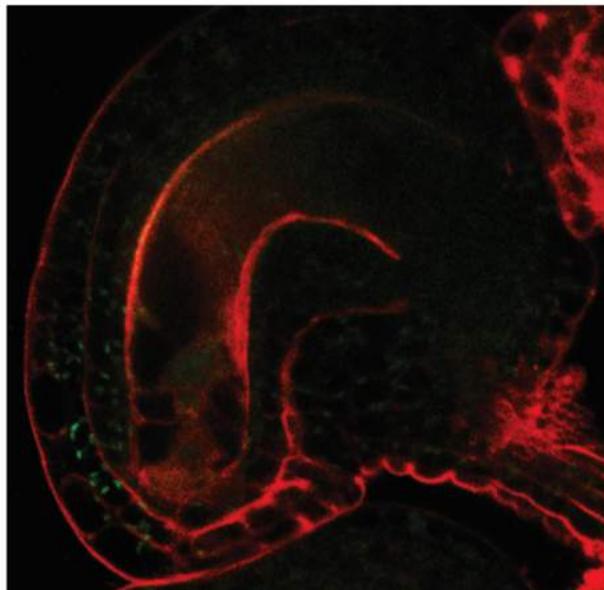


**Ferredoxinas mitocondriales de *Arabidopsis thaliana*: su rol durante el desarrollo y la fertilización.**



**Autor: Lic. Andrés M. Bellido**

**Directora: Dra. Gabriela C. Pagnussat**

**Co-director: Dr. Diego F. Fiol**

**Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias, Área Biología**

**Instituto de Investigaciones Biológicas (CONICET-UNMDP)**

**Universidad Nacional de Mar del Plata**

**2017**



**IIB**

A Felipe

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer enormemente a la Dra. Gabriela Pagnussat por haberme otorgado la posibilidad de realizar esta Tesis, y por el acompañamiento profesional y humano que me brindo durante el transcurso de la misma.

Extiendo mi agradecimiento a todo el Instituto de Investigaciones Biológicas de Mar del Plata y a mis compañeros del laboratorio 10 quienes me apoyaron en la realización de los experimentos, especialmente a la Dra. Ayelén Distéfano.

Quisiera agradecer también a mi Co-director de Tesis, el Dr. Diego Fiol y al Dr. Eduardo Zabaleta, quienes brindaron su apoyo y consejo.

Agradezco al CONICET por haber financiado mi beca doctoral y finalmente a mi familia, quienes me sostuvieron y motivaron para dar este gran paso, a mi mujer Carla y a mi hijo Felipe.

## RESUMEN

La formación de gametas en plantas tiene lugar en estructuras haploides especializadas denominadas gametofitos. El gametofito femenino o saco embrionario se encuentra rodeado por los tejidos maternos del óvulo y está compuesto por siete células: la ovocélula, la célula central, dos sinérgidas y tres antípodas. El estudio de mutantes de inserción en genes codificantes para una ferredoxina mitocondrial (ADX) y una ferredoxina reductasa (ADXR) mostró que estas proteínas son requeridas para el desarrollo del gametofito femenino y para el desarrollo temprano del embrión a través de un efecto materno. En vertebrados e insectos el complejo ADX-ADXR media la transferencia de electrones a un citocromo P450 mitocondrial, lo que constituye un paso clave en la síntesis de hormonas esteroideas. Mediante estudios *in silico* y experimentos de expresión transiente de proteínas de fusión, se determinó que seis citocromos P450 de *A. thaliana* tienen una localización mitocondrial. Experimentos de doble híbrido y de complementación de fluorescencia bimolecular demostraron que cuatro de ellos interactúan con ADX1 *in vivo*. El estudio comparativo del patrón de esteroides de óvulos WT, *spl* y mutantes *adxr*, mostró que la homocastasterona, un esteroide precursor de brasinolide, se encuentra específicamente en el saco embrionario y no en tejidos esporofíticos del óvulo. Por otra parte, los óvulos *adxr* presentan un menor contenido de homocastasterona que las plantas WT. Estos resultados permitieron postular la existencia de una vía de síntesis de esteroides mitocondrial, hasta el momento desconocida en plantas, que sería esencial para el desarrollo gametofítico femenino. Por otra parte, mediante experimentos de silenciado inducible y de sobre-expresión de los genes en estudio se determinó que el sistema ADX-ADXR sería también funcional en tejidos esporofíticos, donde podría regular eventos relacionados al crecimiento y desarrollo.

## Abreviaturas utilizadas

**ACT2:** gen de la actina 2 en *Arabidopsis thaliana* (At3g18780)

**ADN:** ácido desoxiribonucleico

**ADX:** adrenodoxina

**ADXR:** adrenodoxina reductasa

**amiR:** *Artificial microRNA*; microARN artificial

**ARN:** Ácido ribonucleico

**BiFC:** *Bimolecular Fluorescence Complementation*; Complementación Bimolecular de la Fluorescencia

**BL:** brasinolide

**BR:** brasinosteroides

**cDNA:** DNA copia producido por retro-transcripción

**CS:** castasterona

**DAP:** días luego de la polinización

**DIC:** microscopía de contraste diferencial interfencial o Nomarski

**eam:** polaridad alterada en las células del micrópilo del saco embrionario

**FAD:** flavin-adenin-dinucleótido

**Fd:** ferredoxina

**FMN:** Flavin mono-nucleótido

**FNR:** ferredoxina NADPH reductasa

**FG:** Female gametophyte, saco embrionario

**GFP:** *green fluorescent protein*, gen reportero

**GUS:** gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa

**HAF:** horas luego de la fertilización

**HAP:** horas luego de la polinización

**MCP:** muerte celular programada

**Medio MS:** medio de cultivo “*Murashige y Skoog*”

**MMC:** célula madre de las megasporas

**NADH:** Nicotín Adenín Dinucleótido reducido

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotín Adenín Dinucleótido oxidado

**NADPH:** Nicotín Adenín Dinucleótido fosfato reducido

**NADP<sup>+</sup>:** Nicotín Adenín Dinucleótido fosfato oxidado

**PCR:** *Polimerase Chain Reaction*; Reacción en Cadena de la Polimerasa

**pnu:** núcleos polares sin fusionar

**ROS:** *Reactive Oxygen Species*; Especies Reactivas del Oxígeno

**RFP:** *red fluorescent protein*, gen reportero

**RT-PCR:** *Retrotranscriptase PCR*; PCR semi-cuantitativa

**RT-qPCR:** *quantitative Retrotranscriptase PCR*; PCR cuantitativa

**SINÉRGIDA NR:** célula sinérgida no receptora del tubo polínico

**T-DNA:** ADN transposón

**TE:** eficiencia de transmisión genética durante cruzamientos recíprocos

**TP:** Tubo polínico

**UBQ5:** gen de la Ubiquitina 5 en *Arabidopsis thaliana* (At3g62250)

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Ciclo de vida y reproducción sexual en <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>1</b>
<b>Proteínas involucrados en la especificación del saco embrionario</b>	<b>5</b>
<b>Especificación de las células gaméticas</b>	<b>6</b>
<b>Las células accesorias del saco embrionario</b>	<b>9</b>
<b>Polinización y atracción del tubo polínico</b>	<b>10</b>
<b>Fertilización e inicio del desarrollo embrionario</b>	<b>16</b>
<b>Las ferredoxinas, estructura e historia evolutiva</b>	<b>19</b>
<b>Las ferredoxinas y su diversidad de funciones</b>	<b>23</b>
<b>Las adrenodoxinas: ferredoxinas mitocondriales</b>	<b>24</b>
<b>Adrenodoxinas en <i>A. thaliana</i></b>	<b>25</b>
<b>Esteroides en el desarrollo de animales y plantas</b>	<b>26</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>30</b>
<b>Objetivos</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS - CAPITULO I</b>	<b>31</b>
<b>ADXR, su función en gametofitos</b>	<b>31</b>
<b>Análisis de los sacos embrionarios en plantas <i>adxr/ADXR</i></b>	<b>35</b>
<b>Funciones celulares en sacos embrionarios <i>adxr</i></b>	<b>39</b>
<b>Localización de ADXR</b>	<b>43</b>
<b>Estudio de mutantes <i>adx1</i> y <i>adx2</i></b>	<b>45</b>
<b>Especificación celular en sacos embrionarios <i>adx1 adx2</i></b>	<b>50</b>
<b>ADX-ADXR en la homeostasis de ROS y función mitocondrial</b>	<b>52</b>

<b>Estudio de interactores de ADX1: posible función del sistema ADXR-ADX en la síntesis de esteroides</b>	54
<b>DISCUSION – CAPÍTULO I</b>	59
<b>El sistema ADX-ADXR es requerido para el desarrollo normal y para la función del gametofito femenino</b>	59
<b>La síntesis de esteroides en mitocondrias sería posible en <i>A.thaliana</i> en forma análoga a lo que ocurre en otros sistemas.</b>	62
<b>RESULTADOS – CAPÍTULO II</b>	66
<b>Estudio del patrón de expresión de <i>ADXR</i> y <i>ADXs</i></b>	66
<b>Estudio de la función de los genes <i>ADXR</i>, <i>ADX1</i> y <i>ADX2</i> en tejidos esporofíticos</b>	69
<b>Silenciado de los genes <i>ADX1</i> y <i>ADX2</i></b>	69
<b>Silenciamiento inducible del sistema <i>ADXR-ADX</i></b>	71
<b>Sobre-expresión del gen <i>ADXR</i></b>	73
<b>DISCUSION – CAPÍTULO II</b>	81
<b><i>ADXR</i> se expresa tanto en tejidos gametofíticos como en tejidos esporofíticos</b>	81
<b>La alteración de la expresión de <i>ADXR</i> y <i>ADXs</i> en el esporofito produce alteraciones gametofíticas y esporofíticas.</b>	82
<b>CONCLUSIONES</b>	85
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	86
<b>Líneas de plantas utilizadas y condiciones de crecimiento</b>	86
<b>Bacterias</b>	87

<b>Extracción de DNA</b>	87
<b>Genotipificación</b>	88
<b>Electroforesis de ácidos nucleicos</b>	89
<b>Extracción de RNA</b>	89
<b>Síntesis de ADN copia</b>	90
<b>Análisis de expresión por PCR en tiempo real</b>	90
<b>Predicción de p450s mitocondriales</b>	90
<b>Alineamiento de secuencias proteínicas</b>	91
<b>Diseño de las secuencias silenciadoras</b>	91
<b>Búsqueda de proteínas interactoras de ADX1 mediante experimentos de doble híbrido en levaduras</b>	92
<b>Diseción de pistilos y silicuas, análisis fenotípico de óvulos y obtención de imágenes</b>	92
<b>Tinción de tubos polínicos</b>	93
<b>Detección de ROS</b>	93
<b>Estimación del potencial de membrana mitocondrial</b>	93
<b>Detección de esteroides en óvulos</b>	94
<b>Detección de actividad GUS</b>	95
<b>Oligonucleótidos utilizados</b>	96
<b>REFERENCIAS</b>	<b>98</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>107</b>

## Índice de figuras y tablas

Figura 1. El ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i> alterna entre una generación esporofítica diploide y una generación gametofítica haploide.	2
Figura 2. Esquema mostrando los diferentes estadios de desarrollo que incluye la microsporogénesis en <i>A. thaliana</i> .	3
Figura 3. Estadios de desarrollo del saco embrionario en <i>A. thaliana</i> .	4
Figura 4. Estructura del gametofito femenino maduro.	5
Figura 5. Moléculas involucradas en el transporte de electrones.	21
Figura 6. Alineamiento de Fds del tipo “vertebrados” y “plantas”.	23
Figura 7. Interacción de los sitios catalíticos de ADX (naranja) y ADXR (amarillo) para el intercambio de electrones.	24
Figura 8. Ruta biosintética para brasinosteroides conocida hasta el momento.	28
Figura 9. Alineamiento de adredonoxinas reductasas mitocondriales encontradas en <i>A. thaliana</i> , <i>B. taurus</i> y <i>D. melanogaster</i> .	31
Figura 10. Diagrama del gen <i>ADXR</i> mostrando la localización de las inserciones presentes en las líneas mutantes utilizadas.	32
Figura 11. Crecimiento de plantas WT, <i>adxr-1/ADXR</i> y <i>adxr-2/ADXR</i> .	33
Figura 12. A; frecuencia de abortos en plantas WT y <i>adxr/ADXR</i> .	34
Figura 13. Análisis fenotípico mediante microscopía DIC de sacos embrionarios en plantas <i>adxr-1/ADXR</i> , 2 días luego de la emasculación.	37
Figura 14. Análisis fenotípico mediante microscopía DIC de sacos embrionarios en plantas <i>adxr-2/ADXR</i> , 2 días luego de la emasculación.	37
Figura 15. Análisis de la expresión de marcadores celulares específicos dentro del saco embrionario en plantas <i>adxr-1/ADXR</i> .	39
Figura 16. Análisis de atracción de tubos polínicos en plantas <i>adxr/ADXR</i> .	40
Figura 17. Análisis del desarrollo embrionario en plantas <i>adxr-1/ADXR</i> , 3 días luego de la polinización, usando microscopía DIC.	41
Figura 18. Análisis del desarrollo post-fertilización en plantas <i>adxr-2/ADXR</i> , 3 días luego de la polinización (3 DAP), usando microscopía DIC.	42
Figura 19. Localización de ADXR en sacos embrionarios.	45

Figura 20. Alineamiento de adrenodoxinas mitocondriales encontradas en <i>A. thaliana</i> y <i>B. taurus</i> .	46
Figura 21. Análisis de mutantes nulas para los genes <i>ADX1</i> y <i>ADX2</i> .	47
Figura 22. Análisis de silicuas en mutantes para los genes <i>ADX1</i> y <i>ADX2</i> .	48
Figura 23. Análisis fenotípico de sacos embrionarios presentes en plantas <i>adx1/adx1 adx2/ADX2</i> mediante microscopía DIC.	49
Figura 24. Análisis del desarrollo post-fertilización en plantas <i>adx1/adx1 adx2/ADX2</i> , 3 días luego de la polinización (3 DAP), por microscopía DIC.	50
Figura 25. Análisis de la expresión de marcadores celulares específicos en el saco embrionario de plantas <i>adx1/ADX1 adx2/ADX2</i> .	51
Figura 26. Análisis del contenido de ROS en sacos embrionarios provenientes de pistilos WT y mutantes.	52
Figura 27. Análisis del potencial de membrana mitocondrial en sacos embrionarios de plantas WT, <i>adxr-1/ADXR</i> y <i>adx1adx1/adx2ADX2</i> , utilizando el marcador JC-1.	53
Figura 28. Localización mitocondrial de CYP711A1-GFP en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	55
Figura 29. Esteroides presentes en óvulos de plantas WT y mutantes en los genes <i>ADXR</i> y <i>SPL</i> .	58
Figura 30. Modelo propuesto para la síntesis de esteroides mediada por el sistema ADX-ADXR.	63
Figura 31. Estructura química del brasinolide (BL) con los anillos esteroideos marcados como A, B, C y D. Las estructuras dentro de las líneas punteadas azules pueden presentar sustituciones.	64
Figura 32. Análisis de la expresión de los genes <i>ADX1</i> , <i>ADX2</i> y <i>ADXR</i> por RT-qPCR.	66
Figura 33. Análisis de la actividad del promotor del gen <i>ADXR</i> en plantas transgénicas <i>pADXR:GUS</i> .	68
Figura 34. Análisis de expresión de los genes <i>ADX1</i> y <i>ADX2</i> en hojas de plantas WT y en líneas transgénicas T3 conteniendo la construcción <i>35S:amiRadx1-2</i> .	70
Figura 35. Análisis morfológico de líneas <i>samiR-ADXR-ADX1-ADX2</i> tratadas con etanol (inductor).	72
Figura 36. Expresión relativa de los genes <i>ADX1</i> , <i>ADX2</i> y <i>ADXR</i> en hojas de roseta de plantas WT y líneas transgénicas <i>samiR</i> , tratadas con agua o con etanol.	73
Figura 37. Análisis fenotípico de líneas independientes transformadas con la construcción <i>35S:ADXR</i> en plantas <i>rdr6</i> .	75
Figura 38. Óvulos correspondientes a la línea 6 transformada con la construcción <i>35S:ADXR</i> .	76

Figura 39. Óvulos correspondientes a la línea 7 transformada con la construcción <i>35S:ADXR</i> .	77
Figura 40. Óvulos correspondientes a la línea 10 transformada con la construcción <i>35S:ADXR</i>	78
Figura 41. Coloración violácea observada en los tallos de plantas transgénicas <i>35S:ADXR</i> .	79
Figura 42. Expresión del gen <i>ADXR</i> en plantas <i>35S:ADXR rdr6</i> .	79
Tabla 1. Análisis genético de cruzamientos recíprocos para el gen <i>ADXR</i>	35
Tabla 2. Fenotipos encontrados en pistilos emasculados provenientes de plantas WT y <i>adxr/ADXR</i> .	36
Tabla 3. Fenotipos observados por microscopía DIC, en el desarrollo de óvulos de plantas WT y <i>adxr/ADXR</i> , 3 días luego de la polinización.	43
Tabla 4. Selección de clones identificados en un ensayo de doble híbrido utilizando como proteína carnada a ADX1.	54
Tabla 5. Detección de P450s con probable localización mitocondrial en <i>Arabidopsis</i>	56

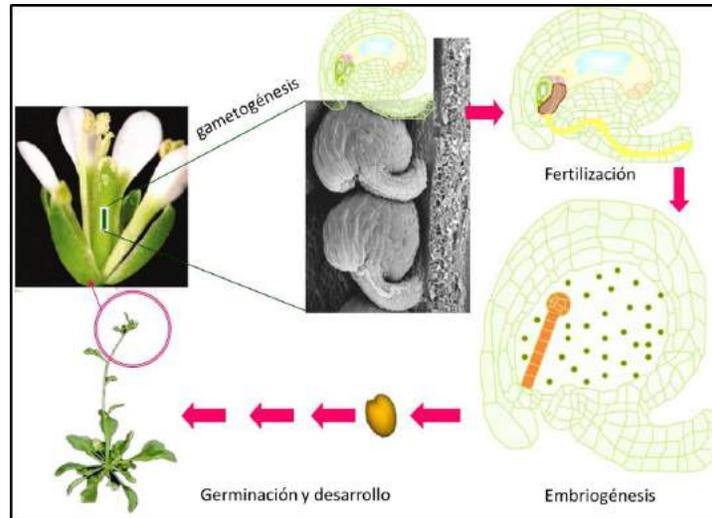
# Introducción



### **1. Ciclo de vida y reproducción sexual en *Arabidopsis thaliana***

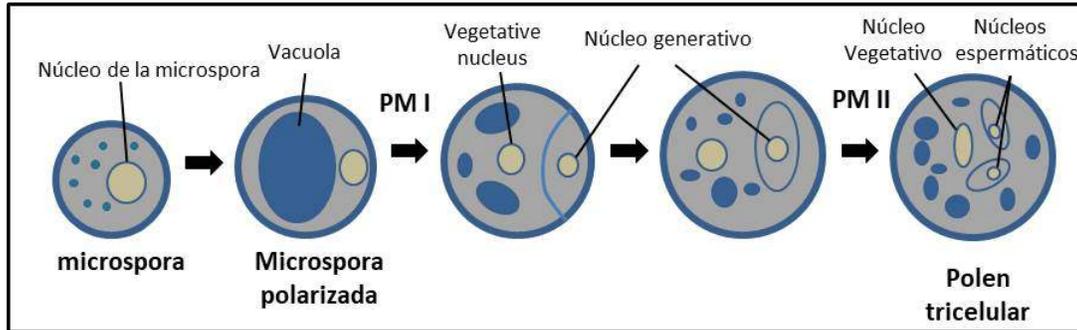
Debido a su pequeño tamaño, su ciclo de vida corto y a su genoma simple, *A. thaliana* es utilizada en laboratorios de todo el mundo como una planta modelo para estudiar tanto el desarrollo de angiospermas como así también para realizar ensayos genéticos y biológicos. *Arabidopsis thaliana* integra la familia de las Brassicaceae (crucíferas), posee inflorescencias en racimos y flores hermafroditas que comúnmente se autopolinizan, produciendo frutos de tipo cápsula (silicuas). El ciclo de vida de *A. thaliana* alterna entre una generación esporofítica diploide predominante y una generación gametofítica haploide que se encuentra reducida a un escaso número de células rodeadas de tejido esporofítico materno.

Los gametofitos son estructuras especializadas donde se especifican las gametas. El gametofito masculino (microgametofito o grano de polen) se desarrolla dentro de las anteras y genera dos células espermáticas, mientras que el gametofito femenino (megagametofito o saco embrionario) se desarrolla dentro del óvulo, en el pistilo de la flor, y contiene dos células gaméticas: la ovocélula y la célula central. Como se detallará más adelante, las células espermáticas fertilizan la célula central y la ovocélula dentro del saco embrionario, lo que da origen a un tejido de nutrición (endosperma) y a un embrión diploide respectivamente, estableciendo de esta forma la siguiente generación esporofítica dentro del ciclo de vida (Figura 1).



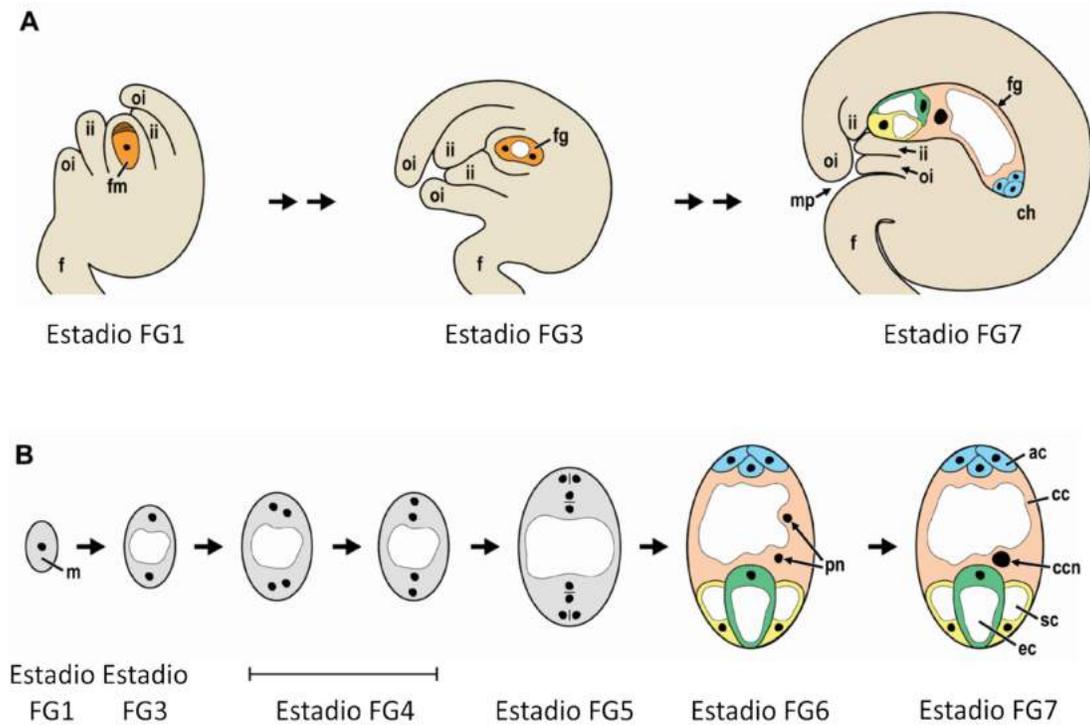
**Figura 1.** El ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* alterna entre una generación esporofítica diploide y una generación gametofítica haploide.

La reproducción sexual se inicia con la diferenciación de esporocitos o meiocitos dentro de los órganos florales. *Arabidopsis thaliana*, por ser heterospórica, produce dos tipos de esporas: microsporas y megasporas, a partir de las cuales se desarrollan los dos tipos de gametofitos unisexuales: microgametofitos (o granos de polen) y megagametofitos (o sacos embrionarios), respectivamente. Durante la microsporogénesis, una célula diploide del saco polínico en la antera, se diferencia generando un microsporocito. El microsporocito sufre meiosis dando lugar a cuatro microsporas haploides. Cada una de estas microsporas dará origen a un gametofito masculino o grano de polen a partir de un proceso denominado microgametogénesis. La microgametogénesis comienza con la expansión de la microspora, lo que se encuentra asociado a la formación de una gran vacuola (Twell, 2011). El núcleo queda desplazado contra la pared de la microspora y sufre una primera división mitótica que resulta en la formación de dos células dimórficas: una célula vegetativa grande y una célula generativa pequeña. El núcleo generativo es rodeado por la célula vegetativa y se divide por mitosis, generando dos células espermáticas completamente incluidas dentro del citoplasma de la célula vegetativa (polen tricelular, Figura 2)



**Figura 2.** Esquema mostrando los diferentes estadios de desarrollo que incluye la microsporogénesis en *A. thaliana*. PMI, mitosis 1; PMII, mitosis 2. Adaptado de (D'Ippolito et al., 2017)

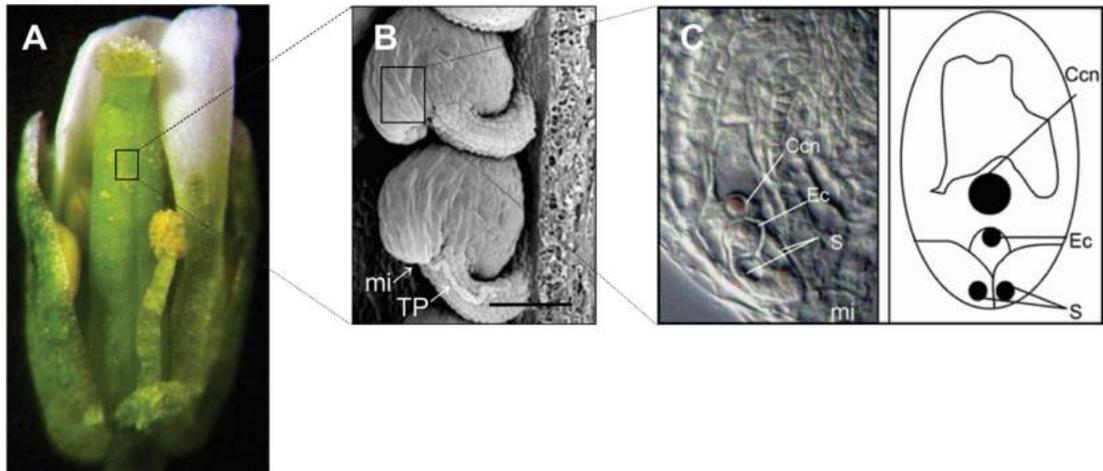
Por otra parte, la megasporogénesis comienza cuando una célula diploide arqueosporial presente en la nucela del óvulo, se diferencia como megasporocito o célula madre de las megasporas (MMC). Esta célula generará por meiosis cuatro megasporas de las cuales tres sufrirán muerte celular programada y solo una, ubicada en el extremo chalazal del primordio del óvulo, sobrevivirá como megaspóra funcional (estadio FG1). Durante la megagametogénesis, la megaspóra funcional pasará por tres ciclos de mitosis sin citocinesis, generando una estructura sincicial. La primera división genera dos núcleos próximos entre sí (estadio FG2) que serán luego separados por la formación de una vacuola central (estadio FG3). La segunda división mitótica genera dos pares de núcleos separados por la vacuola central que muestran una disposición particular en cada extremo del saco en formación (Figura 3, estadio FG4). La última división mitótica genera un saco embrionario formado por 8 núcleos (estadio FG5). El proceso de celularización posterior determina la formación de un gametofito femenino o saco embrionario constituido por siete células: dos células gaméticas, la ovocélula y la célula central -que incluye dos núcleos denominados núcleos polares- (estadio FG6) y cinco células accesorias: dos células sinérgidas, y tres células antípodas. En una última etapa los núcleos polares se fusionan dando origen al núcleo diploide de la célula central (FG7, Figura3).



**Figura 3. Estadios de desarrollo del saco embrionario en *A. thaliana*.** A, Esquema que representa el desarrollo del gametofito femenino junto con el de los integumentos del óvulo. f: funículo del óvulo, oi-ii: integumentos externo e interno, fm: megaspóra funcional, fg: saco embrionario, mp: micrópilo, ch: chalaza. B, la megaspóra conteniendo un único núcleo haploide (FG1) luego de dos rondas de mitosis produce un sincitio de 4 núcleos (FG4) ubicados en polos opuestos del saco embrionario y separados por una gran vacuola. Luego de la tercera mitosis, aparecen los fragmoplastos y comienzan a formarse las paredes celulares (FG5). La celularización se completa y los núcleos polares (np) continúan sin fusionarse (FG6). Al final del desarrollo del saco embrionario los núcleos polares se fusionan para formar la célula central (ccn) diploide (FG7). Adaptado de (Drews & Koltunow, 2011).

El saco embrionario completamente desarrollado es una estructura altamente polarizada. La ovocélula y las células sinérgidas ocupan el extremo micropilar, mientras las células antípodas aparecen en el extremo chalazal. La célula central ocupa gran parte del volumen del saco embrionario. A su vez esta polarización también ocurre a un nivel subcelular; los núcleos de la ovocélula y la célula central (las células gaméticas) aparecen muy cercanos entre sí,

favoreciendo el proceso de fecundación, mientras los núcleos de las células sinérgidas quedan orientados hacia el polo micropilar (Figura 4). Los integumentos del óvulo crecen acompañando el desarrollo del saco embrionario, formando un poro en el extremo micropilar que servirá de paso para el tubo polínico durante la fertilización (Figura 4).



**Figura 4. Estructura del gametofito femenino maduro.** A, flor de *A. thaliana* sin un pétalo/sépalo mostrando el pistilo en su interior. B, fotografía electrónica de barrido mostrando 2 óvulos, uno de ellos con el TP llegando al micrópilo (mi). C, a la izquierda: foto de un ovulo WT en microscopía de tipo DIC en el que se observa un saco embrionario maduro. A la derecha: esquema mostrando los diferentes tipos celulares. Ccn: núcleo de la célula central, Ec: ovocélula, mi: micrópilo, S: sinérgidas. Adaptado de (Pagnussat et al., 2007)

## 2. Proteínas involucradas en la especificación del saco embrionario

En la mutante *sporocyteless (spl)* (también conocida como *nozzle*), las células arqueosporiales son especificadas, pero éstas no son capaces de elongarse y diferenciarse como megasporocitos (Yang et al., 1999) (Schiefthaler et al., 1999). *SPL* codifica para una proteína nuclear perteneciente a la familia MADS box de factores de transcripción y sería esencial para la

esporogénesis tanto femenina como masculina, por lo que la mutación causa una esterilidad completa. Por otro lado, la determinación de la monosporia y el inicio de la megagametogénesis, estaría ligada a proteínas GAPs o proteínas de anclaje a GPI (glucosil-fosfatidil-inositol), y específicamente a ciertos arabinogalactanos (AGP18) (Acosta-García & Vielle Calzada, 2004, Demesa-Arévalo & Vielle-Calzada, 2013). *AGP18* es expresado en la célula madre de las megasporas (MMC) y en las células adyacentes de la nucela del óvulo durante la transición esporofito-gametofito. Las líneas RNAi deficientes en *AGP18*, poseen defectos durante la elongación y en el inicio de las divisiones mitóticas de la megaspora funcional (Acosta-García & Vielle Calzada, 2004).

La polaridad observada en el desarrollo del saco embrionario se corresponde con una polaridad general en el óvulo. Esto sugiere que los tejidos esporofíticos que rodean al gametofito femenino podrían regular dicha polaridad. Se ha observado que el transportador de auxinas PIN1 sería requerido en los tejidos esporofíticos que rodean al saco embrionario para promover el desarrollo del mismo (Ceccato L et al., 2013). Los genes *YUC1* y *YUC2*, que codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de auxinas, se expresarían inicialmente en la nucela del óvulo y luego en el polo micropilar del saco embrionario. La acumulación de auxinas en el extremo micropilar determinaría al menos la diferenciación de las células sinérgidas y de la ovocélula (Pagnussat et al., 2009, Panoli et al., 2015).

### **3. Especificación de las células gaméticas**

Posiblemente todas las células dentro del saco embrionario tengan la capacidad de diferenciarse en células gaméticas. En las mutantes *lachesis (lis-1)*, *clotho (clo)* y *atropos (ato)* existe una desregulación en la diferenciación de la ovocélula (Gross-Hardt et al., 2007a) (Moll et al., 2008). En estas mutantes las células sinérgidas y la célula central pierden su identidad y son capaces de expresar marcadores específicos de ovocélula. Por otro lado, las células antípodas se diferencian como célula central. Esto demuestra una extrema plasticidad en la diferenciación de

las células del gametofito femenino y la existencia un mecanismo que podría censar el estado de cada una de ellas y determinar su destino. *LIS* es expresado específicamente en las células gaméticas y evitaría que las células adyacentes dentro del saco embrionario se diferencien como nuevas células gaméticas, especificándose las mismas como células accesorias. Así, la correcta diferenciación de las células accesorias, así como también el normal funcionamiento de la célula central y el posterior desarrollo del endosperma, estarían regulados por la ovocélula (Völz et al., 2012). Por otra parte, la proteína CLO/GFA1 sería necesaria para mantener el patrón normal de expresión de *LIS*, aunque se ha visto que la desregulación de *LIS* no sería suficiente para explicar el fenotipo observado en las mutantes *clo*. *LIS*, *CLO* y *ATO* codifican para los factores de splicing PRP4, Snu114 y SF3a60, respectivamente. Estos factores están altamente conservados entre distintos organismos y constituyen componentes esenciales del espliceosoma (Snu114 tendría un rol fundamental en la activación del espliceosoma mientras que SF3a60 sería necesario para la formación del pre-espliceosoma). De esta forma, el mecanismo que regula el potencial gamético en las células que componen el saco embrionario, dependería al menos de diversos componentes que integran el espliceosoma. Así, mientras que las auxinas establecerían el destino celular, *LIS* estaría implicado en conservar las funciones de cada una de las células dentro del gametofito femenino, luego de la celularización.

El desarrollo y funcionamiento normal del saco embrionario requiere además de varias funciones celulares fundamentales, como mitosis, citocinesis, migración nuclear, cariogamia y muerte celular. De esta forma, las mutaciones que afecten estos procesos probablemente también afectarán al desarrollo y función del gametofito femenino. En las mutantes *eostre*, se observa una marcada asincronía durante el proceso de migración de los núcleos dentro del saco embrionario luego de la segunda ronda de mitosis, entre los estadios FG4 y FG5. Por tal motivo, solo un núcleo aparece en la posición de las células sinérgidas, diferenciándose finalmente como tal, mientras que se diferencian dos ovocélulas funcionales, ya que ambas son capaces de ser fertilizadas (Pagnussat et al., 2007).

