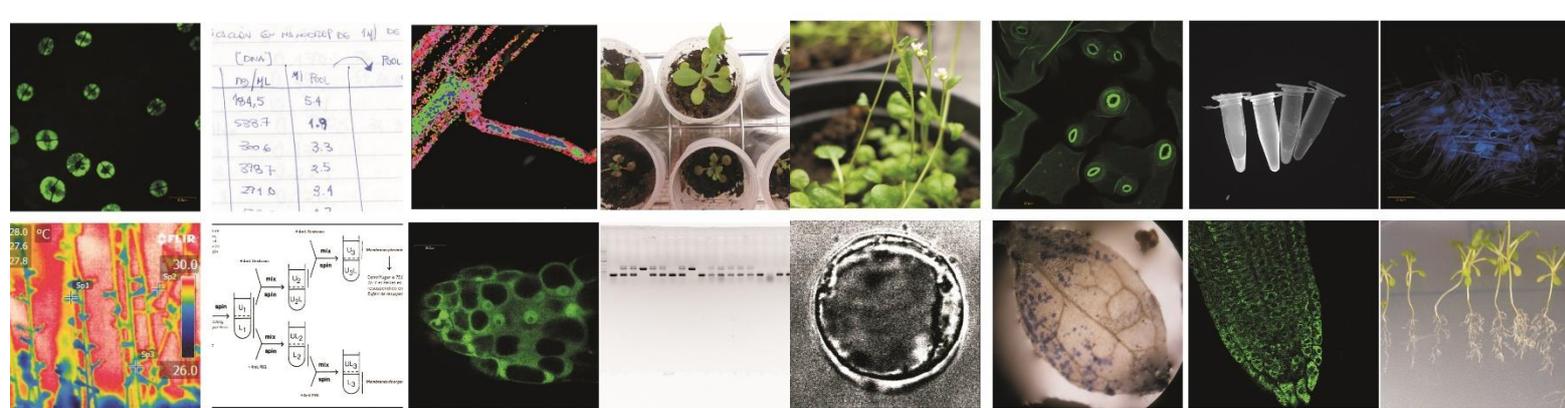


Tesis de Maestría. PEDECIBA Biología
Subárea: Biología Molecular y Celular.

Homeostasis de esteroides en la regulación de las respuestas a sequía en plantas



Estudiante: Lic. María Florencia Sena Falero

Orientador: Omar Borsani

Co-Orientador: Mariana Sotelo Silveira

Tribunal: Sabina Vidal (Presidente), Inés Ponce de León
(Vocal) y Pablo Aguilar (Vocal)

Año 2015

Agradecimientos

A *Omar Borsani*, mi orientador de tesis, quien me introdujo y formó en el fascinante mundo del estrés abiótico en plantas, y además agradecer su confianza en volver a dirigirme en este posgrado.

A *Mariana Sotelo*, mi co-orientadora, en especial por su fuerte compromiso para con este proyecto y destacar su gran apoyo y aporte para la finalización de esta tesis.

A las *agencias financiadoras* que costearon el 100% de este trabajo mediante un proyecto FCE (2013-2014) otorgado por la *ANII*, un proyecto de iniciación a la investigación (2013-2015), una beca de finalización de maestría (2014-2015) y por el proyecto de grupo I+D 418 (2010-2020) financiados por *CSIC*.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía, *Esteban Casaretto*, *Francisco Franco*, *Gastón Quero*, *Jorge Monza*, *Manuel Diez*, *Marthita Sainz*, *Pamela Gutiérrez*, *Pedro Díaz*, *Santiago Signorelli* y *Yolanda Fernández* además de aquellos que ya no están más como *Leticia Batista* y *Máximo Sánchez* por compartir todo lo que conlleva el día a día en estos años. Además agradecer la gran ayuda académica y sobre todo humana que me han brindado a lo largo de estos años.

A *Leonel Malacrida* del Departamento de Fisiopatología del Hospital de Clínicas y ahora desde el Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of California por su generosa colaboración en este proyecto en cuanto al estudio de la fluidez de membranas mediante fasores espectrales, por brindarme sus conocimientos en biofísica de membranas y luchar juntos contra la autofluorescencia de las ligninas.

A *Miguel Ángel Botella* y *Verónica Doblas* de la Universidad de Málaga por la contribución constante para con este trabajo. También a *Abel Rosado* quien desde Vancouver nos ayudó con la depuración de genes para la identificación de *sud3*. Por último a *Heng Zhang* desde Shanghai Center for Plant Stress Biology que colaboró con la secuenciación masiva y el análisis de los datos crudos de *sud3*.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, de Facultad de Ciencias liderado por Sabina Vidal, por permitirme innumerables veces trabajar en su laboratorio y ayudarme en diversas puestas a punto. Pero por sobre todo, por siempre hacerme sentir como en casa.

A mis colegas y mejores personas, mis amigos científicos que tuve la suerte de conocer durante mi formación académica como bioquímica; *Florencia Tomasina, Lucia Rodríguez, Mauricio Mastrogiovanni, Nadia Riera y Santiago Chávez.*

A *mi familia*, quienes siempre fueron, son y serán mi sostén y ejemplo desde 121km de distancia en mi querida Nueva Helvecia.

Y a *Gastón*, claro, por ser incondicionalmente mi cable a tierra.

Índice

Agradecimientos.....	2
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	9
Introducción:	
<i>Estrés hídrico.....</i>	<i>10</i>
<i>dry2/sqe1 un mutante hipersensible a sequía.....</i>	<i>11</i>
<i>Biosíntesis de Esteroles.....</i>	<i>14</i>
<i>Membrana plasmática y Microdominios lipídicos en plantas</i>	<i>18</i>
<i>Trafico vesicular.....</i>	<i>20</i>
<i>Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en plantas.....</i>	<i>21</i>
Hipótesis y Objetivos.....	23
Material y Métodos:	
<i>Material Biológico.....</i>	<i>24</i>
<i>Mapeo del supresor sud3.....</i>	<i>28</i>
<i>Extracciones.....</i>	<i>31</i>
<i>Electroforesis.....</i>	<i>33</i>
<i>Tinción de geles de proteínas.....</i>	<i>34</i>
<i>Inmunodetecciones.....</i>	<i>35</i>
<i>Detección de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.....</i>	<i>36</i>
<i>Visualizaciones histológicas.....</i>	<i>38</i>
<i>Herramientas informáticas.....</i>	<i>38</i>
Resultados:	
<i>Respuestas a sequía en el mutante dry2/sqe1.....</i>	<i>40</i>
Apertura estomática.....	41
Acumulación de prolina.....	43
<i>Evaluación del estado redox intracelular.....</i>	<i>44</i>

<i>La homeostasis redox citosolica esta alterada en dry2/sqe1.....</i>	44
<i>ROS y RNS como responsables de la hipersensibilidad a sequía.....</i>	47
<i>El crecimiento de raíz principal del mutante dry2/sqe1 no es inhibida por ·NO.....</i>	56
<i>Composición y estado de las membranas en dry2/sqe1.....</i>	59
<i>dry2/sqe1 mostró alteraciones en la cantidad y actividad de proteínas de membrana plasmática.....</i>	64
<i>Estructura de organelos y tráfico vesicular.....</i>	66
<i>Identificación de la mutación de un supresor de dry2/sqe1 (sud3) mediante clonación posicional.....</i>	69
Discusión.....	74
<i>El mutante dry2/sqe1 y las respuestas a sequía.....</i>	79
<i>Evaluación del estado redox intracelular.....</i>	80
<i>La alteración en la composición de membranas celulares en dry2/sqe1 contribuye al fenotipo hipersensible.....</i>	82
Conclusiones.....	91
Bibliografía.....	92
Anexos.....	106

Abreviaturas

·ONOO: Peroxinitrito

[]_f: Concentración final

35S: Promotor 35S del virus mosaico del coliflor

4,5- DAF: 4,5-Diaminofluoresceína

ABA: Ácido Abscisico

Abs: Absorbancia

Acetil-CoA: Acetil-Coenzima A

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BFA: Brefeldina A

BR: Brassinoesteroides

BSA: Sero Albumina Bovina

CLSM: Microscopía Laser Confocal

Col-0: Columbia-0

DAF2-DA: 4,5- Diaminofluoresceína de Diacetato

DHE: Dihidroetidium

DIMs: Membranas Insolubles a Detergentes

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Deoxinucleótido 5'-trifosfato

DRMs: Membranas Resistente a Detergentes

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido Etilendiamino Tetraacético

EMS: Metilsulfonato de Etilo

ER: Retículo Endoplasmático

GFP: Proteína Verde Fluorescente

H₂O₂: Peróxido de Hidrogeno

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa

HR: Humedad Relativa

IF: Intensidad de Fluorescencia

LAURDAN: 6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene

Ld: Liquido desordenado

Ler: Landsberg *erecta*

Lo: Liquido ordenado

MM: Marcadores moleculares

MP: Membrana Plasmática

MS: Medio Murashige y Skoog

MVA: Ácido Mevalónico

N_{2(l)}: Nitrógeno líquido

nm: Nanómetros

NO: Óxido Nítrico

NOX: NADPH Oxidasa

O₂⁻: Ión Superóxido

OE: Oxide de Escueleno

OH: Radical Hidroxilo

PA: Ácido Fosfatídico

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLD: Fosfolipasa D

PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo

Pro: Prolina

PSA: Persulfato de amonio

PVC: Compartimentos Pre-Vacuolares

RHD2: Root Hair Defective2

RN: Rojo Nilo

RNA: Ácido ribonucleico

RNAsa: Ribonucleasa

RNS: Especies Reactivas del Nitrógeno

roGFP: Oxido-Reducción Proteína Verde Fluorescente

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

RuBisCO: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

SD: Standar Deviation

SDS: Dodecilsulfato Sódico

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SMT: Sterol Metil Transferase

SNP: Sodium nitroprusside

SP: Fazor Espectral

SQE1: Escualeno Epoxidasa 1

SSLP: Simple Sequence Length Polymorphisms

TAGs: Triacilgliceroles

TAIR: The Arabidopsis Information Resource

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina

TGN: Trans Golgi Network

UBQ10:::Promotor polyubiquitin 10

Xc: Xilencianol

XTT: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

YFP: Proteína Amarilla Fluorescente

Resumen

La sequía es un tipo de estrés abiótico que influye negativamente en el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. En la búsqueda de componentes asociados a la sensibilidad / tolerancia a la sequía esta tesis se centró en el estudio de la participación de moléculas lipídicas, principalmente los esteroides, en las respuestas al déficit hídrico. Para el análisis de las respuestas a estrés se utilizó como modelo un mutante de *Arabidopsis thaliana* denominado *dry2/sqe1* que presenta una mutación en el gen que codifica para la ESCUALENO EPOXIDASA 1. Dicho mutante se caracteriza por ser hipersensible a la sequía y presentar alteraciones en el perfil de esteroides en raíz. Además, de manera interesante, el mismo desarrolla respuestas a estrés incluso en ausencia de este: presenta los estomas más abiertos, niveles más altos de prolina, así como acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, en comparación con individuos salvajes. Para conocer como los esteroides pueden estar afectando las respuestas a estrés, se analizó el estado de las membranas celulares. Encontramos que las membranas plasmáticas se encuentran altamente fluidas. Por otro lado, observamos deslocalización de proteínas de membranas plasmáticas como la NADPH oxidasa o fosfolipasas y de sistemas endomembranosos internos como RabC1 y RabG3f. Tanto la membrana plasmática, como el sistema endomembranoso intracelular, permite la regulación de numerosos procesos celulares los cuales son afectados cuando se sienten factores ambientales desfavorables. Nuestro trabajo sugiere que el déficit de esteroides afecta el estado de las membranas induciendo en el mutante, mecanismos de percepción y respuestas al déficit hídrico en ausencia de una situación de estrés, y la imposibilidad de modular dichas respuestas genera un fenotipo hipersensible.

Introducción

Estrés hídrico

El estrés hídrico en plantas se presenta cuando estas se enfrentan a condiciones ambientales desfavorables, como el exceso o déficit de agua del suelo, lo que conduce a episodios de anegamiento o sequía (Mahajan and Tuteja, 2005). El estrés hídrico más común encontrado, principalmente en nuestras latitudes, es el provocado por déficit de agua. Este factor ambiental limita en gran medida la producción y el rendimiento de los cultivos, sin embargo es importante remarcar que a nivel de campo no es el único factor ambiental al que se enfrentan las plantas ya que estas suelen sufrir varios tipos de estrés al mismo tiempo (Atkinson et al., 2013).

Frente a un escenario de sequía las plantas responden utilizando distintas estrategias, algunas han sido ampliamente estudiadas y pueden explicarse a nivel: molecular, celular, bioquímico, fisiológico y/o morfológico (**Fig. 1**). La capacidad de una planta para alterar su fisiología, morfología y/o fenología para tolerar, evitar o escapar de una situación de estrés, se denomina plasticidad fenotípica (Marshall et al., 2012). La severidad del episodio de sequía (moderado, intermedio o severo) determina como la planta responde para lograr la supervivencia. En este sentido en respuesta a episodios de sequía moderada, las plantas utilizan diversas estrategias, por ejemplo reducir la transpiración como mecanismo para conservar el agua. Esto se logra por disminución en la apertura estomática mediada principalmente por el ácido abscísico (ABA) (Xu et al., 2010; Marshall et al., 2012). En cambio, cuando la intensidad de la sequía se incrementa, también lo hacen las respuestas que se desencadenan, por ejemplo se producen cambios irreversibles en la maquinaria fotosintética como la pérdida de actividad de la enzima Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa comúnmente llamada RuBisCO o en la eficiencia fotoquímica de los fotosistemas, lo que genera una reducción en el crecimiento de hojas y raíces (Mahajan and Tuteja, 2005). Cada tipo de respuesta individual o su efecto aditivo no conduce necesariamente a la tolerancia a la sequía. Por lo tanto, es difícil seleccionar un solo tipo de respuesta como objetivo para la mejora de la tolerancia a sequía (Tardieu, 2012).

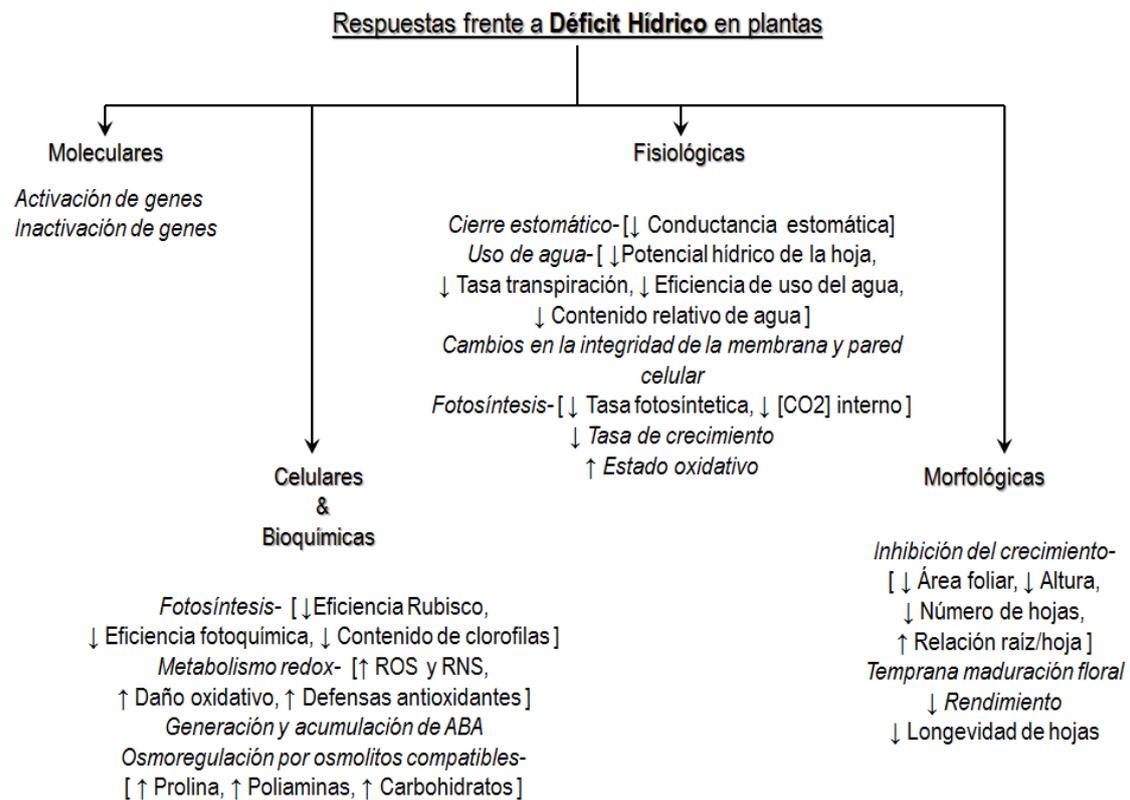


Figura 1: Respuestas desencadenadas frente a episodios de déficit hídrico en plantas. Esquema general de las diferentes respuestas que se desencadenan en episodios de déficit hídrico en plantas, desde cambios a nivel molecular dados por expresión de genes hasta cambios morfológicos complejos. (Atkinson et al., 2013; Nezhadahmadi et al., 2013).

***dry2/sqe1* un mutante hipersensible a sequía**

En la búsqueda dirigida a identificar y caracterizar nuevos componentes genéticos involucrados en la tolerancia a estrés hídrico, el modelo *Arabidopsis thaliana* ha tenido un rol importante y en este sentido el aislamiento de mutantes hipersensibles a sequía es una estrategia que ha mostrado resultados importantes (Shi et al., 2000; Borsani et al., 2002; Rubio et al., 2004; Rosado et al., 2006). En esta búsqueda, Posé et al., (2009) caracterizaron un mutante de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg *Erecta* (Ler) por su hipersensibilidad a la sequía (**Fig. 2b**), al que denominaron *dry2/sqe1*. La mutación se encuentra en el gen que codifica para la ESCUALENO EPOXIDASA 1 (SQE1) (AT1G58440). Esta enzima cataliza la reacción que oxida la molécula de escualeno a 2,3(S)-oxidoescualeno (OE) y es clave en la síntesis de esteroides a nivel de raíz. La mutación fue identificada a nivel del primer nucleótido de un triplete que codifica el aminoácido 183 de la proteína, generando un cambio de una glicina por una arginina (G183R). Esto provoca una disminución en la actividad de la enzima que tiene como consecuencia la alteración del contenido de esteroides en raíz en comparación con el salvaje. El mutante presenta altos niveles de escualeno y de intermediarios finales

asociados a las vías de producción de brassinoesteroides, y bajos niveles de esteroides asociados a funciones estructurales como el sitosterol y estigmasterol (**Fig. 2f**). Además de los cambios observados en la composición de esteroides, el mutante *dry2/sqe1* presenta defectos en el desarrollo de la raíz principal y mayor número de raíces laterales que las plantas salvajes (**Fig. 2a**) (Posé et al., 2009). A su vez, en el mutante se observa un cambio en la localización de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en pelos radiculares en comparación al salvaje (**Fig. 2d**) (Posé et al., 2009; Doblas et al., 2013). De manera interesante, el mutante mostró una expresión diferencial de genes implicados en respuestas a estrés: específicamente, presenta sobrepresados genes como *ABA2* asociado a la biosíntesis de la fitohormona ABA y al cierre estomático (**Fig. 2e**); *P5CS1* y *P5CS2* asociados a la biosíntesis de prolina importante molécula de respuesta a estrés y genes asociados al metabolismo oxidativo como *AtrbohB*, *AtrbohF*, *CAT2*, *CAT3*, *CSD1* y *CCS* (Posé et al., 2009). Además de genes vinculados a la morfogénesis de raíces como *ILR2* (IAA-LEUCINE RESISTANT 2,) responsable de la formación de raíces laterales y la elongación de la raíz primaria (Posé et al., 2009).

Es importante remarcar que el mutante *dry2/sqe1* tiene afectada la actividad de una enzima que no está relacionada directamente con ninguna de las respuestas a la sequía ya conocidas, por lo que representa un buen modelo para estudiar nuevos mecanismos involucrados en la tolerancia al déficit hídrico en plantas (Posé et al., 2009).

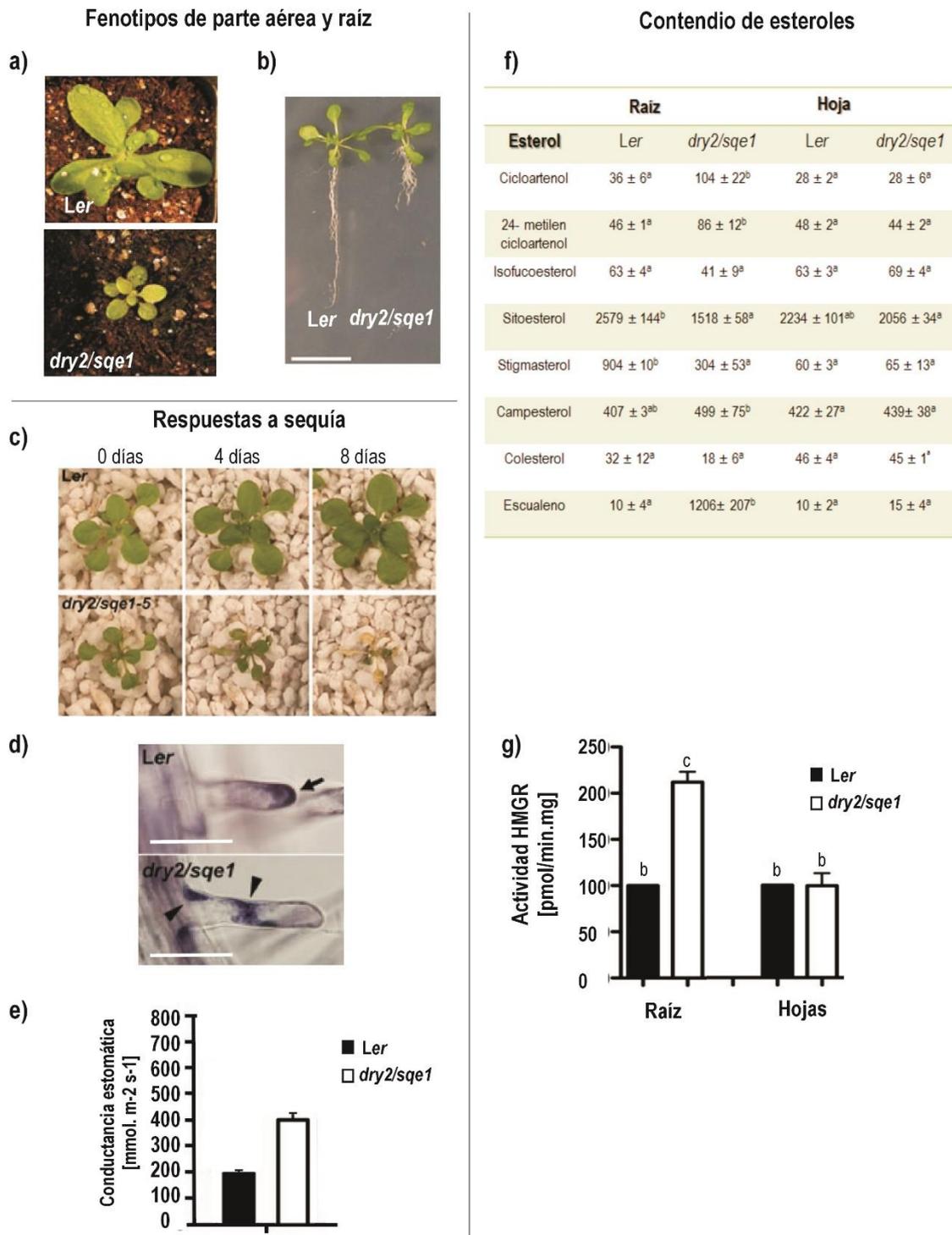


Figura 2: Fenotipos del mutante *dry2/sqe1*. En **a)** fenotipo de parte aérea y en **b)** fenotipo radicular de plantas salvajes *Ler* y del mutante *dry2/sqe1* crecidas en macetas e *in vitro*, respectivamente. **c)** Ensayo de tolerancia a sequía. Plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* de 20 días cultivadas en perlita como sustrato fueron regadas normalmente hasta el inicio del ensayo donde el riego fue suspendido. El estado de las plantas fue evaluado a los 4 y 8 días luego de suspendido el riego. **d)** Localización de especies reactivas del oxígeno (ROS) por tinción con NBT en raíces de plántulas *Ler* y *dry2/sqe1*. Las flechas negras indican la señal de las ROS en las puntas de pelos radiculares de *Ler*, las puntas de flecha indican la localización de las ROS en los pelos radiculares de *dry2/sqe1*. Las barras de escala representan 50µM. **e)** Conductancia estomática de plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* bajo condiciones de baja humedad relativa

(30%). Los datos representan las medias de los valores \pm SD ($n = 3$). **f)** Análisis del contenido de esteroides y escualeno por espectrometría de masas a partir de plántulas *Ler* y *dry2/sqe1*. Las unidades son $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco y los valores representados son las medias \pm SD. $n=3$. Según el análisis estadístico los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$). **g)** Actividad HMGR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) en raíces y hojas de plantas *Ler* y *dry2/sqe1*. Los valores representan el porcentaje de la actividad HMGR en $\text{pmol}/\text{mg}\cdot\text{min}$. Según el análisis estadístico los valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Adaptado de Posé et al., (2009) y Doblas et al., (2013).

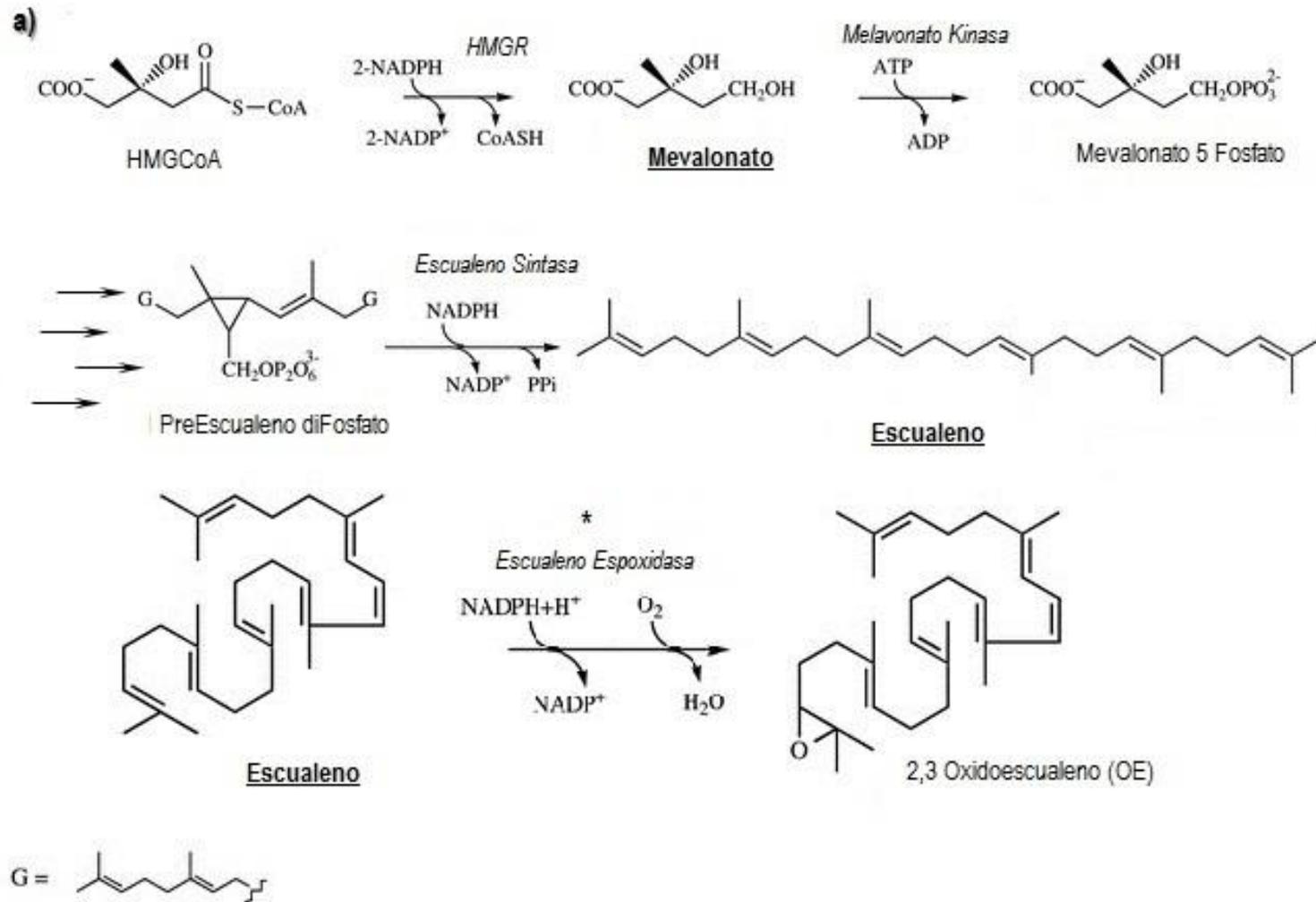
Biosíntesis de esteroides

La mayoría de las células eucariotas sintetizan esteroides mediante una compleja y extensa ruta que requiere de múltiples pasos enzimáticos en los cuales está implicada la enzima SQE. En la Figura 3 se esquematiza el metabolismo de esteroides en plantas. Aunque la síntesis comienza a partir de la molécula de Acetil CoA, es la molécula de Mevalonato la considerada como precursor principal de los esteroides en todas las células eucariotas y principalmente en células vegetales (Benveniste, 2002). El Acetil CoA es convertido en Mevalonato mediante 4 pasos enzimáticos donde la última enzima que lo genera es la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), enzima clave en el metabolismo de esteroides evidenciada por su compleja regulación (Stermer et al., 1994) (**Fig. 3a**). El Mevalonato sufre una serie de fosforilaciones, descarboxilaciones, isomerizaciones y condensaciones hasta la producción de la molécula de Escualeno (**Fig. 3a**) (Espenshade and Hughes, 2007). Posteriormente el producto que genera la SQE, el OE, se cicla formando intermediarios llamados terpenos policíclicos y continúa la biosíntesis bajo control enzimático con adiciones como alquilación, remoción de grupos metilo, apertura de anillos, hidrogenaciones, isomerizaciones y de saturaciones entre otras, hasta llegar a los productos finales (Benveniste, 2002). La biosíntesis de esteroides en plantas puede generar tres clases de productos finales: 1) los esteroides asociados a funciones estructurales como el estigmasterol y el sitosterol, que son terpenos cíclicos que derivan a partir del intermediario 24-etilen lofenol; 2) los brasinoesteroides (BRs), que se generan a partir de 24-metilen lofenol; y 3) el colesterol, que se genera a partir de cicloartenol (**Fig. 3b**) (Benveniste, 2002; Benveniste, 2004).

Los esteroides están representados universalmente en las membranas plasmáticas de las células eucariotas (Mouritsen and Zuckermann, 2004). Mientras que el ergosterol y colesterol son predominantemente los esteroides en hongos y vertebrados, respectivamente, las membranas plasmáticas de plantas superiores contienen una gran diversidad de esteroides principalmente el sitosterol, estigmasterol o campesterol los cuales son altamente dependientes de la especie vegetal (Furt et al., 2011). Los esteroides, dentro de las membranas cumplen un rol en el mantenimiento de la estabilidad y permeabilidad (Bouillon and Benvensite, 1978). Por otro lado son capaces de llevar a cabo funciones de regulación, ya que pueden provocar la transducción

de señales vinculadas por ejemplo a respuestas a estreses ambientales como la sequía o la salinidad (Hong et al., 2008). Finalmente los esteroides son precursores de hormonas esteroideas como los brassinoesteroides (BR), moléculas propuestas como reguladoras del crecimiento, desarrollo y metabolismo de las plantas (Zhu et al., 2013).

Estudios genéticos en la ruta de biosíntesis de esteroides en plantas han demostrado que los esteroides pueden regular y modular diversos aspectos del desarrollo (Clouse, 2002). Por ejemplo, la enzima SMT (Sterol-Metil Transferase), responsable de la biosíntesis de esteroides en *Arabidopsis*, es codificada por tres genes (*STM1*, *SMT2* y *SMT3*), los cuales esconden un motivo S-adenosylmethionine dependiente de C-24 (Parks, 1958). La mutación en *SMT1* genera una alteración en la composición de esteroides, incrementando el nivel de colesterol y reduciendo el de fitosteroides comunes (Diener et al., 2000). Esto provoca una reducción del transporte de auxinas por deslocalización de proteínas PIN1 y causa varios defectos en la polaridad celular (Willemsen et al., 2003). La mutación en *SMT2* reduce el crecimiento de la planta y su fertilidad (Schaeffer and Bronner, 2001; Sitbon and Jonsson, 2001). Por otro lado, la mutación a nivel de *esterol C-14 reductasa* (mutante *fackel*) afecta el desarrollo del embrión y el crecimiento de la planta, lo que lleva un fenotipo de enanismo (Jang et al., 2000; Schrick et al., 2000). La mutación en *esterol C -8,7 isomerasa* (mutante *hydra1*) conduce a la morfogénesis aberrante en la regulación del tamaño y forma de la célula (Souter et al., 2002). La manipulación genética en la composición de esteroides reveló diversos defectos a nivel celular indicando que los esteroides estructurales son indispensables para la integridad normal de la membrana, el crecimiento celular, y desarrollo de la planta (Clouse, 2002).



b)

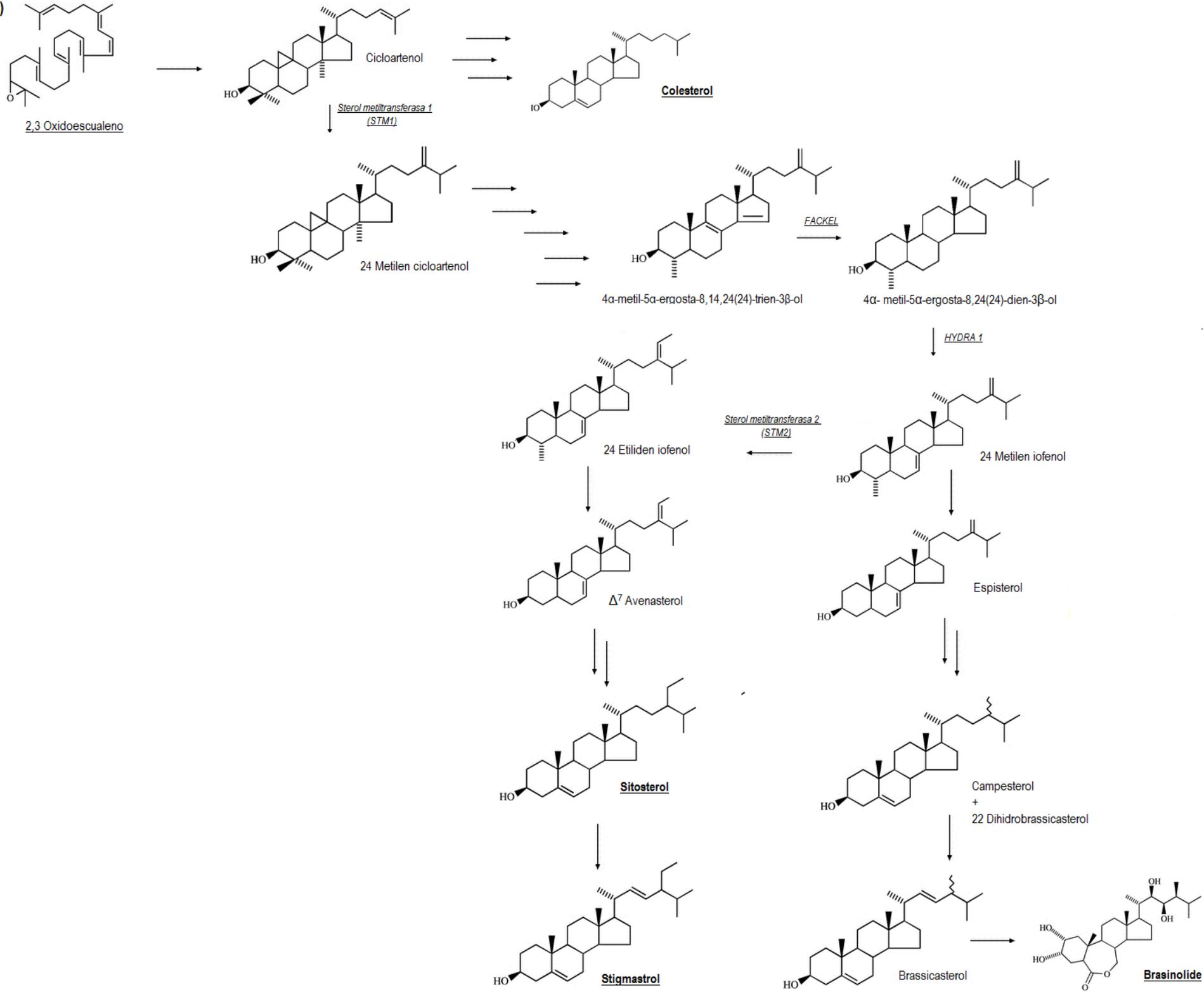


Figura 3: Metabolismo de esteroides en *Arabidopsis thaliana*. a) Inicio de la biosíntesis desde la molécula de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) hasta el 2,3 Oxidoescualeno (OE). El * destaca la enzima mutada en *dry2/sqe1*. b) Síntesis del metabolismo de esteroides desde la molécula de OE hasta los productos finales más destacados como el colesterol, estigmaesterol y el brasinolide. Los intermediarios subrayados son considerados importantes o fueron mencionados en el texto. (Benveniste, 2002)

El mutante *dry2/sqe1*, como ya se mencionó, presenta una mutación puntual en el gen *SQE1* que codifica para la proteína ESCUALENO EPOXIDASA 1 la cual tiene función monoxigenasa (Lamesch et al., 2012). La *SQE1* en plantas 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 (Phillips et al., 2006; Rasbery et al., 2007). En *Arabidopsis* existen 6 genes que codifican para *SQEs*, el gen *de SQE1*, codifica para una proteína de 531 aminoácidos. De los seis genes que codifican para las *SQEs* en plantas solo tres presentan actividad epoxidasa y es *SQE1* el gen considerado como esencial en procesos vinculados al desarrollo en plantas principalmente a nivel de raíces ya que *SQE1* es el de mayor expresión en este órgano (Rasbery et al., 2007). Es curioso que la mutación en *SQE1* no genere alteración en la composición de esteroides a nivel de parte aérea según lo describe Posé et al., (2009) y Doblás et al., (2013); aunque esto puede ser debido a la contribución de las demás *SQEs*; como lo sugiere la sobreexpresión de *SQE3* en hojas de *dry2/sqe1* (Pose et al., 2009). Laranjeira y colaboradores (2015) comprobaron que la actividad de *SQE3* complementa la actividad de *SQE1* en hojas (Laranjeira et al., 2015).

