



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA
.....

Instituto de Investigaciones Biológicas

Participación de las proteínas con dominios DC1 codificadas por los genes At2g44370 y At2g17740 en la gametogénesis y en la respuesta de defensa a patógenos en plantas

Lic. Leonardo A. Arias

Director: Dr. Diego F. Fiol

Co-directora: Dra. Claudia A. Casalongué

2019

Pa' qué andar con tanta vuelta

todo junto y mixturao

no se nota lo que suebra

ni lo que le haya faltao.

José Larralde, 1981

Agradecimientos

A mis directores, Diego y Claudia, por transmitir su pasión por la ciencia y permitirme la libertad de ser creativo y crítico en mi trabajo.

A mis compañeros del IIB, por generar un ambiente de trabajo en el que es fácil pasar cinco años. También por la inagotable fuente de expertos en todo lo que no sé hacer.

A mis docentes, por la vocación de explicar lo inexplicable, por la inquietud de querer entender lo ininteligible, por el arte de sintetizar lo inabarcable.

A la Universidad Nacional de Mar del Plata, por ser mi casa por diez años.

A CONICET, por apoyar la ciencia nacional. Por financiar mi *hobby*.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, por lo que duró.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por lo que dure.

A Sci-Hub, porque si no no hay tesis.

Resumen

En el presente trabajo identificamos a *VLG* y *BNP* como genes que codifican para proteínas con dominios DC1, los cuales poseen alta identidad estructural con los dominios C1 presentes en proteínas animales. A partir del análisis *in silico* de bases de datos de microarreglos y ensayos con plantas reporteras promotor:GUS demostramos que ambas proteínas se regulan fuertemente ante estreses bióticos y abióticos y tratamientos con hormonas. A través del estudio de mutantes hemicigóticas demostramos que la proteína VLG es necesaria para la formación de una gran vacuola central que caracteriza a los estadios tempranos del desarrollo de los gametofitos femenino y masculino en *A. thaliana*. A partir de nuestras evidencias hipotetizamos que la proteína VLG cumple su función en los compartimentos prevacuolares tardíos a través de la interacción entre PVA12 y LTL1, ambas proteínas asociadas a la unión entre vesículas. Además, demostramos que BNP es necesaria para alcanzar el estadio tricelular del desarrollo microgametofítico y participa en la germinación del tubo polínico. También se demostró que la proteína BNP interactúa con ambos reguladores de la transcripción VOZ1 y VOZ2 en compartimentos prevacuolares tardíos y proponemos dicha interacción es necesaria para su translocación desde dichos compartimentos hacia el núcleo. En conjunto, nuestros resultados demuestran que las proteínas con dominios DC1 cumplen funciones en procesos de estrés y del desarrollo gametofítico en *A. thaliana*. Específicamente, ambas proteínas participarían del transporte y anclaje de complejos mayores de proteínas que forman parte de los compartimentos endosomales tardíos.

Futuros estudios sobre la regulación de las proteínas que forman parte de dichos complejos endosomales ampliarán las bases funcionales de su participación en los procesos de desarrollo, incluyendo también las respuestas de defensa de las plantas de *A. thaliana* frente a estrés ambiental.

Abstract

In this study we identify *VLG* and *BNP* as genes that encode DC1 domain containing proteins, which display high structural identity with C1 domains present in animal proteins. Through in silico analysis of microarray databases and bioassays using *A. thaliana* promoter:GUS reporter lines we demonstrate that both proteins *VLG* and *BNP* are strongly regulated during biotic and abiotic stresses and hormone treatments. The study of hemizygotic mutant lines allowed us to discover that *VLG* is necessary for the formation of a big central vacuole that characterizes early stages of male and female gametophytic development. We hypothesize that *VLG* carries out its function in late prevacuolar compartments through the interaction with *PVA12* and *LTL1*, proteins associated to vesicle fusion. Likewise we demonstrate that *BNP* is required for reaching tricellular stage in microgametophytic development and to carry out pollen tube germination. Furthermore we demonstrate that *BNP* interacts with transcriptional regulators *VOZ1* and *VOZ2* in the late prevacuolar compartments, and we hypothesize that this interaction is needed for their nuclear translocation. In summary, our results demonstrate that DC1 domain containing proteins carry out specific functions in processes involving stress and development in *A. thaliana*, participating in protein transport and tethering in endosomal compartments.

Future studies regarding the regulation of the proteins that comprise such endosomal complexes will expand the basic functional knowledge of their involvement in development and stress responses in *A. thaliana*.

Abreviaturas

ABA: ácido abscísico, por el inglés *abscisic acid*
ABRC: *Arabidopsis Biological Resource Center*
ADN: ácido desoxiribonucleico
AJ: ácido jasmónico
ARN: ácido ribonucleico
AS: ácido salicílico
Avr: cepa avirulenta
BNP: binuclear pollen
BiFC: complementación bimolecular de la fluorescencia, por el inglés *bimolecular fluorescence complementation*
ADNc: ADN copia producido por retro-transcripción
Ctrl: control
DAG: diacilglicerol
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DC1: *divergent C1*; C1 divergentes, por el inglés *divergent C1*
DIC: microscopía de contraste interferencial, por el inglés *differential interference contrast microscopy*
FG: saco embrionario, por el inglés *female gametophyte*
GFP: proteína verde fluorescente, del inglés *green fluorescent protein*
GUS: gen reportero de la β -glucuronidasa
IAA: ácido-3-indol acético, por el inglés *indole-3-acetic acid*
MS: medio de cultivo "*Murashige y Skoog*"
MVB: cuerpos multivesiculares, por el inglés *multivesicular bodies*
PCR: reacción en cadena de la polimerasa, por el inglés *polimerase chain reaction*
PKC: quinasa de proteína C, por el inglés *protein kinase C*;
PVC: compartimentos prevacuolares, por el inglés *prevacuolar compartments*
qPCR: PCR cuantitativa, por el inglés *quantitative retrotranscriptase PCR*
RE: retículo endoplasmático
RFP: proteína roja fluorescente, por el inglés *red fluorescent protein*
SV: pequeñas vacuolas, por el inglés *small vacuoles*
T-ADN: ADN transposón
TBE: Tris, ácido ascórbico y EDTA
TE: eficiencia de transmisión genética durante cruzamientos recíprocos
TGN: red trans Golgi, por el inglés *trans Golgi network*
UBQ5: gen de la Ubiquitina 5 en *Arabidopsis thaliana* (*At3g62250*)
vc11: *vacuoleless1*
vir: cepa virulenta
vlg: *vacuoleless gametophytes*
VOZ1: *vascular one zinc finger protein 1*
VOZ2: *vascular one zinc finger protein 2*
WT: tipo salvaje, del inglés *wild type*
Y2H: doble híbrido en levaduras, del inglés *yeast two hybrid*

Contenido

Agradecimientos	2
Resumen.....	3
Abstract	4
Abreviaturas	5
Introducción.....	8
Regulación transcriptómica de la interacción planta-ambiente.....	8
Proteínas con dominios DC1	9
Reproducción y desarrollo gametofítico en <i>A. thaliana</i>	12
Rutas de transporte de endomembranas en plantas.....	16
Complejos SNARE en sistemas de endomembranas	19
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos	22
Materiales y Métodos.....	23
Líneas de plantas utilizadas y condiciones de crecimiento	23
Extracción de ADN	24
Análisis genético de líneas mutantes y transgénicas	24
Electroforesis de ácidos nucleicos.....	25
Extracción de ARN	25
Síntesis de ADN copia.....	26
Análisis de expresión por PCR en tiempo real	26
Análisis de segregación.....	26
Disección de pistilos y silicuas, análisis fenotípico de óvulos	27
Disección de anteras y preparaciones histoquímicas en polen	27
Germinación de polen.....	27
Obtención de imágenes.....	28
Exposición a estreses y tratamientos hormonales.....	28
Detección de actividad GUS.....	29
Ensayos de co-localización en <i>N. benthamiana</i>	29
Identificación de proteínas interactoras de VLG y BNP mediante doble híbrido en levaduras (Y2H).....	29
Ensayo de BiFC	30
Análisis bioinformáticos y filogenéticos.....	30
Descripción de oligonucleótidos utilizados	31

Capítulo 1.....	33
Estructura y perfiles de expresión de las proteínas con dominios DC1: VLG y BNP	33
Cuando se analizó la expresión de estos genes utilizando la base de Los genes <i>VLG</i> y <i>BNP</i> codifican para proteínas con dominios DC1	34
<i>VLG</i> , <i>BNP</i> y sus homólogos cercanos se regulan durante estreses y tratamientos hormonales.....	36
<i>VLG</i> y <i>BNP</i> se expresan en el tejido vascular y en células en elongación de hojas y raíces de plántulas jóvenes	42
Capítulo 2.....	44
Función de la proteína VLG en las gametogénesis	44
<i>vlg</i> es una mutación gametofítica	44
El desarrollo del polen en las plantas mutantes <i>vlg</i> se detiene antes de la mitosis I	47
VLG es requerida para la gametogénesis femenina	51
VLG se localiza en LPVCs en ambos gametofitos, femenino y masculino.....	54
VLG interactúa con la proteína SNARE PVA 12y con la lipasa LTL1.....	57
Capítulo 3.....	63
Función de la proteína BNP en la microgametogénesis	63
<i>bnp</i> es una mutación gametofítica	63
El desarrollo de polen en mutantes <i>bnp</i> está detenido en el estadio bicelularde su desarrollo	67
La proteína BNP se expresa durante la microesporogénesis y la microgametogénesis y estadios tempranos del desarrollo esporofítico.....	70
La proteína BNP interactúa con los factores de transcripción VOZ1 y VOZ2	73
BNP se localiza principalmente enLPVCs y co-localiza con VOZ1 y VOZ2	74
Discusión	77
Perspectivas de estudios a futuro.....	85
Bibliografía.....	88
Publicaciones	93
Revistas científicas con referrato.....	93
Presentaciones a congresos	93

Introducción

Regulación transcriptómica de la interacción planta-ambiente

Las plantas habitan en ambientes constantemente cambiantes. Cuando dichos cambios o perturbaciones son desfavorables para su crecimiento o el desarrollo, las plantas acusan estrés.

El estrés biológico es la respuesta de un organismo a una condición que desafía su homeostasis (Selye, 1956). Los factores bióticos que afectan el desarrollo de las plantas, incluyendo su reproducción pueden ser de origen fúngico, bacteriano, viral o por herbivoría. Los factores abióticos pueden ser escasa disponibilidad de agua o sequía, frío, exceso de sal, metales tóxicos o radiación ultravioleta entre varios otros.

En respuesta al estrés, las plantas responden dinámicamente involucrando diversos procesos regulatorios a través de modificaciones metabólicas, fisiológicas, morfológicas o incluso, de comportamiento, que finalmente alteran su crecimiento y desarrollo (Haak *et al.*, 2017). La mayoría de tales procesos están regulados a nivel transcripcional. Se ha demostrado que los cambios en la expresión génica subyacen en las respuestas tanto a estímulos como a estreses ambientales (Riechmann, 2002).

El estudio de organismos vegetales, tanto de sistemas modelo como de especies de interés agronómico, ha generado un gran volumen de conocimiento sobre los mecanismos moleculares y fisiológicos de las respuestas de estrés. A grandes rasgos, los autores coinciden en que la regulación transcripcional del estrés, tanto de origen biótico como abiótico, involucra no sólo genes específicos de estrés sino, en mayor medida, una reprogramación global del transcriptoma (Kreps *et al.*, 2002; Mahalingam *et al.*, 2003; D'ippólito *et al.*, 2010). Los análisis de microarreglos utilizados para investigar la reprogramación transcripcional de la señalización de defensa en plantas de *Arabidopsis thaliana* mostraron que hasta el 25% de los genes alteran sus niveles de transcripción ante la infección por patógenos (Riechman, 2002). El análisis de las

categorías funcionales a partir de los perfiles transcriptómicos durante respuestas de estrés indica que la regulación ocurre en todos los aspectos de la fisiología y metabolismo vegetal. Entre dichas categorías se identifican crecimiento y división celular, enfermedad y defensa, energía, tráfico intracelular, metabolismo primario y secundario, síntesis y degradación de proteínas, transducción de señales, etcétera (Mahalingam *et al.*, 2003).

En nuestro laboratorio y en el marco de un estudio transcripcional enfocado a identificar genes diferencialmente expresados en papa frente al ataque del hongo patógeno *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* (*Fusarium eumartii*) se identificaron 578 genes sobreexpresados a las 24 hs luego de la infección (D'Ippólito *et al.*, 2010). La clasificación funcional de cada uno de ellos permitió identificar tanto genes típicamente relacionados con respuestas de defensa como así también nuevos genes, varios de ellos con funciones aún desconocidas. Entre la población de genes que codifican a proteínas de función desconocida y cuya expresión aumenta frente a la infección se identificó un clon correspondiente al gen *SGN-U297024* según la nomenclatura de Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>). Dicha secuencia resultó codificante para una proteína con dominios DC1 cuya función a la fecha de publicación de dicho trabajo no había sido estudiada.

Proteínas con dominios DC1

Los dominios DC1 (por *Divergent* C1) son dominios de función desconocida que contienen regiones ricas en residuos de aminoácidos, histidinas y cisteínas los cuales son característicos de los dominios de coordinación de zinc (*zinc fingers*). Deben su nombre a la similitud que tienen con los dominios C1 presentes en la quinasa de proteína de tipo C (PKC) y otras proteínas de animales, incluyendo quinasa de proteína de tipo D, diacilglicerol quinasas, RasGRPs, quimerinas y Munc13s (Brose *et al.*, 2004).

Los dominios C1 fueron originalmente caracterizados como dominios de unión a los lípidos diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol, pero actualmente se acepta que también participan en uniones del tipo proteína-proteína (Colon-Gonzalez y Kazanietz, 2006) y en la unión a membranas (Johnson *et al.*, 2007).

Los dominios C1 cumplen una función importante en la activación alostérica de la PKC (Ono *et al.*, 1989) y en el direccionamiento de PKC y otras proteínas a membrana plasmática o endomembranas (Lehel *et al.*, 1995, Mosior y Newton, 1995). En la proteína MunC13-1 la cual está involucrada en el proceso de fusión de vesículas sinápticas, el dominio C1 actuaría disminuyendo las barreras energéticas requeridas en la fusión vesicular (Basu *et al.*, 2007).

En plantas, con excepción de las diacilglicerol quinasas, no existen proteínas con dominios C1 del tipo a los identificados en animales, pero sí existe un gran número de proteínas con dominios DC1: 141 en *A. thaliana* (Figura 1), 23 en tomate y 45 en arroz, presentando la mayoría entre 3 y 7 dominios DC1 (Arias *et al.*, manuscrito en revisión). Se especula que los dominios DC1 cumplen en las plantas las funciones que desempeña el dominio C1 en animales. Sin embargo, muy poco se sabe sobre los dominios DC1 y sobre las funciones de las proteínas con dominios DC1 en plantas. La posibilidad de interacción de las proteínas con dominios DC1 con el DAG podría posicionarlas como intermediarios en las vías de transducción de señales en las que el DAG actuaría como una molécula señal (Dong *et al.*, 2012).

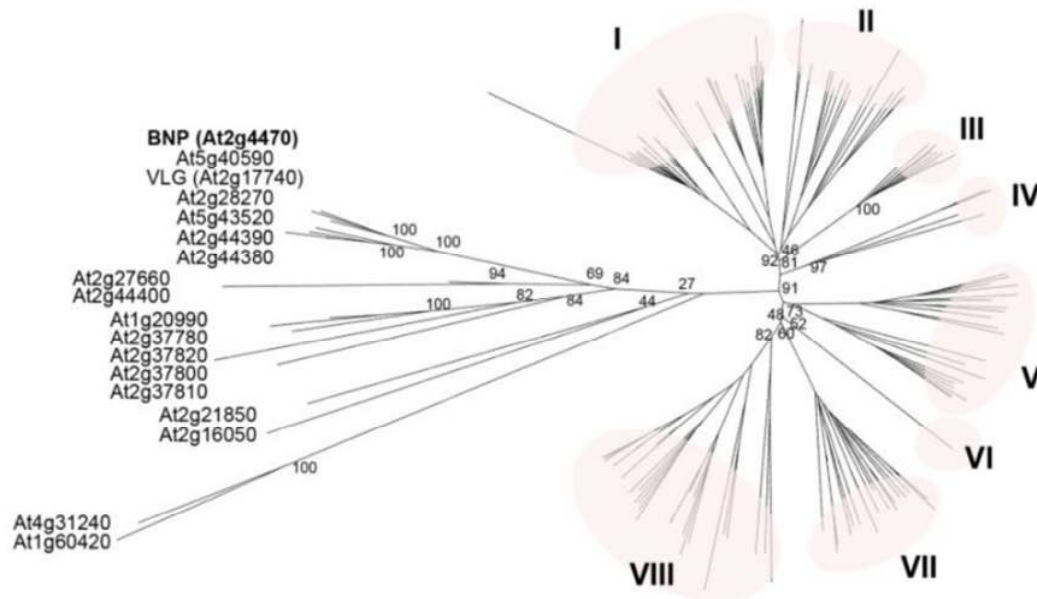


Figura 1. Familia de proteínas con dominio DC1 en *A. thaliana*. Árbol filogenético de las 140 proteínas con dominios DC1 identificadas en *A. thaliana*. Se indican los resultados de la prueba *bootstrap* con 1000 réplicas de los mayores nodos.

Previamente a este trabajo de Tesis, existían sólo unos pocos estudios de proteínas con dominios DC1, y en ninguno de ellos se abordó la caracterización funcional de sus dominios. Sin embargo, se les ha asignado funciones en la regulación fisiológica de procesos de estrés, principalmente porque su transcripción se regula ante estímulos ambientales (Suesslin y Frohnmeyer, 2003, Hwang *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2010, Shinya *et al.*, 2007, Bhaskar *et al.*, 2015, Gao *et al.*, 2016).

En *A.thaliana* se identificaron dos genes que codifican para proteínas con dominios DC1, *At5g17960* y *ULI3 (At5g59920)*. El gen *At5g17960* se describió inicialmente como gen de respuesta a estreses (frío, sal, sequía, quitina y radiación UV) y tratamientos hormonales (ácido giberélico, AS, AJ y etileno) (Bhaskar *et al.*, 2015), mientras que *ULI3* está involucrado en la transducción de señales mediadas por UV-B (Suesslin y Frohnmeyer, 2003).

La proteína CaDC1 fue identificada como regulador positivo durante las respuestas de defensa dependientes de AS en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con *Xanthomonas campestris* (Hwang *et al.*, 2013). CaDC1 se localiza en el núcleo y se une a ADN y ARN in vitro (Hwang *et al.*, 2013).

En trigo, TaCHP se identificó como una proteína expresada diferencialmente bajo estrés salino, que al sobreexpresarse ectópicamente en *A. thaliana* le otorga mayor tolerancia frente a tratamientos con NaCl (Li *et al.*, 2010).

Las proteínas *NtDC1a* y *NtDC1b* se inducen tempranamente en plantas de tabaco ante la acción de laminarina enriquecida en β -1,3-1,6-oligoglucano, la cual es utilizada habitualmente como inductor químico o *elicitor* de la respuesta de defensa (Shinya *et al.*, 2007).

En algodón, la proteína DC1 GhCHR se identificó como blanco del microRNA miRNVL5 y participa en la regulación de la respuesta de estrés salino (Gao *et al.*, 2016). Sin embargo no se ha descrito el gen ortólogo de miRNVL5 en *A. thaliana* y por lo tanto su rol en la regulación de estrés no ha sido completamente interpretado.

En conjunto, las evidencias presentadas apuntan a que las proteínas con dominios DC1 participan de la regulación fisiológica de las respuestas de estrés en diversas especies de plantas angiospermas. En este trabajo se utilizará la especie modelo *A. thaliana* para profundizar el conocimiento básico del rol de las proteínas con dominios DC1 durante procesos de estrés y a lo largo del ciclo de vida de las angiospermas.

Reproducción y desarrollo gametofítico en *A. thaliana*

Las plantas embriofitas atraviesan un ciclo de vida haplodiplonte con alternancia de generaciones. Dicho ciclo involucra una generación multicelular haploide, llamada gametofito, y una generación multicelular diploide, llamada esporofito. La función principal del gametofito es la de producir gametas por mitosis, que luego de la fecundación generan un cigoto diploide (Drews y Koltunow, 2011). El cigoto se

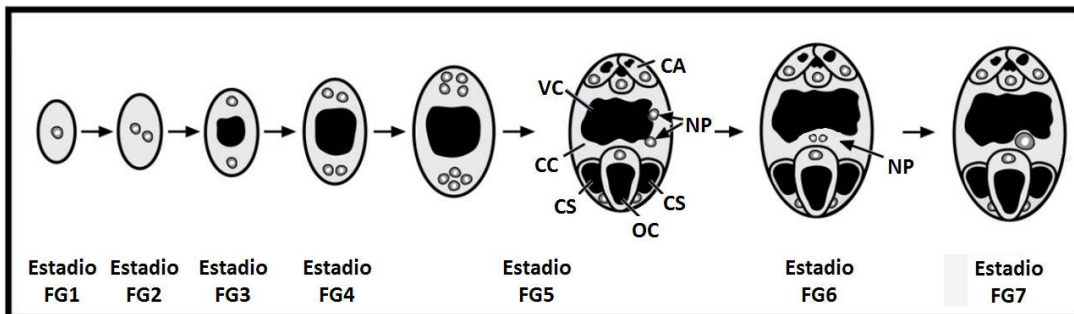
desarrolla en un esporofito, capaz de producir esporas por meiosis, dando lugar a nuevos gametofitos (Drews y Koltunow, 2011).

En las embriofitas inferiores (briofitos en sentido laxo), el gametofito es la generación dominante, conspicua, mientras que los esporofitos se encuentran unidos al gametofito, del cual son fisiológicamente dependientes (Drews y Yadegari, 2002). Durante la evolución de las plantas los gametofitos han tendido a reducirse en tamaño y complejidad en relación a los esporofitos, llegando hasta la dependencia fisiológica en las plantas superiores (espermatofitas) (Drews y Yadegari, 2002). La heterosporia, otra adquisición evolutiva del ciclo haplodiplonte, resultó en la producción de dos tipos de gametofitos unisexuales, femenino y masculino (Drews y Yadegari, 2002).

En las plantas con flores o angiospermas, los gametofitos comprenden muy pocas células y están incluidos dentro de los órganos sexuales de la flor (Drews y Yadegari, 2002). El gametofito masculino, también referido como grano de polen o microgametofito, se desarrolla dentro de la antera y está compuesto de dos células espermáticas dentro de una célula vegetativa. El gametofito femenino, también llamado saco embrionario o megagametofito, se desarrolla dentro del óvulo, que a su vez está dentro del ovario del carpelo (Drews y Yadegari, 2002).

En *A. thaliana*, el desarrollo del saco embrionario comienza a partir de la megaspóra funcional, producto de una meiosis asimétrica (FG1). Tres rondas sucesivas de mitosis dan lugar primero a dos núcleos (FG2), que se separan por una gran vacuola central (FG3), luego cuatro núcleos, dos de cada lado de la vacuola (FG4), y finalmente ocho núcleos que corresponden a cuatro tipos celulares (FG5) (Christensen *et al.*, 1997). Éstos son la ovocélula, la célula central, dos sinérgidas y tres antípodas (Christensen *et al.*, 1997). Entre el estadio FG5 y FG6, un núcleo de cada polo del saco embrionario migra hacia el centro, ubicándose próximos a la ovocélula. Éstos reciben el nombre de núcleos polares y su fusión dará origen al núcleo diploide de la célula central (FG7, Figura 2) La identidad celular se establece durante la celularización, entre los estadios FG5 y FG7, pero se programa anteriormente mediante gradientes hormonales y la

separación física de los núcleos por vacuolas a lo largo del saco embrionario (Pagnussat *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2013).



luego de que la meiosis asimétrica de un megasporocito genera una única megaspora funcional (FG1). Las flechas con rótulo indican las células antípodas (CA), los núcleos polares (NP), la célula central (CC), las células sinérgidas (CS), la ovocélula (OC) y la vacuola central (VC). Adaptado de Christensen *et al.*, (1998).

La gametogénesis masculina comienza luego de que la meiosis de una célula esporógena produce una tétrada de microsporas haploides (McCormick, 1993). Cada una de las microsporas tiene una polaridad determinada por su posición en la tétrada (Park *et al.*, 1998). Siguiendo esa polaridad, se forma una vacuola central por fusión de vacuolas preexistentes, que empuja el único núcleo hacia la pared de la microspora (Twell *et al.*, 1998). Esto desencadena una mitosis asimétrica, produciendo dos células de tamaño desigual: la célula vegetativa y la célula generativa (Twell *et al.*, 1998). La célula vegetativa, más grande, constituye la mayor parte del citoplasma y acumula la reserva de metabolitos y transcritos requeridos para el crecimiento del tubo polínico (Twell *et al.*, 1998). Por otro lado, la célula generativa es de menor tamaño, presenta la

cromatina condensada, relativamente pocas organelas y metabolitos, y migra hacia dentro del citoplasma de la célula vegetativa (Twell *et al.*, 1998). La célula generativa sufre una última mitosis antes de la fecundación, para formar dos células espermáticas que fecundarán simultáneamente a la ovocélula y a la célula central en el saco embrionario (Twell *et al.*, 1998) (Figura 3).

