Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Relevancia de la actividad y dosis génica de VAMP721/2 en condiciones de rápida expansión celular en *Arabidopsis thaliana*

Autora: Florencia Belén Catulo

Director: Martiniano María Ricardi

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET)

Febrero 2025

Tabla de contenido

1. Resumen en español ... 3

Relevancia de la actividad y dosis génica de VAMP721/2 en condiciones de rápida expansión celular en *Arabidopsis thaliana* ... 3

2. Resumen en inglés ... 5

Relevance of VAMP721/2 activity and gene dosage under conditions of rapid cell expansion in *Arabidopsis thaliana* ... 5

3. Introducción ... 7

3.a. *Arabidopsis thaliana* como sujeto experimental ... 7

3.b. Tráfico vesicular vegetal y VAMP721 ... 9

4. Objetivos e hipótesis ... 17

5. Materiales y Métodos ... 18

5.a. Material vegetal y condiciones de crecimiento ... 18

5.b. Ensayos de crecimiento en oscuridad ... 18

5. b.i. Efecto de la dosis génica en el crecimiento en oscuridad ... 19

5.b.ii. Efecto de mutaciones puntuales de la tirosina 57 de VAMP721 en el crecimiento en oscuridad ... 20

5.c. Obtención de datos y análisis computacional ... 21

5.c.i. Medición de hipocotilos utilizando ImageJ y obtención de la tasa máxima de elongación ... 21

5.c.ii. Análisis estadístico utilizando GraphPad Prism ... 21

5.d. Genotipados ... 21

5.d.i. Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* ... 23

5.d.ii. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ... 23

5.d.iii. Electroforesis en gel de agarosa ... 24

5.e. Pruebas de germinación ... 24

5.f. Clonado para edición génica inducible de VAMP721-GFP mediante CRISPR/Cas9 ... 26

5.f.i. Clonado LR Gateway ... 26

5.f.ii. Clonado por Gibson Assembly ... 29

5.f.iii. Transformación génica de *Escherichia coli* y purificación de ADN plasmídico ... 33

5.f.iv. Transformación génica de *Agrobacterium tumefaciens* ... 34

5.f.v. Floral dipping de *Arabidopsis thaliana* ... 35

5.f.vi. *Screening* de semillas transgénicas ... 35

6. Resultados ... 37

6.a. Efecto de la dosis génica de VAMP721 en elongación de hipocotilo ... 37

6.b. Efecto de la mutación puntual de la tirosina 57 de VAMP721 ... 41

6.b.i. Ensayos de germinación ... 42

6.b.ii. Elongación de hipocotilo ... 43

6.c. Clonado para edición génica inducible de VAMP721-GFP mediante CRISPR/Cas9 ... 45

7. Discusión y conclusiones ... 54

7.a. Efecto de la dosis génica de VAMP721 ... 54

7.b. Efecto de la mutación puntual de la tirosina 57 de VAMP721 ... 56

7.c. Conclusiones y perspectivas ... 58

8. Referencias bibliográficas ... 60

Abreviaturas

A*. *thaliana: *Arabidopsis thaliana.*

A. tumefaciens*: Agrobacterium tumefaciens.*

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

C-: Control negativo.

C+: Control positivo.

Col-0: Ecotipo Columbia-0.

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio.

E. coli: *Escherichia coli.*

GA: Gibson Assembly.

GFP: Proteína fluorescente verde.

hpe: Horas post estimulación.

LB: Borde izquierdo (left border) o medio Luria-Bertani para bacterias

LD: Dominio longina.

MS: Medio Murashige-Skoog para plantas.

MTCs: Multi-subunit tethering complexes.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

pEC: Promotor de célula huevo (egg-cell promoter).

pLex: Promotor inducible por la unión de la proteína XVE

pOLE: Promotor de semilla (seed promoter).

RB: Borde derecho (right border).

RD: Dominio R-SNARE.

SNARE: Proteínas solubles de unión al factor sensible a la N-etilmaleimida (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors).

t-SNARES: SNARE localizadas en la membrana destino.

UTR: región no traducida

VAMP: Proteína de membrana asociada a vesículas.

v-SNARES: SNARE localizadas en la membrana vesicular.