Membrana plasmática y microdominios lipídicos en plantas

La membrana plasmática (MP) en células vegetales es ampliamente diversa, variable y altamente dinámica (Dufourc, 2008; Furt et al., 2011; Grecco et al., 2011). Sus propiedades físicas-químicas le proveen una función de barrera permeable selectiva a macromoléculas y solutos, delineando la interfaz entre el espacio intra y extracelular. La descripción sobre las MP ha evolucionado mucho desde el modelo de mosaico fluido propuesto por (Singer and Nicolson, 1972), en el cual, las membranas biológicas se presentan como una bicapa lipídica compuesta por proteínas y lípidos embebidos homogéneamente que pueden difundir libremente en el plano. Actualmente el modelo ha cambiado y se conoce de la existencia dentro de las MP de determinados dominios o áreas (balsas o en inglés *rafts*) definidos entre 10-200nm que presentan una composición molecular específica de lípidos y proteínas que son fundamentales en el mantenimiento y la integridad de las membranas que le proveen de una gran heterogeneidad (Mongrand et al., 2010). Sin embargo, existen importantes características físicas asociadas a las membranas que son fundamentales a la hora de definir un modelo adecuado, e incluso son ignorados en la mayoría de los modelos más populares de las membranas biológicas, incluyendo el

mosaico fluido y la teoría de los lipid rafts (Bagatolli and Mouritsen, 2013). En este contexto la estructura, dinámica y estabilidad de bicapas lipídicas son controladas por fuerzas termodinámicas, que desencadenan la formación de membranas con curvatura, generadas por las diferentes propiedades fisicoquímicas de las moléculas lipídicas, las cual permiten la interacción con proteínas de membrana y generan un conjunto de mecanismos físicos que permiten la formación de lípidos y regiones diferenciadas en el plano de membrana (Bagatolli and Mouritsen, 2013).

El análisis de la lipidómica de estos dominios de membrana evidencia que están enriquecidos principalmente por un mezcla de esteroides libres, conjugados como acetil esteril glucosidos (ASG) o esteril glucosidos (SG) y esfingolípidos como glucosilceramidas (Glu-Cer) o glucosil-inositolfosfoceramidas (GIPC) (Minami et al., 2009) y presentan baja presencia de fosfolípidos como, fosfatidilinositol-fosfato (PIP) y difosfato (PIP₂), los cuales son más abundantes en el resto de la MP (Furt et al., 2011). Se han propuesto propiedades auto asociativas entre esteroides y los esfingolípidos que constituyen la principal fuerza impulsora de la segregación de la membrana lateral *in vivo* y de la formación de los dominios de membrana estables (Silvius, 2005). Aunque los lípidos son importantes componentes para la formación y función de estos dominios, se sabe que las proteínas son también importantes componentes de estas estructuras (Mongrand et al., 2010). Análisis en la proteómica de estas balsas han develado que la gran mayoría están vinculadas a la asociación transitoria con componentes de señalización como receptores kinasa, proteínas G, y otras proteínas implicadas en las respuesta al estrés biótico y abiótico, lo que sugiere que los lipid raft podrían activar cascadas de transducción de señal en respuesta a señales ambientales (Cacas et al., 2012), además (Lefebvre et al., 2007) detecta proteínas asociados al sistema redox en raíces. Finalmente, se sugiere que las regiones de la membrana enriquecidas en esteroides (sitoesterol principalmente) están compuestas por un núcleo de proteínas constante así como también proteínas de señalización asociadas de manera dinámica (Kierszniowska et al., 2009); las cuales pueden estar vinculados a diversos procesos celulares como la polarización de la membrana, tráfico vesicular o respuestas frente a patógenos (Mongrand et al., 2010; Cacas et al., 2012).

Los fosfolípidos constituyen el resto de las membranas plasmáticas, conformando un sistema dinámico que genera moléculas de señalización como el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), el diacilglicerol (DAG) y el ácido fosfatídico (PA) (Zhu, 2002). Actualmente se conocen los roles de estas moléculas en respuestas a estrés en plantas. Por ejemplo, el PA es un fosfolípido que se forma rápida y transitoria durante episodios de estrés osmótico (McLoughlin and Testerink, 2013). La fosfolipasa D (PLD) es la enzima encargada de producir el PA a partir de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana como fosfatidilcolina y fosfatidiletiolamina (Katagiri et al., 2001), la enzima y su producto juegan múltiples funciones reguladoras en diversos procesos de la

planta, incluyendo el movimiento estomático por señalización de ácido abscísico o óxido nítrico (Sang et al., 2001; Distéfano et al., 2012), crecimiento polar de pelos radiculares (Den Hartog et al., 2001), producción y respuestas a ROS (Hong et al., 2010).

Trafico vesicular

Las membranas plasmáticas no son el único organelo celular compuesto por sistemas de membranas en los cuales los esteroides son claves, en el citosol existe un movimiento dinámico de membranas al cual se le define en su conjunto como sistema endomembranas o sistema secretor (Carter et al., 2004; Bassham et al., 2008; Rojo and Denecke, 2008). El tráfico de membrana en las células vegetales comprende de tres principales vías mediadas por organelos compuestos de membranas (**Fig. 4**): *la vía secretora* en la cual las nuevas proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático (ER) son exportadas a la MP o al exterior celular vía Golgi y/o al trans-Golgi (TGN) y viceversa, *la vía endocítica* donde componentes extracelulares o de la MP son reciclados a sus respectivos destinos o dirigidos a la vacuola donde serán degradados, el transporte aquí se da por endosomas tempranos y tardíos, y por último el *transporte vacuolar* el cual está asociado al almacenaje de proteínas, azúcares, iones y otros metabolitos secundarios asociados a las vías líticas celulares (Uemura and Ueda, 2014).

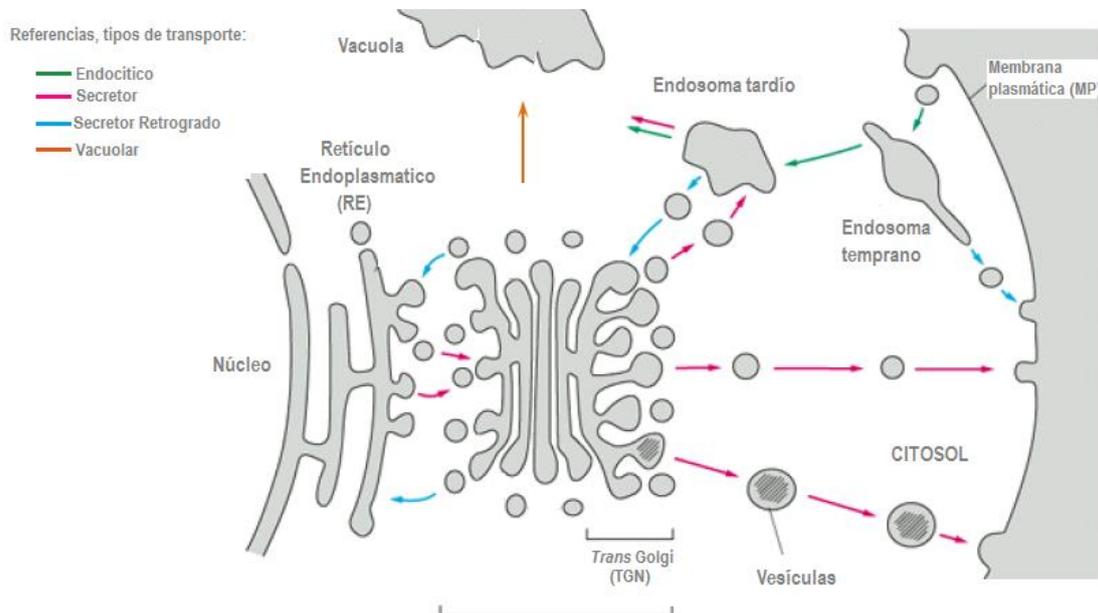


Figura 4: Tráfico vesicular intracelular: Vía Secretora, Endocítica y Vacuolar en células vegetales. La ruta secretora clásica (color rosa) y la retrograda (color celeste) involucran el RE, el Golgi, la membrana plasmática o al espacio extracelular y en algunos casos a la vacuola. La vía endocítica (color verde) se compone de la membrana plasmática y la vacuola. Por último la vía vacuolar (color naranja) o transporte lítico involucra todos los organelos y la vacuola. (Alberts et al., 2002; Bassham et al., 2008).

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS & RNS) en plantas

Curiosamente el mutante *dry2/sqe1* que presenta hipersensibilidad a sequía presenta también alteraciones en el contenido y localización de especies reactivas del oxígeno (Posé et al., 2009; Doblas et al., 2013). El oxígeno molecular (O_2) en nuestra atmósfera se introdujo por evolución de organismos fotosintéticos hace ~ 2.7 mil millones años, esta molécula suele ser llamada radical libre debido a su configuración cuántica y esta conduce a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las ROS más comunes son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH) y el oxígeno singulete. Las fuentes y la regulación de la producción de estas especies son muy variadas, los organelos más comunes en su producción son los peroxisomas (del Rio et al., 2009), cloroplastos (Mullineaux, 2009), membranas plasmáticas (Simon Plas and Mongrand, 2009) y mitocondrias (Geigenberger and Fernie, 2014). La localización de estas especies se da en los mismos organelos o tipos celulares donde se producen, como citosol, apoplasto (Harir and Mittler, 2009), en el ápice de pelos radiculares (Foreman et al., 2003) o el tubo polínico (Liu et al., 2009b).

En este contexto recientes avances de investigación sugieren y apoyan un papel importante de las ROS como moléculas señal fundamentales durante la homeostasis celular pero también en episodios de estrés abiótico, las cuales presentan un rol dual donde pueden controlar el metabolismo celular y donde este las controla a ellas (Geigenberger and Fernie, 2014).

En la última década se han puesto a las ROS como moléculas de señalización en las plantas y están aceptadas como reguladoras clave del metabolismo, crecimiento y desarrollo vegetal, por ejemplo se conoce el rol de las ROS asociadas a vías de señalización de hormonas (Izumi C et al., 2009), desarrollo y crecimiento vegetal (Bell et al., 2009), apertura estomática (Pham and Desikan, 2009), modificación de componentes de las paredes celulares (Ros Barceló and Gómez Ros, 2009) y muerte celular (Vanderauwera et al., 2009).

La generación y la degradación de las ROS son dos procesos diferentes que están por lo general bajo control celular lento y coordinado y desencadena concentraciones de ROS en estado estacionario, lo que suele llamarse la "Homeostasis Redox" (Apel and Hirt, 2004). Sin embargo, varios factores abióticos desfavorables, como la sequía, perturban el equilibrio metabólico de las células, lo que lleva a la sobreproducción de ROS, especies altamente reactivas y tóxicas que causan daño a las proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN (Huang et al., 2012). La pérdida del equilibrio entre la producción y eliminación de ROS celular conduce a la pérdida de la homeostasis redox llamada estado de "estrés oxidativo" (Lushchak, 2011).

Otros actores claves involucrados en la alteración de la homeostasis redox celular son las especies reactivas del nitrógeno (RNS), las cuales asociadas con las ROS coordinan una red de señalización nitro-oxidativa que modula las

respuestas celulares frente a estrés (Molassiotis and Fotopoulos, 2011). Las RNS las componen moléculas de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y sus derivados como el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), el peroxinitrito (ONOO^-), S-nitrosotioles (RSNOs) y S-nitrosoglutatión (GSNO) principalmente (Halliwell, 2006). Se conoce al $\cdot\text{NO}$ con roles asociados a regular el crecimiento y desarrollo de la arquitectura radicular (Correa-Aragunde et al., 2004; Lombardo et al., 2006), mediar el cierre estomático (García-Mata and Lamattina, 2001) y tiene asignado un fuerte rol como mediador de respuestas frente a estrés bióticos (Bellin et al., 2013) y abióticos (Corpas et al., 2008; Signorelli et al., 2013). Molassiotis and Fotopoulos, 2011 definen la existencia de una interacción entre ROS y RNS (Cross-Talk, según la expresión en inglés) que se vincula a redes de señalización. Un ejemplo de esta interacción lo evidencia la existencia del anión ONOO^- generado por la reacción entre $\cdot\text{NO}$ y O_2^- donde el elemento clave de su interacción es la alta difusión del óxido nítrico (Yamasaki and Sakihama, 2000). El peroxinitrito es un buen indicador del estado redox pues refleja la relación ROS/RNS (Molassiotis and Fotopoulos, 2011).

Hipótesis

Los mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en esteroides y que además presentan respuestas a sequía alteradas pueden ser una buena herramienta en la búsqueda de nuevos componentes bioquímicos/fisiológicos involucrados en las respuestas de sensibilidad/tolerancia a sequía en plantas. Se plantea que los esteroides pueden funcionar como moléculas involucradas en las respuestas al déficit hídrico en plantas.

Objetivo general:

Caracterizar mecanismos mediante los cuales los esteroides pueden participar en la regulación de las respuestas a sequía en plantas.

Objetivos específicos:

- Determinar el estado redox celular en el mutante *dry2/sqe1*.
- Analizar los componentes y estructuras asociados a membranas celulares de *dry2/sqe1*.
- Identificar componentes genéticos asociados a la hipersensibilidad a sequía mediada por esteroides.

Materiales y Métodos

Material Biológico

Material vegetal

Se utilizaron 2 mutantes y 2 tipos de líneas marcadoras que se detallan a continuación:

- mutante de *Arabidopsis thaliana* llamado *dry2/sqe1* afectado en el gen que codifica para la ESCUALENO EPOXIDASA 1 (AT1G58440) (Posé et al., 2009);

- mutante supresor de *dry2/sqe1* (*sud3*) generado por mutagénesis química con EMS (Ethyl Methanesulfonate, según sus siglas en inglés) sobre fondos *dry2/sqe1* seleccionado por la recuperación del fenotipo salvaje. Cedidos por el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, España;

-líneas marcadoras traduccionales de *Arabidopsis thaliana* para proteínas de reconocimiento subcelular. El marcaje es con la proteína amarilla fluorescente (YFP, según sus siglas en inglés) bajo el control de un promotor UBQ10 (Polyubiquitin 10) fusionada a diversas proteínas conservadas de localización específica en organelos, principalmente con funciones asociadas al transporte vesicular (Geldner et al., 2009). La proteína RabC1 (AT1G43890) que presenta localización en endosomas tempranos se utilizó en plantas transgénicas con la línea marcadora UBQ10::RabC1:YFP y la proteína RabG3f (AT3G18820) que presenta localización en endosomas tempranos y tonoplasto se utilizó en plantas con la línea marcadora UBQ10::RabG3f:YFP (Rutherford and Moore, 2002). Ver construcción génica (**Anexo, Fig. 1**);

- líneas marcadoras traduccionales de *Arabidopsis thaliana*, 35S::roGFP, como indicadores del estado d oxido-reducción celular. La proteína verde fluorescente (GFP, según sus siglas en inglés) fue modificada por incorporación de dos cisteínas en su sitio activo y se encuentra bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (Jiang et al., 2006). Ver construcción génica (**Anexo, Fig. 2**).

Generación de líneas marcadores en fondo *dry2/sqe1*

Los mutantes *dry2/sqe1* y *sud3* se encuentran en fondo genético Landsberg *erecta* (Ler), las líneas marcadoras en fondo Columbia-0 (Col-0), por lo que se utilizaron dichos ecotipos como genotipos salvajes de *Arabidopsis*.

Se realizaron cruzas entre mutantes y líneas marcadoras usando *dry2/sqe1* como donador de polen. Flores de *dry2/sqe1* pertenecientes a plantas de 35 días en el estadio 12 (Smyth et al., 1990) fueron cruzadas manualmente con el gineceo desnudo de una segunda planta que porta la construcción 35S::roGFP o UBQ10::Rabs:YFP. Las semillas obtenidas de la craza (F1) se crecieron en sustrato hasta obtener semillas. Estas semillas (F2) fueron sembradas para

obtener las plantas doble homocigotas, con una predicción de proporción de 1/16 de la progenie con este genotipo. Las semillas identificadas como posibles dobles mutantes fueron recuperadas y sembradas para su verificación. Las dobles homocigotas se analizaron en la primera generación por selección con herbicidas para las líneas marcadoras que portan la construcción 35S::roGFP y antibióticos para la línea marcadora que porta la UBQ10::RabC1:YFP (ver los genes de resistencia en **Fig. 1 y 2** de los anexos), y por fenotipo característico generado por la mutación de *dry2/sqe1*. Las cruces serán llamadas en adelante 35S::roGFP x *dry2/sqe1*, UBQ10::RabC1:YFP x *dry2/sqe1* y UBQ10::RabG3f:YFP x *dry2/sqe1*.

Tratamiento de las semillas

Las semillas para cultivo *in vitro* se esterilizaron con tratamiento de etanol 70% durante 1min, un enjuague con agua destilada estéril, hipoclorito 20%-tween20 0,1% durante 3 minutos, y 5 lavados con agua destilada estéril. Las semillas se estratificaron por 48 a 96h en oscuridad a 4°C.

Para los ensayos maceteros se realizó un tratamiento de hidratación de las semillas en agua destilada durante 24h en oscuridad a 4°C previo a su siembra.

Condiciones de crecimiento

Las plantas se crecieron en condiciones controladas en cámaras del tipo biotró: fotoperiodo de día largo 16h/8h (luz/oscuridad), $50\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica, 22°C de temperatura y 60% de humedad relativa.



Figura 5: Diferentes formas de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Los ensayos en macetas se realizaron con turba como sustrato de germinación y crecimiento. En los ensayos *in vitro* se utilizó medio MS como sustrato de germinación y crecimiento.

El crecimiento en placa horizontal se llevó a cabo para obtener mayor cantidad de biomasa de parte aérea, mientras que el crecimiento en placa vertical se usó con el fin de visualizar mejor el fenotipo radicular y obtener mayor biomasa.

Medios de crecimiento

Medio MS

Se indica la composición en la Tabla 1 (Murashige and Skoog, 1962):

Tabla 1: Composición de macro y micronutrientes que componen el medio de crecimiento de plantas de *Arabidopsis in vitro* Murashige y Skoog (MS).

Macronutrientes	[g/L]	Micronutrientes	[mg/L]
NH ₄ NO ₃	1,64	H ₃ BO ₃	6
KNO ₃	1,90	CaCl ₂	0,023
KH ₂ PO ₄	0,168	CuSO ₄	1,59
CaCl ₂	0,44	Na ₂ -EDTA	37,22
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,37	FeSO ₄ -7H ₂ O	27,8
		KI	0,83
		MnSO ₄ -H ₂ O	15,1
		Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,24
		ZnSO ₄ -7H ₂ O	8,628

Se ajustó el pH a 5.7 con NaOH y se agregó 10g/L de agar. Por último se esterilizó el medio con autoclave a 121°C durante 20min.

Turba

Para los ensayos en maceta se utiliza turba (KEKKILA®) como sustrato previamente esterilizada en autoclave.

Condiciones de crecimiento particulares:

Las condiciones de sequía en macetas se indujeron mediante la siguiente metodología experimental:

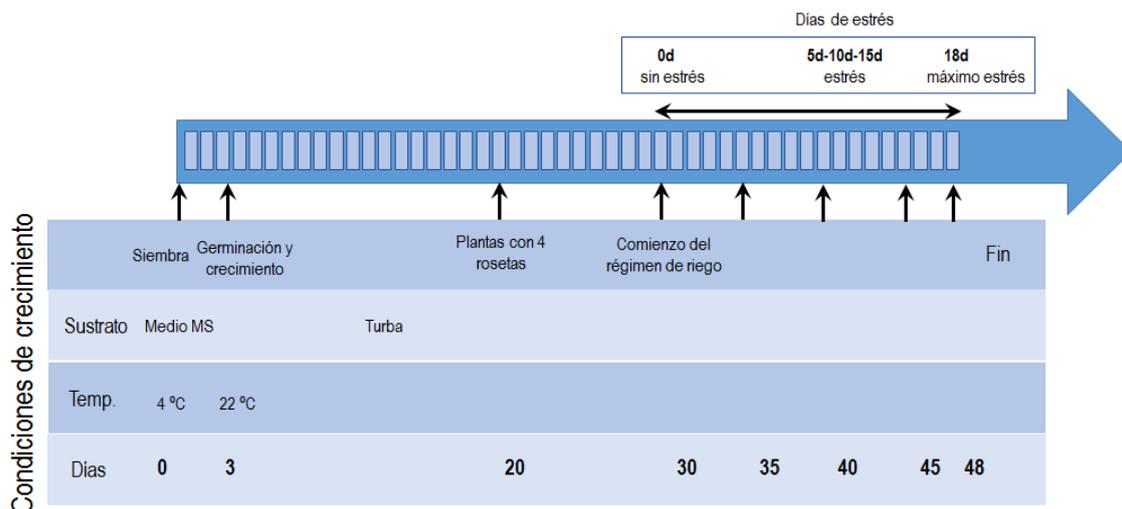


Figura 6: Diagrama del diseño experimental para generar la situación de estrés en plantas *Ler* y *dry2/sqe1*. Semillas *Ler* y *dry2/sqe1* fueron sembradas en medio MS en el día 0 y se incubaron durante 3 días a 4°C donde se transfirieron a la cámara de crecimiento a 22°C. En la etapa de cuatro hojas verdaderas (20d) las plántulas se trasplantaron a macetas con turba y se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento. Luego del día 30 se comenzó el experimento de estrés mediante la imposición de dos regímenes de riego: plantas tanto *Ler* como *dry2/sqe1* fueron regadas con 10ml de agua dos veces por semana durante todo el experimento y plantas *Ler* y *dry2/sqe1* sin riego durante todo el ensayo de estrés hasta el día 19 en que se levantó el ensayo. Las réplicas biológicas fueron 4.

Para el caso de los ensayos *in vitro* se incorporó 200mM de manitol al medio MS como agente osmótico estresante.

Para la obtención del peso seco, se secó el tejido vegetal durante 48hs en estufa a 60°C.

Para los ensayos en presencia de nitroPrusito de sodio (SNP) este se agregó al medio MS sólido en concentraciones finales de 1, 10 y 100µM.

Los ensayos de inhibición de tráfico vesicular se realizaron mediante el tratamiento con 50µM brefeldina A (BFA) (SIGMA®) en medio MS líquido por 30 minutos en plantas con las construcciones UBQ10::Rabs:YFP y UBQ10::Rabs:YFP x *dry2/sqe1*.

La selección de plantas transgénicas se realizó en presencia de 30µM del antibiótico hygromicina B (Duchefa) en plantas con la construcción de 35S::roGFP y 35S::roGFP x *dry2/sqe1* y 10µM del herbicida glufosinato de amonio (PESTRANAL®) en plantas con la construcción de UBQ10::Rabs:YFP y UBQ10::Rabs:YFP x *dry2/sqe1* los cuales fueron incorporados al medio MS.

Mapeo del supresor *sud3*

El mapeo genético del mutante supresor de *dry2/sqe1* (*sud3*) se realizó mediante el uso de marcadores moleculares por genética directa y luego por mapeo profundo por secuenciación masiva.

La población recombinante de los supresores fue generada por el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga (España), mediante el cruce entre una línea de introgresión que contiene la mutación *dry2/sqe1* en fondo genético del ecotipo Col-0 (**Fig.7a**) con *sud3* que porta la mutación *dry2/sqe1* y la mutación supresora en un fondo genético ecotipo Ler (**Fig. 7b**).

Las semillas F2 resultado del cruce fueron germinadas y crecidas en macetas durante 30 días, se sometió a sequía a partir de los 15 días por ausencia de riego para seleccionar los individuos que expresan fenotipo salvaje y no presentan hipersensibilidad a sequía.

La estrategia de mapeo genético usada se representa en la Figura 7, donde el primer paso fue la identificación de la base genética del fenotipo mutante a mapear (*sud3*) 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 este caso Col-0 y Ler.

Los marcadores moleculares empleados son del tipo SSLP (Según sus siglas en inglés: Simple Sequence Length Polymorphisms) y se encuentran distribuidos a lo largo de los 5 cromosomas de *Arabidopsis thaliana*.

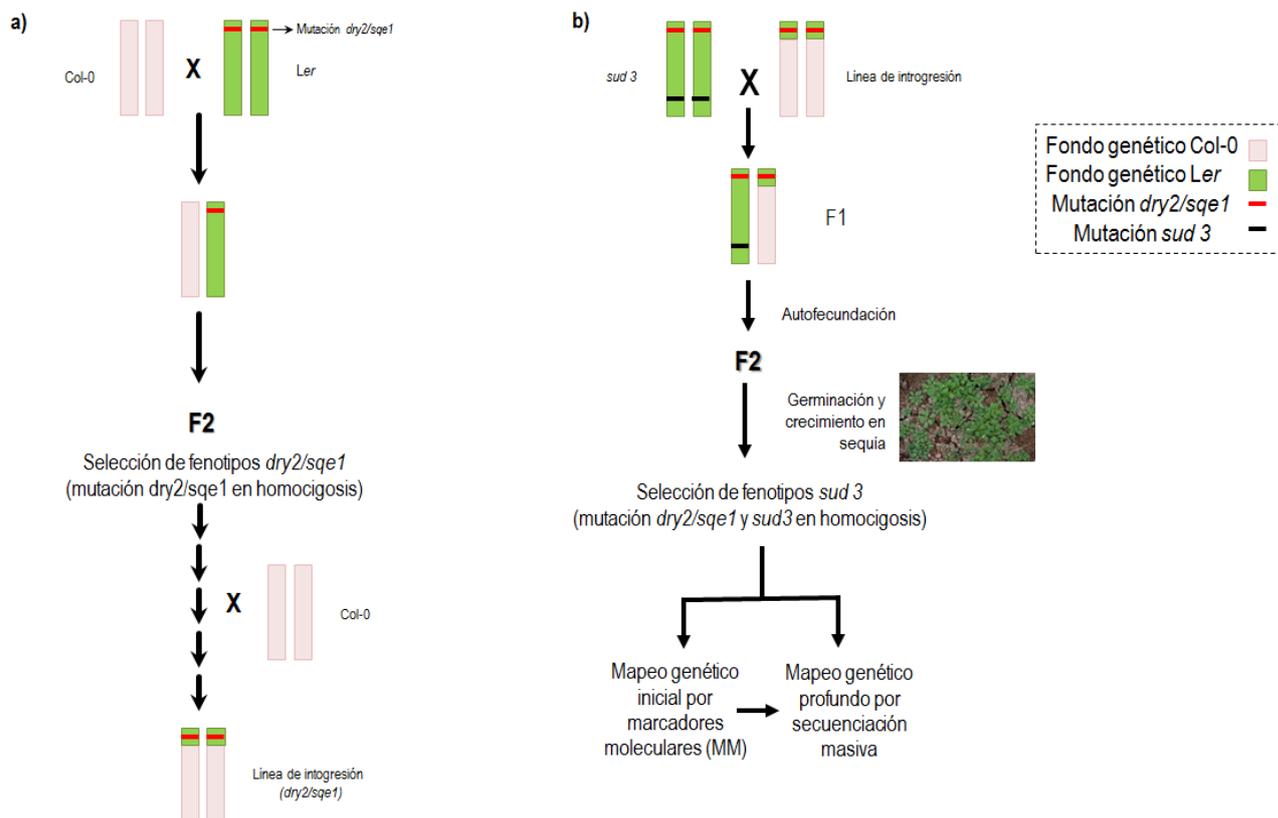


Figura 7: Representación de la estrategia general utilizada para la identificación del gen mutando en *sud3*. a) Generación de la línea de introgresión de *dry2/sqe1*, la cual presenta en homocigosis la mutación *dry2/sqe1* en un fondo genético Col-0, excepto en la región del cromosoma donde se encuentra la mutación en *SQE1* que se encuentra en fondo *Ler*. b) El supresor *sud3*, que se encuentra en un fondo genético *Ler* y porta la mutación *dry2/sqe1* y la *sud3* se debe cruzar con un parental polimórfico como lo es la línea de introgresión de *dry2/sqe1* generada en a) para generar la población no segregante entre *dry2/sqe1* y *sud3*. En la F2 se genera la población que se mapeara, inicialmente con marcadores moleculares (MM) del tipo SSLP hasta flanquear una región pequeña para finalmente por secuenciación masiva afinar el mapeo e identificar el gen o los genes candidatos mutando/s en *sud3*.

La visualización del polimorfismo se realizó mediante amplificación por PCR de la región deseada. Los cebadores utilizados fueron sintetizados por la empresa INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT) y/o cedidos por el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga, España. Los marcadores y las secuencias de los cebadores para cada uno se detallan en la Tabla 1 en el anexo.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo rutinariamente en un volumen final de 10µl donde se siguió el siguiente protocolo para cada reacción:

Tabla 2: Concentraciones finales, []_f, de los reactivos necesarios para la preparación de la mezcla de PCRs. Ver secuencia de los cebadores usados en Tabla 1 en anexos.

Reactivo:	[] _f
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs mix	10mM
Cebadores Forward	100μM
Cebadores Reverse	100μM
Taq polimerasa (Fermentas)	1U/μl
Taq Buffer KCl, libre de MgCl ₂	10X
ADN	20-100ng/μl
H ₂ O _{mq} estéril	Volumen final 10μL

La mezcla se incubó en un termociclador Thermo con la siguiente configuración en el programa de ciclado: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1:30 min, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15seg, hibridación de los cebadores a una temperatura de *annealing* entre 3-5°C inferior a la T_m de los cebadores, durante 15seg, y por último una extensión a 72°C durante 30seg.

La información generada con el mapeo por los MM reduce la distancia a mapear acotando la búsqueda de la mutación sobre una región flanqueada por dos MM en el cromosoma III, luego para la identificación específica del gen se utilizó secuenciación masiva.

Un total de 20 plantas F4 portadoras de la mutación *sud3* que muestran los fenotipos de supresión a *dry2/sqe1* se utilizaron para el mapeo por secuenciación. El genoma de *sud3* en la región del cromosoma 3 entre los marcadores F18C1 y NIT1.2 se secuenció mediante secuenciación de alto rendimiento utilizando la plataforma Illumina con una cobertura de profundidad de 30, por el servicio de Shanghai Center for Plant Stress Biology (PSC).

Se filtraron los datos crudos de la secuenciación de *sud3* inicialmente comparando con la secuencia para el ecotipo *Ler* y posteriormente con la secuencia de *sud1*, otro mutante con supresión en *dry2/sqe1* ya identificada y clonada (Doblas et al., 2013). De los aproximadamente 50 genes obtenidos que presentaron desde 1 a 20 mutaciones se depuraron hasta obtener 20 genes candidatos. Esta última depuración se realizó por búsqueda de las mutaciones puntuales del tipo EMS (sustituciones de G por T) y por la búsqueda de mutaciones que caigan en dominios proteicos identificados para cada proteína. La identificación de dominios proteicos se realizó usando la herramienta InterPro: protein sequence del The european Bioinformatic Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Extracciones

Proteínas totales de Arabidopsis

Las proteínas totales son extraídas para los ensayos de inmunodetección y para las actividades enzimáticas en geles (Ver más adelante).

El material vegetal se maceró en nitrógeno líquido ($N_{2(l)}$). El macerado fue homogenizado en buffer de extracción frío (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM KCl, 1mM EDTA, 2mM ditioneitol (DTT), 0,5mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, (PMSF), 0.2% triton X-100 y 1/2000 de inhibidor de proteasas) en una proporción 2:1 de buffer y macerado. El homogenizado se centrifugó a 6000g por 10min a 4°C y el sobrenadante se utilizó para las distintas determinaciones.

Para optimizar la extracción de proteínas principalmente para las inmunodetecciones en las cuales la especificidad de los anticuerpos es baja se procede a la purificación de los extractos obtenidos anteriormente. Para purificar las proteínas se realizaron cromatografías de exclusión molecular con columnas de cromatografía SephadexG25. Se sembraron 250µl de la extracción de proteínas totales junto con 450µl de buffer de extracción en 10% de glicerol. Luego se eluyeron las proteínas con 500µl de buffer de extracción.

Se cuantificó el contenido de proteínas totales según (Bradford, 1976). 10µl de proteínas se adicionó a 900µl de azul de coomassie (0.01% azul de coomassie G250, 5% etanol y 10% ácido fosfórico) y se midió la absorbancia a 595nm en cubeta de plástico de 1cm de paso óptico en espectrofotómetro UV-1603 SHIMADZU. La concentración de proteínas totales se obtuvo a partir la extrapolación sobre una curva de calibración construida con BSA (1, 2, 5, 10 y 50µg/ml) como solución estándar.

ADN genómico de Arabidopsis para mapeo con marcadores moleculares

Se maceró 2 hojas pequeñas en 800µl de 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 17.500g durante 10min. Se conservó el sobrenadante al cuál se le agregó 600µl de isopropanol para precipitar el ADN, esta mezcla se incubó a -20°C durante 30min; se volvió a centrifugar a 17.500g durante 10min, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet el cual se lavó con etanol 75% (v/v). Se dejó secar el pellet y se resuspendió en 100µl de agua destilada estéril.

ADN genómico de Arabidopsis para secuenciación masiva

Se maceraron 3 hojas con $N_{2(l)}$ y se agregaron 400µl de buffer de extracción (100mM Tris pH 8, 0.5mM NaCl, 20mM EDTA, 0,5% SDS) hasta que el tejido quedó totalmente homogéneo. Se incubó durante 30min a 65°C. Luego se homogeneizó el extracto en 200µl de fenol/cloroformo/alcohol isomílico (25:24:1) y se centrifugó a 12.000g por 5min. La fase acuosa fue colectada y

mezclada con 1µl de RNasa A 50mg/ml, por último se incubó durante 20min a temperatura ambiente. Las muestras se volvieron a re extraer en un volumen igual de fenol/cloroformo/isomílico seguidos de dos re extracciones con cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1). El ADN de la última fase acuosa fue precipitado con 500µl de etanol y centrifugado en las mismas condiciones anteriores para obtener el pellet enriquecido en ADN el cual fue lavado con etanol 70% y se resuspendió en 50µl de agua_{mq}.

El ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) a 260nm. En el análisis de los datos, una unidad de absorbancia a 260nm ($Abs_{260nm} = 1$) equivale a una concentración de 50µg/mL si la muestra es de ADN (Berger, 1987).

La calidad del ADN se evaluó por el cociente entre las absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm que estima si la muestra de ADN está contaminada por proteínas y el cociente entre las absorbancias a 260nm y 230nm que es un indicativo de contaminación de polisacáridos y fenoles. Los valores del cociente $abs_{260nm} / abs_{280nm}$ deben estar comprendidos entre 1.7-1.9 unidades de absorbancia y los valores del cociente $abs_{260nm} / abs_{230nm}$ deben ser superiores a 2 unidades de absorbancia.

El ADN se corrió en electroforesis horizontal en geles de agarosa de 1 a 3% en buffer TBE 1X (54g/L Tris; 27.5g/L ácido bórico y 0,5M EDTA pH 8) con 0.0025% de goodview (SDS, China) para su posterior visualización. Las muestras de ADN a separar se mezclaron con buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol (Xc) 0.25% y glicerol 50%) en proporción 5:1 de buffer-muestra. Se siembran las muestras en el gel y paralelamente se corrieron los marcadores de peso molecular (1kb PLUS y 100bp. GeneRuler™). Se corrió el gel a 100mV en buffer TBE 1X durante 40min. La visualización del gel se realizó en lámparas de luz UV del equipo Dynalight dual intensity UV transilluminador.

En la Tabla 2 de los anexos, se representan las cuantificaciones, purezas e integridad de los ADNs extraídos.

El ADN a secuenciar fue enviado precipitado a partir de un pool de 20 ADNs de 20 individuos *sud3* diferentes en una concentración final de 20µg de ADN (1µg por cada uno). La precipitación se realizó en 2.5 volúmenes de etanol al 100% y en 1/10 de 3M de acetato de sodio pH 5.4. Se incubó durante 1h a -80°C. Luego se centrifugó a máxima velocidad por 30min a 4°C y el pellet obtenido se lavó en etanol 70% y una vez seco se envió para la secuenciación masiva.

Prolina

Para la extracción de prolina se utilizó el protocolo de (Charest and Phan, 1990). Se maceró entre 100 y 50mg de tejido fresco de plántulas en 800µL de solución de metanol-cloroformo-agua (12:5:1). El homogenizado se centrifugó a 5.000g durante 2min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le adicionó

200µl de cloroformo y 300µl de agua y se volvió a centrifugar a 5.000g durante 1min. La fase superior acuosa del sobrenadante contiene la prolina y se conservó para la posterior cuantificación.

