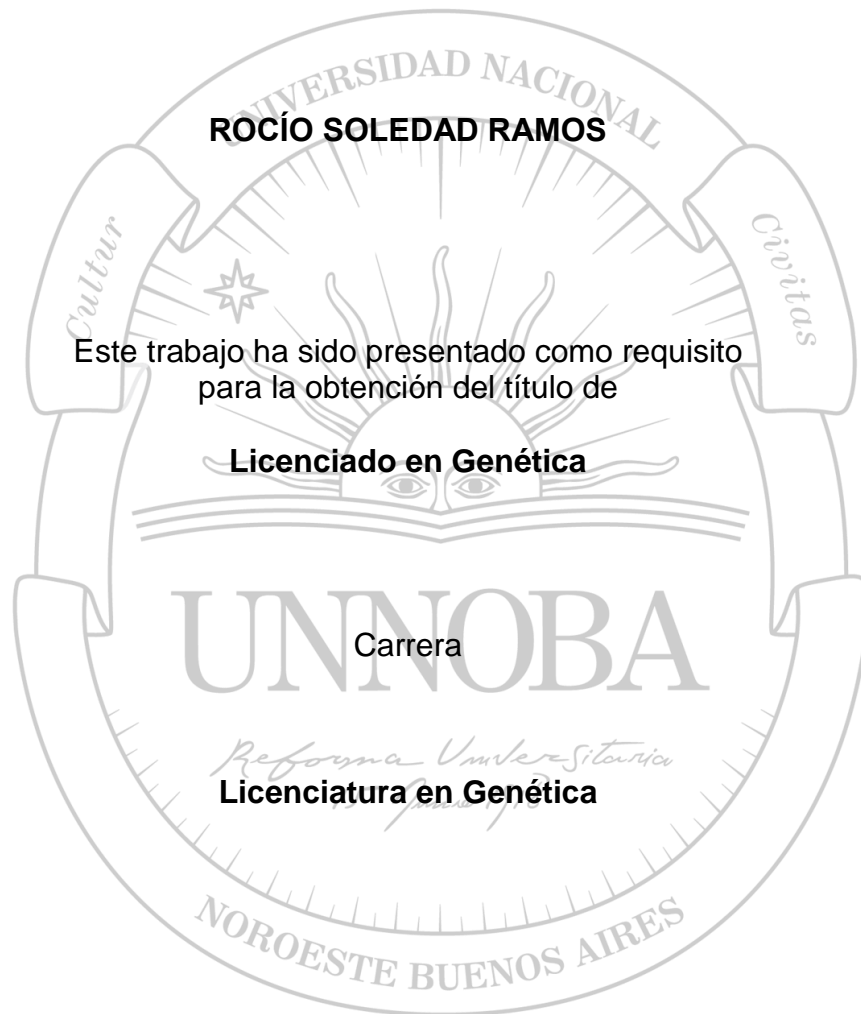


**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES RPL10 EN EL  
DESARROLLO Y EN LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL, Y MECANISMOS DE  
RESPUESTA A LA RADIACIÓN UV-B EN *Arabidopsis thaliana***

Trabajo Final de Grado  
del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 12 de diciembre de 2017

**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES RPL10 EN EL  
DESARROLLO Y EN LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL, Y MECANISMOS DE  
RESPUESTA A LA RADIACIÓN UV-B EN *Arabidopsis thaliana***

Trabajo Final de Grado  
del alumno

**ROCÍO SOLEDAD RAMOS**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

Ing. Agr. MsC Erika Mroginski  
**Co-Director**

Dra. María Lorena Falcone Ferreyra  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 12 de diciembre de 2017

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), por la formación académica que me brindó, en especial a sus profesores, varios de los cuales supieron contagiarnos pasión y ganas de seguir aprendiendo. Agradezco especialmente a Erika por aceptar ser codirectora de este trabajo y su predisposición y a Susana por ayudarme con la organización de la defensa final y por su gran predisposición.

Al Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI), a Paula por abrirme las puertas del laboratorio para poder realizar este trabajo. A Lore especialmente por haber aceptado ser mi directora, por haberme enseñado tanto y por su paciencia y dedicación. A todas las chicas (y al Colo) de laboratorios 1 y 2, tesinistas, becarias e investigadoras por ayudarme siempre que necesité y por el compañerismo.

A mis amigos, los de la vida, los de siempre. A “Alojamientos Izaguirre”, gracias Mari y Pablo. A los amigos que me regaló mi paso por la Universidad, si supieran lo agradecida que voy a estar siempre con la cátedra de química orgánica por haberme atrasado un año, porque gracias a eso pude cursar en este grupo enormemente compañero y de buenas personas. El equipo genetista: Ale, Belu, Cami, Emi, Estefi, Gise, Guada, Jose, Mati, Manu, Rami, Vivi, Yael. Anto, rompo el orden alfabético para decirte especialmente gracias por ser mi co-equiper en tan linda etapa, por ser de fierro y por esta amistad que seguramente haremos durar hasta la vejez. En realidad me gustaría agradecerle a cada uno. Por ejemplo, a Ale por ser mi compañero en ese humor raro y por estar siempre presente; o a Cami, por tantas noches de retroalimentación psicológica y aguante; o a Gise, Emi y Mati, por decir siempre sí a las propuestas cerveceras y su compañerismo. A Romi, amiga vos sos del equipo agrónomo pero no podía dejar de nombrarte acá, sos clave siempre, desde que nos cruzaron botánica y las cremonas pre-biológica. A todos, gracias por formar parte en esta etapa, los quiero mucho.

A Nahuel, gracias por ser mi compañero de camino, mi cable a tierra, por estar en todas y por hacerme ver siempre que lo que hoy parece grave, mañana pasa y que siempre hay que tener fe. Como escribió un grande: las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma. Te amo.

A mi familia. A Mari y Cacho por ayudarme a poder mudar a Rosario. A mis hermanos Darío y Walter, a Luci y, sobre todo, a mis viejos, no sólo porque conté con su apoyo aunque nuestro contexto económico no fuera el más favorable, sino por todo. A mi mamá que me enseñó que la responsabilidad y los libros son buenas opciones, pero que el egoísmo nunca debe ser una opción. A mi viejo, quintero que supo contagiarme su fascinación por la naturaleza, que su conocimiento empírico va más allá de haber terminado sólo la escuela primaria, porque la mayor herramienta es la observación. Los amo, y corrijo a quien un día me dijo que el primer título universitario de la familia iba a ser mío, porque no lo es, es de todos.

*Hay un libro abierto siempre para todos: la naturaleza.*

J. J. Rousseau

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	IV
ANGLICISMOS.....	V
PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	VI
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 La germinación en la especie vegetal <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	1
1.2 Las proteínas ribosomales y su rol en la traducción .....	3
1.3 Las proteínas ribosomales RPL10 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	4
1.4 Las fitohormonas como reguladores de la dormición y la germinación en las semillas.....	7
1.4.1 El Ácido abscísico (ABA).....	8
1.5 La radiación ultravioleta-B (UV-B) y sus efectos en las plantas.....	10
1.5.1 Percepción de la radiación UV-B por las plantas.....	12
1.5.2 Cambios en la expresión génica inducidos por la radiación UV-B.....	13
1.6 El factor de transcripción LIMYB de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	14
Hipótesis.....	16
<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 Material vegetal.....	18
3.2 Ensayos de germinación, crecimiento de la raíz primaria y tratamientos con ácido abscísico (ABA). .....	19
3.3 Condiciones de crecimiento para los tratamientos con radiación UV-B .....	20
3.4 Tratamiento con radiación UV-B.....	21
3.5 Extracción de ADN genómico de plantas de <i>A. thaliana</i> (método CTAB).....	22
3.6 Extracción de ARN total .....	22
3.7 Tratamiento con ADNasa I y retrotranscripción .....	23

3.8	Amplificación de ácidos nucleicos.....	24
3.8.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	24
3.8.2	PCR en tiempo real .....	26
3.9	Electroforesis en geles de agarosa .....	28
3.10	Extracción y cuantificación de clorofilas a y b.....	28
3.11	Determinación de la liberación de electrolitos .....	29
3.12	Preparación de extractos crudos de proteínas.....	29
3.13	Cuantificación de proteínas totales.....	29
3.14	Detección histoquímica de la actividad GUS.....	30
3.15	Análisis estadísticos.....	31
3.16	Diseño experimental.....	31
	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
	<b>PARTE I Estudio de la participación de las proteínas ribosomales RPL10s en el desarrollo y en la señalización del ácido abscísico en <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>33</b>
4.1.	Identificación de plantas de <i>A. thaliana</i> mutantes heterocigotas para el gen <i>RPL10A</i> .....	33
4.2	Análisis de la capacidad germinativa y el desarrollo temprano post-germinativo de plantas de <i>A. thaliana</i> salvajes y mutantes simples en los genes <i>RPL10A-B-C</i> .....	35
4.3	Determinación del crecimiento de la raíz primaria de plantas de <i>A. thaliana</i> salvajes y mutantes simples en los genes <i>RPL10A-B-C</i> .....	39
4.4	Análisis del crecimiento germinativo y del desarrollo temprano post-germinativo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> salvajes y mutantes simples en los genes <i>RPL10A-B-C</i> en presencia de ácido abscísico (ABA) .....	41
4.5	Ensayos de inhibición del crecimiento de la raíz primaria por el ABA exógeno ....	48
4.6	Análisis de la expresión de los genes <i>RPL10A-B-C</i> y su regulación por el ABA.....	51
	<b>PARTE II Estudio de la contribución del factor de transcripción LIMYB en la respuesta a la radiación UV-B en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>57</b>
4.7	Identificación de plantas de <i>A. thaliana</i> mutantes en el gen <i>LIMYB</i> .....	57
4.8	Análisis de la expresión de <i>LIMYB</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> mutantes y sobreexpresantes .....	59

4.9 Estudio de la expresión de los genes <i>RPL10A</i> , <i>RPL10B</i> y <i>RPL10C</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> salvajes, mutantes <i>limyb</i> y sobreexpresantes de <i>LIMYB</i> .....	61
4.10 Análisis de la expresión de <i>LIMYB</i> luego de la exposición a la radiación UV-B en plantas de <i>A. thaliana</i> .....	62
4.11 Estudio de la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas ribosomales en plantas de <i>A. thaliana</i> .....	63
4.12 Análisis de la respuesta de plantas de <i>A. thaliana</i> mutantes <i>limyb</i> y sobreexpresantes frente a la radiación UV-B .....	69
DISCUSIÓN.....	75
5.1 Estudio de la participación de las proteínas ribosomales RPL10s en el desarrollo y en la señalización del ácido abscísico en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	75
5.2 Estudio de la contribución del factor de transcripción LIMYB en la respuesta a la radiación UV-B en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	83
CONCLUSIONES .....	87
BIBLIOGRAFÍA .....	88

## ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ABRE</b>	Elemento de respuesta al ABA ( <i>ABA-Responsive Element</i> )
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>ADNasa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>ADN-T</b>	Secuencia de ADN proveniente del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNt</b>	ARN de transferencia
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio ( <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreiol
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FT</b>	Factor de transcripción
<b>PBS</b>	Fosfato buffer salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PF</b>	Peso fresco
<b>PMSF</b>	Fenil metil sulfonil fluoruro
<b>RT</b>	Transcripción reversa ( <i>Reverse Transcription</i> )
<b>OE</b>	Línea sobreexpresante ( <i>Over-Expressing Line</i> )
<b>TBE</b>	Tris borato EDTA
<b>TBS</b>	Tris buffer salino
<b>U</b>	Unidad
<b>UV</b>	Ultravioleta



## ANGLICISMOS

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

**Bulk:** grupo de plantas de igual genotipo correspondientes a un mismo tratamiento.

## PRESENTACIONES A CONGRESOS CIENTÍFICOS

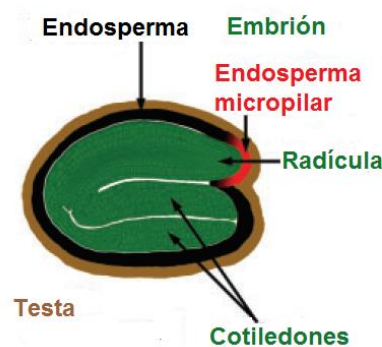
- **Simposio de Genómica Funcional de Plantas, 2017.** “Participación de las proteínas ribosomales RPL10 en el desarrollo y señalización del ABA en *Arabidopsis thaliana*”. Ramos, Rocío Soledad; Falcone Ferreyra, María Lorena; Casati, Paula.

## 1-INTRODUCCIÓN

### 1.1- La germinación en la especie vegetal *Arabidopsis thaliana*.

La semilla es el producto maduro de un óvulo fecundado del cual partirá un nuevo individuo vegetal. Su función es la de multiplicar y mantener la especie. Por lo tanto, es uno de los elementos más eficaces para que la especie se disperse, tanto en el tiempo como en el espacio (Nambara y Nonogaki, 2012).

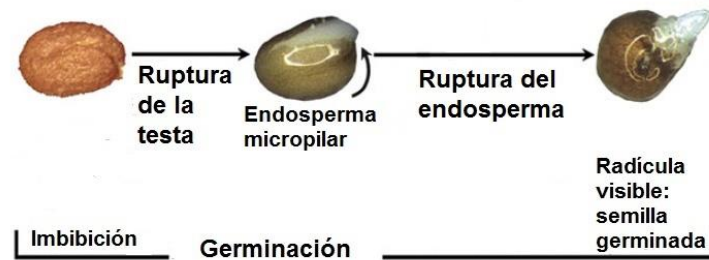
En la especie *Arabidopsis thaliana*, una planta puede producir cientos de miles de semillas a lo largo del ciclo de floración. Estas semillas son extremadamente pequeñas: una semilla seca pesa alrededor de 15 ng y es aproximadamente esférica, con un diámetro de 200  $\mu\text{m}$ . La semilla está compuesta casi enteramente por el embrión. Rodeando al embrión, hay una capa de endosperma, la cual está cubierta por la testa o cubierta externa de la semilla (Figura 1) (Müller *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, el endosperma de la semilla madura está confinado a una capa periférica de células (Lee *et al.*, 2012), la misma actúa como una barrera mecánica para inhibir el crecimiento embrionario y como reserva de nutrientes para la germinación (Yan *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Esquema de la estructura de la semilla de *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Müller *et al.* (2006).

El inicio de la germinación de una semilla es una etapa clave en el ciclo de vida de una planta. Durante este proceso tiene a lugar la traducción de ARNm específicos almacenados en la semilla seca. La germinación se inicia con la toma de agua por la semilla seca, proceso denominado imbibición, y finaliza con la protrusión de la radícula a través de las capas de la cubierta: el endosperma y la testa (Müller

*et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2014) (Figura 2). Un embrión de pocas células en estado quiescente o durmiente rompe la cubierta que lo rodea e inicia un complejo programa de desarrollo para culminar con la formación de una planta adulta. Bajo esta perspectiva, se entiende que este proceso esté altamente regulado por factores internos y ambientales.



**Figura 2. Eventos visibles durante la germinación de las semillas en *A. thaliana*.** Se distinguen las etapas de: la toma de agua, la ruptura de la testa y la ruptura del endosperma. Adaptado de Müller *et al.* (2006).

Las plantas han desarrollado estrategias adaptativas para sobrevivir en un ambiente cambiante. Con la finalidad de asegurar la supervivencia de la especie, en plantas superiores, la formación de las semillas combina el desarrollo del embrión con una serie de procesos fisiológicos y un control por parte de factores hormonales y ambientales. Una estrategia esencial para la supervivencia es el desarrollo de la dormición de las semillas, proceso que permite detener el crecimiento en respuesta a factores tanto endógenos como ambientales. La dormición consiste en la ausencia de la germinación de una semilla intacta y viable para completar el desarrollo del embrión (Nonogaki, 2014). Así, la célula vegetal debe percibir el estímulo y poner en funcionamiento un complejo mecanismo de transmisión de señales hasta el núcleo, para finalmente activar la expresión de genes específicos (Preston *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2012).

Por otro lado, es ampliamente consensuado que la germinación es regulada a nivel transcripcional. Sin embargo, la reciente comparación del transcriptoma y traductoma de semillas de *A. thaliana* durante la imbibición y germinación ha demostrado la ausencia de correlación entre ambos procesos, siendo la regulación de la germinación mayormente a nivel traduccional e implicando el reclutamiento selectivo y dinámico de ARNm específicos, bajo condiciones particulares, hacia los

polisomas (Basbouss-Serhal *et al.*, 2015). De esta manera, los componentes de la maquinaria traduccional, como proteínas ribosomales, son claves en la regulación del proceso de germinación.

## **1.2- Las proteínas ribosomales y su rol en la traducción.**

Los ribosomas son complejos ribonucleoproteicos constituidos por dos subunidades de distinto tamaño y constituyen el 25-30% del total de la masa celular. El complejo ribosomal lleva a cabo la síntesis de proteínas dirigida por los ARNm. Las interacciones específicas entre las proteínas ribosomales y el ARNr con el ARNm, el ARNt y otros cofactores proteicos no ribosomales, permiten que el proceso de iniciación de la síntesis proteica, el ensamblado de aminoácidos y la terminación ocurran apropiadamente en las células (Alberts *et al.*, 2002).

En eucariotas, más de 200 genes codifican para proteínas ribosomales, sin embargo, no todas estas proteínas son incorporadas al ribosoma y esto último se da en numerosos organismos, incluyendo levaduras, animales y plantas (Barakat *et al.*, 2001; Hanson *et al.*, 2004). Esto avala el hecho de que las proteínas ribosomales existen como familias de dos o más miembros, que poseen una similitud a nivel de aminoácidos y nucleótidos de 95-100%. De esta manera, una proteína ribosomal sintetizada a partir de una copia génica de cada familia sería incorporada al ribosoma en ciertos tejidos o condiciones (Schuwirth *et al.*, 2005; Mazahar *et al.*, 2016).

La especie *A. thaliana* posee en su genoma 249 genes que codifican para más de 80 proteínas ribosomales, estos genes existen como familias de dos a siete miembros que pueden expresarse y ser incorporados al ribosoma citosólico bajo diferentes situaciones (Schmid *et al.*, 2005; Byrne, 2009). De esta manera, la heterogeneidad de los ribosomas conferida por las diferentes miembros de cada familia génica permitiría la traducción selectiva de ARNm específicos en diferentes situaciones (Byrne, 2009; Carrol, 2013). En este sentido, la caracterización de plantas de *Arabidopsis* dobles y triples mutantes, así como la complementación observada entre los genes parálogos, demuestra la ausencia parcial y total de redundancia entre los miembros de las familias de proteínas ribosomales, pudiendo así actuar de manera específica en diferentes puntos del desarrollo, en diferentes tejidos o bajo alguna condición de estrés (Briggs *et al.*, 2006; Horiguchi *et al.*, 2012;

Stirnberg *et al.*, 2012). De esta manera, las diferentes isoformas de las proteínas ribosomales contribuirían a la traducción selectiva observada.

Es interesante el hecho que las plantas de *Arabidopsis* mutantes en genes codificantes para proteínas ribosomales exhiben una amplia escala de fenotipos del desarrollo con anomalías extremas como la letalidad del embrión, lo que sugiere que los ribosomas tendrían, también, funciones específicas regulando la expresión de genes involucrados en el desarrollo (Byrne, 2009; Horiguchi *et al.*, 2012). Más aún, se demostró que las proteínas ribosomales controlan programas de desarrollo mediados por auxinas, mediante la regulación de la traducción de los factores de respuesta a auxinas (Rosado *et al.*, 2012). Por otra parte, un gran número de estudios demostraron que la abundancia de un transcripto no necesariamente se correlaciona con su asociación con polisomas y así con el nivel de traducción. Estos estudios mostraron que la traducción de los ARNm es perturbada por una variedad de condiciones ambientales sub-óptimas como: déficit de agua, hipoxia, limitación de sacarosa, salinidad, altas temperaturas, tratamiento con hormonas, elevado cadmio, luz u oscuridad repentina como también mutaciones en genes codificantes para la maquinaria traduccional (Juntawong y Bailey, 2012). Más aún, en plantas de *Arabidopsis* y maíz la exposición a la radiación UV-B provoca un descenso significativo en la síntesis proteica (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010b). De esta manera, un gran número de evidencias conducen a proponer que, dado que la síntesis proteica es un proceso altamente demandante de energía, la modulación de la traducción de ARNm es un mecanismo de conservación de energía ante situaciones de estrés, priorizando la síntesis de ARNm específicos involucrados en las distintas respuestas y adaptación (Juntawong y Bailey, 2012; Carroll, 2013). Así, la traducción selectiva sería posible mediante la alteración de la composición de los ribosomas a través de cambios en la expresión de los miembros génicos de las familias de proteínas ribosomales.

### **1.3- Las proteínas ribosomales RPL10 de *A. thaliana*.**

La proteína ribosomal L10 (RPL10), perteneciente a la subunidad mayor (60S) del ribosoma, es un factor clave en la unión de las subunidades 60S y 40S para formar el ribosoma funcional 80S y fue inicialmente identificada en humanos como un supresor putativo del tumor de Wilms (Eisinger *et al.*, 1997). RPL10 se ha

estudiado en diferentes organismos desde *Archae* y bacterias hasta eucariotas, tales como mamíferos, insectos, levaduras y plantas (Singh *et al.*, 2008).

Una propiedad destacable de esta proteína es su alto grado de conservación de aminoácidos, lo que sugiere propiedades fundamentales y críticas para esta proteína (Hofer *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2008). *A. thaliana* contiene en su genoma 3 genes *RPL10s*: *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C*. Las proteínas RPL10 de *Arabidopsis* exhiben una similitud del 94% al 97%. Además, comparten un alto grado de similitud con sus ortólogos de otros eucariotas, siendo con la de humanos y levaduras del 66,2% y 62%, respectivamente (Figura 4).

```

AtRPL10A MGRRPARCYRQIKGKPYPKSRYCRGVPDPKIRIYDVGMRKRGVDEFPFCVHLVSWEKENV 60
AtRPL10B MGRRPARCYRQIKGKPYPKSRYCRGVPDPKIRIYDVGMRKRGVDEFPYCVHLVSWEKENV 60
AtRPL10C MGRRPARCYRQIKGKPYPKSRYCRGVPDPKIRIYDVGMRKRGVDEFPFCVHLVSWEKENV 60
HsRPL10 MGRRPARCYRYCKNKPYPKSRFCRGVDPKIRIFDLGRKKAKVDEFPPLCGHMVSDEYEYQL 60
ScRPL10 MARRPARCYRYQKNKPYPKSRYNRAVPDSKIRIYDLGKKKATVDEFPPLCVHLVSNELEQL 60
*.*****..*.******:*.***.*****:*.* *:* ***** * *:* ** * :*:.

AtRPL10A SSEALEAARIACNKYMVKSAGKDAFHLRIRVHPPFHVLRINKMLSCAGADRLQTGMRGAFG 120
AtRPL10B SSEALEAARIACNKYMVKSAGKDAFHLRIRVHPPFHVLRINKMLSCAGADRLQTGMRGAFG 120
AtRPL10C SSEALEAARIACNKYMVKSAGKDAFHLRIRVHPPFHVLRINKMLSCAGADRLQTGMRGAFG 120
HsRPL10 SSEALEAARICANKYMVKS CGKDG FHIRVRLHPPFHVIRINKMLSCAGADRLQTGMRGAFG 120
ScRPL10 SSEALEAARICANKYMTTVSGRDAFHLRVRVHPPFHVLRINKMLSCAGADRLQQGMRGAWG 120
*****..*.*.*. .*:*.***:*:*:*****:***** ***** *

AtRPL10A KALGTCARVAIGQVLLSVRCKDAHGHHAEALRRAKFKFPGRQKIIVSRKWGFTKFNRAE 180
AtRPL10B KALGTCARVAIGQVLLSVRCKDAHGHHAEALRRAKFKFPGRQKIIVSRKWGFTKFNRAE 180
AtRPL10C KALGTCARVAIGQVLLSVRCKDNHG VHAQEALRRAKFKFPGRQKIIVSRKWGFTKFNRAE 180
HsRPL10 KPQGTVARVHIGQVIMSIRT KLQNKHEVIEALRRAKFKFPGRQKIHSKKGWFTKFNRAE 180
ScRPL10 KPHGLAARVDIGQIIFSVRTKDSNKDVVVEGLRRARYKFPGQQKIILSKKGWFTNLD RPE 180
*..*..***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:

AtRPL10A FTKLRQEKRVVDPDGVNAKFLSCHGPLANRQPGSAFLPAHY- 220
AtRPL10B YTKLRQEKRIVPDGVNAKFLSCHGPLANRQPGSAFLSAGA Q 221
AtRPL10C YTKLRAMKRIVPDGVNAKFLSNHGPLANRQPGSAFISATSE 221
HsRPL10 FEDMVAEKRLIPDGC GVKYIPSRGPLDKWR---ALHS--- 214
ScRPL10 YLKKREAGEVKDDGAFVKFLSKKGSLENNIREFPPEYFAAQA 221
.....**.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....

```

**Figura 4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas RPL10s de *A. thaliana*, *H. sapiens* y *S. cerevisiae*.** Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal Omega. Los apareamientos perfectos están representados por un asterisco (\*), una alta similitud entre los aminoácidos por dos puntos (:), y una baja similitud por un punto (.).

Es interesante el hecho de que la expresión de los genes *RPL10* es regulada diferencialmente por la radiación ultravioleta B (UV-B): *RPL10B* disminuye, *RPL10C* aumenta y *RPL10A* no es regulado por el UV-B. Además, el análisis de las plantas mutantes simples en los genes *RPL10* reveló que los mismos no son

funcionalmente equivalentes (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010a). Por un lado, las plantas mutantes *rpl10A* homocigotas no son viables, indicando que RPL10A es esencial para la viabilidad. Las plantas mutantes *rpl10B* homocigotas con niveles disminuidos de *RPL10B* exhiben un crecimiento y desarrollo anormal tanto en su etapa vegetativa como reproductiva, indicando que RPL10B tiene una participación específica y esencial en el crecimiento de la planta. Finalmente, plantas mutantes *rpl10C* homocigotas no presentan diferencias fenotípicas, en comparación con las plantas salvajes, bajo condiciones normales de crecimiento.

Además de ser un componente de los ribosomas y participar en la traducción, se han descrito funciones extra-ribosomales para la proteína RPL10 (Chávez-Ríos *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2008). Diversos estudios demostraron que RPL10 es una proteína bifuncional, además de ser un componente de los ribosomas y participar en la traducción, posee funciones extra-ribosomales tales como la regulación de la expresión génica y en las respuestas frente a diferentes tipos de estrés. En este sentido, mediante estudios de traducción *in vivo*, se demostró que en las plantas salvajes de *A. thaliana* ocurre un descenso significativo en la síntesis de proteínas luego de la exposición UV-B, en concordancia a lo anteriormente observado en plantas de maíz (Casati y Walbot, 2004). Las plantas mutantes en *RPL10B* y *RPL10C* no muestran diferencias en la traducción en comparación con las plantas salvajes. Por el contrario, las plantas mutantes *rpl10A* heterocigotas presentan una reducción significativa en la síntesis proteica en comparación con las plantas salvajes luego del tratamiento con UV-B, indicando que la expresión constitutiva de este gen sería necesaria para responder rápidamente a los efectos de la radiación UV-B en la traducción (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010b). Se observó que, en condiciones controles, las 3 proteínas se localizan tanto en el citosol como en el núcleo en similares proporciones, sugiriendo roles extra-ribosomales. Sin embargo, luego de la exposición a la radiación UV-B, RPL10B incrementa su proporción en el núcleo, indicando que la misma tendría un rol diferente a las otras isoformas. Las plantas mutantes *rpl10B* muestran cambios diferenciales en un gran número de proteínas involucradas en la respuesta al estrés, principalmente al estrés biótico, sugiriendo que esta isoforma tendría un rol en las respuestas a patógenos, pudiendo ser estas respuestas comunes a las respuestas al UV-B como así también a diferentes tipos de estrés. Sormani *et al.* (2011) propusieron un modelo de biogénesis del ribosoma por 3 vías transcripcionales, donde una de las vías



involucra una disminución en la expresión de genes codificantes para proteínas ribosomales bajo condiciones de estrés. Este mecanismo resulta en una disminución de la traducción general o reducción en la traducción de ARNm específicos. En base a este modelo, se propone que RPL10C contribuye con RPL10A a la traducción general luego del estrés por UV-B. La disminución en la expresión de *RPL10B* y su mayor acumulación en el núcleo podría disminuir la heterogeneidad de los ribosomas citosólicos, de manera tal que, solo ARNm específicos y necesarios sean traducidos, evitando un excesivo consumo de energía. Así, alternativamente o adicionalmente, RPL10B podría tener roles específicos extra-ribosomales en el núcleo frente al estrés por la radiación UV-B.

No obstante, a pesar de las evidencias descriptas, el conocimiento de las funciones extra-ribosomales para las proteínas RPL10 continúa siendo escaso en plantas, sin ser esclarecido si la misma proteína desempeña una función adicional en situaciones específicas o bien si distintas isoformas de RPL10 desempeñan diferentes funciones, bajo distintas situaciones, en diversos procesos como en la señalización hormonal o durante el desarrollo de la planta.

#### **1.4- Las fitohormonas como reguladores de la dormición y la germinación en las semillas.**

Las hormonas vegetales tienen un papel fundamental en la regulación de las diferentes etapas a lo largo de la vida de una planta. La germinación depende del balance de vías hormonales asociadas con reguladores negativos, como el ácido abscísico (ABA), y positivos, como las giberelinas (GAs) y el etileno, de dicho proceso (Preston *et al.*, 2009; Bentsink *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Finkelstein, 2013). El ABA y las giberelinas juegan un rol antagónico en la adquisición y el mantenimiento de la dormición (Graeber *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Mientras que la biosíntesis de ABA y la degradación de GAs favorecen la adquisición y el mantenimiento del estado durmiente de las semillas, la acumulación de GAs promueve la germinación (Graeber *et al.*, 2012). La biosíntesis de estas hormonas, así como la sensibilidad de las semillas a estas fitohormonas y las rutas de transducción de señales de las mismas, están interconectadas y a su vez interaccionan con otras hormonas y factores ambientales y endógenos, de manera que el equilibrio entre la acción de ambas hormonas tiene un papel esencial en la

regulación de la germinación y la dormición (Finkelstein *et al.*, 2008; Graeber *et al.*, 2012; Rajjou *et al.*, 2012).

#### **1.4.1- El Ácido abscísico (ABA).**

El ABA fue identificado en la década de los 60 como una molécula acumulada en el fruto del algodón y, un tiempo después, fue descrita en las hojas del árbol del Sicomoro, donde esta sustancia se inducía por el fotoperiodo (Finkelstein *et al.*, 2008). A pesar de haber sido asociado con la abscisión del fruto y considerado históricamente como un inhibidor del crecimiento, hoy se sabe que el ABA participa en la senescencia del fruto, no en su abscisión.

Los roles principales del ABA son promover la senescencia e intervenir en las respuestas a distintos tipos de estrés (bióticos y abióticos), procesos precedentes a la abscisión (Finkelstein, 2013). El estrés producido por la sequía, la alta salinidad del suelo y las bajas temperaturas, que lleva a la disminución de la disponibilidad del agua, también llamado estrés osmótico, promueven la síntesis del ABA (Cutler *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2016). Este aumento en los niveles de ABA estimula el cierre estomático, induce cambios en la expresión génica y promueve respuestas fisiológicas adaptativas (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Cutler *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2014). El ABA también juega un importante rol en diversos procesos celulares de desarrollo y crecimiento esenciales para la vida de la planta, como la dormición de las semillas, la germinación, el crecimiento vegetativo (Finkelstein *et al.*, 2008; Miransari y Smith, 2014; Sah *et al.*, 2016) y la modulación de la arquitectura radicular (Harris, 2015; Puertolas *et al.*, 2015), la cual está directamente afectada y moldeada por las condiciones ambientales que la rodean durante su desarrollo y vida (Zolla *et al.*, 2010; Goh *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2014).

La concentración del ABA en la planta varía en momentos concretos del desarrollo como la maduración de la semilla o en respuesta a diferentes tipos de estrés. Su concentración endógena determina la división de sus funciones en aquellas que suceden rutinariamente e implican cambios en la actividad de canales de iones (por ejemplo, canales KAT), como los implicados en el control diario del cierre de los estomas (respuesta rápida), y en aquellas que ocurren asociadas a un importante aumento en la concentración de ABA endógeno e implican, además, cambios en la expresión génica de factores de transcripción (como por ejemplo el ABI5) que regulan procesos como la maduración de las semillas, la latencia de

yemas o la resistencia a sequía (respuesta lenta) (Hubbard *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010). Ambas respuestas poseen en común una serie de factores que componen la cadena de señalización del ABA (Hubbard *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010; Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Yang *et al.*, 2017). La familia de proteínas PYR/PYL1/RCAR (*Pyrabactin Resistance1/PYR-Like1/Regulatory Component of ABA Receptor*) constituye un grupo de receptores solubles de ABA que median la respuesta a esta hormona, interaccionando con miembros de la familia de fosfatasa de tipo 2C, PP2C (*Protein Phosphatase 2C*), antagonizando su acción (Park *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2010; Graeber *et al.*, 2012). Esta familia de genes *PP2C* actúan como reguladores negativos de las respuestas inducidas por ABA (Kucera *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2010). En ausencia de ABA, las fosfatasa 2C actúan sobre determinadas quinasas de tipo SnRK2 (*SNF1-Related Protein Kinase 2*), inhibiendo su actividad. Sin embargo, en presencia de ABA, los receptores PYR/PYL1/RCAR forman un complejo tripartito con la hormona y con PP2C, lo que impide la unión de estas fosfatasa con el sustrato, SnRK2, eliminando la inhibición mediada por PP2C. En esas condiciones, las quinasas SnRK2 son capaces de activar la expresión de genes que poseen secuencias ABRE (*ABA-Responsive Element*) en sus regiones promotoras (Nakashima *et al.* 2009) y que median las respuestas celulares dependientes de ABA. Dicha expresión es regulada por factores de transcripción que poseen dominios de unión a los sitios ABRE, AREB (*ABA-Binding Responsive Elements*) o ABFs (*ABRE-Binding Factors*), como ABI5 (Hubbard *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010; Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Yang *et al.*, 2017) (Figura 3).