Debido a que la migración anormal de los núcleos durante el desarrollo gametofítico afecta la especificación de las células gaméticas, se propuso que existirían claves posicionales a lo largo del saco embrionario que determinarían el destino de cada célula (Pagnussat et al., 2007). En *eostre* existe una desregulación del gen *BLH1*, perteneciente a la familia BELL de factores de transcripción de homeodominio. Mientras en plantas WT la expresión de *BLH1* es detectada sólo en el tracto transmisor de la placenta y en la base del funículo del ovulo, en *eostre BLH1* se expresa ectópicamente en el saco embrionario. Esta expresión ectópica estaría interfiriendo con las interacciones normales entre proteínas de tipo BELL y KNOX que se dan durante el desarrollo normal del gametofito y que serían esenciales para su normal desarrollo (Pagnussat et al., 2007).

La especificación de la célula central implica la fusión de los núcleos polares. En las mutantes *nuclear fusión defective (nfd)* está afectada la fusión de los núcleos polares durante el desarrollo del saco embrionario (Portereiko et al., 2006). Al menos seis de estas mutantes (*nfd1* a *nfd6*) codifican para proteínas localizadas en la mitocondria, sugiriendo un rol para ésta organela durante la cariogamia. *NFD1* codifica para una subunidad ribosomal 50S mitocondrial, y sería requerida además, durante la fusión de gametas en el proceso de doble fertilización. Una sisteinil tRNA transferasa mitocondrial (SYCO ARATH), expresada en la célula central y cuya función sería necesaria para mantener la integridad de las crestas mitocondriales, también participaría en la fusión de los núcleos polares (Kägi et al., 2010). Otra proteína de la matriz mitocondrial que participaría en la fusión de los núcleos polares, es la chaperona GFA2, del tipo Mdj1p de levaduras (Christensen et al., 2002).

Los genes *BiP1* y *BiP2*, los cuales codifican para una chaperona del retículo endoplasmático homóloga a Hsp70 de levaduras, también serían requeridos para la fusión de los núcleos polares (Maruyama et al., 2010). En dobles mutantes *bip1 bip2*, los núcleos polares aparecen cercanos entre sí, pero las membranas nucleares no son capaces de fusionarse. A pesar de ello y a diferencia de lo que ocurre en mutantes *nfd1*, la fusión de las gametas durante la doble fertilización no estaría comprometida, aunque se observan anomalías en el desarrollo del

endosperma. Durante la fertilización, uno de los núcleos polares se fusionaría con una célula espermática dando lugar a un núcleo diploide (fertilizado) y un núcleo haploide (sin fertilizar). El desarrollo posterior del endosperma es más lento que en plantas WT y produce núcleos de diferente tamaño y dispuestos de manera irregular. Aunque las divisiones en el embrión no se ven afectadas, la semilla en desarrollo aborta tempranamente. De esta forma, la fusión de los núcleos polares podría resultar de importancia para la regulación del desarrollo del endosperma.

#### **4. Las células accesorias del saco embrionario**

Las células sinérgidas y las antípodas son consideradas células accesorias dentro del saco embrionario. Las células sinérgidas están involucradas en la atracción del tubo polínico hacia el saco embrionario y la descarga de las células espermáticas dentro del mismo (Higashiyama et al., 2001) (Palanivelu et al., 2010). Hacia el extremo micropilar las paredes celulares de las células sinérgidas aparecen invaginadas y son más delgadas, formando una estructura denominada aparato filiforme (Drews & Koltunow, 2011). Esta estructura incrementa la superficie de la membrana plasmática, que en esta región contiene numerosas organelas para la secreción de sustancias como celulosa, hemicelulosa, pectina, calosa y proteínas. Se ha propuesto que el aparato filiforme sería importante para la secreción de atractantes del tubo polínico y para su recepción (Punwani et al., 2007) aunque un trabajo más reciente indica que la entrada del tubo polínico sería en un punto adyacente al aparato filiforme (Leshem et al., 2013).

Aunque el rol de las células antípodas no estaría del todo elucidado, se cree que éstas podrían transferir nutrientes al gametofito femenino en desarrollo desde los tejidos esporofíticos que lo rodean, y funcionar como células de soporte durante la diferenciación celular, adquiriendo roles gaméticos en los casos en que la célula central pierde dicha capacidad (Kägi et al., 2010). Se ha postulado que en *Arabidopsis* las células antípodas sufrirían muerte celular programada hacia el final del desarrollo del saco embrionario, y que esto sucedería bajo el control de la célula central

(Kägi et al., 2010). A pesar de ello, las células antípodas han sido detectadas luego de la fertilización, al menos durante las primeras etapas del desarrollo del endosperma, por lo que este punto es aun controversial (Song et al., 2014).

### **5. Polinización y atracción del tubo polínico**

La interacción y posterior fusión de las gametas depende en primera instancia de la interacción entre los gametofitos. El pistilo, en conjunto con el saco embrionario, controla la dirección del crecimiento del tubo polínico luego de la polinización, de tal forma que el mismo alcance la zona micropilar del óvulo desde el estigma. Los tejidos esporofíticos maternos dirigen la primera etapa del crecimiento del tubo polínico (TP) desde el estigma y por el tracto transmisor del estilo y la placenta. Las células sinérgidas por su parte controlan la atracción del TP en los estadios finales de su crecimiento, desde la placenta, por el funículo del óvulo hacia el micrópilo.

Ciertos lípidos presentes en el estigma y arabinogalactanos en el estilo junto con otras proteínas de adhesión en el tracto transmisor están involucrados en el proceso de crecimiento del TP (Park et al., 2000). La última etapa de crecimiento direccionado del TP desde la base del funículo hasta el micrópilo del óvulo puede dividirse en dos fases; durante la primera, el TP es guiado por el funículo desde el tracto transmisor hacia el óvulo (fase funicular). Durante la segunda, el TP es atraído desde la parte distal del funículo hacia el micrópilo del óvulo (fase micropilar) (Shimizu & Okada, 2000). Típicamente sólo un TP alcanza el micrópilo del óvulo, mientras la llegada de otros TPs (polispermia), sería bloqueada por un mecanismo que podría depender de la fusión de las gametas (Beale et al., 2012) (Maruyama et al., 2013).

Mediante ensayos de ablación con láser de las células sinérgidas y/o de la ovocélula y/o de la célula central en el saco embrionario de *Torenia fournieri*, se demostró que solo las células sinérgidas serían suficientes para atraer el TP hacia el micrópilo, siendo éstas el principal recurso de atractantes del TP (Higashiyama et al., 2001). En la mutante *eostre*, debido a la

alteración en la identidad de las células micropilares, lo que determina la especificación de una única célula sinérgida en lugar de dos, los tubos polínicos alcanzan el micrópilo del óvulo pero creciendo con patrones ondulantes, lo que se ha propuesto sería el resultado de una debilidad en la señal de atracción (Pagnussat et al., 2007). En mutantes *clo* y *lis* debido a una desregulación en la diferenciación de las células accesorias, la función de las células sinérgidas se encuentra parcialmente afectada, al igual que la atracción de los tubos polínicos (Gross-Hardt et al., 2007b) (Moll et al., 2008). El factor de transcripción nuclear MYB98, expresado en las células sinérgidas, regularía la expresión de al menos 16 genes, algunos de los cuales codifican para pequeñas proteínas ricas en cisteína (CRPs). Este grupo de proteínas conocidas como LURE son secretadas como atrayentes de TPs (Okuda et al., 2009) (Takeuchi & Higashiyama, 2012). Los genes *LURE* son expresados específicamente y en forma muy abundante en sinérgidas y hasta el momento se han descrito dos genes *LURE* en *T. foeneri* (*TfLURE1* and *TfLURE2*) y seis genes *LURE* duplicados en *Arabidopsis* (*AtLURE1.1–AtLURE1.6*).

A pesar de lo demostrado anteriormente, las mutantes en el gen *CCG* (*Central Cell Guidance*), el cual codifica para una proteína nuclear expresada únicamente en la célula central, y que no sería regulada por MYB98, no son capaces de atraer el TP hacia el micrópilo (Chen et al., 2007). Este trabajo sugirió que la célula central también estaría implicada en la atracción del TP de *Arabidopsis*. De la misma forma, en las mutantes *magatama* (*maa*), los TPs serían capaces de crecer por el tracto transmisor y por el funículo hacia el óvulo sin encontrar el camino hacia el micrópilo (Shimizu & Okada, 2000). Aunque se desconoce la base molecular que subyace a la mutación *maa*, ésta afectaría además la fusión de los núcleos polares en la célula central. En ambas mutantes, *ccg* y *maa*, al igual que en mutantes *myb98*, se ha observado una menor cantidad de atrayentes en las sinérgidas (Takeuchi & Higashiyama, 2012). Por otro lado, en líneas silenciadas *ZmEAI* (*RNAi*) de *Zea mays*, también se ha observado la falta de atracción de TPs durante la fase micropilar. *ZmEAI* codifica para una proteína transmembrana, expresada en la ovocélula y localizada en el extremo micropilar del saco embrionario (Márton et al., 2005). Aunque *ZmEAI* podría funcionar como parte de la maquinaria de señalización, para la llegada

del TP y descarga de las células espermáticas en el saco embrionario de maíz y otras gramíneas, aun no se han encontrado homólogos de ésta proteína en *Arabidopsis* ni en otras dicotiledóneas. Por lo expuesto, a pesar del rol principal aceptado para las células sinérgidas en la atracción del TP, no podría descartarse la participación de otras células del saco embrionario (al menos de la célula central en el caso de *Arabidopsis*), durante este proceso.

Luego de su llegada al micrópilo, el TP crece a través (o en cercanía) al aparato filiforme de una de las células sinérgidas, detiene su crecimiento, se rompe y descarga las dos células espermáticas. Típicamente la célula sinérgida receptora inicia un proceso de muerte celular programada (MCP) antes o en el momento de la entrada del TP (Sandaklie-Nikolova et al., 2007). Esta degeneración de la sinérgida receptora en *Arabidopsis* sería inducida por el contacto con el TP y facilitaría la entrada del tubo polínico al saco y el acceso de las células espermáticas a las células gaméticas. En las mutantes *gfa2*, deficientes en una chaperona de la matriz mitocondrial del tipo Mdj1p, las sinérgidas no sufren MCP y la fertilización no se lleva a cabo, resaltando la importancia de la MCP en este proceso (Christensen et al., 2002).

En las mutantes hemicigotas *feronia* (*fer*) (o su alélica *sirene*) los sacos embrionarios se desarrollan normalmente, pero la mitad de ellos no son fertilizados. En estos óvulos, el TP continúa creciendo dentro del gametofito femenino y no libera las células espermáticas. Estos sacos embrionarios además, atraen múltiples TPs y algunos de ellos muestran un desarrollo autónomo del endosperma (Huck et al., 2003) (Escobar-Restrepo et al., 2007). *FER* codifica para un receptor del tipo kinasa (RLK) ubicado en la membrana plasmática del aparato filiforme de las células sinérgidas y podría interactuar con un ligando del TP, haciendo competente a la sinérgida para la descarga de las células espermáticas. La secuencia extracelular de FERONIA es altamente divergente entre especies y se ha propuesto que esta kinasa podría funcionar en un mecanismo de reconocimiento entre los gametofitos y prevenir la fertilización interespecífica. En cruzamientos entre *A. thaliana* y especies relacionadas de la familia Brassicaceae, los TP continúan creciendo dentro del saco embrionario y no liberan las células espermáticas, tal como ocurre en las mutantes *fer* (Escobar-Restrepo et al., 2007).

Las RLKs son proteínas transmembrana capaces de recibir señales a través de su dominio extracelular y activar cascadas de señalización gracias a su dominio kinasa intracelular. Estas proteínas constituyen un grupo monofilético en plantas, con alrededor de 620 miembros. Los genes *ANXUR* (*ANX1* y *ANX2*) expresados en el tubo polínico forman parte de un clado hermano al que pertenece *FERONIA*. Estas kinasas en el tubo polínico formarían parte del sistema de reconocimiento entre los gametofitos, necesario al menos para coordinar la descarga a tiempo de las células espermáticas (Miyazaki et al., 2009). En las dobles mutantes *anx1 anx2*, los tubos polínicos detienen su crecimiento y descargan las células espermáticas antes de alcanzar los tejidos del tracto transmisor materno, *in vitro*. La evidencia filogenética sugiere que *ANX* y *FER* habrían surgido temprano en la evolución de las angiospermas por duplicación, y habrían divergido durante la especificación de cada uno de los gametofitos (Miyazaki et al., 2009).

En las mutantes *scylla* (*syl*) y *loirei* (*lre*) también se encuentra alterada la recepción del TP, observándose el mismo fenotipo que en mutantes *fer*. En óvulos *syl* y *lre* no se observa la ruptura del tubo polínico ni la descarga de las células espermáticas y existe un desarrollo autónomo del endosperma, debido a que no se inhiben las divisiones celulares en la célula central (Rotman et al., 2008) (Capron et al., 2008). Mientras que el gen responsable del fenotipo en mutantes *syl* no ha sido elucidado, *LORELEI* codifica para una proteína de la familia GAP (proteínas con anclaje a GPI) y es expresado en la célula sinérgida receptora del TP en el momento previo a su degeneración. Las proteínas GAP de eucariotas, poseen funciones en señalización celular y en la reproducción. En mamíferos, las proteínas GAP de la superficie de los ovocitos son requeridas para la fusión con los espermatozoides (Kaji & Kudo, 2004). Es interesante notar que aunque plantas y animales han desarrollado mecanismos divergentes para la reproducción y el reconocimiento interespecífico, en ambos casos las proteínas GAP tienen un rol en la regulación de la fertilización (Capron et al., 2008). Asimismo, la interacción entre el TP y las sinérgidas se asemejaría a las interacciones entre ovocito y espermatozoide, aunque

ésta interacción es a nivel de los gametofitos en lugar de a nivel de gametas (Escobar-Restrepo et al., 2007).

Además, de manera análoga a lo ocurrido durante la interacción entre ovocitos y espermatozoides en animales, la glicosilación de proteínas resultaría esencial para la interacción entre los gametofitos durante la recepción de los TPs (Lindner et al., 2015). Los genes *TURAN* (*TUN*) y *EVAN* (*EVN*), codifican para una uridin difosfato (UDP)-glicosiltransferasa y para una dolicol kinasa, respectivamente, involucradas en la N-glicosilación de proteínas en el retículo endoplasmático (ER). Las mutantes *tun* y *evn* son capaces de atraer TPs, pero los mismos invaden el saco embrionario y no liberan las células espermáticas, tal como ocurre en mutantes *fer*. A pesar de ello, y a diferencia de las mutantes *fer*, *tun* y *evn* provocan una letalidad completa en el polen. Los granos de polen *evn* degeneran antes de llegar a la madurez, mientras que en mutantes *tun* el desarrollo del polen es normal, aunque los TPs liberan las células espermáticas inmediatamente luego de la germinación, del mismo modo que las dobles mutantes *anx1 anx2*. *TUN* estaría involucrado en la glicosilación de *ANX1* y *ANX2*. La falta de glicosilación en las proteínas *ANXs* provocaría su degradación y su ausencia en los TPs, lo que desencadenaría la ruptura y liberación de las células espermáticas de manera temprana. *TUN* es requerida además durante el desarrollo vegetativo de la planta. Es probable que *EVN* (homóloga a *SEC59* de levaduras), participe en la glicosilación de *LORELEI*, debido a que en mutantes *sec59*, se ha observado una completa depleción de proteínas *GAPs*.

Los peroxisomas tendrían un papel protagónico durante el reconocimiento de los gametofitos y estarían implicados en emitir una señal difusible requerida para la descarga del TP (Boisson-Dernier et al., 2008). En las mutantes *abstinence by mutual consent* (*amc*), el TP llega al saco embrionario pero no detiene su crecimiento ni descarga las células espermáticas, produciendo un fenotipo similar a *fer*. Además, la sinérgida no degenera y los sacos embrionarios mutantes atraen múltiples TPs. Ambas mutantes, *amc* y *fer*, expresan correctamente marcadores específicos de las células sinérgidas, y no muestran defectos estructurales. A pesar de las similitudes, el fenotipo observado en las mutantes *amc* tiene lugar solo cuando ambos

gametofitos portan la mutación. Los sacos embrionarios *amc* son capaces de recibir TPs WT, a diferencia de lo que ocurre en *fer*. Posiblemente, luego del reconocimiento entre el gametofito femenino y el TP mediado por FER, la mutación *amc* podría interrumpir una señal hacia el TP, necesaria para la descarga de las células espermáticas. *AMC* se expresa en ambos gametofitos y codifica para una peroxina presente en la maquinaria requerida para la importación de proteínas hacia la matriz del peroxisoma.

El control de la competencia de los TPs sería sumamente importante para responder a las señales del saco embrionario. En *Torenia*, el arabinogalactano AMOR en los TPs, los hace competentes a los péptidos LURE (Mizukami et al., 2016). Los arabinogalactanos, además, tendrían un rol crítico para la reproducción sexual, ya que asociados a proteínas participan en el desarrollo del óvulo y polen, en la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico y en la muerte celular de sinérgidas (Hou et al., 2016, Dresselhaus & Coimbra, 2016). En *Arabidopsis* se han descrito varios receptores de LURE en el tubo polínico: MALE DISCOVERER 1 (MDIS1) y MDIS1-INTERACTING RECEPTOR LIKE KINASE (MIK1 y MIK2). MDIS1 forma heterodímeros con MIK1 o con MIK2 que son favorecidos en presencia de LURE. Las mutantes de tipo “knockout” para cada uno de estos genes muestran defectos en la atracción de TPs pero no en su crecimiento (Wang et al., 2016). Por otra parte se ha demostrado que PRK6, una kinasa de tipo receptor ubicada en el extremo del tubo polínico, es un receptor esencial de LURE1 en *Arabidopsis* (Takeuchi & Higashiyama, 2016).

Recientemente, se ha demostrado que el canal de calcio CNGC18, uno de los 8 presentes en el extremo del TP, es el único canal esencial para la dirección del crecimiento del TP (Gao et al., 2016). Por otra parte, se han descrito oscilaciones de calcio en las células sinérgidas que inician al contacto de las mismas con el extremo del TP. En la ovocélula y la célula central se detecta además un incremento transiente en la  $[Ca^{2+}]$  citosólico. Un segundo pico de calcio se da luego en la ovocélula, que se correlaciona con su fertilización (Denninger et al., 2014). Se ha

demostrado que para iniciar y regular estas respuestas, y para acoplar estos incrementos de  $[Ca^{2+}]$  citosólico, se requieren componentes de la vía de señalización de FERONIA (FER) (Ngo et al., 2014).

## 6. Fertilización e inicio del desarrollo embrionario

El proceso de doble fertilización comienza con la descarga de las dos células espermáticas desde el tubo polínico. Una de estas células espermáticas fertiliza la ovocélula para formar un cigoto mientras que la otra fertiliza la célula central, lo que dará origen al tejido nutritivo denominado endosperma. Desde su descubrimiento en 1898 por Nawashin (Maheshwari, 1950) numerosos estudios se han enfocado en este fenómeno. Sin embargo, debido a que el proceso se encuentra embebido dentro del gametofito femenino y a su vez rodeado de tejido esporofítico materno, existen dificultades para su estudio. En esta última década sin embargo, se ha realizado un enorme progreso debido al estudio de numerosas mutantes deficientes en la fusión de gametas y al estudio de la dinámica de las células espermáticas gracias a técnicas de microscopia *in vivo* (Berger et al., 2008, Hamamura et al., 2011).

En *Arabidopsis*, ciertas CRPs (EC1) acumuladas dentro de vesículas de la ovocélula, son necesarias para la competencia de las células espermáticas durante la fertilización (Sprunck et al., 2012). En quintuples mutantes *ec1* las células espermáticas son liberadas dentro del saco embrionario, pero la fusión de gametas no se lleva a cabo. Además, la sinérgida no receptora (sinérgida NR) continúa atrayendo TPs y en ocasiones llegan a observarse 4 células espermáticas dentro del gametofito. Esto sugiere que la fusión de gametas durante la fertilización sería necesaria para prevenir la atracción de múltiples TPs (Beale et al., 2012). El único fusógeno (involucrado en la fusión de gametas) conocido hasta el momento en las células espermáticas es HAPLESS2 o HAP2 (también conocido como GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 o GCS1). HAP2/GCS1 es una proteína transmembrana en las células espermáticas y se ubicaría en sistemas de endomembranas previo a la fertilización. En contacto con las gametas femeninas, EC1 controlaría la formación de dominios de HAP2 en la membrana

plasmática de las células espermáticas, permitiendo la exposición de la maquinaria requerida durante la fusión de las gametas.

La capacidad de atraer múltiples TPs proveería al saco embrionario de un mecanismo capaz de asegurar la fertilización en óvulos que reciben células espermáticas no funcionales, y podría explicar el valor adaptativo para la existencia de dos sinérgidas. A pesar de ello, luego de la fertilización el gametofito femenino debe ser capaz de bloquear rápidamente la llegada de nuevos TPs, de manera de prevenir la polispermia (fertilización con múltiples células espermáticas) y maximizar la eficiencia de la polinización, permitiendo la llegada de TPs a todos los óvulos. Luego de la fertilización, la célula sinérgida NR se fusiona con el endosperma en desarrollo. Este mecanismo permitiría una dilución rápida de los atractantes (LUREs) presentes en el citoplasma de la sinérgida NR (Maruyama et al., 2015). Además, al menos la ovocélula sería capaz de emitir una señal al núcleo de la sinérgida NR que desencadenaría su desorganización, en sincronía con las primeras divisiones mitóticas del endosperma. El etileno tendría un rol principal durante esta señalización y sería requerido para la degeneración de la sinérgida NR luego de la fertilización (Völz et al., 2013).

En *Arabidopsis*, el complejo de proteínas FIS-PRC2 (Fertilization Independent Seed-*Polycomb* Repressive Complex 2) en la célula central también estaría involucrado en el bloqueo de la llegada de múltiples TPs al saco embrionario (Maruyama et al., 2013). Las proteínas PRC están involucradas en el silenciamiento de genes a través del remodelado de la cromatina. De esta forma, aseguran la herencia de un determinado estado de expresión génica (encendido/apagado) y constituyen una “memoria” celular (a través de mecanismos epigenéticos) que no se encuentra presente en la propia secuencia de DNA (Reyes & Grossniklaus, 2003). Las proteínas *polycomb* se han conservado a lo largo de la evolución, y se encuentran involucradas en el control transcripcional de numerosos reguladores del desarrollo. Entre ellos los genes homeóticos (HOX) de *Drosophila* y diversos genes que regulan el crecimiento y la proliferación celular (los complejos PRC estarían relacionados directamente con el desarrollo del cáncer en los seres humanos) (Reyes & Grossniklaus, 2003). El complejo FIS-PRC2 en *Arabidopsis*, mantiene la

represión de genes involucrados en la proliferación celular durante el desarrollo reproductivo (Curtis & Grossniklaus, 2008). Dentro de las mutantes *fis* se incluyen; *fertilization independent seed 2 (fis2)* (Chaudhury et al., 1997), *medea (mea)* (Grossniklaus et al., 1998), *fertilization independent endosperm (fie)* (Ohad et al., 1996) y *Arabidopsis multisuppressor of ira 1 (msi1)* (Köhler et al., 2003). En las mutantes *fis* se produce un desarrollo autónomo del endosperma en ausencia de fertilización. Además, las mutantes *msi1* son capaces de desarrollar embriones haploides por partenogénesis. A pesar de ello, la mayoría de las semillas *fis* no son capaces de sobrevivir más allá de la celularización del endosperma (Chaudhury et al., 1997) y los embriones *msi1* desarrollados por partenogénesis forman estructuras con divisiones asimétricas de no más de 20 células y no son viables (Guitton & Berger, 2005). Por otro lado, en las mutantes *cyclin-dependent kinases1 (cdka;1* o también llamada *cdc2)* donde solo la ovocélula es fertilizada, el endosperma también es capaz de iniciar su desarrollo de manera autónoma. Sin embargo, estas semillas abortan al llegar el embrión al estadio globular (Nowack et al., 2006). De esta forma, en ausencia de fertilización los genes *FIS* reprimen el desarrollo autónomo de la ovocélula y la célula central, mientras que la fertilización de la ovocélula sería un evento capaz de regular positivamente la proliferación del endosperma.

Luego de la fertilización, las mutaciones en los genes *FIS* promueven un desarrollo anormal del embrión y el endosperma, lo que conduce al aborto de la semilla. De esta manera, un defecto en el gametofito (efecto materno) provoca la letalidad en el embrión. Este efecto materno observado en las mutantes *fis*, podría deberse a una alteración en la cantidad de transcritos acumulados en la célula central o en la ovocélula, o a que sólo el alelo paterno no fuese capaz de sostener el desarrollo normal del embrión y endosperma. Alternativamente, el efecto materno podría deberse a que durante la primera etapa del desarrollo de la semilla, la transcripción de genes ocurra exclusivamente a partir de los alelos maternos heredados. Ambos alelos (materno y paterno) luego de la fertilización, pueden expresar diferentes niveles de transcritos debido a marcas epigenéticas (Curtis & Grossniklaus, 2008). Este fenómeno es conocido como “imprinting” genómico, y se cree que podría estar relacionado con la asignación de los recursos

disponibles de la madre hacia la progenie (Baroux et al., 2007). De esta forma los genes paternos promoverían el crecimiento de la descendencia, mientras los genes maternos lo limitarían, distribuyendo los recursos entre toda la progenie. El complejo FIS-PRC2 mantendría silenciada la expresión del alelo *MEDEA* paterno luego de la fertilización.

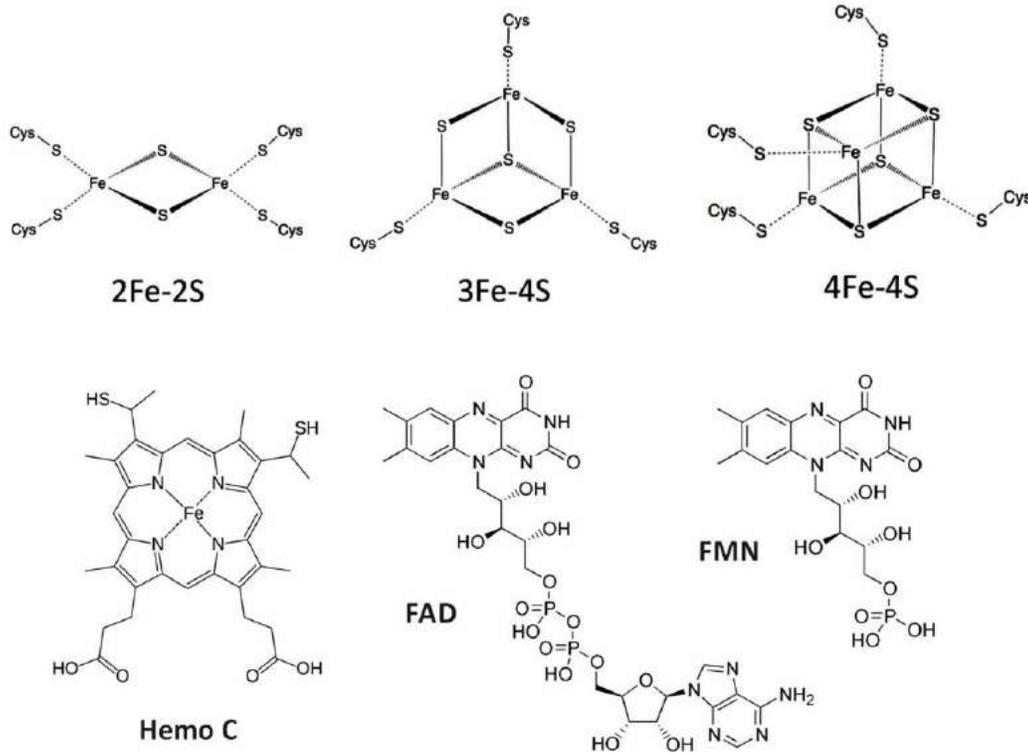
En mutantes *glauce (glc)* la célula central no logra ser fertilizada y tampoco ocurre un desarrollo autónomo del endosperma. Sin embargo, la ovocélula es fertilizada y el embrión es capaz de desarrollarse al menos hasta el estadio globular. *GLC*, expresado de manera materna, sería responsable de la activación del alelo paterno *PHE*, promoviendo el desarrollo del embrión y el endosperma (Ngo et al., 2007). El fenotipo observado en *glc* sugiere que la embriogénesis y el desarrollo del endosperma podrían suceder sin estar acoplados uno al otro, y aún más, que sería posible evitar el “imprinting” en el endosperma que reprime su propio desarrollo. En mutantes *mea* (en las cuales *PHE* no se encuentra reprimido en la célula central) no sería necesario el alelo paterno *PHE* en el endosperma para iniciar su desarrollo. Esta es la razón por la cual, cruzando mutantes *mea* con *cdka-1* (la cual fertilizará solo a la ovocélula y no a la célula central), es posible obtener semillas viables (aunque más pequeñas) con un endosperma diploide (Curtis & Grossniklaus, 2008). Precisamente ésta es la forma en la que las especies apomícticas desarrollan autónomamente sus semillas. Finalmente, la fertilización del endosperma en *Arabidopsis*, constituiría un mecanismo para anular la represión sobre el desarrollo de la célula central. Previo a la fertilización, esta represión prevendría el desarrollo de endosperma en ausencia del embrión.

## **7. Las ferredoxinas, estructura e historia evolutiva**

El análisis filogenético de diversos organismos sugiere que las primeras proteínas redox incorporaron metales como catalizadores en sus estructuras terciarias. En particular, el grupo tiol (SH-) de la cisteína, el anillo imidazol de la histidina y el grupo carboxilo del aspartato y el glutamato son capaces de coordinar dichos metales a través de uniones iónicas.

El hierro es uno de los metales de transición más abundantes de la tierra y es capaz de encontrarse en distintos estados de oxidación [ $\text{Fe}^{2+}$  - $\text{Fe}^{3+}$  - $\text{Fe}^{4+}$ ]. Además, sus átomos pueden asociarse fácilmente en condiciones anaeróbicas. Debido a su versatilidad y biodisponibilidad en la tierra primitiva, el Fe ocupó tempranamente un lugar central unido a las proteínas, como catalizador de una amplia variedad de reacciones biológicas (Barupala et al., 2016). Estas incluyeron transferencia de electrones, activación de sustratos y reacciones de óxido-reducción. Las cadenas de transporte de electrones encontradas en diferentes organismos comparten el mismo esquema, sostenido por proteínas redox que incluyen grupos hemo y centros Fe-S (Figura 5).

Las ferredoxinas (literalmente hierro-redox-proteínas) son proteínas ubicuas con centros Fe-S, que intervienen en la creación de gradientes redox y en el transporte de electrones asociados a membranas en mitocondrias y cloroplastos de eucariotas. Sin embargo, también participan en la fijación de nitrógeno en bacterias anaeróbicas (*clostridium pasteurianum*) y se cree que estuvieron presentes en los primeros organismos vivos, participando en la fermentación de moléculas orgánicas simples. A partir de entonces las ferredoxinas (Fds) han sido asociadas a diversas funciones celulares como la fotosíntesis, la respiración, la fijación de nitrógeno, la transcripción, traducción y reparación del DNA y la detoxificación, han sido encontradas en citosol y organelas diversas; como el núcleo, retículo endoplasmático, cloroplastos y mitocondrias, y en diversos organismos como bacterias, algas, plantas y animales (Cammack et al., 1981) (Müller et al., 1999). Debido a su ubicuidad y origen ancestral, las Fds han sido usadas para reconstruir árboles filogenéticos (Dongun Kim et al., 2013).



**Figura 5. Moléculas involucradas en el transporte de electrones.** Arriba: estructura de centros Fe-S. Abajo: Hemo C presente en citocromos mitocondriales (como el cyt c y el P450sc), FAD (flavin-adenin-dinucleótido) presente en ferredoxin NADPH reductasas y FMN (flavin-mono nucleótido) característico de flavodoxinas.

Como regla general, las Fds son proteínas pequeñas (6-25 kDa), solubles y con un bajo potencial redox otorgado por un centro [2Fe-2S]. Este centro contiene 2 átomos de Fe, cada uno coordinado con 2 átomos de S y 2 enlaces cisteinil-sulfuro que lo unen a la cadena polipeptídica (Figura 5).

En base a la identidad de secuencia, se pueden distinguir 3 subfamilias de Fds [2Fe-2S]: Las del tipo “*plantas*”, típicamente en cloroplastos de organismos fotosintéticos, que intervienen en la transferencia de electrones desde el Fotosistema I para la producción de NADPH. Aquí se incluyen además las Fds de halobacterias involucradas en la fijación de nitrógeno. Las del tipo “*vertebrados*”, representadas por las adrenodoxinas (ADXs), aisladas inicialmente de la corteza adrenal de mamíferos, se ubican en mitocondrias y participan en el transporte de electrones

desde el NADPH hacia diversos citocromos p450. A este grupo también pertenecen las putiderodoxinas, aisladas de *Pseudomonas putida*, involucradas en el transporte de electrones hacia el citocromo P450<sub>cam</sub>. La tercera subfamilia de Fds corresponde a las del tipo “clostridial”, representadas por Fds de *clostridium pasteurianum*, de donde fueron descritas por primera vez. Estas Fds forman parte de otra superfamilia de proteínas Fe-S constituida por Fds bacterianas con una estructura y ensamblaje del centro Fe-S distinto a los típicos [2Fe-S]. Además de la Fd de *C. pasteurianum* con un solo centro [2Fe-2S] y que está asociada a la fijación de N<sub>2</sub>, esta superfamilia comprende a las Fds de *Azotobacter vinelandii*, con un centro [3Fe-3S], las de *Desulfovibrio gigas* con un centro [3Fe-4S], las de *Bacillus polymyxa* con un centro [4Fe-4S], y las presentes en fermentadores anaeróbicos como *Clostridia* y *Peptococci* o en bacterias fotosintéticas como *Chlorobium* y *Chromatium*, todas con 2 centros [4Fe-4S] (Figura 5).

Existe una alta conservación de secuencia dentro de cada subfamilia de Fds; sin embargo entre las distintas subfamilias la identidad de secuencia puede ser muy baja, a pesar de presentar estructuras similares. Un rasgo que se ha conservado en la evolución de todas las Fd con centros [2Fe-2S], es la posición de los 4 residuos de cisteína encargados de coordinar los átomos de Fe durante el ensamblaje del centro Fe-S (Figura 6). Junto a la tercer cisteína de este grupo, la presencia de un residuo de histidina (His<sub>56</sub>) está altamente conservada dentro de las Fds del tipo “vertebrados” pero se encuentra ausente en las Fds del tipo “plantas”. Se cree que esta histidina sería importante para la interacción de las Fds mitocondriales con los citocromos p450, en los sistemas de hidroxilación. Aparecen similitudes además, en las estructuras terciarias de todas las Fds. Estas conformaciones determinan el correcto ensamblado y exposición, del centro Fe-S y de los sitios de interacción con sus pares redox.

