vacío. Los residuos secos se resuspendieron en 0,2 ml de metanol/agua al 70 % v/v para su análisis en un sistema Varian 1200 Triple-Cuádruple-LC-MS (Varian, Palo Alto, CA). En una columna ProntoSIL (C18-ace-EPS, 50 x 2 mm, 5 µm, 120 Å, Bischoff, Leonberg, Germany) conectado a una pre-columna (C18, 4 x 2 mm, Phenomenex, Torrance, CA) se inyectaron 10 µl de la muestra. Como fases móviles se usaron 0,05 % ácido fórmico en agua (solvente A) y metanol (solvente B) en forma de gradiente. Los compuestos se detectaron mediante ionización por *electrospray* (ESI) y con monitoreo de reacciones múltiples.

## 13- Cuantificación de la hormona etileno

Los niveles de etileno (ET) se analizaron mediante espectrometría fotoacústica (INVIVO; <https://www.invivo-gmbh.de>) siguiendo el método descrito en Korner y col., 2009. El material vegetal fresco fue colocado en frascos de vidrio de 100 ml que fueron sellados durante 5 hs previo al análisis. Las hojas a medir, con daño mecánico o sin daño como control fueron introducidas inmediatamente luego del tratamiento en los frascos de vidrio; las flores esterilizadas y polinizadas a mano, fueron colocadas en los frascos inmediatamente luego de la polinización utilizando 5 corolas por muestra. Luego de las mediciones se utilizó un software proporcionado por el fabricante del equipo para analizar los datos obtenidos.

## 14- Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios

Las hojas a analizar fueron congeladas en nitrógeno líquido. Aproximadamente 0,2 g de tejido se extrajo con 1 ml de buffer de extracción (40 % v/v metanol y 0,1 % v/v ácido acético). Las muestras se centrifugaron (16.000 g) durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a

un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente para eliminar partículas sólidas. Las muestras se analizaron en HPLC-1100 (Agilent) usando una columna Chromolith FastGradient RP18e (5032 mm; Merck, Darmstadt, Germany) unida a una pre-columna Gemini NX RP18 (234.6 mm). Los solventes utilizados fueron: A (0.1 % v/v ácido fórmico/agua; 0.1 % v/v hidróxido de amonio/agua pH 3.5) y B (metanol). El gradiente de solventes fue 0 % B por 0.5 min, a 80 % solvente B en 6.5 min y luego mantenido constante durante 3 min. El flujo fue de 0.8 ml/min, inyectando 1 µl, con la columna a 50 °C. El detector fue programado a 260 nm (nicotina), 210 nm [diterpen glucósidos (DTGs)], y 320 nm (caffeoilputrescina, caffeoilspermidina y ácido clorogenico).

#### 15- Cuantificación de la emisión de acetona de bencilo (BA)

Se capturaron los compuestos volátiles emitidos por las flores colocando una flor en un recipiente plástico conectado a una trampa con filtro Super-Q (ARS, Filadelfia, PA) bajo un flujo de aire de 30 ml/min. Se colectaron los volátiles entre los horarios mencionados en las figuras. Para eluir, a las trampas se les agregaron primero 400 ng de tetralina como estándar interno, y la elución se realizó con 250 µl de diclorometano. El análisis de los volátiles fue realizado por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS) con un CP-3800 GC (Varian, Palo Alto, CA, USA) en una columna DB-Wax (Agilent, Waldbronn, Alemania). La BA fue identificada comparando los tiempos de retención y el espectro de masas con un estándar comercial (Sigma, Taufkirchen, Alemania). Se integraron las áreas de los picos y se normalizaron respecto al área del estándar.

La BA también se analizó mediante zNOSE<sub>TM</sub> (*Electronic Sensor Technology*, Newbury Park, CA), como se describe en Kessler y col., 2010. En este caso, cada flor se analizó cada 2 hs, en los horarios señalados en las figuras correspondientes. La aguja del equipo se acercó a las flores, o se introdujo en los frascos correspondientes para determinar la BA en el área circundante lo más cercana al borde de la corola posible. La intensidad del área del pico de BA se utilizó para cuantificar los niveles de BA por flor.

#### 16- Ensayo histoquímico para determinar actividad glucuronidasa (GUS)

Los ensayos de actividad de *GUS in situ* fueron realizados siguiendo la metodología descrita por Jefferson y col. (1987). Las plantas enteras o fragmentos de ellas fueron sumergidos en solución de tinción: fosfato 100 mM a pH 7, Tritón X-100 al 0,1 %, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-

3-indolyl- $\beta$ -ácido glucurónico) 1 mM. Luego de 5 min de infiltración por vacío se incubaron toda la noche a 37 °C. Para una mejor visualización los tejidos se clarificaron con etanol 70 %.

Las muestras decoloradas fueron fotografiadas usando una cámara digital Coolpix 995 (Nikon) montada sobre un microscopio Eclipse E200 (Nikon) o sobre una lupa binocular SMZ800 (Nikon), y posteriormente procesadas con el programa Adobe Photoshop CS3.

#### **17- Análisis de crecimiento de raíces**

Las plantas de *Arabidopsis* fueron germinadas y crecidas en placas de MS-Agar, como se detalla en la sección 4.1. Las placas fueron colocadas, en la cámara de cultivo, en posición vertical para luego observar el desarrollo radicular. A los tiempos establecidos para el ensayo e indicados en las figuras las placas se fotografiaron y se analizaron con el programa ImageJ (Scheider y col., 2012).

#### **18- Análisis del consumo de agua**

Se realizó el ensayo de EHL en forma similar a la descrita en la sección 9.1, pero manteniendo el peso de las macetas en 80 g. Se cuantificó el agua agregada a cada maceta para emparejar todas. Al final del ensayo, cuando finaliza el ciclo de vida de la planta, se sumó el total de agua agregada a cada maceta para tomarlo como consumo de agua total durante el EHL.

#### **19- Ensayo de producción de semillas**

Para realizar los ensayos de producción las plantas se hicieron crecer hasta la madurez de a una por maceta (8 x 7 cm). Al observarse una vaina seca, las ramificaciones se envolvieron en una bolsa de papel dejando libres las hojas de roseta. Al secarse la última hoja de roseta, se cortó la planta en la base de las ramificaciones. Todo el material dentro de la bolsa de papel se dejó secar durante 7 días dentro de la cámara de cultivo. Finalmente, se procedió a limpiar las semillas de vainas y tallos secos y las semillas fueron pasadas a tubos que se pesaron antes y después de ser llenados. El valor de la diferencia de peso se consideró la producción.



## 20- Determinación del área foliar

Para realizar los ensayos de área foliar, las plantas se hicieron crecer hasta el estadio correspondiente a cada ensayo, de a una por maceta (8 x 7 cm). La roseta completa se cortó, se pesó, y se utilizó para tomar fotografías utilizando una cámara digital Coolpix 995 (Nikon). Éstas fueron procesadas posteriormente con el programa ImageJ para calcular el área total. Las fotografías fueron utilizadas también para determinar el área no verde en los ensayos de senescencia.

## 21- Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El tejido de 100 mg de hojas congeladas con nitrógeno líquido se trituroó en un mortero 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 30-60 min, tiempo en el cual los sólidos de la mezcla decantaron. Luego se midió la absorbancia a 645 y 663 nm de los sobrenadantes utilizando un espectrofotómetro. La concentración de clorofila total se calculó aplicando la siguiente ecuación formulada por Chory y col., 1994:

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

## 22- Cuantificación del intercambio de agua y de CO<sub>2</sub>

Para medir el intercambio de agua y de CO<sub>2</sub> de las hojas de plantas de Arabidopsis salvajes y transgénicas se utilizó un instrumento de análisis de gases o IRGA (*Infrared Gas Analyzer*; LI-6400XT). Se ajustaron los parámetros flexibles de la siguiente manera: 600 PAR (10 % luz azul); 300 mol/s de flujo de aire; 500 μmol CO<sub>2</sub>/mol aire; 23 °C temperatura del bloque, siguiendo las instrucciones del proveedor.

## 23- Ensayos de pérdida de agua

Las hojas se escindieron y pesaron inmediatamente (peso inicial); luego se dejaron hasta 2 hs en papel secante, pesando cada hoja cada 10 min. Se consideró la pérdida de agua como la disminución gradual del peso.

**24- Análisis de estomas**

Para este ensayo se utilizaron plantas de *Arabidopsis* de diferentes genotipos mutantes y transgénicos sobre fondo genómico Col-0. Se apoyó delicadamente sobre la cara abaxial de las hojas una cinta adhesiva transparente que se retiró suavemente. Cuando fue necesario, se utilizó una pinza para retirar la hoja, de manera de dejar sobre la cinta adhesiva una impronta de la epidermis. Una vez obtenida la cinta adhesiva con la impronta, se pegó sobre un portaobjetos y se observó al microscopio óptico con aumentos totales de 100 x y 450 x para fotografiar la huella de los estomas. Las fotografías se tomaron con la cámara digital Coolpix 995 (Nikon) y procesaron con el programa ImageJ para calcular el número de estomas y la apertura de los mismos.

**25- Soluciones utilizadas**

\*LB: Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l (pH 7,0). Para preparar el medio sólido se añade 15 g/l de agar.

\*Medio de infiltración para transformación transitoria de *N. benthamiana*:

MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Acetosiringona 150 µM, suspensión de *A. tumefaciens* con el plásmido para la transformación, DO final de 0,5.

\*TRIZOL casero: Preparación de fenol ácido

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

**26- Secuencias de oligonucleótidos utilizados (Tabla M1)**

Los oligonucleótidos utilizados para clonados y para qRT-PCR se enumeran en la siguiente tabla:

Para clonados	Nombre	Secuencia 5'- 3'
	HD20 F	GATATGTTTGATGGAGGGG

HD20 R	ACTAAAAACCACTATTGAGATCC
HD20-VIGS F	GCGGCGGTTCGACAGCAACTCGAGAGGGATTACAAC
HD20-VIGS R	GCGGCGGGATCCCTGTCATCATCTGAAATTACACC
HD20ir F	TCATTTGACTTATCAGAGCATGG
HD20ir R	AGACGCTGGCATCTGATCATATG
AT7cF	GCGGGATCCATGACAGAAGGTGGAGAATATTC
AT7cR	GCGGAGCTCTCATGACCAAAAATCCCGCCAAG
AT12 cF	GCCTCTAGACTGGTGAAAACCATGGAAGA
AT12 cR	GCCGGATCCGCTTTTATGACCAAAACTCC
12y7miR-I	GATACCATATAGCCACTTGGCTCTCTCTTTTGTATTCC
12y7miR-II	GAGAGCCAAGTGGCTATATGGTATCAAAGAGAATCAATGA
12y7miR-III	GAGAACCAAGTGGCTTTATGGTTTCACAGGTCGTGATATG
12y7miR-IV	GAAACCATAAAGCCACTTGGTTCTCTACATATATATTCCT
amiRNA-A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
amiRNA-B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
p12 F	CACCGTTCTTTTCATTTTTGATAT
p12 R	TGACCAAAACTCCCACCAGT
p7 F	CACCTTAAAGAAGTAGGGTAAGATTGTTGGCCAC
p7 R	TGACCAAAAATCCCGCCAAGGGTAATTGTTGCTGG
<b>Para qRT-PCR</b>	
ATHB12 qF	CCAGAAGGGAGGTTAGACCA
ATHB12 qR	GCTTTCTCCACAATGTTTCATCA
ATHB7 qF	CAACTTGGCTTCTCAGTTCCG
ATHB7 qR	TAGAGCAACCACCGTTG
Na-HD20 Fw	CCGAGAAAGAAGGTGGACAGTATTG
Na-HD20 Rv	AGCCGAATAATCAGCCTTTATGC
NCED3 qF	ACAGCCGACCCACGTGTCCA
NCED3 qR	CGACAAGCGTAACTTGC GGAGC
NaOSM F	CTGCGACTATCGAGGTCCGAAAC
NaOSM R	GTACCTCGTGGTGCATTGATCAC
NaLTP1 F	GCTAACGCCCCATGCAGACGCT
NaLTP1 R	GTGCACCGTGGAGCAGTCAATGG
Na-Chal1 Fw	TCATTTGGATAGTATGGTCGGG
Na-Chal1 Rv	ACCGTTGATAGCGCCATCGC
Na-CK Fw	TTCTCTGTTACCTGCTTCAACC
Na-CK Rv	CTACACAGAGATCCGAAGGAG
Na-SAMT/BAMT Fw	AAGCAATGGCCAAAAGCAGTCGC
Na-SAMT/BAMT Rv	TTCGTAGAACGCCGGCAACGAC
Na-DFR Fw	GGCAGCGCCAACGGTTTGC
Na-DFR Rv	TCAAGTCCGCTTTCCACAGCGTC
Na-PP2C Fw	TCCCGTCGGCCACTTACCTCC
Na-PP2C Rv	CATGGTTGCTCGCCATCCTTGC
NewgusF	TGCGGACTTACGTGGCAAAGGAT
NewgusR	AAGCCGACAGCAGTTTCATCA

## **CAPÍTULO 1**

No siempre obtendrás lo que quieres, pero sí lo intentas por un tiempo,  
verás que obtienes lo que necesitas  
(Mick Jagger)

## CAPÍTULO 1. NaHD20 regula el desarrollo de flores, su apertura y la emisión de compuestos volátiles

### Introducción

#### 1- *Nicotiana attenuata* como modelo de estudio

*Nicotiana attenuata* es una planta salvaje que germina luego de los incendios en el desierto del Gran Cañón al sudoeste de EEUU (Baldwin y Morse, 1994). Ésta es una especie utilizada como modelo para el análisis de respuestas hormonales a diversos factores. Como mencionamos en la introducción general, las hormonas vegetales participan en cascadas de señales de la regulación transcripcional de un gran número de genes, y por ende, en numerosas respuestas a las condiciones ambientales. A su vez, los mecanismos de biosíntesis y percepción de las hormonas en las diversas células están regulados fuertemente. Estos mecanismos varían con la edad de las plantas, las condiciones de crecimiento y los factores externos que puedan influir sobre el desarrollo. *N. attenuata* es una especie que, por sus características, es también utilizada en estudios de interacción con otras plantas, otros organismos, y con el ambiente. A modo de ejemplo, los estudios específicos realizados en plantas de *N. attenuata*, lograron demostrar la importancia de los metabolitos de defensa ante el ataque de herbívoros (Gulati y col., 2013). Las plantas que son atacadas por herbívoros también acumulan en sus hojas otro tipo de moléculas además de fitohormonas, críticas en las respuestas de defensa. Estas moléculas son conocidas como metabolitos secundarios; entre ellos se cuentan el 17-hidroxigeranillinalol diterpeno glicósido, la nicotina, los conjugados de fenilpropanoides-poliamina y los inhibidores de proteasas, que tienen efectos sobre el herbívoro atacante deteniendo el ataque. Varios autores han informado que las plantas que producen menores cantidades de estas moléculas tienen disminuida su capacidad para sobrevivir a un ataque por *Manduca sexta* (Steppuhn y col., 2004; Zavala y Baldwin, 2004; Jassbi y col., 2008; Kaur y col., 2010).

En su ambiente natural, las plantas de *N. attenuata* están expuestas a cambios bruscos en las condiciones de crecimiento como resultado de la aparición impredecible de herbívoros y patógenos, o cambios desfavorables de temperatura y disponibilidad de agua. Estos cambios suelen afectar negativamente su crecimiento y reproducción, por lo que las plantas deben reacomodar rápidamente su metabolismo, crecimiento y programa de desarrollo. La regulación de los eventos de desarrollo y de respuestas a cambios en el ambiente es fundamental para el desarrollo óptimo de las plantas. Como mencionamos en la introducción

general, los factores de transcripción son los responsables de un gran porcentaje de regulaciones de estos eventos críticos.

## 2- Los factores de transcripción HD-Zip I de *N. attenuata*

El estudio funcional de los FTs vegetales ayuda a la comprensión de los mecanismos de respuesta y regulación que ocurren en las plantas durante el desarrollo y frente a distintos tipos de estrés. Estos estudios funcionales utilizan herramientas de Biología Molecular como la generación de plantas transgénicas o mutantes. La generación de una línea estable modificada genéticamente para que no exprese o para que sobre-exprese el FT a analizar, permite analizar cómo varía el transcriptoma, las hormonas o la morfología por la alteración de la expresión del FT en estudio, y esos análisis proveen fuertes indicios sobre su función.

En cuanto a *N. attenuata*, hasta el momento se sabe muy poco de la funcionalidad de los FTs de esta especie, de la cual aún no se cuenta con el genoma secuenciado. Como vimos en la introducción general de este trabajo, los miembros de la subfamilia HD-Zip I de distintas especies han sido vinculados tanto con el desarrollo vegetal como las respuestas a distintos tipos de estrés (Ariel y col., 2007a). Entre ellos, AtHB12 y AtHB7 del grupo 1C se expresan fuertemente en condiciones de estrés hídrico y también en las flores de *Arabidopsis thaliana*, aunque no se han realizado estudios funcionales de estos FTs en flores o estadios avanzados de desarrollo.

Los FTs HD-Zip I estudiados hasta el momento provienen mayoritariamente de *Arabidopsis* y algunos de otras especies como girasol, arroz, craterostigma, algodón y cebada. La expresión de estos FTs está regulada por factores abióticos o bióticos en todos los casos y en algunos se ha establecido una función en la respuesta a estos factores. Nos resultó de interés abordar el estudio de FTs de tipo HD-Zip I en *N. attenuata* e investigar si los mismos tienen alguna función en los mecanismos de respuesta a herbívoros y a estrés abiótico.

Hasta el momento no hay información sobre los HD-Zip I de *N. attenuata*, por lo que nos resultó particularmente interesante para este trabajo de Tesis. Los HD-Zip I de esta especie no fueron incluidos en el análisis realizado por Arce y col. (2011), pero por homología de secuencias se pueden identificar aquellos genes que se agrupan en cada clado, definido en ese análisis filogenético (Arce y col., 2011).

## Resultados

### 1- Identificación de factores de transcripción HD-Zip I de *N. attenuata* cuya expresión se induce por múltiples condiciones de estrés

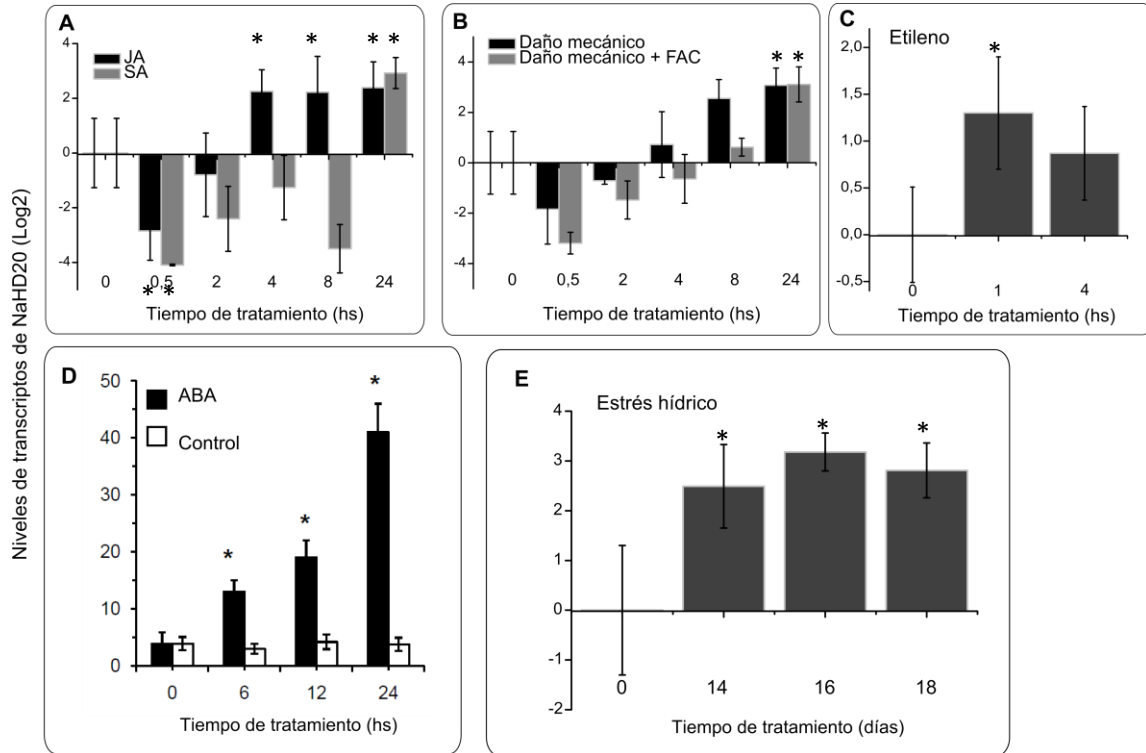
Como paso inicial nos planteamos identificar factores de transcripción HD-Zip I involucrados en la regulación del crecimiento y desarrollo afectados por estrés biótico y abiótico. De acuerdo con el objetivo principal del trabajo de Tesis de evaluar la funcionalidad de FTs HD-Zip I y la relevancia de ciertos motivos putativos, se optó por identificar miembros que pertenezcan al grupo IC (Arce y col., 2011). Al no contar con información sobre el genoma o transcriptoma de *N. attenuata*, se utilizó la base de datos pública de factores de transcripción de *Nicotiana tabacum*, especie que presenta un 90-95 % de identidad en sus secuencias de ADN con las de *N. attenuata* (TOBFAC, Rushton y col., 2008). Se procedió a realizar un análisis básico de alineamiento de secuencias (BLAST) utilizando los HD-Zip I del grupo IC de *Arabidopsis* (AtHB12 y AtHB7), lo que permitió identificar cuatro genes de este grupo en *N. tabacum* (NtHD-1, -20, -34 y -48). Se diseñaron cebadores específicos (Tabla M1) basándonos en las secuencias de *N. tabacum* y los mismos se utilizaron en ensayos de transcripción reversa y PCR cuantitativa (qRT-PCR) sobre ARN de plantas de *N. attenuata*. Se realizaron tratamientos de daño mecánico y de daño mecánico + FAC (del inglés *Fatty acid-Aminoacid Conjugates*, metabolitos que provienen de la saliva de larvas de *Manduca sexta* y emulan el ataque de insectos). También se aplicó estrés hídrico y tratamientos con hormonas relacionadas al estrés biótico como son JA y SA (el detalle de los tratamientos se describe en la sección de Materiales y Métodos). Se midieron los efectos de estos tratamientos sobre la expresión de los genes HD-Zip identificados. Para tres de los cuatro genes analizados (*NaHD1*, *NaHD34* y *NaHD28*) no se observaron cambios significativos en ninguna de las condiciones ensayadas, pero sí para *NaHD20*, que se analiza en detalle a continuación.

### 2- El gen *NaHD20* de *Nicotiana attenuata*

De los genes de *N. attenuata* que codifican proteínas HD-Zip I y que se pueden clasificar filogenéticamente en el grupo IC uno mostró una expresión afectada por los tratamientos aplicados, éste comparte una identidad de secuencia aminoacídica mayor al 95 % con *NtHD20* de *N. tabacum*, por lo que fue nombrado *NaHD20*.

Los resultados indicaron que la expresión de *NaHD20* en hojas se induce de manera tardía, 4 hs luego de aplicado el tratamiento, por daño mecánico, daño mecánico + FAC y por JA

(Figura 1A y B). La expresión de *NaHD20* se reprime en tiempos cortos (de 0,5 a 8 hs luego de aplicado el tratamiento) y luego se induce por SA (a las 24 hs de aplicado el tratamiento; Figura 1A) y muy levemente por ET (Figura 1C). Los transcritos de *NaHD20* también aumentan entre dos y seis veces por ABA y también por déficit de agua (Figura 1D y E). No se evaluó el efecto de otras hormonas.