WT: Tipo salvaje (wild-type)

XVE: Factor de transcripción quimérico activable con estradiol con dominio de unión al promotor pLex.

1. Resumen en español

Relevancia de la actividad y dosis génica de VAMP721/2 en condiciones de rápida expansión celular en *Arabidopsis thaliana*

El crecimiento y desarrollo vegetal implica división, expansión y diferenciación celular a lo largo de toda la vida del individuo con un gran impacto de factores ambientales bióticos y abióticos. VAMP721 es una proteína R-SNARE indispensable para el último paso de la fusión de vesículas que impulsa la expansión y división celular. Si bien la pérdida de VAMP721 o VAMP722 no conduce a un fenotipo aparente en *Arabidopsis thaliana*, el genotipo mutante doble *VAMP721 -/- VAMP722 -/-* muestra defectos severos de citocinesis en plántulas. Estos defectos, interfieren con el progreso de las plántulas más allá del estadio de germinación al punto de provocar su muerte. Dada esta letalidad no se han podido describir fenotipos en plantas adultas carentes de VAMP721/2. En el marco de esta tesis nos propusimos obtener mutantes condicionales para poder inducir la mutación en el momento deseado y así poder identificar en un futuro trabajo los fenotipos de la falta de VAMP721/722 en los distintos tejidos de plantas adultas. Por otra parte, los mutantes *VAMP721 +/- VAMP722 -/-* y *VAMP721 -/- VAMP722 +/-* muestran una apariencia de tipo salvaje en condiciones normales de crecimiento, pero son haploinsuficientes en respuestas a estreses bióticos y abióticos. En base a este antecedente nos preguntamos si la dosis génica de VAMP721/2 afecta el desarrollo en oscuridad de las plantas, proceso que depende de una alta tasa de elongación celular. Nuestros resultados demostraron que una menor dosis génica alteró la elongación de los hipocotilos durante el crecimiento en oscuridad (skotomorfogénesis). La menor tasa de elongación de los hipocotilos responde a una menor elongación a nivel celular al poseer estos un número fijo de células y sugiere que en condiciones de alta exigencia la dosis génica de VAMP721/2 puede ser un factor limitante. Por otro lado, la actividad fusogénica de VAMP721/2 depende de su capacidad para interactuar con Q-SNAREs en la formación de complejos fusogénicos. VAMP721/2 posee un mecanismo de autoinhibición por el repliegue de su dominio longina N-terminal el cual bloquea su interacción con otros SNAREs. El grado de autoinhibición es regulado por la fosforilación del residuo Y57 en el dominio longina. Dados estos antecedentes, nos preguntamos si la regulación de la actividad de VAMP721 a nivel de este residuo también podría ser importante en el crecimiento de los hipocotilos. Utilizando diferentes mutantes de este residuo hemos observado que la falta de fosforilación impide la correcta elongación de los hipocotilos, reflejándose en una menor velocidad de elongación de los mismos. Finalmente, nuestras pruebas de germinación revelaron que la germinación no se ve afectada en las plantas que cuentan con la proteína modificada. Nuestros resultados muestran, en líneas generales, que tanto la dosis génica como la activación de VAMP721/2 por fosforilación son factores importantes para la elongación del hipocotilo.

2. Resumen en inglés

Relevance of VAMP721/2 activity and gene dosage under conditions of rapid cell expansion in *Arabidopsis thaliana*

