



Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos

Tesis de doctorado

**“ESTUDIO DEL ROL DE DISTINTAS ENZIMAS QUE
PARTICIPAN EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE
FLAVONOIDES EN LA RESPUESTA A LA RADIACIÓN
UV-B EN PLANTAS”**

Lic. Julia Emiliani

Directora: Dra. Paula Casati

Codirectora: Dra. María Lorena Falcone Ferreyra

Rosario

2014

Argentina

Estudio del rol de distintas enzimas que participan en la vía de síntesis de flavonoides en la respuesta a la radiación UV-B en plantas

Julia Emiliani

Licenciada en Biotecnología. Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFQBI), Departamento de Química Biológica, Área de Química Biológica dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de febrero de 2009 y el 10 de diciembre de 2013, bajo la dirección de la Dra. Paula Casati y la codirección de la Dra. Ma. Lorena Falcone Ferreyra.

Directora Dra. Paula Casati.....
Co-Directora Dra. María Lorena Falcone Ferreyra.....
Jurado
Jurado.....
Jurado.....
Defendida.....

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se dieron a conocer en distintas Publicaciones, Presentaciones en Congresos Científicos y en Actividades de Divulgación Científica y/o Técnica, como se detalla a continuación:

PUBLICACIONES

- **2013.** Emiliani J., Grotewold E., Falcone Ferreyra M.L. y Casati P. Flavonols protect Arabidopsis plants against UV-B deleterious effects. *Molecular Plant*, 6, 1376-1379.
- **2012.** Morohashi K., Casas M.I., Falcone Ferreyra M.L., Mejía-Guerra M.K., Pourcel L., Yilmaz A., Feller A., Carvalho B., Emiliani J., Rodriguez E., Pellegrinet S., McMullen M., Casati P., y Grotewold E. A genome-wide regulatory framework identifies maize *Pericarp Color1 (P1)* controlled genes. *Plant Cell*, 24, 2745-2764.
- **2010.** Falcone Ferreyra M.L., Rius S., Emiliani J., Pourcel L., Feller A., Morohashi K., Casati P. y Grotewold E. Cloning and Characterization of a UV-B Inducible Maize Flavonol Synthase. *Plant J.*, 62, 77-91.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS CIENTÍFICOS

- **Setiembre 2012. RAFV XXIX.** “Rol de una flavonol sintasa de maíz en la protección contra la radiación UV-B” Emiliani J.; Grotewold, E.; Casati, P.; Falcone Ferreyra, M.L. Mar del Plata, Argentina. (Presentación del poster).
- **Abril 2012. WORKSHOP “FRONTERAS EN BIOCENCIAS”.** **Polo Científico Tecnológico.** “Role of a maize flavonol synthase in the protection against UV-B radiation” Emiliani, J.; Grotewold, E.; Casati, P.; Falcone Ferreyra, M.L. Buenos Aires, Argentina. (Presentación del poster).
- **Junio 2011. PRIMERA REUNIÓN DE FOTOBÍÓLOGOS ARGENTINOS.** “Rol de una flavonol sintasa de maíz en la protección contra la radiación UV-B”. Emiliani, J.; Grotewold, E.; Casati, P.; Falcone Ferreyra, M.L. La Plata, Argentina. (Presentación del poster).
- **Marzo 2011. 53rd ANNUAL MAIZE GENETICS CONFERENCE.** “A combination

of RNA-Seq and ChIP-Seq reveals multiple roles of *P1* in pericarp development and metabolic pathways.” Kengo Morohashi, K.; Alper Yilmaz, A.; Pourcel, L.; Casas, M.I.; **Emiliani, J.**; Falcone Ferreyra, M.L.; McMullen, M.; Casati, P.; y Grotewold, E. St. Charles; Illinois. (Presentación del poster).

- **Noviembre 2010. SAIB XLVI.** “Identifying new P1 targets in leaves under UV-B conditions. Analysis of expression of putative P1 targets in maize.” **Emiliani, J.**; Rius, S.; Grotewold, E. y Casati, P. Puerto Madryn, Argentina. (Presentación del poster).
- **Septiembre 2010. SAFV XXVIII.** “Caracterización de una flavona sintasa tipo II de maíz.” **Emiliani, J.**; Grotewold, E.; Casati, P.; y Falcone Ferreyra, M.L. La Plata; Argentina. (Presentación del poster).
- **Noviembre 2009. SAIB XLV.** “Characterization and Regulation of the First Flavonol Synthase identified in Maize.” Falcone Ferreyra, M.L.; Rius, S.; **Emiliani, J.**; Pourcel, L.; Feller, C.A.; Morohashi, K.; Casati, P.; y Grotewold, E. Tucumán; Argentina. (Comunicación Oral).
- **Noviembre 2009. SAIB XLV.** “UV-B regulation of maize *ZmFLS1* and *ZmFNS* enzymes.” **Emiliani, J.**, Falcone Ferreyra, M.L.; Grotewold, E. y Casati, P. Tucumán; Argentina. (Presentación del poster).

ACTIVIDADES DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y/O TÉCNICA

- **Abril 2013. Entrevista.** Prensa oral. Programa de televisión “De 12 a 14”. Canal 3 Rosario.
- **Abril 2013. Entrevista.** Prensa escrita. www.elotromate.com “Las plantas también usan bronceador”-<http://www.elotromate.com/medio-ambiente/las-plantas-tambien-usan-bronceador/>.
- **Abril 2013. Entrevista.** Prensa escrita. CEFOSI-CONICET-UNR. “Las plantas también se protegen”- <http://www.conicet.gov.ar/las-plantas-tambien-se-protegen/>.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad...

A mi directora Paula por haber confiado en mí durante todos estos años y por permitirme continuar trabajando en su grupo, por su motivación y su practicidad para resolver las cosas. A mi co-directora Lore por su gran ayuda tanto experimental como profesional, por haberme acompañado durante todos estos años de Tesis. A las dos MUCHAS GRACIAS por su dedicación, por su paciencia, por sus críticas y sus consejos que fueron muy importantes para mí en esta etapa de formación y crecimiento.

A mis queridos "COMPAÑEROS DEL LAB 1"... Juli Q, Maby, Lu, Colo, Romi, Lucio, Nela, Ale P y a la más chiquita pero sabionda del grupete: Juli F, gracias a todos por permitirme entrar en su vida, por todos los momentos que compartimos dentro y fuera del laboratorio, gracias por su buena onda y por su ayuda siempre..aun desde la distancia!!

Al resto de mis "COMPAÑEROS CEFOBIANOS"... a todos y cada uno de ustedes...gracias por hacer del CEFOBI un lindo lugar para ir a trabajar

A mis "COMPAÑERAS y COMPAÑEROS DE LA FACU"..a mis "INSEPARABLES CUASI HERMANAS AMIGAS DE CHABAS".. A mi "GENTE LINDA DE CHABÁS" ..uhh son tantos que es imposible nombrarlos a todos!!! simplemente decirles que todos ocupan una parte muy importante en mi corazón

A "RAMI"...mi amor, mi eje, mi equilibrio... gracias por acompañarme siempre, por contagiarme tu tranquilidad y tu forma linda de ver las cosas

A "MI FAMILIA" y muy especialmente a la nueva integrante "ELENITA" gracias porque sin ustedes simplemente no sería quien soy.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMEN.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
ANGLICISMOS.....	X
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introducción.....	1
1.1 Características generales de los flavonoides.....	1
1.2 Síntesis, acumulación y roles biológicos de los flavonoides	2
1.3 Rutas de biosíntesis de los flavonoides.....	3
1.4 Regulación de la biosíntesis de flavonoides	6
1.5 Regulación de la biosíntesis de flavonoides en maíz	7
CAPÍTULO 2.....	8
2. Materiales y Métodos	8
2.1 Medios de cultivo	8
2.2 Cepas y plásmidos.....	9
2.3 Plantas de maíz y <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes y transgénicas	11
2.4 Oligonucleótidos utilizados	14
2.5 Material vegetal. Condiciones de crecimiento y líneas utilizadas	15
2.5.1 <i>Zea mays</i>	16
2.5.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.6 Tratamientos con radiación UV-B	16
2.6.1 Tratamientos de plantas de <i>Arabidopsis</i> para los análisis de expresión génica, ensayos bioquímicos y daño al ADN	16
2.6.2 Tratamientos de plantas de <i>Arabidopsis</i> para la determinación de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria.....	17
2.6.3 Tratamientos de plantas de maíz para los análisis de expresión génica	17

2.7 Purificación y cuantificación de ácidos nucleicos.....	18
2.7.1 Extracción de ADN genómico (método CTAB)	18
2.7.2 Extracción de ARN total.....	19
2.7.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	19
2.8 Cuantificación de ácidos nucleicos	20
2.9 Cuantificación del daño al ADN	21
2.10 Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
2.10.1 Tratamiento con ADNasaI y retrotranscripción	22
2.10.2 Amplificación de regiones codificantes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
2.10.3 Identificación de plantas transgénicas y verificación de la expresión del transgen mediante PCR	24
2.10.4 PCR en tiempo real.....	24
2.10.5 PCR de colonias	26
2.11 Clonado en el vector pGEM-T Easy.....	26
2.12 Clonado en los vectores pGZ25 y pET28a	26
2.13 Preparación de células competentes para la transformación	27
2.14 Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.....	28
2.15 Extracción de ADN plasmídico.....	28
2.16 Secuenciación	29
2.17 Transformación química de levaduras	29
2.18 Extracción, análisis y cuantificación de los flavonoles por HPLC	31
2.19 Determinación de parámetros de daño oxidativo.....	31
2.19.1 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	32
2.19.2 Liberación de electrolitos	32

2.20 Determinación de la concentración de clorofilas y carotenoides	33
2.21 Determinación del contenido de flavonoides totales	33
2.22 Determinación del contenido de antocianinas	34
2.23 Medida de la asimilación de CO ₂	34
2.24 Medición de la fluorescencia de la clorofila en estado estacionario	34
2.24.1 Rendimiento cuántico del fotosistema II	35
2.24.2 Rendimiento cuántico máximo del FSII	35
2.25 Determinación de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria	36
2.26 Observación microscópica de las células del parénquima en empalizada	36
2.27 Determinación del área de las rosetas de <i>A. thaliana</i>	37
2.28 Microscopía confocal	37
2.28.1 Tinción de núcleos con DAPI	37
2.28.2 Observación por microscopía confocal	38
2.29 Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	38
2.29.1 Transformación del huésped de expresión	38
2.29.2 Expresión de las proteínas recombinantes <i>ZmFNSI-1</i> y <i>AtDMR6</i>	39
2.29.3 Purificación de las proteínas recombinantes <i>ZmFNSI-1</i> y <i>AtDMR6</i>	39
2.30 Cuantificación de proteínas	40
2.31 Ensayos de actividad enzimática correspondientes a la caracterización de las distintas enzimas	40
2.31.1 Ensayos de bioconversión <i>in vivo</i> e actividad enzimática <i>in vitro</i>	40
2.31.2 Análisis de los productos flavonoides por HPLC y/o LC-MS	42
2.32 Obtención de anticuerpos	43
2.32.1 Preparación de la muestra a inocular	43
2.32.2 Inoculación del conejo	43

2.32.3 Obtención del suero del conejo	44
2.32.4 Purificación de los anticuerpos contra la proteína ZmFLS1	44
2.33 Preparación de extractos crudos proteicos	44
2.34 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	45
2.35 Ensayos de inmunodetección – <i>Western blot</i>	45
2.36 Análisis estadístico	46
2.37 Números de Acceso.....	46
CAPITULO 3.....	47
3.1 Introducción.....	47
3.1.1 Las plantas y la radiación UV-B.....	47
3.1.2 Las plantas y los flavonoles	48
3.1.3 Biosíntesis y regulación de los flavonoles.....	49
3.1.4 Efectos de la radiación UV-B en plantas.....	52
3.1.5 Lesiones producidas en el ADN tras la exposición a radiación UV-B	53
3.2 Objetivos.....	55
3.2.1 Objetivo general.....	55
3.2.2 Objetivos específicos	55
3.3 Resultados.....	56
3.3.1 Análisis de la expresión del transcrito <i>FLAVONOL SINTASA 1 (ZmFLS1)</i> en plantas de maíz luego de la exposición con radiación UV-B	56
3.3.2 Caracterización de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan la FLS1 de maíz	57
3.3.2.1 Análisis de la expresión del transcrito <i>ZmFLS1</i>	57
3.3.2.2 Obtención de anticuerpos de conejo anti-ZmFLS1. Análisis de los niveles de proteína <i>ZmFLS1</i>	60
3.3.2.3 Análisis del contenido de flavonoles en las plantas de <i>Arabidopsis</i> transgénicas y salvajes.....	61

3.3.3 Determinación de la localización subcelular de <i>ZmFLS1</i>	64
3.3.4 Estudio del rol protector de los flavonoles frente a la radiación UV-B en plantas de Arabidopsis	65
3.3.4.1 Cuantificación del daño al ADN luego de la exposición a radiación UV-B.....	66
3.3.4.2 Análisis de la expresión de enzimas que participan en los sistemas de reparación de plantas.....	67
3.3.5 Estudio de la tolerancia de las plantas de Arabidopsis a la radiación UV-B	69
3.3.5.1 Estudio del daño oxidativo en plantas de Arabidopsis expuestas a la radiación UV-B.....	69
3.3.5.2 Determinación de la pérdida de electrolitos en plantas de Arabidopsis expuestas a la radiación UV-B..	70
3.3.5.3 Ensayo de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por la radiación UV-B.....	72
3.3.5.4 Evaluación de la eficiencia fotosintética en plantas de Arabidopsis expuestas a radiación UV-B	73
3.3.6 Análisis de las células del parénquima en empalizada en plantas de Arabidopsis expuestas a la radiación UV-B	77
3.4 Discusión	80
CAPITULO 4.....	86
4.1 Introducción.....	86
4.1.1 Biosíntesis de flavonas en plantas.....	86
4.1.2 Rol de las flavonas en plantas	89
4.1.3 Las flavonas en maíz y su rol protector frente a la radiación UV-B	90
4.2 Objetivos.....	93
4.2.1 Objetivo general.....	93
4.2.2 Objetivos específicos	93
4.3 Resultados.....	94
4.3.1 Caracterización de enzimas monoxigenasas con un posible rol en la síntesis de flavonas en plantas de maíz.....	94

4.3.1.1	Identificación de un transcripto codificante para una putativa flavona sintasa II de maíz	94
4.3.1.2	Análisis de la expresión del gen <i>ZmFNSII-1</i> en plantas de maíz	95
4.3.1.3	Clonado y expresión de la proteína <i>ZmFNSII-1</i> en levaduras	96
4.3.1.4	Ensayos de actividad enzimática correspondientes a la caracterización de la enzima <i>ZmFNSII-1</i>	96
4.3.1.5	Identificación de los productos formados por distintos métodos analíticos	97
4.3.1.6	Identificación de genes codificantes para putativas FLAVONA SINTASA II de maíz	103
4.3.1.7	Análisis filogenético de enzimas CYP450 que participan en la síntesis de flavonas	104
4.3.1.8	Análisis de la expresión de los genes que codifican para las proteínas CYP93G6 y CYP93G7 en plantas de maíz	106
4.3.1.9	Clonado y expresión de las proteínas CYP93G6 y CYP93G7 en levaduras	107
4.3.2	Caracterización de enzimas dioxigenasas con un posible rol en la síntesis de flavonas en plantas de maíz y <i>Arabidopsis</i>	109
4.3.2.1	Identificación de genes codificantes para putativas flavona sintasas I en maíz y <i>Arabidopsis</i>	109
4.3.2.2	Análisis filogenético de enzimas 2-ODD que participan en la síntesis de flavonas	112
4.3.2.3	Análisis de la expresión del gen <i>ZmFNSI-1</i> en plantas de maíz	114
4.3.2.4	Clonado y expresión de las proteínas <i>ZmFNSI-1</i> y <i>AtDMR6</i> en bacterias	115
4.3.2.5	Ensayos de actividad enzimática de las enzimas <i>ZmFNSI-1</i> y <i>AtDMR6</i> mediante experimentos de bioconversión en <i>E. coli</i>	118
4.3.2.6	Purificación de las proteínas recombinantes <i>ZmFNSI-1</i> y <i>AtDMR6</i> y ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i>	120
4.3.2.7	Análisis de la complementación de plantas de <i>Arabidopsis</i> mutantes en <i>DMR6</i> y plantas de <i>Arabidopsis</i> que sobre-expresan la enzima <i>ZmFNSI</i> de maíz	123
4.4	Discusión	129
CAPITULO 5	136
5. Conclusiones	136
REFERENCIAS	138

RESUMEN

Los flavonoides son metabolitos secundarios con diversas funciones biológicas, distribuidos de forma ubicua en el reino vegetal. Formas primitivas de estos compuestos posiblemente acompañaron la adaptación de las plantas a la superficie de la Tierra. En particular, un subgrupo de estos metabolitos, los flavonoles, participan en la regulación del transporte de auxinas y son esenciales para la macho esterilidad en algunas especies vegetales. En este trabajo de Tesis, la utilización de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con mayores niveles de flavonoles, permitió demostrar mediante experimentos de acumulación de daño en el ADN, actividad fotosintética, daño a las membranas e inhibición de la elongación de la raíz primaria luego de un tratamiento con UV-B, que estos metabolitos cumplen roles protectores en las plantas frente a un tipo de estrés abiótico como la radiación UV-B; ejercido como efectivos filtros UV-B y/o debido a sus propiedades antioxidantes. Otro subgrupo de flavonoides se encuentra constituido por las flavonas producidas a partir de las flavanonas. En este trabajo de Tesis, mediante la expresión recombinante en sistemas heterólogos y análisis de LC-MS, se logró caracterizar por primera vez en maíz, dos enzimas con capacidad de sintetizar flavonas; una de ellas caracterizada como una flavanona 2-hidroxilasa (*ZmF2H1*) y la otra, como una enzima flavona sintasa I (*ZmFNSI-1*). Además, fue posible también demostrar que una especie Brassicácea como *Arabidopsis* contiene en su genoma un gen codificante a una enzima FNSI (*AtFNSI-1*) con capacidad de producir flavonas con un rol no identificado hasta el momento frente al ataque del patógeno oomicete *Hyaloperonospora parasítica*, un hecho nunca antes visto en esta especie vegetal.

ABREVIATURAS

Abs Absorbancia
ADN Ácido desoxirribonucleico
ADNasa I Desoxirribonucleasa I
ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario
ADN-T Segmento de ADN del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*
ANS Antocianidina sintasa
APS Amonio persulfato
ARN Ácido ribonucleico
ARNasa Ribonucleasa
ARNi ARN interferencia
ARNm Ácido ribonucleico mensajero
ATP Adenosín trifosfato
BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
BER Reparación por escisión de bases (del inglés, Base Excision Repair)
BMS (del inglés, Black Mexican Sweet)
BSA Albúmina sérica bovina (del Inglés, Bovine Serum Albumin)
C4'H Cinamato 4' hidroxilasa
CAD Cinamil alcohol deshidrogenasa
CCR2 Cinamoil CoA reductasa 2
CHI Chalcona isomerasa
ChIP Inmunoprecipitación de la cromatina
Chl Clorofila
CHS Chalcona sintasa
4CL 4-coumaroil CoA ligasa
Col 0 Columbia 0
CTAB Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DEPC Dietilpirocarbonato
DFR Dihidroflavonol 4-reductasa
dNTPs Desoxirribonucleótidos
DO Densidad óptica
DPCs Dímeros de pirimidina por formación de un anillo de ciclobutano
DPCs Dímeros de pirimidinas por formación de anillo de ciclobutano
DRM6 Downy mildew resistant 6
DTT Ditiotreitól
EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
EROs Especies reactivas del oxígeno
 F_m Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz.
 F_0 Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad.
F2H1 Flavanona 2 hidroxilasa 1
F3'H Flavanona 3' hidroxilasa

F3H Flavanona 3-hidroxilasa
FLS Flavonol sintasa
F_m Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a oscuridad.
FNS Flavona sintasa
F_t Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a luz.
Gal Galactosa
Glu Glucosa
gPF Gramo de peso fresco
GST Glutación S-transferasa
HCT Hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa
IFS Isoflavoina sintasa
IPTG Isopropil β-D tiogalactopiranosido
K Kaemferol
LB Medio de cultivo Luria-Bertani
LDOX Dioxigenasa de leucoantocianidina
Ler Landsberg *erecta*
M Mirecetina
MATE (del inglés, Multidrug and toxic extrusion compound)
MS Medio de cultivo Murashige and Skoog
NBT Azul de nitrotetrazolio
NER Reparación por escisión de nucleótidos
2ODD Dioxigenasa
PAL Fenilalanina amonioliasa
PBS Buffer fosfato salino
PCR Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)
PEG Polietilenglicol
PMSF Fenil metil sulfonil floururo
PR foto-reactivación
Q Quercetina
SCD (del inglés, Synthetic Complete Dextrose)
SDS Dodecil sulfato de sodio
TBA Ácido tiobarbitúrico
TBARS Sustancias reactivas al TBA
TBE Buffer Tris borato EDTA
TBS Buffer Tris salino
TCA Ácido tricloroacético
TE Buffer Tris EDTA
TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
UA Unidades de absorbancia
UGT UDP-glicosil transferasa
UV Ultravioleta
YNB (del inglés, Yeast Nitrogen Base)

ANGLICISMOS

Buffer: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo pH).

Dot blot: técnica que emplea la hibridización de ADN genómico desnaturalizado con hidróxido de sodio a una membrana apropiada, para un posterior revelado con anticuerpos específicos, los cuales detectan lesiones en el ADN.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

LC-MS: cromatografía líquida asociada a espectrometría de masa.

Pellet: precipitado.

SDS-PAGE: se refiere a la electroforesis en geles de policrilamida realizada en presencia del desnaturizante dodecil sulfato de sodio.

Western blot: técnica que emplea la transferencia de proteínas separadas electroforéticamente a una membrana apropiada para un posterior revelado con anticuerpos específicos.

CAPÍTULO 1. Introducción

CAPÍTULO 1

1 Introducción

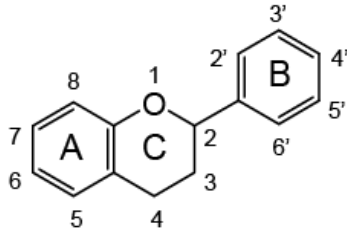
A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado la capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos fenólicos secundarios, los cuales no son requeridos en los procesos primarios de crecimiento y desarrollo, pero son de vital importancia para su interacción con el medio ambiente, para su estrategia reproductiva y sus mecanismos de defensa (Cheynier y col., 2013).

1.1 Características generales de los flavonoides

Los flavonoides representan un grupo muy extenso de metabolitos secundarios del tipo fenólico, con más de 10000 compuestos diferentes identificados y una distribución muy ubicua entre las plantas (Ferrer y col., 2008). Los mismos están compuestos estructuralmente por dos anillos aromáticos (anillo A y B) unidos por un heterociclo (anillo C) formando un esqueleto lineal C6-C3-C6 (Figura 1.1 A). Este esqueleto básico puede sufrir variadas sustituciones con importantes efectos en su función, solubilidad, movilidad, y degradación. Estas modificaciones varían según la especie pero consisten en general de hidroxilaciones, glicosilaciones, acilaciones, malonilaciones, prenilaciones y/o polimerizaciones (Winkel-Shirley, 2001).

Así, dependiendo de la organización y modificación de los tres anillos (A, B y C) podemos clasificar a los flavonoides en distintos subgrupos: *chalconas*, *flavonas*, *flavonoles*, *flavandioles* (o *leucoantocianidinas*), *antocianinas* y *proantocianidinas* (o *taninos condensados*, la forma polimerizada de los flavan-3-oles). Además, podemos considerar otros grupos encontrados sólo en algunas especies, tales como las *auronas* (Winkel-Shirley, 2001; 2006), los *flobafenos*, (la forma polimerizada de los flavan-4-oles; en maíz y ciertas gramíneas) (Mol y col., 1998; Grotewold, 2006) y las *isoflavonas* (en legumbres y un pequeño número de especies no leguminosas) consistiendo estas últimas, en modificaciones en el anillo B del esqueleto carbonado, el cual se condensa al átomo de carbono C-3 y no al C-2 a diferencia del resto de los flavonoides arriba mencionados (Figura 1.1 B).

(A)



(B)

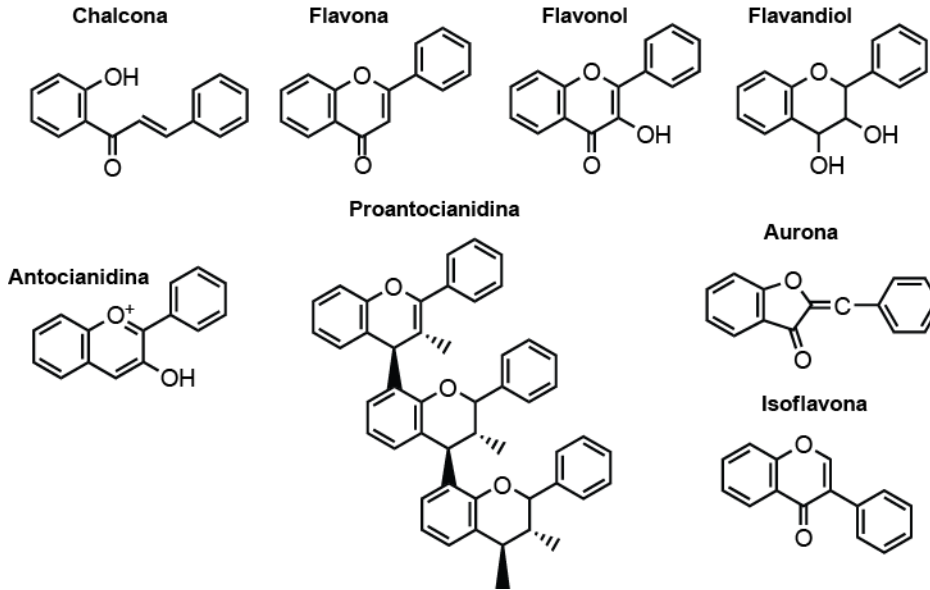


Figura 1.1 Estructura química general de los flavonoides. (A) Los flavonoides tienen una estructura de tres anillos (A, B, y C). Los anillos A y B corresponden a anillos de benceno, mientras que el anillo C se corresponde con un pirano. **(B)** Estructura de los distintos grupos de flavonoides.

1.2 Síntesis, acumulación y roles biológicos de los flavonoides

La síntesis de flavonoides comienza en complejos enzimáticos situados en la cara citosólica del retículo endoplasmático (Jorgensen y col., 2005). Algunas de las enzimas se localizan en el tonoplasto, donde ocurren los últimos pasos de glicosilación de los flavonoides intermediarios. Finalmente, los mismos se almacenan en vacuolas (por ejemplo, antocianinas y proantocianidinas) y/o pared celular (por ejemplo, flobafenos) (Aoki y col., 2000; Winkel, 2004); aunque también fueron localizados en el núcleo, la membrana celular y el citoplasma (Hutzler y col., 1998; Erlejman y col., 2004; Saslowsky y col., 2005; Naoumkina y Dixon, 2008). Por otra parte, la acumulación de

los flavonoides es a menudo específica para ciertos tipos celulares. Por ejemplo, a lo largo de la longitud de la raíz, los mismos se acumulan en la punta y en las células de la cofia (Mathesius y col., 1998a; Mathesius, 2001).

Los flavonoides pueden también ser transportados dentro y a través de las distintas células y tejidos. Dentro de la célula, los flavonoides se transportan a través de vesículas o por familias de transportadores de unión a membrana del tipo ABC (del inglés *ATP binding cassette*, ya que poseen una región de unión a ATP), o MATE (del inglés *Multidrug and toxic extrusion compound*, debido a que proteínas de esta familia participan en la extrusión de compuestos multidroga y tóxicos) (Zhao y Dixon, 2009). El transporte de los flavonoides hacia la vacuola puede estar mediado por la conjugación de los mismos con glutatión en el citoplasma, seguido por el transporte impulsado por ATP a través de bombas con actividad glutatión S-transferasa (Marrs y col., 1995; Mueller y col., 2000; Goodman y col., 2004). El uso de inhibidores de los distintos transportadores de tipo ABC permitió demostrar que el glutatión probablemente esté actuando como un vehículo transportador para los flavonoides.

Los distintos flavonoides cumplen roles vitales en la integridad estructural de las plantas, la fotoprotección UV, la reproducción y la regulación interna de la fisiología celular vegetal y de señalización (Mandal y col., 2010). Las funciones biológicas de los mismos están vinculadas a su potencial citotoxicidad y su capacidad para interactuar con las enzimas a través de la formación de complejos (Williams y col., 2004). En la actualidad resulta muy interesante entender las funciones biológicas y modos de actividad de los distintos flavonoides dado que, estas moléculas presentan numerosos beneficios en los seres humanos al ser parte integral de nuestra dieta, asociados al consumo de frutas y verduras tanto como, de vino y chocolate.

1.3 Rutas de biosíntesis de los flavonoides

Los flavonoides se sintetizan a través de la ruta de los fenilpropanoides, comenzando con la deaminación de un aminoácido aromático, la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), constituyendo este paso el punto de ramificación entre el metabolismo primario y el metabolismo secundario (Hahlbrock y Scheel, 1989; Lewis y Yamamoto, 1990; Dixon y col., 1992; Herrmann, 1995; Harborne,

2000). A continuación, dos enzimas sucesivas catalizan la formación de la molécula precursora de casi todos los fenilpropanoides conocidos, el *p*-coumaroil-CoA. Esta molécula, luego de la condensación con tres moléculas de malonil-CoA, da origen a las chalconas, a partir de las cuales derivan todos los flavonoides (Figura 1.2). La enzima que cataliza esta reacción de condensación se conoce como chalcona sintasa (CHS) y pertenece a la familia de sintasas policétidas de plantas, que junto a enzimas del tipo isomerasas, reductasas, hidroxilasas, dioxigenasas dependientes de Fe^{2+} /2-oxoglutarato, y varias transferasas, modifican la estructura básica de los flavonoides. La vía continúa con la condensación de las chalconas a flavanonas por acción de la enzima flavanona chalcona isomerasa (CHI). Cabe señalar que en algunas especies vegetales, las chalconas pueden también ser directamente convertidas a auronas.

Así, la generación de la flavanona naringenina, puede ser hidroxilada para formar los dihidroflavonoles por intermedio de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), los cuales pueden ser, por un lado reducidos a flavandioles iniciando la síntesis de antocianinas y/o proantocianidinas, a través de las enzimas dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y dioxigenasa de leucoantocianidina, respectivamente (LDOX, conocida también como antocianidina sintasa, ANS) (Davies y col., 2003; Turnbull y col., 2004; Wellmann y col., 2006) o por otro lado pueden ser oxidados a flavonoles por acción de la enzima flavonol sintasa (FLS) (Chua y col., 2008; Owens y col., 2008).

Alternativamente, la naringenina puede ser desaturada para generar flavonas por acción directa de las enzimas flavona sintasa I o II (FNSI/II) (Martens y col., 2001; Gebhardt y col., 2005; 2007); o alternativamente, dar las isoflavonas, por acción de la isoflavona sintasa (IFS) (Yu y Mcgonigle, 2005; Miadoková, 2009; Du y col., 2010; Wang, 2011) y los flavan 4-oles, la forma polimerizada de los flobafenos, por acción de la DFR. En la Figura 1.2 se muestra también la producción de las auronas a partir de las chalconas.

Finalmente, los distintos flavonoides pueden sufrir agregados de azúcares (C- u O- glicosilaciones), grupos metilos y/o fracciones acilo, estas modificaciones varían según la especie, por lo que distintas especies vegetales son capaces de sintetizar diferentes flavonoides.

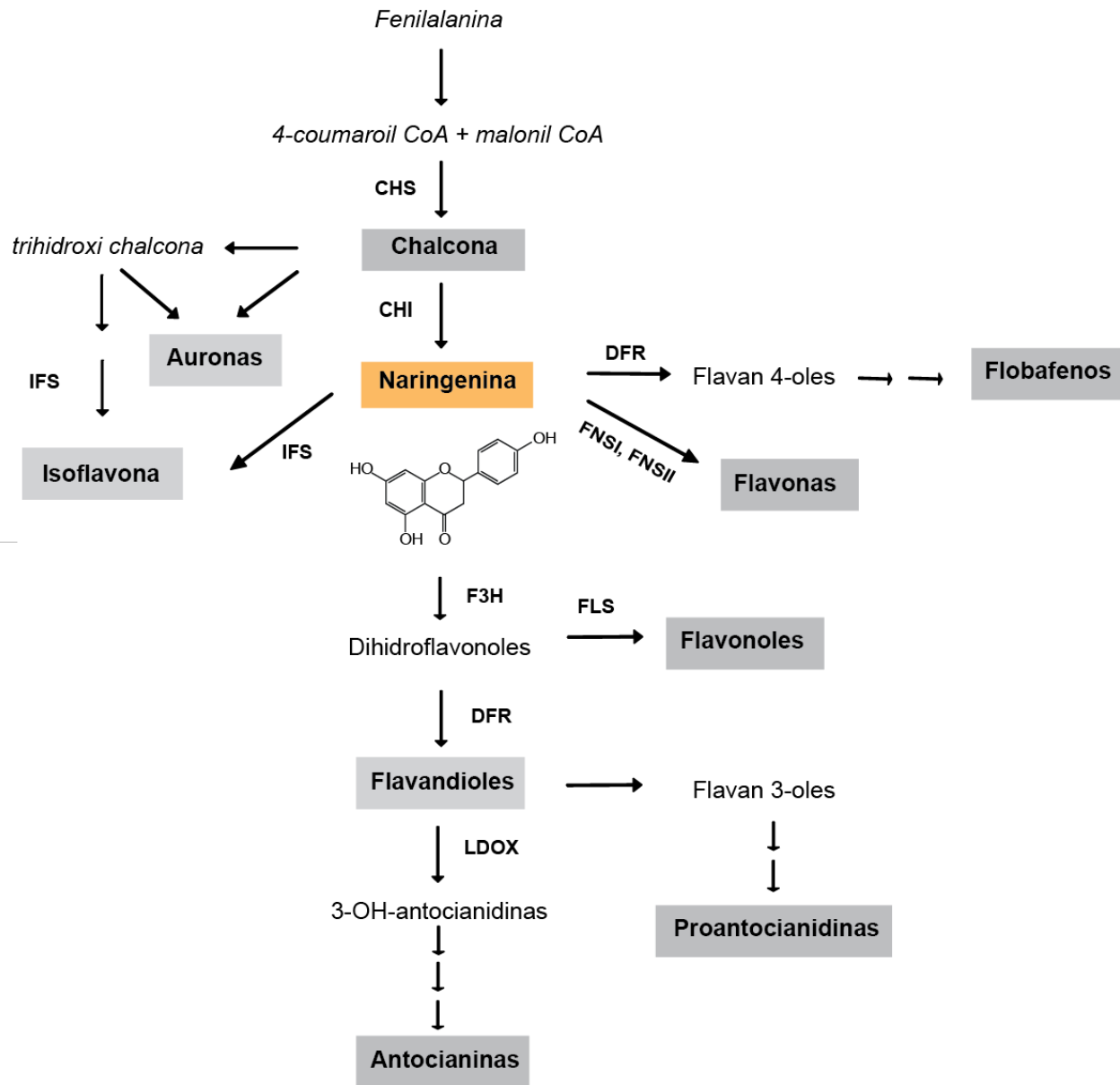


Figura 1.2 Principales rutas de biosíntesis de los flavonoides. En negrita se destacan algunas de las enzimas de la vía, abreviadas de la siguiente manera: CHS, chalcona sintasa; CHI chalcona isomerasa; DFR, dihidroflavonol reductasa; FNSI/II, flavona sintasa I/II; IFS, isoflavona sintasa; FLS, flavonol sintasa; F3H flavanona 3 hidroxilasa; LDOX, dioxigenasa de leucoantocianidina. En los recuadros color gris, se destacan las principales clases de compuestos discutidos en el texto. En el recuadro naranja se destaca la flavanona naringenina, mostrando su estructura correspondiente debajo del mismo (Adaptado de Hassan y Mathesius, 2012).

1.4 Regulación de la biosíntesis de flavonoides

Los genes de la biosíntesis de flavonoides se encuentran regulados por la interacción de diferentes familias de factores de transcripción. Los factores de transcripción son proteínas regulatorias con capacidad de modular la expresión de determinados grupos de genes a través de la unión a secuencias específicas en el ADN y a la interacción proteína-proteína con la maquinaria general de transcripción; las proteínas remodeladoras de la cromatina y/o con otros factores de transcripción. Los mismos se clasifican en familias principalmente en base a su dominio conservado de unión al ADN y pueden actuar como activadores o represores de la expresión génica, mediando tanto un aumento como una disminución en los niveles de transcrito de sus respectivos genes blanco.

La mayor parte de nuestro conocimiento sobre la regulación transcripcional de la vía de biosíntesis de flavonoides proviene del estudio de la síntesis de antocianinas en maíz (*Zea mays*) dado que, mutaciones en genes que participan en dicha biosíntesis, provocan variaciones en la pigmentación de la planta. De esta manera, mediante el uso de plantas mutantes por la inserción de transposones, muchos de los genes que participan en esta vía, incluyendo además a las proteínas reguladoras de la misma; han sido aislados y caracterizados (Mol y col., 1998). La regulación de la vía de los flavonoides ha sido también estudiada en otras especies vegetales, entre ellas familias de plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), petunia (*Petunia hybrida*) y boca de dragón (*Antirrhinum majus*) pudiéndose observar que los genes implicados en la ruta de antocianinas se encuentran regulados de manera general, por la interacción de 3 familias de factores de transcripción: (I) factores de transcripción pertenecientes a familias del tipo hélice-vuelta-hélice (bHLH, del inglés *basic-helix-loop-helix*) (Heim y col., 2003; Jones, 2004; Hichri y col., 2011); (II) proteínas con dominio mieloblastoma (R2R3-MYB), las cuales en su mayoría contienen dos repeticiones R con tres repeticiones imperfectas, cada una con 53 aminoácidos organizados en una estructura hélice-giro-hélice (del inglés, *helix-turn-helix*) (Stracke y col., 2001; Hichri y col., 2011; Czemmél y col., 2012) y, (III) proteínas WD40, que poseen cuatro o más copias de repeticiones WD (triptofano-aspartato), un motivo de secuencia que codifica una repetición estructural con una longitud aproximada de 31 aminoácidos (DeVetten y

col., 1997; Stracke y col., 2001; Heim y col., 2003; Jones, 2004; Hichri y col., 2011; Czernmel y col., 2012). De esta manera, la expresión combinada de los factores de transcripción R2R3-MYB, bHLH, WD40 y sus interacciones en complejos ternarios, determinan la activación, y expresión espacial y temporal de los genes estructurales de la biosíntesis de todos los flavonoides (DeVetten y col., 1997; Stracke y col., 2001; Heim y col., 2003; Jones, 2004; Quattrocchio y col., 2006; Hichri y col., 2011; Czernmel y col., 2012).

1.5 Regulación de la biosíntesis de flavonoides en maíz

En maíz, se han caracterizado al menos dos vías de biosíntesis de flavonoides, reguladas de manera positiva e independiente. Una vía genera 3-hidroxi flavonoides, incluyendo antocianinas y es regulada por las proteínas con dominio R2R3-MYB: C1 (del inglés, *Colorless1*) o PL1 (del inglés, *Purple plant1*), las cuales interactúan físicamente con las proteínas con dominio bHLH, R (del inglés, *Red1*) o B (del inglés, *Booster1*) respectivamente; cada miembro con un patrón de expresión específico del tejido y del estadio de desarrollo (Mol y col., 1998; Grotewold y col., 2000; Irani y col., 2003; Hernandez y col., 2004). Así, la introducción de los genes C1 y R en células BMS (del inglés, *Black Mexican Sweet*) de maíz y otras plantas, es suficiente para inducir la pigmentación causada por la acumulación de antocianinas (Grotewold y col., 1998). La segunda vía produce C-glicosil flavonas, 3-deoxiflavonoides y flobafenos, y requiere de un grupo diferente de proteínas con dominio R2R3-MYB, P1 (del inglés, *Pericarp1*) o su homólogo P2 (del inglés, *Pericarp2*) (Grotewold y col., 1994; 2006), mostrando un patrón de expresión específico del tejido, las cuales actúan independientemente de las proteínas R/B y C1/PL1. No obstante, la expresión de algunos genes comunes en la vía es regulada por ambos grupos de factores de transcripción. Un ejemplo lo constituye la activación tanto por P1 como por C1/R, de las enzimas de la síntesis de flavonoles *ZmFLS1* y *ZmFLS2* (Falcone Ferreyra y col., 2010 y 2012).

CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos

CAPÍTULO 2

2. Materiales y Métodos

2.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados en este trabajo de Tesis se detallan en la siguiente tabla:

Tabla I. Medios de cultivos utilizados

Medios de Cultivo	
Medio Luria-Bertani o LB -0,5% (p/v) extracto de levaduras -1% (p/v) peptona -0,5% (p/v) NaCl	Medio LB-agar Medio LB con 1,5% (p/v) agar-agar.
Medio YPD -1% (p/v) extracto de levaduras -2% (p/v) peptona -2% (p/v) glucosa	Medio YPD-agar Medio YPD con 2% (p/v) agar-agar.
Medio SCD-UW -0,17% (p/v) YNB (Yeast Nitrogen Base), sin aminoácidos ni amonio. -0,5% (p/v) sulfato de amonio -2% (p/v) glucosa -0,1% (p/v) Drop-out (Medio completo conteniendo todos los aminoácidos y bases excepto los que se usan para selección, en este caso uracilo y triptófano)	Medio SCD-UW-agar Medio SCD-UW con 2% (p/v) agar-agar

Medio de Cultivo	
<p>Medio SCgal-UW -0,17% (p/v) YNB (Yeast Nitrogen Base), sin aminoácidos ni amonio. -0,5% (p/v) sulfato de amonio -2% (p/v) galactosa -0,1% (p/v) Drop-out (Medio completo conteniendo todos los aminoácidos y bases excepto los que se usan para selección, en este caso uracilo y triptófano)</p>	<p>Medio SCgal-L-Agar Medio SCgal-UW con 2% (p/v) agar-agar</p>

2.2 Cepas y plásmidos

Las cepas bacterianas, las cepas de levaduras y los plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis se detallan en las siguientes tablas:

Tabla II. Cepas bacterianas utilizadas

Cepa Bacteriana	Fenotipo
<i>E. coli</i> K12 DH5 α	<i>recA endA thi hsdR supE relA deoR lac</i> [Φ 80, <i>lacZ</i> Δ M15]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>pLys</i>	<i>ompT hsdSB (rB-, mB-) gal1 dcm</i> [λ DE3]
<i>E. coli</i> Rosetta2 (DE3)	<i>F ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE (cm^r)</i> , [<i>argU, argW, glyT, lleX, leuW, metT, proL, thrT, thrU, tyrU</i>]
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Resistente a rifampicina

Tabla III. Cepa de levadura utilizada

Cepa de levadura	Fenotipo
<i>S. cerevisiae</i> WATT11	Esta cepa fue generada por integración de la NADPH-citocromo P450 reductasa de <i>A. thaliana</i> bajo el promotor Gal10. <i>Ura+</i> , <i>Trp-</i> (proporcionada por el Dr. P. Urban)

Tabla IV. Plásmidos utilizados

Plásmido	Características
pGEM-T Easy ¹	<i>bla</i> ⁺ , 3018 pb, <i>ori</i> fl, <i>lacZ</i> (SMC), linealizado con <i>EcoRI</i> y con timidinas agregadas en los extremos 3'
pGEMT- <i>ZmF2H1</i> ³	<i>bla</i> ⁺ , pGEM-T Easy:región codificante de <i>ZmF2H1</i> de <i>Z. mays</i> , flanqueada por sitios <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i> (5' y 3' respectivamente) con codón de terminación
pGEMT- <i>ZmCYP93G6</i> ³	<i>bla</i> ⁺ , pGEM-T Easy:región codificante de <i>CYP93G6</i> de <i>Z. mays</i> , flanqueada por sitios <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i> (5' y 3' respectivamente) con codón de terminación
pGEMT- <i>ZmCYP93G7</i> ³	<i>bla</i> ⁺ , pGEM-T Easy:región codificante de <i>CYP93G7</i> de <i>Z. mays</i> , flanqueada por sitios <i>BamHI</i> y <i>EcoRI</i> (5' y 3' respectivamente) con codón de terminación
pGEMT- <i>AtDMR6</i> ³	<i>bla</i> ⁺ , pGEM-T Easy:región codificante de <i>DMR6</i> de <i>A. thaliana</i> , flanqueada por sitios <i>NdeI</i> y <i>EcoRI</i> (5' y 3' respectivamente) con codón de terminación
pENTR- <i>ZmFNSI-1</i> ²	<i>kan</i> ⁺ , 2580 pb. pENTR-D-Topo:región codificante de <i>ZmFNSI-1</i> de <i>Z. mays</i> , flanqueada por sitios <i>attL1</i> y <i>attL2</i> con codón de terminación

pGZ25	<i>bla</i> ⁺ , 5741 pb. Vector dual que contiene un origen de replicación para <i>E. coli</i> (ori pBR322) y un origen para replicación en <i>S. cerevisiae</i> (ori 2μ). Utiliza TRP2 como marcador de selección revirtiendo auxotrofia de triptofano en levaduras. Deriva del pYEpLac112, en el cual en el sitio <i>HindIII</i> se insertó el promotor fuerte y constitutivo del gen <i>gliceraldehído-3P deshidrogenasa (GDP)</i> de <i>S. cerevisiae</i> (proporcionado por el Dr. E. Grotewold, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA)
pGZ25-ZmF2H13	<i>bla</i> ⁺ , pGZ25:región codificante de ZmF2H1 de <i>Z. mays</i> , clonada en los sitios <i>BamHI-EcoRI</i> del sitio de múltiple clonado
pGZ25-ZmCYP93G63	<i>bla</i> ⁺ , pGZ25:región codificante de ZmCYP93G6 de <i>Z. mays</i> , clonada en los sitios <i>BamHI-EcoRI</i> del sitio de múltiple clonado
pGZ25-ZmCYP93G73	<i>bla</i> ⁺ , pGZ25:región codificante de ZmCYP93G7 de <i>Z. mays</i> , clonada en los sitios <i>BamHI-EcoRI</i> del sitio de múltiple clonado
pET28a4	<i>kan</i> ⁺ , 5369 pb, ori f1, <i>lacI</i> , SMC, ori <i>ColE1</i> , vector de expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor y de las señales de inicio de la traducción del bacteriófago T7, fusión a histidinas para permitir su fácil purificación
pET28-AtDMR63	<i>Kan</i> ⁺ , pET28:región codificante de DMR6 de <i>A. thaliana</i> , clonada en los sitios <i>NdeI-EcoRI</i> del sitio de múltiple clonado
pET28-ZmFNSI-13	<i>Kan</i> ⁺ , pET28:región codificante de FNSI-1 de <i>Z. mays</i> , clonada en los sitios <i>BamHI-EcoRI</i> del sitio de múltiple clonado

¹Promega ²Disponibles en el laboratorio ³construidos en este trabajo de tesis ⁴Novagen
bla⁺: resistencia a ampicilina *kan*⁺: resistencia a kanamicina

2.3 Plantas de maíz y *Arabidopsis thaliana* mutantes y transgénicas

Las distintas líneas de maíz y Arabidopsis utilizadas en este trabajo de Tesis se detallan en la siguiente tabla:

Tabla V Plantas de maíz y Arabidopsis utilizadas

Línea de maíz	Ecotipo	Descripción
Salvaje	B73	
W23 ^{B1,PL1}	W23	Línea isogénica que contiene los alelos regulatorios <i>B1</i> y <i>PL1</i> , sintetiza flavonoides y antocianinas
W23 ^{b1, pl1}	W23	Línea deficiente en flavonoides y antocianinas
P1-rr ^{A619}	A619	Expresa el regulador de la síntesis de flavonoides <i>P1</i> . (tejidos proporcionados por la Lic. María Isabel Casas (The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA), provenientes de plantas crecidas a campo durante el verano)
P1-ww ^{A619}	A619	No expresa el regulador de la síntesis de flavonoides <i>P1</i> . (tejidos proporcionados por la Lic. María Isabel Casas (The Ohio State University, Estados Unidos), provenientes de plantas crecidas a campo durante el verano)

Línea de Arabidopsis	Ecotipo	Descripción
Salvaje	Columbia 0 (Col 0)	
Salvaje	Landsberg <i>erecta</i> (Ler)	
p35S: <i>ZmFLS1</i>	Col 0	Expresa la región codificante de <i>FLS1</i> de maíz bajo el control del promotor 35S
p35S: <i>ZmFLS1-GFP</i>	Col 0	Expresa la región codificante de <i>FLS1</i> de maíz con fusión traduccional a GFP bajo el control del promotor 35S
p35S: <i>ZmFNSI-1</i>	Col 0	Expresa la región codificante de <i>FNSI-1</i> de maíz bajo el control de promotor 35S
<i>dmr6-1</i>	Ler	Plantas de <i>A. thaliana</i> mutantes nulas en <i>DMR6</i> . Poseen una mutación puntual simple en el segundo exón que cambia el codón TGG (W, aminoácido 141) por el codón de terminación TGA. Se genera una proteína no funcional. Proporcionadas por el Dr. Guido Van den Ackerveken (Utrecht, Países Bajos)
p35S: <i>ZmFNSI-1^{comp}</i>	Ler	Plantas mutantes nulas de <i>A. thaliana</i> en <i>DMR6</i> (<i>dmr6-1</i>) que expresan la región codificante de <i>FNSI-1</i> de maíz bajo el control del promotor 35S (Complementadas) (proporcionadas por el Dr. Guido Van den Ackerveken, Utrecht, Países Bajos)

2.4 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de Tesis se detallan en la siguiente tabla:

Tabla VI. Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia
LP-AtCPK3-RT	5'CGCTGAGAACCTTTCTGAAG3'
RP-AtCPK3-RT	5'CCATCTCCATCCATATCAGC3'
LP-AtCBP20-RT	5' CCGGCCTATTCGTGTGGATTTTGA3'
RP-AtCBP20-RT	5'CATAATTCGTTGGCGCAGCTTGAG3'
LP-AtUVR2-RT	5'GACCCGAGTGGATATGTTGG3'
RP-AtUVR2-RT	5'GAGCTGTTCTTCAGCTTTCC3'
LP-AtUVR3-RT	5'TTCAACCGCATCTACTCTCC3'
RP-AtUVR3-RT	5'TCTTCCTCTTGCACTCCTTG3'
LP-ZmTRXlike-RT	5'GGACCAGAAGATTGCAGAAG3'
RP-ZmTRXlike-RT	5'ACGGATGTCCCATGAAGA3'
LP-ZmActina-RT	5'CTTCGAATGCCCAGCAAT3'
LP-ZmActina-RT	5'CGGAGAATAGCATGAGGAAG3'
LP-ZmFLS1-RT	5'GACGGTGAACAAGGAGAAGAC3'
RP-ZmFLS1-RT	5'ATCTTGCAGTGCTGGTAGTCC3'
LP-ZmF2H1-RT	5'CGGTCCATCCAAATTCAG3'
RP-ZmF2H1-RT	5'ACCAACATCGAACGGGTA3'

Oligonucleótido	Secuencia
LP-ZmCYP93G6-RT	5'GTAGCGGCACTCGTGCAGTGC3'
RP-ZmCYP93G6-RT	5'CAGGACACGTGGAAGACACGC3'
LP-ZmCYP93G7-RT	5'CAAGATCGACATGTCCGGAGTC3'
RP-ZmCYP93G7-RT	5'GCATGGTATCCACATTCTTCG3'
LP-ZmFNSI-1-RT	5'CCCATGGTCTCCTTGAAATC3'
RP-ZmFNSI-1-RT	5'AGGAGAAGGCCAAGCTCTACT3'
LP-prom35S	5'CTATCCTTCGCAAGACCCTTC3'
RP-ZmFLSexon1	5'CTCGATCTGATCGCCGATATGGA3'
RP-GFP	5'CTGCAGTCAAGCTTTGTATAGTTCATC3'
LP-AtDMR6-NdeI	5'ACAGCATATGGCGGCAAAGCTGATATCCACCGGT3'
RP-AtDMR6-BamHI	5'TGTCAGGATCCTTAGTTGTTTAGAAAATTCTCGAGGC3'
LP-ZmF2H1-BamHI	5'CACTAGGATCCATGGAAGCTGATGCTGCT3'
RP-ZmF2H1-EcoRI	5'CGACGGAATTCCTACGTAGCCGCTCTTGC3'
LP-ZmFNSI-1-NdeI	5'AGGAGAAGGCCAAGCTCTACT3'
RP-ZmFNSI-1-EcoRI	5'AGGAGAAGGCCAAGCTCTACT3'
LP-ZmCYP93G6-BamHI	5'CACTAGGATCCATGCACATCCGCCTTGGC3'
RP-ZmCYP93G6-EcoRI	5'CGACGGAATTCCTATACGACGGGCGGGAA3'
LP-ZmCYP93G7-BamHI	5'CACTAGGATCCATGGAAGAGCAGCAGCCC3'
RP-ZmCYP93G7-EcoRI	5'CGACGGAATTCCTAGACGACGGCCGGGAA3'

2.5 Material vegetal. Condiciones de crecimiento y líneas utilizadas

2.5.1 *Zea mays*

Se emplearon las semillas de maíz descritas en la Tabla V. Las mismas se germinaron en placas de Petri entre hojas de papel de filtro durante dos días a 30°C. Posteriormente se transfirieron a tierra y se crecieron en invernadero bajo luz blanca, en condiciones de fotoperíodo, humedad y temperatura controladas ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo 14 h luz y 10 h oscuridad, 25°C).