La cuantificación se realizó según (Troll and Lindsley, 1955). A 500µl de solución que contiene prolina se le agregó 1mL de ácido acético y 1mL de reactivo de ninhidrina ácida (H₃PO₄ 6M, ácido acético 12.6M y ninhidrina 0.14M). La reacción se desarrolló a 90°C durante 60min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se le adicionó 1mL de tolueno, se agitó vigorosamente y se incubó durante 5min, y se decantó durante 12hs en heladera hasta la formación de dos fases. Se utilizó la fase superior para cuantificar la prolina por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 515nm en celdas de vidrio. Como blanco se utilizó tolueno.

Electroforesis

Geles nativos

Se utilizó electroforesis de geles no desnaturalizantes para examinar y aislar las proteínas en su forma "nativa", en este caso para geles de actividad enzimática (ver más adelante).

Se prepararon dos geles según (Sambrook et al., 1989), un concentrador en la parte superior y otro separador en la inferior. La concentración de Acrilamida fue de 5% y 12.5% respectivamente. La composición de los geles se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3: Detalle de la composición de los geles separador al 12.5% y de Stacking al 5% de para la preparación de geles de Poli(acrilamida) no desnaturalizantes (PAGE).

Composición Gel separador (5mL)	Volumen (mL)	Composición Gel Stacking (1.5mL)	Volumen (mL)
Acrilamida 30%	1.67	Acrilamida 30%	0.24
Agua destilada	2.32	Agua destilada	1.0815
Buffer Tris-HCl 1.8M pH 8.8	1	Buffer Tris-HCl 1.25M pH 6.8	0.15
TEMED	0.005	TEMED	0.003
Persulfato de Amonio (PSA)	0.0333	Persulfato de Amonio (PSA)	0.01

La muestra para sembrar se preparó en una proporción 4/1 con respecto al buffer de carga (62.5mM Tris pH 6,8, 10% glicerol y 0.01% azul de bromofenol). Como buffer de corrida se utilizó 1X de Tris-glicina (25mM Tris pH 8.3 y 0.9M glicina). La corrida se realizó a 30mA hasta que la muestra alcanzó el gel separador y luego a 35mA. Para visualizar las proteínas se tiñó el gel con azul de Commassie, o plata dependiendo de la concentración de las proteínas a visualizar.

Geles desnaturalizantes SDS-PAGE

Los geles SDS-PAGE (Según sus siglas en inglés, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel). Se prepararon en forma similar a los nativos con la diferencia que se generó condiciones desnaturalizantes con la inclusión del detergente SDS, ver composición Tabla 4. El perfil de proteínas desnaturalizadas en el gel se utilizó para las inmunodetecciones (Ver más adelante).

Tabla 4: Detalle de la composición de los geles separador al 12.5% y de Stacking al 5% de para la preparación de geles de Poli(acrilamida) desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Composición Gel separador (5mL)	Volumen (mL)	Composición Gel Stacking (1.5mL)	Volumen (mL)
Acrilamida 30%	1.67	Acrilamida 30%	0.24
Agua destilada	2.27	Agua destilada	1.08
Buffer Tris-HCl 1.8M pH 8.8	1	Buffer Tris-HCl 1.25M pH 6.8	0.15
SDS 10%	0.05	SDS 10%	0.015
TEMED	0.005	TEMED	0.003
Persulfato de Amonio (PSA)	0.0333	Persulfato de Amonio (PSA)	0.01

La muestra (20µg) se sembró en proporción 4/1 con buffer de carga (62.5mM Tris pH 6,8, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol y 2% SDS) previamente a un tratamiento de shock térmico que consistió en 3min a 90°C y 3min a 0°C. Luego se procedió a la corrida en buffer (25mM Tris pH 8.3, 0.9M glicina y 1% SDS). 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 gel se tiñó con azul de comassie o tinción de plata según los requerimientos.

Tinción de geles de proteínas

Azul de Coomasie

El gel se tiñó en una solución de azul de comassie (0,1% azul coomasie, 45% metanol y 10% ácido acético) durante 60min posteriormente se destiñó en una solución de decoloración (15% ácido acético y 5% metanol) hasta que aparecieron las bandas.

Tinción de nitrato de plata

Se realizó según Blum et al., 1987, se fijó el gel en una solución metanol: ácido acético: agua (50:10:40) con 0.5mL/L de formaldehído 37%. Se incubó durante 45min en agitación. Luego se realizó 4 lavados en etanol 50% durante 20min

cada uno en agitación. Se retiró el etanol y se adicionó tiosulfato de sodio 0.8mM por 1min, rápidamente 4 lavados con agua_{mq} de 20s cada uno. En otro recipiente limpio se incubó el gel en una solución de nitrato de plata 0.2g/mL con 0.75mL/L de formaldehído 37% durante 20min en agitación y oscuridad. Se realizó 2 lavados rápidos con agua_{mq} y se reveló el gel en una solución de carbonato de sodio 60g/L, tiosulfato de sodio 4mg/L y formaldehído 0.5/mL/L. Cuando comenzaron a aparecer las bandas se colocó la solución de parada (50% etanol y 10% ácido acético) durante 10min en agitación.

Inmunodetecciones

Western Blot

Para detectar la cantidad de proteínas en este caso los niveles de fosfolipasas presentes en extractos proteicos se ensayó la técnica de inmunodetección de western blot.

Las proteínas previamente separadas en gel desnaturalizante (SDS- PAGE) se transfirieron a una membrana 0.45 μ m de nitrocelulosa (Bio-Rad) en el buffer de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM pH 8.3, metanol 20%) a 40mA aproximadamente durante 1:40hs en un electrotransferidor TE 77 (ECL Semi Dry Transfer Unit, Amersham Biosciences). La membrana se tiñó en una solución de con rojo ponceau (Sigma) 0.5% (p/v) y ácido acético 1% (p/v) para comprobar la correcta transferencia de las proteínas.

A continuación se lavó la membrana 2 veces en agua_{mq} y posteriormente se incubó en un buffer TBS (Tris-HCl 20mM pH 7.5 y NaCl 0,5M) por 10min a temperatura ambiente y en agitación a 30rpm. Luego se bloqueó la membrana con una solución compuesta por leche en polvo libre de grasa al 5% en TBS durante 1h. Se lavó la membrana 2 veces con TBS-tween 20 al 0.1% (TBST) durante 10 min. Se incubó con el anticuerpo primario (Ver dilución para cada caso en **Tabla 5**) durante 1h. Se lavó el exceso de anticuerpo primario 2 veces en buffer TBST durante 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora (Ver discusión en **Tabla 5**). Por último se lavó la membrana 2 veces en TBST durante 10min. Se incubó la membrana en la solución de quimioluminiscencia (BIO-RAD) durante 5min y la membrana se expuso en oscuridad a una placa fotográfica (Kodak) durante 10min. El revelado de las mismas se realizó en las soluciones comerciales de revelado y fijación (MediQ[®]) en placas fotográficas en oscuridad hasta la aparición de bandas.

Tabla 5: Diluciones correspondientes de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunodetecciones.

Anticuerpos	Dilución (en TBST + 5% Leche en polvo)
Primario- Anti FosfolipasaDα 1/2 (Agrisera AS12 2364)	1/1000
Secundario- Anti IgG (H+L) Rabbit conjugado a HRP (BioRad 170-6515)	1/2500

Detección de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

Detección de $O_2^{\cdot-}$ mediante el fluoroforo dihidroetidio (DHE)

DHE es un fluoroforo para la detección de especies reactivas del oxígeno, y es comúnmente usada para la detección del radical superóxido. La sonda difunde a través de la célula donde entra en contacto con el $O_2^{\cdot-}$ produciendo oxyetidio que es el compuesto que fluoresce (Zhao et al., 2003).

La plántula entera de Arabidopsis se incubó según Chaki et al., 2009 con 10 μ M DHE en buffer 10mM Tris-HCl pH 7.4 durante 30min a 37°C en oscuridad. Se visualizó la fluorescencia de la sonda en un microscopio confocal ó de epifluorescencia a una longitud de onda de excitación de 488nm y de emisión a 520nm. Para las muestras de parte aérea se utilizaron filtros en el microscopio confocal para evitar la fluorescencia de las clorofilas a y b de excitación 429nm y 450nm, y emisión 650nm y 670nm respectivamente.

Detección de $\cdot NO$ mediante el fluoroforo 4,5-diaminofluoresceína de diacetato (DAF-2DA)

DAF-2DA es un fluoróforo que detecta el óxido nítrico. Las membranas plasmáticas son permeables a este fluoróforo, pero tiene la particularidad de que un enzima intracelular, una estearasa, criba la sonda volviendo la membrana impermeable a esta. Cuando la sonda reacciona con $\cdot NO$ genera un producto fluorescente llamado bentriazol el cual se mide para cuantificar los niveles de $\cdot NO$ (Kojima et al., 1998).

La plántula entera de Arabidopsis se incubó según Corpas et al., 2008 con 10 μ M DAF-2DA en 10mM de Tris-HCl pH 7.4 durante 60min a 25°C en oscuridad. Se visualizó la fluorescencia de la sonda en un microscopio confocal ó de epifluorescencia a una longitud de onda de excitación de 495nm y de emisión a 515nm. Se utilizaron filtros en el microscopio confocal para evitar la fluorescencia de las clorofilas a y b de excitación 429nm y 450nm, y emisión 650nm y 670nm respectivamente en las muestras de parte aérea.

Detección de NADPH oxidasa en geles de actividad

Este ensayo detecta –de forma cualitativa- la actividad de la enzima NADPH oxidasa dependiente de O_2 en un gel de Poliacrilamida nativo según el método

de reducción del NBT (López-Huertas et al., 1999). Se realizó una extracción de proteínas totales y posteriormente se corrió 10µg de estas en una electroforesis no desnaturante al 12.5% como fue descrito anteriormente. El gel se incubó en una solución que contiene 50mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2mM de NBT, 0.1mM MgCl₂ y 1mM de CaCl₂ durante 20min en oscuridad. Luego para visualizar las bandas se retiró la solución anterior y se agregó 0.5mM NADPH. Como control negativo se pre-incubó durante 10min un segundo gel en 50µM de difenilene de iodo (DPI) que inhibe la NADPH oxidasa.

Detección de la actividad enzimática de la NOX in vitro

La actividad NOX es desarrollada sobre extracciones de proteínas totales y se basa en la detección de la reducción de XTT (2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) por O₂⁻ (Able et al., 1998). La reacción se llevó a cabo por la mezcla de 0.5mM XTT, 10mM Tris-HCl (pH 7.4) y 100mg de proteínas aproximadamente. La reacción se inició tras el agregado de 20µM de NADPH a temperatura ambiente luego de 1min se midió la cinética enzimática a 470nm durante 90s en un espectrofotómetro UV-1603 SHIMADZU en cubetas de vidrio de 1cm de paso óptico. Se realizó la inhibición de la enzima como control agregando a la reacción 400µM de DPI.

Detección del estado redox intracelular

Como herramienta para el monitoreo de los cambios del estado redox *in vivo* se usó la medida de los espectros de excitación de las 35S::roGFPs expresadas dentro del genoma de Arabidopsis. Estas GFP modificadas se excitan diferencialmente dependiendo de su estado redox. Los espectros de excitación se generaron por un barrido entre [350-504nm] con una λ_{em} = 528nm en un lector de placa Varioskan Flash. Las medidas se realizaron sobre hojas pequeñas, 36 de plántulas 35S::roGFP y 36 de 35S::roGFP x *dry2/sqe1* los cuales se colocaron cada una en un pocillo de placas tipo ELISA con 200µl de agua_{mq} con la cara abaxial de la hoja hacia arriba. Se tomaron las medidas de cada pocillo. Luego se removió el agua_{mq} de los pocillos y se colocaron 200µl de H₂O₂ 100mM con el fin de medir la fluorescencia de la roGFP cuando está totalmente oxidada. Luego de tomadas las medidas se retiró el H₂O₂ y se lavó con abundante agua cada pocillo y se añadieron 200µl de DTT 50mM para la reducción completa de las roGFPs. Todas las medidas se tomaron con su respectivo blanco. Se midieron hojas de plantas en condiciones control y en estrés moderado por ausencia de riego durante 5 días. Para reportar el estado redox intracelular se utilizaron los ratios ($R_{IF400/480nm}$) que se obtienen por la división entre las intensidades de fluorescencia de excitación (IF) a 400 y 480nm.

Además se evaluaron raíces de plántulas con la construcción 35S::roGFP y 35S::roGFP x *dry2/sqe1* por microscopia de epifluorescencia. Las plántulas fueron crecidas en placas con MS con y sin 150mM de manitol para generar estrés osmótico durante 5 días.

Visualizaciones histológicas

Cámara termografía

La toma de fotografías térmicas se realizó con una cámara infrarroja FLIR modelo E50.

Microscopía confocal

Se usó un microscopio confocal Leica TCS SP5 del servicio brindado por la Unidad de Biología Celular del Instituto Pauster Montevideo.

Para la obtención de los datos espectrales de la emisión del LAURDAN se utilizó una aplicación de este microscopio llamada Microscopia confocal espectral. LAURDAN es una sonda fluorescente usada para medir efectos de relajación dipolares sobre membranas que está relacionado con el grado de penetración del agua en la bicapa (Weber and Farris, 1979). Este fluoroforo, es capaz de determinar el grado de fluidez de las membranas, cuando estas se encuentran empaquetadas, la sonda tiene un máximo de emisión a 440nm, en cambio cuando se encuentran en fase desordenada o fluida su emisión es de 490nm (Golfetto et al., 2015). La aplicación de la transformación de Fourier a los espectros de emisión de LAURDAN otorga una nueva dimensión al análisis de los resultados, en donde es posible ver cómo los corrimientos espectrales y los cambios en la heterogeneidad en la emisión pueden ser discriminados en un gráfico, denominado fador espectral (SP, según las siglas en inglés) (Golfetto et al., 2015). Actualmente es posible generar combinaciones espectrales en los píxeles de una imagen dadas por emisión de LAURDAN. En este trabajo los SP de LAURDAN se generaron usando un total de 32 canales (de ancho de banda de 9.78nm) de longitudes de onda de emisión en el rango de 416-728nm.

Por otro lado usamos otra sonda fluorescente sensible a la polaridad del solvente llamada Rojo nilo (RN). Los datos espectrales del RN se generaron también usando un total de 32 canales, con longitudes de emisión en el rango del azul a 780nm (asociado a membranas líquido desordenadas) al rojo en 555nm (asociado a membranas líquido ordenadas).

Para la detección de las construcciones de 35S::roGFP se usó microscopio de epifluorescencia marca Olympus-New Vanox con filtros de excitación entre 450-490nm y la emisión a 515nm.

Herramientas informáticas

Las secuencias de ADN para el diseño de primers se extrajeron de la base de datos online de Arabidopsis: TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

Para el diseño de primers se utilizó el programa Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Para evaluar la calidad de los primers se utilizó la herramienta OligoAnalyzer que brinda la

página de Integrated DNA Technologies, (IDT según sus siglas en inglés) (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Análisis informáticos de software libre para el tratamiento gráfico y estadístico de datos: Excel e InfoStat estudiantil (<http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>) respectivamente.

Para el tratamiento de imágenes en la cuantificación de la intensidad de señal de fluoróforos en microscopias confocales, se usó la herramienta de intensidad de señal (IntDen) que registra la sumatoria de intensidad de cada pixel en un área seleccionada del software libre Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Para el tratamiento de imágenes infrarrojas para la cuantificación de áreas térmicas sobre las fotografías generadas por la cámara infrarroja FLIR se utilizó el software libre FLIR tools (<http://www.flir.com/cs/emea/es/view/?id=52662>).

Para la obtención de los fasores espectrales se usó el Software SimFCS 3.0, servicio proporcionado por el Laboratorio de Fisiopatología del Hospital de Clínicas.

Resultados

Respuestas a sequía en el mutante *dry2/sqe1*

El mutante *dry2/sqe1* hipersensible a sequía, presenta alteraciones en el contenido de esteroides en raíz y en las respuestas fisiológicas y bioquímicas asociadas a estrés abiótico (Posé et al., 2009; Doblás et al., 2013). Estas características hacen de *dry2/sqe1* un modelo interesante para estudiar el posible rol de los esteroides en las respuestas a sequía. Durante el desarrollo de esta tesis se pretendió evaluar si los cambios en las respuestas fisiológicas y bioquímicas generados por la mutación en *SQE1* son similares y/o comparables a la forma en que las plantas de *Arabidopsis* salvajes responden frente al déficit hídrico. En este sentido nos planteamos dos escenarios posibles: uno donde la mutación en *SQE1* impide el normal control de la pérdida de agua y esto es lo que desencadena las respuestas a estrés descritas para *dry2/sqe1*; u otro en que la mutación en *SQE1*, una vez que las células se deshidratan, impide una correcta y ordenada respuesta a estrés y esta incapacidad es la desencadenante del fenotipo hipersensible (**Fig. 8**). Para tratar de explicar los posibles escenarios realizamos experimentos que apuntan a estudiar las respuestas conocidas a estrés: apertura estomática, niveles de prolina, evaluación del estado redox intracelular. Y por otro lado, para entender la relación que existe entre la respuesta a estrés observada y la composición alterada de esteroides del mutante, estudiamos la abundancia y actividad de proteínas de membrana asociadas a microdominios lipídicos enriquecidos en esteroides, también la localización de proteínas de tonoplasto y endosomas y por último la fluidez de las membranas celulares. Los resultados obtenidos en estos experimentos se describen a continuación.

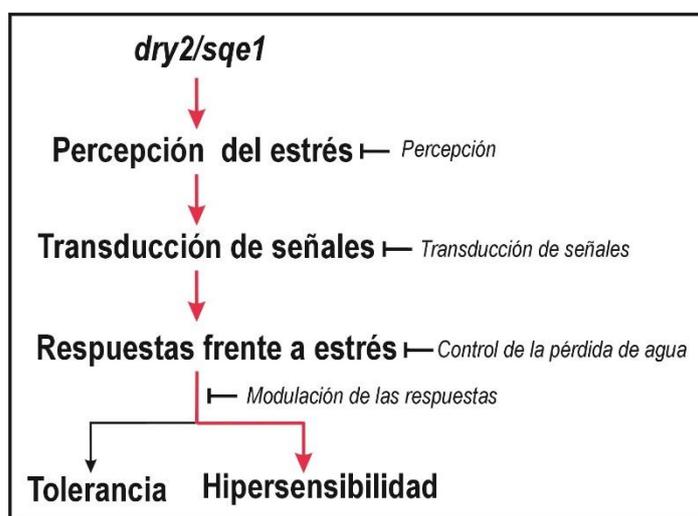


Figura 8: Modelo propuesto para explicar cómo se genera la hipersensibilidad al déficit hídrico en el mutante *dry2/sqe1*. El modelo representa como la *sqe1* puede estar bloqueando algún nivel entre la percepción y la generación de las respuestas a estrés. En este contexto *dry2/sqe1* puede estar impidiendo la percepción del estrés, o generar una alteración en los mecanismos de traducción de señales. Los dos escenarios que proponemos en el texto son consecuencias de estos. Uno en donde

sqe1 bloquea el control de la pérdida de agua y esta desencadena las respuestas y/o otro donde *sqe1* impide el correcto desencadenamiento de las respuestas a estrés y esto generara la hipersensibilidad.

Apertura estomática

El cierre estomático es un fenómeno fundamental para la regulación del balance hídrico de la planta en episodios de sequía. Los principales objetivos del cierre de los estomas son la disminución de la tasa transpiratoria y en consecuencia del agua consumida por la planta son (Nadeau and Sack, 2002). Debido a la imposibilidad de determinar la conductancia estomática directa por problemas metodológicos se utilizó la temperatura foliar como parámetro indicativo indirecto de la transpiración de la planta. En la Figura 9 se observa el perfil térmico entre plantas *Ler* y *dry2/sqe1* crecidas durante 48 días (ver procedimiento experimental en materiales y métodos **Fig. 6**) en maceta en diferentes condiciones de riego. Asumimos que la temperatura foliar está asociada con la apertura estomática, los estomas abiertos generan la pérdida de agua que enfría la hoja y los estomas cerrados impiden dicha pérdida por lo que la temperatura foliar se incrementa. En plantas salvajes (*Ler*) la temperatura foliar comienza a aumentar a medida que los días de sequía incrementan, llegando el máximo (24.5°C) a los 10 días de impuesta la sequía (**Fig. 9**, línea negra). Por otro lado la temperatura foliar del mutante *dry2/sqe1* en condiciones control de riego (0 día), es mayor que *Ler*, lo que sugiere que el mutante tiene los estomas más cerrados que el salvaje. Luego de 5 días de impuesta la sequía, la temperatura foliar de *dry2/sqe1* disminuye y curiosamente es significativamente menor a la del salvaje en las mismas condiciones (**Fig. 9**, línea gris). En resumen, las plantas salvajes sensan la situación de sequía y responden cerrando los estomas, lo que aumenta la temperatura foliar, en cambio el mutante *dry2/sqe1* no puede cerrar los estomas, de la misma forma que lo sugiere (Posé et al., 2009) lo que desencadena la pérdida de agua por los estomas durante el episodio de sequía, lo que explicaría la disminución en la temperatura foliar observada.

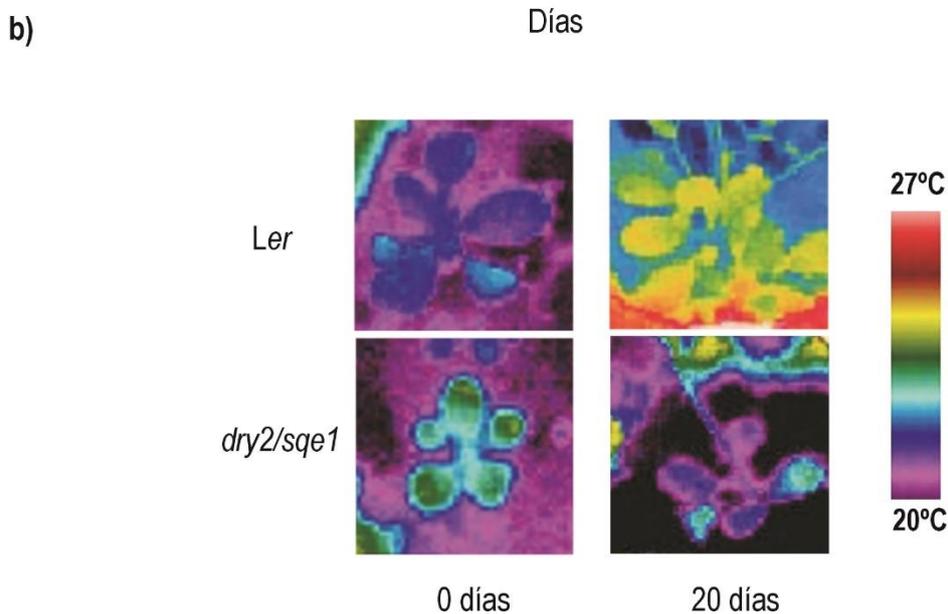
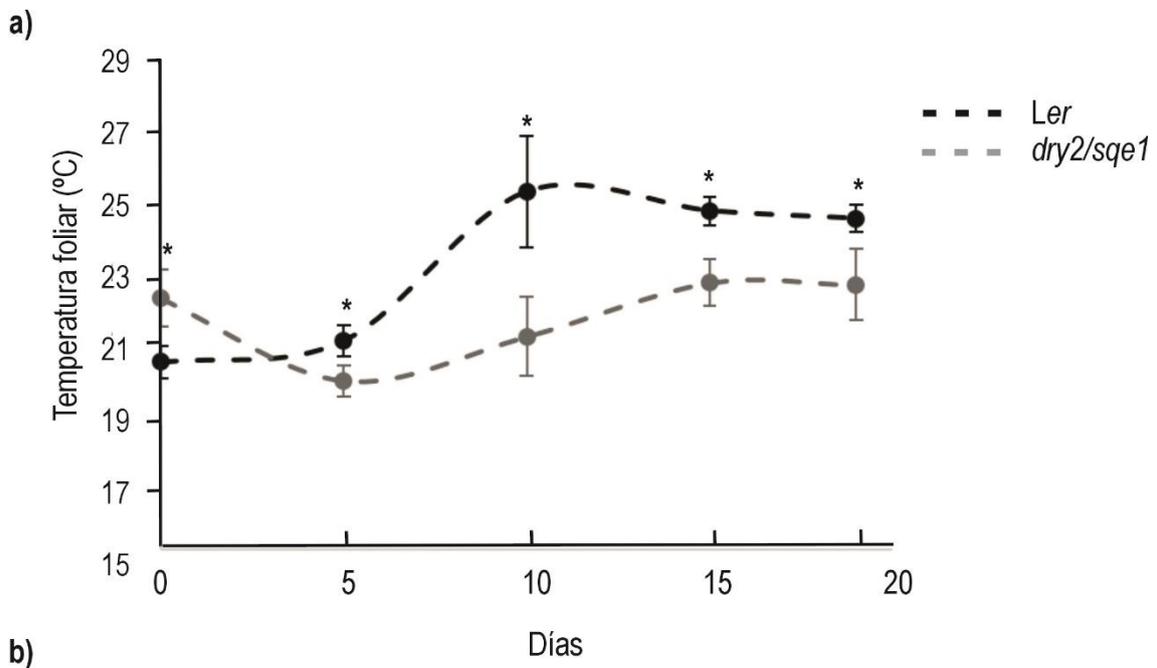


Figura 9: Evolución de la temperatura foliar de Ler y dry2/sqe1 durante 19 días de sequía. a) Plantas Ler y dry2/sqe1, crecidas en macetas mediante la metodología experimental de la Figura 6, se les registró el perfil térmico a los 0, 5, 10, 15 y 19 días de imponer la sequía. Las medidas se llevaron a cabo a través de una cámara termográfica (FLIR) que registra la radiación infrarroja. Mediante el software informático *FLIR tools* se obtuvieron las temperaturas medias de cada tratamiento. Se graficaron los promedios de la temperatura foliar y el desvío estándar en función de los días de sequía. Los * representan aquellas temperaturas que son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$ según el test de Tuckey). $n=16$. b) Fotografías térmicas representativas del análisis en a), al inicio del ensayo (día 0) y al final (día 20). El código de colores se representa en la barra de la derecha, siendo el extremo inferior el violeta con temperaturas de 20°C y el extremo superior, de color rojo con temperaturas de 30°C.

Acumulación de prolina

La prolina (Pro) es un osmolito compatible muy conocido en células vegetales y aunque su función es muy discutida su acumulación está ampliamente comprobada en episodios de sequía (Borsani et al., 1999; Díaz et al., 2005; Signorelli et al., 2013). Los niveles de prolina intracelulares incrementan significativamente inmediatamente que la planta comienza a sentir el estrés (Yoshiba et al., 1997). Resultados anteriores (**Fig. 9**) evidenciaron que la sequía genera en plantas salvajes una respuesta fisiológica asociada al cierre estomático, visualizado a través del aumento de la temperatura foliar. En cambio, el mutante *dry2/sqe1* mantiene una menor temperatura foliar luego de 5 días de sequía (**Fig. 9**), esta respuesta diferencial del mutante frente a la condición de estrés puede ser explicada por una incapacidad de sentir dicho estrés o por problemas en el mecanismo de cierre de los estomas. Una forma indirecta de evaluar si el mutante es capaz de sentir la situación de sequía es a través de la medida de un marcador de estrés ya conocido, como la prolina. En la Tabla 6 se observa que las plantas salvajes no presentan variaciones en el contenido de prolina en condiciones de riego normal. Sin embargo, acumulan niveles más altos en situación de sequía, observándose un pico de acumulación a partir del décimo día de impuesta la sequía. Contrariamente, el mutante *dry2/sqe1* presenta niveles de prolina más altos que *Ler* en condiciones de riego normal e incrementa estos niveles durante los 5 días de impuesta la sequía (**Tabla 6**). Estos resultados se corresponden con los diversos trabajos que proponen que la prolina se acumula en respuesta al estrés hídrico desde (Barnett and Naylor, 1966) hasta la actualidad (Abdelgawad et al., 2015; Reddy et al., 2015; Saibi et al., 2015).

Tabla 6: Niveles de prolina en plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* bajo condiciones de déficit hídrico. El riego representa plantas que fueron regadas durante todo el ensayo para cada genotipo, y el sin riego representa las plantas sometidas al episodio de sequía. Según el análisis estadístico las letras diferentes indican valores significativamente diferentes, comparando entre los tratamientos hídricos dentro de cada genotipo ($p \leq 0.05$, según Tuckey). $n=16$.

Niveles de Pro [$\mu\text{g}/\text{mg PS}$]				
	<i>Ler</i>		<i>dry2/sqe1</i>	
Días	Riego	Sin riego	Riego	Sin riego
5	0.014 \pm 0.004 a	0.073 \pm 0.03 a	0.198 \pm 0.014 a	0.703 \pm 0.124 b
10	0.024 \pm 0.007 a	0.070 \pm 0.019 a	0.238 \pm 0.041 a	1.003 \pm 0.333 b
15	0.021 \pm 0.012 a	0.354 \pm 0.195 b	0.148 \pm 0.022 a	1.1 \pm 0.212 b
19	0.012 \pm 0.006 a	0.355 \pm 0.144 b	0.227 \pm 0.021 a	1.230 \pm 0.276 b

En resumen, el mutante tiene mayores cantidades de prolina en condiciones control que las plantas salvajes y responde frente a la sequía incrementando los niveles de manera más temprana. Estos datos sugieren que el mutante, a pesar de presentar niveles elevados de prolina en condiciones de riego, tiene la capacidad de sensar el estrés hídrico y responder incrementando su síntesis.

Evaluación del estado redox intracelular

Factores abióticos desfavorables, como la sequía, perturban el equilibrio metabólico de las células, lo que lleva a la sobreproducción de ROS y RNS, especies altamente reactivas y tóxicas que causan daño celular tanto a nivel de proteínas, lípidos, carbohidratos como al ADN (Greene, 2002; Apel and Hirt, 2004). La pérdida del equilibrio entre la producción y eliminación de ROS celular conduce a la pérdida de la homeostasis redox llamada estado de "estrés oxidativo" (Huang et al., 2012).

Posé et al., 2009 sugirieron que el fenotipo de hipersensibilidad a la sequía de *dry2/sqe1* podía deberse a la sobreexpresión de ciertos genes que se encuentran implicados en las respuestas a estrés. Por ejemplo el gen *ABA2* asociado a la biosíntesis de la fitohormona ABA y al cierre estomático; así como genes de respuesta a estrés asociados al metabolismo oxidativo, tanto los productores de especies reactivas y a la maquinaria antioxidante como por ejemplo *CAT2* y *CAT3* que codifican para catalasas, enzimas asociadas al catabolismo de peróxido de hidrogeno; así como *AtrbohB* y *AtrbohF* vinculados a la producción de radicales superóxido. En relación a la defensa antioxidante se encontraron alteradas superóxido dismutasas como *CSD1* y *CCS1* que dismutan el radical superóxido como manera de eliminar estos radicales produciendo peróxido de hidrogeno.

En esta tesis, para entender si los cambios en las respuestas fisiológicas y bioquímicas generados por la mutación en *SQE1* son similares y/o comparables a la forma en que las plantas de *Arabidopsis* salvajes responden frente al déficit hídrico se evaluó el estado redox celular y los niveles de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno en el citosol.

La homeostasis redox citosólica esta alterada en dry2/sqe1

Los cambios en el estado redox celular influyen en una gran cantidad de funciones celulares (Geigenberger and Fernie, 2014). La proteína verde fluorescente sensible a cambios de reducción/oxidación (roGFP) con expresión en el citosol permite la visualización en tiempo real del estado redox celular de forma no invasiva (Dooley et al., 2004). Esta roGFP fue expresada en el genoma de *Arabidopsis* de forma estable bajo el promotor 35S (Jiang et al., 2006). Dicha proteína presenta dos mutaciones generadas por la incorporación de dos cisteínas expuestas en la superficie en las posiciones 147 y 204 adyacentes al grupo cromóforo. La formación de enlaces disulfuros entre los residuos de cisteína promueve la protonación del cromóforo y aumenta el pico

del espectro de excitación cerca de 400nm a expensas del pico cerca de 480nm. La fluorescencia de excitación a 400 y 480nm indican el grado de oxidación y por lo tanto el potencial redox (Dooley et al., 2004). Ambas formas de roGFP pueden reversiblemente ser tanto reducidas con Ditiotreitól (DTT) como oxidada con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) permitiendo ver en tiempo real cambios *in vivo* (Hanson et al., 2004). Se asume una alta intensidad de fluorescencia con estados redox citosólicos oxidados (Jiang et al., 2006).

Para cuantificar el efecto del estrés sobre el estado redox celular, se observaron raíces 35S::roGFP y 35S::roGFP x *dry2/sqe1* por microscopía de epifluorescencia en condiciones control y en estrés osmótico generado por crecimiento de las plantas en medio MS con 150mM de manitol. Tanto para Ler como para *dry2/sqe1* el tratamiento con manitol generó un aumento significativo en la señal de la roGFP (**Fig. 10a y b**). Por otro lado en condiciones control, se detectaron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre Ler y *dry2/sqe1* en raíces donde *dry2/sqe1* presentó mayor intensidad de fluorescencia que el salvaje. En las condiciones de estrés osmótico generadas, también se observó un incremento significativo en la señal de roGFP en raíces de *dry2/sqe1* (**Fig.10b**).

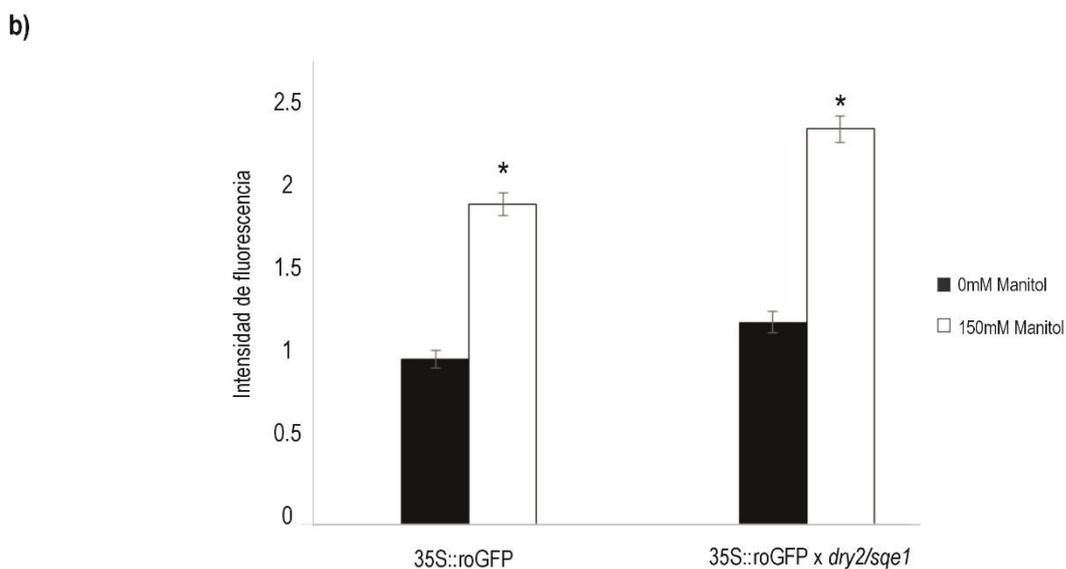
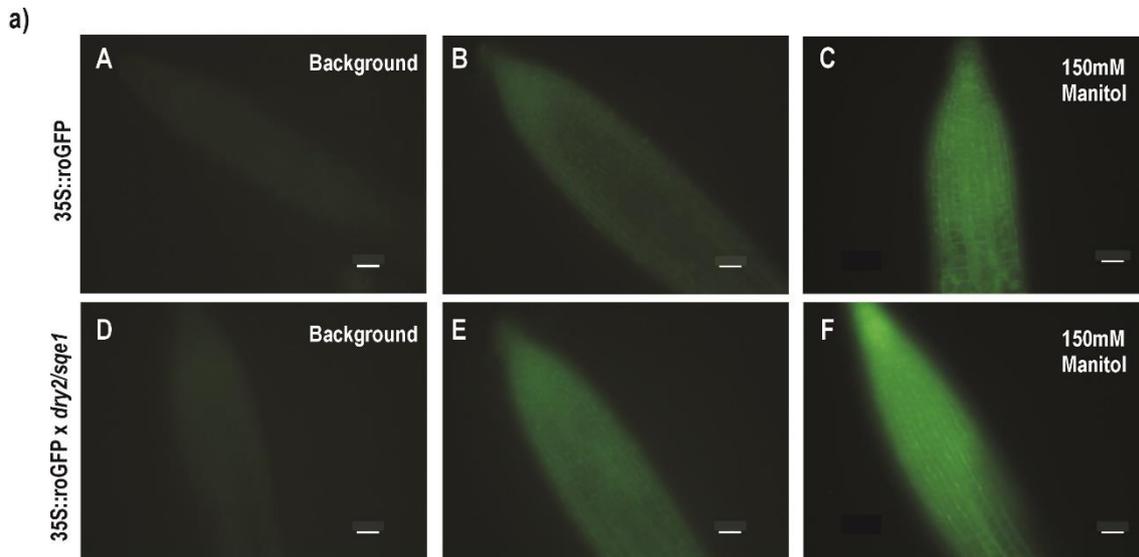


Figura 10: Estado redox citosólico de raíces de *Ler* y *dry2/sqe1* mediante la excitación de roGFP evidencia que *dry2/sqe1* está más oxidado. a) Raíces 35S::roGFP y 35S::roGFP x *dry2/sqe1* de 10 días crecidas en MS sin y con 150mM de manitol y visualizadas en un microscopio de epifluorescencia. La señal que se detecta es la excitación de la roGFP. El background representa el control negativo, plántulas sin la construcción 35S::roGFP. Las barras representan 2 μ M. b) Cuantificación de la intensidad de señal de roGFP en la figura a) Los datos fueron normalizados, expresados como veces de incremento de la señal con respecto al control 35S::roGFP en 0mM de manitol. Los * indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$, según Tuckey). n=3.