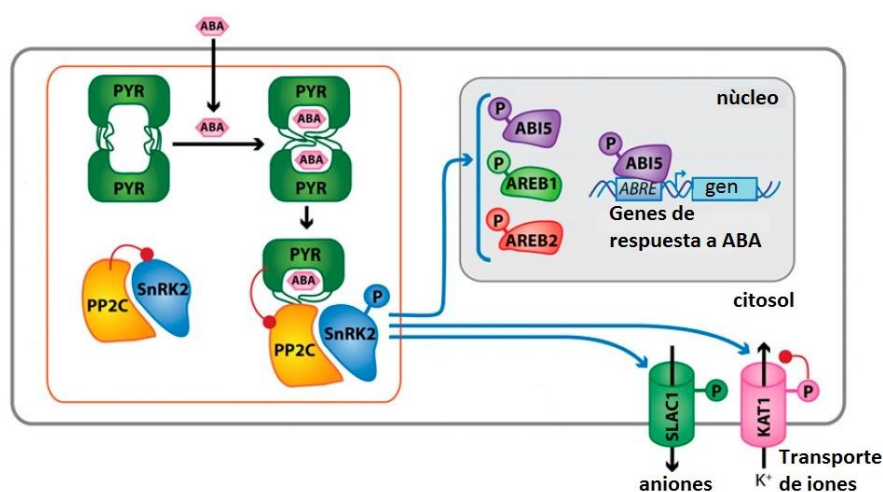


Figura 3. Modelo esquemático que representa la vía de señalización del ABA. Se

muestra la respuesta rápida (a nivel de los canales de iones en las membranas) y la respuesta lenta (a nivel de la expresión génica en el núcleo). Adaptado de Hubbard *et al.* (2010).

En *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que las proteínas ribosomales, además de participar en la traducción, participan en vías de señalización de distintas hormonas (Hoth *et al.*, 2002; Rosado *et al.*, 2012). De esta manera, y dado que el ABA tiene roles críticos en la respuesta a varios tipos de estrés, por ejemplo, al estrés osmótico debido al déficit hídrico o a la alta salinidad del suelo, el estudio de la participación de las proteínas ribosomales RPL10 de *Arabidopsis* en la vía de señalización del ABA permitirá generar nuevos conocimientos sobre los mecanismos de acción de esta fitohormona y brindar herramientas de relevancia biotecnológica para lograr el desarrollo de especies vegetales más tolerantes a los desafíos ambientales.

### **1.5- La radiación ultravioleta-B (UV-B) y sus efectos en las plantas.**

La absorción de la radiación solar es fundamental para las plantas, tanto como fuente de energía así como señal ambiental para la regulación del crecimiento y del desarrollo. Un 7% de la radiación electromagnética emitida por el sol corresponde a la radiación ultravioleta (UV) (Britt, 1999), la cual se divide en: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (200-280 nm). La radiación UV-A es poco absorbida por el ozono, por lo que llega en mayor cantidad a la superficie de la Tierra, constituye una importante señal fotomorfogénica en las plantas y es la menos dañina. Por el contrario, la radiación UV-C es la más energética y letal; es completamente absorbida por el oxígeno y el ozono de la estratosfera, por lo que no llega a la superficie terrestre, reduciéndose así su importancia biológica. Altas intensidades de radiación y cambios en la composición espectral pueden afectar importantes procesos en los organismos.

La disminución de la capa de ozono producida por el uso de clorofluorocarbonos y otros contaminantes, ha causado un aumento en los niveles de la radiación UV-B que llega a la superficie terrestre (Ballaré *et al.*, 2011; McKenzie *et al.*, 2011). Si bien la radiación UV-B comprende una pequeña región del espectro electromagnético, su acción sobre la biósfera es considerable (Blaustein, 2013; Li *et al.*, 2013).

El incremento en la radiación UV-B puede causar graves daños en los organismos vivos, siendo las plantas particularmente sensibles ya que se encuentran inevitablemente expuestas a esta radiación, dada su naturaleza sésil y su necesidad de realizar fotosíntesis (Ballaré *et al.*, 2011). La elevada radiación UV-B tiene efectos pleiotrópicos en el desarrollo y la fisiología de las plantas. En general, los efectos varían de acuerdo a las dosis de radiación.

Numerosos son los efectos atribuibles a esta radiación, varios estudios han demostrado que el incremento en la radiación UV-B afecta significativamente los procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de diversas especies vegetales (Caldwell *et al.*, 2007; Hectors *et al.*, 2007). Los efectos morfológicos de la radiación UV-B incluyen: la reducción en la altura de la planta, la reducción del área foliar e inhibición de la elongación del hipocótilo (Reddy *et al.*, 2013; Fina *et al.*, 2017), el aumento de ramificaciones (Li *et al.*, 2013), clorosis en las hojas y necrosis tisular (Reddy *et al.*, 2013) y retraso en la floración (Wang *et al.*, 2012). Los efectos fisiológicos causados por la radiación UV-B incluyen: la reducción en la actividad fotosintética, principalmente debido a la degradación de proteínas del centro de reacción del fotosistema II, como D1 y D2, la alteración de las membranas tilacoidales, la degradación de las clorofilas (a y b) y carotenoides, la reducción de la actividad y cantidad de la enzima Rubisco; y la fotooxidación del ácido indol acético (IAA), resultando en desbalances hormonales que impiden la expansión celular (Surabhi *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013). Entre los efectos bioquímicos, se incluye el daño a las biomoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos y la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs) que oxidan los lípidos, las proteínas, dañan el ADN y producen la peroxidación de los lípidos de las membranas (Casati y Walbot, 2004; Hectors *et al.*, 2007).

Afortunadamente, las plantas han desarrollado mecanismos de tolerancia y adaptación a la radiación UV-B para disminuir sus efectos adversos (Britt, 1999; Waterworth *et al.*, 2002; Casati y Walbot, 2004). Estos mecanismos incluyen tanto de protección como de reparación. El mecanismo de protección más común frente esta radiación potencialmente dañina es la biosíntesis de compuestos que absorben el UV-B. Estos metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos y flavonoides, se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas en respuesta a la radiación UV-B y atenúan la penetración del UV-B solar en las capas celulares

más profundas con poco efecto en la región visible del espectro solar (Brown *et al.*, 2008; Campi *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2013). Además, para reducir el impacto de las EROs generadas, las plantas sintetizan moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico y el  $\alpha$ -tocoferol y enzimas antioxidantes (Kataria *et al.*, 2014).

El ADN es una de las principales moléculas afectadas por la radiación UV-B debido a su espectro de absorción (Britt, 1999). Los mecanismos de reparación de las lesiones en el ADN son importantes para mantener la integridad del ADN y proporcionar estabilidad genética, siendo las enzimas fotoliasas capaces de revertir en luz las lesiones inducidas por la radiación UV-B. Además, el remodelado de la cromatina y en particular, la acetilación de las histonas, constituyen importantes mecanismos epigenéticos inducidos por el UV-B que participan en la reparación del daño en el ADN (Campi *et al.*, 2012; Lario *et al.*, 2013; Falcone Ferreyra *et al.*, 2016; Fina *et al.*, 2017).

En síntesis, elevadas dosis de radiación UV-B afectan el desarrollo, la morfología y la fisiología de las plantas; y todos estos efectos dan origen a una reducción en la biomasa y una disminución en los rendimientos de los cultivos.

### **1.5.1. Percepción de la radiación UV-B por las plantas.**

Para una óptima adaptación a la luz solar, las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución una variedad de fotorreceptores. El rango de luz azul y rojo/rojo lejano del espectro de luz visible es monitoreado por los criptocromos, fototropinas y fitocromos, respectivamente (Chen *et al.*, 2004). Sin embargo, los mecanismos de fotorrecepción de la radiación UV-B permanecieron desconocidos por un largo tiempo. Probablemente la causa de esto sea la complejidad de los procesos de señalización del UV-B. A diferencia de lo que sucede en los animales, para los cuales el UV-B sólo es una fuente de daño, tal como se mencionó anteriormente, en las plantas el UV-B puede causar daño e incluso provocar necrosis, pero también es una señal fundamental para la inducción de la fotomorfogénesis (Brown y Jenkins, 2008).

Las altas dosis de UV-B no actúan mediante receptores celulares específicos y los efectos nocivos de esta radiación estimulan las repuestas generales del estrés (Frohnmeier y Staiger, 2003). Sin embargo, numerosos estudios han mostrado que las respuestas a bajas dosis de UV-B no parecen tener relación con las vías de

señalización de daño y estrés y han proporcionado evidencias de la existencia de una vía específica que media las repuestas a bajos niveles de UV-B en *A. thaliana* (Oravecz *et al.*, 2006). Progresos genéticos recientes revelaron algunas proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica y en las respuestas fisiológicas a bajas dosis de UV-B. Los componentes claves son: la proteína UVR8 (*UV Resistance Locus 8*), la ubiquitina ligasa E3 COP1 (*Constitutively Photomorphogenic 1*) y el factor de transcripción HY5 (*Elongated Hypocotyl 5*). Las plantas con mutaciones de pérdida de función de UVR8, COP1 o HY5 muestran una mayor sensibilidad a la radiación UV-B (Favory *et al.*, 2009; Heijde y Ulm, 2013). Recientemente, se demostró que UVR8 es el fotoreceptor específico del UV-B (Rizzini *et al.*, 2011; Hofmann, 2012). La proteína UVR8 se encuentra ampliamente distribuida y conservada en plantas (Rizzini *et al.*, 2011). Las respuestas reguladas por UVR8 en general son respuestas fotomorfogénicas y de aclimatación, las cuales suelen inducirse luego de la exposición a dosis crónicas de baja intensidad de UV-B (Favory *et al.*, 2009; Heijde y Ulm, 2013; Davey *et al.*, 2012). Por otra parte, diversas respuestas inducidas por altas dosis de UV-B son independientes del fotoreceptor UVR8. Así, otras vías pueden ser activadas por los efectos nocivos de la alta energía de esta radiación y esté posiblemente vinculada a la transducción de señales de daño y estrés (Frohnmeyer y Staiger, 2003; Casati y Walbot, 2004).

### **1.5.2- Cambios en la expresión génica inducidos por la radiación UV-B.**

Estudios de microarreglos han permitido el análisis a gran escala de los cambios globales inducidos por la radiación UV-B en los patrones de expresión génica. Estudios realizados en plantas de maíz (*Zea mays*) demostraron que la expresión de una amplia variedad de genes se modifica frente a la radiación UV-B. El grupo funcional con el mayor número de genes regulados por la radiación UV-B corresponde a proteínas involucradas en la traducción (Casati y Walbot, 2004).

La radiación UV-B provoca daños en los ribosomas mediante la formación de enlaces cruzados en el ARN ribosomal o entre el ARNm, ARNt o ARNr y proteínas, disminuyendo así la traducción (Casati y Walbot, 2004). Como consecuencia, el aumento de la síntesis de proteínas ribosomales y de factores de traducción es importante para el mantenimiento de esta función celular vital. Se observan también incrementos en los niveles de transcritos de varios factores de transcripción, de

componentes de vías de transducción de señales y respuestas antioxidantes y de una amplia variedad de genes involucrados en diferentes procesos celulares. Más aún, diversos estudios realizados en plantas de *A. thaliana* mostraron que la radiación UV-B induce la expresión de diversos genes que codifican a enzimas que participan en la síntesis de compuestos fotoprotectores (Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

Por otra parte, diversos estudios de microarreglos en plantas de maíz y *Arabidopsis* mostraron que entre los genes que aumentan su expresión por el UV-B se encuentran genes que codifican para proteínas involucradas en el remodelado de la cromatina (Casati *et al.*, 2006). Más aún, se reportó que las plantas mutantes en las diversas proteínas que participan el remodelado de la cromatina acumulan mayores niveles de daño en el ADN luego de la exposición al UV-B, demostrando la importancia del remodelado de la cromatina en las respuestas al daño al ADN inducido por la radiación UV-B (Campi *et al.*, 2012; Lario *et al.*, 2013).

Las evidencias descritas sugieren que la exposición al UV-B solar exige un reajuste de la transcripción con la finalidad de mantener la homeostasis fisiológica y minimizar los impactos inhibitorios de la radiación UV-B en la tasa de crecimiento (Ballaré *et al.*, 2011).

#### **1.6- El factor de transcripción LIMYB de *A. thaliana*.**

Los factores de transcripción (FT) se clasifican en familias según la estructura del dominio de unión al ADN, tales como los factores con: dedos de zinc, hélice-giro-hélice y hélice-bucle-hélice, entre otros (Arratia y Aguirre, 2013). Dentro de la familia de FT con hélice-giro-hélice, se encuentran los FT del tipo MYB. El primer gen *MYB* identificado fue el oncogen *V-MYB* del virus del mieloblastoma aviar. Desde entonces, se han identificado diversas proteínas con dominios MYB en protozoarios, hongos, plantas y animales (Du, 2009; Meneses, 2010). Un dominio MYB consiste en regiones de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, que son capaces de formar tres hélices alfa cada una y, así, unirse al ADN. Los factores MYB se dividen en diferentes clases según el número de repeticiones adyacentes que poseen, una, dos, tres o cuatro, designadas como: 1R-MYB o MYB-relacionado; R2R3-MYB; R1R2R3-MYB o 3R-MYB y 4R-MYB. En plantas se encuentran presentes las 4 clases de factores MYB, no obstante, en *Arabidopsis* y en un gran número de



especies vegetales, el grupo más abundante es el que contiene dos repeticiones (R2R3-MYB) (Dubos *et al.*, 2010). Además, cada una de estas secuencias repetidas imperfectas contiene tres residuos hidrofóbicos espaciados regularmente, los cuales les confieren estabilidad en la unión al ADN (Arratia y Aguirre, 2013). Estos TF están involucrados en un enorme número de procesos metabólicos en las plantas, tanto en el desarrollo como en las respuestas a diferentes tipos de estrés (Dubos *et al.*, 2010).

Debido a que las plantas están inevitablemente expuestas a condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico, las mismas necesitan desarrollar estrategias que les permitan adaptarse a un ambiente continuamente cambiante (Suzuki *et al.*, 2016; Zandalinas *et al.*, 2017; Coffey *et al.*, 2017). Recientemente, se propuso en plantas de *Arabidopsis* un mecanismo de respuesta a la infección por Begomovirus que involucra a la proteína ribosomal RPL10A y a un factor de transcripción del tipo R2R3-MYB, denominado LIMYB (*L10-interacting MYB domain-containing protein*). La vía de señalización de defensa de *Arabidopsis* frente a la infección viral ha sido ampliamente estudiada, demostrando que la proteína ribosomal RPL10A es fosforilada en el citosol por el receptor quinasa NIK1, redireccionando la proteína al núcleo, donde interacciona con el factor de transcripción LIMYB. Luego, ambas proteínas actúan como represores transcripcionales de genes de la maquinaria traduccional, lo que conlleva a la disminución de la traducción citosólica global en el huésped, evitando así la proliferación viral (Carvalho *et al.*, 2008; Zorzatto *et al.*, 2015). Así, las plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan LIMYB muestran menor expresión de genes codificantes a proteínas ribosomales, una disminución en la síntesis proteica, reducida asociación del ARNm viral con los polisomas, y por ende, mayor tolerancia a la infección de Begomovirus. Por el contrario, plantas mutantes *limyb* muestran mayor expresión de genes codificantes para la maquinaria traduccional e incrementada susceptibilidad viral.

Los antecedentes descriptos, plantean como interrogante si el factor de transcripción LIMYB podría participar, junto con las proteínas ribosomales RPL10 o independientemente de ellas, en las respuestas a la radiación UV-B.

Teniendo en consideración las evidencias mencionadas, se postula la siguiente **hipótesis de trabajo**: Las proteínas ribosomales RPL10 desempeñan roles preponderantes en el desarrollo de las plantas de *Arabidopsis thaliana* así como también en la señalización hormonal. Se postula además que la sobre-expresión del factor de transcripción LIMYB o la ausencia del mismo tiene un efecto en la tolerancia de las plantas de *A. thaliana* a la exposición a la radiación UV-B.

## 2- OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

El **objetivo general** de este trabajo de tesina es profundizar en el estudio de los roles de las proteínas ribosomales RPL10 en el desarrollo y en las vías de señalización hormonal y estudiar la participación del factor de transcripción LIMYB en los mecanismos de respuesta frente a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la participación de las proteínas ribosomales RPL10A, RPL10B y RPL10C de *Arabidopsis thaliana* en la germinación y en el desarrollo post-germinativo.
- Evaluar la participación de las proteínas ribosomales RPL10A, RPL10B y RPL10C en la vía de señalización del ácido abscísico (ABA) durante la germinación y crecimiento post-germinativo en plantas de *A. thaliana*.
- Investigar la contribución del factor de transcripción LIMYB, que interacciona con RPL10A para regular la expresión de genes, en las respuestas a la radiación UV-B.

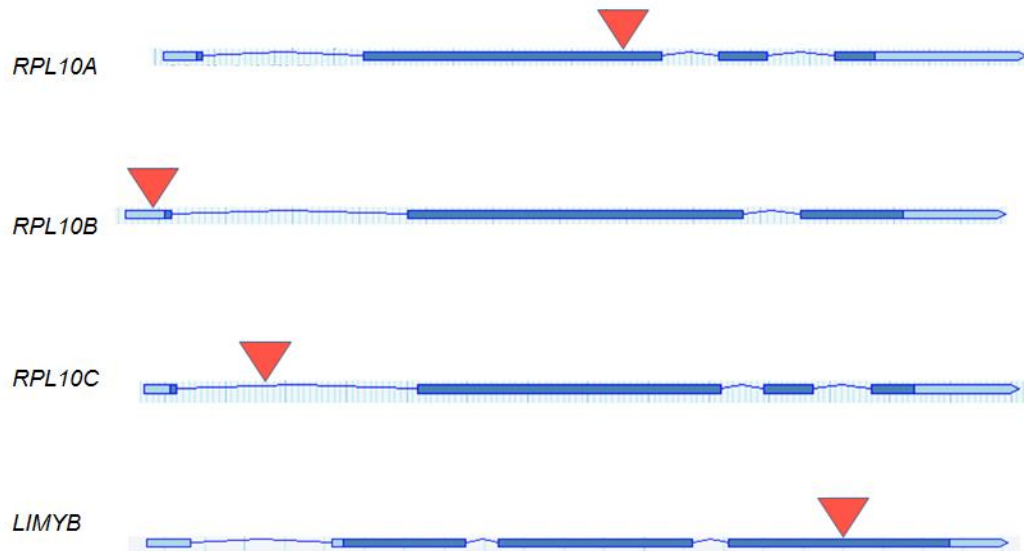
### 3- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1- Material vegetal.

En la presente tesina se trabajó con diversas líneas de plantas de la especie *Arabidopsis thaliana*.

- Línea salvaje ecotipo Columbia 0 (Col-0).
- Líneas mutantes en cada gen *RPL10* por inserción de ADN-T (Figura 5): Una línea mutante *rpl10A* heterocigota con disminución de 5 veces en el nivel del transcripto (SALK\_010170), una línea mutante *rpl10B* homocigota con disminución de 9 veces en el nivel del transcripto (SAIL S500\_01\_06) y una línea mutante *rpl10C* homocigota con ausencia del transcripto (SALK\_140517) (Falcone Ferreyra *et al.* 2010). Las líneas mutantes *rpl10A* y *rpl10C* fueron obtenidas del ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*, Columbus, USA). La línea mutante *rpl10B* fue obtenida de NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*) (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010, 2013).
- Líneas transgénicas con fusión reportera del promotor de *RPL10A-C* al gen que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*Pro<sub>AtRPL10s</sub>:GUS*). Estas líneas fueron generadas previamente en el laboratorio por la transformación de plantas de *A. thaliana* Col-0 salvajes mediante *Agrobacterium tumefaciens* utilizando la técnica de *floral dip* (Falcone Ferreyra *et al.*, 2013).
- Líneas transgénicas de plantas que sobreexpresan el factor de transcripción LIMYB bajo el promotor 35S y una línea mutante *limyb* por inserción de ADN-T (Salk\_032054C) (Figura 5), proporcionadas por la Dra. Elizabeth Fontes (*National Institute of Science and Technology in Plant–Pest Interactions*, Bioagro, Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil) (Zorzatto *et al.*, 2015).

Las plantas transgénicas fueron seleccionadas, previamente a los experimentos, en medio MS (Moorashige & Skoog) suplementado con kanamicina o con higromicina, antibióticos que permiten que sólo crezcan aquellas plantas que posean la resistencia, la cual se incorpora junto con el transgen.



**Figura 5. Representación de los genes *RPL10A-C* y *LIMYB* con la inserción de ADN-T.** Los rectángulos representan a los exones, en celeste se representan las regiones 5'UTR (izquierda) y 3'UTR (derecha) y en azul se representan las regiones codificantes. Las líneas azules indican a los intrones. El triángulo rojo representa al inserto de ADN-T.

### **3.2- Ensayos de germinación, crecimiento de la raíz primaria y tratamientos con ácido abscísico (ABA).**

Las semillas fueron esterilizadas y sembradas en placas conteniendo medio MS suplementado con agar 0,7 % (p/v), incubadas durante 72 horas (hs) a 4°C en oscuridad. Esta etapa de estratificación elimina la dormición de las semillas de *Arabidopsis thaliana*. Luego, las placas se transfirieron a la cámara de cultivo bajo luz blanca en posición horizontal, en condiciones de fotoperiodo, temperatura y humedad controladas ( $100\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 23°C y fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad). Para los ensayos de germinación en presencia de ABA, se agregó dicha hormona al medio de cultivo a una concentración 1  $\mu\text{M}$ . Los ensayos fueron repetidos tres veces para cada condición (presencia y ausencia de ácido abscísico). En cada experimento se sembraron 100 semillas de cada genotipo (50 por placa). Cada semilla fue registrada en un seguimiento individual, utilizando lupa binocular para identificar su estadio en el desarrollo a las distintas horas. Se registraron los siguientes estadios: ruptura de la testa, protrusión de la radícula, desarrollo de cotiledones verdes completamente expandidos y formación de plántula verde con presencia de las dos primeras hojas.

Para cada genotipo, se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas a lo largo del tiempo. Cada semilla se consideró germinada cuando la punta de la radícula perforó completamente la cubierta de la semilla (protrusión de la radícula). Posteriormente, se determinó el porcentaje de formación de cotiledones verdes completamente expandidos y de plántulas verdes.

Para los análisis del crecimiento de la raíz primaria, las semillas salvajes Col-0 y mutantes en los genes *RPL10A-B-C* se sembraron en placas conteniendo MS-agar y se incubaron durante 72 hs a 4°C en oscuridad. Luego, las placas se transfirieron a la cámara de cultivo y se incubaron en las condiciones anteriormente descritas, excepto que se colocaron en posición vertical para promover la elongación de la raíz primaria. Desde el día 4 al día 9, se registró el crecimiento de la raíz primaria realizando una marca en la posición correspondiente a la punta de cada raíz. Luego, se tomaron fotografías a cada placa con la finalidad de evaluar el crecimiento de la raíz primaria utilizando el programa ImageJ. Los ensayos fueron repetidos 3 veces en idénticas condiciones.

Para los ensayos de inhibición de la elongación de la raíz primaria por el ABA, las semillas se sembraron en placas conteniendo MS-agar en ausencia de ABA. Luego de 72 hs a 4°C en oscuridad, las placas se transfirieron a la cámara de cultivo y se incubaron en posición vertical en las condiciones descritas anteriormente. A los 5 días, las plántulas se transfirieron a placas conteniendo MS-agar (control) y placas MS-agar con ABA (10 µM) y se continuó el crecimiento de las plántulas en posición vertical en las condiciones anteriormente descritas. Durante los 4 días posteriores, se registró el crecimiento de la raíz primaria realizando una marca en la posición de la punta de cada raíz. Finalizado el tratamiento, se tomaron fotos para posteriormente realizar los análisis. Los ensayos fueron repetidos 3 veces en idénticas condiciones y analizados utilizando el programa ImageJ.

### **3.3- Condiciones de crecimiento para los tratamientos con radiación UV-B.**

Para los tratamientos con radiación UV-B, las semillas salvajes Col-0, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB fueron sembradas en recipientes individuales, conteniendo tierra humedecida y esterilizada previamente. Los recipientes se colocaron en bandejas las cuales se cubrieron con film y se incubaron 72 hs a 4°C en oscuridad (estratificación). Luego, las bandejas se transfirieron a la cámara de cultivo bajo luz blanca en ausencia de radiación UV-B, en condiciones de

fotoperiodo, temperatura y humedad controladas ( $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $23^{\circ}\text{C}$  y fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad). Las plantas se crecieron en cámara de cultivo durante tres semanas.

### **3.4- Tratamiento con radiación UV-B.**

Para el tratamiento de las plantas con radiación UV-B, se emplearon lámparas que emiten dicha radiación (F40UVB 40 W y TL 20 W/12, Philips, Eindhoven, Holanda) a una irradiancia de  $2,0 \text{ W m}^{-2}$  UV-B,  $0,6 \text{ W m}^{-2}$  UV-A y el tratamiento se realizó durante 4 horas. Para los controles correspondientes al tratamiento en ausencia de UV-B se utilizaron filtros de poliéster (plástico de poliéster claro de  $100 \mu\text{m}$ ), el cual absorbe la radiación UV-B sin disminuir significativamente las radiaciones UV-A o visible ( $0,05 \text{ W m}^{-2}$  UV-B,  $0,5 \text{ W m}^{-2}$  UV-A). Tanto en la condición de exposición al UV-B como en los controles, se utilizaron filtros de acetato de celulosa para eliminar la radiación UV-C. En ambos casos, las lámparas se colocaron por encima de las plantas. La radiación suministrada en cada uno de los tratamientos en todos los experimentos fue registrada usando un detector de radiación UV-A y UV-B (Ultraviolet Radiometer Modelo UV203, MacamPhotometrics Ltd., Livingston, Escocia), el cual fue calibrado para las diferentes fuentes de luz con un espectrorradiómetro, según las especificaciones del Laboratorio Nacional de Física de Escocia. Las plantas controles fueron expuestas durante el mismo período que las plantas irradiadas con UV-B. Se recolectaron muestras de hojas inmediatamente después del tratamiento, o alternativamente, una vez finalizado el tratamiento con UV-B las plantas se mantuvieron en la cámara de cultivo en presencia de luz visible y en estos casos se recolectaron muestras inmediatamente finalizado el tratamiento y luego de 24, 48 y 72 horas de finalizado el tratamiento. En todos los casos, las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. En la Figura 6 se esquematiza lo descripto.

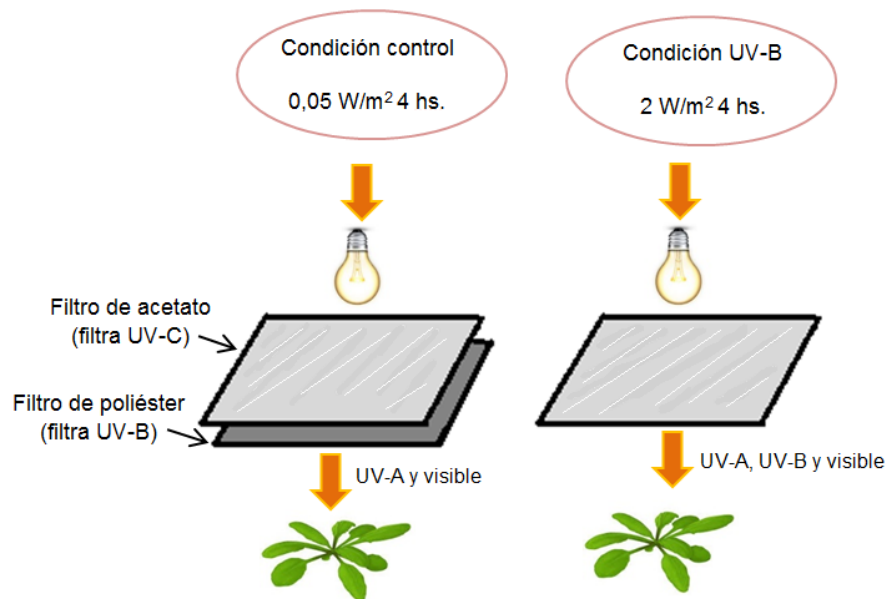


Figura 6. Representación gráfica del tratamiento con radiación UV-B realizado.

### 3.5- Extracción de ADN genómico de plantas de *A. thaliana* (método CTAB).

El material vegetal se maceró en un tubo de microcentrífuga utilizando nitrógeno líquido, luego se agregó 300  $\mu$ L de buffer de extracción CTAB (1,4 M NaCl, 0,2% 2-mercaptoetanol; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 3% (p/v)), hasta lograr la completa disgregación del tejido. Se incubó la mezcla a 60°C durante 30 minutos (min), luego se agregaron 300  $\mu$ L de cloroformo y se centrifugó a 16.000  $xg$  durante 10 min en una microcentrífuga. La fase acuosa (superior) fue transferida a otro tubo al que se le agregó un volumen igual de isopropanol y se precipitó el ADN por al menos una hora a -20°C o alternativamente, durante toda la noche. A continuación, se centrifugó a 16.000  $xg$  (fuerza centrífuga) durante 10 min y el sobrenadante se descartó. El precipitado fue lavado adicionando 1 mL de etanol 70% (v/v). Posteriormente, la solución se centrifugó durante 10 min a 16.000  $xg$  y, nuevamente, se descartó el sobrenadante. El sedimento se secó al vacío y, finalmente, el ADN genómico purificado fue resuspendido en 20  $\mu$ L de agua destilada estéril, mezclando suavemente hasta la resuspensión total. Las muestras se incubaron a 55°C durante 10 min para favorecer la disolución.

### 3.6- Extracción de ARN total.

Se extrajo el ARN total a partir de hojas de plantas de Arabidopsis utilizando el reactivo *Quick-zol* (Kallum Technologies). Se procesaron aproximadamente 100 mg



de tejido por muestra (fresco o almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) en un mortero con  $\text{N}_2$  líquido, hasta la formación de un fino polvo. Se adicionó 1 mL del reactivo evitando que el tejido se descongele, y se continuó con la homogeneización. A continuación, el homogenado fue transferido a un tubo de microcentrífuga y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y la mezcla se invirtió vigorosamente durante 15 segundos (seg). Luego de incubar las muestras 3 min a temperatura ambiente, las mismas fueron centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min a 13.000  $\text{xg}$ . La fase superior obtenida, acuosa e incolora, fue transferida a un nuevo tubo y se procedió a precipitar el ARN, adicionando 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e invirtiendo el tubo con suavidad. Las muestras se incubaron durante al menos 30 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  y luego, fueron centrifugadas a 13.000  $\text{xg}$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante resultante se descartó, y los ARN se lavaron con 1 mL de etanol 75% (v/v), se mezcló y se centrifugó a 13.000  $\text{xg}$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Nuevamente se descartó el sobrenadante y los ARN se secaron al vacío. Finalmente, los ARN se disolvieron en 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril libre de ARNasas (tratada con dietilpirocarbonato, DEPC) y los mismos se incubaron a  $60^{\circ}\text{C}$  para favorecer la disolución. Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La calidad de los ARN total obtenidos fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v). La concentración del ARN de cada muestra se determinaron mediante el sistema Quanti-IT RNA assay kit (Invitrogen).

### **3.7- Tratamiento con ADNasa I y retrotranscripción.**

El tratamiento del ARN obtenido con ADNasa I se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). Se incubaron 2  $\mu\text{g}$  de ARN total con 2 unidades (U) de la enzima RQ1 ADNasa I durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , en el buffer de reacción 1X (suministrado por el fabricante de la enzima). Posteriormente, la enzima se inactivó con el agregado de 1  $\mu\text{L}$  de solución Stop provista por el fabricante, incubando a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

La reacción de síntesis de la primera hebra de ADNc se desarrolló en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Para esto, se incubaron las muestras de ARN tratadas con ADNasa con 1  $\mu\text{g}$  de oligo dT y 0,2mM dNTPs a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se enfrió rápidamente en hielo y se centrifugó brevemente. Luego se añadieron los siguientes componentes a los tubos de reacción: buffer 1X (suministrado por el fabricante de la enzima); 0,1 M DTT, y 100 U de la enzima

transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo incubando las muestras a 42°C durante 2 horas y luego se inactivó la transcriptasa reversa incubando las muestras durante 15 min a 70°C. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

### 3.8- Amplificación de ácidos nucleicos.

#### 3.8.1- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La identificación de las plantas mutantes heterocigotas *rp110A* por inserción del ADN-T se realizó mediante PCR utilizando el ADN genómico como molde y empleando dos combinaciones diferentes de oligonucleótidos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen en estudio (*RPL10A*) que flanquean el sitio de inserción y otro que hibrida en el extremo izquierdo del ADN-T. Las secuencias de los oligonucleótidos empleadas en las reacciones de PCR se especifican en la Tabla I.

**Tabla I.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la identificación de las plantas mutantes heterocigotas en el gen *RPL10A*.

Nombre	Secuencia	Propósito
R-AtRPL10Ag ( <i>RPL10A</i> )	5'TCACCGGAATGAGAAGGA3'	Identificación de plantas mutantes heterocigotas.
L-RPL10A-sc ( <i>RPL10A</i> )	5'TACGATGTTGGTATGAAGAG3'	Identificación de plantas mutantes heterocigotas.
LB-Salk2	5'TGGTTCACGTAGTGGGCCATC G3'	Identificación de plantas mutantes heterocigotas.