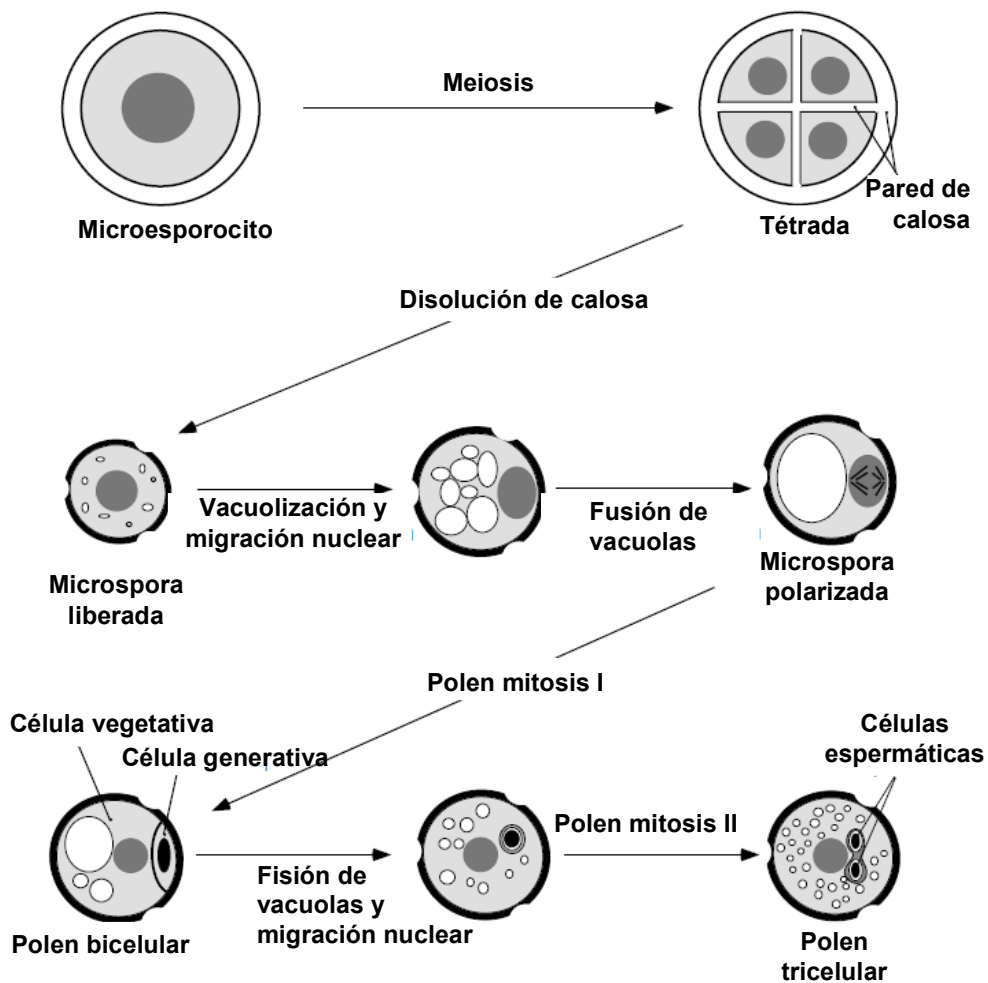


Figura 3. Esquema de las etapas del desarrollo del gametofito masculino. La microesporogénesis comienza con la meiosis de un microesporocito, generando una tétrada de microsporas haploides. Cada microspora pasa por el proceso de microgametogénesis, generando por mitosis dos células espermáticas. Adaptado de Twell *et al.*, (1998)**Figura 2.** Esquema de las etapas de la megagametogénesis. La megagametogénesis comienza

Gracias al escrutinio de líneas de *A. thaliana* mutantes de inserción por transposones se identificaron numerosos genes necesarios para el correcto desarrollo y funcionamiento de los gametofitos (Lalanne *et al.*, 2004; Pagnussat *et al.*, 2005). Se conoce que los transcriptomas gametofíticos de *A. thaliana* son sumamente simplificados con respecto a otros tipos celulares (con un promedio de 6044 genes expresados en polen comparado con 11696 genes en pelo radical y 13222 en célula de la guarda) (Rutley y Twell, 2015). Sin embargo, las proteínas asignadas a las mutaciones gametofíticas están involucradas en funciones tan diversas como biosíntesis de pared celular, señalización, metabolismo primario y secundario, transporte, anclaje de proteínas, etc. (Lalanne *et al.*, 2004; Pagnussat *et al.*, 2005). Además, se calcula que sólo entre un 4 y un 11 % de los genes expresados durante el desarrollo del polen son específicos del gametofito masculino (Rutley y Twell, 2015). Esto sugiere que muchas de las proteínas requeridas para el desarrollo gametofítico están desempeñando funciones celulares básicas que mantienen un correlato esporofítico. Por ejemplo, en un análisis comparativo del transcriptoma de una plántula y el de un grano de polen durante la gametogénesis, el 89% del transcriptoma del polen, enriquecido en transporte de membranas y señalización, correspondió a genes con función esporofítica (Borges *et al.* 2008).

Rutas de transporte de endomembranas en plantas

Si bien las plantas poseen la misma maquinaria molecular que regula el tráfico de membranas en otros eucariotas, también han adquirido evolutivamente especializaciones estructurales y moleculares relacionadas a procesos celulares específicos. Por ejemplo, se cree que las plantas tienen mecanismos específicos para mantener una diversidad de vías de tráfico vacuolar y más de un tipo de vacuola en una célula individual (Otegui y Spitzer, 2008). Típicamente se asocia tal sofisticación al

tipo de vida sésil y a dividirse su ciclo de vida en dos generaciones con historias de vida completamente dispares.

Una célula contiene diferentes tipos de endosomas que difieren en función, arquitectura y composición bioquímica. Los endosomas se clasifican en base a su función principal en distintas clases. La red trans-Golgi (TGN, del inglés *trans-Golgi network*), equivalente a los endosomas tempranos en animales, recibe carga desde la membrana plasmática por endocitosis y recicla endomembranas y receptores hacia la membrana plasmática. Los cuerpos multivesiculares (MVBs, del inglés *multivesicular bodies*), o compartimentos prevacuolares (PVCs, del inglés *prevacuolar compartments*), son comúnmente asociados a los endosomas tardíos en animales. Éstos contienen vesículas lumbales y, al fusionarse al tonoplasto, direccionan proteínas de membrana a la vía de degradación vacuolar (Otegui y Spitzer, 2008). Algunos autores sugieren la existencia de otra organela transportadora de vesículas lumbales que madura a partir de los MVBs por el reciclaje de proteínas de membrana y adquiere la capacidad de fusionarse al tonoplasto, llamada compartimento prevacuolar tardío (LPVC, del inglés *late prevacuolar compartments*) (Foresti *et al.*, 2010). Más recientemente, por tomografía electrónica de raíces de *A. thaliana*, se describió un mecanismo por el cual los MVBs maduran hasta convertirse en unas organelas llamadas “pequeñas vacuolas” (SV, del inglés *small vacuoles*) que no se tiñen con marcadores de vacuola (Cui *et al.*, 2018). Éstas pierden parte de sus vesículas lumbales y, a diferencia de los MVBs, adquieren la capacidad de efectuar fusión homotípica entre ellas, dando lugar a vacuolas propiamente dichas (Cui *et al.*, 2018). A juzgar por su tamaño, arquitectura y comportamiento, existe la posibilidad de que los LPVCs y SV sean nombres distintos para una misma organela (Figura 4).

Las vacuolas son los compartimentos más grandes de las células vegetales. Son organelas dinámicas que constantemente cambian su morfología, se fragmentan, se fusionan, y pueden transicionar de una función predominantemente de almacenaje de proteínas a una función lítica (Krüger y Schumacher, 2018).

Además de ser una forma energéticamente eficiente de ocupar el espacio citoplasmático, las vacuolas les permiten a las plantas adaptarse a la disponibilidad cambiante de nutrientes esenciales, detoxifican el citosol de moléculas dañinas, sirven de compartimentos de degradación lítica, y suelen acompañar el desarrollo tanto esporofítico como gametofítico, actuando durante la expansión celular y el establecimiento de la polaridad (Twell *et al.*, 1998; Pagnussat *et al.*, 2009; Krüger y Schumacher, 2018).

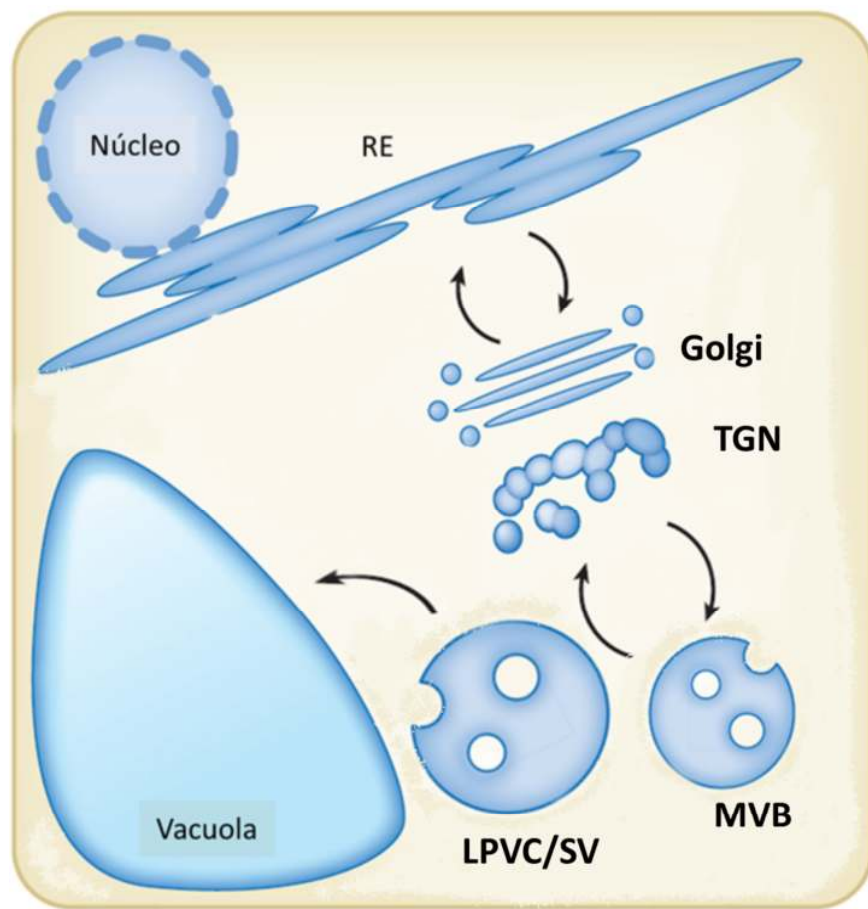


Figura 4. Esquema de los componentes principales de la ruta endosomal hacia la vacuola. La ruta de transporte de proteínas desde el núcleo hacia la vacuola atraviesa el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, la red trans-Golgi (TGN), los cuerpos multivesiculares (MVB), y los compartimentos prevacuolares tardíos/pequeñas vacuolas (LPVC/SV). Adaptado de Shimada *et al.*, 2018.

El origen del tonoplasto ha sido discutido durante décadas. Si bien existen ya vacuolas pequeñas en las células meristemáticas, se especula que la membrana necesaria para generar las grandes vacuolas presentes en las células diferenciadas puede provenir del retículo endoplasmático o de la fusión homotípica de MVBs (Krüger y Schumacher, 2018). La evidencia más reciente parece apoyar el modelo en que los MVBs maduran hasta convertirse en una organela capaz de sufrir fusión homotípica para generar vacuolas de mayor volumen (Cui *et al.*, 2018). No se descarta, sin embargo, el aporte de membrana del retículo endoplasmático, observado por microscopía electrónica (Viotti *et al.*, 2013).

El primer reporte de una línea de *A. thaliana* mutante con completa ausencia de vacuolas fue *vacuoleless1 (vcl1)*. *vcl1* porta una inserción en el gen que codifica para el homólogo de *VPS15p* de levaduras, una subunidad del complejo HOPS de fusión homotípica de MVBs y direccionamiento de proteínas a vacuolas (Rojo *et al.*, 2001). Las células de *vcl1* no forman una vacuola central, y presentan fuertes defectos en la orientación de la división celular y en la elongación, por lo cual el desarrollo de la mutante se detiene temprano en la embriogénesis (Rojo *et al.*, 2001). Los complejos HOPS en plantas sirven como anclaje para la fusión homotípica de PVCs mediada por SNAREs (KleineBalderhaar y Ungermann, 2013). La mutante *vcl1*, junto a otras mutantes de proteínas del complejo HOPS, presentan además defectos gametofíticos tanto masculinos como femeninos, no siempre ligados a la malformación de vacuolas (Hicks *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2017).

Complejos SNARE en sistemas de endomembranas

Típicamente el tráfico de vesículas endosomales ocurre en tres pasos importantes: la formación de la vesícula desde la organela donante, el movimiento hacia la organela blanco, y la fusión (Kim y Brandizzi, 2012).

En general, la fusión de membranas dentro del sistema de endomembranas requiere una maquinaria que se encuentra altamente conservada en los organismos eucariotas. Ésta consiste en GTPasas Rab y sus efectores, los cuales median el primer contacto, y proteínas de tipo SNARE que se encuentran en ambas membranas (Kleine Balderhaar y Ungermann, 2013). La interacción de las proteínas Rab unidas a GTP con factores de anclaje parece ser un evento clave en la fusión endosomal, puesto que pone en contacto a las membranas (Kleine Balderhaar y Ungermann, 2013).

Las proteínas SNAREs se pueden categorizar en dos tipos: v-SNAREs, presentes en las vesículas, y t-SNAREs, en las membranas blanco. Cuando una vesícula se mueve cerca de su objetivo, una v-SNARE en la vesícula interactúa con tres t-SNAREs en la membrana blanco, formando un complejo hétero-tetramérico que dirige la fusión de membranas (Kim y Brandizzi, 2012).

A pesar de la gran diversificación del sistema de transporte vacuolar/endocítico en plantas, la mayoría de los componentes de transporte son compartidos entre los sistemas vegetales y no vegetales (Takemoto *et al.*, 2018). En *A. thaliana* existen más del doble de proteínas SNAREs que en mamíferos, las cuales están mayormente no caracterizadas (Kim y Brandizzi, 2012). Por ejemplo, miembros de la familia de SNAREs AtVAMP71 están involucrados en la respuesta de estrés por sequía al regular la apertura estomática, que está dictada por el volumen vacuolar (Leshem *et al.*, 2010). Otra proteína SNARE, AtVAMP727, forma complejos con AtSYP22 regulados por la GTPasas Rab Ara6 en los compartimentos prevacuolares, regulando la tolerancia a estrés salino (Ebine *et al.*, 2008). Las células de plantas dobles mutantes AtVAMP727/AtSYP22 contienen múltiples vacuolas pequeñas en lugar de la gran vacuola central (Ebine *et al.*, 2008). También durante estrés biótico se encontró un

complejo SNARE involucrado en la fusión homotípica de vesículas que regula la resistencia de *A. thaliana* a hongos no-patógenos (Collins *et al.*, 2003).

El análisis de la diversidad de complejos SNAREs provee información valiosa sobre la biogénesis de vacuolas y la señalización del tráfico vacuolar, especialmente en relación con la especificidad celular y durante procesos de desarrollo o de interacción con el ambiente.

Objetivo general

Estudiar la función de VLG y BNP durante el desarrollo gametofítico y la interacción con factores ambientales.

Objetivos específicos

- Estudiar el perfil de expresión de *VLG* y *BNP* durante el desarrollo y en condiciones de estreses bióticos, abióticos y tratamientos con las hormonas que regulan dichos estreses.
- Estudiar el fenotipo mutante gametofítico en las líneas de inserción para *VLG* y *BNP*.
- Estudiar la localización subcelular de VLG y BNP tanto en el esporofito como en los gametofitos.
- Estudiar la posible interacción de VLG y BNP con otras proteínas de manera de avanzar en la caracterización funcional de las mismas.

Materiales y Métodos

Líneas de plantas utilizadas y condiciones de crecimiento

Todas las semillas utilizadas en este trabajo de Tesis fueron obtenidas del banco de semillas de la Universidad de Ohio Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), con excepción de aquellos stocks donados, que se detallan en forma específica. Las mutantes alélicas *vlg-1*, *vlg-2*, corresponden a las líneas de inserción en ecotipo Columbia (Col-0) *SAIL_507_F09*, *GK-793C12* respectivamente, y presentan inserción de ADN-T en el locus *At2g17740*. Las mutantes *bnp-1* y *bnp-2*, por otro lado, corresponden a las líneas de inserción en Col-0 *SALK_114889* y *GK-008E01* respectivamente y presentan inserción de ADN-T en el locus *At2g44370*. Las líneas reporteras pVLG:VLG-GFP, pBNP:BNP-GFP, pVLG:GUS y p:BNP:GUS se generaron previamente mediante transformación por *Agrobacterium* en nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. Sebastián D'ippólito.

El cultivo de plantas en suelo se llevó a cabo en mezcla de tierra (resaca de pino), vermiculita y perlita en proporción 3:1:1, y se proporcionó riego frecuente con agua de red. Previo al sembrado las semillas se estratificaron durante 72 hs a 4°C y oscuridad. Luego todas las plantas fueron cultivadas en cuartos de cultivo bajo régimen de día largo, 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad, a 22°C y 60% de humedad ambiente. El cultivo en placa fue realizado en medio MS (Murashige and Skoog) marca Sigma, preparado con 9,4 gr por cada L de agua, adicionado con agar al 1% p/v. Se usaron antibióticos para la selección de las plantas transgénicas (Higromicina B 15 µg/ml, o kanamicina 30 µg/ml y glufosinato de amonio 6 µg/ml). Las semillas sembradas en placa se esterilizaron previamente con etanol 70% por 5 minutos, luego con una solución compuesta por lavandina al 10% y tween 20 al 1%, y posteriormente lavadas al menos 5 veces con agua destilada estéril.

Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de hojas de *A. thaliana* para su uso en reacciones de genotipado. El método consistió en desintegrar el tejido (2 hojas jóvenes) congelado en nitrógeno líquido utilizando un mortero, para luego homogeneizar en buffer de extracción (4 partes de buffer H (NaCl 0,1 M, Sacarosa 0,2 M, EDTA 0,01 M, Tris-HCl 0,03 M) y 1 parte de buffer L (EDTA 0,2 M, SDS 2,5% p/v, Tris-HCl 0,5 M pH 9,2) que fueron mezcladas inmediatamente antes de usar) y una incubación de 30 minutos a 65°C. Luego, se agregaron 133 µl de Acetato de potasio 3M pH 4,7 y se incubó 30 min en hielo. Luego se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó por inversión y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4°C. Se tomó la fase superior en un tubo limpio y se le agregaron 700 µl de etanol absoluto. Se volvió a centrifugar a 10000 rpm por 10 min, se descartó el etanol y se lavó con 1000 µl de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente y luego de descartar el etanol se dejó secar el tubo sobre papel absorbente. Finalmente, el precipitado de ADN se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril.

Análisis genético de líneas mutantes y transgénicas

El genotipo de las plantas se determinó mediante PCR, utilizando ADN genómico como templado y la combinación de primers adecuados para detectar el alelo “salvaje” o el alelo interrumpido. Las secuencias de dichos primers se obtuvieron del sitio web “T-DNA primer design” (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 0,2 mM de nucleótidos, 2,5 µM de cada primer, 1X buffer de reacción (GoTaq, Promega), 1U de ADN Polimerasa (GoTaq, Promega) y 0,5 µl de solución de ADNg extraído en 10 µl de volumen final. El programa utilizado fue: 2 min a 94°C (desnaturalización inicial), 30 ciclos de: 94°C por 30 seg, 53°C por 30 seg y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Los

productos de estas reacciones se separaron y visualizaron en geles de agarosa (ver a continuación).

Electroforesis de ácidos nucleicos

Tanto el ADN (productos de PCR o digestiones con enzimas de restricción) como el RNA (total, extraído) se separaron en geles de agarosa 1% o 1,5%, respectivamente, preparados en buffer TBE (TRIS-Ac.Bórico-EDTA) sometidos a diferencias de voltaje de 100V constantes. Los geles se prepararon conteniendo SYBR SAFE 1X (Invitrogen) para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos al exponer los geles a luz azul en un transiluminador.

Extracción de ARN

Se extrajo ARN total por el método de TRIzol: una o dos hojas jóvenes, una fracción de tallo de aproximadamente 1 cm, una inflorescencia, alrededor de 10 mg de raíces u óvulos según el caso se pulverizaron en nitrógeno líquido. El polvo de nitrógeno se pasó a un tubo conteniendo 800 μ l de TRIzol (Invitrogen). Posteriormente, se agregaron 200 μ l de cloroformo, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. La fase superior se traspasó a un tubo limpio y se le agregó 0.7 volúmenes de isopropanol. Se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol (70% en agua DEPC libre de ARNasas). Posteriormente, se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado de ARN se resuspendió en 30 μ l de agua-DEPC, calentando en baño a 55°C durante 5 minutos.

Luego se cuantificó la concentración del ARN obtenido mediante absorbancia espectrofotométrica en longitud de onda 260nm y se calculó la relación de absorbancias 260/280nm. Se separó 1 μ g de ARN para determinar su calidad visualizando las subunidades de ARN ribosomal en geles de agarosa 1,5% p/v.

Finalmente, se tomaron 10 µg del ARN total y se llevó a cabo una digestión del ADN contaminante utilizando la enzima RQ1 DNase de Promega, según indicaciones del fabricante.

Síntesis de ADN copia

Luego de la extracción de ARN y de la digestión del ADN contaminante, se sintetizó el ADN copia (ADNc) según el siguiente protocolo: 2µg de ARN total se mezclaron con 0.6 µg de hexanucleótidos de secuencia aleatoria (Biodynamics), se incubó durante 5 minutos a 70°C y luego 5 minutos en hielo. Luego se agregó la mezcla de reacción para la síntesis de ADNc: transcriptasa reversa Im-Prom II (10 U, Promega), buffer de reacción (1X), dNTPs (0,5 mM), MgCl₂ (1,5mM), inhibidor de ARNasas RNAsin (20 unidades, Promega). Se incubó a 25°C durante 5 min (de manera de permitir el apareamiento de los oligonucleótidos con el ARN), 1 h a 42°C (reacción de retrotranscripción) y desnaturalización de las enzimas durante 15 min a 72°C. Luego de esta reacción, los productos se diluyeron 10 veces en agua-DEPC estéril para su uso.

Análisis de expresión por PCR en tiempo real

Se analizó la expresión de genes mediante la determinación de niveles de transcripto por PCR en tiempo real (qPCR). Se utilizó como templado el ADNc sintetizado, se preparó la mezcla de reacción (3 picomoles de primers y SYBR Green master mix, en 25µl finales, según indicaciones del proveedor) y se llevó a cabo en un equipo StepOne de Applied Biosystems. Se usaron los genes *ACT11* (actina) y *UBQ5* (ubiquitina) como genes de referencia.

Análisis de segregación

Para las autocruzas se dejaron autopolinizar plantas heterocigotas y se colectó la progenie. Los cruces recíprocos se realizaron según Pagnussat *et al.* (2005).

Las semillas de la F1 se germinaron en medio selectivo conteniendo 6 µg/ml de glufosinato de amonio para *vlg-1* o 5,2 µg/ml de sulfadiazina para *vlg-2* y *bnp-2*. Puesto que *bnp-1* no expresó su resistencia a kanamicina, se genotiparon las plántulas de la F1.

Disección de pistilos y silicuas, análisis fenotípico de óvulos

Los pistilos y silicuas se disecaron utilizando agujas hipodérmicas de 0.1 mm de espesor bajo lupa binocular, con aumentos entre 10 y 40 veces. Se efectuaron cortes a ambos lados del septum para liberar los óvulos y poder utilizarlos en los distintos experimentos. Para su observación, los óvulos fueron montados usando solución Hoyer's para su clareado y se observaron por microscopía.

Disección de anteras y preparaciones histoquímicas en polen

Para determinar la viabilidad del polen se colectaron anteras en antesis y se colorearon con la tinción de Alexander (Alexander, 1969). Los estadios de desarrollo del polen en plantas WT y mutantes se analizaron para cada flor de la misma inflorescencia, comenzando desde la primera flor abierta (llamada +1) hasta las 10 flores cerradas sucesivas (-1 a -10) (Lalane y Twell, 2002). Las flores se fijaron en etanol:acético 3:1 hasta la decoloración y se conservaron a temperatura ambiente. Las anteras se lavaron con agua antes de su disección y se montaron en portaobjetos con tinción nuclear 40,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,02 M ácido cítrico, 0,16 M Na₂HPO₄, 0,2 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>).

Las vacuolas se tiñeron con 0,01% p/v de rojo neutro por 30 min según lo descrito por Mahlberg (1972).

Germinación de polen

Para la germinación y emergencia del tubo polínico los granos de polen se incubaron durante la noche en una cámara húmeda (100% de humedad relativa) a 22°C en un

medio sólido con 0,01% de ácido bórico, 5 mM de CaCl₂, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO₄, 1,5% de agarosa, pH 7,5 y 10% de sacarosa para evitar la ruptura por hipotonía. El protocolo utilizado fue optimizado por Boavida y McCormick (2007).

Obtención de imágenes

La microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) se llevó a cabo en un microscopio Zeiss Axioplan Imager A2, acoplado a una cámara fotográfica digital AxioCam (la cual opera con el software Axiovision). Todas las muestras que se analizaron con este microscopio se clarearon previamente en solución de Hoyer's (Goma arábica 0,12 g/ml, hidrato de cloral 1,54 g/ml, glicerol 13% v/v), entre 12 y 24 hs.

Se utilizó microscopía confocal en los casos donde se requería observar la fluorescencia emitida por reporteros fluorescentes. El microscopio utilizado fue un Nikon Eclipse C1 Plus, dirigido por el software EZ C1 Free Viewer, con el cual se ajustaron los parámetros y se tomaron las fotografías.

Exposición a estreses y tratamientos hormonales

Plántulas de *A. thaliana* WT, pVLG:GUS o pBNP:GUS de 10 días se sumergieron en una solución de 200 µg/ml xilanasa (Sigma-Aldrich), 5 mM de H₂O₂, 100 mM de NaCl, 100 mM de ácido salicílico (AS), 100 µg de ácido jasmónico (AJ), 1 µM de ácido absícico (ABA) u 80 nM de ácido indolacético (IAA) durante 2 hs. El estrés por frío se indujo en una heladera a 4°C durante 2 hs. Para el tratamiento con radiación UV-B se expuso las plántulas a 1,2 W/m² durante 2 hs.