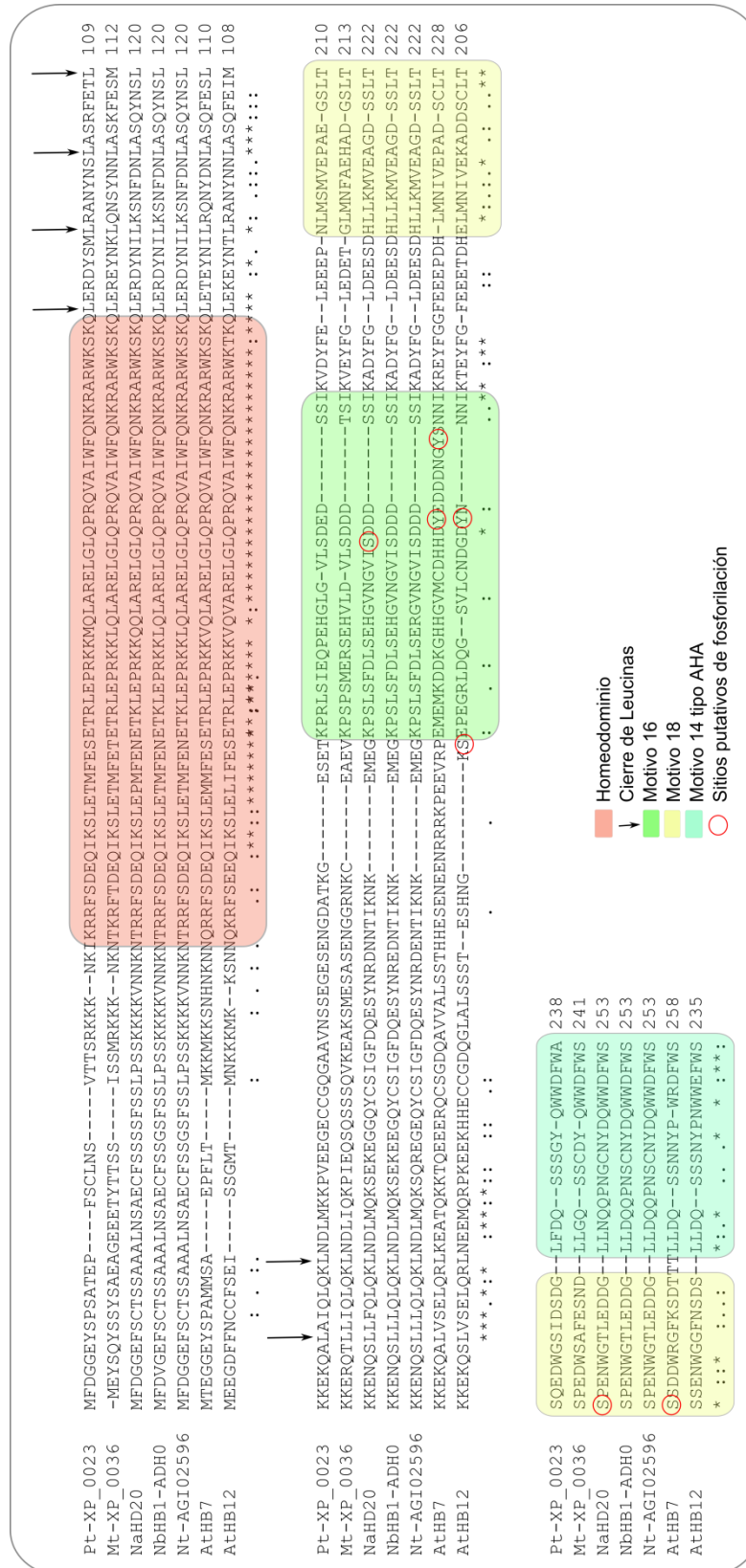
**Figura C1. 1. Cuantificación de transcritos de *NaHD20* en plantas salvajes de *N. attenuata*.** Tratamiento con JA 100  $\mu$ M, SA 300  $\mu$ M, daño mecánico y daño mecánico + FAC, Etefón 1 mM, ABA 300  $\mu$ M, estrés hídrico fuerte. Las muestras se tomaron a las horas/días indicadas en la figura luego de iniciado el tratamiento. Se procesaron para extracción de ARN y RT-qPCR. Se utilizó *NaEF-1* como gen normalizador, los valores se expresan relativos al valor del tiempo 0 como  $\log_2$ , mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Las barras de error indican la desviación estándar de los valores tomados de tres muestras biológicas; \* indican *t-test*  $P < 0,05$ .

Se aisló la secuencia codificante completa de *NaHD20*, utilizando ARN de plantas de *N. attenuata* y oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia de *NtHD20* (Tabla M1). Una vez aislado y clonado el ADNc correspondiente a *NaHD20* se determinó su secuencia y se la comparó con las bases de datos disponibles utilizando *BLASTp*. Los seis genes más cercanos encontrados mediante *BLASTp* se utilizaron para realizar un alineamiento con *ClustalW 2.1*. Dos de estos genes presentaron un 96 % de identidad de secuencia y pertenecían a *N. tabacum* y *N. benthamiana*, otros dos presentaron un 56 % de identidad y son de *Populus trichocarpa* y *Medicago truncatula*, y los últimos dos, un 50 % de identidad, son de *Arabidopsis*



*thaliana*: *AtHB12* y *AtHB7*. En la Figura 2 se muestra el alineamiento, en el que se marcaron los dominios HD y Zip, así como los motivos compartidos por estos genes fuera del HD-Zip, hacia la región carboxilo-terminal (CTR). A estos motivos del CTR se les asignaron los números 14, 16 y 18, en el conjunto de motivos conservados presentes en las proteínas del grupo 1C de HD-Zip I. De estos tres motivos conservados, sólo el nombrado como 14 tiene una función conocida. Es un motivo de tipo AHA, con aminoácidos Aromáticos-Hidrofóbicos grandes-Acídicos, descritos previamente como motivos de activación transcripcional (Döring y col., 2000).

Debido a su cercanía filogenética con *AtHB12* y *AtHB7*, objetos de estudio de esta tesis, y a la regulación por hormonas y distintos tipos de estrés observada, se decidió profundizar en el análisis de *NaHD20*.

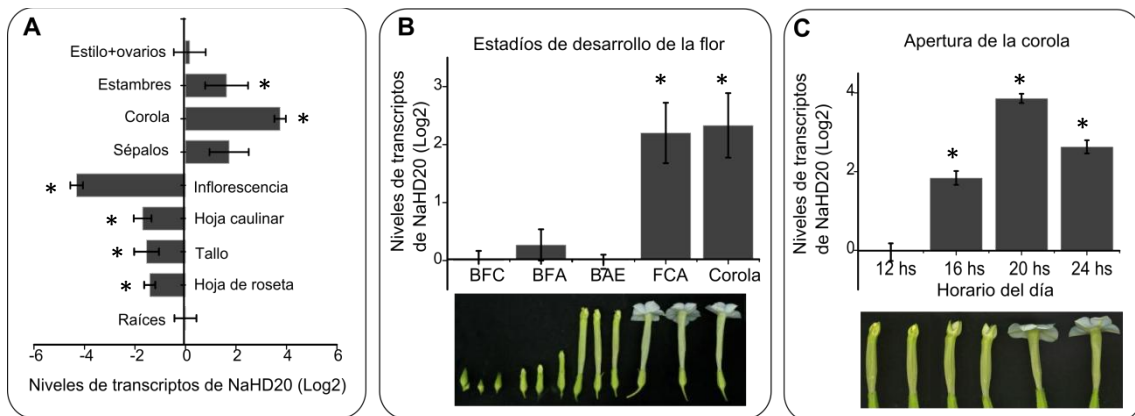


**Figura C1. 2. Alineamiento de la secuencia proteica de NaHD20 con seis homólogos cercanos.** Se utilizó *ClustalW 2.1*. Se marca el homeodominio (HD), el cierre de leucinas (Zip) y la región en la que se encontrarían los motivos putativos en el carboxilo-terminal (denominados con los números 16, 18 y 14 en referencia a Arce y col., 2011).

### 3- Los transcritos de *NaHD20* son abundantes en corolas

Con el objeto de determinar el patrón de expresión de *NaHD20* se inició el estudio evaluando los niveles de expresión de este gen en los diferentes tejidos de *N. attenuata*. Observamos que *NaHD20* se expresa en forma ubicua en la planta pero mayoritariamente en las corolas (Figura 3A). Las flores de *N. attenuata* son particularmente interesantes para estudios de interacciones ecológicas como mencionamos en la introducción de este capítulo.

Conociendo la particularidad del desarrollo y apertura de las flores de *N. attenuata*, se analizó la expresión de este FT en flores en distintos estadios de desarrollo y de apertura. Se tomaron capullos o brotes de flores aún cerrados (BFC), brotes florales recién abiertos (BFA), brotes abiertos y elongados (BAE) y flores con la corola abierta (FCA) para extraer ARN total y cuantificar los transcritos de *NaHD20*. Se observó que la mayor expresión de este FT se da cuando la flor comienza a abrir su corola, 4 veces más respecto a los brotes y flores cerradas (Figura 3B). Luego de esta observación se analizó en más detalle la expresión de *NaHD20* en la corola durante la apertura. Conociendo la cronología de apertura de las corolas (Kessler y col., 2010), se tomaron flores en distintos horarios, desde antes de que las corolas comenzaran a abrirse (12 del mediodía) hasta que estuvieran completamente abiertas (12 de la noche). El pico de expresión de *NaHD20* (16 veces) se produjo a las 20 hs. El valor basal fue tomado en el tiempo inicial (corola cerrada, 12 del mediodía).



**Figura C1. 3. Cuantificación de transcritos de *NaHD20* en plantas salvajes de *N. attenuata*.**

A- Muestras de diferentes tejidos de plantas salvajes. B- Muestras de los diferentes estadios de desarrollo de las flores de *N. attenuata* (BFC: brotes florales cerrados; BFA: brotes florales abiertos; BAE: brotes abiertos elongados; FCA: flores con corola abierta) y de la corola sola. Abajo, foto representativa de las flores en los cuatro estadios de desarrollo, tres flores por cada estadio. C- Cinética de expresión de *NaHD20* en corolas en apertura. Las muestras de corolas separadas de flores que abrían en ese día fueron tomadas en cuatro horarios diferentes del día. Abajo, foto de las flores con las corolas aún cerradas (12 del mediodía), comenzando a abrirse (16 hs) y totalmente abiertas (≈22 hs). Se procesaron para extracción de ARN y qRT-PCR. Se utilizó EF-1 como normalizador, los valores se expresan relativos al valor de

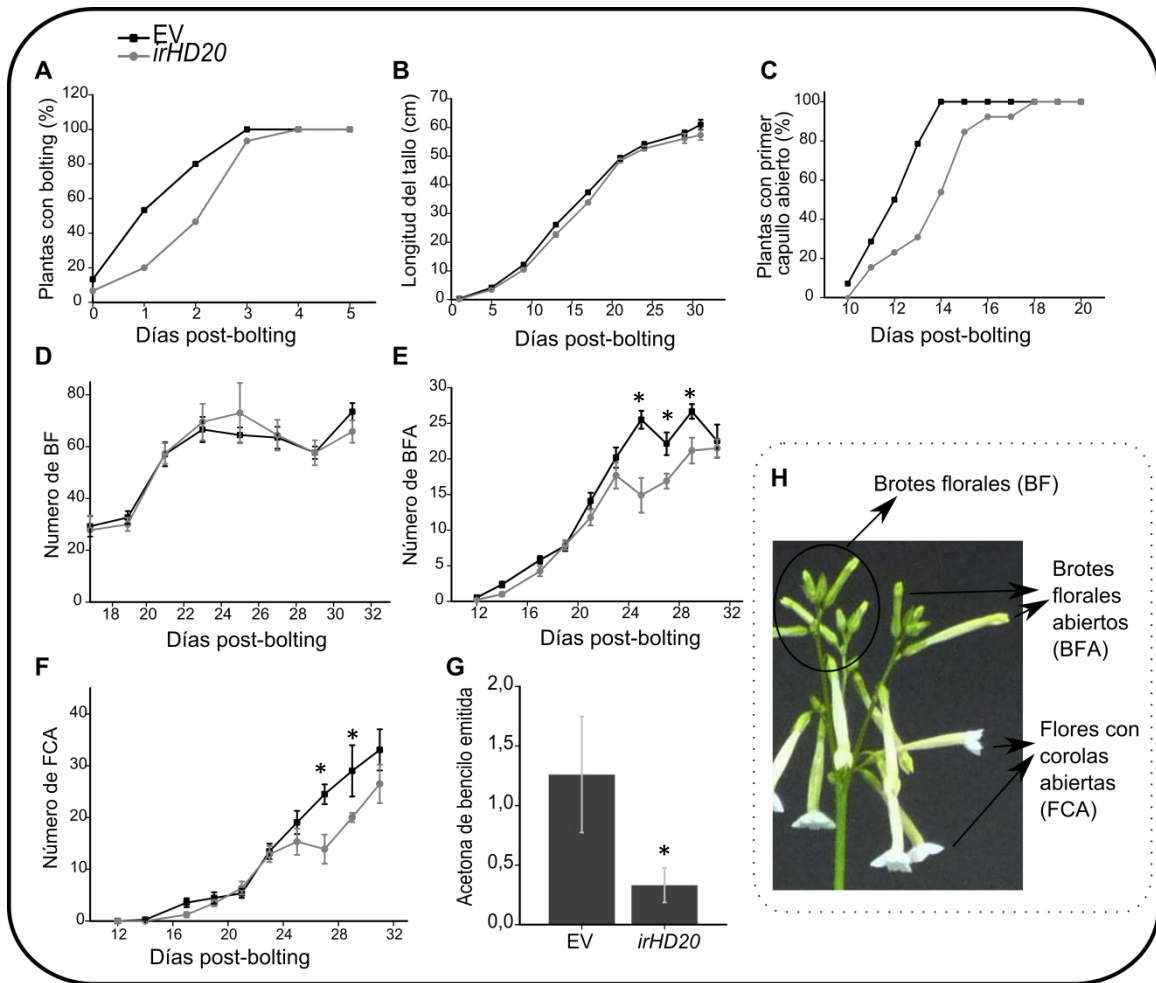
la muestra de raíces para A, de los BC para B y de las corolas a las 12 del mediodía para C, valores expresados como  $\log_2$ , mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Las barras de error expresan la desviación estándar de los valores obtenidos en tres muestras biológicas; \* indica *t-test*  $P < 0,05$ .

#### **4- NaHD20 es un regulador positivo de la transición del estadio vegetativo al reproductivo, y de la diferenciación de las flores en condiciones normales de crecimiento**

Se realizaron transformaciones transitorias, con *Agrobacterium tumefaciens*, de plantas de *N. attenuata* para silenciar la expresión de *NaHD20*. Se utilizó la construcción *irHD20* y un vector vacío como control (*EV*, del inglés *empty vector*) para realizar el silenciamiento por VIGS (del inglés *Virus Induced Gene Silencing*). Una vez obtenidas las plantas, se hizo una caracterización fenotípica que incluyó aspectos morfológicos, de desarrollo y moleculares.

Las plantas silenciadas (*irHD20*) crecidas en condiciones normales mostraron una demora significativa en el pasaje al estadio reproductivo o *bolting*. Las plantas *irHD20* alargaron el tallo entre 1,5 y 2 días más tarde que las transformadas con la construcción EV (Figura 4A), pero luego mantuvieron el crecimiento del tallo sin diferencias con los controles (Figura 4B). Por otro lado, el momento de apertura del primer brote floral se retrasó en las plantas *irHD20* al igual que el momento de *bolting* (Figura 4C).

El número total de capullos o brotes florales (BF) entre los días 16 y 32 luego del *bolting* fue el mismo para las plantas control y las silenciadas (Figura 4D). En cuanto al número de brotes florales abiertos (BFA) y flores con corolas abiertas (FCA), las plantas silenciadas en *NaHD20* tuvieron un 30 % menos de BFA (Figura 4E) y de FCA (Figura 4F) que las plantas transformadas con EV a partir de los 20-23 días *post-bolting*. Al observar diferencias en la apertura de las flores, sabiendo que este evento está vinculado fuertemente con la emisión de BA, se decidió evaluar si los niveles de BA emitidos por las corolas estaban afectados en las plantas *irHD20*. En este ensayo encontramos que efectivamente, las flores al momento de abrirse emiten un 60% menos de BA si *NaHD20* se encuentra silenciado (Figura 4G).



**Figura C1. 4. Efecto del silenciamiento de *NaHD20* en la floración y el desarrollo de las flores de *N. attenuata*.** A- Porcentaje de plantas con botón floral. B- Crecimiento del tallo a lo largo del desarrollo de la planta. C- Porcentaje de plantas con la primera flor, o primer brote floral abierto. D- Número total de brotes florales a lo largo del desarrollo de la planta. E- Número de brotes abiertos. F- Número de flores desarrolladas con la corola abierta. Las líneas negras representan plantas transformadas con EV y las líneas grises plantas *irHD20*; los valores representan % de plantas (A y C) o el promedio del número total por cada planta (B, D, E y F). Se utilizaron entre 10 y 15 plantas. G- Niveles de BA emitida por las corolas de flores nocturnas, al momento de abrirse. Se utilizaron 8 flores de 3 plantas diferentes. H- Foto que representa las flores en sus diferentes estadios de desarrollo. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de ocho muestras biológicas; \* indican *Mann-Whitney U-test*;  $P < 0,05$ .

## 5- Respuestas de las plantas *VIGS-irHD20* a diferentes tratamientos

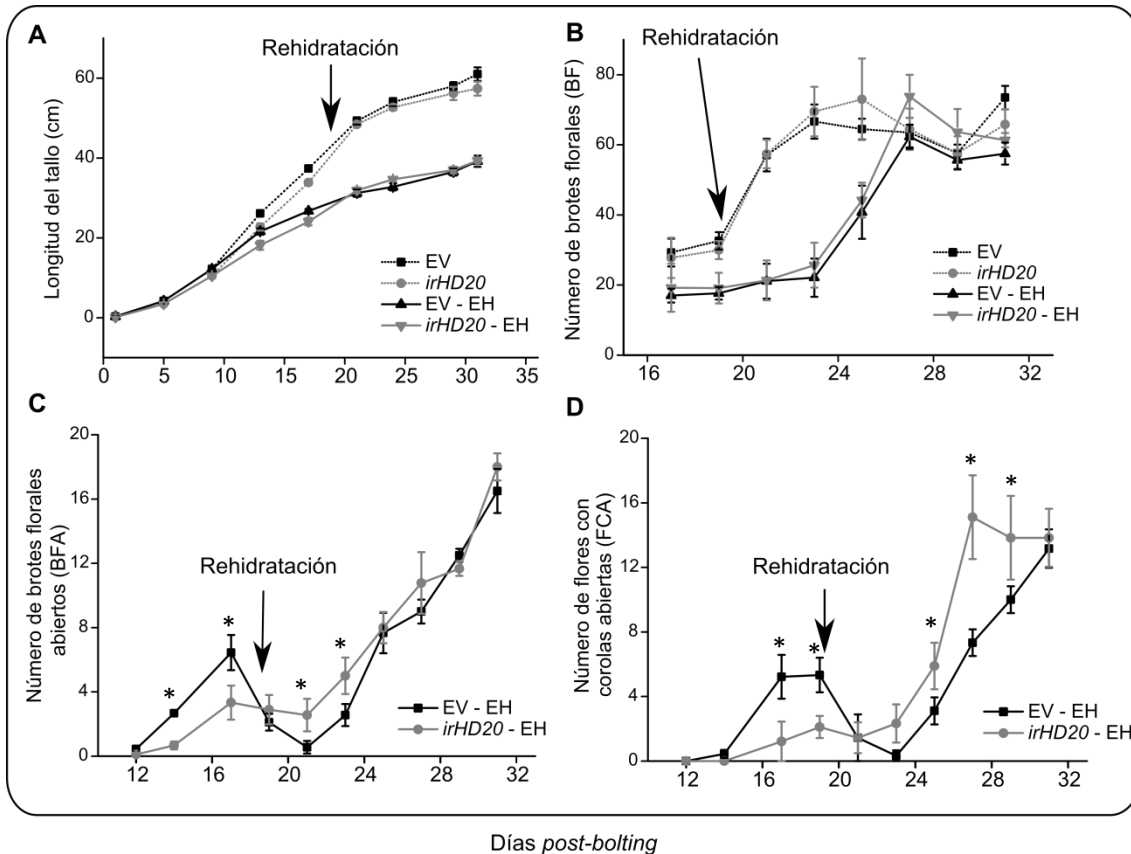
Con el objeto de comprender la función que cumpliría *NaDH20* en situaciones de estrés, se realizaron tratamientos de estrés biótico y abiótico. Los ensayos fueron de daño mecánico y daño mecánico + FAC, ensayos de infección con patógenos y también ensayos de estrés hídrico. Los tratamientos se evaluaron midiendo los niveles de fitohormonas y metabolitos secundarios relacionados con estas condiciones. En cuanto al ensayo por daño mecánico y

daño mecánico + FAC, se cuantificaron los niveles de JA, JA-Ile, SA y ET, sin observar diferencias significativas entre las plantas EV e *irHD20* (anexo I – a). Además, tras el tratamiento de daño mecánico y daño mecánico + FAC, se cuantificaron los niveles de metabolitos secundarios que actúan en la defensa al ataque de herbívoros, como los derivados fenólicos, nicotina y diterpeno-glucósidos. No se observaron diferencias en los niveles de metabolitos secundarios entre las plantas control (EV) y las silenciadas (*irHD20*) (anexo I - a).

Ya que observamos un efecto positivo del SA sobre la expresión de *NaHD20*, y esta hormona está asociada al ataque por patógenos, realizamos también un ensayo de infección con la cepa *Pseudomonas syringae*. Se rociaron plantas transformadas con EV o *irHD20* con una suspensión de *P. syringae* infectivas y se las dejó en cámara húmeda durante 24-72 hs. El ensayo de infección no indicó diferencias fenotípicas observables entre las plantas EV y las *irHD20*. También se tomaron muestras a las cuales se midieron unidades formadoras de colonias (ufc) y los niveles de hormonas (JA, SA y ABA), tampoco en este caso se observaron diferencias entre las plantas EV e *irHD20* (anexo I - b).

Para evaluar el efecto del estrés hídrico, las plantas EV e *irHD20* se dejaron de regar hasta que observamos una fuerte pérdida de turgencia en las hojas tanto de plantas silenciadas como control. Esto ocurrió alrededor de los 18 días de iniciado el tratamiento, luego de los cuales se las regó nuevamente. El estrés hídrico severo provocó una gran disminución en el número de flores totales y en la turgencia de las hojas, pero entre las plantas EV e *irHD20* no se observaron diferencias en el aspecto general, en la tolerancia al estrés ni en la turgencia de hojas.

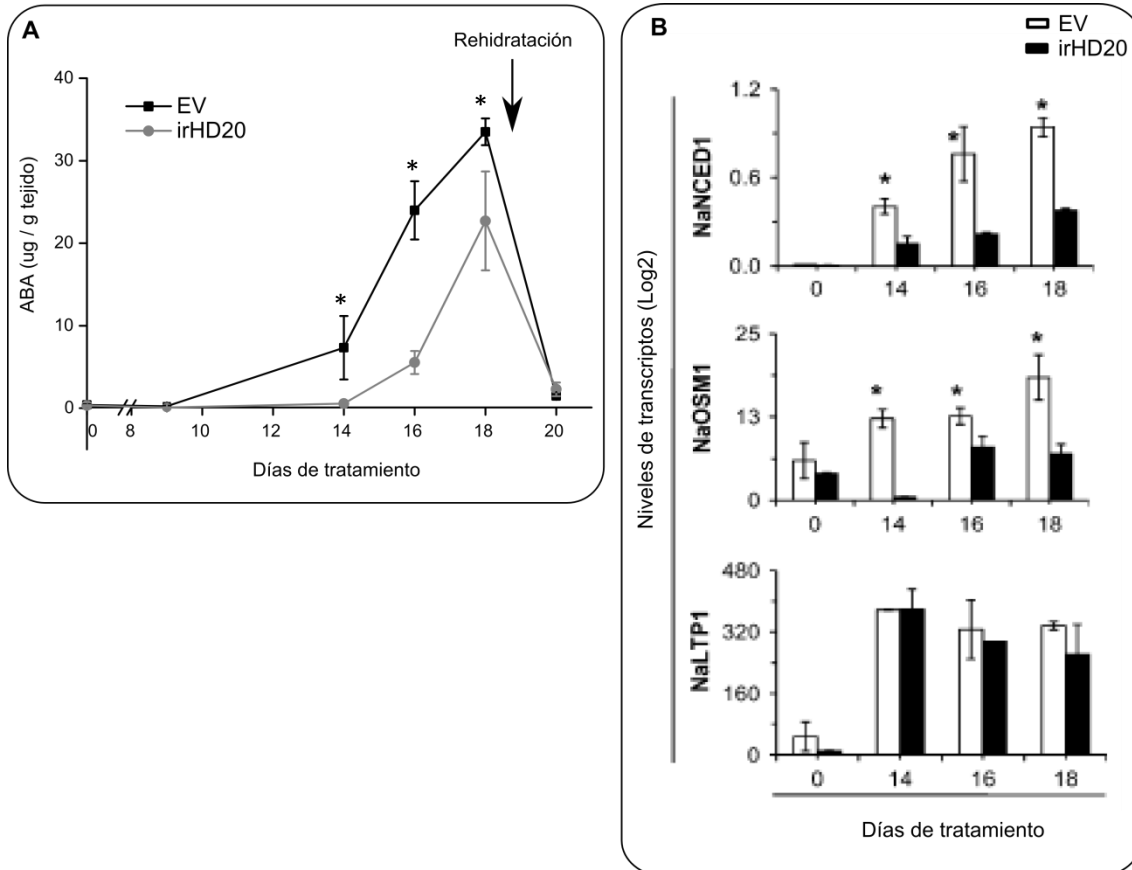
Durante el tratamiento de estrés y luego de su recuperación se continuó con el estudio de los parámetros fenotípico-morfológicos evaluados anteriormente en condiciones normales de crecimiento, evaluando la longitud del tallo y el número total de brotes y flores. El estrés provocó un retraso en la floración y en el desarrollo general de las plantas *irHD20* y las plantas EV, sin diferencias significativas entre ambas. No se observaron diferencias entre las plantas *irHD20* y EV en la longitud del tallo y el número total de brotes (Figura 5A y 5B). Para estos parámetros los niveles en plantas control y plantas silenciadas fueron mucho menores a los de las plantas crecidas en condiciones normales, ya que el estrés aplicado fue severo y las afectó seriamente. Notoriamente, sí se observaron diferencias entre las plantas control y las silenciadas al contabilizar capullos y flores abiertas. Durante el estrés las plantas *irHD20* presentaron entre un 30 y un 50 % menos de brotes abiertos y flores con corolas abiertas que las EV, pero luego de los 18 días de estrés, tras la rehidratación de las plantas, las *irHD20* lograron recuperarse más rápidamente que las EV, e incluso duplicar el número de BFA y FCA con respecto a las EV (Figura 5C y 5D).