Por otra parte, la identificación de las plantas mutantes homocigotas en el gen *LIMYB* por inserción del ADN-T, se realizó mediante PCR utilizando el ADN genómico como molde y empleando dos combinaciones diferentes de oligonucleótidos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen en estudio (*LIMYB*) que flanquean el sitio de inserción y otro que hibrida en el extremo izquierdo del ADN-T. Las secuencias de los oligonucleótidos empleadas en las reacciones de PCR se especifican en la Tabla II.

Además, para determinar la ausencia del transcripto *LIMYB* en las plantas mutantes homocigotas así como también determinar el nivel del transcripto *LIMYB*

en las plantas que sobreexpresan este factor de transcripción, se utilizó ADNc obtenido de muestras de hojas de roseta (14 días) de las plantas mutantes y sobreexpresantes y se emplearon oligonucleótidos específicos para el gen de estudio. Las secuencias de los oligonucleótidos empleadas en las reacciones de PCR se especifican en la Tabla II.

**Tabla II.** Secuencias de los oligonucleótidos empleadas para la determinación de la ausencia del transcrito *LIMYB* y para la identificación de plantas mutantes homocigotas.

Oligonucleótido	Secuencia	Propósito
L-AtLIMYBsc ( <i>LIMYB</i> )	5'AGATGAAGCAGAAACCTC CA3'	Identificación de plantas mutantes en <i>LIMYB</i>
R-AtLIMYBsc ( <i>LIMYB</i> )	5'ACCTCTTCAATTGCGTT GAG3'	Identificación de plantas mutantes en <i>LIMYB</i> . Expresión de <i>LIMYB</i> por PCR y PCR en tiempo real
L-AtLIMYBrt ( <i>LIMYB</i> )	5'AGATGAAGCAGAAACCTC CA3'	Expresión de <i>LIMYB</i> por PCR y PCR en tiempo real
LB-Salk2	5'TGGTTCACGTAGTGGGCC ATCG3'	Identificación de plantas mutantes en <i>LIMYB</i>

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 15  $\mu$ L y las condiciones de reacción fueron las siguientes: Buffer de reacción 1X (proporcionado por el fabricante), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,25  $\mu$ M oligonucleótido reverso y 0,25  $\mu$ M oligonucleótido directo, 0,375 U de enzima taq polimerasa (Promega) y 1 $\mu$ L de ADN genómico o ADNc.

Los protocolos utilizados variaron de acuerdo al molde y al par de cebadores utilizados. El protocolo de amplificación utilizado para la identificación de plantas mutantes *rpl10A* y de plantas mutantes *limyb* consistió en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 38 ciclos de PCR que constaron de tres etapas: 20 seg a 94°C, 25 seg a 51°C y 40 seg a 72°C. Por último, se realizó una etapa de extensión final de 5 min a 72°C. En este protocolo, se utilizó ADN genómico como molde. El protocolo de amplificación utilizado para analizar la expresión de *LIMYB* consistió en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 38 ciclos de PCR que constaron de tres etapas: 15 seg a 94°C, 20

seg a 57°C y 30 seg a 72°C. Por último, se realizó una etapa de extensión final de 5 min a 72°C. En este protocolo de utilización de ADNc como molde.

### 3.8.2- PCR en tiempo real.

Para analizar la expresión de los genes en estudio mediante PCR en tiempo real se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla III), los cuales fueron diseñados de manera tal de que los productos amplificados tuvieran un tamaño entre 150 y 250 pb. Como genes normalizadores se utilizaron los siguientes: a) para ensayar la regulación de la expresión de cada uno de los genes por la radiación UV-B se utilizó un gen que codifica para la proteína quinasa 3 dependiente de  $Ca^{2+}$  (*CPK3*, At4g23650); b) para ensayar la regulación de la expresión de los genes *RPL10A-B-C* por ABA se utilizó el gen que codifica para una proteína componente del citoesqueleto celular (*ACTINA2*, At3g18780); y, c) para analizar el nivel de los transcritos *RPL10A-B-C* en las plantas mutantes y sobreexpresantes de *LIMYB* se utilizó un gen codificante para la proteína de unión al CAP (*CBP20*, At5g44200). Se utilizaron muestras biológicas independientes por triplicado.

**Tabla III.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR en tiempo real.

Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
<i>LIMYB</i>	5'AGATGAAGCAGAAACCTCCA3'	5'ACCTCTTCAATTGCGTTGAG3'
<i>RPL10A</i>	5'TCCTTCTCATTCCGGTGA3'	5'GCCAAGAACGAAGGAACA3'
<i>RPL10B</i>	5'TCCCTGGTCGTCAAAGA3'	5'TGCACCAGCTGACAAGAA3'
<i>RPL10C</i>	5'CTGCAAGGACAACAATGC3'	5'TTTTGGGATCTGGCACAC3'
<i>RPS13A</i>	5'GTGGCTTAAGCTGGAGTCTG3'	5'GATTCTCTTAAACAAGGGAGCA 3'
<i>RPL28e</i>	5'CCAAGTCCGGTGCCAAGCAA3'	5'ACACAAGCACACCAGAAACA3'
<i>RPL4a</i>	5'AGCAGGCAAGTCGTGGTACA3'	5'CCAGACACCCAAAGACAAAA3'
<i>RPS25</i>	5'GCCAGCAGATCTACTCGT3'	5'GAGAGGGAAAAAGCAACTCC3'

<i>RPL13</i>	5'ACCCGTCAAGTACTGAATTC3'	5'ACGAAACGTTTTGGAGGAGG3'
<i>CPK3</i>	5'GTGTGAAGGAGGGGAATTG3'	5'TCACCTGGCTTGAAGAAG3'
<i>Actina2</i>	5'CAGATGCCCGAGAAGTCTTGTTCC 3'	5'AACGACCTTAATCTTCATGCTGCC 3'
<i>CBP20</i>	5'CCGGCCTATTCGTGTGGATTTT GA3'	5'CATAATTCGTTGGCGCAGCTTG AG3'

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador MINIOPTICON2 (Bio-Rad), utilizando el compuesto fluorescente SYBR Green I (Invitrogen) en un volumen de 20  $\mu$ L, y cada muestra se analizó por triplicado. Para la amplificación se utilizaron 1X buffer libre de Mg (proporcionado por el fabricante), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTPs, 0,8 U de enzima Platinum Taq ADN Polimerasa (Invitrogen), 0,5X SYBR green (Invitrogen), 0,25  $\mu$ M oligonucleótido reverso y 0,25  $\mu$ M oligonucleótido directo.

El protocolo de amplificación utilizado consistió en un paso inicial de activación de la ADN polimerasa a 94°C durante 2 min, seguido por 40-45 ciclos de amplificación compuestos por tres etapas: 10 seg a 94°C, 15 seg a 57°C y 20 seg a 72°C. Por último, se realizó una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo al final de la fase de extensión a una temperatura al menos 4°C menor que la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) de los amplicones (76°C aproximadamente). El análisis de la curva de fusión (determinada midiendo el descenso de la fluorescencia con el incremento de la temperatura) luego de 45 ciclos de amplificación permite descartar la presencia de productos espurios, ya que la aparición de un único pico en la curva de fusión corresponde a un solo producto de amplificación.

El valor de Ct, también denominado punto de corte, se define como el ciclo de la reacción de la PCR en el cual se comienza a detectar un incremento significativo de la fluorescencia con respecto a la señal de base. Este valor es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADNc presente en la muestra. Los valores de Ct se determinaron para todas las muestras y se aplicaron a la siguiente fórmula:

Expresión relativa con respecto al gen normalizador =  $2^{-(Ct \text{ gen en estudio} - Ct \text{ gen normalizador})}$

### **3.9- Electroforesis en geles de agarosa.**

El ADN genómico, los productos obtenidos mediante PCR y los ARN fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa de concentraciones variables de entre 1% (p/v) a 2% (p/v), según el tamaño esperado de las muestras o fragmentos a resolver. Para su preparación, la agarosa se disolvió en buffer TBE 0,5X (45 mM Tris-Acetato pH 8,0, 1 mM EDTA, 45 mM de ácido bórico) y a continuación se agregó SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen), compuesto que se asocia a la molécula de ADN y permite su visualización. Las muestras a analizar fueron diluidas en una proporción 1:5 en buffer de siembra 6X (30% (v/v) glicerol; 0,25% (p/v) xilencianol y 0,25% (p/v) azul de bromofenol). En todos los casos, se empleó TBE 0,5X en la preparación de los geles y como buffer de corrida electroforética. Se sembraron marcadores de masa molecular junto con las muestras en estudio para estimar los tamaños moleculares de los fragmentos de interés (correspondientes a las bandas visualizadas). La intensidad de corriente empleada varió entre 50 y 100 V. Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos se visualizaron empleando el digitalizador de imágenes EpiChemi3 de UVP. Las imágenes digitalizadas de los geles de agarosa se muestran como imágenes negativas.

### **3.10- Extracción y cuantificación de las clorofilas a y b.**

Para la extracción de las clorofilas, entre 50 a 100 mg de muestra se homogeneizó con 1 mL de etanol 96% (v/v) y el homogenado se incubó durante 24 horas en oscuridad para permitir la completa extracción de los pigmentos. A continuación, la solución se centrifugó a 16.000 xg durante 5 min y se tomó el sobrenadante obtenido. Posteriormente, las concentraciones de clorofilas (Chl) se determinaron midiendo la absorbancia a 649 y 665 nm y se aplicaron las siguientes fórmulas (Wintermans y De Mots, 1965).

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

$$[\text{Chl b}] (\mu\text{g/mL}) = 21,99 \times \text{Abs}_{649 \text{ nm}} - 5,32 \times \text{Abs}_{665 \text{ nm}}$$

### **3.11- Determinación de la liberación de electrolitos.**

Para la determinación de este parámetro de daño oxidativo en las membranas, se estimó la liberación de electrolitos al medio de incubación. En cada réplica, se utilizaron al menos 6 plantas de *Arabidopsis* de cada genotipo (plantas salvajes, sobreexpresantes y mutantes para el gen *LIMYB*) y para cada condición (expuestas al UV-B y control). Inmediatamente finalizados los tratamientos, se recolectó la hoja número cuatro (#4) de cada planta y luego las mismas fueron colocadas en tubos de microcentrífuga conteniendo 1 mL de agua destilada, se incubó en agitador durante una hora y, posteriormente, se midió la conductividad de la solución utilizando un conductímetro Horiba B-173 (conductividad inicial). A continuación, las muestras fueron expuestas a 120 °C durante 20 min junto con el líquido y, luego de alcanzar la temperatura ambiente, se midió la conductividad resultante de cada muestra (conductividad total). Los datos obtenidos fueron expresados como porcentaje de electrolitos liberados en el tratamiento con respecto al total presente en el tejido (conductividad inicial/conductividad total x 100) (Murphy, 1983).

### **3.12- Preparación de extractos crudos de proteínas.**

Para la obtención de extractos crudos de proteínas totales de hojas de *A. thaliana* se homogeneizó el tejido vegetal (200 mg) en un mortero con N<sub>2</sub> líquido (hasta polvo) y 4-5 volúmenes de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM a pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 20% (v/v) y EDTA 1 mM) suplementado PMSF 1 mM (Fenil metil sulfonil fluoruro: Inhibidor de serin-proteasas). El homogenado se centrifugó durante 15 min a 4°C a 16.000 xg. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

### **3.13- Cuantificación de las proteínas totales.**

Para medir la concentración de proteínas totales se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). La concentración de proteínas de las muestras fue determinada utilizando proteínas de concentración conocida, que exhiben un perfil lineal de absorbancia, como estándar. En este caso se utilizó BSA para realizar la curva de calibración. La absorbancia de las muestras fue medida en un lector de microplacas. Se graficaron los valores de absorbancia a 595 nm en función de la

cantidad de la proteína estándar y a partir de la curva de calibración obtenida se determinó la concentración de proteínas totales en cada muestra (mg/mL).

### **3.14- Detección histoquímica de la actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS).**

Con el objetivo de analizar el patrón de expresión de los tres genes *RPL10* en los diferentes tejidos y estadios de desarrollo temprano en plantas salvajes y mutantes en los genes *RPL10A-B-C*, se utilizaron las líneas de *A. thaliana* transgénicas que poseen la fusión del promotor de cada uno de los genes *RPL10* al gen reportero que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) (*prom<sub>AtRPL10s</sub>:GUS*), anteriormente referidas en la sección 3.1, previamente generadas en el laboratorio (Falcone Ferreyra *et al.*, 2013). La actividad  $\beta$ -glucuronidasa en las plantas transformadas fue ensayada con el sustrato cromogénico 5-bromo, 4-cloro, 3-indol-D-glucorónido (X-Gluc) (Jefferson *et al.*, 1987). Se sembraron semillas de Arabidopsis transgénicas *RPL10A<sub>pro</sub>:GUS*, *RPL10B<sub>pro</sub>:GUS* y *RPL10C<sub>pro</sub>:GUS*, en condiciones control (MS-agar) y, por otra parte, en presencia de ABA (suplementando el MS-agar con ABA 1  $\mu$ M). Luego de la estratificación durante 72 horas, las placas se transfirieron a la cámara de cultivo. Una vez germinadas las semillas, las mismas se recolectaron a distintos tiempos de desarrollo (tanto germinativo como post-germinativo) para su posterior tinción. Además, se realizó la tinción histoquímica en semillas embebidas en agua durante 24 horas, es decir que las mismas no fueron sometidas al tratamiento de estratificación, y, por otro lado, en semillas recolectadas inmediatamente finalizada la estratificación. Los diferentes tejidos recolectados fueron incubados en 90 % (v/v) acetona a 4°C durante 20 min. Para llevar a cabo la tinción, los mismos fueron sumergidos en una solución de tinción (50 mM fosfato de sodio pH 7,2; 0,2 % (v/v) Tritón X-100; 2 mM ferrocianuro de potasio; 10 mM EDTA; 2 mM X-Glu), a 4°C en vacío por un lapso de 7 min, y luego fueron incubados a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron mediante lavados seriados durante 30 min con soluciones acuosas de etanol de concentración creciente (25, 35 y 50% (v/v)), luego con la solución FAA (50% (v/v) de alcohol medicinal, 5% (v/v) de ácido acético, 3,7% (v/v) de formaldehído) y finalmente se almacenaron en 70% (v/v) etanol. Los tejidos fueron observados bajo la lupa y fotografiados.



### 3.15- Análisis estadísticos.

Los resultados presentados en los gráficos representan la media y el error estándar. La comparación estadística se realizó, según correspondiera, mediante el análisis de la variancia (ANOVA), a una o a dos colas, o mediante la prueba T de Student, dado que se comprobó el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de variancias y de normalidad (para este último, test de Shapiro-Wilk). Los análisis de comparaciones múltiples se realizaron con el test de Tukey (con un valor p menor a 0,05). En todos los casos el nivel de confianza fue del 95%.

### 3.16- Diseño experimental.

Los experimentos para estudiar los ítems nombrados a continuación, se realizaron utilizando un diseño completamente aleatorizado (DCA):

- A- Desarrollo germinativo (páginas 35 y 36).
- B- Desarrollo post-germinativo temprano (páginas 37 a 39).
- C- Crecimiento de la raíz primaria (páginas 39 a 41).
- D- Inhibición de la elongación de la raíz primaria (páginas 48 a 50).
- E- Regulación de la expresión de los genes *RPL10A-B-C* por ABA (páginas 53 y 54).
- F- Expresión relativa del gen *LIMYB* y regulación de su expresión por radiación UV-B (páginas 60 a 61 y 62 a 63).
- G- Regulación de la expresión de genes codificantes de proteínas ribosomales (PR) por radiación UV-B y por la presencia o ausencia del gen *LIMYB* (páginas 61 a 62 y 63 a 68).
- H- Contenido de clorofilas (páginas 70 y 71).
- I- Contenido de proteínas totales (páginas 71 a 73).
- J- Porcentaje de liberación de electrolitos (páginas 73 y 74).

En la tabla IV, se presentan detalles sobre el manejo de datos realizado durante el diseño experimental.

**Tabla IV:** Manejo de datos realizado durante el diseño experimental.

Experi- mento	Material vegetal	Unidad experimental	Variable(s) respuesta(s)	Tratamiento	N° de repeticio- nes	Análisis estadístico
A	Semillas dentro de placas de Petri	Placa de Petri conteniendo las semillas	% de semillas germinadas	con ABA; sin ABA	3	T de Student
B	Plántulas dentro de placas de Petri	Placa de Petri conteniendo las plántulas	% de cotiledones expandidos; % de plántulas	con ABA; sin ABA	3	T de Student; ANOVA a dos colas y test de Tukey.
C; D	Raíz primaria de plántulas dentro de placas	Raíz de cada plántula	Longitud de la raíz primaria	con ABA; sin ABA	3	T de Student); ANOVA a dos colas y test de Tukey
E	Bulk de 4 o 5 plántulas salvajes	Bulk de plántulas (transcriptos <i>RPL10</i> )	Expresión relativa de transcriptos <i>RPL10</i>	con ABA; sin ABA	3	T de Student
F	Bulk de hojas de 6 plantas de 3 semanas	Bulk de hojas (transcriptos <i>LIMYB</i> )	Expresión relativa de transcriptos <i>LIMYB</i>	con UV-B; sin UV-B	3	T de Student; ANOVA a una cola y test de Tukey.; ANOVA a dos colas y test de Tukey.
G	Bulk de hojas de 6 plantas de 3 semanas	Bulk de hojas (transcriptos de genes codificantes para PR)	Expresión relativa de transcriptos de genes codificantes para PR	con UV-B; sin UV-B	3	ANOVA a dos colas y test de Tukey
H	Bulk de hojas de 6 plantas de 3 semanas	Bulk de hojas (proteínas totales)	Contenido de proteínas totales	con UV-B; sin UV-B	3	ANOVA a dos colas y test de Tukey
I	Bulk de hojas de 6 plantas de 3 semanas	Bulk de hojas (clorofilas)	Contenido de clorofilas	con UV-B; sin UV-B	3	ANOVA a dos colas y test de Tukey
J	Bulk de hojas de 6 plantas de 3 semanas	Bulk de hojas (electrolitos liberados al medio)	% de liberación de electrolitos liberados	con UV-B; sin UV-B	3	ANOVA a dos colas y test de Tukey

## 4- RESULTADOS

### PARTE I: Estudio de la participación de las proteínas ribosomales RPL10s en el desarrollo y en la señalización del ácido abscísico en *Arabidopsis thaliana*.

#### 4.1- Identificación de plantas de *A. thaliana* mutantes heterocigotas para el gen *RPL10A*.

Para la realización de los experimentos que se describen a continuación, se utilizaron líneas mutantes simples en cada uno de los genes *RPL10* por inserción del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, descritas en la sección Materiales y Métodos.

Las plantas que dieron origen a las semillas de la línea mutante *rp110A* utilizadas presentan la inserción en uno de los dos alelos (heterocigotas para la mutación insercional). Ya que esta especie se reproduce por autofecundación y teniendo en cuenta las leyes de la genética Mendeliana, se espera que el 50% de las semillas producidas sean heterocigotas. Sin embargo, debido a que *RPL10A* es esencial para el desarrollo del gametofito femenino (Imai *et al.*, 2008, Falcone Ferreyra *et al.*, 2010a), la proporción de plantas heterocigotas *rp110A* esperada con respecto a las plantas salvajes es de 2:1.

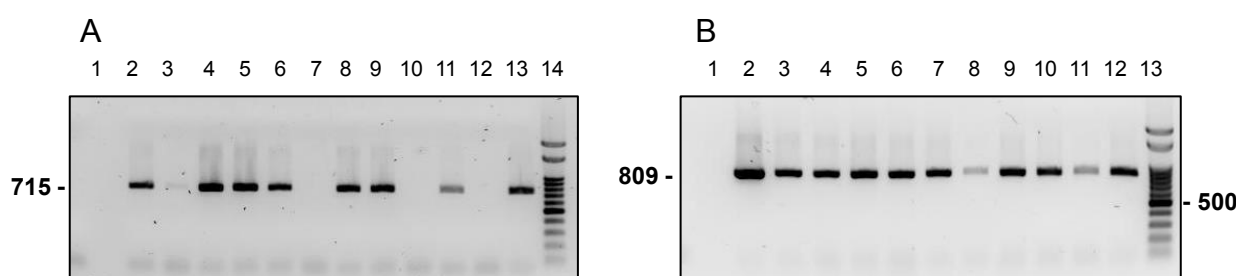
Teniendo en cuenta lo mencionado, y dado que las mutantes homocigotas *rp110A* son letales, se trabajó entonces con plantas mutantes heterocigotas. Debido a ello, al finalizar cada uno de los experimentos que se detallarán a continuación fue necesario realizar la identificación de las plantas que tuvieran la inserción del ADN-T para poder distinguirlas de las plantas salvajes al momento de analizar los resultados y realizar los análisis estadísticos correspondientes. La identificación se realizó mediante PCR utilizando el ADN genómico de cada plántula como molde y empleando dos combinaciones diferentes de oligonucleótidos descritos en la sección Materiales y Métodos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para el gen en estudio (*RPL10A*) y otro que hibrida en el extremo izquierdo del ADN-T (Figura 7) y se realizaron dos tipos de reacciones de PCR con dos propósitos: 1) identificar aquellas plantas que poseían la inserción del ADN-T y, 2) verificar que la ausencia de producto de amplificación con la combinación del oligonucleótido que hibrida en el ADN-T y el oligonucleótido específico para el gen en estudio fuera debido a la ausencia de ADN-T y no a la ausencia de ADN genómico (Figura 8).



**Figura 7. Esquema del gen *RPL10A* con la inserción del ADN-T.** Los rectángulos representan a los exones, en celeste se representan las regiones 5'UTR (izquierda) y 3'UTR (derecha) y en azul se representan las regiones codificantes. Las líneas azules indican a los intrones. El triángulo rojo representa al inserto de ADN-T y las flechas rojas simbolizan a los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR (estos últimos no se encuentran graficados a escala).

Como se observa en la Figura 7, los oligonucleótidos directo (5') y reverso (3') hibridan con secuencias que flanquean al sitio de inserción del ADN-T, mientras que el oligonucleótido BI (LB-Salk2) hibrida con el extremo izquierdo del ADN-T integrado en el gen.

La presencia de producto PCR utilizando las dos combinaciones de oligonucleótidos, indica que las plantas son heterocigotas para el gen *RPL10A* (Figura 8A). Por el contrario, la ausencia de producto de PCR con la combinación de un oligonucleótido específico del gen y uno específico del ADN-T indica que las plantas son salvajes (Figura 8B). Como se observa en la Figura 8, las plantas 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 11 son mutantes heterocigotas para el gen *RPL10A*, mientras que las restantes (3, 7 y 10) no poseen la inserción del ADN-T, y por el ende, son salvajes.



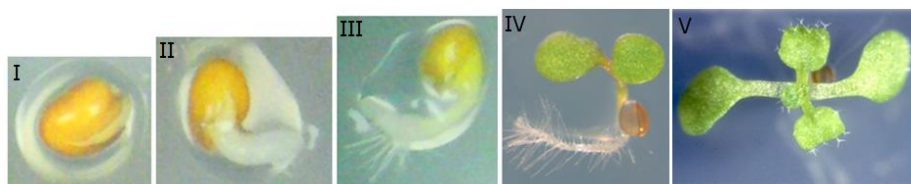
**Figura 8. Identificación de plantas mutantes heterocigotas *rpl10A* por inserción del ADN-T.** Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gels de agarosa 1% (p/v). Se muestra a modo de ejemplo un gel representativo de cada reacción utilizando como molde el ADN genómico de 10 plantas. **(A)** Productos de la reacción de PCR utilizando un oligonucleótido directo específico del gen y el oligonucleótido BI específico del ADN-T. Calles 1 y 12: controles negativos (sin ADN), calles 2 a 11: ADN de 10 plantas independientes, calle 13: control positivo correspondiente al ADN genómico de una planta mutante heterocigota *rpl10A*. Calle 14: marcador de peso molecular de 100 pb. **(B)** Productos de la reacción de PCR utilizando oligonucleótidos reverso y directo específicos del gen. Calle 1: control negativo (sin ADN), calles 2 a 11: ADN de 10 plantas independientes, calle 12: control positivo

correspondiente al ADN genómico de una planta mutante salvaje. Calle 13: marcador de peso molecular de 100 pb. Los números a la izquierda y derecha de los geles indican los pesos moleculares de los productos de PCR y del fragmento de 500 en pares de bases del marcador, respectivamente.

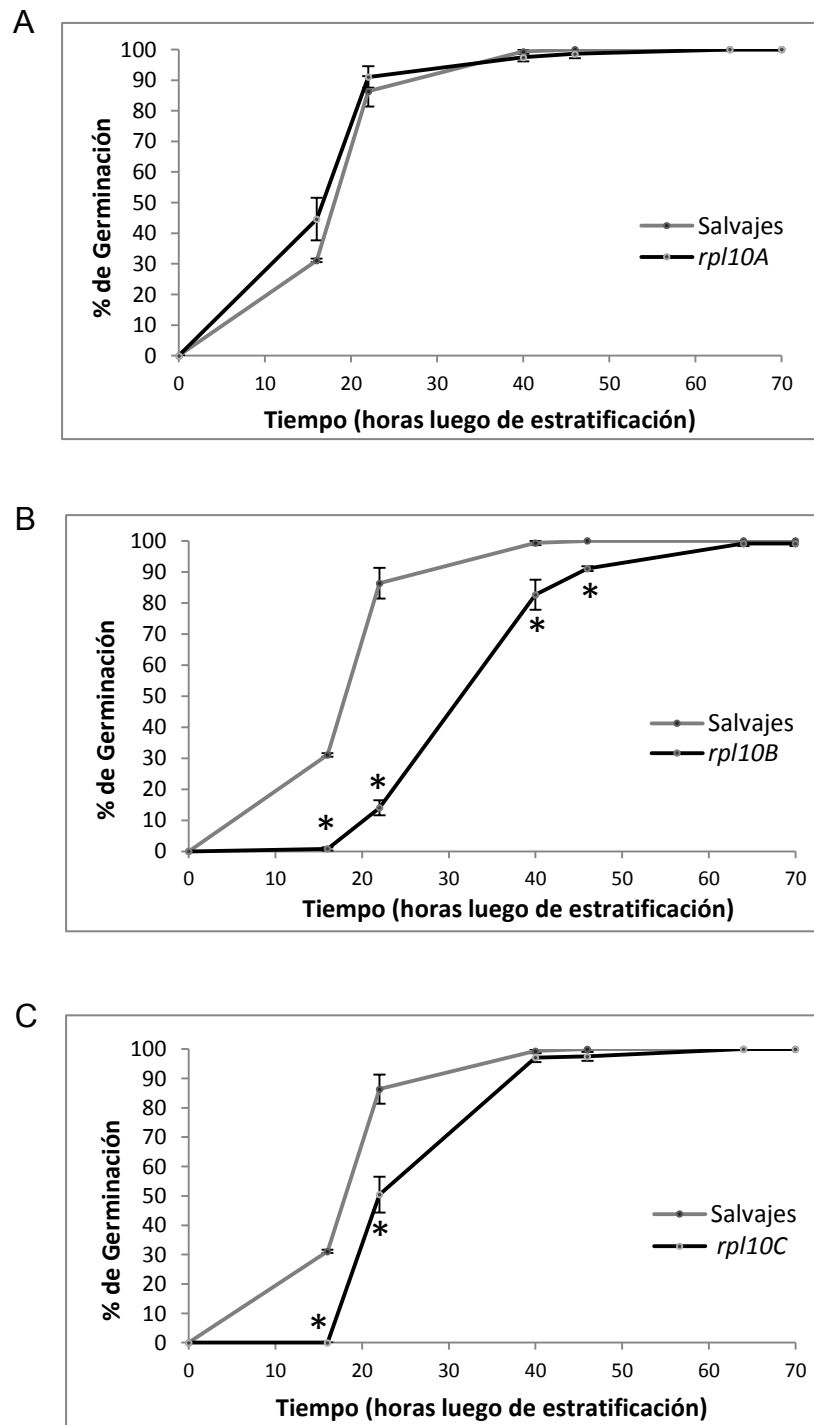
#### **4.2- Análisis de la capacidad germinativa y el desarrollo temprano post-germinativo de plantas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*.**

Con el objetivo de estudiar el rol de las proteínas RPL10 en la germinación y en el desarrollo temprano post-germinativo, se sembraron en MS-agar semillas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes simples para cada uno los tres genes *RPL10* y se evaluaron las mismas en los estadios II, IV y V que se muestran en la Figura 9, correspondientes a semilla germinada, formación de cotiledones verdes completamente expandidos y desarrollo de plántulas, respectivamente. Así, en primer lugar, se evaluó el porcentaje de germinación de cada genotipo a distintos tiempos luego de la estratificación de las semillas.

Todos los genotipos mostraron el 100% de semillas germinadas a las 70 horas. Sin embargo, las plantas mutantes homocigotas *rp10B* mostraron un marcado retraso en la velocidad de germinación, alcanzando el máximo a las 64 horas (Figura 10B), mientras que en las plantas mutantes homocigotas *rp10C* se observó un retraso sólo en las primeras horas (Figura 10C). Por el contrario, las plantas mutantes *rp10A* no exhibieron diferencias en la velocidad de germinación con respecto a las plantas salvajes (Figura 10A).



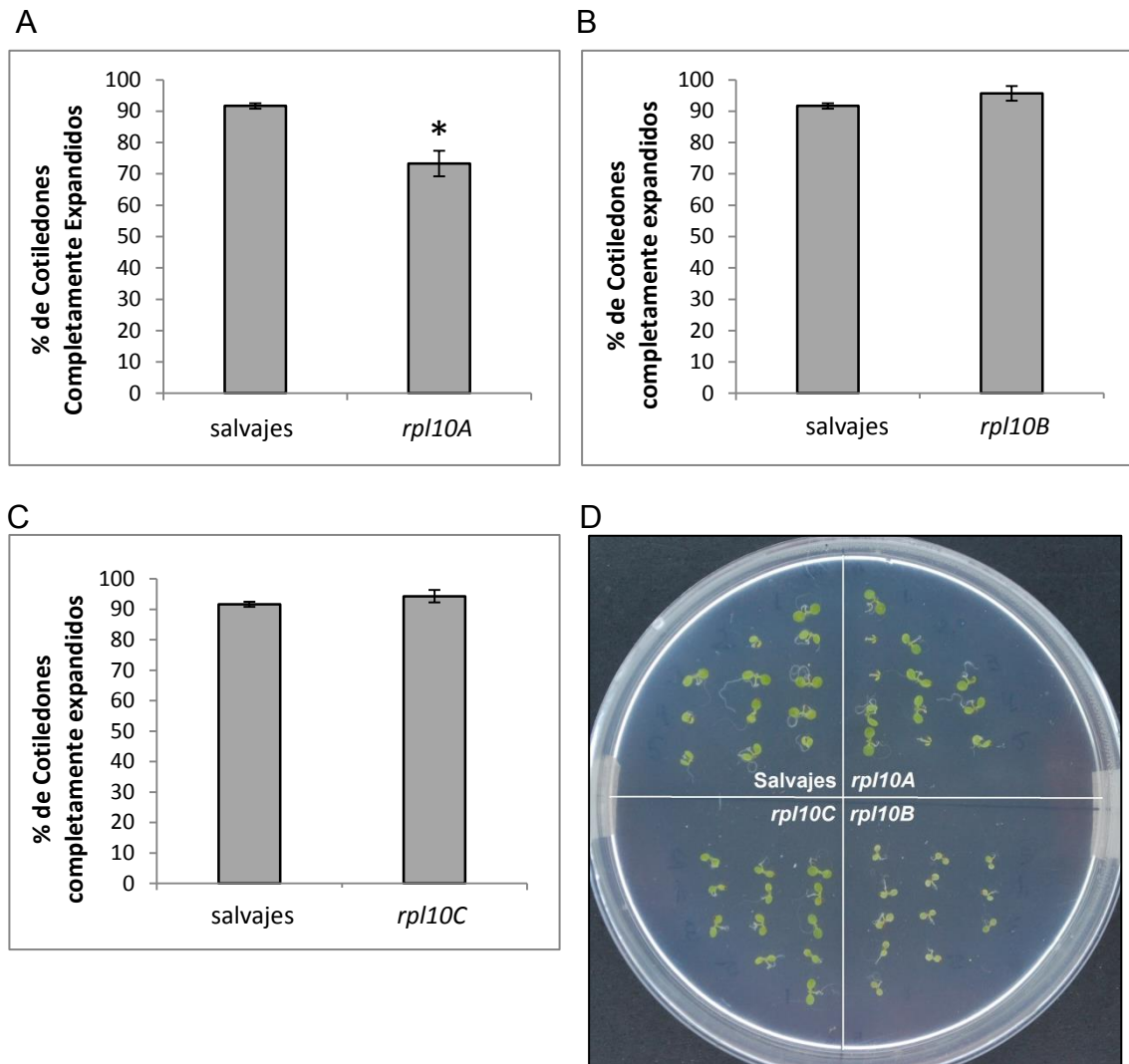
**Figura 9. Estadios de desarrollo germinativo y post-germinativo de plantas *A. thaliana*. (I) Ruptura de la testa. (II) Protrusión de la radícula. (III) Radícula con pelos visibles. (IV) Cotiledones verdes completamente expandidos. Fotografías tomadas utilizando lupa binocular. (V) Plántula con las dos primeras hojas. Fotografía adaptada de Wang *et al.* (2014).**



**Figura 10. Germinación de las plantas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*. (A, B, C) Germinación de las plantas salvajes, plantas mutantes *rpl10A*, plantas mutantes *rpl10B* y plantas mutantes *rpl10C*, respectivamente. A modo comparativo, cada genotipo mutante *rpl10* se muestra con el salvaje. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces en idénticas condiciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas salvajes (Prueba T,  $P < 0,05$ ).**

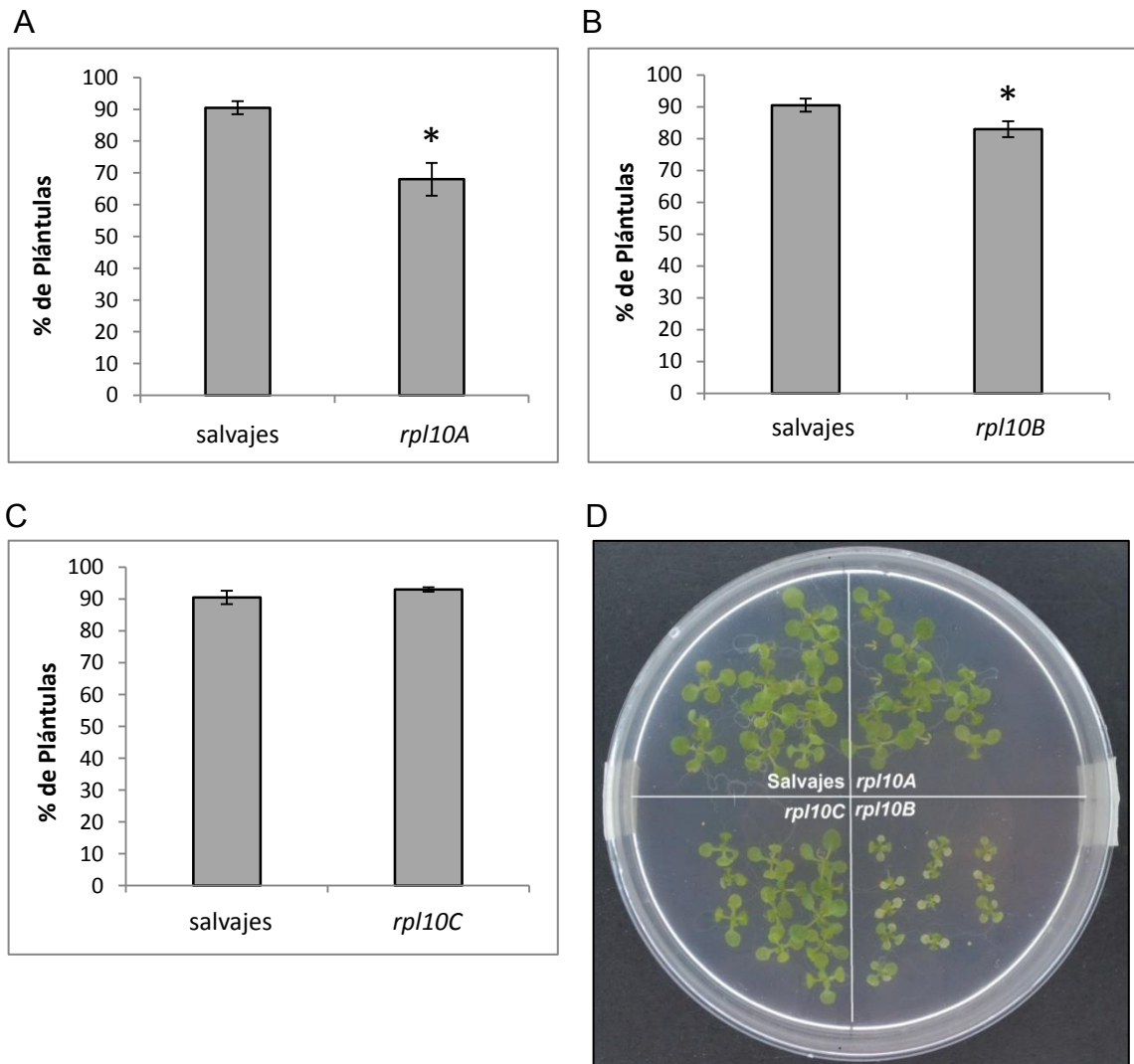
Luego, con el objetivo de estudiar la contribución de las proteínas RPL10s en el desarrollo post-germinativo de *Arabidopsis*, se evaluó la formación de cotiledones verdes completamente expandidos (CCE) a los 4 y 5 días luego de la estratificación (Figura 9, IV) y, posteriormente, el desarrollo de las plántulas, las cuales presentaban las dos primeras hojas desarrolladas, a los 10 días luego de la estratificación (Figura 9, V). Es importante destacar que los cotiledones verdes completamente expandidos corresponden al estadio de desarrollo del embrión en el que los cotiledones empiezan a ser fotosintéticamente activos e implica la transición del estadio de semilla hacia el desarrollo vegetativo (Panadero, 2013).