2.5.2 *Arabidopsis thaliana*

Se emplearon las semillas de *Arabidopsis* descritas en la Tabla V. Las mismas se sembraron en vasos plásticos o bandejas plásticas conteniendo tierra humedecida y esterilizada previamente. Posteriormente se cubrieron con un film e incubaron de 48 a 72 h en oscuridad, a 4°C (estratificación). A continuación se trasladaron a cámara de cultivo y se crecieron bajo luz blanca, en condiciones de fotoperíodo, humedad y temperatura controladas ($100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperíodo 16 h luz y 8 h oscuridad, 23°C). Alternativamente, para los crecimientos en medio sólido, las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas previamente y sembradas en las placas conteniendo medio MS (del inglés, *Murashige and Skoog*) suplementado con 1,5% (p/v) de sacarosa y 0,8 % (p/v) de agar. Por otra parte, para los análisis de complementación en plantas de *Arabidopsis* (sección 4.3.2.7) se adicionó además una concentración 200 μM del flavonoide naringenina. Las placas se incubaron en oscuridad de 48 a 72 h a 4°C y finalmente fueron también trasladadas a la misma cámara de cultivo.

2.6 Tratamientos con radiación UV-B

2.6.1 Tratamientos de plantas de *Arabidopsis* para los análisis de expresión génica, ensayos bioquímicos y daño al ADN

Los tratamientos de las plantas de *Arabidopsis* con radiación UV-B para los análisis de expresión génica, ensayos bioquímicos y daño al ADN se llevaron a cabo en cámara de cultivo, utilizando plantas crecidas durante 4 semanas en tierra en las

condiciones indicadas en la sección 2.5.2. A continuación, las plantas se expusieron a lámparas que emiten dicha radiación colocadas 30 cm por encima de éstas (F40UV-B 40 W y TL 20 W/12, Philips, Eindhoven, Holanda).

Para la **condición tratada** o **UV-B** dichas lámparas se cubrieron con filtros de acetato de celulosa con el objetivo de filtrar las longitudes de onda correspondientes al UV-C pero permitir el paso de la radiación UV-B, UV-A y visible, consiguiendo una irradiancia de 2 W.m^{-2} de UV-B y $0,6 \text{ W.m}^{-2}$ de UV-A y, para la **condición control** o **no UV-B**, las lámparas se cubrieron además de con los filtros anteriormente mencionados, con filtros plásticos de poliéster claro de $100 \mu\text{m}$, con el objetivo de absorber también la radiación UV-B, sin disminuir significativamente las radiaciones UV-A o visible. El tratamiento se realizó durante 4 h, y en todos los casos, inmediatamente después de finalizado el mismo, se recogieron las muestras en N_2 líquido, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

La radiación suministrada en cada uno de los tratamientos en todos los experimentos se registró utilizando un detector de radiación UV-A y UV-B (Ultraviolet Radiometer Modelo UV203, Macam Photometrics Ltd., Livingston, Escocia), el cual se calibró para las diferentes fuentes de luz con un espectroradiómetro, según las especificaciones del Laboratorio Nacional de Física de Escocia.

2.6.2 Tratamientos de plantas de Arabidopsis para la determinación de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria

Los tratamientos de las plantas de Arabidopsis con radiación UV-B para la determinación de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria se llevaron a cabo dentro de un flujo laminar, utilizando plántulas crecidas durante 8 días en medio MS en las condiciones indicadas en la sección 2.5.2, las cuales habían sido colocadas en forma vertical para permitir la elongación de las raíces a lo largo de la misma. El tratamiento se realizó durante 90 min, y una vez finalizado, las placas se trasladaron nuevamente a la cámara de cultivo para su posterior análisis.

2.6.3 Tratamientos de plantas de maíz para los análisis de expresión génica

Los tratamientos de las plantas de maíz con radiación UV-B para los análisis de expresión génica se llevaron a cabo en invernadero, utilizando plantas crecidas durante 4 semanas en tierra en las condiciones indicadas en la sección 2.5.1. A continuación, las plantas se expusieron a las mismas lámparas y a las mismas condiciones de irradiancia mencionadas en las secciones anteriores, pero en este caso el tratamiento se realizó por 8 h. En todos los casos, inmediatamente después de finalizado el mismo, se recogieron las muestras en N₂ líquido, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis

2.7 Purificación y cuantificación de ácidos nucleicos

2.7.1 Extracción de ADN genómico (método CTAB)

La extracción de ADN se realizó pulverizando 100 mg de tejido (previamente almacenado a -80°C) con N₂ líquido. A continuación, se agregaron 0,6 ml de buffer de extracción (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 2% (p/v) bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)). La mezcla resultante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se incubó a 65°C durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron 0,3 ml de cloroformo, invirtiendo suavemente los tubos durante 1 min y luego la mezcla se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min. Posteriormente, el sobrenadante acuoso se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo. A continuación, se agregaron 0,5 ml de isopropanol y la solución se incubó a -20°C durante 20 min. El ADN precipitado se recuperó por centrifugación durante 10 min a velocidad máxima a 4°C y se lavó con 0,5 ml de 70% (v/v) etanol, mezclando suavemente para eliminar el exceso de sales. A continuación, la solución se centrifugó durante 5 min a 7500xg y se descartó el sobrenadante. El sedimento se secó al vacío y, finalmente, el ADN purificado se resuspendió en 20 µl de H₂O destilada, ó alternativamente en 105 µl (para los ensayos de dot blot), mezclando suavemente hasta resuspensión total. Se llevó a cabo una incubación a 60°C para favorecer la disolución. Los extractos de ADN genómico obtenidos fueron conservados a -20°C hasta su posterior utilización.

2.7.2 Extracción de ARN total

Se extrajo ARN total a partir de tejido de plantas de Arabidopsis y maíz utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen). Se procesaron aproximadamente 100 mg por muestra de tejido (fresco o almacenado a -80°C) en mortero con N₂ líquido, hasta la formación de un fino polvo que a continuación se transfirió con espátula a un tubo de 1,5 ml. Luego, se adicionaron 1ml del reactivo TRIzol®, se mezcló y se incubó en hielo mientras se procesaban del mismo modo todas las muestras. A continuación, se incubaron todas las muestras durante 5 min a temperatura ambiente. El siguiente paso fue añadir 200 µl de cloroformo, e invertir vigorosamente la mezcla durante 15 seg. Luego de incubar las muestras de 2 a 3 min a temperatura ambiente, las mismas se centrifugaron durante 15 min a 12.000xg a 4°C. La fase superior, acuosa e incolora obtenida se transfirió a un nuevo tubo en el cual se procedió a precipitar el ARN adicionando 500 µl de isopropanol e invirtiendo el tubo con suavidad. Estas muestras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente antes de ser centrifugadas a 12.000xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante resultante se descartó y el sedimento viscoso de ARN, que precipita en el fondo del tubo, se lavó con 1 ml de etanol 75% (v/v), se mezcló y luego se centrifugó a 7500xg durante 5 min a 4°C. Nuevamente se descartó el sobrenadante y el ARN sedimentado se secó durante 15 min al vacío. Finalmente se disolvió en 50 µl de agua destilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) mezclando suavemente hasta resuspensión total y posteriormente se llevó a cabo una incubación a 60°C para favorecer la disolución. Los extractos de ARN obtenidos fueron conservados a -80°C hasta su posterior utilización.

El agua destilada libre de ARNasas se obtuvo añadiendo DEPC hasta una concentración de 0,1% (v/v). La solución se agitó vigorosamente, se incubó durante 16 h a temperatura ambiente bajo campana y se esterilizó durante 20 min.

2.7.3. Electroforesis en geles de agarosa

El ADN genómico, el ARN total y los productos obtenidos por PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración (1% o 2% (p/v)) de acuerdo a los tamaños esperados de los fragmentos a resolver,

siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook y Russell (2001). Para la preparación de los geles, la agarosa se disolvió en buffer TBE 0,5X (45 mM Tris base; 45 mM H₃BO₃; 1 mM EDTA) y previo a la solidificación del gel se adicionó SYBR[®] Safe 1.000X (Invitrogen) a una concentración final de 1X para observar la distribución de las bandas. Previo a la siembra, las muestras se diluyeron 1:5 con solución de siembra 5X, (30% (v/v) glicerol; 0,25% (p/v) xilencianol; 0,25% (p/v) azul de bromofenol).

En todos los casos se empleó TBE 0,5X como solución de corrida electroforética y se sembraron marcadores de peso molecular junto con las muestras en estudio, para estimar los tamaños moleculares de las bandas de interés. Se utilizaron los marcadores de ADN del fago λ (0,5 μ g) digerido con *EcoRI/HindIII* (Promega), o 4 μ l de marcadores de 50 o 100 pb (PBL, Productos Biológicos[®]), según cual fuere el más conveniente en cada caso. La intensidad de corriente empleada varió entre 50 y 100 V. Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos se visualizaron utilizando un transiluminador UV (longitud de onda de trabajo: 302 nm, equipo BioChemi System, UVP Bioimaging Systems). Las imágenes digitalizadas de los geles de agarosa se muestran como imágenes negativas.

2.8 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración y calidad de la preparación de ácidos nucleicos en solución se determinó espectrofotométricamente (Sambrook y Russell, 2001). Para cuantificar la cantidad de ADN se realizaron diluciones apropiadas de las muestras en buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) y se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm. Se considera que 1 unidad de absorbancia a 260 nm (camino óptico de 1 cm) corresponde a una concentración de 50 μ g.ml⁻¹ de ADN doble hebra y a 40 μ g.ml⁻¹ de ácidos nucleicos monocatenarios. Un valor de Abs260/Abs280 comprendido entre 1,7 y 2,1 indica una pureza apropiada de la preparación respecto a contaminantes proteicos (Sambrook y Russell, 2001).

Alternativamente, se utilizó el sistema Quanti-IT DNA HS assay Kit (Invitrogen) para la cuantificación de ADN, o el sistema Quanti-IT RNA assay kit (Invitrogen) para la cuantificación de ARN. También se estimó la concentración de las soluciones de ácidos nucleicos mediante densitometría. Para ello, volúmenes conocidos de la muestra de

interés y de un marcador de peso molecular proveniente del fago λ digerido con las enzimas *EcoRI/HindIII* (Promega) se sembraron en un gel de agarosa 1% (p/v) (sección 2.7.3), y posteriormente se compararon las intensidades de las bandas presentes en ambas fracciones, observadas en presencia de UV en el gel teñido con SYBR[®] Safe 1.000X. La integridad de los ácidos nucleicos se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) (Sambrook y Russell., 2001).

2.9 Cuantificación del daño al ADN

El protocolo para medir dímeros de pirimidinas por formación de un anillo de ciclobutano (DPCs) se adaptó del descrito por Stapleton y Walbot (1994). Se utilizaron muestras de hojas de *Arabidopsis* salvajes y transgénicas *p35S:ZmFLS1* (Tabla V), tratadas con radiación UV-B según como se indica en la sección 2.6.1.

Para la realización del análisis de cuantificación del daño al ADN o dot blot, fracciones de 2 μ g de ADN obtenidas a partir de 6 muestras para cada condición (UV-B o no UV-B) se sembraron en una membrana de nylon Hybond (GE Healthcare). La membrana se colocó 1 h a 80°C, y posteriormente se bloqueó con 5% (p/v) leche descremada en polvo en buffer TBS (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl NaCl) durante al menos 1 h a 4°C con agitación continua. Luego, se lavó la membrana con buffer TBS y la misma se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-DPCs (1:2.000 en buffer TBS, Cosmo BioCo Ltd, Japón), también a 4°C y con agitación. El anticuerpo no unido se lavó con buffer TBS. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina durante al menos 1 h a 20°C, agitando continuamente. La membrana se lavó y se procedió al revelado con 10 ml de una solución conteniendo 30 μ l de NBT 30 mg.ml⁻¹ y 30 μ L de BCIP 15 mg.ml⁻¹ en buffer sustrato (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂), dejando reaccionar en oscuridad hasta observar aparición de color. Para cortar la reacción se lavó con agua destilada.

Las imágenes de las membranas se adquirieron utilizando el digitalizador de imágenes-cuarto oscuro EpiChemi3 de UVP, y la densitometría se realizó usando el software Gel-Pro.

El daño al ADN se cuantificó normalizando los valores obtenidos de los dot blots a las concentraciones de dichos ADNs, determinadas mediante absorbancia a 260 nm y densitometría (sección 2.1.8).

2.10 Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.10.1 Tratamiento con ADNasa I y retrotranscripción

El tratamiento del ARN obtenido con ADNasa I se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron 2 μ g de ARN total con 2 U de la enzima RQ1 DNase I (Promega) durante 1 h a 37° C en un buffer de reacción 1X, inactivando luego la enzima con el agregado de 1 μ l de solución Stop (ambas soluciones provistas por el fabricante).

La reacción de síntesis de la primera hebra de ADNc se desarrolló en un volumen final de 20 μ l. Se incubó un volumen equivalente a 2 μ g de ARN total tratado con ADNasa I (11 μ l) con 1 μ g de oligo(dT)₁₂₋₁₈ en un volumen final de 12 μ l y se colocó a 70°C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se enfrió rápidamente en hielo y se centrifugó brevemente. Luego se añadieron los siguientes componentes al tubo de reacción: buffer 1X (suministrado por el fabricante de la enzima); dNTPs a una concentración final de 0,1 mM, y agua libre de ARNasas hasta completar un volumen de 19 μ l. Se incubó a 42°C durante 5 min y finalmente se adicionaron 200 U de la transcriptasa reversa Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo incubando la mezcla a 42°C durante 2 h y luego se inactivó la transcriptasa reversa incubando los tubos durante 15 min a 70°C. Posteriormente, las muestras se almacenaron en freezer a -20 °C hasta su posterior utilización.

2.10.2 Amplificación de regiones codificantes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de la región codificante de *ZmF2H1* a partir de ADNc de pericarpios de la línea P1-rr^{A619} se realizó utilizando el buffer G (Kit Epicentre) y la enzima Taq polimerasa proporcionada por el fabricante.

Las amplificaciones de las regiones codificantes de *ZmCYP93G6* y *ZmCYP93G7* se realizaron a partir de ADNc proveniente de hipocótilos y barbas de la línea B73, respectivamente, utilizando la enzima Phusion Taq polimerasa (Thermo) y el buffer GC proporcionado por el fabricante, agregando además 3% de DMSO al medio de reacción.

La amplificación de la región codificante de *AtDMR6* a partir de ADNc de hojas de 4 semanas y la re-amplificación de la región codificante de *ZmFNSI-1* clonada en el vector pENTRY (Tabla IV) se realizaron utilizando la combinación de GoTaq ADN Polimerasa (Promega)/Pfu (Promega). En el último caso se utilizó como molde 1 ng del plásmido pENTR-ZmFNSI-1 (Tabla IV) utilizando oligonucleótidos con sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* (Tabla VI) para su posterior clonado en el vector de expresión pET28a

Se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: 2 mM MgCl₂; buffer 1X (proporcionado por el fabricante); 200 μM dNTPs; 0,625 U ADN polimerasa; 0,25 μM oligonucleótido reverso; 0,25 μM oligonucleótido directo y 2 ng de ADN plasmídico o 1 μl de ADNc, según correspondiera, en un volumen final de 25 μl. Las amplificaciones se realizaron utilizando alternativamente alguno de los termocicladores disponibles en el laboratorio (MyCycler TM Thermal Cycler (Bio-Rad), Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems) y Px2 Thermal Cycler (Thermo)), comenzando con una etapa de 2 min a 94°C. En general, el protocolo de amplificación consistió de 35 ciclos compuestos por tres etapas: una etapa de desnaturalización a 94°C durante 20 seg, una etapa de hibridación a una temperatura variable entre 50 y 60°C durante 30 seg, y una etapa de elongación a 72°C durante 1 y 1,5 min. Los tiempos de amplificación, temperaturas y número de ciclos utilizados se modificaron de acuerdo al molde de ADNc y al par de oligonucleótidos utilizados. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1% o 2% (p/v) (sección 2.7.3).

2.10.3 Identificación de plantas transgénicas y verificación de la expresión del transgen mediante PCR

La determinación de la inserción del transgen *ZmFLS1* en las distintas líneas y la verificación de su expresión se realizaron mediante PCR utilizando como molde ADN genómico o ADNc, respectivamente. Para verificar la inserción del transgen en las líneas se emplearon dos combinaciones diferentes de oligonucleótidos. Por un lado, se utilizó un oligonucleótido que hibrida en el promotor 35S (LP-prom35S) y un oligonucleótido específico para transgen de *ZmFLS1* (RP-ZmFLSexon1) (tamaño del producto generado 1039 bp). Entretanto, para el análisis de la expresión del transgen *ZmFLS1* en las plantas transgénicas se utilizaron los oligonucleótidos LP-ZmFLS1 y RP-ZmFLS1 (tamaño del producto 294 bp) utilizando el gen *CBP20* como control. El medio de reacción consistió en 1X buffer GoTaq, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,25 μM de cada cebador, 0,625 U GoTaq (Promega, Madison, WI), y agua estéril suficiente para completar un volumen de reacción de 25 μl. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización durante 2 min a 95°C y de 35 ciclos compuestos por tres etapas: una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 seg, una etapa de hibridación a una temperatura de 57°C durante 20 seg, y una etapa de elongación a 72°C durante 30 seg. Finalmente se realizó una etapa de elongación final a 72°C durante 7 min. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de 1% (p/v) o 2% (p/v) de agarosa preparada en TBE, sembrando en paralelo marcadores de 50 o 100 pb (PB-L, Productos Biológicos) y empleando Sybr Safe DNA gel stain 1x (Invitrogen).

Para la identificación de las plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobre-expresan *ZmFNSI-1* se utilizaron un oligonucleótido que hibrida en el promotor 35S (LP-prom35S) y un oligonucleótido específico para transgen de *ZmFNSI-1*. Las secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla VI.

2.10.4 PCR en tiempo real

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR en tiempo real se diseñaron mediante la utilización del programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) (Rozen y Skaletsky, 2000), con el objetivo de obtener productos de amplificación específicos de un tamaño de 150 a 250 pb (Tabla VI). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con sistema de detección iCycler IQ (BioRad), utilizando las herramientas del programa Optical System versión 3.0 para la obtención de datos (BioRad), o alternativamente, un termociclador Mx3000P (Stratagene), utilizando las herramientas del programa MxPro v3.00 (Stratagene). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l, y cada muestra se analizó por triplicado.

Para la amplificación se utilizaron 50 ng ADNc; 3 mM $MgCl_2$; 1X buffer libre de Mg^{2+} (proporcionado por el fabricante); 200 μ M dNTPs; 0,8 U Taq Platinum ADN polimerasa; 0,5X SyBr green (Molecular Probes); 0,25 μ M oligonucleótido reverso y 0,25 μ M oligonucleótido directo. Las secuencias de los oligonucleótidos se detallan en la Tabla VI.

El protocolo de amplificación utilizado consistió en un paso inicial de desnaturalización previa del ADNc y activación de la ADN polimerasa a 94°C durante 2 min, seguido por 45 ciclos de amplificación compuestos por tres etapas: 10 seg a 96°C (temperatura de desnaturalización), 15 seg a 58°C (temperatura de hibridación) y 20 seg a 72°C (temperatura de extensión). Por último, se realizó una etapa de extensión final de 2 min a 72°C. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo al final de la fase de extensión a una temperatura 4°C menor que la temperatura de fusión (T_f) de los amplicones (80°C aproximadamente). Finalmente, la curva de disociación para cada producto de RT-PCR se determinó midiendo la disminución de la fluorescencia con el incremento de la temperatura (desde 65 a 98°C). La especificidad de los oligonucleótidos se estudió mediante el análisis de dicha curva luego de 45 ciclos de amplificación, ya que la aparición de un solo pico corresponde a un único producto de amplificación.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L, y cada muestra se analizó por triplicado. Para normalizar los datos de los tratamientos con UV-B, oligonucleótidos para el transcripto de *CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE3* fueron utilizados en plantas de *A. thaliana* y oligonucleótidos para el transcripto

TIORREDOXIN LIKE en maíz. (Tabla VI). Los productos de amplificación fueron sembrados en geles de agarosa al 2% (p/v), sembrando en paralelo marcadores de 50 pb (PB-L, Productos Biológicos).

2.10.5 PCR de colonias

Una variante de la técnica de PCR, conocida como PCR de colonias, se utilizó para el análisis de bacterias transformantes. Las colonias a analizar se colocaron directamente utilizando un palillo en tubos de PCR que contenían la mezcla de los componentes de la reacción de PCR, y se procedió a la amplificación. Los componentes del medio de reacción y el programa de temperaturas utilizados fueron similares a los descritos, dependiendo de la bacteria transformante en estudio.

2.11 Clonado en el vector pGEM-T Easy

Los fragmentos de interés obtenidos por PCR (sección 2.10.2) fueron ligados en el vector pGEM-T Easy, diseñado especialmente para el clonado de productos de amplificación generados por enzimas con actividad transferasa terminal, como la *Taq* ADN Polimerasa. La mezcla de ligación se desarrolló en un volumen final de 10 μ l conteniendo buffer de ligación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima), 3 U de T4 ADN Ligasa (Promega), 50 ng de vector y el producto de amplificación con una relación inserto:vector de 5:1 o superior. La reacción se incubó durante 24 h a 4°C. Luego, se transformaron bacterias competentes de *E. coli* DH5 α utilizando la técnica de electroporación y se sembraron en placas de petri con medio LB agar conteniendo 100 μ g.ml⁻¹ ampicilina, 100 μ M IPTG y 48,9 μ M X-Gal. Las bacterias transformantes que poseían el vector ligado con el inserto se evidenciaron como colonias blancas.

2.12 Clonado en los vectores pGZ25 y pET28a

Los fragmentos de ADN correspondiente a las regiones codificantes de *ZmF2H1*, *ZmCYP93G6* y *ZmCYP93G7* clonados en pGEM-T Easy se subclonaron en el vector pGZ25 utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, generando así

las construcciones pGZ25-*ZmF2H1*, pGZ25-*ZmCYP93G6*, pGZ25-*ZmCYP93G7* (Tabla IV). El fragmento de ADN correspondiente a la región codificante de *AtDMR6* clonado en pGEMT-Easy se subclonó en el vector pET28a utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI*. Para esto, luego de la digestión de los plásmidos (pGEMT-*ZmF2H1*, pGEMT-*ZmCYP93G6*, pGEMT-*ZmCYP93G7*, pGEMT-*AtDMR6*) con las enzimas de restricción mencionadas correspondientes, se purificaron los fragmentos de ADN de interés. La purificación a partir de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el kit comercial Illustra GFX (GE). Este método de purificación de fragmentos de ADN se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en las partículas de sílica-gel en presencia de una sal caotrópica. La calidad y concentración del fragmento purificado se evaluó por electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v), sembrando en paralelo 0,5 µg ADN λ cortado con *EcoRI/HindIII*. Posteriormente, los fragmentos de ADN purificados se ligaron en los vectores pGZ25 o pET28a según corresponda, como se describió anteriormente. La región codificante de *ZmFNSI-1* obtenida por PCR utilizando como molde el vector *pENTR-ZmFNSI-1*, se cortó con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI*, se clonó directamente en el vector pET28a digerido con las mismas enzimas, obteniéndose la construcción pET28-*ZmFNSI-1*. Por último, se transformaron bacterias de *E. coli* DH5α utilizando la técnica de electroporación y se sembraron en placas de petri con medio LB agar conteniendo 100 µg.ml⁻¹ ampicilina o 30 µg.ml⁻¹ kanamicina como agente de selección.

2.13 Preparación de células competentes para la transformación

Las células de *E. coli* se crecieron inoculando con 1/100 volúmenes de un cultivo fresco crecido toda la noche en 1 l de medio LB a 37°C con agitación hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0,5-0,8 UA. El cultivo se colocó a 4°C durante 30 min; luego de este período, las células se centrifugaron a 4.000xg durante 15 min a 4°C. El precipitado conteniendo las células se lavó 2 veces con 1 l (primer lavado) y 0,5 l (segundo lavado) de agua fría y se resuspendió en 20 ml de 10% (v/v) glicerol frío. Posteriormente, se centrifugó a 4.000xg durante 15 min a 4°C y finalmente, las células se resuspendieron en 3 ml de la misma solución fría de glicerol. Las células se

dividieron en alícuotas de 40 μ l en tubos eppendorf y las mismas se conservaron a -80°C.

2.14 Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico

La transformación de *E. coli* se realizó mediante la técnica de electroporación. Para ello, 40 μ l de una suspensión de células competentes y 5-10 μ l de la mezcla de ligación se colocaron en un tubo eppendorf y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación. Se utilizó el electroporador Gene Pulser (Bio-Rad) y las condiciones de electroporación fueron 25 μ F, 2,5 kV y 200 Ω . Luego de la descarga, se agregó rápidamente a la cubeta 1 ml de medio LB. La suspensión se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación. Luego, se centrifugó durante 3 min a 4.000xg. Las células se resuspendieron en 300 μ l del sobrenadante y se sembraron en placas de Petri con medio LB agar conteniendo los antibióticos y reactivos adecuados según el caso.

2.15 Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico se crecieron las células transformadas con el plásmido de interés en 3 ml de medio LB en presencia del agente de selección durante toda la noche a 37°C y con agitación. Este cultivo se centrifugó a 2.000xg por 3 min. El precipitado conteniendo las células se resuspendió en 100 μ l de una solución fría conteniendo 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA y 50 mM glucosa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se agregaron 200 μ l de una solución recién preparada de 0,2 N NaOH y 1% (v/v) SDS y se mezcló por inversión suavemente. Posteriormente, se agregaron 150 μ l de una solución de acetato de sodio 5 M pH 4,8, se agitó vigorosamente, se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 11.600xg por 10 min. El sobrenadante se mezcló con 350 μ l de 6 M KI y 30 μ L de 3 M acetato de sodio y se colocó en columnas del sistema comercial Illustra (GE), incubándose durante 5 min. Se centrifugó durante 1 min a 11.600xg, y se descartó el eluido. El ADN adsorbido a las membranas de sílica se lavó con 750 μ l de 80% (v/v)

etanol. Por último, se adicionaron 50 µl de agua tibia, se dejó reposar 10 min y se centrifugó 1 min a 11.600xg para coleccionar el ADN plasmídico en un tubo eppendorf.

2.16 Secuenciación

Los fragmentos correspondientes a las regiones codificantes de *ZmF2H1*, *ZmCYP93G6*, *CYP93G7*, *ZmFNSI-1* y *AtDMR6* obtenidos por PCR y clonados en los vectores pGEM-T Easy y posteriormente en pGZ25 y pET28a fueron secuenciados con el objetivo de verificar la ausencia de mutaciones que se pudieran haber introducido durante la amplificación por PCR. Para las construcciones en pGEM-T Easy, las secuenciaciones se realizaron utilizando los oligonucleótidos SP6 y T7 promotor. Para la secuenciación de la construcción pET28-ZmFNSI-1 se utilizaron los oligonucleótidos T7 promotor y terminador. Las secuenciaciones se realizaron mediante el método Big Dye TM terminador con el secuenciador 3730XL DNA Analyser, servicio brindado por Macrogen (Korea).

2.17 Transformación química de levaduras

Las construcciones descritas anteriormente (*pGZ25-ZmF2H1*, *pGZ25-ZmCYP93G6* y *pGGZ25-CYP93G7*) se utilizaron para transformar la cepa de levaduras WATT11, empleando el protocolo TRAF0 (Gietz y Woods, 2002). Este método permite la transformación simultánea con varias construcciones diferentes en una sola reacción. Los volúmenes del protocolo de transformación dependen del número de transformaciones a realizar en cada experimento, y se realiza una transformación para cada construcción de interés, más una transformación con agua como control. Para llevar a cabo las transformaciones con cinco construcciones diferentes más el control con agua, se realizó un inóculo de la cepa de levadura en 15 ml (2,5 ml por transformación a realizar) de medio YPD y se creció durante 24 horas a 30°C con agitación continua a 200xg. Se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) en un espectrofotómetro UNICAM, HE10S a las 24 horas, período de tiempo durante el cual el cultivo alcanza la fase estacionaria ($DO_{600nm} = 4$ aproximadamente). Posteriormente, se realizó un inóculo en 30 ml de medio YPD (5 ml por transformación) con una

cantidad del cultivo saturado suficiente para obtener una $DO_{600nm} = 0,2$. Para calcular la cantidad necesaria a inocular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{DO \text{ final } (0,2) \times V_f (30 \text{ ml})}{DO \text{ inicial}}$$

Este nuevo cultivo de 30 ml se creció a 30°C con agitación a 220xg hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 0,6$ (aproximadamente 5 horas), de manera que las células completen al menos dos divisiones. Luego se centrifugó a 3.000xg durante 5 min. El precipitado se lavó con 15 ml (1/2 del volumen del cultivo) de agua destilada estéril y se resuspendió en 1,8 ml (0,3 ml por transformación) de 100 mM acetato de litio. Se incubó durante 15 min a 30°C. Posteriormente, se bajaron las células por centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió por medio de los siguientes agregados en el orden descrito y con el volumen indicado correspondiente a 4 transformaciones:

Reactivo	Nº de transformaciones	
	1	4
1) PEG 3500 50% (p/v)	240 µl	960 µl
2) LiAc 1 M	36 µl	144 µl
3) ADN simple hebra* 2 mg.ml ⁻¹	50 µl	200 µl
4) H ₂ O destilada estéril	19 µl	76 µl
Total	345 µl	1380 µl

*El ADN simple hebra se hirvió durante 5 min y se enfrió en hielo.

Esta mezcla de reacción se dividió en 4 tubos eppendorf (uno para cada transformación) colocando 345 µl en cada uno de ellos y se les agregó 15 µl de la solución de ADN plasmídico conteniendo 3 µg del plásmido correspondiente o agua en el tubo eppendorf control. Se incubaron 30 min a 30°C y luego 45 min a 42°C invirtiéndolos cada 5 min durante 15 segundos. Posteriormente, se centrifugaron a

3.000xg durante 3 min, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en 100 µl de agua destilada estéril. Los 100 µl de cada una de las transformaciones se sembraron en cajas de Petri con medio SCD (del inglés, *Synthetic Complete Dextrose*) sin uracilo y triptófano (SCD-UW) para la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias (generalmente 3 días).

2.18 Extracción, análisis y cuantificación de los flavonoles por HPLC

Para cuantificar el contenido de flavonoles en plantas salvajes y transgénicas de *Arabidopsis*, hojas de plantas de 20 días fueron recolectadas y lavadas con agua destilada. El tejido correspondiente se liofilizó; el tejido seco fue pesado y se resuspendió a temperatura ambiente en una solución de 50% metanol/agua (v/v) para obtener una suspensión final 50 mg.ml⁻¹ (p/v). Posteriormente, las muestras se hidrolizaron por el agregado de un volumen de 2N HCl, seguido por incubación a 70°C por 40 min. Un volumen de metanol al 100% (v/v) fue adicionado para prevenir la precipitación de las agliconas.

Los flavonoles fueron separados mediante cromatografía en fase reversa o HPLC (del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*). La técnica de HPLC se realizó utilizando un equipo ÄKTATMbasic 10/100 (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden), utilizando una columna de afinidad LUNA C18 (150 mmx4.6 mm, 5 µm; Phenomenex Inc.). Los compuestos se separaron por un gradiente lineal consistiendo en 20% del solvente A: 5% (v/v) ácido fórmico (FA) en agua a 100% del solvente B: 5% (v/v) FA in acetonitrilo por 40 minutos a una velocidad de flujo de 0,75 ml.min⁻¹. La absorbancia fue detectada a 360 nm utilizando un detector UV900 (Amersham Bioscience). Los tiempos de retención de los productos analizados fueron comparados con los de los estándares comerciales correspondientes (Sigma-Aldrich). El contenido de los flavonoles fue determinado en al menos 3 líneas transgénicas independientes, obteniéndose resultados similares.

2.19 Determinación de parámetros de daño oxidativo

2.19.1 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para ensayar los productos finales formados por la peroxidación de lípidos, entre ellos el malondialdehído (MDA), se utilizó la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). De esta manera, hojas de plantas salvajes y transgénicas de *Arabidopsis* fueron pulverizados en mortero con N_2 líquido e incubadas durante 1 h a $4^\circ C$ con 1 volumen de TCA 10% (p/v) para precipitar las proteínas. Luego de centrifugar la solución a $13.000 \times g$ durante 20 min se incubaron iguales volúmenes del sobrenadante con TBA (0,5% (p/v) en 20% (p/v) TCA) y 0.1% (p/v) de butilhidroxitolueno (4% (p/v) disuelto en etanol) a $95^\circ C$ durante 45 min. Posteriormente, la solución fue enfriada en hielo y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 20 min. El sobrenadante obtenido fue colectado en un nuevo tubo y se midió la absorbancia a 532 y 600 nm. El valor de absorbancia a 600 nm fue descontado de la absorbancia medida a 532 nm. El coeficiente de extinción del MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) fue utilizado para los cálculos del contenido de TBARS en las muestras. Los resultados fueron expresados en nanomoles por g de peso fresco ($\text{nmol} \cdot \text{gPF}^{-1}$) (Meir y col., 1992).

2.19.2 Liberación de electrolitos

Para la determinación de la liberación de electrolitos se utilizaron 3 plantas de *Arabidopsis* de 14 días de edad por repetición (tres muestras replicadas). Para ello, hojas de plantas salvajes y transgénicas se colocaron en cajas de plástico con pocillos de 3 cm de diámetro conteniendo agua destilada. Las cajas fueron irradiadas a una intensidad de $2 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ de UV-B y a una intensidad de UV-A de $0,65 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ por 4h. El daño oxidativo fue estimado a través de la determinación de la pérdida de electrolitos al medio de incubación. La conductividad de la solución fue medida con un conductímetro Horiba B-173 cada 1 h desde el inicio del tratamiento. Para evaluar la cantidad total de electrolitos presente en el tejido, el mismo fue autoclavado junto con el líquido y luego de alcanzar la temperatura ambiente, se midió la conductividad resultante. Los datos obtenidos fueron expresados como porcentaje liberado en el tratamiento respecto del total presente en el tejido (conductividad inicial/ conductividad total $\times 100$) (Schirra y Mulas, 1995).

2.20 Determinación de la concentración de clorofilas y carotenoides

La extracción de clorofilas se llevó a cabo macerando 100 mg de muestra con 1 ml de etanol 96% (v/v) e incubando durante 24 h en oscuridad a temperatura ambiente para permitir la completa extracción de los pigmentos. A continuación, la solución se centrifugó a 2.500xg durante 5 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se diluyó al 10% (v/v). Finalmente, las concentraciones de clorofilas (Chl) del sobrenadante diluido se determinaron midiendo las absorbancias a 649 y 665 nm, dado que la absorción máxima de las clorofilas se encuentra en la región roja y azul del espectro visible. Igualmente el contenido de carotenos y xantófilas (carotenoides) se cuantificó a 480 nm. Los resultados se obtuvieron aplicando las siguientes fórmulas (Wintermans y De Mots, 1965).

$$[\text{Chl a}] (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = 12,19 \times \text{Abs}_{665 \text{ nm}} - 3,45 \times \text{Abs}_{649 \text{ nm}}$$

$$[\text{Chl b}] (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = 21,99 \times \text{Abs}_{649 \text{ nm}} - 3,45 \times \text{Abs}_{665 \text{ nm}}$$

$$C_{x+c} (\text{Carotenoides}) (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{1.000 \times A_{480} - 2,14 \text{ Chl}_a - 70,16 \text{ Chl}_b}{220}$$

$$x + c = \text{xantofilas} + \text{carotenos}$$

2.21 Determinación del contenido de flavonoides totales

La extracción de flavonoides totales se realizó mediante la maceración de 50 mg de muestra con N₂ líquido, seguida de una primera extracción con 0,6 ml de metanol ácido (1% (v/v) HCl en metanol), y posterior incubación durante 8 h en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizó una segunda extracción con 1,2 ml de cloroformo y 0,6 ml de agua destilada. La solución resultante se centrifugó durante 2 minutos a 4.500xg a temperatura ambiente, descartándose la fase orgánica. Sobre la fase acuosa, se realizó un espectro de absorbancia comprendido entre 280 nm y 600 nm, y se midió el pico de absorbancia a 312 nm (Casati y Walbot, 2005).

2.22 Determinación del contenido de antocianinas

La extracción de antocianinas se realizó mediante la maceración de 100 mg de muestra con N₂ líquido, seguida de una primera extracción con 0,6 ml buffer de extracción (18% (v/v) 1-propanol, 1% (v/v) HCl), hervida por 3 min e incubada durante toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. La solución resultante se centrifugó durante 2 min a 3.000xg a temperatura ambiente, descartándose la fase orgánica. Sobre la fase acuosa, se midió la absorbancia a 535 nm y 650 nm y las cantidades fueron calculadas como $(A_{535} - A_{650}) \text{ g}^{-1}$ peso fresco (PF) (Deikman y Hammer, 1995).

2.23 Medida de la asimilación de CO₂

La velocidad de asimilación neta de CO₂ (ACO₂, en $\mu\text{moles CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) fue determinada utilizando un sistema portátil de análisis de gases mediante infrarrojo Qubit Systems Inc, Ontario, Canadá. El intercambio neto de CO₂ entre una hoja y la atmósfera fue medido introduciendo la hoja en una cámara herméticamente cerrada y registrando la velocidad de cambio de la concentración de CO₂ en un intervalo de tiempo (180 s). Las curvas de respuesta a la luz fueron obtenidas bajo una concentración de CO₂ entrante constante de $1 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$, mientras la intensidad de luz fue variada entre 100 y 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

La fotosíntesis neta fue calculada usando esta velocidad de cambio y otros factores, como el área de la hoja que fue introducido en la cámara y la temperatura que se mantuvo a 20 °C.

2.24 Medición de la fluorescencia de la clorofila en estado estacionario

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila fueron medidos con un fluorómetro modulado por pulso (Qubit System Inc. Ontario, Canadá) para las determinaciones en estado estacionario.

Se registraron los siguientes valores a partir de los espectros de fluorescencia:

F_0 : fluorescencia mínima en hojas adaptadas a oscuridad.

F_m : fluorescencia máxima en hojas adaptadas a oscuridad.

F'_m : fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz.

F_t : fluorescencia mínima en hojas adaptadas a luz.

La fluorescencia mínima de la clorofila cuando los centros de reacción del FSII se encuentran abiertos (F_0) fue determinada en hojas de plantas adaptadas a la oscuridad por un período de 30 min usando luz (655 nm) a una intensidad de $0,1 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se aplicó un pulso de saturación con luz blanca ($4.500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 0,8 s) para determinar la fluorescencia máxima de la clorofila en hojas adaptadas a la oscuridad cuando los centros de reacción del FSII se encuentran cerrados. Los parámetros de hojas adaptadas a la luz (F'_m y F_t) fueron medidos después de 25 min de iluminación con $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las medidas fueron realizadas 6 veces en al menos seis plantas diferentes.

El cálculo de los demás parámetros fotosintéticos, descritos en las siguientes secciones, se realizó de acuerdo a Maxwell y Johnson (2000).

2.24.1 Rendimiento cuántico del fotosistema II

El rendimiento cuántico u operativo del fotosistema II (FSII), $\phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_t) / F'_m$, es la eficiencia con la cual la luz absorbida por clorofilas asociadas al FSII es utilizada en la reducción fotoquímica del receptor primario de electrones (Q_A). Tiene una relación directamente proporcional con el transporte lineal de electrones en la cadena de transporte de electrones fotosintética (Baker, 2008).

2.24.2 Rendimiento cuántico máximo del FSII

Este parámetro, $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$, representa la eficiencia fotoquímica máxima del FSII. Disminuciones en este valor están asociadas a daño foto-oxidativo sobre el FSII.

2.25 Determinación de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria

Para el ensayo de la medida de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, semillas de *Arabidopsis* fueron germinadas en placas de Petri conteniendo medio MS en cámara de cultivo. Las placas se ubicaron en forma vertical para permitir la elongación de las raíces a lo largo de la misma. Las plántulas fueron crecidas durante aproximadamente 8 días, se hizo una marca en el extremo de cada raíz para registrar la longitud de las mismas antes del tratamiento, y luego se realizó el tratamiento con UVB (sección 2.6.2). Luego de finalizado el tratamiento, las placas fueron devueltas a la sala de cultivo en posición vertical, y se registró el crecimiento de las raíces hasta 4 días después del mismo. Las placas fueron entonces fotografiadas y la imagen fue analizada utilizando el programa ImageJ (Rasband, 1997-2008; Abramoff y col., 2004), mientras que el análisis estadístico se realizó empleando el software Graphpad Prism 5.03.

2.26 Observación microscópica de las células del parénquima en empalizada

Plantas de *Arabidopsis* de los genotipos analizados se sometieron al tratamiento con UV-B, luego del cual se incubaron en las condiciones de crecimiento según se indica en la sección 2.5.2 hasta el fin de la expansión de la hoja #5. El momento en el cual la hoja #5 resultó totalmente expandida se determinó midiendo el largo de la misma hasta llegar a un valor constante, aproximadamente 6 semanas luego de la germinación. Se colectaron cuidadosamente las hojas de interés incluyendo el pecíolo, se las incubó al menos 24 h (y como máximo 3 meses) en una solución fijadora denominada FAA (50 % (v/v) alcohol medicinal; 5 % (v/v) ácido acético; 3,7 % (v/v) formaldehído) según se indica en (Horiguchi y col., 2005). A continuación, se las incubó en agitación suave 16 h como mínimo y 48 h como máximo en una solución decolorante conteniendo hidrato de cloral, la cual se preparó calentando en agitación 50 ml de agua con 20 g de glicerol (aproximadamente 16 ml) y se adicionó 200 g de hidrato de cloral de a poco hasta lograr la completa disolución del mismo. A continuación, se montaron las hojas con la cara adaxial hacia arriba utilizando la solución decolorante como solución de montaje dada la gran viscosidad de la misma; y

se tomaron fotografías de las células del parénquima en empalizada utilizando un microscopio diferencial de contraste de interferencia (DIC, del inglés, Differential Interference Contrast) Olympus BH-2 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japón) y una cámara digital Nikon digital Sight DS-Fi1 (Nikon Corporation, Tokyo, Japón). Se tomaron dos fotografías por hoja, una a cada lado de la nervadura central, a una distancia del 50 % de la base de la hoja. Utilizando el software Image Pro Plus 6®, se determinó el área de al menos 20 células para cada hoja. Luego, se tomaron fotos de las hojas completas utilizando el digitalizador de imágenes-cuarto oscuro EpiChemi3 de UVP, y se determinó el área de las mismas utilizando el software Image Pro Plus 6®. Finalmente, se calculó el número promedio de células por hoja, asumiendo que el área de la hoja es igual al área celular promedio por el número de células.