**Figura C1. 5. Efecto del silenciamiento de *NaHD20* en la floración y el desarrollo de las flores de plantas tratadas con estrés hídrico desde el momento del *bolting*, y luego rehidratadas.** A- Crecimiento del tallo a lo largo del desarrollo de la planta. B- Número total de brotes florales a lo largo del desarrollo de la planta. En líneas de puntos se muestran los datos de la Figura 4, que corresponden a las plantas sin tratamiento de estrés. C- Número de brotes abiertos. D- Número de flores desarrolladas con la corola abierta. Las líneas negras representan plantas EV y las líneas grises plantas *irHD20*; los valores representan el promedio del número total por cada planta, se utilizaron entre 10 y 15 plantas. Se señala con una flecha el momento en que se detuvo el estrés hídrico y se rehidataron las plantas (día 18 *post-bolting* y tratamiento). Las barras de error indican la desviación estándar de los valores obtenidos de ocho muestras biológicas; \* indican *Mann-Whitney U-test*;  $P < 0,05$ .

En cuanto a los niveles hormonales durante el estrés hídrico, las plantas EV presentaron un fuerte aumento de ABA en las hojas. En cambio en las plantas *irHD20* esta inducción fue mucho menor; el pico de ABA en el día 18 de estrés llegó a 20  $\mu\text{g/g}$  tejido mientras que en las plantas EV superó los 30  $\mu\text{g/g}$  tejido (Figura 6A). Al observar esta diferencia entre plantas EV y *irHD20*, decidimos evaluar también los niveles de transcritos correspondientes a algunos genes inducibles por sequía, como *NaNCED1* (que codifica la enzima clave para la biosíntesis de ABA), *NaOSM1* (codifica una osmotina) y *NaLTP1* (codifica una transferasa lipídica). Los resultados indicaron también que tras el estrés la expresión de *NaNCED1* aumenta menos en

plantas *irHD20* que en las plantas EV (Figura 6B). La expresión de *NaOSM1* no aumenta en las plantas silenciadas como lo hace en las EV tras el estrés hídrico, y los niveles de *NaLTP1* son menores en las silenciadas que en las plantas EV en condiciones normales, pero durante el estrés aumentan en las plantas control y silenciadas por igual (Figura 6B).



**Figura C1. 6. El silenciamiento de *NaHD20* afecta los niveles de ABA y de transcritos de genes relacionados al ABA durante el estrés hídrico.** A- Cuantificación de ABA en hojas de plantas en tratamiento de estrés hídrico. B- Niveles de transcritos en hojas de plantas en estrés hídrico, cuantificados por qRT-PCR. Los valores se normalizaron con los valores de *NaEF-1* y se relativizaron al valor del día 0 de las plantas EV mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Las barras de error indican la desviación estándar de los valores obtenidos de cuatro muestras biológicas; \* indican t-test  $P < 0,05$ .

## 6- Obtención de plantas transformadas establemente silenciando al gen *NaHD20*

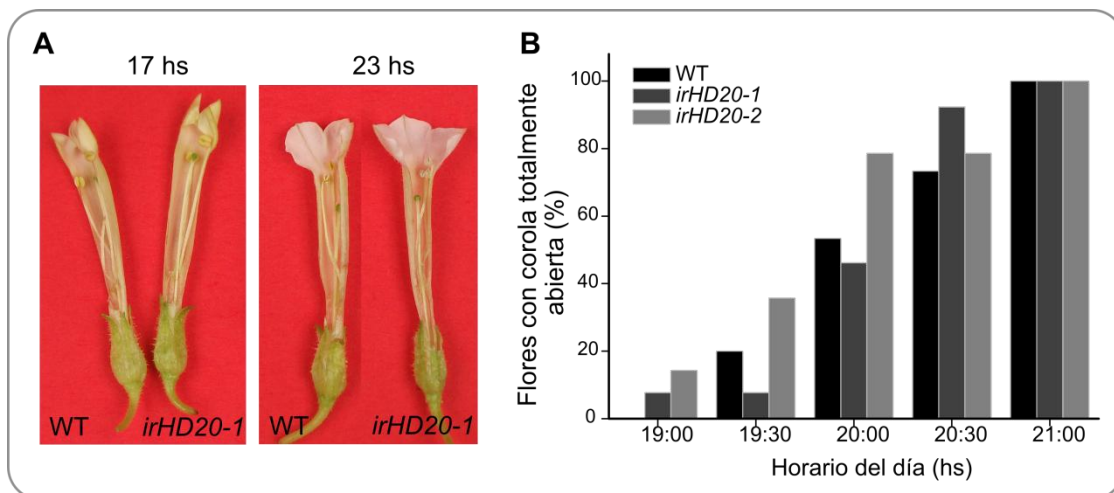
Para realizar un estudio más detallado de la funcionalidad de *NaHD20* se obtuvieron plantas silenciadas en este gen de manera estable. La obtención de plantas silenciadas estables de esta especie se realiza normalmente mediante la técnica de generación de callos, transformación por *Agrobacterium tumefaciens* y diferenciación celular. Ésta es una tarea compleja con muchos detalles técnicos a tener en cuenta. Afortunadamente en el laboratorio del Dr. Baldwin la generación de plantas estables silenciadas de *N. attenuata* es una técnica



rutinaria para los técnicos especializados. Al contar con esta gran ayuda, pudimos ahorrar tiempo y trabajo, dedicándonos exclusivamente a la caracterización fenotípica y molecular de estas plantas. En la sección de materiales y métodos se detalla brevemente el protocolo del laboratorio del Dr. Baldwin para la transformación de *N. attenuata*.

**7- NaHD20 actúa como un regulador positivo de la emisión de BA desde las flores de *N. attenuata***

Una vez obtenidas las plantas *irHD20* estables, se eligieron dos líneas transgénicas independientes para su análisis posterior, *irHD20-1* e *irHD20-2*. La morfología de las flores no presentó diferencias con las plantas salvajes ni en su tamaño, ni en la longitud de estambres y estilos (Foto representativa en la Figura 7A). Asimismo, el momento de apertura de las corolas que abren de noche, a lo largo del posible momento de apertura, no presentó diferencias entre los distintos genotipos, entre las 19 hs y las 21 hs (Figura 7B).



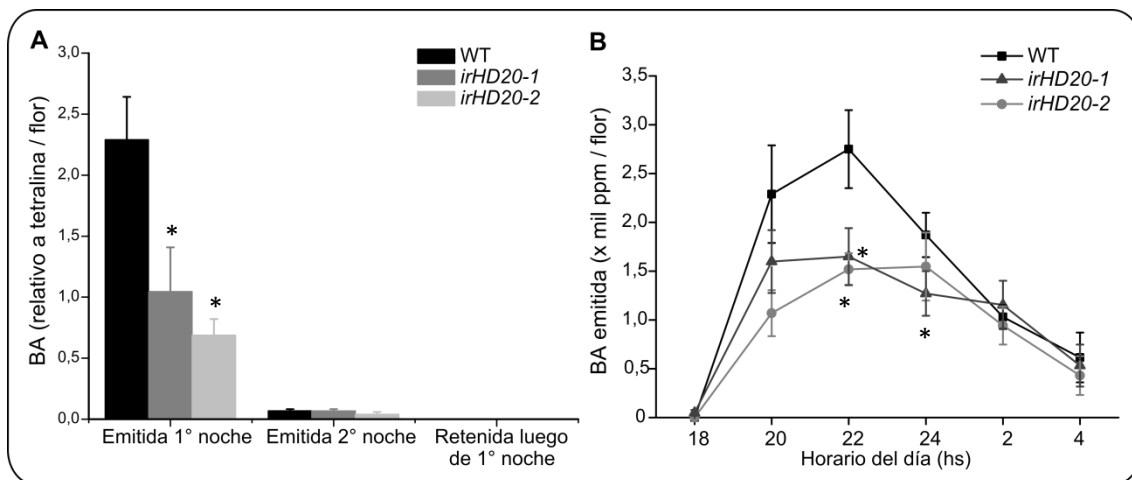
**Figura C1. 7. El silenciamiento estable de *NaHD20* no generó cambios morfológicos ni en la cinética de apertura de las flores.** A- Foto de flores tomadas antes (17 hs) y después (23 hs) de abrir la corola. B- Porcentaje de flores con corola abierta.

Dado que habíamos observado un fenotipo diferencial de apertura de flores y de emisión de volátiles en las plantas silenciadas por VIGS, decidimos analizar las líneas silenciadas en forma estable con un ensayo de captura y cuantificación de VOC. Como mencionamos anteriormente, la acetona de bencilo (BA) es el principal VOC emitido por las flores de esta especie y el responsable de atraer polinizadores. Se analizaron los VOC emitidos por las flores cuando la corola se abre. Las medidas indicaron una producción un 50 % menor de BA en

flores *irHD20-1* e *irHD20-2* que en flores salvajes (WT, del inglés *Wild Type*; Figura 8A). Los demás compuestos volátiles no presentaron diferencias entre genotipos.

La BA es emitida mayoritariamente durante la primera noche (Kessler y col., 2010) pero considerando que las plantas *irHD20* emiten menos, cabía la posibilidad de que el resultado observado fuera consecuencia de un retraso en la emisión o de un problema que causara que la BA se sintetizara pero quedara retenida. Para dilucidar entre estas dos alternativas, los volátiles emitidos se capturaron no sólo durante la noche de apertura de la flor (primera noche) sino también durante el día y la noche siguiente. Además, se extrajo la BA que podría quedar retenida en la corola. El resultado de estos ensayos permitió corroborar que no es así, que las flores de las plantas *irHD20* realmente producen menos BA que las EV y que la baja en la emisión se debe a una disminución en la síntesis y no a una retención causada por otro motivo (Figura 8A).

Como sistema alternativo para evaluar la emisión de BA en las plantas silenciadas, se utilizó un sistema de GC-MS portátil (*zNOSE*) con el cual se evaluó la cinética de este proceso. El perfil de la curva de emisión fue similar en las plantas control y en las *irHD20*, con un pico a las 22 hs. Sin embargo y de acuerdo a lo observado previamente, en las plantas *irHD20* los valores máximos alcanzaron la mitad de los valores máximos de las plantas control (Figura 8B).



**Figura C1. 8. El silenciamiento de *NaHD20* provoca una disminución de la emisión de BA de las corolas que abren durante la noche.** A- Cuantificación de BA capturada y la emitida en la 1<sup>ra</sup> y 2<sup>da</sup> noche de apertura de las corolas, y retenida en la corola luego de la 1<sup>ra</sup> noche. B- Cinética de emisión de BA analizada con *zNOSE*, los valores se tomaron cada dos horas durante la apertura de la corola. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de seis muestras biológicas; \* indican *LSD post-hoc test*  $P < 0,01$ .

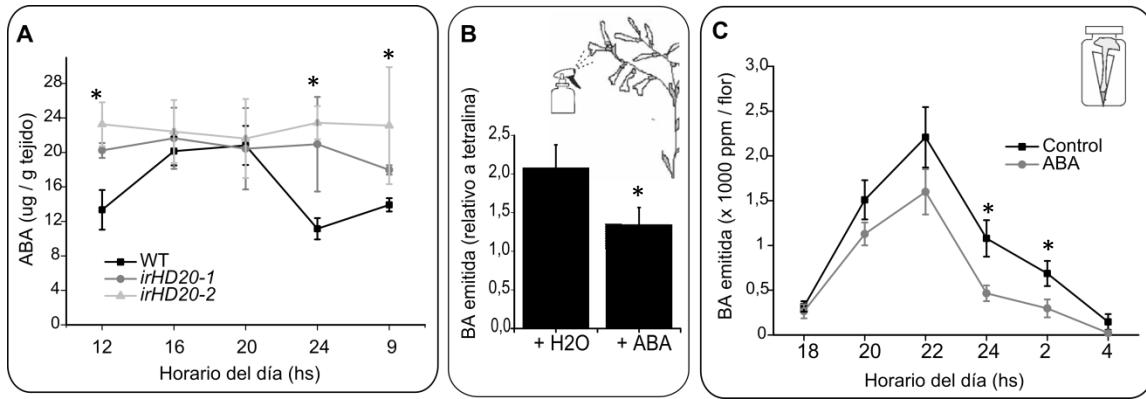
Para completar la caracterización de las plantas silenciadas, se cuantificaron los niveles de ET emitidos por las flores en el momento en que abren sus corolas y son polinizadas. Este

estudio se realizó con plantas esterilizadas y plantas polinizadas a mano, tanto en plantas WT como en las dos líneas *irHD20*. Las flores no polinizadas no emitieron ET, y las plantas polinizadas emitieron esta hormona a razón de 4  $\mu\text{l/hora/g}$  de flor en promedio. No se observaron diferencias entre los dos genotipos.

#### **8- Los cambios en los niveles de ABA en corolas se correlacionan con los cambios en la emisión de BA durante la apertura de la corola**

Con el objetivo de comprender los mecanismos que llevan a una reducción en la emisión de BA de las corolas de plantas *irHD20*, se cuantificaron las fitohormonas acumuladas en este tejido durante el proceso de apertura de las flores. Los niveles de SA y JA no presentaron diferencias entre plantas control y *irHD20*. En cambio, los niveles de ABA sí se encontraron alterados en las plantas *irHD20* respecto de las plantas WT durante la apertura de las corolas. En las corolas de plantas WT, estos niveles aumentaron entre las 12 y las 16 hs, manteniéndose constantes hasta las 20 hs cuando comenzaron a disminuir hasta alcanzar los niveles basales. Este efecto de oscilación de los niveles de ABA en las corolas que están abriéndose, no se observó en las corolas de plantas *irHD20*, en las que los niveles de ABA se mantuvieron elevados y constantes (Figura 9A).

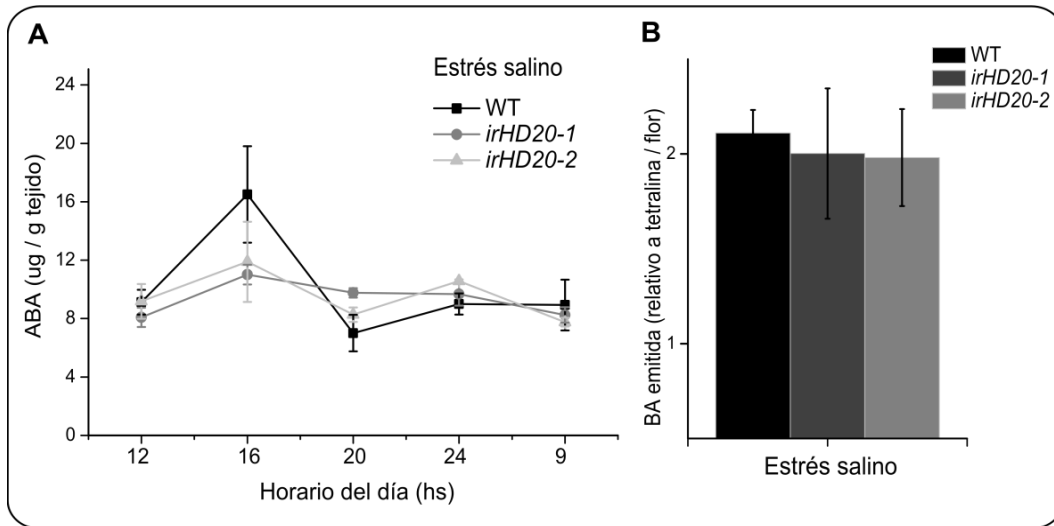
Para evaluar si los niveles de ABA influyen directamente sobre la emisión de BA, se aplicó ABA exógeno a flores de plantas salvajes y se cuantificó la BA emitida. Estos ensayos se realizaron aplicando dos metodologías diferentes: (1) se rociaron las flores en la planta con 1 ml de ABA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) a las 20 hs, y (2) se colocaron flores escindidas de la planta en un tubo con una solución de ABA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). En el primer caso, la BA emitida fue atrapada entre las 15 hs y las 9 hs del día siguiente y analizada por GC-MS (Figura 9B). En el segundo caso, se utilizó el equipo *zNOSE* para medir cada dos horas la BA emitida desde las 18 hs (Figura 9C). En ambos ensayos se observó que las corolas de plantas salvajes tratadas con ABA emiten un 30 % menos de BA que las no tratadas. Cabe aclarar que en ambos ensayos se aplicaron concentraciones de ABA cercanas a las fisiológicas en flores, cuantificadas en el momento de apertura de las corolas (Figura 9A, 1  $\mu\text{g}$  de ABA por cada corola de peso promedio de 50 mg aproximadamente).



**Figura C1. 9. El ABA afecta la producción de BA en las corolas.** A- Cuantificación de los niveles de ABA en corolas de plantas WT y plantas *irHD20* durante su apertura entre las 12 del mediodía y las 9 hs del día siguiente (línea negra-WT, líneas grises-*irHD20*). B- Niveles de BA atrapados durante la noche de apertura de la corola de flores rociadas con agua o con una solución de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ABA. C- Niveles de BA medidos por *zNOSE*, emitidos por corolas de flores cortadas e irrigadas con agua o con una solución de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ABA. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de cuatro muestras biológicas para A y seis muestras biológicas para B y C; \* indican *t-test*  $P < 0,05$ .

Dado que NaDH20 presenta una alta similitud de secuencia con otros HD-Zip I de especies diferentes que están fuertemente vinculados al estrés abiótico se decidió analizar los mismos parámetros de emisión de hormonas y volátiles en plantas crecidas en condiciones de estrés. Las plantas se sometieron a estrés hídrico (EH) y estrés salino (ES) como se describe en la sección de Métodos. En condiciones de estrés hídrico se observaron los mismos valores de BA emitida que en condiciones control, pero se detectaron diferencias cuando el tratamiento fue de estrés salino. El estrés hídrico produce una muy fuerte reducción en el número de flores disponibles para trabajar y sin embargo, no se observaron diferencias entre genotipos en estas condiciones. Se continuó entonces con el estrés salino que representa una condición más controlable y moderada.

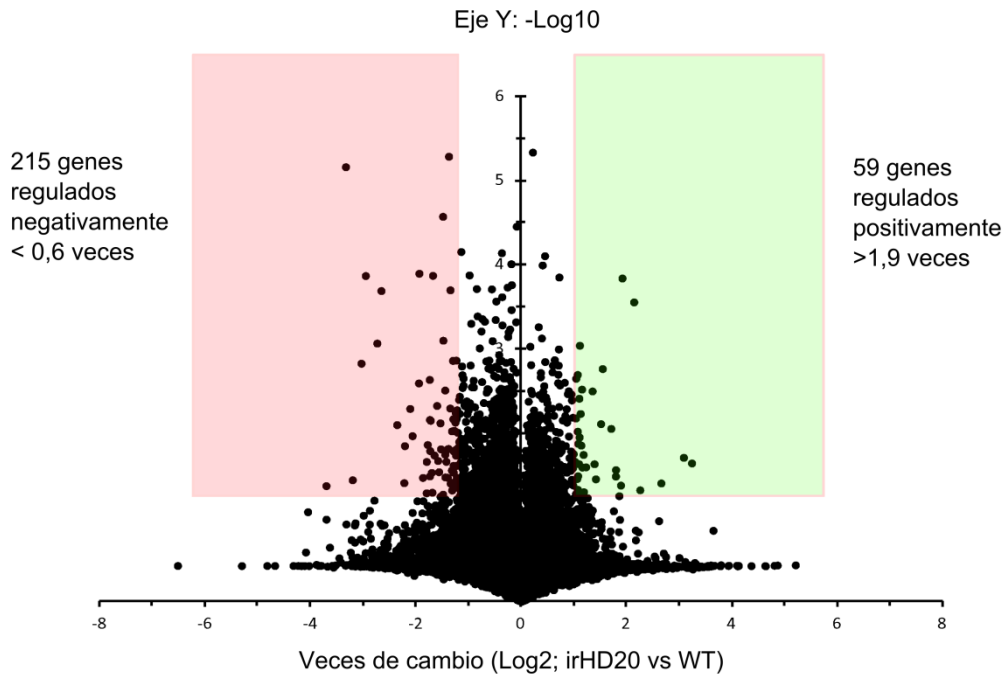
Los niveles de BA emitidos por plantas tratadas con estrés salino fueron elevados tanto para las WT como para las *irHD20*, pero no presentaron diferencias entre las líneas *irHD20* y la WT, como se había observado en condiciones normales de crecimiento (Figura 10). Los niveles de ABA cuantificados en las corolas de las plantas tratadas con estrés salino no mostraron diferencias a lo largo del tiempo de apertura, ni para las plantas WT ni para las *irHD20*. En ambas líneas el ABA se mantuvo en niveles bajos en las corolas, un 50 % por debajo de los cuantificados en las flores de plantas crecidas en condiciones normales (Figura 10). Estos datos se correlacionan con los observados en los ensayos de tratamiento exógeno con ABA y cuantificación de BA (Figura 9).



**Figura C1. 10. Los niveles de ABA se mantienen bajos y los de BA elevados, en plantas WT y *irHD20* sometidas a estrés salino.** A- Cuantificación de los niveles de ABA en corolas de plantas WT y *irHD20* sometidas en estrés salino, durante la apertura de las flores entre las 12 del mediodía y las 9 hs del día siguiente (línea negra-WT, líneas grises-*irHD20*). B- Niveles de BA capturada durante la noche de apertura de la corola de flores de plantas crecidas en estrés salino. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de cuatro muestras biológicas para A y seis para B. El ABA fue cuantificado por LC-MS-MS y la BA por GC-MS-MS.

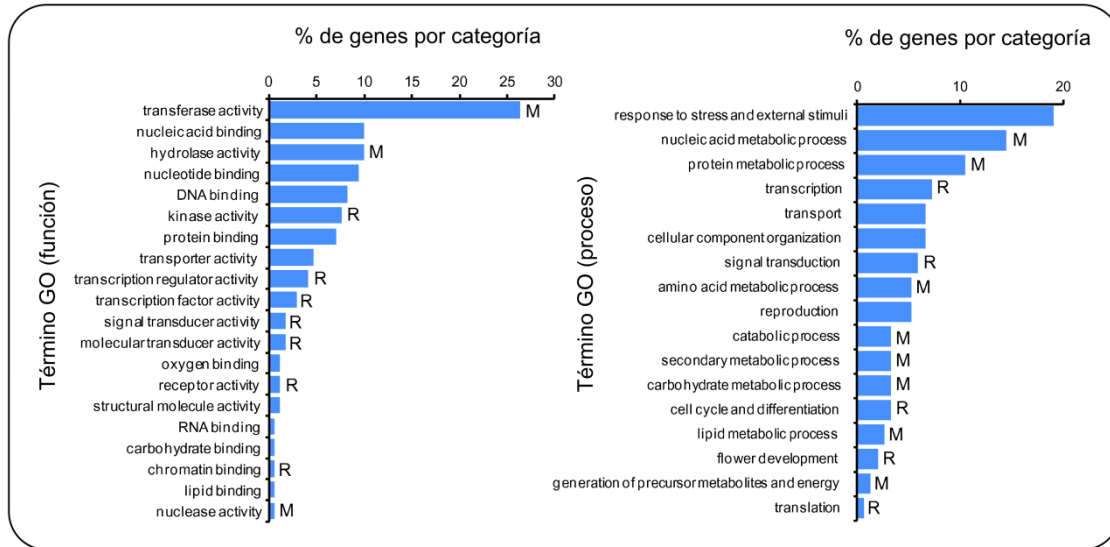
#### 9- El silenciamiento de *NaHD20* en la corola afecta la expresión de diversos genes

Habiendo observado grandes diferencias entre plantas *irHD20* y salvajes en los niveles de ABA y de BA en las corolas que se abren, y siendo *NaHD20* un factor transcripcional, nos resultó de interés realizar un análisis transcriptómico de las flores de estas plantas. Para estudiar el efecto de *NaHD20* en la expresión de genes en las corolas de las flores que están abriéndose, se utilizó un microarreglo *Agilent* con 43.533 sondas de *N. attenuata*. Se purificó ARNm de las corolas de plantas salvajes e *irHD20* tomadas a las 12 hs del mediodía y estos ARNm se utilizaron como sondas para la hibridación del microarreglo. Los resultados indicaron que 215 genes estaban reprimidos y 59 inducidos de manera significativa en las corolas de plantas *irHD20* comparadas con las salvajes (Figura 11).



**Figura C1. 11. Análisis transcriptómico de corolas de plantas *irHD20* y WT.** Se extrajo ARN de las corolas de flores *irHD20* y WT a las 12 del mediodía. Se analizó la expresión génica utilizando un Chip Agilent con 43.533 sondas de *N. attenuata*. Gráfico tipo Volcano, los puntos negros representan a cada gen evaluado. De acuerdo al nivel de expresión y a la diferencia de expresión entre la corola *irHD20* y la corola WT, se establecen los límites de genes regulados con valores estadísticamente significativos. En rosa, los genes regulados negativamente y en verde los genes regulados positivamente por NaHD20.

Los genes con expresión diferencial en las plantas silenciadas fueron categorizados según la ontología génica (GO; proceso y función). En base a estas dos categorías, entre el 44 y 37 % de los genes anotados pertenecen a la categoría de procesos metabólicos. La mayoría de éstos codifica enzimas que participan en procesos metabólicos asociados a compuestos aromáticos. El segundo grupo de genes regulados está asociado al metabolismo de carbohidratos. Entre estos últimos, los que participan en el metabolismo de azúcares estaban reprimidos mientras que dos genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular estaban inducidos. Por otro lado, algunos genes clave en la biosíntesis de lípidos y ácidos grasos aparecieron como inducidos en las corolas *irHD20* (Figura 12).