Las cepas virulenta y avirulenta de *P. syringae* para las infecciones se cultivaron en medio King's B sólido (20 g/L de proteasa peptona, 1,5 g/L de K₂HPO₄, 1,5 g/L de MgSO₄ y 20 g/L de agar a pH 7,2) con 50 µg/ml de rifampicina y 25 µg/ml gentamicina durante 24 hs a 30°C. Posteriormente se repicaron en 3 ml de King's B líquido en donde se incubaron 18 hs a 30°C, se centrifugaron las células a 3000 g por 5 min, se

resuspendieron en $MgCl_2$ 20 mM hasta alcanzar las concentraciones indicadas en los experimentos. La inoculación se realizó infiltrando la suspensión bacteriana con una jeringa de 1 ml por el envés de las hojas hasta llenarla por completo, y las muestras para extracción de ARN se tomaron a los tiempos indicados en los experimentos.

Detección de actividad GUS

Para estudiar la actividad GUS se tomaron diferentes tejidos de acuerdo a lo indicado y se los incubó a 37°C durante 6-18 horas de acuerdo al caso hasta detectar tinción, en una solución conteniendo buffer fosfato 100mM, EDTA 10mM, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 5mM, $K_3Fe(CN)_6$ 5mM, Tritón X-100 0,1% v/v y X-GLUC 1mg/ml. Los tejidos verdes fueron incubados en concentraciones crecientes de etanol (20%-70%) hasta su clareado.

Ensayos de co-localización en *N. benthamiana*

Para los estudios de localización subcellular se co-infiltró *A. tumefaciens* cepa GV3101 portando P35S:VLG-GFP o P35S:BNP-GFP junto con p19 (un supresor de silenciamiento) y *A. tumefaciens* portando alternativamente el marcador de LPVCs RFP-Rha1, el marcador de aparato de Golgi St-RFP o los reporteros RFP-VOZ1 y RFP-VOZ2 en hojas de *N. benthamiana*. Los cortes se analizaron 48-96 hs después de la infiltración por microscopía confocal según lo descrito anteriormente.

Identificación de proteínas interactoras de VLG y BNP mediante doble híbrido en levaduras (Y2H)

Este estudio lo llevo adelante la empresa Hybrigenics Services S.A.S. (Paris, Francia). Para ello, el cDNA correspondiente a VLG y BNP fue amplificada por PCR y clonada en el vector pB66 como proteína de fusión al dominio Gal4 de unión a DNA en su N terminal y utilizado como carnada para tamizar una biblioteca normalizada de

inflorescencia de *A. thaliana* conteniendo 3.2 millones de clones independientes en el vector pGADT7-RecAB (Fromont-Racine *et al.*, 1997). Para la construcción anzuelo Gal4 se tamizaron 35 millones de clones utilizando las cepas de levadura YHGX13 (Y187 *ade2-101::loxP-kanMX-loxP*, mata) y L40ΔGal4 como se describió previamente (Fromont-Racine *et al.*, 1997). Las colonias His⁺ fueron seleccionadas en un medio sin triptofano ni leucina ni histidina. Los fragmentos correspondientes a los clones positivos fueron amplificados por PCR y secuenciados. Las secuencias resultantes fueron utilizadas para identificar las proteínas interactoras en la base de datos GenBank database (NCBI) (Formstecher *et al.*, 2005).

Ensayo de BiFC

Las secuencias de ADNc de *VLG*, *LTL1*, *PVA12*, *BNP*, *VOZ1* y *VOZ2* se amplificaron por PCR utilizando los cebadores específicos detallados en la lista de oligonucleótidos. Los productos de PCR se clonaron en plásmidos pENTR TOPO utilizando tecnología Gateway (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante, se secuenciaron y se recombinaron por la reacción BP en plásmidos destino para BiFC (pUBN-YN y pUBN-YC) (Grefen *et al.*, 2010). Los plásmidos binarios se transformaron en *A. tumefaciens* ceà GB3101 por electroporación. Las fusiones con nYFP- y cYFP se co-infiltraron con p-19 en hojas de *N. benthamiana*. Se examinó la epidermis 48 hs por microscopía confocal después de la infiltración.

Análisis bioinformáticos y filogenéticos

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas mostradas se obtuvieron de GenBank. Los alineamientos se realizaron en el programa MEGA7 (versión 7.0.14) (Kumar *et al.*, 2016). La presentación gráfica de las identidades se visualizó utilizando

Geneious (versión 9.1.4) (<http://www.geneious.com>) basado en una matriz de identidad (Kearse *et al.*, 2012). El árbol filogenético se construyó utilizando el método neighbor-joining y los ajustes por defecto de MEGA7 (Saitou y Nei, 1987; Kumar *et al.*, 2016). El árbol óptimo (suma de la longitud de las ramas = 5855) se muestra en la Figura 1. Los porcentajes de árboles replicados en los que los taxa se agruparon juntos en la prueba bootstrap (500 réplicas) se muestran en las ramas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se computaron utilizando el método de corrección de Poisson, y son unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio (Zuckerkandl y Pauling, 1965). El modelado de los dominios DC1 de VLG se llevó a cabo en el programa SWISS-MODEL Workspace (Biasini *et al.*, 2014). La comparación de estructuras se realizó usando TM-align (versión 20160521) (Zhando y Skolnick, 2005). Los gráficos moleculares y el modelado se realizó con el paquete UCSF Chimera (<http://rbvi.ucsf.edu/>) (Pettersen *et al.*, 2004).

Descripción de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Uso
VLG ORF Fw	CACCGCTTCCCGCCCTTCAGTGAGAC	BiFC
VLG ORF Rv	GTTAATATCTTAGATCATTTTAAGC	BiFC
PVA ORF Fw	CACCAGTAACGAGCTTCTCACCAT	BiFC
PVA ORF Rv	TGTCCTCTTCATAATGTATCCC	BiFC
LTL1 ORF Fw	CACCAATATCAATTGTTCTCCATTAGG	BiFC
LTL ORF Rv	CTAGATTTTAGAAGAATCCAATAG	BiFC

BNP ORF Fw	CACCGCCGCAAGAAAACCGTCGG	BiFC
BNP ORF Rv	TTAGATCAACTTGAGACAAGCCTT	BiFC
VOZ1 ORF Fw	CACCAAGGCTAAGAACCGTGTTGATGA	BiFC
VOZ1 ORF Rv	TCAGGGGATATAATAGTCGCTTAG	BiFC
VOZ2 ORF Fw	CACCTCAAACCACCCGAAGATCACATC	BiFC
VOZ2 ORF Rv	TCACTCCTTACGACCTTTGGTTGG	BiFC
<i>vlg-1 RP</i>	TCATCTTCAACTTGGGCTTTG	Genotipado
<i>vlg-1 LP</i>	TGCCCATTAACCGTTACAC	Genotipado
<i>vlg-2 RP</i>	CCTCCTCTATTCCCCACAGAA	Genotipado
<i>vlg-2 LP</i>	GTTCACTCCATTTCCACCA	Genotipado
<i>bnp-1 -LP</i>	ACGGTAGAGCAATGTGAGTGG	Genotipado
<i>bnp-1 -RP</i>	AGACCCAGCGTAATTGACCTC	Genotipado
<i>bnp-2 -LP</i>	GATTATCTGGAACAGTCTCTTGGC	Genotipado
<i>bnp-2 -RP</i>	TTGAAAATTTTGTCTCTCGTGTG	Genotipado
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Genotipado
GKGT8474	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT	Genotipado

Capítulo 1

Estructura y perfiles de expresión de las proteínas con dominios DC1: VLG y BNP

El análisis del genoma de *A. thaliana* reveló la existencia de seis genes con similitud al transcripto de papa *SGN-U297024* previamente identificado (Tabla 1, Figura 5 a). El grado de identidad de estos genes con el de papa a nivel de secuencia completa es apenas mayor al 30%, aunque las regiones correspondientes a los dominios DC1 se encuentran altamente conservadas. En las proteínas codificadas por los genes con similitud a *SGN-U297024* se identificó también un dominio C1_3 (relacionado con los dominios DC1) pero no se encontró ningún otro tipo de dominio que pudiera ayudar a inferir una función para estas proteínas (Figura 5 b). En vista de su mayor identidad al transcripto *SGN-U297024*, se continuó con el estudio funcional de *At2g17740* y *At2g44370*.

Tabla 1. Identificación de genes de *A. thaliana* con similitud al transcripto de papa *SGN-U297024*. Se indican los valores obtenidos en la búsqueda por BlastX (matriz BLOSUM 62).

	Identidad	Positivos	<i>e value</i>	Score
<i>At2g44370</i>	49/146 (33%)	78/146 (53%)	1e-21	250
<i>At5g40590</i>	49/148 (33%)	75/148 (50%)	8e-21	243
<i>At2g17740</i>	47/143 (32%)	76/143 (53%)	1e-19	233
<i>At2g44380</i>	53/150 (35%)	77/150 (51%)	4e-19	228
<i>At2g28270</i>	48/146 (32%)	73/146 (50%)	5e-18	219
<i>At5g43520</i>	50/149 (33%)	78/149 (52%)	5e-18	219

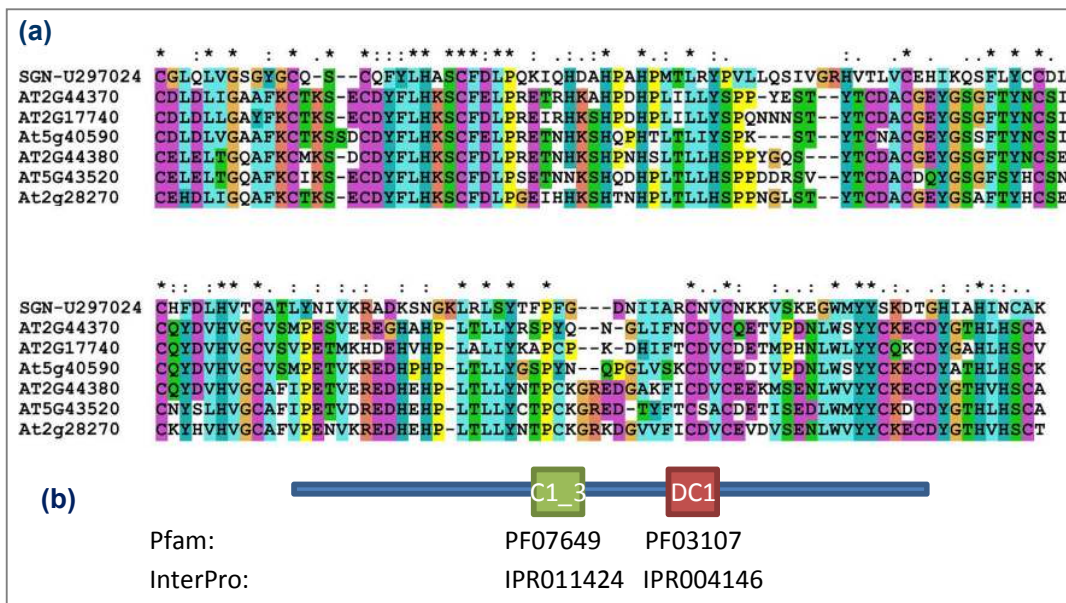


Figura 5. Identificación de genes homólogos al transcrito de papa SGN-U297024.

(a) Alineamiento de la secuencia de papa SGN-U297024 con las secuencias de mayor similitud en el genoma de *A. thaliana*.

(b) Estructura de dominios de las proteínas identificadas según análisis en la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>). Se indica ID de los dominios según las bases de datos Pfam e InterPro.

Los genes *VLG* y *BNP* codifican para proteínas con dominios DC1

Los genes *VLG* (*At2g17740*) y *BNP* (*At2g44370*) codifican para proteínas de 248 y 250 aminoácidos, las cuales nombramos *VLG* (*VACUOLELESS GAMETOPHYTES*) y *BNP* (*BINUCLEAR POLEN*) respectivamente.

A partir del análisis de proteínas provenientes de las bases de datos Pfam e Interpro se identificaron tres dominios DC1 (identificados como PF03107 e IPR011424 Pfam e Interpro respectivamente) (Figura 6) similares al dominio C1 (PF00130 en Pfam e

IPR002219 en Interpro) tanto en VLG como en BNP. La búsqueda de secuencias con identidad similar a los dominios DC1 correspondiente a la proteína VLG arrojó la estructura 1v5n, perteneciente al dominio DC1 de una disulfuro isomerasa tipo PDI codificada por *At1g60420* (Miyamoto *et al.*, 2003). Dicha estructura contiene dos láminas beta antiparalelas y dos alfa hélices y coordina dos iones Zn^{2+} a través de tres residuos cisteína y cinco residuos histidina, correspondientes al motivo conservado de los dominios DC1. Alineamientos de 1v5n con dos estructuras de dominios C1, 1y8f de la proteína Munc13-1 de ratón (Shen *et al.*, 2005) y 2yuu de la proteína PKC delta de humanos (Abe *et al.*, 2007) mostraron un plegado similar al de los dominios DC1 y C1 mencionados anteriormente (Figura 6 b-c). Basado en dichos antecedentes, el motivo funcional del dominio DC1 podría proponerse como $HX_{1-2}HX_{12-18}CX_2CX_{10-14}CX_2CX_4HX_2C$, en el cual el primer residuo de histidina en el dominio DC1 sustituye a la última cisteína en el dominio C1 para la coordinación de Zn^{2+} (Figura 7).

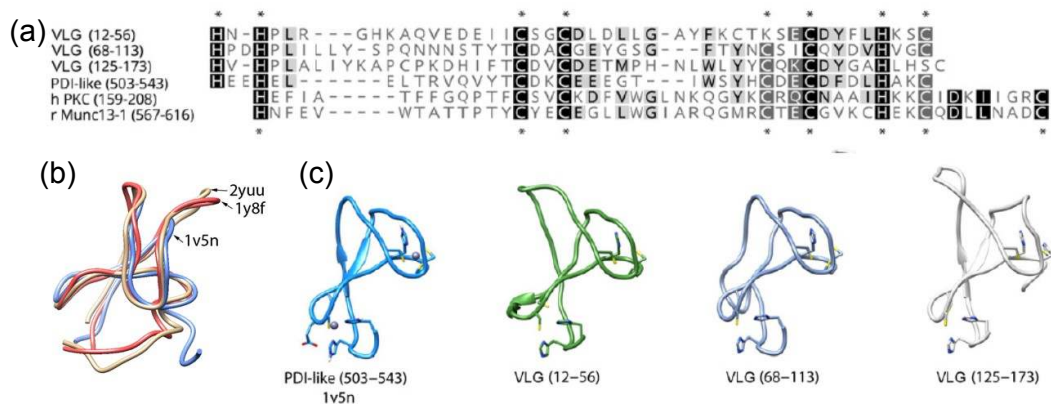


Figura 6. Comparación entre los dominios DC1 de plantas y los dominios C1 de mamíferos.

(a) Alineamiento de los dominios DC1 de VLG, el dominio DC1 de la proteína PDI-like (*Arabidopsis*) y los dominios C1 de la proteína PKC (humana) y la proteína Munc13-1 (ratón).

(b) Estructuras superpuestas del dominio DC1 de PDI-like y los dominios C1 de PKC y de Munc13-1.

(c) Estructuras alineadas de los dominios DC1 tipo PDI y de VLG modelados.

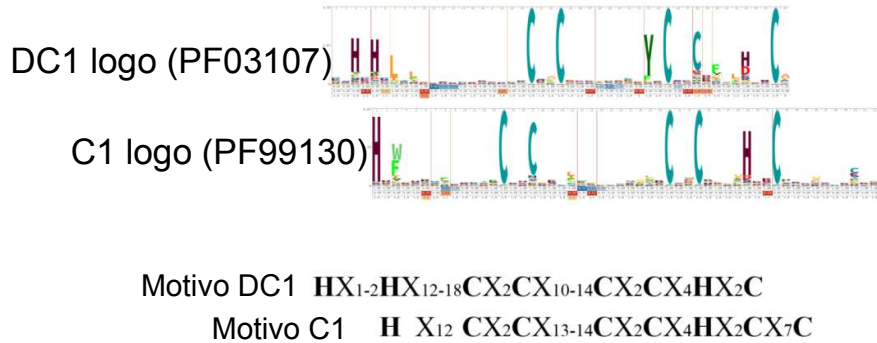


Figura 7. Comparación de la conservación de secuencias de aminoácidos entre los dominios DC1 de plantas y C1 de animales. Se muestran los logos (arriba) y los motivos (abajo) de cada dominio extraídos de la base de datos Pfam (<https://pfam.xfam.org/>).

***VLG*, *BNP* y sus homólogos cercanos se regulan durante estreses y tratamientos hormonales.**

A partir del análisis de bases de datos de microarreglos mediante el programa Genevestigator (<https://genevestigator.com/>) se obtuvieron los perfiles de expresión de los genes *VLG*, *BNP* y sus homólogos más cercanos. Los experimentos se filtraron con un umbral de cambio de expresión de al menos 1,5 veces. A partir de dicho análisis se interpretó que este grupo de genes se regula fuertemente frente a diversos estreses y tratamientos hormonales. *VLG* y *BNP* se regulan positivamente frente a la exposición de las plantas de *A. thaliana* a suspensiones bacterianas de *P. syringae* vir y avr frente a una cepa de *E. coli* no patógena en plantas, y ante los tratamientos con inductores o elicitores de estrés biótico tal como oligoquitosano y flagelina (Thakur y Sohal, 2013) (Figura 8). Ambos genes poseen además una regulación negativa frente a la acción de las hormonas ABA y auxina (IAA) (Figura 8). El gen *BNP* también es regulado por frío y estrés térmico, osmótico y salino específicamente en raíces (Figura 7).

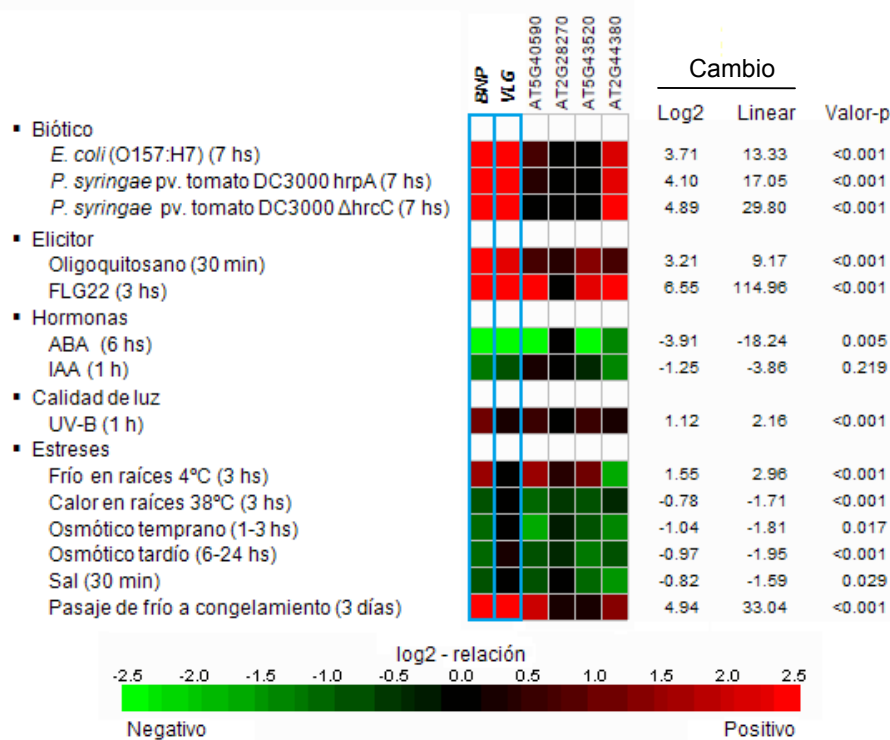


Figura 8. Análisis *in silico* de la expresión de *BNP*, *VLG* y sus homólogos más cercanos frente a distinto tratamientos biológicos y químicos. Datos obtenidos a partir de Genevestigator (<https://genevestigator.com/>). *P. syringae* hrpA corresponde a una cepa avirulenta, mientras que ΔhrpC a una cepa virulenta; FLG22: flagelina bacteriana; ABA: ácido abscísico; IAA: ácido indolacético.

Con el objetivo de validar la información disponible en bases de datos, se analizaron los perfiles de expresión de los genes *VLG* y *BNP* mediante el sistema reportero promotor-GUS en plantas de *A. thaliana* controles y sometidas a diferentes tratamientos. Se cultivaron plantas transgénicas conteniendo las construcciones *pVLG:GUS* y *pBNP:GUS* durante 10 días y se enfrentaron durante dos horas a una serie de tratamientos químicos tales como 200 µg/ml xilanasa utilizado como inductor defensa (Ron y Avni, 2004) , 1,2 W/m² radiación UV-B, 4°C de temperatura, 5 mM de H₂O₂ y 100 mM de NaCl. Además se efectuaron tratamientos hormonales con 100 mM de ácido salicílico (AS) y 100 µg de ácido jasmónico (AJ) como hormonas centrales de

la resistencia contra patógenos (Thaler *et al.*, 2012), 1 μ M de ácido absícico (ABA) como hormona central del estrés abiótico (Tuteja, 2007) y 80 nM de ácido indolacético (IAA) como hormona de crecimiento (Östin *et al.*, 1998). Con el objetivo de estudiar la localización transcripcional de *VLG* y *BNP* se analizaron los cotiledones, primera hoja, hipocotilo, raíz en la mitad de su longitud y ápice radical. En general ambos genes se expresan en todas las condiciones ensayadas y en al menos uno de los órganos indicados (Figura 9 y 10). *VLG* se expresa principalmente en tejidos u órganos de la parte aérea frente a los tratamientos con xilanasa, frío, sal, AS, AJ, ABA e IAA y en raíz frente a luz UV-B con respecto al control (Ctrl) (Figura 9). En cambio su expresión se reprime en la parte aérea frente a luz UV-B y en raíz ante el tratamiento con xilanasa, AS y H₂O₂ (Figura 9). La regulación transcripcional de *BNP* frente a los tratamientos es en general más débil o dado que no muestra cambios significativos en el hipocotilo ni en la raíz frente a ninguno de los tratamientos ensayados (Figura 10). *BNP* se expresa frente a tratamientos con sal o luz UV-B y se reprime frente a ABA e IAA en cotiledones y hojas (Figura 10). En menor medida las primeras hojas también respondieron positivamente a xilanasa y frío (Figura 10).

En conjunto, la multiplicidad de respuestas transcripcionales a tiempos cortos de exposición frente a los diferentes tipos de tratamientos y hormonas sugiere que las proteínas *VLG* y *BNP* tendrían una función en la regulación de las interacciones planta-ambiente.

La respuesta regulatoria de *VLG* y *BNP* durante estrés biótico es la más preponderante en las bases de datos (con un aumento de la expresión de entre 30 y 115 veces), lo cual coincide con el aumento en la expresión de *pVLG:GUS* frente a la aplicación de xilanasa y AS. Por lo tanto, con el objetivo de validar cuantitativamente estos datos se realizaron ensayos de q-PCR con primers para *VLG* en plantas de *A. thaliana* sometidas al elicitor oligoquitosano y a cepas de *P. syringae* virulenta (*vir*) y avirulenta, portando la proteína de avirulencia *avrRpm1* (*avr*). La expresión de *VLG* en plantas WT de 20 días aumenta en promedio más de 50 veces en 1 h después de la

aplicación de 50 mg/ml de oligoquitosano, alrededor de 10 veces después a las 6 hs, y no aumenta significativamente a las 24 hs con respecto al control con $MgCl_2$ (Ctrl) (Figura 11 a). En plantas WT de 30 días infiltradas con *P. syringae* tanto vir como avr se detectó una inducción de la expresión de VLG dependiente de la concentración del inóculo (Figura 11 b). La mayor inducción ocurrió con 1×10^6 unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), superando en promedio las 100 veces, mientras que con 1×10^5 la inducción fue en promedio de 10 veces con respecto al control con $MgCl_2$ (Ctrl) (Figura 11 b). Para estos experimentos se analizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas, se calcularon los promedios y las desviaciones estándar.

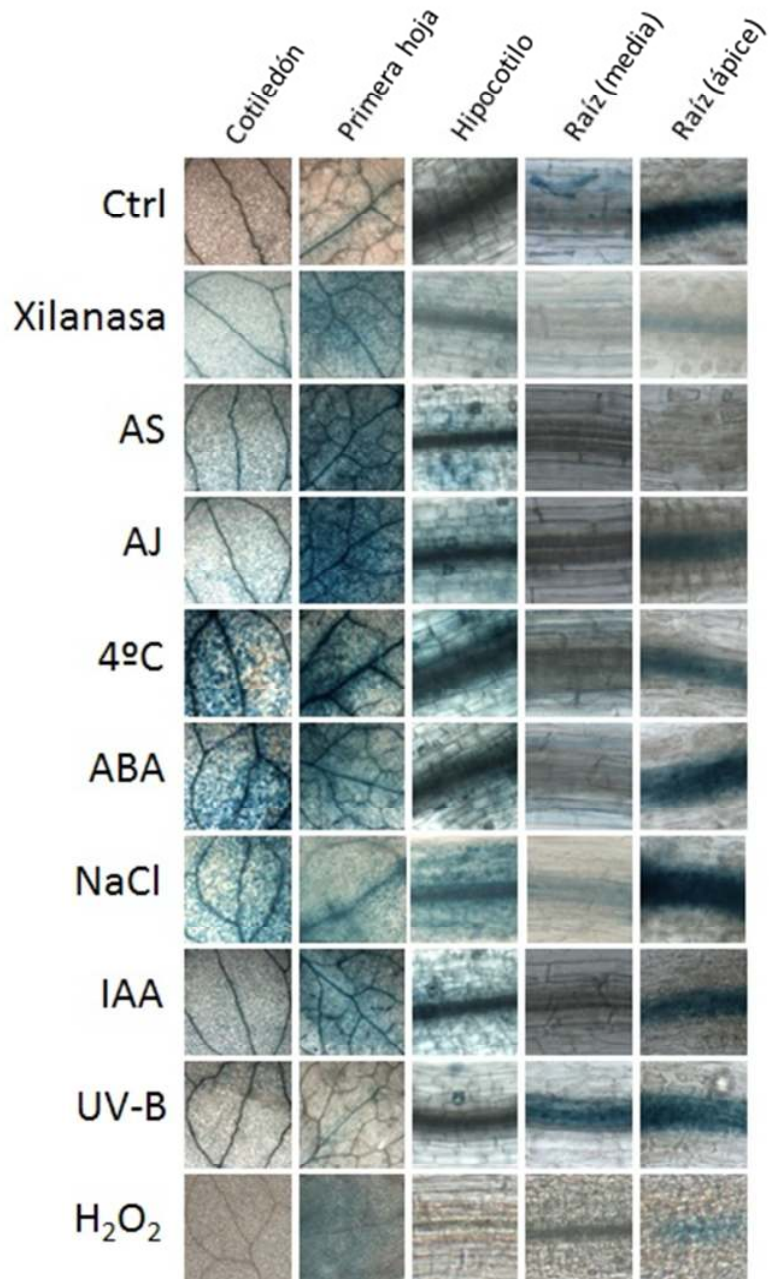


Figura 9. Actividad del promotor de VLG frente a distintos tratamientos químicos, estrés y tratamientos hormonales.