Las plantas salvajes presentaron un máximo de 92% de CCE, siendo similar lo observado en las plantas mutantes *rp10B* (Figura 11B). Sin embargo, el desarrollo final de plántulas es menor en las plantas mutantes *rp10B* con respecto a las plantas salvajes (84% y 91%, respectivamente) (Figura 12B). Es importante mencionar que la mutación en el gen *RPL10B* produce defectos en el desarrollo, exhibiendo las plantas características fenotípicas destacables, tales como una disminución en el área de los cotiledones y en las hojas desarrolladas. Por otra parte, las plantas mutantes *rp10C* no mostraron diferencias tanto en la formación de CCE como en el desarrollo final de plántulas con respecto a las plantas salvajes (Figuras 11C y 12C). Es interesante que, a diferencia de las plantas mutantes en los genes *RPL10B* y *RPL10C*, las plantas mutantes *rp10A* presentan un máximo significativamente menor, tanto de CCE (73%) como de plántulas desarrolladas (68%), con respecto a las plantas salvajes (Figuras 11A y 12A, respectivamente).



**Figura 11. Desarrollo de cotiledones verdes completamente expandidos de plantas *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*. (A, B, C) Porcentaje de cotiledones verdes completamente expandidos de plantas salvajes, plantas mutantes *rpl10A*, plantas mutantes *rpl10B* y plantas mutantes *rpl10C*, respectivamente. A modo comparativo, cada genotipo mutante *rpl10* se muestra con el salvaje. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces en idénticas condiciones. Las barras de error indican las desviaciones estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas salvajes (Prueba T,  $P < 0,05$ ). (D) Semillas salvajes y mutantes en los genes *RPL10A-B-C* fueron germinadas en medio MS-agar y fotografiadas a los 5 días luego de la estratificación, donde se observa el estadio de desarrollo analizado.**



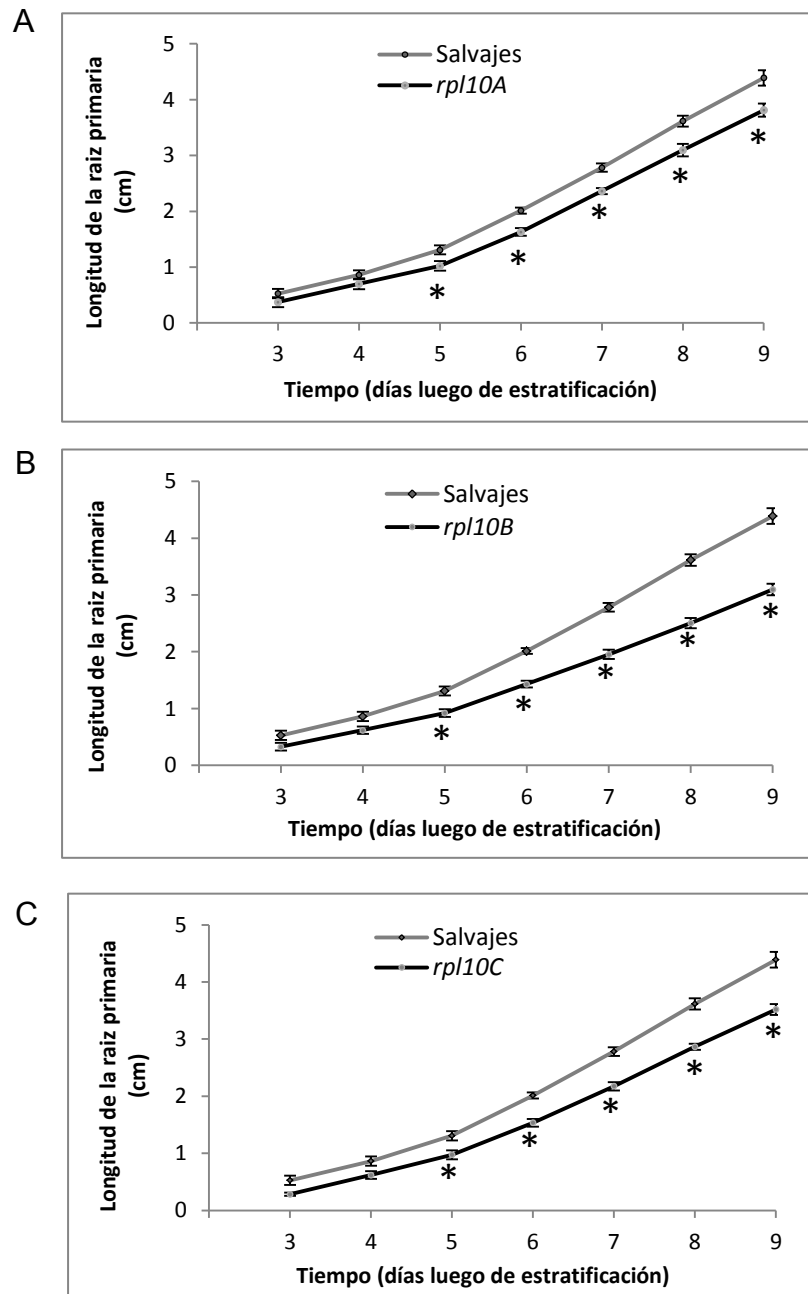


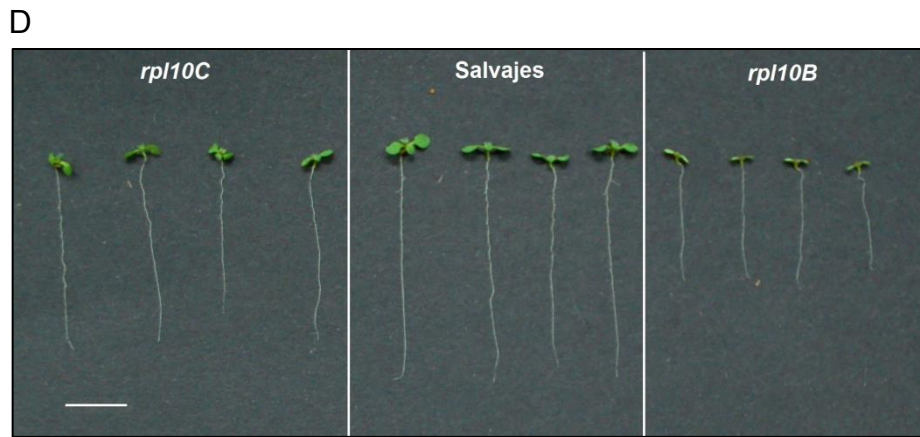
**Figura 12. Desarrollo de plántulas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*. (A, B, C)** Porcentaje de plántulas desarrolladas salvajes, mutantes *rpl10A*, mutantes *rpl10B* y plántulas mutantes *rpl10C*, respectivamente. A modo comparativo, cada genotipo mutante *rpl10* se muestra con el salvaje. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces en idénticas condiciones. Las barras de error indican los errores estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas salvajes (Prueba T,  $P < 0,05$ ). (D) Semillas salvajes y mutantes en los genes *RPL10A-B-C* fueron germinadas en medio MS-agar y fotografiadas a los 10 días luego de la estratificación, donde se observa el estadio de desarrollo analizado.

#### **4.3- Determinación del crecimiento de la raíz primaria de plantas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*.**

Con el propósito de analizar el crecimiento de la raíz primaria, semillas salvajes y mutantes simples *rpl10A*, *rpl10B* y *rpl10C* fueron sembradas y crecidas verticalmente en placas conteniendo medio MS-agar. Desde el día 3 hasta el día 9

luego de la estratificación, se registró el crecimiento de la raíz primaria de cada planta. Como se observa en la Figura 13, las plantas mutantes en los tres genes *RPL10s* muestran una menor elongación de la raíz primaria a partir de día 5 luego de la estratificación en comparación con las plantas salvajes, resultando en raíces primarias significativamente más cortas al día 9.





**Figura 13. Crecimiento de la raíz primaria de plántulas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*. (A, B, C) Elongación de la raíz primaria de plantas salvajes y plantas mutantes *rpl10A*, plantas mutantes *rpl10B* y plantas mutantes *rpl10C*, respectivamente. Se muestra la longitud de la raíz primaria en cm desde el día 3 al día 9 luego de la estratificación. A modo comparativo, cada genotipo mutante *rpl10* se muestra con el salvaje. Las barras de error indican los errores estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas salvajes (Prueba T,  $P < 0,05$ ). (D) Fotografía de plántulas salvajes y mutantes en los genes *RPL10B* y *RPL10C* a los 10 días luego de la estratificación. Las mismas fueron crecidas en placas conteniendo medio MS-agar en posición vertical. Barra de escala: 1 cm.**

En la Figura 13D puede apreciarse que las plántulas mutantes en los genes *RPL10B* y *RPL10C* presentan una raíz primaria de menor longitud con respecto a las plántulas salvajes (siendo la menor en las plántulas mutantes *rpl10B*). En esta fotografía no se incluyeron las plántulas mutantes heterocigotas *rpl10A* porque las mismas solo pueden ser diferenciadas de las plántulas salvajes mediante reacciones de PCR utilizando el ADN genómico de cada plántula, como se explicó al inicio de este capítulo. De esta manera, este procedimiento implica la utilización irreversible del tejido.

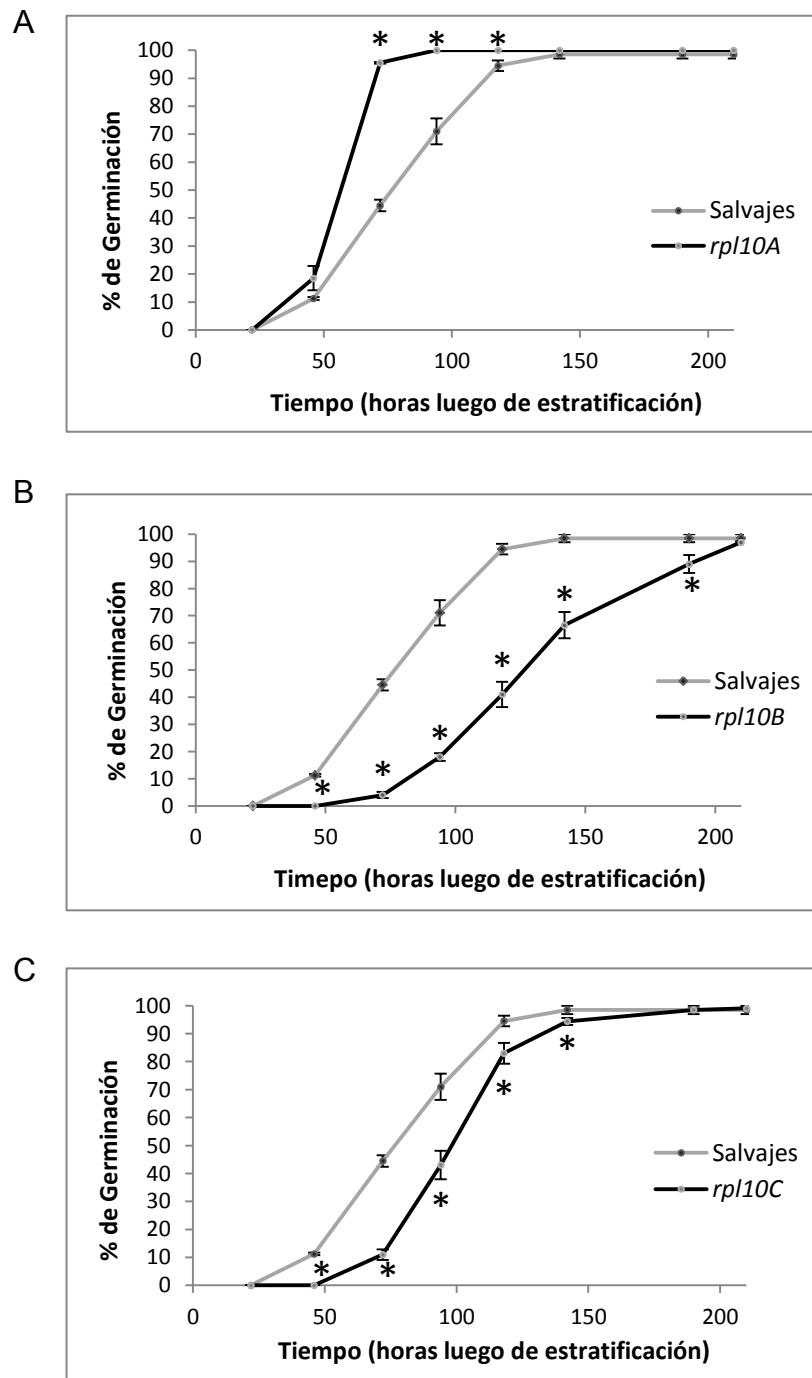
En síntesis, los resultados obtenidos hasta el momento indican que las proteínas *RPL10A-B-C* juegan importantes roles tanto en la germinación como en el desarrollo temprano de plantas de *A. thaliana*.

#### **4.4- Análisis del crecimiento germinativo y del desarrollo temprano post-germinativo de plantas de *Arabidopsis thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C* en presencia de ácido abscísico (ABA).**

La fitohormona ABA regula importantes procesos fisiológicos, tales como la

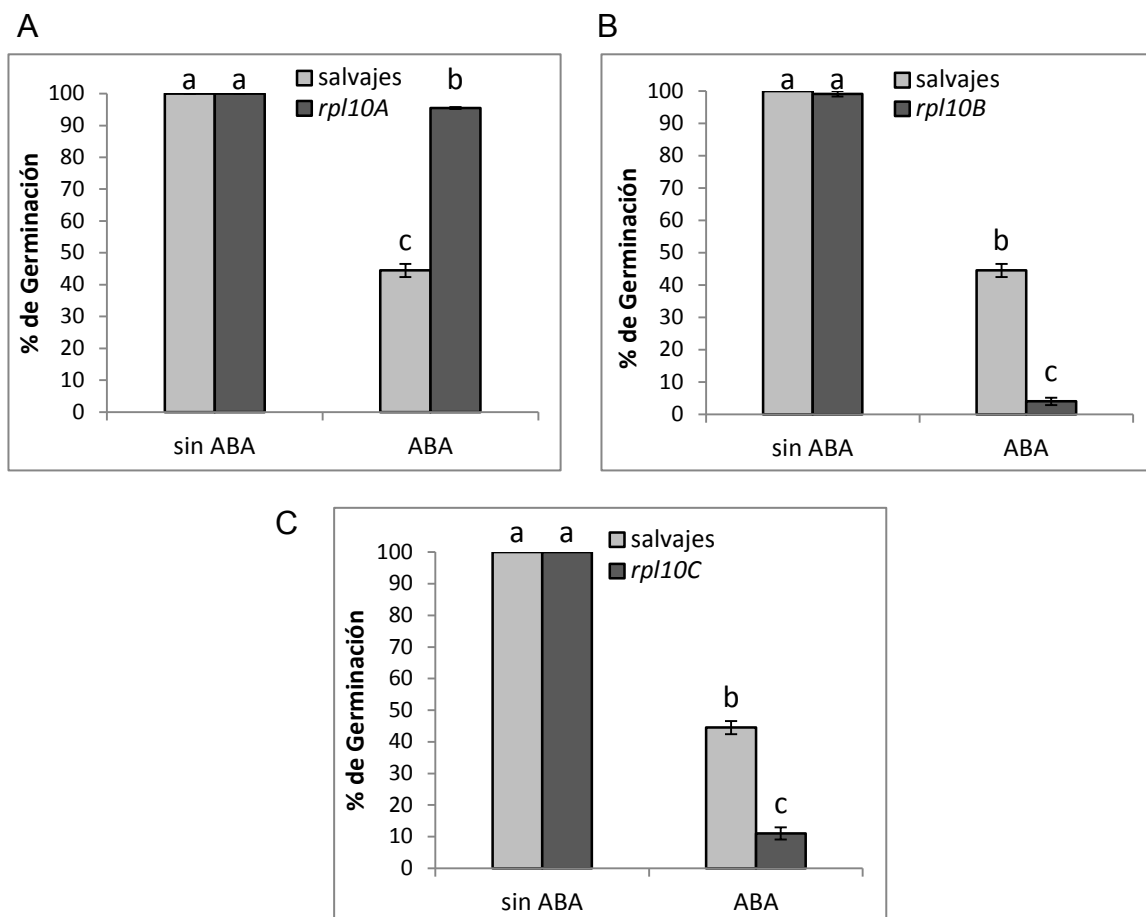
inhibición de la germinación y del desarrollo post-germinativo, y la modulación de la apertura de los estomas, entre otros (Sah *et al.*, 2016). Con el propósito de indagar acerca de la contribución de las proteínas RPL10s de *Arabidopsis* en las respuestas al ABA, se trabajó con las plantas salvajes y las plantas mutantes simples *rpl10A-B-C* ya descritas. En primer lugar, se analizó el crecimiento germinativo mediante la evaluación del porcentaje de germinación de cada genotipo, en semillas germinadas tanto en condiciones control (MS-agar) como en presencia de ABA exógeno (MS-agar suplementado con ABA 1  $\mu$ M).

Como se observa en la Figura 14, las plantas salvajes alcanzaron el máximo de semillas germinadas (98,5%) a las 118 horas luego de la estratificación. Por el contrario, las plantas mutantes *rpl10B* y *rpl10C* mostraron un marcado retraso en la velocidad de germinación con respecto a las plantas salvajes. Las plantas mutantes *rpl10B* alcanzaron el máximo (97%) a las 210 hs, mientras que las plantas mutantes *rpl10C* alcanzaron el máximo de germinación (98,5%) a las 190 horas (Figuras 14B y 14C, respectivamente). Es destacable que las plantas mutantes heterocigotas *rpl10A* mostraron una mayor velocidad de germinación que las plantas salvajes, siendo el porcentaje de semillas germinadas del 100 % a las 94 horas luego de la estratificación, además en todos los tiempos analizados el porcentaje de germinación fue mayor que en las plantas salvajes (Figura 14A).



**Figura 14. Crecimiento germinativo de las plantas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C* en presencia de  $1 \mu\text{M}$  ABA. (A, B, C) Germinación de plantas salvajes, plantas mutantes heterocigotas *rpl10A*, plantas mutantes homocigotas *rpl10B* y plantas mutantes homocigotas *rpl10C*, respectivamente. A modo comparativo, cada genotipo mutante *rpl10* se muestra con el salvaje. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces en idénticas condiciones. Las barras de error indican los errores estándar y los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas salvajes (Prueba T,  $P < 0,05$ ).**

En la Figura 15 se puede observar que, en condiciones control (ausencia de ABA) todos los genotipos analizados presentaron el máximo porcentaje de germinación a las 72 horas luego de la estratificación, mientras que para este mismo tiempo en presencia de ABA se observa un retraso en la velocidad de la germinación en los cuatro genotipos estudiados, aunque en diferente magnitud. Así, es destacable que durante el desarrollo germinativo, las plantas mutantes simples *rpl10A* son menos sensibles al ABA con respecto a las plantas salvajes, por ejemplo, a las 72 horas muestran 96% de semillas germinadas, frente a un 45% en plantas salvajes (Figura 15A). Por el contrario, las plantas mutantes simples *rpl10B* y *rpl10C* muestran mayor sensibilidad a dicha hormona con respecto a las plantas salvajes, exhibiendo a las 72 horas un 4% y 11% de semillas germinadas, respectivamente (Figuras 15B y 15C).

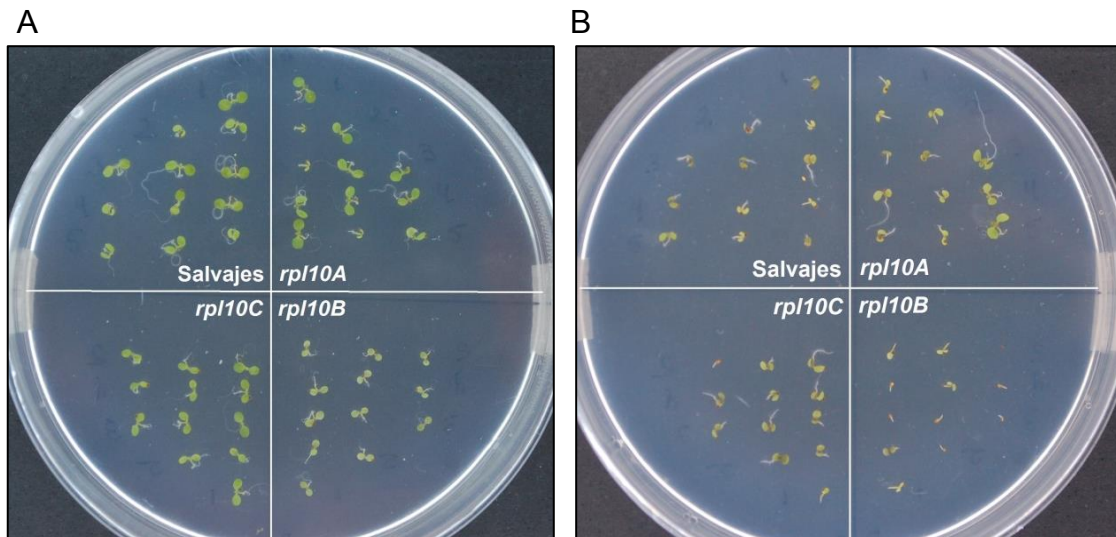


**Figura 15. Porcentaje de germinación a las 72 horas luego de la estratificación en condiciones control (ausencia de ABA) y en presencia de ABA 1 μM. (A, B, C)** Germinación de plantas salvajes, plantas mutantes *rpl10A*, plantas mutantes *rpl10B* y plantas mutantes *rpl10C*, respectivamente. A modo comparativo, cada genotipo mutante *rpl10* se muestra con el salvaje. Los experimentos fueron repetidos al menos tres veces

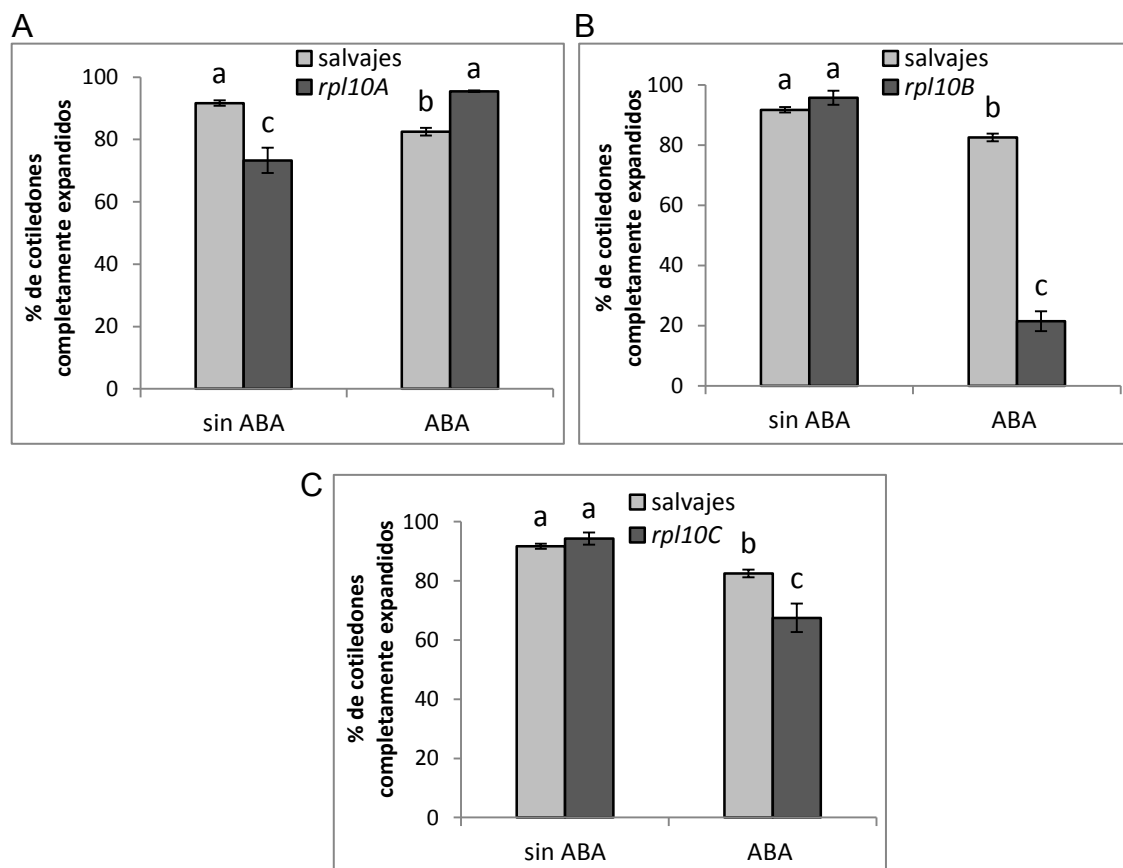
en idénticas condiciones. Las barras de error indican los errores estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Prueba ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

A continuación, se analizó el desarrollo temprano post-germinativo de las plantas salvajes y plantas mutantes en cada uno de los genes *RPL10s* en presencia de ABA, como se describió en ausencia de esta hormona. Los cuatro genotipos exhiben un retraso en el desarrollo en comparación a la condición control en ausencia de ABA, alcanzándose el estadio de desarrollo de cotiledones completamente expandidos (CCE) a las 8 días luego de la estratificación (Figuras 16 y 17) y el desarrollo de plántulas conteniendo las dos primeras hojas a los 15 días (Figura 18 y 19). Se puede apreciar en la Figura 17A que las plantas mutantes *rpl10A* alcanzan un porcentaje significativamente mayor de CCE que las plantas salvajes (95% vs 82%, respectivamente), y este incremento también se observa para el desarrollo de las plántulas (57% vs 37%, respectivamente, Figura 19A). Por el contrario, las plantas mutantes *rpl10B* y *rpl10C* exhiben un descenso significativo en el porcentaje de CCE en comparación con las plantas salvajes (21% y 67%, respectivamente, Figuras 17B y 17C). Esta diferencia se mantiene en las mutantes *rpl10B* para el desarrollo de plántulas, siendo un 14% (Figura 19B). Sin embargo, las plantas mutantes en *RPL10C* no exhibieron diferencias en el porcentaje de plántulas desarrolladas con respecto a las plantas salvajes (Figura 19C).

De esta manera, es destacable que las plantas mutantes *rpl10A-B-C* manifiestan diferente sensibilidad al ABA, tanto entre sí como con respecto a las plantas salvajes. Las plantas mutantes *rpl10A* muestran una menor sensibilidad a la hormona con respecto a las plantas salvajes durante el desarrollo germinativo y post-germinativo, mientras que las plantas mutantes *rpl10B* y *rpl10C* son más sensibles al ABA, siendo aún más marcada la sensibilidad en las plantas mutantes *rpl10B*.



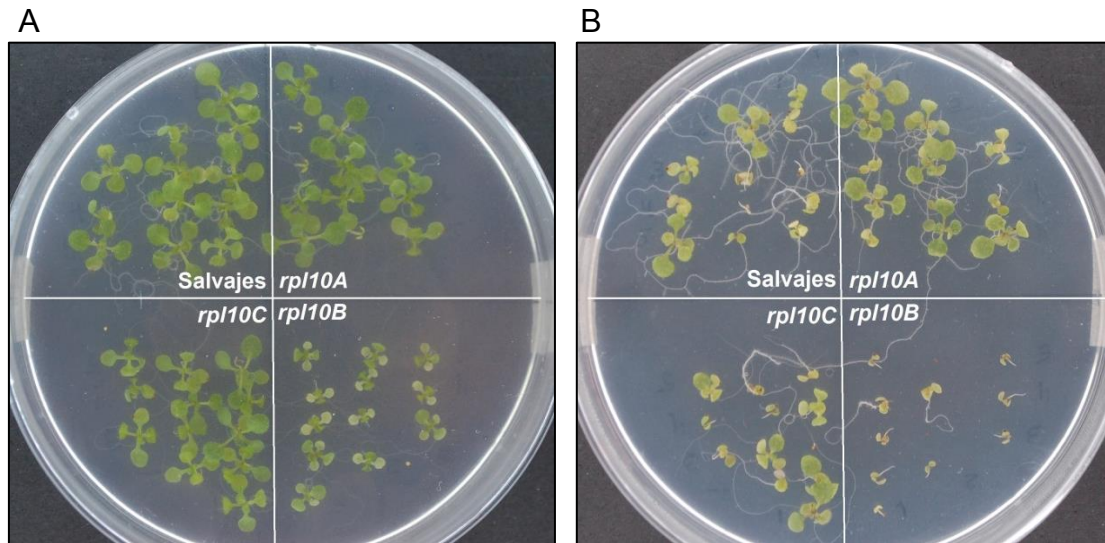
**Figura 16. Desarrollo de cotiledones verdes completamente expandidos de plantas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*. Las fotografías fueron tomadas a los 4 días luego de la estratificación en condiciones control (A) y a los 8 días en presencia ABA 1  $\mu$ M (B).**



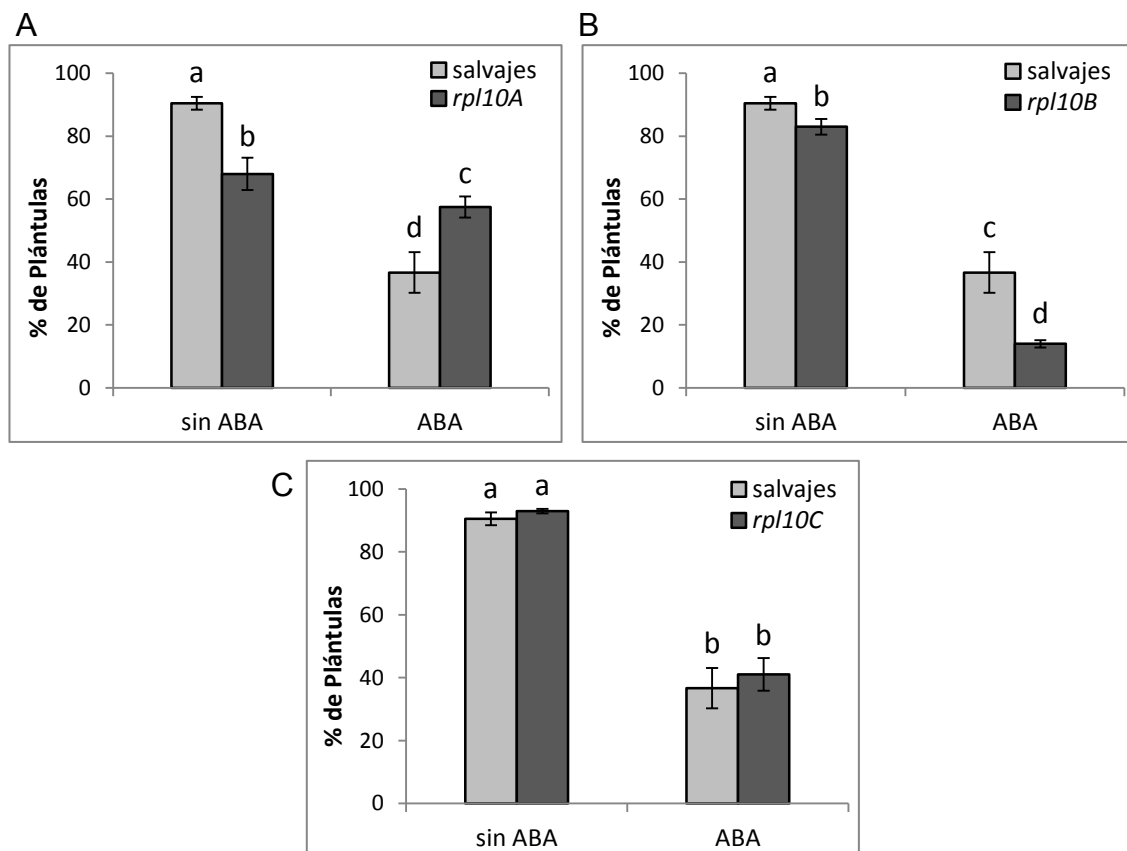
**Figura 17. Comparación del porcentaje máximo de cotiledones completamente expandidos alcanzado en condiciones control y en presencia de ABA 1  $\mu$ M. (A, B, C) Porcentaje de cotiledones verdes completamente expandidos de plantas salvajes, plantas mutantes *rpl10A*, plantas mutantes *rpl10B* y plantas mutantes *rpl10C*, respectivamente. A modo comparativo, cada genotipo mutante *rpl10* se muestra con el salvaje. Las barras de**



error indican las desviaciones estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Prueba ANOVA a dos colas,  $P < 0,05$ ).