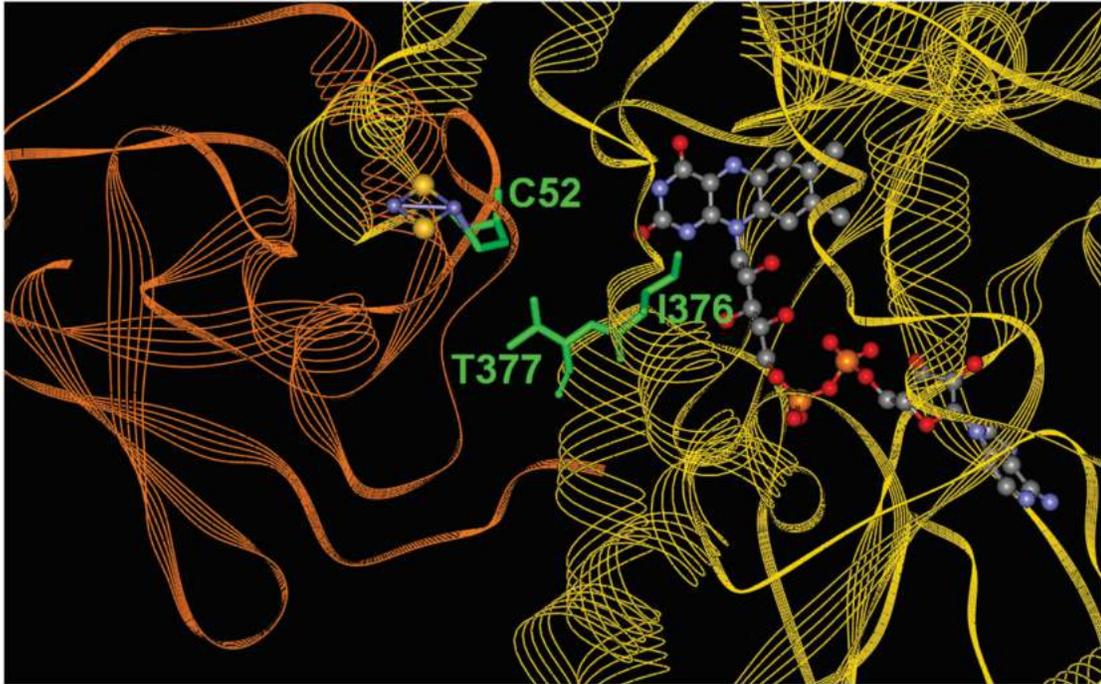
Adx	no	5...10.....5...20....5...30....5...40....5...50....5	
			A B C
Adx		DKITVHFINR.DGETLTTKGIKIGDSLDDVVQNNLDIDGFGACEGTLACSTC	55
Pdx		SKVVVYVSH.dGTRRQLDVADGVSLMQAAVSNgiy.diVGDGGSASCATC	48
Fdx (Ear)		AYKTVLKTP.s.GEFTLDVPEGTTILDAAEEAGYd..lPFSC.RagaCSSC	46
Fdx (Cfu)		YKVTLKTP.s.GEETIECPEDTYILDAAEEAGLdl..PYSC.RagaCSSC	45
Fdx (A,v)		aTFKVTLINeaEGTKHEIEVPEDEYILDAAEEQGYdl..PFSCRA.gaCSTC	49
Fdx (A,h)		asYQVRLINKkqdiDTTIEIDEETTILDGAENGINEIel..PFSCH.sgsCSC	49
Fdx (Hma)		PTVEYLYN.ev*YGSLEVNEGEYILEAAEAQGYdw..PFSCR.AGACANC	71
Fdx (Asa)		asYKVTLKTP.d.GDNVITVPDEYILDVAEEEGLdl..PYSCR.AgaCSTC	47
Fdx (Spl)		ATYKVTLINEaegiNETIDCDDDTYILDAAEEAGLdl..PYSCR.agaCSTC	49
Fdx (Sol)		aAYKVTLVTP.T.GNVEFQCPDDVYILDAAEEEGIDL..PYSCRA.gsCSC	47
Adx	no	...60....5....70....5...80....5...90....5..100....5	
			D E F G H I J
Adx		HLIFEQHIFEKLE.AITDEENDMLDLA.YGLTDRSRLGQIICITKAMDNMTVRVP	108
Pdx		HVYVNEAFTDKVP.AANEReIGMLECVtAELKPNsRLCCQIIMTPELDGIVVDVP	102
Fdx (Ear)		LGKVVsg..s.vdeseg.sfl..ddqgme...EGFVLTCAIPE.s.d.LVIETH	89
Fdx (Cfu)		AGKVEsg.e..vdqsdq..sfl.ddaqmg...KGFVLTCAVAYPT.s.d.VTILTh	88
Fdx (A,v)		AGKLVsg.t..vdqsdqs.fld..ddqie...AGYVLTCAVAYPT.s.d.VVIQTh	92
Fdx (A,h)		VGKVVeg..e.vdqsdqif.l..ddeqmg...KGFALLCVTYPR.s.n.CTIKTh	92
Fdx (Hma)		AAIVLe...gdidmdmq.q.ils.deeved...KNVRLTCIGSPd.a.deVKIVYn	116
Fdx (Asa)		AGKLVsgpa..pdedqsfl...dddqiq...AGYVLTCAVAYPT..g.dCVIETH	90
Fdx (Spl)		AGTITs.gt..idqsdqs.f.l..dddqie...AGYVLTCAVAYPT.s.d.CTIKTh	92
Fdx (Sol)		AGKLVsg..s.lnqddqs.f.l..dddqid...EGWVLTCAAYPV.s.d.VTIETH	90

**Figura 6. Alineamiento de Fds del tipo “vertebrados” y “plantas”.** Los residuos conservados se representan en mayúsculas. Las posiciones de las cisteínas involucradas en el anclaje del centro Fe-S se encuentran resaltadas en amarillo. La his56 es un rasgo conservado solo dentro de las Fds del “vertebrados”. Las regiones sombreadas en celeste forman laminas- $\beta$  y en rojo  $\alpha$ -hélices, en la estructura terciaria de las Fds. En magenta se observan los sitios de interacción específica con el citocromo c. Adx: adrenodoxina. Pdx: putiderodoxina. Fdx (Ear): ferredoxina de *Equisetum arvense*. Fdx (Cfu): Fd de *Chlorella fusca*. Fdx (A,v): Fd de Anabaena en su forma vegetativa. Fdx (A, h): Fd de heterocistos de *Anabaena*. Fdx (Hma): Fd de *Haloarcula marismortui*. Fdx(Asa): Fd de *Aphanothece sacrum*. Fdx(Spl): Fd de *Spirulina platensis*. Fdx(Sol): Fd de *Spinacia oleracea*. Extraído de (Grinberg et al., 2000).

## 8. Las ferredoxinas y su diversidad de funciones

Para intercambiar sus electrones con el NADPH, las Fds requieren de las ferredoxin NADPH reductasas (FNRs) como intermediarias (Figura 7). Estas son enzimas monoméricas e hidrofílicas, con un grupo prostético FAD (flavin-adenin-dinucleótido, Figura 5), que cataliza la transferencia reversible de electrones entre el NADPH y las Fds o flavodoxinas. Las flavodoxinas son proteínas con un centro FMN (flavin-mononucleótido, Figura 5) en lugar del centro Fe-S de las Fds, a menudo sintetizadas por bacterias y algunas algas como reemplazo de las Fd en condiciones de estrés oxidativo (Pierella Karlusich et al., 2014). Las Fds plastidiales en plantas, además de reducir el NADP<sup>+</sup> durante la fotosíntesis oxigénica, tienen la capacidad de revertir el flujo de electrones y usar el poder reductor del NADPH para la asimilación de N<sub>2</sub> en

tejidos no fotosintéticos como frutos y raíces. De la misma manera, en *E. coli* las FNRs son capaces de participar en la detoxificación de ROS, oxidando el NADPH.



**Figura 7. Interacción de los sitios catalíticos de ADX (naranja) y ADXR (amarillo) para el intercambio de electrones.** Los grupos Fe-S de ADX y FAD de ADXR están dibujados usando esferas y varillas (Fe en violeta; S en amarillo; C en gris; N en azul; O en rojo; P en naranja). Los residuos I376 y T377 de ADXR y C52 de ADX2, resaltados en verde, serían importantes en la transferencia de electrones. Extraído de (Ewen et al., 2011).

### 9. Las adrenodoxinas: ferredoxinas mitocondriales

En mamíferos, las Fds mitocondriales o adrenodoxinas (ADXs) transportan electrones desde el NADPH, y por medio de la actividad de una adrenodoxina reductasa (ADXR) hacia diversos citocromos P450 (Miller, 1988). En particular, el citocromo CYP11A1 o P450<sub>scc</sub>, participa en el clivaje del colesterol a pregnenolona precursor de todas las hormonas esteroideas. En *Drosophila melanogaster* el gen *DARE*, que codifica para una ADXR mitocondrial, participa en la síntesis de ecdisona y cumple un rol esencial durante el desarrollo y reproducción sexual. Las

mutantes en el gen *DARE* presentan problemas de desarrollo y en la diferenciación de la cámara de huevos (Freeman et al., 1999). En *P. putida*, las Fds transportan electrones hacia el citocromo p450<sub>cam</sub> que interviene en la hidroxilación del alcanfor y el  $\alpha$ -terpineol para la fijación de C. En levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), aunque no se han descrito P450 mitocondriales, las proteínas Yah1p y Arh1p, homologas a ADX y ADXR de bovinos, participan en la homeostasis del hierro en la mitocondria, en la maduración del centro Fe-S y en la síntesis del centro hemo A, un grupo prostético presente solo en citocromos mitocondriales y de algunas bacterias (Lange et al., 1999) (Li et al., 2001).

Además, las ferredoxinas han sido involucradas en la vía ISC mitocondrial y de bacterias para el ensamblaje de centros Fe-S (Barupala et al., 2016). Estos centros no son exclusivos de las Fds ni de reacciones redox, sino que son usados por un gran número de proteínas mitocondriales como la aconitasa y la succinato deshidrogenasa del ciclo de Krebs, y los complejos respiratorios I y III de la cadena de transporte de electrones. Una particularidad de este último centro presente en el complejo III, es que uno de los Fe del centro [2Fe-2S] es coordinado por histidinas dentro de la cadena polipeptídica en lugar de cisteínas, resultando en una coordinación Cys2His2 (“Rieske center”).

#### **10. Adrenodoxinas en *A. thaliana***

Aunque al momento no se han descrito citocromos P450 mitocondriales en plantas, ni se ha vinculado a la cadena de transporte de electrones mitocondrial con la producción de hormonas (tal como ocurre en animales), sí se han podido identificar en *Arabidopsis* dos Fds (ADX1 y ADX2) y una FdR (ADXR) mitocondriales. El único rol propuesto hasta el momento para las ADXs y la ADXR en *Arabidopsis* está vinculado a la síntesis de vitamina B8 (biotina) en la mitocondria, aunque no existen evidencias *in vivo* para sustentar esa hipótesis (Picciocchi et al., 2003). Además, se ha observado que el sistema ADX-ADXR de *Arabidopsis* sería capaz de transferir electrones desde el NADPH al citocromo c, al menos *in vitro* (Takubo et al., 2003).

En nuestro laboratorio hemos detectado dos mutantes alélicas que presentan una inserción de T-DNA en el gen codificante para la ferredoxina reductasa mitocondrial de *A.thaliana* (ADXR). Las plantas que llevan estas inserciones, como se detallará más adelante en esta Tesis, son hemicigotas para la inserción y presentan más de 35% de abortos en sus frutos. El fenotipo observado difiere de los descritos en los casos de un déficit de biotina (Patton et al., 1998, Muralla et al., 2008, Li et al., 2012) y además no puede ser revertido o prevenido mediante la aplicación exógena de biotina (resultados preliminares del grupo). Esto sugiere un posible rol para las Fds mitocondriales en el desarrollo reproductivo, probablemente gametofítico, cumpliendo un rol diferente al propuesto por Picciocchi y colaboradores (Pagnussat et al., 2005).

## **11. Esteroides en el desarrollo de animales y plantas**

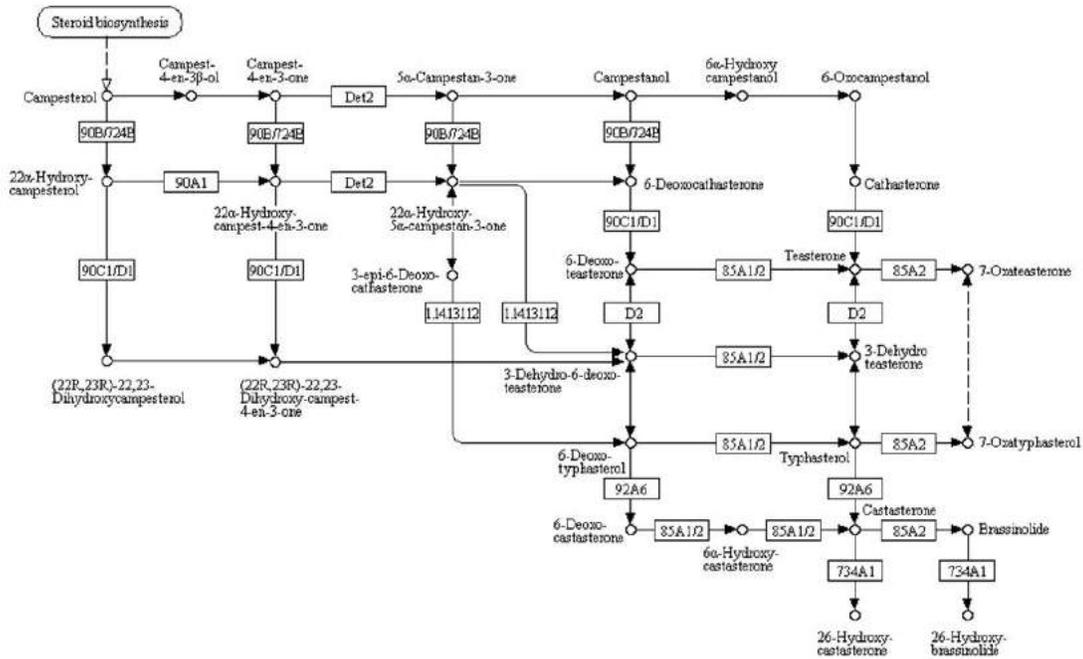
Los esteroides son lípidos con funciones estructurales esenciales dentro de las bicapas lipídicas de las membranas plasmáticas y junto con los fosfolípidos regulan su permeabilidad y fluidez. En animales, el colesterol cumple con esta función estructural, mientras que en plantas existe una mezcla de esteroides, que comprende en mayor parte al sitosterol, aunque también en menor cantidad al estigmasterol, campesterol, isofucosterol y colesterol. Además de su rol estructural, los esteroides son precursores de hormonas esteroideas como glucocorticoides, andrógenos y estrógenos en vertebrados, ecdisteroides en insectos, anteridiol y oogoniol en hongos y brasinosteroides (BRs) en plantas (Clouse, 2002). En vertebrados, los esteroides están involucrados en la regulación del desarrollo embrionario, la expresión génica, la diferenciación celular y la reproducción sexual (Miller, 1988). Los ecdisteroides en insectos están involucrados en el desarrollo y función del sistema nervioso, en el inicio de la metamorfosis y la muda, y en la reproducción (Riddiford et al., 2001). En plantas, los brasinosteroides (BRs) son esteroides esenciales para el normal crecimiento y desarrollo así como también se ha descrito su participación en situaciones de estrés. Particularmente, los BRs han sido relacionados con la

regulación de la expresión génica, la diferenciación y elongación celular, con el desarrollo de los haces vasculares y la fotomorfogénesis (Clouse & Sasse, 1998). Los BRs se definen por su estructura, por poseer un átomo de oxígeno en el C-3 y otros adicionales en uno o algunos de los átomos de carbono C-2, C-6, C-22 y C-23 (Nolan et al., 2017).

Existen mutantes en *Arabidopsis* que presentan fenotipos de enanismo, de-etiolación y esterilidad del polen que pueden ser rescatadas por la aplicación exógena de brasinolide (el BR con mayor actividad biológica en plantas), lo que apoya la idea de que los brasinosteroides funcionarían como fitohormonas esenciales en el desarrollo de las plantas. Entre dichas mutantes se encuentran *bri1* (*brassinosteroid insensitive 1*), *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) y *det2* (*de-etiolation 2*). *BRI1* codifica para un receptor transmembrana del tipo kinasa con un dominio extracelular rico en leucinas, involucrado en la transducción de señales (Li & Chory, 1997). *CPD* codifica para un citocromo P450 (CYP90), homólogo a citocromos de mamíferos importantes en la hidroxilación de esteroides (Szekeres et al., 1996), y *DET2* codifica para una proteína que presenta un 38-42% de identidad con la 5 $\alpha$ -reductasa de mamíferos implicada en la reducción de hormonas esteroideas como la progesterona y la testosterona (Li et al., 1997).

Durante la biosíntesis de hormonas esteroideas en mamíferos, el colesterol es transportado hacia las membranas mitocondriales para su conversión en pregnenolona, utilizando los electrones transferidos vía el sistema ADX-ADX (Stryer, 1988). Este transporte es llevado a cabo por proteínas que poseen un dominio de unión al colesterol en su región c-terminal denominado START (steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer).

En plantas, la ruta de síntesis mejor caracterizada es la que utiliza campesterol como sustrato inicial para rendir los brasinosteroides activos castasterona y brasinolide (figura 8). Esta ruta es usualmente descrita como una red de enzimas capaces de catalizar las conversiones de sustratos múltiples. Todas las enzimas caracterizadas hasta el momento en esta ruta son citocromos P450 que estarían localizados en el retículo endoplasmático (Vriet et al., 2013).



**Figura 8. Ruta biosintética para brasinosteroides conocida hasta el momento.** De acuerdo a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Para que sea posible la síntesis de esteroides en la mitocondria de plantas de manera análoga a lo que ocurre en sistemas animales, sería necesaria la importación de esteroides hacia la mitocondria y la presencia de al menos un citocromo P450. En mamíferos, la importación de colesterol a la mitocondria está mediada por un receptor de benzodiazepina periférico (PBR). La presencia de una proteína de tipo PBR, para la que se demostró actividad de transporte de colesterol, ya fue descrita en mitocondrias de *A. thaliana*, aunque su rol en una posible síntesis de esteroides dependiente de mitocondrias aún no ha sido demostrado (Lindemann et al., 2004).

Por otra parte, en el genoma de *A. thaliana* se han identificado 244 genes codificantes para citocromos P450. De acuerdo a predicciones según su secuencia aminoacídica, éstos se encontrarían mayormente ubicados en las membranas del retículo endoplasmático, mientras que

una pequeña proporción se ubicaría en cloroplastos y mitocondrias. A pesar de ello, al momento no se han descrito citocromos P450 mitocondriales (Schuler et al., 2006).

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

El sistema de adrenodoxina-adrenodoxina reductasa mitocondrial tiene un rol clave en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, pudiendo estar involucrado en la síntesis de esteroides en forma análoga a lo que ocurre en mamíferos e insectos.

## OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar la función del sistema adrenodoxina-adrenodoxina reductasa mitocondrial en la especificación celular durante el desarrollo de los gametofitos y en la atracción de tubos polínicos en *Arabidopsis thaliana*, así como también en las diferentes etapas del desarrollo esporofítico.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el fenotipo de mutantes simples y dobles de adrenodoxina reductasa y adrenodoxinas uno y dos a nivel gametofítico tanto femenino como masculino.
- Estudiar el patrón y los niveles de expresión de las adrenodoxinas tanto durante el desarrollo de los gametofitos femenino como durante diferentes etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar el rol del sistema de adrenodoxina-adrenodoxina reductasa durante el desarrollo esporofítico de *Arabidopsis thaliana* mediante silenciado inducible de sus genes.
- Estudiar un posible rol del sistema de adrenodoxina-adrenodoxina reductasa en la síntesis de esteroides.

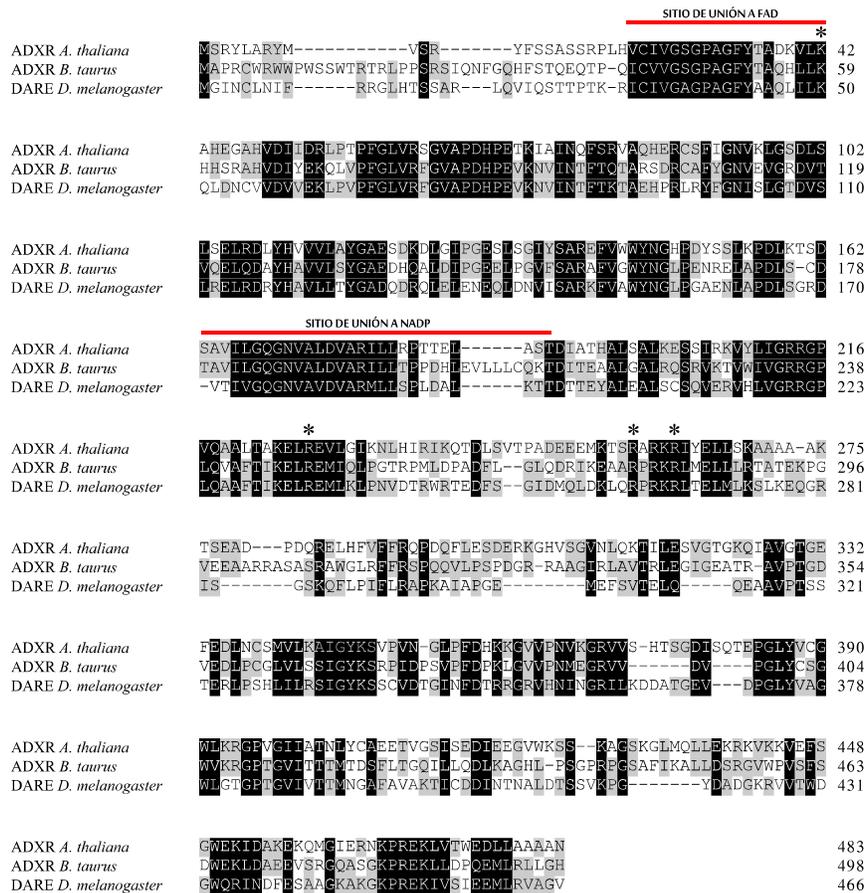
# Resultados

## Capítulo 1



**ADXR, su función en gametofitos**

En *A. thaliana* existe una única Adrenodoxina Reductasa (ADXR) de localización mitocondrial cuya función es aún desconocida (Takubo et al., 2003). En sistemas animales, la actividad de ADXR está vinculada a la síntesis de hormonas esteroideas, donde es esencial para el intercambio de electrones entre las adrenodoxinas (ADX) y el NADPH. Comparando las secuencias a nivel de proteína, la ADXR de *A. thaliana* presenta un 41 % de identidad con la ADXR de *Bos taurus* y de *Drosophila melanogaster*, dos de los sistemas mejor estudiados ((Ewen et al., 2011, Freeman et al., 1999)Figura 9).



**Figura 9. Alineamiento de adrenodoxinas reductasas mitocondriales encontradas en *A. thaliana*, *B. taurus* y *D. melanogaster*.** Las secuencias comparten 41% de identidad. Las barras rojas en la parte superior de la secuencia muestran los sitios de unión a FAD y NADP. Los asteriscos (\*) marcan los aminoácidos involucrados en la interacción con ADX. (Alineamiento usando Genious Consensus Alignment Blosum62 – GapOpenpenalty: 9 – GapExtensionPenalty: 2).

Como puede observarse en la Figura 9, los sitios de unión a FAD (cofactor) y a NADP se encuentran muy conservados. Por otra parte, ADXR solo comparte un 19% de su secuencia con ferredoxinas reductasas plastidiales (Takubo et al., 2003).

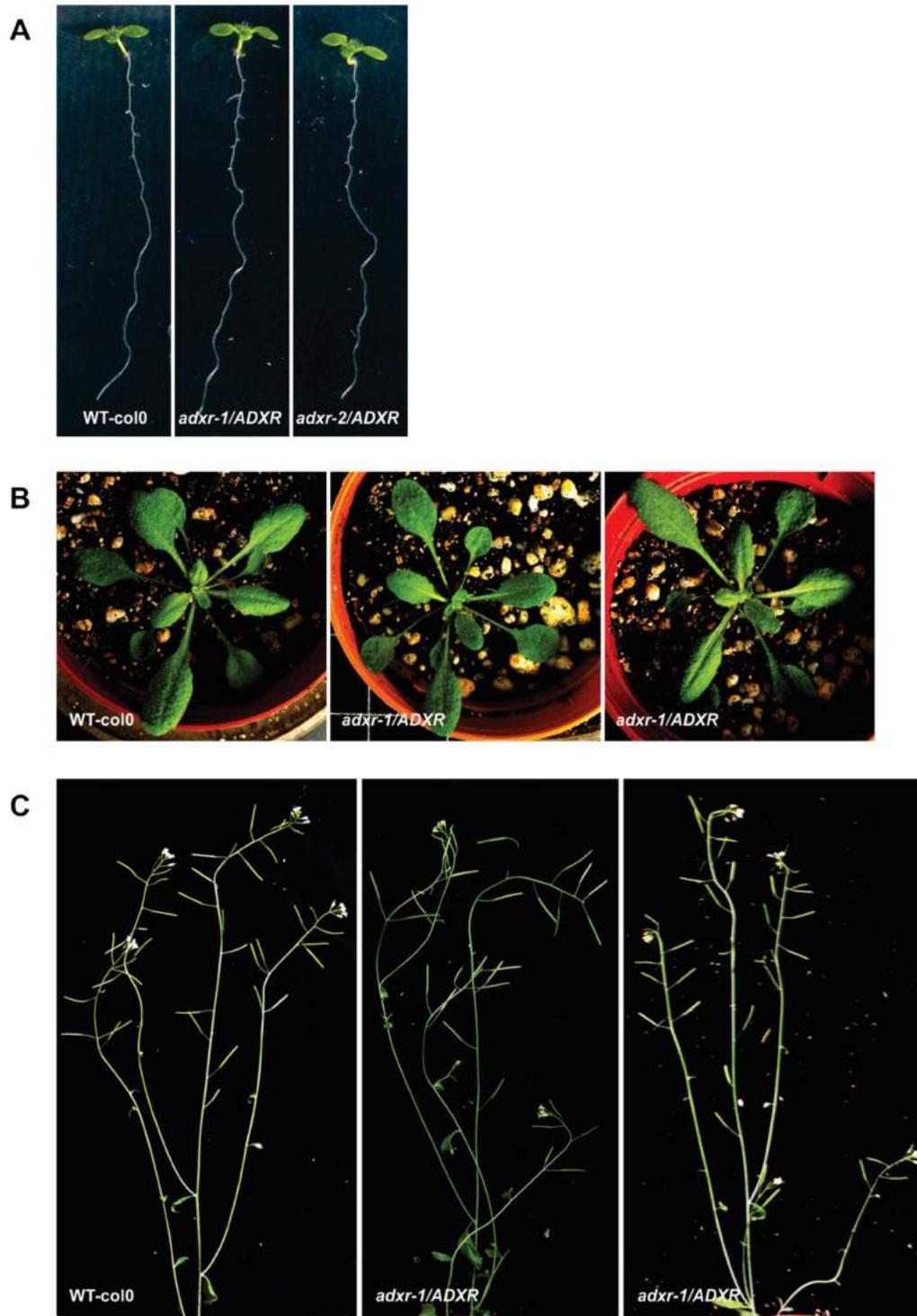
### 1. Estudio de mutantes de inserción en el gen *ADXR*

De manera de conocer la función de la enzima ADXR en Arabidopsis, se estudiaron dos líneas de inserción alélicas que presentan una única inserción en el genoma; en el cuarto exón y en el cuarto intrón del gen *ADXR* (*adxr-1* y *adxr-2* respectivamente, Figura 10).



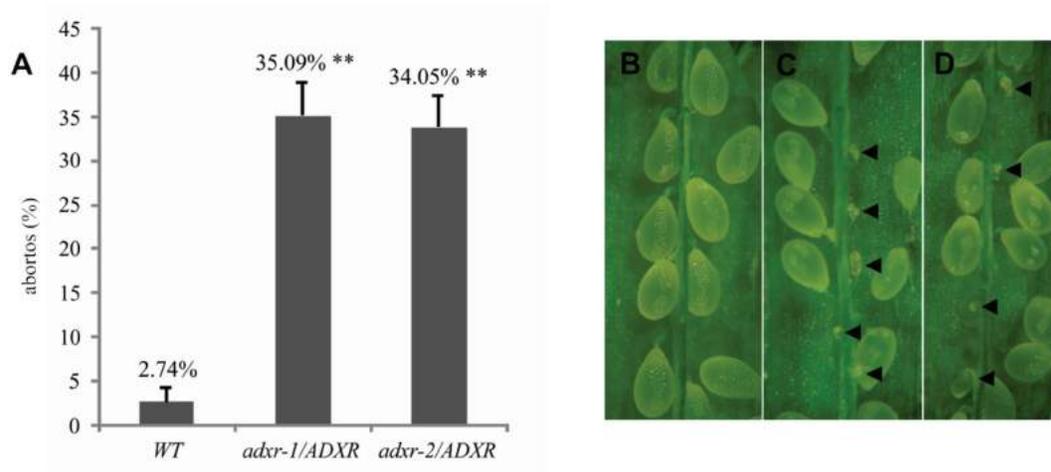
**Figura 10. Diagrama del gen *ADXR* mostrando la localización de las inserciones presentes en las líneas mutantes utilizadas.** Se muestra un diagrama del gen *ADXR* (locus At4g32360) y la posición de la inserción de T-DNA para las mutantes *adxr-1* (exón 4) y *adxr-2* (intrón 4). Cajas negras: exones, grises: intrones, plateadas: UTRs. ATG-TAG: inicio y fin de la transcripción. Triángulos violeta-naranja: inserción de T-DNA.

Cuando se analizó la progenie autofecundada de plantas hemicigotas para la inserción, no pudieron obtenerse mutantes homocigotas (más de 400 plantas fueron analizadas para cada línea), indicando que el gen *ADXR* sería esencial. Así, se estudiaron solo plantas hemicigotas *adxr/ADXR*. Estas plantas *adxr-1/ADXR* y *adxr-2/ADXR* no presentaron defectos evidentes durante el desarrollo esporofítico, sugiriendo que *adxr* sería una mutación recesiva (Figura 11).



**Figura 11. Crecimiento de plantas WT, *adxr-1/ADXR* y *adxr-2/ADXR*.** A, plántulas en estadio 1.02, creciendo en medio MS, a los 11 días post-imbibición. B, plantas en estadio 5.10, creciendo en suelo, 25 días post-imbibición. C, plantas en estadio 6.30, 40 días post-imbibición. Estadios; 1.02: 2 hojas en roseta > 1mm, 5.10: primeras yemas florales visibles, 6.30: 30% de producción floral (Boyes et al., 2001).

Sin embargo, ambas líneas alélicas presentaron un número elevado de abortos en las silicuas. Mientras que en las plantas *adxr-1/ADXR* se observó aproximadamente un 35% de abortos, las plantas *adxr-2/ADXR* presentaron alrededor de un 34% de abortos (Figura 12).



**Figura 12. A; frecuencia de abortos en plantas WT y *adxr/ADXR*. B-D; silicuas abiertas mostrando óvulos en plantas WT (B), *adxr-1/ADXR* (C) y *adxr-2/ADXR* (D). ▲: abortos. n > 1000. \*\* p<0.01 (Test t).**

Además, la relación entre mutantes hemicingotas y plantas WT en la progenie de plantas *adxr/ADXR* auto-fecundadas resultó 1.05:1 (n=449) para el alelo *adxr-1* y 1.23:1 para el alelo *adxr-2* (n=247), valores muy lejanos de la relación mendeliana 3:1 esperada para la progenie de una planta hemicingota. Este hecho, en conjunto con el número de abortos observado (superior al 25%), sugirieron que ADXR podría ser esencial para el desarrollo o función de los gametofitos. Para conocer si ambos o solo uno de los gametofitos se encontraban afectados por la mutación, se realizaron cruces recíprocos entre plantas *adxr/ADXR* y plantas WT (Tabla 1). Para realizar estos cruces se polinizaron plantas WT con polen proveniente de las plantas hemicingotas y viceversa, se polinizaron plantas hemicingotas con polen WT. De esta manera, analizando la progenie resultante, se puede conocer la eficiencia con la que cada gametofito logra transmitir la mutación a la siguiente

generación. La eficiencia de la transmisión (ET), representa la fracción de alelos mutantes transmitidos a la siguiente generación. Se calcula utilizando la fórmula: Numero de plantas mutantes/Numero de plantas WT x 100. El máximo valor teórico es de 100% y ocurriría cuando el gametofito no es afectado por la mutación en cuestión. Como puede observarse en la tabla 1, solo el 19 % de los gametofitos femeninos portando el alelo *adxr-1* fue capaz de transmitir la mutación, mientras que el polen no parece estar afectado severamente (TE cercana al 90%, Tabla 1).

**Tabla 1. Análisis genético de cruzamientos recíprocos para el gen *ADXR***

Genotipo parental		N	Presencia de T-DNA en la progenie		TE	X <sup>2</sup>	p
♀	♂		+	-			
<i>adxr-1/+</i>	<i>+/+</i>	148	24	124	19.35%	67.5675	<0.01
<i>+/+</i>	<i>adxr-1/+</i>	62	29	33	87.87%	0.258	>0.25

N: número de plantas genotipadas. TE: eficiencia en la transmisión de la inserción a la siguiente generación a través del gametofito en estudio.  $p < 0.01$ , las frecuencias observadas son distintas a las esperadas (hipótesis: no existen problemas en la transmisión de la mutación, relación esperada 1:1, obtenida 0.1935:1, X<sup>2</sup>)

### 1.1 Análisis de los sacos embrionarios en plantas *adxr/ADXR*

De modo de conocer cómo la mutación en el gen *ADXR* afecta el desarrollo de los gametofitos femeninos, se analizó el fenotipo en el estadio final de desarrollo de los mismos, utilizando microscopía DIC. Para ello se analizaron pistilos provenientes de plantas hemicigotas para la mutación *adxr*, por lo que pudo compararse el desarrollo de óvulos conteniendo sacos embrionarios WT y mutantes dentro de un mismo pistilo. Para realizar este análisis, las flores fueron emasculadas, de manera de permitir el máximo desarrollo posible de los sacos embrionarios sin que ocurra

fertilización. Teniendo en cuenta la segregación de la inserción, podría obtenerse un máximo de 50% de sacos embrionarios afectados.

Hasta un 13% de los sacos embrionarios analizados por DIC de plantas hemicigotas *adxr/ADXR* mostraron fenotipos anormales en el estadio final del desarrollo, mientras que sólo pudo verse un 2% de sacos embrionarios anormales en plantas WT (Tabla 2).