Plántulas transgénicas pVLG:GUS de 10 días se expusieron durante 2 horas a distintos estreses (200 µg/ml xilanasa, 1,2 W/m² radiación UV-B, 4°C de temperatura, 5 mM de H₂O₂ o 100 mM de NaCl) y a tratamientos con hormonas que regulan la respuesta a tales estreses (100 mM AS 100 µg de AJ 1 µM ABA u 80 nM de IAA).

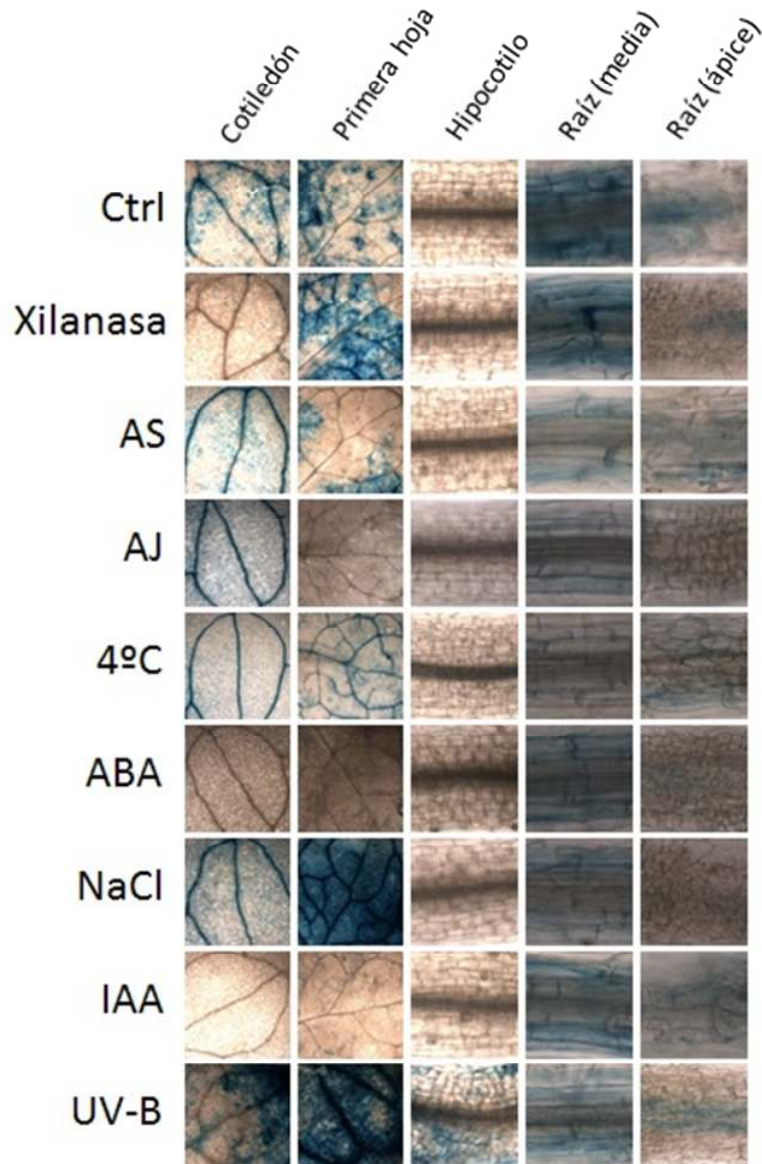


Figura 10. Actividad del promotor de *BNP* frente a distintos estreses y tratamientos hormonales.

Plántulas transgénicas pBNP:GUS de 10 días se expusieron durante 2 horas a distintos estreses (200 $\mu\text{g/ml}$ xilanasa, 1,2 W/m^2 radiación UV-B, 4°C de temperatura o 100 mM de NaCl) y a tratamientos con hormonas que regulan la respuesta a tales estreses (100 mM AS 100 μg de AJ 1 μM ABA u 80 nM de IAA). Se muestran imágenes representativas de microscopía DIC para cada órgano.

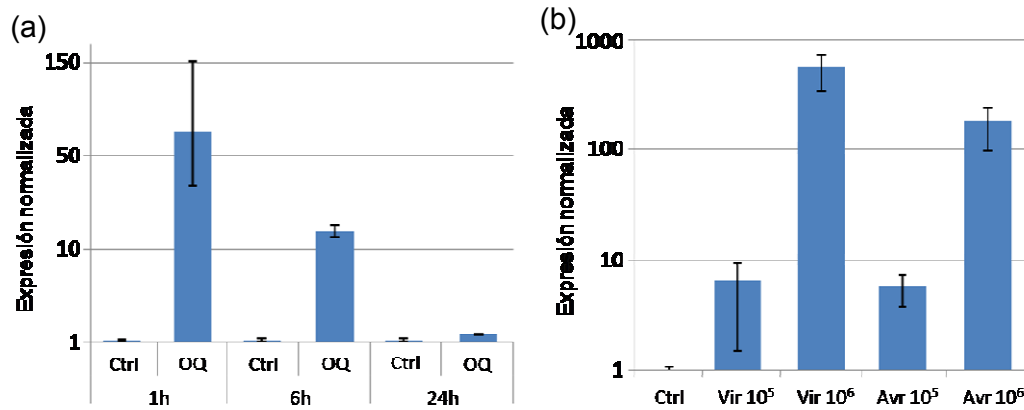


Figura 11. Expresión normalizada de VLG frente a tratamientos con oligoquitosano e infiltraciones con *P. syringae*.

(a) Plantas WT de 20 días 16:8 L/O se asperjaron con 50 mg/ml de oligoquitosano o agua y se midieron los transcritos de VLG por q-PCR a 1, 6 y 24 hs.

(b) Plantas WT de 30 días 12:12 L/O se infiltraron con dos concentraciones de *P. syringae* vir o Avr y se midieron los transcritos por q-PCR a las 2 hs.

En ambos casos se utilizaron 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas y se utilizó el gen de ubiquitina *UBQ5* como control endógeno de la cantidad de transcritos. Se muestran los promedios y los desvíos estándar de los valores normalizados a la expresión basal de VLG.

VLG y BNP se expresan en el tejido vascular y en células en elongación de hojas y raíces de plántulas jóvenes

Para conocer el patrón espacial de la expresión de los genes *VLG* y *BNP* durante el desarrollo esporofítico, se utilizó el sistema reportero promotor-GUS en las líneas de plantas transgénicas pVLG:GUS y pBNP:GUS. La actividad de ambos promotores coincide con la ubicación del sistema vascular tanto en cotiledones, hojas y raíces (Figura 12 b, d, f, g, l). También ambos se expresan a partir de la zona de elongación de la raíz (Figura 12 f, l). El promotor de *BNP* se expresa en las zonas de elongación de las hojas nuevas, excluyendo la zona de proliferación celular (Figura 12 h, i). Curiosamente, *BNP* se expresa en hidátodos y estípulas los cuales, siendo ambos llamativamente, sitios de biosíntesis de auxinas (Wang *et al.*, 2011) (Figura 12 i, j). *VLG* también se expresa en estomas (Figura 12 c) y unas pocas células de la

columela, típicamente asociadas a la respuesta gravitrópica (Blancaflor *et al.*, 1998) (inserto incluido en Figura 8 f).

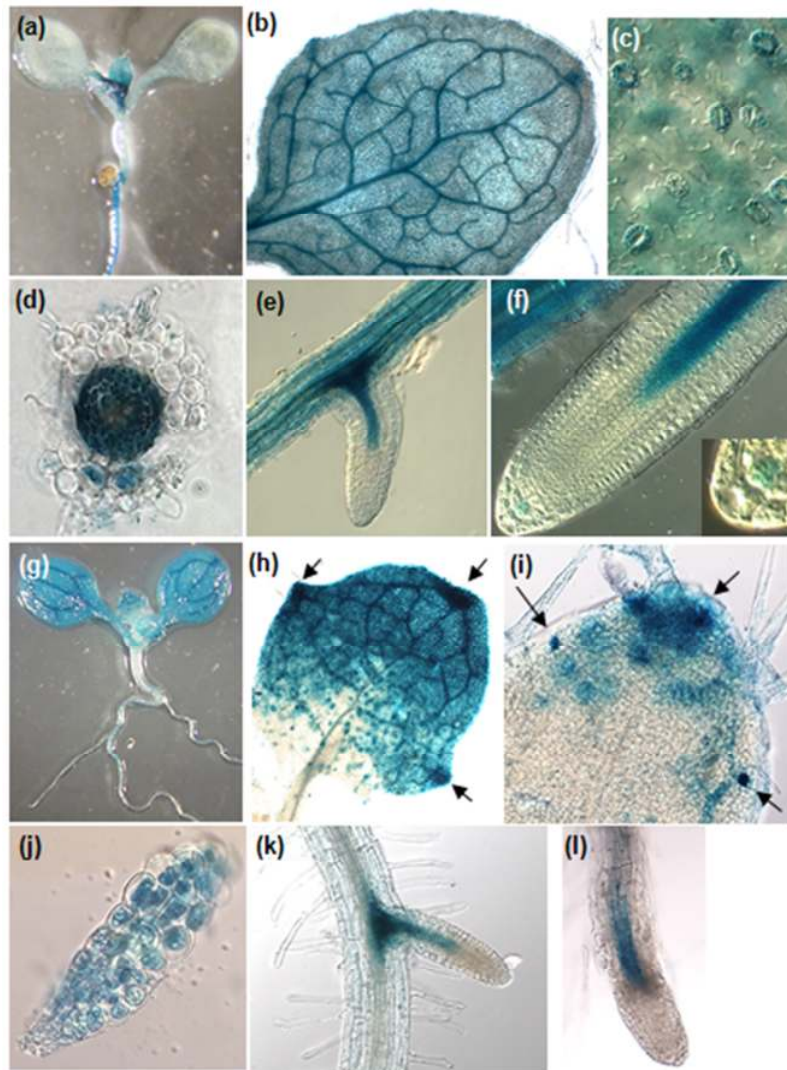


Figura 12. Perfil de expresión de los promotores de los genes *VLG* y *BNP* en plantas transgénicas pVLG:GUS y pBNP:GUS

(a) – (f) Actividad del promotor del gen *VLG* en plantas pVLG:GUS. La expresión se detecta mayormente en hojas jóvenes y raíces (a) coincidentemente con el patrón del sistema vascular (b) y (d), en estomas (c), sitios de iniciación de raíces laterales (e), a partir de la zona de elongación de la raíz (f) y en células de la columela (inserto en f).

(g) – (l) Actividad del promotor del gen *BNP* en plantas pBNP:GUS. La expresión se detecta mayormente en cotiledones (g), zona de elongación de hojas y raíces (h) y (l), hidátodos (i), estípulas (j) y zona de iniciación de raíces laterales (k). Las flechas indican la posición de los hidátodos.

Capítulo 2

Función de la proteína VLG en las gametogénesis

***vlg* es una mutación gametofítica**

Con el objetivo de elucidar la función de la proteína VLG se estudiaron dos líneas mutantes de *A. thaliana* con inserciones de T-DNA localizadas en la región promotora (*SAIL_507_F09*, llamada aquí *vlg-1*) y en el único exón (*GK-793C12*, llamada aquí *vlg-2*) del gen (Figura 13g). Luego de realizar retrocruzas con Col-0 WT, se analizó el genotipo de la progenie de las plantas auto-polinizadas, y no se recuperó ninguna planta homocigota, tanto de *vlg-1/VLG* como de *vlg-2/VLG*.

La relación de plantas hemicigotas a WT fue 0,139 para *vlg-1/VLG* (n = 270) y 0,264 para *vlg-2/VLG* (n = 129). La proporción de mutantes de inserción obtenidas en la progenie de las plantas *vlg/VLG* auto-polinizadas fue menor a la proporción mendeliana 3:1 esperada para mutantes esporofíticas o mutantes de letalidad de embrión (2:1), sugiriendo un defecto gametofítico. La única diferencia visible observada entre WT y las plantas mutantes hemicigotas fue el tamaño de las silicuas. Las silicuas de las plantas mutantes hemicigotas son más cortas que las WT (9,65 +- 0,53 mm para *VLG/vlg-1* y 10,45 +- 0,55 mm para *VLG/vlg-2*, comparadas con 14,15 +- 0,41 mm en plantas WT). Ningún otro fenotipo esporofítico se observó en las plantas hemicigotas sugiriendo que *vlg* es una mutación recesiva. Cuando se analizaron las silicuas de plantas *vlg/VLG*, cerca de la mitad de las semillas lucían abortadas [45,5% para *vlg-1/VLG* (n = 1045) y 41,3% para *vlg-2/VLG* (n = 563); Figura 13], lo cual sugiere que *VLG* es un gen requerido para la gametogénesis y/o el desarrollo de la semilla.

Para evaluar el rol de *VLG* en el desarrollo gametofítico se realizaron cruces recíprocos entre las líneas de inserción *vlg-1* y *vlg-2* y plantas WT, y se calculó la

eficiencia de transmisión (TE = progenie mutante/WT x 100, donde TE es el porcentaje de gametofitos que llevan el alelo mutante y que exitosamente transmite la mutación; Tabla 2). Sólo el 11,7% de los megagametofitos que llevan *vlg-1* y 56,46.1% de los megagametofitos que llevan *vlg-2* pudieron transmitir la inserción a la siguiente generación. La proporción obtenida es significativamente diferente de la proporción 1:1 esperada para una mutación que no afecta a la transmisión (P < 0,0001, prueba de chi-cuadrado), indicando que *vlg* afecta el desarrollo o la función del gametofito femenino. La TE a través del polen fue de 8,04% para *vlg-1* y 49,5% para *vlg-2* (Tabla 2), significativamente diferente de la relación 1:1 (P < 0,0001, prueba de chi-cuadrado). Por lo tanto, ambos gametofitos están comprometidos por la mutación en *VLG*.

Tabla 2. Eficiencia de transmisión de los alelos *vlg-1* y *vlg-2* en cruces recíprocos entre plantas mutantes y WT.

		Genotipo de la progenie ^a			Eficiencia de transmisión	valor-P ^b
		(N° de individuos)				
Femenino	Masculino	<i>VLG/VLG</i>	<i>vlg-1/VLG</i>	gameta <i>vlg-1</i>		
<i>vlg-1/VLG</i>	<i>VLG/VLG</i>	128	15	♀ 11.72 %		<0.0001
<i>VLG/VLG</i>	<i>vlg-1/VLG</i>	112	9	♂ 8.04 %		
		<i>VLG/VLG</i>	<i>vlg-2/VLG</i>	gameta <i>vlg-2</i>		
<i>vlg-2/VLG</i>	<i>VLG/VLG</i>	147	83	♀ 56,46 %		<0.0001
<i>VLG/VLG</i>	<i>vlg-2/VLG</i>	101	50	♂ 49,50 %		

^aNo se detectaron individuos homocigotas

^bPrueba de Chi-cuadrado para una hipótesis de segregación 1:1

Para confirmar que las mutaciones en *VLG* son las responsables de los defectos observados, se realizaron ensayos de complementación de plantas *vlg-1/VLG* y *vlg-2/VLG* usando una construcción que contiene el fragmento de cDNA entero de *VLG* bajo su propio promotor (*pVLG-VLG-GFP*).

Se analizaron las silicuas de plantas de la tercera generación (T3) que eran hemocigotas para el alelo *vlg* y homocigotas para el transgen. Se obtuvieron cinco líneas para cada uno de los alelos y en todos los casos, las silicuas mostraron números de semillas similares a las plantas WT (Figura 13a, e, f).

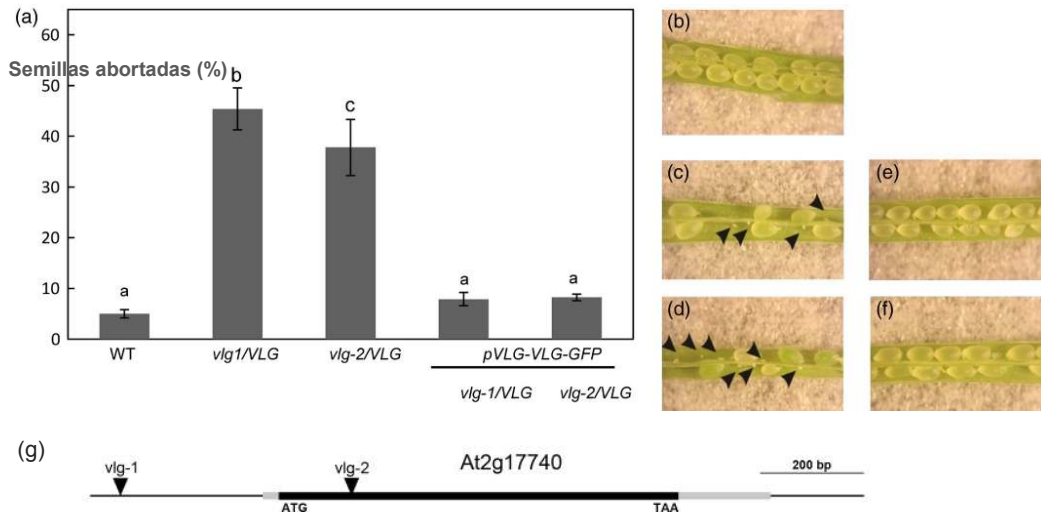


Figura 13. Plantas mutantes *vlg/VLG* producen menor cantidad de semillas.

(a) Porcentaje de semillas abortadas en silicuas de plantas salvajes (WT), *vlg-1/VLG*, *vlg-2/VLG* y complementadas *vlg-1/VLG* y *vlg-2/VLG*. Las barras corresponden a las medias con su desviación estándar. Las silicuas se analizaron en cinco experimentos independientes (media de 28 silicuas; rango 23–32). Las diferentes letras denotan diferencia significativa (ANOVA de una sola vía, $P < 0,05$)

(b) Silicua disecadas de una planta WT mostrando semillas viables.

(c) Silicua *vlg-1/VLG* en un estadio comparable. Los óvulos abortados se indican por puntas de flecha.

(d) Silicua *vlg-2/VLG* en un estadio comparable. Los óvulos abortados se indican por puntas de flecha.

(e) Silicua de una planta *vlg-1/VLG* complementada (*vlg-1/VLG ProVLG-VLG-GFP*) en un estadio comparable. Los óvulos abortados se indican por puntas de flecha.

(f) Silicua de una planta *vlg-2/VLG* complementada (*vlg-2/VLG ProVLG-VLG-GFP*) en un estadio comparable. Los óvulos abortados se indican por puntas de flecha.

(g) Mapa de las inserciones de T-DNA en las mutantes *vlg-1* y *vlg-2* en el locus *At2g17740*.

El desarrollo del polen en las plantas mutantes *vlg* se detiene antes de la mitosis I

Para interpretar la deficiencia en la transmisión a través del gametofito masculino, se analizó la viabilidad de los granos de polen usando la tinción de Alexander, la cual tiñe de rojo los granos de polen con citoplasma viable. Se detectó que alrededor del 44% (n = 1135) de polen era no viable en las anteras maduras de plantas *vlg-1/VLG* (Figura 14 c-e), y un 29,9% de polen no viable en *vlg-2/VLG* (n = 1944) (Figura 14 o-q). En las plantas *vlg-1/VLG* y *vlg-2/VLG* complementadas con la construcción *pVLG-VLG-GFP* en homocigosis, la viabilidad alcanzó valores similares a las plantas WT, resultando en 1,3% y 2%, respectivamente de polen abortado, (Figura 15). Para entender de qué manera la mutación *vlg* afecta a la viabilidad del polen, se analizó el desarrollo del polen en WT y plantas hemicigotas para la inserción mediante tinción con DAPI en granos de polen de flores en distintos estadios de desarrollo. Se analizaron flores de la misma inflorescencia. El estadio +1 corresponde a la flor en antesis, y cada número negativo correlativo corresponde a la flor inmediatamente debajo, tal como fue descrito por Durbarry *et al.*, (2005). Desde el estadio -9 al -7, el polen presente en las anteras de plantas WT tiene mayoritariamente un núcleo, del estadio -6 a -3 dos núcleos, y del estadio -2 a +1 tres núcleos. Cuando se analizaron plantas *vlg-1/VLG* no se encontraron diferencias del estadio -9 al -7, en donde la mayoría de los granos de polen son uni-nucleados. Sin embargo, desde el estadio -6 al +1 el arresto del desarrollo fue evidente, observándose una fracción del polen *vlg-1/VLG* con un solo núcleo (Figura 14). Mientras que el 99% del polen presente en flores WT en el estadio -5 presenta núcleos (n = 561), en plantas *vlg-1/VLG* el 43% de los granos de polen en desarrollo se encontraron en el estadio uni-nucleado (n = 1243) (Figura 14 f-h). Un resultado similar se obtuvo para las plantas *vlg-2/VLG*, en donde el 39.8% de los granos de polen en desarrollo también fue encontrado en el estadio uni-nucleado (n =

1941), mientras que el resto de los granos de polen mostró dos núcleos (Figura 14 r-u). Adicionalmente, esas microsporas no estaban polarizadas ni estaba presente la gran vacuola característica de ese estadio de desarrollo (Twell *et al.*, 1998). Para confirmar esa observación se realizaron tinciones con rojo neutro, las cuales revelaron que mientras que las microsporas WT contenían una vacuola grande con un núcleo periférico (Figura 14 i), las microsporas mutantes sólo contenían vacuolas pequeñas distribuidas en todo el citoplasma (Figura 14 g), sin detectarse una vacuola grande central. Estos resultados sugieren que la mutación de *v/g* impide la formación de la vacuola grande y madura característica de la microspora WT, lo cual podría resultar en algún tipo de arresto morfológico y funcional durante el desarrollo.

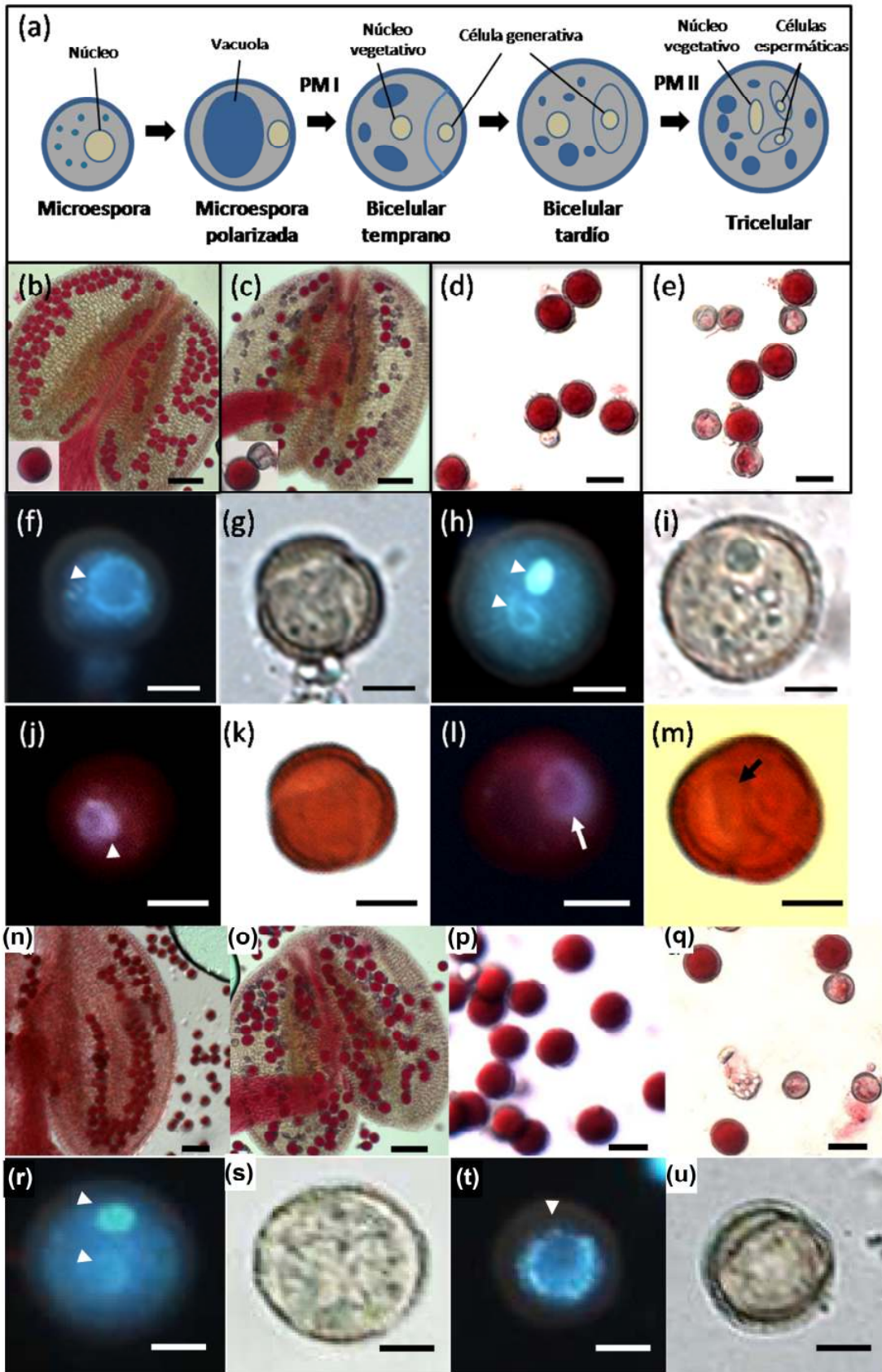


Figura 14. El desarrollo del polen es afectado por la mutación *vlg-1*.