2.27 Determinación del área de las rosetas de *A. thaliana*

Se sembraron plantas de Arabidopsis del genotipo deseado en bandejas plásticas de 17 x 10 cm de forma espaciada para evitar la superposición de las plantas al crecer. En los experimentos en que se analizó la cinética del crecimiento de la roseta, las bandejas se fotografiaron desde una vista superior desde el día 6 luego del fin de la estratificación hasta el día 24, cada 3 días. Para cada día se determinó el área promedio de las rosetas de al menos 10 plantas correspondientes a cada condición con el software Image Pro Plus 6®.

2.28 Microscopía confocal

Para analizar localización subcelular de *ZmFLS1*, se crecieron plantas transgénicas de Arabidopsis (*p35S:ZmFLS1-GFP*) en placas de MS (Tabla V) durante 14 días.

2.28.1 Tinción de núcleos con DAPI

El 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) es un colorante fluorescente azul de ácidos nucleicos que tiñe preferencialmente DNA doble hebra. Al unirse al DNA

doble hebra se produce un incremento en la fluorescencia de hasta 20 veces. De esta manera, el DAPI permite la tinción específica de núcleos con poca o ninguna marca citoplasmática. El máximo de excitación del compuesto es 358 nm y el máximo de emisión 461 nm. En los experimentos realizados se utilizó una solución de DAPI de concentración $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, preparada a partir de una dilución 1/500 de una solución stock de DAPI $1 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ en buffer PBS (10 mM fosfato de sodio, 130 mM NaCl, pH 7,2); a la cual se le adicionó Tween 0,1% (v/v) para facilitar el ingreso del colorante a las células. Las hojas a observar en el microscopio se incubaron durante 15 min en la solución de DAPI. Luego, fueron lavadas con agua destilada para remover el exceso de DAPI y colocadas en portaobjetos para su observación.

2.28.2 Observación por microscopía confocal

La localización subcelular de GFP y DAPI se visualizó en un microscopio confocal Nikon C1 (Laboratorio de Microscopía Confocal, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario) con un objetivo 40X. Se utilizaron un láser de argón a 488 nm y un láser UV a 395 nm para la excitación de GFP y DAPI, respectivamente. La emisión de GFP fue colectada entre 515 y 530 nm para evitar interferencia con la autofluorescencia de los cloroplastos. Para establecer los parámetros de detección eliminando señales inespecíficas se usaron plantas salvajes sin teñir con DAPI como condición sin emisión de fluorescencia.

2.29 Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

2.29.1 Transformación del huésped de expresión

Los plásmidos *pET-28-ZmFNSI-1*, *pET28-AtDMR6* y *pET28a* sin inserto se utilizaron para transformar las cepas *E. coli* BL21(DE3) *pLys*, y *Rosetta2* (DE3) mediante electroporación. Las células transformadas se sembraron en cajas de Petri con medio LB agar conteniendo como agente de selección $30 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ kanamicina y $34 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ cloranfenicol.

2.29.2 Expresión de las proteínas recombinantes *ZmFNSI-1* y *A α DMR6*

Las colonias transformantes fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB con los antibióticos adecuados. A partir de dichos cultivos, se tomó una alícuota para realizar un inóculo 1/100 en medio LB conteniendo los antibióticos apropiados. A continuación, se incubaron los medios a 37°C con agitación hasta alcanzar DO₆₀₀ cercana a 0.5-0.6 UA. Luego se adicionó 0,5 mM IPTG y se continuó la incubación a 22 y/o 30°C durante 20 h. Las muestras se trataron como se describe en la sección siguiente de manera de obtener las fracciones solubles e insolubles. Posteriormente, las muestras no inducidas y las fracciones insolubles y solubles de las muestras inducidas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) en condiciones desnaturalizantes.

2.29.3 Purificación de las proteínas recombinantes *ZmFNSI-1* y *A α DMR6*

Para la purificación de las proteínas a partir de las cepas *E. coli Rosetta2* (DE3), 250 ml de cultivo obtenido según la sección anterior se centrifugaron a 4.000xg durante 5 min a 4°C. Las células fueron resuspendidas en 10 ml de buffer de unión (250 mM NaH₂PO₄ pH 8; 0,5 M NaCl; 5% (v/v) glicerol; 20 mM imidazol) y 1 mM PMSF, 0.1% (v/v) Tween-20. Posteriormente, para obtener las células lisadas, se sonicó dando 6-9 pulsos de 15 s con intervalos de 45 s en un sonicador MSE, se centrifugó 10 min a 7.000xg a 4°C y se separó el sobrenadante (fracción soluble) del precipitado (fracción insoluble).

Luego de tomar una alícuota, el total de la fracción soluble se incubó con la resina HisTag (Invitrogen) previamente equilibrada con el buffer de unión en agitación durante 1 h a 4°C. Se centrifugó para eliminar la fracción soluble no unida a la resina y la misma se traspasó a una columna (Bio-Rad). La columna se lavó con 10 volúmenes del buffer de unión y 10 volúmenes del buffer de lavado (250 mM NaH₂PO₄ pH 8; 0,5 M NaCl; 5% (v/v) glicerol; 50 mM imidazol). La proteína unida a la resina se eluyó con 5 volúmenes de buffer de elución (250 mM NaH₂PO₄ pH 8; 0,5 M NaCl; 5% (v/v) glicerol; 200 mM imidazol). La muestra obtenida se concentró en tubos Amicon Ultra-15 (Millipore) con un corte de 10 kDa centrifugando a 4°C a 2.000xg. El mismo sistema se

utilizó para desalar las muestras mediante dos cambios del buffer (100 mM KPi, 10% glicerol, FeSO₄), agregando 10 volúmenes del mismo en cada cambio. Por último, las proteínas purificadas se almacenaron a -80°C en alícuotas.

2.30 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales y de las proteínas recombinantes purificadas se determinó utilizando el ensayo Quant-it™ (Invitrogen) mediante el cual se mide la fluorescencia luego de la interacción del reactivo del kit comercial que se une específicamente a proteínas. Para realizar la calibración del instrumento se utilizaron testigos proporcionados por el fabricante.

Alternativamente, las concentraciones de proteínas se determinaron por el Método de Bradford (Bradford, 1976). Como testigo se utilizó albúmina bovina sérica (BSA) con la cual se realizaron curvas de calibración variando la cantidad de proteína entre 0,47 µg y 4,7 µg de acuerdo a la sensibilidad del método. Las absorbancias se midieron en un lector de microplaca Dynex. Se graficaron los datos de absorbancia a 595 nm en función de la cantidad de proteína estándar y a partir de la curva de calibración obtenida se determinó la cantidad de proteínas totales en cada muestra.

2.31 Ensayos de actividad enzimática correspondientes a la caracterización de las distintas enzimas

2.31.1 Ensayos de bioconversión *in vivo* e actividad enzimática *in vitro*

Para los ensayos de actividad *in vivo* en bacterias, las células de *E. coli* BL21 (DE3) pLys y las células *E. coli* Rosetta2 (DE3) hospedando los plásmidos pET28-ZmFNSI-1, pET28-AtDMR6 o el vector vacío pET28 fueron crecidas a 37°C durante toda la noche con agitación constante en medio LB con los antibióticos adecuados. A partir de dichos cultivos, se tomó una alícuota y se realizó un inóculo 1/100 en otro recipiente conteniendo medio LB con los antibióticos apropiados. Se continuó la incubación de los medios nuevamente a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una DO₆₀₀ cercana a 0,5-0,6 UA. Una vez alcanzada la DO₆₀₀ se adicionó directamente

al medio de cultivo 0,5 mM del inductor Isopropil β -D tiogalactopiranosido (o IPTG). Los flavonoides sustratos fueron adicionados simultáneamente al medio de cultivo a una concentración final de 0.1 mg.ml⁻¹, y después de la incubación por 20 h a 22 y/o 30°C, los mismos se extrajeron con el agregado de 500 ml de etil-acetato, a partir de una alícuota de 1 ml de cultivo y vortex por 1 min. Las capas de solvente fueron separadas por centrifugación a 12.000xg por 1 min, y los flavonoides se recuperaron en la fase orgánica. La fase orgánica resultante fue re-extraída con dos agregados más de 500 ml de etil acetato, y las fases orgánicas fueron luego combinadas. Esta fase orgánica fue secada al vacío en una centrífuga CentriVap (Labconco), hasta la completa evaporación del líquido, y resuspendida en metanol para los análisis posteriores de LC-MS (del inglés, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*).

Para los ensayos de *in vivo* en levaduras WAT11, una colonia individual de levaduras transformadas con los plásmidos pGZ25-F2H1; pGZ25-CYP93G6, pGZ25-CYP93G7 y el vector vacío pGZ25 fue crecida durante toda la noche a 30°C en 5 ml de medio líquido SC Ura- Trp- conteniendo 2 % (p/v) de glucosa. Después de la incubación, una alícuota correspondiente a una DO₆₀₀ de 1 de este cultivo fue recolectada por centrifugación, lavada con agua estéril y transferida a otro recipiente conteniendo 10 ml del medio de inducción, SC Ura-, Trp-, Leu-, conteniendo 2% (p/v) de galactosa y 3% (v/v) de glicerol. Los distintos flavonoides sustrato fueron adicionados directamente al medio de cultivo en una concentración final de 0,35 mM. Después de la incubación durante 20 h a 30 °C, una alícuota de 750 ml de cultivo fue extraída con un volumen igual de etil acetato, secada al vacío en una centrífuga CentriVap (Labconco), y resuspendida en metanol 100% para su posterior análisis por HPLC y/o LC-MS.

La hidrólisis ácida fue llevada a cabo para poder diferenciar entre productos O- y C- glicosilados dado que el tratamiento ácido hidroliza los enlaces O-glicósidos pero no los conjugados C-glicósidos los cuales son estables a este tratamiento. Después de la extracción con etil acetato, se agregó a las muestras un volumen igual de HCL 2 N seguido de la incubación a 90 °C por 1 h. A continuación la muestra fue secada al vacío en una centrífuga CentriVap (Labconco), hasta la completa evaporación del líquido, y resuspendida en metanol para los análisis posteriores de HPLC y/o LC-MS.

Los ensayos de actividad *in vitro* con las proteínas recombinantes purificadas (*ZmFNSI-1* y *AtDMR6*) se realizaron en un volumen final de 100 o 200 μl de buffer NaH_2PO_4 pH 6,8 conteniendo 10 mM 2-oxoglutarato, 10 mM ascorbato, 0,25 mM FeSO_4 , 0,14 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de naringenina (0,5 mM). Aproximadamente 1 μg de enzima purificada fue usada para cada ensayo. La reacción fue iniciada por el agregado de la enzima y finalizó por el agregado de etil acetato directamente a la mezcla de reacción. La actividad enzimática se llevó a cabo a 30°C durante 60 min. La muestra resultante fue secada al vacío en una centrifuga CentriVap (Labconco), hasta la completa evaporación del líquido, y resuspendida en metanol para los análisis posteriores de LC-MS.

2.31.2 Análisis de los productos flavonoides por HPLC y/o LC-MS

Los análisis de HPLC fueron realizados con un equipo ÄKTA basic 10/100 (Amersham Biosciences), utilizando una columna Phenomenex LUNA C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm). Los datos fueron recolectados y analizados utilizando el programa de control de sistema UNICORN (versión 3.0). Los compuestos fueron separados por un gradiente de elución lineal de 20% de metanol: 80% 10 mM de acetato de amonio, pH 5,6, a 100 % de metanol a una velocidad de flujo de 0,75 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Las unidades de absorbancia fueron detectadas a 268, 292 y 340 nm usando un detector UV900 (Amersham Biosciences). Los tiempos de retención de los productos analizados fueron comparados con los tiempos de retención de los estándares comerciales auténticos (Sigma-Aldrich).

Los análisis de LC-MS fueron realizados utilizando un sistema de bombas de cromatografía líquida de alta resolución Agilent 1100, y un espectrómetro de masas en un modo ión positivo Bruker micrOTOF-Q II configurado con una fuente de ionización Turbo-ion spray con una energía de colisión de 25 eV. Las muestras (10 μl) fueron separadas por cromatografía utilizando una columna Phenomenex HypersilGOLD C18 (150 mm x 2 mm, 3 μm) a 200 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ con un gradiente de elución lineal de 1) 20% de metanol: 80% de acetato de amonio 5 mM, pH 5,6, a 100 % de metanol por un tiempo de 15 min para los ensayos de bioconversión *in vivo* en *E. coli*; 2) 20%: de acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico: 80% de 1 % de ácido fórmico en agua, a 100 % de

acetonitrilo en 0.1% de ácido fórmico por un tiempo de 15 min para los ensayos de bioconversión *in vitro* y los ensayos *in planta*. Los compuestos fueron identificados por la comparación de sus espectros de masas con los espectros de los estándares comerciales auténticos (Sigma-Aldrich y Indofine Chemical Company). Las unidades de absorbancia fueron detectadas a 295 y 360 nm.

2.32 Obtención de anticuerpos

2.32.1 Preparación de la muestra a inocular

La proteína *ZmFLS1* fusionada con una secuencia de oligohistidina fue expresada en *E. coli* BL21(DE3) Rossetta, y posteriormente se purificó a partir de cuerpos de inclusión, mediante cromatografía de afinidad en columnas HisTrap™FF (GE) previamente equilibrada con el buffer de unión. La proteína recombinante purificada (200 µg) se sembró en un SDS-PAGE preparado al 8% (p/v) de acrilamida con un único pocillo del ancho del gel. Luego de la corrida electroforética, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie 0,05% (p/v) en agua destilada durante 15 min y se lavó varias veces con agua destilada hasta visualizar la banda de interés. Dicha banda se escindió del gel, y se segmentó en fragmentos más pequeños que luego se disgregaron pasando la muestra repetidas veces por una jeringa de 2,5 ml. Finalmente, se agregó buffer PBS (10 mM Na₂PO₄; 130 mM NaCl; pH 7,2) hasta un volumen máximo de 0,8 ml.

2.32.2 Inoculación del conejo

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra la enzima recombinante *ZmFLS1* se inoculó un conejo New Zealand con la proteína purificada tratada como se indica en la sección anterior. La inmunización se llevó a cabo según el siguiente protocolo: Día 1: se realizó una inyección subcutánea de 200 µg de la proteína purificada en buffer PBS. Día 21: se realizó una segunda inyección subcutánea de 200 µg de la proteína purificada en buffer PBS. Día 31: se hizo el primer sangrado del cual

se obtuvo el suero. Previo al inicio de este tratamiento se extrajo una muestra de sangre para chequear el suero pre-inmune.

2.32.3 Obtención del suero del conejo

La sangre se incubó a 37°C durante 1 h. Luego, se centrifugó a 2.000xg para separar el coágulo y el suero se conservó con un agregado de 0,02% (p/v) de azida de sodio a -20°C.

2.32.4 Purificación de los anticuerpos contra la proteína ZmFLS1

Para lograr la purificación de los anticuerpos generados, fue necesario obtener la proteína recombinante *ZmFLS1* madura, es decir sin la fusión N-terminal. En primer lugar se ensayaron diversas condiciones de proteólisis utilizando la enzima enteroquinasa, variando la relación enzima:proteína recombinante purificada, la temperatura, como también el tiempo de incubación. Desafortunadamente, en ninguna de las condiciones ensayadas fue posible obtener la proteína madura observándose en general degradación completa de la misma. En segundo lugar y, con objeto de eliminar las fusiones N-terminales Tiorredoxina (Trx) y S-tag presente en el vector de la línea pET32, se inmunopurificaron los anticuerpos anti-*ZmFLS1* utilizando el vector de la línea pET28, el cual no posee estos agregados, pero utilizando la construcción pET28-*SbFLS1*, correspondiente a la proteína FLS1 de sorgo, que se disponía en nuestro laboratorio. Es necesario destacar el alto porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos (94%) entre las proteínas *ZmFLS1* y *SbFLS1*, observándose mediante ensayos de western blot, reacción cruzada entre la proteína de sorgo y el suero inmune anti-*ZmFLS1*.

2.33 Preparación de extractos crudos proteicos

Se pesaron aproximadamente entre 1 y 3 g de hojas y se pulverizaron en un mortero utilizando N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Luego se adicionó el buffer de extracción: [100 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 15 mM 2-

mercaptoetanol; 20% (V/V) glicerol; 1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF)], adicionando 33 μ l por g de tejido fresco de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) conteniendo los siguientes inhibidores (4 (2- aminoetil)benzenosulfonil fluoruro, E-64, 10-Fenanatrolina, Pepstatina, Leupeptina, Bestatina). El homogenado se clarificó por centrifugación a 15.800xg durante 15 min. El sobrenadante fue conservado a -20°C hasta su utilización.

2.34 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Las electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se llevaron a cabo utilizando la celda mini-PROTEAN Tetra System de Bio-Rad y el sistema discontinuo de Laemmli (1970). Las concentraciones finales de acrilamida fueron del 5% (p/v) para el gel de concentración y 15% (p/v) para el gel de separación. Las muestras diluidas en proporción 1:5 en buffer de siembra 5X (60 mM Tris-HCl, pH 8,6; 25% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS; 0,5% (v/v) 2-mercaptoetanol; 0,1% (p/v) azul de Bromofenol) se hirvieron durante 3 min y se sembraron en el gel en función de la cantidad de proteínas totales (entre 50 y 70 μ g de proteínas totales por pocillo). El buffer de electrodo para las corridas electroforéticas contenía 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicina y 0,1% (p/v) SDS. La intensidad de corriente empleada fue de 20 mA. Los geles fueron analizados por tinción con azul de Coomassie ó transferidos a membrana de nitrocelulosa para su posterior análisis mediante Western Blot como se describe a continuación (Bollag y Edelstein, 1991).

2.35 Ensayos de inmunodetección – *Western blot*

La electrotransferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa se llevó a cabo utilizando la celda Mini Trans-Blot (Bio-Rad). La membrana, el gel y las toallas se incubaron durante 10 min con buffer de transferencia (15,6 mM Tris-HCl, pH 8,8; 120 mM glicina; 20% (v/v) metanol) y, luego, se realizó la electrotransferencia durante 1 h a 100 V a 4°C. Posteriormente, la membrana se bloqueó con un buffer conteniendo 5% (p/v) leche descremada en TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) durante 1 h, y luego de 3 lavados de 10 min

con TBS, la misma se incubó con el anticuerpo primario (anti-ASF1A+b de conejo, ab53608, ABCAM) durante toda la noche. Luego de 3 lavados con TBS, la membrana se incubó durante 1 h con anticuerpos secundarios (anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, Bio-Rad) preparados en una dilución 1:3000. Finalmente, luego de realizar 3 lavados con TBS, la membrana se incubó con buffer sustrato (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 10 mg.ml⁻¹ NBT; 50 mg.ml⁻¹ BCIP). El desarrollo de la reacción se realizó en oscuridad hasta la aparición de bandas color púrpura, y se detuvo por el lavado de la membrana con agua destilada.

2.36 Análisis estadístico

Para aquellos ensayos en los cuales se compararon dos condiciones diferentes, se verificó que los valores obtenidos para cada muestra siguieran una distribución Normal, y se empleó el test estadístico t-Student para verificar la significancia de las diferencias, empleando el software Microsoft Excel.

Para los ensayos donde se compararon más de dos parámetros diferentes, se verificó que los valores analizados para cada condición en estudio siguieran una distribución Normal, y se empleó el test estadístico ANOVA (del inglés one-way analysis of variance). Las diferencias significativas fueron calculadas utilizando los test de Bonferroni, Dunnett, Turkey y Duncan ($P < 0.05$) empleando el software Sigma Stat 3.1y Graphpad Prism 5.03.

2.37 Números de Acceso

Las secuencias analizadas en este trabajo de Tesis pueden ser visualizadas en: Arabidopsis Genome Initiative (www.arabidopsis.org) y maize genome sequence version 3b.60 (www.maizesequence.org) con los siguientes números de acceso *CPK3* (At4g23650); *CBP20* (At5g44200); *UVR2* (At1g12370); *UVR7* (At3g05210); *TRX-LIKE*, (AW927774); *ZmActina* (GRMZM2G126010); *ZmFLS1* (GRMZM2G152801), *ZmFNS1* (GRMZM2G167336), *ZmCYP93G6* (GRMZM2G407650), *ZmCYP93G7* (GRMZM2G148441), *ZmFNSI-1* (GRMZM2G099467), *AtDMR6* (At5g24530).

CAPÍTULO 3. Introducción

CAPITULO 3

3.1 Introducción

3.1.1 Las plantas y la radiación UV-B

El éxito evolutivo de los distintos organismos vivos depende sin duda de su resistencia a las condiciones adversas de estrés ambiental. En particular, las plantas, como organismos fotosintéticos, se encuentran obligadas a regular su crecimiento y desarrollo en función de las condiciones de luz de su entorno. Por esta razón la radiación solar es de suma importancia para las mismas ya que es usada como señal de información. La luz puede ser percibida por las plantas de forma específica mediante una variedad de sensibles y sofisticados fotoreceptores con capacidad de distinguir pequeños cambios en la calidad, cantidad, dirección y duración de la luz (Kami y col., 2010). Como constituyente del espectro solar, la radiación UV-B es una señal ambiental capaz de regular diversos procesos fisiológicos, como también de generar daño en el ADN.

La radiación UV-B (280-315 nm) junto a la radiación UV-A (315-400 nm) y UV-C (100-280 nm) forman parte del espectro UV; que dependiendo de factores como la capa de ozono estratosférica, el ángulo solar (latitud, estación, hora del día), la altitud, el grado de contaminación, la nubosidad y variables en pequeña escala como la reflectancia de la superficie y el sombreado (McKenzie y col., 2003; Paul y Gwynn Jones, 2003), permiten el paso a la superficie terrestre de la radiación UV-A y una parte de la radiación UV-B, absorbiendo la radiación UV-C y UV-B por debajo de los 290 nm. Así, a pesar de que la radiación UV-B que alcanza la superficie de la Tierra representa menos del 0,5% de la energía solar (Blumthaler, 1993), la misma es suficiente para ejercer efectos biológicos significativos debido a que contiene fotones UV-B de corta energía (Landry y col., 1995).

Las plantas son más resistentes a la radiación UV-B que los microbios y las células de mamífero, debido en parte a que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios como los flavonoides, capaces de absorber eficientemente la luz UV-B, pero permiten que longitudes de onda de luz fotosintéticamente activas penetren en los tejidos (Caldwell y col., 1983). Estos metabolitos constituyen la primera línea de

defensa frente el daño inducido por dicha radiación, y estudios previos demuestran que su síntesis aumenta en plantas expuestas a luz UV-B (Ormrod y col., 1995).

3.1.2 Las plantas y los flavonoles

Los flavonoles constituyen el subgrupo más abundante dentro del grupo de los flavonoides encontrados en las plantas superiores, y se encuentran usualmente conjugados en las formas de mono-, di- o triglicósidos de kaemferol (K), quercetina (Q) o mirecetina (M). Básicamente los tres difieren en la cantidad de grupos hidroxilos simples que se agregan al anillo B del esqueleto del flavonoide (Figura 3.1).

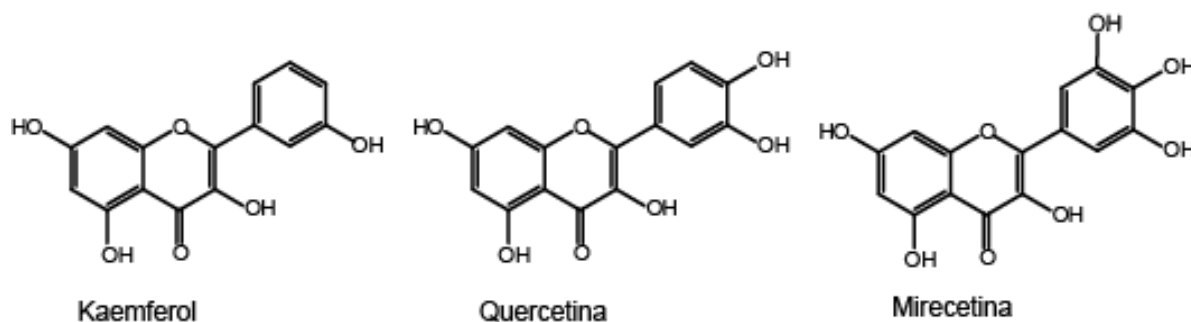


Figura 3.1 Estructura básica de los 3 tipos principales de flavonoles. Kaemferol, quercetina y mirecetina.

Los flavonoles se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas u ocasionalmente en las ceras epicuticulares (Stafford, 1990; Weisshaar y Jenkins, 1998; Bohm y col., 1998; Yonekura-Sakakibara y col., 2008). Su importancia fisiológica difiere entre las distintas especies vegetales, pero su máximo de absorción a 280-320 nm predice una importante función para estos compuestos principalmente en la protección contra la radiación UV-B (Winkel-Shirley 2002; Solovchenko y Schmitz-Eiberger, 2003; Stracke y col., 2007). Los flavonoles son compuestos amarillos o incoloros que pueden determinar el color de las flores y los frutos debido a que poseen una estructura planar de anillo con capacidad de actuar como co-pigmentos entre las moléculas de antocianinas (Yoshitama y col., 1992; Nielsen y col., 2002), siendo por ejemplo los responsables del color amarillo de los pétalos de *Lathyrus chrysanthus* (Markham y

Hammett, 1994). Por otra parte, los flavonoles pueden desempeñar funciones de atracción o defensa en las flores frente a insectos (Gronquist y col., 2001) y participar en la defensa frente a microbios (Stafford, 1991; Stracke y col., 2007). Además, se demostró que estos compuestos resultan ser esenciales para la macho fertilidad, participando por ejemplo, en la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico en especies vegetales tales como maíz (Poaceae) y petunia (Solanaceae), pero no en especies vegetales como *Arabidopsis* (Brassicaceae) o Lisianto (*Eustoma grandiflorum* Grise, Gentianaceae) (Mo y col., 1992; van der Meer y col., 1992; Ylstra y col., 1996; Vogt y col., 1995; Burbulis y col., 1996; Nielsen y col., 2002). Por otro lado, existen evidencias de que los flavonoles regularían negativamente el transporte polar de auxinas, necesario para la respuesta gravitrópica y la elongación de la raíz primaria. Si bien los mecanismos de acción y los blancos moleculares no han sido esclarecidos, hay varias líneas de evidencias que sugieren que modularían directa o indirectamente la actividad de proteínas transportadoras de membrana tales como PIN (del inglés, *PIN FORMED*) y ABCB (del inglés, *ATP Binding Cassette subfamily B*) implicadas en la salida de esta hormona de la célula (Peer y col., 2011).

3.1.3 Biosíntesis y regulación de los flavonoles

Los flavonoles son sintetizados a partir de los dihidroflavonoles dihidrokaemferol (DHK), dihidroquercetina (DHQ) o dihidromiricetina (DHM) por acción de la enzima flavonol sintasa (FLS, mencionada en el Capítulo 1 del presente trabajo de Tesis) (Figura 3.2). Esta enzima pertenece al grupo de enzimas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-ODD) que contienen hierro no hemínico (Holton, 1993; Prescott, 1996; Martens y col., 2010) y catalizan una reacción de desaturación compitiendo por los mismos sustratos con la enzima dihidroflavonol reductasa (DFR) (Figura 1.2, Sección 1.1.3).

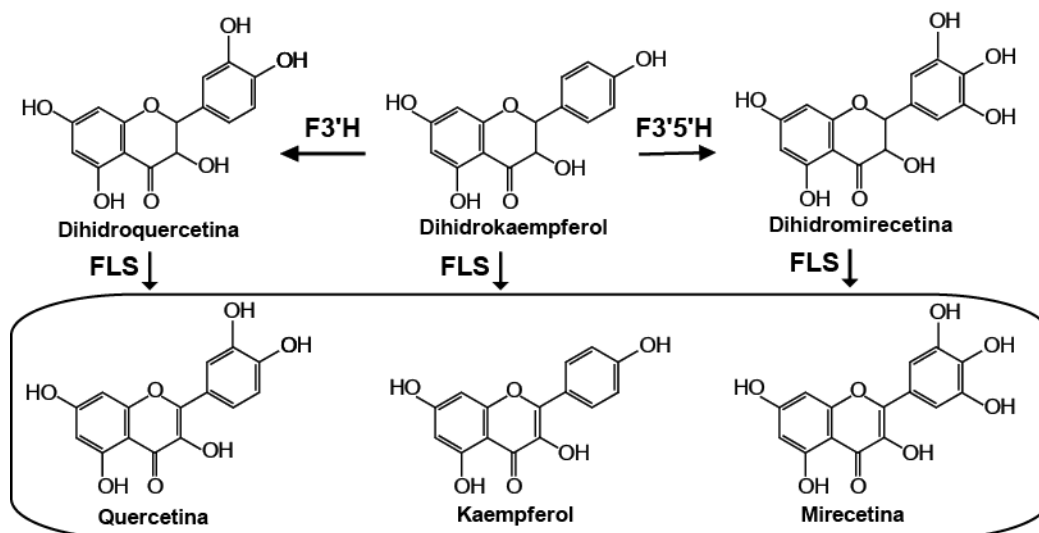


Figura 3.2 Vía de síntesis de los flavonoles. F3'H, flavonoide 3' hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3'5' hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa (Adaptado de Yonekura y Sakakibara, 2008).

Las enzimas de la ruta central de la vía de los flavonoides en *Arabidopsis* son codificadas por genes simple copia, con la excepción de la enzima FLS, para la cual se ha identificado una familia de seis isogenes en su genoma. Los genes *FLS* se localizan en el cromosoma 5 y serían resultado de eventos de duplicación génica (Owens y col., 2008; Stracke y col., 2009). Por otra parte, la expresión recombinante de las distintas enzimas FLS de *Arabidopsis* reveló actividad para las enzimas FLS1 y FLS3 (Wisman y col., 1998; Saito y col., 1999; Winkel-Shirley, 2001; Prescott y col., 2002; Preus y col., 2009); mientras que los otros genes *AtFLS* son considerados inactivos (Owens y col., 2008; Stracke y col., 2009).

La regulación de la síntesis de flavonoles ha sido extensamente estudiada en esta especie, en la cual tanto los reguladores como los genes de la biosíntesis son regulados a nivel transcripcional por un subgrupo de proteínas con dominio R2R3-MYB pertenecientes a la familia PFG (del inglés, *Production of Flavonol Glucosides*) PFG1/MYB12, PFG2/MYB11 y PFG3/MYB111, las cuales muestran un patrón de expresión diferencial y regulan la acumulación de flavonoles en una manera dependiente del tejido y el estadio de desarrollo (Quattrocchio y col., 2006; Stracke y col., 2007; Jenkins, 2008). Además, se ha demostrado que el factor de transcripción

bZIP HY5 (del inglés, *long HYpocotyl5*), un importante participante en la cascada de transducción de la señal inducida por UV-B mediada por UVR8 (del inglés, UV RESISTANCE LOCUS8), un fotoreceptor específico de UV-B (Rizzini y col., 2011, O'Hara y Jenkins, 2012; Hofmann, 2012; Gardner y Correa, 2012), regula la expresión de *PFG1/MYB12* por dicha radiación (Stracke y col., 2010b). Así, *AtFLS1* y otros genes involucrados en la síntesis de flavonoles resultan ser también blancos de estos reguladores (Mehrtens y col., 2005; Stracke y col., 2010a).

En el genoma de maíz de la línea B73 se han sido identificados dos genes codificantes para FLSs. Los mismos fueron caracterizados en nuestro laboratorio y se denominaron *ZmFLS1* y *ZmFLS2* (Falcone-Ferreyra y col., 2010; 2012). El primer gen identificado (*ZmFLS1*) fue clonado y caracterizado poco antes de comenzar mi Tesis doctoral en base a la homología de secuencias con el transcrito *FLS1* de *A. thaliana* (*AtFLS1*) mediante la técnica de RT-PCR utilizando anteras de maíz; demostrando la capacidad de dicha enzima para generar flavonoles. Posteriormente, se demostró que la expresión del gen *ZmFLS1* bajo el promotor constitutivo 35S fue capaz de complementar parcialmente la deficiencia de flavonoles en plantas de *A. thaliana* mutantes en *fls1* y de restaurar los niveles de antocianinas alterados por el desvío del flujo metabólico a niveles normales (Falcone-Ferreyra y col., 2010). El segundo gen caracterizado (*ZmFLS2*) fue identificado más recientemente en base a la secuenciación completa del genoma de la línea B73. La elevada identidad (99%) tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos entre los dos genes y proteínas, respectivamente, así como también el análisis de la sintenia entre especies gramíneas cuyos genomas han sido secuenciados (*Sorghum bicolor*, *Oryza sativa* y *Brachypodium distachyon*), indican que los genes *ZmFLSs* son productos de duplicación génica. El análisis de la regulación de la expresión de ambos genes por RT-PCR en tiempo real, tanto en células BMS (del inglés, Black Mexican Sweet) que expresan o no los reguladores *C1/R* y en pericarpios y barbas que expresan o no los alelos de *P1*, demostró que ambos genes se regulan por los mencionados factores de transcripción de maíz. Por otra parte, estudios *in vivo* de co-expresión transciente en protoplastos de maíz y experimentos *in vitro* de retardo de la movilidad en gel demostraron que *ZmFLS2* resulta más activado por ambos reguladores que *ZmFLS1*, probablemente debido a la presencia de sitios adicionales de

unión a C1 y P1 en la región distal de su promotor. Además, se demostró que la expresión de ambos genes resulta regulada por radiación UV-B, tanto en líneas de maíz que crecen a altas como a bajas altitudes. No obstante, en condiciones control en ausencia de UV-B, se observaron niveles mayores de expresión de ambos transcritos en las líneas de altas altitudes en comparación con las líneas de bajas altitudes (Falcone-Ferreyra y col., 2012). Estos resultados predicen la posibilidad de que los elevados niveles de los transcritos de ambos genes puedan contribuir a la adaptación a ambientes con altos niveles de radiación UV-B. Sin embargo, previo al inicio de esta Tesis, un rol directo para los flavonoles en la resistencia/tolerancia de las plantas a la radiación UV-B no había sido demostrado.

3.1.4 Efectos de la radiación UV-B en plantas

Las plantas responden a la radiación UV-B desencadenando respuestas muy variadas que dependen de la longitud de onda, la intensidad, y la duración de la exposición (Jenkins, 2009). Sin embargo, la radiación UV-B es capaz de provocar efectos pleiotrópicos en el desarrollo, morfología y fisiología de las mismas. A nivel morfológico se observó *I)* inhibición de la elongación del hipocótilo; *II)* engrosamiento de las hojas y cutícula; *III)* reducción del área superficial de las hojas; *IV)* alteración de la floración y la fertilidad y; *V)* disminución de la biomasa (Jansen y col., 1998). A nivel fisiológico se observó: *I)* daño en el ADN; *II)* reducción en la capacidad fotosintética por degradación de las proteínas D1 y D2 del fotosistema II, la destrucción de la clorofila y de los carotenoides, y la reducción de la actividad y cantidad de la enzima Rubisco; *III)* cambios en el metabolismo secundario por activación de la vía de biosíntesis de los flavonoides; *IV)* cambios en la expresión génica por inducción de los genes codificantes de las enzimas de reparación del ADN, del ciclo celular, de la vía de transducción de la señal, del metabolismo secundario y de las enzimas detoxificadoras tales como superóxido dismutasa y peroxidasas, entre otras; *V)* respuestas de estrés, como formación de las especies reactivas del oxígeno (EROs), las cuales a su vez causan aumento en la oxidación de los lípidos y las proteínas y; *VI)* aumento de la resistencia a los insectos (Jordan, 1996; Ballare y col., 1996; Mackerness y col., 2001; Demkura y Ballaré; 2012).

3.1.5 Lesiones producidas en el ADN tras la exposición a radiación UV-B

El daño en el ADN constituye uno de los mayores tipos de daños provocados por la exposición a la radiación UV-B, debido a que esta macromolécula es capaz de absorber fuertemente dichas longitudes de onda, provocando la formación de los fotoproductos de UV. Estos fotoproductos consisten en dímeros entre pirimidinas adyacentes, como por ejemplo, dímeros de pirimidinas por formación de un anillo de ciclobutano (DPCs) y dímeros de pirimidina (6-4) pirimidona, conocidos como 6-4 fotoproductos (6-4PPs) (Figura 3.3) (Mitchell y Nairn, 1989; McGregor, 1999), siendo la formación de DPCs (75%) mucho más frecuente que la formación de 6-4PPs (25%) (Tuteja y col., 2001; Bray y West, 2005). Estas lesiones perturban el metabolismo celular al impedir el progreso de las ADN y ARN polimerasas, conduciendo al bloqueo de la replicación y la transcripción del ADN, respectivamente (Waterworth y col., 2002; Frohnmeyer y Staiger, 2003). Por tal motivo, la eliminación de los DPCs y 6-4 PPs resulta esencial para la supervivencia de las distintas especies afectadas por este tipo de daño (Waterworth y col., 2002).

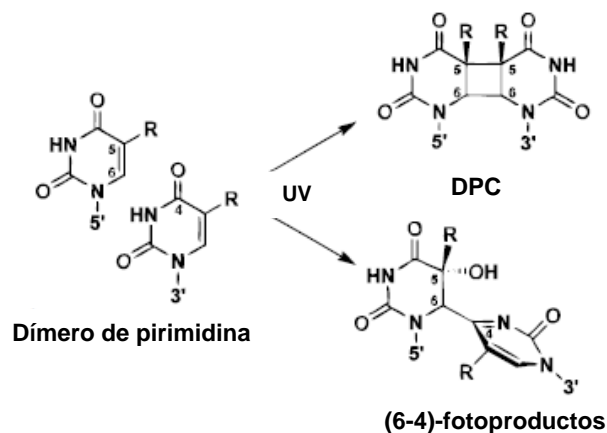


Figura 3.3 Estructura de las lesiones inducidas en el ADN por la radiación UV-B. (Adaptado de Carrasco Ríos, 2009).

La eliminación de las lesiones en el ADN inducidas por UV en plantas se lleva a cabo por la acción coordinada de dos mecanismos principales, reparación en luz y reparación en oscuridad (Quaite, 1994). Cuando los niveles de daño son bajos, participa principalmente la ruta de reparación dependiente de la luz. Esta ruta es conocida como foto-reactivación o reversión directa del daño en el ADN (PR, del inglés, *PhotoReactivation*) y revierte la formación de los dímeros de pirimidina en el ADN a través de la acción de una enzima llamada fotoliasa (Yasui y Eker, 1998). Esta enzima se une específicamente a las lesiones en el ADN y las elimina directamente por absorción de la luz azul y UV-A en el rango de los 300-600 nm; reduciendo el dímero a la forma monomérica (Kimura y col., 2004). En *A. thaliana* se han identificado dos tipos de fotoliasas: la fotoliasa I, PHR1 (del inglés, *PHOTOLYASE1*), también conocida como UVR2 (del inglés, *UV RESISTANCE 2*) que desempeña una función específica para la fotorreparación de DPCs, y otra fotoliasa conocida como UVR3 (del inglés, *UV REPAIR DEFECTIVE 3*) para la fotorreparación de los 6-4 PPs (Ahmad y col., 1997; Waterworth y col., 2002). La acción de estas dos enzimas es muy eficiente ya que se observó que en 16 h, el 96% de los dímeros de pirimidinas inducidos por el tratamiento con UV-B son reparados en presencia de luz (Dany y col., 2001). Por otra parte, en ausencia de luz, la reparación de los dímeros de pirimidina se produce principalmente mediante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Otros mecanismos conocidos de reparación en la oscuridad lo constituyen la reparación por escisión de bases (BER), el sistema de reparación de bases incorrectamente apareadas (Lario y col., 2010) y la recombinación homóloga y no homóloga, procesos en los cuales fragmentos de genes incompletos se combinan para producir genes funcionales. Este tipo de recombinación es estimulado por el tratamiento con radiación UV-B, así como también por otros agentes que dañan el ADN (Liu y col., 2000). La velocidad a la cual uno u otro mecanismo se producen varía ampliamente.

CAPÍTULO 3. Objetivos

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

El objetivo del presente capítulo de Tesis es investigar la participación de la enzima flavonol sintasa 1 de maíz (*ZmFLS1*) en la respuesta a la radiación UV-B.

3.2.2 Objetivos específicos

A partir del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Analizar el patrón de expresión y la regulación del gen *ZmFLS1* por la radiación UV-B en diferentes líneas de maíz.
- Determinar la capacidad de plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen *ZmFLS1* de producir niveles aumentados de flavonoles.
- Evaluar el crecimiento y el desarrollo de plantas transgénicas en comparación con plantas salvajes, así como también la tolerancia de las mismas frente a distintos tratamientos con luz UV-B, con el objetivo de investigar el rol de los flavonoles en la protección frente a este tipo de estrés.

CAPÍTULO 3. Resultados

3.3 Resultados

3.3.1 Análisis de la expresión del transcrito *FLAVONOL SINTASA 1 (ZmFLS1)* en plantas de maíz luego de la exposición con radiación UV-B

La previa caracterización de la enzima ZmFLS1 poco antes de comenzar mi Tesis doctoral (citada en la Introducción del presente capítulo de Tesis) nos permitió indagar sobre el posible rol sugerido por los flavonoles en la respuesta a la radiación UV-B. Para ello, en primer lugar analizamos la regulación transcripcional del gen *ZmFLS1* por dicha radiación, utilizando plantas de maíz del genotipo B73 y W23 que expresan o no los factores de transcripción B1 y PL1 (*W23 B1*, *PL1* y *W23 b1*, *pl1*, respectivamente), reguladores de la síntesis de flavonoides en maíz. Las diferentes líneas fueron crecidas en invernadero en ausencia de radiación UV-B durante 4 semanas (sección 2.5.2) y luego se irradiaron con lámparas de UV-B a una intensidad de 2 W.m^{-2} durante 8 h. Las lámparas fueron cubiertas con filtros de acetato de celulosa que no permiten el pasaje de la radiación UV-C, transmitiendo UV-B, UV-A y luz visible (plantas tratadas o UV-B), mientras que para el tratamiento de las plantas control (o no UV-B), las lámparas además se cubrieron con filtros de poliéster que filtran la radiación UV-B (sección 2.6.3). Finalizado el tratamiento, se recolectaron muestras de hojas y se procesaron de manera de obtener los ADNc correspondientes (sección 2.10.1). Posteriormente, se determinó el nivel de expresión del gen *ZmFLS1* mediante RT-PCR en tiempo real (sección 2.10.4) en las diferentes muestras, incluyendo como control oligonucleótidos específicos que amplifican al gen *TRX-like* (del inglés, *TIORREDOXIN-LIKE*), el cual codifica para una proteína tiorredoxina putativa, que no es regulada por la radiación UV-B (Casati y Walbot, 2004).

Como se muestra en la Figura 3.4, para la línea del genotipo B73 se observó un aumento de 20 veces mientras que las líneas del genotipo W23 mostraron un aumento de 4 veces en los niveles del transcrito en las hojas de plantas irradiadas con UV-B respecto a los niveles en las hojas de plantas controles, indicando una fuerte regulación en la expresión del gen por la radiación UV-B.

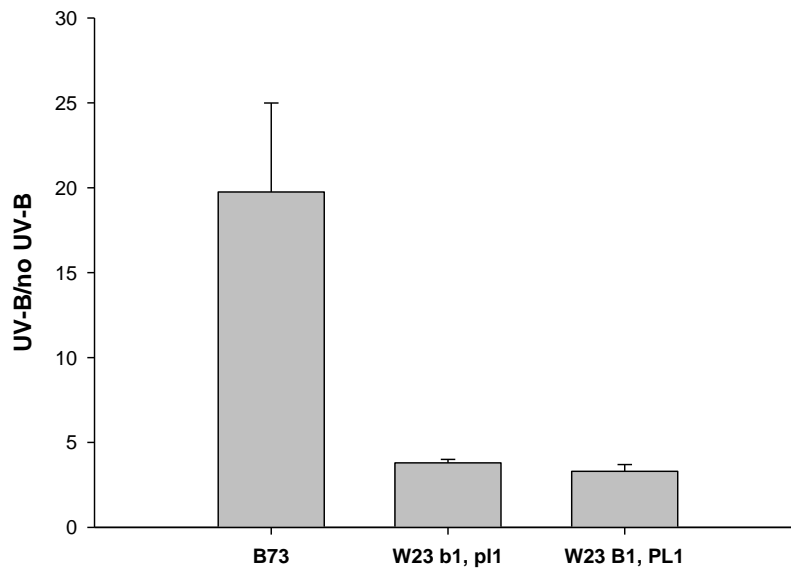


Figura 3.4 Cambios en los niveles de expresión de *ZmFLS1* por radiación UV-B. Cambios en los niveles de expresión de *ZmFLS1* en hojas provenientes de plantas de maíz de las líneas B73 y W23 *b1, pl1* y W23 *B1, PL1* crecidas en invernadero y sometidas a un tratamiento con luz UV-B. Los niveles de expresión de las muestras se determinaron mediante análisis de RT-PCR en tiempo real. Los resultados corresponden al promedio de los datos provenientes de triplicados biológicos para cada una de las muestras, y de dos replicados técnicos como mínimo. Las barras de error indican la desviación estándar de las muestras.

3.3.2 Caracterización de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan la FLS1 de maíz

3.3.2.1 Análisis de la expresión del transcripto *ZmFLS1*

Con el objetivo de profundizar acerca de la posible protección conferida por los flavonoles directamente *in planta* en los sitios blanco de daño por la radiación UV-B, se utilizaron plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col 0) que habían sido transformadas previamente a mi trabajo de Tesis con la construcción p35S-*ZmFLS1*, expresando de esta manera la enzima FLS1 de maíz.

En primer lugar se realizó la selección de las líneas homocigotas para el transgen en placas con medio MS (del inglés, *Murashige and Skoog*) suplementado con

el antibiótico higromicina, dado que es el marcador de selección del vector con el cual fueron transformadas las plantas. La presencia del transgen *ZmFLS1* en las plantas transformadas se verificó por PCR, RT-PCR, y RT-PCR en tiempo real (sección 2.10.3).

Para los análisis mediante PCR se utilizó ADN genómico extraído de plantas de veinte días salvajes (Col 0, sin transformar) y transgénicas (Col 0 transformadas con la construcción p35S-*ZmFLS1*), utilizando los oligonucleótidos LP-prom35S y RP-ZmFLSxon1 (Tabla VI, sección 2.4). El producto de amplificación obtenido se muestra en la Figura 3.5 A y corresponde a un tamaño de 1039 pb. Por otra parte, para los análisis mediante RT-PCR (Figura 3.5 B) y RT-PCR en tiempo real (Figura 3.6), se utilizaron los ADNc correspondientes obtenidos de las mismas plantas pero utilizando para la amplificación específica del transgén los oligonucleótidos LP-ZmFLS1-RT y RP-ZmFLS1-RT (Tabla VI, sección 2.4) los cuales generan un producto de 180 pb. Como control de reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos LP-CBP20-RT y RP-CBP20-RT (Tabla VI, sección 2.4) para amplificar el gen de referencia *CBP20*, el cual codifica para una *PROTEÍNA DE UNIÓN A CAP20*, determinando diferentes niveles expresión del transgén en líneas transgénicas independientes y no detectándose su expresión en las plantas salvajes.