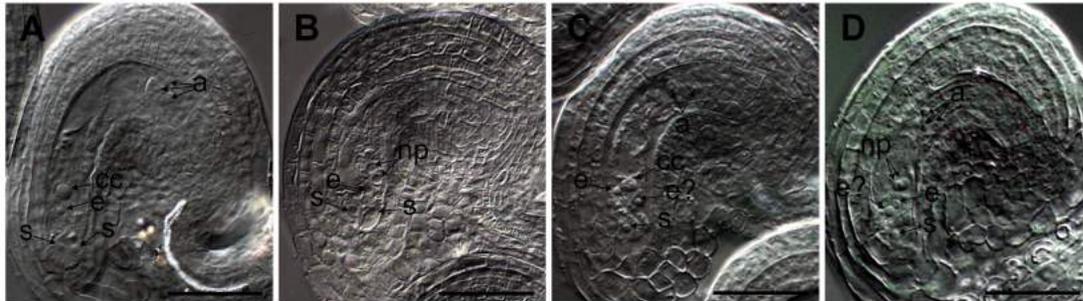
**Tabla 2. Fenotipos encontrados en pistilos emasculados provenientes de plantas WT y *adxr/ADXR*.**

	n	Fenotipos observados			
		FG7 normal	pnu	eam	pnu+eam
<i>ADXR/ADXR</i>	746	97.99%	1.74%	0.27%	0%
<i>adxr-1/ADXR</i>	714	87.25%	8.26%	4.34%	0.14%
<i>adxr-2/ADXR</i>	796	88.94%	9.55%	1.38%	0.13%

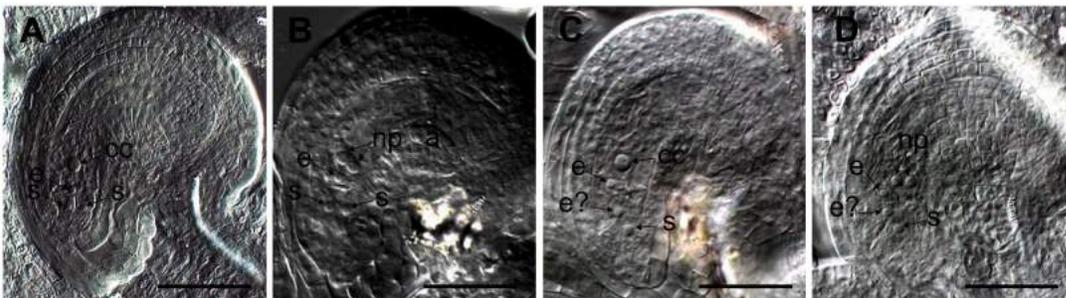
n: óvulos analizados, pnu: núcleos polares sin fusionar, eam: polaridad invertida en células del micrópilo.

Entre los fenotipos observados, además del estadio FG7 típico, se observaron núcleos polares sin fusionar (PNU) y una desorganización en la posición de los núcleos de las células micropilares (EAM). Mientras que en plantas WT los núcleos de las células sinérgidas se encuentran hacia el extremo del micrópilo y la ovocélula muestra la polaridad inversa (el núcleo hacia el extremo chalazal), algunos sacos embrionarios de plantas hemicigotas mostraron dos o más células con núcleos hacia la chalaza (Figura 13). En plantas *adxr-1/ADXR* se observó un 8.2% de sacos

embrionarios con fenotipo PNU, y un 4.3% con fenotipo EAM (n=714) (Figura 13). A su vez, en la mutante *adxr-2/ADXR* se observó un 9.5% de sacos embrionarios con fenotipo PNU, y un 1.4% con fenotipo EAM (n=796). En plantas WT estos fenotipos sólo se encontraron en el 1.7% (PNU) y 0.3% (EAM) de los sacos embrionarios analizados (n=746) (Figura 14).



**Figura 13. Análisis fenotípico mediante microscopía DIC de sacos embrionarios en plantas *adxr-1/ADXR*, 2 días luego de la emasculación.** A, óvulo conteniendo un saco embrionario en estadio FG7 normal; B, saco embrionario con núcleos polares sin fusionar (pnu); C, saco embrionario que presenta una de las células sinérgidas con polaridad invertida (núcleo hacia la chalaza) (fenotipo eam, marcado como “e?”); D, saco embrionario mostrando estos dos 2 últimos fenotipos juntos (pnu+eam). cc: núcleo de la célula central. e: núcleo de la ovocélula. e?: núcleo de célula sinérgida en posición similar a una ovocélula. np: núcleo polar. s: núcleo de la célula sinérgida. a: núcleo de célula antípoda. Barras: 50µm.



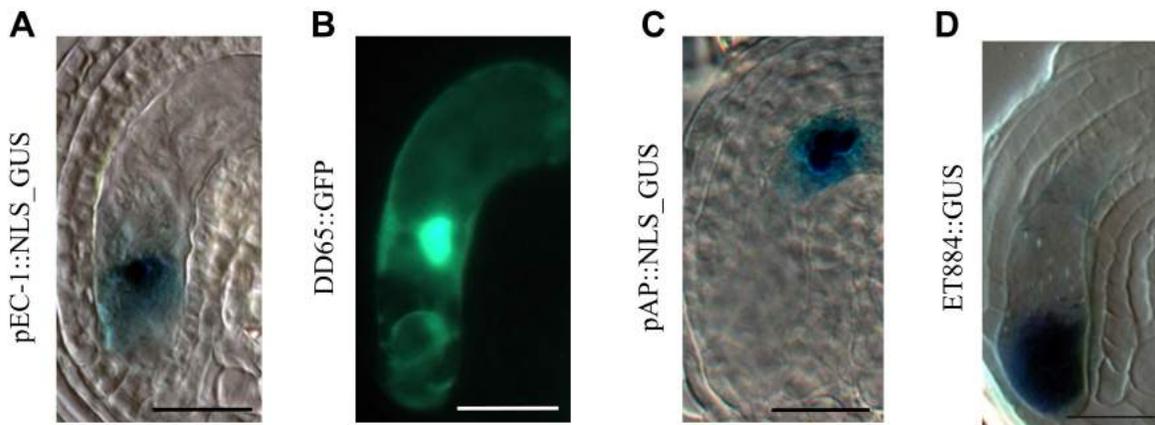
**Figura 14. Análisis fenotípico mediante microscopía DIC de sacos embrionarios en plantas *adxr-2/ADXR*, 2 días luego de la emasculación.** A, óvulo conteniendo un saco embrionario en estadio FG7 normal; B, saco embrionario con núcleos polares sin fusionar (pnu); C, saco embrionario que presenta una de las células sinérgidas con polaridad invertida (núcleo hacia la chalaza) (fenotipo eam, marcado como “e?”); D, saco embrionario mostrando estos dos 2 últimos fenotipos juntos (pnu+eam). cc: núcleo de la célula central. e: núcleo de la ovocélula. e?: núcleo de célula sinérgida en posición similar a una ovocélula. np: núcleo polar. s: núcleo de la célula sinérgida. a: núcleo de célula antípoda. Barras: 50µm.

Teniendo en cuenta que los gametofitos observados mostraron anomalías en el desarrollo y en la morfología de las células, se planteó la posibilidad de que existieran problemas durante la especificación celular que diera como resultado identidades aberrantes dentro del saco embrionario. Con la finalidad de estudiar dicha especificación celular dentro del saco embrionario en plantas *adxr/ADXR*, se utilizaron marcadores para cada tipo celular que dirigen la expresión de GUS o GFP específicamente en una de las células del saco. Se realizaron cruces entre plantas conteniendo dichos marcadores y plantas WT o *adxr-1/ADXR*, y se estudiaron los patrones de expresión y segregación en la progenie (F1). Tal generación, hemicigota para los marcadores y para la mutación *adxr*, mostrará un máximo de expresión del 50% en los sacos embrionarios, en el caso que no haya problemas en la especificación celular.

Cuando se analizó la expresión del marcador de ovocélula *pEC-1:NLS:GUS* en pistilos WT hemicigotas para el marcador, se detectó su expresión en el 47.5% de los sacos embrionarios y exclusivamente en la ovocélula (n=242). Sin embargo, en pistilos *adxr-1/ADXR*, aunque no se observaron patrones de expresión anormales, sólo el 39% de los sacos embrionarios mostraron expresión, mientras que el resto de los sacos embrionarios no mostraron expresión alguna (, Figura 15A, n=512). También se estudió la expresión del marcador de célula central *DD65:GFP* (Figura 15B). El 42% de los sacos embrionarios analizados en pistilos WT hemicigotas para dicho marcador, mostraron una expresión específica en la célula central (n=523). Cuando la expresión del marcador fue estudiada en pistilos *adxr-1/ADXR* se obtuvo un resultado similar (46% de los sacos embrionarios expresaron GFP y sólo en la célula central, Figura 15B, n=332), indicando que la célula central se especificaría normalmente dentro del saco embrionario mutante.

Las células accesorias también se especificaron correctamente dentro del saco embrionario. Un 32% de los sacos embrionarios de pistilos WT y hemicigotas para el marcador de células antípodas *pAP:NLS:GUS*, mostraron una fuerte expresión de GUS localizada en la zona de la antípodas (n=253). A su vez un 29% de sacos embrionarios de pistilos *adxr-1/ADXR* mostraron expresión en

las células antípodas (n=217), sin observarse patrones anormales (Figura 15C). Cuando se analizó la expresión del marcador de células sinérgidas *ET884::GUS* en pistilos WT, 2 células micropilares resultaron positivas para la tinción de GUS, en el 46.2% de los sacos embrionarios analizados (n=210). Los pistilos *adxr-1/ADXR* mostraron un resultado similar, con 44.9% de los sacos embrionarios positivos para GUS sólo en las células sinérgidas (n=323) (Figura 15D).



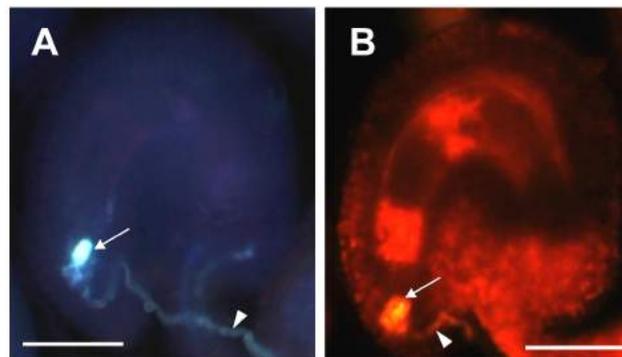
**Figura 15. Análisis de la expresión de marcadores celulares específicos dentro del saco embrionario en plantas *adxr-1/ADXR*.** A; ovocélula. B; antípoda. C; célula central. D; sinérgidas. Barras: 25  $\mu$ m.

En conjunto, estos resultados sugirieron que no existirían problemas en la especificación de cada tipo celular en los sacos embrionarios mutantes *adxr*.

## 1.2. Funciones celulares en sacos embrionarios *adxr*

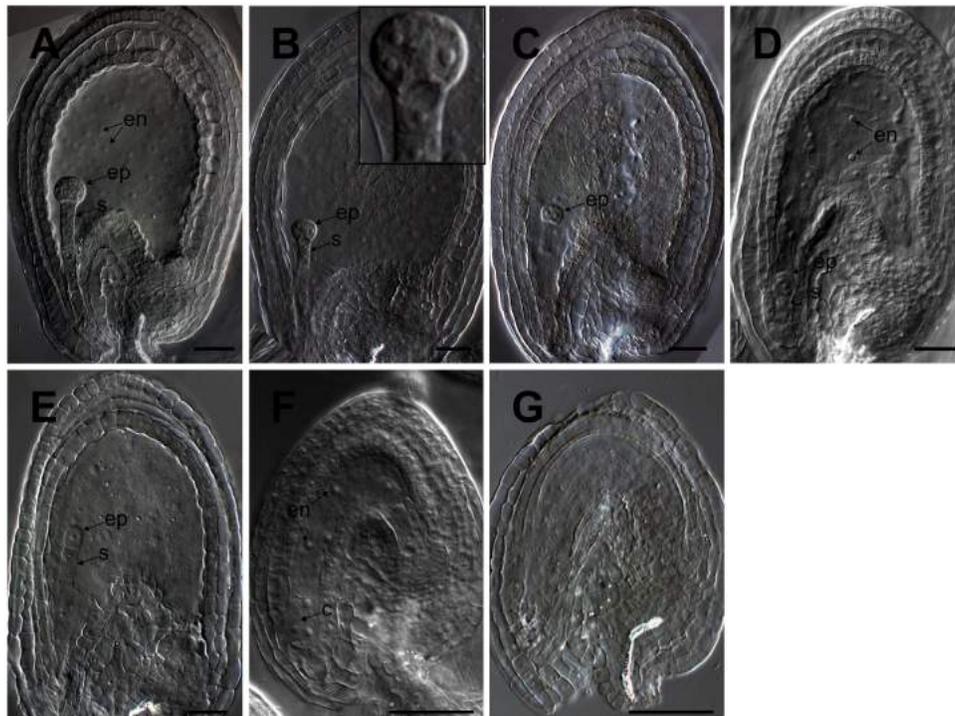
Como se detalló en la introducción, tanto las células sinérgidas como la célula central, estarían involucradas en la atracción del tubo polínico hacia el saco embrionario. Así, una manera de determinar el correcto funcionamiento de estas células dentro del saco, es estudiar la atracción del

tubo polínico. Con tal propósito, pistilos de flores WT y *adxr/ADXR* emasculadas fueron polinizados manualmente con polen WT, y se analizaron los patrones de atracción de tubos polínicos mediante tinción con azul de anilina (Figura 16A). Cuando se analizaron pistilos WT, un 92.7% de los óvulos analizados mostraron la llegada de un tubo polínico al micrópilo (n=231). Por otro lado, un 83.7% de los óvulos en pistilos *adxr-1/ADXR* (n=92) y un 97.6% de los óvulos en pistilos *adxr-2/ADXR* (n=166), fueron capaces de atraer un tubo polínico. No se observaron patrones de crecimiento anormales en las cercanías de los óvulos y tampoco invasión de tubo polínico. Para complementar este estudio, se utilizó además polen de plantas homocigotas para el marcador *LAT52:RFP*, para polinizar manualmente pistilos de plantas WT y *adxr-1/ADXR* (Figura 16B). En un 61% de los óvulos analizados en pistilos WT se observó expresión de RFP en el tubo polínico y en la zona de las células sinérgidas, sugiriendo la descarga de células espermáticas (n=269). Por otro lado, un 60.3% de los óvulos en pistilos *adxr-1/ADXR* mostró un patrón de expresión de *RFP* similar (n=277). Estos resultados sugieren que la mayoría de los sacos embrionarios en plantas *adxr/ADXR*, incluidos aquellos con fenotipos anormales, serían capaces de atraer tubos polínicos.

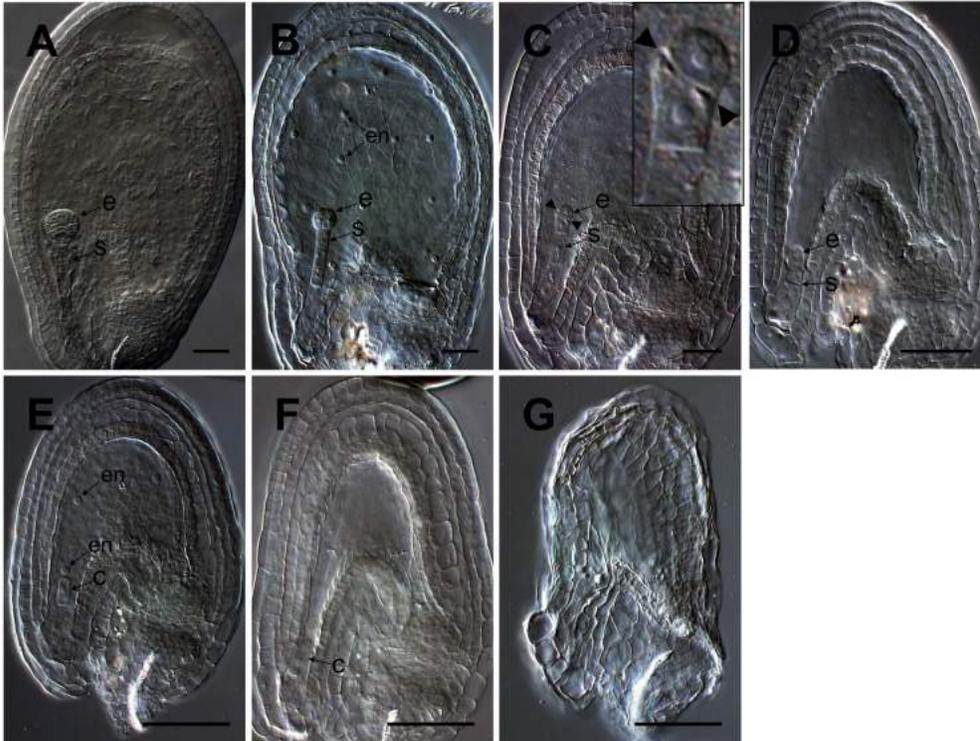


**Figura 16. Análisis de atracción de tubos polínicos en plantas *adxr/ADXR*.** Se muestran fotos representativas de los resultados obtenidos. A, óvulo de una planta *adxr-2/ADXR*, mostrando un TP teñido con azul de anilina. B, óvulo de una planta *adxr-1/ADXR*, polinizado con polen conteniendo el marcador *LAT52:RFP*. Puntas de flecha: tubo polínico. Flechas: descarga. Tinción con azul de anilina: óvulos atrayendo tubo polínico en WT; 92.7% (n=231), en *adxr-1/ADXR*; 83.7% (n=92), en *adxr-2/ADXR*; 97.6% (n=166). *LAT52*: óvulos atrayendo tubo polínico en WT; 61% (n=269), en *adxr-1/ADXR*; 60.3% (n=277). Barras 50  $\mu$ m.

Descartado un problema en la atracción del tubo polínico, se procedió a estudiar los sacos embrionarios post-fertilización, ya que aunque los gametofitos no presenten problemas morfológicos evidentes, es posible que sus funciones se encuentren afectadas; entre ellas, la de permitir un correcto desarrollo del embrión y del endosperma. Estas disfunciones del gametofito femenino pueden desencadenar el aborto del embrión en desarrollo, evento conocido como *efecto materno*. Para estudiar esta posibilidad se analizaron óvulos de plantas WT y *adxr/ADXR* provenientes de pistilos de 7-8 mm, colectados 72 horas luego de la polinización (Figura 17 y Figura 18)



**Figura 17. Análisis del desarrollo embrionario en plantas *adxr-1/ADXR*, 3 días luego de la polinización, usando microscopía DIC.** A; óvulo mostrando un desarrollo normal del embrión y del endosperma, en estadio pre-globular. B; óvulo que presenta un embrión en estadio pre-globular con divisiones asimétricas (detalle en el recuadro superior derecho). C; óvulo conteniendo un embrión con desarrollo detenido en estadio de 4 células. D; óvulo conteniendo un embrión con el suspensor anormalmente corto y con endosperma desarrollado. E; óvulo conteniendo un embrión con desarrollo detenido en estadio de 1 célula. F; óvulo fertilizado mostrando un desarrollo detenido en estadio cigótico. G; óvulo colapsado, no se observan detalles del desarrollo. ep: embrión propiamente dicho. s: suspensor. en: núcleos del endosperma. c: cigoto. Barras: 50µm.



**Figura 18. Análisis del desarrollo post-fertilización en plantas *adxr-2/ADXR*, 3 días luego de la polinización (3 DAP), usando microscopía DIC.** A; óvulo mostrando en su interior un desarrollo normal del embrión, en estadio pre-globular. B; óvulo conteniendo un embrión con desarrollo detenido en estadio de 4 células y con endosperma desarrollado. C; óvulo mostrando un embrión con un plano de división anormal asimétrico (mostrado en detalle en el recuadro superior derecho). D; óvulo conteniendo un embrión con el suspensor anormalmente corto. E; óvulo mostrando en su interior un desarrollo detenido en estadio cigótico y endosperma desarrollado. F; óvulo mostrando en su interior un desarrollo detenido en estadio cigótico y sin desarrollo de endosperma. G; aborto, óvulo colapsado, no se observan detalles del desarrollo. e: embrión propiamente dicho. s: suspensor. en: núcleos del endosperma. c: cigoto. Barras: 50 $\mu$ m.

Mientras un 93.3% de los embriones en pistilos WT se encontraron en estadio pre-globular, sólo un 59.7% y un 61.4% de los embriones hemicigotas para los alelos *adxr-1* y *adxr-2* respectivamente, fueron capaces de llegar a tal estadio (Tabla 3). Un 21% de los óvulos en plantas *adxr-1/ADXR* y un 24% de los óvulos de plantas *adxr-2/ADXR*, detuvieron su desarrollo tempranamente, en estadio de cigoto o embrión uni- o bi-celular. Estos arrestos estuvieron presentes en pistilos WT sólo en el 1.4% de los casos. Además se encontraron un 18.2% y un 7.7% de óvulos colapsados en pistilos de plantas *adxr-1/ADXR* y *adxr-2/ADXR* respectivamente, y solo un 3% en pistilos WT. Finalmente un

7% de los embriones en plantas *adxr-2/ADXR* mostraron divisiones asimétricas. Este fenotipo pudo observarse solo en el 2.3% de los embriones en pistilos WT (Tabla 3).

**Tabla 3. Fenotipos observados por microscopía DIC, en óvulos de plantas WT y *adxr/ADXR*, 3 días luego de la polinización.**

	n	Fenotipos observados				
		óvulos colapsados	Estadio de embrión			Estadio de cigoto
			pre-globular	pda/susp	arresto	arresto
<i>ADXR/ADXR</i>	435	2.99%	93.33%	2.30%	1.15%	0.23%
<i>adxr-1/ADXR</i>	308	18.18%	59.74%	0.97%	14.29%	6.82%
<i>adxr-2/ADXR</i>	430	7.67%	61.40%	6.98%	15.35%	8.60%

n: óvulos analizados. Pda/susp: embrión con planos de división asimétricos y/o suspensor anormalmente corto.

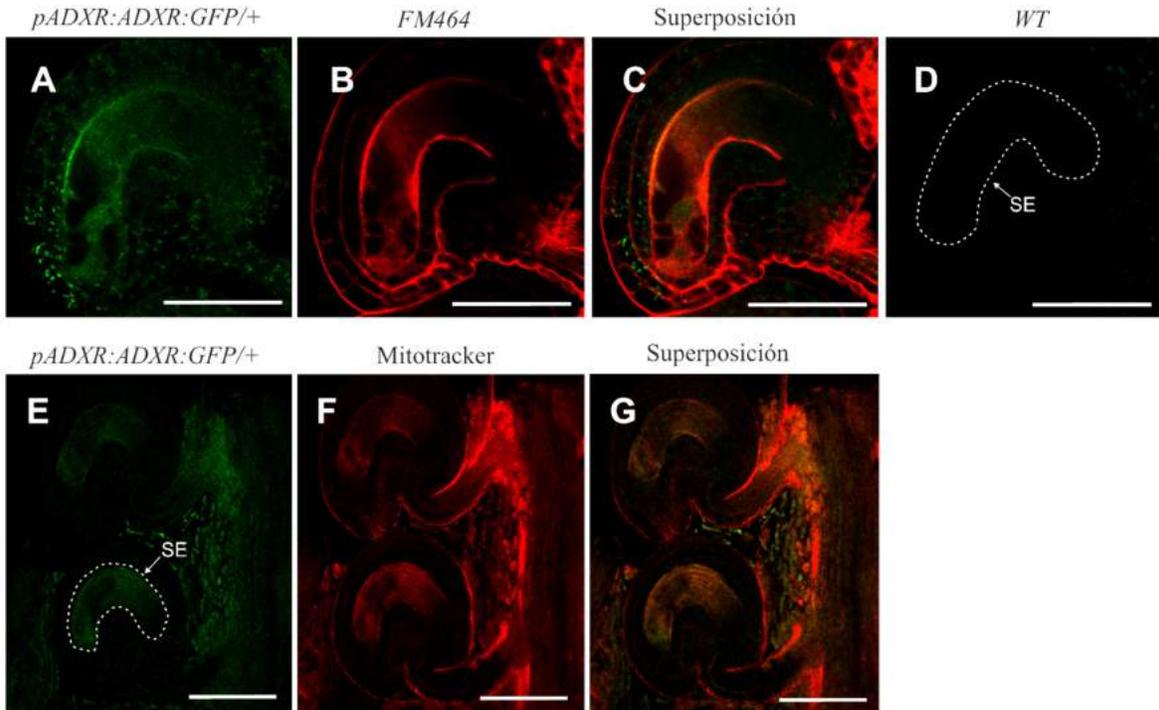
Para determinar si los defectos observados se debían a aberraciones embrionarias esporofíticas o si estaban relacionados a un posible efecto materno, se utilizó polen WT para polinizar pistilos *adxr-1/ADXR*. Luego de la polinización se determinó el fenotipo de los embriones en desarrollo mediante microscopía DIC. La proporción de óvulos mostrando defectos en la embriogénesis 72 horas luego de la polinización se mantuvo cercana al 35%, indicando que los fenotipos post-fertilización observados en pistilos *adxr/ADXR*, obedecen a un *efecto materno* y no a defectos en el embrión, ya que utilizando polen WT no es posible obtener embriones homocigotas para la inserción.

## 2. Localización de ADXR

De manera de profundizar el estudio sobre ADXR y teniendo en cuenta los fenotipos observados, se decidió estudiar la localización de ADXR dentro del gametofito femenino a lo largo de su desarrollo. Para ello se fusionó la secuencia codificante de *ADXR* dirigida por su propio promotor al gen reportero *GFP*, y se transformaron con dicha construcción plantas WT y *adxr-1/ADXR*. Esta

última transformación se realizó de manera de verificar que la proteína de fusión obtenida fuese funcional, complementando el fenotipo observado y representando su localización *in vivo*. Para confirmar la complementación del fenotipo, se analizaron las silicuas de la generación T1 de plantas *adxr-1/ADXR (pADXR:ADXR:GFP/+)* y se determinó el número de abortos. Debido a la segregación independiente de ambas inserciones, solo la mitad de los abortos observados en las mutantes *ADX-ADXRR* podrían ser rescatados. De esta manera, una complementación efectiva sería capaz de rescatar alrededor de un 17.5 % (como máximo) de sacos embrionarios mutantes, teniendo en cuenta los % de abortos previamente observados. La complementación del fenotipo pudo ser confirmada en dos líneas independientes (línea 2, 15.9% de abortos, n= 126; línea 9, 14.2% de abortos, n=154).

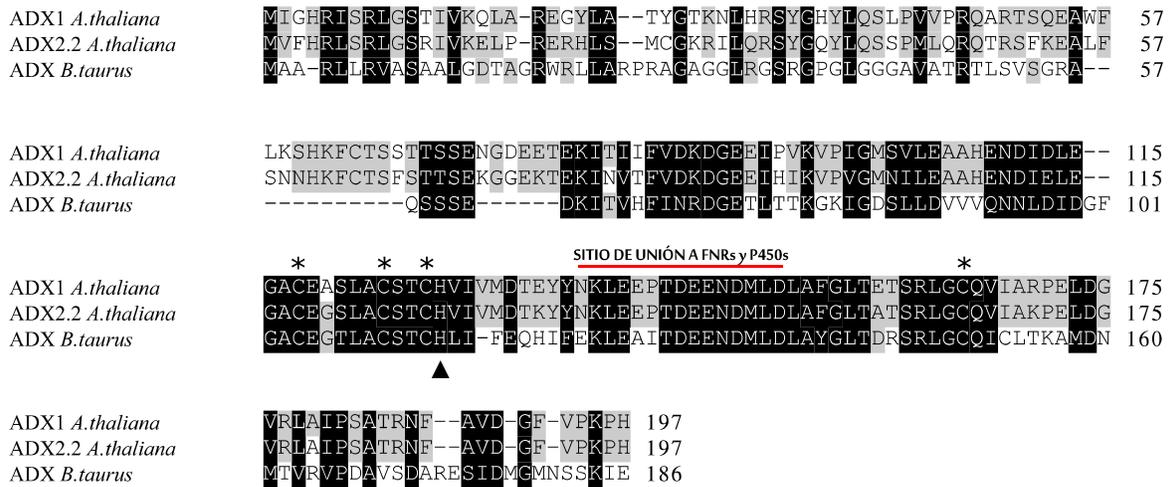
La localización de ADXR-GFP se estudió en plantas transgénicas WT utilizando microscopía confocal (Figura 19). ADXR-GFP se detectó principalmente alrededor del núcleo de la célula central y la ovocélula (Figura 19 A-D). Además, pudo confirmarse la localización de ADXR en las mitocondrias del saco embrionario al observarse co-localización con el marcador mitocondrial MitoTracker-red (Figura 19 E-G). Estos resultados indican que ADXR actuaría principalmente en las células gaméticas, lo que estaría en correlación con los fenotipos observados: núcleos polares sin fusionar y embriogénesis aberrante.



**Figura 19. Localización de ADXR en sacos embrionarios.** A, expresión de *pADXR:ADXR:GFP/+* dentro del saco embrionario. B, El saco embrionario se delimitó utilizando el colorante hidrofóbico FM4-64. C, superposición de A y B. D, control WT, no presenta fluorescencia. E, expresión de *pADXR:ADXR:GFP/+* en sacos embrionarios. F, marcador de mitocondrias Mitotracker-red. G, superposición de E y F. SE: saco embrionario. Barras: 50  $\mu$ m.

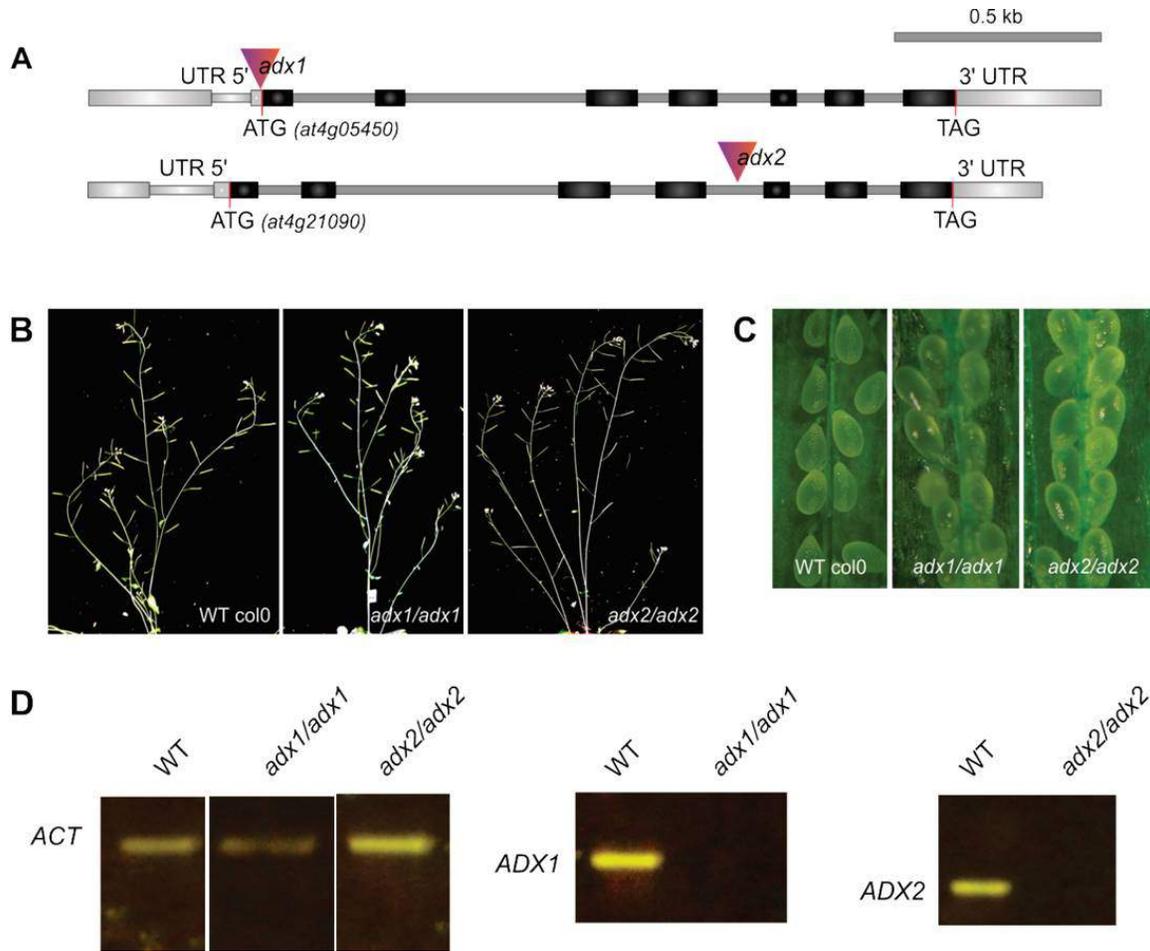
### 3. Estudio de mutantes de inserción en *ADX1* y *ADX2*

*A. thaliana* posee dos genes nucleares codificantes para ferredoxinas mitocondriales de tipo adrenodoxinas (*ADX1* y *ADX2*). *ADX1* y *ADX2* presentan un 76% de identidad en sus secuencias aminoacídicas (Figura 20). Esta identidad ascendería a 86% si no se tuviese en cuenta la región N-terminal de las proteínas, responsable de su localización subcelular. Por otra parte, *ADX1* y *ADX2* presentan un 36.4% y un 34% de identidad respectivamente, con la *ADX* de bovinos, involucrada en la síntesis de hormonas esteroideas (Figura 20). *ADX1* y *ADX2* son además, 52% y 43% idénticas respectivamente, a la proteína Yah1p de *S. cerevisiae*, y conservan en su secuencia el residuo de histidina presente en todas las ferredoxinas del tipo “vertebrados”.



**Figura 20. Alineamiento de adrenodoxinas mitocondriales encontradas en *A. thaliana* y *B. taurus*.** ADX1 y ADX2.2 de *A. thaliana* poseen un 76.1% de identidad entre sí, y un 36.4% y 34% comparadas con ADX de *B. Taurus*, respectivamente. Los asteriscos (\*) marcan la posición de los residuos de cisteína involucrados en el anclaje del centro Fe-S. La barra roja destaca una región ampliamente conservada en ferredoxinas del tipo hidroxilasas. Esta región sería importante para la interacción con la adrenodoxina reductasa y con citocromos P450 (Grinberg et al., 2000). La punta de flecha negra señala la posición de un residuo de histidina, dentro de uno de los dominios de interacción de las ADXs, conservado en todas las ferredoxinas del tipo “vertebrados”. (Alineamiento usando Genious Consensus Aligement – Blosum62 – Gap Open penalty: 9 –Gap Extension Penalty: 2).

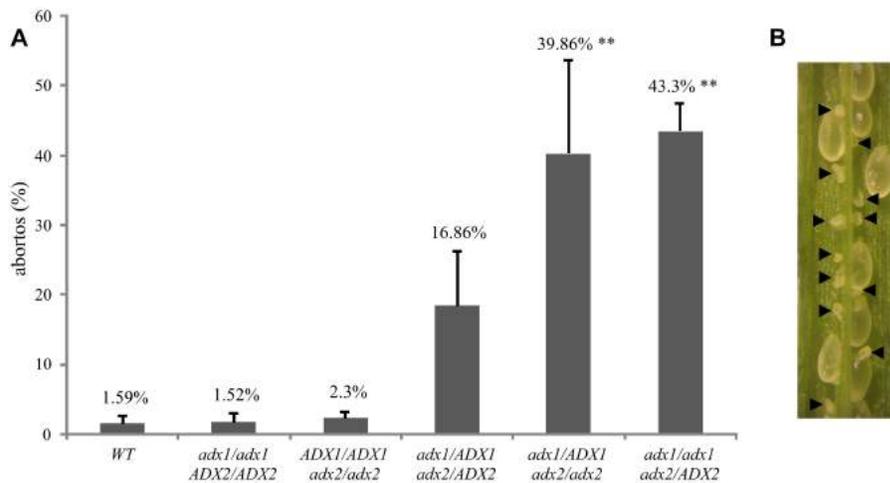
En otros sistemas, como en vertebrados e insectos, las adrenodoxinas transfieren electrones desde la ADXR a diferentes aceptores electrónicos, por lo que es esperable que una disfunción en estas proteínas, produzca defectos similares a aquellos encontrados en mutantes para el gen *ADXR*. Para estudiar esta posibilidad, se analizaron mutantes de inserción de T-DNA para *ADX1* y *ADX2* que mostraron ser nulas (expresión no detectable, Figura 21). Las mutantes homocigotas *adx1* y *adx2* no mostraron abortos en sus silicuas ni defectos en tejidos reproductivos o vegetativos (Figura 21 B y C). La ausencia de fenotipos en mutantes simples *adx1* o *adx2* podría explicarse por una redundancia funcional, dada la alta homología detectada entre ADX1 y ADX2.



