



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



[www.fagro.edu.uy](http://www.fagro.edu.uy)

# Rol de esteroides de membrana en respuesta a estrés hídrico en *Arabidopsis thaliana*.



Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Florencia Sena

Tutor: Omar Borsani

Laboratorio de Bioquímica,

Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Febrero 2012



## AGRADECIMIENTOS:

Soy muy agradecida MUY...

A Norman, Susana e Isabel, mis padres y abuela, les agradezco su apoyo, su guía y su confianza en la realización de mis sueños. Soy muy afortunada por contar siempre con su amor, comprensión y ejemplo.

A mis amigos de la vida, Eliana Brun, Giovanna Boné y Patricia García que quedaron en mi querida Nueva Helvecia y a pesar de la distancia me apoyaron incondicionalmente.

Mis amigos de facultad, que no esperaba conocer y fueron muy importantes en mi formación académica y sobretodo personal. (en estricto orden alfabético) a Florencia Tomasina, Lucía Rodríguez, Mauricio Mastrogiovanni, Nadia Riera, Santiago Chavez y Yanina Barrios. Serán sin dudas seres que siempre tendré en mi corazón.

A mis geniales compañeros del Laboratorio de Bioquímica, por su pacienciay sus respuestas a incontables preguntas, fueron y serán el constante apoyo en el día a día. A Esteban, Gastón, Leticia, Máximo, Santiago y Pedro. Y a los que ya no están Soledad y Dany.

A mi tutor, Omar, le agradezco de manera especial y sincera por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección y por ser el ideador de que esto fuera posible.

ÍNDICE

1-Abreviaturas.....4

2- Resumen.....7

3- Introducción.....8

3.1 Estrés hídrico en plantas.....8

3.2 Mutante *dry2/sqe1*.....9

3.3 Escualeno Epoxidasa y esteroides en plantas.....10

3.4 Rol de la HMG reductasa en la regulación de las respuestas dependientes de esteroides.....14

3.5 Esteroides y Brassinoesteroides en respuesta a estrés abiótico.....15

4-Objetivos.....16

4.1 Objetivos generales.....16

4.2 Objetivos específicos.....16

5-Materiales y Métodos.....17

5.1 Material vegetal.....17

5.2 Condiciones de crecimiento de plantas *in vitro* y en maceta.....17

5.3 Tratamiento con Atorvastatina.....18

5.4 Extracción de proteínas totales.....18

5.5 Cuantificación de proteínas.....18

5.6 Extracción de ADN para mapeo.....18

5.7 Cuantificación de Ácidos Nucleicos.....18

5.8 Inmunodetección de NADPH oxidasa.....19

5.9 Microscopía de Fluorescencia y Confocal.....20

5.10 Detección de  $O_2^{\cdot -}$  in situ mediante tinción con Nitroblue Tetrazolium (NBT).....21

5.11Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....21

---

5.12 Mapeo.....	22
5.13 Programas informáticos.....	24
6- Resultados.....	25
6.1 El tratamiento con atorvastatina recupera parcialmente el fenotipo de dry2/sqe1.....	25
6.2 Relocalización y composición de NADPH oxidasa en pelos radiculares en respuesta a atorvastatina.....	29
6.3 Mapeo inicial de un supresor de dry2/sqe1.....	35
7-Discusión.....	41
7.1 Las estatinas recuperan el fenotipo radicular de mutantes dry2/sqe1.....	41
7.2 La composición de esteroides es clave para la correcta localización y composición de ROS.....	42
7.3 La mutación que causa la supresión 3 se encontraría en el cromosoma 1,3 ó 4.....	44
8-Bibliografía.....	46
9-Anexo.....	54

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscisico
ABS	Absorbancia
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AtrbohC	<i>Arabidopsis thaliana</i> respiratory burst oxidase homolog C
BR	Brassinoesteroles
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphisms
cM	centiMorgan
Col-0	Columbia-0
DIMs	Membranas insolubles a detergentes
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
DRMs	Membranas resistente a detergentes
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EMS	Metilsulfonato de etilo
GFP	Proteína verde fluorescente
GVII	Goodview
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HR	Humedad relativa
HR	Respuesta hipersensible
HSP	Proteínas de choque térmico
I19	Línea de introgresión 19
InDel	Polimorfismo de tipo Inserción-delección
kb	Kilobase

---

kDa	Kilo Dalton
Ler	Ecotipo Landsberg <i>erecta</i>
m.p	Unidad de mapa
MP	Membrana plasmática
MS	Medio Murashige y Skoog
MVA	Ácido Mevalónico
NBT	Nitroblue Tetrazolium
nm	Nanómetros
NOX	NADPH Oxidasa
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ión superóxido
p/v	Porcentaje peso/volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Membrana de polivinildenedifloride
RE	Retículo endoplasmático
RHD2	Root Hair Defective2
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SNPs	Polimorfismo de cambio de un único nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)
SQE	Escualeno Epoxidasa
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
TBE	Tampón de electroforesis (Tris, Ácido Bórico y EDTA)

TBST TBS-Tween

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

Xc Xilencianol

## RESUMEN

Las plantas frecuentemente están sometidas a estrés, condición ambiental que afecta negativamente el crecimiento, desarrollo y productividad de las mismas. El estrés puede ser biótico, impuesto por organismos ó abiótico debido a un exceso ó déficit en algún factor ambiental. Tanto la resistencia como la susceptibilidad al estrés dependen de la especie, del genotipo y del estado de desarrollo de la planta.

El estrés hídrico, estrés abiótico más generalizado se manifiesta en cambios a niveles celulares, fisiológicos y del desarrollo de los organismos vegetales. Mutaciones a nivel de múltiples genes se asocian a la resistencia ó sensibilidad de las plantas a la sequía, tal es el caso de genes que codifican para canales de agua como las aquoporinas, osmolitos compatibles, sistemas antioxidantes, entre muchos otros. Escasa información existe en la bibliografía sobre un nexo entre la composición de esteroides estructurales de membrana plasmática y su función como moléculas señalizadoras y regulatorias con este tipo de estrés. En esta tesis se trabaja sobre el mutante *dry2/sqe1* de *Arabidopsis* que se caracteriza por ser hipersensible a sequía al presentar una única mutación a nivel de la enzima SQE1 que cataliza la reacción que genera la molécula de escualeno, un importante intermediario en la síntesis de esteroides. La mutación causa a nivel celular una localización alterada de las especies reactivas del oxígeno y a nivel del desarrollo un alterado crecimiento en el sistema radicular. En este trabajo se devela que manipulando la composición de esteroides con inhibidores específicos de la HMGR (enzima pre-escualeno) se puede revertir el fenotipo radicular de los mutantes *dry2/sqe1*, la localización y la concentración de las ROS producidas por las NADPH oxidasas. En este contexto se puede decir que los esteroides estructurales ubicados en microdominios lipídicos en las membranas plasmáticas de las células vegetales emergen como actores importantes en el crecimiento polar de la punta de tricomas en los pelos radiculares de las plantas y como relevantes causantes de la correcta localización de enzimas como las productoras de ROS.

En un enfoque más molecular, se trabajó sobre segundas mutaciones causadas sobre el mutante *dry2/sqe1* que se construyeron para estudiar los mecanismos e identificar nuevos componentes genéticos implicados en la regulación de la hipersensibilidad a sequía y el desarrollo de *dry2/sqe1*. Estas mutaciones suprimen el fenotipo de *dry2/sqe1* revertiendo la hipersensibilidad a sequía, además de recuperar parcialmente la parte aérea y/o radicular. La identificación de los genes afectados por estas segundas mutaciones brindaran valiosa información sobre el proceso de cómo los esteroides estarían regulando la respuesta a estrés. En esta tesis se realiza el mapeo inicial de uno de los supresores de los más de 10 creados para generar información inicial sobre el gen causante de la mutación. Se descubre por medio del análisis de resultados de los genotipos de los marcadores en la población F2 que la mutación es posible que se encuentra ligada dentro de los cromosomas 1,3 y 4. El mapeo completo continuará obviamente como futuros objetivos en las líneas de investigación de nuestro grupo de trabajo.

Los resultados generados en esta tesis sugieren que los esteroides estructurales de membrana en células vegetales son reguladores del estrés hídrico en plantas desde una forma indirecta, ya que estas estructuras estarían implicadas en procesos directamente involucrados en la sensibilidad/tolerancia al estrés; como un sistema radicular eficiente, correcta producción y localización de ROS.

## INTRODUCCIÓN

### ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS

El agua es la molécula más abundante y esencial en los sistemas vivos, en plantas posiblemente sea el componente más importante constituyendo más del 90% del peso fresco. La disponibilidad de agua es una de las mayores limitantes en la productividad agrícola (Boyer 1982).

El déficit hídrico, uno de los factores de estrés ambiental más generalizado, tiene lugar cuando la tasa de transpiración excede a la de absorción de agua del sistema radicular. La falta de agua a nivel celular puede resultar en un aumento de la concentración de solutos, cambios en el volumen celular, disrupción del gradiente de potencial hídrico, pérdida de turgencia, pérdida de la integridad de la membrana y desnaturalización proteica. La habilidad de la planta para responder y sobrevivir al déficit hídrico depende de mecanismos que involucran la integración de las respuestas celulares en toda la planta (Bray 2000). El entendimiento de cómo las células vegetales toleran la pérdida de agua es un requisito previo para el desarrollo de estrategias que puedan mejorar la productividad agrícola y la supervivencia de las plantas bajo condiciones de sequía.

Varios genes de respuesta a déficit hídrico cumplen funciones no solo de protección a las células mediante la producción de proteínas metabólicamente importantes, sino también en la regulación de otros genes involucrados en la transducción de señales en respuesta al estrés (Bray 1997).

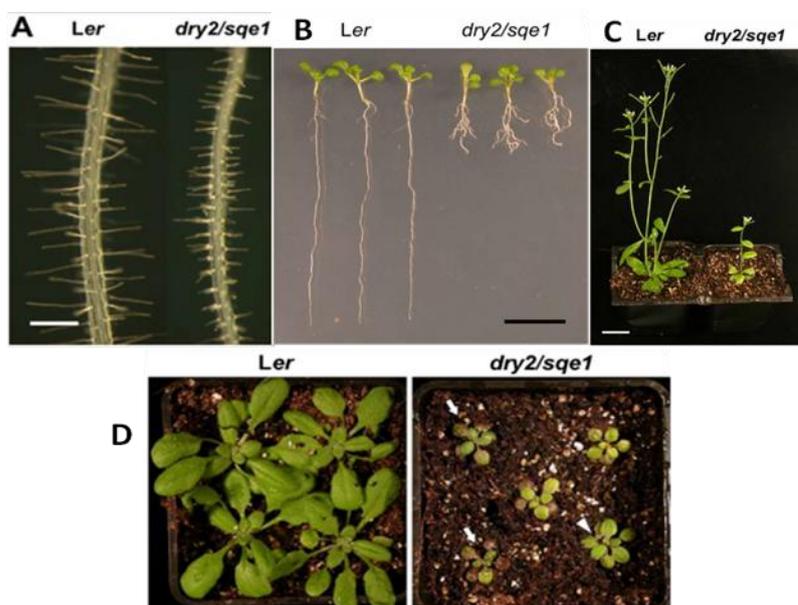
Diversos y numerosos procesos de la planta pueden ser alterados por el déficit hídrico. Las respuestas pueden ser transitorias o bien involucrar cambios que llevan a la alteración de la expresión génica. Así, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*, presenta una alteración en la expresión de gran cantidad de genes cuando es sometida a episodios de déficit hídrico (Bray 2002). Entre los genes más relevantes se encuentran los vinculados con la inhibición de la elongación celular y mecanismos de ajuste osmótico, estrategia bioquímica que las plantas adquieren para aclimatarse en condiciones de estrés. Por último la síntesis del ácido abscísico (ABA) y cierre estomático que regulan el balance hídrico de la planta, donde a través del cierre estomático, mediado por ABA, se disminuye la tasa transpiratoria y, en consecuencia, el agua consumida por la planta (Buchanan et al., 2000).

Recientemente en la búsqueda dirigida a identificar y caracterizar componentes genéticos y procesos involucrados en la tolerancia a estrés hídrico en *Arabidopsis thaliana* se ha aislado un mutante hipersensible a sequía el cual presenta una mutación en una proteína que no está relacionado con ninguna de respuestas ya conocidas y es una oportunidad para estudiar nuevos mecanismos involucrados en la tolerancia a déficit hídrico en plantas (Posé et al., 2009).

MUTANTE *dry2/sqe1*

El mutante *dry2/sqe1* en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg *Erecta* (*Ler*) fue descrito como hipersensible a sequía, este fue aislado a partir de una población de semillas mutagenizadas con EMS (etil-metil sulfonato), y su identificación mostró que este correspondía a un gen que codifica para la Escualeno Epoxidasa 1 (SQE1) una enzima clave en la síntesis de esteroides.

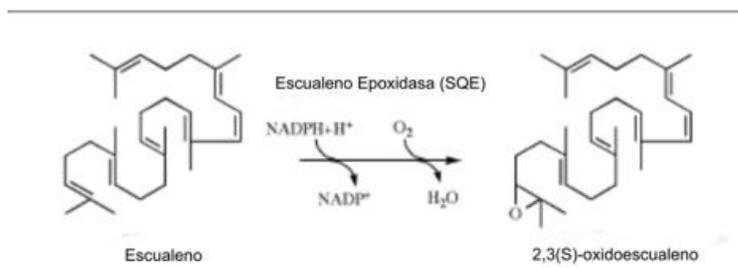
Su fenotipo fue descrito por presentar principalmente extrema sensibilidad a la deshidratación (Figura I1D) y tener defectos pleiotrópicos en el desarrollo (Figura I1C). Es interesante el hecho que parte del fenotipo de hipersensibilidad a sequía puede llegar a recuperarse parcialmente en condiciones de alta humedad relativa. La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) se encuentra alterada en *dry2/sqe1*, por ejemplo en pelos radiculares existe una acumulación ectópica del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y existe una deslocalización de la NADPH oxidasa (NOX) a nivel de la membrana plasmática. En cuanto al desarrollo, el mutante exhibe defectos en el sistema radicular (Figura I1B) como menor tamaño de la raíz primaria presentando en esta una mayor ramificación y los pelos radiculares laterales son más pequeños si se los compara con plantas salvajes (Figura I1A), la parte aérea también tiene un fenotipo alterado aunque no tan notorio que la raíz; por último en relación a procesos fisiológicos existe una menor proporción de esteroides de membrana como el sitoesterol y estigmasterol principalmente en raíz, y una notoria desregulación estomática.



**Figura 1:** Mutante *dry2/sqe1* hipersensible a estrés hídrico presenta múltiples defectos en el desarrollo. **A:** Imagen de un segmento de la raíz donde se observa los pelos radiculares de *Ler* y *dry2/sqe1*. Barra = 500  $\mu$ m, *dry2/sqe1* presenta un tamaño medio de los pelos radiculares menor que *Ler*. **B:** Caracterización de la raíz de *Ler* y *dry2/sqe1*, plantas *Ler* de 10 días en medio MS. Barra = 1 cm. **C:** mutante *dry2/sqe1* presenta un menor tamaño y una menor ramificación que la planta silvestre. Plantas de 34 días, Barra = 2 cm. **D:** mutante *dry2/sqe1* presenta una gran variabilidad en el fenotipo de parte aérea. Plantas de 20 días crecidas a baja HR.

## ESCUALENO EPOXIDASA Y ESTEROLES EN PLANTAS

La Escualeno epoxidasa (E.C. 1.14.99.7) cataliza el primer paso de oxidación en la ruta de biosíntesis de esteroides, convirtiendo el escualeno, molécula lineal de 30 átomos de carbono, en 2,3(S)-oxidoescualeno, precursor de todos los triterpenoides cíclicos conocidos en Angiospermas (Figura I2) (Phillips et al, 2006; Rasbery et al., 2007). En *Arabidopsis* existen 6 genes que codifican para SQE, la SQE1 (AtSQE1) en *Arabidopsis*, mutada en *dry2/sqe1*, es una proteína de 531 aminoácidos.



**Figura I2:** Reacción que cataliza la enzima SQE.

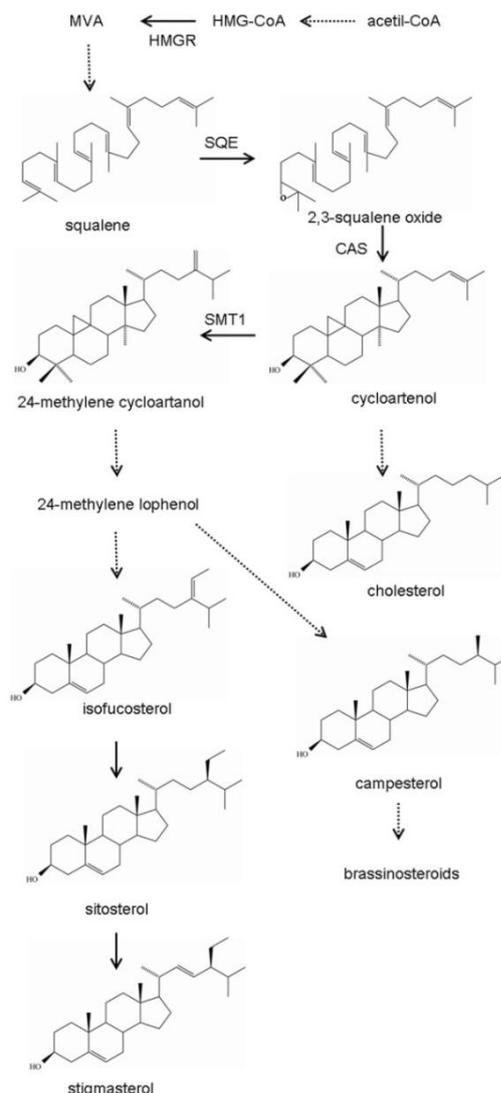
SQE1 presenta un mayor nivel de expresión durante el desarrollo del embrión, concretamente en la fase de torpedo, lo que da indicio que es fundamental para la correcta embriogénesis. A su vez SQE1 es la más expresada en raíz en procesos de elongación celular, está involucrada en el crecimiento polar de las células epidérmicas de la raíz, además presenta una alta expresión en estomas en las células oclusivas (Posé et al., 2009).