En las secciones siguientes del presente capítulo de Tesis, cada vez que denominemos plantas salvajes o Col 0, nos estaremos refiriendo a la línea ecotipo Columbia 0 sin transformar, y, cada vez denominemos plantas transgénicas o T.n1.n2, nos estaremos refiriendo a las plantas transgénicas de Arabidopsis (Col 0) transformadas con la construcción p35S:*ZmFLS1*, que sobreexpresan la enzima flavonol sintasa 1 de maíz correspondiendo n1: al número de generación y n2: al número de líneas transgénicas independientes.

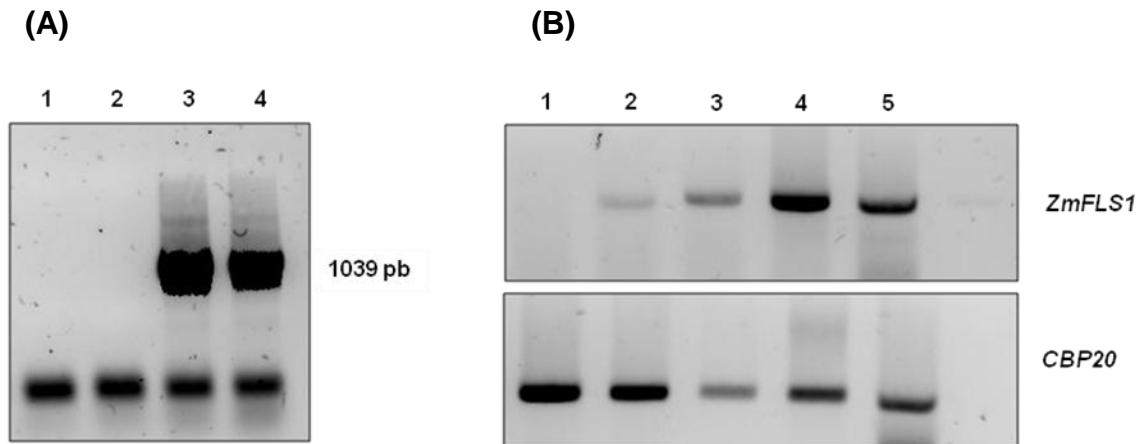


Figura 3.5 Presencia del transgen *ZmFLS1* en plantas de *A. thaliana*. Las reacciones de PCR (A) se llevaron a cabo utilizando ADN genómico de plantas de *Arabidopsis* salvajes y transgénicas separados en un gel de agarosa 1% (p/v). 1: Control negativo (sin ADN genómico); 2: Col 0; 3: T1.1; 4: T1.2. Las reacciones de RT-PCR (B) se llevaron a cabo utilizando ADNc de plantas de *Arabidopsis thaliana* salvajes y transgénicas separados en un gel de agarosa 2% (p/v). 1: Col 0, 2: T1.1, 3: T1.2; 4: T1.3 y 5: T1.4.

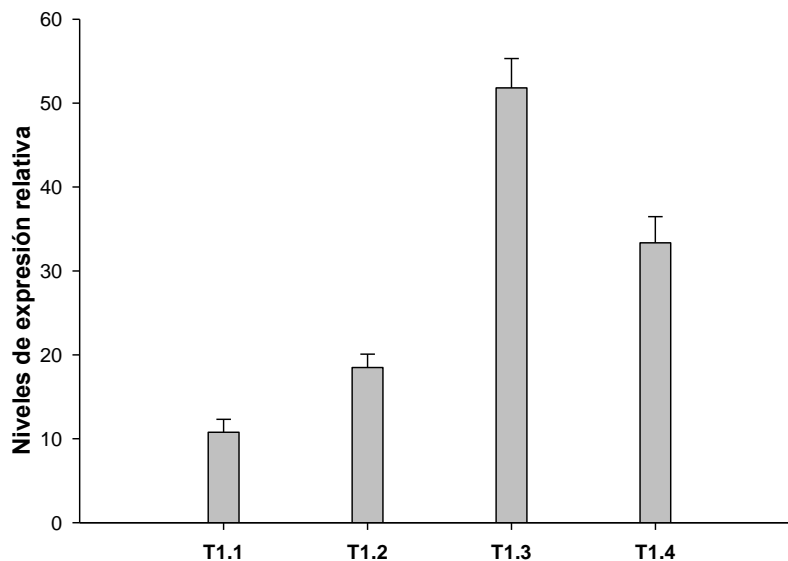


Figura 3.6 Niveles de expresión de *ZmFLS1* en plantas de *Arabidopsis*. Niveles de expresión relativos en hojas provenientes de plantas de *Arabidopsis* crecidas en cámaras de cultivo. Los niveles de expresión de las muestras se determinaron mediante análisis de RT-PCR en tiempo real. Los resultados corresponden al promedio de los datos provenientes de triplicados biológicos para cada una de las muestras, y de dos

replicados técnicos como mínimo. Las barras de error indican el error estándar de las muestras.

3.3.2.2 Obtención de anticuerpos de conejo anti-ZmFLS1. Análisis de los niveles de proteína ZmFLS1

Para analizar si los niveles de expresión del transcrito *ZmFLS1* se correlacionan con la cantidad de la proteína *ZmFLS1* expresada, se prepararon anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína FLS1 de maíz (PM aproximado: 36.5 kDa), los cuales debieron ser posteriormente purificados (sección 2.32.4). A continuación se procedió a analizar la expresión de *ZmFLS1* en extractos crudos de hojas de plantas de maíz de la línea B73 y de *Arabidopsis* salvajes y transgénicas, mediante western blot en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, optimizando una dilución 1:200 para los anticuerpos purificados.

En la Figura 3.7 se muestra la presencia de una banda inmunoreactiva en los extractos de maíz y de *Arabidopsis*, tanto en las plantas salvajes como transgénicas, detectándose un aumento de la señal en estas últimas. Por otra parte, la presencia de señal en las líneas salvajes estaría evidenciando la existencia de reacción cruzada de los anticuerpos con las proteínas FLS endógenas de *Arabidopsis*. (PM aproximado: AtFLS1: 37 kDa).

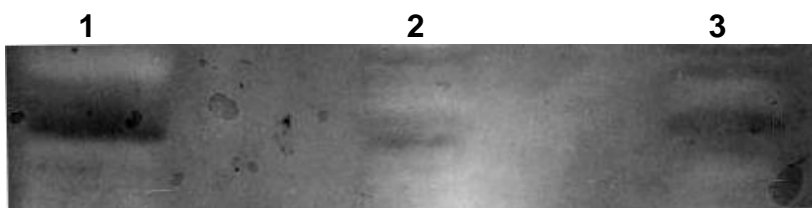


Figura 3.7 Análisis por Western blot de la proteína ZmFLS1. 1: Extracto de proteínas totales de hojas de plantas de maíz de la línea salvaje B73. 2: Extracto de proteínas totales de hojas de plantas de *Arabidopsis* Col 0. 3: Extracto de proteínas totales de hojas de plantas de *Arabidopsis* T1.3.

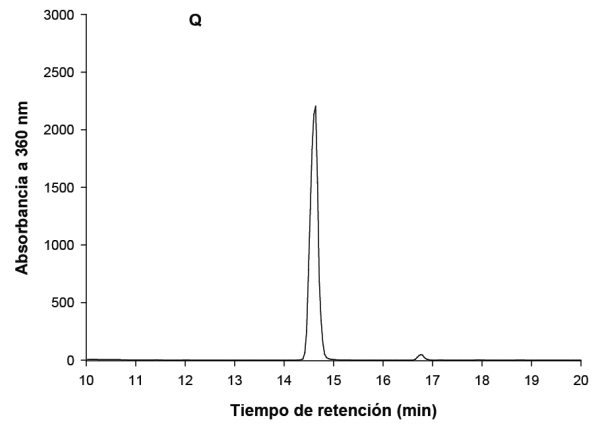
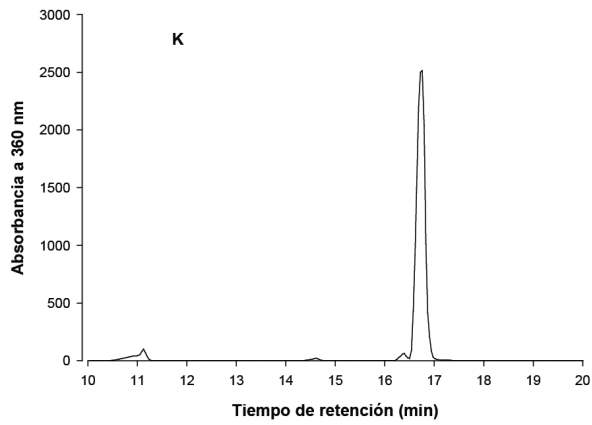
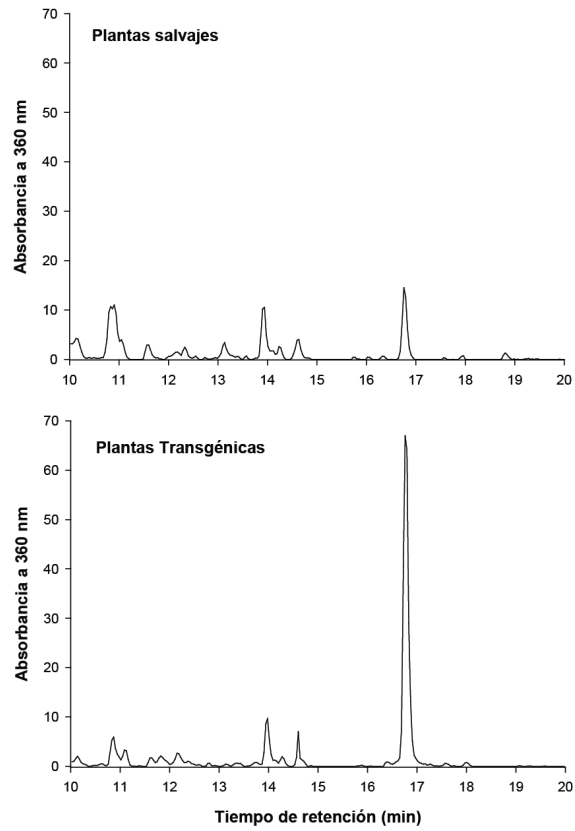
Dada la poca sensibilidad de los anticuerpos generados, estos no fueron utilizados para comparar los niveles de proteína FLS entre las distintas líneas transgénicas de *Arabidopsis* estudiadas.

3.3.2.3 Análisis del contenido de flavonoles en las plantas de *Arabidopsis* transgénicas y salvajes

Por otra parte se procedió a determinar si la expresión de *ZmFLS1* en las plantas transgénicas genera un aumento en la cantidad de flavonoles, productos directos de la reacción catalizada por la enzima analizada. Para ello se cuantificó el contenido total de los flavonoles K y Q (flavonoles más abundantes en *Arabidopsis*) en extractos fenólicos hidrolizados de hojas de plantas salvajes y transgénicas de *Arabidopsis* crecidas durante 20 días en cámara de cultivo (sección 2.5.2), utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución, técnica internacionalmente conocida por su nombre en inglés *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC), de mucha utilidad para el análisis de flavonoides, utilizando un equipo de análisis ÄKTA basic 10/100 (Amersham Biosciences). Además de los extractos fenólicos mencionados, se inyectaron de forma secuencial, las soluciones de los estándares comerciales. Los compuestos fueron separados por un gradiente lineal, y los tiempos de retención de los diferentes picos fueron analizados con el programa UNICORN (versión 3.0), según como se indica en la sección 2.18.

La Figura 3.8 muestra los perfiles cromatográficos de HPLC (A) y los valores promedio resultantes de las integraciones de las áreas correspondientes a los picos obtenidos a 360 nm para los distintos extractos fenólicos hidrolizados (B). Así, se observa que las plantas transgénicas exhiben niveles significativamente mayores de K y Q respecto de las plantas salvajes; sin embargo mientras que los niveles de K aumentaron 3,8 veces, los niveles de Q sólo aumentaron 1,7 veces. De esta manera, a pesar de que los niveles de ambos flavonoles aumentan en las plantas transgénicas, la expresión de *ZmFLS1* produce una mayor acumulación de K.

(A)



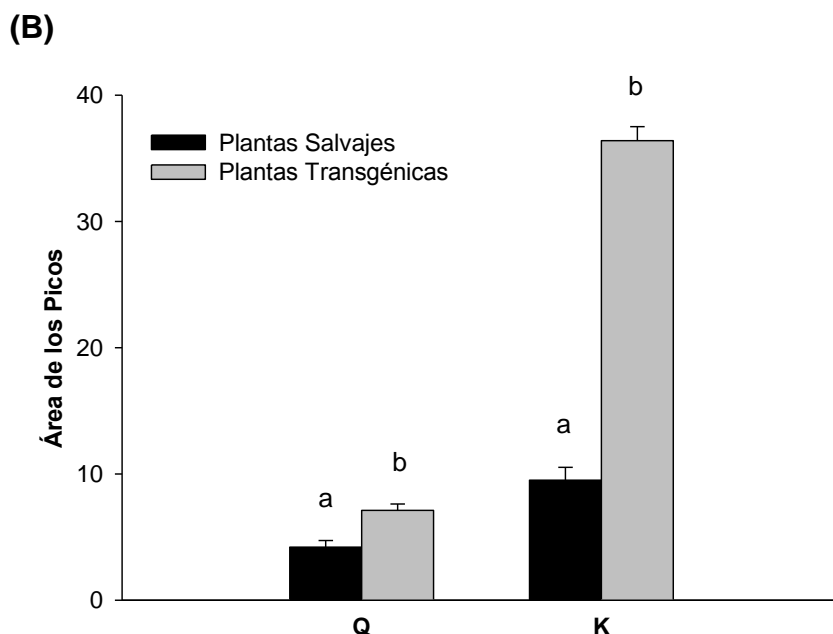


Figura 3.8 Análisis del contenido de flavonoles en plantas de Arabidopsis. (A) Perfiles cromatográficos de HPLC obtenidos a 360 nm para los extractos fenólicos hidrolizados de hojas de plantas de Arabidopsis salvajes y transgénicas (T1.3) y para los estándares comerciales correspondientes usados como control. **(B)** Cuantificación de los picos de flavonoles en plantas de Arabidopsis salvajes y transgénicas (T1.3). La cuantificación se basa en el cálculo del promedio de las áreas de los picos (mAU*min) resultantes de los cromatogramas a 360 nm. Por cada flavonol analizado, las diferentes letras indican variaciones significativas ($P < 0.05$) aplicando el test de ANOVA correspondiente al programa Sigma Stat 3.1

Por último, analizamos si el aumento en los niveles de flavonoles produce una re-dirección del flujo metabólico hacia la síntesis de antocianinas, extraídas como se indica en la sección 2.22. Sorprendentemente, no observamos ninguna diferencia en los niveles de antocianinas entre las plantas salvajes y transgénicas (Figura 3.9).

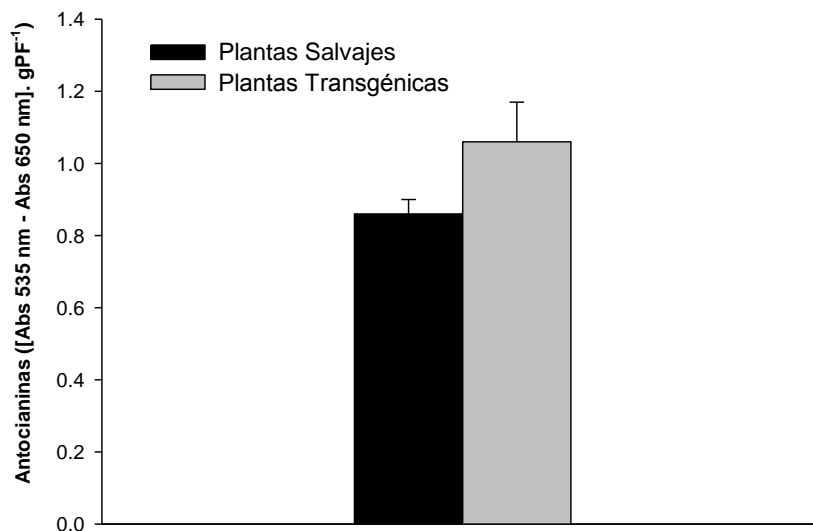


Figura 3.9 Análisis del contenido de antocianinas en plantas de Arabidopsis. Contenido de antocianinas en plantas salvajes y transgénicas (T1.3). Los espectros fueron extraídos y analizados a 535 y 650 nm Las barras de error indican el error estándar de las muestras.

3.3.3 Determinación de la localización subcelular de *ZmFLS1*

Para estudiar la localización subcelular de la enzima *ZmFLS1* por microscopía confocal se utilizaron plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* Col 0 que habían sido transformadas, previamente a mi trabajo de Tesis, con la construcción p35S:*ZmFLS1-GFP*. Las mismas fueron seleccionadas en placas MS en presencia del antibiótico higromicina y se crecieron durante 20 días (sección 2.5.2), verificando la presencia del transgén *ZmFLS1-GFP* en las plantas transformadas por PCR (sección 2.10.3).

En la Figura 3.10 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal detectando fluorescencia correspondiente a la GFP tanto en el citosol como en los núcleos (identificados con DAPI, que liga fluoresceína al núcleo). Estos resultados indican la presencia de la enzima *ZmFLS1* en ambos compartimientos. Es importante señalar que estudios anteriores informaron que la proteína GFP expresada bajo el control del promotor 35S no se localiza en el núcleo. (Kaiserli y Jenkins, 2007). Además, debemos resaltar que enzimas de la vía de biosíntesis de flavonoides, como

CHS y CHI fueron localizadas en el núcleo en plantas de *Arabidopsis* (Saslowky y col., 2005). Más aún, *AtFLS1* también se localiza en los núcleos, lo que sugiere que la maquinaria biosintética para la síntesis de flavonoles podría ser activa en el núcleo, el sitio de acción dentro de la célula donde los flavonoles producidos ejercerían un rol hasta el momento no demostrado (Kuhn y col., 2011).

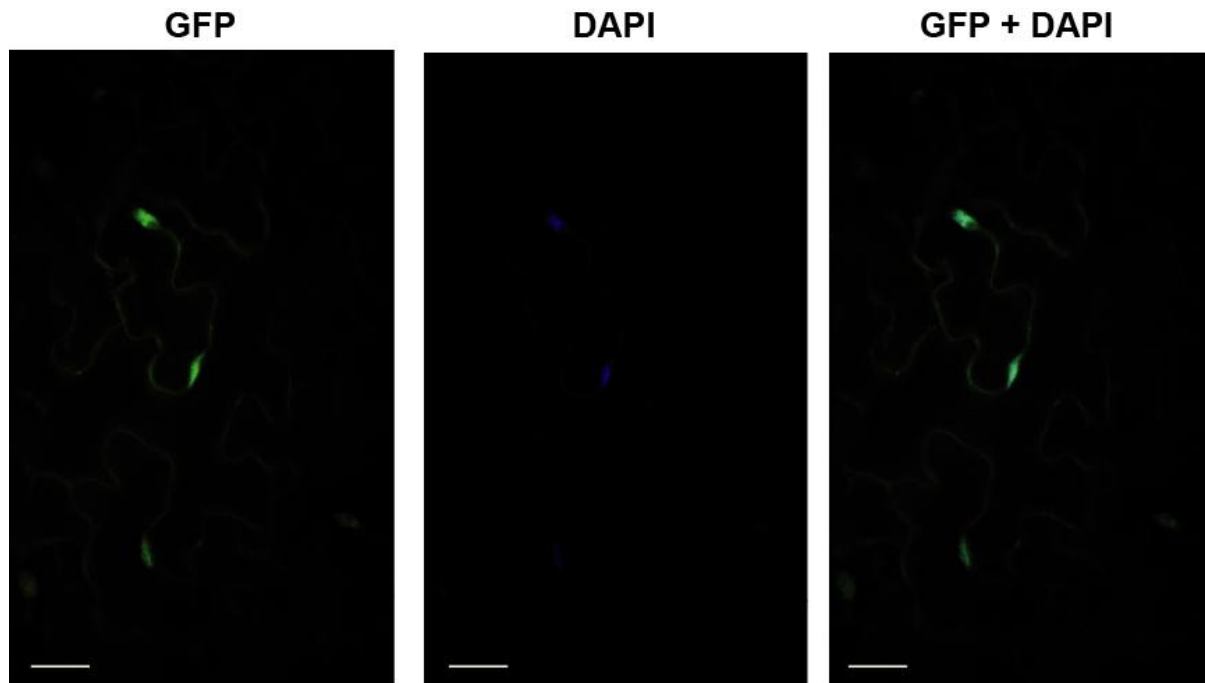


Figura 3.10 Imágenes confocales de fluorescencia de DAPI y GFP en tejidos epidérmicos de hojas de plantas *p35S:ZmFLS1-GFP*. Se muestran imágenes obtenidas en el análisis de la localización subcelular de la proteína de fusión FLS1-GFP en plantas transgénicas. FLS1-GFP fue mayoritariamente detectada en el citosol y en el núcleo de las células. El color verde representa la fluorescencia de FLS1-GFP, mientras que el azul corresponde a la fluorescencia del DAPI. Las flechas indican núcleos que presentan fluorescencia de GFP. Las barras de escala representan 20 μm .

En adelante, todos los resultados presentados en este trabajo de Tesis, corresponden a experimentos realizados con la línea transgénica T.2.3.

3.3.4 Estudio del rol protector de los flavonoles frente a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis*

3.3.4.1 Cuantificación del daño al ADN luego de la exposición a radiación UV-B

Con el objetivo de estudiar el rol de los flavonoles y analizar sus efectos directos o indirectos en la protección de las plantas frente a la radiación UV-B; se procedió en primer lugar a investigar si los niveles aumentados de estos compuestos en las plantas transgénicas respecto a los niveles de las plantas salvajes, las protegían mayoritariamente del daño al ADN ocasionado luego de la exposición a un tratamiento con radiación UV-B. Para ello, plantas de *Arabidopsis* salvajes y transgénicas crecidas durante 4 semanas en cámaras de cultivo en ausencia de luz UV-B (sección 2.5.2) fueron expuestas a radiación UV-B durante 4 h o mantenidas en condiciones control en ausencia de radiación UV-B (sección 2.6.1). Finalizado el tratamiento se recolectaron muestras de hojas de estas plantas, a las cuales se les extrajo luego el ADN (sección 2.7.1) con objeto de realizar experimentos de dot blot (sección 2.9) utilizando anticuerpos monoclonales anti- DPCs acoplados a una reacción colorimétrica. Estos experimentos permiten identificar los DPCs específicamente generados como consecuencia de la radiación UV-B.

La Figura 3.11 muestra la comparación de la acumulación de DPCs en las plantas salvajes y transgénicas, observando que en ausencia de UV-B los niveles de daño son similares en todas las líneas analizadas. Sin embargo, luego de 4 h de tratamiento, las plantas salvajes acumulan un 30 % más de DPCs que las plantas transgénicas. Estos resultados indican que las plantas salvajes son más susceptibles al daño provocado en el ADN por la radiación UV-B respecto a las plantas transgénicas, confirmando así un rol protector para los flavonoles frente al daño al ADN inducido por dicha radiación.

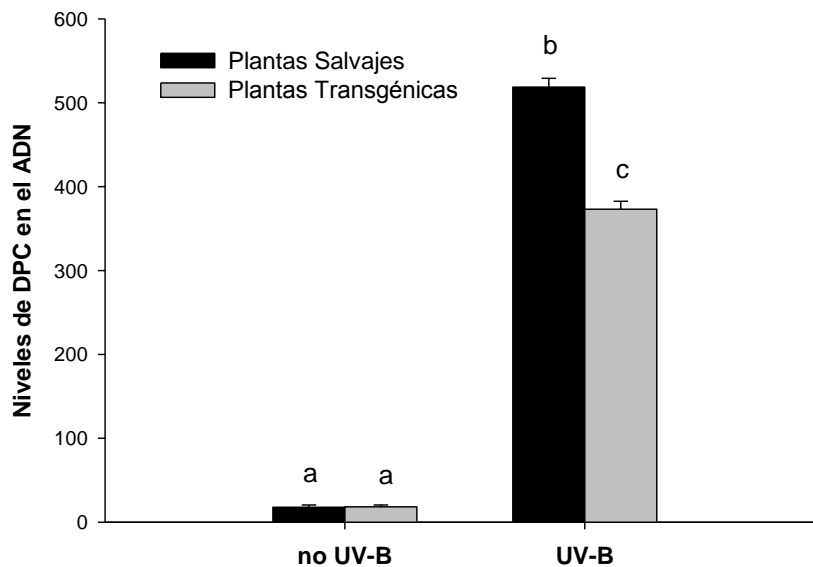


Figura 3.11 Nivel de daño en el ADN por la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis* transgénicas y salvajes. El tratamiento con UV-B se realizó con plantas de 4 semanas de crecimiento. Los experimentos se realizaron bajo condiciones de luz para permitir la fotorreparación. Los niveles de DPCs se cuantificaron inmediatamente al final del tratamiento. Los valores representados en los gráficos corresponden al valor promedio de las densitometrías obtenidas a partir de los sextuplicados de cada una de las líneas en estudio. Las barras de error indican el error estándar de las muestras. Las diferentes letras indican variaciones significativas ($P < 0.05$) aplicando el test ANOVA correspondiente al programa Sigma Stat 3.1.

3.3.4.2 Análisis de la expresión de enzimas que participan en los sistemas de reparación de plantas

Para descartar la posibilidad de que la disminución en el nivel de daño en el ADN de las plantas transgénicas se deba a una mayor actividad de los sistemas de reparación del mismo; se comparó la expresión de dos enzimas de reparación en plantas salvajes y transgénicas utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real. Para ello, las plantas de *Arabidopsis* fueron crecidas y tratadas en iguales condiciones que para los experimentos de dot blot, recolectando sus hojas luego de finalizado el

tratamiento para la posterior obtención de los ADNc correspondientes. Las enzimas analizadas correspondieron a los genes codificantes para *UVR2* y *UVR7*.

UVR2 (mencionada en la Introducción de este capítulo de Tesis), es la fotoliasa encargada de reparar los DPCs en luz; ésta se une específicamente a los mismos y directamente monomeriza el anillo de ciclobutano del dímero de pirimidinas, usando la energía de la luz visible/azul y protegiendo así al genoma de los efectos deletéreos de la radiación UV-B (Kim y col., 1992; Essen y Klar, 2006). *UVR7* (del inglés, *UV REPAIR DEFICIENT 7*) es una proteína del sistema de reparación NER del ADN que codifica para ERCC1 (del inglés, *Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*).

Cada reacción fue normalizada usando los valores de *Ct* correspondientes al transcripto *CPK3*, que codifica para una *PROTEÍNA QUINASA 3 DEPENDIENTE DE CALCIO*, que fue utilizado como gen de referencia, ya que fue demostrado que su expresión no varía en presencia de UV-B (Ulm y col., 2004). Como se observa en la Figura 3.12, ambos genes son inducidos luego del tratamiento con UV-B, no mostrando diferencias significativas entre las líneas. Estos datos indican que no existirían diferencias en los principales mecanismos de eliminación de los DPCs entre las distintas plantas.

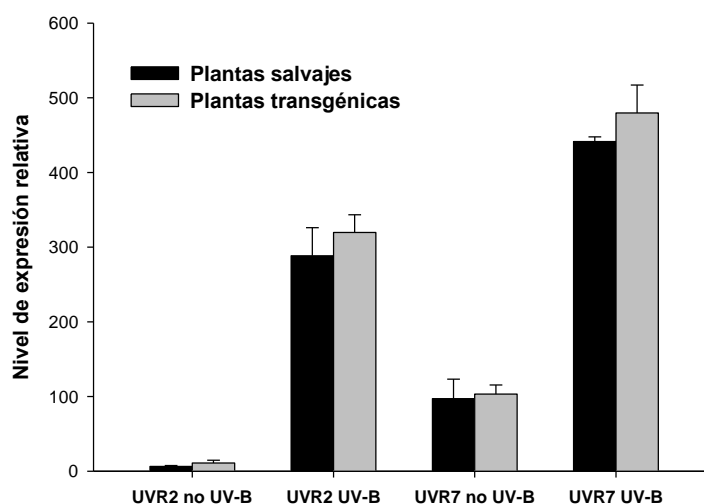


Figura 3.12 Niveles de transcritos de *UVR2* y *UVR7* luego del tratamiento con UV-B. Los niveles de los transcritos se midieron mediante RT-PCR en tiempo real en plantas salvajes y transgénicas irradiadas durante 4 h con 2 W.m^{-2} de UV-B, o mantenidas en condiciones control (no UV-B). Los resultados mostrados corresponden a triplicados biológicos independientes. Las barras de error indican el error estándar de las muestras. Las diferentes letras indican variaciones significativas ($P < 0.05$) aplicando el test ANOVA correspondiente al programa Sigma Stat 3.1.

3.3.5 Estudio de la tolerancia de las plantas de *Arabidopsis* a la radiación UV-B

Por otra parte, nos interesó determinar si las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, además de mostrar un menor daño en el ADN, presentaban una mayor tolerancia a la radiación UV-B. Para ello, se procedió a la evaluación de distintos parámetros fisiológicos luego de la exposición al UV-B, detallados a continuación.

3.3.5.1 Estudio del daño oxidativo en plantas de *Arabidopsis* expuestas a la radiación UV-B

En primer lugar se analizó el estado de las membranas biológicas, considerando que los ácidos grasos poliinsaturados son los componentes principales de las mismas y que son altamente susceptibles a peroxidación por las EROs, tales como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (Shewfelt y Purvis, 1995; Blokhina y col., 2003). De esta manera, en el estadio final del proceso oxidativo se producen aldehídos altamente tóxicos para la célula, como el malonilaldehído, los cuales pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico formando derivados llamados TBARS (o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), que son indicativos del daño en las membranas provocado por la lipoperoxidación. Por consiguiente, para evaluar el daño ocasionado a los lípidos por las EROs se cuantificó el contenido de TBARS, tanto en las plantas salvajes como transgénicas crecidas en cámaras de cultivo en ausencia de luz UV-B durante veintiocho días y posteriormente expuestas a radiación UV-B (2 W.m^{-2} durante 4 h), o mantenidas en condiciones control en ausencia de UV-B (sección 2.6.2). Finalizado el tratamiento se recolectaron muestras de hojas y se realizaron los extractos correspondientes según como se indica en la sección 2.19.1 del presente trabajo.

Como se observa en la Figura 3.13, las plantas salvajes mostraron una mayor peroxidación lipídica que las plantas transgénicas luego del tratamiento con UV-B, mientras que en condiciones control, los niveles basales de TBARS fueron similares para ambas líneas.

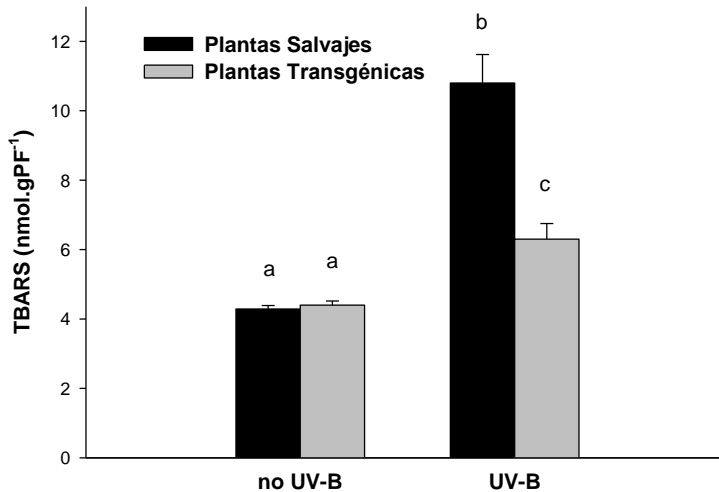


Figura 3.13 Estudio del daño oxidativo en lípidos de plantas de Arabidopsis, luego del tratamiento con UV-B. Los niveles de TBARS se midieron en plantas salvajes y transgénicas, irradiadas durante 4 h con 2 W.m^{-2} de UV-B, o mantenidas en condiciones control. Para cada línea las determinaciones se realizaron al menos 3 veces. Las barras de error indican el error estándar de las muestras. Las diferentes letras indican variaciones significativas ($P < 0.05$) aplicando el test ANOVA correspondiente al programa Sigma Stat 3.1.

3.3.5.2 Determinación de la pérdida de electrolitos en plantas de Arabidopsis expuestas a la radiación UV-B

En segundo lugar, se analizó la liberación de electrolitos (sección 2.19.2). La radiación UV-B puede provocar un aumento en la permeabilidad de las membranas por medio de la producción de EROs (Murphy, 1983) resultando en una mayor liberación de iones y electrolitos de éstas. Así, la medida de la pérdida de electrolitos es un parámetro que se utiliza para estimar la integridad de las membranas. Para ello, plántulas salvajes y transgénicas fueron crecidas durante quince días en placas

conteniendo MS y luego fueron colocadas de forma individual en cajas plásticas conteniendo agua destilada. A continuación, las cajas conteniendo a las plántulas se sometieron al mismo tratamiento con luz UV-B indicado en la sección anterior, con la diferencia que a cada hora se tomaron muestras y se midió la conductividad del medio. Finalizado el tratamiento, el medio conteniendo las plántulas fue autoclavado, provocando la ruptura total de las membranas biológicas, permitiéndonos medir de esta manera la conductividad total resultante. Como se muestra en la Figura 3.14, el análisis de los resultados obtenidos mostró una disminución en la pérdida de electrolitos en las plantas transgénicas respecto de las salvajes, siendo estos resultados significativos a partir de las 2 h de la exposición de las hojas a la radiación UV-B.

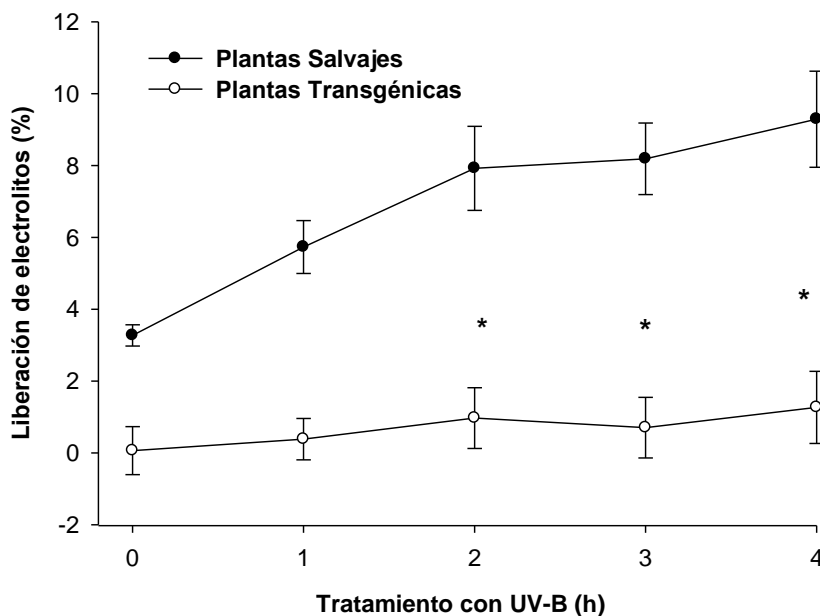


Figura 3.14 Estudio de la liberación de electrolitos en plantas de Arabidopsis luego del tratamiento con UV-B. Los niveles de liberación de electrolitos se midieron cada 1 h desde que se inició el tratamiento en plantas salvajes y transgénicas, irradiadas durante 4 h con 2 W.m^{-2} de UV-B, o mantenidas en condiciones control. Para cada línea las determinaciones se realizaron al menos 3 veces. Las barras de error indican el error estándar de las muestras. Los asteriscos indican diferencias significativas al aplicar el test estadístico de la t de Student ($P < 0,05$).

3.3.5.3 Ensayo de la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por la radiación UV-B

En tercer lugar, se midió la sensibilidad al UV-B de las plantas de *Arabidopsis* mediante la inhibición de la elongación de la raíz primaria (Tong y col., 2008). Recientemente se ha demostrado que en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés, incluyendo estrés por metales pesados, deficiencia de fósforo, radiación UV o estrés mecánico, existe una respuesta morfogénica común caracterizada por la inhibición de la elongación de la raíz primaria y una aumentada producción de raíces laterales o ramas axilares (Potters y col., 2007; 2009). Por ello, plántulas salvajes y transgénicas de *Arabidopsis* fueron crecidas en placas de MS, según como se indica en la sección 2.5.2, y posteriormente estas mismas placas conteniendo las plántulas se irradiaron con lámparas de UV en flujos laminares, de manera de mantener las condiciones de esterilidad, en iguales condiciones que los tratamientos anteriores, con la excepción a que el tiempo de duración del tratamiento con UV-B fue de 90 min. Finalizado el tratamiento, se midió el crecimiento de las raíces hasta 3 días después de finalizado el mismo (sección 2.25).

Como podemos observar en la Figura 3.15, las plantas salvajes mostraron una disminución significativa en la elongación de la raíz primaria luego del tratamiento con UV-B, el cual fue evidente a los 2 días de finalizado el tratamiento; sin embargo, las plantas con mayores niveles de flavonoles presentaron una disminución significativamente menor en el crecimiento de la raíz primaria, el cual fue observado más tarde que para las plantas salvajes (a los 3 días de finalizado el tratamiento). Cabe destacar que las plántulas transgénicas tenían una raíz primaria más corta que las salvajes en condiciones normales en ausencia de UV-B (Figura 3.15); pese a esto después del tratamiento con UV-B ambas líneas mostraron una longitud de raíz similar, demostrando así que el UV-B afecta la velocidad de crecimiento de la raíz de manera más significativa en las plántulas salvajes. Estos resultados también sugieren que las plantas transgénicas son menos sensibles a la radiación UV-B que las plantas salvajes.

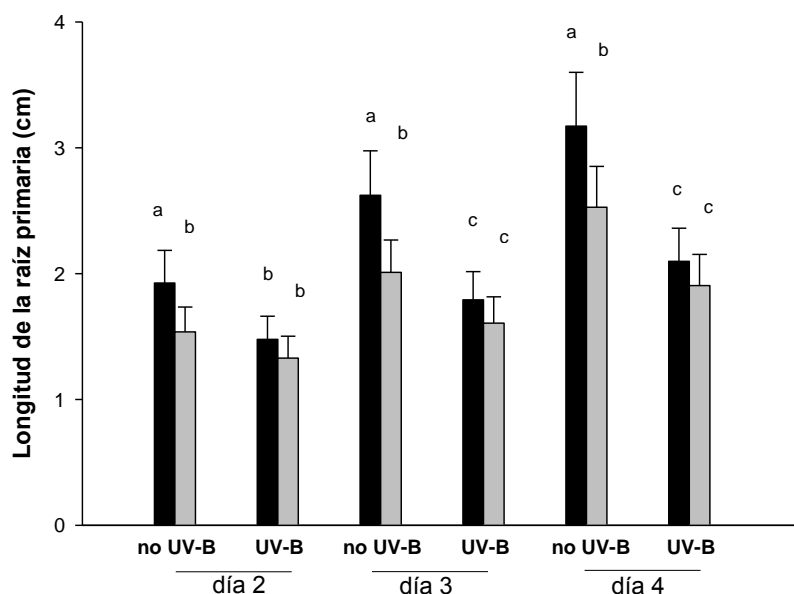


Figura 3.15 Medida de la elongación de la raíz primaria en plantas de Arabidopsis, luego del tratamiento con UV-B. Se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de plantas salvajes y transgénicas luego de la irradiación con luz UV-B durante 90 min a 2 W.m^{-2} . Se grafica la elongación de la raíz luego de 48, 72 y 96 h de finalizado el tratamiento (día 2, 3 y 4, respectivamente), relativa a la longitud de la raíz medida inmediatamente luego de finalizado el tratamiento con UV-B. Las barras de error indican el error estándar. Para cada día luego del tratamiento con UV-B, las diferentes letras indican diferencias significativas respecto a la condición control (no UV-B). Las diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron analizadas aplicando el test ANOVA correspondiente al programa Graphpad Prism 5.03 software.

3.3.5.4 Evaluación de la eficiencia fotosintética en plantas de Arabidopsis expuestas a radiación UV-B

Por último, se evaluó el daño a la maquinaria fotosintética midiendo la eficiencia máxima (PSII, F_v/F_m) y el rendimiento cuántico del FSII (ϕPSII); la fijación de CO_2 y los niveles de clorofilas y carotenoides después del tratamiento con UV-B (secciones 2.20; 21;23 y 24).

Para ello, plantas salvajes y transgénicas fueron crecidas en cámaras de cultivo sin UV-B durante 4 semanas y luego fueron tratadas con radiación UV-B por 4 h como se describió anteriormente. Inmediatamente finalizado el tratamiento, se tomaron hojas

de estas mismas plantas y se realizaron las medidas de la eficiencia máxima (PSII, F_v/F_m) y el rendimiento cuántico del FSII (ϕ PSII)

Como se observa en la Figura 3.16 A y B en condiciones control en ausencia de UV-B, todos los parámetros fotosintéticos fueron similares, independientemente de los niveles de flavonoles en las plantas. Luego del tratamiento con UV-B, tanto las plantas salvajes como las transgénicas mostraron una disminución en la eficiencia máxima y el rendimiento cuántico del FSII; sin embargo, esta disminución resultó significativamente más marcada en las plantas salvajes respecto a las plantas con aumentados niveles de flavonoles, indicando de esta manera un mayor desempeño fotosintético de las plantas sobreexpresantes de la enzima ZmFLS1.

Por otra parte, para continuar con la caracterización de estas plantas, se evaluó la eficiencia fotosintética de las distintas líneas midiendo la velocidad de asimilación de CO_2 tanto en plantas salvajes como transgénicas a 100 y a 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. No se observaron diferencias significativas entre las plantas transgénicas y las salvajes en este parámetro, sugiriendo que el rol protector de los flavonoles no sería efectivo en este proceso metabólico (Figura 3.16 C).

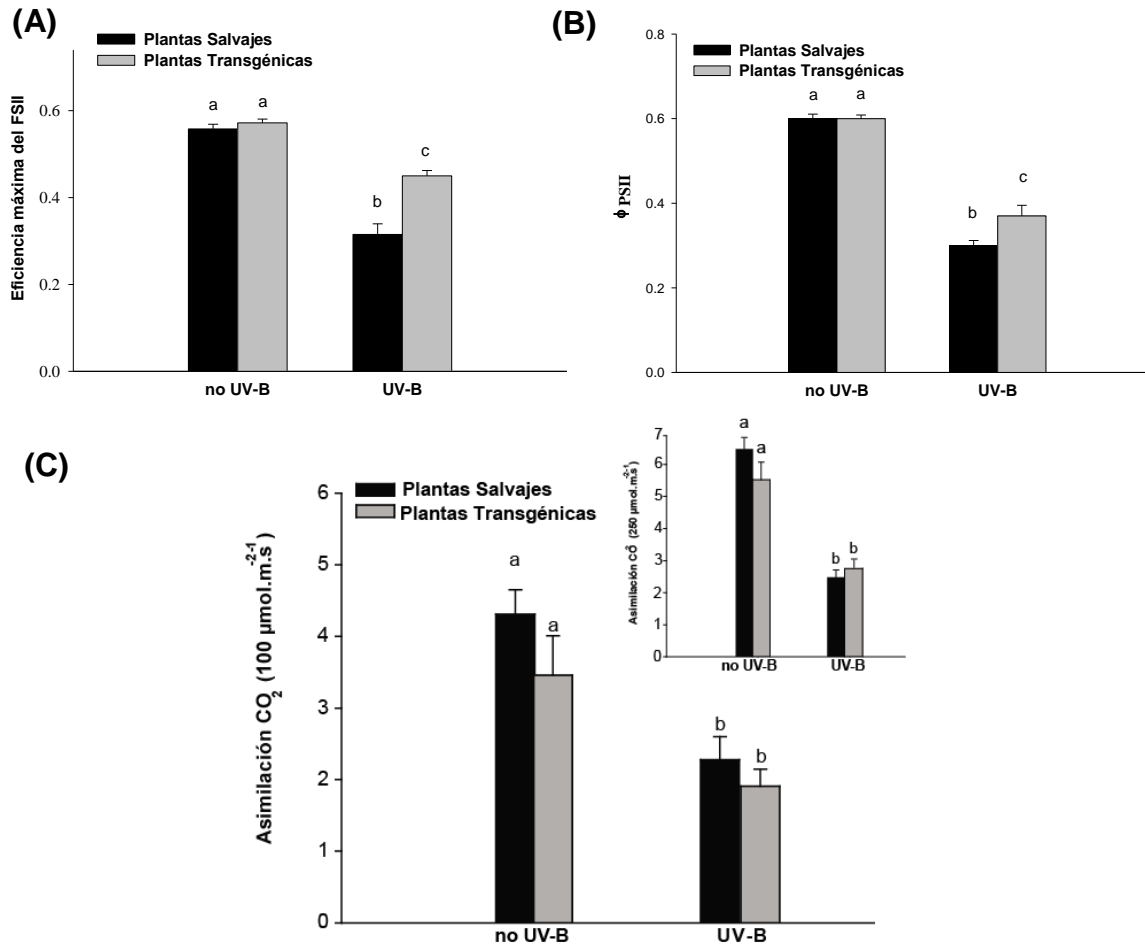


Figura 3.16 Medida de la eficiencia fotosintética en plantas de *Arabidopsis* luego del tratamiento con UV-B. La eficiencia máxima del FSII (A), el rendimiento cuántico del FSII (ϕ_{PSII}) (B) y la asimilación de CO_2 (C) se midieron en plantas salvajes y transgénicas irradiadas durante 4 h con $2 W \cdot m^{-2}$ de UV-B, o mantenidas en condiciones control. Las medidas son el promedio de 6 hojas de 6 plantas adultas diferentes. Las barras de error indican el error estándar de las muestras. Las diferentes letras indican variaciones significativas ($P < 0.05$) aplicando el test ANOVA correspondiente al programa Sigma Stat 3.1.

A continuación, se analizaron los niveles de clorofilas totales (Figura 3.17 A y B) y de carotenoides (Figura 3.17 C) determinados a partir de las muestras de hojas recolectadas luego de finalizado el tratamiento (sección 2.20). Como se muestra en la Figura 3.17, mientras los niveles de carotenoides no resultaron afectados en ninguna de las líneas por el tratamiento; los niveles de clorofilas a y b mostraron una disminución

significativa en las plantas salvajes luego del tratamiento con UV-B, sin observarse cambios en los niveles de clorofilas en las plantas transgénicas.