**Figura 21. Análisis de mutantes nulas para los genes *ADX1* y *ADX2*.** A, esquema mostrando la localización de las inserciones de T-DNA estudiadas; B, plantas de 40 días WT y mutantes *adx1* y *adx2*. C, silicuas abiertas de plantas WT y mutantes *adx1* y *adx2* mostrando la ausencia de abortos. D, análisis de expresión génica para *ADX1* y *ADX2* por RT-PCR. *ACT*: gen control (actina).

Teniendo en cuenta ésta posibilidad, se cruzaron entre sí las mutantes *adx* y se analizó la F2 genotipando la progenie de la F1 en búsqueda de dobles mutantes. Sin embargo, no fue posible detectar mutantes doble homocigotas *adx1 adx2* (n>100). Por esta razón, se analizaron plantas hemicigotas para ambos loci; *adx1/ADX1 adx2/ADX2*, o portando sólo un alelo funcional de ADX:

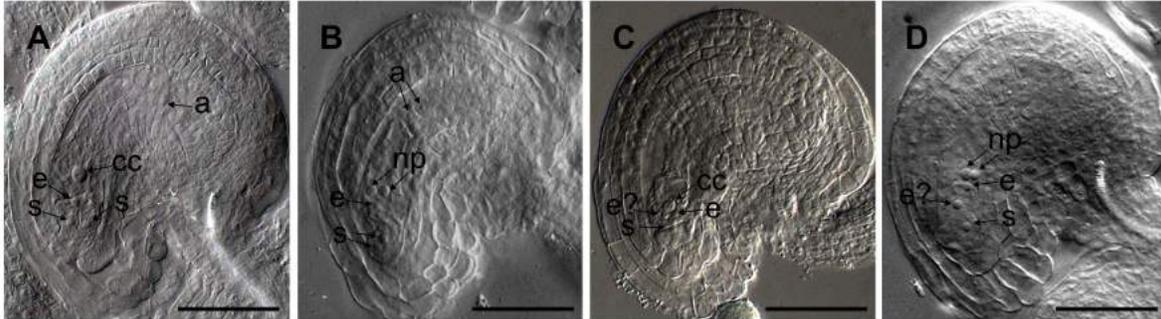
plantas con genotipos *adx1/adx1 ADX2/adx2* o *ADX1/adx1 adx2/adx2*. Cuando se analizaron silicuas de estas plantas, se observó un 16.9% de abortos en silicuas de plantas *adx1/ADX1 adx2/ADX2*, un 43.3% de abortos en silicuas de plantas *adx1/adx1 ADX2/adx2* y un 39.9% en silicuas de plantas *ADX1/adx1 adx2/adx2* (Figura 22). Este fenotipo no pudo ser rescatado polinizando con polen WT al igual que ocurrió en plantas *adxr/ADXR*.



**Figura 22. Análisis de silicuas en mutantes para los genes *ADX1* y *ADX2*.** A; frecuencia de abortos observada en plantas WT y en plantas con inserciones en los genes *ADX1* y *ADX2*. B; silicua abierta de una planta *adx1/adx1 adx2/ADX2*, mostrando abortos (▲) en su interior. \*\*  $p < 0.01$  (Test t), comparando con plantas WT. WT; plantas: 7, óvulos: 1193. *adx1/adx1 ADX2/ADX2*; plantas: 3, óvulos: 262. *ADX1/ADX1 adx2/adx2*; plantas: 4, óvulos: 521. *adx1/ADX1 adx2/ADX2*; plantas: 9, óvulos 2289. *adx1/ADX1 adx2/adx2*; plantas: 6, óvulos: 1179. *adx1/adx1 adx2/ADX2*; plantas: 7, óvulos: 1404.

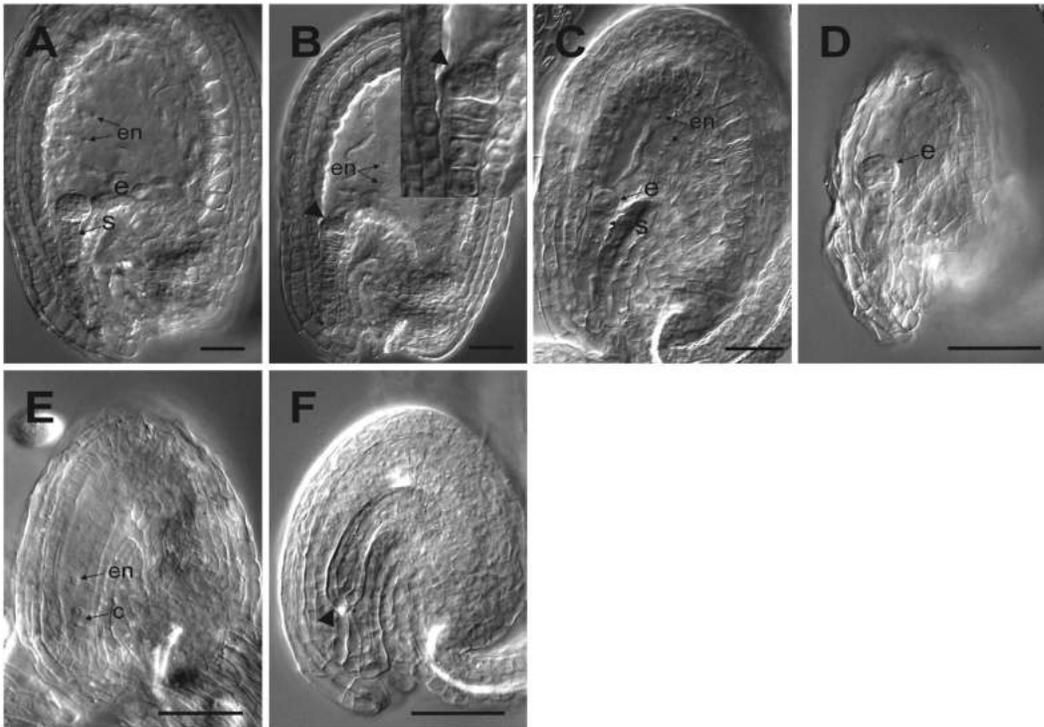
Además, se analizaron sacos embrionarios en estadio FG7 de mutantes *adx1/adx1 ADX2/adx2* y *ADX1/adx1 adx2/adx2* usando microscopía DIC, 48 horas luego de la emasculación, de manera de permitir el máximo desarrollo posible de los sacos embrionarios. De ésta forma pudieron observarse sacos embrionarios con núcleos polares sin fusionar y células micropilares con anomalías en la

localización del núcleo, los mismos fenotipos encontrados en plantas *adxr/ADXR* (Figura 23).



**Figura 23. Análisis fenotípico de sacos embrionarios presentes en plantas *adx1/adx1 adx2/ADX2* mediante microscopía DIC.** A, óvulo conteniendo un saco embrionario en estadio FG7 normal; B, óvulo conteniendo un saco embrionario que presenta núcleos polares sin fusionar (pnu); C, óvulo conteniendo un saco embrionario que presenta uno de los núcleos de las células sinérgida con características de ovocélula (eam). D; fenotipos B y C juntos (pnu+eam). o: óvulo. cc: núcleo de la célula central. e: núcleo de la ovocélula. e?: núcleo en posición de ovocélula. pn: núcleo polar. s: núcleo de la célula sinérgida. a: núcleo de célula antípoda. n:138; FG7: 60.29%; pnu: 16.17%; eam: 17.64%; pnu+eam: 5.88%. Barras: 50  $\mu$ m.

Por otro lado, de manera de determinar si existían problemas luego de la fertilización como los detectados en mutantes *adxr*, se estudiaron las primeras etapas del desarrollo embrionario por microscopía DIC, encontrándose arrestos en estadios de cigoto o embrión uni o bi-celular, al igual que en mutantes *adxr* (Figura 24).

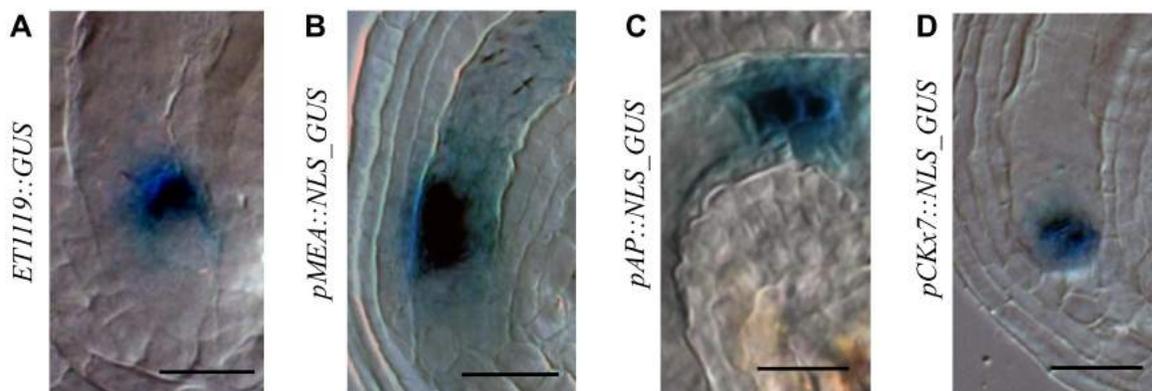


**Figura 24. Análisis del desarrollo post-fertilización en plantas *adx1/adx1 adx2/ADX2*, 3 días luego de la polinización (3 DAP), por microscopía DIC.** A; óvulo mostrando en su interior un desarrollo normal del embrión, en estadio pre-globular. B; óvulo conteniendo un embrión con desarrollo detenido y con divisiones asimétricas (detalle en recuadro superior derecho). Se observa además, endosperma desarrollado. C; óvulo conteniendo un embrión con desarrollo detenido en estadio de 2 células y con endosperma desarrollado. D; óvulo colapsado en el que se observa el desarrollo del embrión en estadio de 8 células y sin desarrollo de endosperma. E; óvulo en el que se observa el desarrollo detenido en estadio cigótico. F; saco embrionario con las paredes del saco embrionario retraídas hacia la chalaza. e: embrión propiamente dicho. s: suspensor. en: núcleos del endosperma. c: cigoto. n:253, fenotipo en A:50.59%, fenotipo en B: 4.35%, fenotipo en C y D: 3.16%, fenotipo en E: 7.11%, fenotipo en F: 34.78%. Barras 50  $\mu$ m.

### 3.1 Especificación celular en sacos embrionarios *adx1 adx2*

Por otra parte, y de manera de determinar si existen problemas en la identidad celular durante el desarrollo del saco embrionario cuando las dos ADXs se encuentran afectadas, se estudió la especificación celular dentro del gametofito femenino en plantas WT y en plantas *ADX1/adx1 ADX2/axd2* utilizando marcadores celulares específicos. El análisis se realizó sobre la F1, luego de cruzar plantas *adx11/adx1 ADX2/axd2* con cada marcador, resultando en plantas hemicigotas para cada locus. Cuando se analizó la expresión del marcador de ovocélula *ET1119:GUS* en pistilos WT

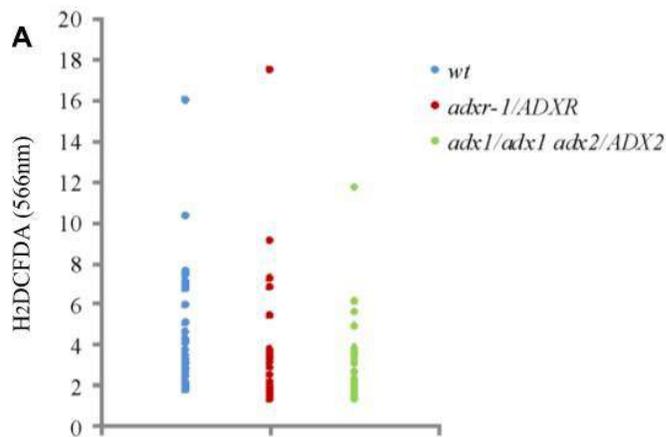
hemicigotas para el marcador, se detectó su expresión en el 27.4% de los sacos embrionarios y exclusivamente en la ovocélula (n=347). En pistilos *ADX1/adx1 ADX2/axd2*, el 27.8% de los sacos embrionarios mostraron expresión, con un patrón normal sobre la ovocélula (Figura 25 A, n=309). También se estudió la expresión del marcador de célula central *pMEA::NLS::GUS*, donde el 34% de los sacos embrionarios analizados en pistilos WT y hemicigotas para dicho marcador, mostraron una expresión específica en la célula central (n=209). Cuando la expresión del marcador fue estudiada en pistilos *ADX1/adx1 ADX2/axd2* se obtuvo un resultado similar, con 33.1% de los sacos embrionarios expresando GUS y solo en la célula central (n=290, Figura 25B). Las células accesorias también se especificaron correctamente. Mientras que un 52.5% de los sacos embrionarios de pistilos WT hemicigotas para el marcador *pAP::NLS::GUS*, mostraron expresión de GUS localizada en la zona de la antípoda (n=139), un 48.5% de sacos embrionarios de pistilos *ADX1/adx1 ADX2/axd2* mostraron expresión en las células antípoda (n=103), sin observarse patrones anormales (Figura 25C). Cuando se analizó la expresión del marcador de células sinérgidas *pCKx7::NLS::GUS* en pistilos WT, se observó la tinción de GUS específica en las dos células micropilares en el 43% de los sacos embrionarios analizados (n=137). En el caso de pistilos *ADX1/adx1 ADX2/axd2* se observó un resultado similar, con 40.3% de los sacos embrionarios positivos para GUS solo en las células sinérgidas (n=149, Figura 25D).



**Figura 25. Análisis de la expresión de marcadores celulares específicos en el saco embrionario de plantas *adx1/ADX1 adx2/ADX2*. A; ovocélula. B; célula central. C; antípoda. D; sinérgidas. Barras: 25  $\mu$ m.**

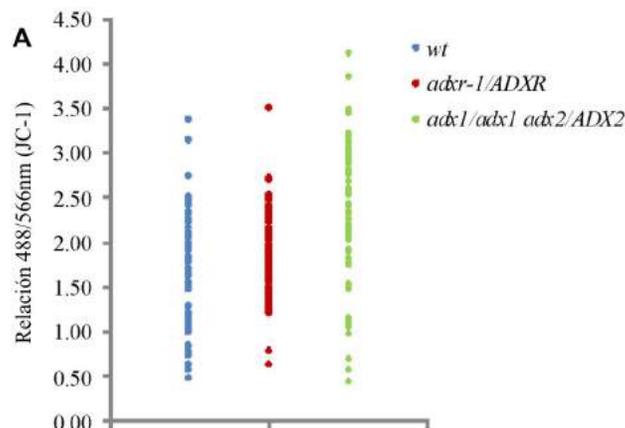
#### 4. ADX-ADXR en la homeostasis de ROS y función mitocondrial

Como se comentó anteriormente, en algunos organismos las ferredoxinass estarían involucradas en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés –Reactive Oxygen Species). Dado que una deficiencia en las proteínas en estudio provoca anomalías durante el desarrollo del gametofito femenino y la detención del programa de desarrollo embrionario debido a un efecto materno, es probable que estos fenotipos se encuentren dados por un incremento en la concentración de ROS, como se ha descrito para otras mutantes gametofíticas (Martin et al., 2013). Por tal motivo se analizó el contenido de ROS en sacos embrionarios de plantas WT, *adxr-1/ADXR* y *adx1/adx1 adx2/ADX2*, utilizando la sonda H<sub>2</sub>DCFDA. Como puede observarse en la figura 26, la distribución de los valores de fluorescencia correspondiente a ROS dentro de los sacos embrionarios es similar entre pistilos WT y pistilos *adxr/ADXR* y *adx1/adx1 adx2/ADX2*, que contienen tanto sacos embrionarios WT como mutantes (prueba H de Kruskal-Wallis). Este resultado sugiere que la deficiencia en la actividad de ADXR o de ADX no tendría como consecuencia una acumulación de ROS en el saco embrionario.



**Figura 26. Análisis del contenido de ROS en sacos embrionarios provenientes de pistilos WT y mutantes.** El gráfico muestra la distribución de los valores de fluorescencia (escala arbitraria) detectados a 566nm usando la sonda H<sub>2</sub>DCFDA en microscopio confocal. WT (n=49,  $\bar{x}$ =3.90); *adxr-1/ADXR* (n=39,  $\bar{x}$ =2.96); *adx1/adx1 adx2/ADX2* (n=47,  $\bar{x}$ =2.62).

Por otra parte, un transporte de electrones mitocondrial ineficiente, podría tener como consecuencia una función mitocondrial alterada en los gametofitos femeninos que porten la mutación en los genes *ADXR* o *ADX1* y *ADX2*. Por tal motivo se estudió el efecto de la mutación sobre la polarización de las membranas mitocondriales. Para ello se utilizó el marcador JC-1, un indicador de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) lipofílico que puede ingresar selectivamente en mitocondrias. En células saludables, con mitocondrias que exhiben un alto  $\Delta\psi_m$ , JC-1 forma espontáneamente complejos con una fluorescencia roja muy intensa. Por el otro lado, en mitocondrias con bajo  $\Delta\psi_m$ , JC-1 permanece en su forma monomérica que fluoresce en verde. De esta manera, la relación entre fluorescencia roja/verde nos da cuenta del potencial de membrana relativo que presentan las mitocondrias de diferentes tejidos (Martin et al., 2013). La distribución de las relaciones de fluorescencia correspondiente al  $\Delta\psi_m$  dentro de los sacos embrionarios resultó similar entre pistilos WT y pistilos *adxr/ADXR* y *adx1/adx1 adx2/ADX2* (prueba H de Kruskal-Wallis), lo que sugiere que las mutaciones en *ADXR* o en los genes *ADX* no están afectado el potencial de membrana mitocondrial.



**Figura 27.** Análisis del potencial de membrana mitocondrial en sacos embrionarios de plantas WT, *adxr-1/ADXR* y *adx1adx1/adx2ADX2*, utilizando el marcador JC-1. WT (n=53,  $\bar{x}$ =1.655); *adxr-1/ADXR* (n=82,  $\bar{x}$ =1.882); *adx1adx1/adx2ADX2* (n=67,  $\bar{x}$ =2.335).

## 5. Estudio de interactores de ADX1: posible función del sistema ADX-ADX1 en la síntesis de esteroides

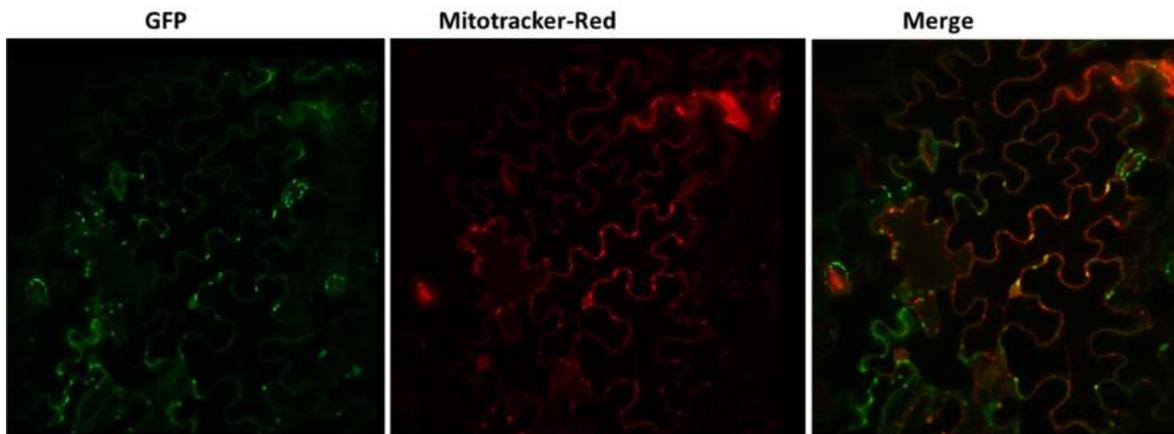
Con el objetivo de determinar la función del sistema ADX-ADX1 en *A. thaliana*, se decidió estudiar los posibles interactores de ADX1, de manera de conocer hacia donde están fluyendo los electrones provenientes de NADPH y transportados por las ADXs. Para ello se realizó un ensayo de doble híbrido utilizando ADX1, sin su secuencia para el péptido señal, como carnada y una biblioteca de cDNA de inflorescencia normalizada. Este estudio lo llevo adelante la empresa Hybrigenics Services S.A.S. (Paris, Francia) y fueron detectados 219 clones positivos, que codifican para 24 proteínas diferentes. En la Tabla 4 se presenta una selección de los clones encontrados.

**Tabla 4. Selección de clones identificados en un ensayo de doble híbrido utilizando como proteína carnada a ADX1.**

AGI Locus	Anotación	Numero de clones	PBS	Localización Subcelular	Cita
AT1G28290	Arabinogalactan protein	73	A	Membrana plasmática, pared celular	(Hijazi et al., 2014)
AT1G31817	NFD3, Ribosomal L18p/L5e family protein	19	A	Cloroplasto, citoplasma, mitocondria	ND, predicción (anotación)
AT3G56460	Oxidoreductase, zinc-binding alcohol dehydrogenase family	8	B	Peroxisomas	(Reumann et al., 2009)
AT2G26170	<b>P450, family 711, subfamily A, polypeptide 1 (CYP711A1)</b>	2	D	Plástidos	(Abe et al., 2014)
AT1G18540	60S ribosomal protein L6 (RPL6A)	2	D	Citoplasma, Retículo end. Mambrana plasmática	ND, predicción (anotación)

PBS (*Predicted Biological Score*), representa confianza en la interacción. A: Muy alta probabilidad de interacción, B: alta probabilidad de interacción, C: buena probabilidad de interacción, D: moderada probabilidad de interacción

Como entre las posibles proteínas interactuantes con ADX1 se encontraba el citocromo CYP711A1 (At2g26170), un miembro de la subfamilia A de citocromos P450 y teniendo en cuenta la función descrita para las adrenodoxinas en otros sistemas, se decidió confirmar esta interacción mediante experimentos de complementación de fluorescencia bimolecular (BIFC, experimentos llevados a cabo por la Dra. Ayelen Distefano en el marco de su proyecto post-doctoral). Como esta interacción pudo ser confirmada, la Dra. Distefano estudió además la posible localización mitocondrial de CYP711A1, mediante experimentos de expresión transiente de la proteína de fusión CYP711A1-GFP en *Nicotiana benthamiana*, que mostraron una clara co-localización con el marcador de mitocondrias Mitotracker Red (Figura 28).



**Figura 28.** Localización mitocondrial de CYP711A1-GFP en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

De manera de determinar si CYP711A1 está involucrado en la misma vía que ADXR y ADX, se analizaron dos líneas homocigotas nulas para el gen At2g26170, líneas de inserción CS\_717630 y CS\_9564, sin detectarse defectos evidentes relacionados, ya que no se observaron abortos en las silicuas. Sin embargo, debido a que el genoma de *A. thaliana* codifica para 244 citocromos P450s, es probable que exista una redundancia funcional entre los miembros de esta superfamilia, lo que

podría explicar la ausencia del fenotipo gametofítico en mutantes *cyp711a1* (Bak et al., 2011). Utilizando diferentes predictores de localización sub-celular, fue posible determinar que 15 citocromos P450 podrían tener una localización mitocondrial (Tabla 5).

**Tabla 5. Detección de P450s con probable localización mitocondrial en *Arabidopsis***

Locus	Anotación	Predictores utilizados										Localización según todos los predictores
		<a href="#">Targ etP</a>	<a href="#">Mito prot 2</a>	<a href="#">Su bl oc</a>	<a href="#">iPS OR I</a>	<a href="#">Pred otar</a>	<a href="#">Mito Pred</a>	<a href="#">Per oxP</a>	<a href="#">WoLFPS ORT</a>	<a href="#">MultiL oc</a>	<a href="#">LOCtr ee</a>	
AT1G01600.1	CYP86A4	M	M	C		RE			P	M	M	C,RE,M,P
AT1G11610.1	CYP71A18	M	M	C		RE			P	M	M	C,RE,M,P
AT1G12740.1	CYP87A2	M		M	P	RE			MP	P	M	RE,M,MP,P
AT1G64900.1	CYP89A2	M		M	P	RE			MP	M		RE,M,MP,P
AT1G69500.1	similar to CYP704A2			E					C		C	C,E
AT1G74550.1	CYP98A9	P		M	P	RE			P	M	M	RE,M,P
AT2G02580.1	CYP71B9	M		C		RE			V	M	U	C,RE,M,U,V
AT2G28850.1	CYP710A3	E	M	E		RE			MP		U	RE,E,M,MP,U
AT2G45550.1	CYP76C4	M		C		RE			P	P	U	C,RE,M,P,U
AT3G13730.1	CYP90D1	E		M		RE			U	M	M	RE,E,M,U
AT3G26320.1	CYP71B36	M		C		RE			V	M	M	C,RE,M,V
AT3G26330.1	CYP71B37			C	M	P			P	M	M	C,M,P
AT4G15110.1	CYP97B3	M		C	P	P			C	P	P	C,M,P
AT5G05690.1	CPD	M	M	M		RE			V	M	M	RE,M,V
AT5G07990.1	TT7	M	M	M		RE			V	P	U	RE,M,P,U,V

C, citosol; E, extracelular; M, mitocondria; P, plástido; RE, retículo endoplasmático; U, poco claro; V, vacuola. Para las proteínas marcadas en celeste fue posible realizar una construcción en fase con GFP para verificar su localización sub-celular.

Para 10 de estos citocromos (sombreados en celeste en la Tabla 5), fue posible realizar construcciones en fase con GFP y determinar si las proteínas de fusión co-localizaban con Mitotracker-Red en experimentos de expresión transiente en *Nicotiana benthamiana*. La localización mitocondrial fue confirmada para los citocromos CYP90A1, CYP90D1, CYP71B9, CYP75B1, CYP89A2 y CYP86A4 (Dra. Ayelen Distefano, proyecto de beca post-doctoral). Por otra parte, mediante ensayos de complementación de fluorescencia bimolecular, se comprobó que los citocromos CYP90A1, CYP75B1 y CYP71B9 eran capaces de interactuar con ADX1 *in vivo*, por lo que en total existirían 4 citocromos P450 mitocondriales capaces de interactuar con ADX1 (Dra. Ayelen Distefano, proyecto de beca post-doctoral).

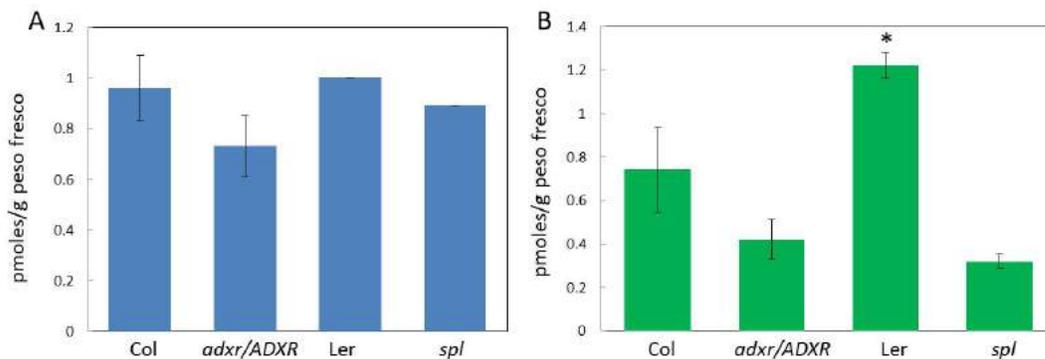
Estos resultados sugirieron que podría existir en *Arabidopsis* un sistema de hidroxilación de esteroides, mediada por citocromos P450 mitocondriales, tal como ocurre en sistemas animales. En concordancia, existe además, un transportador con afinidad al colesterol en las membranas mitocondriales de *A. thaliana* (Lindemann et al., 2004).

## **6. Perfil de esteroideos en ovulos de plantas WT y mutantes**

Para estudiar el posible rol de la ADXR en la síntesis de esteroideos en el saco embrionario, se analizó el perfil de esteroideos de óvulos provenientes de plantas WT, *adxr/ADXR*, y *sporocytless (spl)*. El gen *SPOROCYTTLESS (SPL)* es requerido para la iniciación de la megasporogénesis y las mutantes *spl* son incapaces de desarrollar un saco embrionario dentro de los integumentos del óvulo (Yang et al., 1999). De esta manera, mediante un estudio comparativo, sería posible determinar los esteroideos que derivan específicamente del saco embrionario, diferenciándolos de aquellos que derivan de los integumentos del óvulo que lo rodean. Para realizar este experimento, se extrajeron óvulos de pistilos en estadio 14 (Bowman, 1994), usando un equipo de vacío diseñado para tal fin (ver materiales y métodos). Para comparar el contenido de esteroideos presente en

mutantes *spl* se utilizó el eco-tipo Landsberg erecta, ya que es el *background* genético de dicha mutante, mientras que las mutantes en *ADXR* fueron comparadas con plantas WT eco-tipo Columbia.

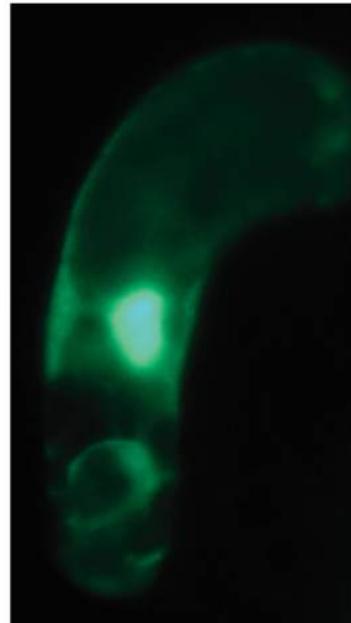
De cada tipo de planta se extrajeron aproximadamente 100 mg de óvulos, que fueron analizados mediante cromatografía líquida de ultra performance seguida de espectrometría de masa en tándem en el laboratorio del Dr. Ondrej Novack, de la Universidad de Palacki, en Republica Checa. Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 29, permiten inferir que existen brasinosteroides específicos para el saco embrionario, ya que existen diferencias significativas entre el contenido presente en óvulos WT con respecto a las mutantes *spl*, las cuales carecen de gametofito femenino. Concretamente esta diferencia se dio en el caso de la homocastasterona (Figura 29 B). Tanto para la castasterona, como para la homocastasterona, se observa un menor contenido en óvulos provenientes de plantas *adxr/ADXR*, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Esto podría deberse a diferencias entre muestras, ya que el contenido de brasinosteroides es escaso y la masa de óvulos limitante y variable entre muestras, lo que hace que en algunos casos no sea posible detectar los esteroides presentes, por lo que este ensayo, realizado en dos oportunidades, está en vías de ser repetido en una tercera ocasión.



**Figura 29. Esteroides presentes en óvulos de plantas WT y mutantes en los genes *ADXR* y *SPL*.** A, contenido de castasterona; B, contenido de homocastasterona. \*Diferencia significativa comparando con Ler,  $p < 0.01$ , Test de T.

# Discusión

## Capítulo 1



**El sistema ADX-ADXR es requerido para el desarrollo normal y para la función del gametofito femenino**

Los resultados presentados en este capítulo demostraron que el sistema ADX-ADXR es esencial para el desarrollo normal del gametofito femenino y para sostener el desarrollo temprano embrionario. La única función descrita hasta el momento para las adrenodoxinas y la ADXR mitocondrial está relacionada con la síntesis de biotina (vitamina B8). Las mutantes *bio1*, deficientes en biotina, han demostrado tener problemas para superar el estadio globular durante el desarrollo embrionario. Aun así, estas mutantes son factibles de ser rescatadas por adición de biotina 0.5mM al medio de cultivo, generando plantas homocigotas saludables (Schneider et al., 1989). En un trabajo posterior, se pudo comprobar que la actividad de las ADXs y ADXR mitocondriales podía mediar el pasaje de electrones hacia la enzima BIO2, involucrada en el paso final de síntesis de biotina en la mitocondria, en experimentos *in vitro* (Picciocchi et al., 2003). Sin embargo, en resultados previos a esta Tesis, se comprobó que las plantas hemicigotas *adxr/ADXR* no pudieron ser rescatadas cuando fueron suplementadas con biotina durante su crecimiento, lo que sugiere que el sistema ADX-ADXR estaría involucrada en una vía diferente que además afecta el desarrollo y función del gametofito femenino. Esto no resulta sorprendente, teniendo en cuenta que los sistemas ferredoxina-ferredoxina reductasa son considerados sistemas funcionalmente promiscuos, pudiendo servir como sistemas de transferencia de electrones hacia una amplia variedad de sustratos (Bakkes et al., 2015, Catalano-Dupuy et al., 2011).

Entre los fenotipos observados en las mutantes estudiadas durante el desarrollo del gametofito se destaca la presencia de núcleos polares sin fusionar. Notablemente, un gran número de mutantes deficientes en proteínas mitocondriales presentan este defecto, por lo que se ha sugerido que la mitocondria estaría cumpliendo un rol en dicha fusión. Muchas de estas mutantes presentan deficiencias en proteínas ribosomales. Tal es el caso de *nfd1* (Portereiko et al., 2006), que presenta una inserción en un gen que codifica para una subunidad ribosomal 50S mitocondrial, y sería

requerida además, durante la fusión de gametas en el proceso de doble fertilización. Por otra parte, una sisteinil tRNA transferasa mitocondrial (SYCO ARATH), que al igual que ADXR es expresada en la célula central y que es necesaria para mantener la integridad de las crestas mitocondriales, también es esencial para la fusión de los núcleos polares (Kägi et al., 2010). Además una chaperona mitocondrial del tipo Mdj1p de levaduras también sería necesaria para este proceso (Christensen et al., 2002). Por último, una superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de Mn también se requiere para la fusión de núcleos polares, probablemente debido a que mantiene la homeostasis de ROS en la célula central (Martin et al., 2013). Dada la inusitada cantidad de proteínas mitocondriales cuya actividad es requerida para el mismo proceso, se ha propuesto que la fusión de los núcleos polares es un evento mediado por la mitocondria, aunque las bases moleculares de tal dependencia es aún desconocida (Wu et al., 2012).