**Figura C1. 12. Análisis de los genes con expresión diferencial observados en el análisis transcrito. Mediante software *Blast2GO*, se clasifican a los genes regulados por el silenciamiento de *NaHD20* en las corolas según su función (izquierda) o según el proceso en el que participan (derecha). **M** indica relación con metabolismo y **R** indica relación con regulación de expresión génica y/o actividad enzimática.**

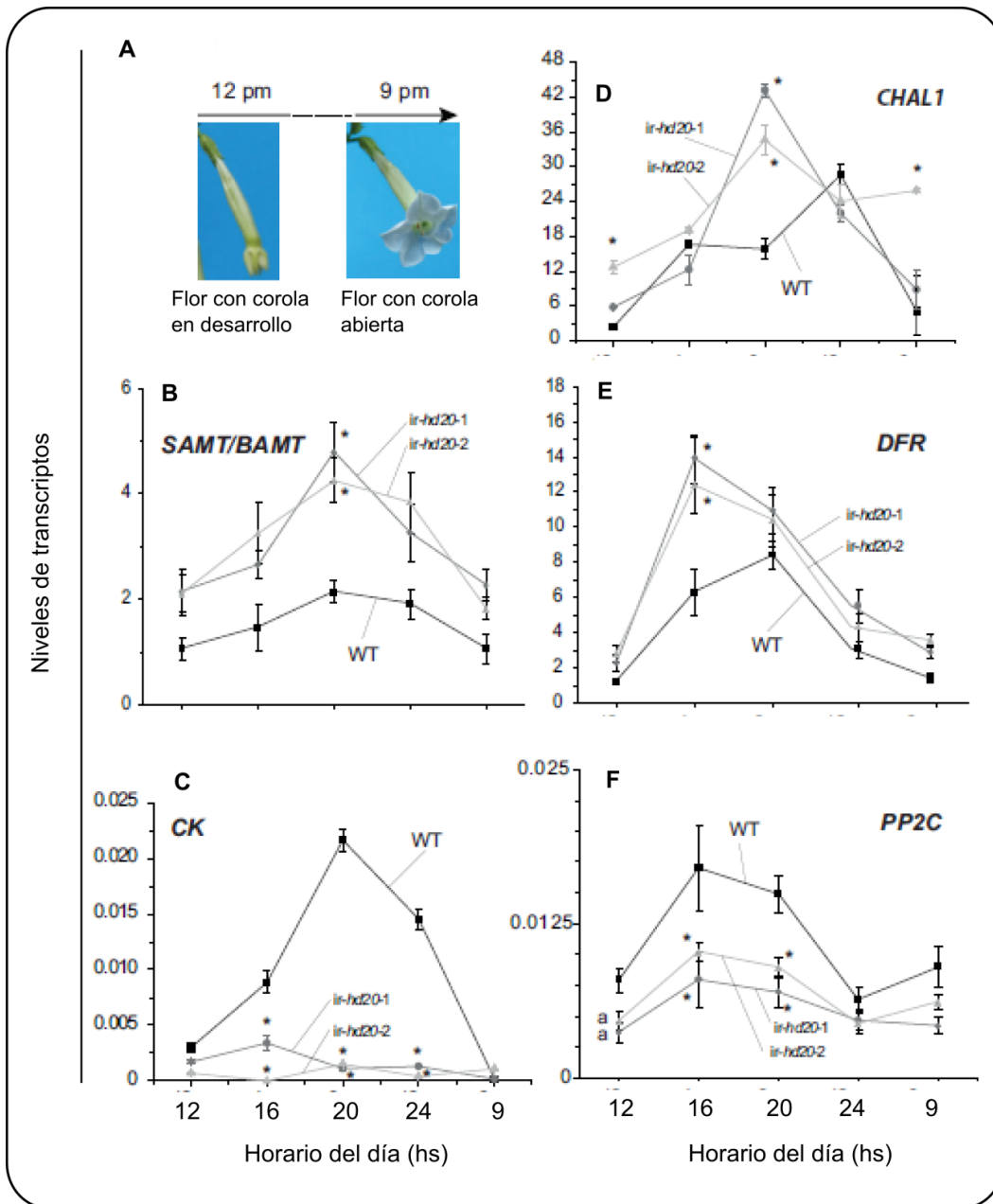
El único gen relacionado a la biosíntesis de BA en *N. attenuata* identificado en la bibliografía es *CHALCONE SINTASA (CHAL1)* (Kessler y col., 2008). *CHAL1* participa en las vías de siquimato y biosíntesis de flavonoides; Dihidroflavonol 4-Reductasa (*DFR*) es otra enzima que participa en las vías de flavonoides, llevando a la síntesis de antocianinas (Winkel-Shirley, 2001). Los benzenoides también son producidos a través de la vía de siquimato o fenilpropanoides (Figura I.4). Las enzimas *BAMT/SAMT* sintetizan ésteres de metilo como el metil- benzoato y metil-salicilato, que son los constituyentes de los aromas florales de muchas especies (Dudareva y Pichersky, 2000).

El análisis del ensayo de microarreglos indicó que los transcritos de los genes que codifican *CHAL1*, *DFR* y *BAMT/SAMT* se encontraron inducidos en las corolas *irHD20* respecto de las salvajes. Estas observaciones, que indican que *CHAL1*, *DFR* y *BAMT/SAMT* están aumentadas a lo largo de la apertura de la corola en las flores *irHD20* respecto de las salvajes, coincidirían con la disminución de los niveles de BA en las plantas *irHD20*.

Además de los genes relacionados con vías metabólicas, la expresión de algunos factores regulatorios también se vio alterada en las corolas de plantas *irHD20*. Entre éstos se encontró al gen de *N. attenuata* homólogo al que codifica una caseína-quinasa Ser/Thr (CKs) y otro a una proteína fosfatasa tipo 2C (PP2C), que interacciona con receptores de ABA.

Para validar los datos obtenidos del microarreglo se seleccionaron algunos genes, cuya expresión se analizó por qRT-PCR. También nos planteamos como objetivo, profundizar el resultado realizando una cinética de expresión de los mismos en las plantas *irHD20*. Se eligieron tres genes involucrados en el metabolismo de compuestos aromáticos (*CHAL1*, *SAMT/BAMT* y *DFR*). Los transcritos de estos tres genes se acumularon en las plantas salvajes durante la apertura de la corola, alcanzando el máximo entre las 16 y las 20 hs (Figura 13). En coincidencia con el microarreglo, los niveles de estos genes estaban aumentados en las corolas de las *irHD20* comparados con los de las plantas salvajes. También se analizó la expresión de dos genes regulatorios, *CK* y *PP2C*. Tanto los niveles de *CK* como los de *PP2C* aumentaron en las corolas de plantas salvajes durante su apertura pero no se modificaron en las plantas *irHD20* (Figura 13).





**Figura C1. 13. Validación de la expresión de genes seleccionados del análisis transcriptómico.** Las muestras de corolas de plantas WT e *irHD20-1* y *irHD20-2* se tomaron en los horarios indicados en la figura. Se procesaron para extracción de ARN y RT-qPCR. Se utilizó *NaEF-1* como gen normalizador, los valores se expresan mediante el método de  $\Delta Ct$ . Las barras de error indican la desviación estándar de los valores tomados de tres muestras biológicas; \* indican *LSD post-hoc test*  $P < 0,05$ .

## Discusión

NaHD20 es un factor de transcripción que pertenece al grupo IC de la familia HD-Zip I (Arce et al., 2011). En este trabajo intentamos caracterizar funcionalmente este FT de *N. attenuata*. La primera aproximación fue el estudio de la expresión de este gen en plantas crecidas en condiciones normales o sometidas a distintos tratamientos. Los niveles de transcritos de *NaHD20* en hojas de plantas tratadas con ABA o sometidas a estrés hídrico aumentaron con respecto a condiciones estándar (Figura 1D y E), al igual que otros HD-Zip I como *AtHB12*, *AtHB7* y *HaHB4* (Söderman y col., 1996, 1999; Olsson y col., 2004; Dezar y col., 2005). Se obtuvieron plantas silenciadas en este gen y en éstas los niveles de ABA tras un tratamiento de estrés hídrico fueron menores a los de las plantas control (EV; Figura 6A). El aumento de ABA tras el estrés hídrico resulta principalmente de la biosíntesis *de novo* de esta hormona debida a la activación transcripcional de genes de la biosíntesis (Milborrow, 2001; Wasilewska y col., 2008). La transcripción del gene *NCED* (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa) se induce rápidamente por el estrés hídrico en un gran número de especies vegetales; en *Arabidopsis*, *NCED3* es la enzima clave en el paso limitante en la biosíntesis de ABA en hojas (Burbidge y col., 1999; Qin y Zeevaart, 1999; Chernys y Zeevaart, 2000; Ikegami y col., 2009). De forma consistente con estos datos bibliográficos, los niveles de *NaNCED1* aumentaron por el tratamiento de estrés hídrico en las hojas de *N. attenuata*, y también en menor medida en las plantas *irHD20* (Figura 6B), plantas que a su vez mostraron tener menores niveles de ABA en este tratamiento (Figura 6A). Esto indicaría que en las plantas silenciadas está alterada la vía de biosíntesis del ABA, a través de una inducción débil de los transcritos de *NaNCED1*.

Dada la similitud de secuencia con *HaHB4* y que este FT tiene una participación en la respuesta a herbívoros (Manavella y col., 2008), se analizó si la expresión de *NaHD20* variaba en estas condiciones. La expresión de *NaHD20* aumentó por daño mecánico, daño mecánico + FAC y por la aplicación de JA exógeno. La expresión ectópica de *HaHB4* en *Arabidopsis* provoca un aumento en la acumulación de JA y ET tras el daño mecánico y una reducción en la acumulación de SA tras la infección por patógenos (Manavella y col., 2008). En las plantas silenciadas en *NaHD20*, la acumulación de JA y ET tras estos tratamientos de estrés fue similar a la observada en las plantas control (EV), los niveles de las fitohormonas en hojas no mostraron diferencias sustanciales, indicando que su silenciamiento no derivó en una respuesta medible al estrés biótico, al menos no en las condiciones ensayadas. Esto indicaría que *NaHD20* no afectaría la producción de JA, SA y ET en hojas de *N. attenuata*. Las cinéticas de inducción de *NaHD20* por estas hormonas y condiciones fueron tardías, por lo que tal vez este HD-Zip esté involucrado en respuestas secundarias a este tipo de estrés y no en

respuestas rápidas como la síntesis de hormonas. La acumulación de metabolitos secundarios tampoco se vio afectada por el silenciamiento de este FT, por lo que la conexión entre *NaHD20* y las respuestas asociadas al daño mecánico, daño mecánico + FAC y al JA no pudieron develarse. Cabe destacar que las respuestas observadas en el análisis de *HaHB4* durante estrés biótico fueron en plantas de *Arabidopsis* con expresión ectópica y constitutiva de este gen de girasol (Manavella y col., 2008), en cambio, para *NaHD20* se analizaron plantas de *N. attenuata* silenciadas en *NaHD20*. Por este motivo no se esperaba necesariamente un efecto contrario, ya que en el caso de *HaHB4* al no poderse obtener mutantes de girasol o plantas silenciadas la transformación se hizo en un sistema heterólogo y resultó en una expresión ectópica.

El silenciamiento de *NaHD20* afectó procesos del desarrollo, tanto en condiciones de crecimiento normales como en plantas sometidas a estrés hídrico. Las plantas silenciadas mostraron un retraso en el tiempo de *bolting* sin afectar el crecimiento del tallo ni la longitud de éste al final del ciclo de vida. El estrés hídrico afectó negativamente el crecimiento del tallo tanto en las plantas silenciadas como en sus controles indicando que *NaHD20* no estaría participando de este proceso y que el fenotipo observado se debe exclusivamente a la aplicación del estrés. *AtHB12* y *AtHB7*, homólogos de *NaHD20*, fueron descritos como reguladores de elongación, expansión y diferenciación celular en respuestas al estrés hídrico. La expresión ectópica de estos genes retrasa el *bolting* y modifica la elongación del tallo primario (Hjellström y col., 2003; Olsson y col., 2004). La comparación del fenotipo que causa la sobreexpresión de *AtHB12* y *AtHB7* con el que causa el silenciamiento de *NaHD20* no permite hacer una relación directa de sus funciones, ya que en un caso se sobreexpresan o se mutan individualmente *AtHB12* o *AtHB7* en *Arabidopsis* y en el otro caso se silencia *NaHD20* en *N. attenuata*. Estos resultados sí nos permiten decir que estos tres FTs están involucrados de alguna manera en el pasaje al estadio reproductivo.

El número de brotes florales no se vio afectado por el silenciamiento de *NaHD20*, indicando que este FT no estaría participando del desarrollo de meristemas florales, ni en condiciones estándar ni en respuesta al estrés (Figura 4C, D y B). En cambio, la apertura de los brotes florales sí se vio afectada por el silenciamiento de *NaHD20*, particularmente luego de los 20 días *post-bolting*, cuando la planta alcanza el máximo de brotes abiertos (Figura 4E). Este efecto se reflejó claramente en el número de flores con corolas abiertas producidas por planta. La disminución o retraso en la apertura de brotes florales se observó también en plantas sometidas a estrés hídrico. Después de este tratamiento la recuperación tras la rehidratación de las plantas *irHD20* fue muy rápida y esta observación fue llamativa. Esta rápida recuperación resultó en la aparición del doble de brotes abiertos en las plantas *irHD20* comparadas con sus controles, aunque al final del ciclo la cantidad de FCA en ambos genotipos

fue similar (Figura 5C y D), consistentemente con la similitud observada en el número total de brotes florales. Las diferencias en la producción de brotes abiertos y flores con corola abierta podría ser el resultado de un efecto directo de NaHD20 sobre la regulación del desarrollo floral o tal vez un efecto indirecto a través del control de factores regulatorios del desarrollo o fitohormonas.

Los transcritos de *NaHD20* fueron detectables, en distinta medida, en todos los tejidos analizados, siendo mayor la expresión en las corolas de las flores. Estas observaciones son consistentes con datos bibliográficos de otros genes que codifican FTs HD-Zip I. Muchos de ellos se expresan en la mayoría de los tejidos vegetales, incluyendo las flores (Lee y Chun, 1998; Henriksson y col., 2005; Deng y col., 2006) aunque a ninguno se le ha atribuido hasta la fecha una función en el desarrollo floral u otro proceso asociado a las flores. Sin embargo, esto puede deberse a la poca cantidad de trabajos funcionales sobre FTs HD-Zip I más que a que otros no tengan funciones asociadas a las flores. Por lo tanto, este trabajo representa el primero en el cual se atribuye una función relacionada a las flores a un FT HD-Zip I. En el caso de NaHD20 los elevados niveles de transcritos en corola así como su cinética de expresión en este tejido mientras las corolas se abren, fueron consistentes con su efecto sobre la emisión de BA. El momento de mayor inducción se correlacionó con el momento de apertura de las corolas y con la cinética de emisión de BA y fue entre las 20 y las 21 hs (Figura 3, 7B y 7B).

La BA es considerada como el principal compuesto aromático entre los VOC emitidos por las flores de *N. attenuata*, aunque no en otras especies (Baldwin y col., 1997; Verdonk y col., 2005). Al analizar los VOC de las plantas silenciadas en *NaHD20* y sus controles se confirmó lo descrito en la literatura: del perfil de VOC emitidos, BA presenta el pico de mayor área (analizados mediante GC-MS-MS), siendo claramente menor en las flores de plantas silenciadas que en las salvajes.

El silenciamiento de *NaHD20* mediante VIGS y también mediante transformación estable permitió observar el mismo fenotipo de retraso de *bolting* y de disminución de BA emitida para ambos sistemas de silenciamiento. Esto refuerza la idea de que NaHD20 es el que regula los niveles de BA y no es un artefacto de la técnica o de las condiciones de crecimiento. Respecto de la biosíntesis de VOCs florales, se conocen dos factores de transcripción (FTs) que juegan papeles cruciales en dicha regulación, ODORANT1, EOBII y PhMYB4 (Verdonk y col., 2005; Spitzer-Rimon y col., 2010; Colquhoun y col., 2011). Para comprender con mejor detalle cómo este FT regula la floración y los niveles de BA de las flores, se continuó con la caracterización de las plantas silenciadas estables, *irHD20-1* e *irHD20-2*.

El perfil de concentración de ABA durante la apertura de las corolas en las plantas salvajes mostró una curva en aumento hasta las 20 hs y una disminución del 40 % posterior, entre las

20 y las 24 hs, horario en el que se emite la BA. En cambio, en las flores de *irHD20*, los niveles de ABA son más altos y constantes y los de BA más bajos (Figura 9A). La aplicación de ABA exógeno durante la apertura de las corolas provocó una disminución en los niveles de BA emitido y este efecto negativo del ABA sobre la emisión de BA coincidió con el hecho de que las plantas *irHD20* sometidas a estrés salino presentaron menores niveles de ABA en la corola y una emisión normal de BA (Figura 9B, C y 10).

Estos resultados indicarían que *NaHD20* regula los niveles de ABA durante la apertura de las corolas afectando así los niveles de BA emitida. La relación entre los bajos niveles de ABA con los altos niveles de BA en condiciones de estrés salino reforzó lo observado en condiciones control, enfatizando la posibilidad de que *NaHD20* esté regulando los niveles de ABA y así impidiendo la correcta producción de BA en condiciones normales.

El análisis transcriptómico realizado con corolas tomadas a las 12 del mediodía (6 hs antes de que comience la emisión de BA) no permitió detectar una regulación diferencial de genes relacionados con la biosíntesis de ABA, a excepción de *NaNCED1*. Se desconoce cómo la corola controla sus niveles de ABA y podrían plantearse varias hipótesis: que la síntesis se produzca en el momento, que se importe desde otro tejido, que se transforme a partir de otro compuesto o una combinación de estos procesos. A las 12 del mediodía las plantas *irHD20* tenían el doble de ABA que las control; sin embargo sólo dos genes posiblemente vinculados al ABA se encontraron regulados en el microarreglo. Uno es un homólogo a *SnRK2* de *Arabidopsis* (Boudsocq y col., 2004). Otro es un gen homólogo a un gen que codifica una PP2C, que estaba inhibido en las corolas silenciadas en *NaHD20*. *ABI1* y *ABI2* son dos PP2C que interactúan con los receptores de ABA y se inactivan rápidamente por la unión del ABA a los receptores RCARs/PYR1/PYLs (Klingler y col., 2010; Hirayama y Shinozaki, 2007). Las mutaciones en *ABI1* o *ABI2* provocan una insensibilidad al ABA.

Las caseína-quinasas o CKs juegan papeles importantes en las plantas; por ejemplo la CK2 de *Arabidopsis* participa en la señalización de la luz, en el ritmo circadiano, en respuestas hormonales y el tiempo de floración (Verdonk y col., 2005; Park y col., 2008). En el microarreglo y en el ensayo de qRT-PCR se observó una fuerte represión de una caseína-quinasa, la cual podría estar involucrada en la regulación de la emisión de BA. En conexión con esto último, cabe destacar que tanto *NaHD20* como *AtHB12* y *AtHB7* presentan, en sus regiones carboxilo-terminales, sitios putativos de fosforilación (Figura 2), sugiriendo que probablemente sus actividades como FTs estén reguladas por mecanismos de fosforilación/defosforilación (Arce y col., 2011).

*N. attenuata* no tiene su genoma secuenciado y tampoco hay bases de datos de genes para esta especie. Por estos motivos no fue posible la búsqueda de genes blanco para este FT. Con ese tipo de herramienta hubiéramos podido analizar si la secuencia pseudopalindrómica reconocida por los HD-Zip I (CAATNATTG) se encontraba en la región promotora de genes de vías de síntesis de ABA o de compuestos aromáticos como siquimato y bencenoides. En el mismo sentido, los genes aparentemente regulados por NaHD20, presentados en las figuras 11, 12 y 13 tampoco pueden inferirse como blancos directos de este FT.

Dado que múltiples vías metabólicas se vieron afectadas en la corola cuando se silenció la expresión de *NaHD20*, se puede inferir que este FT tendría un papel protagónico en la regulación de procesos bioquímicos en las flores.

Como conclusión podemos señalar que el FT NaHD20 es un inductor de la apertura de los brotes florales y de la corola de las flores de *N. attenuata*. Además, induce la emisión de BA desde la corola, durante su apertura en las flores que abren de noche. En este proceso y en el de respuesta al estrés hídrico, NaHD20 controla que los niveles de la hormona ABA sean los apropiados, para la óptima respuesta al estrés hídrico y salino y para garantizar el mejor comportamiento de de las flores de *N. attenuata* que aseguran la polinización y perpetuación de la especie. Los mecanismos que regulan la biosíntesis de BA son realmente complejos, involucrando a NaHD20 y factores hormonales como el ABA.

## **CAPÍTULO 2**

*La teoría es asesinada tarde o temprano por la experiencia  
(Albert Einstein)*

## **CAPÍTULO 2. AtHB12 y AtHB7 se regulan entre sí y coordinan eventos del desarrollo y de respuestas al estrés hídrico en Arabidopsis**

### **Introducción**

#### **1- El estrés abiótico**

Como condiciones de estrés abiótico se consideran a todas las condiciones ambientales desfavorables que produzcan algún efecto negativo sobre la fisiología y desarrollo del individuo. Las plantas pueden afectarse por la falta o el exceso de agua, la falta de nutrientes, el exceso de sales, los contaminantes en el suelo, las modificaciones de la temperatura o del pH, el exceso o la insuficiencia de luz (Lambers y col., 2008). En la mayoría de los casos, el grado de estrés se mide en relación a la supervivencia de la planta, a la producción del cultivo, al crecimiento, a la acumulación de biomasa, o a la asimilación primaria de CO<sub>2</sub> y de minerales que están relacionados al desarrollo (Taiz y Zaiger, 1998).

Los efectos del estrés abiótico y las respuestas de las plantas van a depender no sólo del tipo de estrés sino de su duración, y también de la especie y genotipo de la planta, del estadio de desarrollo de ésta y del órgano afectado. En la definición de estrés hay que tener en cuenta que determinadas condiciones, por ejemplo de disponibilidad de agua, temperatura y luz, pueden ser óptimas para una especie vegetal y estresantes para otra (Taiz y Zaiger, 1998; Mahajan y Tuteja, 2005).

Afortunadamente, tanto para los ecosistemas como para el hombre, las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos para evadir o sobrevivir en cierta medida a las condiciones de estrés. No debemos asumir que las plantas crecen hasta quedarse sin recursos independientemente de su ambiente, sino que son capaces de procesar las condiciones del ambiente y responder a éstas (Ballaré, 1999).

Los mecanismos moleculares de respuesta al estrés son objeto de estudio desde hace tiempo, y han mostrado hasta el momento ser muy complejos. Ya mencionamos en la introducción general la rápida capacidad que tienen las plantas de modificar su expresión génica ante cambios endógenos y exógenos. Estas modificaciones/regulaciones dadas a través de los factores de transcripción (FTs) permiten la adaptación y respuesta de las plantas al estrés. Con numerosas vías metabólicas interconectadas, los FTs y las fitohormonas son los principales coordinadores de estas respuestas.

El estrés hídrico usualmente resulta en una limitación en la elongación del tallo, una disminución del área foliar y un aumento en el crecimiento de las raíces. Los cambios



fisiológicos y bioquímicos observados en estas condiciones incluyen la pérdida de turgencia de las hojas, las modificaciones en la composición lipídica de la membrana citoplasmática y la síntesis de solutos osmo-protectores (Daugherty y col., 1994; Chaves y col., 2003). Las plantas han desarrollado numerosas estrategias para evitar o tolerar al estrés hídrico. En el caso de la evasión, las plantas tratan de mantener niveles de agua elevados mediante una alta eficiencia de absorción desde las raíces o mediante la reducción de la evapo-transpiración desde los tejidos aéreos. El ABA es una fitohormona clave en las respuestas a estrés abiótico. Cuando las plantas detectan la escasez de agua, aumentan los niveles de ABA y esta hormona induce rápidamente el cierre estomático para impedir la pérdida de agua a través de las hojas (Trewavas y Jones, 1991; Shinozaki y col., 2003).

Estos procesos, tanto a nivel radicular como aéreo, están fuertemente controlados por diversos efectores y vías que se entrelazan. Se conocen hasta el momento dos vías principales de respuesta al estrés hídrico, una dependiente de la hormona ABA y otra independiente de la misma. Por ejemplo, el gen *RD29* contiene secuencias en su promotor que pueden ser reguladas por ABA, ya que contienen un elemento en cis de seis nucleótidos que se conoce como ABA Responsive Element (ABRE). Alternativamente, estos promotores también contienen una secuencia en cis de nueve nucleótidos, llamada Dehydration Responsive Element (DRE; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Stockinger y col., 1997). Los miembros de un grupo específico de FTs reconocen estas secuencias. Los FTs se dividen en familias de acuerdo a los dominios de unión al ADN que contengan y a otras características estructurales. Los miembros de la familia EREBE/AP2 unen el elemento en cis DRE y miembros de la familia b-Zip unen los elementos ABRE (Xiong y col., 2002).