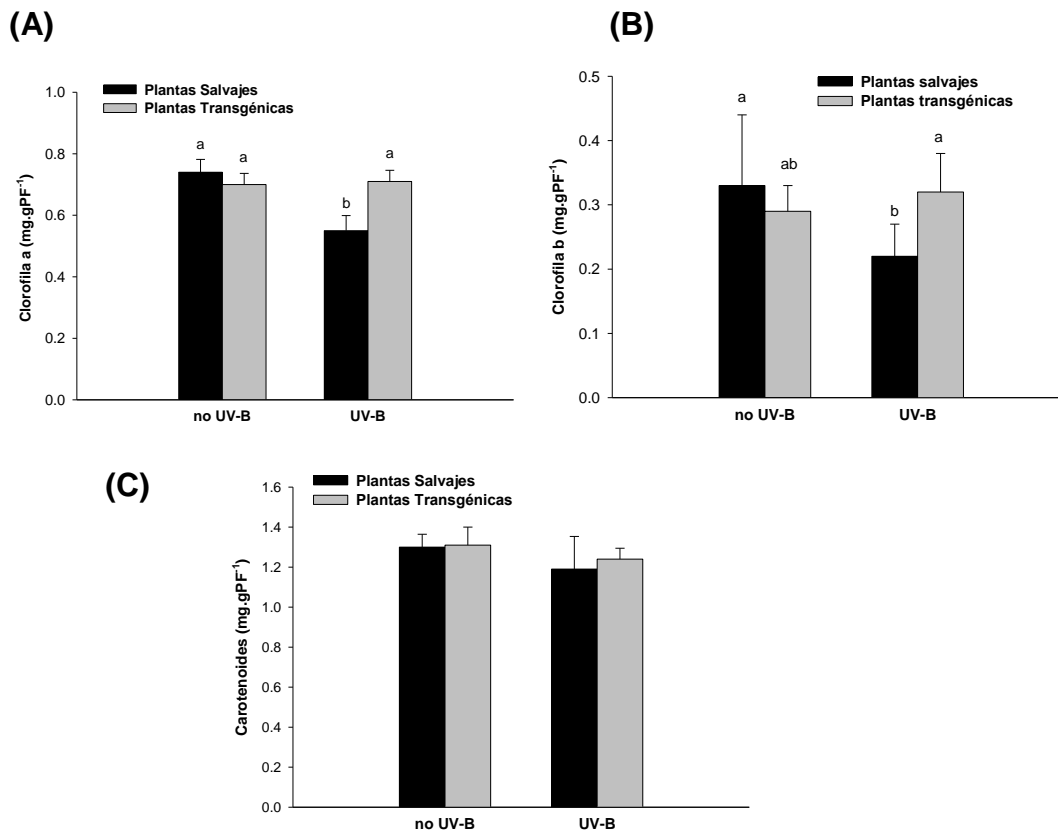


Figura 3.17 Contenido de clorofilas y carotenoides en plantas de Arabidopsis, luego del tratamiento con UV-B. (A) Los niveles de clorofila a, (B) clorofila b y carotenoides (C) se midieron en plantas salvajes y transgénicas irradiadas durante 4 h con 2 W.m^{-2} de UV-B, o mantenidas en condiciones control. Para cada línea las determinaciones se realizaron al menos 3 veces. Las barras de error indican el error estándar de las muestras. Las diferentes letras indican variaciones significativas ($P < 0.05$) aplicando el test ANOVA correspondiente al programa Sigma Stat 3.1.

Los resultados descriptos en esta sección indican que las plantas transgénicas muestran un fenotipo más tolerante a la radiación UV-B en comparación con las plantas salvajes, siendo los flavonoles los responsables de ejercer este rol protector atenuando el daño a las macromoléculas.

3.3.6 Análisis de las células del parénquima en empalizada en plantas de *Arabidopsis* expuestas a la radiación UV-B

Finalmente, para investigar la posibilidad de que alteraciones en los niveles de flavonoles afecten también procesos de desarrollo relacionados con auxinas, se analizó fenotípicamente a las plantas transgénicas. Para ello, se eligió estudiar en mayor detalle los cambios que ocurren en la hoja 5 (sección 2.26; 27), en un momento en la cual la misma se encuentre en división celular activa (18 DAS). Se tomaron cinco fotos por muestra y se determinó el área celular promedio con el programa ImageProPlus6. Además se tomó una foto de la hoja entera y se determinó el área de la hoja. De esta manera, midiendo ambas áreas es posible estimar el número de células, dado que el área de la hoja nº 5 es aproximadamente igual al número de células por el área celular promedio

$$\text{Área de la hoja nº5} = \text{área celular promedio} \times \text{nº de células}$$

Como podemos observar en la Figura 3.18, las plantas transgénicas mostraron un aumento general en el tamaño de la roseta debido a que poseen hojas más grandes que las plantas salvajes (20% mayor tamaño). Este aumento se debe a una mayor área celular dado que el número final de células por hojas entre ambas líneas es similar. Por el contrario, las plantas transgénicas presentaron una raíz primaria más corta que las plantas salvajes.

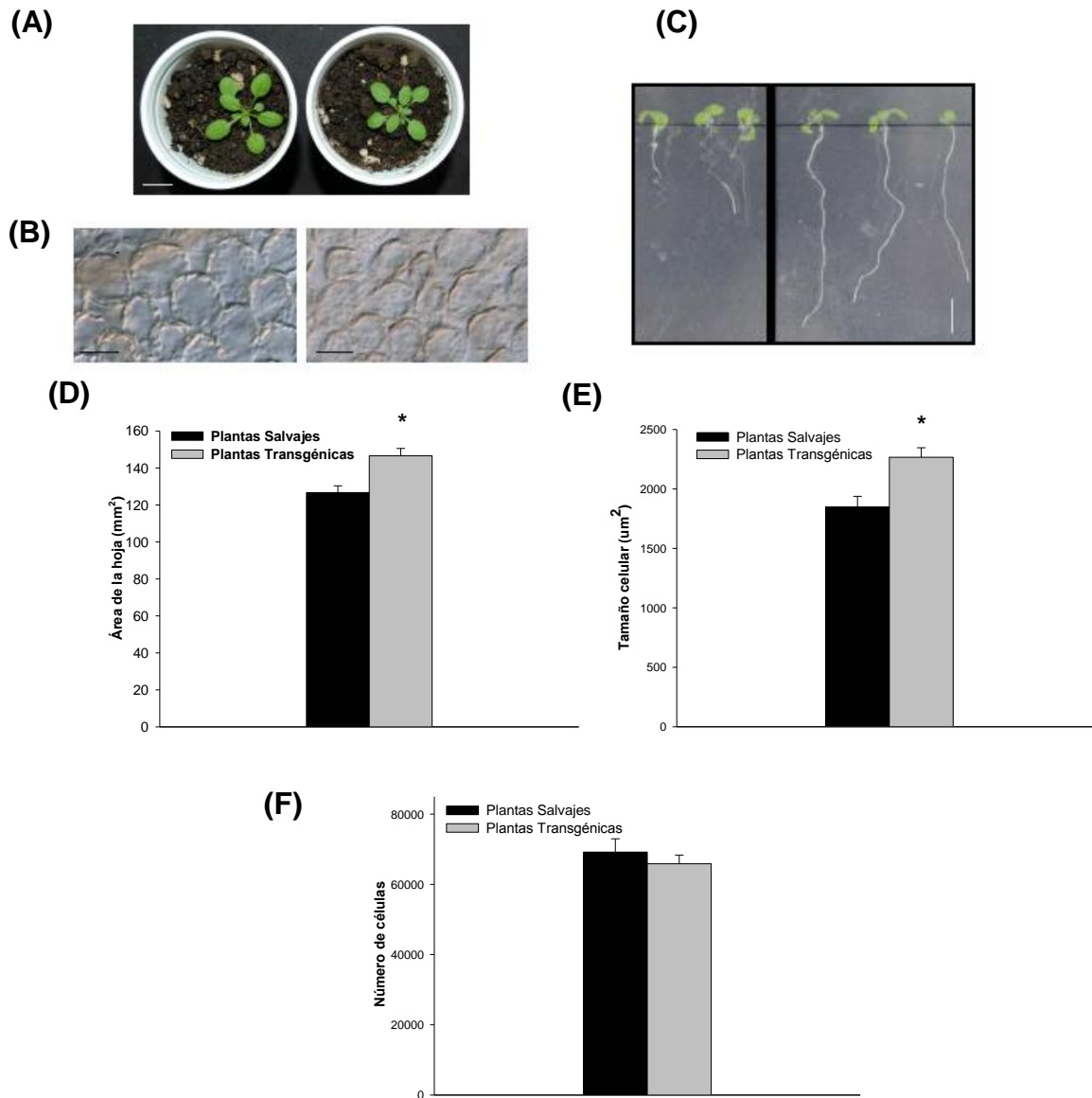


Figura 3.18 Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas de Arabidopsis. (A) Imagen obtenida a partir de plantas transgénicas (izquierda) y salvajes (derecha), crecidas durante de 20 días en cámara de cultivo según como se indica en la sección 2.5.2. Barra de escala: 1 cm. (B) células del parénquima empalizadas correspondientes a la cara adaxial sub-epidérmica de la hoja #5 de las plantas salvajes (izquierda) y transgénicas (derecha). Barra de escala: 5 µm. (C) Imagen obtenida de a partir de plántulas de las líneas salvajes (derecha) y transgénicas (izquierda) completas diez días post germinación. Barra de escala: 0.5 cm. (D) área de la hoja #5 (E) área celular promedio y, (F) número de células correspondientes a la cara adaxial sub-epidérmica de la hoja #5 de las plantas salvajes (izquierda) y transgénicas (derecha). Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas ($P < 0,05$; Anova; $P < 0.05$). Los datos muestran el promedio y el error estándar de 4 plantas y son representativas de al menos dos experimentos independientes.

Aunque más experimentos se necesitan para demostrar que las plantas transgénicas muestran un transporte de auxinas alterado, el fenotipo de desarrollo exhibido es consistente con una alterada distribución de auxinas.

CAPÍTULO 3. Discusión

3.4 Discusión

Los metabolitos secundarios que las plantas sintetizan incluyen a los flavonoides, dentro de los cuales los flavonoles son un subgrupo generado a partir de los dihidroflavonoles por acción de la enzima flavonol sintasa. Estos compuestos se acumulan como glicósidos en las vacuolas de las células epidérmicas y cumplen importantes funciones en la fisiología, el crecimiento y el desarrollo tales como proteger a las plantas y a los frutos contra los efectos deletéreos de la radiación UV-B (Stafford, 1990; Ryan y col., 2001, 2002; Solovchenko y Schmitz-Eiberger, 2003); proveer señales a los simbiontes (Hungria y col., 1991), regular el transporte de fitohormonas tales como auxinas (Brown y col., 2001; Peer y Murphy, 2006; Lewis y col., 2011, Kuhn y col., 2011), y condicionar la macho fertilidad en especies como maíz y petunia (Mo y col., 1992; Ylstra y col., 1994; Vogt y col., 1995). En particular, su capacidad de absorber la luz UV-B ha sido considerada una evidencia para el rol de estos compuestos en la protección frente a este tipo de estrés. Estudios realizados en un amplio rango de especies, incluyendo *Arabidopsis*, proporcionaron evidencias de que la luz UV-B induce la síntesis de flavonoles (Ryan y col., 2002; Stracke y col., 2010b, Agati y col., 2011; Kusano y col., 2011). Estos metabolitos contienen un grupo OH en la posición 3 del anillo C de los flavonoides (Figura 3.1), una característica estructural que le permite a estos compuestos unir metales e inhibir la formación de radicales libres, así como también de reducir las EROs una vez formadas. Por otra parte, se demostró que la expresión de los genes *FLS* es inducida por la radiación UV-B, tanto en líneas de maíz de altas altitudes como de bajas altitudes, aunque niveles mayores de estos transcritos están presentes en las variedades de altas altitudes expuestas naturalmente a niveles elevados de radiación UV-B en comparación con las bajas altitudes (Falcone Ferreyra y col., 2012); sugiriendo que el incremento en los niveles de los transcritos *FLSs* podría ser un mecanismo de adaptación frente a este tipo de ambiente. De esta manera, las evidencias descriptas indican que estos compuestos desempeñan roles no caracterizados en la respuesta al estrés por UV-B. En este trabajo de Tesis, demostramos que la expresión del gen *FLS1* se induce en plantas de maíz del genotipo B73 y en las distintas líneas del genotipo W23 luego de un tratamiento con radiación UV-B, independientemente de la expresión de los factores de

transcripción que regulan la síntesis de antocianinas *B1* y *PL1* (Figura 3.4) Estos resultados demuestran como la acumulación de flavonoles es controlada por radiación UV-B.

En segundo lugar, generamos plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la *flavonol sintasa 1* de maíz, las mismas muestran niveles aumentados de kaemferol y quercetina (Figura 3.8). Sin embargo, los niveles de antocianinas en las plantas transgénicas no se ven alterados (Figura 3.9), en contraste a estudios previos que muestran que plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresan la proteína FLS1 endógena presentan una disminución en este subtipo de flavonoides (Kuhn y col., 2011). Además, la sobreexpresión de *AtFLS1* en *Arabidopsis* no resultó en un aumento en el contenido de flavonoles como fue observado en nuestras plantas transgénicas, reflejando diferencias cinéticas significativas entre las enzimas FLS1 de *Arabidopsis* y de maíz, siendo posiblemente la eficiencia catalítica por el dihidrokaemferol (Falcone Ferreyra y col., 2010, Kuhn y col., 2011) y/o alternativamente, las diferencias en los niveles de proteínas y/o la expresión de los transgenes, las responsables de las diferencias en los niveles de flavonoles acumulados en las plantas transgénicas.

El análisis de la proteína de fusión *ZmFLS1-GFP* por microscopía confocal reveló que la misma se acumula tanto en el citosol como en el núcleo de las plantas transgénicas (Figura 3.10), de acuerdo con la localización descrita para *AtFLS1* en *Arabidopsis* bajo su propio promotor (Kuhn y col., 2011). Además, fue previamente demostrado que las enzimas chalcona sintasa y chalcona isomerasa también se localizan en el núcleo, sugiriendo que la biosíntesis de flavonoles puede también ocurrir en esta organela (Saslowsky y col., 2005). En este trabajo de Tesis demostramos por experimentos de dot blot, que mayores niveles de ambos flavonoles, pero principalmente K, protegen a las plantas transgénicas frente al daño al ADN inducido por UV-B (Figura 3.11), probablemente a través de una protección directa de los flavonoles en el núcleo. Apoyando esta hipótesis, la chalcona naringenina y los flavonoles quercetina y kaemferol fueron encontrados en el núcleo de las plantas de *Arabidopsis* (Peer y col., 2001, Saslowsky y col., 2005) y de algunas especies de árboles (Feucht y col., 2004). Por otra parte, previamente se habían encontrado flavonoides localizados en el núcleo de la epidermis de *A. thaliana* y spruce, y un

flavonol sulfatado asociado con el núcleo de *Flaveria chloraefolia* (Grandmaison y Ibrahim 1996, Hutzler y col., 1998, Buer y Muday 2004, Polster y col., 2006). También fue demostrado que los flavonoides en general protegen al ADN de la radiación UV (Stapleton y Walbot, 1994); así, la presencia de estos compuestos, y en particular de los flavonoles en el núcleo podría ser muy importante en esta protección. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la localización de ZmFLS1 en el núcleo pueda deberse a un rol alternativo no enzimático para esta enzima, representado a una proteína bifuncional como fue demostrado para muchas otra proteínas anteriormente descritas (Moore, 2004, Huberts y van der Klei, 2010).

Por otro lado, demostramos que los flavonoles protegen las plantas de *Arabidopsis* contra el daño a la maquinaria de transporte de electrones fotosintética por UV-B, sin tener un efecto protector contra el proceso de fijación de CO₂, al menos en las condiciones experimentales utilizadas (Figura 3.16). Previamente fue demostrado que la exposición a mayores niveles de UV-B en plantas no aclimatadas al mismo perjudica los principales procesos de la fotosíntesis en las hojas; tanto es así que diferentes estudios han indicado que el UV-B puede afectar la reacción de fotofosforilación, las reacciones de fijación de CO₂ y el control estomatal del suministro de CO₂, con el fotosistema II siendo particularmente sensible a este daño (Teramura y Sullivan 1994; Allen y col., 1998, Casati y Walbot, 2004; Falcone Ferreyra y col., 2010b). Por ejemplo, Bredahl y col. (2004) demostraron que el UV-B proveniente de la radiación solar disminuyó la eficiencia máxima del fotosistema mientras que la asimilación neta no resultó afectada. Sin embargo, Keiller y Holmes (2001) encontraron que los incrementos de UV-B durante más de 5 años llevaron a la inhibición de la asimilación de carbono en cinco especies de árboles, en ausencia de algún daño aparente al fotosistema II. De esta manera, ambos procesos parecen ser afectados diferencialmente por la radiación UV-B, resultando en nuestros experimentos los flavonoles más importantes en la protección al daño al fotosistema II que en la protección al proceso de fijación de CO₂.

Por otra parte, determinamos por la disminución tanto de los TBARS (Figura 3.13) como de la liberación de electrolitos (Figura 3.14) luego del tratamiento con radiación UV-B que los flavonoles protegen mayoritariamente a las plantas transgénicas

respecto a las salvajes del daño a membranas. Estos resultados probablemente se deban a un aumento del estrés oxidativo inducido por UV-B, resultando en una mayor producción de EROs en plantas con menores niveles de flavonoles. Varios experimentos han demostrado que el UV-B genera EROs en las plantas (Allan y Fluhr, 1997; Barta y col., 2004; Dai y col., 1997; Hideg y col., 1996, 2002), siendo el radical superóxido el más comúnmente detectado, el cual rápidamente es convertido a peróxido de hidrógeno. El origen de las EROs por UV-B no es claro, las fuentes más probables son las reacciones fotosintéticas, la respiración y la actividad de enzimas tales como peroxidasas y oxidasas (Mittler y col., 2004). Sin embargo, fue también reportado que el UV-B es capaz de estimular la actividad NADPH oxidasa (Mackerness y col., 2001; Rao y col., 1996) y que, plantas mutantes en los genes NADPH oxidasa *AtRBOHD* y *AtRBOHF* (del inglés, *Respiratory Burst Oxidase Homologues D* y *F*, respectivamente) muestran una menor acumulación de peróxido de hidrógeno en respuesta a UV-B (Kalbina y Strid, 2006). Así, parece que el UV-B podría producir EROs por más que un mecanismo. Algunos flavonoides proveen protección al estrés, por ejemplo, actuando como disipadores de las EROs tanto como quelando metales que generan EROs por intermedio de la reacción de Fenton (Williams y col., 2004). El exceso de luz, incluyendo longitudes de onda de UV-B, es una condición estresante a la cual todas las plantas se encuentran expuestas y, un exceso de radiación energética que alcance el aparato fotosintético resulta en una masiva generación de EROs, y activa un amplio rango de ajustes bioquímicos dirigidos principalmente a contrarrestar el daño oxidativo inducido por la luz (Halliwell, 2009). De esta manera, nuestros resultados avalan la hipótesis postulada para la cual los flavonoles son sustrato de las peroxidasas vacuolares, disipadores del H_2O_2 que difunde del cloroplasto, actuando como amortiguadores de los niveles de H_2O_2 en las células de las plantas (Yamasaki y col., 1997, Ferreres y col., 2011). Además, la disminución en el daño a membranas observado en las plantas transgénicas expuestas a la radiación UV-B en comparación al observado en las plantas salvajes es consistente con la habilidad descrita para los flavonoles de alterar la peroxidación cinética a través de la modificación del orden de empaquetamiento de los lípidos y a la disminución de la fluidez de la membrana; obstruyendo la difusión de los radicales libres y consecuentemente restringiendo las

reacciones peroxidativas (Arora y col., 2000; Tarahovsky y col., 2008). Finalmente, las plantas transgénicas con mayores niveles de K muestran también una menor disminución de la elongación de la raíz primaria en comparación con las plantas salvajes (Figura 3.15), lo que sugiere que este efecto de la radiación UV-B en el desarrollo de las plantas podría también ser protegido por los flavonoles.

El último objetivo de este capítulo de Tesis fue comparar el fenotipo de crecimiento de las plantas salvajes y transgénicas con mayores niveles de flavonoles, dado que, como fue mencionado al comienzo de esta Discusión, los flavonoles han sido considerados también como reguladores del transporte de auxinas, afectando el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Brown y col 2001; Peer y col., 2004; Ge y col., 2010, Kuhn y col., 2011, Lewis y col., 2011). El transporte polar de auxinas es controlado por varios tipos de proteínas, las cuales bombean auxinas dentro y fuera de las células de las plantas incluyendo transportadores de entrada y de salida de la misma, respectivamente, donde los flavonoles podrían modular la distribución de los transportadores de salida de auxinas como las proteínas PIN y ABCB (mencionadas en la Introducción de este capítulo de Tesis) interaccionando con ellos y evitando la salida de esta hormona (Peer y col. 2004, Santelia y col., 2008, Lewis y col., 2009). En las raíces en desarrollo, existen dos fuentes importantes de auxinas, las auxinas sintetizadas *de novo* desde las partes aéreas de la planta a la punta de la raíz transportadas en forma basipetal, y las auxinas que son localmente sintetizadas en las puntas de las raíces laterales y primarias (Mahajan y col., 2011). En particular, en nuestras plantas transgénicas, los mayores niveles de flavonoles causarían la inhibición del transporte basipetal de auxinas desde la región aérea a las raíces de las plántulas de *Arabidopsis*, resultando en la inhibición del crecimiento de la raíz (Figura 3.18 C). Por otro lado, las plantas transgénicas muestran un mayor tamaño de las hojas, como resultado de tener células más grandes que las plantas salvajes (Figura 3.18 A). Un gran número de evidencias indican un efecto negativo en el tamaño de las células de las hojas causado por altos niveles de auxinas por un mecanismo que todavía no ha sido definido (Keller y col., 2004; Mahajan y col., 2011). Además, la expansión celular se encuentra fuertemente asociada con la endoreduplicación (Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003; Inze y De veylder, 2006; Ishida y col., 2010). Por otra parte, fue

demostrado que las auxinas coordinan la transición mitótica a endociclo en *Arabidopsis*, y que una reducida señalización de auxinas disminuye la expresión de los genes del ciclo mitótico, reduce las actividades de los reguladores mitóticos y provoca la entrada a endorreduplicación, promoviendo la expansión celular, y a la inversa altos niveles de auxina (Ishida y col., 2010). Por tanto, las auxinas juegan un rol clave tanto en la entrada como en la salida de la endorreduplicación y por consiguiente, cambios en la progresión del ciclo celular, debido a alteraciones en la distribución de auxina por el aumento del nivel de flavonoles.

En resumen, el fenotipo de desarrollo exhibido para nuestras plantas transgénicas con altos niveles de flavonoles parece ser concordante con una alterada distribución de auxinas. No obstante, experimentos adicionales son necesarios para investigar como el transporte de auxinas y su distribución es modificada en las plantas transgénicas y cuál es su relación con los fenotipos de desarrollo observados. Además, si bien nuevas evidencias señalan que la quercetina sería el principal flavonol que modula el transporte basipetal de auxinas, el kaemferol parece estar también implicado en este proceso, así como en el transporte acropetal presentando un rol de desarrollo distinto (Peer y col., 2004, Ringli y col., 2008, Lewis y col, 2011). De acuerdo a nuestro resultados, el kaemferol, el cual es el flavonol cuyos niveles se encuentran mayormente incrementados en nuestras plantas transgénicas, podría ser el modulador activo del transporte de auxinas, sugiriendo que los dos compuestos (K y Q) podrían unirse al mismo transportador y tendrían características similares que los harían apropiados como reguladores de este transporte. Sin embargo, como las plantas transgénicas también muestran un ligero aumento en el nivel de quercetina, este flavonol podría ser el responsable de los fenotipos observados.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo de Tesis indican que los flavonoles, y en particular el kaemferol, son efectivos protectores solares de la luz UV-B. La inducción de la síntesis de estos compuestos protege a las plantas frente a este tipo de estrés con un rol funcional que podría ser logrado no sólo por sus características de absorción de la radiación UV-B, sino también por la reducción de las EROs una vez formadas.

CAPÍTULO 4. Introducción

CAPITULO 4

4.1 Introducción

4.1.1 Biosíntesis de flavonas en plantas

Las flavonas son un grupo mayoritario de metabolitos flavonoides con diferentes funciones fisiológicas en las plantas superiores. Su biosíntesis comienza a partir de las flavanonas, las moléculas precursoras de todos los tipos de flavonoides principales. En plantas fueron descritas dos clases de enzimas flavona sintasas (FNS) diferentes, con capacidad de catalizar la formación del doble enlace entre el C2 y el C3 del esqueleto de la flavanona, denominadas: FNSI y FNSII, representando este hecho una característica única dentro de la ruta de biosíntesis de los flavonoides (Figura 4.1).

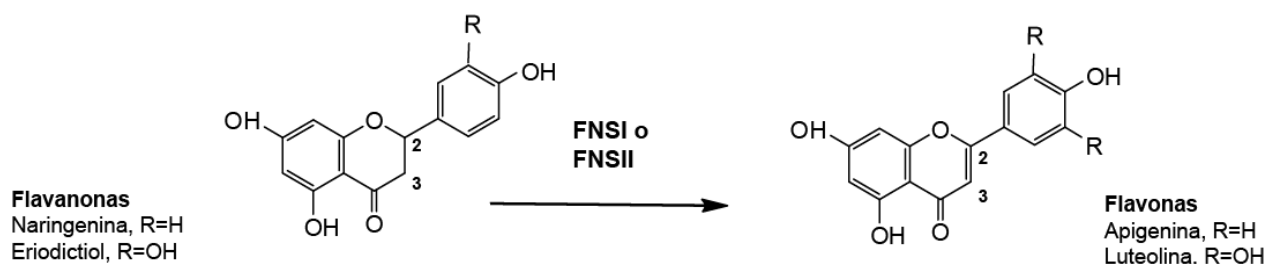


Figura 4.1 Formación de flavonas catalizada por las enzimas FNSI o FNSII. (Adaptado de Martens y col., 2003).

FNSI, es una dioxigenasa soluble (2-ODD) dependiente de Fe^{+2} (necesario para reducir el oxígeno) y de 2-oxoglutarato (Britsch, 1990), las cuales han sido descritas principalmente en el género *Apiaceae*, sin embargo, hace pocos años que se identificó una FNSI en una planta monocotiledónea como arroz (*Oryza sativa*); la misma fue denominada OsFNS1-1 y representó la primer FNSI encontrada fuera del género *Apiaceae* (Lee y col., 2007; Kim y col., 2008a). FNSI junto a la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), la flavonol sintasa (FLS) y la dioxigenasa de leucoantocianidina (LDOX), constituyen un grupo de dioxigenasas que participan de la síntesis de los flavonoides en las plantas. Dos motivos conservados en las secuencias de aminoácidos de las distintas proteínas representados por HXD y RXS, participan en la unión al Fe^{+2} y al 2-oxoglutarato, respectivamente; y son los responsables de la clasificación de estas proteínas como 2-ODDs (Britsch y Grisebach, 1986; Lukacin y col., 2000). Por otra

parte, la comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas 2-ODDs caracterizadas muestra que la FNSI presenta la mayor identidad de secuencia con la enzima F3H, las cuales compiten por el mismo sustrato flavanona, que con cualquier otra 2-ODD (Martens y col., 2003; 2005) (Figura 4.2). Más aún, resultados de mutagénesis sitio-dirigida realizados en la secuencia FNSI de perejil (*Petroselinum crispum*) sugieren que la misma evolucionó a partir de la F3H por duplicación de genes y ganancia de función (Gebhardt y col., 2005; 2007).

Por el contrario, las FNSII pertenecen al grupo de monooxigenasas de unión a membranas dependientes del citocromo P450, las cuales requieren NADPH y oxígeno (Heller y Forkmann, 1993). Estas enzimas se encuentran ampliamente más distribuidas en plantas que las FNSI y fueron encontradas en familias de dicotiledóneas que acumulan flavonas, incluyendo *Leguminosae*, *Asteraceae*, *Plantaginaceae* y *Lamiacea* (Martens y Mithofer, 2005). Todas las enzimas FNSII caracterizadas de dicotiledóneas pertenecen a la subfamilia CYP93B, siendo la mayoría de las proteínas estudiadas capaces de convertir flavanonas directamente a flavonas. Así, fueron identificadas enzimas FNSII en especies tales como: *Gerbera hybrids*, *Antirrhinum majus*, *Torenia hybrida*, *Perilla frutescens* y *Glycine max* L., las cuales recibieron la denominación: CYP93B2; CYP93B3, CYP93B4; CYP93B6 y CYP93B16, respectivamente (Martens y Forkmann, 1999; Akashi y col., 1999; Kitada y col., 2001; Fliegmann y col., 2010), encontradas en Cytochrome P450 Homepage <http://drnelson.uthsc.edu/> (Nelson y col., 2009). Sin embargo, dentro de esta subfamilia, los mecanismos catalíticos de las distintas enzimas pueden diferir unos de otros, habiéndose demostrado para los genes *FNSII* de leguminosas como *Glycyrrhiza echinata* (regaliz, CYP93B1) y *Medicago truncatula* (CYP93B10 y CYP93B11) (Akashi y col. 1998; Zhang y col. 2007), que codifican a enzimas con actividad flavanona 2-hidroxilasa (F2H), conduciendo por el contrario a la formación de 2-hidroxiflavanona *in vitro* y produciendo las flavonas solo después de un tratamiento ácido (Akashi y col., 1999; Zhang y col., 2007). Las 2-hidroxiflavanonas representan metabolitos secundarios raros, informados en especies tales como *Baccharis bigelovii*, *Collinsonia canadensis*, *Galega officinalis*, *Populus nigra* y *Uvaria rufus*, entre otras (Stevens y col., 1999). En legumbres, se piensa que las 2-hidroxiflavanonas sirven de intermediarios en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

El silenciamiento de *CYP93B10* y *CYP93B11* en *M. truncatula* resultó en raíces deficientes en flavonas, sugiriendo que la 2-hidroxilación es un paso importante para la formación de flavonas. En *G. echinata*, las 2-hidroxiflavanonas son también sustrato para la producción de la fitoalexina licodiona, sugiriendo así que la enzima CYP93B1 provee de un intermediario común en la biosíntesis de licodionas y flavonas. Más aún, el análisis filogenético de la subfamilia CYP93B de *Leguminosae* sugirió duplicación génica temprana en las FNSII, generando una enzima menos eficiente con actividad F2H. Además, en *M. truncatula* se predice la presencia de una enzima FNS denominada “Antigua” y una F2H “Moderna”, cuyos patrones de expresión serían mutuamente excluyentes, presentando expresión tejido-específica (Medicago Gene expression Atlas) (Zhang y col., 2010).

Dentro del grupo de las monocotiledóneas se describieron en arroz y sorgo (*Sorghum bicolor*) dos enzimas con actividad F2H demostrada, capaces de producir 2-hidroxiflavanonas en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Estas enzimas recibieron la denominación CYP93G2 y CYP93G3, respectivamente (Du y col., 2010a y b), por pertenecer a la subfamilia CYP93G (Nelson y col., 2004), demostrándose de esta manera que la 2-hidroxilación de flavanonas no se encuentra restringida únicamente a especies leguminosas o de la subfamilia CYP93B. Sin embargo, estudios filogenéticos sugieren un origen independiente para las F2H en cereales. Más recientemente se identificó y caracterizó en arroz una enzima FNSII denominada CYP93G1, la cual fue capaz de generar las flavonas directamente, sin la formación del intermediario 2-hidroxiflavanona (Brazier-Hicks y Robert Edwards, 2013).

En maíz, un cereal de importancia económica en nuestro país y en *Arabidopsis thaliana*, la planta dicotiledónea modelo de estudio; a pesar que diferentes flavonoides en los distintos tejidos ya habían sido identificados; al comenzar mi Tesis doctoral los pasos enzimáticos de la síntesis de flavonas resultaban desconocidos, no habiéndose encontrado en los genomas de tales especies, ningún gen capaz de codificar enzimas para la síntesis de flavonas.

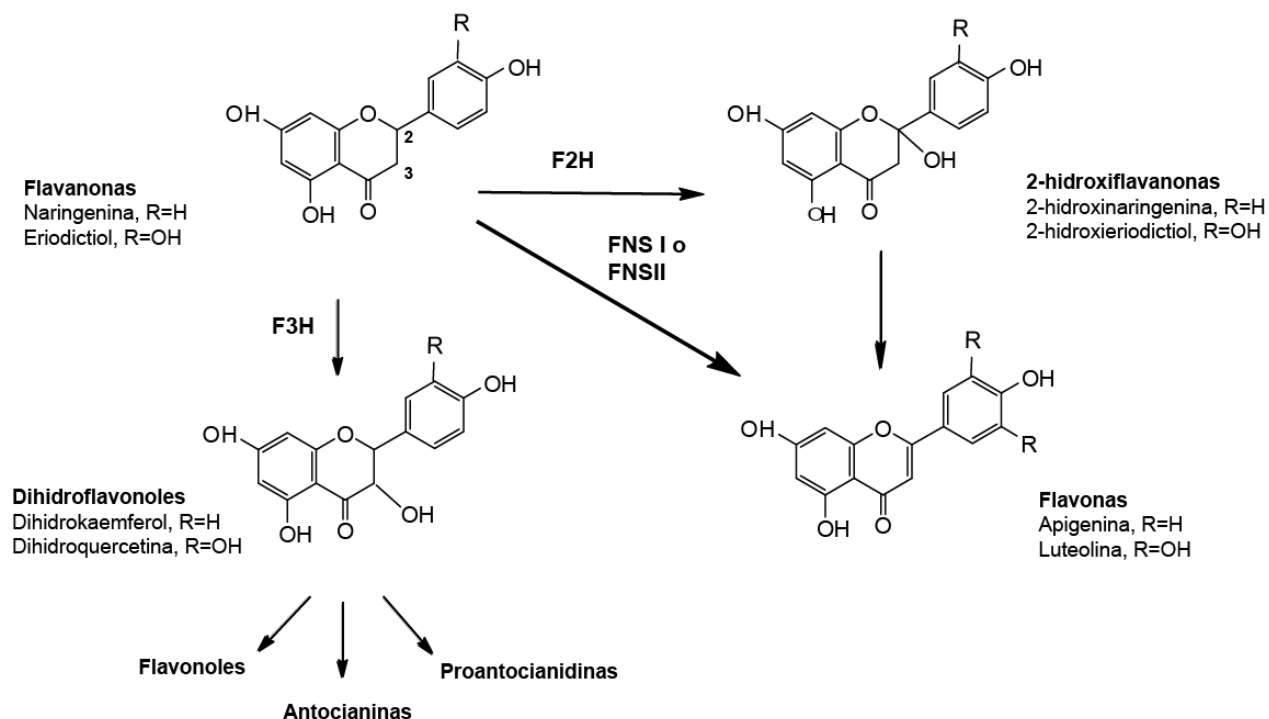


Figura 4.2 Biosíntesis de flavonas de flavanonas. Dos sistemas de enzimas FNS han sido descritos en plantas. FNSI es una enzima soluble mientras que FNSII es una enzima de unión a membrana. FNSI y la mayoría de las enzimas FNSII convierten flavanonas a flavonas directamente. En otras especies vegetales ocurre la conversión de flavanonas en 2-hidroxi flavanonas, las cuales pueden luego ser convertidas a flavonas. La flavanona 3-hidroxilasa (F3H) también usa las flavanonas como sustratos, produciendo dihidroflavonoles, los cuales son los precursores de los flavonoles, antocianinas y proantocianidinas. (Adaptado de Du y col., 2009).

4.1.2 Rol de las flavonas en plantas

Los flavonoides, y dentro de ellos las flavonas, son metabolitos secundarios que se acumulan en las vacuolas de las plantas generalmente como derivados C- u O-glicósidos. Los azúcares en los flavonoides C-glicósidos se encuentran unidos directamente al flavonoide por un enlace C-C que es resistente a la hidrólisis ácida. Por otra parte, los O-azúcares están unidos a los grupos hidroxilo fenólicos de los flavonoides y son inestables al tratamiento ácido.

La mayoría de los flavonoides C-glicósidos son flavonas encontradas en briofitas, helechos, gimnospermas y angiospermas (Harborne, 1993). En cereales, tales como arroz, trigo (*Triticum aestivum*) y maíz, la principal clase de flavonoides C-glicósidos se

acumulan en la forma de C-glicosil flavonas, con una amplia gama de funciones fisiológicas. Entre las distintas funciones, las C-glicosil flavonas están involucradas en la defensa frente a patógenos. Por ejemplo, la maicina, es la C-glicosil flavona predominante en las barbas de algunas variedades de maíz y se demostró que es un insecticida natural contra el gusano de la mazorca de maíz *Helicoverpa zea* (McMullen y col., 1998; 2004). Además, se observó que los C-glicosil flavonoides identificados en hojas de pepino (*Cucumis sativus*) actúan como fitoalexinas en la defensa frente al hongo *powdery mildew* (McNally y col., 2003a; b).

Por otro lado, las C-glicosil flavonas se encuentran también involucradas en la protección frente a la radiación UV-B. Por ejemplo, líneas de maíz provenientes de altas altitudes, desarrollan mayor tolerancia a niveles aumentados de UV-B, debido a que acumulan mayores niveles de maicina y ramnosil-isoorientina (el precursor de la maicina), compuestos que se encuentran a bajos niveles y de manera constitutiva en las hojas de las variedades provenientes de bajas altitudes. El hábitat natural de las variedades de alta altitud, recibe diariamente niveles significativamente mayores de UV-B que zonas más bajas a las mismas latitudes, por lo que estas razas se muestran aclimatadas a la radiación UV-B (Casati y Walbot, 2005). Algo similar ocurre en arroz, donde se observó un aumento de C-glicosil flavonas por la radiación UV-B en cultivares tolerantes y no así, en cultivares susceptibles a dicha radiación (Markham y col., 1998).

En general, las flavonas son de colores claros pero pueden actuar como co-pigmentos junto a las antocianinas. Además, estos metabolitos son importantes en plantas debido a que interactúan con los microorganismos del ambiente (Dixon y Paiva, 1995; Shirley, 1996). Por ejemplo, actúan como señal en las etapas tempranas de la simbiosis de las leguminosas con las bacterias del suelo (*Rhizobia*) encargadas de formar los nódulos radiculares fijadores de nitrógeno (Phillips, 1992; Spaink, 1995; Hassan y Mathesius, 2012).

4.1.3 Las flavonas en maíz y su rol protector frente a la radiación UV-B

En la mayoría de las variedades de maíz, la maicina es la principal C-glicosil flavona predominante en las barbas (más del 2% del peso seco) cuya síntesis es regulada por P1; el factor de transcripción del tipo MYB que regula la síntesis de

flavonoides, citado en capítulos anteriores (Gueldner y col., 1989; Byrne y col., 1996). Otras flavonas, como el precursor inmediato de la maicina, ramnosilisoorientina, también pueden estar presente (Snook y col., 1993). El gusano lepidóptero de la larva CEW (del inglés, *corn earworm*) es uno de los insectos más dañinos que infecta al maíz en América, el cual se alimenta de las barbas pudiendo alcanzar también los granos (Rector y col., 2002). La maicina y compuestos relacionados, apimaicina y metoximaicina acumulados en las barbas, confieren resistencia contra este insecto inhibiendo el crecimiento de las larvas. La combinación de genética clásica, mapeo genético por QTLs y análisis químicos en poblaciones F2 generadas mediante cruza entre líneas de maíz de diferentes genotipos permitió la identificación de locus involucrados en la producción de maicina y compuestos relacionados (Byrne y col., 1996; McMullen y col., 1998; Grotewold y col., 1998). Además, mediante la utilización de líneas mutantes en *sm1* y *sm2*, y doble mutantes que exhiben el fenotipo “salmon silk (*sm*)”, fueron propuestas las etapas mediante las cuales la maicina es sintetizada. El gen *Sm2* codifica para una enzima ramnosil transferasa o un regulador que controla su actividad, y *Sm1* codifica o controla la enzima que modifica la molécula de glucosa (McMullen y col., 2004) (Figura 4.3). No obstante, si bien se ha propuesto una vía de síntesis, hasta el momento no se han identificado y caracterizado los genes codificantes a las enzimas implicadas en la síntesis de flavonas C-glicósidos. Varios intentos con resultados no satisfactorios se han realizado para transferir mediante cruza y selección la resistencia conferida por la maicina hacia germoplasmas de importancia económica como el maíz dulce, tratando de mantener características preferidas por los consumidores (Guo y col., 2010).

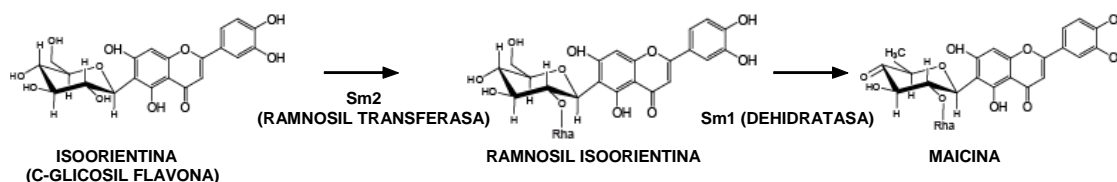


Figura 4.3 Esquema de la vía propuesta de síntesis de maicina (Adaptado de McMullen y col., 2004).

Por otra parte, la protección frente al UV-B en hojas verdes de maíz es también un rol documentado para las flavonas, al igual que fue demostrado para los flavonoles en el capítulo anterior. Así, se demostró en cinco razas de maíz de altura con altos niveles de flavonoides y antocianinas: tres de México (Arrocillo Amarillo, Cacahuacintle y Cónico; que crecen a altitudes entre 2200-2800 m.s.n.m.) y dos de la Cordillera de los Andes (Mishca y Confite Puneño; que crecen a altitudes entre 2200-2800 y 3600-3900 m.s.n.m., respectivamente) y, en plantas deficientes en flavonoides del genotipo W23 (Casati y Walbot, 2003), que la línea deficiente en flavonoides presentaba mayores cambios en el transcriptoma que las líneas que acumulan flavonoides (Casati y Walbot, 2003) verificando de esta manera, que estos pigmentos actúan como protectores atenuando el efecto del UV-B (Stapleton y Walbot, 1994). Por lo tanto, la producción en hojas de estos flavonoides y su inducción por UV-B podría ser un mecanismo que estas razas han desarrollado para aumentar su tolerancia a elevados niveles de UV-B. Estas líneas expresan también el factor de transcripción *P1* en hojas. Además, la expresión de *P1* es considerablemente mayor en las líneas de altas altitudes que en las líneas de baja altitud y es inducido por la radiación UV-B en las hojas de las distintas variedades (Casati y Walbot, 2005; Rius y col., 2012).

CAPÍTULO 4. Objetivos

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo general

- El objetivo general del presente capítulo de Tesis es identificar y caracterizar enzimas que participen en la biosíntesis de flavonas en plantas de maíz y Arabidopsis.

4.2.2 Objetivos específicos

A partir del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Identificar y analizar el patrón de expresión de distintos genes putativos codificantes para enzimas mono y dioxigenasas involucradas en la síntesis de flavonas.
- Clonar y expresar las distintas regiones codificantes (CDS) putativas que codifican para estas proteínas en vectores adecuados para su posterior expresión heteróloga en bacterias y levaduras.
- Definir la actividad catalizada por las enzimas en estudio mediante ensayos de bioconversión *in vivo* agregando a los cultivos de estos microorganismos los distintos flavonoides posibles sustratos. Verificar la bioconversión mediante la identificación de los productos formados por métodos analíticos.
- Expresar las proteínas dioxigenasas de maíz y Arabidopsis de manera recombinante en bacterias. Purificar las proteínas y realizar ensayos de actividad *in vitro*.
- Investigar la capacidad de la enzima dioxigenasa de maíz de producir flavonas *in planta*

CAPÍTULO 4. Resultados

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterización de enzimas monoxigenasas con un posible rol en la síntesis de flavonas en plantas de maíz

4.3.1.1 Identificación de un transcripto codificante para una putativa flavona sintasa II de maíz

Con el propósito de estudiar la síntesis de flavonas en maíz, investigamos la base de datos correspondiente a experimentos de secuenciación de ARN e inmunoprecipitación de la cromatina acoplada a secuenciación (RNA-seq y ChIP-Seq, por sus nombres en inglés *RNA Sequencing* y *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*, respectivamente) realizados previamente en el laboratorio del Dr. Erich Grotewold en The Ohio State University, Estados Unidos, con el objetivo de analizar la función regulatoria de P1, el factor de transcripción que regula la expresión de algunos genes de la vía de las flavonas mencionado en la Introducción del presente capítulo de Tesis. Estos experimentos se realizaron utilizando tejidos de pericarpios y barbas de la línea P1-rr^{A619} generada al introducir mediante cruza el alelo *P1-rr* en la línea de maíz A619, la cual posee el alelo recesivo *P1-ww*, y por consiguiente no expresa P1 y casi no acumula flavonas en las barbas (Bushman y col., 2002). Estos estudios demostraron que P1 modula la expresión de miles de genes de los cuales aproximadamente 1.500 fueron identificados como blancos directos del mismo. Entre los genes identificados, se encontraron genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides, siendo de nuestro interés el gen *GRMZM2G167336*, localizado en el cromosoma 9 (www.maizesequence.org) del genoma de maíz, que mostró mayores niveles de expresión en pericarpios y barbas *P1-rr* respecto de *P1-ww* y cuya región codificante presentó una alta identidad de secuencia con la región codificante de la flavona sintasa II (FNSII) caracterizada de sorgo y arroz (89 y 74 %, respectivamente) (Du y col., 2010a; Du y col., 2010b). Teniendo en cuenta estos datos, denominamos por convención a este gen *ZmFNSII-1*.

4.3.1.2 Análisis de la expresión del gen *ZmFNSII-1* en plantas de maíz

Con el objetivo de analizar la expresión del gen *ZmFNSII-1*, se utilizaron diferentes tejidos de la línea B73 de maíz incluyendo tejidos embrionarios (hipocótilo y radícula) y tejidos de plantas adultas (hoja y raíz); como también tejidos florales de la línea A619 de maíz (pericarpios y barbas *P1-ww* y *P1-rr*), para realizar experimentos de RT-PCR en tiempo real (sección 2.10.4) utilizando los oligonucleótidos adecuados para amplificar el gen de interés y el gen normalizador *ACTINA1*, el cual fue previamente descrito como un apropiado gen de referencia (Tabla VI).

Como se observa en la Figura 4.4, la expresión del gen *ZmFNSII-1* fue detectada en todos los tejidos analizados, mostrando notablemente una mayor en pericarpios y barbas que expresan P1 (*P1-rr*), confirmando también por esta técnica su regulación por P1, de manera similar a como fue observado en los experimentos de RNA-Seq y ChIPSeq mencionados en el párrafo anterior.

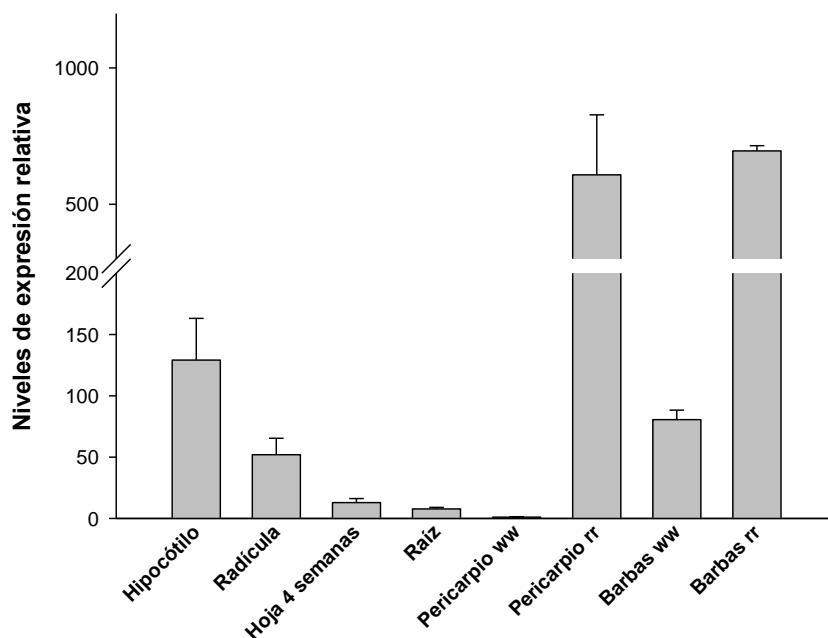


Figura 4.4 Niveles del transcripto *ZmFNSII-1* determinados por RT-PCR en tiempo real. Las muestras provienen de distintos tejidos de la línea B73 y A619 de maíz. Para cada muestra los resultados analizados corresponden al promedio de los datos

provenientes de tres réplicas biológicas independientes, y de dos replicados técnicos como mínimo. Las barras de error indican el error estándar de las muestras.