Plant growth and development involves cell division, expansion and differentiation throughout an individual's life with a large impact of biotic and abiotic environmental factors. VAMP721 is an R-SNARE protein indispensable for the final step of vesicle fusion that drives cell expansion and division. While loss of VAMP721 or VAMP722 does not lead to an apparent phenotype in *Arabidopsis thaliana*, the *VAMP721 -/- VAMP722 -/-* double mutant genotype shows severe cytokinesis defects in seedlings. These defects interfere with seedling progress beyond the germination stage to the point of death. Given this lethality, it has not been possible to describe phenotypes in adult plants lacking VAMP721/2. In the framework of this thesis we set out to obtain conditional mutants in order to induce the mutation at the desired time and thus be able to identify in future work the phenotypes of the lack of VAMP721/722 in different tissues of adult plants. On the other hand, *VAMP721 +/- VAMP722 -/-* and *VAMP721 -/- VAMP722 +/-* mutants show a wild-type appearance under normal growth conditions, but are haploinsufficient in responses to biotic and abiotic stresses. Based on this background, we asked whether the gene dose of VAMP721/2 affects the dark development of plants, a process that depends on a high rate of cell elongation. Our results showed that a lower gene dose altered hypocotyl elongation during dark growth (skotomorphogenesis). The lower elongation rate of hypocotyls responds to lower elongation at the cellular level as they possess a fixed number of cells and suggests that under conditions of high demand the gene dose of VAMP721/2 may be a limiting factor. On the other hand, the fusogenic activity of VAMP721/2 depends on its ability to interact with Q-SNAREs in the formation of fusogenic complexes. VAMP721/2 possesses an autoinhibition mechanism by the folding of its N-terminal longin domain which blocks its interaction with other SNAREs. The degree of autoinhibition is regulated by phosphorylation of the Y57 residue in the longin domain. Given this background, we wondered whether the regulation of VAMP721 activity at this residue might also be important in hypocotyl growth. Using different mutants of this residue, we have observed that the lack of phosphorylation prevents the correct elongation of the hypocotyls, which is reflected in a lower elongation speed of the hypocotyls. Finally, our germination tests revealed that germination speed is not affected in plants with the modified protein. Overall, our results show that both gene dosage and activation of VAMP721/2 by phosphorylation are important factors for hypocotyl elongation.

3. Introducción

3.a. *Arabidopsis thaliana* como sujeto experimental

La planta *Arabidopsis thaliana* es ampliamente utilizada como modelo para estudios de biología molecular en plantas por múltiples características que la hacen un organismo idóneo. Por un lado, se puede mencionar su ciclo de vida que es particularmente corto en comparación a otros organismos del mismo reino, con los que comparte una gran proporción de procesos fisiológicos y moleculares que hacen posible la extrapolación de los resultados a otras especies, e incluso a organismos de otros géneros. Además, su información genética está ordenada en un genoma corto y diploide, lo cual facilita su manipulación genética en laboratorio y contrasta con los dificultosos estudios en especies de plantas poliploides. Se caracteriza por producir una gran cantidad de semillas a la vez que tiene muy bajos requerimientos de luz, agua y nutrientes, de manera que es una planta de muy fácil cultivo (Provart, 2016). Por último, en particular para el presente trabajo, resultan de suma importancia el profundo estudio de esta especie y la experiencia del grupo de trabajo en cuanto a protocolos experimentales realizados con esta planta en particular.

Al inicio de su corto ciclo de vida **(Fig.1)**, durante la germinación, las plántulas de *A. thaliana* desarrollan una radícula que es el primer órgano en emerger a través de la caliptra, estructura que recubre la semilla. Bajo condiciones de luz suficientes, la planta inicia el proceso de fotomorfogénesis, que es el programa de crecimiento promovido por la luz. Este proceso se caracteriza por la formación de un hipocotilo corto, la pronta apertura del gancho apical, la expansión y diferenciación de los cotiledones (las primeras hojas embrionarias), el desarrollo de plástidos que se diferencian en cloroplastos funcionales para la fotosíntesis, y la producción de clorofilas a y b. Al contrario, cuando la planta crece en ausencia de luz, se activa la skotomorfogénesis (o crecimiento etiolado), cuyos principales síntomas incluyen la falta de enverdecimiento, cotiledones pequeños, elongación del hipocotilo y la persistencia del gancho apical **(Fig. 2)** (Taiz, 2018).