Por otro lado, se repitió el experimento pero en condiciones de déficit hídrico. Se utilizaron hojas de plantas salvajes y mutantes que expresan la roGFP (35S::roGFP y 35S::roGFP x *dry2/sqe1* respectivamente) para calcular los radios de fluorescencia de excitación de la roGFP. En la Figura 12 se muestra que en condiciones de riego las plantas salvajes que expresan 35S::roGFP presentaron menor radio ($R_{IF400/480nm}=2.3$) que las plantas 35S::roGFP x *dry2/sqe1* ($R_{IF400/480nm}=3.7$) evidenciando que el estado redox del mutante

dry2/sqe1 parece estar más oxidado que *Ler*. Cuando las plantas se sometieron a sequía, se obtuvo el mismo comportamiento donde 35S::roGFP presentó un ratio menor ($R_{IF400/480nm}=2.9$) que 35S::roGFP x *dry2/sqe1* ($R_{IF400/480nm}=4.1$), si bien estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Fig. 11).

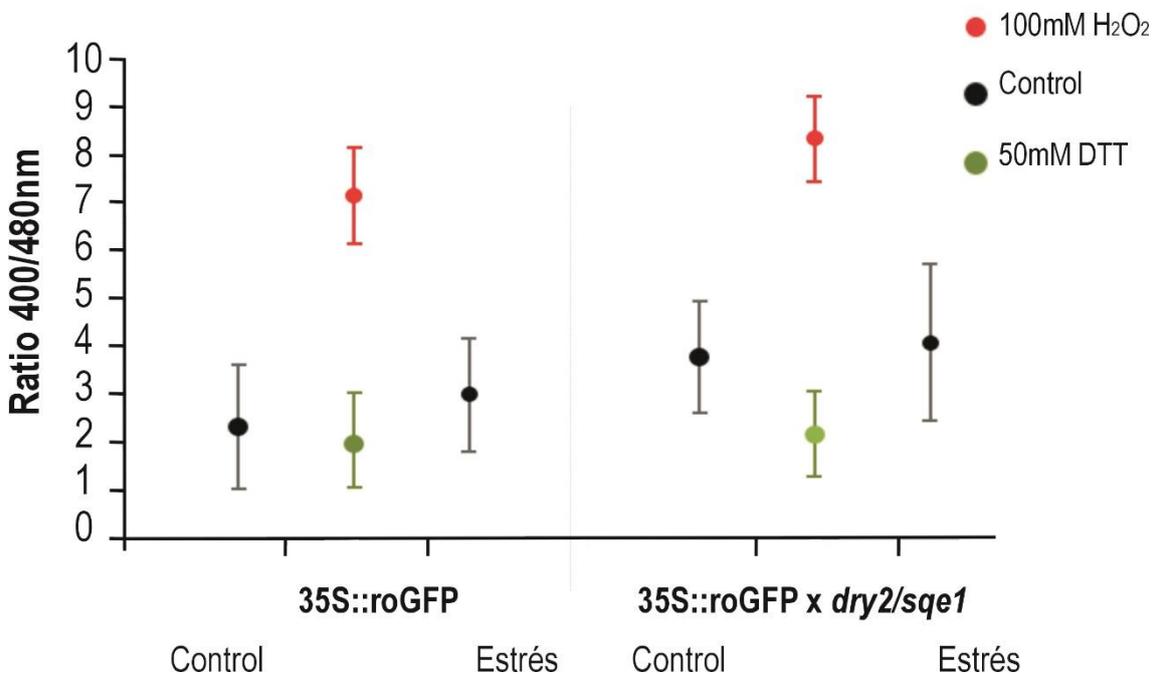


Figura 11: Estado redox citosólico de *Ler* y *dry2/sqe1* en condiciones control y sequía. Ratios generados por la $IF_{ex400/480nm}$ a λ_{em} 428nm en hojas con la construcción de roGFP en plantas crecidas en maceta durante 30 días con y sin riego, por suspensión del riego durante 5 días. La fluorescencia fue medida en un lector de fluorescencia de placa (Varioskan Flash), $n=20$. En color rojo se representa el máximo de oxidación (100mM H₂O₂) y en verde el máximo de reducción (50mM DTT).

Acumulación de ROS y RNS como repuestas de hipersensibilidad a sequía

Las especies reactivas del oxígeno, principalmente, han sido propuestas desde hace décadas como componentes centrales en la adaptación de las plantas frente al estrés hídrico. La sequía induce la inhibición de la fotosíntesis e incrementa los niveles de ROS producidas por los cloroplastos, este ambiente celular desencadena los primeros mecanismos que producen el estrés oxidativo, una de las respuestas a estrés por sequía más estudiados en los últimos años (Smirnoff, 1993; Dat et al., 2000; Lee and Park, 2012; Kocsy et al., 2013; Signorelli et al., 2013).

Durante el estrés oxidativo el equilibrio redox de las células se ve perturbado por el aumento en la tasa de generación ROS tales como el anión $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 que es mayor que la eliminación de estas especies por los sistemas antioxidantes enzimáticos o no-enzimáticos (Mittler, 2002). Por otro lado

recientemente se encontró que las especies reactivas del nitrógeno contribuyen en alterar el metabolismo nitrosativo (Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2011). Las funciones celulares son alteradas durante el estrés oxidativo generado por el incremento de estas especies no sólo debido al daño oxidativo per se, sino también porque las ROS y RNS son importantes moléculas de señalización (Neill et al., 2008).

La idea de que la mutación a nivel de *SQE1* genera hipersensibilidad a sequía por alteración del estado redox intracelular evaluado por *roGFP* (**Fig. 10 y 11**) permite especular con el posible aumento de ROS y RNS. Para detectar ROS y RNS se usaron sondas fluorescentes *in vivo*.

Las Figuras 12 y 13 muestran la localización de la sonda DHE, que se asocia con niveles de especies reactivas del oxígeno en especial en el O₂, en hojas y raíces de plántulas de *Ler* y *dry2sqe1* respectivamente. En hojas de *Ler* la señal se localizó en las membranas de las células epidérmicas (**Fig. 12a A-D**) en condiciones control, observándose un incremento de la señal de 2.15 veces luego del tratamiento con manitol (**Fig. 12a E-H y 12b**). En hojas de *dry2/sqe1* la señal se localizó en el citoplasma de las células epidérmicas en condiciones control (**Fig. 13a A-D**), observándose un incremento de la señal de 6.5 veces luego del tratamiento con manitol (**Fig. 13a E-H y 13b**). En raíces de *Ler*, en situación control, se observó que la señal está restringida al ápice donde se encuentran las regiones meristemáticas activas (**Fig.12a I-L**). Luego de sometido el estrés osmótico, la señal se extiende a otras zonas de la raíz y se incrementa 13.4 veces (**Fig. 12a M-P y 12b**). Sin embargo, las raíces de *dry2/sqe1* tienen en condiciones control más intensidad de señal, así como una distribución más extendida de la misma en comparación con las raíces de *Ler* (**Fig. 13a I-L**). Luego del tratamiento con manitol, se ve un incremento de la intensidad de señal, aproximadamente 1.9 veces, pero de menor magnitud que en *Ler* (**Fig. 13a M-P y 13b**). Cabe destacar que el estrés impuesto generó un incremento de ROS mayor en raíces que en hojas de plantas salvajes y que este incremento no es tan acentuado en *dry2/sqe1*.

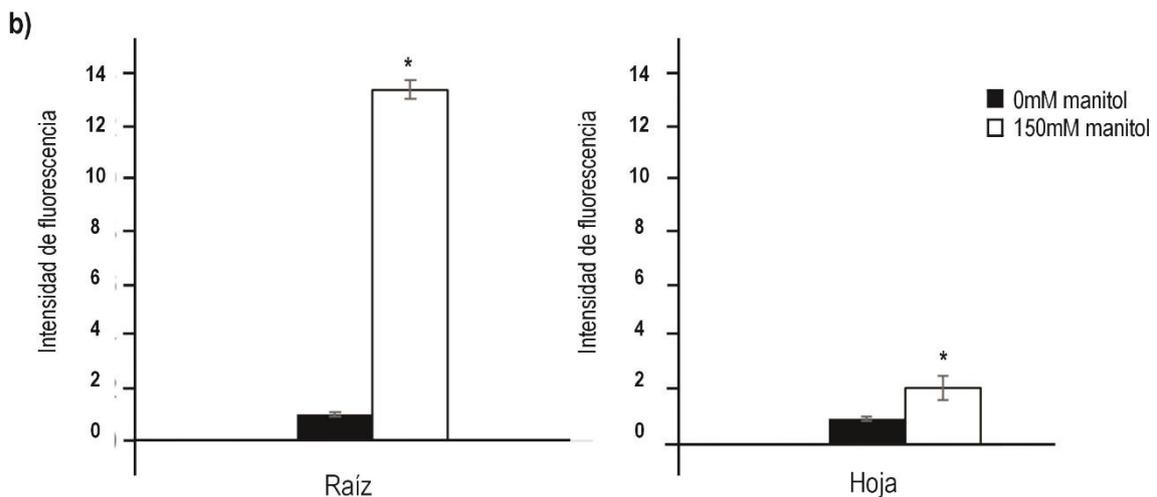
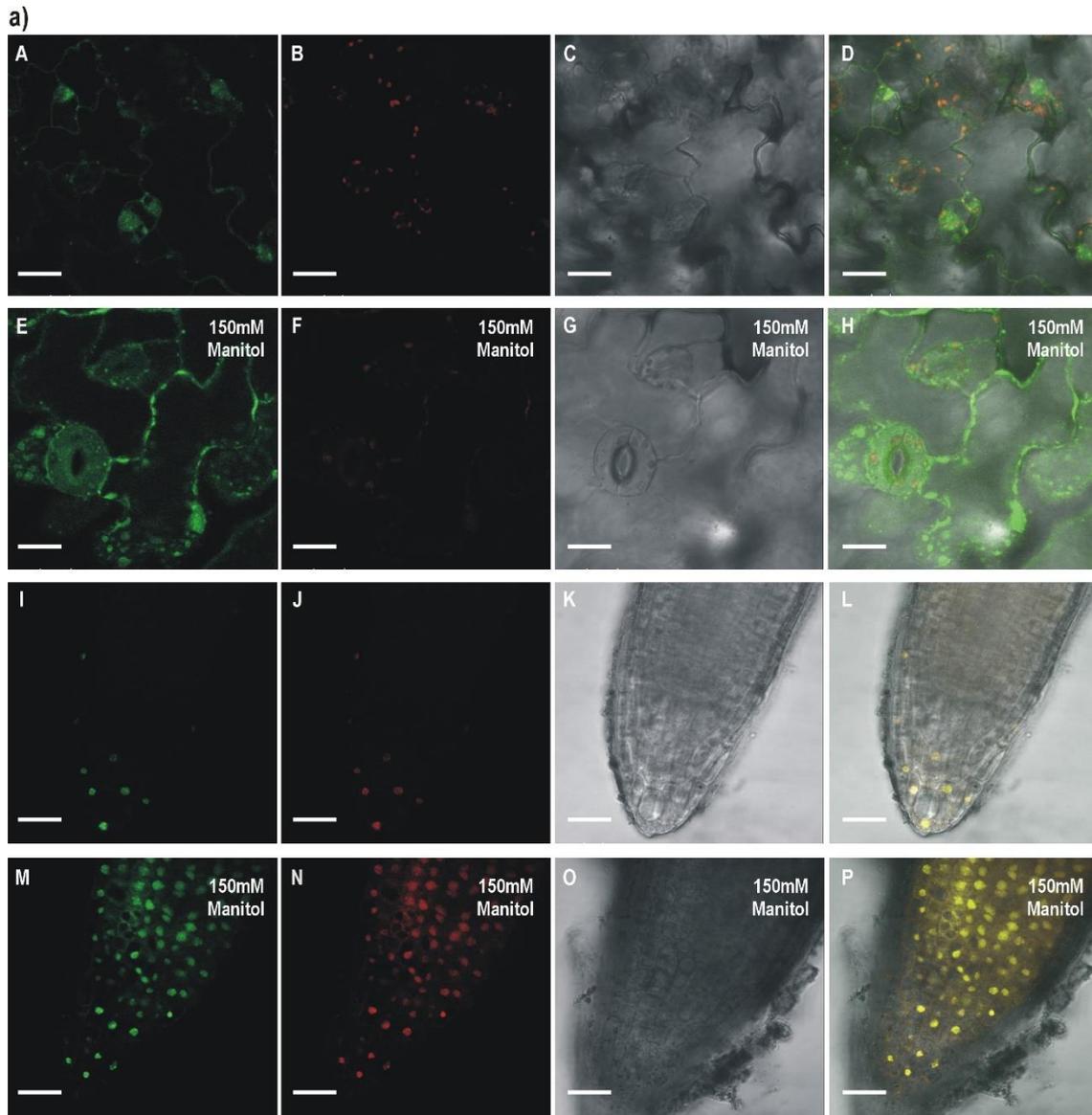
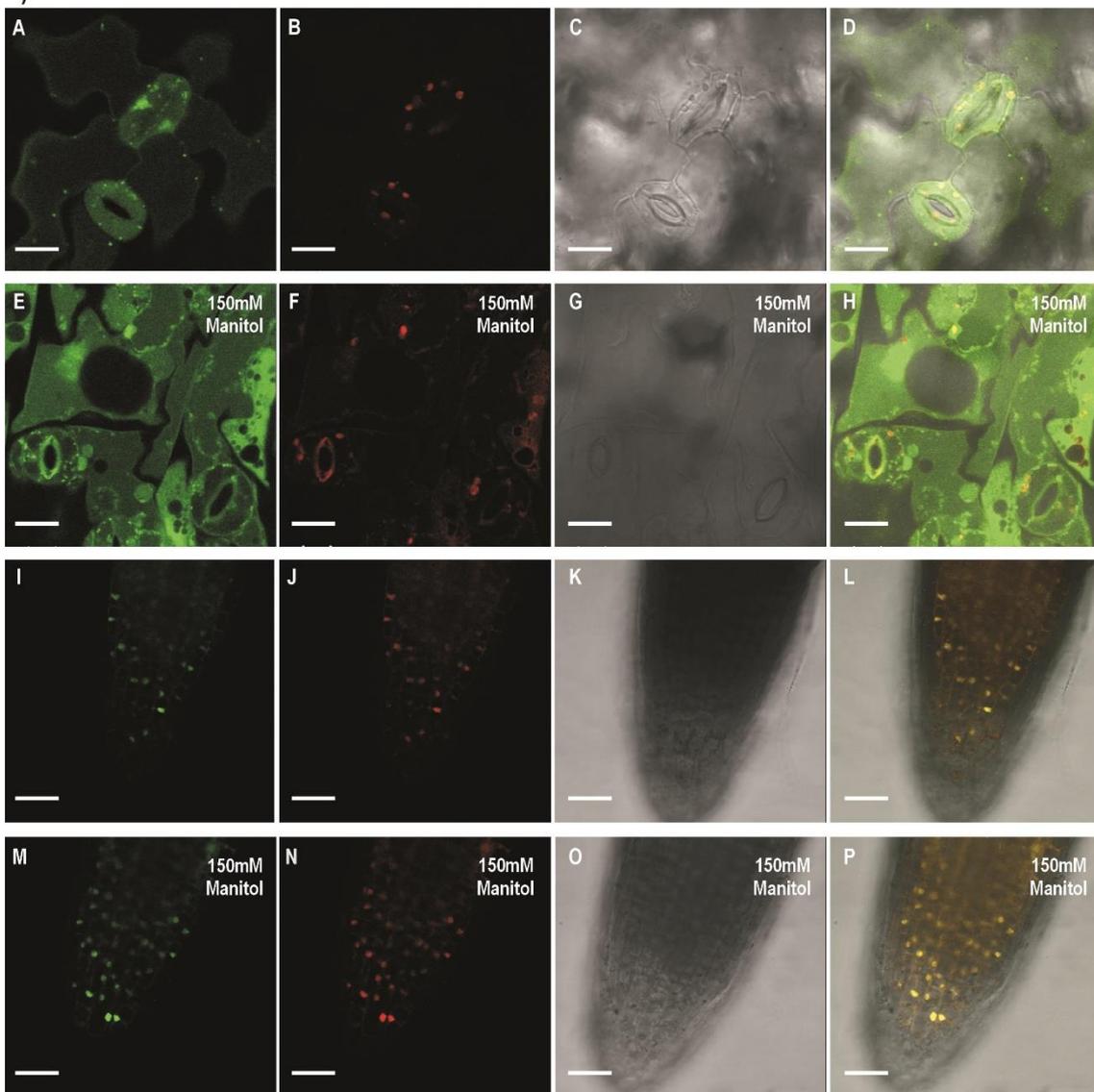


Figura 12: Detección de niveles de ROS en hojas y raíces de Ler en respuesta a estrés osmótico. Plántulas Ler crecidas *in vitro* en medio MS por 10 días en condiciones control y en 150mM de manitol. **a)** La detección de ROS se realizó incubando plántulas enteras en 10 μ M de DHE y midiendo la señal generada por CLSM. A-D representa la parte aérea de Ler en condición control, y E-H en

tratamientos con 150mM de manitol. Por otro lado I-L representa la raíz de Ler en condiciones control mientras que en M-P en 150mM de manitol. Las condiciones de visualización fueron: excitación de la sonda a $\lambda_{ex}=514\text{nm}$ y emisión entre $\lambda_{em}= 607\text{-}653\text{nm}$ (A-E-I-M), excitación de las clorofilas fue $\lambda_{ex}= 543\text{nm}$ y la emisión $655\text{-}731\text{nm}$ (B-F-J-N), este rango se solapa además de con las clorofilas con la emisión de la sonda. Se visualizaron los campos claros (C-G-K-O). Y por último se representa el *merge* (D-H-L-P). $n=10$. Las barras representan $10\mu\text{m}$. **b)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las microscopias en **a)**. Los datos normalizados fueron expresados como veces de incremento con respecto al control (Ler en 0mM manitol). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tuckey ($P < 0,05$), $n = 3$.

a)



b)

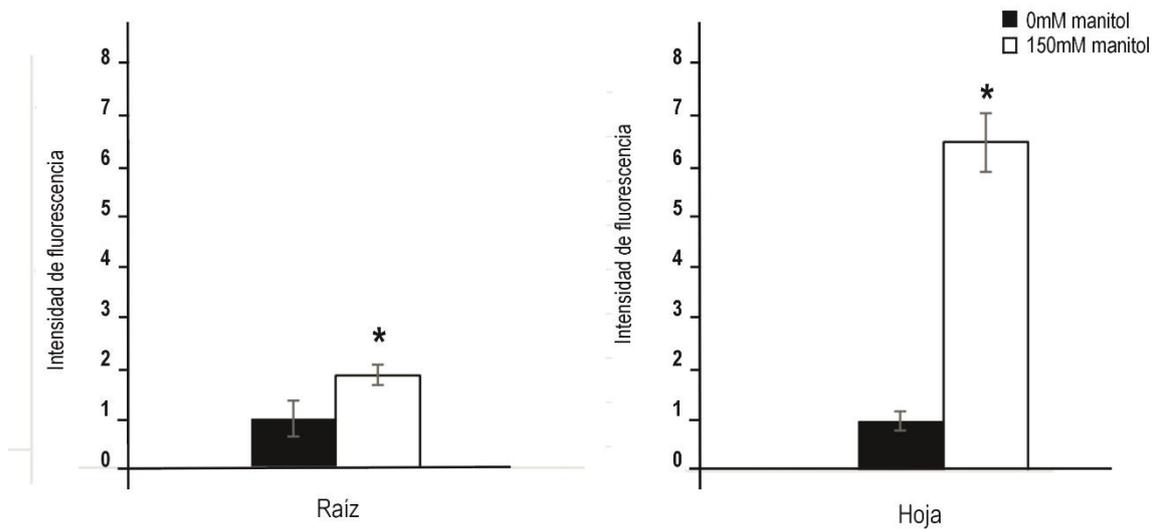


Figura 13: Detección de niveles de ROS en hojas y raíces de *dry2/sqe1* en respuesta a estrés osmótico. Plántulas *dry2/sqe1* crecidas *in vitro* en medio MS por 10 días en condiciones control y en 150mM de manitol. **a)** La detección de ROS se realizó incubando plántulas enteras en 10 μ M de DHE y midiendo la señal generada por CLSM. A-D representa la parte aérea de *dry2/sqe1* en condición control, y E-H en tratamientos con 150mM de manitol. Por otro lado I-L se representa la raíz de *dry2/sqe1* en condiciones control mientras que en M-P en 150mM de manitol. Las condiciones de visualización fueron: excitación de la sonda a λ_{ex} =514nm y emisión entre λ_{em} = 607-653nm (A-E-I-M), excitación de las clorofilas fue λ_{ex} = 543nm y la emisión 655-731nm (B-F-J-N), este rango se solapa además de con las clorofilas con la emisión de la sonda. Se visualizaron los campos claros (C-G-K-O). Y por último se representa el *merge* (D-H-L-P). n=10. Las barras representan 10 μ m. **b)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las microscopías en **a**. Los datos normalizados fueron expresados como veces de incremento con respecto al control (*dry2/sqe1* en 0mM manitol). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tuckey (P <0,05), n = 3.

Por otro lado, la detección con el fluoróforo DA-DAF se asocia al contenido de RNS, específicamente a $\cdot\text{NO}$. En hojas de *Ler* (**Fig.14a A-D**) y *dry2/sqe1* (**Fig. 15a A-D**) en condiciones control, la señal de la sonda se localizó dentro de las células oclusivas de los estomas. En hojas de ambos genotipos sometidas a estrés osmótico no se observaron cambios significativos en el incremento del nivel de $\cdot\text{NO}$ con respecto a la situación control (**Fig.14b y 15b**). Sin embargo, es curioso que *dry2/sqe1* presenta 9 y 12 veces más señal en condición control y de estrés osmótico, respectivamente, si lo comparamos con *Ler*.

La señal de esta sonda en raíces tanto de *Ler* como *dry2/sqe1*, está distribuida homogéneamente a lo largo de la raíz, y solo *dry2/sqe1* incrementa significativamente los niveles de $\cdot\text{NO}$ en este órgano tras el tratamiento con 150mM de manitol (**Fig. 14b y 15b**).

Para complementar los ensayo *in vivo*, donde los niveles de $\cdot\text{NO}$ en *dry2/sqe1* fueron claramente superiores que en las plantas salvajes se evaluaron los niveles *in vitro* de $\cdot\text{NO}$, confirmándose la observación de los ensayos *in vivo*, donde el mutante *dry2/sqe1* presenta significativamente mayores niveles de $\cdot\text{NO}$ que *Ler*, en condiciones control (**Fig. 16**).

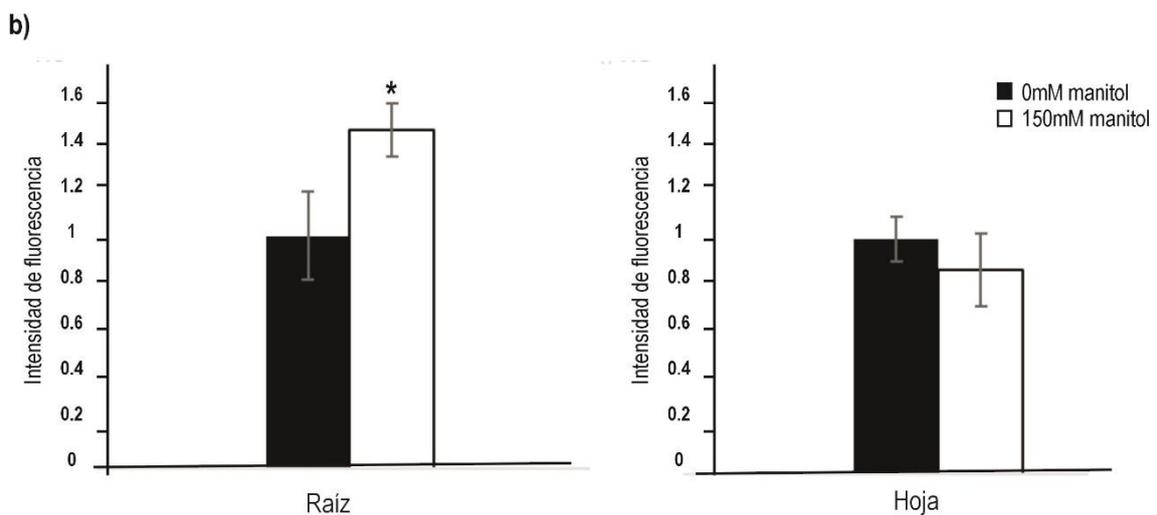
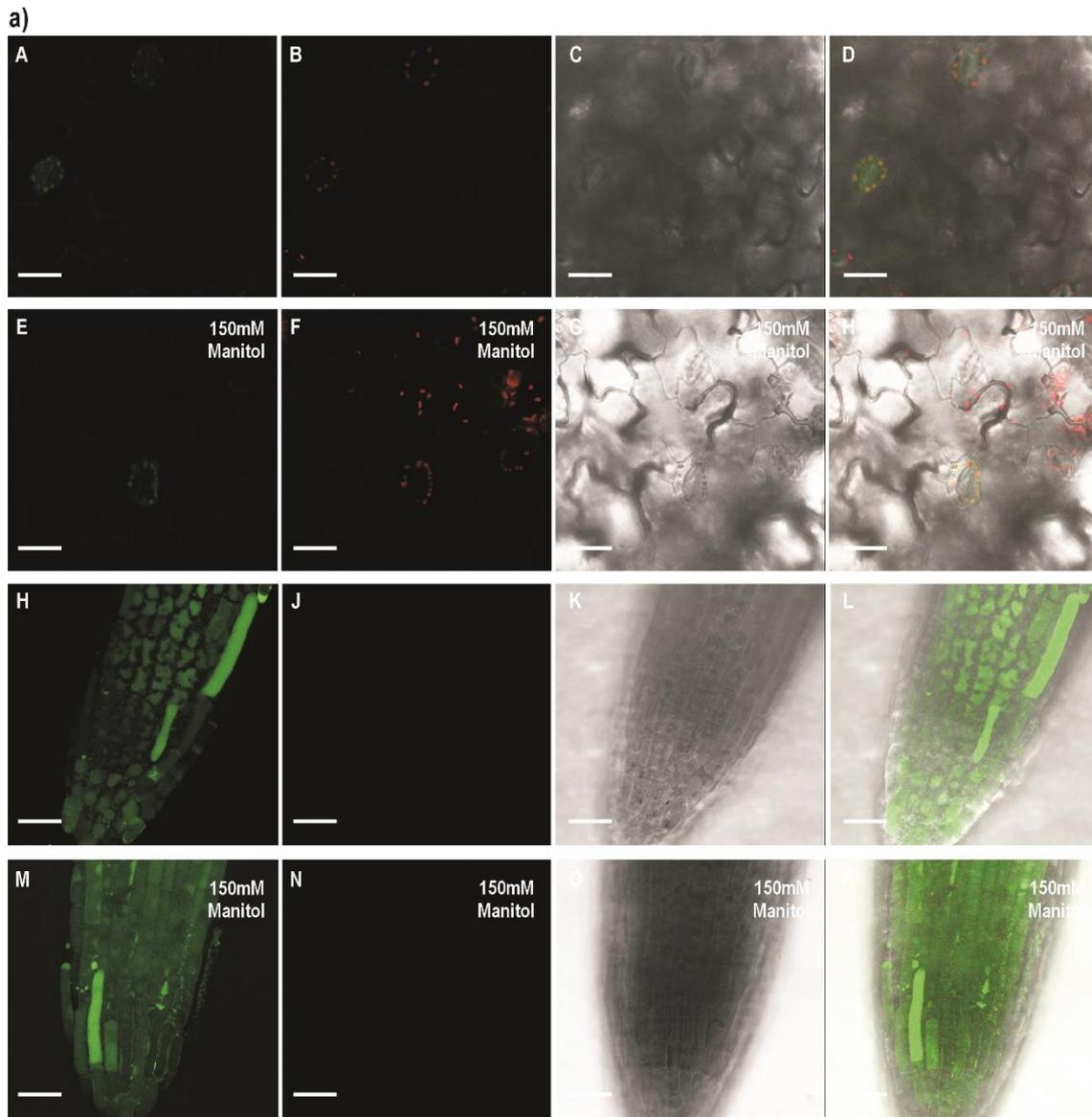
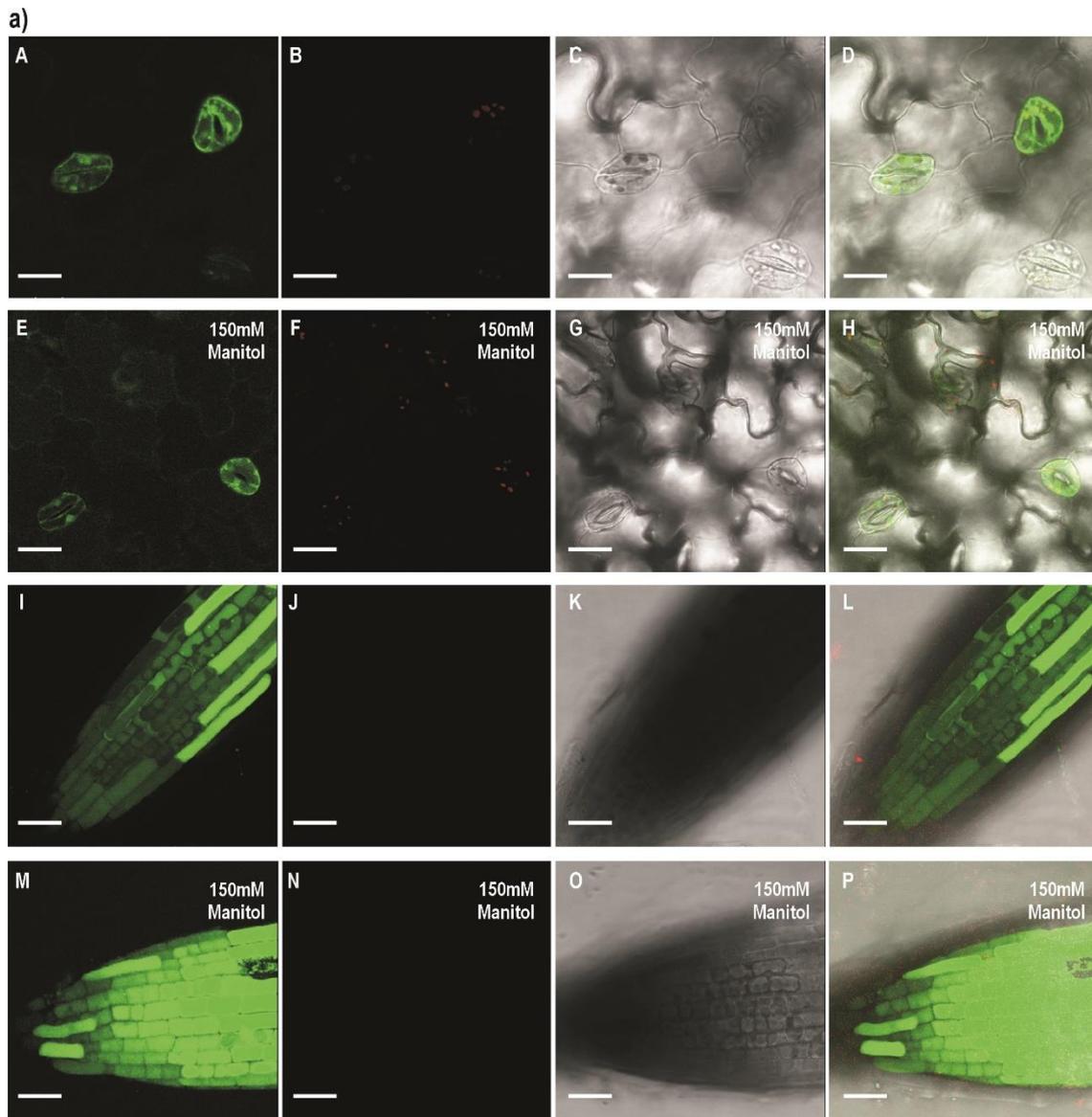


Figura 14: Detección de niveles de RNS en hojas y raíces de Ler en respuesta a estrés osmótico. Plántulas Ler crecidas *in vitro* en medio MS por 10 días en condiciones control y en 150mM de manitol. **a)** La detección de RNS se realizó incubando plántulas enteras en 10 μ M de DA-DAF y midiendo la señal generada por CLSM. A-D representa la parte aérea de Ler en condición control, y E-H en

tratamientos con 150mM de manitol. Por otro lado I-L se representa la raíz de Ler en condiciones control mientras que en M-P en 150mM de manitol. Las condiciones de visualización fueron: excitación de la sonda a $\lambda_{ex}=488nm$ y emisión entre $\lambda_{em}= 510-530nm$ (A-E-I-M), excitación de las clorofilas fue $\lambda_{ex}= 588nm$ y la emisión 560-750nm (B-F-J-N). Se visualizaron los campos claros (C-G-K-O). Y por último se representa el *merge* (D-H-L-P). $n=10$. Las barras representan $10\mu m$. **b)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las microscopias en **a)**. Los datos normalizados fueron expresados como veces de incremento con respecto al control (Ler en 0mM manitol). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tuckey ($P < 0,05$), $n = 3$.



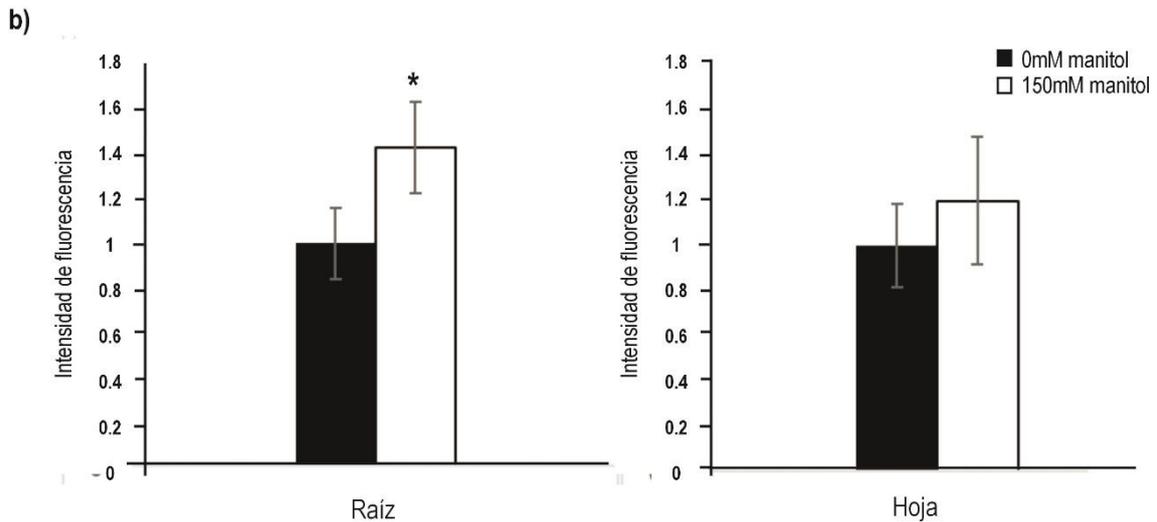


Figura 15: Detección de niveles de RNS en hojas y raíces de *dry2/sqe1* en respuesta a estrés osmótico. Plántulas *dry2/sqe1* crecidas *in vitro* en medio MS por 10 días en condiciones control y en 150mM de manitol. **a)** La detección de RNS se realizó incubando plántulas enteras en 10 μ M de DA-DAF y midiendo la señal generada por CLSM. A-D representa la parte aérea de *dry2/sqe1* en condición control, y E-H en tratamientos con 150mM de manitol. Por otro lado I-L se representa la raíz de *dry2/sqe1* en condiciones control mientras que en M-P en 150mM de manitol. Las condiciones de visualización fueron: excitación de la sonda a λ_{ex} =488nm y emisión entre λ_{em} = 510-530nm (A-E-I-M), excitación de las clorofilas fue λ_{ex} = 588nm y la emisión 560-750nm (B-F-J-N). Se visualizaron los campos claros (C-G-K-O). Y por último se representa el *merge* (D-H-L-P). n=10. Las barras representan 10 μ m. **b)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las microscopías en **a)**. Los datos normalizados fueron expresados como veces de incremento con respecto al control (*dry2/sqe1* en 0mM manitol). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tuckey (P <0,05), n = 3.