Los esteroides, mayoritariamente, son componentes esenciales de las membranas celulares, son lípidos derivados de isoprenoides, que cumplen múltiples funciones esenciales para las células eucariotas, principalmente regulan la fluidez, estructura y permeabilidad de la membrana plasmática (Benveniste 2004; Phillips et al., 2006).

La biosíntesis general de esteroides se lleva a cabo en el retículo endoplasmático (RE), atravesando al complejo de Golgi donde posteriormente serán exportados a su destino, la membrana plasmática. (Hartmann et al., 1987; Moreau et al., 1998; Grebe et al., 2003)

La síntesis de esteroides comienza con la molécula de Acetil-CoA como precursor, esta es convertida en Ácido mevalónico (MVA) a través de varios pasos enzimáticos. Uno de los puntos limitantes de la síntesis es llevado a cabo por una de estas enzimas la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) que cataliza la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA en mevalonato. Posteriormente el mevalonato a través de varios pasos enzimáticos de oligomerización y dimerización dará lugar a la molécula lineal de 30 átomos de carbono escualeno, el precursor de todos los triterpenoides cíclicos conocidos de Angiospermas (Benveniste et al., 2002; Rasbery et al., 2007). La escualeno epoxidasa cataliza la producción de 2,3-oxidoescualeno. A partir de este punto, las células vegetales utilizan una ruta de biosíntesis de esteroides que es diferente a la de otros eucariotas (Schaller 2003, 2004; Benveniste 2004). Después de la conversión de 2,3-oxidoescualeno a cicloartenol, existe una bifurcación que conduce a cualquiera de los 24-metil esteroides, que incluyen campesterol y sus

derivados, los brasinoesteroides (BRs), o 24-etil esteroides, que incluyen los esteroides estructurales sitosterol y estigmasterol (Figura I3) (Clouse 2002).



**Figura I3: Biosíntesis de esteroides en *Arabidopsis thaliana*.**

Una menor proporción de esteroides no solo cumplen funciones estructurales sino que también sirven como precursores de moléculas importantes en el metabolismo vegetal como lo son las hormonas esteroideas, que cumplen funciones en el crecimiento y desarrollo, las más conocidas son los llamados brasinoesteroides (Schumacher et al., 2000; Clouse 2001; Altmann 1999). El fenotipo de mutantes deficientes en precursores de esta hormona incluye enanismo extremo, morfología de hojas alterado, reducción de la esterilidad, senescencia retardada y alterado el desarrollo vascular, esto evidencia que los BRs están vinculados en importantes procesos de desarrollo (Clouse et al., 1999).

BRs son necesarios para el normal desarrollo de las plantas. En plantas superiores se sugiere que juegan un papel crítico en una amplia gama de procesos en el desarrollo, por ejemplo, el crecimiento

del tallo, raíz, iniciación floral y desarrollo de flores y frutos (Hayat et al., 2003; Sasse 2003) también se han implicado en la respuesta de las plantas al estrés abiótico y biótico (Krishna 2003).

Los BR pueden producir efectos en la respuesta de las plantas al estrés ambiental al mediar la destoxificación de especies reactivas por medio de comunicación (cross-talk) entre los BR y la producción de otras hormonas vegetales. También generan múltiples respuestas de protección frente a estrés oxidativo, osmótico, salino, térmico y biótico por activación de múltiples genes marcadores de estrés como proteínas de choque térmico (HSP), rd29A y ERD10 (Dhaubhadel 1999, 2002; Kagale et al., 2007).

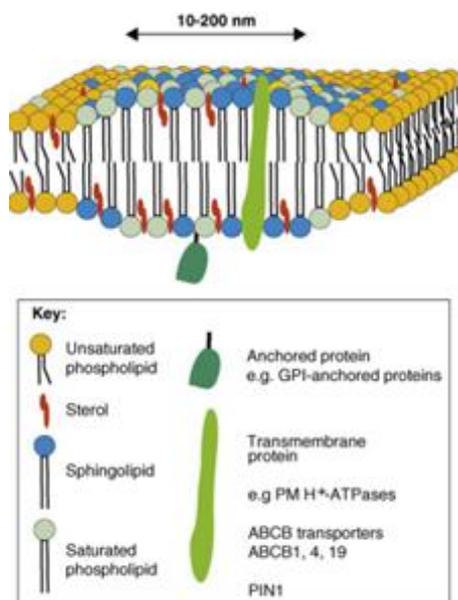
Mutaciones en genes relacionados en la biosíntesis de esteroides pueden causar defectos estructurales en las membranas celulares causados por el agotamiento de esteroides esenciales y pueden generar individuos no viables, por ejemplo algunos mutantes son letales debido a que presentan múltiples defectos en el desarrollo. *smt1* es uno de los fenotipos más estudiados y presenta incapacidad de establecer una correcta polaridad celular, como por ejemplo la localización errónea de los transportadores de auxina PIN1 y PIN3 (Diener et al., 2000, Willemsen et al., 2003), *fackel* (Jang, et al. 2000, Schrick, et al. 2000). Entre otros mutantes en la ruta de biosíntesis de esteroides se encuentra *hyd1*, que presenta una alteración en la señalización por etileno y auxinas (Souter et al., 2002), *cvp1* (*smt2*) (Carland et al., 2002) que presenta alteraciones en el desarrollo de cotiledones (Schaeffer et al., 2001) *ycas1* (Babiychuk et al., 2008).

La mayoría de los esteroides en plantas superiores se encuentran de tres formas: como esteroides libres que son la gran mayoría que componen principalmente la membrana y una pequeña cantidad de estos forman precursores de BR (Yokota 1997) ó, como formas menos abundantes, ésteres (Dyas et al., 1994) y glucósidos (Mudd 1980; Warnecke et al., 1997).

La adecuada composición de esteroides es necesaria para la formación de patrones a nivel embrionario, división celular, enlongación celular, polaridad celular, vías de señalización, etc (Boutteet et al., 2009). Se han descrito dominios moleculares de membrana plasmática celular muy dinámicos que se encuentran enriquecidos en esteroides y proteínas que interactúan y se caracterizan por la insolubilidad a detergentes no iónicos y a bajas temperaturas. Estas fracciones de membrana suelen denominarse resistentes a detergente o insoluble en estos (DRMs y DIMS respectivamente) (Figura 16) (Borner et al., 2005; Mongrand et al., 2004). En 1997 se los definió por primera vez utilizando el término de balsas lipídicas o su traducción al inglés Lipid Rafts (Simons et al., 1997).

La composición lipídica de las balsas se encuentra enriquecida en esteroides que coexiste con la estructura de fosfolípidos formados por ácidos grasos insaturados y está compuesta principalmente por esfingolípidos como la glicosilceramida, así como mezclas de sitoesterol y colesterol. Los fosfo y glicolípidos son excluidos como componentes de estos dominios (Mongrand et al., 2004). Las proteínas reclutadas en estas balsas varían mucho, se han identificado por ejemplo proteínas involucradas en la defensa como remorin, NADPH oxidasa, NtrbohD, Ntrac 5, receptores transmembrana de células T y B ó de interleuquinas (García et al., 2003); relacionadas al flujo vectorial de agua como acuaporinas, tráfico vesicular como syntaxina, dinamina; crecimiento celular como H-ATPasas, anhidrasa carbónica, y relacionadas con organización del citoesqueleto como actina

(Mongrand et al., 2004). La orientación de las proteínas embebidas en estas regiones es importante ya que puede verse afectada su función. La concentración de estas podría facilitar la interacción entre ellas, y/o con el entorno de la red lipídica, directamente podría modular su actividad, posiblemente por una modificación de su conformación. La interacción proteica con esta compleja red lipídica está involucrada en procesos fisiológicos fundamentales como el tráfico celular, el establecimiento de la polaridad celular, organización del citoesqueleto, respuesta inmunológica, señalización hormonal, apoptosis. (Simons et al., 1997; Bagna et al., 2002). Sin embargo, aún falta descifrar que procesos de la fisiología de una planta utilizan estos dominios como centro para la señalización.



**Figura 16: Modelo hipotético de una región de la membrana plasmática enriquecida en esteroides que simula un microdominio DRM.** En la figura se observa una exclusión de fosfolípidos insaturados (amarillo), concentración de esteroides (rojo), esfingolípidos (azul) y fosfolípidos saturados (gris). Las proteínas transmembrana son la H<sup>+</sup> ATPasa, sitios de acción a múltiples fármacos/P-glicoproteínas/transportadores ABCB y PIN1 (verde), así como las proteínas GPI-ancladas (verde oscuro) (Boutte et al., 2009).

La polarización de microdominios lipídicos enriquecidos en esteroides se ha relacionado con la morfogénesis y el movimiento celular en diversos tipos de células. La expansión celular es un proceso central en la morfogénesis de las plantas, como lo es por ejemplo en la elongación de las raíces y pelos radiculares que son esenciales para la absorción de minerales y agua del suelo (Boutte et al., 2009).

Un mecanismo general para el control del crecimiento polarizado de las células vegetales es la participación de la enzima NADPH oxidasa que depende de especies reactivas del oxígeno, y está relacionada en la señalización del crecimiento del tubo polínico y raíces laterales (Takeda et al., 2008; Liu et al., 2009). Las ROS producidas por NOX se han propuesto como moduladores del crecimiento polar de células como en pelos radiculares, mediante la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> necesario para

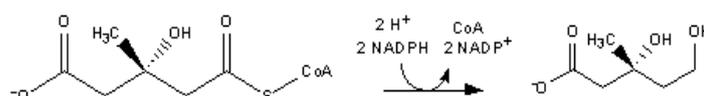
generar la punta polarizada en un gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carol et al, 2005; Samaj et al., 2004.; Takeda et al., 2008).

La NADPH oxidasa es un componente de la gran variedad de mecanismos enzimáticos responsables de la producción de las especies reactivas de oxígeno en las células. Cataliza la reacción que produce el radical superóxido a partir de oxígeno molecular a expensas de NADPH. La producción de ROS en la célula es uno de los principales acontecimientos que ocurren durante la respuesta de las plantas a los cambios ambientales, y contribuyen a establecer la adaptación por medio de la activación de vías de señalización (Elmayan et al., 2007).

#### ROL DE LA HMG REDUCTASA EN LA REGULACION DE LAS RESPUESTAS DEPENDIENTES DE ESTEROLES

Un paso limitante en la biosíntesis de esteroides es la síntesis del mevalonato, una etapa que se encuentra pre escualeno, y es precursor del amplio espectro de moléculas esteroideas.

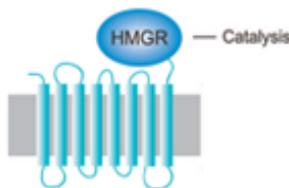
La enzima que cataliza su síntesis la HMGR produce ácido mevalónico a partir de la reducción de HMG-CoA a expensas de NADPH (Figura 4).



**Figura 14:** Reacción catalizada por la enzima HMGR, donde como reactivo se representa a la molécula de HMG-CoA y como producto el Mevalonato.

Es una enzima ampliamente regulada en animales, y sabiendo que los isoprenoides desempeñan un mayor número de funciones en las plantas en comparación con animales, se cree que la regulación de la actividad de la HMGR en las plantas puede ser aún más compleja. Es una proteína integral de membrana que fue identificada en tres compartimentos distintos plastidos, mitocondrias y retículo endoplasmático (Bach et al., 1990) está conformada por un extremo N-terminal que se encuentra anclado a la membrana presentando 2 dominios transmembrana muy conservados, este tiene un rol como blanco para la regulación de la destrucción de la proteína y el C-terminal es el sitio catalítico encargado de la actividad de la enzima que queda expuesto a la cara citosólica (Figura 15) (Hampton et al., 2009).

A diferencia de animales donde la HMGR está codificada por un único gen, las plantas presentan varios genes que codifican HMGR. El número de genes varía dependiendo de la especie, en *Arabidopsis* por ejemplo son dos (Monfaret et al., 1990), pero existen casos de familias multigénicas como es el caso en el maíz, arveja y papa (Choi et al., 1992). La actividad de la enzima puede ser regulada por diversos factores, ambientales como la luz, bióticos como el ataque de diversos patógenos, a nivel transcripcional sus productos regulan el nivel de mRNA, la regulación postraduccional involucra la inactivación por fosforilación reversible donde el calcio se especula como regulador de quinasas y fosfatasa (Stermer et al., 1994).



**Figura I5: Estructura de la HMG-CoA reductasa en animales.** A diferencia de animales la enzima en plantas presenta 2 dominios transmembrana en lugar de 8.

#### ESTEROLES Y BRASSINOSTEROIDES EN REPUESTA A ESTRÉS ABIOTICO

Además de su papel en el desarrollo, los BRs protegen a las plantas frente a una variedad de estreses abióticos, incluyendo altas y bajas temperaturas, sequía, salinidad y bióticos como el ataque de patógenos (Krishna 2003; Divi et al., 2009). Existen pruebas que demuestran que el suministro de BRs genera tolerancia cuando son aplicados de forma exógena en plantas sometidas a estrés. Los cambios moleculares inducidos por estos BR están relacionados con la tolerancia al estrés incluyen un mayor nivel de expresión de genes de respuesta al estrés (Dhaubhadel 1999; Kagale et al., 2007) el mantenimiento de la síntesis de proteínas (Dhaubhadel et al., 2002), la inducción de la respuesta hormonal (Vert 2005), el aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, mayor acumulación de osmolitos osmoprotectores (Divi et al., 2009; Ozdemir 2004) y una mayor eficiencia fotosintética (Ogwen 2007; Krishna 2003). Estudios en la expresión génica global de *Arabidopsis* en tratamientos con y sin BRs exógenos sometidas bajo estrés indican que los BR afectan una gran variedad de procesos celulares, ya sea directamente o través de interferencias con otras vías hormonales, lo que resulta en un mejor rendimiento de las plantas bajo condiciones de estrés (Krishna com. per). Es evidente que la alteración de la actividad endógena de la BRs a través de la tecnología transgénica ofrece una gran promesa en la generación de cultivos con mayor tolerancia al estrés.

Recientemente, un gen que codifica una proteína HSD1 con homología a la de animales llamada 11- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) se identificó en *Arabidopsis* (Liet al., 2007). HSDs son importantes en la regulación del crecimiento y desarrollo de los animales, pero en las plantas sus funciones enzimáticas son no conocidas. Existe una relación de AtHSD con la biosíntesis de BR o con su señalización que aún no se ha establecido, pero se ha visto que la sobreexpresión de AtHSD1 en *Arabidopsis* lleva a la expresión constitutiva de genes de respuesta a BR y produce fenotipos similares a plantas con sobreproducción de BRs o BRI1 (receptor de BR), tales como un mayor crecimiento y rendimiento de semillas, así como una mayor tolerancia al de estrés salino y la latencia de las semillas se reduce (Divi et al., 2009).

En relación al estrés biótico, por ejemplo las respuestas de las plantas a este tipo de estrés se puede instrumentar a través de una compleja red que integra las vías de señalización caracterizada por la producción de etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico (Divi et al., 2010).

## OBJETIVOS:

### Objetivos generales:

Estudiar el posible rol de los esteroides en la regulación de las respuestas de tolerancia frente a estrés por sequía en plantas.

### Objetivos específicos:

- ✂ Evaluar los cambios en el desarrollo radicular inducidos por la inhibición de la enzima HMGR.
- ✂ Determinar si la relocalización de la enzima NADPH oxidasa en pelos radiculares es afectada por la aplicación de estatinas.
- ✂ Iniciar el mapeo y localización de una mutación responsable de restablecer el fenotipo en un mutante deficiente en esteroides (*dry2/sqe1-3*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg *erecta* como plantas salvajes, semillas mutantes *dry2/sqe1*, supresores de *dry2/sqe1*, líneas de introgresión y semillas transgénicas *dry2/sqe1* NOX-GFP (Takeda et al., 2008) fueron cedidas por el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Malaga, España.

### Condiciones de crecimiento de plantas *in vitro* y en maceta

La germinación de plantas de *Arabidopsis* para el posterior crecimiento *in vitro* requiere la esterilización previa de las semillas por lo que estas se esterilizaron con un tratamiento de hipoclorito 20%-Tween 20 0,1% durante 3 minutos, se retiró el hipoclorito y se enjuagó con agua destilada estéril, una vez retirada el agua se sumergieron en etanol 70% durante 1 minuto, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Las semillas se conservaron 24h en oscuridad a -4°C en agarosa 0,1% previo a la siembra.

Como medio basal de germinación y crecimiento en placas de petri se utilizó medio MS (Murashige et al., 1962).

La concentración de nutrientes 1X de este medio es la siguiente:

Macronutrientes	mM	Micronutrientes	mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6	H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	100
KNO <sub>3</sub>	18,8	CaCl <sub>2</sub>	0,1
		CuSO <sub>4</sub>	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	Na <sub>2</sub> -EDTA	100
CaCl <sub>2</sub>	3,0	FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	100
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1,5	KI	5
			100
		MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	1
		ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	30

Se ajustó el pH a 5.7 con NaOH y se agrega 7g/L de agar y 5g/L de sacarosa y la esterilización del medio se logró con autoclave.

Para el crecimiento de las plántulas las placas fueron colocadas en cámara de cultivo en posición vertical en la mayoría de los casos, siempre que se quiso observar un fenotipo radicular, o en posición horizontal en los ensayos en los que se necesitó observar un fenotipo de parte aérea.

Las semillas sembradas en maceta no se esterilizaron, pero se les realizó un tratamiento de hidratación que consiste en dejarlas en agua destilada 24h en oscuridad a -4°C para la posterior

siembra en macetas con turba. Hasta el momento de la germinación las semillas se protegieron de la atmosfera directa cubriéndolas con papel film.

En ambos casos (*in vitro* o macetas) las plantas fueron cultivadas en cámara de crecimiento en condiciones de fotoperiodo 16h/8h (luz/oscuridad),  $50\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de intensidad lumínica, 22°C de temperatura y 60% de humedad relativa.