**Figura 18. Desarrollo de plántulas de *A. thaliana* salvajes y mutantes simples en los genes *RPL10A-B-C*.** Las fotografías fueron tomadas a los 9 días luego de la estratificación en las condiciones control **(A)** y a los 15 días en MS-agar suplementado con ABA 1  $\mu\text{M}$  **(B)**.



**Figura 19. Desarrollo de plántulas en condiciones control y en presencia de ABA 1  $\mu\text{M}$ .** **(A, B, C)** Porcentaje de plántulas desarrolladas salvajes, mutantes *rpl10A*, mutantes *rpl10B* y mutantes *rpl10C*, respectivamente. A modo comparativo, cada genotipo mutante

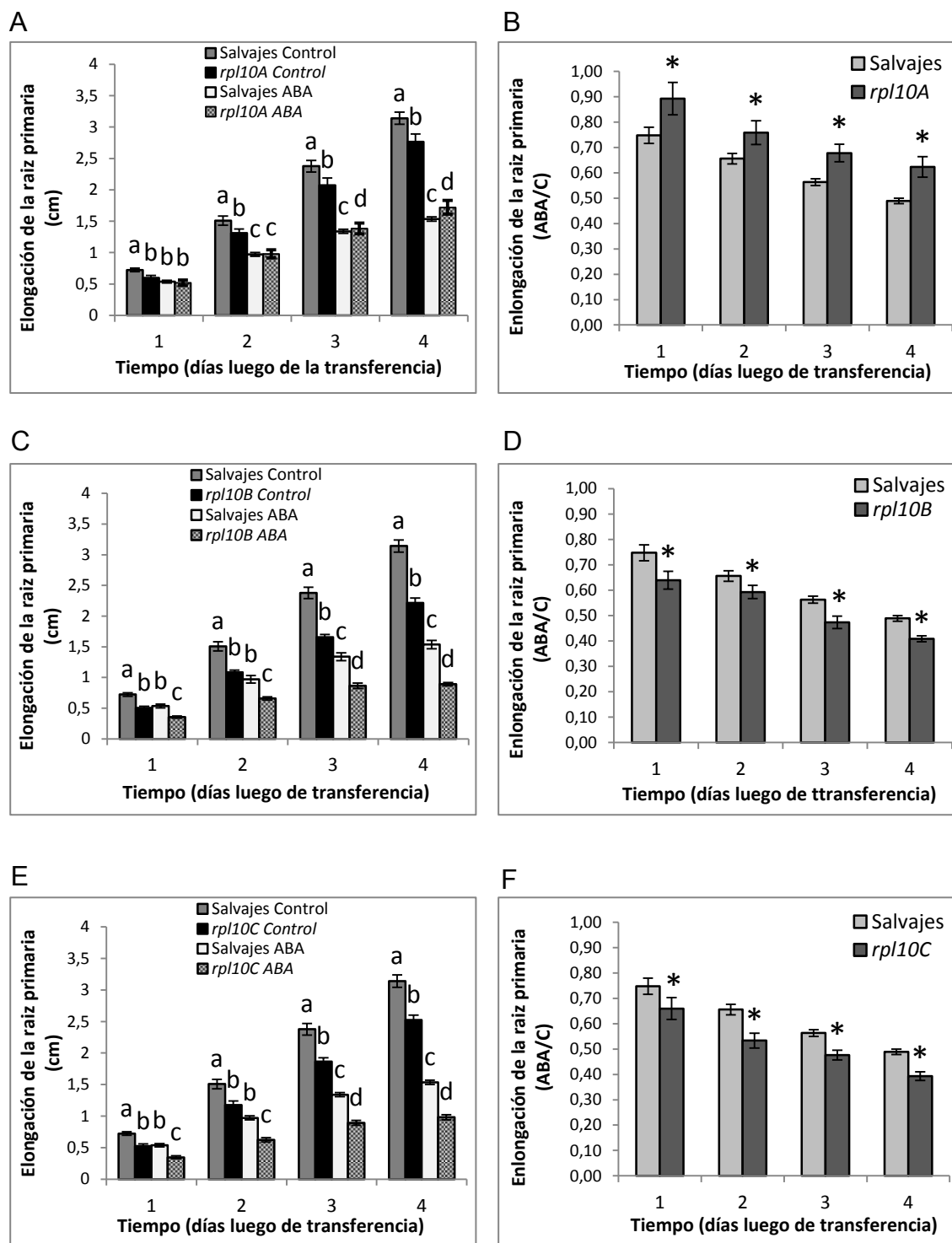
*rpl10* se muestra con el salvaje. Las barras de error indican los errores estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y condiciones (Prueba ANOVA a dos colas,  $P < 0,05$ ).

#### **4.5- Ensayos de inhibición de la elongación de la raíz primaria por el agregado de ABA exógeno.**

El ácido abscísico (ABA) es uno de los mediadores más importantes de señales bióticas y abióticas, actuando como intérprete del medioambiente, controlando procesos fisiológicos claves. Así, hay un creciente interés en conocer el rol del ABA en el proceso de desarrollo del sistema radicular de plantas (Sozzani e Iyer-Pascuozzi, 2014; Vermer y Gelgmer, 2015). Con el propósito de investigar en más detalle la contribución de las proteínas RPL10s de Arabidopsis en las respuestas al ABA luego de la germinación, se realizaron ensayos de inhibición de la elongación de la raíz primaria por el agregado de ABA exógeno utilizando plantas salvajes y mutantes en cada uno de los genes *RPL10*.

En la Figura 20 puede apreciarse que, si bien todos los genotipos exhiben una inhibición de la elongación de la raíz primaria en respuesta al ABA, el comportamiento frente a dicha hormona difiere entre los genotipos analizados. Las plantas mutantes *rpl10A* mostraron una inhibición del crecimiento de su raíz primaria significativamente menor con respecto a la observada en las plantas salvajes (Figuras 20A y 20B). Por el contrario, la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en las plantas mutantes *rpl10B* y *rpl10C* fue significativamente mayor en comparación con las plantas salvajes (Figuras 20 B-C, y 20 D-E, respectivamente).

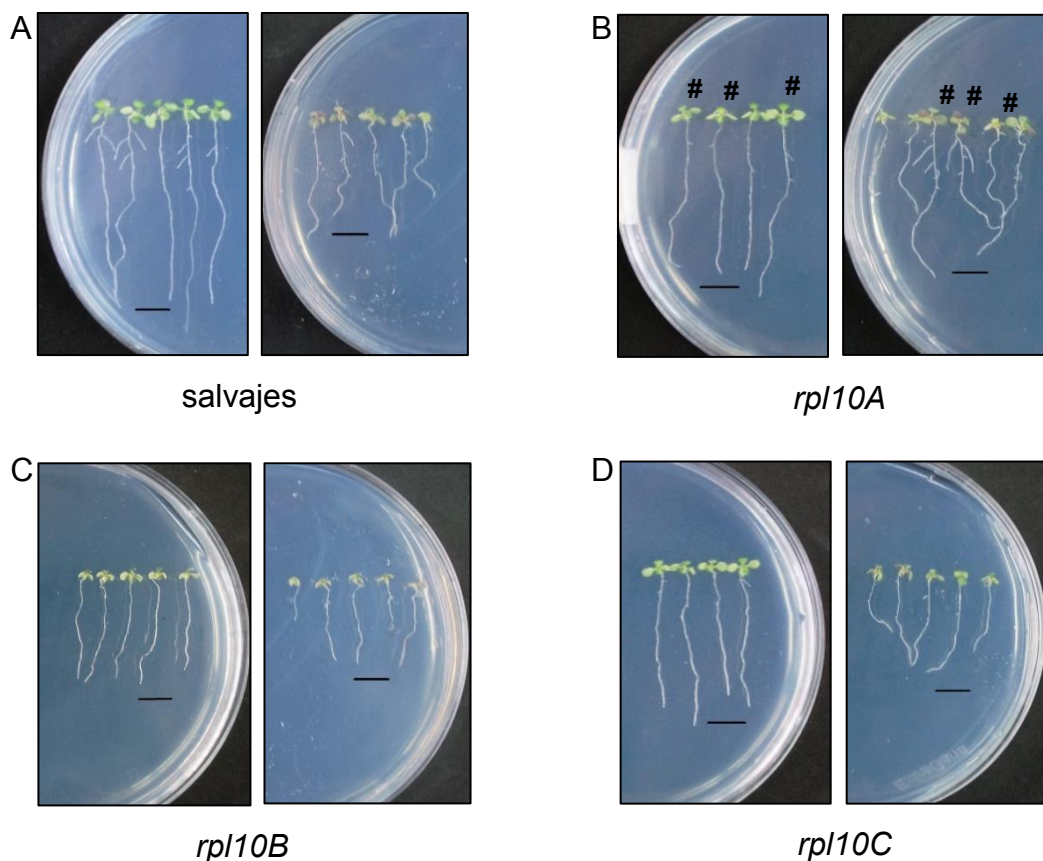
Es importante destacar que las relaciones ABA/control correspondientes a la elongación de la raíz primaria de las plantas de cada uno de los genotipos, permite una mayor apreciación del efecto del ABA tanto por su efecto inhibitorio así como también por el hecho que las plántulas mutantes *rpl10* poseen una menor longitud de la raíz primaria en comparación con las plantas salvajes. De esta manera, se observa que en plantas mutantes *rpl10A* el efecto inhibitorio del ABA en la elongación de la raíz primaria es menor que en plantas salvajes (Figura 20B), mientras que en plantas mutantes *rpl10B* y *rpl10C* la inhibición es mayor que en plantas salvajes (Figuras 20D y 20F, respectivamente).



**Figura 20. Inhibición de la elongación de la raíz primaria por el agregado exógeno de ABA 10  $\mu$ M.** Se evaluó el crecimiento de la raíz primaria de plantas salvajes y plantas mutantes *rpl10A-B-C* tanto en condiciones control como en presencia de ABA. En **A**, **C** y **E** se grafica la elongación de la raíz primaria en función de los días luego de la transferencia. Las barras de error indican los errores estándar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos y condiciones para cada día (Prueba ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ). En **B**, **D** y **F** se grafica la relación ABA/C de la elongación de la raíz en función de los días luego de la transferencia para las plantas

mutantes *rpl10A*, *rpl10B* y *rpl10C*, respectivamente. Las barras de error indican los errores estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos para cada día (Prueba T,  $P < 0,05$ ).

La Figura 21 muestra imágenes representativas de las plántulas salvajes y las plántulas mutantes *rpl10A*, *rpl10B* y *rpl10C* a los 4 días posteriores a la transferencia a medios control (sin ABA, izquierda) y a medios con ABA (derecha), observándose la inhibición de la elongación de la raíz primaria por el ABA en los 4 genotipos, siendo más pronunciada en las plantas mutantes *rpl10C* y *rpl10B* en comparación con las plantas salvajes, mientras que lo opuesto se observa en las plántulas mutantes *rpl10A*.

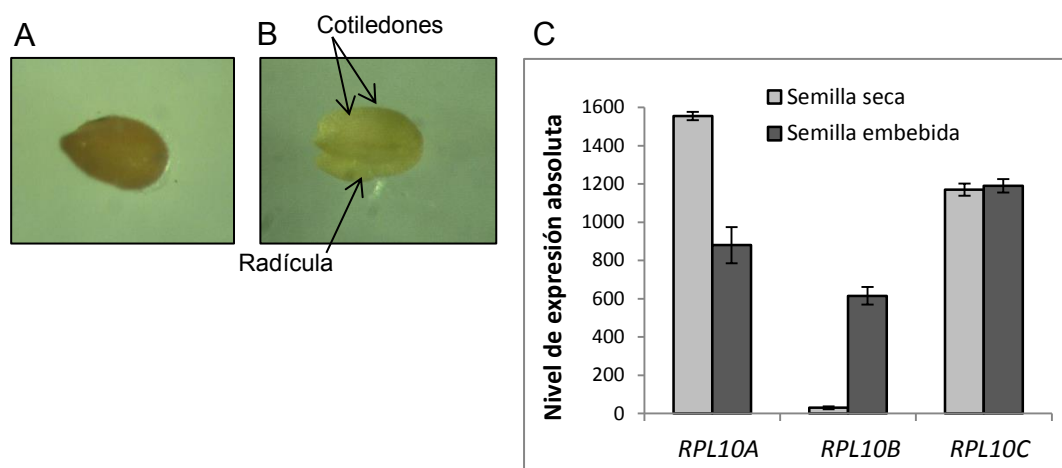


**Figura 21.** Imágenes representativas de plántulas salvajes y mutantes *rpl10A*, *rpl10B* y *rpl10C* crecidas verticalmente en MS-agar durante 5 días y luego transferidas a medios MS-agar control (izquierda) y suplementado con ABA 10  $\mu\text{M}$  (derecha). (A) Plantas salvajes. (B) Plantas mutantes *rpl10A*, donde se señalan (#) aquellas que resultaron positivas para la verificación de presencia de inserción de ADN-T mediante PCR. (C) Plantas mutantes *rpl10B*. (D) Plantas mutantes *rpl10C*. Las fotografías fueron tomadas a los 4 días luego de la transferencia. Barra de escala: 1 cm.

#### 4.6- Análisis de la expresión de los genes *RPL10A-B-C* y su regulación por el ABA.

Con el objetivo de profundizar acerca de la participación de las proteínas RPL10 en la germinación y en el desarrollo temprano en plantas de Arabidopsis, en primer lugar, procedimos a analizar el patrón de expresión de los tres genes *RPL10* en los diferentes tejidos y estadios de desarrollo temprano descritos anteriormente en plantas de Arabidopsis transgénicas *RPL10A<sub>pro</sub>:GUS*, *RPL10B<sub>pro</sub>:GUS* y *RPL10C<sub>pro</sub>:GUS*, en condiciones control (MS-agar) y, por otra parte, en presencia de ABA (suplementando el MS-agar con ABA 1  $\mu$ M).

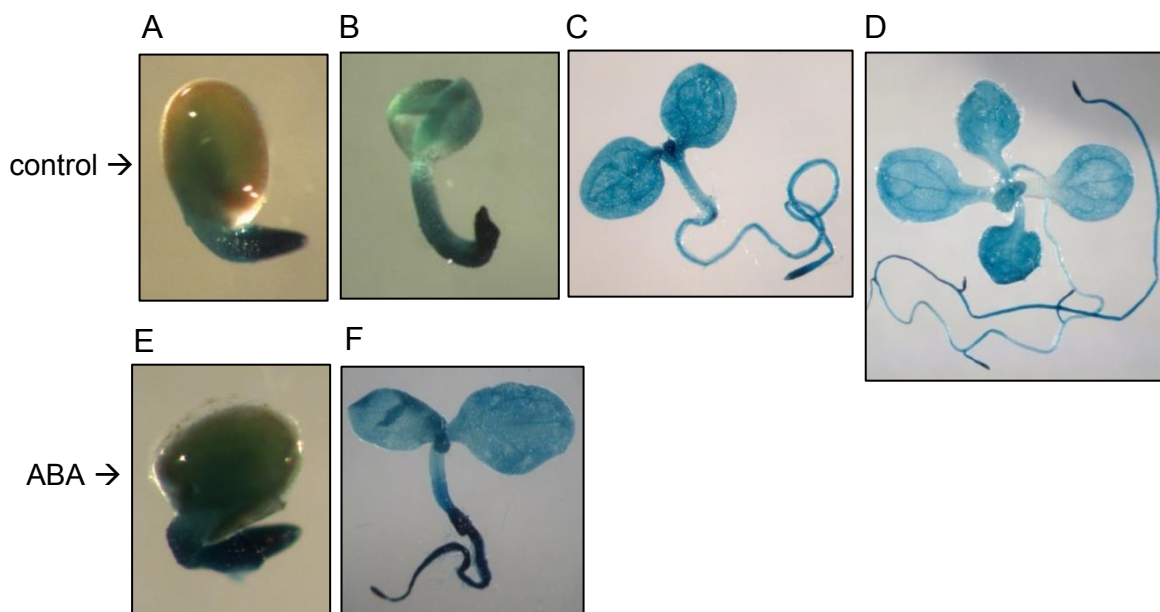
En las semillas, tanto embebidas durante 24 horas en agua como luego de la estratificación, no fue posible detectar la expresión de los genes *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* (Figura 22). Sin embargo, en bases de datos de microarreglos de Arabidopsis se observa la presencia de los transcritos *RPL10A-B-C* tanto en las semillas secas como en las semillas embebidas (Figura 22C; Winter *et al.*, 2007; Petryszak *et al.*, 2016). Por lo tanto, la ausencia de detección por el método utilizado podría deberse a la sensibilidad de la técnica o bien, a otras causas descritas en la discusión.



**Figura 22. Tinción histoquímica de semillas de Arabidopsis que expresan la fusión reportera del promotor *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* al gen que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. (A) Semilla embebida en agua. (B) Embrión de semilla embebida en agua donde se retiró la testa para visualizar mejor el embrión. Las fotografías son representativas y corresponden a las tinciones realizadas en varias semillas de cada una de las plantas transgénicas *RPL10<sub>pro</sub>:GUS*. (C) Expresión de los genes *RPL10A-B-C* en semillas secas y embebidas durante 24 horas en agua. Los datos de microarreglos fueron obtenidos de la base de datos de Arabidopsis eFP**

Browser y Expression Atlas (Winter *et al.*, 2007; Petryszak *et al.*, 2016).

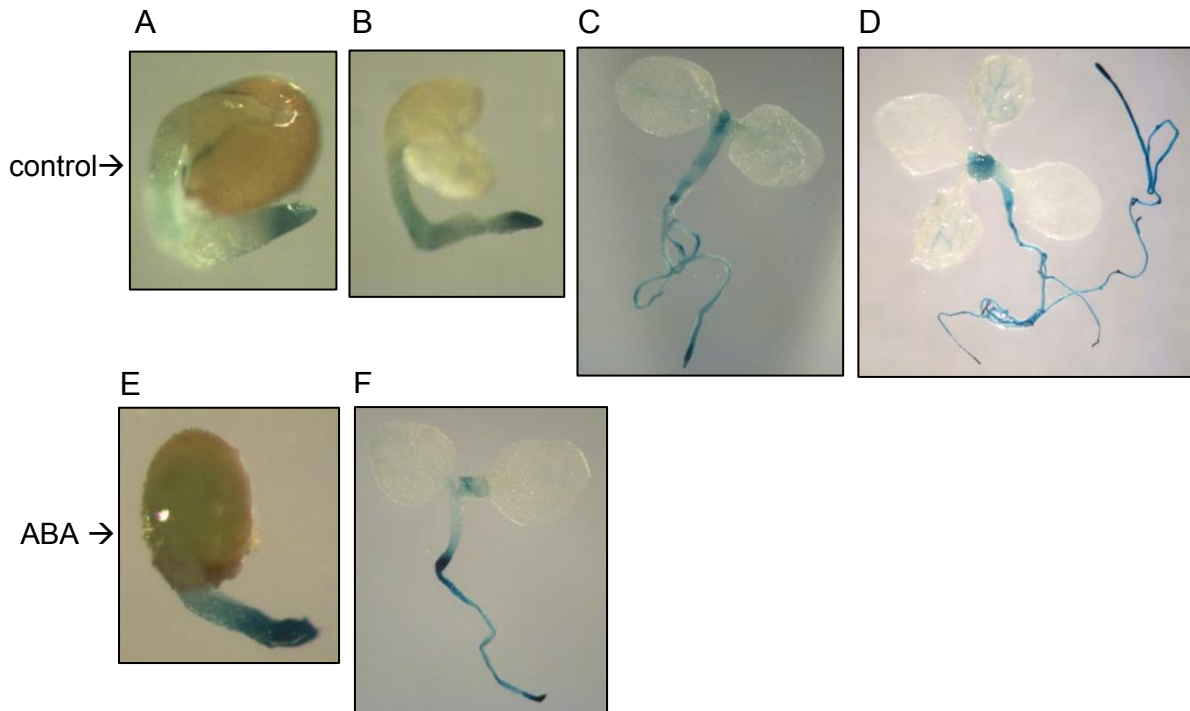
En las plántulas transgénicas que expresan el gen *GUS* bajo el promotor del gen *RPL10A*, se observó la expresión del gen reportero tanto durante el desarrollo germinativo como durante el desarrollo post-germinativo. Es destacable la expresión de *RPL10A* en las radículas de las semillas germinadas (Figuras 23A y 23B), así como también en la raíz primaria, el hipocótilo, los cotiledones (Figura 23C) y en las primeras dos hojas de plántulas (Figura 23D).



**Figura 23. Tinción histoquímica de plantas de *Arabidopsis* que expresan la fusión reportera del promotor *RPL10A* al gen que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*RPL10B<sub>pro</sub>:GUS*). (A)** Estadio de semilla germinada, 22 horas luego de la estratificación en condición control. **(B)** Embrión de semilla germinada donde se retiró la testa para visualizar el embrión. **(C)** Estadio de cotiledones verdes completamente expandidos 4 días luego de la estratificación. **(D)** Plántula de 8 días, con las dos primeras hojas desarrolladas. **(E)** Estadio de semilla germinada, 46 horas luego de la estratificación en presencia de ABA 1  $\mu$ M. **(F)** Estadio de cotiledones verdes completamente expandidos (8 días luego de la estratificación) en presencia de ABA 1  $\mu$ M.

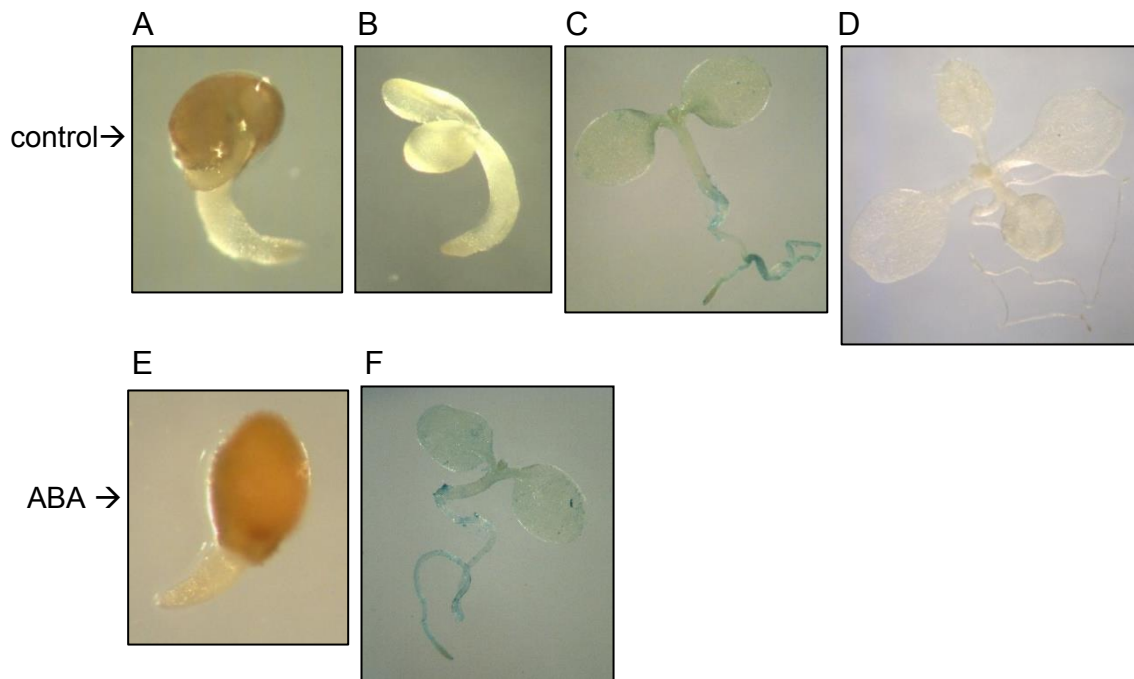
Para las plántulas que expresan al gen *GUS* bajo el promotor del gen *RPL10B*, también se observó que este gen se expresa tanto durante el desarrollo germinativo (Figuras 24A y 24B) como durante el desarrollo post-germinativo, siendo predominante su expresión en el hipocótilo y las raíces primarias, confinándose la mayor expresión en las puntas de las mismas (Figuras 24C y 24D). Por el contrario,

la expresión de *RPL10B* es débil en los cotiledones y en las primeras hojas, observándose casi exclusivamente en los tejidos vasculares (Figuras 24C y 24D).



**Figura 24.** Tinción histoquímica de plantas de *Arabidopsis* que expresan la fusión reportera del promotor *RPL10B* al gen que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*RPL10B<sub>pro</sub>:GUS*). **(A)** Estadio de semilla germinada, 22 horas luego de la estratificación en condición control. **(B)** Embrión de semilla germinada donde se retiró la testa para visualizar el embrión. **(C)** Estadio de cotiledones verdes completamente expandidos 4 días luego de la estratificación. **(D)** Plántula de 8 días, con las dos primeras hojas desarrolladas. **(E)** Estadio de semilla germinada 46 horas luego de la estratificación en presencia de ABA 1  $\mu$ M. **(F)** Estadio de cotiledones verdes completamente expandidos 8 días luego de la estratificación en presencia de ABA 1  $\mu$ M.

Finalmente, en las plántulas que expresan el gen *GUS* bajo el promotor del gen *RPL10C*, a diferencia de *RPL10A* y *RPL10B*, no se observó la expresión de *RPL10C* en las semillas germinadas (Figura 25A y 25B). Durante el desarrollo post-germinativo, *RPL10C* se expresa en las raíces de las plántulas en el estadio de cotiledones verdes completamente expandidos, aunque más tenue que los otros genes *RPL10s* (Figura 25C). Por el contrario, en las plántulas conteniendo las dos primeras hojas desarrolladas la expresión de *RPL10C* no se observa tanto en las raíces como en las hojas (Figuras 25D).



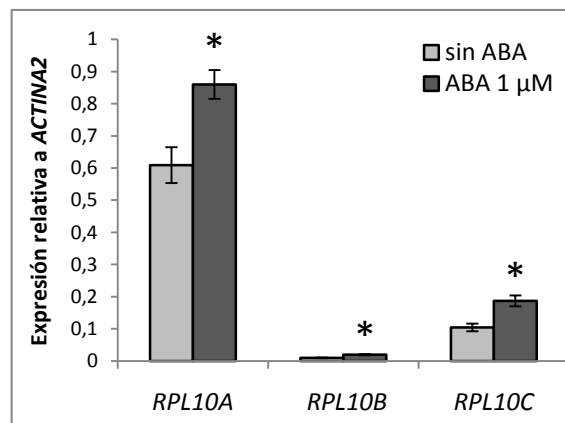
**Figura 25.** Tinción histoquímica de plantas de *Arabidopsis* que expresan la fusión reportera del promotor *RPL10C* al gen que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*RPL10C<sub>pro</sub>:GUS*). **(A)** Estadio de semilla germinada, 22 horas luego de la estratificación en condición control. **(B)** Embrión de semilla germinada donde se retiró la testa para visualizar el embrión. **(C)** Estadio de cotiledones verdes completamente expandidos 4 días luego de la estratificación. **(D)** Plántula de 8 días, con las dos primeras hojas desarrolladas. **(E)** Estadio de semilla germinada, 46 horas luego de la estratificación en presencia de ABA 1  $\mu$ M. **(F)** Estadio de cotiledones verdes completamente expandidos 8 días luego de la estratificación en presencia de ABA 1  $\mu$ M.

Adicionalmente, evaluamos la expresión de los genes *RPL10A-B-C* en los estadios de semillas germinadas y plántulas en desarrollo en presencia de ABA. Como se observa en las Figuras 23, 24 y 25 (paneles E y F), en las semillas germinadas y en las plántulas en estadio de cotiledones verdes completamente expandidos, la expresión de los genes *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* parece ser similar a lo observado en ausencia de ABA (condición control), pudiéndose visualizar un color azul levemente más intenso que en las condiciones controles, sugiriendo un aumento en la expresión de estos genes por el ABA exógeno.

Los resultados descriptos hasta el momento indican que las plantas mutantes en cada uno de los genes *RPL10* presentan diferentes respuestas al ABA exógeno, sugiriendo que las proteínas *RPL10A-B-C* estarían diferencialmente involucradas en la señalización del ABA durante la germinación y el desarrollo temprano de las



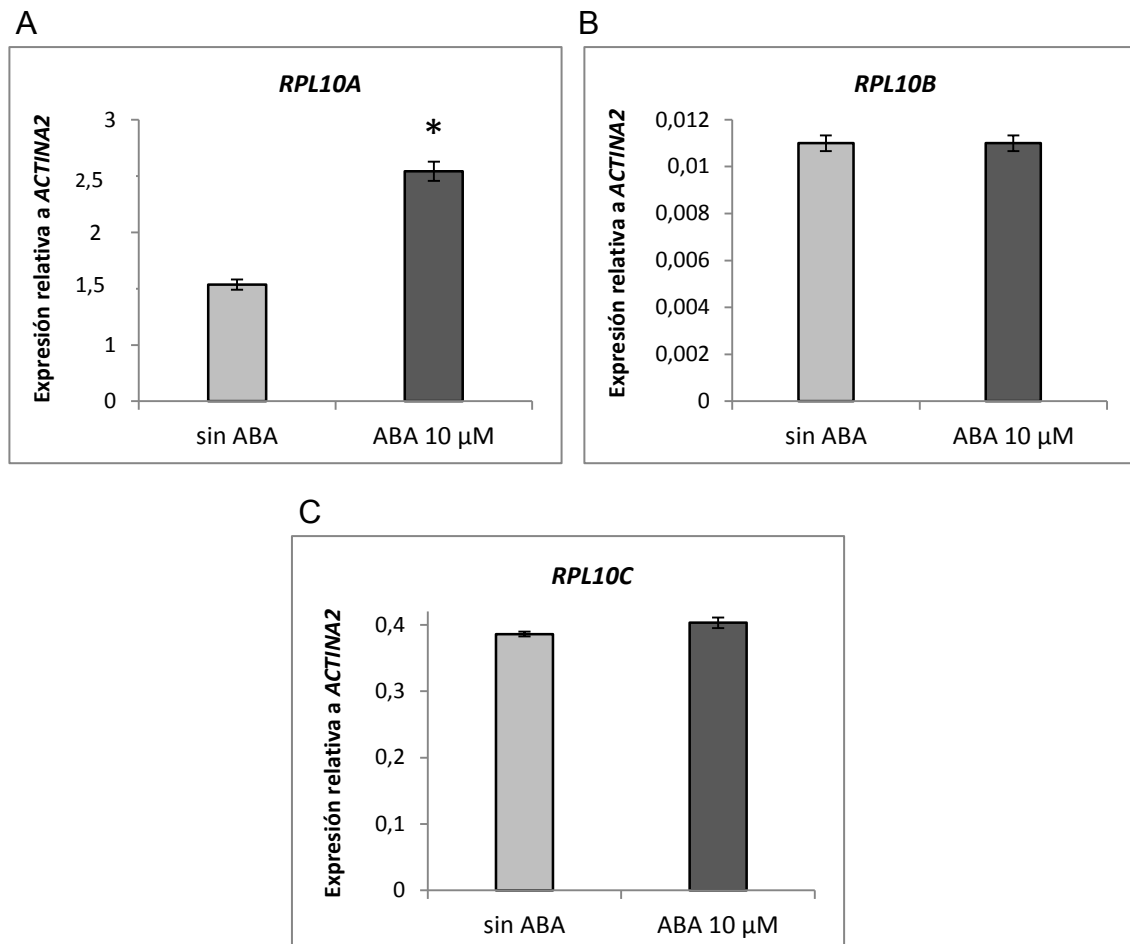
plántulas. Por tal motivo, a continuación procedimos a analizar si la expresión de los genes *RPL10A-B-C* es regulada por el ABA. Para esto, evaluamos mediante RT-PCR en tiempo real los niveles de los transcritos utilizando ADNc de plántulas de *Arabidopsis* salvajes crecidas en ausencia de ABA (condición control), recolectadas a los 4 días y de plántulas de *Arabidopsis* salvajes crecidas en presencia de ABA recolectadas a los 9 días, ambas correspondientes al estadio de cotiledones verdes completamente expandidos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen (descritos en la sección Materiales y Métodos) y, como gen normalizador se utilizó el gen que codifica para una proteína componente del citoesqueleto celular, *ACTINA2*. La Figura 26 muestra que la expresión de los tres genes *RPL10* es inducida por la presencia de ABA en similar magnitud (1,5 a 2 veces).