4.3.1.3 Clonado y expresión de la proteína *ZmFNSII-1* en levaduras

Con el objetivo de determinar si *ZmFNSII-1* codifica para una FNSII, procedimos en primer lugar a amplificar mediante RT-PCR la región codificante a partir de ADNc de pericarpios P1-rr^{A619}. La reacción de PCR se llevó a cabo como se indica en la sección 2.10.4. El producto de PCR obtenido fue verificado mediante electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) y el tamaño del fragmento amplificado fue comparado con el marcador de tamaño molecular λ *EcoRI-HindIII*. El fragmento amplificado presentó la masa molecular esperada. A continuación, con el objeto de determinar la actividad FNSII, el ADNc obtenido fue purificado y subclonado en el vector de expresión pGZ25 de levaduras (sección 2.12) debido a que FNSII es a una enzima CYP450 de unión a membrana dependiente de NADPH. El vector pGZ25 deriva del plásmido YEplac112 (Gietz y Sugino, 1988), el cual posee el promotor constitutivo de la gliceraldehído-3P deshidrogenasa (GDP). Así, con la construcción obtenida pGZ25-*ZmFNSII-1* y el vector pGZ25 vacío como control negativo, se transformaron las células de levaduras WATT11 (Pompon y col., 1996), una cepa que expresa la enzima ATR1 P450 reductasa de *A. thaliana* (citocromo P450:NADPH reductasa) y de esta manera, provee los equivalentes de reducción esenciales para la actividad de citocromos P450 de plantas (sección 2.17).

4.3.1.4 Ensayos de actividad enzimática correspondientes a la caracterización de la enzima *ZmFNSII-1*

Para caracterizar funcionalmente el gen de maíz, se procedió a realizar los ensayos de expresión y actividad de *ZmFNSII-1* *in vivo* (sección 2.31), agregando directamente al medio de cultivo, las flavanonas sustratos, naringenina y eriodictiol; alternativa que fue posible debido a la naturaleza anfipática de ambas flavanonas. Luego de 20 h de incubación a 30 °C con agitación se tomaron las alícuotas correspondientes y se extrajeron los flavonoides con etil-acetato. Las muestras resultantes fueron resuspendidas en metanol para su posterior análisis.

4.3.1.5 Identificación de los productos formados por distintos métodos analíticos

La identidad de los productos formados se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los análisis de HPLC se realizaron inyectando en forma secuencial a un equipo de análisis ÄKTA basic 10/100 (Amersham Biosciences) los extractos metanólicos mencionados en el párrafo anterior junto a las soluciones de los estándares comerciales (Sigma-Aldrich) necesarios para verificar la reacción enzimática investigada. Los compuestos fueron separados por un gradiente lineal, y los tiempos de retención de los diferentes picos fueron analizados con el programa UNICORN (versión 3.0), según como se indica en la sección 2.31.2.

En la Figura 4.5 se muestran los espectros correspondientes a los análisis de HPLC para las células transformadas de levaduras WAT11 (A y B), y para los estándares comerciales correspondientes (C). Cuando el medio de reacción conteniendo el vector *pGZ25-ZmFNSII-1* fue suplementado con los sustratos, naringenina o eriodictiol, se observó la formación de las flavonas producto, apigenina y luteolina, respectivamente (derecha), no observándose por el contrario formación de productos en el medio de reacción correspondiente al vector pGZ25 vacío (vector vacío; izquierda). No obstante, fue posible detectar la presencia de un tercer pico adicional más polar que el sustrato en la reacción utilizando naringenina como sustrato, que podría corresponder a la forma hidroxilada de la flavanona respectiva (2-hidroxinaringenina), por comparación de su tiempo de retención con dicho compuesto sintético. Por otra parte, había sido previamente descrito que células de levaduras son capaces de convertir 2-hidroxiflavanonas en las correspondientes flavonas debido a que podrían expresar una enzima con actividad deshidratasa (Zhang y col., 2007). Así, *ZmFNSII-1* podría ser una flavanona 2-hidroxilasa (F2H1), capaz de formar 2-hidroxiflavanona, la cual sería posteriormente convertida enzimática o químicamente en flavona, y no una FNSII, como fue sugerido en un primer momento.

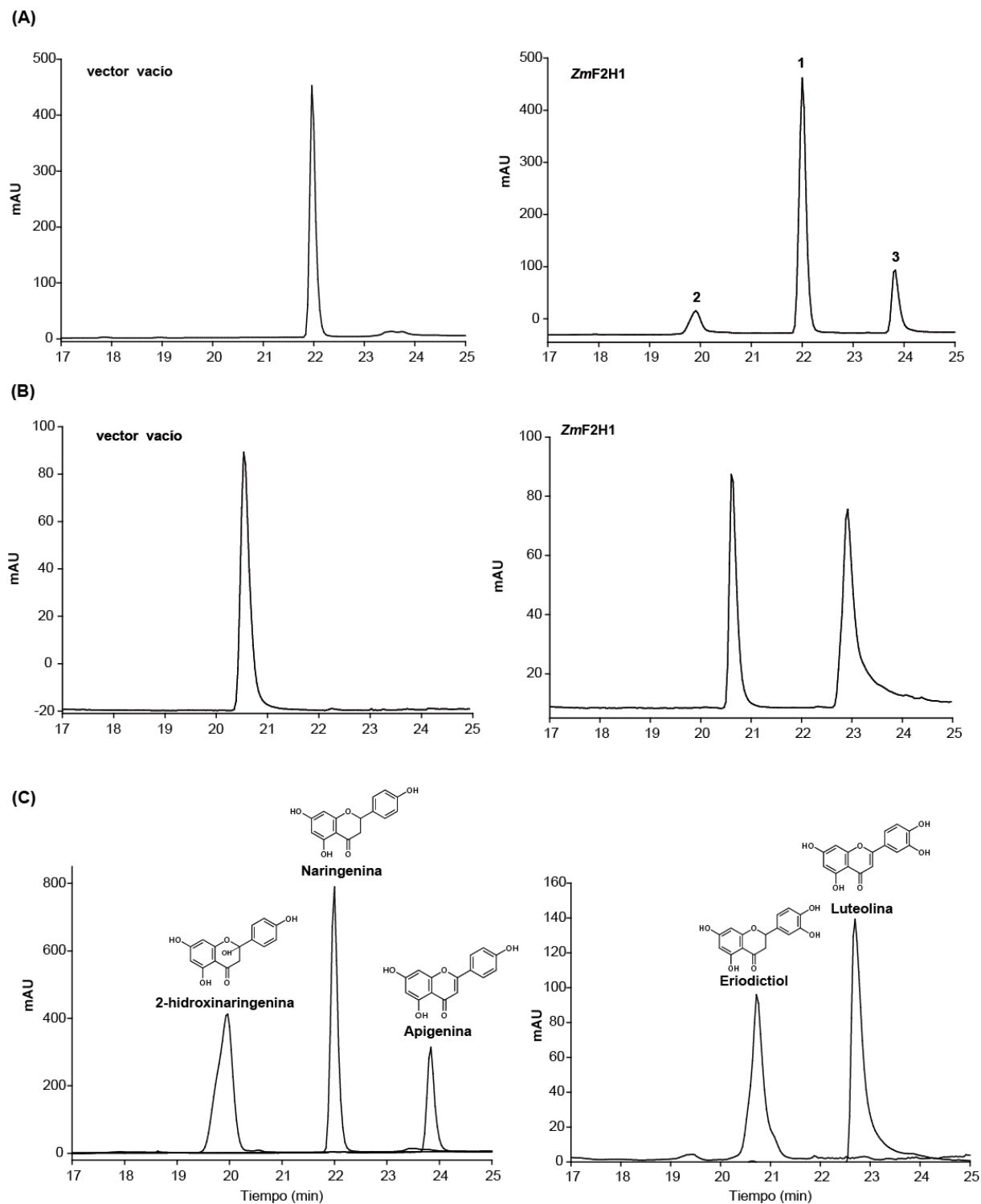


Figura 4.5 Perfiles de HPLC de las células de levaduras WATT11 expresando la F2H1 de maíz. **(A)** Cultivos de levaduras suplementados con naringenina (pico 1) conteniendo el vector vacío (izquierda) o F2H1 (derecha) mostrando la producción de apigenina (pico 3) y de 2-hidroxinaringenina (pico 2). mUA, mili unidades de

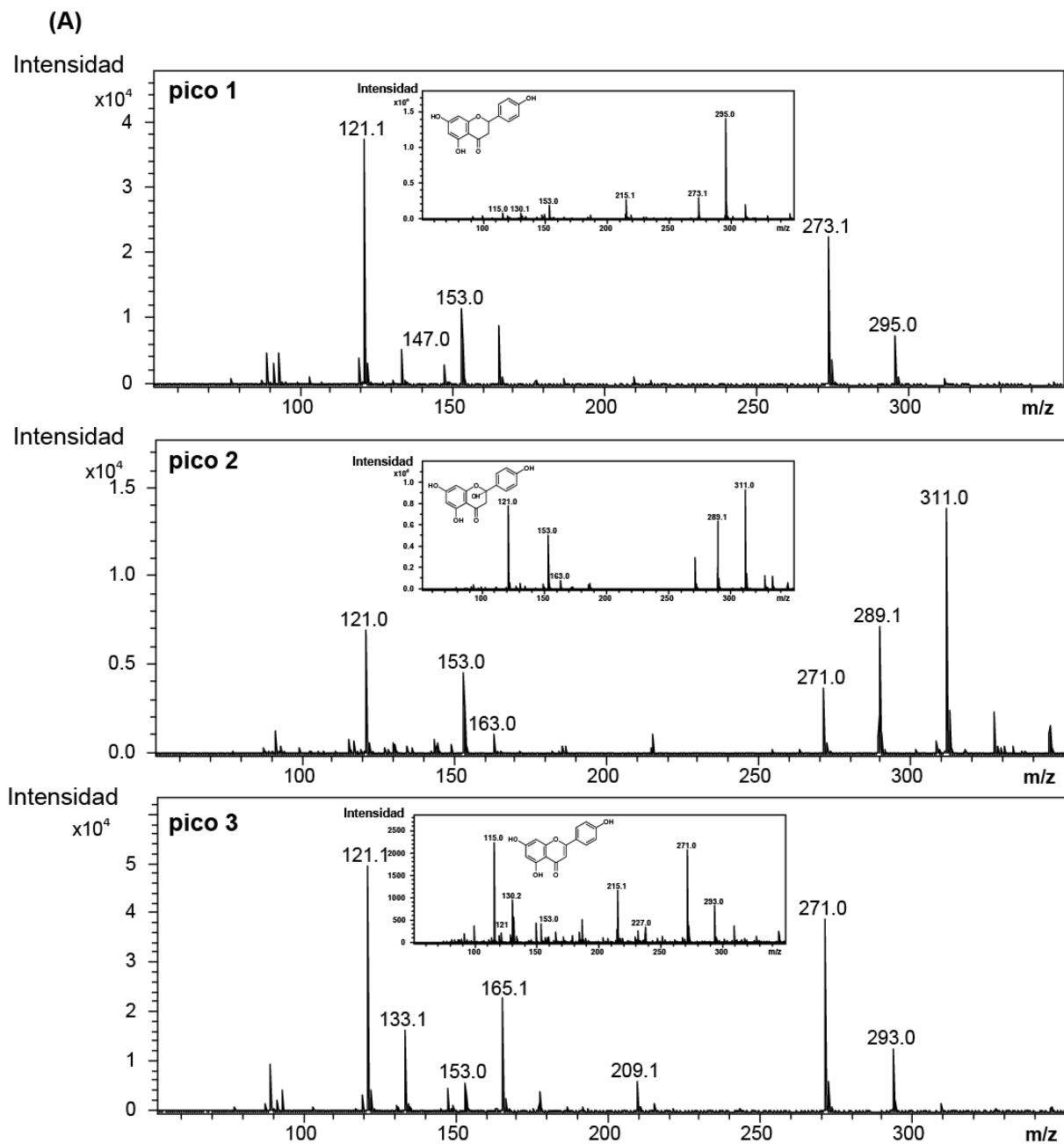
absorbancia. **(B)** Cultivos de levaduras suplementados con eriodictiol para analizar la producción de luteolina por la F2H1 (derecha). F2H1 expresada en levaduras también produce 2-hidroxinaringenina (tiempo de retención = 19.8 min) usando naringenina como sustrato. **(C)** Estándares comerciales fueron usados como control.

Para verificar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, técnica internacionalmente conocida por su nombre en inglés *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS), con objeto de identificar si el producto de la enzima en estudio detectado por HPLC podría ser 2-hidroxinaringenina. Esta técnica analítica es comúnmente utilizada para el análisis de flavonoides, debido a que permite combinar las características de separación de LC con las excelentes características de detección de MS, obteniendo mayor sensibilidad y poder de identificación que con la técnica de HPLC mencionada anteriormente.

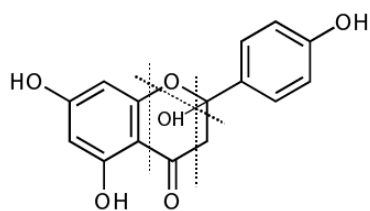
En la Figura 4.6 A se observan los perfiles de fragmentación de los distintos compuestos presentes en el medio de reacción de las levaduras suplementadas con naringenina. El análisis de la abundancia relativa del producto iónico utilizando el modo de ionización positiva por electroespray permitió validar el producto 2 como 2-hidroxinaringenina con una relación carga masa (m/z) de 289 $[M+H^+]$. Además fue posible validar el patrón de fragmentación correspondiente a la naringenina con m/z 273 $[M+H^+]$ y a la apigenina con m/z de 271 $[M+H^+]$ por comparación con los patrones de fragmentación de los estándares respectivos por LC-MS/MS. Por otra parte, cuando se suplementaron las células con eriodictiol (Figura 4.6 C), se detectó también la formación de 2-hidroxi-eriodictiol con una relación carga masa (m/z) de 305 $[M+H^+]$, validando además el patrón de fragmentación correspondiente a eriodictiol con m/z 289 $[M+H^+]$ y a la luteolina con m/z de 287 $[M+H^+]$ por comparación con los patrones de fragmentación de los estándares respectivos por LC-MS/MS.

De esta manera, las células de levaduras que expresan la enzima en estudio acumularon bajos, pero detectables niveles de 2-hidroxi-flavanonas, y la aparición de las flavonas en el medio de reacción pudo deberse a la reacción de deshidratación de las flavanonas hidroxiladas que, como se ha descrito para otras especies vegetales, sería catalizada por una enzima presente en las levaduras o espontáneamente debido a la inestabilidad de la forma hidroxilada. En conjunto, estos resultados demuestran que el gen *GRMZM2G167336* codifica para una F2H1 y no una FNSII, una enzima capaz de convertir naringenina y eriodictiol en los correspondientes 2-OH derivados, una etapa

hasta el momento desconocida en la formación de flavonas en maíz. Esta enzima recibió el nombre CYP93G5 por pertenecer a la subfamilia CYP93 de proteínas de plantas con posible función F2H/FNS.



(B)



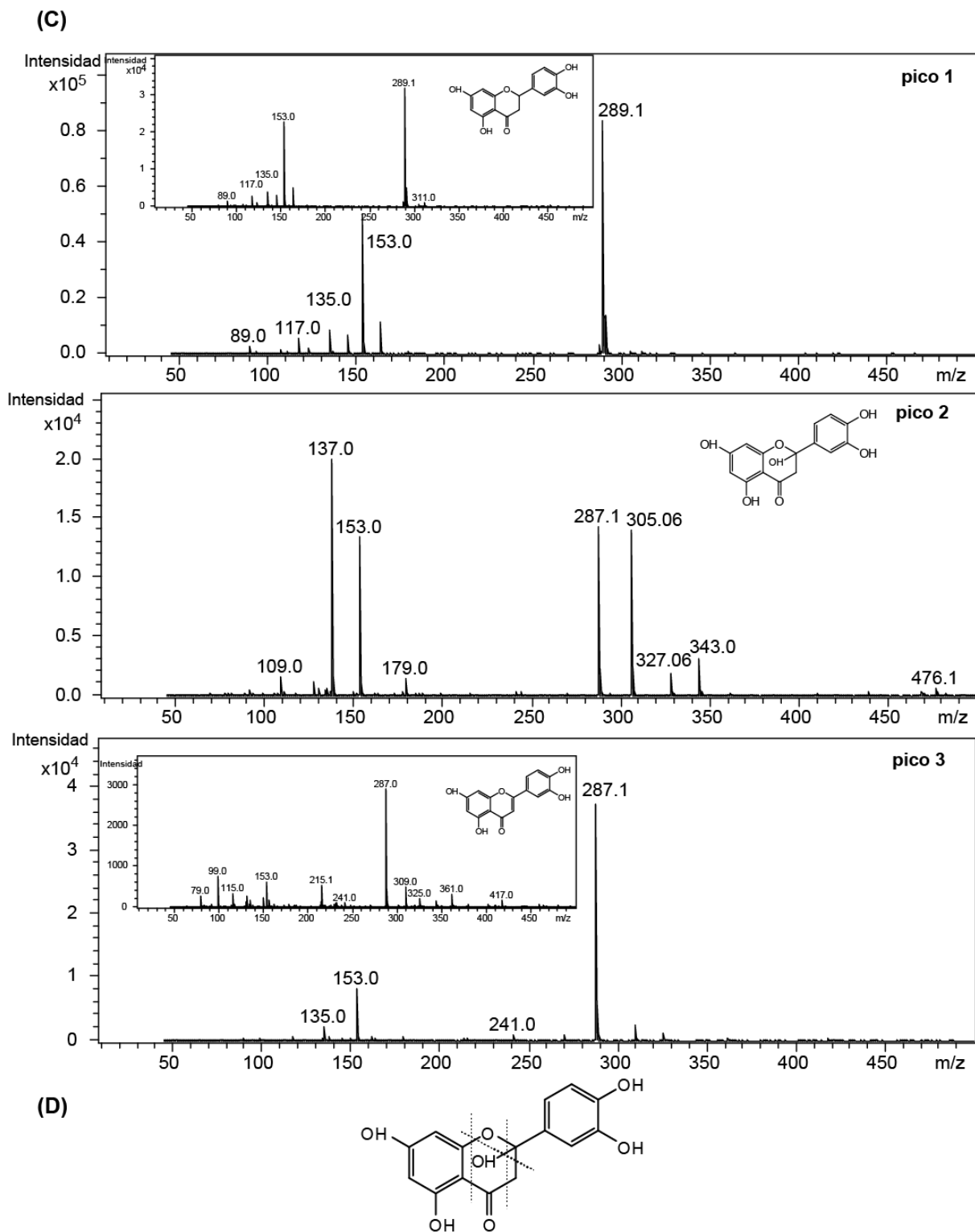


Figura 4.6 Análisis de LC-MS mostrando los productos de actividad de la ZmF2H1. (A) Patrones de fragmentación correspondientes a los picos 1, 2 y 3 producidos por la enzima ZmF2H1. Para la comparación se muestran en la parte superior central de cada

recuadro los patrones de fragmentación de los estándares comerciales. Naringenina, apigenina y 2-hidroxinaringenina producen los iones moleculares con relación carga masa $m/z+ 273$, 271 y 289 , respectivamente. **(B)** Sitios de fragmentación propuestos para la estructura de la 2-hidroxinaringenina. **(C)** Patrones de fragmentación correspondientes a los picos 1, 2, 3 producidos por la enzima *ZmF2H1* (la producción del pico 2 no se muestra en la Figura 4.5 B). Para la comparación se muestran en la parte superior central de cada recuadro los patrones de fragmentación de los estándares comerciales. Eriodictiol, luteolina y 2-hidroxi-eriodictiol producen los iones moleculares con relación carga masa $m/z+ 289$, 287 y 305 , respectivamente. **(D)** Sitios de fragmentación propuestos para la estructura del 2-hidroxi-eriodictiol.

4.3.1.6 Identificación de genes codificantes para putativas FLAVONA SINTASA II de maíz

A partir de la caracterización de la enzima *ZmF2H1* (CYP93G5), como la primer enzima de maíz capaz de convertir naringenina y eriodictiol en las correspondientes 2-hidroxi-flavanonas, investigamos si en esta especie vegetal, la síntesis de flavonas ocurre únicamente a partir de las 2-OH-flavanonas o si además, existe una FNS capaz de convertir directamente flavanonas en flavonas, debido a que estudios previos identificaron trazas de luteolina (flavona) presentes específicamente en líneas mutantes *sm2* (carentes de actividad ramnosil transferasas), sugiriendo que la luteolina y no la 2-OH-flavanona podría ser el sustrato para la síntesis de las C- glicosil flavonas (McMullen y col., 2004).

De esta manera identificamos dos genes *GRMZM2G407650* y *GRMZM2G148441*, localizados en el cromosoma 10 (www.maizesequence.org) del genoma de maíz, cuyas proteínas predichas (denominadas CYP93G6 y CYP93G7, respectivamente) presentan una mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la FNSII caracterizada de arroz (CYP93G1; Brazier-Hicks y Edwards, 2013) (74 y 72 %, respectivamente) que con la secuencia de aminoácidos de la F2H caracterizada de arroz anteriormente mencionada (CYP93G2, 55% y 54%, respectivamente). Sin embargo, para ambos genes los resultados de RNA-Seq mostraron muy bajos niveles de expresión en pericarpios y barbas *P1-rr* respecto de *P1-ww*, no mostrando inducción por P1 y sugiriendo que, si en maíz ocurre la conversión directa de flavanonas en flavonas, esta etapa no sería regulada por P1.

4.3.1.7 Análisis filogenético de enzimas CYP450 que participan en la síntesis de flavonas

A continuación, se realizó un análisis filogenético incluyendo las secuencias de las nuevas proteínas de maíz CYP93G6 y CYP93G7, identificadas como putativas FNSII junto a otras proteínas de la familia CYP450 cuyas actividades fueron caracterizadas o predichas, tales como la proteína CYP93G5 de maíz, y las secuencias de proteínas de especies como *Gerbera hybrids* (Grotewold y col., 1991; Martens y Forkmann, 1999), *Antirrhinum majus*, *Torenia hybrida*, (Akashi y col., 1999), *Glycine max* (Fliegmann y col., 2010), *Perilla frutescens* (Kitada y col., 2001) *Glycyrrhiza echinata* (Akashi y col., 1998), *Medicago truncatula* (Zhang y col., 2007), *Oryza sativa* (Dykes y col., 2009) y *Sorghum bicolor* (Du y col., 2010).

La Figura 4.7 muestra el árbol filogenético resultante donde se observa que las proteínas se encuentran divididas en dos grandes grupos según si pertenecen a la subfamilia CYP93G o CYP93B para especies de plantas mono y dicotiledóneas, respectivamente. Además, podemos observar dentro de cada grupo la existencia de dos subgrupos según si las proteínas corresponden a enzimas capaces de convertir directamente flavanonas en flavonas (FNS) o si ocurre la formación de 2-hidroflavanonas (F2H).

De esta manera, se observa que las proteínas CYP93G6 y CYP93G7 se encuentran dentro del grupo de proteínas de la subfamilia CYP93G para especies monocotiledóneas, y dentro del subgrupo que incluye a la proteína FNSII de arroz (CYP93G1, 74% y 72%, respectivamente). Por otra parte, la proteína CYP93G5 se agrupa con proteínas de la subfamilia CYP93B y dentro del subgrupo que abarca las F2Hs, donde también están presentes la F2H de sorgo (CYP93G3, 83%) y arroz (CYP93G2, 72%), mencionadas al comienzo del capítulo; y por el contrario, evolutivamente distante de las proteínas CYP93G6 y CYP93G7 (54 y 53 %, respectivamente).

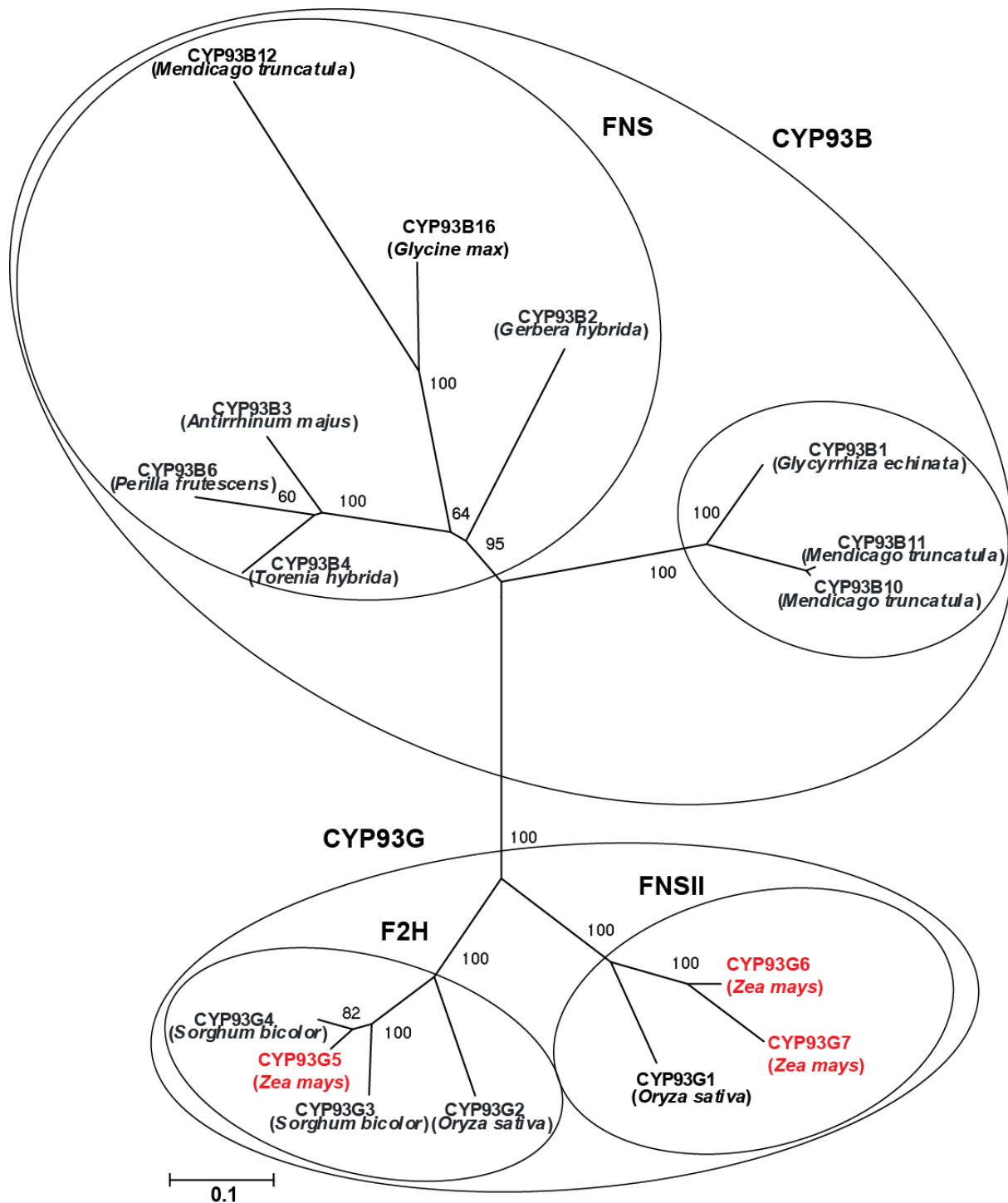


Figura 4.7 Árbol filogenético de proteínas pertenecientes a la subfamilia CYP93. El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos se llevó a cabo utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versión 4.0). Las secuencias de las proteínas CYP93G5, CYP93G6 y CYP93G7 fueron alineadas con las

secuencias de distintas proteínas CYP93 de plantas. La significancia estadística de cada rama del árbol fue evaluada mediante un análisis bootstrap con 10000 iteraciones de muestreo. Bar= 0.1 sustituciones de aminoácidos por sitio. En rojo se indican las proteínas de maíz CYP93G5, CYP93G6 y CYP93G7. En negrita se indican las proteínas CYP93 analizadas. Los diferentes grupos enzimáticos se encuentran encerrados en círculos.

4.3.1.8 Análisis de la expresión de los genes que codifican para las proteínas CYP93G6 y CYP93G7 en plantas de maíz

Con el objetivo de analizar la expresión de los genes que codifican para las proteínas CYP93G6 y CYP93G7, se utilizaron diferentes tejidos de la línea B73 de maíz incluyendo tejidos embrionarios (hipocótilo y radícula) y tejidos de plantas adultas (hoja y raíz); así como también tejidos florales de la línea genéticamente modificada A619 de maíz (pericarpios y barbas P1-ww y P1-rr) (Tabla V), para realizar experimentos de RT-PCR en tiempo real (sección 2.10.4) utilizando los oligonucleótidos apropiados para amplificar dicha reacción (Tabla VI).

En la Figura 4.8 se observa que el gen que codifica la proteína CYP93G6 se expresa mayoritariamente en tejidos embrionarios y adultos, mostrando sus mayores niveles de expresión en raíz. Por otra parte, para el gen que codifica la proteína CYP93G7, los niveles de expresión fueron inferiores en comparación con el gen que codifica la proteína CYP93G6 pero el mismo se expresó en todos los tejidos analizados en similar magnitud, incluyendo también tejidos florales. Además, la expresión de ambos genes no sería regulada por *P1*, dado que no se observan diferencias en la expresión entre pericarpios y barbas *P1-rr* respecto de pericarpios *P1-ww*, de manera similar a como fue observado en los experimentos de RNA-Seq y ChIPSeq mencionados al comienzo del capítulo.

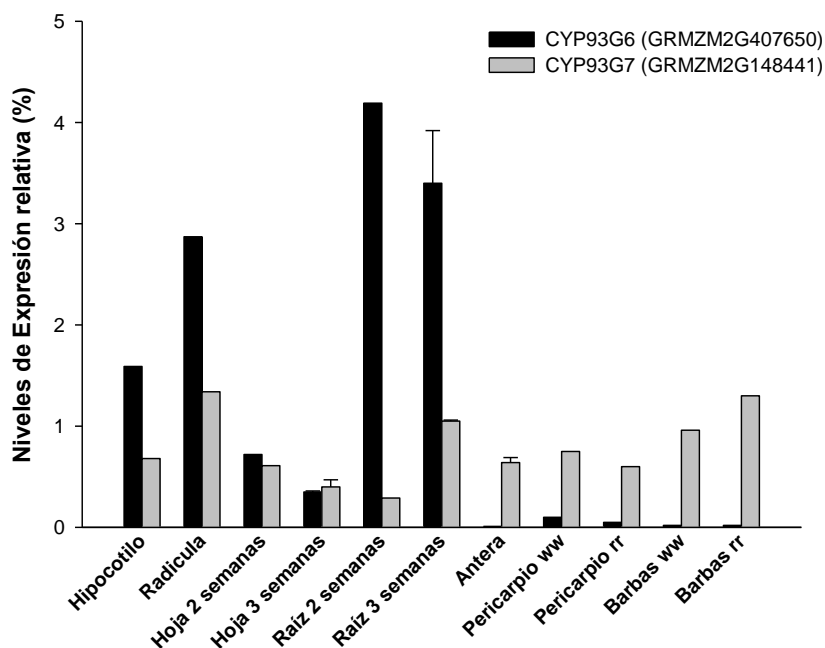


Figura 4.8 Niveles de los transcritos que codifican para CYP93G6 y CYP93G7 determinados por RT-PCR en tiempo real. Las muestras provienen de distintos tejidos de la línea B73 y A619 de maíz. Para cada muestra los resultados analizados corresponden al promedio de los datos provenientes de tres réplicas biológicas independientes, y de dos replicados técnicos como mínimo. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

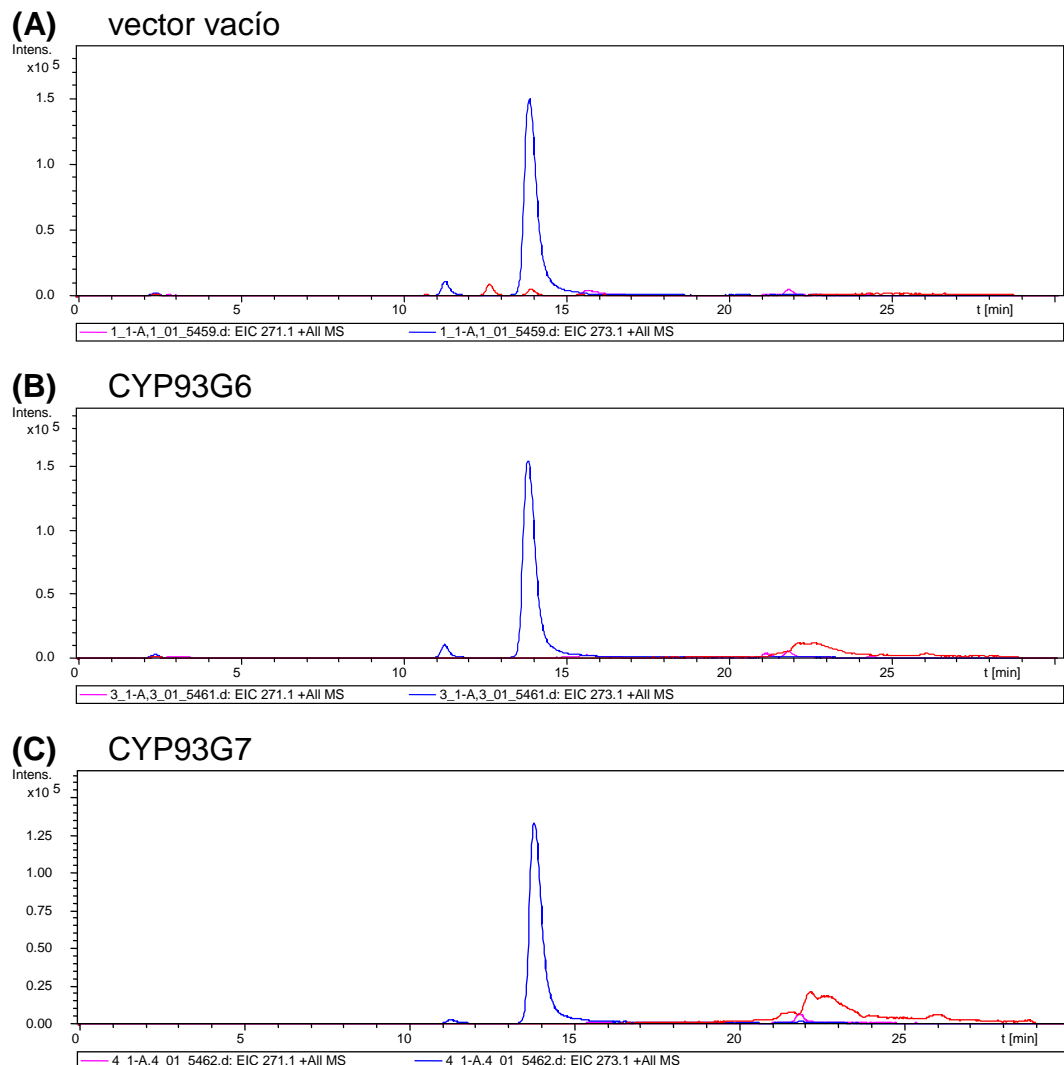
4.3.1.9 Clonado y expresión de las proteínas CYP93G6 y CYP93G7 en levaduras

Para analizar si los genes de maíz *GRMZM2G407650* y *GRMZM2G148441* codifican para putativas FNSII, procedimos en primer lugar a aislar las secuencias codificantes para CYP93G6 y CYP93G7 a partir de radículas y barbas de la línea B73, respectivamente mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos a los cuales se les agregó en sus extremos 5' sitios de restricción para permitir su posterior clonado en vectores de expresión (Tabla IV).

Una vez obtenidas ambas regiones codificantes, los ADNc fueron clonados en el vector pGZ25 para su expresión recombinante en levaduras WATT11 (sección 2.12), y posteriormente, se realizaron los ensayos *in vivo* de actividad agregando a los cultivos

líquidos la flavanona sustrato naringenina. Finalmente se evaluó la aparición o no de productos utilizando la técnica de LC-MS.

En la Figura 4.9 se muestran los resultados de los análisis de LC-MS conteniendo los espectros de barrido completo utilizando el modo de ionización positiva por electroespray (ESI positivo), dominados por la molécula protonada $[M+H]^+$. En todas las muestras se observa un único pico correspondiente al sustrato naringenina (ión 273), no detectándose la formación de la flavona producto apigenina (ión 271) en ninguno de los ensayos de actividad realizados. Asimismo, tampoco fue posible detectar la formación de la flavona luteolina para ambas enzimas cuando se ensayó el sustrato eriodictiol.



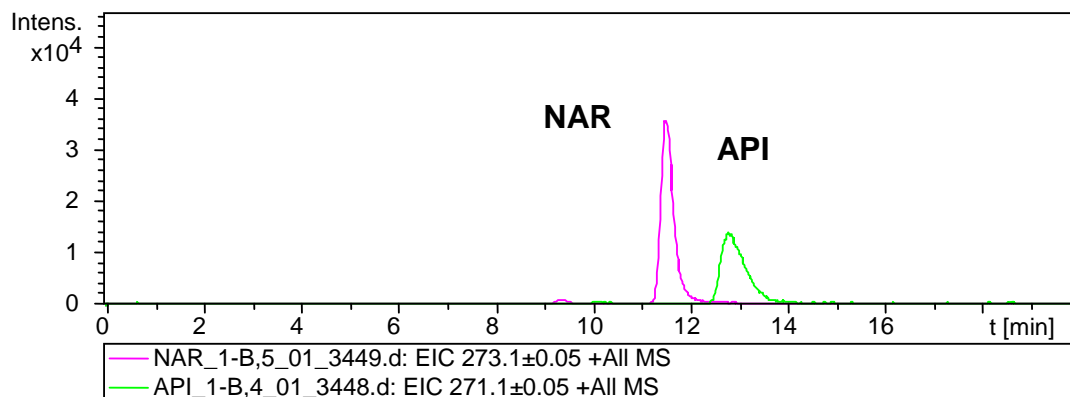
(D) Estándares comerciales

Figura 4.9 Perfiles de LC-MS mostrando los productos de las actividades para las putativas ZmFNSIs. A modo de ejemplo en esta Figura se muestran los espectros de barrido completo correspondientes a los cultivos de levaduras suplementados con naringenina conteniendo el vector vacío (A), la proteína CYP93G6 (B) y la proteína CYP93G7 (C). En ningún caso fue posible detectar formación de apigenina. Para la comparación se muestra en la parte (D) de la Figura el espectro conteniendo los tiempos de retención de los picos obtenidos para los estándares correspondientes.

4.3.2 Caracterización de enzimas dioxigenasas con un posible rol en la síntesis de flavonas en plantas de maíz y Arabidopsis

4.3.2.1 Identificación de genes codificantes para putativas flavona sintasas I en maíz y Arabidopsis

Por otra parte, con objeto de investigar si la síntesis de flavonas en maíz podría estar catalizada por una flavona sintasa I (FNSI), previo a comenzar mi trabajo de Tesis, se realizó la búsqueda en el genoma de la línea B73 de maíz de secuencias putativas que codifiquen para flavona sintasas solubles, utilizando la secuencia de un transcripto de arroz (*Oryza sativa*) codificante para una enzima FNSI y/o F3H, (BGIOGA33357, Lee y col. 2007; Kim y col., 2008a). Dicha búsqueda resultó en la identificación de el gen candidato GRMZM2G099467, localizado en el cromosoma 1 (www.maizesequence.org) del genoma de maíz, cuya región codificante presentó alta identidad de secuencia con la región codificante de arroz mencionada (83%), así como también con la región codificante de otra secuencia de arroz posteriormente propuesta

como una FNSI (Os03g0122300, Kim y col. 2008b) (77%). Ensayos *in vivo* de co-bombardeo con una región del promotor del gen GRMZM2G099467 (1,5 kpb) fusionado al gen reportero *luciferasa* y el factor de transcripción P1 (p35S:P1) o los factores de transcripción C1 y R en células de maíz BMS (del inglés, *Black Mexican Sweet*) realizados en el laboratorio del Dr. Erich Grotewold en The Ohio State University, Estados Unidos; demostraron que la expresión de este gen es altamente regulada por los reguladores de la síntesis de antocianinas C1 y R y en menor magnitud, por P1. Por otra parte, el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína identificada en maíz con las enzimas flavanona 3-hidroxilasa (F3H ; Deboo y col., 1995), flavonol sintasa 1 (FLS1; Falcone Ferreyra y col., 2010) y antocianidina sintasa (ANS, Menssen y col., 1990) caracterizadas en esta especie vegetal mostró la presencia de los sitios conservados en estas proteínas involucrados en la unión del hierro y del alfa-cetoglutarato, presentando además un 30% de identidad entre las secuencias característico de las 2-ODD e indicando así que la misma pertenece a la familia de dioxigenasas solubles dependiente de Fe^{2+} y 2-oxoglutarato (2-ODD) (Figura 4.10). Teniendo en cuenta estos datos, denominamos a este gen por la alta identidad con las FNSI de arroz: *ZmFNSI-1*.



Figura 4.10 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de distintas enzimas dioxigenasas que participan en la vía de flavonoides en maíz. En negrita subrayado y en rojo se muestran los residuos de aminoácidos que participan en la unión al hierro y al 2-oxoglutarato, respectivamente. Los aminoácidos similares son indicados por puntos y los aminoácidos idénticos con asteriscos.

Posteriormente, utilizando la secuencia codificante identificada en maíz (GRMZM2G099467) se investigó en el genoma de *A. thaliana* la presencia de secuencias con un alto porcentaje de identidad a la misma. Es importante mencionar que hasta el momento, en el genoma de esta especie vegetal no se encontró ningún gen codificante para una enzima FNS, mientras que sólo la flavona apigenina ha sido

detectada en plantas de *Arabidopsis* (ecotipo Col 0) pero en muy baja concentración (Yun y col., 2008).

Esta búsqueda reveló la presencia del gen At5g24530, denominado *DMR6* (del inglés, *downy mildew resistant 6*), localizado en el cromosoma 5 (www.arabidopsis.org) del genoma de *Arabidopsis* con una identidad del 59% tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos con el gen de maíz. *AtDMR6* codifica para una dioxigenasa (2-ODD) de función desconocida, pero con un rol posible en la defensa frente a patógenos, debido a que plantas de *Arabidopsis* mutantes en este gen pierden la susceptibilidad al patógeno oomicete *Hyaloperonospora parasitica*, causante del moho veloso o “downy mildew” (Van Damme y col., 2008).

4.3.2.2 Análisis filogenético de enzimas 2-ODD que participan en la síntesis de flavonas

A continuación, se realizó un análisis filogenético incluyendo: las secuencias de las proteínas *ZmFNSI-1* y *AtDMR6*, junto a las dos proteínas de arroz anteriormente mencionadas (*OsFNSI*, *OsF3H-2/FNS1*), y secuencias de diferentes enzimas 2-ODD caracterizadas e involucradas en la síntesis de flavonoides tales como F3H, FNSI, FLS y ANS. Además, se incluyeron secuencias de 2-ODD no caracterizadas pero que presentaron un porcentaje de identidad significativa (mayor al 50%) con la proteína *ZmFNSI-1* de maíz, como por ejemplo una proteína de trigo informada como una F3H (*TaF3H*), involucrada en la defensa contra patógenos (Giovanini y col., 2006), el parólogo de *ZmFNSI-1* (GRMZM2G476380, que denominamos: *ZmFNSI-2*), el parólogo de las proteínas de arroz (*Os04g49194*) y los ortólogos de maíz en sorgo, la especie evolutivamente más cercana a maíz (*Sb01g030680* y *Sb01g049030*).

La Figura 4.11 muestra el árbol filogenético resultante donde se observa que tanto la enzima de maíz (*ZmFNSI-1*) como la de *Arabidopsis* (*AtDMR6*) se agrupan junto a las enzimas FNSI de arroz mencionadas, pero evolutivamente distantes de las enzimas FNSI caracterizadas hasta el momento, presentes sólo en el género *Apiaceae* (Martens y col., 2001; Gebhardt y col., 2005, 2007) (círculo en azul). Por otra parte, *ZmFNSI-1* y *AtDMR6* tampoco se agrupan con enzimas con actividad F3H, ANS y FLS.

De esta manera, el análisis filogenético muestra un nuevo grupo de enzimas 2-ODD que podrían tener la misma actividad, el cual denominamos "tipo-FNSI" en base a la presencia en el mismo de la enzima FNSI caracterizada de arroz (*OsFNSI*), pero carente este mismo de enzimas con una identidad significativa a las FNSI previamente caracterizadas (30%).

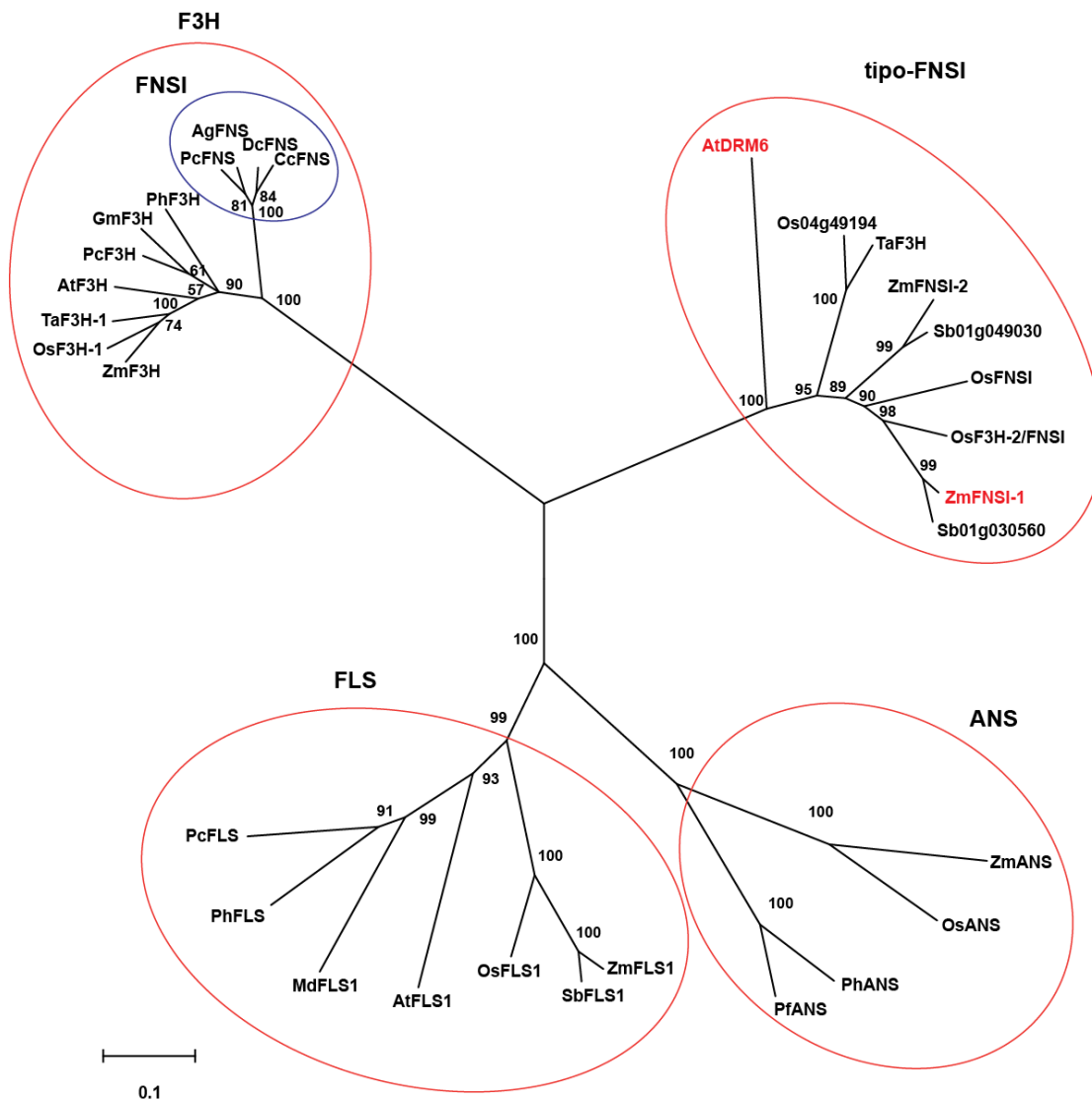


Figura 4.11 Árbol filogenético de distintas proteínas 2-ODD. El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versión 4.0). Las secuencias de las proteínas *ZmFNSI-1* y *AtDRM6* fueron alineadas con las secuencias de distintas proteínas 2-ODD de plantas. La significancia estadística de cada rama del árbol fue evaluada mediante un análisis bootstrap con 10000 iteraciones de muestreo. Bar = 0.1 sustituciones de aminoácidos por sitio. Con

rojo se indican las proteínas *ZmFNSI-1* y *AtDMR6* de maíz y *Arabidopsis*, respectivamente. En negrita se indican el resto de las proteínas 2-ODD analizadas. Los diferentes grupos enzimáticos se encuentran encerrados en círculos.