Para el riego de las macetas se utilizó agua corriente a demanda.

#### Tratamiento con Atorvastatina

La atorvastatina cálcica es un fármaco de la familia de las estatinas que actúa como blanco de la enzima HMG-CoA reductasa, la atorvastatina se disolvió en metanol en una concentración final de 5, 10, 25 y 50mM. El tratamiento se realizó en los ensayos *in vitro*, donde las semillas son incubadas en atorvastatina diluida en MS a las concentraciones de ensayo e incubadas por 24 horas de oscuridad a 4°C posteriormente a la esterilización.

#### Extracción de proteínas totales

El tejido vegetal fresco se homogenizó en buffer de extracción en frío (50mM de Tris-HCl pH 7.5, 10mM KCl, 1mM EDTA, 2mM Ditioneitol (DTT), 0,5mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, (PMSF), 0.2% Triton X-100) en proporción 5:1 de tampón y tejido. El homogenizado se centrifuga a 6000g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó para realizar las distintas determinaciones.

#### Cuantificación de proteínas

La cuantificación se realiza según Bradford (1976). A 0,1mL de muestra se le agregan 5mL de reactivo, Azul de Coomassie G250 (Sigma) y se lee la absorbancia a 595nm.

#### Extracción de ADN para mapeo

Se tomaron 2 ó 3 foliolos pequeños y se los maceró con sondas de microtubos junto con el buffer de extracción (200mM Tris pH 7.5; 250mM NaCl; 25mM EDTA pH 3; 0,5 SDS) hasta que el tejido quedó totalmente homogéneo. Luego se centrifugó a 17500g durante 10 minutos. Se conservó el sobrenadante al cual se le agregó isopropanol para precipitar el ADN, esta mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos; se volvió a centrifugar a 17500g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado al cual se le agregó etanol 75% (v/v). Luego de 5 minutos de incubación se descartó el etanol y se dejó secar el precipitado. Una vez seco se lo resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril.

#### Cuantificación de Ácidos nucleicos.

La cuantificación espectrofotométrica de la concentración y pureza del DNA se realizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop2000 Spectrophotometer (Thermo scientific). Este espectrofotómetro se basa en el sistema patentado de tecnología de retención de muestra que permite entre otras ventajas la utilización de 1  $\mu\text{l}$  de muestra, no requiere la preparación de diluciones en la mayor parte de los casos, no requiere cubetas y capilares en el análisis y la preparación de la muestra y realización de las medidas se realiza en menos de 10 s. En el análisis de los datos, una unidad de absorbancia a

260nm (ABS260 = 1) equivale a una concentración de 50 µg/mL si la muestra es de DNA (Berger 1987).

Una aproximación sobre la calidad del DNA fue obtenida por el cociente entre las absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm que estima si nuestra preparación de ácidos nucleicos está contaminada por proteínas, ya que a 280nm absorben las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos. Los valores del cociente ABS260/ABS280 deben estar comprendidos entre 1,7 – 1,9 para el DNA. Además de dicho cociente, otra estimación de la pureza de la preparación se obtuvo realizando el cociente entre las absorbancias a 260nm y 230nm.

La absorbancia a 230nm es un indicativo de la contaminación de nuestra preparación por polisacáridos y fenoles. Los valores del cociente ABS260/ABS230 deben ser superiores a 2 tanto para DNA como RNA.

### Inmunodetección de RhoGTPasas

#### *SDS-PAGE*

La electroforesis de proteínas totales en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó en geles de poliacrilamida-SDS. Para la preparación del gel y el tampón se siguió el protocolo propuesto por Sambrook et al., 1989. La concentración de los geles concentrador y separador fue del 10% y 5% respectivamente. Una vez armado el cassette de aproximadamente 1.5mm de espesor se preparan los geles separador y concentrador según la siguiente tabla.

Gel separador 5mL:	Volumen
Acrilamida	1,67mL
Agua Destilada	2,27mL
Buffer Tris-HCl 1,8M pH 8,8	1mL
Dodecil sulfato (SDS) 10%	50µl
TEMED	5µl
Persulfato de Amonio 10% (PSA)	33,3µl

Gel stacking (1,5ml)	Volúmenes
Acrilamida	0,24ml
Agua destilada	1,08ml
Buffer Tris-Hcl 1,25M pH 6,8	0,15ml
SDS 10%	15µl
TEMED	3µl
Persulfato de Amonio 10% (PSA)	10µl

Se colocó Butanol ó agua destilada cuidadosamente sobre la superficie del gel separador antes de que polimerice (20 minutos aproximadamente) para alisar la superficie, luego se retiró y enjuagó con agua destilada.

Antes que polimerice el gel concentrador, se insertó el peine. Una vez producida la polimerización se retiró cuidadosamente el peine y se enjuagaron los pocillos con agua destilada. Se desarmó el cassette y se colocó el gel en la cuba de electroforesis. Se llenaron los compartimentos de la cuba con el Buffer de corrida Tris-glicina pH 8.3, y se procedió a sembrar las muestras.

Las muestras se sembraron a razón de 10 ug de muestra aproximadamente conjuntamente con el buffer de carga (2,5mL Tris 1,25M pH 6,8; 5,8mL Glicerol 87%, 5mg azul de bromofenol, 35mL agua destilada) en proporción 5:1. Se conectó la fuente de poder y se reguló a 30mA, luego que la muestra alcanzó el gel separador se aumentó a 35mA y la corrida se realizó hasta que buffer de corrida salió del gel. El teñido y desteñido de los geles se realizó sumergiendo el gel en la solución de tinción (Azul de Commassie: 0,1% Azul de Commassie, 45% Metanol, 10% Ácido Acético) durante 60 minutos en equilibrio, luego se retiró esta solución y se agregó la solución de decoloración (15%Ácido acético, 5% Metanol) equilibrando también hasta que aparezcan las bandas.

#### *Transferencia de proteínas totales a membrana*

Para la transferencia de las proteínas a membranas se equilibró durante 10 minutos aproximadamente en el buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM pH 8.3, Metanol 20%) el gel junto con 6 hojas de papel Whatman 1 cortadas del mismo tamaño. Además se cortó la membrana de PVDF un poco más grande que el gel y se la sumergió 5 segundos en metanol y posteriormente se la saturó en buffer de transferencia.

Se armó el sándwich (3 hojas Whatman-membrana-gel-3 hojas Whatman) dentro del Electrotransferidor TE 77 (ECL Semi-Dry Transfer Unit, Amershan Biosciences). La electrotransferencia se realizó a 40mA durante 1 hora. La transferencia de proteínas a la membrana se comprobó por tinción con rojo Ponceau 0.5% (p/v) y ácido acético 1% (p/v) hasta la aparición de bandas.

#### *Inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF*

Para la inmunodetección de la Rho-GTPasa se utilizaron anticuerpos Anti-AtRAC8 (SIGMA). Las membranas se lavaron 2 veces con agua miliQ y se incubaron en buffer TBS (Tris-HCl 20mM pH 7.5 y NaCl 0,5M), en agitación a 30rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Como solución de bloqueo se usó leche en polvo libre de grasa al 5% en TBS. Las membranas se incubaron en agitación a 30rpm por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces con TBS-Tween-20 0.1% (TBST) durante 10 minutos. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBST con leche en polvo libre de grasa al 5% y solución del anticuerpo primario Anti-AtRAC8 de conejo en una dilución 1/5000 en agitación 30rpm.

Luego se lavó 2 veces la membrana con TBST durante 10 minutos cada vez y se incubó durante 1 hora en anticuerpo secundario de cabra anti IgG de conejo conjugado con HRP en una dilución 1/8000 con TBST en leche en polvo sin grasa al 5%. Se lavó la membrana 2 veces en TBST durante 10 minutos cada vez y se incubó la membrana 2 min en las soluciones del Kit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham). Se removió el líquido y las membranas se cubrieron con papel film previo a la exposición a las películas de rayos X.

#### Microscopía de Fluorescencia y Confocal

Pelos radiculares de plántulas transgénicas *dry2/sqe1* NOX-GFP (Takeda et al., 2009) crecidas por tres días *in vitro* fueron observadas al Microscopio de fluorescencia Olympus-New Vanox y las fotos se tomaron con cámara Olympus DP71, servicio del Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía. Para la microscopia confocal se uso un Microscopio Leica TCS SP5, servicio de la Unidad de Biología Celular del Instituto Pauster.

Detección de  $O_2^{\cdot-}$  in situ mediante tinción con Nitroblue Tetrazolium (NBT)

La detección del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en raíz se realizó según el protocolo propuesto por Jabs et al. (1996). Plántulas enteras de tres días se infiltraron con ayuda de vacío en tampón fosfato 10mM pH 7.8,  $NaN_3$  10mM conteniendo NBT 0.1%, en volumen suficiente para cubrirlos. Se incubaron bajo un tubo de luz de 20W durante 1 hora. Posteriormente las plántulas se lavaron primero en etanol 50% (v/v) y después con agua, y se montaron sobre portaobjetos con glicerol 70%. Las observaciones se realizaron en microscopio como se describió anteriormente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los cebadores utilizados en este trabajo parte fueron sintetizados por la empresa INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT)- Tanirely parte cedidos por el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Malaga, España. En el Anexo (A1) se recoge la secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR. Las reacciones se llevaron a cabo rutinariamente en un volumen de 10  $\mu$ l; en microtubos estériles a las cuales se añadió los distintos reactivos según el siguiente protocolo:

	Volúmenes
1,5mM $MgCl_2$	0,6 $\mu$ l
100 $\mu$ l dNTPs	0,4 $\mu$ l
250nM Forward primer	0,3 $\mu$ l
250nM Reverse primer	0,3 $\mu$ l
1 Unidad de Taq polimerasa	0,2 $\mu$ l
Buffer Taq +KCl - $MgCl_2$	1 $\mu$ l
ADN de la muestra	5 $\mu$ l
$H_2O$ mq estéril para llevar a 10 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l

Una vez realizado la mezcla de reacción los tubos se incubaron con el programa de ciclado correspondiente:

1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1:30 minutos

40 ciclos:

desnaturalización a 94°C durante 15 segundos

hibridación, a una temperatura de annealing entre 3-5°C inferior a la  $T_m$  de los cebadores, durante 15 segundos

extensión a 72°C durante 30 segundos.

Por último 1 ciclo de extensión final durante 2 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron visualizados tras separarlos mediante una electroforesis en geles de agarosa.

El ADN se corre en electroforesis horizontal en geles de agarosa. El tampón con el que se realizaron los geles y se desarrolló la electroforesis fue TBE 1X (54g/L Tris; 27.5g/L Ácido Bórico; 0,5M EDTA pH 8) procedente de una solución madre concentrada TBE 5X. El porcentaje de agarosa en los geles osciló entre el 1 y 3 % (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Una vez pesada la cantidad adecuada de agarosa se fundió en TBE 1X calentando la solución en un horno microondas. Una vez fundida se dejó enfriar al aire hasta que la solución alcanzó una temperatura aproximada de unos 50 °C momento en el cual se le añadió la cantidad adecuada de Goodview (SDS, China) (GVII). La mezcla resultante se vierte en un soporte de metacrilato donde se deja solidificar.

Las muestras a separar se mezclaron con el volumen de tampón de carga de Azul de bromofenol (Azul de Bromofenol 0.25%; Xilencianol (Xc) 0.25%; Glicerol 50%) en proporción 5:1. Como marcadores de tamaños moleculares se utilizaron 1 kb PLUS y 100 bp Ladder fermentas. Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje que osciló entre los 100mA para la visualización de las bandas de DNA se utilizaron lámparas de luz UV en el equipo Dynalight Dual intensity UV transilluminator y el equipo Gel Logic 100, Imagine System que permitió registrar y almacenar los resultados obtenidos.

### Mapeo

Para el mapeo del supresor3 de *dry2/sqe1* se utilizaron líneas de introgresion, técnica usada en la transferencia de material genético desde un individuo a otro por retrocruzamientos.

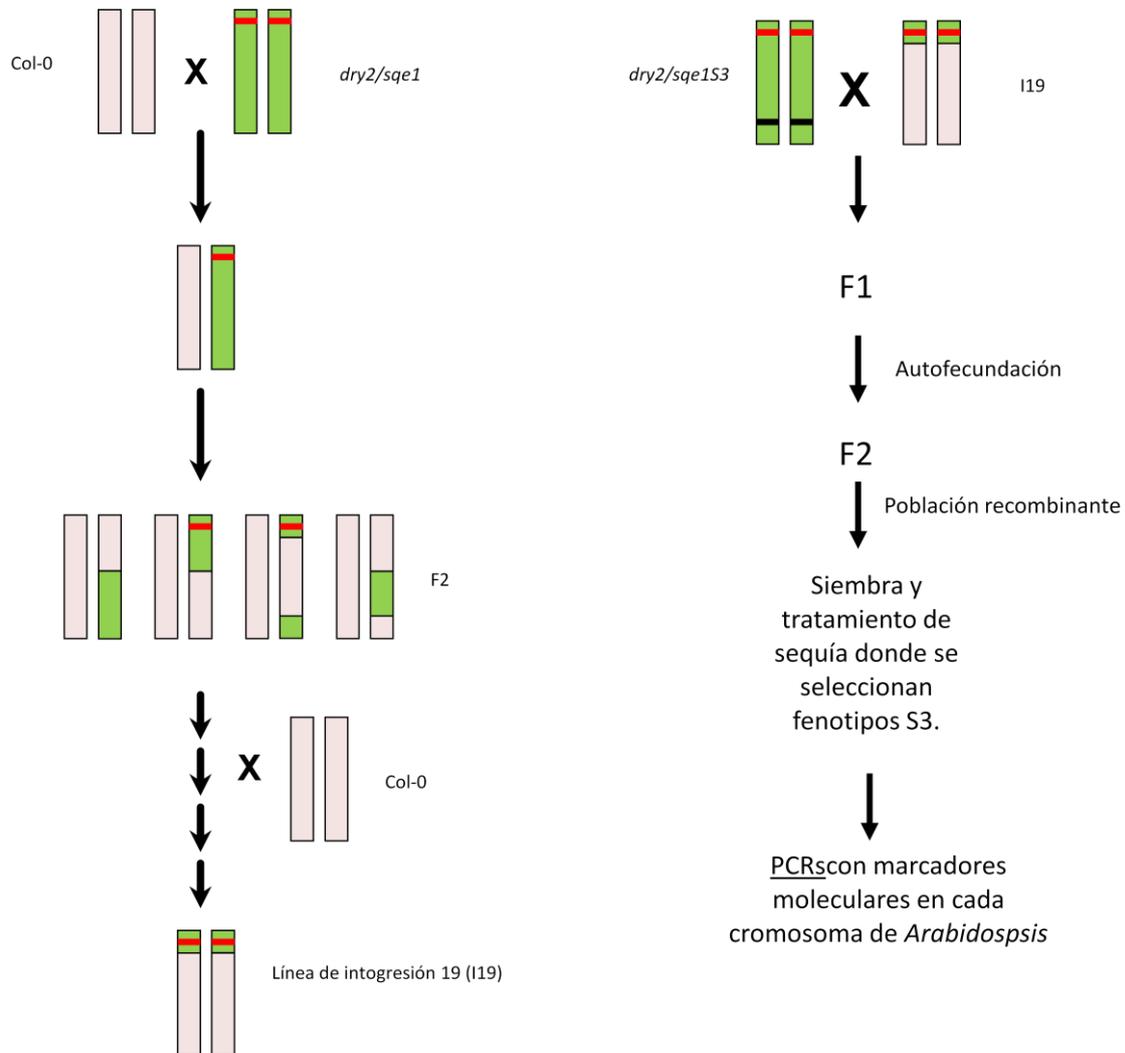
Las líneas de introgresión (I19) son cruzadas con el supresor S3, obteniendo la F2 que será la población mapeada. Las líneas de introgresión están construidas por el retrocruce de individuos de ecotipo Col-0 por *dry2/sqe1* (fondo genético *Ler*), la F1 es autofecundada para obtener la F2 la cual a su vez es cruzada 19 veces por uno de los parentales (Col-0). El individuo resultante es I19, que contiene la mutación *dry2/sqe1* en fondo genético Col-0.

I19 es entonces cruzado con el individuo S3 (mutante que lleva la mutación *dry2/sqe1* y la que se quiere mapear en un fondo *Ler*) obteniendo una población F2 recombinante. Esta F2 fue adquirida por Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Malaga, España.

Las semillas F2 son germinadas en macetas con turba, en cámara de crecimiento durante 30 días. Se las somete a sequía para diferenciar fenotipo *dry2/sqe1* (sensibles a sequía) y *dry2/sqe1-S3* (no sensibles a sequía). Para lograr estrés hídrico, el déficit hídrico se impuso severamente interrumpiendo el riego de las plantas desde el inicio de la germinación.

La estrategia de mapeo genético se representa en la figura M1, se puede definir como un proceso de identificación de la base genética de un fenotipo mutante mediante la búsqueda de marcadores cuya posición física en el cromosoma es conocida y que están físicamente ligados a la mutación de interés (Jander et al., 2002). Este método para la localización de mutaciones es posible gracias al conocimiento de los polimorfismos existentes entre las secuencias de dos ecotipos de *Arabidopsis*,

en nuestro caso Col-0 y *Ler*, los cuales están disponibles en la base de datos TAIR (<http://www.Arabidopsis.org/browse/Cereon/index.jsp>). Para la clonación posicional es necesario crear una población recombinante, para lo cual se cruzó el individuo mutante (*dry2/sqe1-S3*, que presenta además de la mutación a mapear la mutación *dry2/sqe1* en fondo *Ler*) con la línea de intogresión I19 (Col-0 con mutación *dry2/sqe1*). Por autofecundación se obtuvo la población F2 que es recombinante y fue la que se utilizó en el mapeo.