En plantas, los genes que codifican FTs abarcan un alto porcentaje del genoma, en *Arabidopsis* ese porcentaje es un 6 % y en arroz un 3 % (Riechmann y col., 2000; Goff y col., 2002). Las plantas utilizan este gran número de FTs como un medio de adaptación que han adquirido durante su evolución. La inducción de genes relacionados al estrés ocurre principalmente a nivel transcripcional, y la regulación temporal y espacial de la expresión de estos genes es un proceso clave en las respuestas de las plantas al estrés (Rushton y Somssich, 1998; Riechmann y col., 2000). En *Arabidopsis* hay más de 45 familias de FTs (Riechmann, 2002); entre éstas se encuentra la familia de los HD-Zip I, descrita en detalle en la introducción general.

## 2- Los Factores de transcripción AtHB12 y AtHB7

*Arabidopsis thaliana* es la planta modelo de dicotiledóneas por excelencia para estudios moleculares. Esta especie cuenta con más de 2000 FTs en su genoma (Gong y col., 2004; Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009), de los cuales 17 pertenecen a la subfamilia HD-Zip I. AtHB12 y AtHB7 son los miembros más estudiados hasta el momento de esta subfamilia (Söderman y col., 1996; Olsson y col., 2004; Ariel y col., 2007a; Son y col., 2011; Valdés y col., 2012).

De acuerdo con la clasificación de Arce y col. (2011), AtHB12 y AtHB7 son los únicos HD-Zip I de *Arabidopsis* que pertenecen al grupo 1C. Entre ellos comparten un 68 % de identidad en la secuencia aminoacídica y se consideran como dos genes que divergieron de un ancestro en común (Henriksson y col., 2005). Sólo otra especie, *Capsella rubella* del género *Brassicaceae* presenta también dos genes diferentes dentro del mismo clado (*CARUB10017952* y *CARUB10023896*), el primero homólogo de *AtHB12* y el segundo de *AtHB7*. Las demás especies analizadas hasta el momento presentan uno o dos genes en el grupo 1C pero con similitud parcial con ambos, *AtHB12* y *AtHB7*. Por ejemplo, *MtHB1* de *Medicago truncatula*, *NaHD20* de *Nicotiana attenuata*, dos genes duplicados recientemente casi idénticos como *Vv-XP22629* y *Vv-CAN7896* de *Vitis vinifera* o *Pt-HB7* y *Pt-731421* de *Populus trichocarpa* son tan similares a *AtHB12* como a *AtHB7*.

Respecto de *AtHB12* y *AtHB7*, Olsson y col. (2004) describieron que la expresión de estos dos FTs se induce por condiciones de estrés hídrico, ABA y NaCl. También Henriksson y col. (2005) en un estudio de expresión más general de todos los miembros HD-Zip I de *Arabidopsis* demostraron que estos genes se inducen por ABA y NaCl. A su vez, se observó que estos genes se expresan en regiones meristemáticas, raíces y flores (Henriksson y col., 2005). En los trabajos de Olsson y col. (2004) y de Son y col. (2010) se muestra que al sobre-expresar estos genes, las plantas transformadas tienen tallos más cortos y mayor número de ramificaciones que las plantas salvajes. En un trabajo más reciente se informó que las plantas mutantes dobles en *AtHB12* y *AtHB7* presentan raíces más cortas y que en presencia de ABA no muestran un retraso en el crecimiento como ocurre normalmente con las plantas salvajes (Valdés y col., 2012).

La bibliografía nos presenta a *AtHB12* y *AtHB7* como reguladores negativos del crecimiento en respuesta al estrés hídrico (Olsson y col., 2004). Aunque también existen indicios de que estos dos FTs no cumplen exactamente las mismas funciones. Por ejemplo, la unión de *AtHB12* a los promotores de genes relacionados a ABA como *AHG3*, *PYL5* y *PYL8* depende de la presencia de ABA, mientras que la unión de *AtHB7* a estos mismos promotores se da en forma independiente de ABA (Valdés y col., 2012). El aumento de los transcritos de *AtHB12* por

estrés hídrico ocurre a los 2-3 días de iniciado el tratamiento, mientras que los de *AtHB7* aumentan mucho más rápido y fuerte, el primer día (Lee y Chun, 1998). La inducción por ABA 10  $\mu$ M se da para *AtHB12* a los 30 minutos de tratamiento y para *AtHB7* a las 1 -2 horas (Lee y Chun, 1998). A su vez, como se aprecia en la Figura 1, la actividad de los promotores de *AtHB12* y *AtHB7* dirigiendo la expresión del gen reportero *GUS* en plantas transgénicas no es exactamente igual, *AtHB12* es activo en el crecimiento del primer par de hojas (Figura 1A), mientras que *AtHB7* no (Figura 1G). *AtHB7* es activo en semillas en desarrollo, dentro de las vainas desarrolladas (Figura 1O), mientras que *AtHB12* no (Figura 1N). En cambio, ante un tratamiento con estrés hídrico ambos son inducidos fuertemente en toda la planta (Figura 1L y M; Olsson y col., 2004).



**Figura C2. 1. La expresión de *AtHB12* es similar pero no idéntica a la de *AtHB7* en *Arabidopsis*.** Análisis histoquímico de GUS para observar la actividad de los promotores de *AtHB12* (A, N y L) y de *AtHB7* (G, O y M). Plantas de 10 días (A y G), de 28 días (N y O), plantas de 28 días crecidas en condiciones normales de irrigación (izquierda) o en condiciones de estrés hídrico durante dos semanas (derecha; fotos L y M). Adaptado de la figura publicada por Olsson y col., (2004).

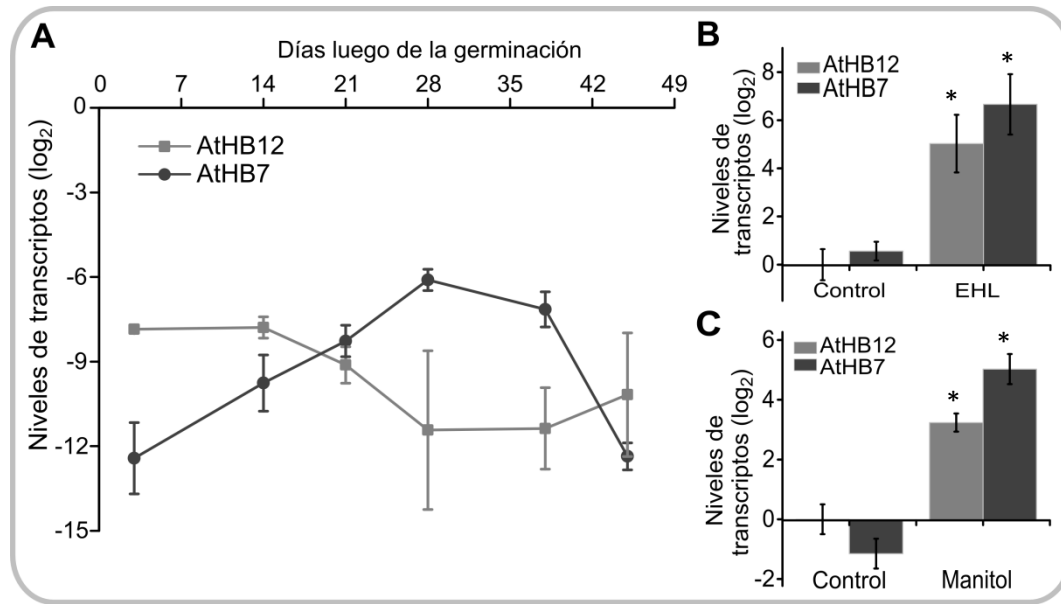
Cabe mencionar que los estudios encontrados en la bibliografía sobre AtHB12 y AtHB7 se han realizado en plantas de diferentes ecotipos y diferentes estadios de desarrollo, haciendo difícil la comparación de estos trabajos y la comprensión de las funciones de AtHB12 y AtHB7.

## Resultados

### 1- *AtHB12* y *AtHB7* tienen diferentes perfiles de expresión en *Arabidopsis*

Con el objetivo de caracterizar los genes *AtHB12* y *AtHB7*, la primera estrategia aplicada fue la de estudiar sus patrones de expresión en distintos tejidos y estadios de desarrollo. Se cuantificaron los niveles de transcritos de estos genes en plantas salvajes de *Arabidopsis* de distintas edades utilizando la técnica de qRT-PCR. Entre los 3 y los 14 días, los niveles de *AtHB12* fueron mayores que entre los 21 y 38 días, mientras que los niveles de transcritos de *AtHB7* fueron casi indetectables en estadios tempranos, aumentando al pasar al estadio reproductivo, entre los días 21 y 38 de crecimiento. Cuando las plantas entraron en la etapa de senescencia, definiendo este estadio cuando al menos una hoja muestra coloración amarilla, lo que en nuestras condiciones de cultivo ocurre aproximadamente a los 45 días, los niveles de transcritos de ambos genes disminuyeron drásticamente, volviéndose casi indetectables (Figura 2A).

Dado que en la bibliografía está informado que la expresión de ambos genes se regula por condiciones de estrés abiótico (estrés hídrico, salino, osmótico; Olsson y col., 2004; Henriksson y col., 2005), nos planteamos hacer un estudio más detallado. Se cuantificaron los transcritos de *AtHB12* y *AtHB7* en plantas sometidas a estrés hídrico leve (EHL) aplicado desde el momento de *bolting* (21 días) y durante 16 días en forma continua. El tratamiento consistió en generar estrés suministrando una cantidad de agua mínima pero suficiente para que el tratamiento no se vuelva letal. Los niveles de expresión tanto de *AtHB12* como de *AtHB7* aumentaron por este tratamiento (Figura 2B). Para evaluar si esta inducción se produce también en plantas más jóvenes (14 días), se realizó un tratamiento con manitol 300 mM. Éste produjo efectos muy similares al estrés hídrico, induciendo los niveles de ambos transcritos (Figura 2C).



**Figura C2. 2.** En plantas salvajes los niveles de transcritos de *AtHB12* y *AtHB7* varían según el estadio de la planta, y aumentan tanto por estrés osmótico como hídrico. Niveles de transcritos de *AtHB12* (gris claro) y de *AtHB7* (gris oscuro). A- tejido aéreo de plantas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones normales de cultivo. B- Hojas de plantas de *Arabidopsis* sometidas a EHL durante 16 días (tratamiento realizado entre los días 22 y 38 luego de la germinación). C- Plantas de 14 días expuestas a manitol 300 mM durante 4 hs. Las muestras se procesaron para extracción de ARN y qRT-PCR. Se utilizaron *ACTINA2/8* como normalizadores, los valores se expresan en forma relativa al valor de *AtHB12* en la muestra control para B y C, valores expresados como log<sub>2</sub>, mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Las barras de error denotan desviación estándar de los valores de tres muestras biológicas; \* indican *Tukey's* < 0,05.

## 2- *AtHB7* y *AtHB12* se regulan mutuamente dependiendo del tejido y del estadio de desarrollo.

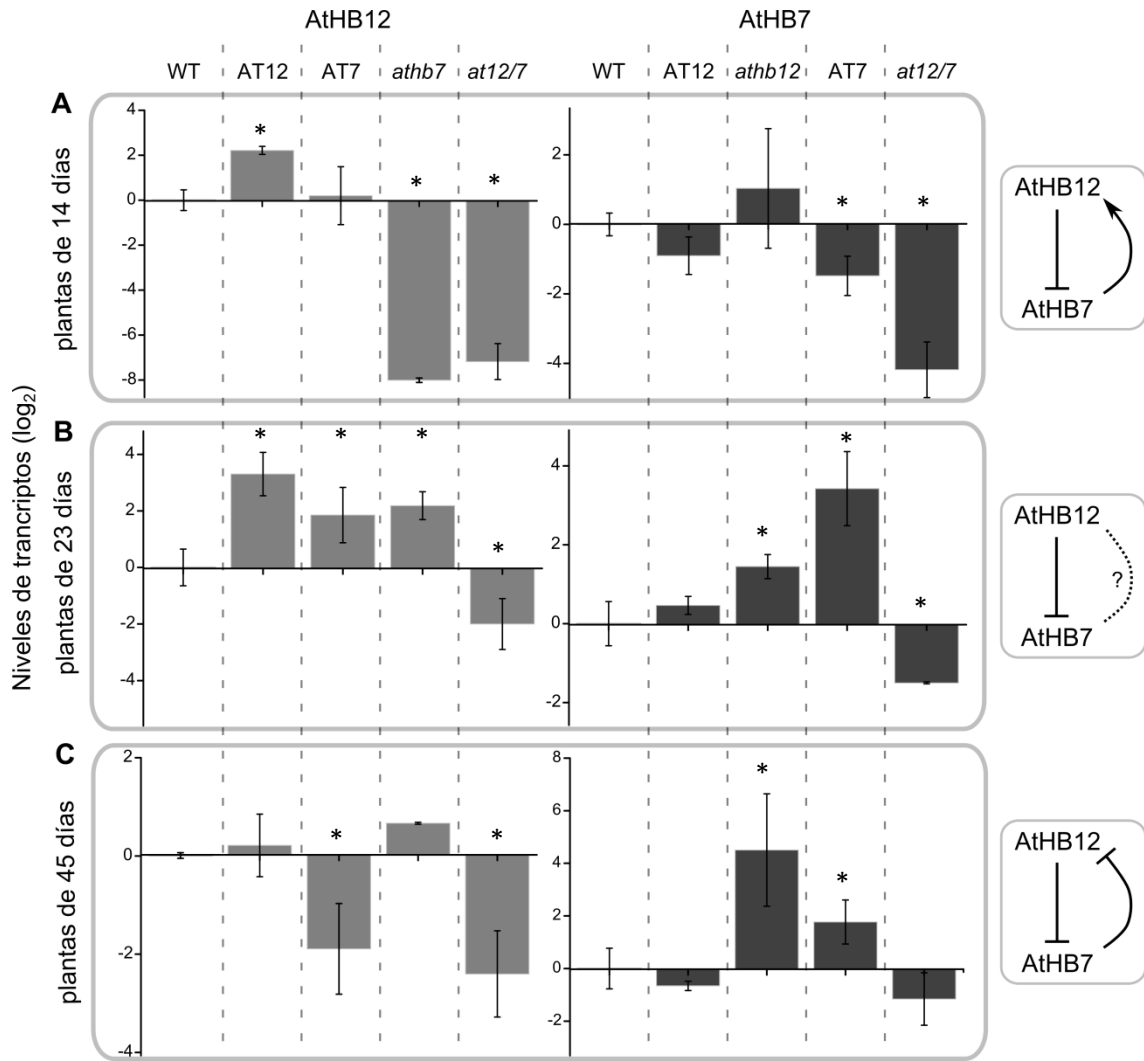
Con el objeto de comprender qué función cumplen estos genes en el desarrollo y la respuesta a las condiciones ambientales, se obtuvieron plantas mutantes y sobreexpresantes para *AtHB12* y *AtHB7*. Se hicieron construcciones en las que la expresión de los ADNc de cada uno de estos genes fuera dirigida por el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor. También se generó un microARN artificial (mARNa) para silenciar ambos genes al mismo tiempo, y se obtuvieron del ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) plantas mutantes en cada uno de estos genes. Las plantas sobreexpresantes de *AtHB12* (*35S::AtHB12*) se denominarán de aquí en adelante AT12, mientras que las de *AtHB7* (*35S::AtHB7*) se llamarán AT7 y las doblemente silenciadas (*35S::mARNa12/7*) *at12/7*. Por otro lado, la nominación de las mutantes simples será a partir de ahora *athb12* y *athb7*.

Como primer paso en la caracterización procedimos a cuantificar los niveles de transcritos de *AtHB7* y *AtHB12* en plantas de *Arabidopsis* de los genotipos mutantes y sobreexpresantes

obtenidos. Como puede apreciarse en la Figura 3, el patrón de expresión de estos genes presenta un cuadro bastante complejo. A los 14 días, *AtHB12* presenta altos niveles de expresión en las plantas AT12 y muy bajos en las *athb12* y *at12/7* como era esperado. Sin embargo, los niveles de este gen fueron muy bajos en las plantas *athb7* y este resultado resultó inesperado. Al mismo tiempo, los niveles de *AtHB7* fueron muy bajos en los genotipos *athb7* y *at12/7* como se esperaba pero también en las plantas AT12, lo cual también nos sorprendió. Curiosamente, las plantas AT7 presentaron los mismos niveles de transcritos de *AtHB7* que los de las plantas salvajes pero en las plantas *athb12*, los niveles de *AtHB7* sí estaban aumentados con respecto a los controles salvajes. La interpretación de estos resultados, una vez corroborada la correcta inserción y secuencia de los transgenes, se volvió compleja. Una de las hipótesis que permitiría explicar estas observaciones experimentales sería una posible represión ejercida directa o indirectamente por *AtHB12* sobre *AtHB7* y una posible inducción ejercida por *AtHB7* sobre *AtHB12* en plantas de 14 días. Un esquema que ilustra este modelo de regulación cruzada se muestra en la Figura 3A.

Las plantas de 23 días presentaron un cuadro diferente. En ellas los niveles de *AtHB12* aumentaron en el genotipo *athb7* con respecto a los genotipos salvaje y AT7. Además, *AtHB7* aumentó como se esperaba en las plantas AT7 y disminuyó en las plantas *athb7* y *at12/7*. Por otro lado, los niveles de *AtHB7* aumentaron en las plantas *athb12*, como se observó en las plantas de 14 días (Figura 3B). De los resultados observados, se puede inferir que en plantas de 23 días, *AtHB7* no induce a *AtHB12*, como sucede a los 14 días, mientras que *AtHB12* continúa reprimiendo la expresión de *AtHB7*. Habiendo observado que en las plantas salvajes de 23 días los niveles de *AtHB7* son altos y los de *AtHB12* bajos (Figura 3A), se podría decir que *AtHB7* “gana” esta competencia entre ellos y que probablemente esté cumpliendo un papel importante en este estadio.

A los 45 días, las plantas *athb7* tienen niveles de *AtHB12* incrementados mientras que las AT7 disminuidos con respecto a las salvajes. A su vez, los niveles de *AtHB7* están aumentados en plantas *athb12* y disminuidos en las AT12 (Figura 3C). Estos resultados se pueden interpretar como el producto de un efecto represor de *AtHB12* sobre *AtHB7* y también un efecto represor de *AtHB7* sobre *AtHB12*. Un modelo esquematizado de estos resultados se muestra a la derecha de la Figura 3.



**Figura C2. 3. Los niveles de transcritos de *AtHB12* y *AtHB7* dependen de la presencia de su homólogo.** Se analizaron los transcritos de *AtHB12* (gris claro) y *AtHB7* (gris oscuro) en hojas de plantas WT, sobreexpresantes y mutantes. A- Tejido aéreo de plantas de 14 días. B- Hojas de roseta de plantas de 23 días. C- Hojas de roseta verdes y en buen estado, de plantas de 45 días. Las muestras se procesaron para extracción de ARN y qRT-PCR. Se utilizaron *ACTINA2/8* como normalizadores, los valores se expresan en forma relativa al valor en la muestra WT, valores expresados como  $\log_2$ , mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de tres muestras biológicas independientes; \* indican Tukey's  $< 0,05$  para cada línea *versus* WT. A la derecha se muestra la posible regulación entre *AtHB12* y *AtHB7*, inferida de los niveles de expresión en todos los genotipos, analizados para cada estadio.

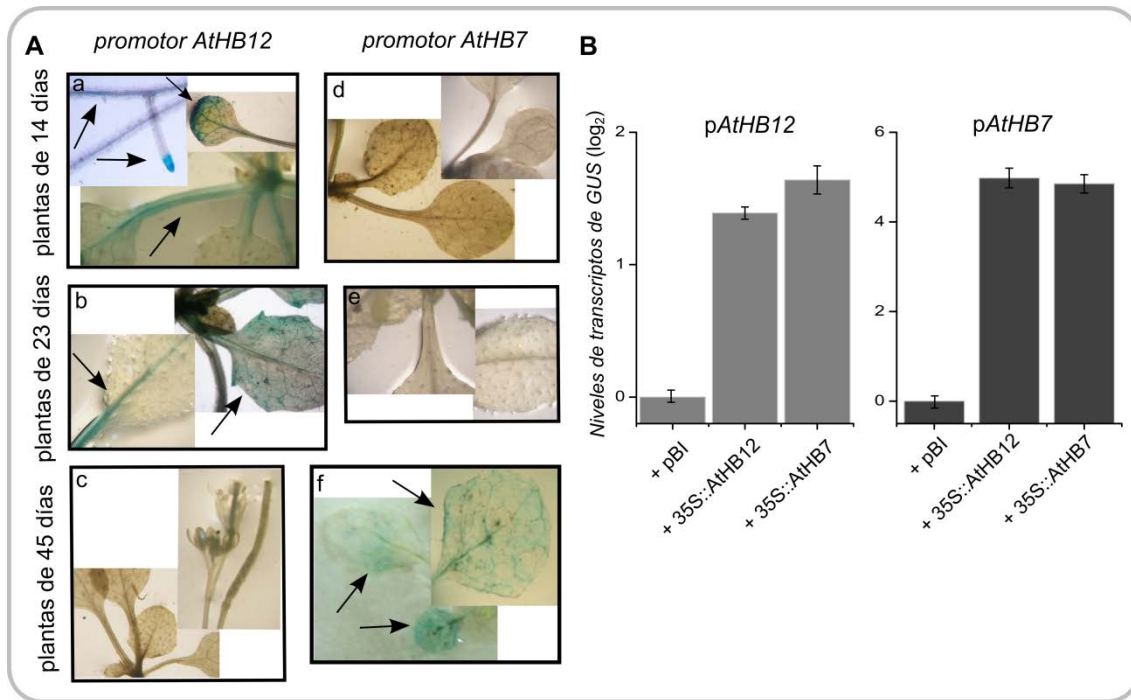


**3- La expresión del gen reportero *GUS* dirigida por el gen *AtHB12* o *AtHB7* indica que el primero es activo en estadios tempranos y el segundo en estadios tardíos del desarrollo vegetal**

Con el objeto de analizar detalladamente la expresión de *AtHB7* y *AtHB12* se aislaron y clonaron ambos genes (región promotora, región 5' no codificante, región codificante más intrón). Se realizaron las construcciones *pAtHB12:AtHB12::GFP::GUS* y *pAtHB7:AtHB7::GFP::GUS* (ver Materiales y Métodos) y se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis*. Las plantas transformadas se llamaron pAtHB12 y pAtHB7 respectivamente.

La actividad de *AtHB12* se evaluó mediante histoquímica del gen *GUS* en las plantas pAtHB12. En la Figura 4A se puede observar una alta expresión en las hojas en estadios tempranos (14 días). Esta expresión disminuye a los 23 días y se vuelve indetectable a los 45 días. Por otro lado, la actividad de *AtHB7* fue indetectable utilizando la misma metodología en casi todos los estadios de desarrollo. Recién en plantas de 45 días se observó tinción histoquímica en hojas senescentes exclusivamente (Figura 4A). Esto se condice con los niveles de transcritos analizados por qRT-PCR, donde se detecta el transcrito de *AtHB7* en estadios tardíos de desarrollo y el de *AtHB12* mayormente en estadios tempranos de desarrollo.

Para evaluar si la actividad de estas construcciones genómicas se veía afectada por la presencia o ausencia de las proteínas codificadas, se realizaron co-transformaciones transitorias en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Se utilizaron las construcciones *35S::AtHB12* y *35S::AtHB7* para poder expresar cada uno de los factores de transcripción y como control negativo, el vector vacío pBI101.3. Se co-transformaron hojas con *pAtHB12:AtHB12::GFP::GUS* + *35S::AtHB12*, *35S::AtHB7* o pBI101.3, y también *pAtHB7:AtHB7::GFP::GUS* + *35S::AtHB12*, *35S::AtHB7* o pBI101.3 Las plantas transformadas se dejaron dos días en reposo y luego se tomaron las muestras y se analizaron los transcritos correspondientes a *GUS*. En la Figura 4B se puede observar que la actividad de la construcción genómica de *AtHB12* es inducida 1,5- 2 veces cuando se expresa *AtHB12* o *AtHB7* con respecto al control, mientras que la construcción genómica de *AtHB7* se indujo unas 5 veces en presencia de cualquiera de las dos proteínas (Figura 4B). Estos resultados indicarían que en un sistema heterólogo, tanto *AtHB12* como *AtHB7* afectan la expresión de ambos genes, *AtHB12* y *AtHB7*. No podemos decir que el efecto sea directo o no, ni tampoco si es un efecto estrictamente positivo, ya que en las hojas de *N. benthamiana* pueden faltar co-factores necesarios para la regulación positiva y/o negativa de un HD-Zip sobre el otro.



**Figura C2. 5. La construcción genómica de *AtHB12* es activa en plantas de edad temprana y la de *AtHB7* en plantas de edad avanzada.** Esta actividad es a su vez afectada por la expresión de ambas proteínas, *AtHB12* y *AtHB7*. A- Tinción histoquímica GUS que revela la actividad de los genes *AtHB12* y *AtHB7* en plantas de diferentes edades crecidas en condiciones normales. B- Niveles de transcritos de *GUS* en hojas de tabaco transformadas transitoriamente con los plásmidos que se indican en el eje x de la figura. Las muestras se procesaron para extracción de ARN y qRT-PCR. Se utilizaron *ACTINA2/8* como normalizadores, los valores se expresan en forma relativa al valor en la muestra control (+pBI), valores expresados como  $\log_2$ , mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de tres muestras biológicas independientes.