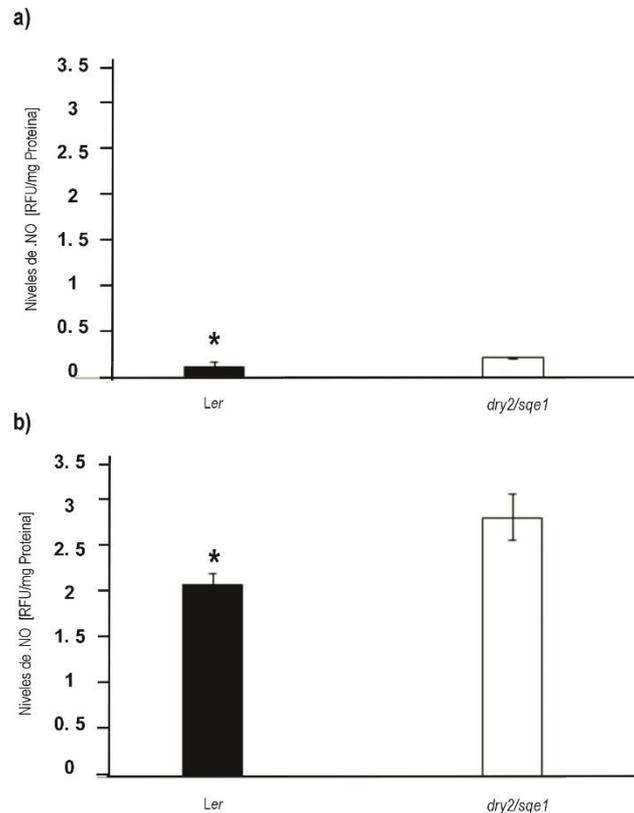


Figura 16: Acumulación de ·NO en raíces y hojas de *dry2/sqe1*. Detección *in vitro* de ·NO presente en hojas **a)** y raíces **b)** de plántulas Ler y *dry2/sqe1* crecidas durante 15 días. La detección para ambos órganos se realizó incubando 10µM de 4,5- DAF en extractos enriquecidos en ·NO y se midió la emisión de fluorescencia $\lambda_{ex}=491\text{nm}$ y $\lambda_{em}=513\text{nm}$ de la sonda en una espectrofluorímetro. Según el análisis de varianza, utilizando el test de Tuckey las medias con * son significativamente diferentes ($p \leq 0.01$), ($n=5$).

En resumen, el estudio comparativo del estado redox de Ler y el mutante *dry2/sqe1* a través de diferentes estrategias (cambios en la oxido-reducción de *roGFP*, detección de ROS y RNS a través de sondas fluorescentes) develó que el citosol de *dry2/sqe1* se encuentra más oxidado que el citosol del salvaje en situación control y que el estado de oxidación se incrementa en situaciones de estrés osmótico.

El crecimiento de raíz principal del mutante *dry2/sqe1* no es inhibida por ·NO.

El mutante *dry2/sqe1* presenta mayor desarrollo de raíces laterales y una marcada disminución del largo de la raíz principal (Posé et al., 2009; Doblas et al., 2013), además de una mayor acumulación de ·NO en raíces en comparación con el genotipo salvaje (**Fig. 2a y b, 14, 15 y 16**). El ·NO juega un rol central en el desarrollo de raíces adventicias, laterales y en pelos radiculares que contribuye a la correcta arquitectura radical en plantas (Correa-Aragunde et al., 2004; Lombardo et al., 2006). La generación de ·NO promueve el desarrollo de raíces laterales más largas y disminución en la longitud de la raíz primaria, en cambio cuando los niveles de ·NO se reducen se generan

raíces primarias más largas y laterales más cortas evidenciando un rol crucial de esta molécula en la regulación del crecimiento y desarrollo del sistema radicular (Correa-Aragunde et al., 2004). Además, el $\cdot\text{NO}$ se ha descrito como una molécula fundamental en el proceso que conduce a la formación de pelos radiculares a través de su implicancia en cascadas de señalización vinculadas a las auxinas (Lombardo et al., 2006).

Para evaluar si existe una relación entre los niveles de $\cdot\text{NO}$ detectados en la raíz de *dry2/sqe1* y su arquitectura radicular se crecieron plantas de *dry2/sqe1* y *Ler* durante 20 días en presencia de un donador de $\cdot\text{NO}$ de forma exógena (SNP). En la Figura 17a se observa la respuesta de la raíz principal a concentraciones crecientes de SNP, el genotipo salvaje mostró una reducción de la longitud de raíz principal mientras que el crecimiento de la raíz de *dry2/sqe1* no fue afectada. Es interesante destacar que a $1\mu\text{M}$ de SNP los niveles de $\cdot\text{NO}$ dentro de la raíz de *Ler* son similares a los del mutante con $0\mu\text{M}$ de SNP y son suficientes para generar una disminución significativa en la longitud de la raíz del salvaje y un aumento en la cantidad de raíces laterales (**Fig. 17a y b**). A $100\mu\text{M}$ de SNP, los niveles de $\cdot\text{NO}$ generados en *Ler* producen una disminución de la longitud de la raíz del mismo orden que en *dry2/sqe1* sin el generador de $\cdot\text{NO}$. A su vez, a esta concentración de SNP se ve un aumento de la cantidad de raíces laterales de *Ler* (**Fig. 17c**).

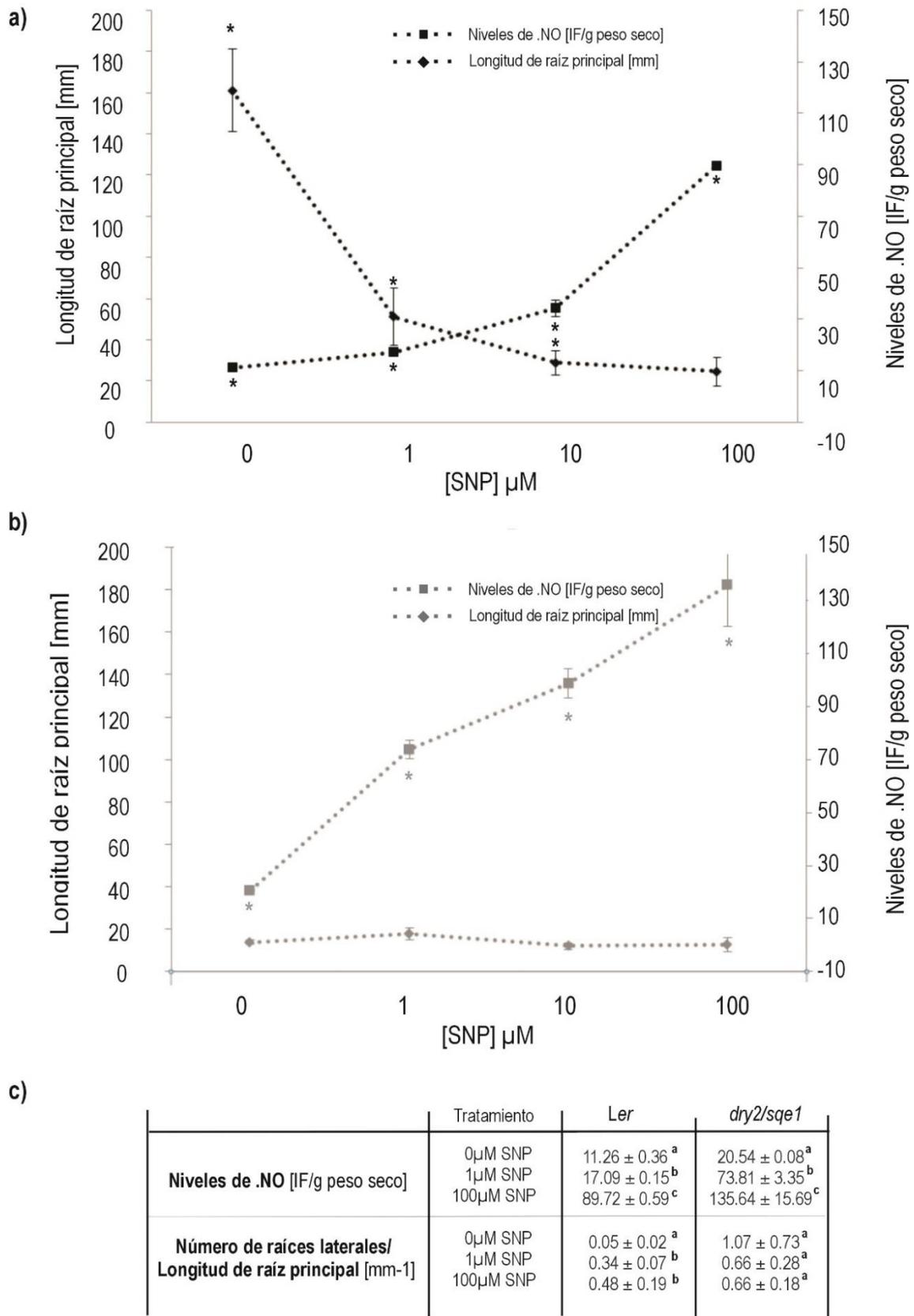


Figura 17: La generación de $\cdot\text{NO}$ mediante SNP afectó la longitud de raíz en el salvaje y no en *dry2/sqe1*. Plántulas Ler **a)** y *dry2/sqe1* **b)** crecidas durante 20 días en medios MS enriquecidos con en 0, 1, 10 y 100μM SNP, y **c)** cuantificación de raíces laterales. Al final del ensayo se midió la longitud radicular absoluta expresado como número de raíces laterales (RL)/Longitud de raíz principal (RP) y los niveles de $\cdot\text{NO}$ in

vivo. Según el análisis estadístico los valores con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,01$), $n=5$.

Composición y estado de las membranas en *dry2/sqe1*

La estructura de las membranas en las células eucariotas está determinada, entre otros componentes, por la presencia de esteroides (Benveniste, 2002). Los esteroides no son los únicos componentes lipídicos en las membranas celulares, existen diversos mensajeros lipídicos citosólicos que dependen de la composición y funcionamiento de las membranas plasmáticas, como por ejemplo el ácido fosfatídico (PA), que su producción depende de fosfolípidos de membrana que son hidrolizados por fosfolipasas (Wang, 2005). Además se ha vinculado a estas moléculas con respuestas frente a estrés (Hong et al., 2010). En este contexto evaluamos el nivel de lípidos totales a través de tinción con Sudan III en el mutante *dry2/sqe1*, como manera indirecta de medir los niveles de triacilgliceridos (TAGs) como forma de estudiar si otros componentes lipídicos de las membranas de *dry2/sqe1* están también alterados, pues ya sabemos que el mutante presenta menor contenido de sitoesterol y stigmasterol en raíces (Posé et al., 2009).

La Figura 18 muestra que el mutante *dry2/sqe1* acumula más TAGs que Ler, tanto en raíces (**Fig. 18a**) como en pelos radiculares (**Fig. 18b**).

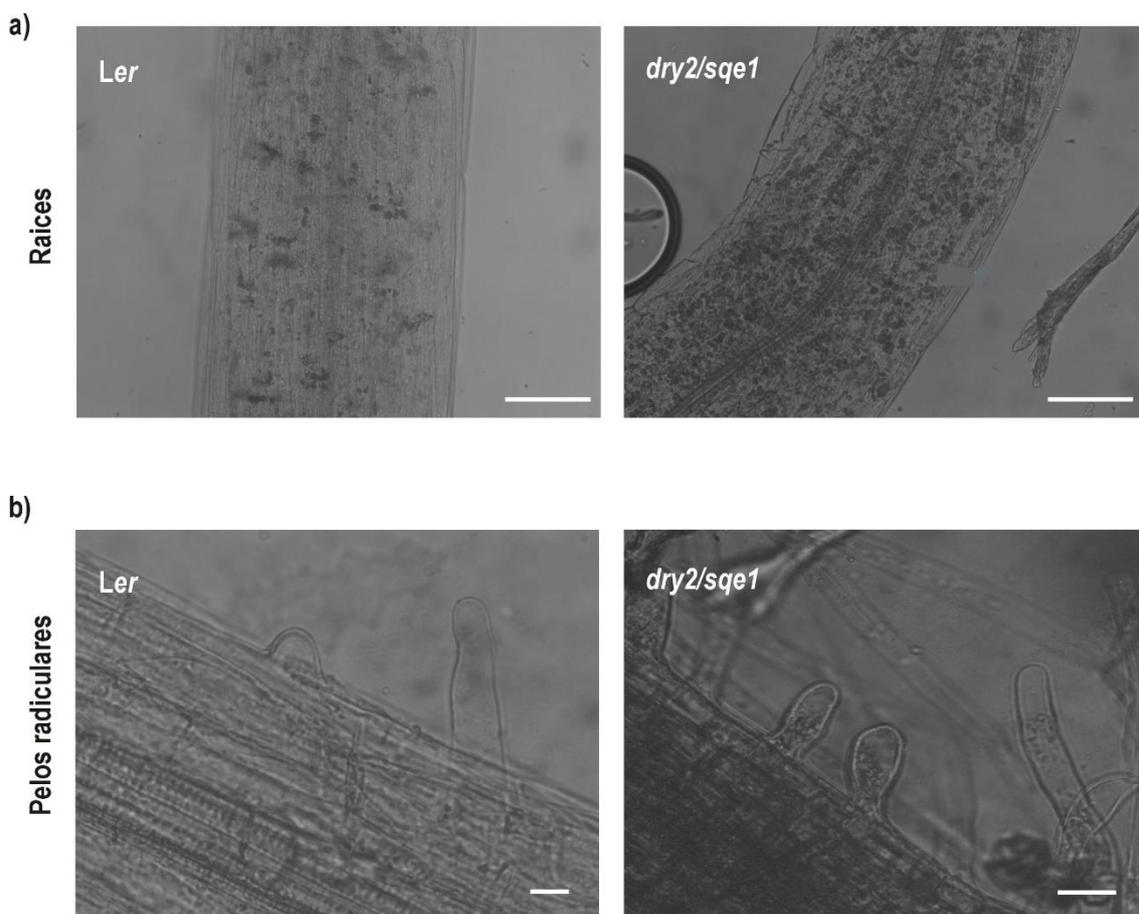


Figura 18: Tinción de lípidos con reactivo de Sudan III en raíces de *dry2/sqe1* y Ler. Plántulas Ler y *dry2/sqe1* crecidas 10 días *in vitro* y teñidas con el reactivo de

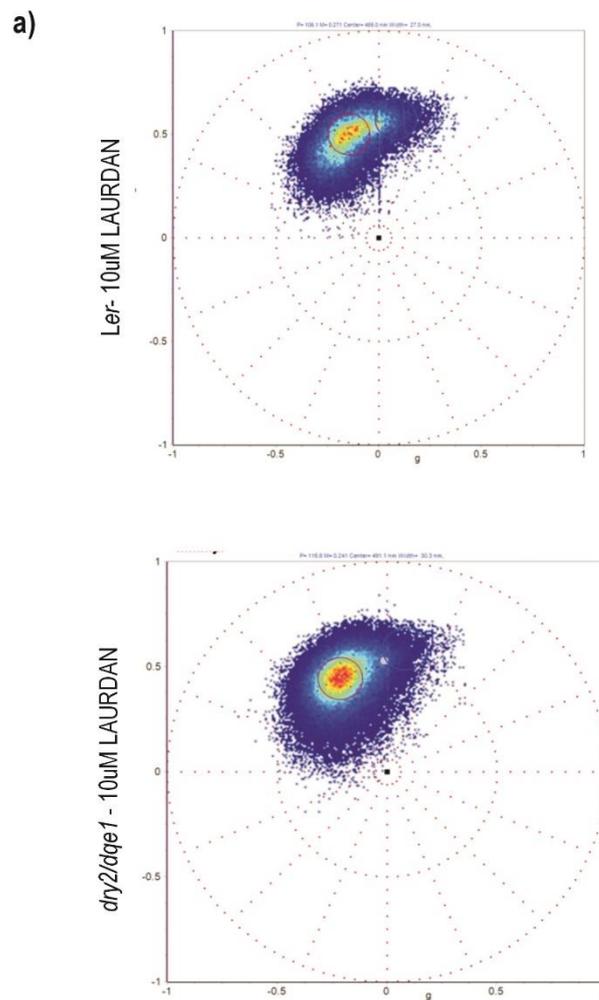
Sudan III. Las raíces **a)** y los pelos radiculares **b)** son visualizados en microscopía de campo claro. Las barras blancas representan 5µm.

Por otro lado, la organización de las membranas celulares y sus propiedades biofísicas pueden ser evaluadas por el uso de un fluoróforo denominado LAURDAN (6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene) sintetizado por Weber en 1979 (Weber and Farris, 1979). LAURDAN es una molécula fluorescente que detecta cambios en las propiedades de fase de las membranas a través de su sensibilidad a la polaridad del ambiente en las bicapas. Como forma de obtener un análisis simple y en forma gratuita de los datos sobre los cambios en la polaridad del LAURDAN es que se trabajó sobre imágenes espectrales las cuales fueron transformadas en SP (Golfetto et al., 2015).

Las bicapas lipídicas pueden adoptar diferentes estados los cuales se suelen clasificar como 3 fases: Fase sólida- ordenada (So), Fase líquida- ordenada (Lo) y Fase líquida-desordenada (Ld). Estas fases dependen de la composición de lípidos y esteroides, de la insaturación de las cadenas acilo de los fosfolípidos, temperatura y presión entre otros (Cacas et al., 2012). Por ejemplo en células vegetales, el campesterol presenta una fuerte capacidad para promover la formación de dominios ordenados y de organizar la distribución espacial en la superficie de las membranas, y en un rango menor los β -sitosterol, además de otros productos finales de la biosíntesis de esteroides, fueron reportados recientemente por tener capacidad de ordenar bicapas lipídicas (Mannock et al., 1970). También algunos tipos de esteroides conjugados, solos o en sinergia con esteroides libres, exhiben una capacidad sorprendente para ordenar membranas (Grosjean et al., 2015). Sin embargo es importante tener en cuenta que no todos los esteroides tienen la capacidad de ordenar membranas celulares, este es el caso del estigmasterol el cual fue descrito por Mannock et al., 1970 con baja capacidad para ordenar bicapas lipídicas y en consecuencia para promover la formación de fases ordenadas.

En esta tesis estudiamos el grado de orden de las membranas celulares, en pelos radiculares de *Ler* y *dry2/sqe1* incubadas *in vivo* con 5µM de la sonda LAURDAN, a través de imágenes generadas utilizando microscopía confocal de dos fotones con el objetivo de constatar si la deficiencia en esteroides encontrada en el mutante se traduce en alteraciones en el orden y estado de fluidez de las membranas con respecto al salvaje. La Figura 19 muestra el análisis de los fasores espectrales con la sonda LAURDAN que evidencia una distribución de pixeles diferencial entre el mutante y el salvaje. Los cursores que agrupan los pixeles en el SP fueron diseñados con un modelo continuo de arcoíris entre los cursores azul y rojo (azul: membranas ordenadas y rojo: fluidas). Las coordenadas de centro y ancho representan la posición espectral de cada cursor, donde los cambios en la longitud de onda de emisión de la sonda generan el corrimiento en la posición angular en sentido antihorario (coordenada de centro), mientras que los incrementos en el ancho de pico mueven la posición del espectro hacia el centro del gráfico de manera radial

(coordenada de ancho). Los cambios de centro representan corrimiento del espectro desde el azul (solido ordenado) hacia el rojo (líquido desordenado) y los cambios en ancho en el SP representan la complejidad de las membranas (mayor ancho, mayor complejidad). Según la Figura 19a, *dry2/sqe1* presenta mayor acumulación de pixeles en el cursor rojo que representa mayor población de membranas fluidas y las coordenadas de ancho en Figura 19b, evidencia menor complejidad de membranas que en *Ler*. Pese a que la emisión de LAURDAN indica que las membranas de *dry2/sqe1* son más fluidas que las del salvaje, la autofluorescencia en pelos radiculares asociadas a las ligninas (**Anexo, Fig.3**) impide una correcta separación de la emisión del LAURDAN.



b)

Tratamiento	Color cursor	Centro (nm)	Ancho (nm)
Ler- 10µM LAURDAN	Rojo	508.5	234
	Azul	525.9	157.4
<i>dry2/sqe1</i> - 10µM LAURDAN	Rojo	504.8	234
	Azul	525.5	104

Figura 19: Estudio de la fluidez de membranas de pelos radiculares de Ler y *dry2/sqe1* a partir de las propiedades espectrales de LAURDAN. a) Comparación de fasores espectrales de raíces de Ler y *dry2/sqe1* utilizando LAURDAN. Distribución de los pixeles en el SP, usando el segundo armónico de la transformación espectral. Además se representan en la tabla las coordenadas de posición de los cursores de colores en los fasores espectrales en ancho (nm) y centro espectral (nm). Pese a que la emisión de LAURDAN indica que las membranas de *dry2/sqe1* son más fluidas que las del salvaje, la autofluorescencia en pelos radiculares asociadas a las ligninas impide una correcta separación de la emisión del LAURDAN.

Dado que el uso de la sonda LAURDAN no fue efectiva para nuestro modelo celular, pelos radiculares de Arabidopsis, por problemas espectrales con la autofluorescencia del tejido, se utilizó la sonda rojo nilo (RN) como alternativa, ya que presenta un máximo de emisión en 628nm (Greenspan and Fowler, 1985) que no interfiere con la autofluorescencia de las ligninas. Esta sonda junto con el LAURDAN son ampliamente usadas como sondas específicas de membranas celulares (Klymchenko and Kreder, 2014).

Utilizando la misma estrategia de fasores espectrales con RN se seleccionaron cinco cursores de color representados en el fador espectral (**Fig. 20a B y D**) que permiten distinguir al menos cinco grupos de membranas presentes en los dos genotipos indicados en el gráfico con distintos colores: fucsia, azul, rojo, verde y celeste (**Fig 20b**). Dos de estos grupos se asocian principalmente a raíces de Ler (pixeles fucsia, azul) y dos a raíces de *dry2/sqe1* (rojo y verde), que se caracterizan por presentar diferencias en la fluidez de las membranas celulares.

A través del SP se encontraron en las membranas de pelos de raíces de Ler regiones de baja y mediana fluidez coloreados con pixeles fucsia y azul que corresponden a emisiones de bajas longitudes de onda del RN (**Fig 20**). De manera interesante, las membranas de pelos radiculares *dry2/sqe1* son más fluidas asociados con pixeles coloreados principalmente con verde y rojo que corresponden a emisiones de altas longitudes de onda del RN (**Fig 20a y b**). Los cambios observados fueron estadísticamente significativos. Para regiones de la membrana que presentan mayor fluidez, representadas por el cursor celeste, la sonda no es lo suficientemente sensible para detectar diferencias entre los genotipos.

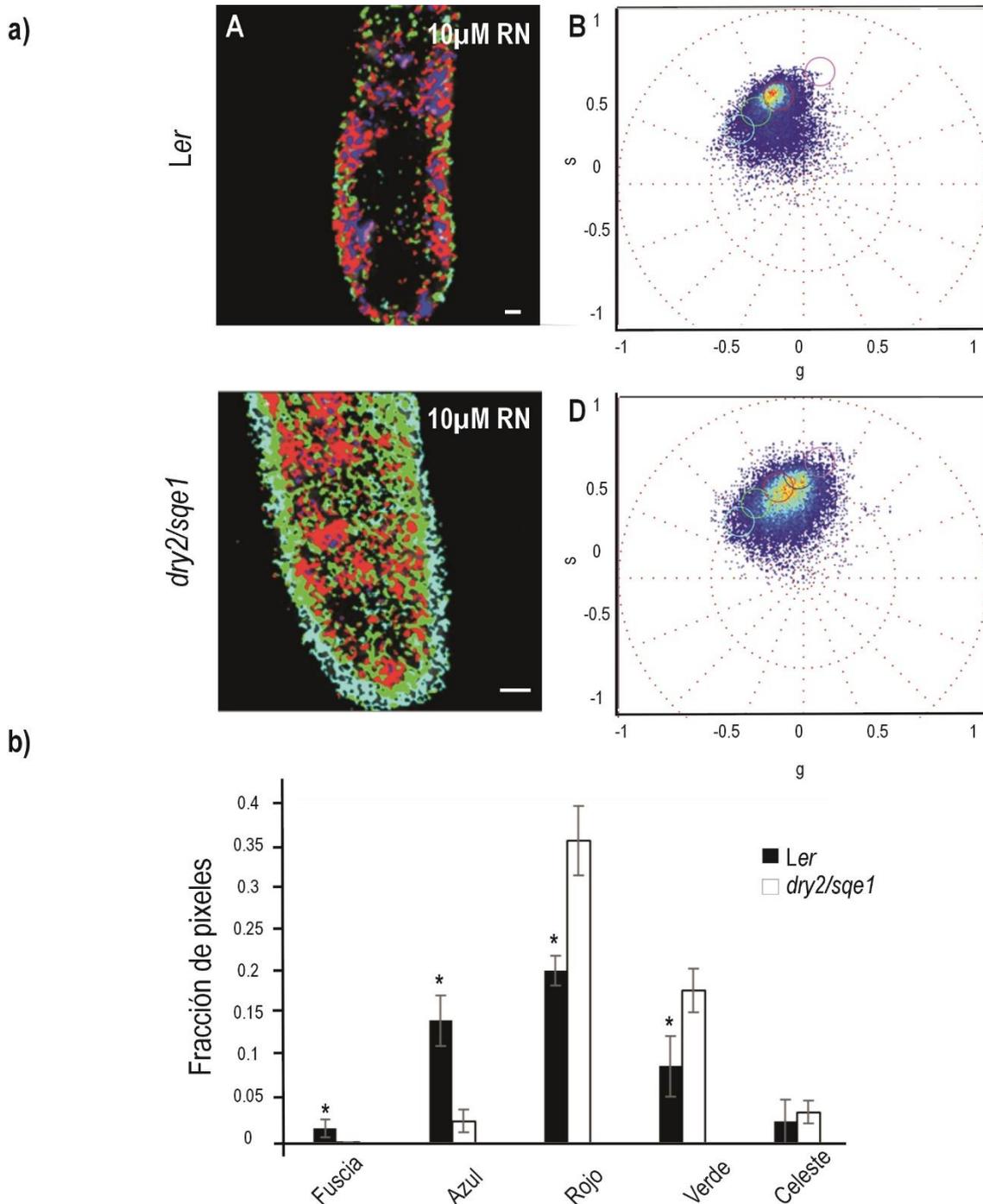


Figura 20: Estudio de la fluidez de membranas de pelos radiculares de *Ler* y *dry2/sqe1* a partir de las propiedades espectrales del rojo nilo y con análisis de fasores espectrales (SP). La emisión del rojo nilo indica que las membranas de *dry2/sqe1* son más fluidas que las del salvaje, la autofluorescencia en pelos radiculares para esta sonda es nula. a) A y C representan pseudo-imágenes generadas a partir del análisis de fasores espectrales representativos de pelos radiculares de plántulas *Ler* y *dry2/sqe1* incubados con 10 μM de rojo nilo, los pixeles son coloreados usando cinco cursores de colores (fucsia, azul, rojo, verde y celeste) donde el orden de fluidez aumenta del fucsia hacia el celeste. Las barras blancas representan 1 μM. B y D representan la distribución de los pixeles en grafico polar de las imágenes en A y C usando el primer armónico de la transformación espectral. b) Representación gráfica de la fracción de pixeles de cada cursor para cada genotipo.

Los valores representan la media y las barras de error el desvío estándar. El análisis estadístico según el Test de Tuckey ($p < 0.10$) indica que * representa medias significativamente diferentes, $n=7$.

***dry2/sqe1* mostró alteraciones en la cantidad y actividad de proteínas de membrana plasmática**

Las NADPH oxidasas (NOXs) son complejos enzimáticos con múltiples subunidades embebidos en las membranas plasmáticas de las células vegetales, los cuales presentan componentes transmembrana y citosólicos. Existen varias isoformas identificadas en *Arabidopsis*: AtrbohA, AtrbohB, AtrbohD, AtrbohF en hoja y AtrbohC/RHD2 en raíz. Se suele proponer que las NOXs se localizan dentro de micro-dominios de membrana enriquecidos en esteroides (Mongrand et al., 2010). Estudios previos en *dry2/sqe1* mostraron un cambio en la localización de estas enzimas en las membranas plasmáticas de pelos radiculares y los autores sugieren que el déficit de esteroides estructurales podría ser la causa de este cambio (Posé et al., 2009). Para evaluar si los cambios en la localización celular afectan la actividad enzimática, se midió la misma a través de ensayos de oxidación del reactivo XXT o en geles de actividad. En la Figura 21a se observa una mayor actividad NOX en hojas que en raíz, tanto en el salvaje como en el mutante. Esto puede deberse a la presencia de más isoformas en hojas, evidenciado por la intensidad disminuida de las isoformas en el mutante (**Fig. 21b**). Además, *dry2/sqe1* presentó menor actividad NOX tanto en hojas como en raíces en comparación con Ler (**Fig. 21a**).

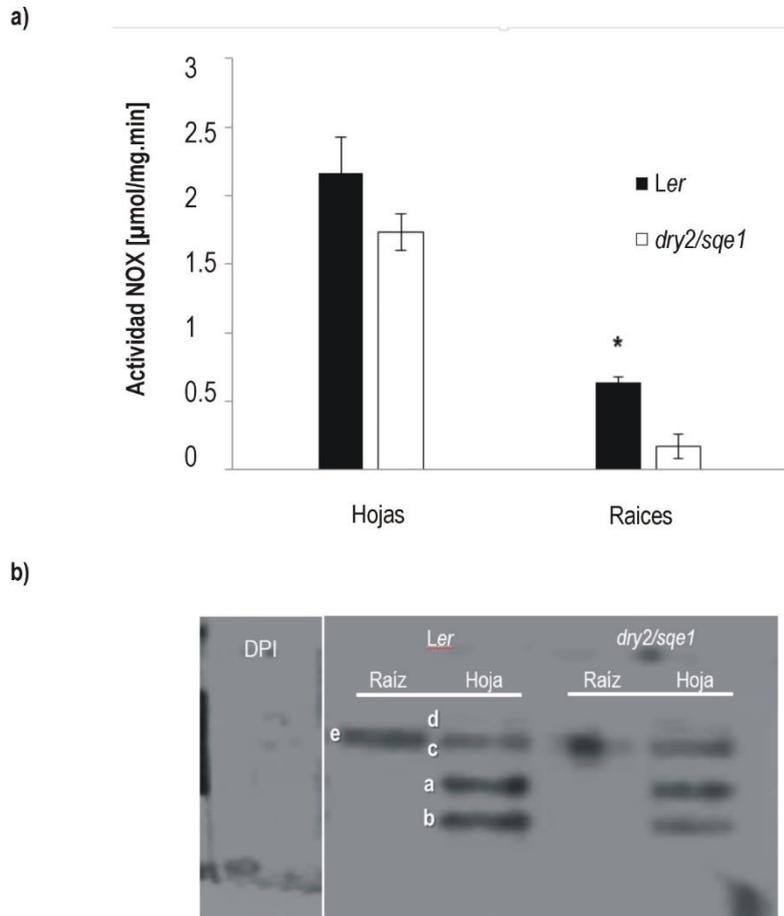


Figura 21: La actividad NADPH oxidasa (NOX) de membranas plasmáticas es menor en *dry2/sqe1* que en el salvaje. a) Extractos de proteínas totales de hojas y raíces *Ler* y *dry2/sqe1* crecidas por 20 días. La actividad NOX se midió por reducción del reactivo XTT usando análisis espectrofotométrico a $\lambda_{470\text{nm}}$, con $\xi = 2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Según el análisis de varianza, utilizando el test de Tuckey las medias con * son significativamente diferentes ($p \leq 0.01$), $n=5$. **b)** 50µg de proteínas totales de raíces y hojas de *Ler* y *dry2/sqe1* fueron separadas por electroforesis en gel nativo de poliacrilamida y revelado por actividad NOX. DPI indica el control con inhibidor de NOX. Las letras indican las diferentes isoformas de la NOX, a) AtrbohA, b) AtrbohB, c) AtrbohD, d) AtrbohF y e) AtrbohC/RHD2.

También es interesante señalar que se observó que el mutante presenta mayor cantidad de proteína PLD α en raíces, en comparación con el salvaje (**Fig. 22**). Esta enzima participa en la generación a partir de fosfolípidos de membrana del ácido fosfatídico (PA), mensajero lipídico citósolico (Wang, 2005) asociado a respuestas frente a estrés (Hong et al., 2010).

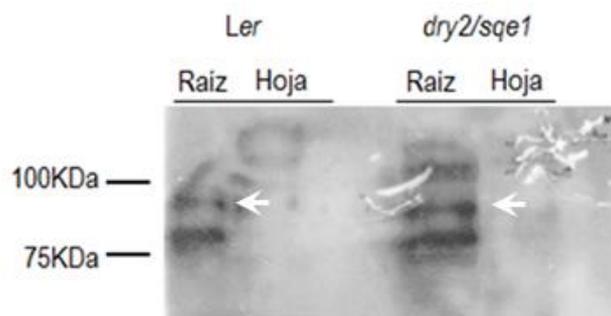


Figura 22: Inmunodetección de PLD α en raíces de *dry2/sqe1* y *Ler*. 20 μ g de proteínas totales de raíz y parte aérea de *Ler* y *dry2/sqe1*, purificadas por Sephadex G25 fueron sembrados para el blot. Se incubaron con 1/1000 de anti- α -PLD. Las flechas indican la banda correspondiente a la isoforma de PLD α (\approx 92KDa), según el marcador de peso molecular.

Estructura de organelos y tráfico vesicular

El retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, la vacuola y la membrana plasmática constituyen los componentes del sistema de secreción celular en plantas (Bassham et al., 2008). La comunicación entre estos orgánulos está mediada por pequeñas GTPasas de la Subfamilia de Rab (Stenmark and Olkkonen, 2001). Miembros de esta familia se han localizado en los compartimentos de distintas membranas y ejercen funciones en diferentes etapas de la secreción y las vías endocítica (Kotzer et al., 2004). Estas proteínas son útiles para el estudio del tráfico vesicular. A partir de plantas transgénicas con fusiones de YFP con diferentes Rab con localización definida es que nos proponemos investigar como es el tráfico vesicular en el mutante *dry2/sqe1* y analizar como la alteración en el metabolismo de esteroides puede afectar dicho tráfico.

La localización subcelular en plantas salvajes de RabC1 se detectó en forma de gránulos que representan los endosomas a lo largo de todo el citoplasma de la misma forma que reporta (Geldner et al., 2009). Sorprendentemente, la proteína RabC1 en el fondo genético de *dry2/sqe1* presenta una localización diferente, próxima a la membrana plasmática interna (**Fig. 23**).

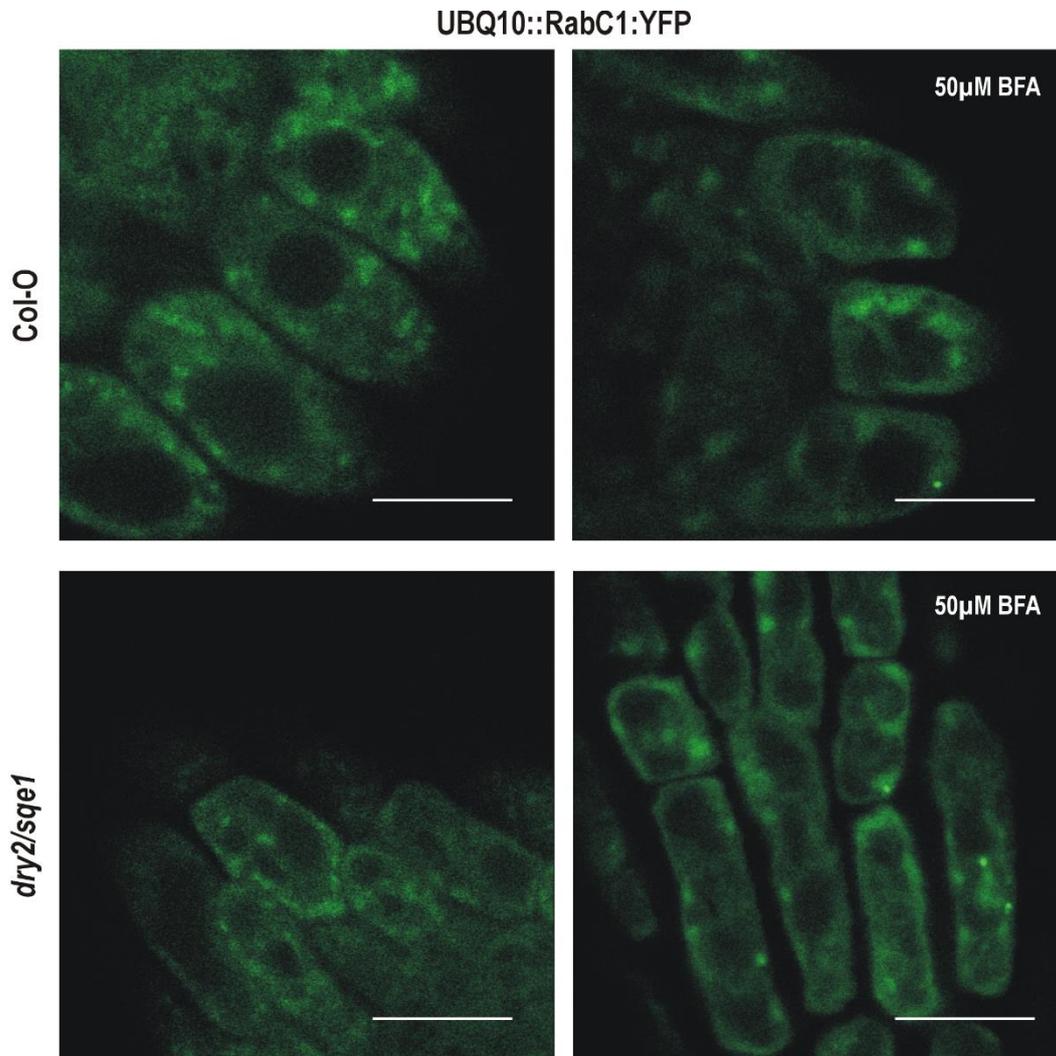


Figura 23: *dry2/sqe1* no presenta la localización subcelular característica de *RabC1* en endosomas tempranos. Las imágenes de la derecha muestran células de raíces de plántulas transgénicas UBQ10::RabC1:YFP en fondo Col-0 y *dry2/sqe1* en situación control y las imágenes de la izquierda muestran células de raíces de plántulas *crecidas in vitro* en presencia de 50μM de BFA durante 20min y visualizadas por CLSM. Las barras blancas representan 10μm.