**Figura 26. Niveles relativos de los transcritos *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* en ausencia y en presencia de ABA.** Los niveles de los transcritos *RPL10A-B-C* en plántulas salvajes crecidas en ausencia y presencia de ABA 1  $\mu$ M se determinaron por RT-PCR en tiempo real. Para la normalización de los datos se utilizaron cebadores que amplifican el transcrita *ACTINA2*. Los asteriscos sobre las barras indican una diferencia estadísticamente significativa para cada genotipo entre las condiciones analizadas (Prueba T,  $P < 0,05$ ).

Posteriormente, para determinar si el ABA modula la expresión de los genes *RPL10* durante el crecimiento post-germinativo, plántulas salvajes de 7 días crecidas en ausencia de ABA fueron transferidas a medios MS-agar controles (sin ABA) y medios suplementados con ABA 10  $\mu$ M, como se describió en la sección Materiales y Métodos. Luego de 6 horas, se recolectó el tejido para la posterior extracción del ARN total y ensayos de RT-PCR en tiempo real para analizar la regulación de la expresión de los genes *RPL10* por el ABA. Como se observa en la Figura 27A, el

ABA exógeno induce la expresión de *RPL10A*, mientras que la expresión de *RPL10B* y *RPL10C* no se modifica por el ABA exógeno (Figura 27B y 27C). Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de los genes *RPL10B* y *RPL10C* por el ABA exógeno podría ser indirecta involucrando diferentes reguladores en la vía de señalización, en contraposición a la inducción de *RPL10A* cuyo nivel se incrementa a las 6 horas de aplicado el tratamiento.



**Figura 27. Niveles relativos de los transcritos *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* luego de transferencia a medio MS-agar (control) y a medios MS-agar suplementados con ABA 10 µM.** Los niveles de los transcritos *RPL10A-B-C* se determinaron por RT-PCR en tiempo real en plántulas salvajes de 7 días, crecidas en MS-agar y posteriormente transferidas a medios MS-agar en ausencia de ABA (control) y a medios MS-agar suplementados con ABA 10 µM. Para la normalización de los datos se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el transcrito *ACTINA2*. Las barras de error indican los errores estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones (Prueba T,  $P < 0,05$ ).

## PARTE II: Estudio de la contribución del factor de transcripción LIMYB en la respuesta a la radiación UV-B en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Como se describió en la Introducción, recientemente se propuso en plantas de *Arabidopsis* un mecanismo de respuesta al estrés biótico causado por la infección por Begomovirus que involucra al factor de transcripción LIMYB, reprimiendo la transcripción de genes de la maquinaria traduccional, originando la disminución de la traducción citosólica y, por ende, de la síntesis de proteínas del huésped, evitando así la reproducción viral (Zorzatto *et al.*, 2015). En esta parte del trabajo se procedió a analizar si el factor de transcripción LIMYB interviene en las respuestas al estrés abiótico causado por radiación UV-B en plantas de *A. thaliana*.

### 4.7- Identificación de plantas de *A. thaliana* mutantes en el gen *LIMYB*.

Para estudiar la participación del factor de transcripción LIMYB en las respuestas a la radiación UV-B en plantas de *A. thaliana*, se solicitó una línea de semillas mutantes por inserción del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* en este gen (Salk\_032054C) (Zorzatto *et al.*, 2015). Las plantas mutantes presentan la inserción del ADN-T en el cuarto exón del gen *LIMYB* (Figura 28).

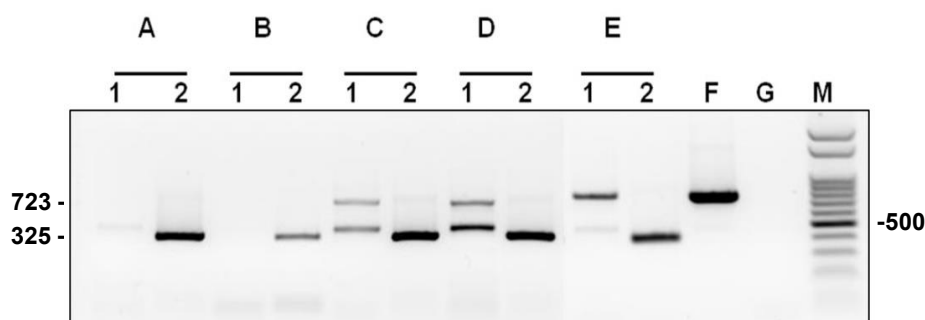


**Figura 28. Representación del gen *LIMYB* con la inserción de ADN-T.** Los rectángulos representan a los exones, en celeste se representan las regiones 5'UTR (izquierda) y 3'UTR (derecha) y en azul se representan las regiones codificantes. Las líneas azules indican a los intrones. El triángulo rojo representa al inserto de ADN-T y las flechas rojas simbolizan a los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR (estos últimos no se encuentran graficados a escala).

A continuación, se realizó la selección de las plantas de *Arabidopsis* homocigotas mutantes para el gen *LIMYB*. Para ello, se identificaron las plantas mutantes homocigotas mediante la técnica de PCR. Para cada muestra de ADN genómico, correspondiente a una planta, se realizaron dos reacciones de PCR distintas que diferían en el par de oligonucleótidos empleados.

Como se observa en la Figura 28, los oligonucleótidos directo (3') y reverso (5') hibridan en regiones que flanquean al sitio de inserción del ADN-T, mientras que el oligonucleótido BI (LB-Salk2) hibrida con el extremo izquierdo del ADN-T integrado en el gen de interés. Así, en las plantas homocigotas la presencia de ADN-T impide la amplificación del producto de PCR utilizando ambos cebadores específicos del gen, ya que el producto a amplificar es demasiado grande para las condiciones de PCR utilizadas. De este modo, de acuerdo al genotipo de cada planta analizada y al par de oligonucleótidos utilizados, pueden distinguirse las plantas mutantes *limyb* homocigotas de aquellas heterocigotas y salvajes. Para plantas salvajes, se observa sólo un producto de amplificación, correspondiente a la reacción de PCR que utiliza los cebadores directo y reverso específicos del gen. En el caso de las plantas homocigotas, solamente se evidencia presencia del producto en aquella reacción de PCR que emplee los oligonucleótidos BI y el reverso específico del gen, mientras que las plantas heterocigotas mutantes muestran producto para ambas reacciones de PCR.

En la Figura 29 se muestra, a modo de ejemplo, el patrón de bandas obtenido para cinco plantas (A-E), donde se observa que las plantas A y B son homocigotas y las plantas C, D y E son heterocigotas.

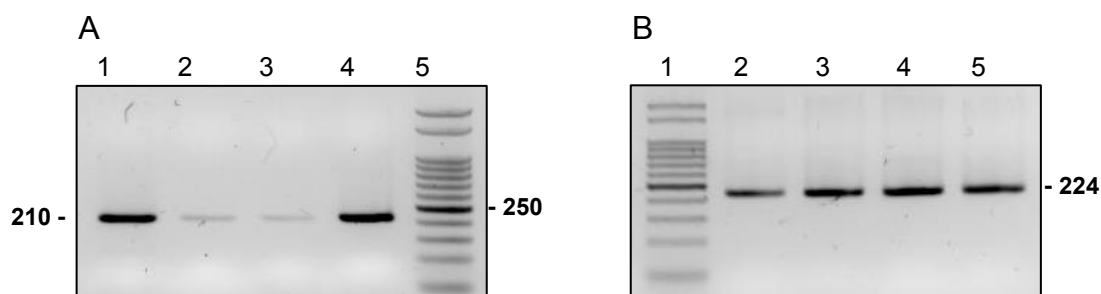


**Figura 29. Identificación de plantas de *A. thaliana* mutantes *limyb* por inserción de ADN-T.** Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v). Se muestra un gel representativo. Productos de la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos reverso (3') y directo (5') específicos del gen (reacción 1), y el oligonucleótido reverso (3') específico del gen y oligonucleótido BI específico del ADN-T (reacción 2). Se utilizó como molde el ADN genómico de cinco plantas independientes, denominadas A, B, C, D y E. Calle F: ADN genómico de una planta salvaje. Calle G: control negativo (sin ADN). Calle M: marcador de peso molecular de 100 pb. Los números a la izquierda y derecha de los gels indican los tamaños de los productos de PCR y del fragmento de 500 en pares de bases del marcador, respectivamente.

#### 4.8- Análisis de la expresión de *LIMYB* en plantas de *A. thaliana* mutantes y sobreexpresantes.

Con el propósito de analizar el nivel del transcripto *LIMYB* en las plantas mutantes homocigotas en comparación con las plantas salvajes, plantas de ambas líneas se crecieron en una cámara de cultivo y luego se realizaron experimentos de RT-PCR a partir de hojas de dichas plantas. De esta manera, al utilizar los oligonucleótidos directo y reverso específicos del gen *LIMYB* (Tabla II, Materiales y Métodos), se espera que en las plantas salvajes se obtenga un producto de PCR correspondiente a la amplificación de *LIMYB*, mientras que en las plantas mutantes *limyb* la ausencia o presencia del producto de PCR indicaría que las mismas son mutantes con ausencia o disminución del transcripto, respectivamente. Además, se utilizaron los oligonucleótidos directo y reverso específicos del gen *CBP20*, cuya amplificación se espera tanto en las plantas mutantes *limyb* como en las plantas salvajes por ser su expresión constitutiva.

La Figura 30 muestra la presencia de los productos de PCR para ambos genes tanto en las plantas salvajes como en las plantas mutantes *limyb*, no obstante, las bandas del producto de amplificación para *LIMYB* son más tenues en estas últimas.

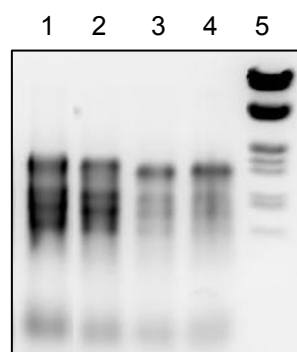


**Figura 30. Análisis de la expresión de *LIMYB* en las plantas de *A. thaliana* mutantes homocigotas *limyb*.** Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa 2% (p/v). **(A)** Productos de PCR utilizando los oligonucleótidos directo y reverso para el gen *LIMYB*. **(B)** Productos de PCR utilizando los oligonucleótidos directo y reverso para el gen *CBP20*. Calles 1 y 4: plantas salvajes independientes. Calles 2 y 3: plantas mutantes homocigotas *limyb* independientes. Calles 5: marcador de peso molecular de 50 pb. Los números a la izquierda y derecha de los geles indican los pesos moleculares de los productos de PCR y del fragmento de 250 en pares de bases.

Si bien puede observarse la presencia del transcripto *LIMYB* en las plantas mutantes para este gen (Figura 30A, calles 2 y 3), la secuenciación de los

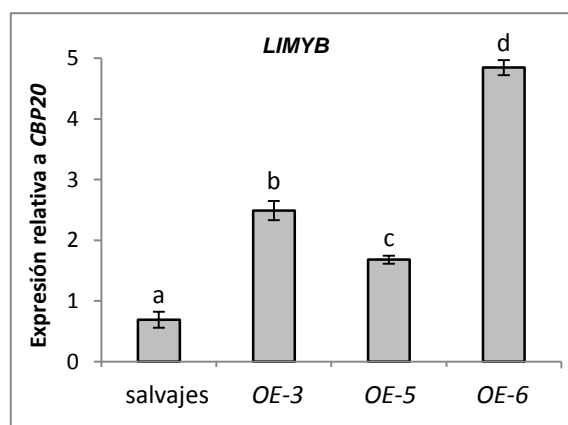
transcriptos *LIMYB* en las plantas mutantes *limyb*, reveló que los mismos poseen un intrón no procesado con codones *stop* (codones de terminación de la traducción) prematuros (Zorzatto *et al.*, 2015). Por dicho motivo, el transcripto *LIMYB* en las plantas mutantes *limyb* no codifica a una proteína funcional y, por lo tanto, las plantas mutantes homocigotas *limyb* son mutantes con pérdida de función.

Por otra parte, en el laboratorio disponíamos de semillas de plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobreexpresan el factor de transcripción *LIMYB* bajo el promotor constitutivo 35S (Zorzatto *et al.*, 2015). A continuación, se procedió a analizar la expresión del transgen *LIMYB* en estas plantas. Se analizaron tres líneas transgénicas independientes sobreexpresantes, *OE* (*over-expressing lines*), para *LIMYB*: *OE-3* (*over-expressing line 3*), *OE-5* (*over-expressing line 5*) y *OE-6* (*over-expressing line 6*). Las semillas fueron sembradas y crecidas en una cámara de cultivo y luego se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real. La calidad de los ARN obtenidos de dichas plantas se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) (Figura 31).



**Figura 31. Análisis de la integridad de ARN total de plantas de *A. thaliana* mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v).** Calle 1: ARN total extraído de plantas de la línea *OE-6*. Calle 2: ARN total extraído de plantas de la línea *OE-5*. Calle 3: ARN total extraído de plantas de la línea *OE-3*. Calle 4: ARN total extraído de hojas de plantas salvajes. Calle 5: marcador de masa molecular del fago  $\lambda$  digerido con enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

Posteriormente, se realizó la retrotranscripción del ARN total y se determinaron, mediante PCR en tiempo real, los niveles del transcripto *LIMYB*. Como puede observarse en la Figura 31, las tres líneas sobreexpresantes analizadas muestran un mayor nivel del transcripto *LIMYB* en comparación con el mismo en las plantas salvajes, siendo mayores los niveles en las líneas *OE-3* y *OE-6*.



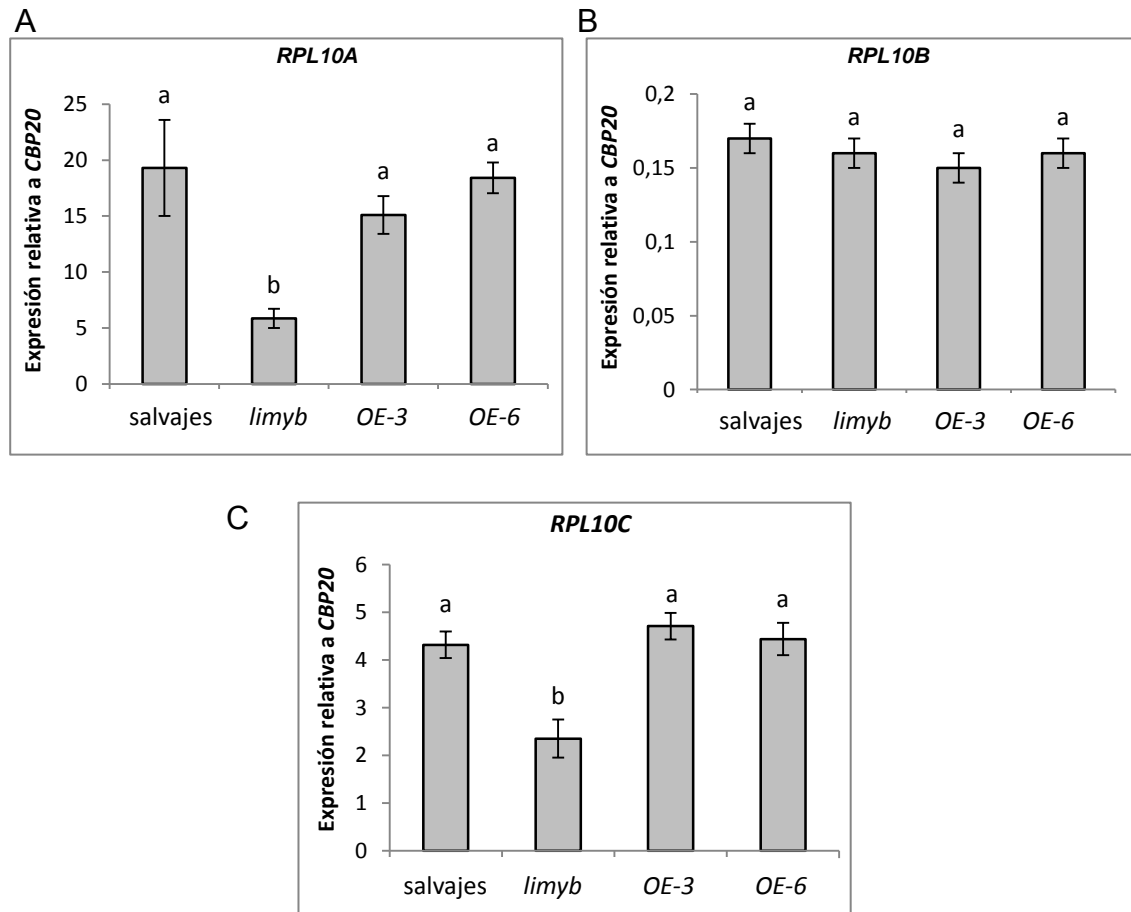
**Figura 31. Niveles relativos del transcrito *LIMYB* en las plantas de *A. thaliana* salvajes y transgénicas sobreexpresantes de *LIMYB* (OE-3, OE-5 y OE-6).** Niveles de los transcritos *LIMYB* determinados por RT-PCR en tiempo real. Para la normalización de los datos se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el transcrito *CBP20*. Letras distintas sobre las barras indican una diferencia estadísticamente significativa entre los genotipos (ANOVA a una cola, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

A partir de los resultados descritos en las líneas transgénicas sobreexpresantes disponibles, se seleccionaron las líneas que mostraron los mayores niveles del transcrito *LIMYB* (OE-3 y OE-6) para la realización de los siguientes experimentos.

#### **4.9- Estudio de la expresión de los genes *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* en plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes de *LIMYB*.**

A continuación, se procedió a analizar si la sobreexpresión o la ausencia del factor de transcripción *LIMYB* modifica la expresión de los genes que codifican para las proteínas ribosomales *RPL10A-B-C*. Para esto, las plantas de *Arabidopsis* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes de *LIMYB* se crecieron en una cámara de cultivo durante tres semanas. Al finalizar este periodo, se recolectaron las muestras de hojas y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización. Posteriormente, se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real. Como se detalla en Materiales y Métodos, se utilizaron oligonucleótidos que amplifican de manera específica los transcritos de cada uno de los tres genes *RPL10* de *Arabidopsis* y, como gen normalizador, *CBP20*. Como puede observarse en la Figura 32, la expresión de *RPL10A* es menor en las plantas mutantes *limyb*, mientras que no se observan diferencias significativas en las líneas sobreexpresantes con

respecto a la expresión observada en las plantas salvajes (Figura 32A). De igual manera, el nivel de transcripto *RPL10C* es menor en las plantas mutantes *limyb*, mientras que el nivel no se modifica en las líneas sobreexpresantes con respecto a las plantas salvajes (Figura 32C). Por otra parte, no se observan diferencias en la expresión de *RPL10B* entre los genotipos analizados (Figura 32B).



**Figura 32. Niveles relativos de los transcritos *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* en plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y transgénicas sobreexpresantes de *LIMYB*. (A, B y C) Niveles de los transcritos *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C*, respectivamente, determinados por RT-PCR en tiempo real. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativa entre los genotipos (ANOVA a una cola, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).**

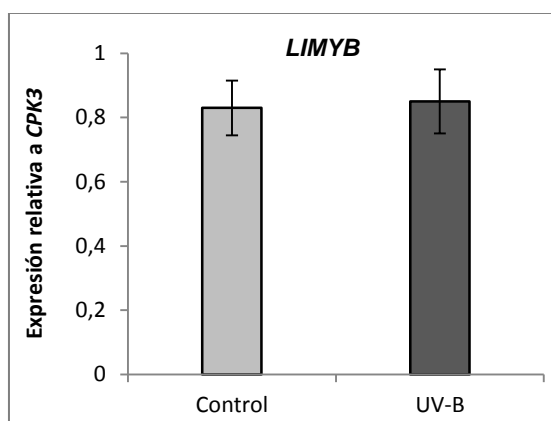
#### **4.10- Análisis de la expresión de *LIMYB* luego de la exposición a la radiación UV-B.**

Con el objeto de investigar si la expresión de *LIMYB* es regulada por la radiación UV-B, las plantas salvajes de *A. thaliana* se crecieron en una cámara de cultivo en ausencia de radiación UV-B durante 3 semanas y luego se dividieron en dos grupos,



uno se expuso a la radiación UV-B (plantas tratadas) y el segundo grupo se expuso a las mismas condiciones pero sin UV-B (plantas control) durante 4 horas (condiciones descritas en Materiales y Métodos). Posteriormente, se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real. Como gen normalizador se utilizó el gen que codifica para la proteína CPK3 (*calcium-dependent protein kinase 3*).

Como se puede ver en la Figura 33, no se observaron diferencias en el nivel del transcrito *LIMYB* entre las plantas tratadas con la radiación UV-B y las plantas controles, indicando que la expresión de este gen no es regulada por la radiación UV-B.



**Figura 33. Niveles relativos del transcrito *LIMYB* en respuesta a la radiación UV-B en plantas salvajes de *A. thaliana*.** Niveles de los transcritos *LIMYB* determinados por RT-PCR en tiempo real. Para la normalización de los datos se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el transcrito *CPK3*. Las barras de errores indican las desviaciones estándar de las muestras.

#### **4.11- Estudio de la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas ribosomales.**

Como se describió en la Introducción, se ha reportado que el grupo funcional con el mayor número de genes regulados por la radiación UV-B corresponde a proteínas involucradas en la traducción, lo que sugiere que la exposición de las plantas al UV-B solar exige un reajuste de la transcripción con la finalidad de mantener la homeostasis fisiológica y minimizar los impactos inhibitorios de la radiación UV-B en la tasa de crecimiento (Casati y Walbot, 2004; Ballaré, 2011). A continuación, se propuso analizar si la expresión de genes que codifican para las

proteínas ribosomales RPL4, RPL10A, RPL10B, RPL10C, RPL13, RPL28e, RPS3a y RPS25 de *A. thaliana*, componentes de la subunidad mayor (60S) y menor (40S) de los ribosomas citosólicos, es regulada por el UV-B tanto en las plantas salvajes de *A. thaliana* como en las plantas mutantes *limyb* y sobreexpresantes.

Para estudiar el efecto de la radiación UV-B sobre la expresión de genes que codifican para proteínas ribosomales de *A. thaliana*, las plantas salvajes se crecieron en una cámara de cultivo en ausencia de radiación UV-B. Luego, las plantas fueron expuestas a la radiación UV-B y, posteriormente, se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real, como se describió en el punto 4.10.

Los siguientes resultados muestran que la radiación UV-B regula positivamente la expresión de *RPL4* (aumenta 2,5 veces), *RPL13* (aumenta 1,6 veces) y *RPS25* (aumenta 2 veces) en plantas de *A. thaliana* salvajes (Figuras 34A, 34B y 34C). Por el contrario, la expresión de los genes *RPL28e* y *RPS13a* no es regulada por la radiación UV-B (Figuras 34E y 34F).

Además, como se demostró previamente (Falcone Ferreyra *et al.* 2010a), la expresión de *RPL10C* es inducida por el UV-B (aumenta 4 veces), *RPL10B* disminuye su expresión (4,6 veces), mientras que el nivel del transcrito *RPL10A* no se modifica por la exposición al UV-B (Figuras 34D, 34G y 34H).

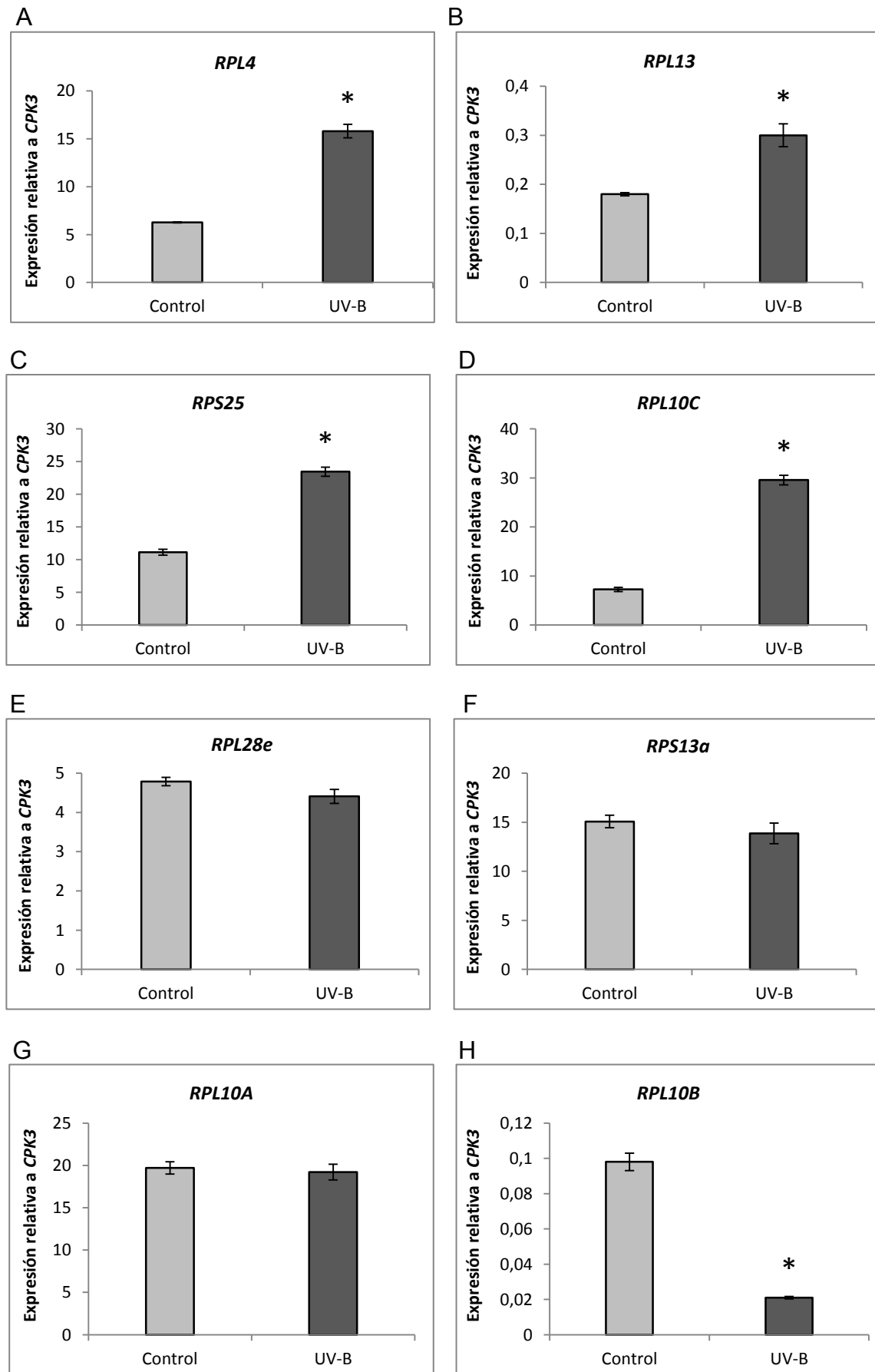
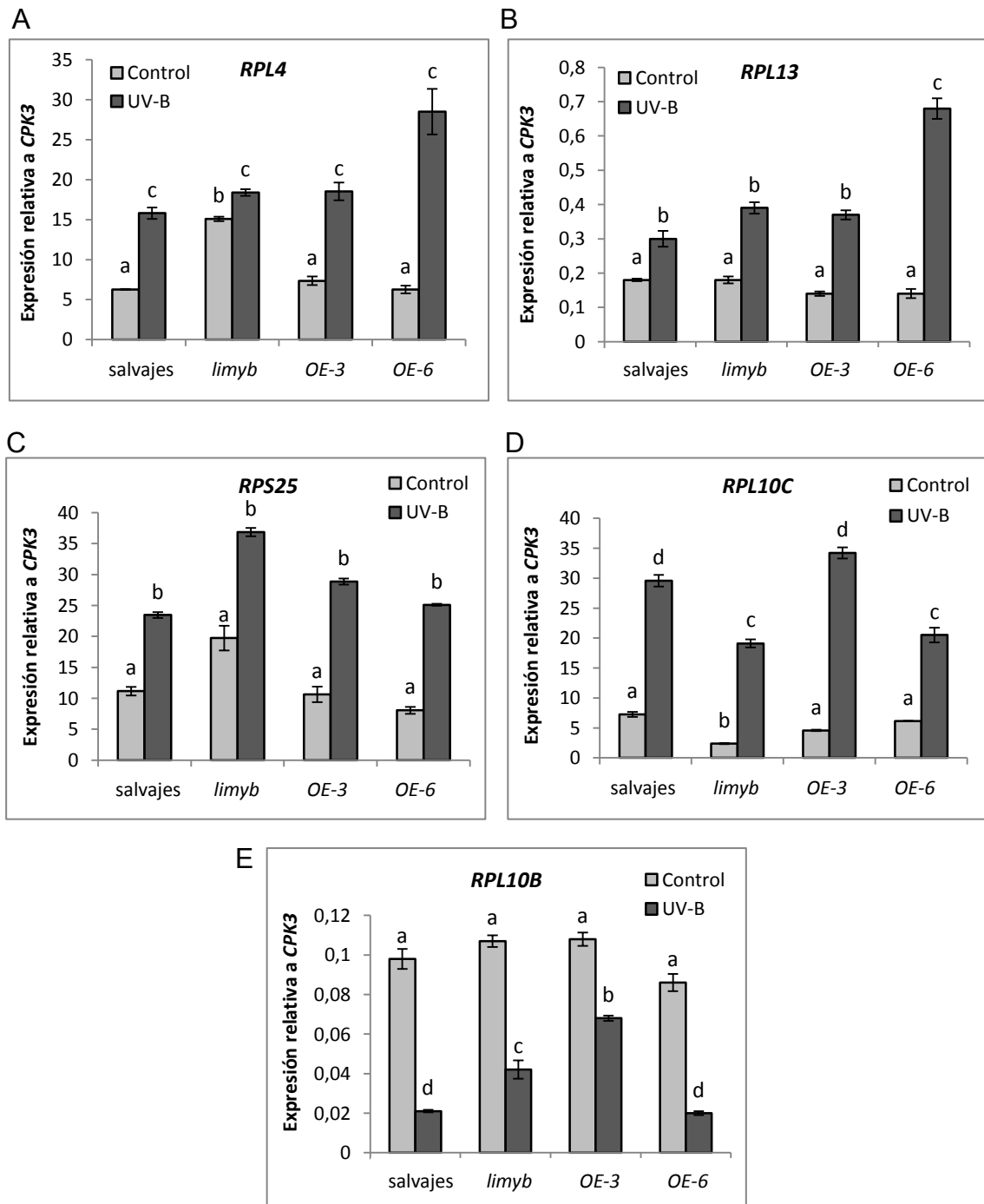


Figura 34. Niveles de los transcritos *RPL4*, *RPL13*, *RPS25*, *RPL10C*, *RPS13a*, *RPL28e*, *RPL10A* y *RPL10B* en las plantas salvajes de *A. thaliana* controles y

**expuestas a la radiación UV-B.** Los niveles de los transcritos fueron determinados por RT-PCR en tiempo real. Para la normalización de los datos se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el transcrito *CPK3*. Las barras de errores indican las desviaciones estándar de las muestras. Los asteriscos sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones (control y luego del tratamiento con UV-B) para cada genotipo (Prueba T,  $P < 0,05$ ).

Por otro lado, con el fin de analizar si la regulación de la expresión de los genes ribosomales por el UV-B se ve afectada por la sobreexpresión o la ausencia del factor de transcripción LIMYB, las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB se crecieron en una cámara de cultivo en ausencia de radiación UV-B. A continuación, las plantas se expusieron al UV-B y, posteriormente, se realizaron experimentos de RT-PCR en tiempo real, como se describió anteriormente.