(a) Modelo de la constitución nuclear de granos de polen WT a lo largo de la microgametogénesis. PMI: polen mitosis I; PMII: polen mitosis II.

(b) y **(c)** Viabilidad del polen según la tinción de Alexander en anteras de plantas WT y *vlg-1* respectivamente. Recuadro: detalle de grano de polen aislado.

(d) y **(e)** Tinción de Alexander de granos de polen de flores en estadio -5 de plantas WT y *vlg-1* respectivamente.

(f) y **(h)** Constitución nuclear por tinción de DAPI de granos de polen de flores en estadio -5 de plantas salvajes y *vlg-1* respectivamente. Los núcleos están indicados por puntas de flecha.

(g) e **(i)** Imágenes de campo claro correspondientes a **(f)** y **(h)** respectivamente.

(j) y **(l)** Tinción de DAPI del núcleo central (punta de flecha) y polarizado (flecha) respectivamente en microesporas de flores en estadio -9 de plantas *vlg-1*.

(k) y **(m)** Imágenes de campo claro correspondientes a **(j)** y **(l)** respectivamente, mostrando la gran vacuola central por tinción de rojo neutro (flecha negra).

(n) y **(o)** Viabilidad del polen según la tinción de Alexander en anteras de plantas salvajes y *vlg-2* respectivamente.

(p) y **(q)** Tinción de Alexander de granos de polen de flores en estadio -5 de plantas salvajes y *vlg-2* respectivamente.

(r) y **(t)** Constitución nuclear por tinción de DAPI de granos de polen de flores en estadio -5 de plantas salvajes y *vlg-2* respectivamente. Los núcleos están indicados por puntas de flecha.

(s) y **(u)** Imágenes de campo claro correspondientes a **(r)** y **(t)** respectivamente.

Barras = 100 μm en **(b)**, **(c)**, **(n)** y **(o)**, 25 μm en **(d)**, **(e)**, **(p)** y **(q)**, y 10 μm en **(f)** a **(m)** y **(r)** a **(u)**.

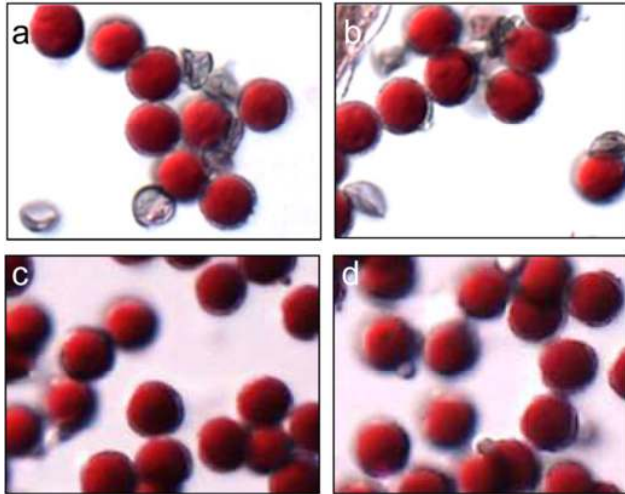


Figura 15. La viabilidad del polen de plantas *vlg/VLG* complementadas es similar a la de plantas WT según la tinción de Alexander.

(a) Polen de plantas *vlg-1/VLG* en antesis.

(b) Polen de plantas *vlg-2/VLG* en antesis.

(c) Polen de plantas *vlg-1/VLG* complementadas con *proVLG::VLG-GFP*

(d) Polen de plantas *vlg-2/VLG* complementadas con *proVLG::VLG-GFP*

VLG es requerida para la gametogénesis femenina

Con el objetivo de conocer las bases del defecto de transmisión observado a través del gametofito femenino, se estudió el fenotipo de los sacos embrionarios en flores de plantas *vlg/VLG* mediante microscopía DIC.

Se colectaron óvulos de plantas WT y *vlg/VLG*. Se eligieron los pistilos de un tamaño entre 1.5 y 2 mm, donde los gametofitos WT están en el estadio FG5 (Cigliano *et al.*, 2013), dado que más tarde los sacos embrionarios mutantes se encontraron colapsados. En dichos pistilos, el 89% de los sacos embrionarios se encontraron en el estadio FG5, mientras que el 8.5% estaba todavía en FG4 y el 2.5% lucía colapsado (n = 334). En cambio, alrededor del 45% de los sacos embrionarios presentes en pistilos *vlg/VLG* se encontraron detenidos en los primeros estadios de desarrollo (FG1 o FG2). En el caso de sacos embrionarios de pistilos *vlg-1/VLG*, 36.5% se encontraron en

FG1, 9.2% en FG2, 1.2% colapsado y 53.1% se encontró en el estadio FG5 (n = 229; Figura 16). Para *vlg-2/VLG*, 32.7% se encontró en estadios FG1, 8.8% en FG2, 1.3% colapsado y 57.2% en FG5 (n = 305). Ningún gametofito femenino se encontró en estadio FG3, en el cual la vacuola grande se forma entre los dos núcleos, sugiriendo que dicho estadio FG3 es clave y está afectado en las plantas mutantes. Dado que la proporción de sacos embrionarios aberrantes detectados en *vlg-2/VLG* fue ligeramente superior a lo esperado (43% versus 32% esperada de la TE calculada en la Tabla 2), es probable que algunos de los gametofitos femeninos encontrados en estadios FG1-FG2, aunque severamente retrasados, puedan completar el programa de desarrollo. Teniendo en cuenta los resultados de la caracterización fenotípica de las mutantes estudiadas, podemos decir que las plantas que llevan la mutación *vlg* mostraron defectos severos en ambas gametogénesis; la formación de la vacuola central, que es característica de ambos procesos, no fue observada, lo que sugiere que VLG podría estar involucrada en este proceso.

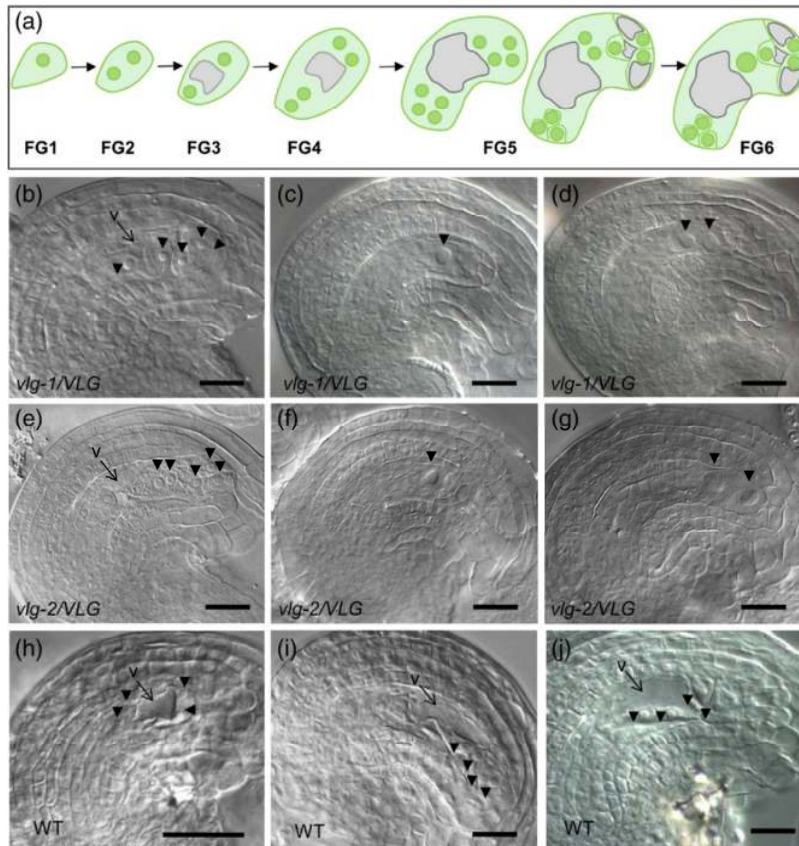


Figura 16. La gametogénesis femenina se ve afectada por la mutación *vlg*.

(a) Esquema de la gametogénesis femenina.

(b) Saco embrionario en estadio FG5 de una planta *vlg-1/VLG*. Los núcleos están indicados con puntas de flecha, y la vacuola grande (V) con una flecha.

(c) Saco embrionario arrestado en estadio FG1, con sólo un núcleo visible, en una planta *vlg-1/VLG*.

(d) Saco embrionario arrestado en estadio FG2, con dos núcleos visible, en una planta *vlg-1/VLG*. No se observa vacuola central.

(e) Saco embrionario en estadio FG5 de una planta *vlg-2/VLG*.

(f) Saco embrionario arrestado en estadio FG1, con sólo un núcleo visible, en una planta *vlg-2/VLG*.

(g) Saco embrionario arrestado en estadio FG2, con dos núcleos visibles, en una planta *vlg-2/VLG*. No se observa vacuola central.

(h) Saco embrionario en estadio FG4 WT.

(i) Saco embrionario en estadio FG5 WT.

(j) Saco embrionario en estadio FG6 WT.

V: vacuola. Las puntas de flecha indican los núcleos visibles en el plano focal. Barras = 25 μ m.

Si bien las inserciones en *VLG* comprometen severamente el desarrollo de ambos gametofitos, la transmisión de la mutación no fue cero (Tabla 2), indicando que debería ser posible detectar plantas mutantes homocigotas en la progenie resultante de la autofecundación de las plantas hemicigotas. Sin embargo esto no fue posible, por lo que investigamos si la embriogénesis podría estar también afectada por la mutación. Para ello se analizaron pistilos de plantas *vlg-2/VLG* (pues este alelo mostró las mayores tasas de transmisión) a las 72 hs luego de la polinización manual con polen de una planta *vlg-2/VLG*. Entre los 174 óvulos analizados, 93 (53.4%) se encontraron en estadio globular temprano, 68 (39.1%) se encontraron arrestados en estadios tempranos de gametogénesis y colapsando y 11 (6.3%) se encontraron arrestados en el estadio cigótico. Dichos resultados sugieren que una fracción de las semillas abortadas detectadas en las silicuas podrían corresponder a letalidad embrional. Adicionalmente, no podemos descartar que exista letalidad post-embriónica de la plántula, que junto con los defectos gametofíticos y la letalidad de embriones observada explicarían la ausencia de plantas mutantes homocigotas en la progenie de las plantas hemicigotas auto-polinizadas.

VLG se localiza en LPVCs en ambos gametofitos, femenino y masculino.

Con el objetivo de conocer la localización de la proteína *VLG* durante la mega y microgametogénesis, plantas transgénicas *VLG-GFP* que expresan la construcción *promVLG:VLG-GFP* se analizaron por microscopía confocal. Esta construcción es totalmente funcional, pues pudo complementar el fenotipo observado en plantas *vlg/VLG* (Figura 14).

En óvulos, la proteína reportera VLG-GFP se detectó tanto en la nucela y en el interior del saco embrionario en desarrollo, detectándose la señal en estructuras puntuadas discretas (Figura 17). Dicho patrón se observó desde el estadio FG1 al FG6 (Figura 17a-d) en todas las células del saco embrionario. Luego de la fertilización también se detectó señal en el cigoto y en el endosperma en desarrollo (Figura 17e). Cuarenta y ocho horas después de la polinización la señal de fluorescencia fue más débil y a las 72 hs la misma fue indetectable, sugiriendo que VLG podría ser requerida tempranamente durante la embriogénesis. En granos de polen, la fluorescencia asociada a GFP se detectó en la microspora polarizada y en el estadio bicelular temprano, en el cual está concentrada cerca de la pared del grano de polen en desarrollo (Figura 17h-i). En el estadio bicelular tardío la señal fue menor en la periferia y la proteína se detectó hacia el centro del grano de polen, siguiendo el mismo patrón puntuado observado en el saco embrionario (Figura 17j). En el estadio tricelular la proteína se detectó nuevamente en estructuras puntuadas esparcidas en el grano de polen (Figura 17k). Un patrón semejante se identificó durante la germinación de granos de polen (Figura 17l).

Para definir la naturaleza del patrón puntuado previamente observado se analizó el tráfico endocítico mediante el uso del colorante lipofílico FM4-64. Por su naturaleza transparente, se analizaron raíces de plantas que expresan la fusión proteica VLG-GFP. Luego de la internalización, este colorante pasa a través de los compartimentos endosomales en su vía al tonoplasto (Dettmer *et al.*, 2006; Chow *et al.*, 2008). El TGN y los MVBs también se tiñen secuencialmente y por esa razón, se definen como endosomas tempranos o tardíos respectivamente (Dettmer *et al.*, 2006; Chow *et al.*, 2008). Luego de 30 minutos, se detectó FM4-64 en la membrana e internalizado en compartimentos endosomales. Sin embargo, no se detectó co-localización con VLG.

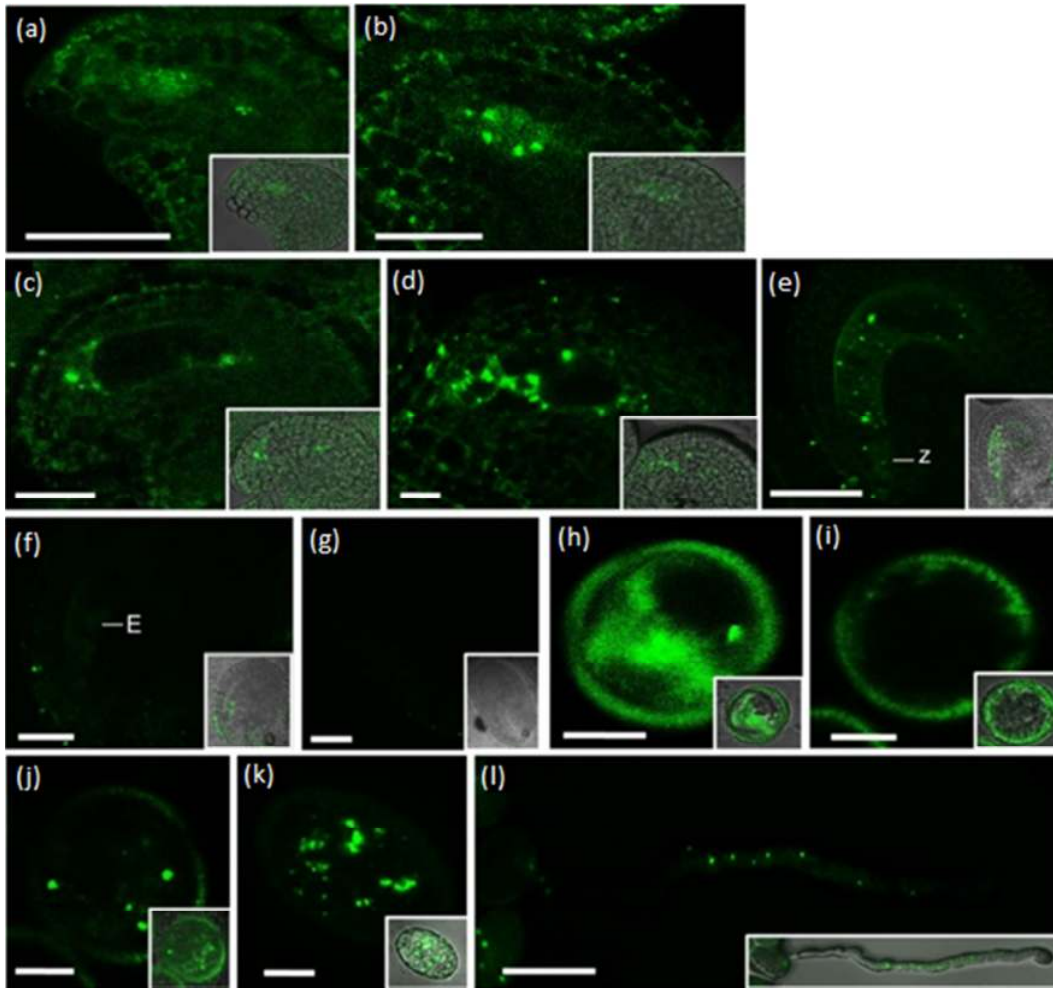


Figura 17. Localización de VLG-GFP en los gametofitos masculino y femenino.

(a)(d) Imágenes confocales de la localización de VLG-GFP en el gametofito femenino en los estadios FG1 (a), FG2 (b), FG4 (c) y FG6 (d).

(e) a (g) Imágenes confocales de la localización de VLG-GFP en el saco embrionario 24 hs después de la polinización (e), 48 hs después (f), y 72 hs después (g). Z: cigoto, E: embrión.

(h) a (k) Imágenes confocales de la localización de VLG-GFP en el gametofito masculino en la microespora (h), microespora polarizada (i), estadio bicelular (j) y tricelular (k).

(l) Localización de VLG-GFP en tubo polínico..

Los recuadros muestran en (g) a (r) muestran superposiciones del campo claro y la señal de GFP. Se utilizaron cuatro líneas transgénicas independientes. Las imágenes son representativas de los resultados obtenidos en todas las líneas analizadas.

Barras = 25 μ m en (g) a (j), 50 μ m en (k) a (m), 5 μ m en (n) a (q) y 25 μ m en (r).

Luego de 4 hs de incubación con FM4-64 el colorante definió pequeños compartimentos rodeando el tonoplasto en las cuales se localiza VLG (Figura 18). La localización y estructura de dichos compartimentos indicó que VLG podría localizarse

en compartimentos endosomales PVCs o MVBs. Para confirmar esta localización se estudió la co-localización de VLG con la proteína Rha1 la cual es homólogo de Rab5 de plantas y se utiliza generalmente como marcador de compartimentos prevacuolares tardíos LPVC (Foresti *et al.*, 2010). Para ello se utilizó un sistema de expresión transiente en *N. benthamiana*. Como se observa en la Figura 18 (e-g), VLG co-localiza con el marcador RFP-Rha1, confirmando su localización en LPVCs. Sin embargo, no se encontró co-localización con la proteína ST-RFP, la cual fue utilizada como marcadora de aparato de Golgi (Jin *et al.*, 2001; Speth *et al.*, 2009).

VLG interactúa con la proteína SNARE PVA 12y con la lipasa LTL1

Para profundizar el conocimiento sobre la función de VLG, se abordó un análisis de interacción proteína-proteína mediante la técnica Y2H, la cual permite identificar proteínas capaces de interactuar con VLG. Entre las proteínas interactoras putativas identificadas se identificaron clones que corresponden a proteínas con localización predicha asociada al núcleo y a diferentes organelas (Tabla 3). Tal es el caso de una proteína con dominio SAP localizada en el cloroplasto, un factor de terminación Rho identificado en el citosol y la proteína con dominio NAC número 73 (NAC073) localizada en el núcleo. Puesto que la localización de ambas no coincide con la localización subcelular de VLG, no se realizaron experimentos con esos clones. Por lo tanto, enfocamos nuestra atención en 2 clones cuya localización predicha coincide con la localización *in vivo* de la proteína VLG. Tal es el caso de PVA12, una proteína de membrana asociada a vesículas la cual es miembro de la familia VAP33, previamente descrita como capaz de unirse a esteroides (Saravanan *et al.*, 2009) y el de la proteína LTL1, una lipasa con motivo GDSL asociada con la resistencia a salinidad (Naranjo *et al.*, 2006).

Curiosamente, las proteínas que contienen el motivo GDSL han sido asociadas con el tonoplasto (Carter *et al.*, 2004) y las mutantes en *MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 (mvp1)*, que codifica para una lipasa/esterasa de motivo GDSL, muestra una morfología aberrante de la membrana vacuolar y de los cuerpos de Golgi (Agree *et al.*, 2010; Nakano *et al.*, 2012).

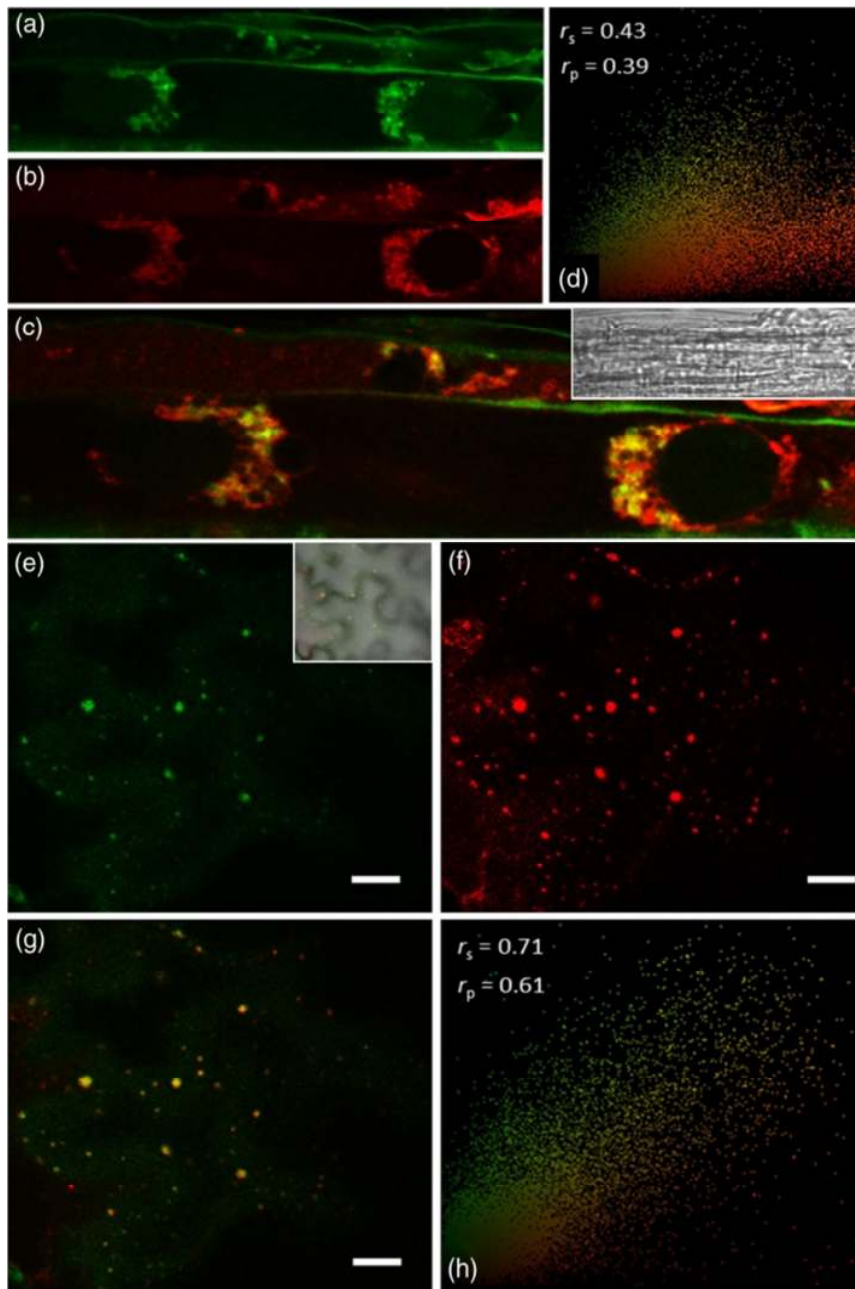


Figura 18. Localización subcelular de VLG-GFP en compartimentos prevacuolares.

(a) Localización de VLG-GFP en células de la raíz de *A. thaliana*.

- (b) Localización del colorante fluorescente FM4-64 en células teñidas por 10 min, lavadas e incubadas por 4 hs.
 - (c) Superposición de la señal de FM4-64 y VLG-GFP mostrando co-localización parcial alrededor del tonoplasto. Recuadro: imagen de campo claro.
 - (d) Test de correlación de Pearson y Spearman que confirma la co-localización de la señal. Se utilizó el complemento *PSC colocalization* para el programa ImageJ.
 - (e) Localización de VLG-GFP bajo el promotor 35S CaMV en células epidérmicas de *N. benthamiana* transformadas transientemente. Recuadro: imagen de campo claro.
 - (f) Localización del marcador fluorescente de compartimentos prevacuolares tardíos RFP-Rha1 expresado transientemente.
 - (g) Superposición de la señal de VLG-GFP y RFP-Rha1.
 - (h) Test de correlación de Pearson y Spearman que confirma la co-localización de la señal. Se utilizó el complemento *PSC colocalization* para el programa ImageJ.
- Barras = 10 μ m.

Para confirmar las interacciones proteína-proteína, VLG-PVA12 y VLG-LTL1 se llevaron a cabo ensayos de BiFC mediante expresión transiente en epidermis de hojas de *N. benthamiana*. Se fusionó VLG y cada uno de los genes candidatos al fragmento N- y C- terminal de la proteína amarilla fluorescente YFP para generar las construcciones de fusión VLG-N-YFP y PVA12-C-YFP o LTL1-C-YFP, respectivamente. Se transformaron las construcciones de fusión bajo el control del promotor CaMV 35S en hojas de *N. benthamiana* y se registró la señal de BiFC. YFP se expresó siguiendo un patrón puntuado (Figura 19), sugiriendo que la interacción tiene lugar en el sistema de endomembranas. Como control de la técnica se co-expresaron VLG-N-YFP con C-YFP sin fusionar o N-YFP sin fusionar, con PVA12-C-YFP o con LTL1-C-YFP, y no se observó señal de BiFC (Figura 19). Se realizó un control adicional para demostrar especificidad de interacción utilizando una proteína relacionada a VLG (la proteína con dominio DC1 codificada por *At2g44370* con 72.0% de identidad; Figura 19), la cual no mostró interacción con PVA12 ni con LTL1.