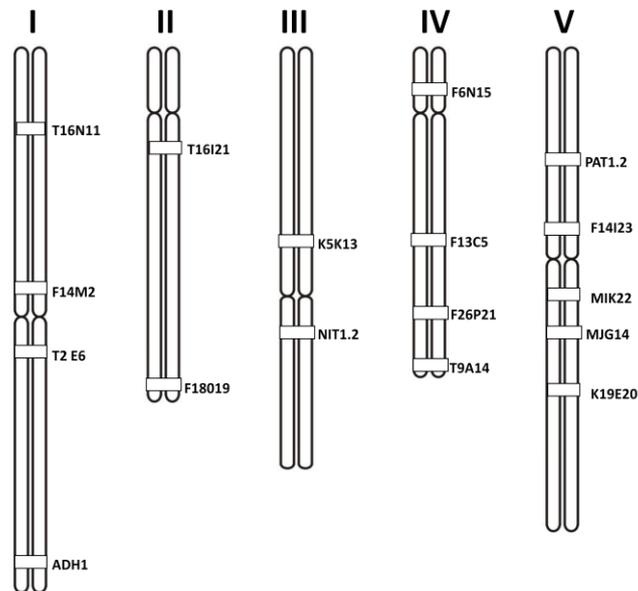
**Figura M1: Estrategia general utilizada para el mapeo inicial del mutante *dry2/sqe1-S3*.**

Los marcadores empleados son de dos tipos y se encuentran distribuidos en los 5 cromosomas de *Arabidopsis*, en la figura M2 se representan (en el Anexo1 están los detalles de secuencias de los marcadores empleados):

SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms): marcadores que sirven para detectar diferencias en la longitud de un producto de PCR. Las diferencias son debidas normalmente a pequeñas inserciones o deleciones (InDels) debidas a diferencias en el número de repeticiones de secuencias pequeñas como los microsatélites. Usando cebadores para amplificar esta región genómica y separando los productos de PCR en gel de agarosa se pueden detectar estos polimorfismos. Suelen tratarse de marcadores codominantes.

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphisms): son marcadores basados en cambios puntuales de nucleótidos (SNPs), que provocan la ausencia o presencia de un sitio de restricción. En este método, el DNA genómico que contiene el polimorfismo es amplificado por PCR usando cebadores específicos.

El producto de PCR es digerido con una enzima de restricción y los productos separados en un gel de agarosa. El polimorfismo se detecta comprobando la capacidad o incapacidad de la endonucleasa de digerir dicho producto de PCR. En esta tesis no se realizaron los cortes con enzimas de restricción, solamente se realizaron las amplificaciones de PCR y se corrieron en gel de agarosa.



**Figura M2:** Esquema representativo de los 5 cromosomas de *Arabidopsis thaliana* con la localización de los marcadores moleculares de tipo SSLP y CAPS empleados para el mapeo inicial del mutante *dry2/sqe1-S3*.

#### Programas informáticos

##### *Medidas del crecimiento radicular.*

El crecimiento radicular fue seguido por medidas de raíz primaria a través del Software libre Image-Pro-Plus.

##### *Construcción de Mapa genético.*

Se trabajó con un mapa genético de la población F2 producto del cruzamiento de S3X I19, este mapa fue reconstruido a partir de una población de 34 individuos. Para la construcción del mapa se usó un valor de LOD=3 y una frecuencia de recombinación  $r=1/2$ , para el cálculo de las distancias en centiMorgans se usó la función de mapeo haldane. Se usó el software libre Onemap (Margarido, 2007).

## RESULTADOS

El tratamiento con atorvastatina recupera parcialmente el fenotipo de *dry2/sqe1*

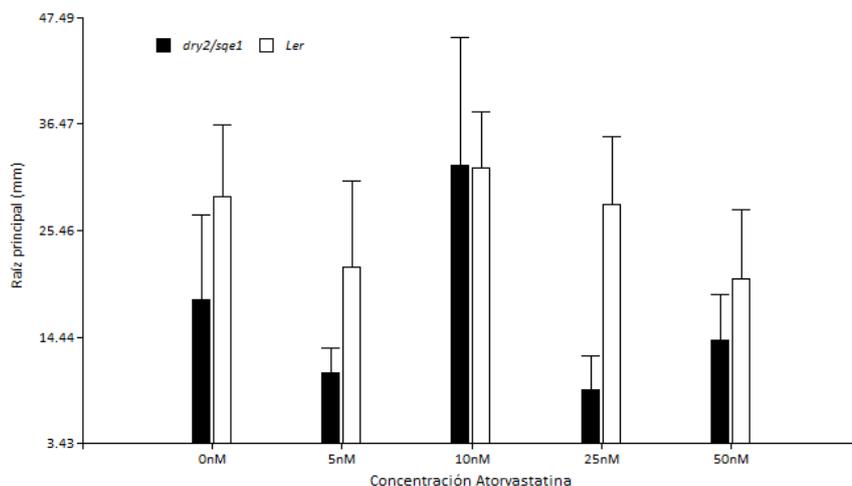
Las plantas *dry2/sqe1* se caracterizan por tener un menor tamaño de la raíz primaria y por presentar una mayor ramificación que las de tipo salvaje, este fenotipo de sistema radicular alterado es característico de estos mutantes (Posé et al., 2009).

Antecedentes de nuestro laboratorio de investigación evidenció que las raíces del mutante *dry2/sqe1* presenta un incremento de la actividad de la enzima 3-hidroxi-3- metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), pasando de los 196,8 pmoles/g min en *Ler* a 272,5 pmoles/g min en *dry2/sqe1*. Esto sugiere que en las raíces de *dry2/sqe1* se está incrementando la actividad HMGR posiblemente como efecto compensatorio ante la reducción de actividad SQE1. Cabe recordar que la proteína codificada por el gen *SQE1* mutado está situada por debajo de la enzima HMGR en la ruta biosintética de esteroides.

Debido a que la enzima HMGR tiene un papel regulatorio muy importante en la síntesis de esteroides se procedió en este trabajo a realizar ensayos con inhibidores específicos, en este caso se utilizó atorvastatina cálcica. Esta estrategia intenta restaurar los niveles de esteroides, principalmente los niveles de escualeno, y lograr la homeostasis a nivel celular y de esa forma modificar el fenotipo mutante.

La atorvastatina es un tipo de estatina que actúan como inhibidor específico de la HMGR, es comúnmente utilizada en medicamentos para reducir los niveles de colesterol (Tobert et al., 2003), la estrategia de acción se basa al gran parecido estructural que exhiben estos fármacos con el sustrato de la enzima, la molécula de HMG-CoA. La inhibición se realiza de forma competitiva, parcial y reversible.

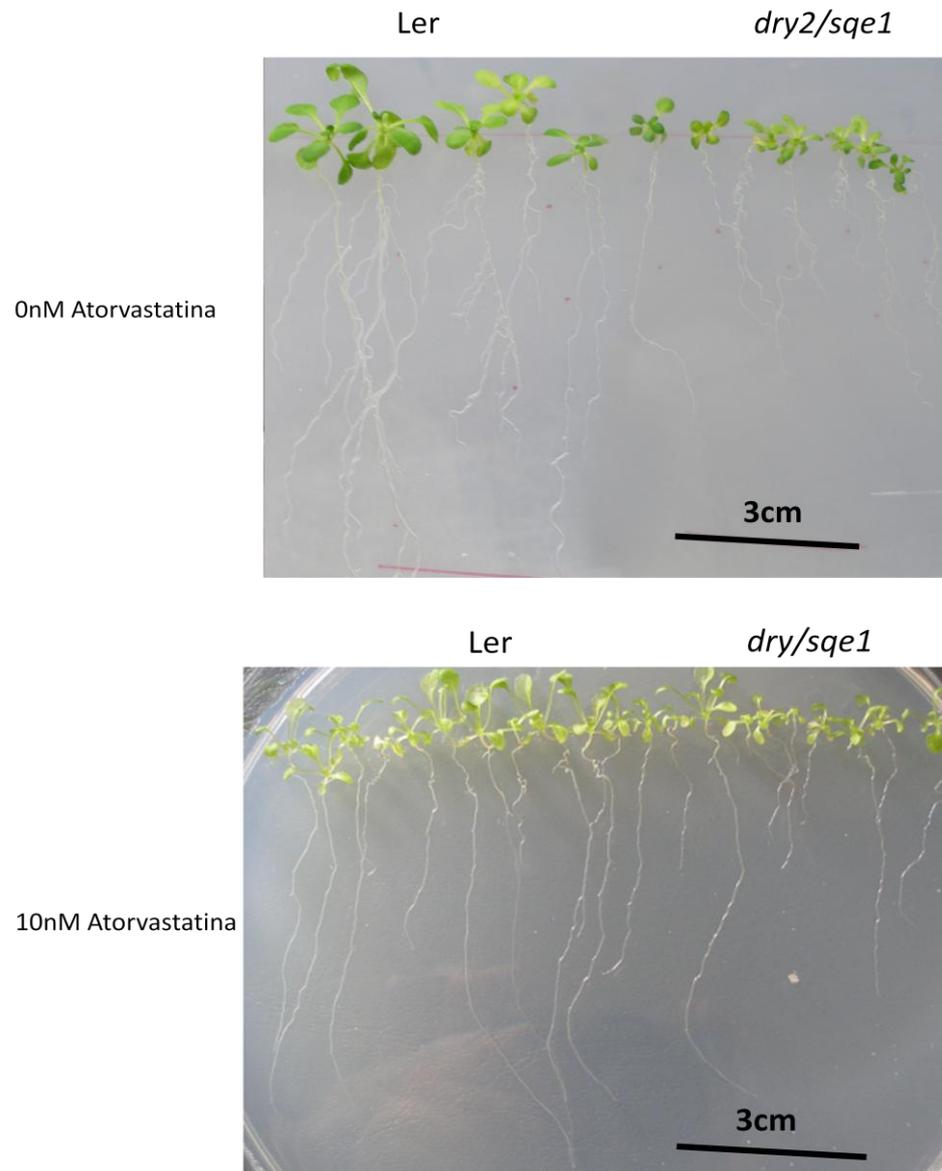
Antes de comenzar con los ensayos se experimentó con distintas concentraciones de atorvastatina, donde se analizó la respuesta de las plantas a dicho fármaco ya que no existe mucha evidencia del uso de estatinas en células vegetales. Para esto se germinaron *in vitro* semillas de *Ler* y mutantes *dry2/sqe1* pretratadas con distintas concentraciones de atorvastatina y se evaluó el fenotipo tras 15 días de tratamiento. Las concentraciones con que se trabajó fueron en el orden de los nM y  $\mu$ M. En la figura R1 se observa la gráfica de crecimiento obtenida. A 100 $\mu$ M todas las plantas mueren (dato no mostrado), de las concentraciones usadas la que tuvo mejor resultado fue 10nM, curiosamente como primera aproximación se observa que el tratamiento revierte el fenotipo radicular de *dry2/sqe1* ya que la raíz principal es de tamaño similar al de las plantas salvajes.



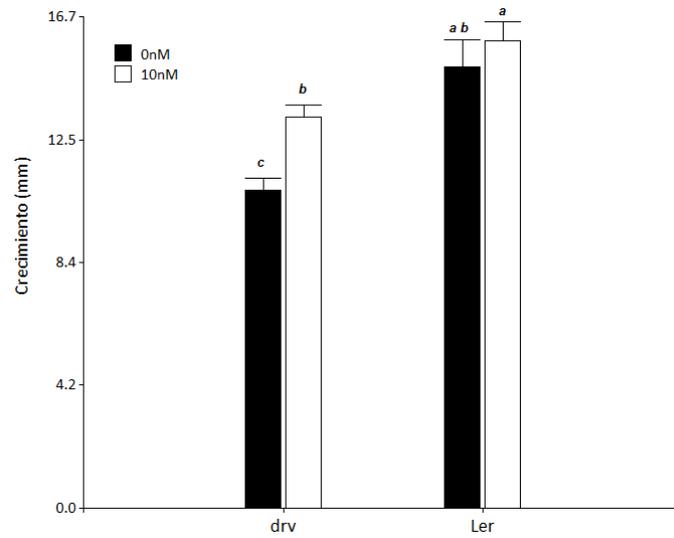
**Figura R1: Crecimiento radicular de la raíz primaria a distintas concentraciones de atorvastatina.**

Los resultados son medias del crecimiento del sistema radicular en mm de plantas *Ler* (negro) y *dry2/sqe1* (rojo) en de forma *in vitro* de 15 días a distintas concentraciones de Atorvastatina (0, 5, 10, 25, 50nM). Las líneas verticales indican el desvío estándar.

Una vez puesto a punto el ensayo anterior, se procedió a evaluar la recuperación del fenotipo en el mutante a concentraciones de 10nM de atorvastatina. Se evaluó la longitud de raíz primaria en dos tiempos, uno inicial que se corresponde a una semana después de la germinación y el final a las dos semanas cuando se levanta el ensayo. En la figura R2 se observa una foto del ensayo en el tiempo final, donde de forma cualitativa se puede evidenciar la recuperación del fenotipo radicular de las plantas *dry2/sqe1* en atorvastatina. En un análisis cuantitativo se realizó la medida de la raíz primaria y se calculó la tasa de crecimiento absoluta, como forma de evaluar el crecimiento de las plantas dentro del tiempo del ensayo. En la Figura R3, se muestra que el mutante *dry2/sqe1* en atorvastatina crece igual al salvaje. Esto confirma que la inhibición de la HMGR a través del uso de atorvastatina revierte el fenotipo inducido por la deficiencia de esteroides.



**Figura R2:** Fotografías de plántulas de *Ler* y *dry2/sqe1* donde se analiza fenotipo en respuesta al tratamiento de atorvastatina. Plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* germinadas y crecidas por 15 días y tratadas de forma control con 0nM (cuadro superior) y con 10nM de Atorvastatina (cuadro inferior).



**Figura R3:** Crecimiento absoluto del sistema radicular de plántulas *Ler* y *dry2* en tratamiento con Atorvastatina 10nM. Gráfico con el crecimiento absoluto en mm de la raíz principal de plántulas de *Arabidopsis thaliana Ler* y *dry2* en placas con MS de 15 días en tratamiento control ó con Atorvastatina. El ensayo se realizo de forma aleatorizada en un n=4. Según el análisis de varianza las medidas con una letra en común son significativamente iguales ( $p \leq 0,05$ ).

### Relocalización y composición de NADPH oxidasa en pelos radiculares en respuesta a atorvastatina

El mutante *dry2/sqe1* presenta una deslocalización de la enzima NADPH oxidasa a nivel de la membrana plasmática de los pelos radiculares (Posé et al., 2009). Seguramente la existencia de una disminución en la composición de esteroides, consecuencia de la mutación a nivel de uno de sus intermediarios de biosíntesis, más específicamente a nivel de la enzima SQE1, provoque una localización distinta de la enzima.

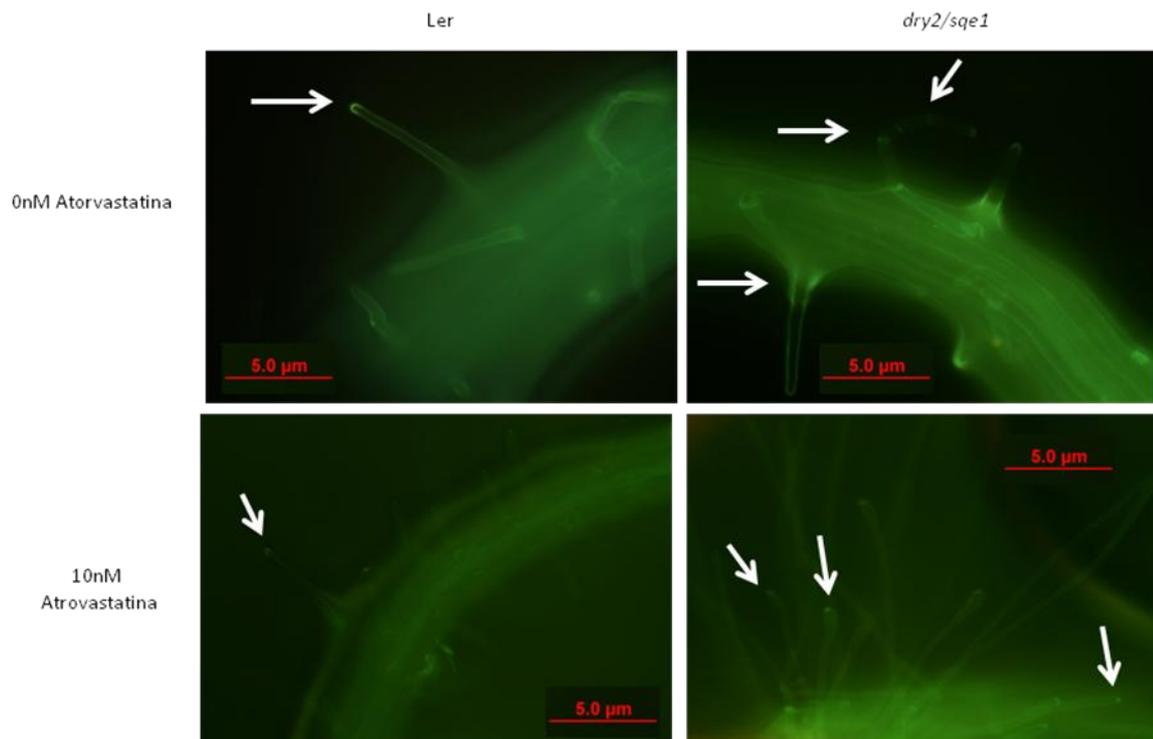
Existe conocimiento que la polarización de microdominios lipídicos enriquecidos con esteroides se ha relacionado con la morfogénesis y el movimiento celular en diversos tipos de células. La localización de las especies reactivas del oxígeno en la MP producidas por la NOX (también llamado Rboh en plantas) es probable que sea un mecanismo general para el control del crecimiento polarizado de las células vegetales, tal como sucede en los tubos polínicos, pelos radiculares y cigotos de *Fucus* (Carol et al., 2005; Coelho et al., 2008; Potocky et al., 2007; Samaj et al., 2004). La generación de ROS por NOX desencadenan la hiperpolarización por la activación de canales de  $Ca^{2+}$  en la MP apical, que conduce a la entrada de este ion, regulando así una punta centrada en un gradiente de  $Ca^{2+}$  que es esencial para el crecimiento de la punta (Foreman et al., 2003).