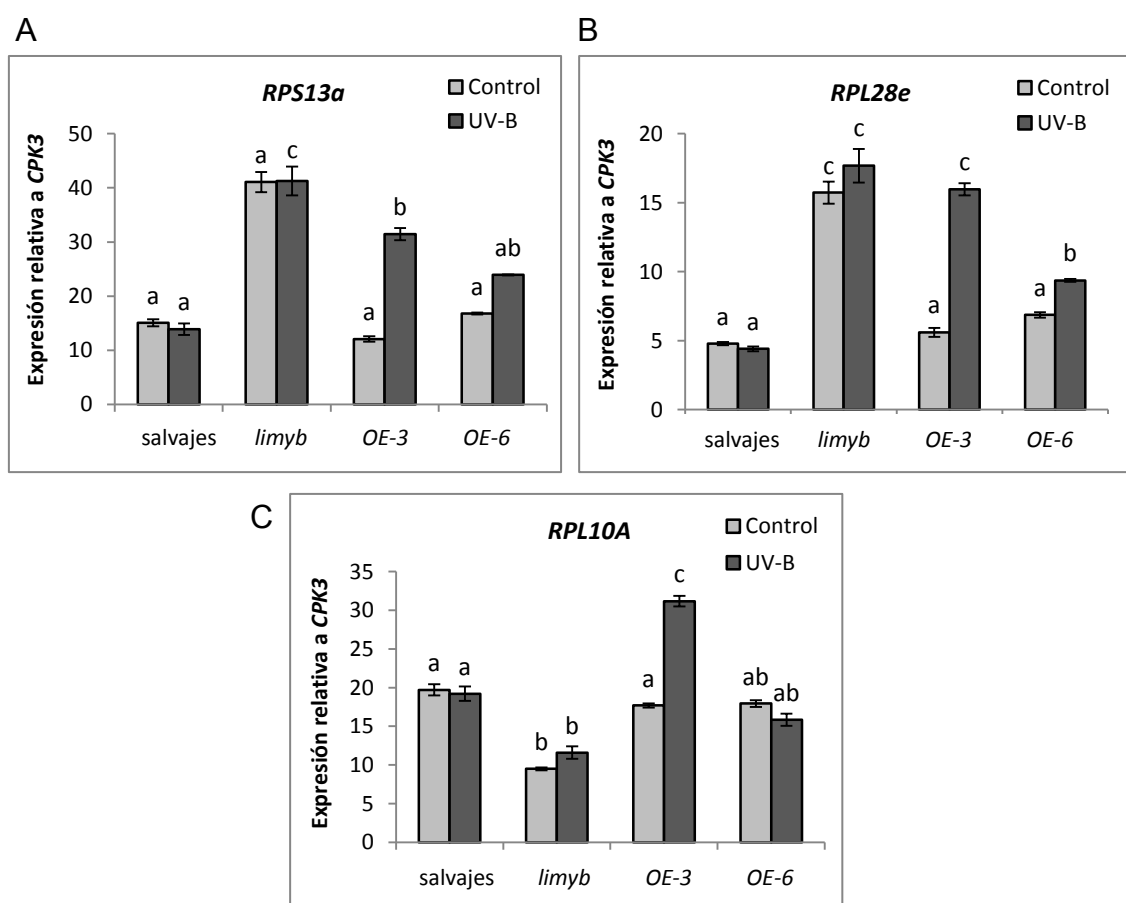
En la Figura 35 puede observarse que la regulación de la expresión de los genes *RPL4*, *RPL13*, *RPS25* y *RPL10C* por el UV-B no se modifica por la ausencia o sobreexpresión de LIMYB, siendo los niveles de los transcritos mayores en las plantas expuestas al UV-B con respecto a sus niveles en las plantas controles (Figuras 35 A-D). De manera similar, la expresión de *RPL10B* disminuye en las plantas mutantes *limyb* y en las sobreexpresantes, como ocurre en las plantas salvajes (Figura 35E).



**Figura 35.** Niveles de los transcritos *RPL4*, *RPL13*, *RPS25*, *RPL10B*, y *RPL10C* en las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB luego de la exposición al UV-B. Los niveles de los transcritos fueron determinados por RT-PCR en tiempo real. Para la normalización de los datos se utilizaron cebadores que amplifican el transcritto *CPK3*. Las barras de errores indican las desviaciones estándar de las muestras. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa (ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

Si bien los niveles de los transcritos *RPL28e* y *RPS25a* no se modifican por el UV-B en las plantas salvajes y en mutantes *limyb*, es interesante el hecho que sus

niveles se incrementan por el UV-B, en plantas que sobreexpresan LIMYB (Figuras 36A y 36B). Además, la expresión de RPL10A aumenta por la radiación UV-B solo en una de las líneas que sobreexpresan LIMYB (línea OE-3), mientras que los niveles del transcrito RPL10A no se modifica por el UV-B en las plantas mutantes *limyb* y en la línea OE-6, al igual que ocurre en las plantas salvajes (Figura 36C). Es importante destacar que, en ausencia de LIMYB, los niveles de transcritos de *RPL10A* y *RPL10C* son menores en comparación a sus niveles en las plantas salvajes en condiciones control, sugiriendo que LIMYB podría estar involucrado en la regulación de la expresión de estos genes (Figuras 32A, 32C, 35D y 36C).



**Figura 36.** Niveles de los transcritos *RPS13a*, *RPS28e* y *RPL10A* en respuesta a la radiación UV-B en plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB. Los niveles de los transcritos fueron determinados por RT-PCR en tiempo real. Para la normalización de los datos se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el transcrito *CPK3*. Las barras de errores indican las desviaciones estándar de las muestras. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa (ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

En síntesis, la regulación por el UV-B de la expresión de los genes codificantes

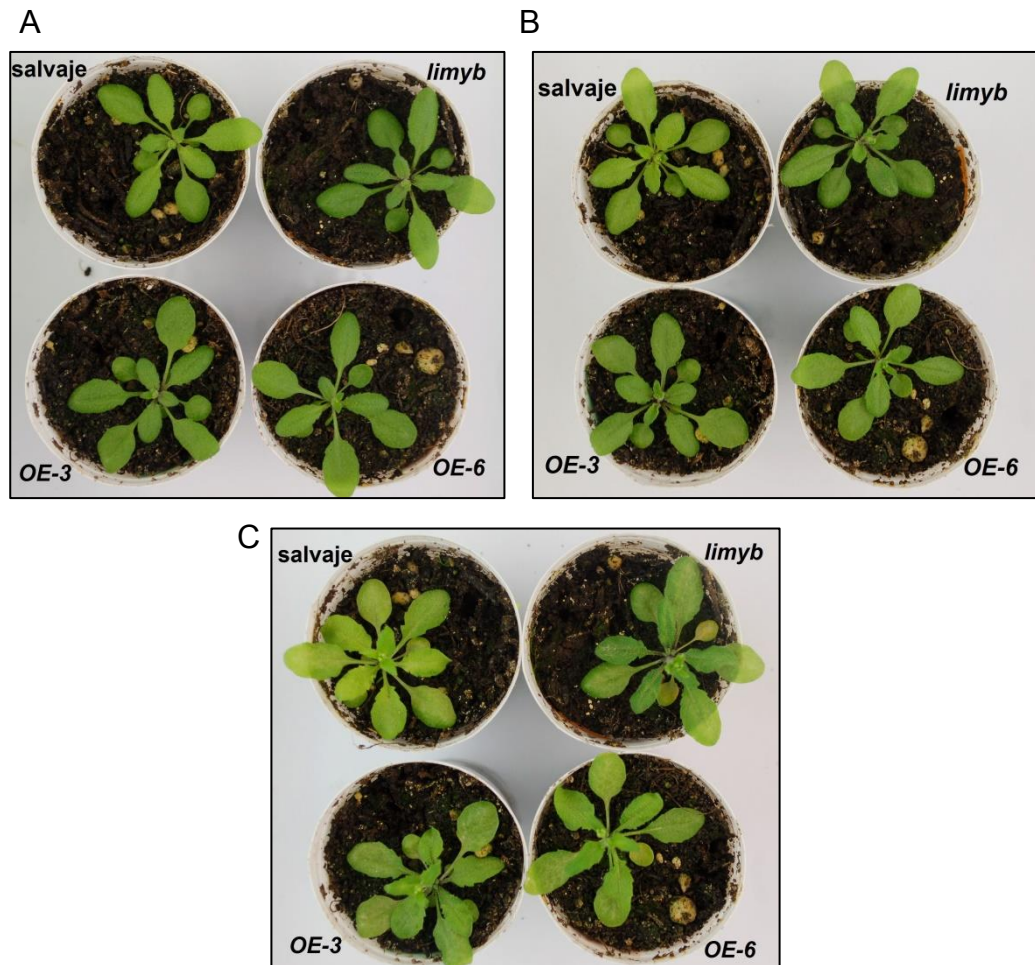
para las proteínas ribosomales estudiadas parece no modificarse mayormente por la ausencia o por la sobreexpresión de LIMYB.

#### **4.12- Análisis de la respuesta de plantas de *A. thaliana* mutantes *limyb* y sobreexpresantes frente a la radiación UV-B.**

Como se describió en la Introducción, la radiación UV-B produce efectos deletéreos en las diferentes macromoléculas biológicas como los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos y, afecta a los pigmentos fotosintéticos, ya sea teniendo un efecto directo sobre éstos o a través de la inhibición de su síntesis, afectando las enzimas involucradas (Casati y Walbot, 2004; Kataria *et al.*, 2014). Con el objetivo de analizar la tolerancia al estrés por la radiación UV-B en las plantas mutantes *limyb* y las plantas sobreexpresantes de LIMYB, se determinaron los siguientes parámetros indicativos de daño oxidativo: los niveles de las clorofilas a y b, el porcentaje de liberación de electrolitos y el contenido de proteínas totales. Para esto, las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB se crecieron en cámara de cultivo en ausencia de radiación UV-B y, a continuación, se realizó el tratamiento con radiación UV-B, descrito anteriormente en Materiales y Métodos.

Posteriormente, se realizaron las mediciones de cada uno de los parámetros mencionados en las muestras de hojas recolectadas a distintos tiempos post-tratamiento. Para ello, se recolectaron muestras de hojas al finalizar el tratamiento (tiempo 0) y, posteriormente, se recolectaron muestras de a las 24 horas y 96 horas luego de finalizado el tratamiento.

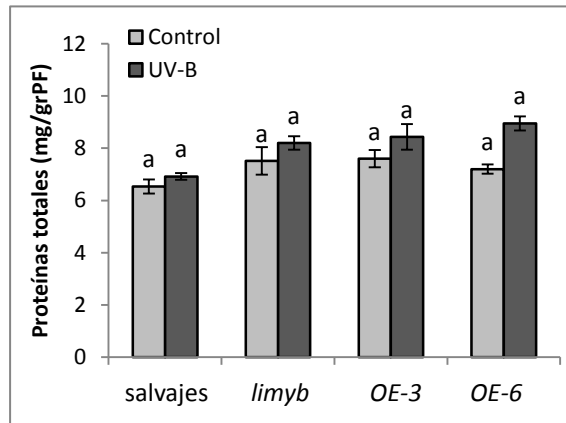
Como se puede ver en la Figura 37, no se observaron diferencias fenotípicas visibles en cuanto al daño visible y necrosis entre las plantas salvajes, las plantas mutantes *limyb* y las plantas sobreexpresantes para LIMYB a los tiempos post-tratamiento analizados.



**Figura 37. Observación fenotípica de las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB. (A) Al finalizar el tratamiento con UV-B, (B) 24 horas luego del tratamiento con UV-B y (C) 96 horas luego del tratamiento con UV-B.**

Con el objetivo de analizar si el contenido de proteínas totales varía diferencialmente por la exposición a la radiación UV-B en las plantas mutantes y sobreexpresantes en comparación con las plantas salvajes, se realizaron extractos de proteínas totales y se cuantificaron sus niveles. No se observaron diferencias significativas en la cantidad (mg/gr de peso fresco) de las proteínas totales en las plantas controles y expuestas al UV-B en todos los genotipos analizados (Figura 38).

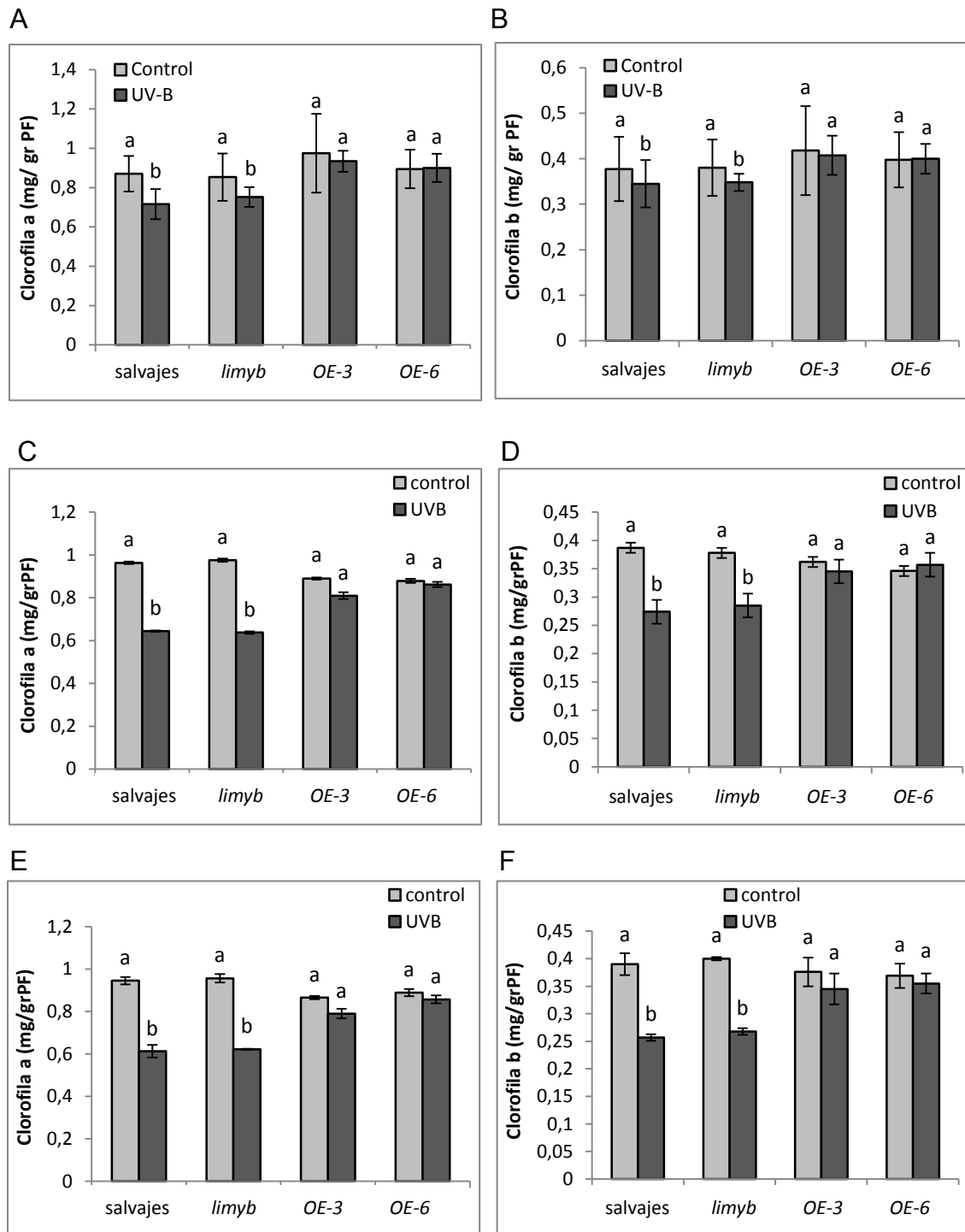




**Figura 38. Contenido de proteínas totales en las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB.** La determinación fue realizada en plantas no expuestas al UV-B (control) y en las plantas expuestas al UV-B. Las barras de error indican las desviaciones estándar de las muestras. Las letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas (ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

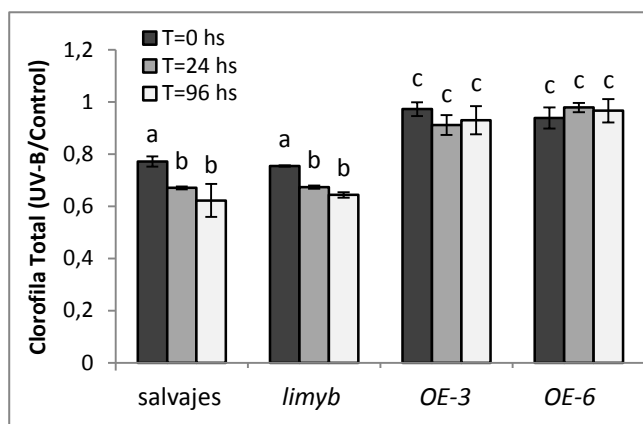
Para evaluar si el contenido de clorofilas se modifica diferencialmente luego de la exposición a la radiación UV-B en las plantas mutantes *limyb* y las sobreexpresantes para LIMYB con respecto a las plantas salvajes, se realizó la determinación del contenido de clorofilas a y b, como se describe en Materiales y Métodos, en muestras de hojas recolectadas al finalizar el tratamiento con radiación UV-B, y también en muestras de hojas recolectadas 24 y 96 horas luego de finalizado el tratamiento.

Los resultados muestran igual disminución en el contenido de clorofilas a y b (mg/gr de peso fresco) luego del tratamiento con UV-B, tanto en las plantas salvajes como en las plantas mutantes *limyb*, mientras que en las plantas OE el contenido de clorofilas no disminuye luego del tratamiento con UV-B. Esta diferencia se observa tanto al finalizar el tratamiento como a las 24 y 96 horas posteriores (Figura 39).



**Figura 39. Contenido de clorofilas en las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y en las sobreexpresantes para LIMYB. (A, B)** Contenido de clorofila a y clorofila b al finalizar el tratamiento con UV-B, respectivamente. **(C, D)** Contenido de clorofila a y contenido de clorofila b 24 horas luego de finalizado el tratamiento con UV-B, respectivamente. **(E, F)** Contenido de clorofila a y clorofila b 96 horas luego de finalizado el tratamiento con UV-B, respectivamente. Las determinaciones se realizaron en las plantas control y en las plantas tratadas con UV-B. Las barras de error indican las desviaciones estándar de las muestras. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

En la Figura 40 se presenta una síntesis de estos resultados, pudiéndose observar que, luego de la exposición a la radiación UV-B, en las plantas de *Arabidopsis* salvajes y mutantes *limyb* el contenido de clorofila total disminuye, siendo los valores de la relación UV-B/control menores a 1. Por el contrario, en las plantas que sobreexpresan LIMYB el contenido de clorofilas no se modifica, observándose valores de la relación UV-B/control cercanos a 1.

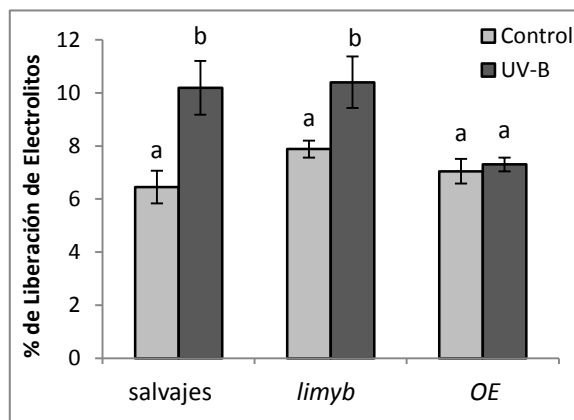


**Figura 40.** Contenido total de clorofilas en las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes de LIMYB luego de la exposición al UV-B. Los valores son expresados como la relación UV-B/control para cada genotipo en cada tiempo analizado. Las barras de error indican las desviaciones estándar de las muestras. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

La radiación UV-B puede provocar un aumento en la permeabilidad de las membranas debido al daño oxidativo en los lípidos causado por las especies reactivas del oxígeno, EROs, formados (Murphy, 1983), resultando en una mayor liberación de iones y electrolitos al medio. Así, la medida de la pérdida de electrolitos es un parámetro que se utiliza para estimar la integridad de las membranas. Por ello, se determinó el porcentaje de liberación de electrolitos en las plantas salvajes, las plantas *limyb* y las sobreexpresantes de LIMYB en condiciones control en ausencia de UV-B y luego de un tratamiento de 4 horas con esta radiación. La determinación de este parámetro se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

La Figura 41 muestra el porcentaje de electrolitos liberados en las plantas controles y expuestas al UV-B. En las plantas salvajes y las mutantes *limyb*, la

liberación de electrolitos aumenta significativamente luego de la exposición al UV-B, por el contrario, en las plantas *OE-3* la liberación de electrolitos no varía luego de la exposición UV-B.



**Figura 41. Porcentaje de liberación de electrolitos en las plantas de *A. thaliana* salvajes, mutantes *limyb* y sobreexpresantes para LIMYB al finalizar el tratamiento con UV-B.** Las barras de error indican las desviaciones estándar de las muestras. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA a dos colas, test de Tukey,  $P < 0,05$ ).

En resumen, los resultados obtenidos de los análisis del contenido de clorofilas y del daño a las membranas, sugieren que la sobreexpresión del factor de transcripción LIMYB confiere cierto grado de tolerancia a las plantas de *Arabidopsis* frente al daño oxidativo inducido por la radiación UV-B, mientras que la ausencia de LIMYB no modifica la sensibilidad de las plantas a la radiación.

## 5- DISCUSIÓN

### **5.1- Estudio de la participación de las proteínas ribosomales RPL10s en el desarrollo y en la señalización del ácido abscísico en *Arabidopsis thaliana*.**

Las proteínas ribosomales son constituyentes de los ribosomas y su rol principal es participar en el proceso de traducción, sin embargo, se han descrito numerosas funciones extra-ribosomales para las mismas. Existen algunas evidencias que indican que las proteínas ribosomales están involucradas en las respuestas a hormonas y en los procesos de desarrollo, tales como la germinación, la formación de las hojas y la floración (Byrne, 2009; Rosado *et al.*, 2012). Recientemente, un rol extra-ribosomal fue demostrado en plantas de *Arabidopsis* para la proteína RPL24B, siendo la misma requerida tanto en la biogénesis como en el control de los niveles de los microARNs (Li *et al.*, 2017). Por otra parte, la caracterización de plantas de *Arabidopsis* mutantes (dobles y triples), así como también la complementación observada entre genes parálogos demuestra diversos grados de redundancia entre los miembros de las familias de las proteínas ribosomales, pudiendo así actuar de manera específica en diferentes puntos del desarrollo, en diferentes tejidos o bajo alguna condición de estrés (Briggs *et al.*, 2006; Horiguchi *et al.*, 2012; Stirnberg *et al.*, 2012).

Previamente, se demostró que los genes *RPL10* de *A. thaliana* no son funcionalmente equivalentes (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010a). Las plantas mutantes *rpl10A* homocigotas no son viables, siendo *RPL10A* esencial para el desarrollo del gametofito femenino (Imai *et al.*, 2008; Falcone Ferreyra *et al.*, 2010b). Las plantas mutantes homocigotas con niveles disminuidos de *RPL10B* exhiben un crecimiento y desarrollo anormal tanto en su etapa vegetativa como reproductiva, indicando que *RPL10B* tiene una participación específica y esencial en el crecimiento de la planta. Por el contrario, las plantas mutantes *rpl10C* homocigotas no presentan fenotipos anormales visibles bajo condiciones estándares de crecimiento (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010b). Con el fin de investigar los roles de los genes *RPL10s* de *A. thaliana* en el desarrollo, en el presente trabajo, se analizó en primer lugar la capacidad germinativa de las plantas de *Arabidopsis* mutantes simples en cada uno de los tres genes *RPL10*. Como se describió en la sección Resultados, las plantas mutantes

*rpl10B* exhibieron un retraso en la germinación en todos los tiempos analizados (Figura 10B). Las plantas mutantes heterocigotas para *RPL10A* y las plantas mutantes *rpl10B* mostraron un menor desarrollo post-germinativo (Figura 12A y 12B). Por el contrario, las plantas mutantes homocigotas *rpl10C* no mostraron alternaciones en su desarrollo en comparación con las plantas salvajes (Figura 10C y Figura 12C). Más aún, las plantas mutantes en cada uno de los genes *RPL10* exhibieron una menor elongación de la raíz primaria (Figura 13). De esta manera, las diferencias observadas entre las plantas mutantes *rpl10A*, *rpl10B* y *rpl10C*, sugieren que estas proteínas contribuirían de manera diferencial en la germinación y el desarrollo temprano.

Estudios previos reportaron que las proteínas ribosomales controlan programas de desarrollo mediados por auxinas, mediante la regulación de la traducción de los factores de respuesta a auxinas (Rosado *et al.*, 2012). Más aún, se reportó que la proteína RACK1, un constituyente de los ribosomas citosólicos, es un importante regulador negativo de las respuestas que involucran a la hormona ácido abscísico (ABA) (Guo *et al.*, 2011). En este trabajo se analizó la sensibilidad de las plantas mutantes simples *rpl10A-B-C* al tratamiento con la hormona ABA, observándose que las plantas mutantes *rpl10A* poseen una mayor tasa de germinación y de desarrollo de cotiledones verdes que las plantas salvajes, de esta manera, son menos sensibles al ABA, ensayado aquí a una concentración intermedia (Figura 14A, Figura 16A, Figura 17A, Figura 18B y Figura 19A). Por el contrario, las plantas mutantes *rpl10B* y *rpl10C* mostraron una mayor sensibilidad al ABA, presentando menores porcentajes de germinación y de cotiledones verdes desarrollados que las plantas salvajes (Figura 14B-C, Figura 16B-C, Figura 17B-C, Figura 18B y Figura 19B-C). Más aún, las mismas exhibieron una mayor inhibición de la elongación de la raíz primaria por el ABA exógeno en comparación con las plantas salvajes (Figura 20C-D, Figura 20E-F, respectivamente), mientras que un efecto contrario se observó en las plantas mutantes *rpl10A* en comparación con las plantas salvajes en la respuesta a dicha hormona (Figura 20A-B).

Por otra parte, al analizar la expresión de los genes *RPL10A-B-C* en las plantas de *A. thaliana* transgénicas que poseen la fusión del promotor de cada uno de los genes *RPL10* al gen reportero que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), se observó diferentes patrones de expresión de los genes *RPL10s*. La expresión de

*RPL10A* y *RPL10B* se detectó tanto durante el desarrollo germinativo como durante el desarrollo post-germinativo; *RPL10A* se observó en las radículas de semillas germinadas, en la raíz primaria, en el hipocótilo, los cotiledones y las primeras hojas de plántulas; mientras que la expresión de *RPL10B* es predominante en el hipocótilo y las raíces primarias, confinándose la mayor expresión en las puntas de las mismas (Figuras 23 y 24, respectivamente). A diferencia de *RPL10A*, la expresión de *RPL10B* es más débil en los cotiledones y en las primeras hojas (Figura 24). El hecho de que la expresión de *RPL10B* se observe casi exclusivamente en los tejidos vasculares indicaría la importancia de *RPL10B* en el proceso de germinación y en la elongación de la raíz primaria, siendo las plantas mutantes en este gen las que presentaron las mayores anomalías en estos procesos, tanto en presencia como en ausencia de ABA. Por el contrario, la expresión de *RPL10C* no se observó en las semillas germinadas. Sin embargo, durante el desarrollo post-germinativo, *RPL10C* se expresa en las raíces de las plántulas en el estadio de cotiledones completamente expandidos, aunque más tenue que los otros genes *RPL10s*. (Figura 25)

De manera similar, al evaluarse la expresión de los genes *RPL10A-B-C* en las mismas líneas transgénicas en presencia de ABA, se observó que la expresión de los genes *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* es similar a la observada en ausencia de ABA (condición control). Sin embargo, se puede visualizar un color azul levemente más intenso que en las condiciones controles, sugiriendo un aumento en la expresión de estos genes por el ABA exógeno.

Cabe mencionar que en bases de datos de microarreglos de *Arabidopsis* se observa la expresión de *RPL10A*, *RPL10B* y *RPL10C* en los cotiledones, el hipocótilo y las raíces, siendo los transcritos de *RPL10A* y *RPL10C* los mayoritarios y en menor proporción el transcrito *RPL10B* (Figura 22C) (Winter *et al.*, 2007; Petryszak *et al.*, 2016), en concordancia con los niveles de los transcritos *RPL10* previamente determinados por RT-PCR en tiempo real (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010b). Por lo tanto, la escasa o la ausencia de detección de la expresión de *RPL10C* en las plántulas podría deberse a una incorrecta expresión del transgen en las plantas transgénicas utilizadas, siendo posible que el transcrito *RPL10C* esté presente en estos tejidos. Alternativamente o adicionalmente, la ausencia de detección de la expresión por esta técnica podría estar limitada a la región del promotor utilizada para la generación de las plantas transgénicas de manera tal que

regiones adicionales sean necesarias para la expresión y/o regulación de *RPL10C*. De esta forma, no se descarta que la sensibilidad del método sea la limitante en la detección de la expresión, mayormente cuando la misma no es elevada. Asimismo, no puede excluirse que estas causas también ocurran en las plantas transgénicas *RPL10A<sub>pro</sub>:GUS* y *RPL10B<sub>pro</sub>:GUS*.

Adicionalmente, el análisis de los niveles de los transcritos *RPL10A-B-C* mediante RT-PCR en tiempo real mostró que los mismos incrementan en presencia de ABA con respecto a sus niveles en ausencia de la hormona, indicando que la expresión de los tres genes es regulada positivamente por el ABA (Figura 26). Sin embargo, la determinación de los niveles de los transcritos *RPL10s* en plántulas crecidas en ausencia de ABA y transferidas a los 7 días a medios suplementados con ABA, mostró que sólo la expresión de *RPL10A* se induce a las 6 horas posteriores a la transferencia (Figura 27). Esto sugiere que la inducción de la expresión de los genes *RPL10B* y *RPL10C* por el ABA exógeno podría ser indirecta, en contraste a la inducción de *RPL10A*, involucrando diferentes reguladores en la vía de señalización y/o la participación de otras vías hormonales interconectadas con la del ABA.

En los últimos años, se han descrito componentes claves en la señalización del ABA. Se ha demostrado que las quinasas SnRK son reguladores positivos de la señalización del ABA durante la germinación y el desarrollo temprano, siendo su expresión fuertemente inducida por el ABA (Hubbard *et al.*, 2010). Estas quinasas son capaces de activar diversos factores de transcripción (FT) como, por ejemplo, ABI3, ABI4 o ABI5 (*ABA-insensitive 5*), cuyas mutaciones resultan en fenotipos insensibles al ABA durante la germinación y el desarrollo temprano (Finkelstein y Lynch, 2000; Feng *et al.*, 2014). Además, ABI1 y ABI2, fosfatasa 2C capaces de desactivar a las quinasas SnRK en ausencia de ABA, regulan negativamente las respuestas al ABA durante la germinación y el desarrollo temprano (Rubio *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2011). Asimismo, las fosfatasa 2C son inhibidas mediante la interacción con proteínas receptoras PYR/PYL1/RCAR, las cuales constituyen un grupo de receptores de ABA que median la respuesta a esta hormona (Park *et al.*, 2010).

El factor de transcripción ABI5, al igual que otros FT llamados ABFs (*ABRE-Binding Factors*), pertenecen a la familia de dominio bZIP (*basic leucine zipper*)



(Finkelstein y Lynch, 2000; Feng *et al.*, 2014). Los dominios bZIP participan en la unión de los FT a los elementos de respuesta al ABA o ABRE (*ABA-Responsive Element*), secuencias conservadas presentes en las regiones promotoras de los genes blanco, activando así su expresión (Feng *et al.*, 2014; Yoshida *et al.*, 2015). El análisis *in silico* de los promotores de cada uno de los genes *RPL10* (AGRIS, AthaMap, PlantPAN2.0) (Tabla V) muestra que los genes *RPL10A* y *RPL10B* poseen elementos ABRE en sus promotores. Por tal motivo, una hipótesis posible es que la presencia de estos sitios podría indicar que factores de transcripción como ABI5 o ABFs, regulen directamente la expresión de *RPL10A* y *RPL10B*. Esta hipótesis es coincidente con la inducción de la expresión de estos genes *RPL10s* observada por el agregado de ABA exógeno.

No obstante, no todos los genes regulados por ABA poseen sitios ABRE en sus promotores, la señalización del ABA involucra, además, diversos tipos de FTs tales como: NACs, MYCs, MYBs, ERFs (factores de respuesta al etileno, *Ethylene-Responsive Factors*) y WRKYs (Du *et al.*, 2013; Sah *et al.*, 2016). Al respecto, es interesante destacar que el análisis *in silico* de los promotores de los tres genes *RPL10*, permitió la identificación de sitios de unión a varios FT (Tabla V), como RAV1 (perteneciente a la familia ABI3/VP1, *Related to ABI3 VP1*) y WRKY18, ambos reguladores negativos de la señalización del ABA que actúan corriente arriba de AB3/ABI4/ABI5 (Sah *et al.*, 2016); NAC46/55; TOE1/2 (pertenecientes a la familia AP2/EREBF, *Apetala2/Ethylene-Responsive Element Binding*); MYC2 y MYB52 (pertenecientes a la familia bHLH, *basic helix loop helix*), entre otros. Por lo tanto, otra hipótesis posible es que la regulación de los genes *RPL10s* por ABA sea compleja e involucre múltiples FTs y más de una vía. Por ejemplo, para el caso de RAV-1, diversos estudios demostraron que este factor de transcripción regula negativamente la expresión de *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* (Ikeda y Ohme-Takagi, 2009; Feng *et al.*, 2014). Se demostró que plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *RAV1* son insensibles al ABA exógeno, mientras que las plantas mutantes en este factor de transcripción son más sensibles, sugiriendo que RAV1 es un regulador negativo en la señalización del ABA. Más aún, la actividad de RAV1 es regulada post-traduccionalmente de manera negativa mediante fosforilación por quinasas SnRK (Feng *et al.*, 2014). Por otro lado, los FT WRKY18, WRKY40 y WRKY60 son otro ejemplo de reguladores negativos de la vía de señalización del ABA, cuyas mutaciones produce un fenotipo de hipersensibilidad al ABA, y se ha demostrado

que los mismos se unen a las secuencias W-box en los promotores de los genes *ABI4* y *ABI5*, inhibiendo su expresión (Liu *et al.*, 2013).

En base a la información descrita anteriormente, en ausencia de ABA, RAV1 y/o WRKY18, podrían estar regulando negativamente la expresión de *RPL10A-B-C* mientras que, en presencia de ABA, la regulación negativa de la expresión de *RPL10A-B-C* no ocurriría; en consecuencia, los niveles de los transcritos se incrementan. Esto sería coincidente con la inducción de la expresión de los tres genes *RPL10s* que se observó por el agregado de ABA exógeno.

**Tabla V:** Análisis *in silico* de los promotores de cada gen *RPL10*. Bases de datos utilizadas como fuentes: AGRIS (*Arabidopsis Gene Regulatory Information Server*), AthaMap y PlantPAN2.0. Se muestran los sitios/motivos de unión a FT presentes en el promotor de cada gen *RPL10*. En la columna familia, entre paréntesis, se indican los FTs putativos de unión a los sitios.