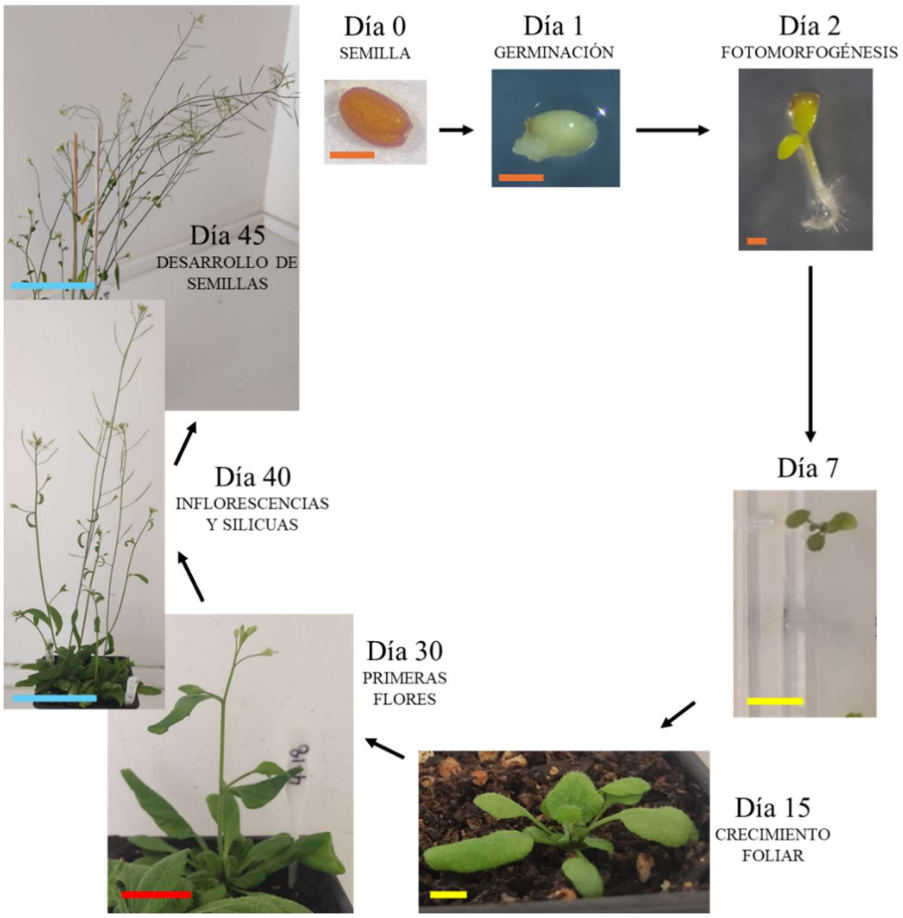

Figura 1 - Ciclo de vida de *A. thaliana*. Adaptado de Boyes et al. (2001) Barras de escala; naranja = 0,5 mm, amarilla = 1 cm, rojo = 2 cm, celeste = 5 cm.

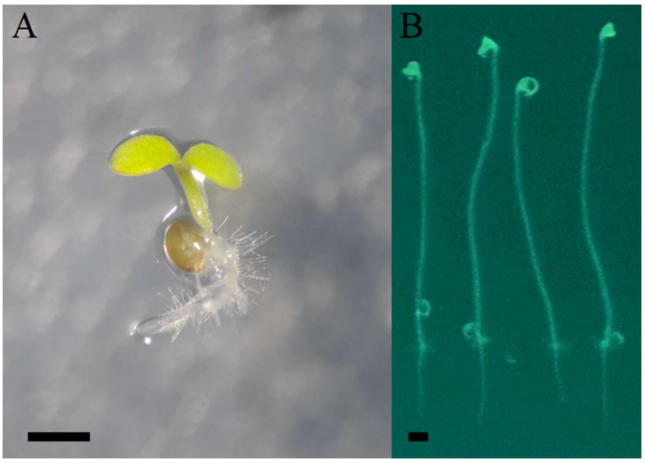

Figura 2 – Fenotipos de crecimiento de las plántulas de *A. thaliana* según la disponibilidad de luz. (A) Fotomorfogénesis, en presencia de luz. **(B)** Skotomorfogénesis, en ausencia de luz o crecimiento etiolado. Barra de escala = 1 mm.

El crecimiento etiolado cumple una importante función de supervivencia en las plántulas, ya que se desencadena cuando la semilla germina bajo tierra o cuando la luz es escasa. Este programa de crecimiento es esencial para la supervivencia tras la germinación porque permite que la plántula elongue el hipocotilo, lo que facilita la elevación de los cotiledones hacia la superficie. Además, la persistencia del gancho apical permite que los cotiledones atraviesen la matriz del suelo, manteniéndose protegidos durante su ascenso.

Unos 7 días luego de la germinación, la planta desarrolla las primeras hojas verdaderas y aproximadamente a los 30 días los primeros ciclos florales. El ciclo de vida de *A. thaliana* se completa en aproximadamente 45 días con la maduración de las silicuas y el desarrollo de las semillas.