En este trabajo por medio del tratamiento con atorvastatina en plántulas *dry2/sqe1* se mostró que se revierte el fenotipo al restablecer de alguna forma la homeostasis de esteroides. Al igual que lo observado con la arquitectura radicular se espera que la deslocalización de la NOX también se revierta a la posición apical que presentan las plantas salvajes (Foreman et al., 2003).

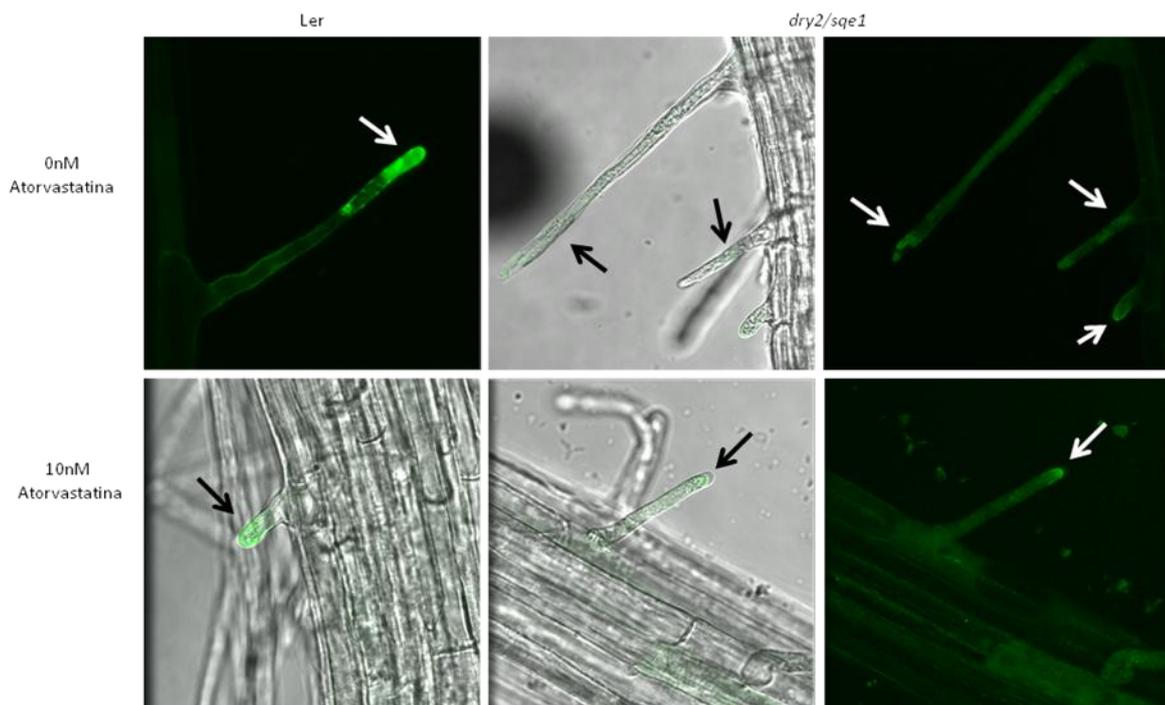
Mediante plantas transgénicas *Ler* y *dry2/sqe1* que llevan la construcción de la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero, fusionada a RHD2, un tipo de NADPH oxidasa (RHD2-GFP), permitirá seguir la localización de la enzima tanto en condiciones control como en tratamientos con atorvastatina.

La proteína RHD2/AtrbohC (Root Hair Defective2/*Arabidopsis thaliana* respiratory burst oxidase homolog C en sus siglas en inglés) es una NADPH oxidasa que transfiere electrones desde el NADPH al  $O_2$  provocando la generación de ROS en los tricoblastos. Esta generación de ROS en los ápices de los pelos radiculares es necesaria para la elongación de los mismos. En este proceso, RHD2/AtrbohC parece estar regulada directa o indirectamente por ROP2/GTPase, y se generan ROS que activan canales de  $Ca^{2+}$  provocando la entrada de este ión, involucrado en la modulación de los filamentos de actina y de otros procesos necesarios para el crecimiento del pelo radicular. Además, el  $Ca^{2+}$  activa la RHD2/AtrbohC de manera que se establece una retroalimentación positiva que mantiene activo el crecimiento en la zona de expansión del pelo radicular (Takeda et al., 2008; Foreman et al., 2003).

En la figura R4 y R5 se muestran las microscopías de epifluorescencia y confocal respectivamente de plántulas transgénicas con tres días de crecimiento *in vitro* en los distintos tratamientos. Como es de esperar las plántulas salvajes presentan un aumento de la señal verde en forma cóncava en posición apical en los pelos radiculares como lo sugiere Foreman et al. 2003. La señal se localiza en la punta de los pelos en las primeras etapas del desarrollo y esta localización polar se mantiene durante el crecimiento posterior del pelo de raíz (Posé et al., 2009).



**Figura R4:** Fotografías de pelos radiculares utilizando microscopía de epifluorescencia donde se analiza la fluorescencia de plántulas transgénicas GFP-RHD2 de *Ler* y *dry2/sqe1*. Plántulas de *Ler* GFP-RDH2 y *dry2/sqe1*-GFP-RDH2 germinadas durante tres días *in vitro* en MS se sometieron a tratamientos con (cuadro inferior) y sin atorvastatina (cuadro superior). Las flechas blancas indican la mayor señal del GFP.

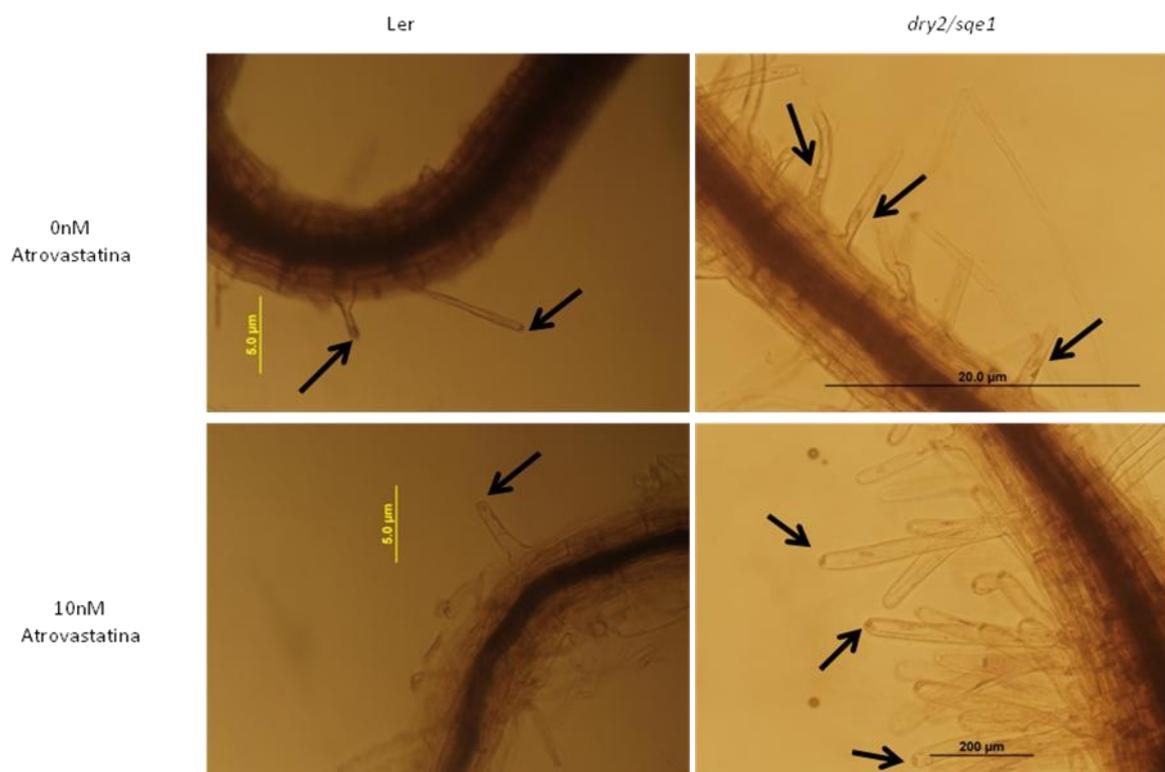


**Figura R5:** Fotografías de pelos radiculares utilizando microscopía confocal donde se analiza la fluorescencia de plántulas transgénicas **GFP-RHD2 Ler y *dry2/sqe1***. Plántulas de *Ler* GFP-RDH2 y *dry2/sqe1*GFP-RDH2 germinadas de tres días *in vitro* en MS se sometieron a tratamientos con (cuadro inferior) y sin atorvastatina (cuadro superior). Las flechas blancas y negras indican la mayor señal del GFP.

Las plántulas transgénicas *dry2/sqe1* presentaron una deslocalización de la NOX aunque al inicio del desarrollo la localización es apical, como también es de esperar (Posé et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que esta enzima se recicla entre la membrana plasmática y endosomas tempranos (Takeda., et al 2008). Es posible por tanto que el defecto de *dry2/sqe1* se deba a un defecto en el tráfico vesicular que impida que la NOX se localice en el lugar correcto por falta de esteroides estructurales esenciales.

Sin embargo cuando las plantas *dry2/sqe1* que son sometidas a tratamientos con atorvastatina, presentan un patrón diferente y muy particular de señal. En las figuras se puede apreciar como la señal se revierte a la posición apical, pero no con forma cóncava como las plantas salvajes sino que en forma esférica. Este patrón fue detectado en la gran mayoría de los pelos y no fue encontrado en ningún otro tratamiento. Como control se sometió plántulas salvajes a tratamientos con atorvastatina para asegurar que el patrón observado en *dry2/sqe1* era exclusivo del mutante. Estas plantas salvajes presentaron señales similares a lo que se produjo en las plantas control sin atorvastatina.

Para apoyar estos resultados se realizaron ensayos que detectan el producto de la enzima NOX: el radical superóxido. Por medio de tinción con NBT que es un indicador de este radical se detectó la localización de este ión. En la figura R6 se observa la microscopía de los pelos radiculares teñidos con NBT los cuales presentan el mismo patrón que las microscopías de plántulas con la construcción RDH2-GFP. Plantas salvajes con y sin atorvastatina presentan señal en forma cóncava apical, *dry2/sqe1* posee una deslocalización espacial de ROS y cuando se trata con el inhibidor de la HMGR la señal se recupera a la posición apical pero la acumulación de ROS tiene la misma forma esférica observada con la proteína RDH2.



**Figura R6: Fenotipo de pelos radiculares y análisis de la acumulación del ión superóxido mediante tinción con NBT.** Las flechas indican en detalle pelos radiculares de plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* germinadas durante 3 días *in vitro* en MS en tratamiento control (fotografías superiores) y con atorvastatina (fotografías inferiores).

Además del estudio sobre la localización de la enzima NADPH oxidasa en el sistema radicular se evaluó la cantidad de una proteína vinculada en la regulación de las NADPH oxidasas, una Rho GTPasa la proteína ROP2/GTPasa, a través de ensayos de inmunodetección, por otro lado se evaluó la respuesta de esta proteína al agregado de atorvastatina.

Las Rho GTPasas pertenecen a la superfamilia de las pequeñas proteínas Ras GTPasas, que están compuestas por los subgrupos Rho, Rac, Cdc42. En las células animales, Rho GTPasas regulan diferencialmente el citoesqueleto de actina, endocitosis, y varias cascadas de señalización activadas por mitógenos como las proteínas quinasa (MAPK) y fosfoinosítidos (Hall 1998; Bishop et al., 2000).

La activación de Rho se produce a través de la interacción con factores de cambio GDP / GTP (GEF) y las proteínas activadas por GTPasa (GAPs), moduladas por prenilación (Zhang et al., 1996).

Las plantas contienen una única subfamilia de Rho GTPasa designada como RAC o Rop. La subfamilia RAC / Rop se subdivide en dos grandes subgrupos llamados de tipo I y tipo II. Las proteínas RAC/Rop regulan una amplia variedad de procesos celulares, que inducen la reorganización de la actina, y han sido implicados en los cambios en el patrón del crecimiento polar (Fu et al., 2002; Molendijk et al., 2001). Además de los cambios en la organización de la actina, RAC / Rop pueden inducir la entrada  $Ca^{2+}$  en la punta de los tubos polínicos y el crecimiento de células en los pelos de la raíz (Li et al 1999., 2001).

También regulan la señalización mediada por diversas hormonas de la planta, procesos de desarrollo, producción de especies reactivas del oxígeno, y modulan la respuesta de hipersensibilidad inducida por patógenos (HR) (Li et al., 2001; Park et al., 2000; Ono et al., 2001)

En *Arabidopsis*, se han identificado 11 diferentes RAC/Rop GTPasas (~ 21 kDa) (Winge et al., 2000). En pelos radiculares está demostrado que la ROS generada por NADPH es la causante del crecimiento polar del pelo radicular en *Arabidopsis*. Se ha demostrado que la ROP2/GTPase (una Rho GTPasa de planta) es la encargada de regular a RHD2/AtrbohC en raíz (Carol et al., 2005).

RHD2/AtrbohC está activada por  $Ca^{2+}$  (Takeda et al., 2008), de manera que se produce una retroalimentación positiva, ya que las ROS generadas por esta proteína produce la activación de canales de  $Ca^{2+}$ , de manera que este ion entra por el ápice del pelo radicular activando más RHD2/AtrbohC y generando un gradiente de concentración entre la base y el ápice, fundamental para la elongación del pelo (Foreman et al., 2003).

Estas enzimas son componentes críticos para la localización o actividad de la NADPH oxidasa, es por esto que es útil trabajar con anticuerpos anti-GTPasas que colocalizan con las NOXs específicamente en raíz.

Para la inmunodetección se realizó una extracción de proteínas totales de plantas enteras de 15 días de crecimiento de *Ler* y *dry2/sqe1* en tratamientos con y sin atorvastatina. La cuantificación proteica se observa en la tabla R1 a continuación.

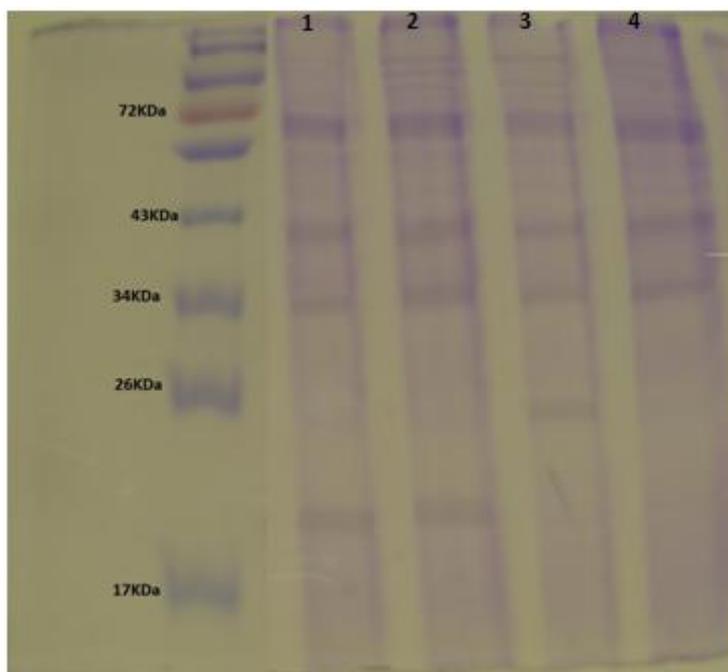
**Tabla R1: Concentración de proteínas totales en plantas *Ler* y *dry2/sqe1* en tratamientos con atorvastatina.** Cuantificación por el método de Bradford del extracto de proteínas totales de plantas enteras de *Ler* y *dry2/sqe1* en 0 y 10nM de Atorvastatina con 15 días de crecimiento.

[Atorvastatina]	Genotipo	Concentración (mg/ml)
0nM	<i>Ler</i>	0.3936
10nM	<i>Ler</i>	0.2801
0nM	<i>dry2/sqe1</i>	0.2705
10nM	<i>dry2/sqe1</i>	0.3128

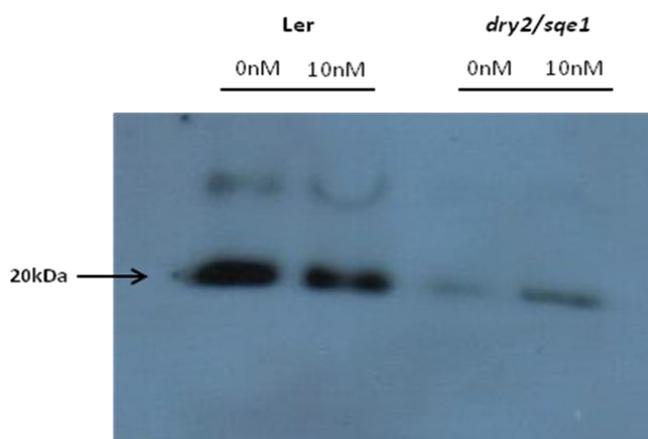
A partir de la cuantificación se realizó una electroforesis de proteínas totales y una inmunodetección de Rho-GTPasa sembrando aproximadamente 40µg de proteína por pocillo.

En la figura R7 se representa la electroforesis proteica donde se aprecia un perfil similar en ambos genotipos.

En la figura R8 se observa el resultado del Western Blot donde se observa una única banda de un peso aproximado de 21kDa, presente en todos los tratamientos. La banda con mayor señal se corresponde a plantas *Ler* sin atorvastatina y se observa una leve disminución con el agregado de 10nM de este fármaco. Por otro lado plantas *dry2/sqe1* en condiciones control presenta claramente una menor cantidad de enzima con respecto a *Ler*. Al contrario de lo observado en *Ler* el tratamiento con atorvastatina induce una acumulación de la proteína en plantas *dry2/sqe1*.