Tabla 3. Selección de clones obtenidos por Y2H usando BNP como carnada. PBS: puntaje biológico predicho; jerarquiza la confianza de la interacción de la A (muy alta) a la D (moderada)

Locus	Anotación	PBS	Largo de la región interactora	Localización
At2g45140	Proteína de plantas asociada a VAMP	D	239 (1-239)	Sistema de endomembranas, ER
At5g63460	Protína con dominio SAP	A	162 (1-162)	Núcleo, cloroplasto
At4g18740	Factor de terminación Rho	A	245 (1-245)	Citosol
At4g28500	Proteína 73 con dominio NAC	D	305 (20-305)	Núcleo
At3g0429	Proteína de superfamilia tipo GDSL LTL1	D	366 (1-366)	Secretada

Dado que las mutantes *vlg* mostraron defectos gametofíticos, se analizó si las proteínas interactoras de VLG, PVA12 y LTL1 eran también requeridos para la gametogénesis masculina o femenina. Las líneas mutantes de inserción por T-DNA (SALK_088746 para PVA12 y SALK_012570 para LTL1) fueron caracterizadas con dicho propósito. Para ambas líneas mutantes se identificaron plantas homocigotas sugiriendo que, cada uno de dichos genes no son esenciales en la gametogénesis. Las plantas mutantes homocigotas no mostraron ningún fenotipo obvio en el esporofito, y las silicuas tuvieron un rendimiento de semillas equivalente a las plantas WT (Figura 20). Dado que el crecimiento del tubo polínico depende de una morfología vacuolar normal se analizó también si la germinación o la elongación del tubo polínico se encontraba afectada (Steinhorst *et al.*, 2015). Sin embargo, no se detectaron defectos, sugiriendo que otras proteínas de la misma familia podrían funcionar de manera redundante con LTL1 y PVA12 (Figura 20). En relación a esta hipótesis

existen 2 proteínas pertenecientes a la familia de las esterasa/lipasa de motivo GDSL, codificadas por *At5g18430* y *At5g33370* con alrededor del 70% de identidad y con un 80% de similitud en su secuencia de aminoácidos con LTL1. Además, otras dos proteínas asociadas a vesículas – PVA11, codificada por *At3g60600*, y PVA13, codificada por *At4g00170* – comparten 81 y 56% de identidad y 90 y 72% de similitud, respectivamente con PVA12. También se expresan en polen y óvulos (datos no mostrados de <https://genevestigator.com/gv/>), sugiriendo que existe redundancia funcional entre PVA12 y sus homólogos gametofíticos.

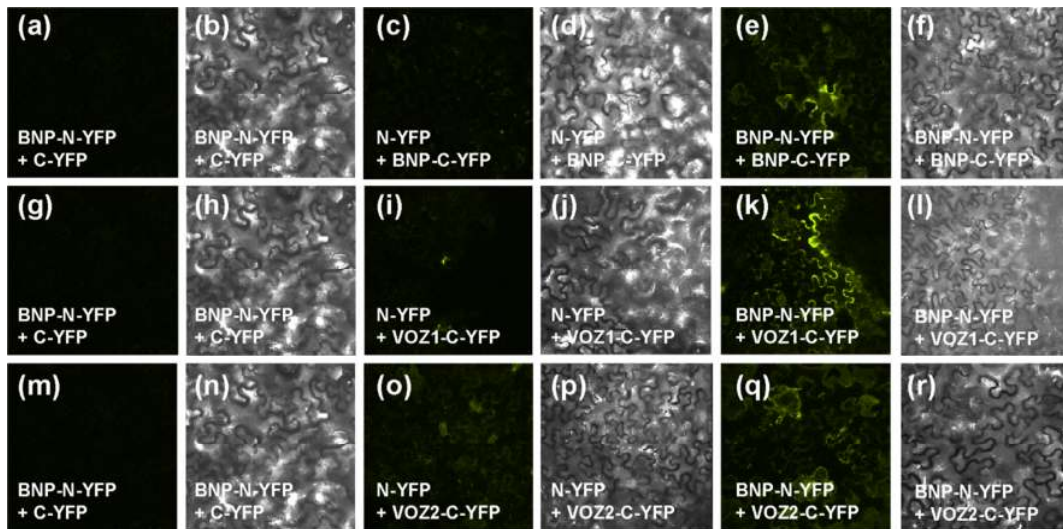


Figura 19. VLG interactúa con LTL1 y PVA12. Análisis de la interacción de VLG con PVA12 y LTL1 por BiFC en epidermis de *N. benthamiana*.

(a) a (f) Imágenes confocales representativas de la interacción de VLG y LTL1. Se muestra la fluorescencia reconstituida de YFP o imágenes de DIC en células epidérmicas de *N. benthamiana* co-infiltradas con *Agrobacterium* que porta las construcciones indicadas.

(g) a (l) Imágenes confocales representativas de la interacción de VLG y PVA12. Se muestra la fluorescencia reconstituida de YFP o imágenes de DIC en células epidérmicas de *N. benthamiana* co-infiltradas con *Agrobacterium* que porta las construcciones indicadas.

(m) a (r) Imágenes confocales representativas que muestran que PVA12 no interactúa con BNP, otra proteína con dominios DC1, confirmando su especificidad.

(s) a (x) Imágenes confocales representativas que muestran que LTL1 no interactúa con BNP, otra proteína con dominios DC1, confirmando su especificidad.

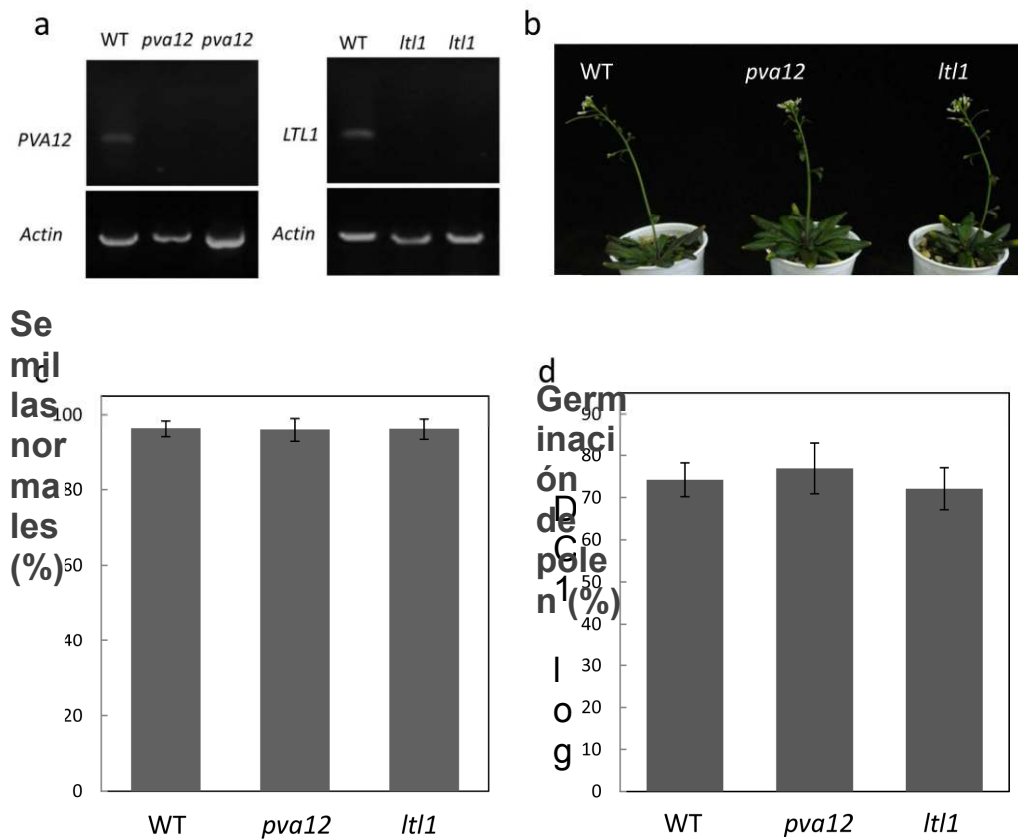


Figura 20. Caracterización de plantas homocigotas para *pva12* y *ltl1*.

(a) Análisis de RT-PCR de transcritos *pva12* y *ltl1* de inflorescencias provenientes de plantas mutantes homocigotas. Se utilizaron cebadores de actina como control endógeno.

(b) Aspecto de plantas de *A. thaliana* de 28 días después de la germinación.

(c) Análisis del contenido de semillas en silicuas maduras de plantas WT (n = 390), *pva12* (n = 670) y *ltl1* (n = 520). Los datos corresponden a las medias \pm el error estándar. No se encontraron diferencias significativas entre WT, *pva12* y *ltl1* (ANOVA de una vía)

(d) Porcentaje de germinación de polen de plantas WT, *pva12* y *ltl1*. Los datos corresponden a la media \pm el error estándar. No se encontraron diferencias significativas (ANOVA de una vía).

Capítulo 3

Función de la proteína BNP en la microgametogénesis

***bnp* es una mutación gametofítica**

Con el objetivo de conocer la función de la proteína con dominios DC1BNP, se estudiaron dos líneas de inserción por T-DNA (SALK_114889, llamada *bnp-1* y GK-008E01, llamada *bnp-2*) (Figura 21). Las plantas hemicigotas para la mutación se dejaron autopolinizar y la progenie se analizó genotípicamente. No se recuperaron plantas mutantes homocigotas, registrándose una relación de hemicigosis *bnp-1/BNP* a WT de 1.44 (n = 183). Para las plantas *bnp-2/BNP*, los análisis de segregación por resistencia a sulfadiazina mostraron una relación de plantas resistentes a sensibles equivalente a 1.31 (n = 2634). El análisis genotípico de las plantas resistentes determinó que tampoco se encontraron plantas *bnp-2* homocigotas. La proporción de plantas que portaban el transgen en la progenie de plantas autofecundadas fue menor a la relación esperada por segregación mendeliana para mutantes esporofíticas (3:1) o de letalidad de embrión (2:1), sugiriendo un defecto gametofítico.

Por otro parte, no se detectaron defectos esporofíticos evidentes, sugiriendo que *bnp* es una mutación recesiva. De manera similar a las plantas WT, las silicuas de plantas *bnp/BNP* presentaron en promedio un pequeño porcentaje de semillas abortadas (~1%). Como no se obtuvieron plantas homocigotas y las silicuas de plantas hemicigotas lucían normales, se hipotetizó que la mutación en *BNP* podría estar afectando el desarrollo, la germinación y/o la función del polen. En este último caso, sólo los tubos polínicos de gametofitos WT llegarían a fertilizar los óvulos en el pistilo, impidiendo la transmisión del alelo mutante a la siguiente generación. Para probar dicha hipótesis se realizaron cruces recíprocos entre plantas *bnp/BNP* y WT y se calcularon las eficiencias de transmisión ($TE = \text{resistentes}/WT * 100$) del alelo mutante

(Tabla 2 A). Aproximadamente, el 15,5 % de los microgametofitos que portaban la mutación *bnp-1* y el 22,0% de los microgametofitos con mutación en *bnp-2* transmitieron la inserción a la siguiente generación (prueba de Chi cuadrado, $p < 0,0001$), indicando que dicha mutación afecta la viabilidad o función del gametofito masculino (Tabla 2 A). Sin embargo, no se observaron defectos de transmisión a través del gametofito femenino (90,8 % y 95,8% para *bnp-1* y *bnp-2* respectivamente, Tabla 2 A, valores-p 0,51 y 0,66 respectivamente en la prueba de Chi-cuadrado).

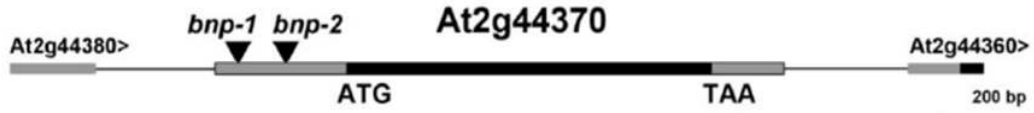


Figura 21. Mapa de las inserciones de T-DNA en el locus *At2g44370* para las mutantes *bnp-1* y *bnp-2*

Tabla 4. Eficiencia de transmisión de los alelos y viabilidad de la progenie en mutantes *bnp*.

(A) Eficiencia de transmisión de los alelos *bnp-1* y *bnp-2* en cruces recíprocos entre plantas mutantes y WT. El valor-p corresponde a la prueba de Chi-cuadrado.

(B) Porcentaje de germinación y letalidad de plántulas en la progenie de plantas *bnp-1/BNP*, *bnp-2/BNP* y WT autofecundadas. Entre paréntesis se indica el número de individuos analizados respecto al total. El valor-p corresponde a la prueba de Chi-cuadrado.

Genotipos parentales		Genotipo de la progenie			Eficiencia de transmisión	Valor-p
Femenino	Masculino	WT	<i>bnp-1/BNP</i>	<i>bnp-1</i>		
<i>bnp-1/BNP</i>	WT	98	89	♀ 90,8 %	0,51	
WT	<i>bnp-1/MNW</i>	181	28	♂ 15,5 %	< 0,0001	
Genotipos parentales		Genotipo de la progenie			Eficiencia de transmisión	Valor-p
Femenino	Masculino	WT	<i>bnp-2/BNP</i>	<i>bnp-2</i>		
<i>bnp-2/BNP</i>	WT	217	208	♀ 95,9 %	0,66	
WT	<i>bnp-2/MNW</i>	254	56	♂ 22 %	< 0,0001	

Genotipo parental	Viabilidad de la progenie (%)	Progenie inviable (%)		Valor-p
		No germinada	Letalidad de plántula	
WT	98,86 (435/440)	0,23 (1/440)	0,91 (4/440)	
<i>bnp-1/MNW</i>	94,83 (715/754)	1,72 (13/754)	3,45 (26/754)	< 0,001
<i>bnp-2/MNW</i>	93,32 (908/973)	2,15 (21/973)	4,52 (44/973)	< 0,00001

Si bien las inserciones en *BNP* comprometieron la transmisión de la mutación a través del gametofito masculino, una pequeña fracción de granos de polen pudo transmitir la inserción a la siguiente generación (15-20 %). No obstante, no se recuperaron plantas mutantes homocigotas en la progenie de plantas hemicigotas autofecundadas. De manera de determinar el origen de este resultado, se investigó si la embriogénesis o la germinación de las semillas eran afectadas por la mutación. Para ello, se analizaron pistilos y semillas de plantas *bnp/BNP*. No se observaron defectos obvios en las silicuas ni en el número de semillas respecto a las plantas WT. Sin embargo, las semillas de *bnp/BNP* autofecundadas mostraron menor tasa de germinación

comparadas con WT [94,8 % para *bnp-1/BNP* (n = 754), 93,3 % para *bnp-2/BNP* (n = 973) y 98,9 % para WT (n = 440)]. Adicionalmente, una proporción de plántulas detuvo su desarrollo justo después de la germinación, entre los estadios 0.7 y 1.0 según Boyes *et al.* (2001) y resultó inviable (Figura 22). Los valores de letalidad de plántulas obtenidos fueron 0,9 % para WT (n = 440), 3,5 % para *bnp-1/BNP* y 4,5% (n = 973) para *bnp-2/BNP* autopolinizadas (Tabla 2 B). El análisis genotípico de las plántulas con desarrollo atrasado mostró que el 75% (n = 12) correspondían a individuos *bnp/bnp*.

En conjunto, estos los resultados permiten sugerir que la mutación podría afectar la gametogénesis y/o la función del grano de polen y resultar en alteraciones en la germinación de semillas y letalidad de plántulas.

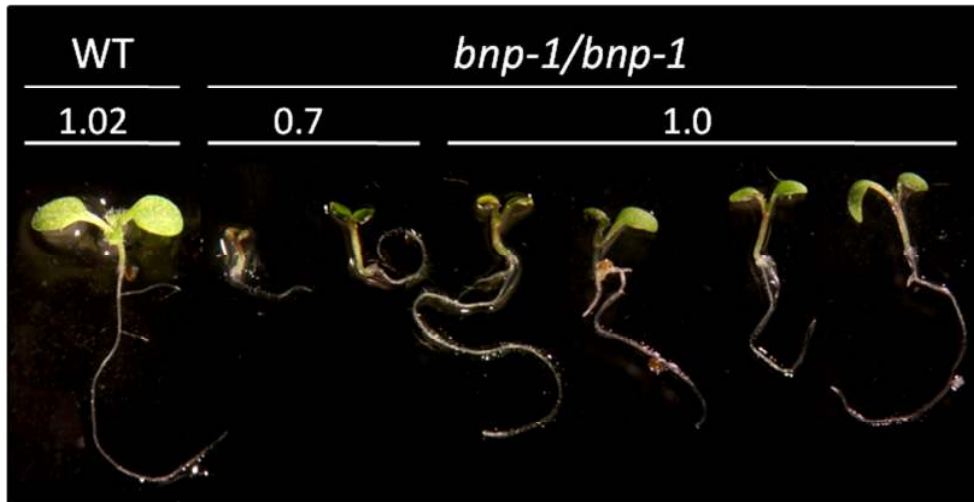


Figura 22. La mutación *bnp-1* en homocigosis causa un arresto en el desarrollo esporofítico temprano. Se sembraron semillas provenientes de plantas *bnp-1/BNP* y WT crecidas en medio nutricional agar MS y a los 6 días se colectaron las plántulas que lucían atrasadas respecto a las WT. Las plántulas *bnp-1* que se encontraron en estadio 0.7 (Boyes *et al.* 2001) no mostraron los cotiledones separados o abiertos; en el estadio 1.0 los cotiledones se abrieron pero no se observaron hojas verdaderas; las plantas WT, en el estadio 1.02, ya tenían primordios de hojas verdaderas.

El desarrollo de polen en mutantes *bnp* está detenido en el estadio bicelular de su desarrollo

Con el objetivo de conocer las causas de la menor eficiencia de transmisión del gametofito masculino se comenzó analizando la viabilidad de granos de polen maduros en las plantas *bnp-1* y *bnp-2*. La tinción de Alexander, la cual revela viabilidad, no mostró diferencias con respecto al polen de las plantas WT, indicando que la mutación *bnp* no afecta la viabilidad del polen (Figura 23).

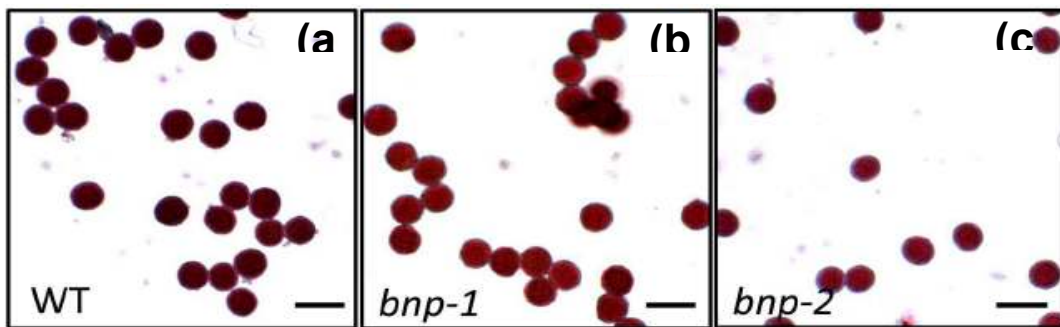


Figura 23. La viabilidad de los granos de polen de las plantas *bnp/BNP* es similar al de las plantas WT.

(a-c) Tinción de Alexander en granos de polen maduros de plantas WT (a), *bnp-1* (b) y *bnp-2* (c). No se observaron diferencias en la viabilidad del polen entre los genotipos analizados y las plantas WT.

A continuación, se analizó la composición nuclear de granos de polen maduros usando la tinción DAPI con el objetivo de detectar si el problema de transmisión radica en un número o posición incorrecta de los núcleos del polen.

Mientras que las anteras WT en antesis contuvieron un 99% de polen tricelular ($n = 772$), las anteras de *bnp/BNP* mostraron un valor mayor al 50% de granos de polen bicelulares [57 % en *bnp-1/BNP* ($n = 1113$) y 41 % en *bnp-2/BNP* ($n = 981$)], demostrando un arresto en su desarrollo.

Los ensayos de complementación genética confirmaron que la inserción en *BNP* causa el fenotipo de desarrollo esperado. Las plantas mutantes *bnp-1* hemicigotas transformadas con la construcción *ProBNP::BNP-GFP* mostraron cantidades similares de polen tricelular en anteras maduras que las plantas WT (Figura 24). Resultados similares se obtuvieron en 3 líneas complementadas independientes (generación T3). Con el objetivo de caracterizar el defecto observado durante el desarrollo polínico, se hicieron cruzamientos de plantas *bnp-1* con la mutante *qrt1*, deficiente en una pectin-metil esterasa responsable por la separación de las tétradas de microsporas (Francis *et al.*, 2006). Se utilizaron para los análisis plantas F2 con la inserción *BNP* en hemicigosis y homocigotas para *qrt1* (*bnp/BNP qrt1/qrt1*). Las tétradas maduras se colectaron y tiñeron con DAPI (Figura 24 b-e). Consistentemente con nuestros resultados previos, la mayoría de las tétradas *bnp-1/BNP qrt1/qrt1* mostraron un número anormal de núcleos (Figura 24 a), indicando nuevamente una falla en completar la segunda mitosis en aproximadamente, la mitad de los granos de polen analizados.

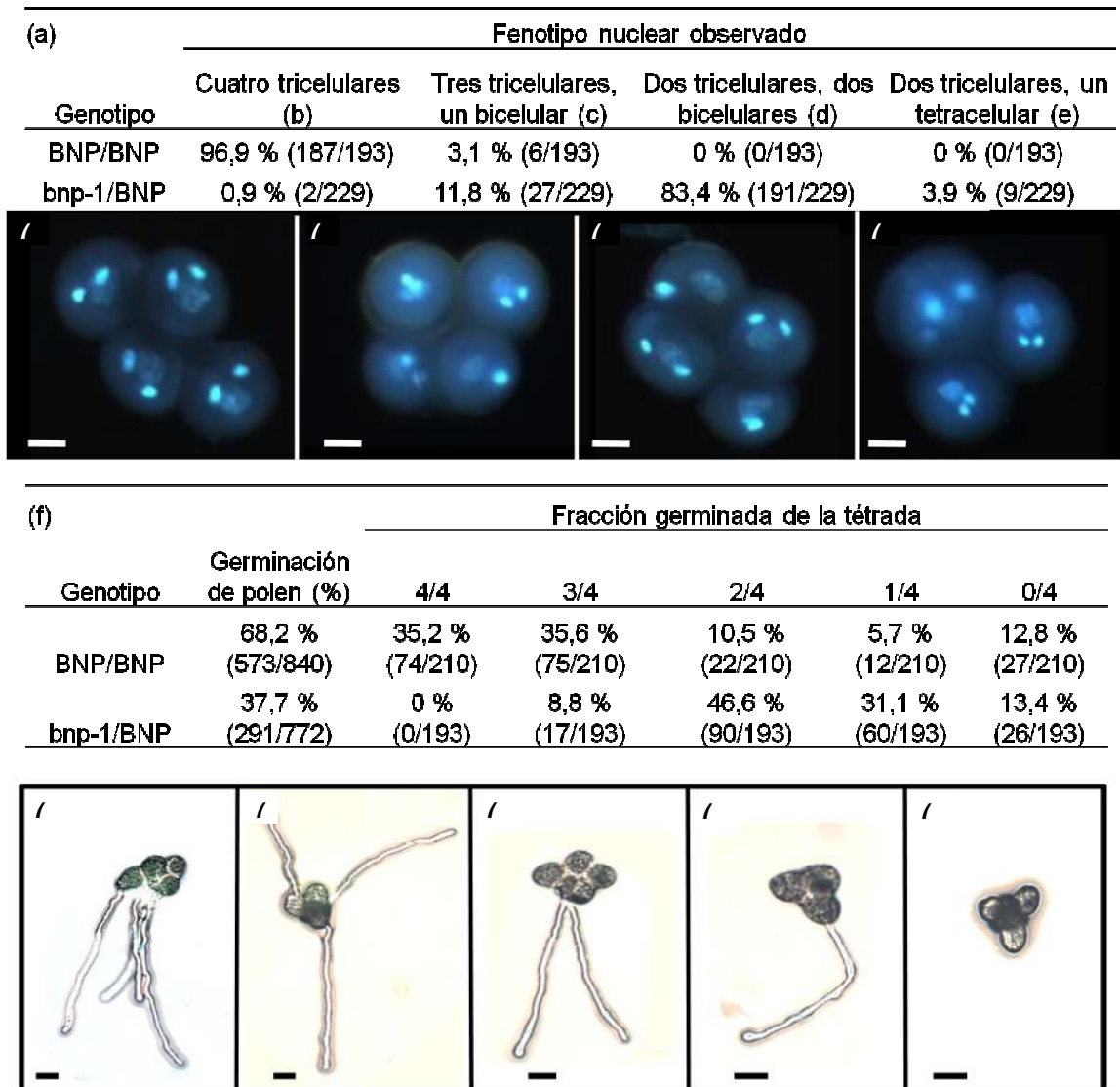


Figura 24. El desarrollo y la germinación del polen están afectados por la mutación *bnp-1*.

(a) Cuantificación de los fenotipos observados en plantas *BNP/BNP* y *bnp-1/BNP* en la base genética *qrt1/qrt1*.

(b-e) Configuración nuclear revelada por DAPI. Barras = 10 μ m.

(f) Cuantificación de la germinación de tétradas de polen en las plantas *BNP/BNP* y *bnp-1/BNP* en la base genética *qrt1/qrt1*.