4.3.2.3 Análisis de la expresión del gen *ZmFNSI-1* en plantas de maíz

Con el objetivo de investigar la expresión del gen *ZmFNSI-1* se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real (sección 2.10.4; Tabla VI) utilizando diferentes tejidos de la línea B73 de maíz incluyendo tejidos embrionarios (hipocótilo y radícula) y tejidos de plantas adultas (hoja y raíz); así como también tejidos florales de la línea genéticamente modificada A619 de maíz (pericarpios y barbas P1-ww y P1-rr) (Tabla V).

En la Figura 4.12 se observa que el gen *ZmFNSI-1* se expresa en casi todos los tejidos analizados, mostrando la mayor expresión en anteras y pericarpios que expresan P1 (*P1-rr*), mientras que se expresa a muy bajos niveles en radícula y no se detecta expresión en barbas de maíz. Además, los mayores niveles del transcripto *ZmFNSI-1* en pericarpios que expresan el factor de transcripción P1 (*P1-rr*) respecto a los niveles en los pericarpios carentes de P1 (*P1-ww*) indican que la expresión de este gen es regulada por P1 en este tejido, en concordancia a los resultados previamente obtenidos mediante los experimentos de co-bombardío.

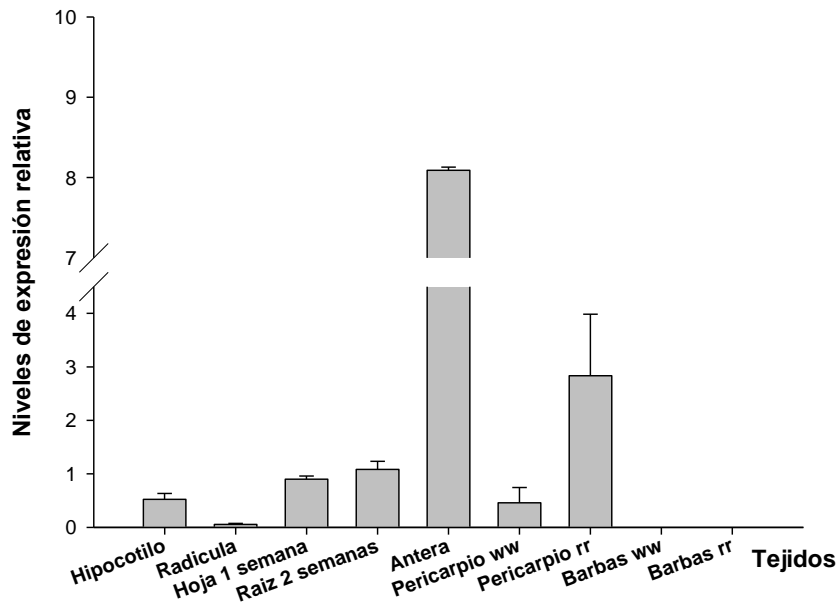


Figura 4.12 Nivel relativo del transcripto *ZmFNSI-1* determinado por RT-PCR en tiempo real. Las muestras provienen de distintos tejidos de la línea B73 y A619 de maíz. Para cada muestra los resultados analizados corresponden al promedio de los datos provenientes de tres réplicas biológicas independientes, y de dos replicados técnicos como mínimo. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

4.3.2.4 Clonado y expresión de las proteínas *ZmFNSI-1* y *AtDMR6* en bacterias

Para analizar si los genes de maíz y de *Arabidopsis* codifican una FNSI, procedimos en primer lugar, a aislar las secuencias codificantes para los genes *ZmFNSI-1* y *AtDMR6* a partir de tejido de hojas de la línea B73 de maíz y de *A. thaliana*, respectivamente, mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos a los cuales se les agregó en sus extremos 5' sitios de restricción para permitir su posterior clonado en vectores de expresión (Tabla VI). Una vez obtenidas las regiones codificantes, las mismas fueron digeridas con las enzimas de restricción apropiadas y ligadas en el vector pET28. Los productos de ligación obtenidos se utilizaron para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α y las células transformadas se seleccionaron en placas con medio LB agar con kanamicina, verificando la presencia de los insertos de interés. Las colonias transformantes que contenían las construcciones

de interés se identificaron mediante PCR de colonias seguido de la extracción del ADN plasmídico para luego verificar la presencia de los insertos de interés mediante digestión con enzimas de restricción.

Los vectores de expresión recombinantes obtenidos pET28-*ZmFNSI-1* y pET28-*AtDMR6* (Tabla IV) fueron utilizados para transformar bacterias competentes *E. coli* BL21(DE3) pLys, un hospedador comúnmente utilizado para la expresión de proteínas recombinantes, procediendo en primer lugar a determinar las condiciones óptimas para la inducción de ambas proteínas recombinantes. De esta manera, ambos cultivos bacterianos se incubaron a 37 °C en agitación constante, y una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento (DO de 0,5-0,6) se agregó el inductor IPTG, continuando luego la incubación durante toda la noche en agitación constante a 30 °C. En segundo lugar se procedió a la ruptura de las células por sonicado y centrifugación, analizando la expresión de las proteínas recombinantes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), observando buena inducción de la proteína recombinante *ZmFNSI-1* en las condiciones utilizadas (30°C, 0.5 mM de IPTG, 20 h), pero no ocurriendo lo mismo para la proteína recombinante *AtDMR6*. No obstante, se observó bajo nivel de expresión de la proteína recombinante *ZmFNSI-1* en la fracción soluble y mayor cantidad en la fracción insoluble, probablemente asociada a restos de membrana y otros componentes celulares. Así, dado que la disminución de la temperatura es una variable comúnmente empleada para aumentar la solubilidad de una proteína eucariota expresada en un huésped heterólogo, procedimos a ensayar la expresión de las proteínas recombinantes también a 22°C, no observándose enriquecimiento de las mismas en la fracción soluble y sin embargo, ocasionando esta modificación menor inducción.

La expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* puede estar limitada por la falta de ciertos ARNt poco frecuentes en el mismo, los cuales suelen ser abundantes en los organismos a partir de los cuales deriva la proteína heteróloga. La inducción de dichas proteínas en *E. coli* puede ocasionar una detención prematura de la traducción debido a la escasez de estos ARNt. Para sobrellevar este inconveniente existen células *E. coli* que poseen plásmidos con copia extra de genes codificantes de estos ARNt. En este sentido, la cepa *E. coli Rosetta2* (DE3) posee el plásmido pRARE el cual codifica para

los ARNt poco frecuentes de Arginina (AGA, AGG y CGG), Glicina (GGA), Isoleucina (AUA), Leucina (CUA) y Prolina (CCC). Por lo tanto en tercer lugar, con el objetivo de mejorar la expresión de ambas proteínas, las construcciones pET28-AtDMR6 y pET28-ZmFNSI-1 se introdujeron en la cepa bacteriana *E. coli Rosetta2* (DE3). Al analizar la inducción mediante SDS-PAGE, se observó que 24 h a 30 °C fueron requeridas para observar una inducción de la proteína pET28-ZmFNSI-1 y que por el contrario 24 h a 22 °C fueron requeridas para observar inducción de la proteína pET28-AtDMR6. Así se eligieron para realizar los ensayos posteriores las últimas condiciones mencionadas.

En la Figura 4.13 se puede observar el análisis mediante SDS-PAGE conteniendo los extractos proteicos de la fracción soluble e insoluble de los cultivos bacterianos que expresan las proteínas recombinantes o que contienen el vector vacío (control negativo), luego de finalizada la inducción.

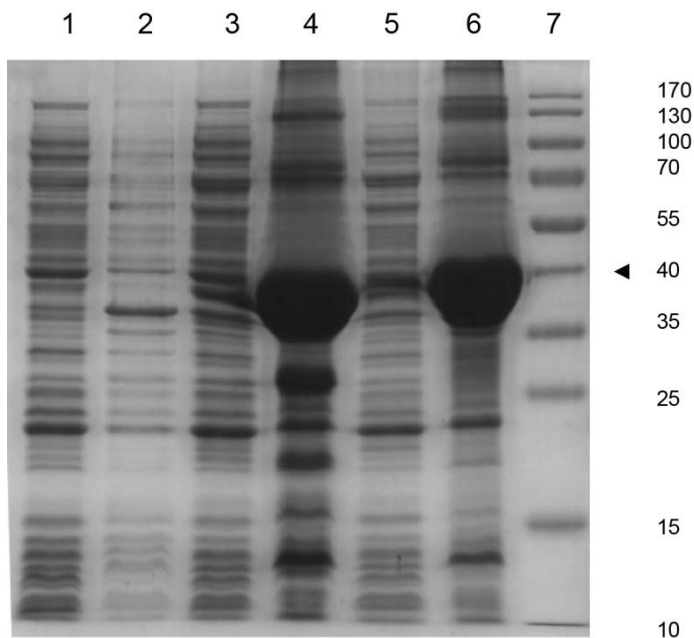


Figura 4.13 Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes ZmFNSI-1 y AtDMR6 mediante SDS-PAGE de extractos proteicos bacterianos. SDS-PAGE de acrilamida al 12% (p/v) teñido con azul de Coomassie de extractos proteicos de cultivos bacterianos. Se muestran los extractos proteicos de células *E. coli Rosetta2* (DE3) transformadas con el vector pET28 vacío o con los vectores pET28-ZmFNSI-1 y pET28-AtDMR6. Los números 1, 3 y 5 corresponden a la fracción soluble (o sobrenadante) del vector vacío, AtDMR6 y ZmFNSI-1, respectivamente. Los números 2, 4 y 6

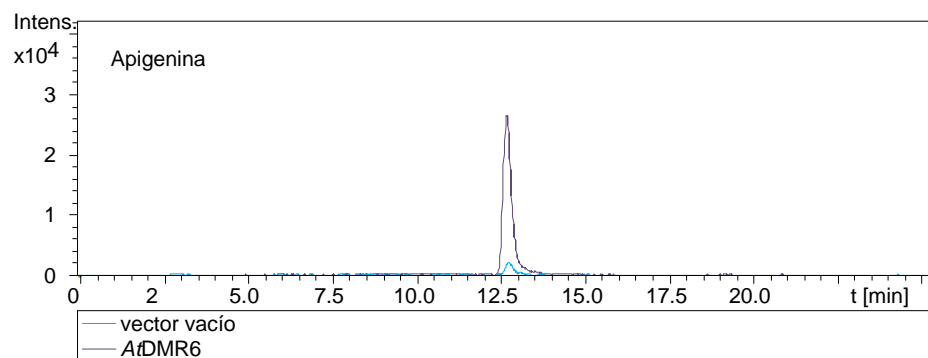
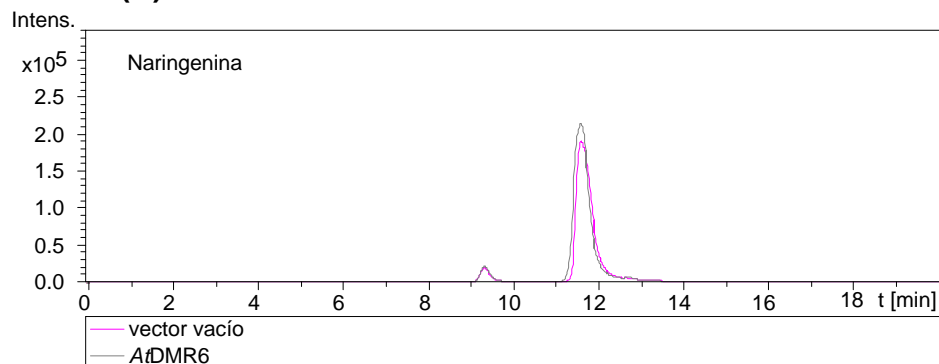
corresponden a la fracción insoluble (o pellet) del vector vacío, *AtDMR6* y *ZmFNSI-1*, respectivamente. 7: Marcador de peso molecular. Los distintos pesos moleculares son indicados a la derecha de la Figura en kDa. Las proteínas de expresión de maíz y *Arabidopsis* tienen un peso molecular aproximado de 38 kDa.

4.3.2.5 Ensayos de actividad enzimática de las enzimas *ZmFNSI-1* y *AtDMR6* mediante experimentos de bioconversión en *E. coli*

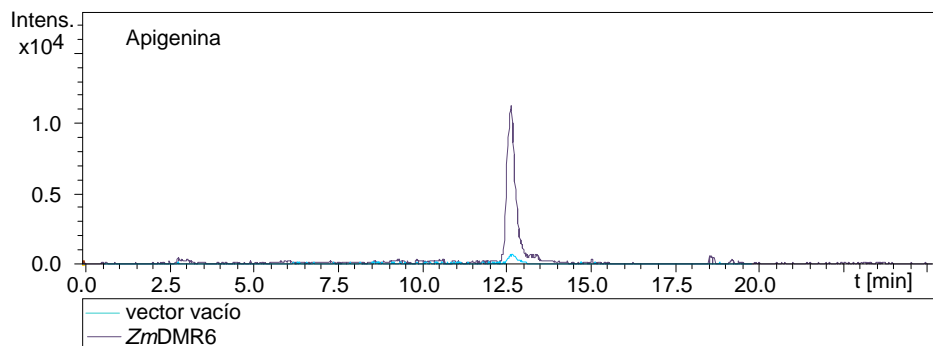
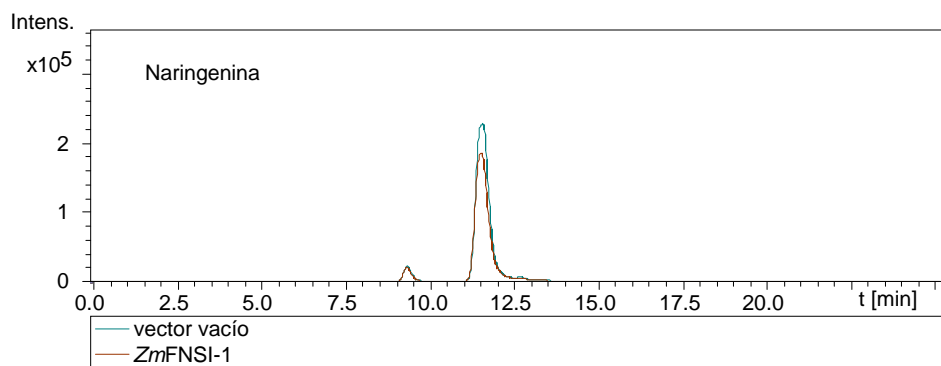
A continuación se procedió a realizar los ensayos de actividad mediante experimentos de bioconversión en *E. coli*, evaluando la aparición o no del producto mediante LC-MS. Para esto, se agregaron a los cultivos bacterianos líquidos los flavonoides a ensayar como putativos sustratos: 1) las flavanonas: naringenina y eriodictiol, 2) el dihidroflavonol: dihidroquercetina y 3) la leucoantocianidina: leucocianidina, como posibles sustratos de ambas enzimas junto con el inductor. A las 24 h se tomaron alícuotas y se extrajeron los flavonoides con etil-acetato. En la Figura 4.14 se muestran los resultados obtenidos mediante LC-MS conteniendo los espectros de barrido completo utilizando el modo de ionización positiva por electrospray (ESI positivo), dominados por la molécula protonada $[M+H]^+$, observándose la formación de la flavona producto apigenina a partir del sustrato naringenina y de la flavona producto luteolina tanto para la enzima de maíz como para la enzima de *Arabidopsis*. Por el contrario, en los cultivos bacterianos conteniendo el vector vacío pET28 sólo se observa el ión correspondiente al sustrato flavanona ensayado. No obstante, ninguna de las dos enzimas presentó actividad cuando se utilizaron dihidroquercetina y leucocianidina como sustratos. Para la comparación se utilizó como control positivo la enzima FNSI caracterizada de parsley (*parsley crispum*), provista por el Dr. Stefans Martens.

En conjunto, estos resultados demuestran que los genes *GRMZM2G099467* y *At5g24530* codifican una enzima FNSI capaz de metabolizar las flavanonas naringenina y eriodictiol directamente a las flavonas apigenina y luteolina, respectivamente; una etapa desconocida hasta el momento para ambas especies vegetales.

(A) AtDMR6



(B) ZmFNSI-1



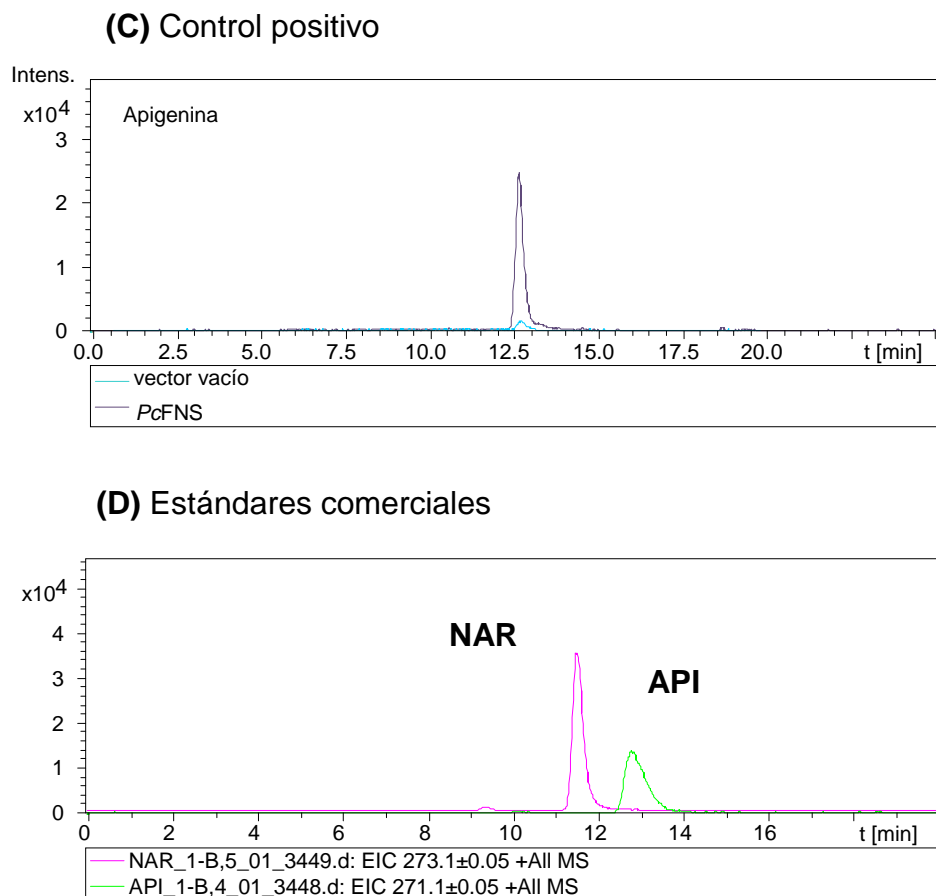


Figura 4.14 Perfiles de LC-MS mostrando los productos de las actividades para las putativas FNSI. A modo de ejemplo se muestran en esta Figura los espectros de barrido completo correspondientes a los cultivos de levaduras suplementados con naringenina mostrando la producción de apigenina por las enzimas *AtDMR6* (A), *ZmFNSI-1* (B) y *PcFNS* conteniendo en cada gráfico el resultado para el vector vacío correspondiente. Para la comparación se muestra en la parte (D) de la Figura el espectro conteniendo los tiempos de retención de los picos obtenidos para los estándares comerciales correspondientes.

4.3.2.6 Purificación de las proteínas recombinantes *ZmFNSI-1* y *AtDMR6* y ensayos de actividad enzimática *in vitro*

En segundo lugar, se procedió a realizar ensayos de actividad *in vitro* utilizando las enzimas purificadas. Para ello, se procedió a la purificación de ambas proteínas recombinantes utilizando una resina Ni-NTA. Las fracciones obtenidas en el paso de elución que presentaron mayores cantidades de proteína recombinante se juntaron y luego se procedió a la concentración de las mismas y a su desalado según como se

indica en la sección 2.29.3 del presente trabajo de Tesis. Como se describió en la sección 4.3.2.4, si bien las proteínas recombinantes estaban presentes mayormente en las fracciones insolubles, al aumentar el volumen de los cultivos iniciales la cantidad obtenida en las fracciones solubles resultó suficiente para llevar a cabo la purificación. A modo de ejemplo, en la Figura 4.15 se muestra un SDS-PAGE en el que se muestran los perfiles proteicos provenientes de las distintas fracciones de elución durante la purificación de la proteína recombinante *AtDMR6*.

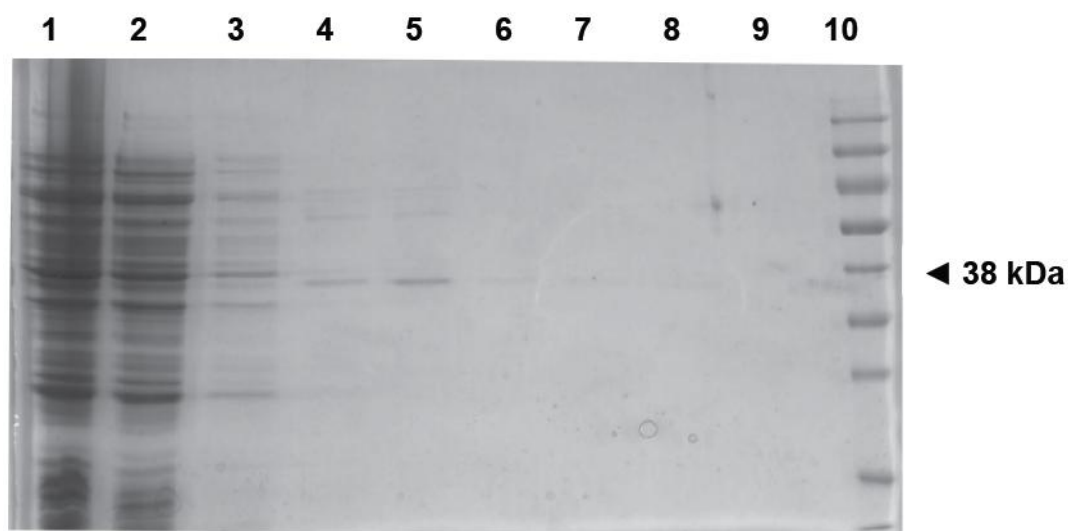
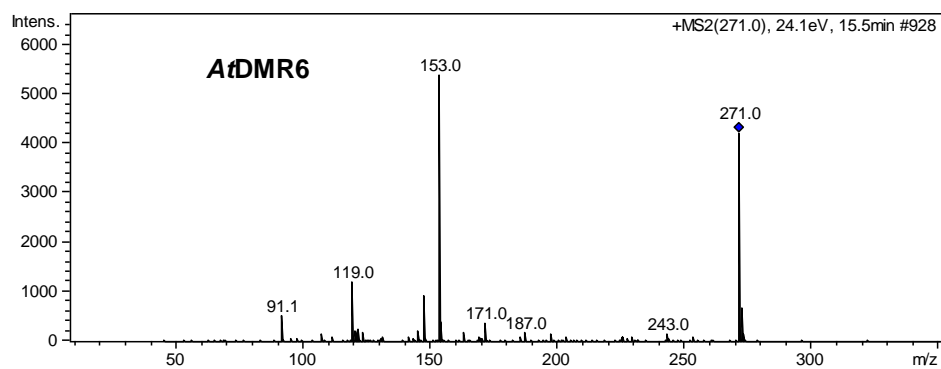
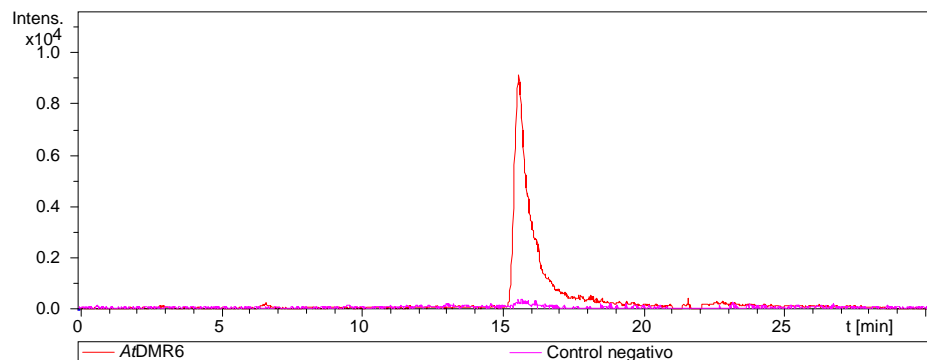


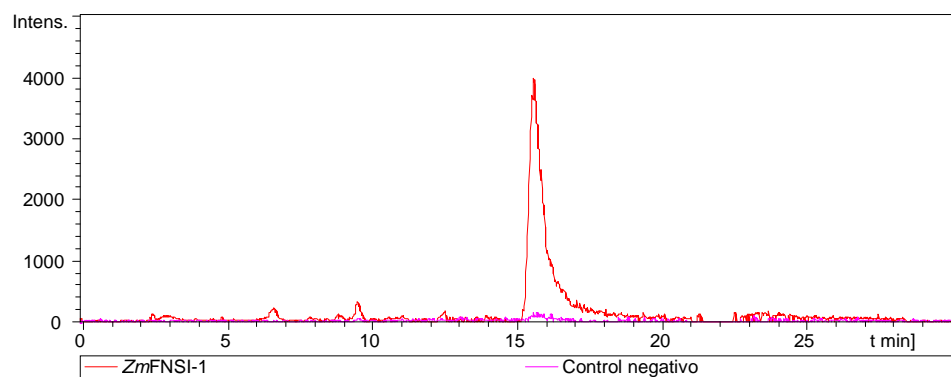
Figura 4.15 Purificación de la proteína *AtDM6* recombinante mediante cromatografía de afinidad. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las distintas etapas de la purificación de la proteína recombinante. Calle 1: fracción soluble (siembra). Calle 2: fracción no retenida por la columna. Calle 3: fracción eluida con el buffer de siembra (imidazol 20 mM). Calle 4: fracción eluida con buffer de lavado (imidazol 50 mM). Calles 5, 6, 7, 8 y 9: fracciones correspondientes a la elución con el buffer de elución conteniendo 200 mM imidazol. Calle 10: marcadores de masa molecular.

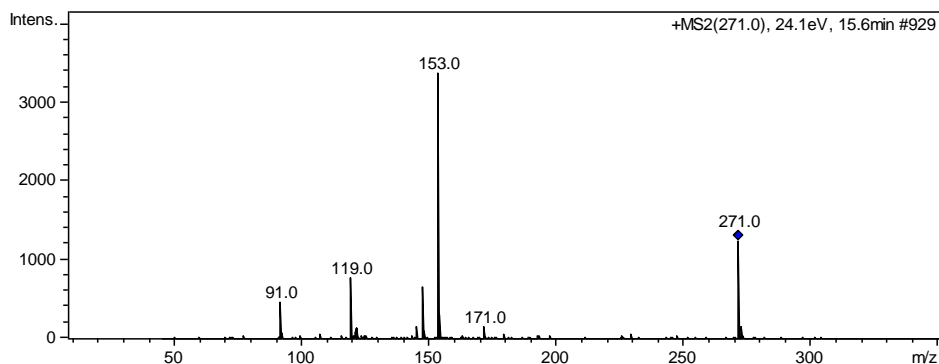
Posteriormente se ensayaron las actividades enzimáticas de las proteínas purificadas agregando al medio de reacción la flavanona sustrato naringenina como se describe en los Materiales y Métodos (sección 2.31). La reacción enzimática se siguió midiendo la aparición del producto mediante LC-MS, observándose para ambas enzimas purificadas la formación de la flavona apigenina, validando los resultados obtenidos mediante ensayos *in vivo* de biconversión en *E. coli*.

(A) AtDMR6



(B) ZmFNSI-1





(C) Estándar comercial

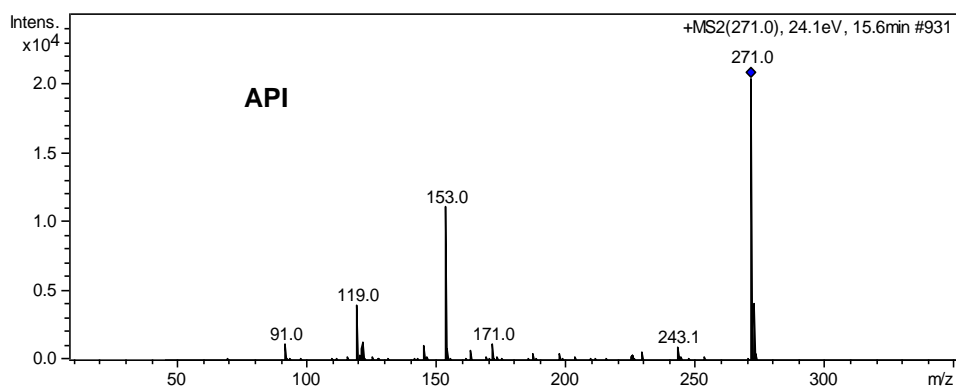


Figura 4.16 Perfiles de LC-MS mostrando los productos de las actividades enzimáticas *in vitro* para las enzimas recombinantes *ZmFNSII* y *AtDMR6* purificadas. Espectros de barrido completo y patrones de fragmentación de los productos correspondientes a los ensayos de actividad con naringenina mostrando la producción de apigenina por las enzimas *AtDMR6* (A) y *ZmFNSI-1* (B) conteniendo en cada gráfico el resultado para el control negativo correspondiente sin el agregado de enzima purificada. Para la comparación se muestra en la parte (C) de la Figura el espectro con el patrón de fragmentación correspondiente al estándar comercial apigenina.

4.3.2.7 Análisis de la complementación de plantas de *Arabidopsis* mutantes en *DMR6* y plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan la enzima *ZmFNSI* de maíz

Con el propósito de analizar el rol de *ZmFNSI-1* durante la infección por patógenos como fue descrito anteriormente para *AtDMR6*, se analizó si el gen de maíz es capaz de complementar plantas de *Arabidopsis* mutantes en *DMR6*. Para ello, en colaboración con el laboratorio del Dr. Guido Van den Ackerveken (Utrecht, Países Bajos) se transformaron plantas mutantes *dmr6* de *A. thaliana* (ecotipo Ler), con la

construcción p35S:*ZmFNSI-1* (Tabla V). Una vez obtenidas las plantas transgénicas (T2.1), se estudió la infección por el oomicete *Hyaloperonospora parasitica*. Este hongo, al igual que todos los hongos que provocan moho veloso penetra en las células hospedadoras y crece intracelularmente, formando un haustorio en las células mesofílicas y epidérmicas (Koch y Slusarenko, 1990). Resultados informados por el Dr. Guido Van den Ackerveken indican que el gen de maíz es capaz de complementar plantas de *Arabidopsis* mutantes en *DMR6* y que, de igual manera a como ocurre en las plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes de la enzima *DMR6* endógena, las plantas complementadas son más susceptibles al patógeno que las mutantes. De esta forma, el producto de la reacción catalizada por la *ZmFNSI-1* podría favorecer el ataque de estos patógenos en *Arabidopsis* y/u otros en maíz; o alternativamente la mutación en este gen favorecería el flujo metabólico hacia la biosíntesis de otro flavonoide, compuesto fenilpropanoide u otro compuesto desconocido con acción protectora frente a los patógenos.

Por otra parte, con el objetivo de profundizar acerca de la posible funcionalidad *in planta* de las enzimas FNSI, previamente a mi trabajo de Tesis, se transformaron plantas de *A. thaliana* tipo salvaje ecotipo Columbia 0 (Col 0), con la construcción p35S:*ZmFNSI-1*, expresando de esta manera la enzima FNSI de maíz. Se realizó la selección de las líneas homocigotas para el transgen en placas con medio MS (del inglés, *Murashige and Skoog*) suplementado con el antibiótico higromicina, dado que es el marcador de selección en planta, del vector con el cual fueron transformadas las mismas. La inserción del transgen *ZmFNSI-1* en las plantas transformadas se verificó mediante PCR, utilizando ADN genómico extraído de plantas de 20 días salvajes (Col 0, sin transformar) y transgénicas (Col 0 transformadas con la construcción p35S:*ZmFNSI-1*), utilizando los oligonucleótidos denominados LP-FNSI-1-RT y RP-FNSI-1-RT (sección 2.10.3, Tabla VI). En la Figura 4.17 se muestra el producto de amplificación obtenido correspondiente al tamaño esperado (181 pb) para una de las líneas transgénicas seleccionadas.

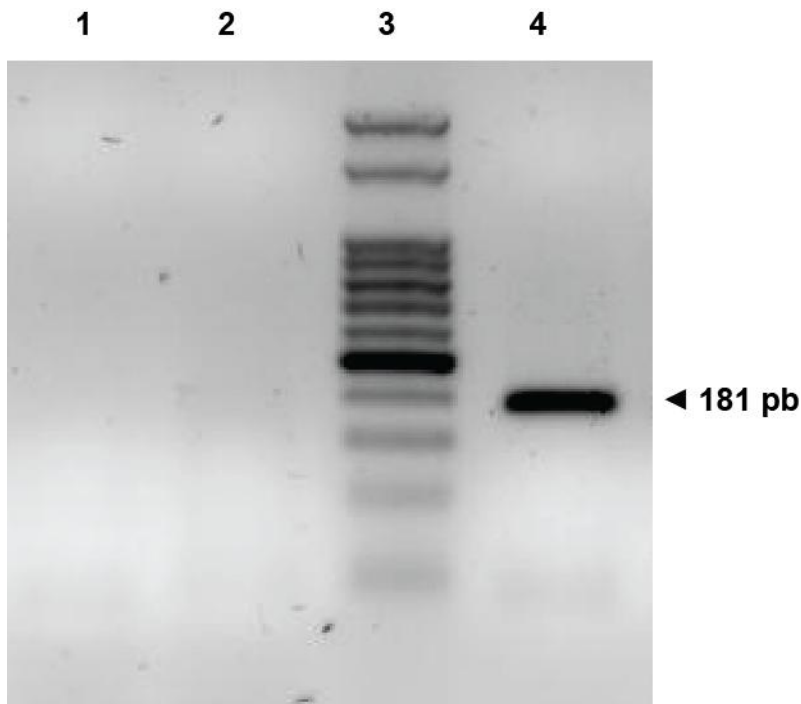


Figura 4.17 Presencia del transgén *ZmFNSI-1* en plantas transformadas de *A. thaliana* analizada mediante PCR. Análisis de los productos de amplificación por PCR separados en un gel de agarosa 1% (p/v). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando ADN genómico de plantas de *A. thaliana* salvajes y transgénicas. 1: Control negativo (sin ADN genómico). 2: ADN genómico de Col 0. 3: marcador de masa molecular de 50 pb. 4: ADN genómico de p35S:*ZmFNSI-1* (T2.1). Las reacciones de PCR fueron realizadas con el par de oligonucleótidos LP-FNSI-1 y RP-FNSI-1.

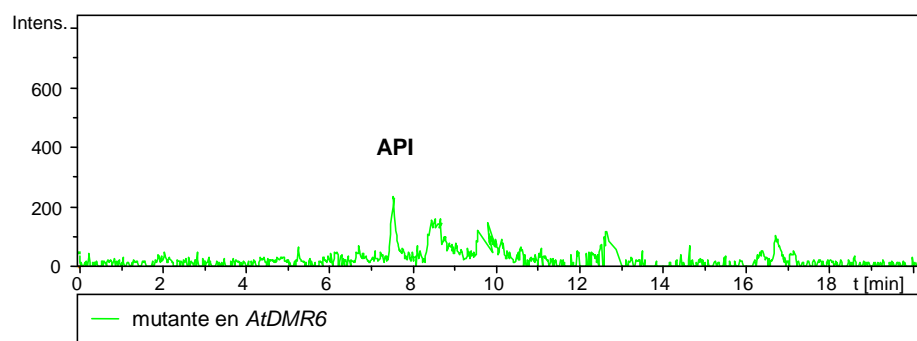
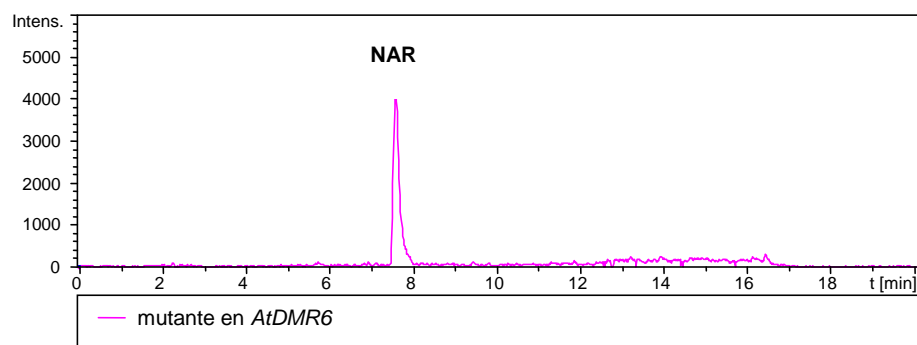
Finalmente, para verificar la funcionalidad de esta dioxigenasa en la vía de los flavonoides *in planta*, se realizaron extractos fenólicos hidrolizados de hojas de plantas de *Arabidopsis*, incluyendo la línea salvaje (Col 0), la línea transgénica que expresa *ZmFNSI-1* (p35S:*ZmFNSI-1*), la línea mutante en *DMR6* (*dmr6-1*) y la línea complementada (p35S:*ZmFNSI-1^{comp}*). Las mismas se crecieron durante 20 días en placas de MS a las cuales se le suplemento el sustrato naringenina (sección 2.5.2), con el objetivo de aumentar su disponibilidad *in planta* debido a que la enzima FNS compite por dicho sustrato con la enzima F3H responsable de la síntesis de dihidroflavonoles, según como se indica en la Introducción de este capítulo de Tesis.

En la Figura 4.18 se muestran los resultados de los análisis mediante LC-MS conteniendo los espectros de barrido completo utilizando el modo de ionización positiva por electroespray (ESI positivo), dominados por la molécula protonada $[M+H]^+$, donde

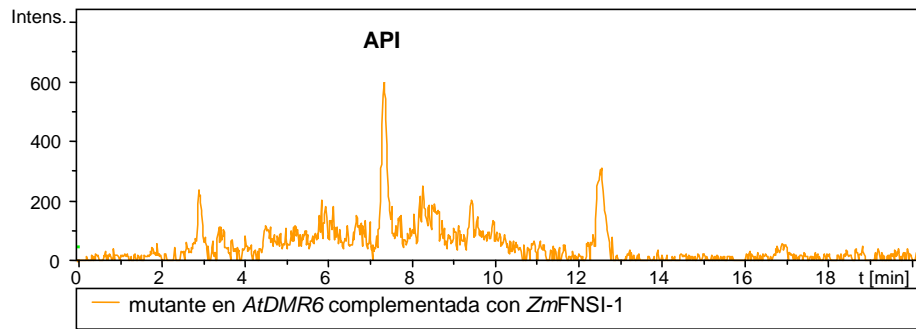
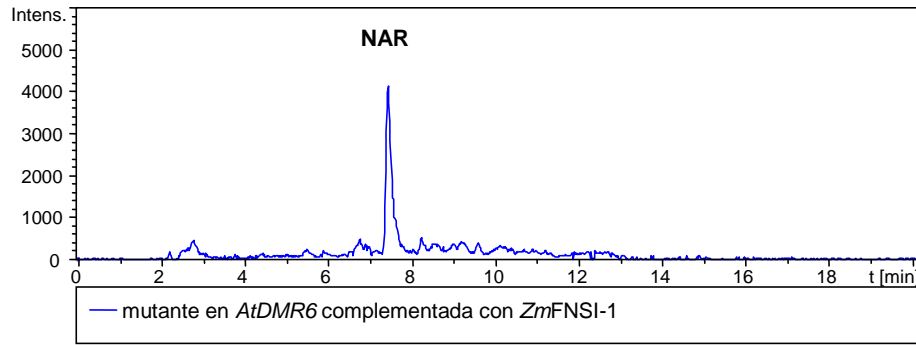
se puede observar un incremento en la intensidad del pico correspondiente a la apigenina en las plantas de Arabidopsis mutantes en *DMR6* complementadas con la enzima *ZmFNSI-1* ($p35S:ZmFNSI-1^{comp}$) (B) respecto a las plantas mutantes en *DMR6* (*dmr6-1*) (A), y en las líneas de Arabidopsis que expresan la enzima *ZmFNSI-1* ($p35S:ZmFNSI-1$) (D) respecto a las plantas salvajes (Col 0) (C). En la misma Figura se muestra el espectro con el tiempo de retención correspondiente al estándar comercial apigenina (E).

En conjunto, estos resultados demuestran que la enzima *ZmFNSI-1* es también activa *in planta* para la conversión de naringenina en apigenina.

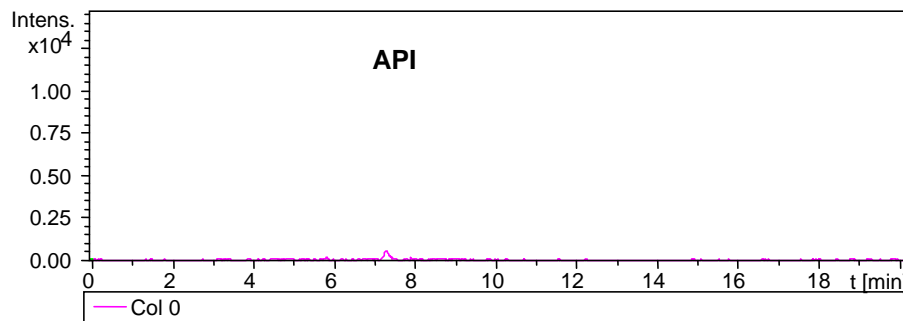
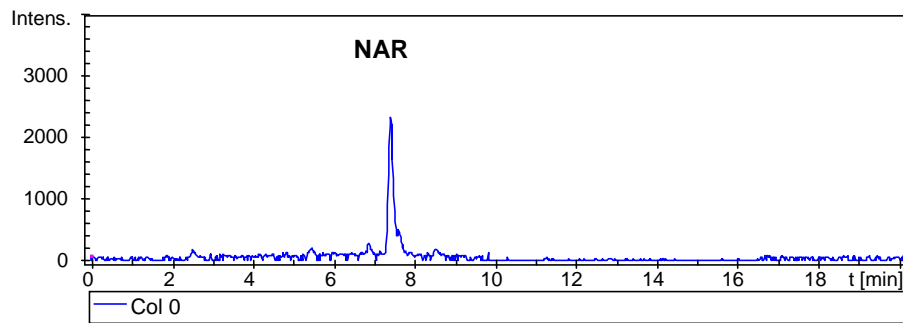
(A) *dmr6-1*



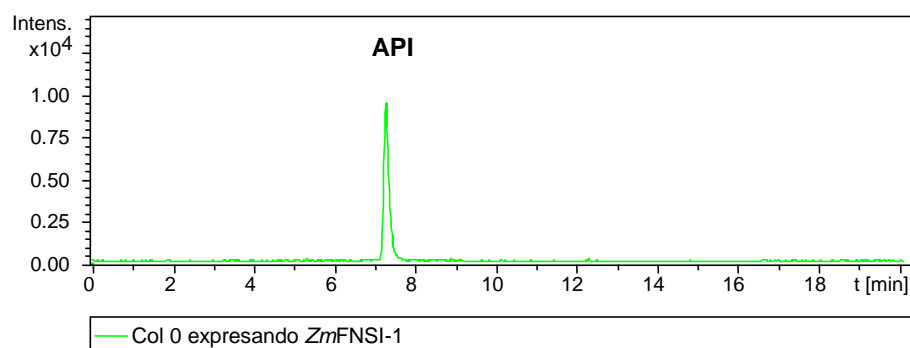
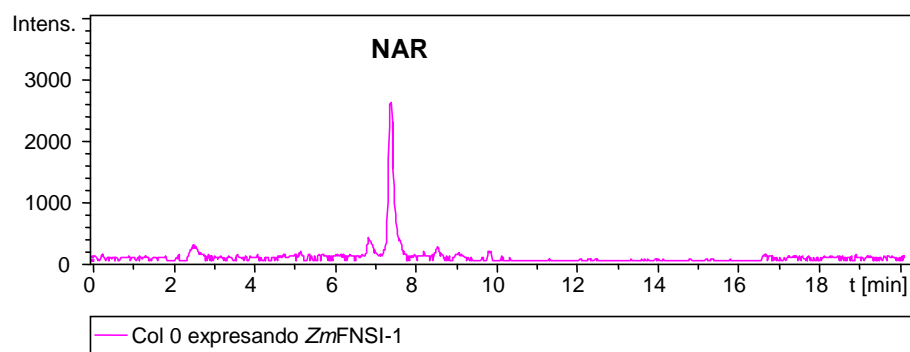
(B) p35S:*ZmFNSI-1*^{comp}



(C) Col 0



(D) p35S:*ZmFNSI-1*



(E) Estándar comercial

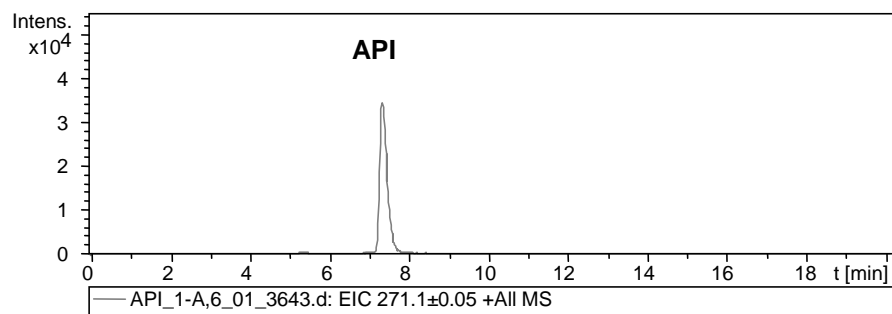


Figura 4.18 Perfiles de LC-MS mostrando los productos de los extractos de plantas de *Arabidopsis*. Las plantas se crecieron durante 20 días en placas de MS suplementadas con naringenina. Perfil de flavonoides en hojas de plantas mutantes en *DMR6* complementadas con la enzima *ZmFNSI-1* (p35S:*ZmFNSI-1*^{comp}, A); de plantas mutantes en *DMR6* (*dmr6-1*, B); de plantas salvajes (Col 0, C); y de plantas transgénicas que expresan la enzima *ZmFNSI-1* (p35S:*ZmFNSI-1*, D) (E) estándar comercial de apigenina.