<i>RPL10A</i> (At1g14320)	<i>RPL10B</i> (At1g26910)	<i>RPL10C</i> (At1g66580)	Familia	Roles
MYC2 <i>binding site motif</i>		MYC2 <i>binding site motif</i>	bHLH (MYC2)	Respuesta al ABA, degradación de clorofila.
	ABRE <i>binding site motif</i>		bZIP (ABF, ABI5)	Respuesta al ABA
ABRE-like sequence (ABRELATERD1)	ABRE-like sequence (ABRELATERD1)		bZIP (ABF, ABI5)	Respuesta al ABA
W-box <i>binding site motif</i>	W-box <i>binding site motif</i>	W-box <i>binding site motif</i>	WRKY (WRKY18)	Regulador negativo en señalización del ABA.
RAV1 <i>binding site motif</i>	RAV1 <i>binding site motif</i>	RAV1 <i>binding site motif</i>	ABI3/VP1 (RAV1)	Regulador negativo en señalización del ABA.
NAC <i>binding site motif</i>	NAC <i>binding site motif</i>	NAC <i>binding site motif</i>	NAC (ANAC46)	Senescencia, degradación de clorofilas.
NAC <i>binding site motif</i>	NAC <i>binding site motif</i>	NAC <i>binding site motif</i>	NAC (ANAC55)	Senescencia, degradación de clorofilas.
TOE1/2 <i>binding site motif</i>	TOE1/2 <i>binding site motif</i>	TOE1/2 <i>binding site motif</i>	AP2/EREB P (TOE1/2)	Respuesta a estrés, floración.

REM1 <i>binding site motif</i>	REM1 <i>binding site motif</i>	REM1 <i>binding site motif</i>	ABI3/VP1 (REM1)	Desarrollo.
MYB52 <i>binding site motif</i>	MYB52 <i>binding site motif</i>	MYB52 <i>binding site motif</i>	bHLH (MYB52)	Regulador negativo en la señalización del ABA.
ARF1 <i>binding site motif</i>	ARF1 <i>binding site motif</i>	ARF1 <i>binding site motif</i>	ABI3/VP1 (ARF1)	Señalización de auxinas.

Los resultados obtenidos con las plantas mutantes *rp10s* en este trabajo sugieren que RPL10A actuaría como un regulador positivo que media las respuestas al ABA durante la germinación y el desarrollo temprano. Así, las plantas mutantes *rp10A* son menos sensibles al ABA que las plantas salvajes. Por otro lado, RPL10B parece tener un rol importante en la germinación y en el desarrollo post-germinativo temprano. Así, las plantas mutantes *rp10B* presentan un marcado retraso en la germinación, una reducción en la capacidad germinativa y sustanciales alteraciones en el desarrollo. Además, RPL10B actuaría como un regulador negativo en la señalización del ABA, dada la marcada hipersensibilidad al ABA de las plantas mutantes *rp10B* en comparación con las plantas salvajes. En cuanto a RPL10C, esta proteína tendría un rol solo durante las primeras horas del proceso de germinación. Si bien las plantas mutantes *rp10C* presentaron un fenotipo de hipersensibilidad al ABA, el mismo no es tan marcado en la germinación y en el desarrollo post-germinativo como en el caso de las mutantes *rp10B*. En las raíces, sin embargo, las mutantes *rp10C* son más sensibles al efecto inhibitorio del ABA en comparación con las plantas salvajes, indicando que RPL10C tendría un rol en la señalización del ABA mayormente confinado a las raíces. Más aún, *RPL10C* ha sido reportado como un gen SAG (*Senescence-Associated Gene*), cuya expresión es inducida durante el proceso de senescencia de las hojas (Ay *et al.*, 2009). Así, por ejemplo, la inducción de *RPL10C* por ABA podría deberse a su rol en dicho proceso.

Por otra parte, existen otros mecanismos post-traduccionales de regulación en la vía de señalización del ABA, además de la fosforilación y desfosforilación, como es la ubiquitinación y la consecuente degradación por el proteasoma (Yang *et al.*, 2017). En este sentido, ha sido reportado que los niveles de ABI3, ABI5, ABF1 y ABF3 (entre otros) son regulados por este mecanismo y que, además, el ABA induce la expresión de ubiquitin-ligasas E3 (reguladores negativos de la señalización)

siendo sus blancos para la degradación, por ejemplo, ABI3. Más aun, algunas proteínas ubiquitin-ligasas E3 son capaces de auto-ubiquitarse en presencia de ABA (Yang *et al.*, 2017). Así, la inducción por el ABA de los reguladores negativos de la vía de señalización, así como también de la vía de síntesis, tiene la finalidad de mantener la homeostasis de la misma. En el presente trabajo, resulta interesante el hecho de que el ABA exógeno induce la expresión de un regulador positivo (RPL10A) y de dos reguladores negativos (RPL10B y RPL10C) de la vía; esta situación podría estar evidenciando un mecanismo de retroalimentación negativa en la vía de señalización del ABA, que involucre a estas proteínas.

Es importante además, recordar que las proteínas ribosomales regulan la expresión génica ya sea a nivel traduccional, determinado por la heterogeneidad de la composición de los ribosomas, o bien a nivel transcripcional (por unión directa al ADN o por interacción con FT), funcionando como reguladores transcripcionales en el núcleo, exhibiendo así funciones extra-ribosomales. Con respecto a esto último, se demostró que las tres proteínas RPL10 de *Arabidopsis* se localizan tanto en citosol como en el núcleo (Falcone Ferreyra *et al.*, 2013) y, mediante estudios de co-inmunoprecipitación, se observó la asociación de proteínas RPL10s a proteínas nucleares, sugiriendo que al menos una de las isoformas de RPL10 tendría funciones extrarribosomales en el núcleo (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010a), siendo posible que las mismas intervengan en la regulación de la expresión de genes. De esta manera, otra hipótesis posible es que las proteínas RPL10s regulen la expresión de genes involucrados en la señalización del ABA, ya sea determinando la traducción de genes corriente abajo involucrados en la acción del ABA o regulando su expresión a nivel transcripcional mediante la unión a secuencias en los promotores de los genes blanco, actuando como co-reguladores o alternativamente, secuestrando reguladores mediante interacciones proteína-proteína.

Por lo tanto, no sólo es posible que la expresión de los genes *RPL10A-B-C* sea regulada por diversos FT para los cuales se identificaron sitios de unión putativos en sus promotores, sino que, alternativamente o adicionalmente, las proteínas RPL10s podrían estar regulando la expresión de genes, que participan en la señalización del ABA y/o en la síntesis de dicha hormona.

En síntesis, los resultados obtenidos indican una contribución diferencial de las proteínas RPL10A-B-C en el desarrollo y en la señalización del ABA. No obstante, RPL10A participaría a través de diferentes vías y/o mecanismos de señalización que

RPL10B y RPL10C. Estudios futuros permitirán revelar estos interrogantes y profundizar el conocimiento sobre su participación en los procesos fisiológicos de la planta como así también en las respuestas y tolerancia frente a diferentes factores de estrés.

## **5.2- Estudio de la contribución del factor de transcripción LIMYB en las respuestas a la radiación UV-B en plantas de *A. thaliana*.**

El crecimiento de las plantas y la producción agrícola mundial se ve constantemente afectado por varios tipos de estrés ambientales, tales como la alta salinidad en el suelo, la sequía, las temperaturas extremas, el ataque de patógenos y la radiación ultravioleta, entre otros (Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). Durante las últimas décadas, los daños producidos por el UV-B se han incrementado debido a la disminución en la capa de ozono estratosférica como resultado de las emisiones de compuestos clorofluorocarbonados (Parihar *et al.*, 2015). A pesar de que se espera que el agujero en la capa de ozono estratosférica se recupere en las próximas décadas, seguirán existiendo variaciones en los niveles de UV-B que llegan a la tierra año a año, que podrán influir en la severidad e impacto ambiental que puede causar esta radiación (Mckenzie *et al.*, 2011). La radiación UV-B causa varios efectos directos e indirectos sobre las plantas, que incluyen el daño en el ADN, las proteínas y las membranas, alteraciones en la transpiración y la fotosíntesis, y cambios en el crecimiento, el desarrollo y la morfología (Hectors *et al.*, 2007; Kataria *et al.*, 2014). Sin embargo, las plantas han desarrollado una gran variedad de respuestas de adaptación para protegerse contra los efectos nocivos de esta radiación. Así, diversos genes son inducidos frente a determinados tipos de estrés y juegan importantes roles en este proceso de adaptación de las plantas (Hectors *et al.*, 2007; Ahuja *et al.*, 2010; Hirayama y Shinozaki, 2010).

En los últimos años se han descripto numerosos genes involucrados en la respuesta frente a diversos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. Se ha demostrado que varios miembros de diversas familias de factores de transcripción en plantas, como AP2/EREBP, bZIP y MYB, son inducidos en determinadas situaciones de estrés y están involucrados en la respuesta de las plantas a dichas situaciones. Por ejemplo, Wang *et al.* (2016) demostraron que la sobreexpresión en *Arabidopsis* del gen *MYB12* resulta en la inducción de la expresión de genes

involucrados en la biosíntesis de flavonoides, del ABA y de proteínas detoxificadoras de EROs, en respuesta a condiciones de estrés abiótico, como la sequía.

Por otra parte, las bases de datos de microarreglos permitieron el análisis a gran escala de los cambios globales inducidos por la radiación UV-B en los patrones de expresión génica. El grupo funcional con el mayor número de genes regulados por la radiación UV-B corresponde a proteínas involucradas en la traducción, lo que sugiere que la exposición de las plantas al UV-B solar exige un reajuste de la transcripción del genoma con la finalidad de mantener la homeostasis fisiológica y minimizar los impactos inhibitorios de la radiación UV-B en la tasa de crecimiento (Ballaré, 2011; Casati y Walbot, 2004). En el presente trabajo, se analizó la contribución del factor de transcripción LIMYB de *A. thaliana* en las respuestas a la radiación UV-B. En primer término, se observó que el nivel del transcrito *LIMYB* es similar en las plantas expuestas a la radiación UV-B y en las plantas controles, indicando que la expresión de este gen no es regulada por la radiación UV-B (Figura 33).

Recientemente, se reportó que el factor de transcripción LIMYB regula negativamente la expresión de genes que codifican para varias proteínas ribosomales en *Arabidopsis* frente a la infección de Begomovirus. Así, plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan LIMYB muestran una menor expresión de genes codificantes a proteínas ribosomales, una disminución en la síntesis proteica, una reducida asociación del ARNm viral con los polisomas, y por ende, una mayor tolerancia a la infección de Begomovirus. Por el contrario, las plantas mutantes *limyb* muestran una mayor expresión de genes de la maquinaria traduccional e incrementada susceptibilidad viral (Carvalho *et al.*, 2008; Zorzatto *et al.*, 2015). Por lo tanto, en este trabajo, se propuso estudiar el efecto de la radiación UV-B sobre la expresión de genes que codifican para proteínas ribosomales en plantas salvajes de *A. thaliana*. Se observó que la radiación UV-B regula positivamente la expresión de los genes *RPL4*, *RPL13* y *RPS25*, mientras que la expresión de los *RPL28e* y *RPS13a* no se modifica por el tratamiento con radiación UV-B. Además, como se demostró previamente (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010a), se observó que la expresión de *RPL10C* es inducida por el UV-B, mientras que *RPL10B* disminuye su expresión y el nivel del transcrito *RPL10A* no se modifica (Figura 34).

Posteriormente, se analizó si la expresión de los genes que codifican para las

proteínas ribosomales estudiados se ve afectada por la sobreexpresión o la ausencia del factor de transcripción LIMYB en respuesta a la radiación UV-B. En general, se observó que la regulación de la expresión de estos genes codificantes para proteínas ribosomales por el UV-B no se modifica por la ausencia o por la sobreexpresión de LIMYB, indicando que LIMYB no estaría involucrado en la regulación ejercida por el UV-B en la expresión de estos genes. Sin embargo, es importante destacar que, en ausencia de LIMYB, los niveles de transcritos de *RPL10A* y *RPL10C* son significativamente menores en comparación a sus niveles en las plantas salvajes en condiciones control (2 a 3,3 veces), sugiriendo que LIMYB podría estar involucrado en la regulación de la expresión de estos genes (Figuras 35D y 36C). Sin embargo, el hecho que los transcritos *RPL10A* y *RPL10C* no se modifican por la sobreexpresión de LIMYB indicaría que cierto nivel de LIMYB podría ser requerido para la regulación de la expresión de estos genes.

Por otra parte, al analizar parámetros indicativos de la tolerancia frente a la radiación UV-B en las plantas mutantes *limyb* y las plantas sobreexpresantes de LIMYB, las plantas sobreexpresantes presentaron un menor daño oxidativo en sus membranas, mostrando un menor porcentaje de liberación de electrolitos (Figura 41). Además, las plantas sobreexpresantes de LIMYB no exhibieron una reducción en el contenido de clorofilas totales luego del tratamiento con radiación UV-B (Figura 40). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del factor de transcripción LIMYB confiere cierto grado de tolerancia a las plantas de *Arabidopsis* frente al daño oxidativo inducido por la radiación UV-B, mientras que la ausencia de LIMYB no modifica la sensibilidad de las plantas a la radiación UV-B. No obstante, la expresión de *LIMYB* no es regulada por UV-B y el mecanismo involucrado no implicaría un descenso de la maquinaria de traducción como fue demostrado en la vía de señalización frente al estrés biótico, como lo es la infección por Begomovirus.

Previamente se reportó que la sobreexpresión del factor de transcripción MYB12B2 de soja (*Glycine max*) en plantas de *Ar. thaliana* modifica la expresión de genes que codifican a algunas enzimas claves en la biosíntesis de flavonoides, mostrando las plantas transgénicas un incremento en la acumulación de flavonoides comparadas con las plantas salvajes (Li *et al.*, 2013), resultando en una mayor tolerancia al estrés por alta salinidad y por la radiación UV-B que las plantas salvajes (Li *et al.*, 2015). De esta manera, es posible que el factor de transcripción LIMYB esté involucrado en la tolerancia al estrés producido por la radiación UV-B, así como

también otros tipos de estrés abiótico, participando en diversas vías como por ejemplo la síntesis de compuestos fotoprotectores. No obstante, se requiere de estudios adicionales para, en un futuro, responder estos interrogantes.



## **6- CONCLUSIONES**

- Las proteínas RPL10A-B-C tienen roles preponderantes y diferenciales en la germinación, el desarrollo post-germinativo y en la señalización del ABA en *Arabidopsis thaliana*.
- La expresión de *LIMYB* no es regulada por la radiación UV-B y la regulación de la expresión de los genes codificantes para proteínas ribosomales por el UV-B no se modifica por la ausencia o por la sobreexpresión de LIMYB. No obstante, las plantas que sobreexpresan el factor de transcripción LIMYB presentan una mayor tolerancia a la radiación UV-B en lo que respecta al contenido de clorofilas y al daño oxidativo en las membranas producido por dicha radiación.

**BIBLIOGRAFÍA**

Ahuja I, De Vos RC, Bones AM, Hall RD. 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci.* 15: 664-674.

Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell.* 4° ed.

Arratia J, Aguirre J. 2013. Los factores de transcripción tipo MYB, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *TIP Rev Esp Cienc Quí Biol.* 16:98-108.

Ay N, Irmeler K, Fischer A, Uhlemann R, Reuter G, Humbeck C. 2009. Epigenetic programming via histone methylation at WRKY53 controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 58:333–346.

Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY. 2012. Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Natl Cell Biol.* 14: 810-817.

Ballaré CL, Caldwell MM, Flint SD, Robinson A, Bornman JF. 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci.* 10:226–241.

Bao Y, Aggarwal P, Robbins NE, Sturrock CJ, Thompson MC, Tan HQ, Tham C, Duan L, Rodriguez PL, Vernoux T. 2014. Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:9319–9324.

Barakat A, Szick-Miranda K, Chang IF, Guyot R, Blanc G. 2001. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiol.* 127:398–415.

Bentsink L, Hanson J, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Coltrane C, Keizer P, El-Lithy M, Alonso-Blanco C, Reymond M, Smeekens S, Koornneef M. 2010. Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. *Proc of the Nat Acad of Sci of USA.* 107: 4264-4269.

Blaustein AR. 2013. Ultraviolet radiation. *Encyclopedia of Biodiversity.* 2:296-303.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Briggs GC, Osmont KS, Shindo C, Sibout R, Hardtke CS. 2006. Unequal genetic redundancies in Arabidopsis—a neglected phenomenon? *Trends in Plant Science*. 11:492-498.
- Britt A.B. 1999. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci*. 4:20-25.
- Brown B, Jenkins G. 2008. UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature Arabidopsis leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiol*. 146:576–588.
- Byrne ME. 2009. A role for the ribosome in development. *Trends in Plant Sci*. 14:512–519.
- Caldwell MM, Bornman JF, Ballaré CL, Flint SD, Kulandaivelu G. 2007. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobiol Sci*. 6:252–266.
- Campi M, D’Andrea L, Emiliani J, Casati P. 2012. Participation of Chromatin-Remodeling Proteins in the Repair of Ultraviolet-B-Damaged DNA. *Plant Physiol*. 158, 981.
- Carroll AJ. 2013. The Arabidopsis Cytosolic Ribosomal Proteome: From form to Function. *Front in Plant Sci*. 4:32.
- Carvalho CM, Fontes EP, Santos AA, Pires SR, Rocha CS, Saraiva DI, Machado JP, Mattos EC, Fietto LG. 2008. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathogenesis*. 4:12.
- Casati P, Walbot V. 2004. Crosslinking of ribosomal proteins to RNA in maize ribosomes by UV-B and its effects on translation. *Plant Physiol*. 136:3319-3332.
- Casati P, Zhang X, Burlingame AL, Walbot V. 2005. Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. *Mol Cell. Proteomics*. 4:1673–85.
- Casati P, Stapleton AE, Blum JE, Walbot V. 2006. Genome-wide analysis of high-altitude maize and gene knockdown stocks implicates chromatin remodeling proteins in response to UV-B. *Plant J*. 46:613–27.
- Caldwell MM, Bornman JF, Ballaré CL, Flint SD, Kulandaivelu G. 2007. Terrestrial ecosystems, increased solar UV radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem. Photobiol. Sci*. 6:252–66.

Chávez-Ríos R, Arias-Romero LE, Almaraz-Barrera MJ, Hernández-Rivas R, Guillén N, Vargas M. 2003. L10 ribosomal protein from *Entamoeba histolytica* share structural and functional homologies with QM/Jif-1: proteins with extraribosomal functions. *Mol and Bioch Parasitology*. 127:151-160.

Chen M, Chory J, Fankhauser C. 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 38:87-117.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR. 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*. 61:651–679.

Davey MP, Novita I, Susanti J, Wargent E, Findlay W, Paul Q, Nigel D, Gareth I, Jenkins. 2012. The UV-B photoreceptor UVR8 promotes photosynthetic efficiency in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated levels of UV-B. *Photosynth Res*. 114:121–131.

Du H. 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry Mosc*. 74:1-11.

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends plant Sci*. 15:573-581.

Eisinger DP, Dick FA, Trumpower BL. 1997. Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining of 40S and 60S subunits. *Mol Cell Biol*. 17: 5136–5145.

Falcone Ferreyra ML, Pezza A, Biarc J, Burlingame AL, Casati P. 2010a. *Arabidopsis* L10 ribosomal proteins in UV-B responses. *Plant Signal Behav*. 5:1222-1225.

Falcone Ferreyra ML, Biarc J, Burlingame AL, Casati P. 2010b. Plant L10 ribosomal proteins have different roles during development and translation under ultraviolet-B stress. *Plant Physiol*. 153: 1878–1894.

Falcone Ferreyra ML, Casadevall R, Luciani MD, Pezza A, Casati P. 2013. New Evidence for Differential Roles of L10 Ribosomal Proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 163:378–391.

Falcone Ferreyra ML, Casadevall R, D'Andrea L, Elgawad H, Beemster GT, Casati P. 2016a. AtPDCD5 Plays a Role in Programmed Cell Death after UV-B Exposure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 170:2444.

Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravec A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Ulm R. 2009. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO J*. 28:591–601.

- Feng CZ, Chen Y, Wang C, Kong YH, Wu WH, Chen YF. 2014. Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. *The Plant J.* 80:654–668.
- Fina J, Casadevall R, AbdElgawad H, Prinsen E, Markakis MN, Beemster GTS, Casati P. 2017. UV-B Inhibits Leaf Growth through Changes in Growth Regulating Factors and Gibberellin Levels. *Plant Physiol.* 174:1110.
- Finkelstein RR, Lynch TJ. 2000. The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell.* 12:599–609.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol.* 59:387–415.
- Finkelstein R. 2013. Abscisic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book.* 11:166-175.
- Frohnmeier H, Staiger D. 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* 133:1420–1428.
- Goh CH, Veliz Vallejos DF, Nicotra AB, Mathesius U. 2013. The impact of beneficial plant-associated microbes on plant phenotypic plasticity. *J Chem Ecol.* 39:826–839.
- Graeber K, Nakabayashi K, Miatton E, Leubner-Metzger G, Soppe WJ. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant cell & env.* 35:1769-1786.
- Hanson CL, Videler H, Santos C, Ballesta JP. 2004. Mass spectrometry of ribosomes from *Saccharomyces cerevisiae*: implications for assembly of the stalk complex. *J Biol Chem.* 279:42750–42757.
- Harris J. 2015. Abscisic acid: hidden architect of root system structure. *Plants.* 4:548–572.
- Hassan IA, Basahi JM, Haiba NS, Kadi MW. 2013. Investigation of climate changes on metabolic response of plants; Interactive effect of drought stress and excess UV-B. *J Earth Sci Climate Change.* 4:129.
- Hirayama T, Shinozaki K. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61:1041-1052.
- Hectors K, Prinsen E, De Coen W, Jansen MAK, Guisez Y. 2007. *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of UV B radiation show specific

changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytol.* 175:255–270.

Heijde M, Ulm R. 2012. UV-B photoreceptor mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 17: 230–237.

Hofer A, Bussiere C, Johnson A.W. 2007. Mutational analysis of the ribosomal protein Rpl10 from yeast. *The Journal of Biological Chemistry.* 282:32630-32639.

Hofmann NR. 2012. The molecular mechanism of the UVR8 UV-B photoreceptor. *Plant Cell.* 24:3485.

Horiguchi G, Van Lijsebettens M, Candela H, Micole JL, Tsukaya H. 2012. Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant Sci.* 191:24–34.

Hoth S, Morgante M, Sanchez JP, Hanafey M. 2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *J Cell Sci.* 115:4891-4899.

Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JL. 2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 24: 1695–1708.

Ikeda M, Ohme-Takagi M. 2009. A novel group of transcription repressors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50:970–975.

*Arabidopsis thaliana* Imai A, Komura M, Kawano E, Takahashi T. 2008. A semi-dominant mutation in the ribosomal protein L10 gene suppresses the dwarf phenotype of the *acl5* mutant in. *Plant J.* 56:881–890.

Jain K, Kataria S, Guruprasad KN. 2003. Changes in antioxidant defenses of cucumber cotyledons in response to UVB and to the free radical generating compound AAPH. *Plant Sci.* 165:551–557.

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

Jenkins GI, Brown BA. 2007. UV-B perception and signal transduction. *Light and Plant Develop.* 155–182.

Jeon J, Kim NY, Kim S, Kang NY. 2010. A subset of cytokin in two component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *J. Biol Chem.* 285:23371–23386.

- Juntawong P, Bailey-Serres J. 2012. Dynamic Light Regulation of Translation Status in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 3:66.
- Kataria S, Jajoo A, Guruprasad KN. 2014. Impact of Increasing Ultraviolet-B (UV-B) Radiation on Photosynthetic Processes. *J of Photochem Photobiol.* 137:55–66.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res.* 15:281-307.
- Lario L, Ramirez-Parra E, Gutierrez C, Spampinato C, Casati P. 2013. ANTI-SILENCING FUNCTION1 Proteins Are Involved in Ultraviolet-Induced DNA Damage Repair and Are Cell Cycle Regulated by E2F Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 162:1164.
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Kwong L, Belmonte M, Fischer RL, Goldberg RB. 2010. Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Nat Acad Sci USA.* 107:8063-8070.
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Develop.* 5:646-58.
- Lee KJD, Dekkers B, Steinbrecher T, Walsh CT. 2012. Distinct cell wall architectures in seed endosperms in representatives of the Brassicaceae and Solanaceae. *Plant Physiol.* 160:1551–1566.
- Li J, Yang L, Jin D, Nezames CD, Terzaghi W, Deng XW. 2013. UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Protein Cell* 4:485–492.
- Li XW, Li JW, Zhai Y, Zhao Y. 2013. A R2R3-MYB transcription factor, GmMYB12B2, affects the expression levels of flavonoid biosynthesis genes encoding key enzymes in transgenic *Arabidopsis* plants. *Gene.* 532:72-79.
- Li XW, Wang Y, Yan F, Li JW, Zhao Y, Zhai Y, Wang QY. 2015. Overexpression of soybean R2R3-MYB transcription factor, GmMYB12B2, and tolerance to UV radiation and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Genet and Mol Res.* 15(2).
- Li S, Liu K, Zhang S, Wang Z, Ren G, Yua B. 2017. STV1, a ribosomal protein, binds primary microRNA transcripts to promote their interaction with the processing complex in *Arabidopsis*. *Pnas.* 114:1424-1429.
- Liu Y, Ye N, Liu R, ChenM, Zhang J. 2010. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *J Experim Botany.* 61:2979–2990.

- Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang HQ, Luan S, Li J. 2013. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 110:15485-90.
- Liu DG, He SZ, Song XJ, Zhai H, Liu N. 2015a. IbSIMT1, a novel salt-induced methyltransferase gene from Ipomoea batatas, is involved in salt tolerance. *Plant Cell Tiss Org*. 120:701–715.
- Malamy JE. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ*. 28:67–77.
- McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Björn LO, IlyasM, Madronich S. 2011. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem Photobiol Sci*. 10:182–198.
- Melcher K, Zhou XE, Xu HE. 2010. Thirsty plants and beyond: structural mechanisms of abscisic acid perception and signaling. *Curr Opin Struct Biol*. 20:722–729.
- Meneses E. 2010. The R2R3 Myb protein family in Entamoeba histolytica. *Gene*. 455:32-42.
- Miransari M, Smith DL. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ Exp Bot*. 99:110–121.
- Mazahar M, Bakshi A, Saha A, Dutta M, Sheshu M. 2016. Rice Ribosomal Protein Large Subunit Genes and Their Spatio-temporal and Stress Regulation. *Front Plant Sci*. 7:1284.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol*. 59:651–681.
- Murphy TM. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol Plant*. 58: 381-388.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant & cell physiol*. 50:1345-1363.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2013. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell*. 32:959-970.



Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev Plant Biol.* 56:165–185.

Nambara E, Nonogaki H. 2012. Seed biology in the 21st century: perspectives and new directions. *Plant Cell Physiol.* 53:1-4.

Ng LM, Melcher K, Teh BT, Xu HE. 2014. Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacol Sin.* 35:567–584.

Nishimura M, Kaminishi T, Takemoto C, Kawazoe M, Yoshida T, Tanaka A, Sugano S, Shirouzu M, Ohkubo T, Yokoyama S, Kobayashi Y. 2008. Crystal structure of human ribosomal protein L10 core domain reveals eukaryote-specific motifs in addition to the conserved fold. *J Mol Biol.* 377:421–430.

Nishimura N, Sarkeshik A, Park S, Wang, A, Carvalho PC, Schroeder JI. 2010. PYR/PYL/RCAR family members are major *in vivo* ABI1 protein phosphatase 2C interacting proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* 61:290-299.

Nonogaki H. 2014. Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Front in Plant Sci.* 5:233-238.

O'Hara A, Jenkins GI. 2012. *In vivo* function of Tryptophans in the *Arabidopsis* UV-B photoreceptor UVR8. *Plant Cell.* 24:3755-3766.

Oravec A, Baumann A, Brzezinsk A, Jean Molinier, Nagy F, Ulma R. 2006. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 Is Required for the UV-B Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18:1975–1990.

Panadero NM. 2013. GEM, una proteína con dominio GRAM, es un regulador negativo de la señalización por ABA durante la germinación en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral, Madrid.

Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM. 2015. Changing scenario in plant UV-B research: UV-B from a generic stressor to a specific regulator. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 153:334-343.

Park S, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y. 2009. Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science.* 324:1068–1071.

Preston J, Tatematsu K, Kanno Y, Hobo T, Kimura M, Jikumaru Y, Yano R, Kamiya Y, Nambara E. 2009. Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiol.* 50:1786-1800.

- Puertolas J, Conesa MR, Ballester C, Dodd IC. 2015. Local root abscisic acid (ABA) accumulation depends on the spatial distribution of soil moisture in potato: implications for ABA signalling under heterogeneous soil drying. *J Exp Bot.* 66:2325–2334.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E. 2010. ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci.* 15:395-401.
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C. 2012. Seed germination and vigor. *Annu Rev Plant Biol.* 63:507–533.
- Reddy KR, Singh SK, Koti S, Kakani VG, Zhao D, Gao W. 2013. Quantifying the effects of corn growth and physiological responses to ultraviolet-B radiation for modeling. *Agro J.* 105:1367–1377.
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E., Baumeister R, Jenkins GI, Ulm R. 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science.* 332:103-106.
- Rodríguez-Gacio MC, Matilla-Vázquez MA, Matilla AJ. 2009. Seed dormancy and ABA signaling: the break through goes on. *Plant Signal Behav.* 4:1035–1048.
- Rosado A, Li R, Van de Vem W, Hsu E, Raikhel NV. 2012. Arabidopsis ribosomal proteins control developmental programs through translational regulation of auxin response factors. *Proceed Natio Acad Sci USA.* 109:19537-19544.
- Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim TH. 2009. Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol.* 150:1345–1355.
- Sah SK, Reddy KR, Li J. 2016. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front. Plant Sci.* 7:571.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Gen.* 37:501–506.
- Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM. 2005. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science.* 310:827–834.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot.* 58:221–227.
- Singh K, Paul A, Kumar S, Ahuja PS. 2008. Cloning and differential expression of

QM like protein homologue from tea [*Camellia sinensis*]. *Mol Biol Reports*. 36:921-927.

Sormani R, Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Chardon F. 2011. Transcriptional regulation of ribosome components are determined by stress according to cellular compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 6:12

Sozzani R, Iyer-Pascuzzi A. 2014. Postembryonic control of root meristem growth and development. *Curr Opin Plant Biol*. 17:7–12.

Stirnberg P, Liu JP, Ward S, Kendall SL, Leyser O. 2012. Mutation of the cytosolic ribosomal protein-encoding RPS10B gene affects shoot meristematic function in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*. 12:160.

Surabhi GK, Reddy KR, Singh SK. 2009. Photosynthesis, fluorescence, shoot biomass and seed weight responses of three cowpea cultivars with contrasting sensitivity to UV-B radiation, *Environ Exp Bot*. 66:160–171.

Suzuki N, Bassil E, Hamilton JS, Zandalinas SI, Luo Y, Dion E, Fukui G, Kumazaki A, Nakano R, Rivero RM, Azad RK, Blumwald E, Mittler R. 2016. ABA is required for plant to a combination of salt and heat stress. *Plos One*. 11: 1-21.

Ulm R, Baumann A, Oravec A, Mate Z, Adam E, Oakeley EJ, Schafer E, Nagy F. 2004. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:1397–1402.

Vermeer JE, Geldner N. 2015. Lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: A force awakens. *Prime Rep*. 7.

Wang F, Kong W, Wong G, Fu L, Peng R, Li Z, Yao Q. 2016. AtMYB12 regulates flavonoids accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*. 12:1067–1078.

Wang FB, Tong WJ, Hong Zhu, Kong WL, Peng RH. 2016. A novel Cys2/His2 zinc finger protein gene from sweet potato, IbZFP1, is involved in salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*. 243:783–797.

Wang Y, Wang XA, Wang RJ, Qiu NW, Ma Z. 2012. Effects of UV-B radiation on the growth and reproduction of *Vicia angustifolia*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 23:1333 – 1338.

Wang Y, Meng Y, Zhang M, Tong X, Govers F, Shan W. Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Phytophthora parasitica* and identification of variation in host specificity. 2014. *Mol Plant pathol*. 12:187–201.

- Waterworth WM, Jiang Q, West CE, Nikaido M. 2002. Characterization of Arabidopsis photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J Exp Bot.* 53:1005-1015.
- West M, Hedges JB, Chen A, Johnson AW. 2005. Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits. *Mol Cell Biol.* 9:3802-3813.
- Wintermans JF, De Mots A. 1965. Spectrophotometric characteristics of the chlorophylls and their pheophytins in ethanol. *Biochim Biophys Acta.* 109:448–455
- Xie T, Ren R, Zhang Y. 2011. Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the *Arabidopsis thaliana* abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. *J Biol Chem.* 287:794–802.
- Yan D, Duermeyer L, Leoveanu C, Nambara E. 2014. The Functions of the Endosperm During Seed Germination. *Plant Cell Physiol.* 55: 1521–1533.
- Yang W, Zhang W, Wang X. 2017. Post-translational control of ABA signalling: the roles of protein phosphorylation and ubiquitination. *Plant Biotech J.* 15:4–14.
- Yoshida K, Fujita Y, Maruyama J, Mogami J, Todaka D, Shinozaki Z, Yamaguchi-Shinozaki K. 2015. Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment.* 38:35–49.
- Zolla G, Heimer YM, Barak S. 2010. Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *J Exp Bot.* 61:211–224.
- Zorzatto C, Machado JP, Lopes KV, Nascimento KJ, Pereira WA, Brustolini OJ, Rei PA, Calil IP. 2015. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature.* 520:679-682.