(g-k) Fotos representativas de tétradas con distinta fracción de granos de polen germinados. Barras = 20 μ m

Aunque los granos de polen *bnp* portan un número anormal de núcleos, su viabilidad según la tinción de Alexander no se modificó (Figura 23). De manera de determinar si la mutación en estudio afectaba otro aspecto requerido para la transmisión, se analizó

la germinación de granos de polen en las tétradas de plantas *bnp-1/BNP qrt1/qrt1*. Aproximadamente, el 37,5 % de los granos de polen germinaron *in vitro* en medio sólido de germinación de polen, comparado con un 78,5 % en plantas *BNP/BNP qrt1/qrt1* (WT para el alelo *BNP*) (Figura 24 f-k). En las plantas *bnp-2/BNP*, el polen presentó un porcentaje de germinación del 43% (n = 787), comparado con el 67% del polen WT (n = 443). El porcentaje máximo de germinación de polen WT con el protocolo de Boavida y McCormick, (2007) es de alrededor del 80% en condiciones óptimas. Si consideramos que el 78,5% obtenido en nuestras condiciones es el máximo alcanzable, el porcentaje corregido de germinación de *bnp-1/BNP qrt1/qrt1* es sólo del 48 %, y 63% para *bnp-2/BNP*. Los granos de polen con el desarrollo detenido son viables, pero la germinación está impedida, lo cual explica la eficiencia de transmisión reducida de *bnp* a través del gametofito masculino. Por lo tanto, hipotetizamos que *BNP* es una proteína clave para completar el desarrollo del grano de polen, específicamente la mitosis II, afectando además la germinación del tubo polínico en *A. thaliana*.

La proteína BNP se expresa durante la microesporogénesis y la microgametogénesis y estadios tempranos del desarrollo esporofítico.

La localización de *BNP* durante el desarrollo del polen se estudió mediante el análisis de la proteína reportera *BNP-GFP* en plantas llevando la construcción *pBNP:BNP-GFP*. Dicha construcción complementó el fenotipo mutante de granos de polen de las plantas *bnp/BNP* demostrando su funcionalidad durante el desarrollo gametofítico (Figura 25). *BNP-GFP* se detectó distribuida en el citoplasma en estadios tempranos del desarrollo del polen (tétrada de microsporas y microspora liberada, Figura 26 a-b),

y en estructuras puntuadas discretas durante los estadios bicelulares y tricelular de los granos de polen (Figura 26 c-d). Un patrón similar se observó en el tubo polínico de granos de polen *pBNP:BNP-GFP* (Figura 26 i). Dado que la mutación en homocigosis causó fallas en la germinación y detuvo el desarrollo de las plántulas antes de alcanzar el estadio 1.02, se analizó la expresión de *BNP* en estadios tempranos del desarrollo esporofítico. Se analizó la actividad del promotor de *BNP* en las plantas transgénicas *pBNP-GUS*. La expresión de GUS se detectó en estadios embrionarios desde las 24 hs luego de la imbibición de la semilla (Figura 26 k), y se mantuvo en estadios tempranos las plántulas de 1 a 10 días de edad (Figura 26 l, m, n) principalmente, en tejidos de activa expansión celular y siguiendo una localización vascular.

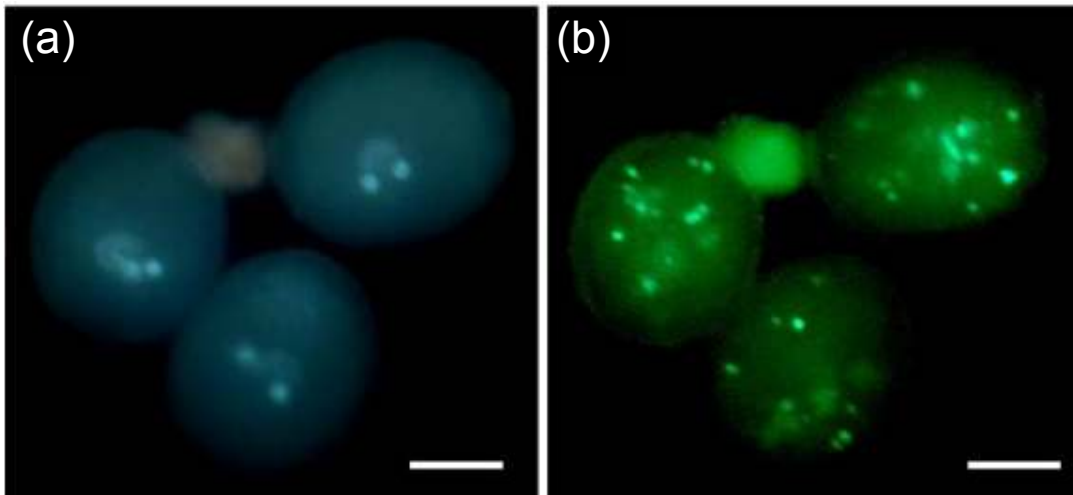


Figura 25. La complementación de *bnp-1/BNP* con la construcción *ProBNP::BNP-GFP* restauró el fenotipo de polen binucleado típico de las plantas WT.

(a) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de núcleos teñidos con DAPI en granos de polen de las plantas *bnp-1/BNP* complementadas con *ProBNP::BNP-GFP*.

(b) Señal de BNP-GFP en los granos de polen complementados.

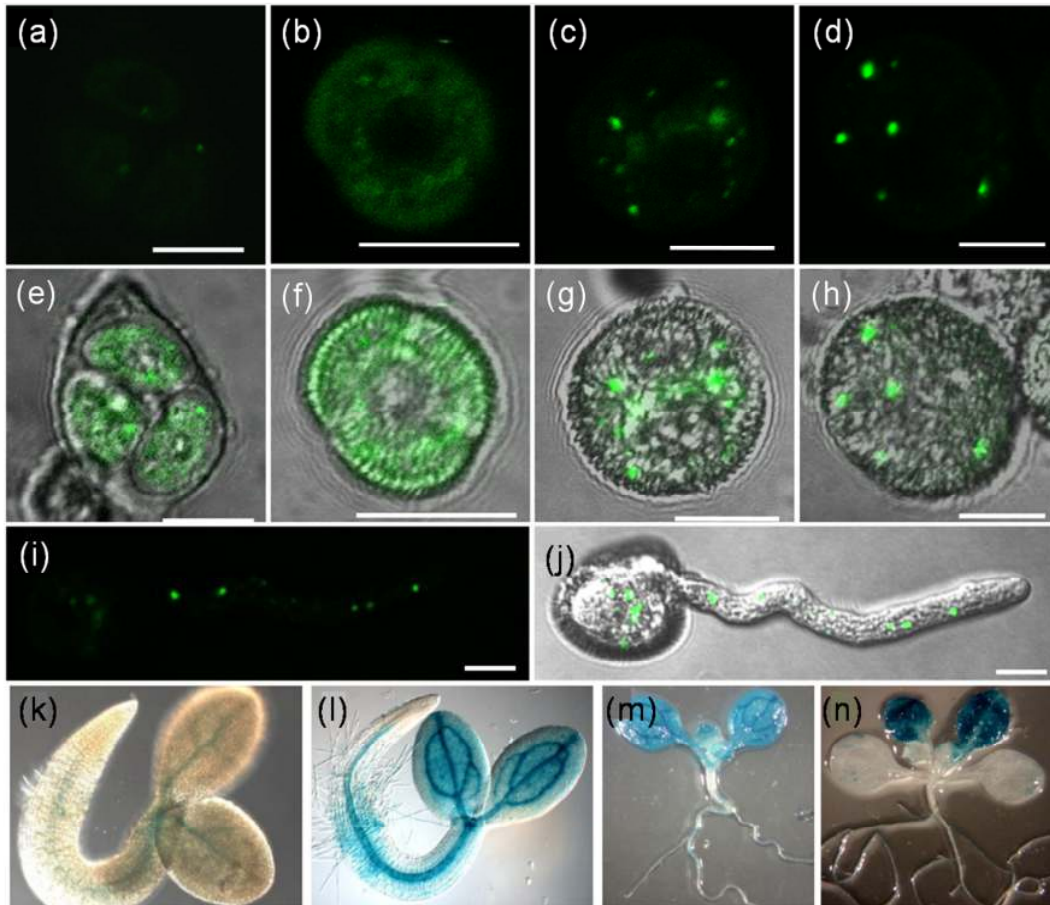


Figura 26. *BNP* se expresa en el polen y en tejidos esporofíticos de plántulas.

(a-j) Imágenes de microscopía confocal mostrando expresión de *BNP-GFP* en la tétrada de microsporas (a, e), en la microspora liberada (b, f), en el estadio bicelular (c, g), en el estadio tricelular (d, h) y durante la germinación del tubo polínico (i, j).

(k-n) Actividad del promotor *BNP* en plantas transgénicas *pBNP:GUS*. Se muestra la actividad de la proteína reportera GUS siguiendo con localización vascular. La actividad es débil a las 24 hs de la imbibición de la semilla (k), más fuerte en la plántula de 1 día (l) y 6 (m), y finalmente confinado a las primeras hojas verdaderas a los 12 días post-germinación (n). Las fotos son representativas de fenotipos de 3 líneas transgénicas independientes.

Barras = 10 μ m

La proteína BNP interactúa con los factores de transcripción VOZ1 y VOZ2

Para profundizar sobre la comprensión de las posibles funciones de la proteína BNP se llevaron a cabo escrutinios por la técnica de doble híbrido en levadura para identificar sus potenciales interactores proteicos. Se identificaron 2 reguladores de la transcripción de la familia NAC, anotados como Vascular plant one zinc finger protein 1 y 2 (VOZ1 y VOZ2) (Tabla 3). Curiosamente, la proteína BNP también interactúa consigo misma (Tabla 3). Para confirmar las interacciones BNP-VOZ1, BNP-VOZ2 y BNP-BNP se realizaron ensayos de tipo BiFC. Se diseñaron las construcciones para expresar BNP y cada una de las proteínas candidatas fusionadas ya sea a los fragmentos N- o al C-terminal de la proteína amarilla fluorescente YFP generando las construcciones BNP-N-YFP, VOZ1-C-YFP, VOZ2-C-YFP y BNP-C-YFP. Las construcciones de fusión bajo el promotor CaMV 35S se transformaron transientemente en hojas de *N. benthamiana* y las señales de BiFC se analizaron utilizando microscopía confocal (Figura 27). Las hojas control, co-transfectadas con BNP-N-YFP y C-YFP sin fusionar o con N-YFP sin fusionar y VOZ1-C-YFP, VOZ2-C-YFP o BNP-C-YFP no mostraron señal de BiFC (Figura 27).

Tabla 5. Selección de clones obtenidos por Y2H usando BNP como carnada. PBS: puntaje biológico predicho; jerarquiza la confianza de la interacción de la A (muy alta) a la D (moderada)

Locus	Anotación	PBS	Largo de la región interactora	Localización
At1g28520	VOZ1, Vascular plant one zinc finger protein 1	D	486 (129-486)	Núcleo, citosol
At2g42400	VOZ2, Vascular plant one zinc finger protein 2	C	450 (1-450)	Citosol, núcleo
At2g44370	BNP, proteína con dominios DC1	B	250 (1-250)	LPVCs

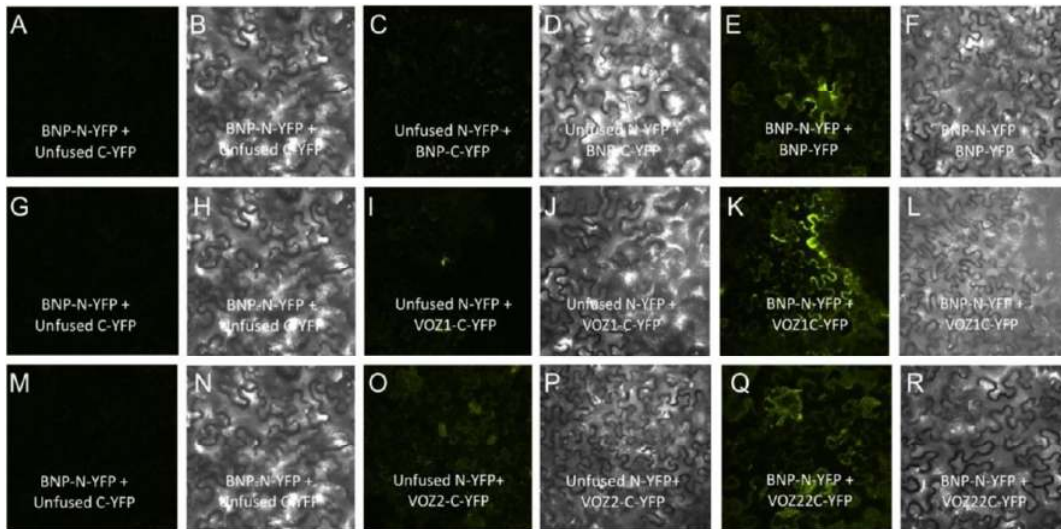


Figura 27. La proteína BNP interactúa con VOZ1, VOZ2 y otras BNP. Ensayos de BiFC de la interacción de BNP con VOZ1, VOZ2 y otras BNP en epidermis de *N. benthamiana*.

(a-f) Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran que BNP interactúa con otras BNP.

(g-l) Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran que BNP interactúa con VOZ1.

(m-r) Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran que BNP interactúa con otras VOZ2.

BNP se localiza principalmente en LPVCs y co-localiza con VOZ1 y VOZ2

Con el objetivo de conocer la naturaleza de la localización y precisar la/s organela/s en las que se localiza la proteína BNP, se analizó la expresión de BNP-GFP utilizando el sistema de *N. benthamiana* previamente mencionado. Además, se comparó su localización con RFP-Rha1, marcador de LPVCs, y St-RFP, marcador de aparato de Golgi (Grefen *et al.*, 2010). BNP co-localizó principalmente con el marcador de LPVCs (Figura 28 a-e), y sólo en casos aislados con el marcador ST-RFP (Figura 28 f-j). Para confirmar que BNP se localiza en los mismos compartimentos que sus proteínas

interactoras se realizaron análisis de co-localización en hojas de *N. benthamiana* co-transformadas con BNP-GFP, VOZ1-RFP y VOZ2-RFP. La expresión tanto de VOZ1-RFP como de VOZ2-RFP se identificó con el típico patrón puntuado coincidente con BNP-GFP, mostrando altos niveles de co-localización (Figura 28 k-t). El análisis de imágenes por la aplicación *PSC colocalization* en el programa Image-J (<https://www.nottingham.ac.uk>) reveló que, si bien hay altos niveles de co-localización, tanto BNP como VOZ1 y VOZ2 pueden existir en organelas separadas (Figura 28 o, t). En conjunto, nuestros datos sugieren que la interacción entre BNP y VOZ1/VOZ2 ocurre en los LPVCs.

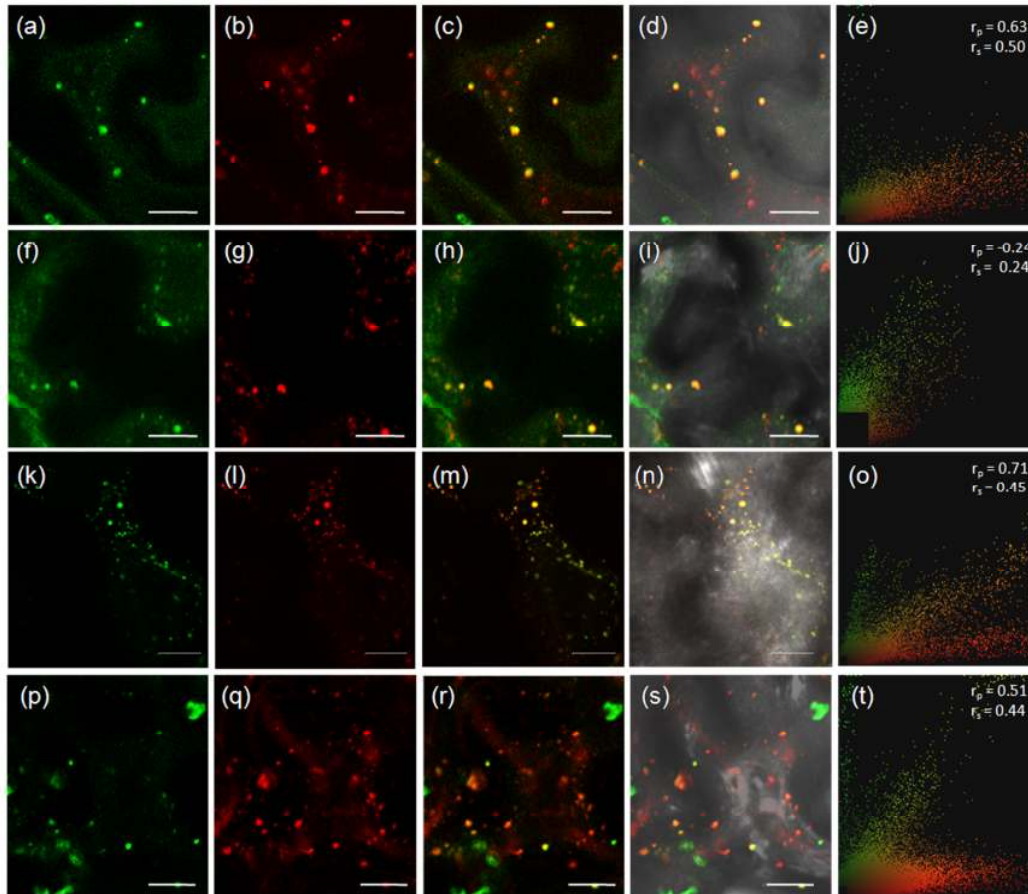


Figura 28. La proteína BNP co-localiza con VOZ1 y VOZ2 en compartimentos prevacuolares tardíos.

(a-d) Co-localización de BNP-GFP (a) con el marcador de LPVCs *RFP-Rha1* (b), mostrando superposición de la señal (c) en epidermis de *N. benthamiana* (d).

(f-i) Co-localización de una pequeña parte de la señal de BNP-GFP (f) con el marcador de Golgi St.RFP (g), mostrando superposición parcial (h) en epidermis de *N. benthamiana* (i).

(k-n) Co-localización de BNP-GFP (k) con RFP-VOZ1 (l), mostrando superposición de la señal (n) en epidermis de *N. benthamiana* (n).

(p-s) Co-localización de BNP-GFP (p) con RFP-VOZ2 mostrando superposición parcial de la señal (r) en epidermis de *N. benthamiana* (s).

(e, j, o, t) Prueba de co-localización de la aplicación *Pearson Spearman colocalization* (<https://www.nottingham.ac.uk>) para el programa Image-J. r_p y r_s corresponden al coeficiente de correlación de Pearson y de Spearman respectivamente.

Barras = 20 μ m.

Discusión

VLG y BNP son proteínas modulares que contienen 3 dominios DC1 con alta similitud estructural a los dominios C1. En su estructura se observa un plegado muy similar en las regiones de coordinación de Zn^{+2} y en las láminas beta antiparalelas. La gran afinidad de unión al Zn^{+2} les otorga un plegado capaz de formar bucles, los cuales en los dominios C1 definen el sitio de unión a ligandos (Zhang *et al.*, 1995). Dichos bucles, no conservados en secuencia ni en longitud en los dominios DC1 podrían determinar la especificidad de unión, ya sea a lípidos o a proteínas. Aparte de su afinidad a agonistas fosfolipídicos y a proteínas específicas, los dominios C1 presentes en numerosas isoformas de las proteínas PKC y quinasas de proteínas de tipo Raf comparten la capacidad de responder a estrés oxidativo (Zhao *et al.*, 2011). En ensayos *in vitro* con el dominio C1b de la PKC α se observó que tanto su activación clásica por ligandos como la respuesta a la acción redox provoca la liberación de Zn^{+2} , el cambio de conformación y la alteración de su competencia enzimática (Zhao *et al.*, 2011). Lin y Takemoto (2005) demostraron que el dominio C1 de la PKC γ además de, unirse a diacilglicerol responde al agregado exógeno de H_2O_2 . Esto sugiere que los dominios DC1 también podrían responder tanto a ligandos específicos como a la acción redox mediante la liberación de Zn^{+2} y su cambio de conformación. Tal mecanismo de respuesta le otorgaría a las proteínas con dominios DC1 un gran potencial regulatorio. Zhou *et al.*, (2002) demostraron que a pesar de su gran similitud estructural, los dominios C1 de las quinasas supresoras de Ras en animales, no son intercambiables y mientras unos dirigen la translocación a membranas otros interactúan con proteínas específicas. De esta manera las proteínas modulares con dominios DC1 podrían funcionar como andamios que facilitan la unión de fosfolípidos y el ensamblaje de complejos proteicos de forma sensible al estado redox.

Inicialmente, los genes *VLG* y *BNP* se identificaron a partir de un análisis transcriptómico global que se realizó en nuestro laboratorio con el objetivo de estudiar genes que participan de la respuesta de las plantas de papa frente a patógenos fúngicos (Godoy *et al.*, 2000). Dado que los mismos se describieron como genes con función desconocida inicialmente exploramos su expresión a través del análisis *in silico* en plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés.

A partir del análisis de bases de datos de microarreglos se identificó que *VLG* y *BNP*, al igual que algunos de sus homólogos más cercanos se regulan fuertemente frente a estreses bióticos y abióticos (Figura 8). Particularmente, frente a la inoculación con bacterias y la exposición a inductores de la respuesta de defensa se observó que la expresión de ambos genes se activa fuertemente. La aplicación exógena de las fitohormonas ABA e IAA reprime la expresión de los genes *VLG* y *BNP* en tiempos cortos comprendidos entre 1 y 6 hs luego de la infección (Figura 8). A continuación, demostramos mediante los tratamientos de las plantas frente a diferentes tipos de estreses y tratamientos hormonales que existe una regulación general y diferencial de la expresión de los genes *VLG* y *BNP* en las plantas reporteras p*VLG*:GUS y p*BNP*:GUS. Curiosamente, todos los tratamientos de inducción de las respuestas a estrés causaron algún cambio en la intensidad o distribución de la expresión del gen reportero GUS en ambas líneas transgénicas. Dicha regulación se observó dentro de las primeras 2 hs de aplicados cada uno de los tratamientos y resultó órgano específica.

En las plantas reporteras p*VLG*:GUS expuestas a los tratamientos de estreses y hormonales se observó una expresión positiva del gen reportero en la parte aérea, salvo frente a los tratamientos con luz UV-B y H₂O₂ para los cuales se observó represión génica (Figura 9). Particularmente, en la raíz se observó represión por estrés biótico y estrés oxidativo mediado por H₂O₂ (Figura 9). Coincidentemente con los datos de expresión *in silico*, *VLG* se indujo ante el tratamiento con xilanasas, utilizada como inductor de la respuesta de defensa y muerte celular (Ron y Avni, 2004) (Figura 9).

En las plantas reporteras pBNP:GUS el gen se indujo en hojas sometidas a estrés oxidativo mediado por sal y radiación UV-B y se reprimió ante los tratamientos por las hormonas ABA e IAA (Figura 10). Sin embargo, no se detectaron cambios en la expresión del reportero en las raíces hipocotilos de las plantas sometidas a los tratamientos anteriores (Figura 10).

Los genes *VLG* y *BNP* se regulan ante el tratamiento con oligoquitosano, típicamente utilizado como inductor de la respuesta de defensa (Thakur y Sohal, 2013) y ante la infección con la bacteria fitopatógena *P. syringae* cepas vir y avr, resultando en un aumento de su expresión de alrededor de 100 veces durante las primeras 2 hs de aplicados los respectivos tratamientos bacterianos. En la misma dirección que nuestros resultados, el gen de *A. thaliana* *ULI3* (*At5g59920*) el cual codifica para una proteína con un dominio DC1 se regula por UV-B (Suesslin y Frohnmeyer, 2003). En tabaco, *NtDC1a* y *NtDC1b* se inducen después del tratamiento con laminarina, la cual actúa como inductora de estrés biótico (Shinya *et al.*, 2007). Los genes *TaCH* y *GhCHR* se expresan diferencialmente bajo estrés salino en plantas de trigo y algodón, respectivamente (Li *et al.*, 2010) (Gao *et al.*, 2016). *CaDC1* es un regulador de la respuesta de defensa dependiente de AS en *C. annuum*, (Hwang *et al.*, 2013). En el caso del gen *At5g17960* de *A. thaliana* que codifica para una proteína con dominios DC1 se induce por los tratamientos con quitina, sal, sequía, radiación UV y frío y tratamientos hormonales (ácido giberélico, AS, ácido metil-jasmónico y etileno) (Bhaskar *et al.*, 2015). Existen evidencias de que los estreses tanto bióticos como abióticos, impactan el estado redox de la homeostasis celular (Potters *et al.*, 2009). Esto sucede ya sea de forma inespecífica, por la disrupción del metabolismo celular, o específica, por ejemplo, a través de NADPH-oxidasas (Potters *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios que evidencian la regulación de los genes que codifican para proteínas con dominios DC1 frente a estímulos hormonales y ambientales aún no existen antecedentes funcionales sobre su rol en los mecanismos de defensa de las plantas frente a estrés.

Desde el punto de vista del crecimiento y desarrollo de las plantas de *A. thaliana*, se observó que la expresión de *VLG* y *BNP* ocurre en condiciones normales de crecimiento y sigue un patrón vascular, incluso antes del completo desarrollo de xilema y floema en las hojas nuevas y raíces (figura 12). En la parte aérea también se observa mayor expresión en estípulas e hidátodos, sitios de biosíntesis de auxinas en *A. thaliana* (Aloni *et al.*, 2003) (Figura 12). Los hidátodos además guían la diferenciación vascular en los márgenes de las hojas (Aloni *et al.*, 2003). Las células procambiales que se diferencian en elementos de vaso y elementos de tubo criboso sufren un drástico crecimiento en longitud, en el que el transporte polar de auxinas es crucial (Schuetz *et al.*, 2012). Tales evidencias sugieren un posible rol de *VLG* y *BNP* en la ruta de señalización por auxinas en el contexto de la diferenciación vascular. Tal antecedente admitiría plantear futuros estudios que conduzcan a elucidar la función de los genes durante la vascularización de los tejidos esporofíticos de las plantas de *A. thaliana*.