CAPÍTULO 4. Discusión

4.4 Discusión

Las flavonas constituyen uno de los subgrupos más grandes de flavonoides derivados de las flavanonas. Las mismas participan en las interacciones de las plantas con otros organismos, como microbios e insectos, así como también con otras plantas, mediante interacciones que para la planta huésped pueden resultar tanto beneficiosas como perjudiciales (Brundrett, 2002; Kistner y Parniske, 2002). La luteolina y la apigenina representan las flavonas más comúnmente detectadas en las distintas especies vegetales, y su interés en la actualidad radica no solamente en los beneficios que les otorgan a las plantas, sino también en los efectos favorables generados en los humanos al consumir alimentos que contienen flavonas, ya que está demostrado que las mismas previenen múltiples enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares (Geleijnse y col., 1999; Knekt y col., 2002; Mulvihill y Huff, 2010), enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Gao y col., 2012; Rossi y col., 2008) y cáncer (Knekt y col., 1997; García-Closas y col., 1999; LeMarchand y col., 2000; Kozic, y col., 2011). Estos efectos beneficiosos para la salud humana se deben a que la luteolina y la apigenina poseen capacidad antioxidante, anti-inflamatoria (Nicholas y col., 2007; Seelinger y col., 2008) y de prevención en la terapia del cáncer al inducir la apoptosis, inhibir la proliferación celular, la metástasis y la angiogénesis, así como también sensibilizar las células tumorales a la citotoxicidad terapéutica inducida (Das y col., 2006; Kaur y col., 2008; Cho y Kim, 2009; Lin y col., 2008).

La formación de flavonas a partir de flavanonas representa la única conversión química conocida en ser catalizada por dos tipos de flavona sintetas diferentes: FNSI y FNSII. Las FNSI son enzimas solubles dependientes de 2-oxoglutarato, mientras que las FNSII son enzimas de unión a membrana dependientes del citocromo P450. Por otra parte, las enzimas dependientes de citocromo P450 poseen dos mecanismos catalíticos diferentes, por ello han sido clasificadas en familias y subfamilias basándose en su homología y en criterios filogenéticos (Nelson y col., 1996). De esta manera, a estas proteínas se les asigna un número CYP, y las mismas son agrupadas según si presentan un 40% o más de identidad en sus secuencias de aminoácidos.

Las flavonas están presentes en todos los linajes de plantas terrestres (Harborne y Baxter, 1999) incluyendo angiospermas, gimnospermas y especies de plantas inferiores, tales como *Pteridophyta* y *Briophyta* (Markham, 1988; Bohm, 1998). Además, las flavonas fueron detectadas en registros fósiles de *Quercus consimilis* dentro de la flora Succor Creek (Mioceno, 25-17 x 10⁶ años atrás) en el este de Oregón (Niklas y Giannasi, 1978), indicando en conjunto estos hallazgos que la síntesis de flavonas representa una característica evolutiva antigua para las plantas, la cual probablemente pudo ser establecida en el momento que las mismas empezaron a colonizar la Tierra. A pesar de estos datos, estos compuestos parecen estar ausentes o en muy baja abundancia en prácticamente la totalidad de las especies de *Brassicácea*, habiéndose encontrado sólo unas pocas flavonas y sus glicósidos en por ejemplo *Barbarea vulgaris* (Senatore y col., 2000), *Alliaria petiolata* (Kumarasamy y col., 2004) e *Isatis tinctoria* (Cheng y col., 2005). Estos hallazgos coinciden con la aparente ausencia de los genes que codifican para enzimas flavona sintasas en el genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, que pertenece a este grupo. Sin embargo, estudios realizados por Yun y col., (2008) permitieron detectar apigenina en plantas de *Arabidopsis* (Ecotipo Col 0) aunque en muy bajos niveles, sugiriendo la existencia de una enzima FNS en el genoma de *Arabidopsis* o por el contrario, la posibilidad que dicho metabolito haya sido generado por una reacción secundaria ó alternativa de otra enzima de la vía de flavonoides.

En cereales, las flavonas se encuentran preferentemente en la forma de C-glicósidos, acumulándose de manera constitutiva en los diferentes tejidos. Así, fueron descritas tres proteínas en arroz con capacidad de convertir flavanonas en flavonas, utilizando diferentes mecanismos según si el producto es la flavona aglicona (apigenina o luteolina) o su correspondiente O- glicósido, o la flavona C-glicósido, y demostrando que la síntesis de C- glicosil flavonas involucra la acción de una enzima P450, la cual es una F2H (CYP93G2; Du y col., 2010a) por poseer un mecanismo catalítico diferente al de la enzima FNSII (CYP93G1; Brazier-Hicks y Edwards. 2013). Dicha enzima hidroxila flavanonas, las cuales serían luego los sustratos para la C-glicosilación seguido por deshidratación enzimática y/o espontánea para dar finalmente las C- glicosil flavonas tales como C-glicosil apigenina y C-glicosil luteolina (Brazier-Hicks y col. 2009).

En maíz, la maicina constituye la C-glicosil flavona predominante en las barbas cuya síntesis es regulada por P1 (Gueldner y col. 1989, Byrne y col. 1996). Otras flavonas, como el precursor inmediato de la maicina, la ramnosilisoorientina, también pueden estar presentes (Snook y col. 1993). Por otra parte, en pericarpios la apigenina o luteolina pueden normalmente estar presentes pero a bajos niveles, debido a que en este tejido la vía se canaliza mayormente hacia la formación de flavan 4-oles (Figura 1.3. Introducción general) (Styles y Ceska, 1977; 1989). Sin embargo, en pericarpios de líneas que expresan P1, el regulador de la síntesis de flavonas en maíz, hay acumulación de C- glicosil flavonas cuyos niveles son significativos (Styles y Ceska, 1989, Waiss y col., 1979; Wiseman y col., 1993; Byrne y col., 1996a; McMullen y col., 2001), sugiriendo el potencial de este órgano de sintetizar flavonas. De manera similar, elevados niveles de C-glicosil flavonas están presentes en las barbas de líneas que expresan P1, los tejidos florales femeninos.

En este trabajo de Tesis, demostramos por experimentos de bioconversión en levaduras con posterior identificación del producto formado por HPLC y LC-MS, que maíz posee, al igual que arroz, una enzima P450 con actividad funcional F2H debido a su capacidad de utilizar los sustratos naringenina y eriodictiol para convertirlos en 2-hidroxinaringenina y 2-hidroxieriodictiol, respectivamente (Figura 4.5 y 4.6), la cual recibió la denominación CYP93G5 (Nelson, Comunicación Personal). Sin embargo, estudios previos identificaron trazas de luteolina presentes específicamente en líneas mutantes de maíz *sm2* (carentes de actividad ramnosil transferasas), sugiriendo que la luteolina podría ser sustrato para la síntesis de C-glicosil flavonas (McMullen y col., 2004). Estos resultados sugieren que, además de la enzima CYP93G5, en esta especie podría existir alguna enzima FNS con capacidad de convertir flavanonas directamente en flavonas, sin la formación del intermediario flavanona hidroxilado. Así, identificamos dos genes denominados CYP93G6 y CYP93G7, que presentan un mayor porcentaje de identidad con la F2H caracterizada de sorgo (CYP93G3; Du y col., 2010b) y arroz (CYP93G1), que con la F2H (CYP93G2) caracterizada también en arroz (Figura 4.7). A pesar de esto, no fue posible detectar formación de apigenina luego de agregar como sustrato naringenina en los ensayos de bioconversión en levaduras para ninguna de las 2 proteínas recombinantes CYP93G6 y CYP93G7 (Figura 4.9). Las posibles causas de

la ausencia de actividad enzimática pueden deberse a que maíz no posea enzimas del tipo FNSII funcionales, aunque no podemos descartar que diversos factores experimentales podrían estar afectando la medida de la actividad de ambas enzimas; por ejemplo, la imposibilidad de verificar la expresión de ambas proteínas en las levaduras, la adecuada inducción de las proteínas recombinantes, o la deficiencia en algún tipo de modificación postraduccional necesaria para la actividad de las enzimas.

Por otra parte, en este trabajo de Tesis demostramos que, al igual que sucede con la OsFNSI-1 caracterizada en arroz (Lee y col., 2007; Kim y col., 2008a), maíz es también capaz de generar flavonas directamente por el sistema enzimático de la FNSI, a través de una enzima a la cual denominamos *ZmFNSI-1*. Esta capacidad de conversión de naringenina en apigenina fue demostrada por diferentes métodos, tales como experimentos de bioconversión utilizando sistemas bacterianos de expresión seguido de la identificación del producto formado por LC-MS (Figura 4.14), como también *in vitro*, a partir de la purificación de la proteína recombinante y ensayos de actividad enzimática (Figura 4.16).

Al mismo tiempo fue posible demostrar que una especie *Brassicácea* como *Arabidopsis thaliana* posee un gen que codifica a enzima FNSI, la cual denominamos *AtFNSI-1*, por su capacidad de convertir naringenina en apigenina, luego de identificar el producto formado mediante LC-MS tanto en experimentos de bioconversión *in vivo* como en ensayos enzimáticos *in vitro* con la enzima purificada, de manera similar a los realizados para la enzima de maíz (Figuras 4.14 y 4.16). Dicha proteína fue identificada inicialmente por el grupo del Dr. Guido Van den Ackerveken (Utrecht, Países Bajos), quienes informaron la presencia en el genoma de *Arabidopsis* de un gen, el cual denominaron *AtDMR6*, que codificaba una dioxigenasa (2-ODD) de función desconocida pero con un rol posible en la defensa frente a patógenos, debido a que plantas de *Arabidopsis* mutantes en el mismo pierden la susceptibilidad al patógeno *Hyaloperonospora parasítica* (*Hpa*), biotrófico obligado que infecta de forma natural plantas de *A. thaliana*, causando la enfermedad del moho velloso o “downy mildew”. (Van Damme y col., 2008).

Por otra parte, resultados de susceptibilidad al patógeno *Hpa* realizados en el laboratorio del Dr. Guido Van den Ackerveken demostraron que el gen *ZmFNSI-1* fue

capaz de complementar plantas de *Arabidopsis* mutantes en *DMR6* (ecotipo Ler), ya que las mismas fueron más susceptibles al patógeno que las plantas mutantes, sugiriendo que las enzimas de maíz y *Arabidopsis* cumplirían la misma función *in planta*. Finalmente, en este trabajo de Tesis fue posible demostrar la actividad de la enzima *ZmFNSI-1 in planta*, ya que hojas de plantas de *Arabidopsis* que expresan la *ZmFNSI-1* acumulan mayores niveles de apigenina (Figura 4.18).

En conjunto, las enzimas FNSI caracterizadas en este trabajo de Tesis fueron agrupadas en un nuevo grupo de enzimas FNSI al que denominamos “tipo-FNSI”, en base a la presencia en el mismo de la FNSI caracterizada de arroz (*OsFNSI-1*), pero evolutivamente distante de las enzimas FNSI caracterizadas en la familia *Apiaceae*. Este nuevo grupo de enzimas podría corresponder a un grupo de proteínas de reciente evolución a partir de las F3H por duplicación de genes y ganancia de función.

La función biológica de las flavonas en la susceptibilidad al patógeno puede deberse a que las plantas son capaces de responder al estrés, tanto biótico como abiótico, produciendo metabolitos protectores. Sin embargo, muchas veces las plantas se enfrentan de forma simultánea a diferentes tipos de estrés sin poder evadir la situación y encontrándose obligadas, debido a su condición sésil, a priorizar su metabolismo en función de la amenaza más urgente. Así, en cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis*, un estrés abiótico como el UV -B, es capaz de inducir la producción de flavonoles, y esta acumulación puede verse disminuida por la aplicación simultánea del inductor bacteriano flg22 (simulador del estrés biótico) (Schenke y col., 2011). Esta inhibición se correlaciona con una fuerte supresión de los genes de la biosíntesis de flavonoles, induciendo en paralelo la producción de compuestos relacionados con la defensa, tales como la fitoalexinas, camalexina y escopoletinas, así como también la síntesis de lignina, la cual constituye una barrera estructural para restringir la propagación de patógeno entre las células, debido a que los distintos metabolitos secundarios como flavonoles, lignina y escopoletina derivan del mismo precursor fenilalanina (Figura 4.19; Schenke y col., 2011; 2014). De manera similar, la síntesis de flavonas podría favorecer el ataque de patógenos en las plantas de *Arabidopsis* al desviar el flujo metabólico hacia la biosíntesis de flavonoides, y no hacia la síntesis de los metabolitos de defensa.

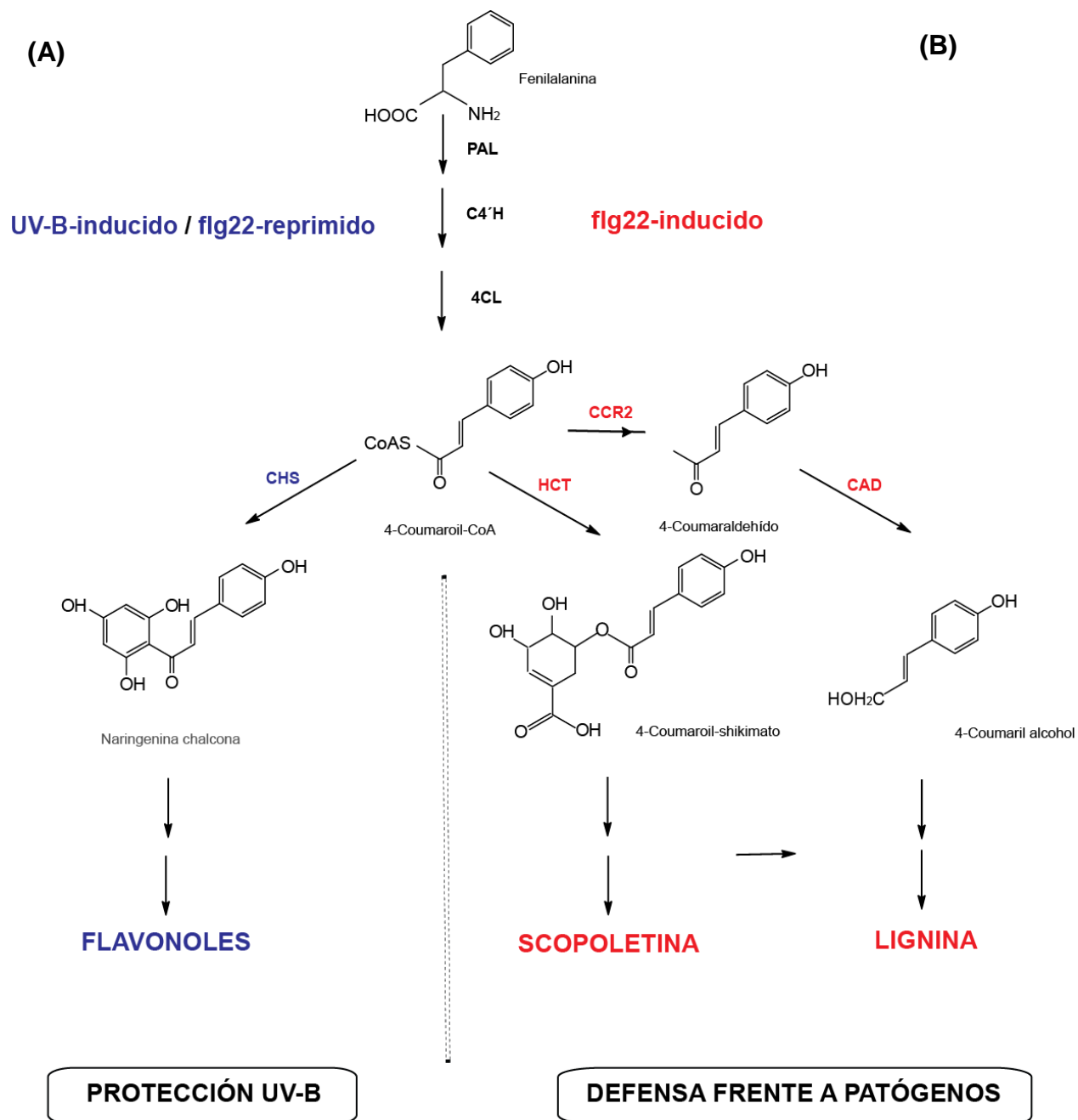


Figura 4.19 Resumen simplificado de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides (A) y de la camalexina (B). En negrita se destacan algunas de las enzimas de la vía abreviadas de la siguiente manera: PAL: fenilalanina amonio liasa; C4'H: cinamato 4' hidroxilasa; 4CL: 4-coumaroil CoA ligasa; CCR2: cinamoil CoA reductasa 2; CHS, chalcona sintasa; HCT: hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferasa; CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa. En rojo se muestran los metabolitos que se inducen por flg22 y en azul los metabolitos que se inducen por radiación UV-B y se reprimen por flg22. (Adaptado de Schenke y col., 2011).

En resumen, en este trabajo de Tesis fue posible demostrar que la síntesis de flavonas en maíz es catalizada por dos enzimas diferentes, una enzima F2H1, (CYP93G5) capaz de hidroxilar flavanonas generando así los sustratos para la C-glicosilación mediada por una UDP-glicosil transferasa (UGT) formándose finalmente las C-glicosil flavonas: C-glicosil apigenina y C-glicosil luteolina (Falcone Ferreyra y col. 2013); y una enzima FNSI capaz de sintetizar flavonas directamente de flavanonas, sin la formación del intermediario hidroxilado. Por otra parte, demostramos que una especie Brasicácea como *A. thaliana* es capaz de sintetizar apigenina, debido a la existencia en su genoma de un gen que codifica la enzima AtFNSI-1, cuyo producto enzimático las flavonas, mostraron un rol negativo frente al ataque de patógenos en Arabidopsis, posiblemente debido a que desvían el flujo metabólico en detrimento de la síntesis de metabolitos de defensa.

CAPÍTULO 5. Conclusiones

CAPITULO 5

5. Conclusiones

Las conclusiones principales de este trabajo de Tesis son las siguientes:

Los flavonoles actúan como efectivos protectores solares en plantas frente a la radiación UV-B

Mediante análisis de RT-PCR en tiempo real, se observó la inducción del gen *ZmFLS1* en plantas de maíz tratadas con radiación UV-B, indicando una fuerte regulación en su expresión luego de la exposición a dicho estrés ambiental. Por otra parte, plantas de *Arabidopsis* transgénicas sobreexpresantes de la enzima *ZmFLS1* acumularon mayores niveles de flavonoles (quercetina y kaemferol), mostrando una respuesta generalizada de tolerancia a dicho factor ambiental, dada principalmente por una menor acumulación de DPCs en el ADN, una mayor eficiencia fotosintética y una mejor integridad de las membranas celulares luego del tratamiento. Estas respuestas podrían deberse no sólo por las características de absorción de UV de los flavonoles, sino también por una reducción de las EROS una vez formadas, demostrándose así que los flavonoles actuarían como protectores solares frente a los efectos deletéreos causados por el UV-B..

Las plantas de maíz poseen distintas enzimas que podrían participar de la biosíntesis de flavonas.

Mediante la caracterización de las distintas enzimas que podrían estar involucradas en la síntesis de flavonas en maíz fue posible demostrar que en esta especie existe una enzima F2H1, CYP93G5, capaz de hidroxilar flavanonas que participa en la biosíntesis de C-glicosilflavonas; y una enzima FNSI capaz de formar flavonas directamente de flavanonas, sin la formación del intermediario hidroxilado. De esta manera, existirían 2 vías alternativas para la producción de estos compuestos. En maíz, la importancia biológica de las flavonas deriva, al menos en parte, de su capacidad insecticida natural frente al gusano de la mazorca *Helicoverpa zea*. Por otra

parte, en este trabajo también se demostró que las flavonas pueden también sintetizarse en una especie Brassicácea como *Arabidopsis thaliana*, a través del sistema enzimático FNSI, y en esta especie estos metabolitos presentan un rol negativo frente al ataque del patógeno *Hyaloperonospora parasitica*, posiblemente debido a que su generación y síntesis provocaría el desvío del flujo metabólico en sentido opuesto hacia la síntesis de compuestos protectores frente al ataque de este patógeno, por ejemplo la lignina y scopopoletina, considerados metabolitos de defensa en dicha especie vegetal.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS

- Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ, (2004), *Methods* 129 133-455
- Agati G, Biricolti S, Guidi L, Ferrini F, Fini A, Tattini M, (2011), *J Plant Physiol* 168 204-212
- Ahmad M, Jarillo J, Klimczak L, Landry L, G Peng, Last R, Cashmore AR, (1997), *Plant Cell* 9 199-207
- Akashi T, Aoki T, Ayabe S, (1998), *FEBS Lett* 431 287-290
- Akashi T, Fukuchi-Mizutani M, Aoki T, Ueyama Y, Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Kusumi T, Ayabe S, (1999), *Plant Cell Physiol* 40 1182-1186
- Allan AC, Fluhr R, (1997), *Plant Cell* 9 559-72
- Allen DJ, Nogués S, Baker NR, (1998), *J Exp Bot* 49 1775-1788
- Aoki T, Akashi T, Ayabe S, (2000), *J Plant Res* 113 475-488
- Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM, (2000), *Arch Biochem Biophys* 373 102-109
- Baker N, (2008), *Annu Rev Plant Biol* 59 89-113
- Barta C, Kalai T, Hideg K, Vass I, Hideg E, (2004), *Funct Plant Biol* 31 23-28
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V, (2003), *Ann Bot* 91 179-194
- Blumthaler M, (1993), En: "UV-B radiation and ozone depletion- effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials" (ed Tevini M). Lewis Publishers, Boca Raton, pp 71-94
- Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A, (1998), *Z Ernährungswiss* 37 147-163
- Bollag D M, Edelstein SJ, (1991), *Protein Methods*. Wiley-Liss Inc, Nueva York, pp 229
- Bradford MM, (1976), *Anal Biochem* 72 248-254
- Bray CM, West CE, (2005), *New Phytologist* 168 511-528
- Brazier-Hicks M, Edwards R, (2013), *Metabolic Engineering* 16 11-20
- Brazier-Hicks M, Evans KM, Gershtater MC, Puschmann H, Steel PG, Edwards R, (2009), *J Biol Chem* 284 17926-17934
- Bredahl L, Ro-Poulsen H, Mikkelsen TN, (2004), *Alp Res* 36 364-369
- Britsch L, (1990), *Arch Biochem Biophys* 276 348-354
- Britsch L, (1990), *Arch Biochem Biophys* 282 152-160

- Britsch L, Grisebach H, (1986), *J Biochem* 156 569-577
- Brown, DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK, (2001), *Plant Physiol* 126 524-535
- Buer CS, Muday GK, (2004), *Plant Cell* 16 1191-1205
- Burbulis IE, Iacobucci M, Shirley BWS, (1996), *Plant Cell* 8 1013-1025
- Bushman BS, Snook ME, Gerke JP, Szalma SJ, Berhow MA, Houchins KE, McMullen MD, (2002), *Crop Sci* 42 1669-1678
- Byrne PF, Darrah LL, Snook ME, Wisemen BR, Widstrom NW Moellenbeck DJ, Barry BD, (1996a), *Maydica* 41 13-18
- Byrne PF, McMullen MD, Snook ME, Musket TA, Theuri JM, Widstrom NW, Wiseman BR, Coe EH, (1996b), *Proc Natl Acad Sci* 93 8820-8825
- Caldwell MM, Robberecht R, Flint SD, (1983), *Physiol Plant* 58 445-450
- Carrasco-Ríos, (2009), *Idesia* 27 59-76
- Casati P, Walbot V, (2003), *Plant Physiol* 132 1739-1754
- Casati P, Walbot V, (2004), *Genome Biol* 5 3, R16
- Casati P, Walbot V, (2005), *Plant Cell Environ* 28 788-799
- Cheyrier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S, (2013), *Plant Physiology and Biochemistry* 72 1-20
- Choi SW, Friso S, (2010), *Epigenetics Adv Nutr* 1 8-16
- Chua CS, Biermann D, Goo KS, Sim TS, (2008), *Phytochemistry* 69 66-75
- Czemmel S, Heppel SC, Bog SJ, (2012), *Protoplasma* 249 109-118
- Dai QJ, Yan B, Huang SB, Liu XZ, Peng SB, Miranda MLL, Chavez AQ, Vergara B, Olszyk DM, (1997), *Physiol Plant* 101 301-308
- Dany AL, Douki T, Triantaphylides C, Cadet J, (2001), *J Photochem Photobiol B* 65 127-135
- Das A, Banik NL, Ray SK, (2006), *Int J Cancer* 119 2575-2585
- Davies KM, Schwinn KE, Deroles SC, Manson DG, Lewis DH, Bloor SJ, Bradley JM, (2003), *Euphytica* 131 259-268
- Deboo GB, Albertsen MC, Taylor LP, (1995), *Plant J* 7 703-705
- Deikman J, Hammer PE, (1995), *Plant Physiol* 108 47-57
- Demkura P, Ballare C, (2012), *Molecular Plant* 1-11

- DeVetten N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R, (1997), *Gen Dev* 11 1422-1434
- Dixon RA, Choudhary AD, Dalkin D, Edwards R, Fahrendorf T, Gowri G, Harrison MJ, Lamb CJ, Loake GJ, Maxwell CA, Orr J, Paiva NL, (1992), En: "Phenolic Metabolism in Plants" (eds Stafford HA y Ibrahim RK). Plenum Press, Nueva York, pp 91-138
- Dixon RA, Paiva NL, (1995), *Plant Cell* 7 1085-1097
- Du Y, Chu H, Chu IK, Lo C, (2010a), *Plant Physiol* 154 324-333
- Du Y, Chu H, Wang M, Chu IK, Lo C, (2010b), *J Exp Bot* 61 983-994
- Erlejman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI, (2004), *Free Radical Research* 38 1311-1320
- Essen LO, Klar, T, (2006), *Cell Mol Life Sci* 63 1266-1277
- Falcone Ferreyra ML, Rius S, Emiliani J, Pourcel L, Feller A, Morohashi K, Casati P, Grotewold E, (2010a), *Plant J* 62 77-91
- Falcone Ferreyra ML, Casas MI, Questa JI, Herrera AL, DeBlasio S, Wang J, Jackson D, Grotewold E, Casati P, (2012), *Frontiers Plant Science* 3 101 doi, 10 3389/fpls 2012 00101
- Falcone Ferreyra ML, Pezza A, Biarc J, Burlingame AL, Casati P, (2010b), *Plant Physiol* 153 1878-1894
- Falcone Ferreyra ML, Rodriguez R, Casas MI, Labadie G, Grotewold E, Casati P, (2013), *J Biol Chem* 288 31678-31688
- Ferrer JL, Austin MB, Stewart C, Noe JP, (2008), *Plant Physiol Biochem* 46 356-370
- Ferreres F, Figueiredo R, Bettencourt S, Carqueijeiro I, Oliveira J, Gil-Izquierdo A, Pereira DM, Valenta P, Andrade PB, Duarte P, Ros Barcelo A, Sottomayor M, (2011), *J Exp Bot* 62 2841-2854
- Feucht W, Treutter D, Polster J, (2004), *Plant Cell Rep* 22 430-436
- Fliegmann J, Furtwängler K, Malterer G, Cantarello C, Schüler G, Ebel J, Mithöfer A, (2010), *Phytochemistry* 71, 508-514
- Frohnmeier H, Staiger D, (2003), *Plant Physiol* 133 1420-1428
- Gao X, Cassidy A, Schwarzschild MA, Rimm EB, Ascherio A, (2012), *Neurology* 78 1138-1145
- Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E, (1999), *Cancer Causes Control* 10 71-75
- Gardner KH, Correa F, (2012), *Plant Sci* 335 1451-1452

- Ge L, Peer W, Robert S, Swarup R, Ye S, Prigge M, Cohen JD, Friml J, Murphy A, Tang D, Estelle M, (2010), *Plant Cell* 22 1749-1761
- Gebhardt Y, Witte S, Forkmann G, Lukacin R, Matern U, Martens S, (2005), *Phytochemistry* 66 1273-1284
- Gebhardt YH, Witte S, Steuber H, Matern U, Martens S, (2007), *Plant Physiol* 144 1442-1454
- Geleijnse JM, Launer LG, Hofman A, Pols HAP, Witteman JCM, (1999), *Arch Intern Med* 159 2170-2174
- Gietz RD, Sugino A, (1988), *Gene* 74 527-534
- Gietz RD, Woods RA, (2002), *Method Enzymol* 350 87-96
- Giovanini MP, Puthoff DP, Nemacheck JA, Mittapalli O, Saltzmann KD, Ohm HW Shukle RH, Williams CE, (2006) *Mol Plant Microbe Interact* 19 1023-1033
- Goodman CD, Casati P, Walbot V, (2004), *Plant Cell* 16 1812-1826
- Grandmaison J, Ibrahim RK, (1996), *Plant Physiol* 147 653-660
- Gronquist M, Bezzerides A, Attygalle A, Meinwald J, Eisner M, Eisner T, (2001), *Proc Natl Acad Sci* 98 13745-13750
- Grotewold E, (2006), *Ann Rev Plant Biol* 57 761-780
- Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, Siame B, Butler L, Swenson J, Maddock S, Clair GS, Bowen B, (1998), *Plant Cell* 10 721-740
- Grotewold E, Drummond T, Bowen BB, Peterson T, (1994), *Cell* 76 543-553
- Grotewold E, Sainz MB, Tagliani L, Hernandez JM, Bowen B, Chandler VL, (2000), *Proc Natl Acad Sci*, 97 13579-13584
- Gueldner RC, Snook ME, Wiseman BR, Widstrom NW, Himmelsbach DS, Costello CE, (1989), En: "197th and 198th National Meetings of the American Chemical Society and the 1989 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies" (ed. Hedin PA). American Chemical Society Symposium Series, Washington DC, EEUU, pp 251-263
- Guo BZB, Butrón A, Scully BT, (2010), *Int J Plant Biol* 1 13-18
- Hahlbrock K, Scheel D, (1989), *Plant Physiol* 40 347-369
- Halliwell B, (2009), *Free Radic Biol Med* 46 531-542
- Harborne JB, (1993), "The flavonoids: advances in research since 1986". Chapman y Hall, London Publications

- Harborne JB, Baxter H, (1999), "Handbook of Natural Flavonoids vol, 2". Wiley Chichester
- Harborne JB, Williams CA, (2000), *Phytochemistry* 55 481-504
- Hassan S, Mathesius U, (2012), *J Exp Bot* 63 3429-3444
- Heim M A, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC, (2003), *Mol Biol Evol* 20 735-747
- Heller W, Forkmann G, (1993), En: "The flavonoids: advances in research since 1986". Chapman y Hall, London Publications (ed Harborne JB), pp 499-535
- Hernandez JM, Heine GF, Feller A, Grotewold E, (2004), *J Biol Chem* 274 48205-48213
- Herrmann KM, (1995), *Plant Cell* 7 907-919
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V, (2011), *J Exp Bot* 62 2465-2483
- Hideg E, Barta C, Kalai T, Vass I, Hideg K, Asada K, (2002), *Plant Cell Physiol* 43 1154-1164
- Hofmann NR, (2012), *Plant Cell* 24 3485
- Holton TA, Brugliera F, Tanaka Y, (1993), *Plant J* 4 1003-1010
- Horiguchi G, Kim G, Tsukaya H, (2005), *Plant J* 43 68-78
- Huberts D, HEW, van der Klei IJ, (2010), *Biophys Acta* 1803 520-525
- Hungria M, Joseph CM, Phillips DA, (1991), *Plant Physiol* 97 751-758
- Hutzler P, Fischbach R, Heller, W, Jungblut, TP, Reuber, S, Schmitz, R, Veit M, Weissenböck, G, Schnitzler J-P, (1998), *J Exp Bot* 49 953-956
- Inze D, De Veylder L, (2006), *Annu Rev Genet* 40 77-105
- Irani NG, Hernandez, JM, Grotewold E, (2003), *Rec Adv Phytochem* 38 59-78
- Ishida T, Adachi S, Yoshimura M, Shimizu K, Umeda M, Sugimoto K, (2010), *Development* 137 63-71
- Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM, (1998), *Trends Plant Sci* 3 131-135
- Jenkins GI, (2008), En "Health Benefits of Organic Food: Effects of the Environment" (eds Givens DI, Minihane AM, Shaw E). Oxfordshire: CABI; pp 240–262.
- Jenkins GI, (2009), *Plant Biol* 60 407-431
- Jones S, (2004), *Genome Biol* 5 doi 10 1186/gb-2004-5-6-226
- Jordan BR, (1996), *Adv Bot Res* 22 98-138

- Jorgensen K, Rasmussen AV, Morant M, Nielsen AH, Bjarnholt N, Zagrobelny M, Bak S, Moller BL, (2005), *Curr Opin Plant Biol* 8 280-291
- Kaiserli E, Jenkins GI, (2007), *Plant Cell* 19 2662-2673
- Kalbina I, Strid A, (2006), *Plant Cell Environ* 29 1783-93
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C, (2010), *Curr Top Dev Biol* 91 29-66
- Kaur P, Shukla S, Gupta S (2008), *Carcinogenesis* 29 2210-2217
- Keiller DR, Holmes MG, (2001), *Photosynth Res* 67 229-240
- Keller CP, Stahlberg R Barkawi LS, Cohen JD (2004), *Plant Physiol* 134 1217-1226
- Kim B G, Kim J H, Kim J, Lee C, Ahn J -H, (2008), *Mol Cell* 25 247-252
- Kim JH, Cheon YM, Kim BG, Ahn JH, (2008), *J Plant Biol* 51 97-101
- Kim ST, Heelis, PF, Sancar A, (1992), *Biochemistry* 31 11244-11248
- Kimura S, Tahira Y, Ishibashi T, Mori Y, Mori T, Hashimoto J, Sakaguchi K, (2004), *Nucleic Acids Res* 32 2760-2767
- Kitada C, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K, (2001), *Plant Cell Physiol* 42 1338-1344
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T Aromaa A, (2002), *Am J Clin Nutr* 76 560-568
- Koch E, Slusarenko A, (1990), *Plant Cell* 2 437-445
- Kozics K, Valovicova Z, Slamenova D, (2011), *Neoplasma* 58 516-24
- Kuhn BM, Geisler M, Bigler L, Ring C, (2011), *Plant Physiol* 156 585-595
- Kusano M, Tohge T, Fukushima A, Kobayashi, M, Hayashi N, Otsuki H, Kondou Y, Goto H, Kawashima M, Matsuda F, Niida R, Matsui M, Saito K, Fernie AR, (2011), *Plant J* 67 354-369
- Laemmli UK, (1970), *Nature* 227 680-685
- Landry L G, Chapple C C S, Last R L, (1995), *Plant Physiol* 109 1159-1166
- Lario LD, Ramirez-Parra E, Gutierrez C, Casati P, Spampinato C, (2011), *J Exp Bot* 62 2925-2937
- Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, TongprasitW, Zhao H, Lee I, Deng XW, (2007), *Plant Cell* 19 731-749
- Lee YJ, Kim JH, Kim BG, Lim Y, Ahn JH, (2007), *BMB Rep* 41 68-71

- Lewis DR, Ramirez MV, Miller ND, Vallabhaneni P, Ray WK, Helm RF, Winkel B, S, Muday GK, (2011), *Plant Physiol* 156 144-164
- Lewis DR, Wu GS, Ljung K, Spalding EP, (2009), *Plant J* 60 91-101
- Lewis NG, Yamamoto E (1990), *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41 455-496
- Liu Z, Hossain GS, Islas-Osuna MA, Mitchell DA, Mount DW, (2000), *Plant J* 21 519-528
- Lukacin R, Groning I, Pieper U, Matern U, (2000b), *Eur J Biochem* 267 853-860
- Lukacin R, Groning I, Schiltz E, Britsch L, Matern U, (2000a), *Arch Biochem Biophys* 15 364-370
- Mackerness SA-H, John FC, Jordan BR, Thomas B, (2001), *FEBS Lett* 489 237-242
- Mahajan M, Kumar V, Yadav SK, (2011), *Int J Plant Dev Biol* 5 42-48
- Mandal SM, Chakraborty D, Dey S, (2010), *Plant Signal Behav* 5 359-353
- Markham K, R, Tanner G, J, Cassi-Lit M, Whitecross MI, Nayudu M, Mitchell KA, (1998), *Phytochemistry* 49 1913-1919
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V, (1995), *Nature* 375 397-400
- Martens S, Forkmann G, (1999), *Plant J* 20 611-618
- Martens S, Forkmann G, Matern U, Lukacin R, (2001), *Phytochemistry* 58 43-46
- Martens S, Wellmann F, Britsch L, Forkmann G, Matern U, Lukacin R, (2003), *FEBS Lett* 544 93-98
- Martens S, Mithofer A, (2005), *Phytochemistry* 66 2399-2407
- Martens S, Preuss A, Matern U, (2010), *Phytochemistry* 71 1040-1049
- Mathesius U, (2001), *J Exp Bot* 52 419-426
- Mathesius U, Bayliss C, Weinman JJ, Schlaman HRM, Spaink HP, Rolfe BG McCully ME, Djordjevic MA, (1998), *Mol Plant-Microbe Interact* 11 1223-1232
- Maxwell K, Johnson GN, (2000), *J Exp Bot* 51 659-668
- McGregor WG, (1999), *J Invest Dermatol Symp Proc* 4 1-5
- McKenzie RL, Bjorn LO, Bais A, Ilyasd M, (2003), *Photochem Photobiol Sci* 2 5-15
- McMullen MD, Byrne PF, Snook ME, Wiseman BR, Lee EA, Widstrom NW, Coe EH, (1998) *Proc Natl Acad Sci* 95 1996-2000
- McMullen MD, Kross H, Snook ME, Cortés-Cruz M, Houchins KE, Musket TA, Coe EH, (2004), *J Hered* 95 225-233

- McMullen MD, Snook M, Lee EA, Byrne PF, Kross H, Musket TA, Houchins K, Coe EH Jr, (2001), *Genome* 44 667-676
- McNally DJ, Wurms KV, Labbe C, Belanger RR, (2003), *Mol Plant Pathol* 63 293-303
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B, (2005), *Plant Physiol* 138 1083-1096
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Aharoni N, (1992), *J Am Soc Hort Sci* 117 128-132
- Menssen A, Hohmann S, Martin W, Schnable PS, Peterson PA, Saedler H, Gierl A, (1990), *EMBO J* 9 3051-3057
- Miadoková E, (2009), *Toxicology* 2 211-218
- Mitchell DL, Nairn RS, (1989), *Photochem Photobiol* 49 805-819
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F, (2004), *Trends Plant Sci* 9 490-98
- Mo Y, Nagel C, Taylor LP, (1992), *Proc Natl Acad Sci* 89 7213-7217
- Mol J, Grotewold E, Koes R, (1998), *Trends Plant Sci* 3 212-217
- Moore BD, (2004) *Trends Plant Sci* 9 221-228
- Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V, (2000), *Plant Physiol* 123 1561-1570
- Mulvihill EE, Huff MW, (2010), *Can J Cardiol Suppl A* 17A-21A
- Murphy TM, (1983), *Plant Physiol* 58 381-388
- Naoumkina M, Dixon RA, (2008), *Plant Signal Behav* 3 573-575
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, (1996), *Pharmacogenetics* 6 1-41
- Nelson DR, Schuler MA, Paquette SM, Werck-Rechhart D, Bak S, (2004), *Plant Physiol* 135 756-772
- Nicholas C, Batra S, Vargo MV, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI, (2007), *J Immunol* 179 7121-7127
- Nielsen K, Deroles SC, Markham KR, Bradley MJ, Podivinsky E, Manson D, (2002), *Mol Breeding* 9 217-229
- Ormrod DP, Landry LG, Conklin PL, (1995), *Physiol Plant* 93, 602-610
- Owens DK, Alerding AB, Crosby KC, Bandara AB, Westwood JH, Winkel BSJ, (2008), *Plant Physiol* 147 1046-1061
- Paul ND, Gwynn Jones D, (2003), *Trends Ecol Evol* 18 48-55
- Peer W, A, Blakeslee JJ, Yang H, Murphy AS, (2011), *Mol Plant* 4 487-504

- Peer W A, Murphy AS, (2006), En: "The Science of Flavonoids" (ed Grotewold E). Springer, Berlin, pp 239-268
- Peer WA, Bandyopadhyay A, Blakeslee JJ, Makam SN, Chen RJ, Masson PH, Murphy AS, (2004), *Plant Cell* 16 1898-1911
- Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L, Murphy AS, (2001), *Plant Physiology* 126 536-548
- Polster J, Dithmar H, Burgemeister R, Friedemann G, Feucht W (2006), *Physiol Plantarum* 128 163-174
- Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P, (1996), *Methods Enzymol* 272 51-64
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen MAK, (2009), *Plant Cell Environ* 32 158-169
- Prescott A G, John P, (1996), *Plant Physiol Plant Mol Biol* 47 245-271
- Prescott A G, Stamford NPJ, Wheeler G, Firmin JL, (2002), *Phytochemistry* 60 589-593
- Preus A, Stracke R, Weisshaar B, Hillebrecht A, Matern U, Martens S, (2009), *FEBS Lett* 583 1981-1986
- Quaite FE, Takayanagi S, Ruffini J, Sutherl JC, Sutherland BM, (1994), *Plant Cell* 6 1635-1641
- Quattrocchio F, Baudry A, Lepiniec L, Grotewold E, (2006), En: "The Science of Flavonoids" (ed Grotewold E). Springer, Berlin, pp 97-122
- Rao MV, Paliyath C, Ormrod DP, (1996), *Plant Physiol* 110 125-136
- Ringli C, Bigler L, Kuhn, BM Leiber RM, Diet A, Santelia D, Frey B, Pollmann S, Klein M, (2008), *Plant Cell* 20 1470-1481
- Rius S, Grotewold E, Casati P, (2012), *BMC Plant Biol* 15 92
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schafer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R, (2011), *Science* 332 103-106
- Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo CR, Rotilo G, (2008), *Neurochem Res* 33 2390-2400
- Rozen S, Skaletsky H, (2000), *Methods Mol Biol* 132, 365-386
- Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C, (2002), *Phytochemistry* 59 23-32
- Saito K, Kobayashi M, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M, (1999), *Plant J* 17 181-189
- Sambrook J, Russell D W, (2001), "Molecular cloning-A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EEUU

- Santelia D, Henrichs S, Vincenzetti V, Sauer M, Bigler L, Klein M, Bailly A Lee Y, Friml J, Geisler M, Martinoia E, (2008), *J Biol Chem* 283 31218-31226
- Saslowsky DE, Warek U, Winkel BSJ, (2005), *J Biol Chem* 280 23735-23740
- Schenke D, Böttcher C, Scheel D, (2011), *Plant Cell Environ* 34 1849-1864
- Schenke D, Cai D, Scheel D, (2014), *Plant Cell Environ* doi, 10 1111/pce 12283
- Schirra M, Mulas M, (1995), *Biol Technol* 6 129-133
- Shewfelt T, Purvis AC, (1995), *Hort Sci* 30 213-218
- Snook ME, Widstrom NW, Wiseman BR, Gueldner RC, Wilson RL, Himmelsbach DS, Harwood JS, Costello CE, (1994), En "Bioregulators for Crop Protection and Pest Control" (ed Hedin PA), pp 122-135
- Snook MW, Widstrom N, Gueldner RC, (1989), *Chromatographia* 477 439-447
- Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M, (2003), *J Exp Bot* 54 1977-1984
- Stafford HA, (1991), *Plant Physiol* 96 680-684
- Stapleton AE, Walbot V, (1994), *Plant Physiol* 105 881-889
- Stevens JF Ivancic Monika I Deinzer ML Wollenweber E (1999), *J Nat Prod* 62 392-394
- Stracke R, Ishihara H, Hup G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, Weisshaar B, (2007), *Plant J* 50 660-677
- Stracke R, De Vos R C, Bartelniewoehner L, Ishihara H, Sagasser M, Martens S, Weisshaar B, (2009), *Planta* 229 427-445
- Stracke R, Favory J-J Gruber H, E, Bartelniewoehner L, Bartels S, Binkert M, Funk M, Weisshaar B, Ulm R, (2010a), *Plant Cell Env* 33 88-103
- Stracke R, Jahns O, Keck M, Tohge T, Niehaus K, Fernie A, R, Weisshaar B, (2010b), *New Phytol* 188 985-1000
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B, (2001), *Curr Opin Plant Biol* 4 447-456
- Styles ED, Ceska O, (1989), *Maydica* 34 227-237
- Styles ED, Ceska O, (1977), *Can J Genet Cytol* 19 289-302
- Sugimoto-Shirasu K, Roberts K, (2003), *Curr Opin Plant Biol* 6 544-553
- Tarahovsky YS, Muzafarov EN, Kim YA, (2008), *Mol Cell Biochem* 314 65-71
- Teramura AH, Sullivan JH (1994), *Photosynth Res* 39 463-473
- Tong H, Leasure C D, Hou X, Yuen G, Briggs W, y He Z H, (2008), *Proc Natl Acad Sci* 105 21039-21044

- Turnbull JJ, Nakajima J-I, Welford RWD, Yamazaki M, Saito K, Schofield CJ, (2004), *J Biol Chem* 279 1206-1216
- Tuteja N, Ahmad P, Panda B B, Tuteja R, (2009), *Mut Res Rev Mut Res* 681 134-149
- Ulm R, Baumann A, Oravec A, Mate Z, Adam E, Oakeley E, J, Schafer E Nagy F, (2004), *Proc Natl Acad Sci USA* 101 1397-1402
- Van, Der, Meer IM, Stam ME, Van Tunen AJ, Mol JNM, Stuitje AR, (1992), *Plant Cell* 4 253-262
- Van Damme, M Huibers RP, Elberse J, Van den Ackerveken G, (2008), *Plant J* 54 785-793
- Vogt T, Wollenweber E, Taylor LP, (1995), *Phytochemistry* 38 589-592
- Weiss AC, JrChan BG, Elliger CA, Wiseman BR, McMillian WW, Widstrom NW, Zuber MS, Keaster AJ, (1979), *J Econ Entomol* 72 256-258
- Wang X, (2011), *Funct Integr Genomics* 11 13-22
- Waterworth WM, Jiang Q, West CE, Nikaido M, Bray CM, (2002), *J Exp Bot* 53 1005-1015
- Weisshaar, B Jenkins GI, (1998), *Curr Opin Plant Biol* 1 251-257
- Wellmann F, Griesser M, Schwab W, Martens S, Eisenreich W, Matern U, Lukacin R, (2006), *FEBS Lett* 580 1642-1648
- Williams R, Spencer J, Rice-Evans C, (2004), *Free Radic Biol Med* 36 838-849
- Winkel-Shirley B, (2001), *Plant Physiol* 126 485-493
- Winkel-Shirley B, (2002), *Curr Opin Plant Biol* 5 218-223
- Winkel-Shirley B, (2006), En: "The Science of Flavonoids" (ed Grotewold E). Springer, Berlin, pp 123-142
- Wintermans JF, De Mots A, (1965), *Biochim Biophys Acta* 109 448-455
- Wiseman BR, Snook ME, Isenhour DJ, (1993), *J Econ Entomol* 86 939-944
- Wisman E, Hartmann U, Sagasser M, Baumann E, Palme K, Hahlbrock K, Saedler H, Weisshaar B, (1998), *Proc Natl Acad Sci* 95 12432-12437
- Xue B, Charest PJ, Devantier Y Rutledge RG, (2003), *Mol Genet Genomics* 270 78-86
- Yamasaki H Sakihama Y Ikehara N, (1997), *Plant Physiol* 115 1405-1412
- Yasui A, Eker APM, (1998), En: "DNA Damage and Repair: DNA Repair in Higher Eukaryotes" (eds Nickoloff JA y Hoekstra MF), Totowa, NJ: Humana Press, pp 9-32

- Ylstra B, Busscher J, Franken J, Hollman PCH, Mol J, NM, Van Tunen AJ, (1994), Plant J 6 201-212
- Ylstra B, Muskens M, Tunen AJ, (1996), Plant Mol Biol 32 1155-1158
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Saito K, (2008), Plant Cell 20 2160-2176
- Yoshitama K, Ishikura N, Fuleki T, Nakamura S, (1992), J Plant Physiol 139 513-519
- Yu O, Mcgonigle B, (2005), Adv Agron 86 147-190
- Yun CH, Yamamoto T Nozawa A, Tozawa Y, (2008), Biosci Biotechnol Biochem 72 968-973
- Zhang J, Subramanian S, Zhang Y, Yu O, (2007), Plant Physiol 144 741-751
- Zhao J, Dixon RA, (2010), Trends Plant Sci 15 72-80