Otro de los defectos observados en los gametofitos femeninos de plantas deficientes en el sistema ADX-ADXR fue la localización aberrante de núcleos en las células del micrópilo. Un defecto similar también fue observado en las mutantes *eostre* y *oiwa*, aunque en ambos casos ocurría una especificación anormal de las células del micrópilo (Martin et al., 2013, Pagnussat et al., 2007) que no fue observada en las mutantes *adxr* y *adx1,adx2*. Este resultado indica que las células del micrópilo pueden presentar defectos en la migración de núcleos, pero aun así especificarse correctamente. Estudios previos indican que la migración nuclear en plantas se encuentra asociada a la organización del citoesqueleto (Kawashima et al., 2014), por lo que es posible que la ausencia de actividad ADX-ADXR afecte su dinámica.

Sin embargo, el fenotipo mayoritario, observado post-fertilización, indica que una vez fertilizada la ovocélula el desarrollo del embrión se detiene tempranamente. Dado que no fue posible el rescate del fenotipo polinizando plantas *adxr-1/ADXR* con polen WT, nuestros datos en conjunto sugieren que las mutaciones en *ADXR* y en *ADX1-2* estarían ocasionando un efecto materno, en el que el gametofito femenino no puede sostener el desarrollo inicial del embrión.

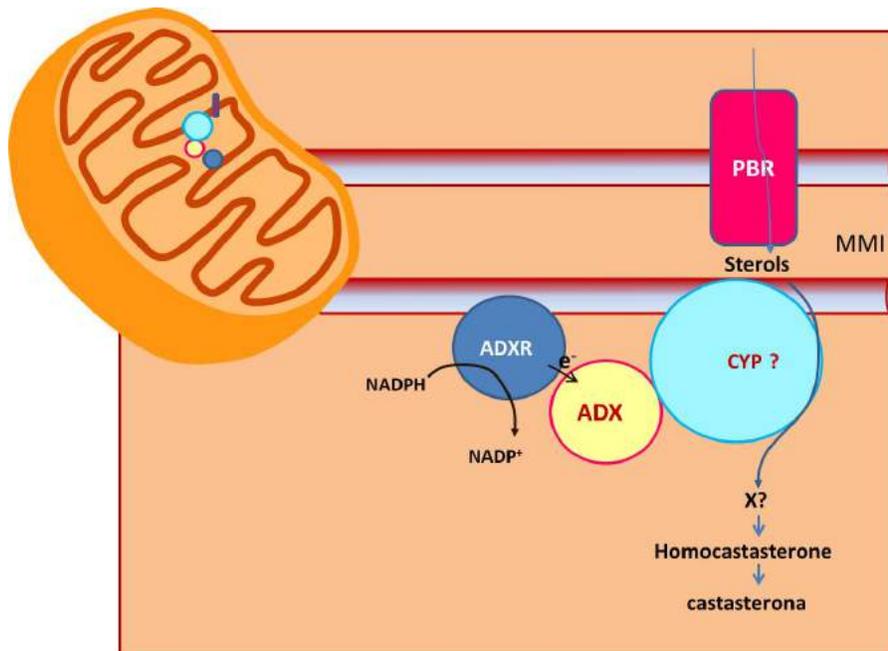
El embrión y endosperma en desarrollo heredan el citoplasma materno, y son provistos con nutrientes que provienen de los integumentos del óvulo. De esta forma, existen contribuciones maternas al embrión en desarrollo provenientes de tejidos esporofíticos diploides, así como también del saco embrionario haploide. Se han descrito mutantes de *A. thaliana* asociadas a un *efecto materno*, tales como aquellas que afectan los genes *FIS*. En mutantes *mea* o *fis2*, el alelo paterno WT no es capaz de rescatar la mutación heredada del lado materno debido a un “imprinting” genómico, originándose así un *efecto materno* sobre el desarrollo del endosperma (Chaudhury et al., 1997) (Grossniklaus et al., 1998). La activación de los alelos maternos *FIS2* y *MEA* depende a su vez de otro gen perteneciente a la familia de genes *FIS*, *DME (DEMETER)*, el cual codifica para una DNA glicosilasa (Choi et al., 2002). Las mutantes que afectan al gen *atLIG1 (DNA LIGASE 1)*, el cual es esencial para la replicación y reparación de DNA, también exhiben un *efecto materno* que afecta el desarrollo del endosperma. Posiblemente éste gen actúe en la célula central en la misma vía que DME, aunque su expresión en el embrión y endosperma dependería de ambos alelos, materno y paterno, y no estaría bajo un “imprinting” genómico (Andreuzza et al., 2010). Aunque el origen del *efecto materno* generado por *adxr* aún es desconocido, la expresión de *ADXR* sería requerida en la zona de la ovocélula y la célula central previo a la fertilización. Luego de la fertilización únicamente es detectada en el cigoto. El citoplasma de estas células, heredado por el embrión, podría contener moléculas derivadas de la función de *ADXR*, esenciales durante la embriogénesis temprana. El hecho de que el polen WT no es capaz de rescatar el arresto del embrión en desarrollo indica o bien que el genotipo del embrión es irrelevante para que el defecto se manifieste (en ese caso sería importante la señalización proveniente del saco embrionario) o que *ADXR* sea expresado sólo del lado materno al inicio de la embriogénesis. Ambas posibilidades podrían explicar los arrestos observados en el embrión y/o el endosperma, luego de la fertilización de sacos embrionarios *adxr*.

**La síntesis de esteroides en mitocondrias sería posible en *A.thaliana* en forma análoga a lo que ocurre en otros sistemas.**

Durante la biosíntesis de hormonas esteroideas en mamíferos, el colesterol es transportado hacia las membranas mitocondriales para su conversión en pregnenolona, el precursor de todas las hormonas esteroideas (Stryer, 1988). Este transporte es llevado a cabo por proteínas que poseen un dominio de unión al colesterol en su región c-terminal denominado START (steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer). Dentro de la mitocondria, los electrones son transferidos desde el NAPDH, vía el sistema ADX-ADX<sub>R</sub>, a un citocromo P450 que cataliza el clivaje de colesterol a pregnenolona. Antes de comenzar este trabajo de Tesis doctoral se conocía la localización de un transportador de esteroides en las membranas externa e interna de la mitocondria, cuya actividad fue probada *in vivo* (Lindemann et al., 2004). Sin embargo, como no existían hasta el momento P450s descritos en mitocondrias, la función de las adrenodoxinas y de la ADX<sub>R</sub> nunca había sido relacionada a la síntesis de esteroides. En nuestro laboratorio probamos que existen al menos 4 citocromos P450 mitocondriales capaces de interactuar *in vivo* con ADX<sub>I</sub>: CYP711A1, CYP90A1, CYP75B1 y CYP71B9. Además, se mostró por primera vez que existen esteroides específicamente dentro del saco embrionario al comparar el perfil de esteroides de óvulos WT con el de óvulos *spl*, los cuales carecen de gametofito femenino. Específicamente, se demostró que el contenido de homocastasterona en óvulos provendría principalmente del gametofito femenino (Figura 29). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar óvulos WT y óvulos *adx<sub>r</sub>/ADX<sub>R</sub>*, se observó que el contenido de homocastasterona en óvulos hemicigotas para la inserción sería menor que en óvulos WT (Figura 29). Esta medición, si bien es indicativa y se realizó en dos oportunidades utilizando 100 mg de tejido, debe ser repetida para determinar si efectivamente existen diferencias significativas entre los óvulos estudiados. Además de la limitante de masa, ya que no es posible la colección de mucho más material, los sacos embrionarios mutantes

se encuentran diluidos con sacos embrionarios WT, ya que se utilizan plantas hemicigotas, lo que hace que sea aún más difícil apreciar diferencias.

Teniendo en cuenta estos resultados en conjunto, postulamos un modelo para la síntesis de homocasterona en mitocondrias de *A.thaliana*, que sería esencial para el desarrollo y función del gametofito femenino (Figura 30).



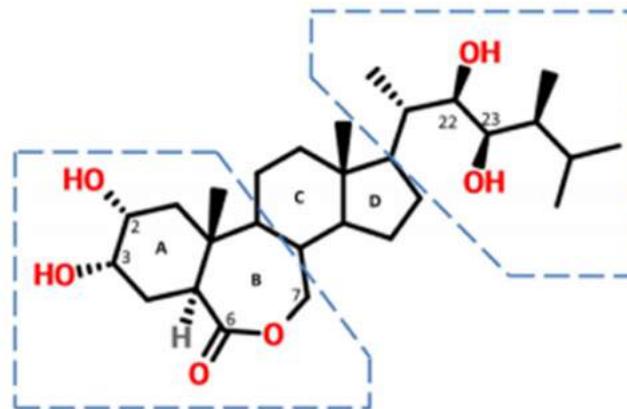
**Figura 30. Modelo propuesto para la síntesis de esteroides mediada por el sistema ADX-ADXR.** Por medio del transportador PBR los esteroides ingresarían a la mitocondria. Los electrones transferidos desde el sistema ADX-ADXR serían utilizados por un citocromo mitocondrial para la síntesis de un precursor desconocido x. El pasaje de electrones en la mitocondria mediado por ADXR, sería esencial para la síntesis de homocasterona y castasterona. MMI: membrana interna mitocondrial.

En este modelo, un esteroide precursor -probablemente campesterol, ya que es el precursor común para la síntesis de brassinosteroides (Clouse, 2011)- sería transportado hacia la membrana interna de la mitocondria por medio del transportador PBR (Lindemann et al., 2004). Dentro de la mitocondria, los electrones serían transferidos desde el NADPH a través del sistema ADX-ADXR a

uno de los cuatro citocromos encontrados en mitocondrias. Proponemos que este pasaje de electrones hacia un citocromo P450 sería esencial para la síntesis de homocasterona y castasterona dentro del saco embrionario.

La homocasterona es la molécula precursora de castasterona (CS), la cual a su vez es convertida en brasinolide (BL) en el paso final de la ruta de biosíntesis de BL (Joo et al., 2015). Tanto la castasterona como la homocasterona son moléculas bioactivas. Ambos brasinosteroides (BRs) son capaces de interactuar con el receptor BRI1, involucrado en la señalización extracelular mediada por BRs. La aplicación exógena de CS, al igual que de BL, es capaz de revertir los fenotipos observados en mutantes que afectan la vía de biosíntesis de BL (Kim et al., 2005).

Los BRs con mayor actividad biológica presentan una estructura del tipo 6-oxo (CS) o 7-oxolactona (BL) en el anillo B del esqueleto esteroideo (Figura 31).



**Figura 31.** Estructura química del brasinolide (BL) con los anillos esteroideos marcados como A, B, C y D. Las estructuras dentro de las líneas punteadas azules pueden presentar sustituciones. Extraído de (Tang et al., 2016).

En concentraciones nanomolares, los BRs son capaces de promover la división y elongación celular, así como actuar sinérgicamente con las auxinas y giberelinas (Altmann, 1999). Los BRs

serían capaces además, de modular la dirección de la expansión celular por medio de la reorientación de los microtúbulos corticales, lo cual afecta la orientación de las microfibrillas de celulosa en la pared celular. Estas actividades podrían explicar algunos de los fenotipos observados en mutantes deficientes en ADX-ADXR. Tanto en plantas *adxr/ADXR* como en *adx1 adx2/ADX2* pudieron observarse divisiones celulares asimétricas en embriones, así como también arrestos en distintos estadios del desarrollo post-fertilización. Teniendo en cuenta la actividad biológica de los brasinosteroides y los fenotipos observados, es posible proponer que la síntesis de homocastasterona-castasterona a través del sistema ADX-ADXR pueda ser requerida en el saco embrionario para sostener el desarrollo embrionario temprano, mediando tanto las divisiones celulares como los planos de división.

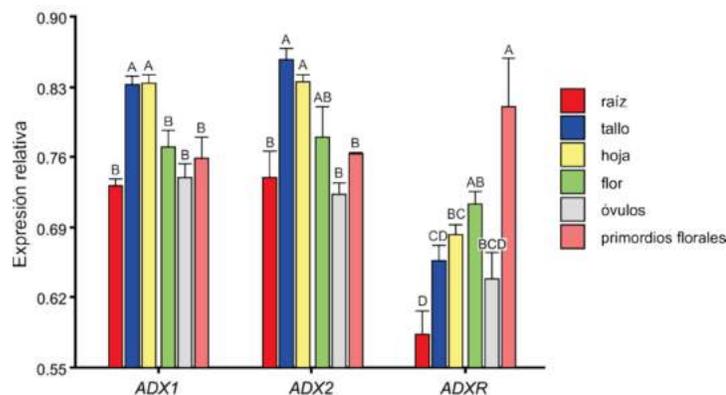
# Resultados

## Capítulo II



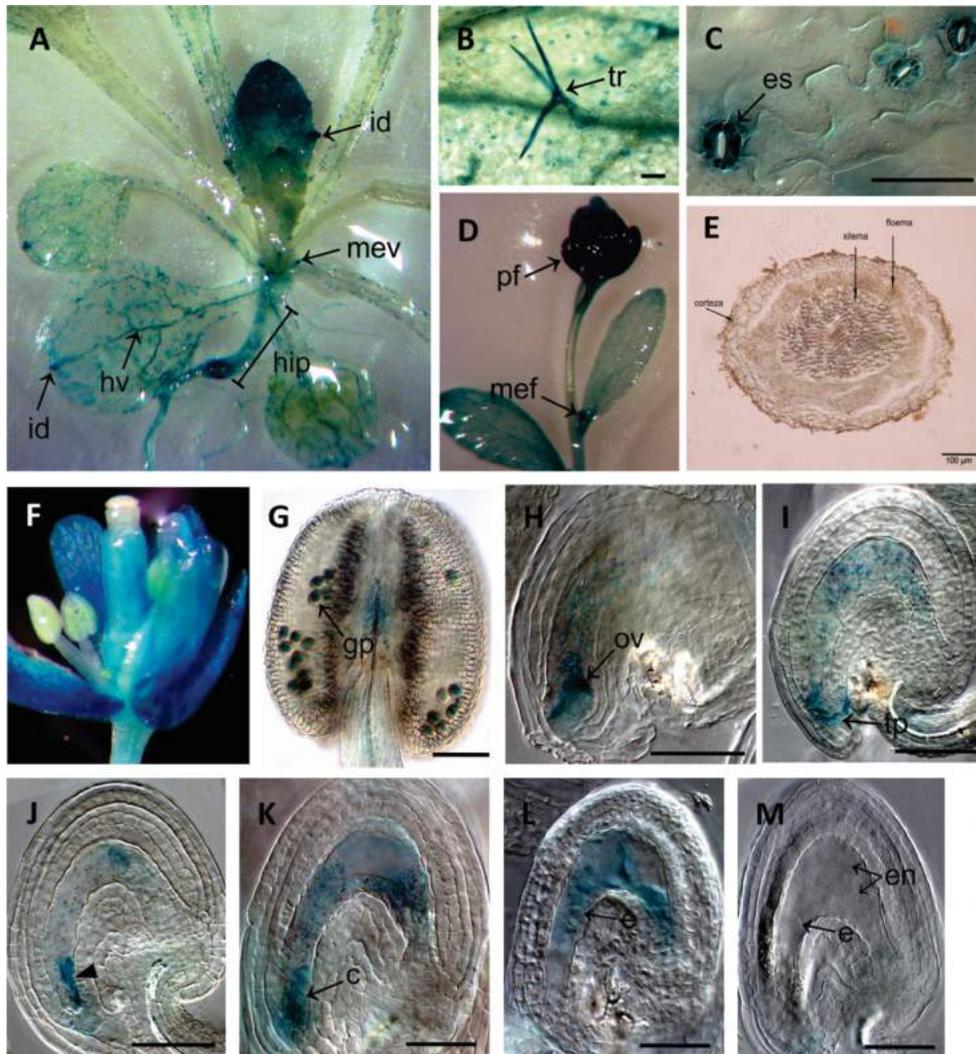
### 1. Estudio del patrón de expresión de *ADX1* y *ADX2*

De acuerdo a lo descrito en el capítulo 1, la adrenodoxina reductasa y las adrenodoxinas mitocondriales son esenciales para el desarrollo normal del gametofito femenino y la embriogénesis temprana. De manera de avanzar en la caracterización funcional de este sistema, se estudió en primer lugar el patrón de expresión de los genes en estudio mediante qRT-PCR. Esta primera aproximación se realizó para conocer si *ADX1*, *ADX2* y *ADXR* se expresaban no solamente en el gametofito femenino, donde se localizó la proteína y se determinó su función, sino también en tejidos esporofíticos de la planta. Se determinó la expresión de los genes *ADX1*, *ADX2* y *ADXR* en hoja, raíz, tallo, flor, primordios florales y óvulos de plantas WT (Figura 32). Para el caso de los genes *ADX1* y *ADX2* dicha expresión resultó mayor en tallo y hoja que en raíz, óvulos y primordios florales ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, la mayor expresión del gen *ADXR* se observó en primordios florales. Esta expresión resultó significativamente mayor que en raíz, óvulos, tallo y hoja ( $p < 0.05$ ). Además, *ADXR* se expresó más en flor que en raíz y tallo ( $p < 0.05$ ), y la menor expresión de éste gen se observó en raíces. No obstante las diferencias observadas, los 3 genes mostraron expresión en todos los tejidos analizados por encima del 50% en relación a la expresión del gen *ACT11* (actina). El hecho de que se haya detectado expresión de estos genes en otros tejidos, sugiere que el sistema ADX-ADXR también podría cumplir un rol en tejidos esporofíticos.



**Figura 32. Análisis de la expresión de los genes *ADX1*, *ADX2* y *ADXR* por RT-qPCR.** La expresión de los genes en estudio se muestra como expresión relativa del gen *ACT11* (actina). Barras: error estándar. Las letras diferentes indican resultados significativamente diferentes (Anova;  $p < 0.05$ ).

Para conocer en mayor detalle el patrón de expresión del gen *ADXR*, se fusiono la región regulatoria del gen *ADXR* al gen reportero *GUS*. Para ello se utilizaron 640 pares de bases correspondientes a la región intergénica completa rio arriba del codón ATG. Como se mostró en el capítulo 1 de esta Tesis, cuando esta secuencia fue fusionada al cDNA de *ADXR*, fue posible complementar el fenotipo gametofítico observado, lo que sugiere que es una secuencia regulatoria funcional. Se transformaron plantas con esta construcción y se analizó el patrón de expresión del gen reportero en tres líneas independientes no segregantes (T3). Como puede observarse en la figura 31, dicha expresión pudo ser detectada próxima a los haces vasculares de raíz y tallo, en la base del hipocótilo, en las células oclusivas de los estomas, en tricomas, idátodos, meristemas, sépalos, en carpelos y en la base del pistilo, y en filamentos de las anteras (Figura 33, A-E). Además, pudo confirmarse la expresión de *ADXR* en ambos gametofitos. Dentro del saco embrionario en estadio FG7, la expresión fue particularmente alta en la ovocélula y alrededor del núcleo de la célula central (Figura 33 H). En el momento de la recepción del tubo polínico (Figura 33 I) la expresión parece ser importante en ovocélula, célula central y en el aparato filiforme de sinérgidas. Posteriormente y luego de la fertilización, se observa una fuerte expresión únicamente en una de las células sinérgidas, probablemente la sinérgida NR, ya que la sinérgida receptora se encuentra colapsada en este punto (Figura 33, J). Se detectó además una fuerte expresión en el cigoto, 24H luego de la polinización (Figura 33 K). Posteriormente, en el desarrollo temprano del embrión, se detectó una expresión muy leve en el endosperma, para luego ser indetectable (Figura 33 L-M).



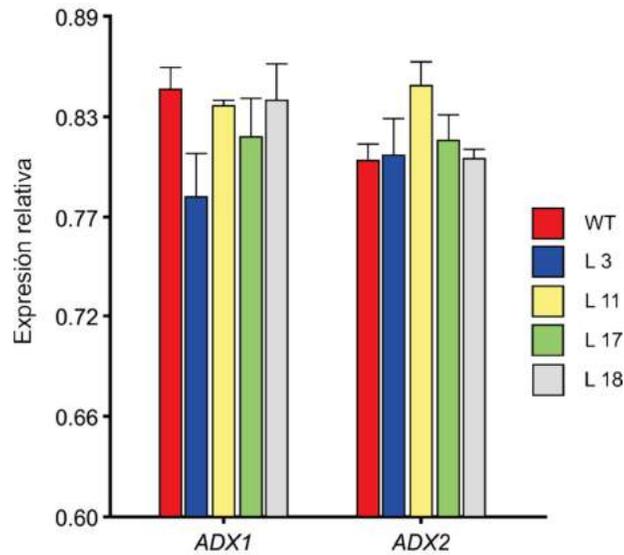
**Figura 33. Análisis de la actividad del promotor del gen *ADXR* en plantas transgénicas *pADXR:GUS*.** A-F, expresión en tejidos esporofíticos. A, plántula de 21 días donde se observa la expresión en idátodos (id), meristemas vegetativos (mev), haces vasculares (hv) y base del hipocótilo (hip). B, expresión en tricoma (tr). C, expresión en células oclusivas del estoma (es). D, expresión en primordios (pf) y meristemas florales (mf). E, corte de tallo; se observa tinción en tejidos suberificados. F, flor abierta en estadio 12 (Bowman, 1994), mostrando expresión en sépalos, pétalos y pistilo. G-J, expresión en gametofitos. G, antera con granos de polen (gp) en su interior expresando GUS. H, óvulo mostrando expresión en la zona de la ovocélula (ov) del saco embrionario. I, óvulo mostrando la llegada de un tubo polínico (tp) al micrópilo. J, expresión al momento de la recepción del TP, en una de las sinérgidas del saco embrionario (▲). K-M, expresión luego de la fertilización. K, óvulo mostrando expresión en la zona del cigoto (c). L, óvulo con un embrión (e) en estadio bi-celular, mostrando una leve expresión en el endosperma. M, desarrollo del embrión (e) y el endosperma (en) 48 horas luego de la polinización, no se observa expresión de GUS. Barras en B y E: 100  $\mu$ m. Barras en C, G-M: 50  $\mu$ m.

## 2. Estudio de la función de los genes *ADXR*, *ADX1* y *ADX2* en tejidos esporofíticos

Debido a que no es posible obtener mutantes nulas para *ADXR* y dobles mutantes *adx1 adx2*, se recurrió a diversas estrategias para estudiar las posibles funciones de estos genes en tejidos esporofíticos. En primer lugar se utilizó el promotor CaMV 35S, que no es activo en gametofitos (Roszak & Kohler, 2011), para dirigir el silenciado y la sobre-expresión de los genes en estudio. Por otra parte, se diseñaron construcciones para silenciar los genes de manera inducible, de forma de conocer su función en diferentes etapas del desarrollo.

### 2.1. Silenciado de los genes *ADX1* y *ADX2*

Debido al rol gametofítico del sistema *ADX-ADXR*, del mismo modo que no fue posible obtener plantas mutantes homocigotas *adxr* (nulas para *ADXR*), tampoco fue posible obtener plantas dobles mutantes *adx1 adx2*. Dado que en el *Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)* se encontraba disponible un clon conteniendo un microRNA artificial dirigido a *ADX1* y *ADX2* (AT4g05450, AT4g21090, clon CSHL\_0129E3), se transformaron plantas WT eco-tipo Columbia con esta construcción y se obtuvieron 4 líneas independientes no segregantes portando la construcción *35S:amiRadx1-2*. Sin embargo, al evaluar el nivel de transcritos para cada uno de estos genes, en ninguna de las líneas analizadas pudo observarse un silenciamiento significativo de los genes (Figura 34).



**Figura 34. Análisis de expresión de los genes *ADX1* y *ADX2* en hojas de plantas WT y en líneas transgénicas T3 conteniendo la construcción *35S:amiRADX1-2*.** La expresión relativa de los genes en estudio se muestra como expresión relativa a *UBQ5* (ubiquitina). Barras: error estándar. No se encontraron diferencias significativas al comparar la expresión media obtenida para cada línea con la obtenida en plantas WT para ambos genes *ADX1* y *ADX2* (Test t).

Además, no se observaron diferencias fenotípicas evidentes entre las plantas llevando la construcción *35S:amiRadxl-2* y plantas WT.

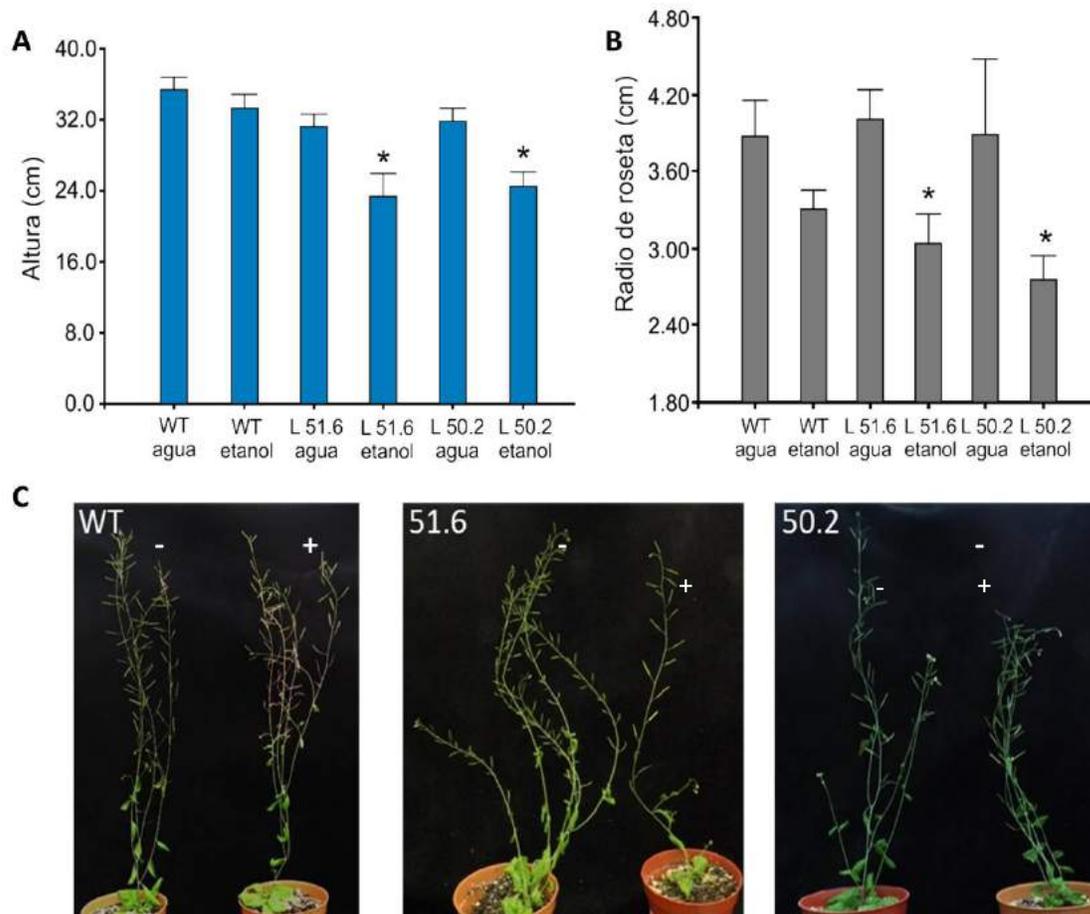
El grado de silenciamiento de los genes utilizando miRNAs, puede variar dependiendo de la eficiencia con la que éstos reconocen a los mRNAs. Además, en plantas existe un sistema endógeno citoplasmático que controla la calidad de las moléculas de RNA producidas y su degradación. Este sistema depende de pequeñas moléculas de RNA de doble cadena, siRNA o small interfering RNA, producidas a partir de la RNA polimerasa 6 (RDR6 o RNA-dependent RNA polymerase 6). De esta manera el miRNA (*amiR* en el caso de las plantas transgénicas analizadas) transcrito en la célula, podría ser degradado por el sistema RDR6, silenciándose así el transgen. Para evitar ésta posibilidad, se procedió a transformar con la construcción *35S:amiRADX1-2* plantas *rdr6*, en las que el sistema de silenciado del transgen no sería posible (Mourrain et al., 2000). Estos experimentos se encuentran en curso al momento de escritura de ésta Tesis, y aunque se han

obtenido líneas transgénicas *amiRADX1-2 rdr6*, aún no se han establecido las líneas no segregantes y las plantas transgénicas no han sido analizadas.

Por otra parte, se intentó analizar los niveles de proteína específica en cada línea mediante experimentos de tipo *Western blot* utilizando anticuerpos monoclonales comerciales desarrollados para reconocer cada adrenodoxina. Sin embargo, la calidad de los anticuerpos no permitió determinar sus niveles con la suficiente especificidad.

## 2.2. Silenciamiento inducible del sistema ADX-ADXR

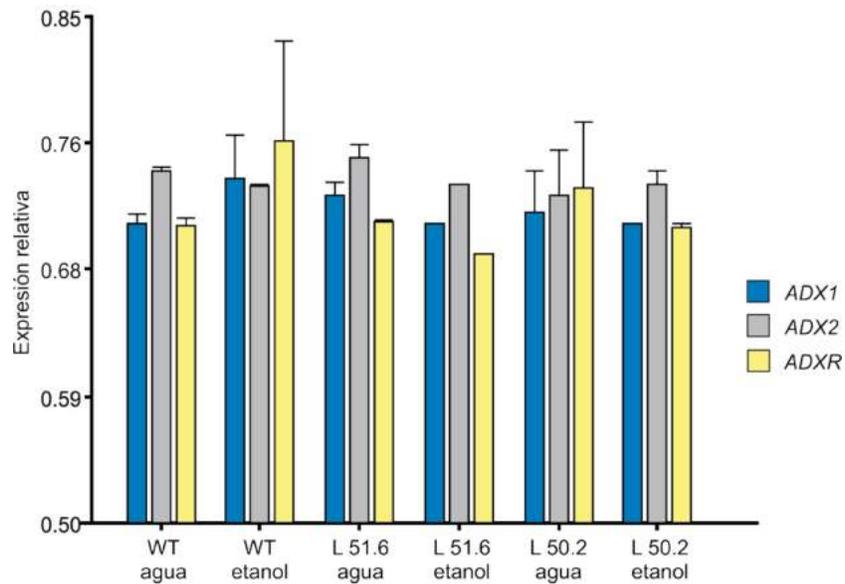
Otra estrategia utilizada para estudiar un posible rol del sistema ADX-ADXR en el esporofito de *A. thaliana*, fue utilizar un sistema que permitiera el silenciamiento inducible de los genes en estudio. Para ello, se diseñaron microRNAs artificiales para hacer blanco en *ADXR*, *ADX1* y *ADX2*, que fueron sintetizados y clonados en un *cassette* de manera tal de poder contar con los tres amiRNAs en tándem en la misma construcción. Además, se utilizó un vector que permite una expresión inducible por etanol (sistema AlcR-AlcA (Roslan et al., 2001)). Teniendo en cuenta los sistemas de inducción disponibles, se consideró que el sistema de inducción por etanol era el más apropiado, ya que no se utilizan esteroides o esteroides que podrían estar interfiriendo con la lectura de los posibles resultados, teniendo en cuenta que las proteínas en estudio podrían estar involucradas en la síntesis de esteroides. Se transformaron plantas de *Arabidopsis* WT eco-tipo Columbia con la construcción generada y se obtuvieron 2 líneas estables no segregantes en T3 (línea 51.6 y línea 50.2) llevando la construcción *samiR-ADX-ADXR1-ADX2*. Cuando estas plantas que portaban la construcción inducible fueron tratadas con etanol 2%, se observó que existían diferencias evidentes entre las plantas control y las plantas tratadas, que fueron cuantificadas. Tal es el caso del diámetro alcanzado por la roseta y la altura máxima de la planta. Estas diferencias no fueron observadas cuando se trataron plantas WT con etanol (Figura 35).



**Figura 35. Análisis morfológico de líneas *samiR-ADX-ADX1-ADX2* tratadas con etanol (inductor).** A, medición de altura máxima alcanzada (estadio 9.70) de plantas WT y líneas *samiR* tratadas o no con etanol 2%. B, radio de la roseta en plantas de 11 días WT y líneas *samiR*. Barras: error estándar. Los asteriscos (\*) marcan diferencias significativas entre las medias de una misma línea tratada con agua o etanol (Test t;  $p < 0.05$ ). Estadios 6.90 y 9.70 según (Boyes et al., 2001). C, fotografías representativas de plantas WT y líneas *samiR* L51.6 y L50.2 en estadio 6.90 (floración completa) tratadas (+) o no (-) con etanol.

Además, se observó el crecimiento de la raíz y el tiempo de floración, parámetros para los que no se detectaron diferencias entre plantas tratadas y sin tratar. A pesar de haberse detectado diferencias morfológicas significativas en la altura y radio de la roseta, no pudieron observarse diferencias significativas en la expresión de los genes *ADXR*, *ADX1* y *ADX2* entre plantas tratadas y no tratadas con etanol (Figura 36). El nivel de expresión relativa de *ADX1*, *ADX2* y *ADXR* se

determinó en hojas de roseta y los valores obtenidos fueron en general muy bajos. Este ensayo podría repetirse utilizando otro tejido en el que los niveles basales de expresión de los genes en estudio sean más altos. Tanto hojas de roseta jóvenes como tallos podrían ser una opción, teniendo en cuenta las diferencias morfológicas observadas (Figura 33).



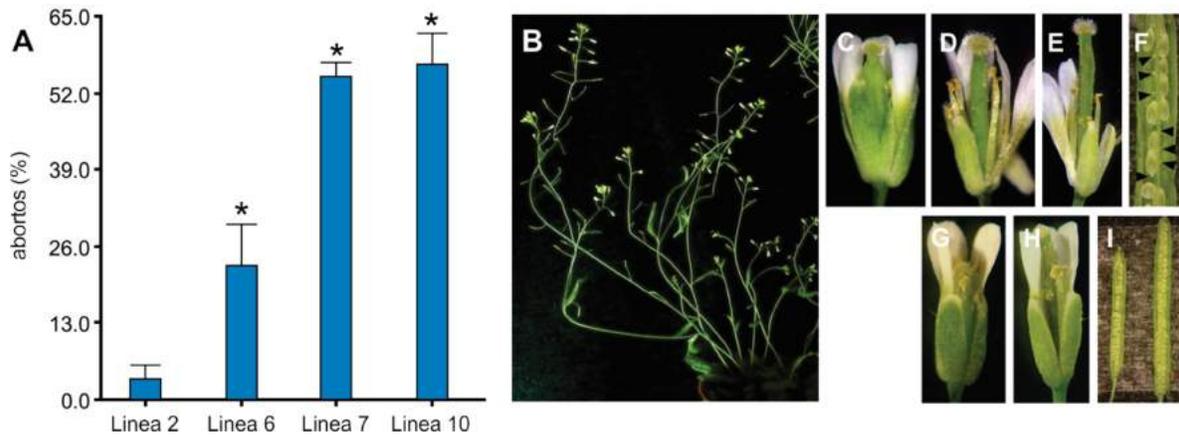
**Figura 36. Expresión relativa de los genes *ADX1*, *ADX2* y *ADXR* en hojas de roseta de plantas WT y líneas transgénicas *samiR*, tratadas con agua o con etanol.** La expresión en los genes se muestra como expresión relativa a *ACT11* (actina). Barras: error estándar. No se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con etanol para cada caso (Test t).