**Figura R7:** Perfil proteico de plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* en tratamiento con atorvastatina obtenido a partir de extractos de proteínas totales. 40µg de proteínas fueron sembradas en cada carril. 0: Marcador de peso molecular, 1: *Ler* en 0nM de Atrovastatina, 2: *Ler* en 10nM de Atrovastatina, 3: *dry2/sqe1* en 0nM de Atrovastatina, 4: *dry2/sqe1* en 10 nM de Atrovastatina.



**Figura R8:** Inmunodetección de Rho-GTPasa en plantas *Ler* y *dry2/sqe1* en respuesta al tratamiento con atorvastatina. Inmunodetección con anticuerpos anti-Rho GTPasa a partir proteínas totales de plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* en tratamiento con y sin atorvastatina. En cada carril se sembró aproximadamente 40µg.

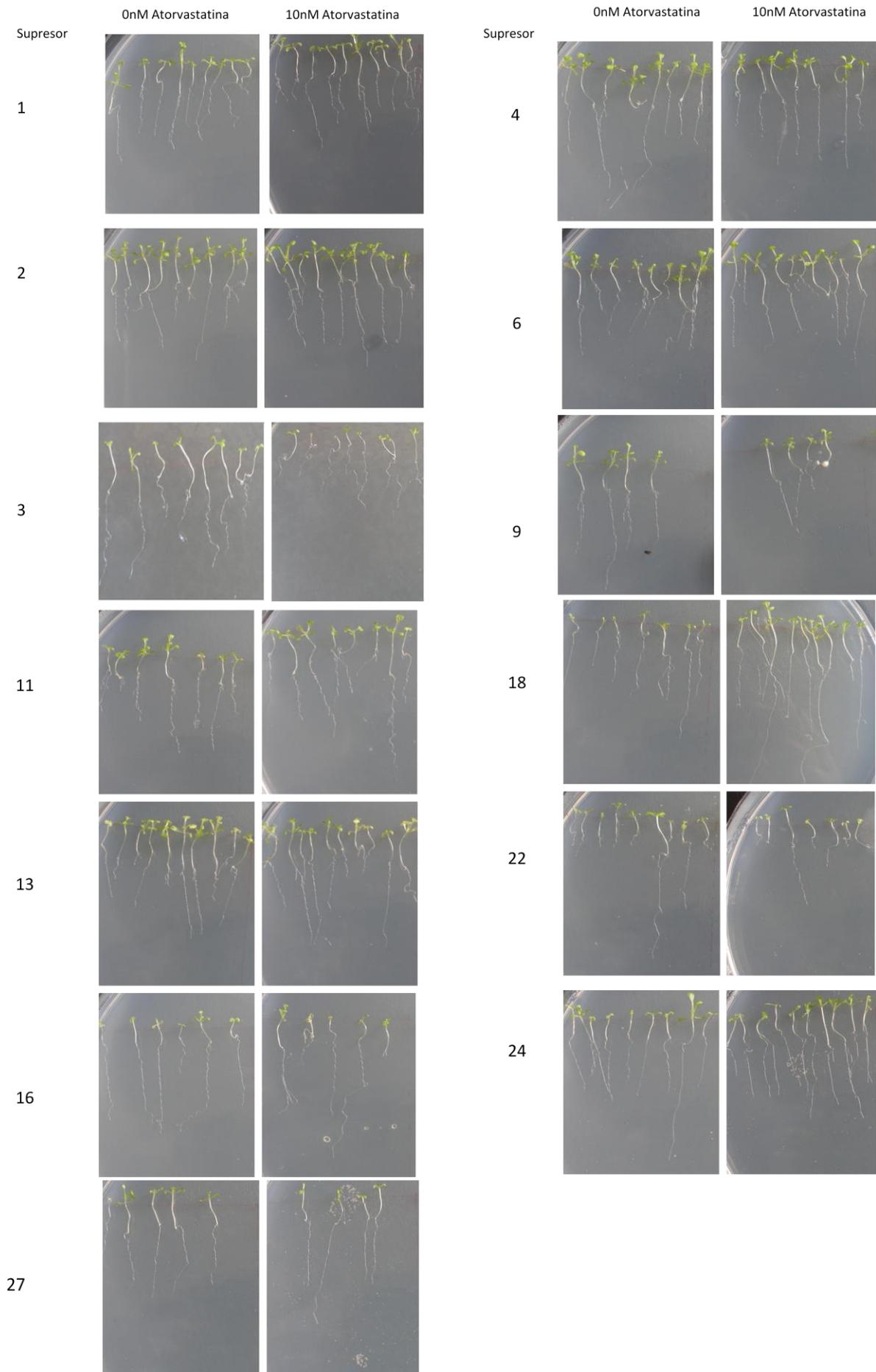
### Mapeo inicial de un supresor de *dry2/sqe1*

La fertilidad de *dry2/sqe1* permitió obtener segundas mutaciones que suprimen tanto la alta sensibilidad a sequía, como los defectos de desarrollo y la respuesta estomática, a este tipo de mutaciones se las llama supresores.

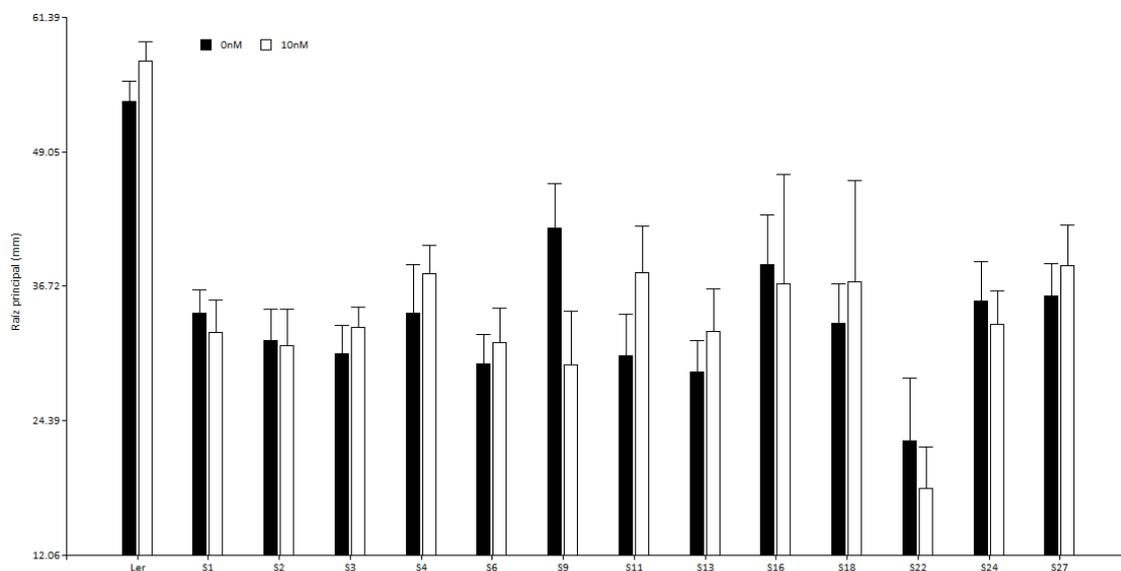
La búsqueda de segundas mutaciones que supriman el fenotipo de un determinado mutante es una estrategia genética muy utilizada que permite identificar componentes genéticos relacionados con la mutación y estudiar rutas de transducción de señales. Para conocer el mecanismo e identificar nuevos componentes genéticos implicados en la regulación de la hipersensibilidad a sequía y el desarrollo de *dry2/sqe1* se realizó un cribado de supresores en el fondo genético del mutante *dry2/sqe1*.

Se identificaron 14 supresores los cuales presentan la mutación *dry2/sqe1* y recuperan la tolerancia a sequía en las siguientes generaciones. Estos fueron obtenidos por una nueva mutágenesis y sometiendo las plántulas a estrés hídrico para posteriormente recuperar los individuos que presentan una mayor tolerancia a sequía que *dry2/sqe1*.

En este trabajo se germinaron los 13 supresores para evaluar su fenotipo. La figura R9 muestra el fenotipo de cada supresor en condiciones control y en tratamiento con atorvastatina, siempre comparándolo con las plantas de tipo salvaje de ecotipo *Ler* (datos no mostrados). Una primera aproximación muestra que las estatinas no tienen ningún efecto visible sobre el fenotipo de los supresores como sucede con los mutantes *dry2/sqe1*. Un análisis más cuantitativo (Figura R10), se realizó a través de medidas de la raíz principal y confirma que la atorvastatina no tiene efecto sobre los supresores.



**Figura R9: Análisis del crecimiento *in vitro* de los 13 supresores en tratamiento con atorvastatina.** Los diferentes supresores fueron crecidos por 15 días en *in vitro* en medio MS en tratamiento control (cuadro izquierdo) ó con 10nM de atorvastatina (cuadro derecho).



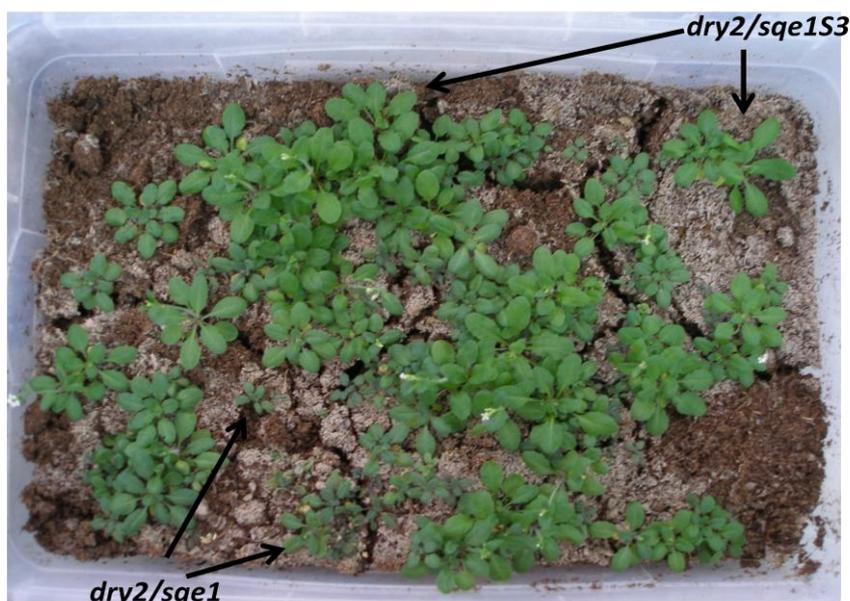
**Figura R10: Gráfico del crecimiento promedio de la raíz de plantas *Ler* y los 13 supresores de *dry2/sqe1* en 0 y 10nM de atorvastatina.** Plántulas de 15 días crecidas en *in vitro* fueron fotografiadas y a través de programas informáticos se midió la longitud de raíz principal.

Si se analizan los fenotipos de los supresores éstos se pueden clasificar en aquellos más parecidos a *dry2/sqe1* y aquellos que recuperan parcial ó totalmente el fenotipo salvaje. Por ejemplo, algunos recuperan solamente la parte aérea como es el caso de los supresores S4, S24, otros parcialmente el sistema radicular como el S18, S11 o como es el caso de los supresores S2, S3 y S9 que recuperan casi por completo el fenotipo salvaje. Por otro lado existen algunos supresores como el S22 que son más similares al fenotipo de *dry2/sqe1* y no recuperan demasiado el fenotipo salvaje.

El análisis de estos supresores y la identificación de los genes afectados permitirán la identificación de componentes involucrados en la señalización mediada por esteroides, proceso esencial para el desarrollo de la planta y que hoy en día es bastante desconocida. A su vez se debe aprovechar la posibilidad de que el mutante *dry2/sqe1* es viable, hasta el momento muchos de los mutantes relacionados a esteroides son infértiles y no viables para la germinación, este es el motivo principal de la limitante información existente. Por este motivo se comenzó con el mapeo de un supresor, con la idea que en un futuro se puedan identificar los genes que están mutados en estos 13 supresores. En este trabajo se seleccionó *dry2/sqe1-S3* para realizar el mapeo inicial por ser uno de los que recupera mejor el fenotipo salvaje.

Este trabajo comenzó desde la siembra de la población F2 recombinante en macetas. Una vez iniciada la germinación se impuso estrés hídrico por supresión del riego y a los 30 días aproximadamente se seleccionaron los fenotipos *dry2/sqe1* y salvajes. En la figura R11 se ilustra el momento de la selección donde las plantas con síntomas de marchitez se corresponden con el

genotipo *dry2/sqe1* y las plantas con fenotipo salvajes se corresponden al genotipo del supresor 3. Estas últimas plantas son las que se conservarán para la extracción de ADN y el posterior mapeo.



**Figura R11: Selección de la población de mapeo.** Plántulas F2 recombinantes sembradas en turba durante 30 días con estrés hídrico impuesto desde la germinación. Las flechas negras indican los dos tipos de fenotipos encontrados: *Ler* que se corresponde con la mutación supresora y *dry2/sqe1*.

Se realizaron un total de 35 extracciones de ADN de distintas plántulas seleccionadas de genotipo *dry2/sqe1-S3*. El ADN de cada muestra fue cuantificado variando entre 20-100ng/ $\mu$ l en las diferentes muestras, y con valores de pureza aceptables (Se adjuntan datos en anexo A2). Posteriormente se procedió a probar los distintos marcadores moleculares a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

Para un mapeo inicial se analizaron aproximadamente 35 plantas de la F2 con fenotipo salvaje (*dry2/sqe1-S3*) usando marcadores moleculares localizados en los 5 cromosomas.

Cuando no existe ligamiento entre la mutación y el marcador, la proporción teórica de individuos con un determinado genotipo para los marcadores moleculares en la población F2 es de 25% individuos homocigotos Col-0, 50% individuos heterocigotos Col/*Ler* y 25% individuos homocigotos *Ler* (1Col : 2 Col/*Ler* : 1 *Ler*). A medida que el grado de ligamiento entre la mutación *dry2/sqe1-S3* (de fondo genético *Ler*) y el marcador aumente, la proporción de individuos con genotipo *Ler* será mayor. La TablaR2 muestra el análisis de los diferentes marcadores distribuidos en los 5 cromosomas.

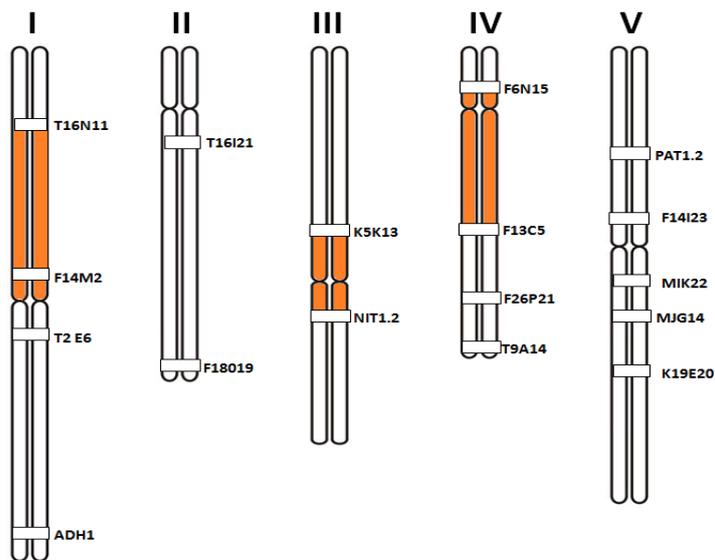
Con la excepción del cromosoma 1, 3 y 4, la distribución de los genotipos de la población para los marcadores se aproxima a la segregación teórica de no ligamiento 1:2:1. Los marcadores en el cromosoma 1: T16N11, F14M2 y T2E6, en el cromosoma 3: K5K13 y NIT1.2 y en el cromosoma 4: F6N15 y F13C5 presentan una desviación hacia *Ler*, lo que indica que la mutación *dry2/sqe1-S3* se encuentra situada en alguno de estos 3 cromosomas (Figura R12).

**Tabla R2:** Genotipo de los marcadores en la población F2 *dry2/sqe1-S3* x I19.

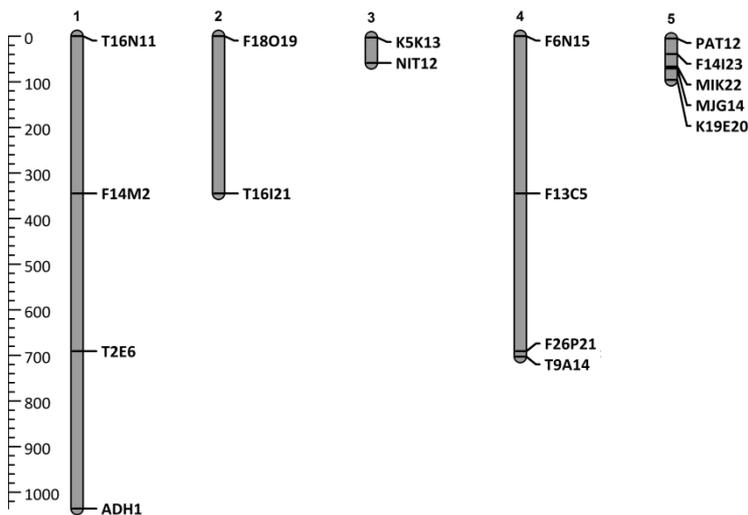
Cromosoma	Marcadores	Nº de plantas analizadas	Nº Homocigotas Col-0	Nº Heterocigotas	Nº Homocigotas Ler
1	T16N11	32	5	16	11
	F14M2	23	2	10	11
	T2E6	33	0	28	5
	ADH1	35	6	29	
2	T16I21	32	7	16	9
	F18019	32	9	18	5
3	K5K13	35	27		8
	NIT1.2	33	2	17	14
4	F6N15	37	15	16	6
	F13C5	32	4	16	12
	F26P21	34	6	21	7
	T9A14	29	5	17	7
5	PAT1.2	33	9	18	6
	F14I23	35	10	20	5
	MIK22	34	34		0
	MJG14	34	15	19	0
	K19E20	34	11	17	6

En gris se muestran los marcadores más ligados a la mutación *dry2/sqe1-S3*. El tono indica el grado de ligamiento, donde el más oscuro indica el marcador más ligado y el más claro el menos.