La señal de la proteína RabG3f se localizó en la membrana vacuolar ó tonoplasto de las células del ápice radicular y en el citoplasma en forma de gránulos que representan endosomas en plántulas de *Ler* (**Fig. 24**). La señal presente en tonoplasto coincide con la descrita por Geldner et al., 2009. La señal de RabG3f en las plántulas *dry2/sqe1* no presentó la localización característica del salvaje, en membranas vacuolares, y los gránulos asociados a endosomas se ubicaron próximos a la membrana plasmática.

El tratamiento con el metabolito fúngico Brefeldina A (BFA) genera disrupción y pérdida de función en el aparato de Golgi (Dinter and Berger, 1998). En este trabajo usamos este metabolito para interrumpir el tráfico vesicular en las plantas salvajes y comparar esta situación con lo que ocurre en el mutante en condiciones control. Las Figuras 23 y 24 muestran como luego de la aplicación de BFA en plantas salvajes, RabC1 y RabG3f adoptan una localización similar

a la que presenta el mutante en condiciones control; lo que sugiere que el mutante puede tener alterado el tráfico vesicular. La aplicación de BFA a plantas mutantes no provocó un cambio en la localización de dichas proteínas (Fig. 23 y 24).

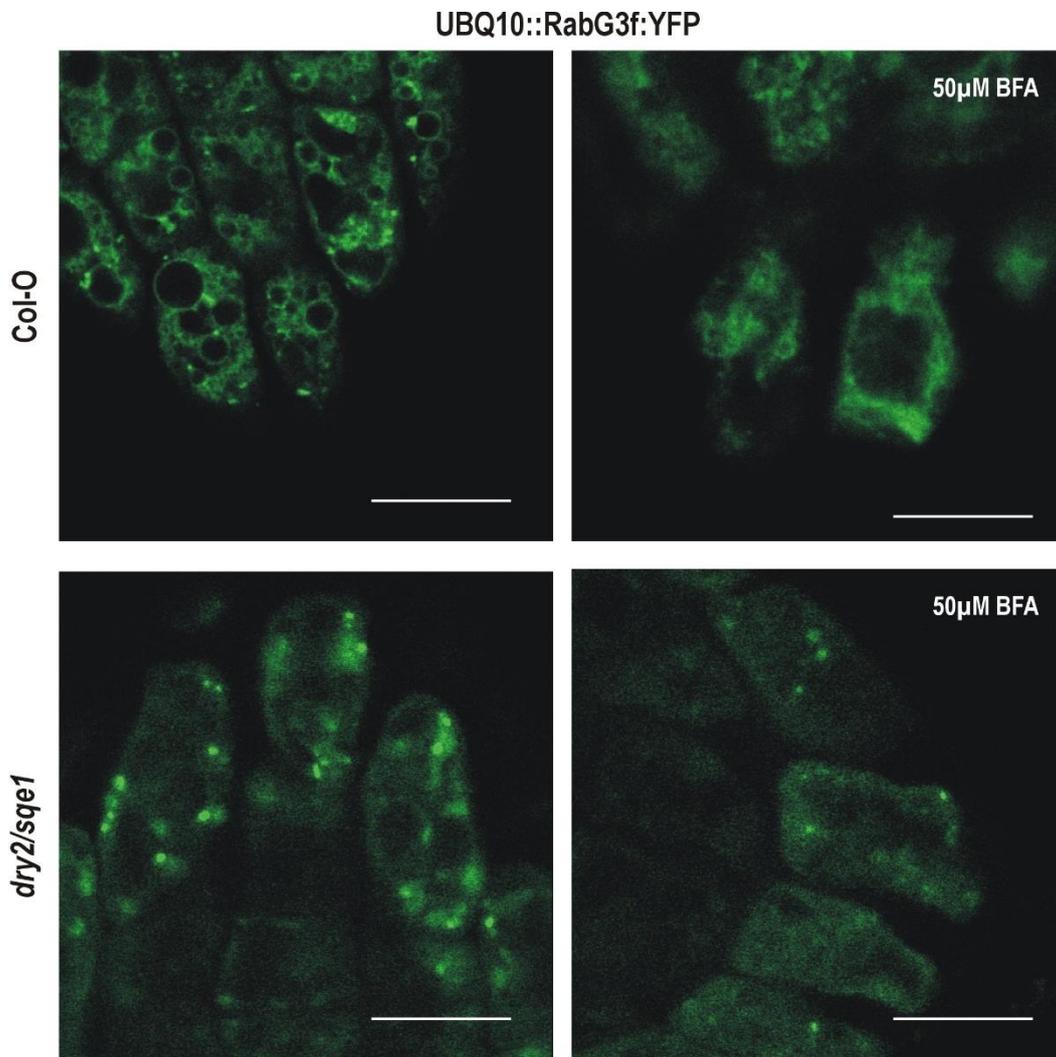


Figura 24: *dry2/sqe1* no presenta la localización subcelular característica de *RabG3f* en vacuolas y endosomas. Las imágenes de la derecha muestran células de raíces de plántulas transgénicas UBQ10::RabG3f:YFP en fondo Col-0 y *dry2/sqe1* en situación control y las imágenes de la izquierda muestran células de raíces de plántulas *crecidas in vitro* en presencia de 50 μ M de BFA durante 20min y visualizadas por CLSM. Las barras blancas representan 10 μ m.

En resumen, se observaron cambios en la fluidez de membranas celulares en raíces de *dry2/sqe1*, las cuales fueron evaluadas mediante el uso de la sonda LAURDAN y RN las cuales evidenciaron que las membranas de los pelos radiculares se encuentran más fluidas, lo que podría ser explicado por la alteración del contenido de esteroides en el mutante. Además, los cambios en localización celular de las proteínas RabC1 y RabG3f encontrados en el mutante sugieren que el tráfico vesicular podría estar afectado. Estos cambios de composición, fluidez o biogénesis de las membranas pueden explicar los cambios observados en la localización y actividad de la NADPH oxidasa.

Identificación de la mutación de un supresor de *dry2/sqe1* (*sud3*) mediante clonación posicional

En general la búsqueda de segundas mutaciones que supriman el fenotipo de un determinado mutante es una estrategia genética muy utilizada que permite identificar nuevos componentes genéticos relacionados con la mutación de interés y permite estudiar y conocer rutas de transducción de señales, por ejemplo en *Arabidopsis* en la búsqueda de identificar supresores en genes implicados en distintas rutas, se han aislado mutantes asociados a la señalización por las hormonas auxina, giberelina y ABA (Xiao et al., 2004) o incluso se ha identificado un supresor del mutante *dry2/sqe1* el cual mediante el gen E3 ubiquitin ligasa regula positivamente enzimas del metabolismo de esteroides (Doblas et al., 2013). Con el fin de conocer mecanismos e identificar nuevos componentes genéticos implicados en la regulación de la hipersensibilidad a sequía y el desarrollo de *dry2/sqe1* se realizó el mapeo de un nuevo supresor del mutante *dry2/sqe1*.

En este trabajo se contó con un mutante supresor de *dry2/sqe1* cedido por el Dr. Miguel Ángel Botella (Universidad de Málaga) generado por mutagénesis de *dry2/sqe1*. Se consideraron supresores a los mutantes que recuperaron el fenotipo salvaje. En esta tesis se seleccionó para trabajar el supresor 3 (*sud3*, según sus siglas en inglés suppressor 3 of dry2/sqe1) por recuperar parcialmente el fenotipo salvaje de la parte aérea y parcialmente el fenotipo radicular (Sena et al., 2012)

sud3 se caracteriza por recuperar parcialmente el fenotipo salvaje, perdido de hipersensibilidad a la sequía y recuperación del fenotipo normal de raíz y parte aérea (**Fig. 25**).

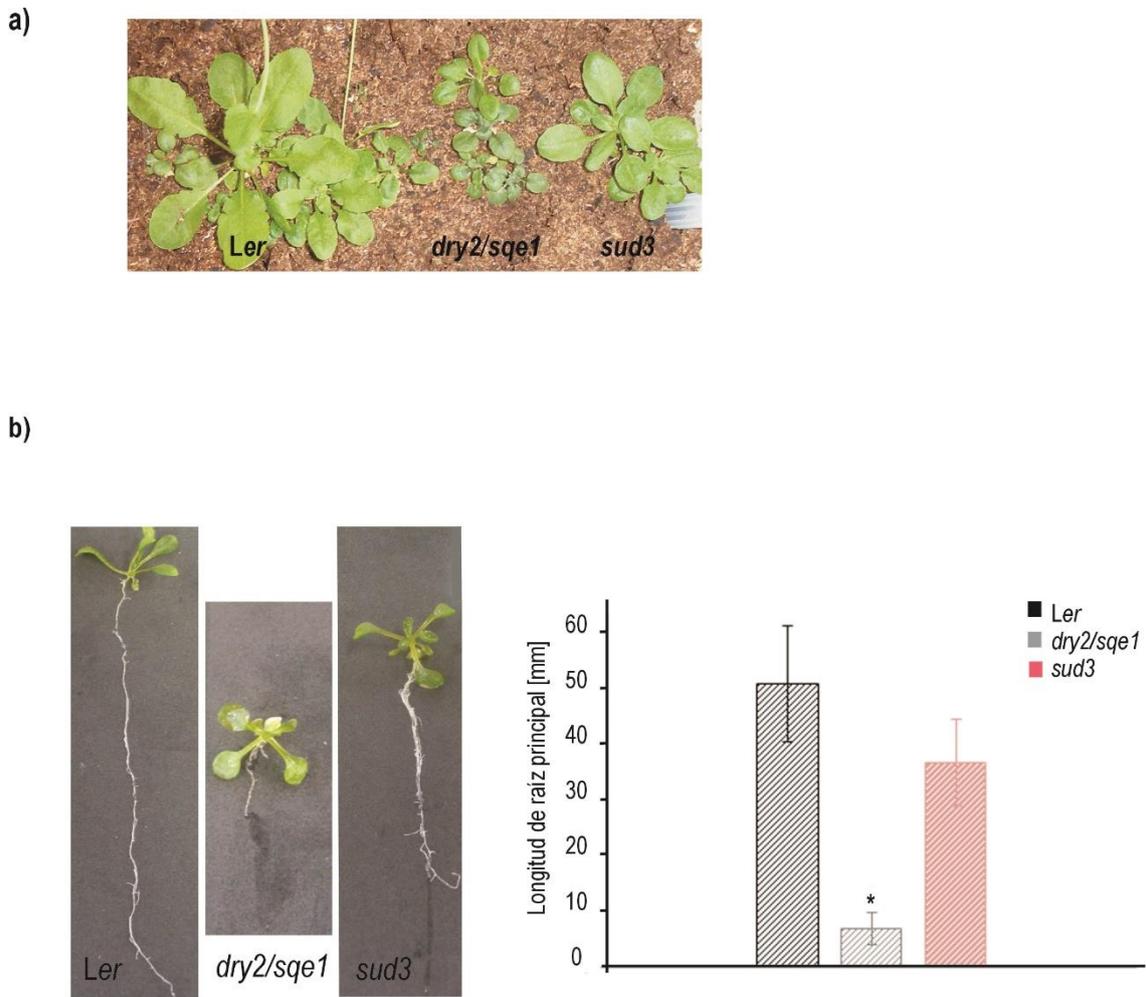


Figura 25: La caracterización fenotípica de *sud3* evidencia la reversión parcial al fenotipo salvaje tanto en parte aérea como en raíces. a) Crecimiento en maceta de plantas del tipo salvajes (*Ler*), *dry2/sqe1* y *sud3* durante 30 días para visualización de parte aérea. **b)** Plántulas crecidas *in vitro* durante 20 días se les midió la longitud final de la raíz principal. Los datos representados son las medias, y según el test de Tuckey las medias con * son significativamente diferentes para una $p \leq 0.01$, $n=10$.

Para la determinación de la base molecular de los fenotipos supresores de *sud3* se llevó a cabo la identificación del gen afectado usando la estrategia de clonación posicional. Para ello se contó con una población recombinante *sud3*, con polimorfismo del ecotipo *Ler* y *Col-0*. Esta población fue generada por el Laboratorio de Biología Molecular en Málaga, España. Para el mapeo inicial de la mutación se analizaron 20 plantas de la F3 usando marcadores moleculares distribuidos en los 5 cromosomas de *Arabidopsis*. En ausencia de ligamiento entre la mutación y el marcador molecular la proporción de individuos esperada según una segregación de Mendelina es de 25% individuos homocigotos *Col-0*, 50% individuos heterocigotos *Col/Ler* y 25% individuos homocigotos *Ler* para un determinado marcador. A medida que se incrementa el grado de ligamiento entre la mutación *sud3* (de fondo genético *Ler*), se enriquecerá la proporción de individuos con genotipo homocigoto *Ler*, lo que es visualizado a través del marcador. En la Figura 26 se presentan los marcadores moleculares usados y

su ubicación estimada en cada uno de los cromosomas según la base de datos de Arabidopsis, TAIR. En los anexos (**Tabla. 2**) se cuantifico la concentración, pureza e integridad de los ADNs de cada genotipo *sud3* usados. La Tabla 7 muestra el análisis de los diferentes marcadores moleculares usados, con la excepción del cromosoma 3, la distribución de los marcadores para los genotipos se aproxima a la segregación teórica de no ligamiento 1:2:1. Los marcadores moleculares del cromosoma 3 F18C1, LDM1 y LDM4 presentan una desviación hacia *Ler* que sugiere que la mutación *sud3* se encuentra situada en el cromosoma 3, flanqueada entre estos marcadores. Según la base de datos TAIR de Arabidopsis, estos marcadores delimitan una región de aproximadamente 3.8Mb.

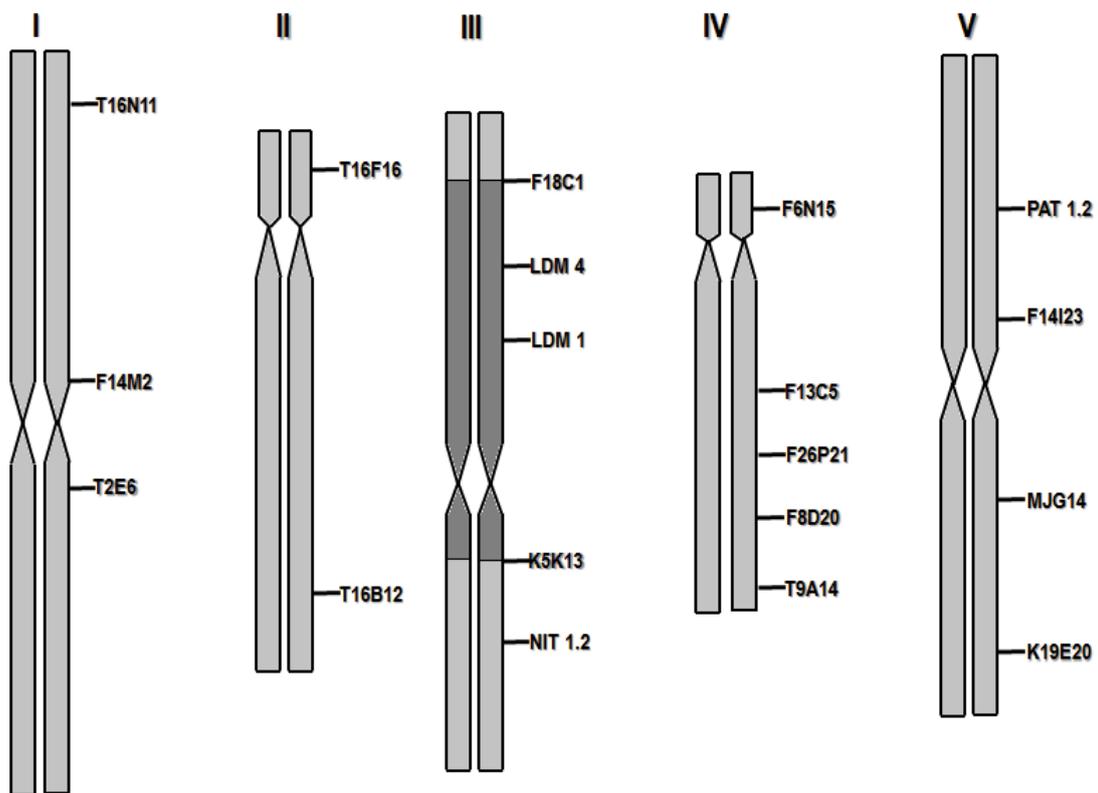


Figura 26: Representación de los 5 cromosomas de Arabidopsis thaliana con la posición de los marcadores moleculares del tipo SSLP empleados para mapear a *sud3*. En gris oscuro se representa la región que flanquea la mutación en *sud3*.

Tabla 7: Distribución de los marcadores moleculares a lo largo de los 5 cromosomas de *Arabidopsis* en la población F3 de *sud3*. El mayor número de individuos en homocigosis *Ler* para los marcadores F18C1, LDM1 y LDM4 sugieren que la mutación está ubicada en el cromosoma 3.

Cromosoma	Marcador Molecular	Homocigotas Col-0	Heterocigotas Col-0/Ler	Homocigotas Ler	Total
1	T16N11	2	10	7	19
	F14M2	1	13	6	20
	T2E6	2	15	3	20
2	T16F16	4	10	6	20
	T16B12	6	11	3	20
3	F18C1	2	4	13	19
	LDM 1	3	3	13	19
	LDM4	2	4	13	19
	K5K13	1	7	12	20
	NIT 1.2	1	8	6	15
4	F6N15	7	9	3	19
	F13C5	4	10	5	19
	F26P21	3	12	4	19
	F8D20	5	11	4	20
	T9A14	2	14	4	20
5	PAT 1.2	5	13	2	20
	F14I23	6	10	4	20
	MJG14	7	12	1	20
	K19E20	5	11	3	19

Una vez acotada la mutación de *sud3* entre los marcadores F18C1 y NIT1.2 en el cromosoma III, se llevó a cabo el afinamiento del mapeo por secuenciación masiva sobre la región de interés en un pool de 20 líneas que portan la mutación *sud3*. Los datos crudos generados en la secuenciación fueron comparadas con las secuencias de referencia *Ler*. De este análisis se obtuvieron 84 genes candidatos que presentaron mutaciones (desde 1 a 20) en el genotipo *sud3*. Los 84 genes fueron sometido a una triple depuración: 1) nos quedamos con los genes que presentan mutaciones del tipo que genera EMS, que es el agente mutagénico que genero la población *sud3*; 2) por otro lado se realizó el análisis sobre las secuencias de las proteínas candidatas mediante la herramienta informática libre InterPro del instituto de bioinformática europeo (EBI), para evaluar si las mutaciones identificadas en la secuenciación coinciden con dominio proteicos de importancia biológica; 3) y por último se compararon las secuencias de *sud3* contra otro supresor de *dry2/sqe1* ya identificado y clonado, llamado *sud1*. La Tabla 8 muestra los 22 genes candidatos identificados y su descripción según la base de datos *Arabidopsis.org* (TAIR).

Tabla 8: Genes candidatos para la mutación de *sud3*. Extraídos de la secuenciación masiva de *sud3* en el cromosoma III entre los marcadores moleculares F18C1 y NIT1.2 y de la posterior depuración. La tabla representa el ID de cada gen y su descripción según TAIR.

ID_TAIR	Descripción
AT3G05720	Putative importin alpha isoform
AT3G05780	Member of the Lon protease-like proteins
AT3G06210	ARM repeat superfamily protein
AT3G06230	MAP Kinase Kinase
AT3G06290	SAC3/GANP/Nin1/mts3/eIF-3 p25 family
AT3G06300	Prolyl-4 hydroxylase
AT3G06340	DNAJ heat shock
AT3G06350	Bi-functional dehydroquininate-shikimate dehydrogenase enzyme
AT3G06370	Member of Sodium proton exchanger family
AT3G06530	ARM repeat superfamily protein
AT3G06560	Poly(A) polymerase
AT3G06580	Protein with galactose kinase activity
AT3G06640	PAS domain/Protein tyrosine kinase family
AT3G06780	Glycine-rich protein
AT3G06880	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT3G06960	Trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD 4)
AT3G06980	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein
AT3G07010	Pectin lyase-like superfamily protein
AT3G07060	EMBRYO DEFECTIVE 1974 (EMB 1974)
AT3G07120	RING/U-box superfamily protein
AT3G07130	Purple acid phosphatase 15
AT3G36659	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein

Discusión

En un escenario de sequía las plantas responden utilizando distintas estrategias, algunas de estas han sido bien estudiadas y pueden explicarse a distintos niveles: molecular, celular, bioquímico, fisiológico y/o morfológico (**Fig.1**). La capacidad de una planta para alterar su fisiología, morfología y/o fenología para tolerar, evitar o escapar de una situación de estrés determinada, se denomina plasticidad fenotípica y es la que determina la capacidad de una planta de sobrevivir a un episodio de estrés ambiental (Marshall et al., 2012).

La búsqueda dirigida a identificar y caracterizar nuevos componentes genéticos y procesos involucrados en la tolerancia a déficit hídrico en el modelo *Arabidopsis thaliana* se ha centrado en el aislamiento de mutantes hipersensibles a sequía. En esta búsqueda, Posé et al., (2009) caracterizaron un mutante de *Arabidopsis thaliana* aislado por su hipersensibilidad a la sequía, denominado *dry2/sqe1*.

El mutante *dry2/sqe1* hipersensible a la demanda de agua, presenta alteraciones en el contenido de esteroides en raíz y en las respuestas fisiológicas y bioquímicas asociadas a estrés abiótico (**Fig. 2**; Posé et al., 2009; Doblaz et al., 2013). Estas características hacen de *dry2/sqe1* un modelo interesante para estudiar el posible rol de los esteroides en las respuestas a sequía y principal objetivo de esta tesis. Durante el desarrollo de este trabajo se pretendió evaluar si los cambios en las respuestas fisiológicas y bioquímicas generados por la mutación en *SQE1* son similares y/o comparables a la forma en que las plantas salvajes perciben y responden frente al déficit hídrico. En este sentido propusimos el modelo de la Fig. 8 donde planteamos dos posibles escenarios para explicar la hipersensibilidad de *dry2/sqe1*:

- *sqe1* genera una alteración en el perfil de esteroides y esta bloquea de alguna forma el normal control de la pérdida de agua en las células vegetales, lo que desencadena respuestas de hipersensibilidad al estrés y/o
- la alteración en el perfil de esteroides causada por *sqe1*, una vez que las células se deshidratan, impide el correcto y ordenado desencadenamiento de las respuestas a estrés y esta incapacidad genera el fenotipo hipersensible.

En esta tesis se intentó trabajar sobre estos escenarios para analizar el rol de los esteroides en la sensibilidad a sequía en el mutante *dry2/sqe1*. Además de identificar cuáles podrían ser los mecanismos bioquímicos/celulares/fisiológicos o moleculares que podrían estar mediando el fenotipo de *dry2/sqe1*.

En la búsqueda de comprender a que nivel y como se genera la hipersensibilidad en *dry2/sqe1* encontramos diversos mutantes que desencadenan sensibilidad al déficit hídrico mediante diferentes estrategias que son representadas en la Figura 27. Las mutaciones descritas a continuación representan todos los niveles desde que se percibe el estrés

hasta los mecanismos de respuesta que se desencadenan para lograr evadir el déficit hídrico u otros tipos de estrés abiótico.

A nivel de la percepción de estrés, los receptores del tipo LRR pueden tener un rol importante en la regulación tanto positiva como negativa de las respuestas a estrés (Osakabe et al., 2005; Osakabe et al., 2010; Lee et al., 2011; Tanaka et al., 2012; Finkelstein, 2013). La percepción mediada por este tipo de receptores desencadena la activación de proteínas quinasas del tipo SnRK (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE, según sus siglas en inglés), quienes mediante la fosforilación de factores de transcripción (FT) como AREB (ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 2) a nivel nuclear regulan positivamente genes de respuesta a ABA y estrés como las proteínas del tipo LEA (Late Embryogenesis Abundant, según sus siglas en inglés) o HAI2 (HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1) (Fujita et al., 2009). El mutante *rpk1* presenta mutado uno de los diversos receptores de membrana del tipo LRR RLK (leucine-rich repeat receptor-like kinase), en este caso es el receptor RPK1 (Receptor protein kinase 1) el cual regula positivamente las vías de señalización del ABA inducidas por déficit hídrico (Osakabe et al., 2005; Osakabe et al., 2010). La pérdida de función de *RPK1* resulta en la insensibilidad al ABA y en la expresión reducida de varios genes de respuesta a estrés tales como RD22 (responsive to dehydration 22), AtMYC2 (Jasmonate insensitive 1), ERDs (Early response to dehydration), AREB1 (Osakabe et al., 2005). La insensibilidad al ABA se genera por no poder sentirlo al presentar el receptor mutado y esto desencadena en un fenotipo sensible al estrés debido al incremento en la pérdida de agua consecuencia del no cierre estomático (Osakabe et al., 2010).



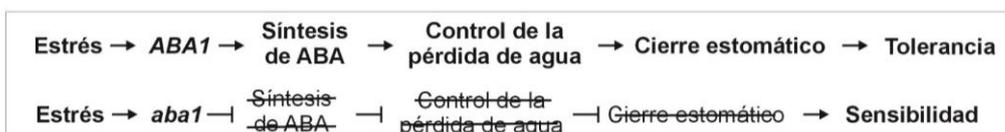
Por otro lado, vinculado a mecanismos de transducción de señales encontramos al gen *PLDα1*. *PLDα1* codifica para una enzima del tipo fosfolipasa D (PLD) que hidroliza lípidos estructurales como la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina resultando en la formación del ácido fosfátidico (PA) (McLoughlin and Testerink, 2013). *PLDα1* y PA median positivamente el proceso de señalización por ABA; PA se une a ABI1 inhibiendo su acción (Zhang et al., 2004a). La retención de ABI1 mediada por PA en la membrana plasmática disminuye su translocación del citosol al núcleo (Zhang et al., 2004a), donde une y activa ATHB6, un factor de transcripción que regula negativamente las respuestas al ABA (Himmelbach et al., 2002). *pldα1*, un mutante con pérdida de función de la *PLDα1* (Zhang et al., 2004a), presenta incrementada la pérdida de agua a través de los estomas, debido a la inhibición del cierre estomático (estomas más abiertos), consecuencia de la pérdida de la regulación negativa del ABA mediada por ABI1 (Mishra et al., 2006; Lu et al., 2013). Además, se conoce que el PA se une a la NADPH oxidasa que induce la

formación de ROS importante en la señalización por ABA durante el cierre estomático (Zhang et al., 2009).



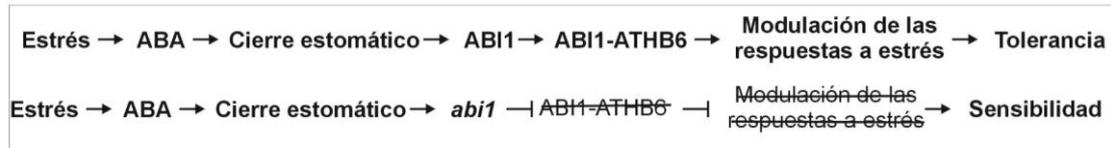
A nivel de expresión de genes de respuesta a estrés encontramos un mutante vinculado con la síntesis del ABA llamado *aba1* (Koornneef et al., 1982). *ABA1* codifica para una zeaxanthin epoxidase (ZEP) que está involucrada en la síntesis de ABA (Rock and Zeevaart, 1991), la pérdida de función le confiere deficiencia de ABA (Koornneef et al., 1982). *aba1* presenta el mismo contenido de agua que las plantas del tipo salvaje (Barrero et al., 2005), pero cuando se someten a un episodio de estrés presentan un fenotipo con defectos en el cierre de los estomas que genera aumento en la pérdida de agua y desencadena un fenotipo hipersensible al estrés (Iuchi et al., 2001; North et al., 2007).

En cuanto a las respuestas a estrés de *aba1*, se ha visto que la acumulación de Pro es tanto dependiente (Strizhov et al., 1997) como independiente a la señalización por ABA (Savouré et al., 1997), también se han descrito fenotipos para *aba1* que con problemas en la promoción del crecimiento incluso sin estrés impuesto (Barrero et al., 2005), y presentan baja expresión de genes de respuesta a estrés osmótico y ABA como RD29A (RESPONSIVE TO DESSICATION 29A), COR15A (COLD-REGULATED 15A), KIN1 (PROTEIN KINASE 2A), RD22 (RESPONSIVE TO DESSICATION 22), ADH (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1) (Xiong et al., 2002).



Por último, dentro de los genes asociados a la modulación de las respuestas a estrés encontramos a *ABI1*, que es un regulador negativo en la transducción de señales del ABA durante el cierre estomático. *ABI1* presenta alta homología con la familia de las proteínas fosfatasa 2C (PP2C), quien interactúa a nivel nuclear con diversos componentes modulando procesos celulares y respuestas a estrés (Finkelstein, 2013; Babula-Skowrońska et al., 2015). *abi1* presenta insensibilidad al ABA (Koornneef et al., 1984) e impide el correcto desencadenamiento de respuestas a estrés (Babula-Skowrońska et al., 2015). *abi1* cierra los estomas mediado por ABA frente a déficit hídrico pero al no existir la regulación negativa de *ABI1* estos genotipos acumulan niveles altos de ABA (Murata et al., 2001). La incorrecta modulación de la respuestas a estrés conducen a incrementar la sensibilidad al estrés, por ejemplo se discute que la acumulación de ABA es requerida para la acumulación de Pro, pero no solo la acumulación de ABA alcanza para acumular Pro (Verslues and Bray,

2006), también presenta alteraciones en la producción de ROS (Murata et al., 2001) y estas alteraciones conducen a incrementar la sensibilidad al estrés (Xiong and Zhu, 2003).



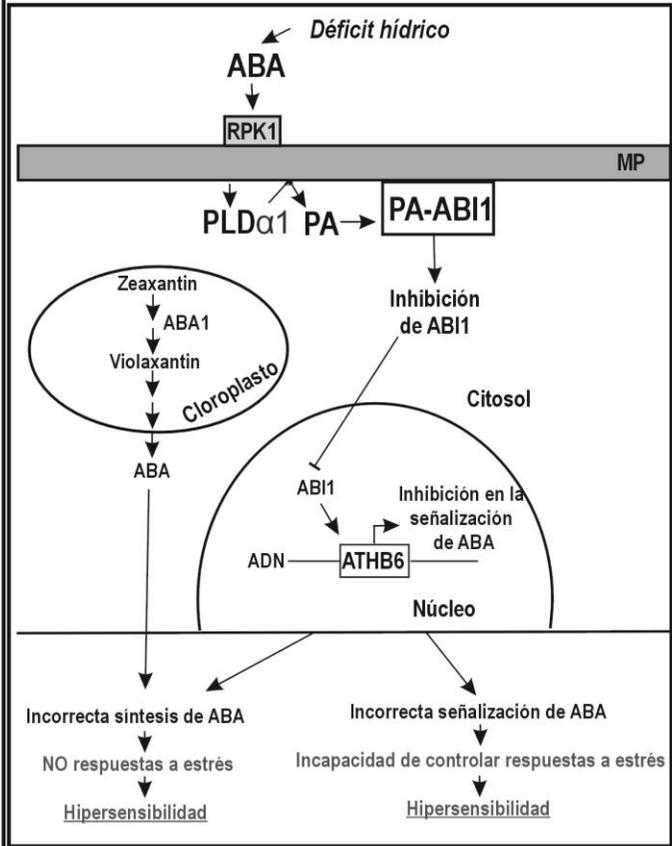
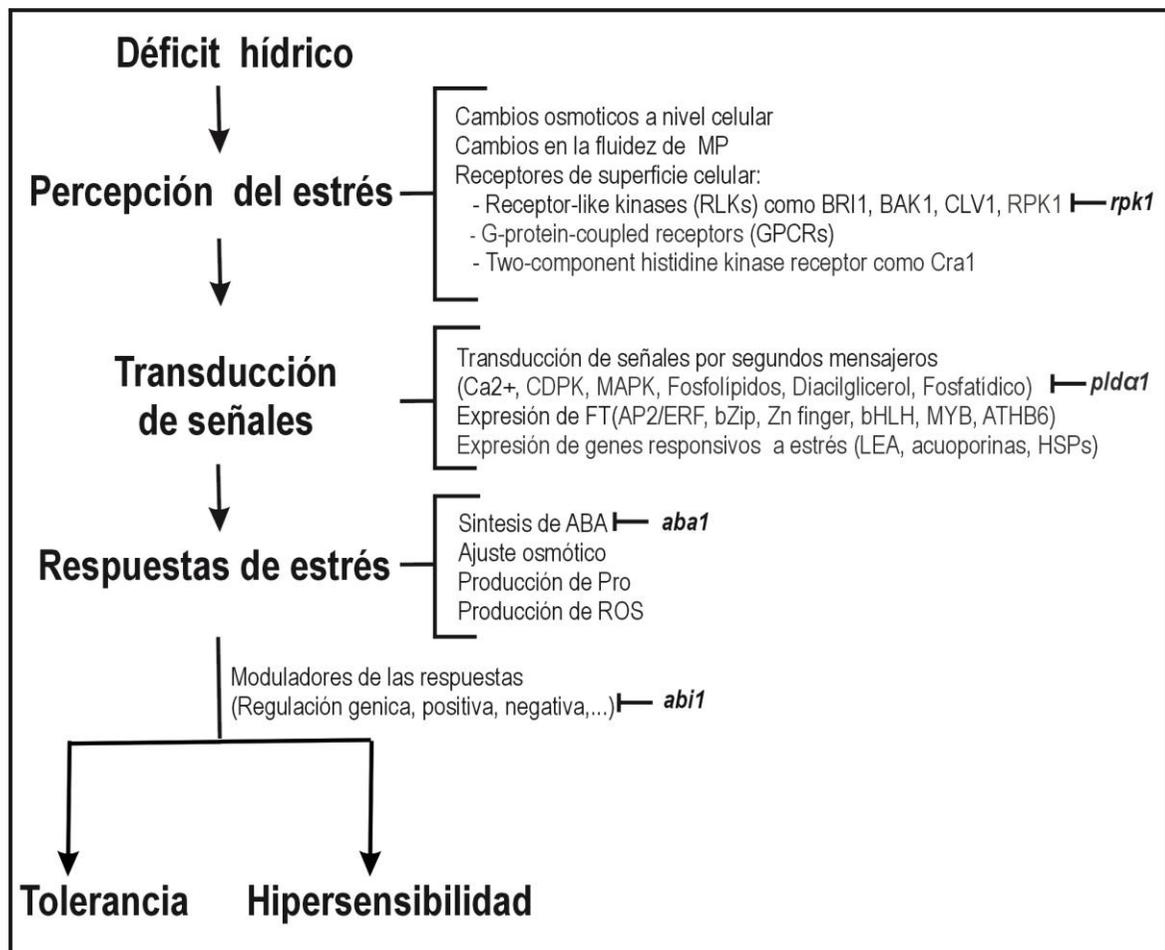


Figura 27: Modelo sobre la señalización que ocurre a nivel celular en respuesta al déficit hídrico en plantas. El estrés es percibido mediante receptores de superficie celular como RLKs, G-protein-coupled receptors, Two-component histidine kinase. También se conocen cambios en las propiedades de las MP y cambios osmóticos a nivel celular, resultado del déficit hídrico. La percepción desencadena una cascada de señalización intracelular que incluye la generación de segundos mensajero como Ca²⁺, CDPK, MAPK, Fosfolípidos, Diacilglicerol ó Ácido fosfatídico. Como consecuencia se genera la expresión de diversos FTs y finalmente la expresión de múltiples genes de respuesta a estrés asociados a la síntesis de ABA, control osmótico, síntesis de Pro, entre otros. La generación de las respuestas de estrés conduce a la tolerancia o a la sensibilidad al estrés. Los mutantes *rpk1*, *plda1*, *aba1* y *abi1* mencionados en el texto por presentar hipersensibilidad son indicados en la figura. Abreviaciones: MP, membrana plasmática. RLKs, Receptor-like-kinase. *BRI1*: Brassinosteroid receptor. *RPK1*: Receptor protein kinase1. *BAK1*: BR1-associated receptor kinase. *CLV1*: Clavata1. *GPCRs*: G-protein-coupled receptors. *Cra1*: cruciferina. Ca²⁺: Calcio. *CDPK*: Calcium-dependent protein kinases. *MAPK*: Mitogen-activated protein kinases. *FT*: Factores de transcripción. *LEA*: Late Embryogenesis Abundant proteins. *HSP*: Heat Shock Proteins. ABA: Ácido abscísico, Pro: Prolina, ROS: Especies reactivas del oxígeno. (Xiong et al., 2001; López-Pérez et al., 2009; Huang et al., 2012; Bhargava and Sawant, 2013; Osakabe et al., 2014).

El mutante *dry2/sqe1* y las respuestas a sequía

dry2/sqe1 presenta temperaturas foliares más elevadas que el salvaje en condiciones control, lo que indica de manera indirecta que sus estomas están más cerrados. Las plantas en general frente a episodios de sequía, entre otros factores ambientales, controlan el movimiento de los estomas, como estrategia para evitar la pérdida de agua intracelular (Schroeder et al., 2001). Sin embargo, frente a la situación de estrés impuesta la temperatura foliar del mutante fue menor a la del salvaje, evidenciando que el mismo fue incapaz de cerrar los estomas para controlar la pérdida de agua (**Fig.9**), indicando una diferencia en el comportamiento de la respuesta de las plantas del tipo salvaje.

El cierre estomático está asociado a la acumulación de ácido abscísico y a segundos mensajeros como las ROS inducidas en condiciones de estrés hídrico (Borsani et al., 2002; Finkelstein, 2013). Nuestros datos concuerdan con la información reportada por Posé et al. (2009) donde mostraron que *dry2/sqe1* no cierra los estomas frente a la aplicación externa de ABA con respecto a *Ler*, lo que indica que se requiere a *SQE1* para el correcto cierre estomático inducido por ABA, además el gen *ABA2*, asociado a la biosíntesis de la fitohormona ABA y al cierre estomático, está sobreexpresado en dicho mutante. *dry2/sqe1* presenta incapacidad de cerrar estomas mediante las vías de señalización desencadenadas por ABA (Posé et al., 2009), lo que podría explicar la incapacidad de cerrar estomas en episodios de sequía.