#### 4- *AtHB12* induce la elongación de la raíz principal

Una vez obtenidas las plantas mutantes y sobreexpresantes homocigotas descritas más arriba, se evaluaron distintos parámetros fenotípicos, con el objeto de realizar una caracterización funcional. Para analizar las raíces las plantas fueron crecidas en MS-Agar en posición vertical y se midieron las longitudes de las raíces principales a los 8, 12 y 14 días luego de la germinación. En plántulas de entre 8 y 14 días, las raíces principales de las plantas del genotipo AT12 presentaron una longitud superior en un 15 % comparadas con las plantas salvajes. Las plantas *athb7* también mostraron una longitud superior en un 15 % entre los días 8 y 12 respecto a las salvajes mientras que las de los genotipos *athb12*, *at12/7* y AT7 presentaron raíces entre un 10 y un 30 % más cortas que las de plantas salvajes (Figura 5). Considerando el efecto de cada uno de estos FT sobre el otro, estos resultados indicarían una acción positiva de *AtHB12* y/o negativa de *AtHB7* sobre la elongación de la raíz principal.

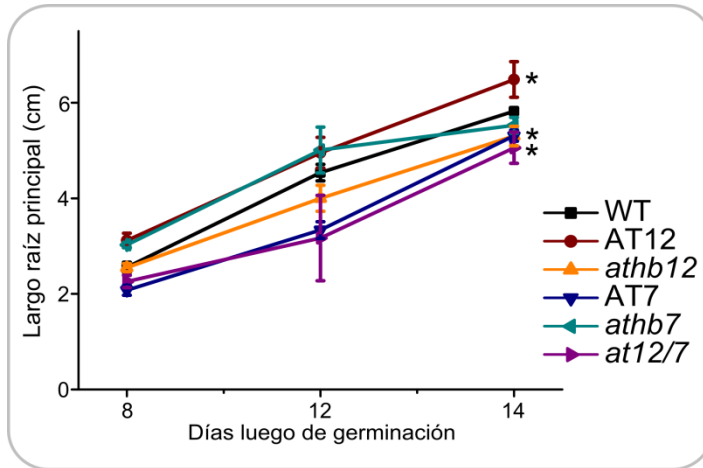
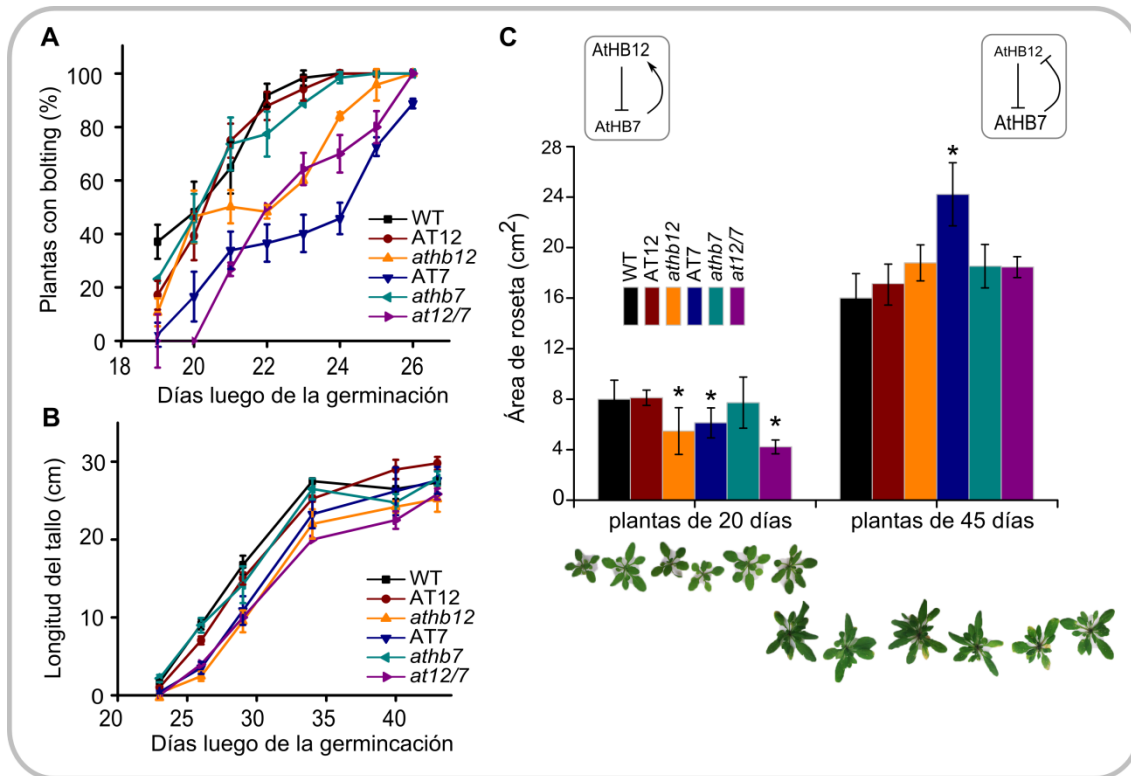


Figura C2. 5. El largo de la raíz principal se ve aumentado por la sobreexpresión de AtHB12 (rojo) y reducida por la sobreexpresión de AtHB7 (verde) respecto a las plantas salvajes (negro). Las barras de error indican la desviación estándar de los valores obtenidos en diez muestras biológicas; \* indican *Tukey's* < 0,05.

### 5- AtHB12 y AtHB7 regulan el desarrollo foliar en forma dependiente del estadio de desarrollo de la planta

Se analizó la aparición y longitud del tallo principal. Las plantas AT7, *athb12* y *at12/7* presentaron un *bolting* entre 2 y 3 días retrasado respecto de los demás genotipos (Figura 6A) aunque la longitud final del tallo no presentó diferencias significativas entre los distintos genotipos (Figura 6B). También se procedió a cuantificar el área foliar en plantas de 20 y 45 días de edad; se pesaron y fotografiaron las rosetas completas de las plantas sobreexpresantes y mutantes. Las observaciones más relevantes fueron que a los 20 días, las plantas *athb12* y *at12/7* mostraron un 40 % menos de área foliar que las plantas salvajes y a los 45 días las plantas AT7 presentaron un 50 % más de área de roseta (Figura 6C). Estos resultados estarían indicando que AtHB12 regularía positivamente el desarrollo foliar en plantas de estadio vegetativo, mientras que AtHB7 lo haría en plantas de estadio reproductivo.

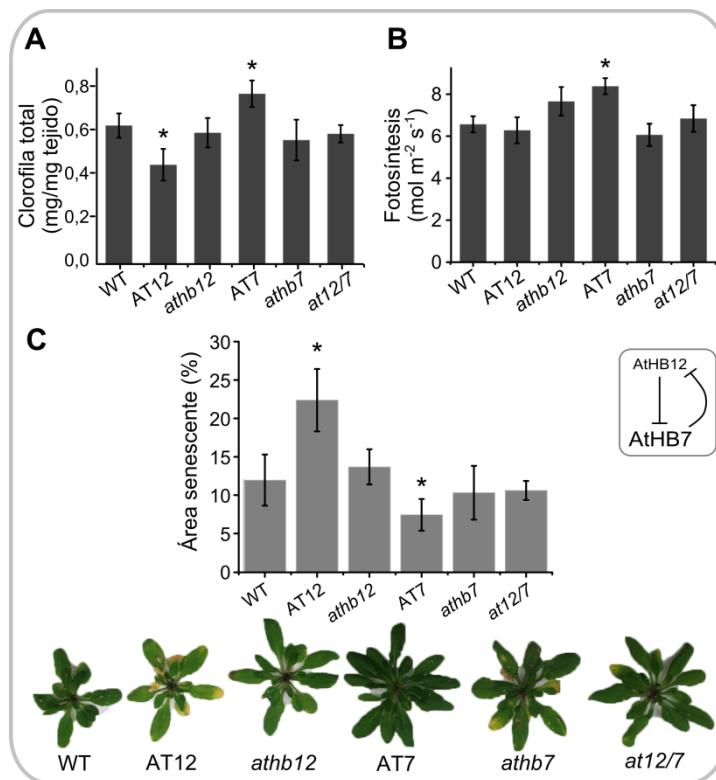


**Figura C2. 6.** Las plantas AT7 tienen un retraso inicial en el crecimiento del tallo y la roseta que luego de los 40 días se iguala en la longitud del tallo y se supera en el tamaño de la roseta, respecto de los demás genotipos. A- Porcentaje de plantas de cada genotipo que presentan *bolting* entre los 18 y 26 días luego de la germinación. B- Longitud del tallo durante el desarrollo. C- Tamaño de la roseta. Las barras de error denotan desviación estándar de los valores de diez muestras biológicas para A, 8 muestras para B y 6 muestras para C; \* indican *Tukey's* < 0,05.

## 6- AtHB7 y AtHB12 participan del control de los niveles de pigmentos fotosintéticos y de la fotosíntesis

Se analizaron los niveles de clorofila y fotosíntesis en las plantas sobreexpresantes y mutantes. Las plantas de 20 días no presentaron diferencias en la concentración de clorofila entre genotipos, mientras que las de 45 días mutantes y sobreexpresantes comienzan a diferenciarse. El genotipo AT7 mostró tener un 30 % más de clorofila total y las plantas AT12 un 20 % menos que las plantas salvajes (Figura 7A). La tasa fotosintética se evaluó midiendo el intercambio de CO<sub>2</sub>. Las hojas de plantas AT7 tienen una tasa fotosintética 30 % mayor que la de las plantas salvajes (Figura 7B). Las plantas AT7 son más eficientes fotosintéticamente que los demás genotipos, y si tenemos en cuenta que el área de roseta de las plantas AT7 es mayor que el de las plantas salvajes (Figura 6C), podemos decir que la diferencia de en la eficiencia fotosintética total es aún mayor.

Cuando las plantas entraron en el estadio de senescencia se valoró el ingreso a este estadio midiendo la superficie amarilla de las hojas en todos los genotipos. Para esto se tomaron fotografías de las hojas y las mismas se analizaron con el programa ImageJ, lo que permitió calcular el % de área no verde. Las plantas AT7, no sólo presentaron una mayor área total (Figura 6C) sino que también el porcentaje de área senescente respecto al área total fue un 8 % menor que el de las de las plantas salvajes (Figura 7C). Esto se puede visualizar en la fotografía de las rosetas de plantas maduras en la Figura 7C.

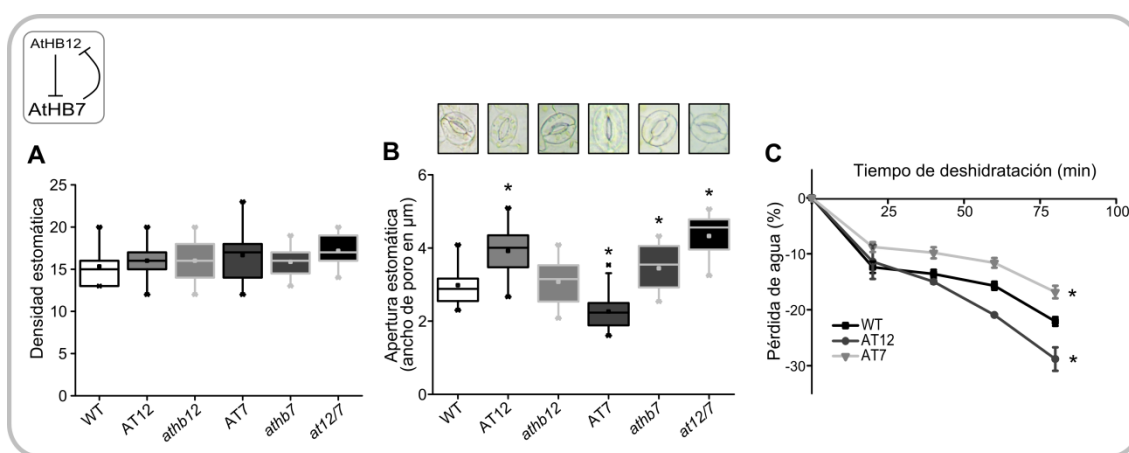


**Figura C2. 7. AtHB7 induce la producción de clorofila y la fotosíntesis en plantas de 45 días y retrasa la senescencia.** A- Niveles de clorofila total en plantas sobreexpresantes y mutantes de 40 días. B- Niveles de fotosíntesis en plantas sobreexpresantes y mutantes de 40 días. C- Porcentaje de área senescente de la roseta completa de plantas sobreexpresantes y mutantes de 45 días. Las barras de error indican la desviación estándar de los valores tomados de seis muestras biológicas independientes; \* indican Tukey's < 0,05.

## 7- AtHB7 controla la pérdida de agua promoviendo el cierre estomático

Se evaluaron en detalle los estomas de plantas de 40-45 días. No se observaron diferencias entre genotipos en la densidad estomática (Figura 8A) pero sí en la apertura de los poros estomáticos (Figura 8B). El ensayo fue realizado tomando improntas de la cara abaxial de las hojas y las mismas se observaron al microscopio óptico y se fotografiaron (Materiales y Métodos). Los estomas de las plantas WT presentaron poros de alrededor de 3  $\mu\text{m}$  de apertura, las plantas AT7 de 1  $\mu\text{m}$  más cerrados que el promedio, y las plantas AT12 tuvieron poros 1  $\mu\text{m}$  más abiertos que las plantas salvajes (Figura 8B). Se pueden observar fotos representativas en la Figura 8B. Además, se analizó la pérdida de agua de las hojas sometidas a

deshidratación. Se escindieron hojas y se las pesó cada 10 minutos. Los valores se graficaron considerando la pérdida de peso en su totalidad como pérdida de agua en función del tiempo transcurrido. A los 80 minutos las hojas de plantas salvajes perdieron un 20 % de agua, las AT12 un 30 % y las AT7 sólo un 15 % de agua (pérdida de peso referida al peso inicial de la hoja, Figura 8C). Estos resultados indicarían que las plantas AT7 no sólo tienen estomas más cerrados sino que durante la deshidratación los mantienen más cerrados o los cierran aún más, mientras que las plantas AT12 muestran un comportamiento opuesto.



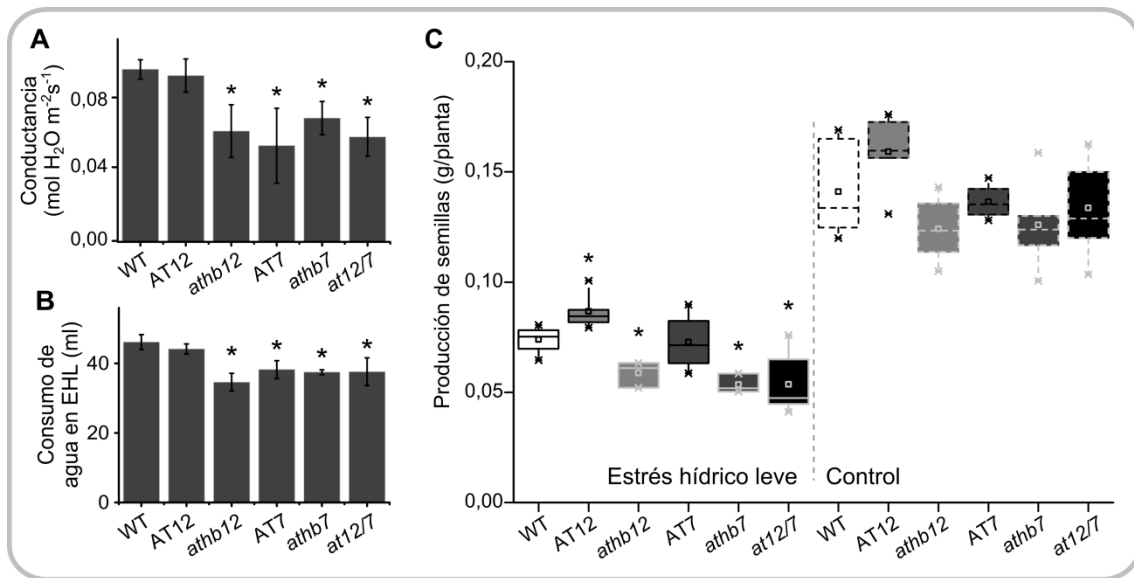
**Figura C2. 8. La pérdida de agua y el cierre estomático son regulados por AtHB7.** A- Densidad estomática en hojas de plantas crecidas en condiciones normales. B- Ancho de la apertura del poro estomático de hojas de plantas crecidas en condiciones normales. C- Porcentaje de la pérdida de agua de hojas escindidas que se dejaron deshidratar (tomada como peso de las hojas a lo largo del tiempo). Las barras de error denotan desviación estándar de los valores de diez muestras biológicas para 20 estomas (A y B) y seis muestras biológicas (C); \* indican *Tukey's* < 0,05.

## 8- AtHB7 y AtHB12 afectan la conductancia estomática, el consumo de agua y la producción de semillas

Como ya mencionamos anteriormente, la expresión de los genes *AtHB12* y *AtHB7* se induce por estrés hídrico (Figura 2B; Olsson y col., 2004). Además, nuestras propias observaciones indicaron que las plantas sobreexpresantes y mutantes en estos genes presentan alteraciones en el comportamiento de los estomas, reflejadas en la pérdida de agua. Resultó interesante entonces, analizar el fenotipo de estas plantas en condiciones de estrés hídrico.

La evaluación de la tasa de transpiración o conductancia de las hojas medida por IRGA indicó menores niveles que en plantas salvajes en las hojas de plantas AT7 y mutantes, *athb12*, *athb7* y *at12/7* (Figura 9A). Además, se realizó un ensayo de estrés hídrico leve (EHL) y continuo aplicado desde el momento de *bolting* hasta las senescencia. No se observaron diferencias

significativas en la condiciones de senescencia causada por el estrés para los distintos genotipos, pero sí observamos diferencias en el consumo de agua durante el tratamiento. Cada 48-72 hs desde el inicio del tratamiento de EHL, las plantas fueron pesadas para controlar el consumo de agua y para mantener el mismo grado de estrés en cada maceta (detallado en Materiales y Métodos). Se observó que las plantas *athb12*, *athb7* y *at12/7* consumieron entre un 18 y un 25 % menos de agua a lo largo de todo el tratamiento, mientras que las plantas AT12 y AT7 consumieron igual cantidad que las plantas salvajes (Figura 9B). Las diferencias en el consumo de agua se vieron reflejadas en la producción de semillas.



**Figura C2. 9. El consumo de agua y la producción de semillas en EHL se ven afectados por la presencia de AtHB12.** A- Conductancia estomática medida con IRGA. B- Consumo de agua de plantas en maceta durante el tratamiento de EHL. C- Producción de semillas (en peso) de plantas crecidas en condiciones de EHL (panel izquierdo) y en condiciones normales (panel derecho). Las barras de error indican la desviación estándar de los valores de seis muestras biológicas (A) y 12 muestras biológicas (B y C); \* indican *Tukey's* < 0,05.

La evaluación de la producción se hizo cosechando y pesando las semillas de cada planta individual. Las plantas mutantes *athb12*, *athb7* y *at12/7* produjeron entre un 20 y un 25 % menos (en peso) mientras que las AT12 produjeron un 10 % más que las plantas salvajes respectivamente (Figura 9C, panel izquierdo). La producción de semillas se evaluó asimismo en plantas crecidas en condiciones estándar, ésta fue como se esperaba, mayor que en condiciones de EHL para todos los genotipos. Lo que sí fue sorprendente fue que no hubo variaciones entre genotipos en estas condiciones indicando que AtHB7 y AtHB12 no participarían en estos eventos en condiciones normales sino sólo en respuesta a estrés (Figura 9C, panel derecho).

## Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo nos indican que ArHB12 y AtHB7 cumplen funciones diferentes pero relacionadas, tanto en el desarrollo de *Arabidopsis* como en las respuestas a estrés. La expresión de los genes *AtHB12* y *AtHB7* estaría regulada de alguna forma por la presencia o ausencia del otro. Esta regulación varía con el estadio de desarrollo, siendo inductiva o represiva, generando una coordinación de funciones, principalmente en el desarrollo de hojas, la producción de clorofila, la fotosíntesis y la toma y pérdida de agua en plantas sometidas a estrés hídrico leve. Esta coordinación de funciones se refleja a su vez en la producción final de semillas.

La información disponible en bases de datos coloca a AtHB12 y AtHB7 como dos parálogos que divergieron de un ancestro común en las *Brassicaceae* (Henriksson y col., 2005; Arce y col., 2011). Estos dos HD-Zip, junto con NaHD20 caracterizado en el capítulo 1 de este trabajo, se resuelven en el grupo 1C de los HD-Zip I, presentando motivos similares pero no idénticos fuera del dominio HD-Zip (Arce y col., 2011; y este trabajo). AtHB12 presenta al final de la región carboxilo-terminal (CTR) un motivo de activación transcripcional de tipo AHA (con aminoácidos Aromáticos-Hidrofóbicos grandes-Acídicos; Döring y col., 2000) que es diferente en AtHB7 (Figura C1.2).

Existen otros HD-Zip I también aparentemente parálogos que presentan diferencias fuera del HD-Zip; éstos son HvHox2 y Vrs1 de cebada. El primero tiene en su CTR un motivo adicional de 14 aminoácidos, que el segundo no tiene. Los autores sugieren que este motivo podría interactuar con ciertos co-activadores para ejercer sus funciones biológicas (Sakuma y col., 2013). AtHB12 y AtHB7 presentan también diferencias en otros motivos putativos hacia el CTR. Además, AtHB12 tiene dos sitios putativos de fosforilación en esta región, mientras que AtHB7 tiene tres (Figura C1.2; Arce y col., 2011).

En la literatura, AtHB12 y AtHB7 han sido considerados como duplicaciones con las mismas funciones (Olsson y col., 2004), pero a su vez no se ha estudiado detalladamente la función de los dos en un mismo trabajo, con las mismas condiciones y el mismo fondo genético. Las pocas comparaciones que podemos realizar respecto de la funcionalidad de estos dos FTs son, por ejemplo del trabajo de Valdés y col., (2012), en el que se observa que la unión de AtHB12 a los promotores de ciertos genes relacionados al ABA depende de ABA, mientras que la unión de AtHB7 a los mismos promotores no depende de esta hormona. En los trabajos de Lee y Chun (1998) y de Olsson y col., (2004), se observa que *AtHB12* y *AtHB7* se inducen por estrés hídrico, pero esta inducción es diferente para cada uno, siendo necesario un estrés más avanzado para *AtHB7* que para *AtHB12*. Estas observaciones y las diferencias mencionadas que se observan



en el CTR de *AtHB12* y *AtHB7* son consistentes con los resultados obtenidos en este trabajo, que indicarían que serían necesarios factores adicionales como co-represores o co-activadores para llevar a las funciones de ambos HD-Zips. Podemos especular que estos co-factores interaccionarían con los motivos presentes en el CTR, para determinar así funcionalidades específicas del estadio de desarrollo, del tejido o de la condición de crecimiento, lo cual contribuiría a la regulación cruzada que ocurre entre *AtHB12* y *AtHB7*.

El análisis de expresión de *AtHB12* y *AtHB7* en plantas salvajes que realizamos junto con el análisis de la actividad de sus promotores fusionados al gen reportero *GUS* mostró que *AtHB12* sería el de mayor actividad en estadios tempranos (Figura 2A y 4A) y ejercería un efecto negativo muy fuerte sobre la expresión de *AtHB7* (Figura 3A). En concordancia con este estudio de expresión, las plantas AT12 son las que dan mayores diferencias fenotípicas en este estadio respecto de las salvajes y las demás líneas. Para *AtHB7*, en cambio, se observó que en estadios avanzados, pasados los 35 días de crecimiento, se expresa más fuertemente y pasa a tener un efecto negativo sobre la expresión de *AtHB12* (Figura 2A, 3C y 4A). Esto se observa en los niveles de transcritos de *AtHB12*, elevados en las plantas *athb7* y disminuidos en las plantas AT7 en este estadio. El ensayo de co-transformación de hojas de *N. benthamiana* con los promotores de *AtHB12* y *AtHB7*, más las construcciones *35S::AtHB12* o *35S::AtHB7*, confirmó que existe un efecto de cada uno de estos FTs sobre la actividad de su promotor y del promotor del gen homólogo. En este ensayo observamos una inducción en la actividad de ambos promotores por la presencia de cualquiera de los dos FTs. Con este ensayo no podemos concluir si esta regulación es directa o no, ni tampoco si la naturaleza de la regulación es positiva o negativa. En el sistema heterólogo utilizado podrían faltar co-factores que sí se encuentren en *Arabidopsis*.

Olsson y col. (2004) analizaron las raíces de plantas de 10-14 días en respuesta a la hormona ABA. Estos autores observaron una menor inhibición del crecimiento de la raíz por ABA en plantas mutantes en *AtHB12* comparadas con las salvajes (ecotipo Col-6) y una mayor inhibición por efecto de ABA en plantas sobreexpresantes de *AtHB12* y *AtHB7* (ecotipo Ws). Posteriormente, Valdés y col. (2012) observaron que las plantas mutantes dobles en *AtHB12* y *AtHB7* presentaban raíces más cortas; sin embargo, en presencia de ABA las raíces de estas mutantes dobles no retrasaron su crecimiento como ocurre normalmente con las plantas salvajes. En este trabajo, las plantas AT12 mostraron una elongación superior de las raíces que las plantas WT mientras que las plantas AT7 presentaron el fenotipo contrario al igual que las de genotipo *athb12* (Figura 5). Resumiendo las observaciones propias, y las de la literatura

referidas a la elongación de la raíz principal, podríamos decir que *AtHB12* tiene un efecto positivo sobre este parámetro y, por el contrario, *AtHB7* tendría un efecto negativo. Esto sería un claro ejemplo en el que estos dos FTs tienen efectos opuestos en el mismo tejido.