Desde el punto de vista del desarrollo, se demostró que *VLG* es una proteína necesaria para la formación de la vacuola central durante la micro y megagametogénesis en líneas mutantes hemicigotas de *A. thaliana*, lo cual se confirmó mediante complementación genética (Figura 15).

Durante la microgametogénesis las microsporas libres contienen pequeñas vacuolas alrededor del núcleo central. En microsporas más maduras las vacuolas se fusionan en una gran vacuola central que empuja al núcleo hacia la pared de la microspora (Twell *et al.*, 1998). Sin embargo, en las plantas mutante *vlg/VLG* cerca de la mitad de las microsporas detienen su desarrollo antes de formar la vacuola central (Figura 14). Como consecuencia, la microspora no efectúa su primera mitosis y eventualmente colapsa. Coincidentemente, la formación de una gran vacuola caracteriza el estadio FG3 de la megagametogénesis. En sacos embrionarios mutantes *vlg* dicha vacuola principal no se detecta, la mitosis no progresa y el saco embrionario resulta inviable (Figura 16).

Las vacuolas en plantas tienen diversas y especializadas funciones durante el desarrollo y la homeostasis celular, incluyendo el almacenaje, reciclado y degradación de componentes, la osmorregulación y la elongación celular, entre otras (Takemoto *et al.*, 2017). En *A. thaliana*, VLG se localiza en LPVCs, los cuales median el tráfico de proteínas hacia las vacuolas después de pasar por el TGN (Takemoto *et al.*, 2017). Por lo tanto nuestras evidencias indican que VLG podría estar involucrada en la biogénesis de vacuolas a partir de los LPVCs en los gametofitos.

La fusión específica entre la membrana de vesículas de transporte y membranas blanco está mediada por SNAREs (Kim y Brandizzi, 2012). En *A. thaliana* se han identificado al menos 64 proteínas SNAREs (Uemura *et al.*, 2004). El tráfico de vesículas mediado por SNAREs ha sido relacionado a las proteínas VAP (proteínas asociadas a VAMP, las cuales se localizan en vesículas), las cuales son proteínas integrales de membrana altamente conservadas. Las VAPs de mamíferos están involucradas en distintas funciones celulares, incluyendo el transporte de lípidos, el tráfico de membranas, la liberación de neurotransmisores y la estabilización de microtúbulos presinápticos (Lev *et al.*, 2008). La primera proteína VAP descrita, VAP33, se aisló de *Aplysia californica* y está involucrada en la liberación de neurotransmisores mediada por VAMP en la membrana plasmática (Skehel *et al.*, 1995). En el presente trabajo demostramos que VLG interactúa con PVA12, la cual corresponde a una VAP de *A. thaliana*. *A. thaliana* posee 10 VAPs agrupadas en la subfamilia VAP33 de SNAREs que se localizan en el sistema de endomembranas, mediando el anclaje y fusión vesicular asociado al RE (Saravanan *et al.*, 2009). En un estudio previo, se demostró que PVA12 media el direccionamiento de la proteína de unión a oxisterol ORP3a al RE durante el transporte de esteroides en *A. thaliana* (Saravanan *et al.*, 2009). En relación a esto, existen evidencias de que el transporte de lípidos y proteínas desde el RE hacia la vacuola es necesario para la correcta biogénesis de vacuolas en *A. thaliana* (Viotti *et al.*, 2013). En este escenario, VLG podría actuar mediando el tráfico de esteroides desde el RE hacia las prevacuolas al

interactuar con PVA12. De esta manera anclaría al complejo PVA12-ORP3a en los sitios de contacto entre los LPVCs y el RE. VLG también podría actuar disminuyendo la barrera energética requerida para la fusión de vesículas, tal como fue demostrado para la proteína con dominio C1 de mamíferos Munc13-1 (Basu *et al.*, 2007), probablemente como parte de un complejo SNARE. Curiosamente, ORP3a fue identificada en un escrutinio de mutantes de inserción de saco embrionario originadas por transposones en *A. thaliana* (Pagnussat *et al.*, 2005). Esto sugiere que procesos similares de anclaje y fusión de vesículas durante la biogénesis de vacuolas pueden tener lugar en el gametofito femenino. Adicionalmente, también demostramos que VLG interactúa con LTL1, una lipasa con motivo GDSL, cuya sobreexpresión aumenta la tolerancia a sal en levaduras y plantas (Naranjo *et al.*, 2006). La familia de lipasas GDSL en *A. thaliana* consiste en 118 miembros, aunque algunos de ellos podrían no tener actividad lipasa. Éste es el caso de MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 (MVP1), la cual se localiza en RE y tonoplasto y sus mutantes muestran severos fenotipos relacionados a la vacuola y tráfico de endomembranas (Agee *et al.*, 2010). En el caso particular de LTL1, su localización subcelular se desconoce y se requerirán futuros estudios para elucidar si forma parte de un complejo de anclaje con VLG durante la biogénesis de vacuolas.

Con respecto a la proteína BNP, demostramos que se encuentra en granos de polen desde el estadio más temprano de la microspora hasta la germinación y elongación del tubo polínico (Figura 26). Al igual que VLG, se localiza en estructuras puntuadas que colocalizan con el marcador de LPVCs. El estudio de plantas mutantes *bnp/BNP*, mostró que la transmisión a través del gametofito masculino se vio interrumpida (Tabla 4). Cerca de la mitad de los granos de polen arrestaron su desarrollo antes de la PMII, mostrando sólo dos núcleos, y su germinación se vio reducida significativamente (Figura 24). Dicho fenotipo se logró recuperar mediante complementación genética, corroborando el efecto de la mutación en el desarrollo del polen (Figura 25). En un porcentaje minoritario de las tétradas observadas (<4%) se detectaron granos de

polen de mayor tamaño portando cuatro núcleos (Figura 24), indicando un defecto funcional durante la meiosis II, en el cual una de las células, habiendo heredado la mutación, no logra dividirse. Esto sugiere que BNP podría tener una función durante la meiosis. El bajo porcentaje de microsporas detectado con este fenotipo podría explicarse por la complementación funcional de los transcritos de la célula madre de las microsporas.

La pequeña proporción de plantas homocigotas que lograron analizarse genéticamente mostraron un atraso en su desarrollo esporofítico con respecto a plantas WT, y resultaron inviables (Figura 22). Esto indica que BNP puede desempeñar funciones en el desarrollo esporofítico temprano, quizás como parte de la organogénesis de hojas y el correcto desarrollo vascular guiado por la señalización por auxinas, tal como sugiere su localización vascular y en estípulas e hidátodos (Figura 12).

Mediante experimentos de BiFC demostramos que BNP interactúa consigo misma, y con los reguladores de la transcripción VOZ1 y VOZ2. Estos últimos pertenecen a la familia NAC de factores de transcripción y están involucrados en el control del tiempo de floración (Celesnik *et al.*, 2013); Yasui y Kohchi, 2014), ya sea por la interacción con PhyB (Yasui *et al.*, 2012), Flowering Locus C (Mimida *et al.*, 2011) o Constans (Koguchi *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). Las proteínas VOZ también están relacionadas al estrés biótico y abiótico (Nakai *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2018). Se ha demostrado que VOZ1 y VOZ2 son funcionalmente redundantes, pues las mutantes simples de cada gen mostraron fenotipos normales, pero las dobles mutantes *voz1voz2* mostraron defectos fenotípicos (Yasui *et al.*, 2012; Celesnik *et al.*, 2013). Notablemente, dichas mutantes presentan el mismo defecto en el gametofito masculino observado en plantas *bnp/BNP*, ya que una fracción de los granos de polen detiene su desarrollo antes de PMII, con sólo dos núcleos (Celesnik *et al.*, 2013). Este hecho apoya un posible rol fisiológico de la interacción entre BNP y las proteínas reguladoras de la transcripción VOZ durante el desarrollo del polen.

Aunque las proteínas VOZ son funcionales en el núcleo, inicialmente se identificaron en compartimentos citoplasmáticos (Yasui *et al.*, 2012). Por este motivo se propuso que la translocación citoplasma-núcleo podría modular la actividad de las proteínas VOZ como reguladores transcripcionales (Yasui *et al.*, 2012; Koguchi *et al.*, 2017). Puesto que VOZ1 y VOZ2 no contienen una región transmembrana ni señales de localización (Jensen *et al.*, 2010), BNP podría estar actuando como una proteína de anclaje, acompañando su translocación a través de los LPVCs. La observación de co-localización de BNP y VOZ por microscopía confocal parece apoyar esta hipótesis (Figura 28).

Nuestros resultados demuestran que BNP es requerida no sólo durante el desarrollo del polen sino también en el desarrollo esporofítico de las plantas de *A. thaliana* (Figuras 24 y 22 respectivamente). En concordancia, la expresión del gen *BNP* se detectó muy temprano en el desarrollo de la plántula en tejidos vasculares (Figura 26). Las proteínas VOZ también se expresan en el esporofito siguiendo el mismo patrón vascular (Yasui *et al.*, 2012), sugiriendo que dicha interacción proteína-proteína podría cumplir funciones tanto gametofíticas como esporofíticas.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que ambas, VLG y BNP son proteínas modulares que actúan a través de la interacción con otras proteínas y lípidos de endomembranas. Dicha interacción podría ocurrir como parte de los complejos SNARE de fusión de vesículas a membranas blanco y/o guiando reguladores de la transcripción en su translocación citoplasma-núcleo. Los dominios DC1 les otorgarían además la capacidad de sensar el estado redox, efectivamente integrando señales ambientales en la regulación del transporte de lípidos y proteínas. La ubicuidad de los sistemas de tráfico molecular juega un rol central en numerosas actividades celulares durante el ciclo de vida de las plantas (Takemoto *et al.*, 2018). Es así que, por ejemplo, las proteínas SNAREs, están involucradas en la división y elongación celular, tolerancia a estrés, respuesta gravitropica, cierre estomático y desarrollo gametofítico (Kim y Brandizzi, 2018). La gran divergencia en la secuencia de aminoácidos en los

dominios DC1 (Figura 6) podría conferirle propiedades para su unión a diversos ligandos (Rahman y Das, 2015) sugiriendo, a su vez, una gran diversidad de posibles interactores moleculares. El conjunto de tales características le confiere a la familia de proteínas con dominios DC1 un gran potencial para una regulación específica pero a su vez, altamente dinámica y controlada para asegurar la homeostasis celular que se requiere tanto durante los procesos de desarrollo como de aclimatación y defensa frente a los cambios y estrés ambiental.

Perspectivas de estudios a futuro

Los dominios C1 en animales son capaces de unirse a DAG, ésteres de forbol y proteínas específicas, además de cambiar de conformación frente a la acción redox (Zhao *et al.*, 2011). Sin embargo, en plantas aún no existen estudios que demuestren que los dominios DC1 tienen la misma capacidad de unión a ligandos y sensibilidad redox. Por lo tanto futuros experimentos comparativos entre plantas y animales sobre los dominios C1 permitirán avanzar con mayor certeza en el estudio funcional de dichos dominios.

Puesto que no se han detectado plantas mutantes homocigotas y dado que los genes *VLG* y *BNP* se expresan fuertemente frente a la inoculación con *P. syringae* y la exposición a inductores y a tratamientos con las hormonas del estrés AS y AJ (Figuras 8, 9, 10 y 11) planteamos la posibilidad de estudiar la respuesta de defensa frente a fitopatógenos en las plantas silenciadas en el gen *VLG*. Adicionalmente, se podría estudiar si la participación de las proteínas es localizada o sistémica.

Puesto que numerosos estreses comparten la característica de alterar la homeostasis redox, se podrían plantear experimentos para discernir su especificidad y/o si ambas proteínas *VLG* y *BNP* responden por la modificación del dominio DC1 antedicha regulación.

Por otra parte, *VLG* y *BNP* se expresan específicamente en sitios de biosíntesis de auxinas, en células en elongación, en tejido vascular y en células de la columela (Figura 12) sugiriendo su rol en la biosíntesis y/o señalización por auxinas. Por lo tanto, proponemos analizar el desarrollo vascular y los procesos de desarrollo dependientes de auxinas, tal como por ejemplo la respuesta gravitrópica. Para ello se podrían utilizar las líneas silenciadas en *VLG* o mutantes *bnp* homocigotas. Además se dispone de las líneas DR5:GUS (Sabatini *et al.*, 1999) cruzadas con las líneas silenciadas en *VLG* y mutantes *bnp*, las cuales podrían facilitar los estudios sobre la distribución de la respuesta a auxinas.

Desde el punto de vista citológico, dado que *VLG* y *BNP* se expresan en células en elongación (Figura 12) en las que el lumen vacuolar se incrementa dramáticamente (Krüger y Schumacher, 2018), ambas proteínas podrían cumplir funciones vacuolares en el esporofito. Esta función, al igual que en los gametofitos, podría radicar en la fusión de LPVCs en vacuolas para aumentar el tamaño vacuolar (Cui *et al.*, 2018). En *A. thaliana* la mutación en el gen *VACUOLELESS1* previene la biogénesis de vacuolas y por lo tanto la elongación celular, deteniendo así el desarrollo temprano del esporofito (Rojo *et al.*, 2001). Similarmente, podría ser el caso de la proteína BNP, cuya mutación en homocigosis causa arresto del desarrollo y letalidad de plántulas, y por lo tanto estudios futuros podría dilucidar acerca de su rol.

Finalmente, desde el punto de vista gametofítico resta conocer los mecanismos a través de los cuales *VLG* y *BNP* y sus respectivas proteínas interactoras actúan durante los procesos de desarrollo gametofítico en *A. thaliana*. Para ello se ha avanzado en la generación de líneas mutantes *bnp/BNP* expresando establemente sus interactoras VOZ1 y VOZ2 en fusión con la proteína reportera RFP. Experimentos similares se pueden llevar a cabo para *VLG* y sus interactoras.

En conjunto, los resultados originales obtenidos en este trabajo de Tesis junto con posibles evidencias futuras sentarán una base amplia de conocimientos para

comprender las bases funcionales de las proteínas con dominios DC1 en plantas y su grado de conservación molecular y funcional a lo largo de la diversidad biológica.

Bibliografía

- Agee, A.E., Surpin, M., Sohn, E.J. et al. (2010) MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 is an Arabidopsis myrosinase-associated protein involved in endomembrane protein trafficking. *Plant Physiol.* 152, 120–132.
- Basu, J., Betz, A., Brose, N., & Rosenmund, C. (2007). Munc13-1 C1 domain activation lowers the energy barrier for synaptic vesicle fusion. *Journal of Neuroscience*, 27(5), 1200-1210.
- Bhaskar, R.V., Mohanty, B., Verma, V., Wijaya, E. and Kumar, P.P. (2015) A hormone-responsive c1-domain-containing protein At5g17960 mediates stress response in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 10, e0115418.
- Blancaflor, E. B., Fasano, J. M., & Gilroy, S. (1998). Mapping the functional roles of cap cells in the response of Arabidopsis primary roots to gravity. *Plant physiology*, 116(1), 213-222.
- Borges, F., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijó, J. A., & Becker, J. D. (2008). Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. *Plant Physiology*, 148(2), 1168-1181.
- Brose, N., Betz, A. and Wegmeyer, H. (2004) Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 328–340.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E.L., Girke, T. and Raikhel, N.V. (2004) The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell*, 16, 3285–3303.
- Chow, C.-M., Neto, H., Foucart, C. and Moore, I. (2008) Rab-A2 and Rab-A3 GTPases define a trans-golgi endosomal membrane domain in Arabidopsis that contributes substantially to the cell plate. *Plant Cell*, 20, 101–123.
- Christensen, C. A., King, E. J., Jordan, J. R., & Drews, G. N. (1997). Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant. *Sexual Plant Reproduction*, 10(1), 49-64.
- Collins, N. C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J. L., ...& Schulze-Lefert, P. (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 425(6961), 973.
- Colon-Gonzalez, F. and Kazanietz, M.G. (2006) C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein–protein interactions. *Biochim.Biophys. Acta*, 1761, 827–837.

Cui, Y., Cao, W., He, Y., Zhao, Q., Wakazaki, M., Zhuang, X., ...& Wong, H. Y. (2018). A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in Arabidopsis root cells. *Nature plants* 5, 95–105.

Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y.-D. and Schumacher, K. (2006) Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18, 715–730.

D'Ippólito, S., Martín, M. L., Salcedo, M. F., Atencio, H. M., Casalongué, C. A., Godoy, A. V., & Fiol, D. F. (2010). Transcriptome profiling of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*-infected potato tubers provides evidence of an inducible defense response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75(1-2), 3-12.

Dong, W., Lv, H., Xia, G., & Wang, M. (2012). Does diacylglycerol serve as a signaling molecule in plants?. *Plant signaling & behavior*, 7(4), 472-475.

Drews, G. N., & Koltunow, A. M. (2011). The female gametophyte. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.

Drews, G. N., & Yadegari, R. (2002). Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics*, 36(1), 99-124.

Foresti, O., Gershlick, D. C., Bottanelli, F., Hummel, E., Hawes, C., & Denecke, J. (2010). A recycling-defective vacuolar sorting receptor reveals an intermediate compartment situated between prevacuoles and vacuoles in tobacco. *The Plant Cell*, tpc-110.

Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP(2006) Separation of Arabidopsis pollen 599 tetrads is regulated by QUARTET1, a pectin methylesterase gene. *Plant Physiol* 600 142: 1004-1013.

Gao, S., Yang, L., Zeng, H.Q., Zhou, Z.S., Yang, Z.M., Li, H., Sun, D., Xie, F. and Zhang, B. (2016) A cotton miRNA is involved in regulation of plant response to salt stress. *Sci. Rep.* 6, 19736.

Haak, D. C., Fukao, T., Grene, R., Hua, Z., Ivanov, R., Perrella, G., & Li, S. (2017). Multilevel regulation of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 1564.

Hicks, G. R., Rojo, E., Hong, S., Carter, D. G., & Raikhel, N. V. (2004). Geminating pollen has tubular vacuoles, displays highly dynamic vacuole biogenesis, and requires VACUOLESS1 for proper function. *Plant Physiology*, 134(3), 1227-1239.

Hwang, I.S., Choi, D.S., Kim, N.H., Kim, D.S. and Hwang, B.K. (2013) The pepper cysteine/histidine-rich DC1 domain protein CaDC1 binds both RNA and DNA and is required for plant cell death and defense response. *New Phytol.* 2013, 518–530.

Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.-W. and Hwang, I. (2001) A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13, 1511–1526.

Johnson, J.E., Goulding, R.E., Ding, Z., Partovi, A., Anthony, K.V., Beaulieu, N., Tazmini, G., Cornell, R.B. and Kay, R.J. (2007) Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs. *Biochem. J.* 406, 223–236.

Kim, S. J., & Brandizzi, F. (2012). News and views into the SNARE complexity in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 3, 28.

Kleine Balderhaar, H. J., & Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes—coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci*, 126(6), 1307–1316.

Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., & Harper, J. F. (2002). Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant physiology*, 130(4), 2129–2141.

Krüger, F., & Schumacher, K. (2018). Pumping up the volume—vacuole biogenesis in Arabidopsis thaliana. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 106–112).

Lalanne, E., Michaelidis, C., Moore, J. M., Gagliano, W., Johnson, A., Patel, R., ... & Twell, D. (2004). Analysis of transposon insertion mutants highlights the diversity of mechanisms underlying male progamic development in Arabidopsis. *Genetics*, 167(4), 1975–1986.

Lehel, C., Olah, Z., Jakab, G. and Anderson, W.B. (1995) Protein kinase C epsilon is localized to the Golgi via its zinc-finger domain and modulates Golgi function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 1406–1410.

Li, C., Lv, J., Zhao, X., Ai, X., Zhu, X., Wang, M., Zhao, S. and Xia, G. (2010) TaCHP: a wheat zinc finger protein gene down-regulated by abscisic acid and salinity stress plays a positive role in stress tolerance. *Plant Physiol.* 154, 211–221.

Mahalingam, R., Gomez-Buitrago, A., Eckardt, N., Shah, N., Guevara-Garcia, A., Day, P., ... & Fedoroff, N. V. (2003). Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis. *Genome biology*, 4(3), R20.

Martin, M. V., Fiol, D. F., Sundaresan, V., Zabaleta, E. J., & Pagnussat, G. C. (2013). oiwa, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc-113.

McCormick, S. (1993). Male gametophyte development. *The plant cell*, 5(10), 1265.

Miyamoto, K., Tomizawa, T., Koshiba, S., Inoue, M., Kigawa, T. and Yokoyama, S., and R.S.G.P. Initiative.(2003) Solution structure of DC1 domain of PDI-like hypothetical protein from *Arabidopsis thaliana* (Protein Data Bank).

Mosior, M. and Newton, A.C. (1995) Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters.Reversibility and nature of membrane association.*J. Biol. Chem.* 270, 25526–25533.

Nakano, R.T., Matsushima, R., Nagano, A.J., Fukao, Y., Fujiwara, M., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2012) ERMO3/MVP1/GOLD36 Is Involved in a cell type-specific mechanism for maintaining ER morphology in *Arabidopsis thaliana*.*PLoS ONE*, 7, e49103.

Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1989) Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 4868–4871.

Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (1998).Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 118(1), 285-296.

Otegui, M. S., & Spitzer, C. (2008). Endosomal functions in plants. *Traffic*, 9(10), 1589-1598.

Pagnussat, G. C., Alandete-Saez, M., Bowman, J. L., & Sundaresan, V. (2009).Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*, 324(5935), 1684-1689.

Park, S. K., Howden, R., & Twell, D. (1998). The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development*, 125(19), 3789-3799.

Riechmann, J. L. (2002). Transcriptional regulation: a genomic overview. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 1.

Rojo, E., Gillmor, C. S., Kovaleva, V., Somerville, C. R., & Raikhel, N. V. (2001). VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental cell*, 1(2), 303-310.

Rutley, N., & Twell, D. (2015).A decade of pollen transcriptomics. *Plant reproduction*, 28(2), 73-89.

Selye H. *The Stress of Life* (1956). New York: McGraw-Hill.

Shen, N., Guryev, O. and Rizo, J. (2005) Intramolecular occlusion of the diacylglycerol-binding site in the C1 domain of munc13-1. *Biochemistry*, 44, 1089–1096.

Shinya, T., Galis, I., Narisawa, T., Sasaki, M., Fukuda, H., Matsuoka, H., Saito, M. and Matsuoka, K. (2007) Comprehensive analysis of glucan elicitor-regulated gene expression in tobacco BY-2 cells reveals a novel MYB transcription factor involved in the regulation of phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell Physiol.* 48, 1404–1413.

Speth, E.B., Imboden, L., Hauck, P. and He, S.Y. (2009) Subcellular localization and functional analysis of the Arabidopsis GTPase RabE. *Plant Physiol.* 149, 1824–1837.

Steinhorst, L., Meahs, A., Ischebeck, T., Zhang, C., Zhang, X., Arendt, S., Sch€ultke, S., Heilmann, I. and Kudla, J. (2015) Vacuolar CBL-CIPK12 Ca²⁺- sensor-kinase complexes are required for polarized pollen tube growth. *Curr. Biol.* 25, 1475–1482.

Suesslin, C. and Frohnmeyer, H. (2003) An Arabidopsis mutant defective in UV-B light-mediated responses. *Plant J.* 33, 591–601.

Surpin, M., & Raikhel, N. (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(2), 100.

Takemoto, K., Ebine, K., Askani, J. C., Krüger, F., Gonzalez, Z. A., Ito, E., ...& Ueda, T. (2018). Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201717839.

Tan, X., Wei, J., Li, B., Wang, M., & Bao, Y. (2017). AtVps11 is essential for vacuole biogenesis in embryo and participates in pollen tube growth in Arabidopsis. *Biochemical and biophysical research communications*, 491(3), 794-799.

Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN biochemistry*, 2013, 10.

Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in plant science*, 17(5), 260-270.

Twell, D., Park, S. K., & Lalanne, E. (1998). Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends in plant science*, 3(8), 305-310.

Viotti, C., Krüger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., ...& Sauer, N. (2013). The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc-113.

Publicaciones

La presente tesis se llevó a cabo a través de una Beca Doctoral Interna del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (abril 2014 – abril 2019). Las tareas fueron realizadas en el laboratorio de Fisiología del Estrés en Plantas del Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Las actividades de investigación presentadas en este trabajo dieron lugar a las publicaciones en revistas científicas con referato y presentaciones a congresos que se detallan a continuación

Revistas científicas con referato

Arias, L. A., D'Ippólito, S., Casalongue, C. A., Pagnussat, G. C., & Fiol, D. F. (En revisión, 2019). The DC1 domain protein MENEW is required for pollen development in *Arabidopsis*.

D'Ippólito, S., **Arias, L. A.**, Casalongué, C. A., Pagnussat, G. C., & Fiol, D. F. (2017). The DC1-domain protein VACUOLELESS GAMETOPHYTES is essential for development of female and male gametophytes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 90(2), 261-275. [IGUAL CONTRIBUCIÓN]

Presentaciones a congresos

2018. VACUOLELESS GAMETOPHYTES se regula diferencialmente de acuerdo a distintos estreses y tratamientos hormonales. RAFV, Córdoba, Argentina.

2018. Caracterización funcional de la proteína con dominios DC1 VLG en el desarrollo esporofítico de *Arabidopsis thaliana*. RAFV, Córdoba, Argentina.

2017. MENEW is a DC1-domain protein essential for microgametogenesis and pollen tube germination. 1st International Symposium on Genome Engineering & Developmental Biology, Irapuato, México.

2016. Functional characterization of a DC1-domain protein essential for early gametophytic development. SAIB LII Annual Meeting, Córdoba, Argentina.

2015. Characterization of the expression of two genes coding for DC1-domain-containing proteins under biotic and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. 11th International Congress of Plant Molecular Biology, Foz do Iguazú, Brasil.

2014. DC1-domain-containing proteins: Functional characterization and their role in plant development. L Reunión de la SAIB, Rosario, Argentina.

2014. Participación de genes con dominios DC1 en procesos de defensa y desarrollo en *Arabidopsis*. V Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, Argentina.