Sin embargo, esta incapacidad no es total, ya que se ha visto que frente a la aplicación externa de H₂O₂, se obtiene una correcta respuesta estomática, lo que indica que la señalización es posterior a las ROS (Wang and Song, 2008) es funcional en el mutante *dry2/sqe1* (Posé et al., 2009).

Para comprender cuál puede ser la causa de la alteración en la vía de señalización del cierre estomático en *dry2/sqe1*, comparamos las respuestas con algunos mutantes con genotipo similar. Un mutante que presenta la misma imposibilidad en el cierre estomático y disminución en las temperaturas foliares frente al déficit hídrico es el mutante *ost1* (OPEN STOMATA 1, según las siglas en inglés) mutado en una proteína quinasa del tipo SnRK2 (AT4G33950) que podría actuar en la red de señalización de ABA, en el intervalo entre la percepción de ABA y la producción de ROS (Mustilli et al., 2002). *dry2/sqe1* podría encontrarse alterado a este mismo nivel. En este sentido sería capaz de sentir el estrés lo que permitiría que se acumule ABA, pero es incapaz de sentir el aumento de esta fitohormona impidiendo desencadenar el cierre estomático. Existen diversos mensajeros entre la percepción de ABA y la producción de H₂O₂ que pueden estar alteradas en *dry2/sqe1*. Algunos de estos mensajeros son: MAPK (mitogen-activated protein kinases), concentración de calcio intracelular e interesantemente mensajeros lipídicos como el ácido fosfático y fosfolipasas entre otras (Wang and Song, 2008).

Una forma indirecta de evaluar si efectivamente el mutante es capaz de sentir la situación de sequía es a través de la medida de un marcador de estrés ya conocido, como la prolina (Pro). La acumulación de este osmolito es conocida durante episodios de sequía y ha sido usado como marcador de estrés para diversas especies vegetales (Borsani et al., 1999; Signorelli et al., 2013).

En este trabajo, observamos que durante la sequía impuesta en nuestros ensayos se incrementan los niveles de Pro en las plantas salvajes a partir del décimo día (**Tabla 6**). Curiosamente, el mutante *dry2/sqe1* presentó niveles significativamente mayores a *Ler* en situación de riego normal, lo que se correlaciona con la menor conductancia presente en esta situación, y dichos niveles se mantienen constantes durante todo el ensayo de sequía (**Tabla. 6**). Estos resultados son concordantes con la observación de (Posé et al., 2009) que muestra que los genes *P5CS1* y *P5CS2* asociados a la biosíntesis de Pro están sobreexpresados en el mutante.

La mayor acumulación de Pro en el mutante indica que el mismo está sometido a una mayor situación de estrés que el genotipo salvaje incluso en situaciones con estrés. Esto indicaría que el mutante sensa adecuadamente el estrés, pues responde, pero es incapaz de poner en marcha los mecanismos necesarios para evitar la pérdida de agua, lo que genera respuestas de hipersensibilidad al estrés.

Los mutantes en genes asociados al metabolismo de prolina comúnmente incrementan los niveles de Pro, y en consecuencia se incrementa la tolerancia a diversos estreses, por ejemplo sobreexpresando la enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetasa se acumula Pro y las plantas presentan un fenotipo de tolerancia a estrés osmótico (Kavi Kishor et al., 1995) o mutando una E3 ubiquitin ligase se obtiene acumulación de Pro y en consecuencia plantas con mayor tolerancia a la sequía (Ju et al., 2013). Sin embargo la mutación en *dry2/sqe1* presenta acumulación de Pro antes y durante el episodio de sequía impuesto y su fenotipo es de hipersensibilidad sugiriendo que el mutante sensa el estrés e incrementa los niveles de prolina para intentar evadir el episodio de estrés pero es incapaz de poner en marcha en forma adecuada los mecanismo de tolerancia.

Evaluación del estado redox intracelular

El estado redox en todas las células vegetales es generalmente reductor en condiciones óptimas de crecimiento, esto asegura la homeostasis del metabolismo redox en organismos que viven en una atmósfera oxidante (Kocsy et al., 2013). Sin embargo, como respuesta frente a condiciones de estrés, se producen grandes cambios en el equilibrio redox celular cuando la producción de especies reactivas del oxígeno sobrepasan las barreras antioxidantes (Jaspers and Kangasjärvi, 2010; Geigenberger and Fernie, 2014). En este trabajo, se estudió el estado redox de *Ler* y el mutante *dry2/sqe1* a través de diferentes estrategias (cambios en la oxido-reducción de *roGFP* (**Fig.**

10 y 11) y detección de O_2^- y $\cdot NO$ a través de sondas fluorescentes (**Fig. 12, 13, 14 y 15**) donde se observó que el citosol de *dry2/sqe1* se encuentra más oxidado que el citosol del salvaje en situación control. Estos resultados concuerdan con los cambios de expresión encontrados por Posé et al., (2009) en el mutante *dry2/sqe1* en el que genes de respuesta a estrés asociados al metabolismo oxidativo (*AtrbohB*; *AtrbohF*; *CAT2*; *CAT3*; *CSD1* y *CCS*) están sobreexpresados. A su vez, en esta tesis encontramos que el estado de oxidación se incrementa en situaciones de estrés osmótico para plantas salvajes pero más aún para *dry2/sqe1*.

La acumulación de ROS y RNS en *dry2/sqe1* ya sea con o sin sequía impuesta, evidencia que el mutante es capaz de sentir el estrés e incluso lo percibe en presencia y ausencia de déficit hídrico en el suelo. Diversos estudios evidencian que la acumulación de estas especies reactivas tanto del oxígeno como del nitrógeno son encendidas como respuestas frente a diversos tipos de estreses (Greene, 2002; Jaspers and Kangasjärvi, 2010; Lee and Park, 2012; Grob et al., 2013) y oxidan los compartimentos celulares (Kocsy et al., 2013).

En los últimos años se han publicado diversos trabajos donde se propone al $\cdot NO$ como molécula clave en el desarrollo y determinación de la arquitectura radicular. Por ejemplo, se propuso un rol central en el desarrollo de raíces laterales en plantas de tomate (Correa-Aragunde et al., 2004), en la elongación de raíces de maíz (Manoli et al., 2014), ó como regulador positivo del crecimiento de pelos radiculares (Lombardo et al., 2006). Esta tesis mostró que el aumento de la concentración de $\cdot NO$ (por un dador exógeno, el SNP) hasta niveles de $\cdot NO$ similares a los encontrados endógenamente en el mutante *dry2/sqe1*, provocan en el genotipo salvaje un enlentecimiento del crecimiento en longitud de la raíz principal y un aumento en el número de las raíces laterales (**Fig. 16 y 17**). Sin embargo, para concluir que el fenotipo radicular observado en *dry2/sqe1* se pueda deber a una mayor concentración de $\cdot NO$ sería fundamental lograr revertir el fenotipo de este mutante con un secuestrador de $\cdot NO$. En esta tesis se intentó secuestrar $\cdot NO$ con el fin de recuperar el crecimiento radicular en *dry2/sqe1*. Estos ensayos fueron realizados con reactivos conocidos que capturan $\cdot NO$ como el cPTIO ó con medios sin nitrato para disminuir la actividad de la enzima nitrato reductasa principal fuente de $\cdot NO$ en plantas (Yamasaki and Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002; Sakihama et al., 2002). Los ensayos mostraron inhibición en el crecimiento de las plantas, cuestionando la verdadera función secuestradora del cPTIO y del correcto crecimiento de plantas en medios sin nitrato (datos no mostrados). De todas formas el cPTIO es usado en la literatura como scavenger de $\cdot NO$, donde incluso se han inhibido raíces laterales e incrementado el largo total de raíces de plantas salvajes de tomate (Correa-Aragunde et al., 2004). Actualmente se discute la fiabilidad del cPTIO con scavenger de $\cdot NO$ (D'Alessandro et al., 2013).

En base a los resultados generados hasta el momento podemos especular sobre los escenarios propuestos en la Figura 8 para definir al mutante *dry2/sqe1*. Hemos discutido que *dry2/sqe1* tiene la capacidad de sensar el estrés, además sin déficit hídrico impuesto el mutante responde como si el estrés estuviera presente. Por ejemplo, a nivel estomático, aunque presente la incapacidad de cerrar estomas, el estrés es percibido. Además, mediante un indicador de estrés como la prolina, detectamos acumulación en *dry2/sqe1*, incluso en ausencia de estrés, demostrando que el estrés es percibido. Por otro lado, *dry2/sqe1* presenta las respuestas desencadenadas frente a estrés hídrico, como el desplazamiento de la homeostasis redox celular, lo que confirma esta hipótesis. Por esto podemos plantear un escenario donde la mutación en *SQE1* impide un control adecuado de la homeostasis hídrica induciendo la maquinaria celular de defensa frente al estrés. Resta por conocer que cambios celulares, genéticos o fisiológicos y a qué nivel se desencadena la hipersensibilidad en este mutante con una *SQE1* disfuncional. A continuación se discuten los resultados obtenidos a partir de las estrategias experimentales dirigidas a contestar esta pregunta.

La alteración en la composición de membranas celulares en *dry2/sqe1* contribuye al fenotipo hipersensible

Existe evidencia reciente sobre la participación de lípidos en la detección primaria frente a cambios ambientales y en la activación celular y hormonal asociadas a la regulación de cascadas de señalización (Golldack et al., 2014). Por ejemplo, el estrés por sequía induce cambios en el contenido de lípidos de membranas de cloroplastos necesarios para mantener y estabilizar las membranas bajo condiciones de estrés (Torres-Franklin et al., 2007), además existen lípidos que reorganizan las membranas para enfrentar a los episodios de estrés como el ácido fosfatídico (Hong et al., 2010). Es posible que *dry2/sqe1* tenga un fenotipo de hipersensibilidad a sequía por presentar alteración en las membranas causado por la mutación en *SQE1*.

Para entender la relación que existe entre las respuestas a estrés observadas y la composición alterada de esteroides del mutante, estudiamos la abundancia y actividad de proteínas de membrana asociadas a microdominios lipídicos enriquecidos en esteroides, la localización de proteínas de tonoplasto y vesículas y la fluidez de las membranas celulares.

Las fases ordenadas asociadas a membranas, son denominadas frecuentemente como fases colesterol dependientes debido a su enriquecimiento en colesterol en las células animales (Almeida et al., 2005; London, 2005; Almeida, 2009), y además se ha observado por presencia de otros esteroides como ergosterol en hongos y estigmaesterol y sitoesterol en plantas (Beck et al., 2007; Dufourc, 2008). Con el fin de evaluar la fluidez de las membranas nos basamos en algunas propiedades físico-químicas de las moléculas de agua presentes en las membranas biológicas. El grado de empaquetamiento de los lípidos en las membranas biológicas puede ser

evaluado asumiendo que cuanto más empaquetamiento hay en la membrana, más ordenada está y esto excluye las moléculas polares de agua de la bicapa lipídica no polar. Esto resulta en cambios en la polaridad del entorno que pueden ser detectados por medio de sondas fluorescentes sensibles a cambios en la polaridad del entorno, tales como LAURDAN (Golfetto et al., 2015) o Rojo Nilo (Klymchenko and Kreder, 2014). En esta tesis se evaluó la fluidez de membranas *in vivo* a través del análisis de fasores espectrales aplicados a la emisión de fluorescencia de la sonda LAURDAN y del Rojo Nilo. El análisis de fasores de las membranas de pelos radiculares del mutante *dry2/sqe1* evidenció que el mismo presenta membranas más fluidas que el salvaje *Ler* (**Fig. 19 y 20**).

Aunque existe fuerte evidencia que LAURDAN es efectivo en la detección de distintos estados de fluidez de membrana en diversos tejidos u órganos *in vivo*, por ejemplo se ha detectado una gran heterogeneidad de dominios de membranas de embriones de zebrafish *in vivo* de diferentes órganos (Owen et al., 2010) con LAURDAN y además en cultivos celulares de mamífero se identificaron regiones con diferente fluidez e incluso se pudo distinguir entre las diferentes membranas celulares según el análisis de fasores espectrales del LAURDAN (Golfetto et al., 2015). Sin embargo el uso en plantas mostró ciertos inconvenientes. La autofluorescencia que presentan las raíces por la contribución de las ligninas se solapa con la emisión de fluorescencia de esta sonda, e impide la correcta visualización de su emisión (**Fig. 19**). Como alternativa utilizamos la sonda fluorescente Rojo Nilo (**Fig. 20**), la cual no presenta solapado su espectro de emisión con el de las ligninas y permitió continuar el estudio de la fluidez de las membranas.

Nuestros resultados concuerdan con Posé et al. (2009) y Doblaz et al. (2013) que muestran que la composición de estigmaesterol y sitoesterol en raíces de *dry2/sqe1* es menor en comparación con *Ler*. Estos dos tipos de esteroides son generadores de dominios altamente ordenados en las membranas de las células vegetales (Mannock et al., 1970; Grosjean et al., 2015) lo que explicaría los resultados de fluidez de membrana encontrados en el mutante.

La fluidez de las membranas plasmáticas juega un rol clave en la formación los microdominios, donde un ambiente rígido favorecería a la formación de estos Lipid Raft (Golfetto et al., 2015). Los microdominios de membrana tienen la capacidad de influir en la organización espacio-temporal de los complejos de proteínas, por lo tanto permiten la regulación de diversos procesos celulares (Cacas et al., 2012). Roche et al., (2008) describieron como el secuestro de esteroides de las membranas plasmáticas de células vegetales genera alteración en la formación de microdominios lipídicos. En este contexto, se evaluó en *dry2sqe1*, que presentó mayor fluidez de membranas, que sucede con proteínas conservadas en estas regiones como lo son las NADPH oxidasas (NOX). Se detectó que en *dry2/sqe1* la NOX de pelos radiculares no tiene la localización habitual (Sena et al., 2012) y su actividad enzimática está reducida

(Fig. 21). Resultados similares se encontraron en *Picea meyeri* donde se ha sugerido que los microdominios enriquecidos en esteroides favorecen la localización y actividad de la NOX, ya que la inhibición de la producción de esteroides genera su deslocalización y la disminución de su actividad en tubos polínicos (Liu et al., 2009a). También hay que tener en cuenta que la actividad NOX está relacionada a la producción de superóxido, el cual actuaría como molécula que modula el crecimiento y desarrollo en las células vegetales (Foreman et al., 2003; Carol et al., 2005), en este contexto podríamos atribuir algunos de los defectos en el desarrollo que presenta *dry2/sqe1* a la pérdida de función de esta enzima.

Por otro lado, el principal y más abundante componente lipídico de las membranas plasmáticas no son los esteroides, sino que son los fosfolípidos (Furt et al., 2011). La función de los fosfolípidos no es solo estructural sino que además cumple funciones de señalización, donde participarían en “detectar” señales extracelulares desencadenando transducciones de señales intracelulares (Lin et al., 2014). Por ejemplo, frente a estreses ambientales se generan cambios sobre la composición de fosfolípidos de las membranas celulares como mecanismo de respuesta (McLoughlin and Testerink, 2013). Se ha visto que inhibiendo la *SQE1* con terbinafina en suspensiones celulares de tabaco se genera aumento de escualeno y aparición de TAGs (Wentzinger and Bach, 2002) de manera similar que en *dry2/sqe1* (Fig.18), sin embargo el mecanismo por el cual ambos metabolitos aumentan no ha sido descrito. Por otro lado, se cuantificó la fosfolipasa D α (PLD), enzima que hidroliza fosfolípidos estructurales de membrana para generar el ácido fosfático (PA) (Distéfano et al., 2012), un segundo mensajero implicado en las respuestas a estrés ampliamente estudiado en plantas (Hong et al., 2010; McLoughlin and Testerink, 2013). Las raíces de *dry2/sqe1* mostraron un incremento en la cantidad de PLD (Fig. 22), el cual es un comportamiento también observado en plantas en respuesta a estrés (Munnik et al., 2000; Katagiri et al., 2001; Darwish et al., 2009; Vu et al., 2015). Además, se ha visto que cambios en las membranas plasmáticas podrían generar aumentos en la actividad de PLDs como mecanismo para mantener la homeostasis celular (Li et al., 2009).

Las membranas plasmáticas además de una barrera biológica entre el espacio extracelular e intracelular, son esenciales para el mantenimiento de la integridad celular. En el espacio intracelular existe un extenso sistema de membranas que se compone de muchos organelos compuestos por membranas las cuales intercambian lípidos y proteínas mediante el tráfico vesicular (Bassham et al., 2008). Los esteroides al igual que en las membranas plasmáticas son componentes fundamentales del sistema de membranas en particular del tráfico vesicular. Plantas *dry2/sqe1* con proteínas en tonoplasto (RabG3f) y endosomales (RabC1) fusionadas a YFP de manera estable fueron utilizadas como herramienta para analizar el tráfico vesicular. Las proteínas del tipo Rabs son reguladores claves en los eventos de fusión que se producen en el sistema de membranas intracelular (Numrich and Ungermann, 2014) . El

mutante *dry2/sqe1* mostró una deslocalización de la señal de la proteína RabG3f la cual en el salvaje se encuentra embebida en la superficie del tonoplasto y en endosomas tempranos (**Fig. 24**). RabG3f o también llamada Rab7 participa en el tráfico desde la maduración de los endosomas tempranos hacia la superficie de las vacuolas (Numrich and Ungermann, 2014). La deslocalización de señal en el tonoplasto y la aparición de agregados endosomales indica la disrupción del tráfico a este nivel. Además nuestros resultados usando brefeldina (BFA) indican disrupción o inhibición del tráfico pues las imágenes de *dry2/sqe1* son similares a los encontrados con los tratamientos con BFA. La pérdida de función de Rab7 genera una maduración endosomal defectuosa y reducción de proteínas que median la señalización entre el tráfico desde los endosomas hacia la vacuola como la familia de las proteína kinasas TOR (target of rapamycin) que median el crecimiento celular (Numrich and Ungermann, 2014). Aquí proponemos que la falta de esteroides en *dry2/sqe1* genera la maduración endosomal defectuosa debido a la localización incorrecta de la proteína Rab7.

Por otro lado, mediante la construcción con RabC1 se observó también la aparición de agregados endosomales sobre la cara interna de la bicapa lipídica en raíces de *dry2/sqe1*, perdiéndose la señal de agregados homogéneamente distribuidos en el citosol de las plantas salvajes (**Fig. 23 y 24**). La RabC1 o también llamada Rab 18 se asocia con el tráfico de endosomas entre el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático y también puede estar asociado con el reciclado de la membrana plasmática (Rutherford and Moore, 2002; Dejgaard et al., 2008). Se ha visto además que la sobreexpresión de esta proteína genera tolerancia frente a diversos estreses (Shi et al., 2014; Xinli and Lei, 2015).

En base a nuestros resultados sobre las proteínas RabC1 y RabG3f, proponemos que la deficiencia de esteroides en *dry2/sqe1* genera endomembranas defectuosas llevando a la pérdida en la localización de estas proteínas y alteraciones en el tráfico vesicular. Estos cambios de composición, fluidez o biogénesis de las membranas pueden explicar también los cambios observados en la localización y actividad de la NADPH oxidasa (**Fig. 21**).

En búsqueda de explicar cómo la alteración en las membranas celulares desencadenan la sensibilidad a sequía en *dry2/sqe1* encontramos que años atrás era una enigma como los lípidos podían asociarse al estrés abiótico y participar en la traducción de señales que se desencadenan, pero en los últimos años se ha avanzado en este conocimiento (Golldack et al., 2014). El tráfico vesicular se requiere para muchos procesos de transducción de señales desencadenadas por la percepción del estrés. Por ejemplo, proteínas inducidas por el ABA como RHD3 (ROOT HAIR DEFECTIVE 3) ó syntaxin-like proteins, están involucradas en el tráfico vesicular entre el ER y el Golgi o con otros componentes asociados al tráfico vesicular respectivamente (Xiong and Ishitani, 2006). Estas evidencias apoyan la idea que la generación de un

sistema endomembranas defectuoso, generado por la mutación en *SQE1*, contribuiría a un fenotipo sensible, como sucede con *dry2/sqe1*.

La adaptación de las plantas frente a los cambios en la demanda y suministro hídrico ambiental requiere de una rápida detección de la situación de estrés y de las señales que se inducen, en este contexto un desafío que deben atravesar las células vegetales es el mantenimiento tanto de las membranas plasmáticas como del sistema endomembrana (Golldack et al., 2014). Actualmente existe evidencia sobre la importancia de las moléculas lipídicas en la organización de las membranas celulares durante la detección de cambios ambientales desfavorables y en el desencadenamiento y regulación de cascadas de señalización como forma de tolerar diferentes tipos de estreses (Torres-Franklin et al., 2007; Darwish et al., 2009; Du et al., 2013; Gasulla et al., 2013; Lu et al., 2013). Por ejemplo, un mutante en *Arabidopsis* con una *LTP3* (Lipid Transfer Protein 3) disfuncional presenta un incremento en la pérdida de agua por transpiración y es hipersensible a la sequía, los autores proponen que cambios en lípidos de membranas están vinculados a la regulación de la transpiración y contribuyen a la tolerancia frente a la sequía (Guo et al., 2013).

Finalmente, apoyados en la Figura 28 a partir de nuestro trabajo podemos sugerir que el déficit de esteroides generado por la disminución de la actividad de *SQE1*, podría provocar alteraciones a nivel de la membrana plasmática (MP), simulando la pérdida de integridad que sufren las MP de las plantas cuando se impone un déficit hídrico. Hemos visto que la percepción del estrés es iniciada principalmente a este nivel, por esto sugerimos que la alteración en las membranas en *dry2/sqe1* podrían estar simulando una situación similar a cuando se está sensando el estrés. Receptores de membrana del tipo LRR asociados a la percepción al estrés, algunos descritos por (Osakabe et al., 2013) como por ejemplo, DISEASE RESISTANCE PROTEINS (TIR-NBS), ERECTA (ERL1), CLAVATA (CLV2), CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1) (CRK1) se encuentran sobreexpresados en *dry2/sqe1* (Posé et al., 2009). Es interesante también mencionar que hemos descrito alteraciones en el tráfico vesicular en *dry2/sqe1*, que podrían imposibilitar el correcto transporte de proteínas a las membranas plasmáticas.

Comúnmente, luego de que se genera la percepción del estrés se desencadena la transducción de señales mediada por segundos mensajeros para terminar en la generación de las respuestas a estrés. En esta tesis encontramos que el mutante tiene más *PLD* y mayor actividad de la misma, lo que indicaría de manera indirecta que segundos mensajeros como el *PA* podrían estar alterados en *dry2/sqe1*. Hemos discutido que una vez establecido el déficit hídrico en plantas la actividad de esta enzima es clave para el desencadenamiento de la transducción de señales, por ejemplo para la producción del *ABA* o de *ROS*. Al igual que nosotros, también Posé et al., (2009) encontró sobreexpresadas muchas de las isoformas de las fosfolipasas

en el mutante. También es interesante comentar que si bien no conocemos los niveles de ABA en *dry2/sqe1*, suponemos por trabajos anteriores de Posé et al., 2009 y Doblás et al., 2013 que se encuentran incrementados. El aumento en el contenido de PA mediado por la PLD secuestra a un regulador negativo de la síntesis de ABA, llamado ABI1, que regula los niveles intracelulares de esta fitohormona, principalmente mediante la unión al ADN de un factor de transcripción llamado ATHB6. En este sentido no existiría esta regulación negativa en *dry2/sqe1* (ATHB6 presenta baja expresión en *dry2/sqe1*, según Posé et al., 2009) lo que desencadenaría en la continua síntesis de ABA potenciado la activación de genes de respuesta a estrés dependiente de ABA, como lo mostró Posé et al. (2009). Sin embargo *dry2/sqe1* no cierra los estomas.

La localización del PA en las membranas plasmáticas afecta directamente la localización, actividad y funciones biológicas de sus efectores proteicos (Zhao, 2015). Se ha sugerido además la localización de este mensajero lipídico en regiones de membrana particulares como en microdominios lipídicos (Wang et al., 2006). Hemos visto que el PA une ABI1 anclándolo en regiones de membrana plasmática, de manera de que se generen mecanismos de respuesta al ABA necesarios para evadir la situación de estrés (Zhang et al., 2004b). En este contexto el estado de las membranas de *dry2/sqe1* podría estar causando la no correcta localización del PA, el cual no ancla correctamente ABI1, el cual bloquea las respuestas al ABA, imposibilitando el cierre de estomas.

Otro punto importante es que la modulación de las respuestas en el mutante no está siendo controlada, ya que se detectaron altos niveles de Pro y oxidación intracelular mediada. Es posible que esta imposibilidad en modular las respuestas sea a causa de la constatación simulación en la percepción del estrés dada por el genotipo de *dry2/sqe1*, que presenta membranas afectadas.

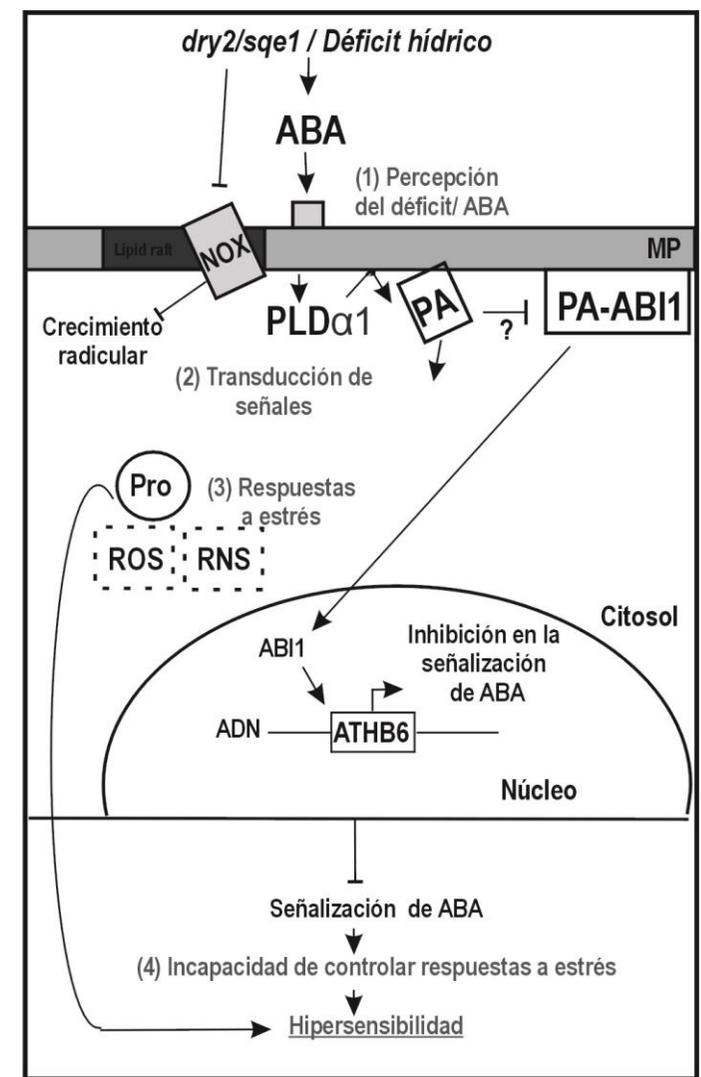
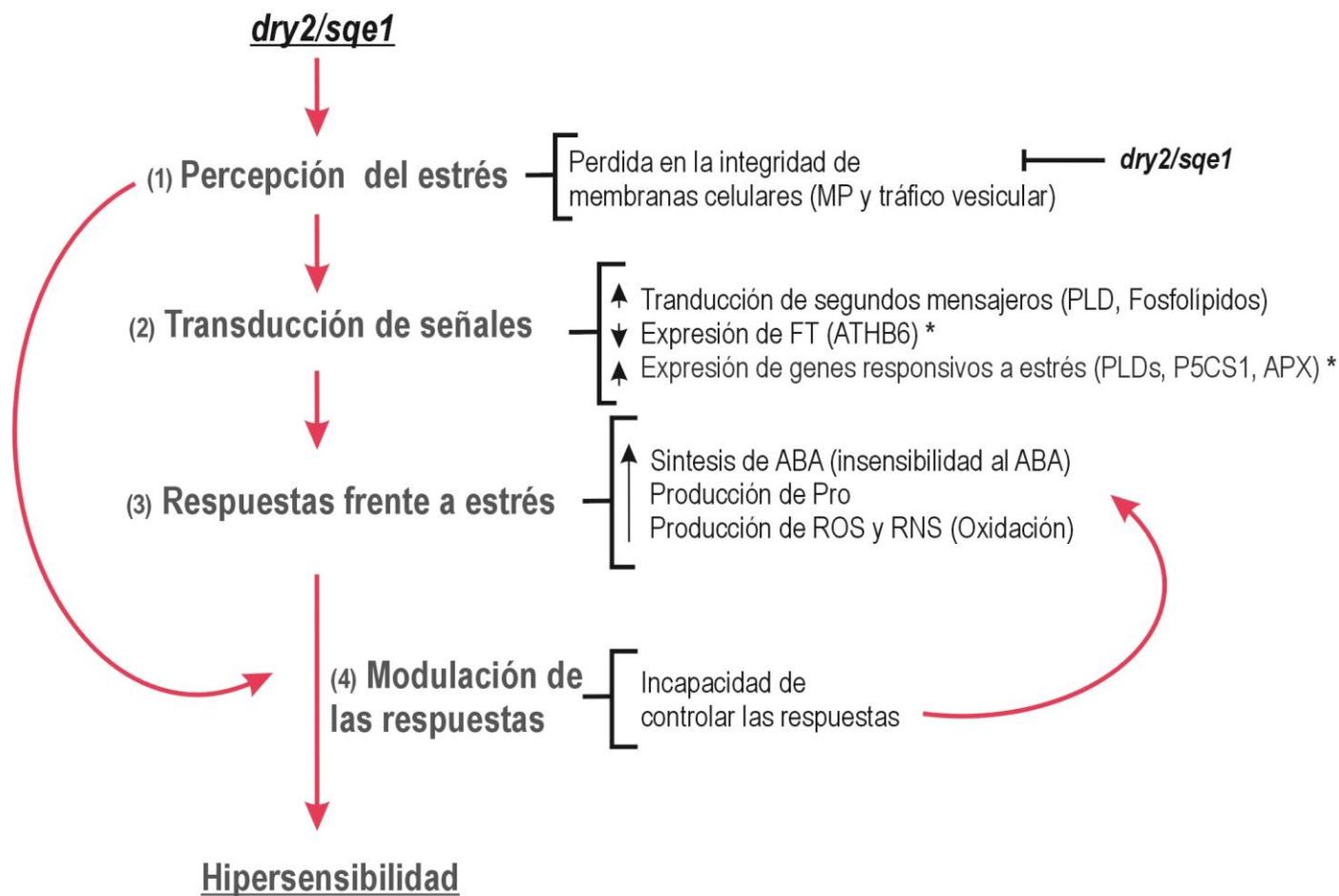


Figura 28: Modelo final propuesto para explicar la hipersensibilidad de *dry2/sqe1*. La mutación en *SQE1* genera la pérdida en la integridad de las membranas celulares, tanto plasmáticas como endomembranas, y podría estar simulando el inicio de la percepción del estrés, de la misma forma que las plantas perciben el estrés cuando el déficit hídrico se impone. Como consecuencia se inicia la traducción de señal para desencadenar el encendido de las respuestas. En esta tesis observamos que enzimas como las PLD, que participa en la transducción de señales durante el cierre estomático en plantas sometidas a estrés, o el contenido de fosfolípidos están alterados y según Posé et al., 2009 genes sensibles a estrés también lo están. Por otro lado hemos encontrado respuestas como cierre estomático, acumulación de Pro, perturbación del estado redox dado por acumulación de ROS y RNS afectado en *dry2/sqe1*. La incapacidad de controlar estas respuestas, generaría el desencadenamiento del fenotipo hipersensible. Esta incapacidad puede ser debida a la constante percepción de estrés generada por las membranas defectuosas. * Posé et al., 2009.

Mapeo de sud3, un mutante supresor de dry2/sqe1

Como estrategia para identificar componentes genéticos que ayuden en la comprensión de *dry2/sqe1*, a partir de una búsqueda en condiciones donde *dry2/sqe1* expresa su fenotipo, fueron aislados varios mutantes (llamados *sud* porque son supresores de *dry2/sqe1*) que revierten la mayor parte de los defectos en el desarrollo de mutante (Posé et al., 2009). En este sentido, Doblas et al., 2013 identificó un supresor de *dry2/sqe1*, llamado *sud1*, el cual codifica para una E3 ubiquitin ligasa la cual estaría regulando positivamente la actividad de la HMGR u otra enzima varios pasos metabólicos antes de la reacción catalizada por SQE1 lo que restablecería el flujo de esteroides, revertiendo el fenotipo. Siguiendo esta misma estrategia utilizando otro supresor (*sud3*), en esta tesis intentamos identificar el gen afectado utilizando mapeo genético. *sud3* presenta una reversión parcial al fenotipo salvaje tanto en raíces como en parte aérea (**Fig.25**).

Mediante el mapeo genético con marcadores moleculares del tipo SSLP, iniciamos el mapeo de *sud3*, y se logró mapear una región en el cromosoma III flanqueada entre dos marcadores moleculares F18C1 y NIT 1.2 (**Fig 26 y Tabla 7**). Posteriormente mediante secuenciación masiva y análisis informáticos profundizamos en el mapeo, logrando identificar 22 genes candidatos que portan mutaciones que podrían estar asociadas a la mutación buscada (**Tabla 8**). Esta tesis llegó hasta este punto, sin poder lograr definir el gen responsable de la supresión dentro de los 22 genes candidatos. Como alternativas para poder avanzar en la identificación de *sud3* se podrían seguir varias estrategias. Arabidopsis al ser un organismo modelo presenta su genoma completamente secuenciado y presenta un completo banco de germoplasma con mutantes en la gran mayoría de los 22 genes, esto nos permitiría obtener cada uno de los 22 genes identificados mutados para poder realizar cruces genéticas con *dry2/sqe1* y analizar si el doble mutante tiene fenotipo salvaje.

Pese a no obtener la identificación del gen mutado en *sud3*, realizamos la búsqueda de cada uno de los 22 genes candidatos, y seleccionamos para el análisis uno que podría ser de interés.

MAP KINASE KINASE 8 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 8) fue uno de los genes candidatos identificados. MKK8 está vinculada con la activación de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) mediante su fosforilación para el desencadenamiento de cascadas de señalización (**Fig.29**) (Dóczi et al., 2007). El genoma de Arabidopsis thaliana presenta 10 MKKs, pero solo algunas, incluida la MKK8 se han visto relacionadas directamente con la activación de genes inducidos por estrés o por ABA, como por ejemplo RD29A y RD29B (Hua et al., 2006).

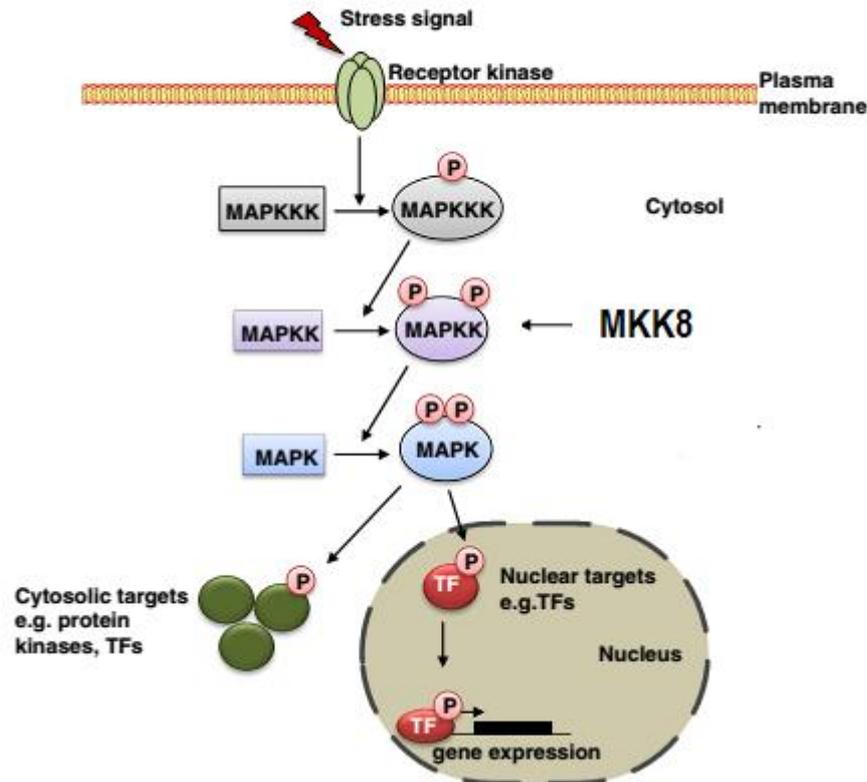


Figura 29: Cascada de MAPK típica. Las cascadas de MAPK se organizan generalmente como vías modulares en los que la activación de MAPKKK inicia la fosforilación y la posterior activación secuencial de MAPKKs y MAPKs. A través de su actividad quinasa, las cascadas de MAPK traducen señales ambientales en diferentes tipos de respuestas, por ejemplo, activación de factores de transcripción, para reorganizar la expresión génica y adaptación al estrés. (Danquah et al., 2014)

En este contexto, proponemos que la pérdida de función de MKK8 en fondos *dry2/sqe1* generaría una modulación de las respuestas a estrés que impediría el desencadenamiento excesivo de respuestas al déficit que presenta *dry2/sqe1* y le permitiría evadir la situación de estrés que presenta este mutante. Resultados que apoyan esta hipótesis son por ejemplo que los niveles de expresión de los genes RD29A y RD29B que son activados por MKK8 están sobreexpresados en *dry2/sqe1* (Posé et al., 2009), de la misma forma que son sobreexpresados en plantas cuando son sometidas a diferentes tipos de estrés abióticos (Danquah et al., 2014).