Se han publicado trabajos que muestran un menor crecimiento del tallo principal de plantas sobreexpresantes en *AtHB12* (Olsson y col., 2004; Son y col., 2010) y *AtHB7* (Olsson y col., 2004). Nosotros no pudimos observar este fenotipo en nuestras plantas AT12 (Figura 6B); la principal causa de esta diferencia podría ser que estos autores (Olsson y col., 2004; Son y col., 2010) utilizaron una construcción para sobreexpresar *AtHB12* que no codifica para la proteína completa, sino para una versión trunca carente del CTR. Al comparar resultados de ensayos realizados con una versión de *AtHB12* completa y otros con una versión sin carboxilo-terminal, hay que hacerlo con cautela. Como ya mencionamos, en esta región de la proteína se encuentran motivos conservados en los HD-Zip I de diferentes especies (Figura C1.2); a su vez, el CTR junto con la región amino-terminal, son las zonas proteicas que diferencian a unos HD-Zip I de otros dentro de una misma especie. Por todo ello, estas regiones tienen una clara importancia en la funcionalidad de cada HD-Zip I, y la comparación de ensayos realizados con la proteína completa o con la proteína trunca no es ideal.

El análisis del desarrollo de la roseta de las plantas mutantes y sobreexpresantes nos indicó que *AtHB12* regularía positivamente el desarrollo foliar en plantas de estadio vegetativo, mientras que *AtHB7* lo haría en plantas de estadio reproductivo. Estas observaciones estarían de acuerdo con el hecho de que en plantas salvajes en estadio vegetativo el transcrito de *AtHB12* se encuentra más expresado, mientras que en estadio reproductivo es el transcrito de *AtHB7* el que se expresa.

Los niveles de clorofila y de fotosíntesis no habían sido analizados por otros autores en plantas sobreexpresantes y mutantes en *AtHB12* y *AtHB7*, pero sí en plantas de tomate que expresan *AtHB7* (línea DTL-20, Mishra y col., 2012). Los autores del trabajo hecho en plantas de tomate observaron un aumento de la fluorescencia de la clorofila en hojas de plantas de tomate DTL-20. En concordancia, nosotros observamos que las plantas de *Arabidopsis* AT7 tienen mayores niveles de clorofila y también de fotosíntesis, mientras que las plantas AT12 tienen el fenotipo contrario. Las plantas de tomate que expresan *AtHB7* son también más tolerantes a la sequía que sus controles salvajes (Mishra y col., 2012). En nuestro trabajo los ensayos de estrés hídrico, las plantas mutantes y sobreexpresantes en *AtHB12* y *AtHB7*, no mostraron diferencias en la tolerancia o susceptibilidad al estrés hídrico. Esto podría deberse a que en *Arabidopsis* están ambos FTs. A través de la regulación cruzada que ejercen entre sí *AtHB12* y *AtHB7* no permiten que los niveles de expresión de ninguno de los dos genes en las plantas sobreexpresantes alcancen valores elevados. Por ello tal vez las plantas de *Arabidopsis*

sobreexpresantes no presentan un fenotipo en tolerancia al estrés hídrico, como sí lo hacen las plantas DTL-20 de tomate (Mishra y col., 2012). Por otro lado, en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés hídrico leve sí observamos diferencias fenotípicas en el consumo de agua durante el estrés, en la pérdida de agua durante la deshidratación y en la producción final de semillas. De acuerdo a nuestros resultados podemos inferir que AtHB7 controlaría la pérdida de agua a través del cierre estomático y que tanto AtHB12 como AtHB7 participarían en la regulación del consumo de agua.

En relación a la producción, las plantas AT7, con mayores rosetas, mayor nivel fotosintético y menor pérdida de agua, no producen más cantidad de semillas, incluso producen menos que las plantas salvajes en estrés hídrico leve, al igual que las *athb12* y *at12/7*. En cambio, las AT12, con menor clorofila y mayor pérdida de agua producen más semillas en estrés hídrico leve que las salvajes y las demás líneas.

Podemos concluir que las diferencias estructurales entre AtHB12 y AtHB7, junto con las diferencias en los patrones de expresión, han llevado a una neo-funcionalidad. Existe una regulación cruzada entre *AtHB12* y *AtHB7*, positiva o negativa, dependiendo del estadio de desarrollo y de las condiciones de crecimiento. Esta regulación cruzada conduce a que ambos factores de transcripción controlen el desarrollo foliar de *Arabidopsis* y la producción de semillas.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES**

*Cuando más grande es el caos, más próxima está la solución*

*(Mao Tse-Tung)*

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de Tesis nos permitió caracterizar funcionalmente tres factores de transcripción de la familia HD-Zip I. Uno de ellos, *NaHD20* de *Nicotiana attenuata*, no había sido identificado ni estudiado con anterioridad; los otros dos, *AtHB12* y *AtHB7* de *Arabidopsis*, contaban con información parcial acerca de su expresión y función.

*NaHD20* participa de la regulación del desarrollo floral de *Nicotiana attenuata*, tanto en el pasaje al estadio reproductivo como en la apertura de los capullos y las corolas de las flores. Además, *NaHD20* regula los niveles de la hormona ABA, tanto en hojas durante el estrés hídrico como en flores durante su apertura. *NaHD20* también regula la producción y emisión del compuesto volátil principal en la atracción de polinizadores, la acetona de bencilo. La BA emitida durante la apertura de la corola de flores de *N. attenuata*, es inducida por *NaHD20*. Las flores, para emitir apropiadamente la BA, necesitan de la correcta regulación de los niveles de ABA que estaría coordinada por *NaHD20*.

Por su parte, *AtHB12* y *AtHB7*, presentan una variación temporal de su expresión a lo largo del desarrollo. Esta variación de la expresión es opuesta entre *AtHB12* y *AtHB7*, cuando el primero se induce, el segundo se reprime, y viceversa. Esto nos llevó a concluir que existe una regulación cruzada entre ambos HD-Zips. Observamos una retroalimentación en la que *AtHB12* regularía negativamente los niveles de transcritos de *AtHB7*, y *AtHB7* regularía positiva o negativamente los niveles de transcritos de *AtHB12* dependiendo del estadio en el que se encuentra la planta.

Esta regulación entre ambos HD-Zips permitiría una coordinación fina de los eventos de desarrollo, como la elongación de las raíces, el desarrollo foliar, la producción de clorofila, la fotosíntesis y el cierre estomático. A su vez, cuando las plantas se someten al estrés hídrico, tanto *AtHB12* como *AtHB7* son inducidos transcripcionalmente, desapareciendo el control de la expresión de uno por el otro. Cuando se aplica estrés hídrico leve, *AtHB12* induce el consumo de agua, y también la pérdida de ésta a través de los estomas, mientras que *AtHB7* tiene el efecto contrario en la pérdida de agua. A su vez, la expresión de *AtHB12* en estadios avanzados del desarrollo influye positivamente en la producción de semillas en condiciones limitantes de agua.

Los tres HD-Zip I estudiados, pertenecientes al grupo 1C, comparten entre un 50 y un 68 % de identidad aminoacídica. Contienen, además del homeodominio y el cierre de leucinas, motivos conservados y no conservados en la región carboxilo-terminal. Uno de estos motivos

es de tipo AHA, caracterizado como de activación transcripcional (Döring y col., 2000; Arce y col., 2011). Además, comparten algunos sitios putativos de fosforilación, pudiendo ser éste un mecanismo de regulación post-traducciona l de estos HD-Zips que presentan funciones particulares para cada condición de crecimiento y tejido en el que se los analizó.

Tanto la expresión de *NaHD20* como las de *AtHB12* y *AtHB7* aumentan transcripcionalmente por estrés hídrico. Al comparar el comportamiento de las plantas mutantes en estos genes en condiciones de estrés hídrico, comprobamos que el silenciamiento de *NaHD20* provocó una recuperación post-estrés más rápida que en plantas no silenciadas, aumentando considerablemente el número de flores y capullos producidos luego del estrés. La sobreexpresión de *AtHB12* originó un aumento en la producción de semillas de las plantas estresadas respecto de las salvajes. La mutación de uno de los dos, plantas *athb12* y plantas *athb7*, o de ambos, plantas *at12/7*, provocó una fuerte disminución de la producción de semillas en estrés, pero no así en condiciones normales.

El número de flores y la producción de volátiles florales fue fuertemente afectado por el silenciamiento de *NaHD20*. Estos parámetros no pudieron ser evaluados en plantas sobreexpresantes y mutantes para los HD-Zip de Arabidopsis, ya que hay que tener en cuenta que cada especie tiene un conjunto de volátiles específico; en Arabidopsis incluso los diferentes ecotipos emiten diferentes volátiles (Gutensohn y col., 2011).

Para demostrar la funcionalidad de los motivos conservados y no conservados en las regiones CTRs, serán necesarios ensayos adicionales que implican mutaciones puntuales y obtención de nuevas plantas transgénicas de ambas especies.

A modo de cierre, mediante este trabajo podemos afirmar que los tres HD-Zips l estudiados responden a estrés abiótico, regulan el desarrollo de las plantas en estas condiciones y en condiciones normales de crecimiento, y se relacionan con respuestas que involucran al ABA. Cabe destacar que *NaHD20*, *AtHB12* y *AtHB7* participan en la etapa de floración de las plantas, encontrándose involucrados en el desarrollo de flores y/o semillas.

**REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama R; Agren J** (2012). *Magnitude and timing of leaf damage affect seed production in a natural population of Arabidopsis thaliana (Brassicaceae)*. PLoS ONE, 7(1): e30015.
- Allmann S; Baldwin IT** (2010). *Insects betray themselves in nature to predators by rapid isomerization of green leaf volatiles*. Science, 329: 1075-1078.
- Anderson JP; Badruzsaufari E; Schenk PM; Manners JM; Desmond OJ; Ehlert C; Maclean DJ; Ebert PR; Kazan K** (2004). *Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis*. Plant Cell, 16: 3460-3479.
- Aoyama T; Dong CH; Wu Y; Carabelli M; Sessa G; Ruberti I; Morelli G; Chua NH** (1995). *Ectopic expression of the Arabidopsis transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in Tobacco*. Plant Cell, 7: 1773-1785.
- Aphalo PJ; Ballaré CL** (1995). *On the importance of information-acquiring systems in plant-plant interactions*. Funct Ecol, 9: 5-14.
- Arce AL; Raineri J; Capella M; Cabello JV; Chan RL** (2011). *Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors; a potential source of functional diversity*. BMC Plant Biol, 11: 42.
- Ariel FD; Diet A; Marion V; Gruber V; Florian F; Chan RL; Crespi M** (2010). *Environmental regulation of lateral root emergence in Medicago truncatula requires the HD-Zip I transcription factor HB1*. Plant Cell, 22: 1–14.
- Ariel FD; Manavella PA; Dezar CA; Chan RL** (2007a). *The true story of the HD-Zip family*. Trends Plant Sci, 12: 419-426.
- Ariel FD; Manavella PA; Giacomelli JI; Chan RL** (2007b). *HD-Zip I and II, transcription factors involved in the adaptive response to environmental stress*. En: *Plant Stress*. Global Science Books (Ed: Prof. J. Teixeira Da Silva) Japan 1(2), pp. 189-196.
- Arrom L; Munné-Bosch S** (2012). *Hormonal changes during flower development in floral tissues of Lilium*. Planta, 236: 343-354.
- Atkinson NJ; Urwin PE** (2012). *The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field*. J Exp Bot, 63: 3523–3544.
- Azad AK; Ishikawa T; Ishikawa T; Sawa Y; Shibata H** (2008). *Intracellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip*. J Exp Bot, 59: 2085–2095.
- Baldwin IT** (2001). *An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco*. Plant Physiol, 127: 1449-1458.
- Baldwin IT; Morse L** (1994). *Up in Smoke 2. Germination of Nicotiana attenuata in response to smoke-derived cues and nutrients in burned and unburned soils*. J Chem Ecol, 20: 2373–2391.



- Baldwin IT; Preston C; Euler M; Gorham D** (1997). *Patterns and consequences of benzyl acetone floral emissions from Nicotiana attenuata plants*. J Chem Ecol, 23: 2327–2343.
- Ballaré CL** (1999). *Keeping up with the neighbours: Phytochrome sensing and other signalling mechanisms*. Trends Plant Sci, 4: 97-102.
- Bar-Akiva A; Ovadia R; Rogachev I; Bar-Or C; Bar E; Freiman Z; Nissim-Levi A; Gollop N; Lewinsohn E; Aharoni A; Weiss D; Koltai H; Oren-Shamir M** (2010). *Metabolic networking in Brunfelsia calycina petals after flower opening*. J Exp Bot, 61: 1393–1403.
- Bell DL; Sultan SE** (1999). *Dynamic phenotypic plasticity for root growth in Polygonum: a comparative study*. Am J Bot, 86: 807–819.
- Bernier G** (1988). *The Control of Floral Evocation and Morphogenesis*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 39: 175-219.
- Boatright J; Negre F; Chen X; Kish CM; Wood B; Peel G; Orlova I; Gang D; Rhodes D; Dudareva N** (2004). *Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue*. Plant Physiol, 135: 1993-2011.
- Boudsocq M; Barbier-Brygoo H; Laurière C**. (2004). *Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 279: 41758-41766.
- Brewer PB; Dun EA; Ferguson BJ; Rameau C; Beveridge CA** (2009). *Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis*. Plant Physiol, 150: 482-493.
- Brilli F; Ruuskanen TM; Schnitzhofer R; Müller M; Breitenlechner M; Bittner V; Wohlfahrt G; Loreto F; Hansel A** (2011). *Detection of plant volatiles after leaf wounding and darkening by proton transfer reaction "time-of-flight" mass spectrometry (PTR-TOF)*. PLoS One, 6(5): e20419.
- Burbidge A; Grieve TM; Jackson A; Thompson A; McCarty DR; Taylor IB** (1999). *Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14*. Plant J, 17: 427-431.
- Burbulis IE; Winkel-Shirley B** (1999). *Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway*. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 12929–12934.
- Burg SP; Burg EA** (1962). *Role of ethylene in fruit ripening*. Plant Physiol, 37: 179-189.
- Cabello JV; Dezar CA; Manavella PA; Chan RL**. (2007). *The intron of the Arabidopsis thaliana COX5c gene is able to improve the drought tolerance conferred by the sunflower Hahb-4 transcription factor*. Planta, 226: 1143-1154.
- Cabello JV; Arce AL; Chan RL** (2012). *The homologous HD-Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis related and glucanase proteins*. Plant J, 69: 141-153.
- Cabello JV; Chan RL** (2012a). *The homologous homeodomain-leucine zipper transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer tolerance to drought and salinity stresses via the induction of proteins that stabilize membranes*. Plant Biotech J, 10: 815-825.

- Cabello JV; Arce AL; Chan RL.** Conicet-Universidad Nacional del Litoral. *Methods and Compositions for stress tolerance in plants*. International Patent Publication No. WO/2010/139993 and US/2012/0185964A1.
- Callahan HS; Pigliucci M; Schlichting CD** (1997). *Developmental phenotypic plasticity: where ecology and evolution meet molecular biology*. *Bioessays*, 19: 519-525.
- Canto T; Uhrig JF; Swanson M; Wright KM; MacFarlane SA** (2006). *Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity*. *J Virol*, 80: 9064-9072.
- Chalker-Scott L** (1999). *Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses*. *Photochem and Photobiol*, 70: 1–9.
- Chan RL; Gago GM; Palena CM; Gonzalez DH** (1998). *Homeoboxes in plant development*. *Biochim Biophys Acta*, 1442: 1-19.
- Charrier B; Champion A; Henry Y; Kreis M** (2002). *Expression profiling of the whole arabidopsis Shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. *Plant Physiol*, 130: 577-590.
- Chaves MM; Maroco JP; Pereira JS** (2003). *Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant*. *Funct Plant Biol*, 30: 239–264.
- Chen W; Provart NJ; Glazebrook J; Katagiri F; Chang HS; Eulgem T; Mauch F; Luan S; Zou G; Whitham SA; Budworth PR; Tao Y; Xie Z; Chen X; Lam S; Kreps JA; Harper JF; Ammour AS; Mauch-Mani B; Heinlein M; Kobayashi K; Hohn T; Dangl JL; Wang X; Zhu T** (2002). *Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses*. *Plant Cell*, 14: 559-574.
- Chernys JT; Zeevaart JA** (2000). *Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado*. *Plant Physiol*, 124: 343-353.
- Chory J; Reinecke D; Sim S; Washburn T; Brenner M** (1994). *A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 104: 339-347.
- Clough SJ; Bent AF** (1998). *Floral Dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16: 735-743.
- Colquhoun TA; Kim JY; Wedde AE; Levin LA; Schmitt KC; Schuurink RC; Clark DG** (2011). *PhMYB4 fine-tunes the floral volatile signature of Petunia x hybrida through PhC4H*. *J Exp Bot*, 62: 1133–1143.
- Conesa A; Gotz S; Garcia-Gomez JM; Terol J; Talon M; Robles M** (2005). *Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research*. *Bioinformatics*, 21: 3674–3676.
- Croft K; Juttner F;; Slusarenko AJ** (1993). *Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from Phaseolus vulgaris (L.) leaves inoculated with Pseudomonas syringae pv phaseolicola*. *Plant Physiol*, 101: 13-24.

- Daugherty CJ; Rooney MF; Paul AL; deVetten N; Vega-Palas MA; Lu G; Gurley WB; Ferl RJ** (1994). *Environmental stress and gene regulation*. Cold Spring Harbor Lab Press, 769–806.
- Davis SJ** (2009). *Integrating hormones into the floral-transition pathway of Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 32: 1201–1210.
- Deng X; Phillips J; Meijer AH; Salamini F; Bartels D** (2002). *Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol*, 49: 601–610.
- Deng X; Phillips J; Bra A; Engström P; Johannesson H; Ouwkerk PBF; Ruberti I; Salinas J; Vera P; Iannaccone R; Meijer AH; Bartels D** (2006). *A homeodomain leucine zipper gene from Craterostigma plantagineum regulates abscisic acid responsive gene expression and physiological responses*. *Plant Mol Biol*, 61: 469–489.
- Dezar CA; Gago GM; Gonzalez DH; Chan RL** (2005). *Hahb-4, a sunflower homeobox leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants*. *Transgenic Res*, 14: 429–440.
- Diezel C; Allmann S; Baldwin IT** (2011). *Mechanisms of optimal defense patterns in Nicotiana attenuata: flowering attenuates herbivory-elicited ethylene and jasmonate signaling*. *J Integr Plant Biol*, 53: 971–983.
- Dixon RA** (2001). *Progress Natural products and plant disease resistance*. *Nature*, 411: 843–847
- Dixon RA; Paiva NL** (1995). *Stress-induced phenylpropanoid metabolism*. *Plant Cell*, 7: 1085–1097.
- Domagalska MA; Sarnowska E; Nagy F; Davis SJ** (2010). *Genetic analyses of interactions among gibberellin, abscisic acid, and brassinosteroids in the control of flowering time in Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 5 (11): e14012.
- Döring P; Treuter E; Kistner C; Lyck R; Chen A; Nover L** (2000). *The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2*. *Plant Cell*, 12: 265–278.
- Dudareva N; Martin D; Kish CM; Kolosova N; Gorenstein N; Faldt J; Miller B; Bohlmann J** (2003). *(E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily*. *Plant Cell*, 15: 1227–1241.
- Dudareva N; Pichersky E** (2000). *Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents*. *Plant Physiol*, 122: 627–633.
- Dudareva N; Pichersky E; Gershenzon J** (2004). *Biochemistry of Plant Volatiles*. *Plant Physiol*, 135: 1893–1902.
- Durrant WE; Rowland O; Piedras P; Hammond-Kosack KE; Jones JDG** (2000). *cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles*. *Plant Cell*, 12: 963–977.

- Euler M; Baldwin IT** (1996). *The chemistry of defense and appearance in the corollas of Nicotiana attenuata*. Oecologia, 107: 102–112.
- Evans JR** (1989). *Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants*. Oecologia, 78: 9-19.
- Felippes FF; Weigel D** (2010) *Transient assays for the analysis of miRNA processing and function*. Methods Mol Biol, 592: 255-264.
- Feys BJF; Benedetti CE; Penfold CN; Turner JG** (1994). *Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen*. Plant Cell, 6: 751-759.
- Filkenstein R; Rock C** (2002). *Abscisic Acid Biosynthesis and Signalling*. En: *The Arabidopsis Book*. (Eds: C.R. Somerville y E.M. Meyerowitz) Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, doi/10.1199/tab.0058.
- Fox G** (1990). *Drought and the evolution of flowering time in desert annuals*. Am J Bot, 77: 1508–1518.
- Fujita M; Fujita Y; Noutoshi Y; Takahashi F; Narusaka Y; Yamaguchi-Shinozaki K; Shinozaki K** (2006). *Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks*. Curr Opin Plant Biol, 9: 436–442.
- Gan S; Amasino RM** (1997). *Making sense of senescence*. Plant Physiol, 113: 313-319.
- Garber RL; Kuroiwa A; Gehring WJ** (1983). *Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in Drosophila*. EMBO J, 2: 2027-2036.
- Gase K; Weinhold A; Bozorov T; Schuck S; Baldwin IT** (2011). *Efficient screening of transgenic plant lines for ecological research*. Mol Ecol Resour, 11: 890–902.
- Gehring WJ; Qian YQ; Billeter M; Furukubo-Tokunaga K; Schier AF; Resendez-Perez D; Affolter M; Otting G; Wuthrich K** (1994). *Homeodomain-DNA Recognition*. Cell, 78: 211-223.
- Gilardoni PA; Hettenhausen C; Baldwin IT; Bonaventure G** (2011). *Nicotiana attenuata LECTIN RECEPTOR KINASE1 suppresses the insect-mediated inhibition of induced defense responses during Manduca sexta herbivory*. Plant Cell, 23: 3512–3532.
- Gilardoni P; Schuck S; Jüngling R; Rotter B; Baldwin I; Bonaventure G** (2010). *SuperSAGE analysis of the Nicotiana attenuata transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses*. BMC Plant Biol, 10: 66.
- Glazebrook J** (2001). *Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis*. Curr Opin Plant Biol, 4: 301-308.
- Goff SA; Ricke D; Lan TH; Presting G; Wang R; Dunn M; Glazebrook J; Sessions A; Oeller P; Varma H; col.** (2002). *A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica)*. Science, 296: 92-100.

- Gong; W; Shen Y; Ma L; Pan Y; Du Y; Wang D; Yang J; Hu L; Liu X; Dong C; col.** (2004). *Genome-wide ORFeome cloning and analysis of Arabidopsis transcription factor genes*. *Plant Physiol*, 135: 773–782.
- Gonzalez DH; Valle EM; Chan RL** (1997). *Interaction between proteins containing homeodomains associated to leucine zippers from sunflower*. *Biochim Biophys Acta*, 1351: 137–149.
- Gouinguéné SP; Turlings TC** (2002). *The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants*. *Plant Physiol*, 129: 1296-1307.
- Gould KS; Lister C** (2006). *Flavonoid functions in plants*. En: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. (Eds: Andersen M y Markham KR) Boca Raton: CRC Press pp. 397–411.
- Grant SG; Jessee J; Bloom FR; Hanahan D** (1990). *Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 4645-4649.
- Gulati J; Kim SG; Baldwin IT; Gaquerel E** (2013). *Deciphering herbivory-induced gene-to-metabolite dynamics in Nicotiana attenuata tissues using a multifactorial approach*. *Plant Physiol*, 162: 1042–1059.
- Gutensohn M; Klempien A; Kaminaga Y; Nagegowda DA; Negre-Zakharov F; Huh JH; Luo H; Weizbauer R; Mengiste T; Tholl D; Dudareva N** (2011). *Role of aromatic aldehyde synthase in wounding/herbivory response and flower scent production in different Arabidopsis ecotypes*. *Plant J*, 66: 591-602.
- Hanson J; Johannesson H; Engström P** (2001). *Sugar-Dependent Alterations in Cotyledon and Leaf Development in Transgenic Plants Expressing the HD Zip Gene ATHB13*. *Plant Mol Biol*, 45: 247-262.
- Harper JL** (1977). *Population biology of plants*. (Eds: Academic Press) London, United Kingdom.
- Henriksson E; Olsson ASB; Johannesson H; Johansson H; Hanson J; Engström P; Söderman E** (2005). *Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships*. *Plant Physiol*, 139: 509–518.
- Himmelbach A; Hoffmann T; Leube M; Höhener B; Grill E** (2002). *Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis*. *EMBO J*, 21: 3029–3038.
- Hirayama T; Shinozaki K** (2007). *Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA*. *Trends Plant Sci*, 12: 343–351.
- Hjellström M; Olsson ASB; Engström P; Söderman EM** (2003). *Constitutive expression of the water deficit-inducible homeobox gene ATHB7 in transgenic Arabidopsis causes a suppression of stem elongation growth*. *Plant Cell Environ*, 26: 1127–1136.
- Ikegami K; Okamoto M; Seo M; Koshiha T** (2009). *Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of Arabidopsis thaliana in response to water deficit*. *J Plant Res*, 122: 235–243.
- Jansen M; Gilmer M; Biskup B; Nagel KA; Rascher U; Fischbach A; Briem S; Dreissen G; Tittmann S; Braun S; De Jaeger I; Metzlauff M; Schurr U; Walter A** (2009). *Simultaneous*

*phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in Arabidopsis thaliana and other rosette plants.* Funct Plant Biol, 36: 902–914.