### 2.3. Sobre-expresión del gen *ADXR*

La sobre-expresión de genes ofrece una estrategia alternativa y complementaria a los análisis de silenciamiento que es menos afectada por la redundancia funcional.

Aun cuando las mutaciones o silenciados resulten en fenotipos claros, los experimentos de sobre-expresión resultan valiosos porque pueden generar resultados inesperados e información sobre la función de un gen que de no ser por este tipo de experimentos no resultarían evidentes. Para analizar el efecto de sobre-expresar el gen *ADXR* en tejidos esporofíticos, se clonó el cDNA completo de *ADXR* río abajo del promotor CaMV35S. Como se explicó anteriormente, este promotor es capaz de dirigir una expresión constitutiva en tejidos esporofíticos, aunque es muy poco eficaz para dirigir la expresión en tejidos gametofíticos (Desfeux et al., 2000). Teniendo en cuenta que se podría silenciar el transgen a través del sistema RDR6 (Luo & Chen, 2007), se generaron plantas transgénicas *35S:ADXR* transformando plantas *rdr6*. Se obtuvieron 5 líneas independientes, en las que se analizó el fenotipo esporofítico, así como también el nivel de expresión del gen *ADXR* mediante RT-qPCR.

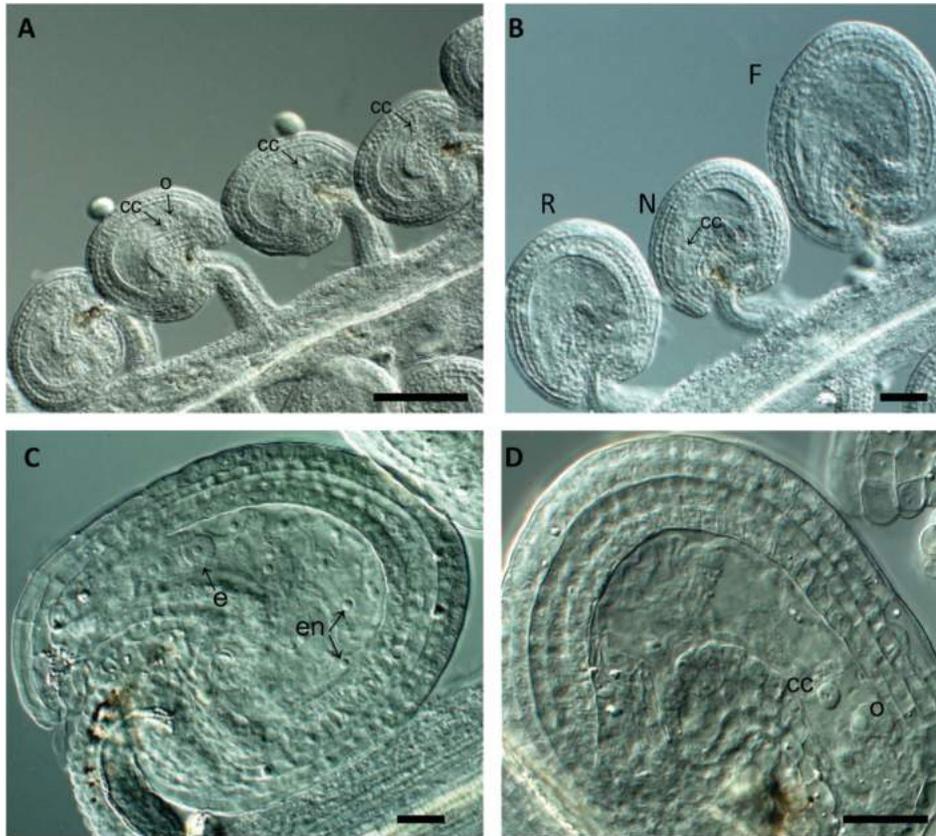
En todas las líneas transgénicas analizadas se pudo observar un tamaño de silicua menor al de plantas *rdr6* sin transformar. Dado que el crecimiento del fruto está en sincronía con el desarrollo de las semillas en su interior, se abrieron al menos 5 silicuas para cada línea y se realizó un recuento de abortos en las mismas (Figura 37A). Se observó un 22.8% de abortos en la línea 6, 54.9% en la línea 7 y un 56.8% en la línea 10. Todos éstos porcentajes resultaron estadísticamente diferentes al recuento de abortos en plantas *rdr6* (aprox. 3%). La línea 2 presentó un porcentaje de abortos similar al fenotipo WT (3.4%). Al analizar las flores al momento de ser polinizadas, se observó un desarrollo desincronizado entre los filamentos de las anteras y el pistilo, al menos claramente en las líneas 7 y 10 (Figura 37C-E). Por esta razón, los estigmas aparecen libres de polen al momento de la apertura de la flor, a diferencia de lo que ocurre en plantas *rdr6* (Figura 37G-H). A pesar de ello cerca de la mitad de los óvulos forman una semilla con morfología normal (Figura 37F).



**Figura 37. Análisis fenotípico de líneas independientes transformadas con la construcción 35S:ADX en plantas *rdr6*.** A, recuento de abortos en líneas transgénicas. Las líneas 6, 7 y 10 muestran una media de abortos significativamente mayor a la observada en plantas *rdr6* (no se muestra, 3%) (Test t;  $p < 0.05$ ). B-F, desarrollo vegetativo y floral en la línea 7. Se muestran fotos representativas. B, se observan las varas florales con silicuas anormalmente cortas. C-E, se observa la pérdida de sincronía en el desarrollo entre los estambres y el pistilo. E, estigma receptivo pero libre de polen. F, silicua abierta donde se observan semillas en desarrollo y abortos (puntas de flecha). G-H, desarrollo normal de una flor *rdr6*. Se puede observar una polinización completa al momento de la apertura de la flor. I, Comparación del largo máximo de silicuas obtenidas en una planta perteneciente a la línea 7 (izquierda) y a una planta *rdr6* (derecha).

Para conocer si los óvulos efectivamente son fertilizados y desarrollan un embrión normal, se analizaron pistilos de plantas 48 horas luego de ser polinizados por microscopía DIC. Para ello, se estudiaron pistilos provenientes de 3 líneas de plantas transgénicas 35S:ADX *rdr6* (T1). Como se detallará a continuación, para dos de las líneas analizadas (líneas 7 y 10) se observaron defectos en el saco embrionario. Este resultado fue sorprendente, ya que el promotor utilizado no es activo en gametofitos y sugiere que la expresión de ADXs y ADXR en tejidos esporofíticos del óvulo estaría afectando el desarrollo gametofítico.

En pistilos de la línea 6 los sacos embrionarios se desarrollan normalmente hasta el estadio FG7 (Figura 38A). A pesar de ello, algunos sacos embrionarios permanecen sin ser fecundados (18%, N=151), mientras que otros son fertilizados pero los embriones arrestan su desarrollo tempranamente (3.3%, N=151, Figura 38B).



**Figura 38. Óvulos correspondientes a la línea 6 transformada con la construcción *35S:ADXR*.** A, Los sacos embrionarios en estadio FG7 no muestran alteraciones morfológicas. B, Aproximadamente 48 hs luego de la polinización se observan 3 tipos de óvulos: Aquellos que resultan fertilizados y que presentan embrión y endosperma en desarrollo (F), aquellos que parecen ser fertilizados pero que muestran un retraso en el desarrollo embrionario (R) y no fertilizados (N). C, Detalle del saco embrionario fertilizado mostrado en B exhibiendo Desarrollo embrionario y de endosperma. D, Detalle de un saco embrionario sin fertilizar. cc: núcleo de la célula central. e: embrión. en: núcleos del endosperma. o: núcleo de la ovocélula. Barras: 40  $\mu$ m en A y B, 20  $\mu$ m en C y D.

Por otra parte en pistilos de la línea 7, un 48.6% (N=148) de los sacos embrionarios observados se detectaron arrestados en el estadio FG1 (Figura 39). Una proporción menor (4.7%, N=148) mostró un desarrollo normal del gametofito pero no presentó fertilización.



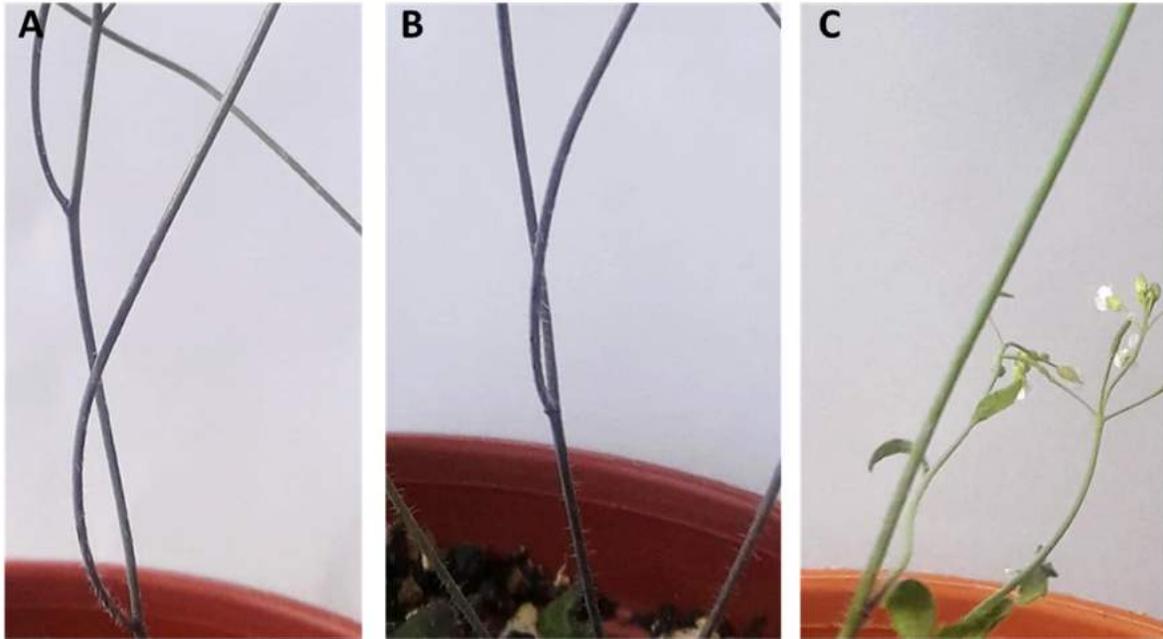
**Figura 39. Óvulos correspondientes a la línea 7 transformada con la construcción 35S:ADX.** A, Los sacos embrionarios en estadio FG7 muestran desarrollo normal de Integumentos pero una gran proporción de los sacos se encuentran arrestados (\*) B, Detalle de un óvulo mostrando arresto del desarrollo megagametofítico en FG1. C, Aproximadamente 48 hs luego de la polinización se observan algunos sacos fertilizados con desarrollo embrionario y de endosperma incipiente. D, Detalle de un saco embrionario arrestado, aun sin colapsar 48 h luego de la polinización. c: cigoto. en: núcleos del endosperma. M: núcleo de la megaspóra funcional. Barras: 40  $\mu$ m en A, B y D y 20  $\mu$ m en C.

En pistilos de la línea 10 se observó un fenotipo similar al detectado en la línea 7. En este caso, un 49.4% (N=162) de los sacos embrionarios observados estaban arrestados en el estadio FG1 (Figura 40) mientras que un 6.1% (N=162) mostró un desarrollo normal del gametofito pero no presentó fertilización.



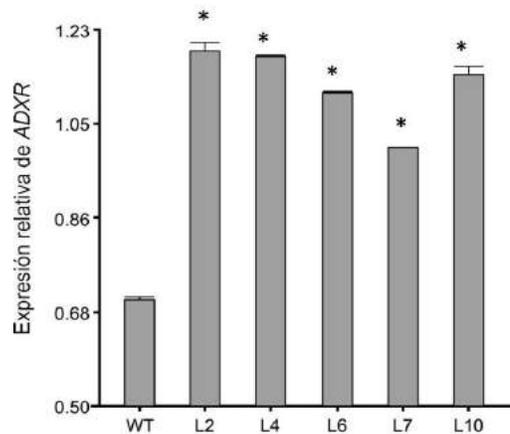
**Figura 40. Óvulos correspondientes a la línea 10 transformada con la construcción *35S:ADXR*** A, Mientras sacos embrionarios del mismo pistilo alcanzan el estadio FG7 (detalle en B), numerosos sacos embrionarios presentan arresto en estadio FG1 (\*, detalle en C). B, Ovulo presentando un saco embrionario maduro en FG7. C, Ovulo presentando un saco embrionario arrestado en FG1. D, Aproximadamente 48 hs luego de la polinización se observan 3 tipos de óvulos: Aquellos que resultan fertilizados y que presentan embrión y endosperma en desarrollo (F), aquellos que permanecen arrestados en estadio FG1 (\*, detalle en E) y aquellos que no son fertilizados (N, detalle en F). E, Detalle del saco embrionario arrestado en pistilos ya polinizados. F, Detalle de saco embrionario proveniente de un pistilo polinizado, sin fertilizar. Barras: 40  $\mu$ m en A y D, 20  $\mu$ m en B, C y E y F.

Por último, hacia el final de la floración se pudo observar una coloración violácea en los tallos de las plantas de todas las líneas transgénicas (Figura 41). Esto podría ser el resultado de una acumulación atípica de antocianinas.



**Figura 41. Coloración violácea observada en los tallos de plantas transgénicas *35S:ADXR*.** A, foto representativa del tallo de una planta correspondiente a la línea 7, B, foto representativa del tallo de una planta correspondiente a la línea 10; C, foto representativa del tallo de una planta *rdr6* crecida en la misma bandeja.

Para conocer si efectivamente las plantas transgénicas *35S:ADXR rdr6*, eran capaces de sobre-expresar *ADXR*, se realizaron RT-qPCRs a partir de hojas de roseta obtenidas de dichas plantas y de plantas WT. De esta forma fue posible observar un aumento de hasta 2 veces en la expresión de *ADXR* en todas las líneas analizadas (Figura 42).

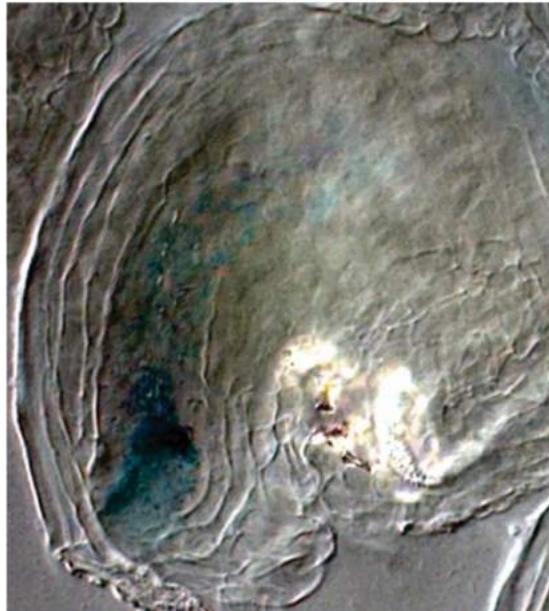


**Figura 42. Expresión del gen *ADXR* en plantas *35S:ADXR rdr6*.** La expresión se muestra en relación al gen *ACT11* (actina). Barras: error estándar.

Estos resultados indican que efectivamente la sobreexpresión de *ADXR* en el esporofito estaría provocando una serie de defectos en la planta, incluyendo no solamente una disminución en la elongación de filamentos, que explicaría la falta de fertilización observada, y acumulación de antocianinas, sino también defectos en el desarrollo del saco embrionario. Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de *ADXR* se dirigió exclusivamente a tejidos esporofíticos, este último fenotipo estaría indicando una fuerte influencia del tejido materno sobre el desarrollo del gametofito femenino.

# Discusión

## Capítulo II



***ADXR* se expresa tanto en tejidos gametofíticos como en tejidos esporofíticos**

La expresión de GUS detectada en plantas *pADXR:GUS* mostró que *ADXR* se expresaría tanto en gametofitos masculinos como femeninos.

En el caso particular del saco embrionario, la actividad del promotor se detectó fuertemente en la zona de la ovocélula, así como también en la célula central, en las proximidades del núcleo. Se ha observado que la correcta diferenciación de las células accesorias, así como también el normal funcionamiento de la célula central y el posterior desarrollo del endosperma, estarían regulados por la ovocélula (Völz et al., 2012). Aunque en las mutantes *adxr* y *adx* se detectaron fenotipos anormales en las células del micrópilo (Figuras 13 y 14), esto no afectó la especificación de las células del aparato de la ovocélula. Tanto la ovocélula como las sinérgidas se diferencian correctamente, aunque la posición de los núcleos es aberrante en algunas de ellas. Es posible que exista alguna función del sistema ADX-ADXR relacionada con la migración nuclear dentro de cada célula en los pasos finales de la diferenciación celular. Sin embargo, tal proceso no sería esencial para sus funciones como células gaméticas o accesorias, ya que los sacos embrionarios deficientes en el sistema ADX-ADXR son capaces de atraer tubos polínicos y ser fertilizados. La migración nuclear en plantas está fuertemente asociada a la dinámica del citoesqueleto (Kawashima et al., 2014), por lo que es posible que la ausencia de actividad ADX-ADXR afecte la organización del mismo. De acuerdo con esta idea y con la posibilidad de que el sistema ADX-ADXR esté vinculado a la síntesis de brassinosteroides, se ha descrito que en algodón, los niveles de brassinosteroides bioactivos estarían íntimamente relacionados con la organización del citoesqueleto (Yang et al., 2014).

Por otra parte, aunque se observa expresión en polen, ésta no resultaría esencial, ya que las mutantes estudiadas no presentan problemas del lado paterno.

**La alteración de la expresión de *ADXR* y *ADXs* en el esporofito produce alteraciones gametofíticas y esporofíticas.**

Como puede observarse en la Figura 33, los tejidos esporofíticos maternos del ovulo no presentan expresión de *ADXR*. Sin embargo, esta no sería la situación cuando la expresión de *ADXR* se encuentra dirigida por el promotor 35S, ya que numerosos estudios previos han demostrado que este promotor dirige la expresión a los integumentos del óvulo (Simon et al., 2012, Truernit & Haseloff, 2008). Esta expresión ectópica de *ADXR* demostró ser relevante para el desarrollo de los sacos embrionarios, que mostraron un arresto en el estadio FG1 (megaspora funcional, Figuras 39 y 40). El arresto del desarrollo del gametofito femenino como consecuencia de la expresión ectópica de diversos genes en los integumentos del óvulo ya ha sido descrita previamente y sugiere que existe una fuerte interconexión entre los tejidos esporofíticos y gametofíticos durante su desarrollo (Liu & Makaroff, 2015, Simon et al., 2012, Truernit & Haseloff, 2008). Además, las hormonas presentes en los integumentos del óvulo también afectan fuertemente el desarrollo del gametofito femenino. Las auxinas expresadas en los integumentos del óvulo son capaces de afectar el desarrollo y diferenciación del saco embrionario (Ceccato L et al., 2013, Pagnussat et al., 2009, Panoli et al., 2015). Una sobreexpresión de *ADXR* podría estar promoviendo la transferencia de electrones a su aceptor natural (un P450 por ejemplo), desencadenando la síntesis de esteroides, o hacia otro sustrato aceptor, promoviendo la síntesis de otro compuesto. Así, el incremento en *ADXR* resultaría en un aumento de brasinosteroides o de otro tipo de molécula resultante de la actividad reductora de *ADXR* en la mitocondria. En el caso que se produzcan brasinosteroides de forma ectópica en los tejidos esporofíticos del óvulo (que como se mostró en la figura 29 del capítulo 1, no serían una fuente importante de BRs), éstos estarían influyendo en el desarrollo del saco embrionario, promoviendo su arresto.

La expresión de *ADXR* en tejidos jóvenes y meristema apical sugiere que el sistema en estudio podría ser importante en la regulación del crecimiento. Esto ya ha sido demostrado para los

brassinosteroides, a través del estudio de diversas mutantes. Entre las mismas se encuentran *bri1* (*brassinosteroid insensitive 1*), *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) y *det2* (*de-etiolation 2*) que presentan diversos fenotipos asociados al crecimiento y desarrollo, incluido enanismo. Aunque aún resta conocer si efectivamente las plantas que llevan las construcciones que median el silenciado inducible tienen niveles de expresión de *ADXR* y *ADXs* menores que las plantas WT, se pudieron observar diferencias en la altura y el tamaño de las rosetas en plantas en las que se induciría el silenciamiento de los genes en estudio, lo que se correlaciona con las actividades de los brassinosteroides conocidas a la fecha (Figura 35).

Por otro lado la expresión ectópica de *ADXR* en plantas transgénicas *35S:ADXR* provocó una pérdida de coordinación en el desarrollo de estambres y pistilo, lo que condujo a una polinización deficiente (Figura 37). Como consecuencia, las silicuas en desarrollo mostraron un gran porcentaje de sacos embrionarios sin fertilizar (Figuras 38-40). En relación a este fenotipo, se ha reportado que la señalización por brassinosteroides es requerida para el crecimiento de los filamentos de las anteras (Xing et al., 2013, Kim et al., 2005). Sin embargo, los brassinosteroides no son las únicas hormonas que median este proceso. Se ha probado que otras hormonas, incluyendo auxinas, giberelinas, citoquinias y ácido jasmónico estarían también involucradas (Ye et al., 2010). La señalización mediada por BRs, durante el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, no depende únicamente del equilibrio entre su producción e inactivación sino también de la interacción de su vía de señalización con la de otras hormonas (Thornton et al., 2010, Ye et al., 2010). Por esta razón, una acumulación anormal de BRs en las estructuras florales de plantas sobre-expresantes *35S:ADXR* podría alterar la señalización mediada por todas las hormonas involucradas y producir el fenotipo observado.

Por otra parte, se pudo observar una coloración violácea en tallos de plantas transgénicas *35S:ADXR*, lo que podría estar vinculado a una sobreproducción de antocianinas. Las antocianinas son pigmentos bio-activos comúnmente presentes en las hojas, sintetizados a partir de la

fenilalanina en una vía de biosíntesis común con los flavonoides (Shi & Xie, 2014). Los aumentos en los niveles de antocianinas son una respuesta común y un importante mecanismo de supervivencia contra diversos estreses. Además, las antocianinas son capaces de proteger a las plantas contra una alta radiación solar y de secuestrar radicales libres producidos en la célula en condiciones de estrés (Shi & Xie, 2012). Recientemente las antocianinas han sido relacionadas con la fotomorfogénesis y la señalización hormonal. Se ha reportado que los BRs podrían afectar las vías de biosíntesis de antocianinas dependientes del jasmonato (JA) y de citoquininas (CK) (Peng et al., 2011) (Yuan et al., 2015). Por ejemplo, las mutantes *dwf4*, defectuosas en la biosíntesis de BRs, y *br1-4* deficientes en la señalización de BRs, sufren una disminución en la acumulación de antocianinas dependiente de citoquininas (Yuan et al., 2015). De esta manera, es posible que la sobre-expresión de *ADXR* en tallos de plantas *35S:ADXR*, produzca una acumulación de BRs y a su vez una sobreproducción de antocianinas.

En conjunto, estos resultados muestran que el sistema ADX-ADXR no estaría únicamente involucrado en el desarrollo del saco embrionario y en la embriogénesis temprana, sino que también estaría afectando diferentes aspectos del desarrollo esporofítico.

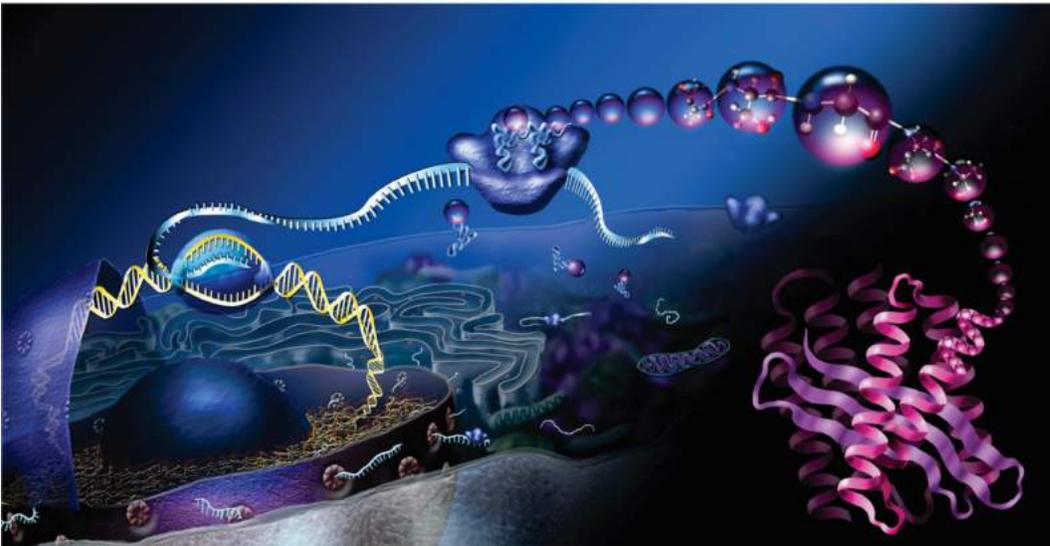
# Conclusiones



## Conclusiones

- El sistema mitocondrial ADX-ADXR de *A. Thaliana* es esencial para el desarrollo normal del gametofito femenino y para sostener el desarrollo temprano embrionario.
- La ADX1 puede interaccionar in vivo con al menos 4 citocromos P450 mitocondriales: CYP711A1, CYP90A1, CYP75B1 y CYP71B9.
- Se mostró por primera vez que existen esteroides específicamente dentro del saco embrionario, ya que el contenido de homocastasterona en óvulos provendría principalmente del gametofito femenino.
- La síntesis de homocastasterona a través del sistema ADXR-ADX en *A.thaliana* sería posible dado que todos los componentes necesarios se encuentran en la mitocondria.
- El sistema ADX-ADXR seria funcional en tejidos esporofíticos.
- La expresión ectópica de *ADXR* demostró ser relevante para el desarrollo de los sacos embrionarios que mostraron un arresto en el estadio FG1.
- La sobre-expresión de *ADXR* produciría una acumulación anormal de antocianinas en tallos *A. thaliana*.

# Materialles y Métodos



### **Líneas de plantas utilizadas y condiciones de crecimiento**

Todas las semillas utilizadas en este trabajo de Tesis fueron obtenidas del banco de semillas de la Universidad de Ohio Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), con excepción de aquellos stocks donados, que se detallan en forma específica. Las mutantes alélicas *adxr-1* y *adxr-2* corresponden a las líneas de inserción en ecotipo Columbia SALK\_035957 y SALK\_035966 respectivamente, y presentan inserción de T-DNA en el locus At4g32360. La mutante *adx1* corresponde a la línea SALK\_033579, con inserción del gen At4g05450, ecotipo Columbia, mientras que la mutante *adx2* corresponde a la línea SALK\_101583 del gen At4g21090, también ecotipo Columbia. Las líneas utilizadas para la marcación de los núcleos celulares dentro del saco embrionario fueron cedidas por la Dra. Rita Gross-Hardt, Universidad de Bremen, Alemania (ecotipo Landsberg erecta (Ler)). Para la marcación de las células antípodas se usó la línea *pAP::NLS\_GUS* (promotor de At1g36340). Para la marcación de las células sinérgidas se utilizó la línea *pCKx7::NLS\_GUS* (promotor de At5g21482). Para la marcación de la célula central se usó la línea *pMEA::NLS\_GUS* (promotor de At1g02580). Para la marcación de la ovocélula fue utilizada la línea *pEC1::NLS\_GUS* (promotor de At1g76750). Las líneas marcadoras de célula central *DD65::GFP* en eco-tipo Col-0, y la línea marcadora de sinérgidas *ET884::GUS*, también en ecotipo Columbia, fueron una donación del Dr. Ueli Grossniklaus, Universidad de Zurich, Suiza. La línea *spl* en ecotipo Ler fue una donación del Dr. Venkatesan Sundaresan, Universidad de California, Davis, EEUU.

El cultivo de plantas en suelo se llevó a cabo en mezcla de tierra (resaca de pino), vermiculita y perlita en proporción 3:1:1, y se proporcionó riego frecuente con agua de red. Previo al sembrado las semillas se estratificaron durante 72 horas a 4°C y oscuridad. Luego todas las plantas fueron crecidas en cuartos de cultivo bajo régimen de día largo, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 22°C y 60% de humedad ambiente. El cultivo en placa fue realizado en medio MS (Murashige and Skoog) marca Sigma, preparado con 9.4 gr por cada L de agua,

adicionado con agar al 1% p/v. Se usaron antibióticos para la selección de las plantas transgénicas (Higromicina B 15 µg/ml, o kanamicina 30 µg/ml y glufosinato de amonio 6 µg/ml). Las semillas sembradas en placa se esterilizaron previamente con etanol 70% por 5 minutos, luego con una solución compuesta por lavandina al 50% y SDS al 1% y posteriormente lavadas 5 veces con agua destilada estéril.

### **Bacterias**

Para clonar genes, promotores y secuencias silenciadoras se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* (cepa XLI Blue). Las bacterias fueron crecidas a 37°C en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (líquido o solidificado con agar 1% p/v), suplementado con antibióticos según la resistencia conferida por el vector utilizado para vehicular el transgen (Kanamicina 50µg/ml, spectinomomicina 100µg/ml, tetraciclina 2.5µg/ml). Para la transformación de plantas se utilizó la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) y el método de *floral dip* (Clough & Bent, 1998). Las bacterias fueron crecidas a 30°C en medio LB (líquido o solidificado con agar 1% p/v), suplementado con rifampicina (50µg/ml), gentamicina (25µg/ml) y antibióticos específicos para la selección de los plásmidos utilizados portadores del transgen (Kanamicina 50ug/ml, spectinomomicina 100ug/ml, tetraciclina 2.5ug/ml).

Las bacterias fueron transfectadas mediante shock térmico o electroporación usando plásmidos con tecnología Gateway™ (Invitrogen). Se utilizó el plásmido pMDC162 para el análisis de la expresión del gen *ADXR* y el plásmido pMDC107 para estudiar la localización de la proteína *ADXR* mediante la fusión *ADXR-GFP* (Curtis & Grossniklaus, 2003). Además para sobre-expresar *ADXR* se usó el plásmido p7WG2 (V032) (Karimi et al., 2002).

### **Extracción de DNA**

El DNA genómico se obtuvo a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* para su uso en reacciones de genotipificación o como templado para amplificar promotores. El método

consistió en desintegrar el tejido (2 hojas jóvenes) congelado en nitrógeno líquido utilizando un mortero, para luego homogeneizar en buffer de extracción (4 partes de buffer H (NaCl 0.1M, Sacarosa 0.2M, EDTA 0.01M, Tris-HCl 0.03M) y 1 parte de buffer L (EDTA 0.2M, SDS 2.5% p/v, Tris-HCl 0.5M pH 9.2) que fueron mezcladas inmediatamente antes de usar) y una incubación de 30 minutos a 65°C. Luego, se agregaron 133 µl de Acetato de potasio 3M pH 4.7 y se incubó 30 minutos en hielo. Luego se agregaron 200µl de cloroformo, se agitó por inversión y se centrifugó a 10000rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomó la fase superior en un tubo limpio y se le agregaron 700µl de etanol absoluto. Se volvió a centrifugar a 10000rpm por 10 minutos, se descartó el etanol y se lavó con 1000µl de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente y luego de descartar el etanol se dejó secar el tubo sobre papel absorbente. Finalmente, el precipitado de DNA se resuspendió en 30µl de agua destilada estéril.

### **Genotipificación**

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

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 0,2mM de nucleótidos, 2,5 µM de cada primer, 1X buffer de reacción (GoTaq, Promega), 1U de DNA Polimerasa (GoTaq, Promega) y 0.5 µl de solución de DNAg extraído en 10 µl de volumen final. El programa utilizado fue: 2 minutos a 94°C (desnaturalización inicial), 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos de estas reacciones se separaron y visualizaron en geles de agarosa (ver a continuación).

### **Electroforesis de ácidos nucleicos**

Tanto el DNA (productos de PCR o digestiones con enzimas de restricción) como el RNA (total, extraído) se separaron en geles de agarosa 1% o 1.5%, respectivamente, preparados en buffer TBE (TRIS-Ac.Bórico-EDTA) sometidos a diferencias de voltaje de 100V constantes. Los geles se prepararon conteniendo SYBR SAFE 1X (Invitrogen) para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos al exponer los geles a luz azul en un transiluminador.

### **Extracción de RNA**

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

Luego se cuantificó la concentración del RNA obtenido mediante absorbancia espectrofotométrica en longitud de onda 260nm y se calculó la relación de absorbancias 260/280nm. Se separó 1 $\mu$ g de RNA para determinar su calidad visualizando las subunidades de RNA ribosomal en geles de agarosa 1.5% p/v. Finalmente, se tomaron 10  $\mu$ g del RNA total y se llevó a cabo una digestión del DNA contaminante utilizando la enzima RQ1 DNase de Promega, según indicaciones del fabricante.

### **Síntesis de ADN copia**

Luego de la extracción de RNA y de la digestión del DNA contaminante, se sintetizó el DNA copia (cDNA) según el siguiente protocolo: 2µg de RNA total se mezclaron con 0.6 µg de hexanucleótidos de secuencia aleatoria (Biodynamics), se incubó durante 5 minutos a 70°C y luego 5 minutos en hielo. Luego se agregó la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA: transcriptasa reversa Im-Prom II (10 U, Promega), buffer de reacción (1X), dNTPs (0.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), inhibidor de RNAsas RNAsin (20 unidades, Promega). Se incubó a 25°C durante 5 minutos (de manera de permitir el apareamiento de los oligonucleótidos con el RNA), 1 hora a 42°C (reacción de retrotranscripción) y desnaturalización de las enzimas durante 15 minutos a 72°C. Luego de esta reacción, los productos fueron diluidos 10 veces en agua-DEPC estéril para su uso.

### **Análisis de expresión por PCR en tiempo real**

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

### **Predicción de p450s mitocondriales**

Para realizar las predicciones de localización subcelular, se utilizaron las secuencias aminoácidas de los P-450 codificados en el genoma de *A.thaliana* utilizando los predictores TargetP, Mitoprot 2, SubLoc, iPSORT, Predotar, MitoPred, WoLFPSORT, LOctree y los parámetros por default.

### **Alineamiento de secuencias proteínicas**

Se utilizó el programa Geneious para realizar las alineaciones. Las secuencias de las proteínas fueron extraídas de la base de datos [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y de [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) (The Arabidopsis information Resource-TAIR). ADXR y ADX de bovinos corresponden a P08165.3 y P00257.2, respectivamente.

### **Diseño de las secuencias silenciadoras**

Para el silenciamiento de los genes *ADX1* y *ADX2*, se utilizó un plásmido binario conteniendo un amiR obtenido en el Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (clon CSHL\_0129E3).