Conclusiones

- La alteración del perfil de esteroides generada como consecuencia de la mutación en *SQE1* induce mecanismos de percepción y respuestas al déficit hídrico en ausencia de una situación de estrés.
- La alteración de la localización de proteínas de membrana como las NOX, consecuencia del déficit de esteroides, podría estar vinculada con algunos de los defectos en el desarrollo radicular.
- El tráfico vesicular parece ser altamente dependiente de esteroides y este sería necesario para una correcta respuesta a déficit hídrico.
- La imposibilidad de modular las respuestas al estrés genera un fenotipo hipersensible.

Bibliografía

- Abdelgawad H, Vos D De, Zinta G, Domagalska MA, Beemster GTS** (2015) Grassland species differentially regulate proline concentrations under future climate conditions: an integrated biochemical and modelling approach. *New Phytol* 1–16
- Able AJ, Guest DI, Sutherland MW** (1998) Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Plant Physiol* **117**: 491–499
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. pp 642-92
- Almeida PFF** (2009) Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers. *Biochim Biophys Acta- Biomembr* **1788**: 72–85
- Almeida PFF, Pokorny A, Hinderliter A** (2005) Thermodynamics of membrane domains. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1720**: 1–13
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399
- Atkinson NJ, Lilley CJ, Urwin PE** (2013) Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis thaliana* to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* **162**: 2028–2041
- Babula-Skowrońska D, Ludwików A, Cieśla A, Olejnik A, Cegielska-Taras T, Bartkowiak-Broda I, Sadowski J** (2015) Involvement of genes encoding ABI1 protein phosphatases in the response of *Brassica napus* L. to drought stress. *Plant Mol Biol*. doi: 10.1007/s11103-015-0334-x
- Bagatolli LA, Mouritsen OG** (2013) Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? *Front Plant Sci* **4**: 1–6
- Barnett NM, Naylor AW** (1966) Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. *Plant Physiol* **11**: 1222–1230
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, Ponce MR, Micol JL** (2005) A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* **56**: 2071–2083
- Bassham DC, Brandizzi F, Otegui MS, Sanderfoot AA** (2008) The secretory system of *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* **65**: 1–29
- Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, Dufourc EJ** (2007) Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J* **21**: 1714–1723

- Bell E, Takeda S, Dolan L** (2009) Reactive Oxygen Species in Growth and Development. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 43–53
- Bellin D, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H** (2013) Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Mol plant-Microbe Interact* **26**: 271–277
- Benveniste P** (2002) Sterol Metabolism. *Arabidopsis Book* **38**: 1–31
- Benveniste P** (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 429–557
- Berger J** (1987) Guide to molecular cloning techniques, First Edit. pp 152
- Bhargava S, Sawant K** (2013) Drought stress adaptation: Metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breed* **132**: 21–32
- Blum H, Beier H, Gross HJ** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99
- Borsani O, Cuartero J, Valpuesta V, Botella MÁ** (2002) Tomato *tos1* mutation identifies a gene essential for osmotic tolerance and abscisic acid sensitivity. *Plant J* **32**: 905–914
- Borsani O, Díaz P, Monza J** (1999) Proline is Involved in Water Stress Responses of *Lotus corniculatus* Nitrogen Fixing and Nitrate Fed Plants. *J Plant Physiol* **155**: 269–273
- Bouillon HMA, Benvensite P** (1978) Sterol biosynthetic capability of purified membrane fractions from maize coleoptiles. *Phytochemistry* **17**: 1037–1042
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Cacas JL, Furt F, Le Guédard M, Schmitter JM, Buré C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule JJ, Simon-Plas F, Mongrand S** (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Prog Lipid Res* **51**: 272–299
- Carol RJ, Takeda S, Linstead P, Durrant MC, 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
- Carter CJ, Bednarek SY, Raikhel N V** (2004) Membrane trafficking in plants: new discoveries and approaches. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 701–707
- Chaki M, Fernández-Ocaña AM, Valderrama R, Carreras A, Esteban FJ, Luque F, Gómez-Rodríguez M V, Bergara-Morales JC, Corpas FJ, Barroso JB** (2009) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower–mildew interaction. *Plant Cell Physiol* **50**: 265–279

- Charest C, Phan CT** (1990) Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): Properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiol Plant* **80**: 159–168
- Clouse SD** (2002) *Arabidopsis* Mutants Reveal Multiple Roles for Sterols in Plant Development. *Plant Cell* **14**: 1995–2000
- Corpas FJ, Chaki M, Ocaña AF, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, Del Río LA, Barroso JB** (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol* **49**: 1711–1722
- Corpas FJ, Leterrier M, Valderrama R, Airaki M, Chaki M, Palma JM, Barroso JB** (2011) Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Sci* **181**: 604–611
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L** (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**: 900–905
- D'Alessandro S, Posocco B, Costa A, Zahariou G, Lo Schiavo F, Carbonera D, Zottini M** (2013) Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings. *Front Plant Sci* **4**: 1–7
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H** (2014) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol Adv* **32**: 40–52
- Darwish E, Testerink C, Khalil M, El-Shihy O, Munnik T** (2009) Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant Cell Physiol* **50**: 986–997
- Dat J, Vandenberghe S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779–795
- Dejgaard SY, Murshid A, Erman A, Kizilay O, Verbich D, Lodge R, Dejgaard K, Ly-Hartig TBN, Pepperkok R, Simpson JC, et al** (2008) Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *J Cell Sci* **121**: 2768–2781
- Díaz P, Borsani O, Márquez A, Monza J** (2005) Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source. *Plant Growth Regul* **46**: 223–232
- Diener AC, Li H, Zhou W, Whoriskey WJ, Nes WD, Fink GR** (2000) Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell* **12**: 853–870
- Dinter A, Berger EG** (1998) Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* **109**: 571–590

- Distéfano AM, Scuffi D, García-Mata C, Lamattina L, Laxalt AM** (2012) Phospholipase D δ is involved in nitric oxide-induced stomatal closure. *Planta* **236**: 1899–1907
- Doblas VG, Amorim-Silva V, Posé D, Rosado A, Esteban A, Arró M, Azevedo H, Bombarely A, Borsani O, Valpuesta V, et al** (2013) The SUD1 gene encodes a putative E3 ubiquitin ligase and is a positive regulator of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 728–743
- Dóczi R, Brader G, Pettkó-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige M, Hirt H** (2007) The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* **19**: 3266–3279
- Dooley CT, Dore TM, Hanson G., Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY** (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* **279**: 22284–22293
- Du ZY, Chen MX, Chen QF, Xiao S, Chye ML** (2013) *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein ACBP1 participates in the regulation of seed germination and seedling development. *Plant J* **74**: 294–309
- Dufourc EJ** (2008) Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol* **1**: 63–77
- Espenshade PJ, Hughes AL** (2007) Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **41**: 401–427
- Finkelstein R** (2013) Abscisic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* **11**: 1–36
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, et al** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442–446
- Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, et al** (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **50**: 2123–2132
- Furt F, Simon-Plas F, Sébastien M** (2011) Lipids of the Plant Plasma Membrane. *Plant Cell Monogr* **19**: 3–30
- García-Mata C, Lamattina L** (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**: 1196–1204
- Gasulla F, Vom Dorp K, Dombrink I, Zähringer U, Gisch N, Dörmann P, Bartels D** (2013) The role of lipid metabolism in the acquisition of

desiccation tolerance in *Craterostigma plantagineum*: A comparative approach. *Plant J* **75**: 726–741

Geigenberger P, Fernie AR (2014) Metabolic Control of Redox and Redox Control of Metabolism in Plants. *Antioxid Redox Signal* 1–33

Geldner N, Dénervaud-Tendon V, Hyman DL, Mayer U, Stierhof Y-D, Chory J (2009) Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J* **59**: 169–78

Golfetto O, Hinde E, Gratton E (2015) The Laurdan Spectral Phasor Method to Explore Membrane Micro-heterogeneity and Lipid Domains in Live Cells. *Methods Membr Lipids, Methods Mol Biol* **1232**: 273–290

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci* **5**: 1–10

Grecco HE, Schmick M, Bastiaens PI (2011) Signaling from the living plasma membrane. *Cell* **144**: 897–909

Greenspan P, Fowler SD (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J Lipid Res* **26**: 781–789

Grene R (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *Arabidopsis Book* **49**: 1–20

Grob F, Durner J, Gaupels F (2013) Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Front Plant Sci* **4**: 1–15

Grosjean K, Mongrand S, Beney L, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P (2015) Differential Effect of Plant Lipids on Membrane Organization. *J Biol Chem* **290**: 5810–5825

Guo L, Yang H, Zhang X, Yang S (2013) Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **64**: 1755–1767

Halliwell B (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol* **141**: 312–322

Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* **279**: 13044–13053

Harir Y, Mittler R (2009) The ROS Signaling Network of Cells. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 165–174

Den Hartog M, Musgrave A, Munnik T (2001) Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J* **25**: 55–65

- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Höhener B, Grill E** (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J* **21**: 3029–3038
- Hong Y, Pan X, Welti R, Wang X** (2008) Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 803–816
- Hong Y, Zhang W, Wang X** (2010) Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant Cell Environ* **33**: 627–635
- Hua Z, Yang X, Fromm ME** (2006) Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active Arabidopsis MAPKK or MAPK proteins. *Plant, Cell Environ* **29**: 1761–1770
- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF** (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep* **39**: 969–987
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T** (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9- cis -epoxycarotenoid dioxygenase , a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* **27**: 325–333
- Izumi C M, Murata Y, Uraji M** (2009) Integration of ROS and Hormone Signaling. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 25–42
- Jander G, Norris SR, Rounsley SD** (2002) Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol* **29**: 440–450
- Jang J, 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
- Jaspers P, Kangasjärvi J** (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant* **138**: 405–413
- Jiang K, Schwarzer C, Lally E, Zhang S, Ruzin S, Machen T, Remington SJ, Feldman L** (2006) Expression and Characterization of a Redox-Sensing Green Fluorescent Protein (Reduction-Oxidation-Sensitive Green Fluorescent Protein) in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 397–403
- Ju HW, Min JH, Chung MS, Kim CS** (2013) The atrzf1 mutation of the novel RING-type E3 ubiquitin ligase increases proline contents and enhances drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Sci* **203-204**: 1–7
- Katagiri T, Takahashi S, Shinozaki K** (2001) Involvement of a novel Arabidopsis phospholipase D, AtPLDdelta, in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *Plant J* **26**: 595–605

- Kavi Kishor PB, Hong Z, Miao G-H, Hu C-A, Verma DP** (1995) Overexpression of A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiol* **108**: 1387–1394
- Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX** (2009) Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**: 612–23
- Klymchenko AS, Kreder R** (2014) Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. *Chem Biol* **21**: 97–113
- Kocsy G, Tari I, Vanková R, Zechmann B, Gulyás Z, Poór P, Galiba G** (2013) Redox control of plant growth and development. *Plant Sci* **211**: 77–91
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T** (1998) Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**: 2446–2453
- Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DLC, Karssen CM** (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theor Appl Genet* **61**: 385–393
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377–383
- Kotzer AM, Brandizzi F, Neumann U, Paris N, Moore I, Hawes C** (2004) AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *J Cell Sci* **117**: 6377–6389
- Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, et al** (2012) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res* **40**: 1–9
- Laranjeira S, Amorim-Silva V, Esteban A, Arró M, Ferrer A, Tavares RM, Botella MA, Rosado A, Azevedo H** (2015) Arabidopsis Squalene Epoxidase 3 (SQE3) Complements SQE1 and Is Important for Embryo Development and Bulk Squalene Epoxidase Activity. *Mol Plant* **3**: 1–13
- Lee IC, Hong SW, Whang SS, Lim PO, Nam HG, Koo JC** (2011) Age-dependent action of an ABA-inducible receptor kinase, RPK1, as a positive regulator of senescence in arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol* **52**: 651–662
- Lee S, Park C-M** (2012) Regulation of reactive oxygen species generation under drought conditions in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **7**: 599–601

- Lefebvre B, Furt F, Hartmann M-A, Michaelson L V, Carde J-P, Sargueil-Boiron F, Rossignol M, Napier J a, Cullimore J, Bessoule J-J, et al** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* **144**: 402–148
- Li M, Hong Y, Wang X** (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1791**: 927–935
- Lin F, Qu Y, Zhang Q** (2014) Phospholipids: Molecules regulating cytoskeletal organization in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signal Behav* **9**: 1–5
- Liu P, Li R-L, Zhang L, Wang QL, Niehaus K, Baluska F, Samaj J, Lin J-X** (2009a) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant J* **60**: 303–313
- Liu P, Li R-L, Zhang L, Wang Q-L, Niehaus K, Baluska F, Samaj J, Lin J-X** (2009b) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant J* **60**: 303–13
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L** (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* **1**: 28–33
- London E** (2005) How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochim Biophys acta- Mol Cell Res* **1746**: 203–220
- López-Huertas E, Corpas F, Sandalio L, Del Rio L** (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J* **337**: 531–536
- López-Pérez L, Martínez-Ballesta MDC, Maurel C, Carvajal M** (2009) Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry* **70**: 492–500
- Lu S, Bahn SC, Qu G, Qin H, Hong Y, Xu Q, Zhou Y, Hong Y, Wang X** (2013) Increased expression of phospholipase D α 1 in guard cells decreases water loss with improved seed production under drought in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol J* **11**: 380–389
- Lushchak VI** (2011) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol* **153**: 175–190
- Mahajan S, Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* **444**: 139–158

- Mannock DA, Benesch MGK, Mcelhaney RN** (1970) A comparative calorimetric and spectroscopic study of the effects of cholesterol and of the plant sterols β -sitosterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayermembranes. *J Am Med Assoc* **212**: 1094–1094
- Manoli A, Begheldo M, Genre A, Lanfranco L, Trevisan S, Quaggiotti S** (2014) NO homeostasis is a key regulator of early nitrate perception and root elongation in maize. *J Exp Bot* **65**: 185–200
- Marshall A, Aalen RB, Audenaert D, Beeckman T, Broadley MR, Butenko M a., Cano-Delgado a. I, de Vries S, Dresselhaus T, Felix G, et al** (2012) Tackling Drought Stress: RECEPTOR-LIKE KINASES Present New Approaches. *Plant Cell* **24**: 2262–2278
- McLoughlin F, Testerink C** (2013) Phosphatidic acid, a versatile water-stress signal in roots. *Front Plant Sci* **4**: 1–8
- Minami A, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y, Uemura M** (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol* **50**: 341–359
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X** (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* **312**: 264–266
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405–410
- Molassiotis A, Fotopoulos V** (2011) Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree? *Plant Signal Behav* **6**: 210–214
- Mongrand S, Stanislas T, Bayer, Emmanuelle M. F Lherminier J, Simon-Plas F** (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci* **15**: 656–663
- Mouritsen OG, Zuckermann MJ** (2004) What's so special about cholesterol? *Lipids* **39**: 1101–1113
- Mullineaux PM** (2009) ROS in Retrograde Signalling from the Chloroplast to the Nucleus. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 221–240
- Munnik T, Meijer HJG, Riet B Ter, Hirt H, Frank W, Bartels D, Musgrave A** (2000) Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J* **22**: 147–154
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Murata Y, Pei Z, Mori IC, Schroeder J** (2001) Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Ca^{2+} Channels in Guard Cells Requires Cytosolic NAD

(P) H and Is Differentially Disrupted Upstream and Downstream of Reactive Oxygen Species Production in *abi1-1* and *abi2-1* Protein Phosphatase 2C Mutants. *Plant Cell* **13**: 2513–2523

Mustilli A, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**: 3089–3099

Nadeau JA, Sack FD (2002) Stomatal development in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* **1**: 1–28

Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* **59**: 165–176

Nezhadahmadi A, Proadhan Z, Faruq G (2013) Drought Tolerance in Wheat. *Sci World J* **2013**: 1–12

North HM, Almeida AD, Boutin JP, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A (2007) The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* **50**: 810–824

Numrich J, Ungermann C (2014) Endocytic Rabs in membrane trafficking and signaling. *Biol Chem* **395**: 327–333

Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 1105–1119

Osakabe Y, Mizuno S, Tanaka H, Maruyama K, Osakabe K, Todaka D, Fujita Y, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase 1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *J Biol Chem* **285**: 9190–9201

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP (2014) Response of plants to water stress. *Front Plant Sci* **5**: 1–8

Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2013) Sensing the environment: Key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J Exp Bot* **64**: 445–458

Owen DM, Magenau A, Majumdar A, Gaus K (2010) Imaging membrane lipid order in whole, living vertebrate organisms. *Biophys J* **99**: 7–9

Parks LW (1958) S-Adenosylmethionine and ergosterol synthesis. *J Am Chem Soc* **80**: 2023–2024

- Pham J, Desikan R** (2009) ROS Signalling in Stomata. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 55–72
- Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Matsuda SP** (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 MÁ** (2009) Identification of the Arabidopsis dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant J* **59**: 63–76
- Rasbery JM, Shan H, LeClair RJ, Norman M, Matsuda SPT, Bartel B** (2007) Arabidopsis thaliana squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. *J Biol Chem* **282**: 17002–17013
- Reddy PS, Jogeswar G, Rasineni GK, Maheswari M, Reddy AR, Varshney RK, Kishor PBK** (2015) Plant Physiology and Biochemistry Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L .) Moench]. *Plant Physiol Biochem* **94**: 104–113
- Del Rio LA, Puppo A, Mullineaux PM** (2009) Peroxisomes as a Cellular Source of ROS Signal Molecules. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 221–240
- Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Perrier-Cornet JM, Simon-Plas F** (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J* **22**: 3980–3991
- Rock CD, Zeevaert JA** (1991) The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7496–7499
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103–110
- Rojo E, Denecke J** (2008) What is moving in the secretory pathway of plants? *Plant Physiol* **147**: 1493–1503
- Ros Barceló A, Gómez Ros L V** (2009) Reactive Oxygen Species in Plant Cell Walls. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 73–94
- Rosado A, Amaya I, Valpuesta V, Cuartero J, Botella MÁ, Borsani O** (2006) ABA- and ethylene-mediated responses in osmotically stressed tomato are regulated by the TSS2 and TOS1 loci. *J Exp Bot* **57**: 3327–3335
- Rubio L, Rosado A, Linares-Rueda A, Borsani O, García-Sánchez MJ, Valpuesta V, Fernández JA, Botella MÁ** (2004) Regulation of K⁺ transport in tomato roots by the TSS1 locus. Implications in salt tolerance. *Plant Physiol* **134**: 452–459

- Rutherford S, Moore I** (2002) The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 518–528
- Saibi W, Feki K, Ben Mahmoud R, Brini F** (2015) Durum wheat dehydrin (DHN-5) confers salinity tolerance to transgenic Arabidopsis plants through the regulation of proline metabolism and ROS scavenging system. *Planta*. doi: 10.1007/s00425-015-2351-z
- Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H** (2002) Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol* **43**: 290–297
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis. T** (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Second edi. pp.6.39
- Sang Y, Zheng S, Li W, Huang B, Wang X** (2001) Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dalpha. *Plant J* **28**: 135–144
- Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N** (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **254**: 104–109
- Schaeffer A, Bronner R** (2001) The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2; 1. *Plant J* **25**: 605–615
- Schrack K, Mayer U, Horrichs A, Kuhnt C, Bellini C, Dangl J, Schmidt J, Jürgens G** (2000) FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* **14**: 1471–1484
- Schroeder JI, Allen GJ, Veronique H, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 627–658
- Sena F, Doblaz V, Casaretto E, Díaz P, Botella MÁ, Borsani O** (2012) Regulation of plant drought responses by sterols homeostasis. *Plant Dev. Environ. Interact. EMBO Conf.* pp. 65
- Shi H, Chen L, Ye T, Liu X, Ding K, Chan Z** (2014) Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiol Biochem* **82**: 209–217
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK** (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6896–6901
- Signorelli S, Corpas FJ, Borsani O, Barroso JB, Monza J** (2013) Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress

- response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Sci* **201-202**: 137–146
- Silvius JR** (2005) Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: Insights from model-membrane studies. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1746**: 193–202
- Simon Plas F, Mongrand S** (2009) ROS and Plant Membrane Rafts. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 209–220
- Singer SJ, Nicolson GL** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720–731
- Sitbon F, Jonsson L** (2001) Sterol composition and growth of transgenic tobacco plants expressing type-1 and type-2 sterol methyltransferases. *Planta* **212**: 568–572
- Smirnoff N** (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* **125**: 27–58
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM** (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 755–767
- Souter M, Topping J, Pullen M** (2002) hydra mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell* **14**: 1017–1031
- Stenmark H, Olkkonen VM** (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol* **2**: 1–7
- Stermer B a, Bianchini GM, Korth KL** (1994) Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res* **35**: 1133–40
- Strizhov N, Abrahám E, Okrész L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L** (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J* **12**: 557–569
- Tanaka H, Osakabe Y, Katsura S, Mizuno S, Maruyama K, Kusakabe K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2012) Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* **70**: 599–613
- Tardieu F** (2012) Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *J Exp Bot* **63**: 25–31
- Torres-Franklin ML, Gigon A, de Melo DF, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT** (2007) Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiol Plant* **131**: 201–210
- Troll W, Lindsley J** (1955) A photometric method for the determination of proline. *J Biol Chem* **215**: 655–660

- Uemura T, Ueda T** (2014) Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr Opin Plant Biol* **22**: 116–121
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez M V, Colmenero-Varea P, Del Río LA, Barroso JB** (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* **581**: 453–461
- Vanderauwera S, Hoeberichts FA, Breusegem F Van** (2009) Hydrogen Peroxide-Responsive Genes in Stress Acclimation and Cell Death. *React. Oxyg. Species Plant Signal*. Springer. pp 149–164
- Verslues P. ., Bray EA** (2006) Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot* **57**: 201–212
- Vu HS, Roston R, Shiva S, Hur M, Wurtele ES, Wang X, Shah J, Welti R** (2015) Modifications of membrane lipids in response to wounding of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Signal Behav.* doi: 10.1080/15592324.2015.1056422
- Wang P, Song C-P** (2008) Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytol* **178**: 703–18
- Wang X** (2005) Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol* **130**: 566–573
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R** (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res* **45**: 250–78
- Weber G, Farris FJ** (1979) Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **18**: 3075–3078
- Wentzinger LF, Bach TJ** (2002) Inhibition of Squalene Synthase and Squalene Epoxidase in Tobacco Cells Triggers an Up-Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. *Plant Physiol* **130**: 334–346
- Willemsen V, Friml J, Grebe M, Toorn A Van Den, Palme K, Scheres B** (2003) Cell Polarity and PIN Protein Positioning in *Arabidopsis* Require STEROL METHYLTRANSFERASE1 Function. *Plant Cell* **15**: 612–625
- Xiao S, Dai L, Liu F, Wang Z, Peng W, Xie D** (2004) COS1: an *Arabidopsis* coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. *Plant Cell* **16**: 1132–1142
- Xinli X, Lei P** (2015) Molecular cloning, sequence characterization and expression pattern of Rab18 gene from watermelon (*Citrullus lanatus*). *Biotechnol Biotechnol Equip* **29**: 255–259
- Xiong L, Ishitani M** (2006) SIGNAL TRANSDUCTION: components, pathways and network integration. *Abiotic Stress Toler. plants*. pp 3–29

- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK** (2001) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**: 2063–2083
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu JK** (2002) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**: 8588–8596
- Xiong L, Zhu J** (2003) Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiol* **133**: 29–36
- Xu Z, Zhou G, Shimizu H** (2010) Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signal Behav* **5**: 649–654
- Yamasaki H, Sakihama Y** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: In vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**: 89–92
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko Shinozaki K** (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol* **38**: 1095–1102
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X** (2004a) Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9508–13
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X** (2004b) Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9508–9513
- Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, Li M, Yan M, Wang R, Wang L, Welti R, Zhang W, Wang X** (2009) Phospholipase α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 2357–77
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B** (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* **34**: 1359–1368
- Zhao J** (2015) Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling. *J Exp Bot.* doi: 10.1093/jxb/eru540
- Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247–273
- Zhu JY, Sae Seaw J, Wang ZY** (2013) Brassinosteroid signalling. *Development* **140**: 1615–1620

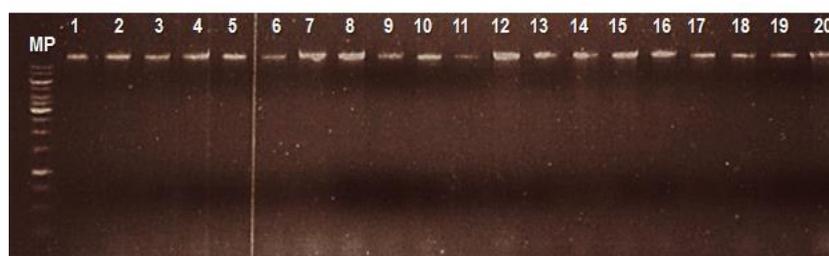
Anexos

Tabla 1: Secuencia de cebadores usado en el mapeo inicial de *sud3*. Se detallan las secuencias nucleotídicas en sentido 5'→3' y las temperaturas de melting (T_m) para todos los cebadores. Además se especifican los tamaños en pares de bases esperados de los productos de PCR para cada genotipo.

	Nombre MM	Secuencia 5'-3'	T_m (°C)	Fragmentos (pb)
Cromosoma I	T16N11-F	TGCATCTGCTGAAATCGAAC	52	Col-0: 1191
	T16N11-R	CCTCATGTGGAGTTTGCTCA	52	Ler: 508
	F14M2-F	GGTTTTAGGGAAAGATATTGATG	50	Col-0: 507
	F14M2-R	CAAAACAATATACGAAGAGACGCA	54	Ler: 303
	T2E6-F	CAAGAATGGAGTCCCGGTTA	51	Col-0: 837
	T2E6-R	TGGAGCATGGTTCAGTCAAG	52	Ler: 600
Cromosoma II	T16F16-F	TCTATACGAATGATAACGGTTTATGG	54	Col-0: 500
	T16F16-R	TGAGCACATTGATTAGAGACTTGA	54	Ler: 353
	T16B12-F	GTAATCAGTCTAAAGTACACATG	48,41	Col-0: 585
	T16B12-R	CTAATTTTTGTTTTGATACT	48,21	Ler: 273
Cromosoma III	F18C1-F	CAAAATGGGAATTGTGATGG	48	Col-0: 1022
	F18C1-R	GTTTTGCATCGGACGGTTAT	51	Ler: 439
	LDM 1-F	GCGATGTGGATGATGAACTG	64,30	Col-0: 174
	LDM 1-R	GACGGAATCTCCTCGTTGAC	63,70	Ler: 149
	LDM4-F	CACGCTGTGTCGTTTTCTG	64,50	Col-0: 207
	LDM4-R	TTCTCTGTTTCGGCCTTTTC	63,20	Ler: 169
	K5K13-F	GGAACTGCCGTAGACGAAG	54	Col-0: 699
	K5K13-R	AGTCCTCATTCCCCACAC	50	Ler: 400
	NIT 1.2-F	CGGAATTGATGTTTTGGACC	49	Col-0: 850
	NIT 1.2-R	CCCTACATTCTACAACCATGTAGC	54	Ler: 1000
Cromosoma IV	F6N15-F	GTGTGGTCAGGGCTTCAAAT	51	Col-0: 984
	F6N15-R	TGGTGACTTCCATTGTCTGC	51	Ler: 830
	F13C5-F	TTGAATGTTTAGGGTAAAAGT	46,5	Col-0: 692
	F13C5-R	TCTTTCATCCCACCGTACTTG	52	Ler: 320
	F26P21-F	GCCCTTGAGGACTTGATGAG	53	Col-0: 148
	F26P21-R	TGGTTGTGAGTTTCGCATGT	52	Ler: 138
	F8D20-F	GCTTTGAGCTGTCTTTCGAA	52,5	Col-0: 850
	F8D20-R	CCACGGCTTCAACTTCAGAC	53,5	Ler: 851
	T9A14-F	CCGCAGCTGCACTTCTTCAA	58	Col-0: 502
	T9A14-R	TGCATTGATTTCCGTCTTGA	51	Ler: 258
Cromosoma V	PAT 1.2-F	CATGCTTCATCATTGCCC	48	Col-0: 706
	PAT 1.2-R	AGCTGAAGCTCTGCCACC	54	Ler: 606
	F14I23-F	GGTGGAGAAATTGCCATTA	49	Col-0: 521
	F14I23-R	TAATAATTTGGAATCACATGTTT	46	Ler: 165
	MJG14-F	CCGTGAATCCTTGTGTTGCTT	51	Col-0: 758
	MJG14-R	CACGACGAACCCTAGAAACC	52	Ler: 365
	K19E20-F	ATGAGAGCATATGAGAGGAAA	50	Col-0: 649
	K19E20-R	GATGGATTGTTGATGTGTTT	46	Ler: 360

Tabla 2: Cuantificación, pureza e integridad del pool de ADNs de sud3 a secuenciar. Se cuantifico 1µl de cada ADN extraído en nanodrop obteniendo los mg/µl además del cociente $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ que permitió evaluar el grado de contaminación por proteínas o polisacáridos, respectivamente. Por último se evaluó la integridad del ADN por la corrida electroforética de 3 µl de ADN de cada individuo en un gel de agarosa al 1% en TBE. MP es el marcador de peso molecular usado donde la primer banda representa 20.000pb.

Individuos Sud-3	[ADN] _g ng/µL	A _{260/280}	A _{260/230}	µL c/ADNg p/10mg finales
1	184.5	1.9	1.94	10.8401084
2	538.7	1.9	1.93	3.712641544
3	300.6	1.92	1.92	6.653359947
4	389.7	1.85	2.07	5.132152938
5	291.6	1.84	1.95	6.858710562
6	593.9	1.92	1.96	3.367570298
7	453.4	1.86	1.96	4.411116012
8	424.3	1.9	2	4.713646005
9	351.4	1.84	1.99	5.691519636
10	521	1.93	2.15	3.838771593
11	271.8	1.91	2.02	7.358351729
12	543	1.93	2.05	3.683241252
13	417.3	1.85	1.93	4.792715073
14	531.2	1.85	2.09	3.765060241
15	415.8	1.91	1.93	4.81000481
16	579.8	1.9	1.92	3.449465333
17	290.3	1.91	1.93	6.889424733
18	552.2	1.83	2.14	3.621876132
19	286.8	1.92	1.97	6.973500697
20	693.9	1.88	1.99	2.882259692



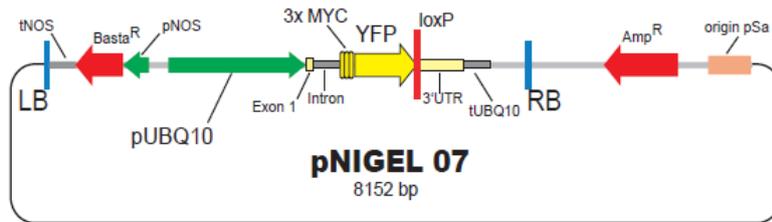


Figura 1: Construcciones para la expresión de RabC1::YFP y RabG3f::YFP . Según Geldner et al., 2009 (Geldner et al., 2009) las secuencias de las líneas marcadoras (RabC1 y RabG3f con YFP) se clonaron individualmente mediante la recombinación en un marco de lectura abierto (U-clon) en un vector generado por el sistema de recombinación CRE-lox. El vector de origen fue pNIGEL07 el cual presenta entre otros componentes, un promotor UBQ10 y el gen de resistencia para ampicilina y al herbicida Basta (flechas en rojo) para la selección de las cepas de *Agrobacterium* y de las plantas transformadas respectivamente. El vector fue introducido en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 a través de cepas GV3101 de *Agrobacterium*.

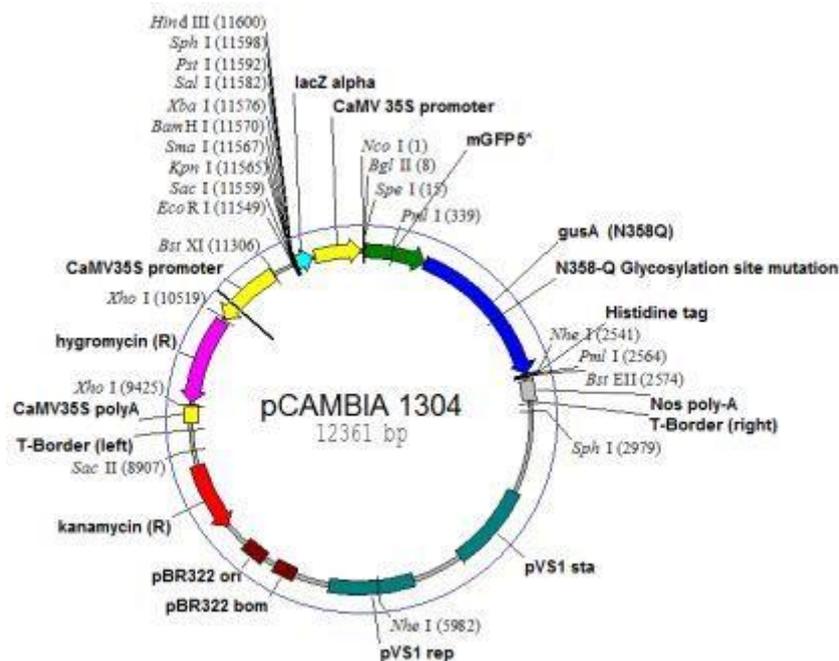
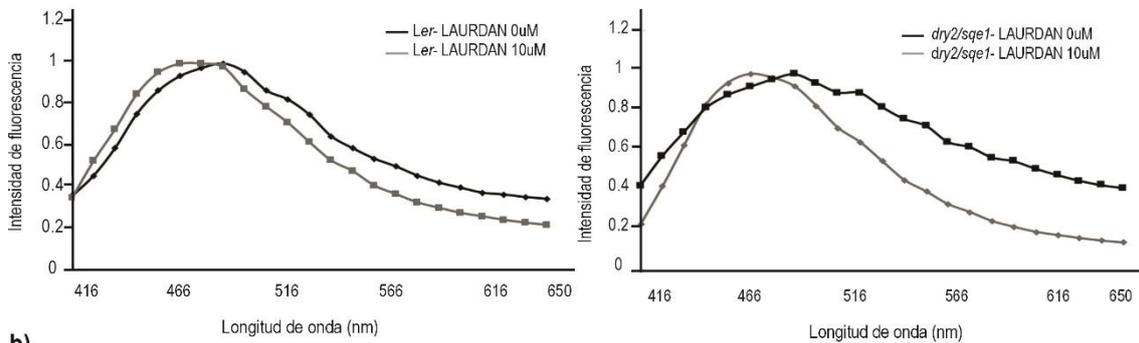


Figura 2: Construcciones que expresan roGFP.1 Según Jiang et al., 2006 (Jiang et al., 2006) se clono el gen de roGFP1 en un vector binario del tipo pCambia-1304 sustituyendo la secuencia que codifica la proteína de fusión mGFP5-GUSA por la de la roGFP. Los componentes principales del vector son el promotor 35S del virus de mosaico del coliflor (CaMV 35S) y entre otros el gen de resistencia a Hygromicina B que le proveerá la resistencia a las plantas transformadas. Este vector se transformó

en *Agrobacterium* y luego se incorporó por inmersión floral a plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0.

a)



b)

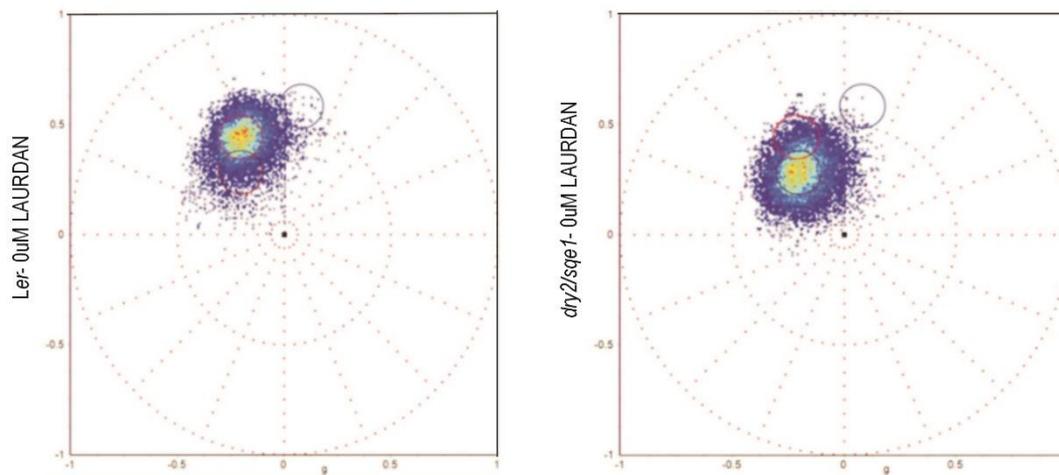


Figura 3: Autofluorescencia del LAURDAN. a) Espectros de emisión de fluorescencia de LAURDAN y autofluorescencia normalizados. Se incubó con 10 μ M (líneas grises) de LAURDAN raíces Ler y *dry2/sqe1* de 5 días e iguales raíces pero sin sonda fueron utilizadas para adquirir la autofluorescencia. b) Distribución de los pixeles en el SP usando el primer armónico de la transformación espectral, en plántulas salvaje y *dry2/sqe1* en ausencia del LAURDAN. Además se representan en la tabla las coordenadas en ancho y centro (nm) espectral de la posición de los cursores de colores en los fasores espectrales.