**Jassbi AR; Gase K; Hettenhausen C; Schmidt A;; Baldwin IT (2008).** *Silencing geranylgeranyl diphosphate synthase in Nicotiana attenuata dramatically impairs resistance to tobacco hornworm.* Plant Physiol, 146: 974-986.

**Jefferson RA; Kavanagh TA; Bevan MW (1987).** *GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.* EMBO J, 6: 3901-3907.

**Jin JB; Jin YH; Lee J; Miura K; Yoo CY; Kim W; Van Oosten M; Hyun Y; Somers DE; Lee I; Yun DJ; Bressan RA; Hasegawa PM (2008).** *The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure.* Plant J, 53: 530–540.

**Jin Y; Yang H; Wei Z; Ma H; Ge X (2013).** *Rice Male Development under Drought Stress: Phenotypic Changes and Stage-Dependent Transcriptomic Reprogramming.* Mol Plant, 6: 1630-1645.

**Johannesson H; Wang Y; Hanson J; Engström P (2003).** *The Arabidopsis thaliana homeobox gene ATHB5 is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings.* Plant Mol Biol, 51: 719–729.

**Jorgensen R; Arathi HS (2013).** *Floral longevity and autonomous selfing are altered by pollination and water availability in Collinsia heterophylla.* Ann Bot, 112: 821-828.

**Kallenbach M; Gilardoni PA; Allmann S; Baldwin IT; Bonaventure G (2011).** *C(12) derivatives of the hydroperoxide lyase pathway are produced by product recycling through lipoxygenase-2 in Nicotiana attenuata leaves.* New Phytol, 191: 1054–1068.

**Katagiri F; Thilmony R; He S (2002).** *The Arabidopsis thaliana–Pseudomonas syringae interaction.* En: *The Arabidopsis Book.* (Eds: Somerville C y Meyerowitz E) Rockville, MD: Am Soc Plant Biol pp. 1–35.

**Kaur H; Heinzl N; Schöttner M; Baldwin IT; Gális I (2010).** *R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in Nicotiana attenuata.* Plant Physiol, 152: 1731-1747.

**Kaushal Tripathi S; Tuteja N (2007).** *Integrated Signaling in Flower Senescence.* Plant Sign Behav, 2: 437-445.

**Kessler D; Diezel C; Baldwin IT (2010).** *Changing pollinators as a means of escaping herbivores.* Curr Biol, 20: 237–242.

**Kessler D; Gase K; Baldwin IT (2008).** *Field experiments with transformed plants reveal the sense of floral scents.* Science, 321: 1200–1202.

**Kissinger CR; Liu BS; Martin-Blanco E; Kornberg TB; Pabo CO (1990).** *Crystal structure of an engrailed Homeodomain-DNA complex at 2.8 a resolution: A framework for understanding Homeodomain-DNA interactions.* Cell, 63: 579-590.

- Klingler JP; Batelli G; Zhu JK** (2010). *ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling*. J Exp Bot, 61: 3199–3210.
- Kotak S; Port M; Ganguli A; Bicker F; von Koskull-Döring P** (2004). *Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A HSFS with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization*. Plant J, 39: 98–112.
- Krügel T; Lim M; Gase K; Halitschke R; Baldwin IT** (2002). *Agrobacterium-mediated transformation of Nicotiana attenuata, a model ecological expression system*. Chemoecology, 12: 177–183.
- Lambers H; Chapi FS; Pons TJ** (2008). *Plant Physiological Ecology*. Segunda edición. (Eds: Springer Science + Business Media, LLC) New York, USA.
- Landschulz W; Johnson P; McKnight S** (1988). *The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins*. Science, 240: 1759–1764.
- Lechner E; Leonhardt N; Eisler H; Parmentier Y; Alioua M; Jacquet H; Leung J; Genschik P** (2011). *MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling*. Dev Cell, 21: 1116-1128.
- Lee YH; Chun J** (1998). *A new homeodomain-leucine zipper gene from Arabidopsis thaliana induced by water stress and abscisic acid treatment*. Plant Mol Biol, 37: 377–384.
- Lee YH; Oh HS; Cheon CI; Hwang IT; Kim YJ; Chun J** (2001). *Structure and expression of the Arabidopsis thaliana Athb-12, Homeobox gene*. Biochem Biophys Res Commun, 284: 133–141.
- Li L; Zhao Y; McCaig BC; Wingerd BA; Wang J; Whalon ME; Pichersky E;; Howe GA** (2004). *The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development*. Plant Cell, 16: 126-143.
- Lin Z; Hong Y; Yin M; Li C; Zhang K; Grierson D** (2008). *A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening*. Plant J, 55: 301-310.
- Liu P; Sun F; Gao R; Dong H** (2012). *RAP2.6L overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity*. Plant Mol Biol, 79: 609-622.
- Lodish H; Berk A; Zipursky SL; Matsudaira P; Baltimore D; Darnell JE** (2002). *Biología celular y molecular*. Cuarta edición (Editorial Médica Panamericana) Madrid, España, p. 648, G8.
- Lorenzo O; Piqueras R; Sánchez-Serrano JJ; Solano R** (2003). *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense*. Plant Cell, 15: 165-178.
- Mahajan S; Tuteja N** (2005). *Cold, salinity and drought stresses: an overview*. Arch Biochem Biophys, 444: 139–158.

- Manavella PA; Dezar CA; Bonaventure G; Baldwin IT; Chan RL** (2008). *HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses*. *Plant J*, 56: 376–388.
- Martin C; Gerats T** (1993). *Control of Pigment Biosynthesis Genes during Petal Development*. *Plant Cell*, 5: 1253-1264.
- Matsui K** (2006). *Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism*. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 274-280.
- McConn M; Browse J** (1996). *The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis mutant*. *Plant Cell*, 8: 403–416.
- McCourt P; Creelman R** (2008). *The ABA receptors: we report you decide*. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 474-478.
- Milborrow BV** (2001). *The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis*. *J Exp Bot*, 52: 1145-1164.
- Mishra KB; Iannacone R; Petrozza A; Mishra A; Armentano N; La Vecchia G; Trtílek M; Cellini F; Nedbal L** (2012). *Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission*. *Plant Sci*, 182: 79-86.
- Mittler R; Blumwald E** (2010). *Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives*. *Ann Rev Plant Biol*, 61: 443–462.
- Miura K; Hasegawa P** (2010). *Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants*. *Trends Cell Biol*, 20: 223-232.
- Mutasa-Göttgens E; Hedden P** (2009). *Gibberellin as a factor in floral regulatory networks*. *J Exp Bot*, 60: 1979–1989.
- Nakamura M; Katsumata H; Abe M; Yabe N; Komeda Y; Yamamoto KT; Takahashi T** (2006). *Characterization of the class IV homeodomain-leucine zipper (HD-Zip IV) gene family in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 141: 1363–1375.
- Nakashima K; Fujita Y; Kanamori N; Katagiri T; Umezawa T; Kidokoro S; Maruyama K; Yoshida T; Ishiyama K; Kobayashi M; Shinozaki K; Yamaguchi-Shinozaki K** (2009). *Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy*. *Plant Cell Physiol*, 50: 1345-1363.
- Nicotra AB; Cosgrove MJ; Cowling A; Schlichting CD; Jones CS** (2008). *Leaf shape linked to photosynthetic rates and temperature optima in South African Pelargonium species*. *Oecologia*, 154: 625–635.
- O'Maoileidigh SD; Graciet E; Wellmer F** (2013). *Gene networks controlling Arabidopsis thaliana flower development*. *New Phytol*, doi: 10.1111/nph.12444.
- Oh Y; Baldwin IT; Galis I** (2013). *A jasmonate ZIM-domain protein NaJAZd regulates floral jasmonic acid levels and counteracts flower abscission in Nicotiana attenuata plants*. *PLoS One*, 8(2): e57868.



- Olsson AS; Engström P; Söderman E** (2004). *The Homeobox Genes Athb12 and Athb7 Encode Potential Regulators of Growth in Response to Water Deficit in Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 55: 663-677.
- Ooms G; Hooykaas PJ; Van Veen RJ; Van Beelen P; Regensburg-Tuink TJ; Schilperoort RA** (1982). *Octopine Ti-plasmid deletion mutants of agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region*. *Plasmid*, 7: 15-29.
- Palena CM; Tron AE; Bertoncini CW; Gonzalez DH; Chan RL** (2001). *Positively charged residues at the N-terminal arm of the homeodomain are required for efficient DNA binding by Homeodomain Leucine-Zipper proteins*. *J Mol Biol*, 308: 39-47.
- Park CJ; Peng Y; Chen X; Dardick C; Ruan D; Bart R; Canlas PE; Ronald PC** (2008). *Rice XB15, a protein phosphatase 2 C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity*. *PLoS Biology*, 6(9): e231.
- Penninckx IA; Thomma BP; Buchala A; Métraux JP; Broekaert WF** (1998). *Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: 2103-2113.
- Pichersky E; Dudareva N** (2007). *Scent engineering: toward the goal of controlling how flowers smell*. *Trends Biotechnol*, 25: 105–110.
- Qin X; Zeevaart JA** (1999). *The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 15354-15361.
- Raguso RA** (2004). *Flowers as sensory billboards: progress towards an integrated understanding of floral advertisement*. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 434–440.
- Raguso RA; Levin RA; Foose SE; Holmberg MW; McDade LA** (2003). *Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in Nicotiana*. *Phytochemistry*, 63: 265–284.
- Raskin I** (1992). *Salicylate, a new plant hormone*. *Plant Physiol*, 99: 799-803.
- Reguera M; Peleg Z; Abdel-Tawab YM; Tumimbang E; Delatorre CA; Blumwald E** (2013). *Stress-induced CK synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in Rice*. *Plant Physiol*. DOI:10.1104/pp.113.227702.
- Riechmann JL** (2002). *Transcriptional Regulation: a Genomic Overview*. En: *The Arabidopsis Book*. (Eds: C.R. Somerville y E.M. Meyerowitz) Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 1:e0085.
- Riechmann JL; Heard J; Martin G; Reuber L; Jiang C; Keddie J; Adam L; Pineda O; Ratcliffe OJ; Samaha RR; col.** (2000). *Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes*. *Science*, 290: 2105-2110.
- Rivas-San Vicente M; Plasencia J** (2011). *Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development*. *J Exp Bot*, 62(1): 3321-3338.

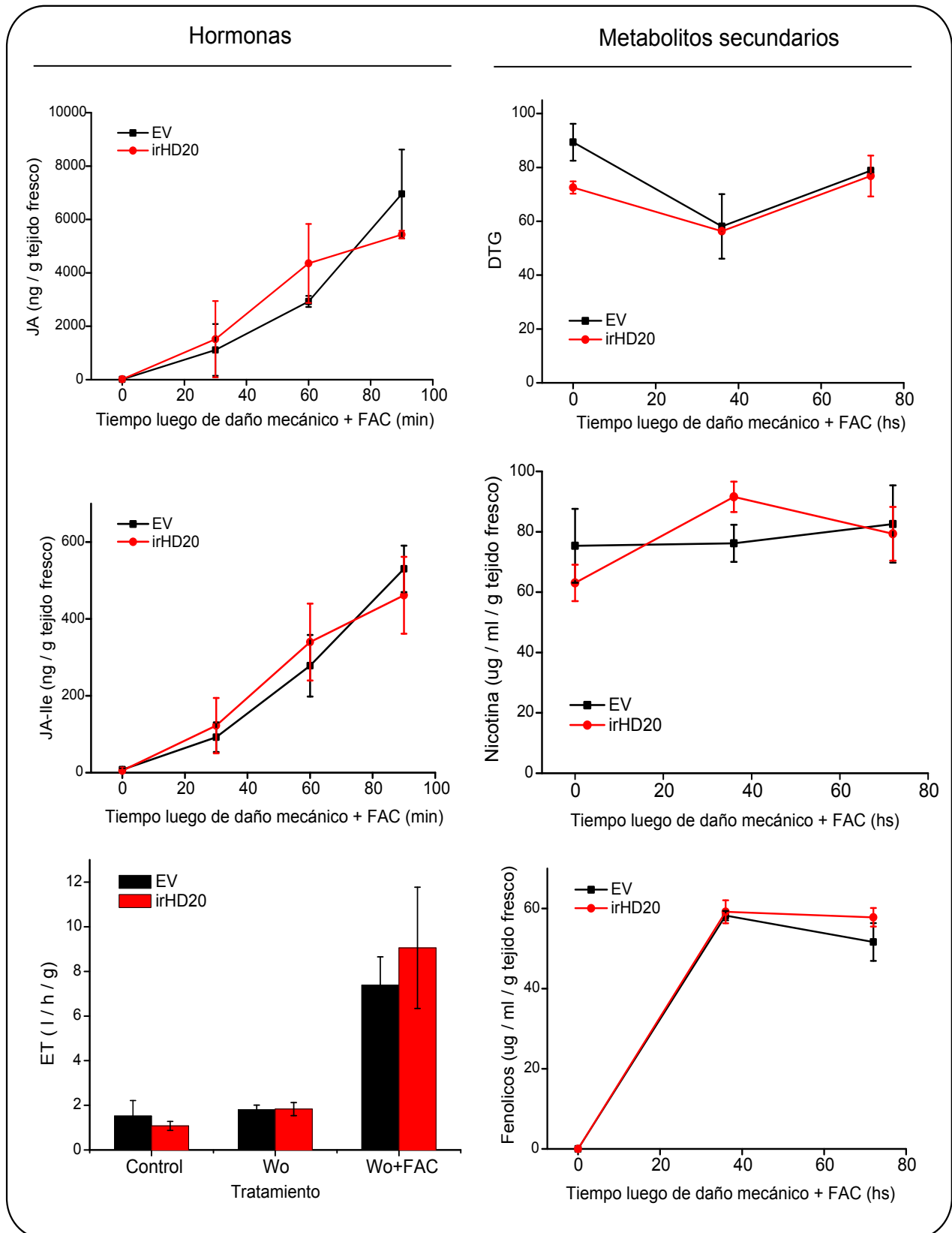
- Ruberti I; Sessa G; Lucchetti S; Morelli G** (1991). *A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif*. EMBO J, 10: 1787–1791.
- Rushton PJ; Bokowiec MT; Han S; Zhang H; Brannock JF; Chen X; Laudeman TW; Timko MP** (2008). *Tobacco Transcription Factors: Novel Insights into Transcriptional Regulation in the Solanaceae*. Plant Physiol, 147: 280–295.
- Rushton PJ; Somssich IE** (1998). *Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens*. Curr Opin Plant Biol, 1: 311–315.
- Sakuma S; Pourkheirandish M; Hensel G; Kumlehn J; Stein N; Tagiri A; Yamaji N; Ma JF; Sassa H; Koba T; Komatsuda T** (2013). *Divergence of expression pattern contributed to neofunctionalization of duplicated HD-Zip I transcription factor in barley*. New Phytol, 197: 939–948.
- Sanders PM; Lee PY; Biesgen C; Boone JD; Beals TP; Weiler EW; Goldberg RB** (2000). *The Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway*. Plant Cell, 12: 1041–1061.
- Santner A; Calderon-Villalobos LIA; Estelle M** (2009). *Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth*. Nature Chem Biol, 5: 301–307.
- Scala A; Allmann S; Mirabella R; Haring MA; Schuurink RC** (2013). *Green Leaf Volatiles: A Plant's Multifunctional Weapon against Herbivores and Pathogens*. Int J Mol Sci, 14: 17781-17811.
- Schaefer HM; Rolshausen G** (2006). *Plants on red alert: do insects pay attention?* Bioessays, 28: 65-71.
- Schena M; Davis RW** (1992). *HD-Zip protein members of arabidopsis homeodomain protein superfamily*. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 3894-3898.
- Schuurink RC; Haringa MA; Clark DG** (2006). *Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers*. Trends Plant Sci, 11: 20–25.
- Sessa G; Morelli G; Ruberti I** (1993). *The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities*. EMBO J, 12: 3507– 3517.
- Shao H; Guo Q; Chu L; Zhao X; Su Z; Hu; y Cheng J** (2007). *Understanding Molecular Mechanisms of Higher Plant Plasticity under Abiotic Stress*. Colloids Surf B, 54: 37–45.
- Sharma RC; Duveiller E; Ortiz-Ferrara G** (2007). *Progress and challenge towards reducing wheat spot blotch threat in the Eastern Gangetic Plains of South Asia: is climate change already taking its toll?* Field Crops Research, 103: 109–118.
- Shinozaki K; Yamaguchi-Shinozaki K; Seki M** (2003). *Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses*. Curr Opin Plant Biol, 6: 410–417.
- Shiojiri K; Kishimoto K; Ozawa R; Kugimiya S; Urashimo S; Arimura G; Horiuchi J; Nishioka T; Matsui K; Takabayashi J** (2006). *Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: an approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens*. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 16672-6.

- Sime KR; Baldwin IT** (2003). *Opportunistic out-crossing in Nicotiana attenuata (Solanaceae), a predominantly self-fertilizing native tobacco*. BMC Ecol, 3: 6.
- Söderman E; Mattsson J; Engström P** (1996). *The Arabidopsis homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid*. Plant J, 10: 375–381.
- Son O; Hur Y-S; Kim Y-K; Lee H-J; Kim S; Kim M-R; Nam KH; Lee M-S; Kim B-Y; Park J; Park J; Lee S-C; Hanada A; Yamaguchi S; Lee I-J; Kim S-K; Yun D-J; Söderman E; Cheon C-I** (2012). *ATHB12, an ABA-inducible Homeodomain-Leucine Zipper (HD-Zip) protein of Arabidopsis, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a Gibberellin 20-Oxidase gene*. Plant Cell Physiol, 51: 1537–1547.
- Song S; Qi T; Huang H; Ren Q; Wu D; Chang C; Peng W; Liu Y; Peng J; Xie D** (2011). *The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in Arabidopsis*. Plant Cell, 23: 1000-1013.
- Spitzer-Rimon B; Marhevka E; Barkai O; Marton I; Edelbaum O; Masci T; Prathapani NK; Shklarman E; Ovadis M; Vainstein A** (2010). *EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia*. Plant Cell, 22: 1961–1976.
- Steppuhn A; Gase K; Krock B; Halitschke R; Baldwin IT** (2004). *Nicotine's defensive function in nature*. PLoS Biol, 2(8): E217. Erratum in: PLoS Biol, 2(10): e382.
- Stockinger EJ; Gilmour SJ; Thomashow MF** (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*. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 1035-1040.
- Sultan SE** (2000). *Phenotypic plasticity for plant development, function and life history*. Trends Plant Sci, 5: 537–542.
- Szumanski AL; Nielsen E** (2009). *The Rab GTPase RabA4d regulates pollen tube tip growth in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 21: 526–544.
- Taiz L; Zeiger E** (2002). *Plant Physiology*. Third Edition. (Eds: Sinauer Associates, Inc., Publishers) doi:10.1093/aob/mcg079.
- Tobeña-Santamaria R; Bliet M; Ljung K; Sandberg G; Mol JNM; Souer E; Koes R** (2002). *FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture*. Genes Dev, 16: 753-763.
- Trewavas A; Jones H** (1991). *Abscisic acid: physiology and biochemistry*. In: Davies W, Jones H, eds. *An assessment of the role of ABA in plant development*. Oxford: BIOS, 169–188.
- Tron AE; Bertoncini CW; Palena CM; Chan RL; Gonzalez DH** (2001). *Combinatorial interactions of two amino acids with a single base pair define target site specificity in plant dimeric homeodomain proteins*. Nucleic Acids Res, 29: 4866–4872.
- Turlings TC; Loughrin JH; McCall PJ; Rössle US; Lewis WJ; Tumlinson JH** (1995). *How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps*. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 4169-4174.

- Tusher VG; Tibshirani R; Chu G** (2001). *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 5116–5121.
- Umehara M; Hanada A; Yoshida S; Akiyama K; Arite T; Takeda-Kamiya N; Magome H; Kamiya Y; Shirasu K; Yoneyama K; Kyojuka J; Yamaguchi S** (2008). *Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones*. Nature, 455: 195–200.
- Underwood BA; Tieman DM; Shibuya K; Dexter RJ; Loucas HM; Simkin AJ; Sims CA; Schmelz EA; Klee HJ; Clark DG** (2005). *Ethylene-regulated floral volatile synthesis in petunia corollas*. Plant Physiol, 138: 255-266.
- Valdés A; Övernäs E; Johansson H; Rada-Iglesias A; Engström P** (2012). *The homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class I transcription factors ATHB7 and ATHB12 modulate abscisic acid signalling by regulating protein phosphatase 2C and abscisic acid receptor gene activities*. Plant Mol Biol, 80: 405-418.
- van Dam NM** (2009). *How plants cope with biotic interaction*. Plant Biol, 11: 1–5.
- van Doorn WG; Woltering EJ** (2008). *Physiology and molecular biology of petal senescence*. J Exp Bot, 59: 453-480.
- van Doorn WG; Dole I; Celikel FG; Harkema H.** (2013). *Opening of Iris flowers is regulated by endogenous auxins*. J Plant Physiol, 170: 161-164.
- Vanneste S; Friml J** (2009). *Auxin: a trigger for change in plant development*. Cell, 136: 1005–1016.
- Verdonk JC; Haring MA; van Tunen AJ; Schuurink RC** (2005). *ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers*. Plant Cell, 17: 1612–1624.
- Vickers CE; Gershenzon J; Lerdau MT; Loreto F** (2009). *A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress*. Nature Chem Biol, 5: 283-291.
- Wang Y; Li L; Ye T; Lu Y; Chen X; Wu Y** (2013). *The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in Arabidopsis*. J Exp Bot, 64: 675-684.
- Wasilewska A; Vlad F; Sirichandra C; Redko Y; Jammes F; Valon C; Frei dit Frey N; Leung J.** (2008). *An update on abscisic acid signaling in plants and more...* Mol Plant, 1: 198-217.
- Went FW; Thimann KV** (1937). *Phytohormones*. En: *Experimental Biology Monographs*. (Eds: MacMillan) Michigan University, USA.
- Westfall CS; Muehler AM; Jez JM** (2013). *Hormone responses enzyme action in the regulation of plant*. J Biol Chem, 288: 19304-19311.
- Westhof E** (2004). *How to silence silencing*. Chem Biol, 11: 158-160.
- Winkel-Shirley B** (2001). *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. Plant Physiol, 126: 485–493.
- Xiong L; Schumaker KS; Zhu JK** (2002). *Cell signaling during cold, drought, and salt stresses*. Plant Cell, 14: S165-S183.

- Yaish MW; Colasanti J; Rothstein SJ** (2011). *The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress*. J Exp Bot, 62: 3727-3735.
- Yamaguchi-Shinozaki K; Shinozaki K** (1994). *A novel cis-acting element in an arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high salt stress*. Plant Cell, 6: 251-264.
- Zavala JA; Baldwin IT** (2004). *Fitness benefits of trypsin proteinase inhibitor expression in Nicotiana attenuata are greater than their costs when plants are attacked*. BMC Ecol, 10: 4-11.
- Zhai Q; Yan L; Tan D; Chen R; Sun J; Gao L; Dong; M; Wang; y Li C** (2013). *Phosphorylation-coupled proteolysis of the transcription factor MYC2 is important for jasmonate-signaled plant immunity*. PLOS Genet, 9(4): e1003422.
- Zhang S; Haider I; Kohlen W; Jiang L; Bouwmeester H; Meijer AH; Schluepmann H; Liu CM; Ouwerkerk PB** (2012). *Function of the HD-Zip I gene Oshox22 in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice*. Plant Mol Biol, 80: 571-585.
- Zhao Y; Zhou Y; Jiang H; Li X; Gan D; Peng X; Zhu S; Cheng B** (2011). *Systematic analysis of sequences and expression patterns of drought-responsive members of the HD-Zip gene family in maize*. PLoS One, 6(12): e28488.
- Zhu JK** (2001). *Cell signaling under salt, water and cold stresses*. Curr Opin Plant Biol, 4: 401-406.
- Zhu Z; An F; Feng Y; Li P; Xue L; A M; Jiang Z; Kim JM; To TK; Li W; Zhang X; Yu Q; Dong Z; Chen WQ; Seki M; Zhou JM; Guo H** (2011). *Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 108: 12539-12544.

**ANEXO I - a.** Cuantificación de fitohormonas y metabolitos secundarios en hojas de plantas VIGS-EV y VIGS-irHD20, luego de tratamientos de daño mecánico y daño mecánico + FAC. JA: ácido jasmónico; JA-Ile: ácido jasmónico-isoleucina; ET: etileno; DTG: diterpeno glucosidos; Wo: *wounding* o daño mecánico.



**ANEXO I - b.** Cuantificación de fitohormonas y de unidades formadoras de colonias (ufc) luego del tratamiento con *Pseudomonas syringae*. JA: ácido jasmónico; JA-Ile: ácido jasmónico-isoleucina; SA: ácido salicílico.