Para el silenciamiento inducible de *ADX1*, *ADX2* y *ADXR* se diseñaron un amiRs artificiales para hacer blanco en cada uno de los genes utilizando la herramienta *on line* del sitio WEB MICRORNA DESIGNER (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Los amiRNA fueron clonados en un vector que permite la expresión de los genes de manera inducible por etanol. El sistema inducible por etanol está conformado por tres componentes: el promotor del gen que codifica para el alcohol deshidrogenasa de *A. nidulans* (*alcA*), una proteína regulatoria (ALCR) y un tercer componente que se basa en la fusión de un promotor constitutivo al gen *alcR*. En presencia de etanol la ALCR se une a las secuencias dianas del promotor *alcA* y dirige la expresión del gen río abajo (Roslan et al., 2001). Para utilizar este sistema, los tres amiRNAs fueron clonados en tándem en el vector binario pSRN utilizando el sitio de restricción SpeI, río abajo del promotor *AlcA*.

### **Búsqueda de proteínas interactoras de ADX1 mediante experimentos de doble híbrido en levaduras**

Este estudio lo llevo adelante la empresa Hybrigenics Services S.A.S. (Paris, Francia). Para ello, el cDNA correspondiente a ADX1 sin su péptido señal (aa 1-260) fue amplificada por PCR y clonada en el vector pB66 como proteína de fusión al dominio Gal4 de unión a DNA en su N terminal y utilizado como carnada para tamizar una biblioteca normalizada de inflorescencia de Arabidopsis conteniendo 3.2 millones de clones independientes en el vector pGADT7-RecAB (Fromont-Racine et al., 1997). Para la construcción anzuelo Gal4 se tamizaron 35 millones de clones utilizando las cepas de levadura YHGX13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, mat $\alpha$ ) y L40 $\Delta$ Gal4 como se describió previamente (Fromont-Racine et al., 1997). Las colonias His<sup>+</sup> fueron seleccionadas en un medio sin triptofano ni leucina ni histidina. Los fragmentos correspondientes a los clones positivos fueron amplificados por PCR y secuenciados. Las secuencias resultantes fueron utilizadas para identificar las proteínas interactoras en la base de datos GenBank database (NCBI). (Formstecher et al., 2005).

#### **Diseción de pistilos y silicuas, análisis fenotípico de óvulos y obtención de imágenes**

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

La microscopía DIC o de Nomarsky se llevó a cabo en un microscopio Zeiss Axioplan Imager A2, acoplado a una cámara fotográfica digital AxioCam (la cual opera con el software Axiovision). Todas las muestras que se analizaron con este microscopio se clarearon previamente en solución de Hoyer's (Goma arábica 0.12 g/ml, hidrato de cloral 1.54 g/ml, glicerol 13% v/v), entre 12 y 24 hs.

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

### **Tinción de tubos polínicos**

Para la tinción de tubos polínicos los pistilos fueron polinizados manualmente, incubados con NaOH 5M a 65 °C por 5 min, lavados con agua corriente y tratados con solución de azul de anilina al 0.1% en buffer  $K_3PO_4$  0.1 M pH 8.3 por 3 horas. Luego de la incubación, los pistilos fueron lavados con agua corriente, montados en un portaobjeto con glicerol al 20% y presionados suavemente con un cubreobjetos. Los pistilos fueron luego observados utilizando microscopía confocal (Nikon Eclipse C1 Plus).

### **Detección de ROS**

Se utilizó la sonda  $H_2DCFDA$  (Molecular Probes) para detectar especies reactivas del oxígeno. Los pistilos se disectaron bajo lupa, se montaron en portaobjetos con buffer HEPES 20 mM pH 7.2 y  $H_2DCFDA$  10  $\mu M$  y se visualizó inmediatamente bajo microscopio confocal. La presencia de ROS se evidenció por la fluorescencia verde ( $\lambda$  excitación: 488nm).

### **Estimación del potencial de membrana mitocondrial**

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial en sacos embrionarios, se utilizó un protocolo puesto a punto en el laboratorio (Martin et al., 2014). Los pistilos fueron disectados realizando un corte superficial a ambos lados del septum y fueron sumergidos en 100  $\mu l$  de una solución conteniendo 10 $\mu g.ml^{-1}$  de la sonda JC-1 (Life Technologies, N° de catálogo

T3168) en buffer A (20mM HEPES ph 7.2) e incubados a T ambiente durante 30 minutos. Posteriormente los pistilos fueron lavados en 3 ocasiones con buffer A, montados y observados en microscopio confocal. Finalmente se analizaron las intensidades emitidas en verde ( $\lambda$  excitación/emisión= 485/538) y rojo ( $\lambda$  excitación/emisión= 485/590) y la proporción verde/rojo es calculada ( $\lambda$  488/566) utilizando el software NIH ImageJ, según lo detallado en (Martin et al., 2014).

### DetECCIÓN DE ESTEROIDES EN ÓVULOS

Para la extracción de óvulos se utilizó un equipo de vacío diseñado específicamente para tal función. Dicho equipo consta de una bomba de vacío unida por mangueras de 0.2mm de diámetro a un contenedor de óvulos, que consiste en un recipiente cilíndrico de acero inoxidable en el que se ajusta un tubo de 1.5 ml y que puede ser rellenado con hielo seco para permitir la congelación de la muestra en el momento de su recolección (Figura). Los óvulos succionados caen dentro del tubo de 1.5ml y luego son almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su liofilización. Las muestras liofilizadas fueron analizadas mediante cromatografía líquida de ultra performance seguida de espectrometría de masa en tándem. Este análisis fue realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Ondrej Novack, de la Universidad de Palacki, en Republica Checa.



**Colector de óvulos.** Los pistilos son fijados a un portaobjetos usando cinta adherente bifaz y disectados bajo la lupa. Los óvulos son succionados desde este arreglo utilizando el equipo de la figura.

### **Detección de actividad GUS**

Para estudiar la actividad GUS se tomaron diferentes tejidos de acuerdo a lo indicado y se los incubó a 37°C durante 2-20 horas de acuerdo al caso hasta detectar tinción, en una solución conteniendo buffer fosfato 100mM, EDTA 10mM,  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  5mM,  $K_3Fe(CN)_6$  5mM, Tritón X-100 0.1% v/v y X-GLUC 1mg/ml. Los tejidos verdes fueron incubados en concentraciones crecientes de etanol (20%-70%) hasta su clareado. Los óvulos fueron montados en portaobjetos con solución de Hoyer y luego de 15-20 horas, se observaron en microscopio DIC.

## Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5'→3'	Uso
ADX1 fw	GCCGTCTCTTTAACCTTATTCTTC	genotipado
ADX1 rv	CATTATAGACCACCCAATTTCTCAC	genotipado
ADX2 fw	GAGAACTCACGTTGCTGTTAACC	genotipado
ADX2 rv	AAATGCCTGAGTCTGTTGCTTAG	genotipado
ADXR fw	GCTTGCATATGGTGCTGAAA	genotipado
ADXR rv	CCCGTCTCCGATGAGATAC	genotipado
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTGGAAC	genotipado
ADX1 qPCR fw	TGATTGCTTACCGAGAGGAAA	RT-qPCR
ADX1 qPCR rv	ACAACAACGAGAAATGCCAAT	RT-qPCR
ADX2 qPCR fw	TCTCAGAGCAAATGATTTTTCG	RT-qPCR
ADX2 qPCR rv	CACAATAAAACAATGCTGCAAAA	RT-qPCR
ADXR qPCR fw	GGTTGGTAGCATAAGCGAGGA	RT-qPCR
ADXR qPCR rv	CCCACCCACTAAACTCCACCT	RT-qPCR
qACT2 Fw	GCCATCCAAGCTGTTCTCTC	RT-qPCR
qACT2 Rv	GAAACCCTCGTAGATTGGCA	RT-qPCR
UBQ5 qPCR Fw	AAGGTTTCAGCGTTTGAGGAAGG	RT-qPCR
UBQ5 qPCR Rv	TCTTCTGGTAAACGTAGGTGAGTC	RT-qPCR
M13 Fw (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	colonyPCR
M13 Rv	CAGGAAACAGCTATGAC	colonyPCR
cDNA pADXR fw	CACCCGCTACGATTCTTCTCTCATAAAGCCTC	clonado promotor ADXR
	C	
cDNA ATGADXR fw	CACCATGAGTAGATATCTAGCA	clonado cDNA ADXR
cDNA ADXR	CTAGTTGGCTGCTGCTGCTAATAGATCCTCC	clonado cDNA ADXR con

<b>cSTOP rv</b>			<b>STOP</b>
<b>cDNA</b>	<b>ADXR</b>	<b>GTTGGCTGCCGCTGCTAATAGATCCTCC</b>	<b>clonado cDNA ADXR sin</b>
<b>sSTOP rv</b>			<b>STOP</b>

# Referencias



- Acosta-Garcia G, Vielle Calzada JP, 2004. A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2614.
- Altmann T, 1999. Molecular physiology of brassinosteroids revealed by the analysis of mutants. *Planta* 208, 1-11.
- Andreuzza S, Li J, Guitton AE, et al., 2010. DNA LIGASE I exerts a maternal effect on seed development in Arabidopsis thaliana. *Development* 137, 73-81.
- Bakkes PJ, Biemann S, Bokel A, Eickholt M, Girhard M, Urlacher VB, 2015. Design and improvement of artificial redox modules by molecular fusion of flavodoxin and flavodoxin reductase from Escherichia coli. *Scientific Reports* 5, 12158.
- Baroux C, Pecinka A, Fuchs J, Schubert I, Grossniklaus U, 2007. The Triploid Endosperm Genome of Arabidopsis Adopts a Peculiar, Parental-Dosage-Dependent Chromatin Organization. *The Plant Cell* 19, 1782-94.
- Barupala DP, Dzul SP, Riggs-Gelasco PJ, Stemmler TL, 2016. Synthesis, Delivery and Regulation of Eukaryotic Heme and Fe-S Cluster Cofactors. *Arch Biochem Biophys* 592, 60-75.
- Beale KM, Leydon AR, Johnson MA, 2012. Gamete Fusion Is Required to Block Multiple Pollen Tubes from Entering an Arabidopsis Ovule. *Current Biology* 22, 1090-4.
- Berger F, Hamamura Y, Ingouff M, Higashiyama T, 2008. Double fertilization – caught in the act. *Trends in Plant Science* 13, 437-43.
- Boisson-Dernier A, Frietsch S, Kim TH, Dizon MB, Schroeder JI, 2008. The Peroxin loss-of-function mutation abstinence by mutual consent disrupts male-female gametophyte recognition. *Curr. Biol.* 18, 63.
- Cammack R, Rao KK, Hall DO, 1981. METALLOPROTEINS IN THE EVOLUTION OF PHOTOSYNTHESIS. *BioSystems* 14, 57-80.
- Capron A, Gourgues M, Neiva LS, Faure JF, Berger F, 2008. Maternal control of male-gamete delivery in Arabidopsis involves a putative GPI-anchored protein encoded by the LORELEI gene. *Plant Cell* 20, 3038.
- Catalano-Dupuy DL, Musumeci MA, Lopez-Rivero A, Ceccarelli EA, 2011. A highly stable plastidic-type ferredoxin-NADP(H) reductase in the pathogenic bacterium Leptospira interrogans. *PLoS ONE* 6, e26736.
- Ceccato L, Masiero S, Sinha Roy D, et al., 2013. Maternal Control of PIN1 Is Required for Female Gametophyte Development in Arabidopsis. *PLoS ONE* 8, e66148.
- Chaudhury AM, Ming L, Miller C, Craig S, Dennis ES, Peacock J, 1997. Fertilization-independent seed development in Arabidopsis thaliana

Chen Y-H, Li H-J, Shi D-Q, et al., 2007. The Central Cell Plays a Critical Role in Pollen Tube Guidance in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 3563-77.

Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, 2002. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* 110, 33.

Christensen CA, Gorsich SW, Brown RH, Jones LG, Brown J, 2002. Mitochondrial GFA2 is required for synergid cell death in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 2215.

Clough SJ, Bent AF, 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16, 735-43.

Clouse SD, 2002. Arabidopsis Mutants Reveal Multiple Roles for Sterols in Plant Development. *The Plant Cell* 14, 1995-2000.

Clouse SD, 2011. Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 9, e0151.

Clouse SD, Sasse JM, 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 49, 427-51.

Curtis MD, Grossniklaus U, 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133, 462-9.

Curtis MD, Grossniklaus U, 2008. Molecular control of autonomous embryo and endosperm development. *Sex Plant Reprod* 21, 79-88.

Demesa-Arévalo E, Vielle-Calzada JP, 2013. The Classical Arabinogalactan Protein AGP18 Mediates Megaspore Selection in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 1274-87.

Denninger P, Bleckmann A, Lausser A, et al., 2014. Male-female communication triggers calcium signatures during fertilization in Arabidopsis. *Nat Commun* 5, 4645.

D'ippolito S, Arias LA, Casalongue CA, Pagnussat GC, Fiol DF, 2017. The DC1-domain protein VACUOLELESS GAMETOPHYTES is essential for development of female and male gametophytes in Arabidopsis. *Plant J* 90, 261-75.

Dongun Kim J, Senn S, Harel A, Jelen BI, Falkowski PG, 2013. Discovering the electronic circuit diagram of life: structural relationships among transition metal binding sites in oxidoreductases. *Phil Trans R Soc B* 368.

Dresselhaus T, Coimbra S, 2016. Plant Reproduction: AMOR Enables Males to Respond to Female Signals. *Curr Biol* 26, R321-3.

Drews G, Koltunow A 2011. The female gametophyte. *Arabidopsis Book On-line* [URL Year/Electronic Resource Number].

- Escobar-Restrepo JM, Huck N, Kessler S, et al., 2007. The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. *Science* 317, 656.
- Ewen KM, Kleser M, Bernhardt R, 2011. Adrenodoxin: The archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814, 111-25.
- Formstecher E, Aresta S, Collura V, et al., 2005. Protein interaction mapping: a *Drosophila* case study. *Genome Res* 15, 376-84.
- Freeman MR, Dobritsa A, Gaines P, Segraves WA, Carlson JR, 1999. The dare gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*. *Development* 126, 4591-602.
- Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P, 1997. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16, 277-82.
- Gao QF, Gu LL, Wang HQ, et al., 2016. Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca<sup>2+</sup> channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 3096-101.
- Grinberg AV, Hannemann F, Schiffler B, Müller J, Heinemann U, Bernhardt R, 2000. Adrenodoxin: Structure, Stability, and Electron Transfer Properties. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 40, 590-612.
- Gross-Hardt R, Kagi C, Baumann N, Moore JM, Baskar R, 2007. LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5, 494.
- Grossniklaus U, Vielle-Calzada JP, Hoepfner MA, Gagliano WB, 1998. Maternal Control of Embryogenesis by MEDEA, a Polycomb Group Gene in *Arabidopsis*. *Science* 20, 446-50.
- Guitton AE, Berger F, 2005. Loss of Function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 Produces Nonviable Parthenogenetic Embryos in *Arabidopsis*. *Current Biology* 15, 750-4.
- Hamamura Y, Saito C, Awai C, et al., 2011. Live-Cell Imaging Reveals the Dynamics of Two Sperm Cells during Double Fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* 21, 497-502.
- Higashiyama T, Yabe S, Sasaki N, Nishimura Y, Miyagishima SY, 2001. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293, 1480.
- Hou Y, Guo X, Cyprys P, et al., 2016. Maternal ENODLs Are Required for Pollen Tube Reception in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 26, 2343-50.
- Huck N, Moore JM, Federer M, Grossniklaus U, 2003. The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception. *Development* 130, 2149.

- Joo SH, Jang MS, Kim MK, Lee JE, Kim SK, 2015. Biosynthetic relationship between C(2)(8)-brassinosteroids and C(2)(9)-brassinosteroids in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Phytochemistry* 111, 84-90.
- Kägi C, Baumann N, Nielsen N, Stierhof Y-D, Groß-Hardt R, 2010. The gametic central cell of *Arabidopsis* determines the lifespan of adjacent accessory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 22350-5.
- Kaji K, Kudo A, 2004. The mechanism of sperm–oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127, 423-9.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A, 2002. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7, 193-5.
- Kawashima T, Maruyama D, Shagirov M, et al., 2014. Dynamic F-actin movement is essential for fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Elife* 3.
- Kim T-W, Hwang J-Y, Kim Y-S, et al., 2005. *Arabidopsis* CYP85A2, a Cytochrome P450, Mediates the Baeyer-Villiger Oxidation of Castasterone to Brassinolide in Brassinosteroid Biosynthesis. *The Plant Cell* 17, 2397-412.
- Köhler C, Hennig L, Bouveret R, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Grissem W, 2003. *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *The EMBO Journal* 22, 4804-14.
- Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R, 1999. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *PNAS* 97, 1050-5.
- Leshem Y, Johnson C, Sundaresan V, 2013. Pollen tube entry into the synergid cell of *Arabidopsis* is observed at a site distinct from the filiform apparatus. *Plant Reprod* 26, 93-9.
- Li J, Biswas MG, Chao A, Russel DW, Chory J, 1997. Conservation of function between mammalian and plant steroid 5 $\alpha$ -reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3554-9.
- Li J, Brader G, Helenius E, Kariola T, Palva ET, 2012. Biotin deficiency causes spontaneous cell death and activation of defense signaling. *Plant J* 70, 315-26.
- Li J, Chory J, 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929-38.
- Li J, Saxena S, Pain D, Dancis A, 2001. Adrenodoxin Reductase Homolog (Arh1p) of Yeast Mitochondria Required for Iron Homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 1503-9.
- Lindemann P, Koch A, Degenhardt B, Hause G, Grimm B, Papadopoulos V, 2004. A Novel *Arabidopsis thaliana* Protein is a Functional Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor. *Plant and Cell Physiology* 45, 723-33.

- Lindner H, Kessler SA, Müller LM, Shimosato-Asano H, Boisson-Dernier A, Grossniklaus U, 2015. TURAN and EVAN Mediate Pollen Tube Reception in Arabidopsis Synergids through Protein Glycosylation. *PLoS Biology* 13.
- Liu D, Makaroff CA, 2015. Overexpression of a truncated CTF7 construct leads to pleiotropic defects in reproduction and vegetative growth in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 15, 74.
- Maheshwari P, 1950. *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York
- Martin MV, Fiol DF, Sundaresan V, Zabaleta EJ, Pagnussat GC, 2013. oiwa, a Female Gametophytic Mutant Impaired in a Mitochondrial Manganese-Superoxide Dismutase, Reveals Crucial Roles for Reactive Oxygen Species during Embryo Sac Development and Fertilization in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 1573-91.
- Martin MV, Fiol DF, Zabaleta EJ, Pagnussat GC, 2014. Arabidopsis thaliana Embryo Sac Mitochondrial Membrane Potential Stain . *Bio-protocol* 4, e1128.
- Márton ML, Cordts S, Broadhvest J, Dresselhaus T, 2005. Micropylar Pollen Tube Guidance by Egg Apparatus 1 of Maize. *Science* 37, 573-6.
- Maruyama D, Endo T, Nishikawa S, 2010. BiP-mediated polar nuclei fusion is essential for the regulation of endosperm nuclei proliferation in Arabidopsis thaliana. *PNAS* 107, 1684-9.
- Maruyama D, Völz R, Takeuchi H, et al., 2015. Rapid Elimination of the Persistent Synergid through a Cell Fusion Mechanism. *Cell* 161, 907-18.
- Maruyama M, Hamamura Y, Takeuchi H, 2013. Independent Control by Each Female Gamete Prevents the Attraction of Multiple Pollen Tubes. *Developmental Cell* 25, 317-23.
- Miller WL, 1988. *Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis*. *Endocrine Reviews* 9, 295-318.
- Miyazaki S, Murata T, Sakurai-Ozato N, Kubo M, Demura T, 2009. ANXUR1 and 2, sister genes to FERONIA/SIRENE, are male factors for coordinated fertilization. *Curr. Biol.* 19, 1327.
- Mizukami AG, Inatsugi R, Jiao J, et al., 2016. The AMOR Arabinogalactan Sugar Chain Induces Pollen-Tube Competency to Respond to Ovular Guidance. *Curr Biol* 26, 1091-7.
- Moll C, Von Lyncker L, Zimmermann S, Käßigi C, Baumann N, 2008. CLO/GFA1 and ATO are novel regulators of gametic cell fate in plants. *Plant J* 56, 913.
- Müller JJ, Müller A, Rottmann M, Bernhardt R, Heinemann U, 1999. Vertebrate-type and Plant-type Ferredoxins: Crystal Structure Comparison and Electron Transfer Pathway Modelling. *J. Mol. Biol.* 294, 501-13.
- Muralla R, Chen E, Sweeney C, et al., 2008. A Bifunctional Locus (BIO3-BIO1) Required for Biotin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 146, 60-73.

- Ngo QA, Moore JM, Baskar R, Grossniklaus U, Sundaresan V, 2007. Arabidopsis GLAUCE promotes fertilization-independent endosperm development and expression of paternally inherited alleles. *Development* 134, 4107.
- Ngo QA, Vogler H, Lituiev DS, Nestorova A, Grossniklaus U, 2014. A Calcium Dialog Mediated by the FERONIA Signal Transduction Pathway Controls Plant Sperm Delivery. *Developmental Cell* 29, 491-500.
- Nolan T, Chen J, Yin Y, 2017. Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses. *Biochemical Journal* 474, 2641.
- Nowack MK, Grini PE, Jakoby MJ, Lafos M, Koncz C, Schnittger A, 2006. A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nature Genetics* 38, 63-7.
- Ohad N, Margossian L, Hsu Y-C, Williams C, Reppetti P, Fisher RL, 1996. A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Plant Biology* 93, 5319-24.
- Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, et al., 2009. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* 458, 357-U122.
- Pagnussat GC, Alandete-Saez M, Bowman JL, Sundaresan V, 2009. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the Arabidopsis female gametophyte. *Science* 324, 1684.
- Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S, Mayalagu S, 2005. Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. *Development* 132, 603.
- Pagnussat GC, Yu HJ, Sundaresana V, 2007. Cell-fate switch of synergid to egg cell in Arabidopsis eostre mutant embryo sacs arises from misexpression of the BEL1-like homeodomain gene BLH1. *Plant Cell* 19, 3578-92.
- Palanivelu R, Tsukamoto T, Al E, 2010. A role for LORELEI, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in Arabidopsis thaliana double fertilization and early seed development. *The Plant Journal* 62, 571-88.
- Panoli A, Martin MV, Alandete-Saez M, et al., 2015. Auxin Import and Local Auxin Biosynthesis Are Required for Mitotic Divisions, Cell Expansion and Cell Specification during Female Gametophyte Development in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* 10, e0126164.
- Park SY, Jauh GY, Mollet JC, et al., 2000. A Lipid Transfer-like Protein Is Necessary for Lily Pollen Tube Adhesion to an in Vitro Stylar Matrix. *The Plant Cell* 12, 151-63.
- Patton DA, Schetter AL, Franzmann LH, Nelson K, Ward ER, Meinke DW, 1998. An Embryo-Defective Mutant of Arabidopsis Disrupted in the Final Step of Biotin Synthesis. *Plant Physiol* 116, 935-46.

- Peng Z, Han C, Yuan L, Zhang K, Huang H, Ren C, 2011. Brassinosteroid Enhances Jasmonate-Induced Anthocyanin Accumulation in Arabidopsis Seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology* 53, 632-40.
- Piccicocchi A, Douce R, Alban C, 2003. The Plant Biotin Synthase Reaction. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24966-75.
- Pierella Karlusich JJ, Lodeyro AF, Carrillo N, 2014. The long goodbye: the rise and fall of flavodoxin during plant evolution. *Journal of Experimental Botany* 65, 5161-78.
- Portereiko MF, Sandaklie-Nikolova L, Lloyd A, Dever CA, Otsuga D, 2006. NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 encodes the Arabidopsis RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. *Plant Physiol* 141, 975.
- Punwani JA, Rabiger DS, Drews GN, 2007. MYB98 positively regulates a battery of synergid-expressed genes encoding filiform apparatus-localized proteins. *Plant Cell* 19, 2557.
- Reyes JC, Grossniklaus U, 2003. Diverse functions of Polycomb group proteins during plant development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 14, 77-84.
- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW, 2001. Ecdysone Receptors and Their Biological Actions. *Vitamins and Hormones* 60, 1-72.
- Rotman N, Gourgues M, Guitton A-E, Faure J-E, Berger F, 2008. A Dialogue between the Sirene Pathway in Synergids and the Fertilization Independent Seed Pathway in the Central Cell Controls Male Gamete Release during Double Fertilization in Arabidopsis. *Molecular Plant* 1, 659-66.
- Sandaklie-Nikolova L, Palanivelu R, King EJ, Copenhaver GP, Drews GN, 2007. Synergid cell death in Arabidopsis is triggered following direct interaction with the pollen tube. *Plant Physiol* 144, 1753.
- Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber P, Chevalier D, Wisman E, 1999. Molecular analysis of NOZZLE, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11664.
- Schneider T, Dinkins R, Robinson K, Shellhammer J, Meinke D, 1989. An Embryo-Lethal Mutant of Arabidopsis thaliana Is a Biotin Auxotroph. *Developmental Biology* 131, 161-7.
- Schuler MA, Duan H, Bilgin M, Ali S, 2006. Arabidopsis cytochrome P450s through the looking glass: a window on plant biochemistry. *Phytochem Rev* 5, 205-37.
- Shi M-Z, Xie D-Y, 2012. Biosynthesis and Metabolic Engineering of Anthocyanins in Arabidopsis thaliana. *Recent Patents on Biotechnology* 8, 47-60.
- Shimizu KK, Okada K, 2000. Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in Arabidopsis pollen tube guidance. *Development* 127, 4511.

- Simon MK, Williams LA, Brady-Passerini K, Brown RH, Gasser CS, 2012. Positive- and negative-acting regulatory elements contribute to the tissue-specific expression of INNER NO OUTER, a YABBY-type transcription factor gene in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* 12, 214.
- Song X, Yuan L, Sundaresan V, 2014. Antipodal cells persist through fertilization in the female gametophyte of Arabidopsis. *Plant Reproduction* 27, 197-203.
- Sprunck S, Rademacher S, Vogler F, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Dresselhaus T, 2012. Egg Cell-Secreted EC1 Triggers Sperm Cell Activation During Double Fertilization. *Science* 338, 1093-7.
- Stryer L, 1988. *Biochemistry Freeman*, New York.
- Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, et al., 1996. Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, a Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-etiolation in Arabidopsis. *Cell* 85, 171-82.
- Takeuchi H, Higashiyama T, 2012. A species-specific cluster of defensin-like genes encodes diffusible pollen tube attractants in Arabidopsis. *PLoS Biol* 10, e1001449.
- Takeuchi H, Higashiyama T, 2016. Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in Arabidopsis. *Nature* 531, 245-8.
- Takubo K, Nonaka Y, Mizutani M, et al., 2003. Identification and molecular characterization of mitochondrial ferredoxins and ferredoxin reductase from Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 52, 817-30.
- Tang J, Han Z, Chai J, 2016. Q&A: what are brassinosteroids and how do they act in plants? *BMC Biol* 14, 113.
- Thornton LE, Rupasinghe SG, Peng H, Schuler MA, Neff MN, 2010. Arabidopsis CYP72C1 is an atypical cytochrome P450 that inactivates brassinosteroids. *Plant Molecular Biology* 74, 167-81.
- Truernit E, Haseloff J, 2008. Arabidopsis thaliana outer ovule integument morphogenesis: Ectopic expression of KNAT1 reveals a compensation mechanism. *BMC Plant Biology* 8, 35.
- Twell D, 2011. Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sex Plant Reprod* 24, 149-60.
- Völz R, Heydlauff J, Ripper D, Von Lyncker L, Gross-Hardt R, 2013. Ethylene Signaling Is Required for Synergid Degeneration and the Establishment of a Pollen Tube Block. *Developmental Cell* 25, 310-6.
- Völz R, Von Lyncker L, Baumann N, Dresselhaus T, Sprunck T, Gross-Hardt R, 2012. LACHESIS-dependent egg-cell signaling regulates the development of female gametophytic cells. *Development* 139, 498-502.
- Vriet C, Russinova E, Reuzeau C, 2013. From squalene to brassinolide: the steroid metabolic and signaling pathways across the plant kingdom. *Mol Plant* 6, 1738-57.

Wang T, Liang L, Xue Y, et al., 2016. A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature* 531, 241-4.

Wu J-J, Peng X-B, Li W-W, He R, Xin H-P, Sun M-X, 2012. Mitochondrial GCD1 Dysfunction Reveals Reciprocal Cell-to-Cell Signaling during the Maturation of Arabidopsis Female Gametes. *Developmental Cell* 23, 1043-58.

Xing S, Quodt V, Chandler J, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P, 2013. SPL8 Acts Together with the Brassinosteroid-Signaling Component BIM1 in Controlling Arabidopsis thaliana Male Fertility. *Plants* 2, 416-28.

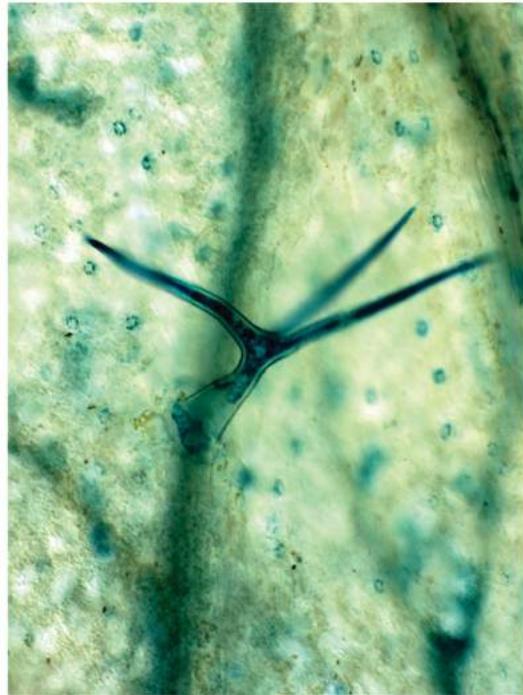
Yang WC, Ye D, Xu J, Sundaresan V, 1999. The SPOROCTELESS gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev.* 13, 2108.

Yang Z, Zhang C, Yang X, et al., 2014. PAG1, a cotton brassinosteroid catabolism gene, modulates fiber elongation. *New Phytol* 203, 437-48.

Ye Q, Zhu W, Li L, et al., 2010. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 6100-5.

Yuan LB, Peng ZH, Zhi TT, et al., 2015. Brassinosteroid enhances cytokinin-induced anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis seedlings. *BIOLOGIA PLANTARUM* 59, 99-105.

# Antecedentes



## Antecedentes

Este trabajo se realizó entre los años 2012 y 2017, a través de una beca doctoral del CONICET y financiamientos provenientes del HHMI (Howard Hughes Medical Institute) y del MinCyt a través de la ANPCyT.

Las tareas experimentales se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Biológicas (CONICET – Universidad Nacional de Mar del Plata).

Los resultados mostrados, junto con otros, se publicaron en revistas internacionales con referato y/o en congresos nacionales e internacionales como se detalla a continuación:

### 1. Publicaciones en revistas

1. **Bellido, Andrés\***, Distefano, Ayelen\*, Setzes, Nicolas; Noval, Ondrej; Fiol, Diego F., Zabaleta, Eduardo J. , Pagnussat, Gabriela Carolina. A mitochondrial ADX-ADXR-P450 shuttle is essential for reproduction in plants. Manuscrito en preparación.

2 . Ayelén Distéfano , María Victoria Martin, Juan Pablo Córdoba ; **Andrés Martín Bellido**; Sebastián D'Ippólito; Silvana Colman; Débora Soto; Juan Alfredo Roldan; Carlos Bartoli; Eduardo Zabaleta ; Diego Fernando Fiol; Brent R. Stockwell ; Scott j. Dixon ; Gabriela Carolina Pagnussat. **(2017)** Heat stress induces ferroptosis-like cell death in plants. **Journal of Cell Biology**; COVER ARTICLE. Feb;216(2):463-476.

2. Panoli, Aneesh, Martin, Maria Victoria, Alandete-Saez, Monica, Simon, Marissa, Neff, Christina, Swarup, Ranjan, **Bellido, Andrés**, Yuan, Li, Pagnussat, Gabriela C.\* Sundaresan, Venkatesan\* **(2015)**. Auxin import and local auxin biosynthesis are required for mitotic divisions, cell expansion

and cell specification during female gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS One** 13;10(5):e0126164

3. Martín, Maria V., Distefano, Ayelen; **Bellido, Andrés**, Cordoba, Juan Pablo, Soto, Débora, Pagnussat, Gabriela Carolina\*, Zabaleta, Eduardo\*. (2014). Role of mitochondria during female gametophyte development and fertilization in *A. thaliana*. **Mitochondrion**. pii: S1567-7249(14)00014-2. doi: 10.1016/j.mito.2014.01.005.

## 2. Trabajos presentados en congresos internacionales:

**Bellido Andrés M.**, Distéfano Ayelén M., Zabaleta Eduardo J., Pagnussat Gabriela C. “Mitochondrial ferredoxins are essential for gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*”. International Plant Molecular Biology Congress IPMB, October 25th to 30th, 2015. Iguazú Falls, Brazil.

Ayelen Distéfano, **Andrés Bellido**, Diego F. Fiol, Eduardo Zabaleta and Gabriela Pagnussat. “The mitochondrial electron shuttle ADXR-ADX is essential for gametophyte development in *Arabidopsis*”. 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology ICPMB. May 17th to 22th, 2015. Wrocław, Poland.

**Bellido A.** “The mitochondrial ferredoxin ADXR is crucial for normal development and fertilization of the female gametophyte in *Arabidopsis thaliana*”. 8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology ICPMB. May 12th to 16th, 2013. Rosario, Argentina.

## 3. Trabajos presentados en congresos nacionales:

**Andrés M. Bellido**, Ayelén M. Distéfano, Juan A. Roldan, Gabriela C. Pagnussat. Función de las adrenodoxinas mitocondriales durante el desarrollo gametofítico y esporofítico de *Arabidopsis thaliana*. III Taller de Biología Celular y del Desarrollo. 27 al 29 de Octubre de 2016. Chascomús.

**Bellido Andrés M.**, Distéfano Ayelén M., Roldan Juan R., Zabaleta Eduardo J., Pagnussat Gabriela C. Female gametogenesis requires mitochondrial ferredoxins in *Arabidopsis*. Reunion Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular. 3 al 6 de Noviembre de 2015. Mar del Plata.

**Bellido Andrés M.**, Distefano Ayelen M., Zabaleta Eduardo J., Pagnussat Gabriela C. The electron shuttle ADX-ADX<sub>R</sub> is essential for gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*. L Reunion Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular. 11-14 Noviembre 2014. Rosario.

**Bellido Andrés M.**, Distefano Ayelen M., Zabaleta Eduardo J., Pagnussat Gabriela C. Las ferredoxinas mitocondriales son esenciales durante el desarrollo del gametofito femenino y la fertilización en *Arabidopsis thaliana*. XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 21-24 Septiembre 2014. Mar del Plata.

Distéfano A., **Bellido A.**, Fiol D., Zabaleta E., Pagnussat G. El sistema de transporte de electrones adrenodoxina-adrenodoxina reductasa en *Arabidopsis thaliana*: Rol en la gametogénesis y fertilización. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 17-20 Septiembre 2012. Mar del Plata. Argentina.