Posteriormente se trabajó sobre la construcción de un mapa genético consistente en 5 grupos de ligamiento que corresponden con los 5 cromosomas de *Arabidopsis* según lo descrito por Laibach 1943. A partir de los valores de la tabla 2 se construyó un mapa genético por medio de análisis informático que reproduce la ubicación y la distancia en cM que se encuentran los marcadores utilizados (Figura R13). Si se compara el mapa de *Arabidopsis* de la figura M2 encontrado en la bibliografía con el construido en este trabajo se ve que son similares aunque en el cromosoma 2 existe una inversión en la posición de los marcadores.



**Figura R12:** Representación esquemática de los 5 cromosomas de *Arabidopsis* con la posición de los marcadores moleculares empleados en el mapeo inicial de *dry2/sqe1-S3*. En naranja se representa la región que comprendería la mutación *dry2/sqe1-S3*.



**Figura R13:** Mapa genético del individuo *dry2/sqe1-S3* construido a partir del mapeo inicial. Localización de los 17 marcadores moleculares ligados a cada uno de los 5 cromosomas de *Arabidopsis* con la escala que representa el valor de cM ó porcentaje de recombinación que se encuentra cada marcador.

## DISCUSIÓN

Las estatinas recuperan el fenotipo radicular de mutantes *dry2/sqe1*.

Los esteroides juegan en las células eucariotas tanto un papel estructural en las membranas como una función señalizadora. En plantas existen evidencias que señalan a los esteroides como moléculas señalizadoras, aunque los únicos con esta función demostrada son los brassinosteroides.

El mutante *dry2/sqe1* tiene defectuoso el gen de la Escualeno Epoxidasa y es hipersensible a sequía. Además de varios problemas en el desarrollo presenta múltiples defectos en el fenotipo radicular. Existe un nexo no muy conocido entre la composición de esteroides de membrana en raíz, aunque se podría extrapolar posiblemente a todos los tejidos, con el estrés hídrico. Esta tesis de grado intenta aportar conocimientos sobre esta temática.

En este trabajo se demostró que manipulando la composición de esteroides, por inhibición de reguladores en la ruta de síntesis de esteroides se puede recuperar el fenotipo radicular del mutante *dry2/sqe1*. La enzima HMGR aumenta su actividad y el escualeno se acumula en estos como consecuencia de la disminución de la actividad de SQE1. La acción de las estatinas desde antes que el embrión sea metabólicamente activo repercute directamente sobre la HMGR disminuyendo su actividad y reduciendo el contenido de escualeno. Esto posiblemente provoca que la composición de esteroides se normalice lo suficiente para que la planta recupere el fenotipo salvaje. Esto es, los dos puntos claves en el metabolismo de *dry2/sqe1* que provocan su fenotipo alterado son la acumulación de escualeno por verse disminuida la actividad de SQE1 que es la enzima que lo metaboliza y el aumento de enzimas pre-escualeno como es el caso de la HMGR que por mecanismos regulatorios aumentan para compensar el flujo de esteroides.

La acción de las estatinas sobre la HMGR repercute a través de algún mecanismo regulatorio desconocido en la ruta metabólica relacionado directamente a la disminución de escualeno de forma que permite que el sistema radicular sea similar al de las plantas salvajes. La composición alterada de esteroides en la MP de estas células causada por la acción de estatinas, similar a las condiciones salvajes alcanza para el crecimiento normal del sistema radicular. Por lo tanto aquí se propone al escualeno como un esteroide regulatorio en la síntesis de estos complejos compuestos.

La ruta de síntesis de esteroides se inicia con la síntesis de mevalonato por la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, que provee a la célula de un diverso espectro de compuestos isoprenoides entre los que se encuentran los fitoesteroides. Por la acción de HMGR, a partir de HMG-CoA se obtiene el mevalonato. Esta enzima es clave en la biosíntesis de esteroides, regulándose su actividad por mecanismos de retroalimentación que operan en múltiples niveles: transcripcional a través de los niveles de ARNm, traduccional, modificación postraduccional por ejemplo por fosforilaciones reversibles, y la degradación de proteínas (Goldstein et al., 1990). Entre los más estudiados se encuentra la regulación de la degradación dependiente de esteroides de la enzima HMGR (Goldstein et al., 2006), que es un mecanismo similar a lo que se provocó de forma *in vitro* en este trabajo con los tratamientos con atorvastatina.

Parte de la regulación por retroalimentación en la ruta de síntesis de esteroides es controlada vía la degradación de la HMGR por el proteosoma, que es una enzima clave y a menudo limitante en la velocidad de la síntesis de los esteroides. Fue observado por primera vez en células de mamíferos que la estabilidad de la HMGR se redujo cuando los precursores de los esteroides son altos ó los esteroides

se añadieron al medio de cultivo celular, lo que indica que la estabilidad de HMGR estaba sujeta a regulación por retroalimentación. Además cuando los niveles de los intermediarios de síntesis son elevados existe una mayor degradación de la HMGR, reduciendo así los niveles de la enzima, mientras que a la inversa al disminuir los productos de síntesis se produce la estabilización y aumento en los niveles de enzimas. Por lo tanto, la regulación por retroalimentación es la que regula la tasa de degradación de la molécula de HMGR (Hampton et al., 2009). Datos no publicados revelan que un supresor de la mutación *dry2/sqe1* es defectuoso en el gen que codifica para una Ubiquitin ligasa encargada de la ubiquitinación de proteínas para la posterior degradación en el proteosoma (Gonzalez, V com. pers.).

En todos los aspectos de la vida celular el proceso de degradación selectiva de proteínas intracelulares es muy importante. En este caso la disminución del proceso de ubiquitinación causante de la supresión en los mutantes *dry2/sqe1* revierte el fenotipo salvaje. *dry2/sqe1* por otra parte presenta una elevada actividad de estas enzimas en comparación con plantas salvajes y a este supresor. Se especula por tanto que la regulación de esteroides a través de procesos como la ubiquitinación ó por la utilización de inhibidores específicos de enzimas como se utilizó en este trabajo, modifican la composición de esteroides, a través de mecanismos aún no conocidos revertiendo el fenotipo alterado del mutante *dry2/sqe1* a uno salvaje.

#### La composición de esteroides es clave para la correcta localización y composición de ROS.

Los pelos radiculares se forman en células denominadas tricoblastos que son prolongaciones tubulares de células epidérmicas, las cuales generan cada una un único pelo. Debido al aumento que generan de la superficie radicular, los pelos radiculares ayudan a la planta en la toma de nutrientes, en el anclaje y en la interacción con microorganismos (Grierson et al., 2002). Los esteroides estructurales son abundantes en la membrana plasmática de las células del ápice de la raíz en *Arabidopsis thaliana*, específicamente se acumulan en los tricoblastos, y muestran una acumulación polar en la punta durante la elongación de la raíz y se distribuyen de manera uniforme en los pelos radiculares maduros.

El suministro de oxígeno es fundamental para la raíz, no sólo para la respiración celular, sino también para la formación de especies reactivas del oxígeno. Tradicionalmente, las especies reactivas del oxígeno eran consideradas como subproductos tóxicos del metabolismo aeróbico, los cuales necesitaban ser eliminados mediante distintos mecanismos (Apel et al., 2004). Se sabe que el estrés hídrico provoca una acumulación de ROS que deben ser detoxificadas para que la planta pueda presentar una tolerancia a dicho estrés (Chaves et al., 2004). Sin embargo, desde hace tiempo se ha establecido que las ROS son utilizadas por las plantas como moléculas señalizadoras que controlan diversos procesos como la muerte celular programada, la respuesta a estrés abiótico, la defensa frente a patógenos, la señalización sistémica (Mittler 2002), la formación y crecimiento del pelo radicular (Foreman et al., 2003) y la regulación estomática (Pei et al., 2000) procesos de los cuales muchos son afectados en el mutante *dry2/sqe1*. Muchos de los defectos en el desarrollo exhibido por este pueden ser explicados por una alteración en la producción de ROS. Algunas de las ROS que participan en el desarrollo se producen mediante las NADPH oxidasas, la correcta localización espacial de estas enzimas es esencial para su función. Los pelos de raíces defectuosas que se desarrollan en el mutante *dry2/sqe1* producen deslocalización espacial de ROS distribuidas, causada por la deslocalización de la NADPH oxidasa. Debido a que la localización polar de la enzima

depende del tráfico endocítico (Takeda et al., 2008), se cree que este proceso es defectuoso en el mutante *dry2/sqe1* debido a la composición de esteroides alterado.

Algunas evidencias sugieren que la distribución y acumulación apical de los esteroides estructurales pueden regular el tráfico vesicular y propiedades de la membrana plasmática durante la iniciación y el crecimiento de la punta de los pelos radicales. Se sugiere que los esteroides estructurales principalmente los que se encuentran embebidos en microdominios están involucrados espacial y temporalmente en el transporte endocítico y el reciclaje vesicular en el crecimiento en los pelos radiculares de *Arabidopsis* (Ovecka et al., 2010).

En este trabajo los tratamientos con atorvastatina se piensa que inhibieron la HMGR y de alguna forma se restablece la composición de esteroides, provocando la correcta ubicación de la NOX. Como las plántulas son observadas a pocos días de su germinación es probable que la señal en forma esférica observada en los tratamientos con atorvastatina que se corresponde a la enzima o a su producto, pueda relacionarse al proceso de reciclaje vesicular existente entre la MP y organelos como el RE y AP, donde se produce el transporte de componentes esenciales de la membrana (Hartmann et al., 1987; Moreau et al., 1998; Grebe et al., 2003).

En *Arabidopsis*, la actividad de las proteínas Atrboh (NADPH oxidasas) pueden ser reguladas directamente por Rac-Rboh.

La inmunodetección realizada utilizando anticuerpos anti-Rho-GTPasa pretende detectar la cantidad de enzima NADPH oxidasa de una forma indirecta por ser este un regulador de esta a nivel de pelos radiculares. La inmunodetección develó que las plántulas mutantes *dry2/sqe1* tienen menor cantidad de NOX en comparación con las salvajes. Esto concuerda con lo sugerido por Posé et al., 2009 en que la producción de ROS está alterada tanto su producción como regulación en el mutante. El aporte de este trabajo sugiere que el tratamiento con atorvastatina parece tener un efecto no solo en la localización de la enzima sino que también sobre su actividad. Como una primera aproximación se podría decir que la atorvastatina recuperaría parcialmente la producción de NOX en las plántulas *dry2/sqe1*.

Los dominios de membrana enriquecidos en esteroides han sido reportados como moduladores de la localización y actividad de proteínas embebidas en estas regiones de la membrana (Kleine-Vehn et al., 2008; Feraru et al., 2008). En los últimos años los *lipid raft* han sido descriptos como microdominios de esteroides enriquecidos en esfingolípidos en la membrana plasmática, que se han involucrado directamente en el tráfico vesicular y en la señalización celular (Grennan 2007).

En base a estos resultados se plantea una hipótesis estructural en relación a los esteroides de membrana, en donde la NOX se encontraría en un microdominio lipídico de la MP donde los esteroides son claves, este microdominio determinaría la actividad y localización de la enzima.

Como perspectivas se plantean varias estrategias para seguir trabajando sobre esta hipótesis. En primer lugar se deberá probar por medio de extracción de microdominios de membrana la presencia de la enzima NOX en estos dominios. A través de técnicas como la inmunodetección se intentará detectar que en los mutantes *dry2/sqe1* esta enzima no estará presente, y en cambio en las plántulas mutantes tratadas con estatinas deberá reubicarse en los microdominios.

Por otro lado se podría realizar la inhibición de esteroides estructurales de MP con antibióticos específicos para evaluar la función estructural que estos cumplen. La incubación con concentraciones altas del antibiótico filipin y/o por un período prolongado de tiempo, produce el secuestro de esteroides estructurales y se interrumpe la estructura y función de los microdominios de MP en la célula vegetal, lo cual entorpecería las función de proteínas asociadas a microdominios (Papanikolaou et al, 2005.; Simons y Toomre, 2000; Wachtler et al, 2003; Yang et al.,2006). Esta última idea permitirá evaluar si la estructura de los esteroides son los que le proveen la localización y actividad a la NOX. Ya que paralelamente a la hipótesis estructural que se plantea en este trabajo existe una regulatoria donde la NOX no necesariamente depende de esteroides directamente sino que es regulada por otras moléculas que si dependen de microdominios.

La mutación que causa la supresión 3 se encontraría en el cromosoma 1,3 ó 4.

Las supresiones son mutaciones secundarias que restauran total o parcialmente la función génica perdida. En este caso la función recuperada es la extrema sensibilidad a sequía y los defectos de desarrollo que el mutante *dry2/sqe1* presenta.

Las mutaciones supresoras son una estrategia muy útil para obtener más información sobre la mutación inicial.

El análisis de estos supresores y la identificación de los genes afectados permitirán la identificación de componentes involucrados en la señalización mediada por esteroides, proceso esencial para el desarrollo de la planta y que es totalmente desconocido.

En este trabajo se utilizó el genotipo del supresor3 como blanco de mapeo, que es uno de los 14 supresores que fueron cribados a partir de *dry2/sqe1* en trabajos anteriores. La elección de este supresor se realizó después de crecer en forma *in vitro* todos los supresores, en base a una observación cuantitativa de los fenotipos se seleccionó el mutante *dry2/sqe1-S3* para el mapeo por ser uno de los individuos que recupera mejor el fenotipo salvaje, especulando que será de gran información identificar el gen que está detrás de la supresión.

Antes de comenzar el mapeo se realizó el crecimiento de todos los supresores en tratamiento con atorvastatina para evaluar su respuesta frente a este fármaco. Se detecta que no existen cambios llamativos en el crecimiento radicular de los supresores cuando están sometidos a estatinas.

El mapeo genético, (también conocido como mapeo de ligamiento o mapeo meiótico), hace referencia a la determinación de la posición relativa y distancia entre marcadores a lo largo de los cromosomas. La distancia genética entre dos marcadores es definida por el número de eventos de recombinación que se dan en una cromátida (Semagn et al., 2006). La construcción de un mapa genético requiere de la correcta elección de una población de mapeo, en este caso la población recombinante F2 producto del cruce entre los parentales I19 y *dry2/sqe1-S3*, el tamaño de la muestra que fue de un total de 35 individuos aproximadamente y por último el tipo de marcadores moleculares a emplear en este mapeo se usaron 17 marcadores del tipo CAP y SSLP.

El mapeo inicial que se realiza en este trabajo culminó con la posible localización de la mutación dentro de una región en 3 de los cinco cromosomas de *Arabidopsis thaliana*.

Como perspectivas obviamente se plantea seguir con el mapeo hasta develar el gen involucrado en la supresión3. Hasta aquí se generó información de que la mutación afectada en los mutantes *dry2/sqe1-S3* queda flanqueada en el cromosoma 1 entre los marcadores T16N11, F14M2 y T2E6 que según el mapa físico obtenido se encuentran a una distancia de 700cM, en el cromosoma 3: K5K13 y NIT1.2 con una distancia de 50cM y por último en el cromosoma 4: F6N15 y F13C5 a una distancia de

300cM

aproximadamente.

Los marcadores son asignados a los grupos de ligamiento usando la relación entre las probabilidades que dos *loci* estén ligados con un valor de recombinación dado, sobre la probabilidad que no estén ligados. Esta relación es llamada como el logaritmo de odds (LOD) (Risch 1992; Stam et al., 1993a). Lo ideal es poder llegar a tener tantos grupos de ligamiento como número de cromosomas haploides tiene la especie de estudio (Semagn et al., 2006). Para este caso 5 grupos de ligamiento que se corresponde con los 5 cromosomas de *Arabidopsis*.

Existen dos funciones de mapeo (Haldane y Kosambi), que traducen las frecuencias de recombinación dentro del mapa en distancias y viceversa. La función de mapeo de Haldane (Haldane 1931) utilizada en este trabajo asume que no hay interferencia entre los cruces en la meiosis, mientras que en la función de mapeo de Kosambi (Kosambi 1944) se asume un cierto grado de interferencia. La interferencia es tomada como el efecto que genera la aparición de un cruce en una determinada región y que reduce la probabilidad de recombinación en la región adyacente. Tales funciones de mapeo convierten las fracciones de recombinación dentro del mapa en unidades llamadas centimorgans (cM) en honor al genetista Thomas Hunt Morgan. Por definición, una unidad de mapeo (m.u.) es igual al 1% de fenotipos recombinantes o 1cM. Para las frecuencias de recombinación superiores al 10%, la función de mapeo de Haldane da mayores distancias en el mapa que Kosambi (Semagn et al., 2006).

Como posteriores ensayos se deberá aumentar el número de individuos a mapear y buscar en el genoma de *Arabidopsis* nuevos marcadores que se encuentren dentro de estas zonas para poder ir disminuyendo la distancia que flanquean los marcadores para crear un mapa de alta resolución. Una vez que se haya podido flanquear una región pequeña se deberá secuenciar la región y realizar el análisis informático necesario para identificar los genes que se encuentren y postular genes candidatos, con estos se realizan alineamientos para identificar el gen que contiene la mutación.

Un mapa de alta resolución se logra analizando un gran número de plantas y un mapa de alta densidad se obtiene por medio del uso de muchos marcadores moleculares polimórficos.

La forma más racional de desarrollar un mapa genético es hacerlo en forma gradual, primero ubicando una serie de marcadores, e ir aumentando progresivamente el número de los mismos en los espacios desiertos hasta lograr un “andamio” sólido. Con este enfoque escalonado y, teniendo en cuenta que el número de marcadores a disposición es suficientemente grande, es posible hoy en día realizar mapas de alta densidad. En este trabajo se minimizo lo más posible el uso de muchos marcadores y de gran número de plantas por el hecho que se quiere abordar un mapeo inicial. Tal vez este es el hecho que el tamaño de los cromosomas obtenido sea más grande y alejado a lo que evidencia la bibliografía.

Es importante tener en cuenta que no se obtuvo el tamaño total de los cromosomas sino que la distancia que flanquean los marcadores utilizados, de todas formas el tamaño obtenido es muy alto ya que la distancia de algunos marcadores excede al tamaño del cromosoma, según la bibliografía.

Según la base de datos TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource) la longitud en cM en un mapa genético de los cromosomas de *Arabidopsis thaliana* es:

Cromosoma I: 135cM, Cromosoma II: 97cM, Cromosoma III: 101cM, Cromosoma IV: 125cM, Cromosoma V: 139cM.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altmann, T.** (1999). Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta*. 208, 1–11.
- Apel, K., Hirt, H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Babiychuk, E., Bouvier-Nave, P., Compagnon, V., Suzuki, M., Muranaka, T., Van Montagu, M., Kushnir, S., Schaller, H.** (2008) Allelic mutant series reveal distinct functions for *Arabidopsis* cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3163–3168.
- Bach, T.J., Weber, T., Motel, A.** (1990). Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in plants. In *Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 24. Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*, G. H. N. Towers and H. A. Stafford, editors. Plenum Press, New York. 1–82.
- Bagnat, M., Simons, K.** (2002) Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 383(10), 1475–800.
- Bajguz, A., Hayat, S.** (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47, 1–8.
- Benveniste, P.** (2002) Sterol Metabolism. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi: 10.1199/tab.0004, <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis/>.
- Benveniste, P.** (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 429–457.
- Berger, J.** (1987) *Guide to molecular cloning techniques*, 152. Ed. Elsevier.
- Bishop, A.L., Hall, A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348: 241–255.
- Borner, G.H., Sherrier, D.J., Weimar, T., Michaelson, L.V., Hawkins, N.D., Macaskill, A., Napier, J.A., Beale, M.H., Lilley, K.S., Dupree, P.** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* 137, 104–116.
- Boutte, Y., Grebe, M.** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 705–713.
- Boyer, J. S.** (1982) *Plant Productivity and Environment*. *Science* 218, 443–448.

- Bray, E., Bailey–Serres, J., Weretilnyk, E.** (2000) Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants: American Society of plants physiologists USA* pp.1158-1203.
- Bray, E.A.** (1997) Plant responses to water deficit, *Trends in plants science.* 2, 48-54.
- Bray, E.A.** (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann.Bot. (Lond)* 89 Spec No:803-811.
- Buchanan B.B., W. Gruissem, R.L. Jones.** (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.*American Society of Plant Physiologists.Rockville, Maryland. USA pp. 1158-1174.
- Carland, F.M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Nelson, T.** (2002) The identification of CVP1 reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell.* 14, 2045-2058.
- Carol, R.J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M.C., Kakesova, H., Derbyshire, P., Drea, S., Zarsky, V., Dolan, L.** (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature,* 438, 1013–1016.
- Chaves, M.M., Oliveira, M.M.**(2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J.Exp.Bot.* 55, 2365-2384.
- Choi, D., Ward, B.L., Bostock, R.M.**(1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell.* 4, 1333-1344.
- Clouse, S., Feldmann, K.** (1999). Molecular genetics of brassinosteroid action. In *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*, A. Sakurai, T. Yoda, and S. Clouse, eds (Tokyo: Springer), pp. 163-190.
- Clouse, S.D.** (2001) Integration of light and brassinosteroid signals in etiolated seedling growth. *Trends Plant Sci.* 6(10), 443-5.
- Clouse, S.D.** (2002) *Arabidopsis* mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell.* 14, 1995-2000.
- Coelho, S., Brownlee, C., Bothwell, J.** (2008) A tip-high,  $Ca^{2+}$  interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes. *Planta.* 227, 1037–1046.
- Dhaubhadel, S., Browning, K.S., Gallie, D.R., Krishna, P.**(2002) Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J.* 29, 681-691.
- Dhaubhadel, S.**(1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol. Biol.* 40, 333–342.

- Diener, A.C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W.J., Nes, W.D., Fink, G.R.** (2000) Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell*. 12, 853-870.
- Divi, U.K., Krishna, P.** (2009) Brassinosteroids confer stress tolerance. In *Plant Stress Biology* (Hirt, H., ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim pp.119–135.
- Divi, U.K., Krishna, P.** (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New Biotechnology*. 26, 3/4.
- Divi, U.K., Rahman, T., Krishna, P.** (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology* .10, 151.
- Dyas, L., Goad, L.J.** (1994) The occurrence of free and esterified sterols in the oil bodies isolated from maize seed scutella and a cell suspension culture. *Plant Physiol Biochem*. 32, 799-805.
- Elmayan, T., Simon-Plas, F.** (2007) Regulation of Plant NADPH Oxidase. *Plant Signaling & Behavior*. 2:6, 505-507.
- Feraru, E., Friml, J.** (2008) PIN Polar Targeting. *Plant Physiology*. 147, 1553-1559.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D., Davies, J. M., Dolan, L.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422, 442-446.
- Fu, Y., Li, H., Yang, Z.** (2002) The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis. *The Plant Cell*. 14, 777-794.
- Garcia, A., Cayla, X., Fleischer, A., Guergnon, J., Alvarez-Franco Canas, F., Rebollo, M. P., Roncal, F., Rebollo, A.** (2003) Rafts: a simple way to control apoptosis by subcellular redistribution. *Biochimie*. 85, 727–731.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S.** (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 343, 425-30.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boy, R.A., Brown, M.S.** (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124:35–46.
- Grebe, M., Xu, J., Mobius, W., Ueda, T., Nakano, A., Geuze, H.J., Rook, M.B., Scheres B.** (2003) *Arabidopsis* sterol endocytosis involves actin mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol*. 13, 1378-1387.
- Grennan, A.K.** (2007) Lipid rafts in plants. *Plant Physiol*. 143, 1083-1085.

- Grierson, C., Schiefelbein, J.** (2002) Root hairs. In: Somerville, C., Meyerowitz, E.M (eds) *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, doi/10.1199/tab.0060. <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis/>
- Haldane, J.B.S. (1931).** The cytological basis of genetical interference. *Cytologia* 3, 54–65.
- Hall, A. (1998)** Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science*. 279, 509-514.
- Hampton, R.Y., Garza, R.M.** (2009) Protein Quality Control as a Strategy for Cellular Regulation: Lessons from Ubiquitin-Mediated Regulation of the Sterol Pathway. *Chem. Rev.* 109, 1561-1574.
- Hartmann, M.A., Benveniste, P.** (1987) Plant membrane sterols: isolation, identification, and biosynthesis. *Methods Enzymol.* 148, 632-650.
- Hayat, A., Ahmad, A., Fariduddin, Q.** (2003) Brassinosteroids: a regulator of 21<sup>st</sup> century. *Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity. Kluwer Academic Publishers Dordrecht-Boston-London.* pp. 231-246.
- Jabs, T., Dietrich, R.A., Dangel, J.L.** (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*. 273, 1853-1856.
- Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., Last, R.L.** (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol* 129, 440-450.
- Jang, J. C., Fujioka, S., Tasaka, M., Seto, H., Takatsuto, S., Ishii, A., Aida, M., Yoshida, S., Sheen, J.** (2000) A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 14, 1485-1497.
- Kagale, S., Divi, U.K., Krochko, J.E., Keller, W.A., Krishna, P.** (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta*. 225, 353-364.
- Kleine-Vehn, J., Friml, J.** (2008) Polar Targeting and Endocytic Recycling in Auxin-Dependent Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 24, 447-473.
- Kosambi, D.D.** (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*. 12, 172-175.
- Krishna, P.** (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* 22, 289–297.
- Laibach F.** (1943) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Object für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot. Arch.* 44, 439–55.
- Lessire R, Bessoule J.J.** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem.* 279, 36277-36286.

- Li, H., Lin, Y., Heath, R.M., Zhu, M.X., Yang, Z.**(1999). Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to the tip-localized calcium influx. *Plant Cell*. 11, 1731–1742.
- Li, H., Shen, J., Zheng, Z., Lin, Y., Yang, Z.**(2001). The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 126, 670–684.
- Li, F.**(2007) A putative hydroxysteroid dehydrogenase involved in regulating plant growth and development. *Plant Physiol*. 145, 87–97.
- Liu, P., Li Li, R., Zhang, L., Wang, Q., Niehaus, K., Baluska, F., Samaj, J., Lin, J.** (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *The Plant Journal* 60, 303–313.
- Margarido, G.R.A., Souza, A.P., García, A.A.F.** (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*. 144, 78–79.
- Mittler, R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 7, 405-410.
- Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S., Palme, K.**(2001). *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J*. 20, 2779–2788.
- Monfar, M., Caelles, C., Balcells, L., Ferrer, A., Hegardt, F.G., Boronat, A.** (1990). Molecular cloning and characterization of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. In *Recent Advances in Phytochemistry*. 24, 83-97.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P., Hartmann, M.A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., Bessoule, J.J.**(2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem*. 279, 36277–36286.
- Mudd, J.B.** (1980) The biochemistry of plants, a comprehensive treatise. In: Stumph PK, Conn EE, eds. *Lipids: Structure and Function*. 4, 509-32.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15(3), 473-497.
- Ogwen, J.O.** (2007) Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*. *J. Plant Growth Regul*. 27, 49–57.
- Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K.** (2001) Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 759-764.
- Ovecka, M., Lichtscheidl, I.K., Berson, T., Beck, M., Derksen, J., Samaj, J., Baluska, F.** (2010) Structural Sterols Are Involved in Both the Initiation and Tip Growth of Root Hairs in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 22, 2999–3019.

- Ozdemir, F.** (2004) Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul.* 42, 203–211.
- Papanikolaou, A., Papafotika, A., Murphy, C., Papamarcaki, T., Tsolas, O., Drab, M., Kurzchalia, T.V., Kasper, M., Christoforidis, S.** (2005) Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ectonucleotidase CD39. *J. Biol. Chem.* 280, 26406–26414.
- Park, J., Choi, H.J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z., Lee, Y.** (2000) Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol.* 124, 725–732.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature.* 406, 731–734.
- Phillips, D.R., Rasbery, J. M., Bartel, B., Matsuda, S. P.** (2006) Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 305–314.
- Posé, D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Taconnat, L., Ferrer, A., Dolan, L., Valpuesta, V., Botella, M.A.** (2009) Identification of the *Arabidopsis* *dry2/sqe1-5* mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *The Plant Journal.* 59, 63–76.
- Potocky, M., Jones, M.A., Bezdova, R., Smirnov, N., Zarsky, V.** (2007) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol.* 174, 742–751.
- Rasbery, J.M., Shan, H., LeClair, R.J., Norman, M., Matsuda, S.P., Bartel, B.** (2007) *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *J. Biol. Chem.* 282, 17002–17013.
- Risch, N.** (1992). Genetic linkage: Interpreting LOD scores. *Science* 255, 803–804.
- Samaj, J., Baluska, F., Menzel, D.** (2004) New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends Plant Sci.* 9, 217–220.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sasse, J.M.** (2003) Physiological actions of brassinosteroids: an update, *J. Plant Growth Regul.* 22, 276–288.
- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., Schaller, H.** (2001) The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *Plant J.* 25, 605–615.
- Schaller, H.** (2003) The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.* 42, 163–175.

- SchalLer, H.** (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol Biochem.* 42, 465-476.
- Schrack, K., Mayer, U., Horrichs, A., Kuhnt, C., Bellini, C., Dangl, J., Schmidt, J., Jurgens, G.** (2000) FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* 14, 1471-1484.
- Schumacher, K., Chory, J.** (2000) Brassinosteroid signal transduction: Still casting the actors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 79-84
- Semagn, K., Bjørnstad, A., Ndjioudjop, M.N.** (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology.* 5, 2540-2568.
- Simons, K. Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., Toomre, D.** (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
- Souter, M., Topping, J., Pullen, M., Friml, J., Palme, K., Hackett, R., Grierson, D., Lindsey, K.** (2002) hydra Mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell.* 14, 1017-1031.
- Stam, P.** (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* 3, 739-744.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M., Korth, K.L.** (1994) Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *Journal of Lipid Research.* 35, 1133-40.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., Dolan, L.** (2008) Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science.* 319, 1241-1244.
- Tobert, J.A.** 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 517-26.
- Vert, G.** (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 177-201.
- WachtLer, V., Rajagopalan, S., Balasubramanian, M.K.** (2003) Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 116, 867-874.
- Warnecke D.C, Baltrusch M, Buck F, Wolter FP., Heinz E.** (1997) UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol.* 35, 597-603.

- Willemsen, V., Friml, J., Grebe, M., van den, T. A., Palme, K., Scheres, B.** (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell* 15, 612-625.
- Winge, P., Brembu, T., Kristensen, R., Bones, A.M.** (2001) Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 156, 1959-71.
- Yang, B., Oo, T.N., Rizzo, V.** (2006) Lipid rafts mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro-survival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J.* 20, 1501–1503.
- Yokota, T.** (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.* 2, 137–143.
- Zhang, F.L., Casey, P.J.** (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem.* 65, 241-269.

## ANEXO

Tabla A1. Marcadores moleculares utilizados en el mapeo inicial.

Aplicación	Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Polimorfismo	Producto PCR (nts)
<b>Cromosoma 1</b>					
	T16N11-F	5'- TGCATCTGCTGAaatcgaac-3'	52	SSLP	Col 1191
	T16N11-R	5'- CCTCATGTGGAGTTTGCTCA-3'	52	SSLP	Ler 508
	F14M2-F	5'- GGTTTTTAGGGAAAGATTTGATG-3'	50	SSLP	Col 507
	F14M2-R	5'- CAAAACAATATACGAAGAGACGCA-3'	54	SSLP	Ler 303
	T2E6-F	CAAGAATGGAGTCCCGGTTA	51	SSLP	Col 837
	T2E6-R	TGGAGCATGGTTCAGTCAAG	52	SSLP	Ler 600
	ADH1-F	5'-GCGTGACCATCAAGACTAAT-3'	59.1	CAP	Ler 1291
	ADH1-R	5'-AAAAATGGCAACACTTTGAC-3'	59.1	CAP	Col 1097+262 (marcador dominante ler)
<b>Cromosoma 2</b>					
	F18O19-F	5'- aaacatgcgcatacaaaa-3'	50	SSLP	Col 1183
	F18O19-R	5'- cctggcctgtttgttagac-3'	53	SSLP	Ler 634
	T16I21-F	5'- agatggtagacagctctgtg-3'	54	SSLP	Col 686
	T16I21-R	5'- GGCAAAACCCTAATGTGGAA-3'	49	SSLP	Ler 381
<b>Cromosoma 3</b>					
	K5K13-F	5'- GGAAACTGCCGTAGACGAAG-3'	54	CAP	Col 699 (marcador dominante col)
	K5K13-R	5'- agtctcattccccacac-3'	50	CAP	Ler 400
	NIT1.2-F	5'-CGGAATTGATGTTTGGACC-3'	49	SSLP	Col 850
	NIT1.2-R	5'-CCCTACATTCTACAACCATGTAGC-3'	54	SSLP	Ler 1000
<b>Cromosoma 4</b>					
	F6N15-F	5'- GTGTGGTCAGGGCTTCAAAT-3'	51	SSLP	Col 984
	F6N15-R	5'- TGGTGACTTCCATTGTCTGC-3'	51	SSLP	Ler 830
	F13C5-F	5'- ttgaatglttagggtaaaa-3'	46.5	SSLP	Col 692
	F13C5-R	5'- tcttcatcccaccgacttg-3'	52	SSLP	Ler 320
	F26P21-F	5'- gcccttgaggactgatgag-3'	53	SSLP	Col 148 (agarosa especial 3%)
	F26P21-R	5'- tggttgtgagtttcgatg-3'	52	SSLP	Ler 138
	T9A14-F	5'- CCGCAGCTGCACCTTCTCAA-3'	58	SSLP	Col 502
	T9A14-R	5'- TGCATTGATTTCCGCTCTGA-3'	51	SSLP	Ler 258
<b>Cromosoma 5</b>					
	PAT1.2-F	5'-CATGCTTCATCATTGCC-3'	48	SSLP	Col 706
	PAT1.2-R	5'-AGCTGAAGCTCTGCCACC-3'	54	SSLP	Ler 606
	F14I23-F	5'- ggtggagaaattgccatta-3'	49	SSLP	Col 521
	F14I23-R	5'- taataattggaatcacatggtt-3'	46	SSLP	Ler 165
	MIK22-F	5'-actctcgaccatagg-3'	48	CAP	Col 646 (marcador dominante Col)
	MIK22-R	5'-gactctaccgttgattta-3'	47	CAP	Ler 457
	MJG14-F	5'- CCGTGAATCCTGTTTGCTT-3'	51	SSLP	Col 758
	MJG14-R	5'- caccagAACCCtagaaacc-3'	52	SSLP	Ler 365
	K19E20-F	5'-atgagacatatgagaggaas-3'	50	SSLP	Col 649
	K19E20-R	5'-gatggattttgatgttcc-3'	46	SSLP	Ler 360

Tabla A2. Cuantificación de ADN de los 35 individuos utilizados en el mapeo.

Individuo	Concentración (ng/μl)	Cociente 260/280	Cociente 260/230
1	35.8	2.19	2.71
2	111	2.07	2.4
3	125	2.09	2.71
4	96.9	2.07	2.75
5	82.5	2.1	2.77
6	98	2.12	2.89
7	89	2.11	2.77
8	113.6	2.07	2.73
9	112.1	2.11	2.79
10	90.8	2.09	2.68
11	39.4	1.99	2.15
12	49.5	2.07	2.08
13	35.1	2.03	1.8
14	114.4	1.77	2.02
15	15.3	1.88	1.69
16	46.8	1.99	2.25
17	48.5	2.01	2.13
18	86.3	2.11	2.62
19	16.7	2.22	2.07
20	117.7	2.1	2.56
21	18	2.23	2.25
22	22.3	2.14	2.14
23	90.4	1.92	2.11
24	21.9	2.18	2.38
25	21.2	2.11	2.41
26	55.5	2.13	2.38
27	37.8	2.09	2.16
28	37.2	2.1	2.46
29	51.6	2.05	2.34
30	22.9	1.51	1.8
31	21	1.97	2.05
32	51.5	2.04	2.38
33	36.4	2.12	2.57
34	35.9	2.11	2.18
35	55.2	2.11	2.37