En *A. thaliana* se han caracterizado diversos ecotipos, los cuales hacen referencia a variantes de una misma especie que han desarrollado adaptaciones específicas a distintos ambientes. Entre estos ecotipos se encuentra Columbia-0 (Col-0), que es el utilizado en este trabajo. Este ecotipo presenta la capacidad de producción continua de semillas durante varios meses, lo que permite que la planta se mantenga activa hasta su muerte.

3.b. Tráfico vesicular vegetal y VAMP721

El transporte vesicular es un proceso fundamental que permite la comunicación y el intercambio de materiales entre diferentes compartimentos y el exterior de las células. La regulación de este proceso impacta en el tráfico intracelular de proteínas, lípidos y otros componentes esenciales tanto para el funcionamiento celular como para la expansión y división de células vegetales. En el caso de la citocinesis o división celular, el material recientemente sintetizado debe dirigirse hacia el fragmoplasto para formar la placa celular. En cambio, en el caso de la secreción general, las vesículas deben dirigirse a la membrana plasmática y, tras la fusión de membranas, liberar su carga en el espacio extracelular, también conocido como apoplasto. (More et al., 2020) La formación, tráfico y fusión de las vesículas que transportan moléculas específicas desde una membrana a otra requiere la acción concertada de una gran variedad de proteínas. La fusión vesicular inicia con el anclaje o *tethering.* **(Fig. 3)** Para este paso inicial se requiere de factores de *tethering,* complejos proteicos también llamados *multi-subunit tethering complexes* (MTCs) que actúan a modo de "caña de pescar" para acercar las vesículas a la membrana

de su compartimiento *target*. Una vez que las membranas se encuentran lo suficientemente cercanas entre sí, pueden reconocerse las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) presentes en ambas membranas. Cuando estas proteínas se reconocen ocurre el *docking* o atraque. Los dominios Q y R de los SNAREs que intervienen se entrelazan como un cierre (*zippering*) y esto induce la fusión de las membranas, permitiendo la liberación del contenido de la vesícula en el compartimiento celular.

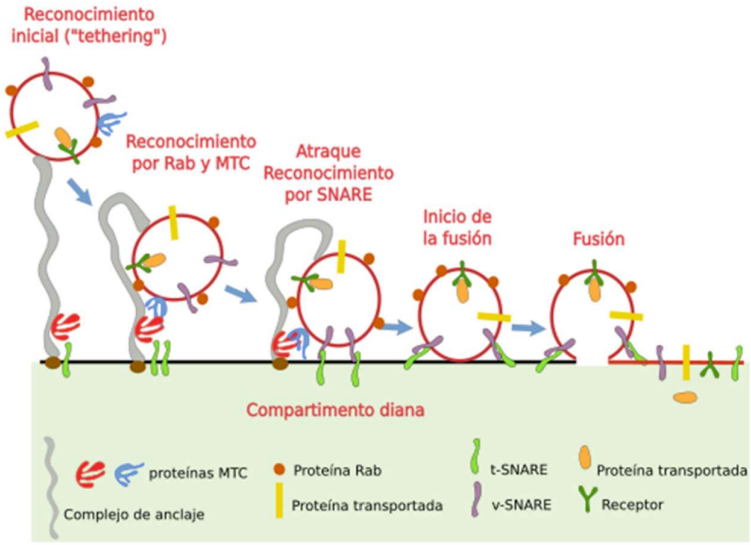

Figura 3 - Pasos de la fusión de membranas mediada por la v-SNARE VAMP721/2. (Megías et al., 2023)

La función central de las SNAREs hace que estas proteínas sean vitales para una serie de procesos celulares y fisiológicos en plantas que dependen del tráfico secretor, como la citocinesis (El Kasmi et al., 2023; Jürgens, 2005), la defensa contra patógenos (Lipka et al., 2007; Kwon et al., 2008) y el crecimiento polarizado (Enami et al., 2009; Ichikawa et al., 2014; Slane et al., 2017). Dependiendo de un residuo glutamina o arginina conservado dentro del dominio SNARE, se dividen en Q- y R-SNARE, respectivamente (Fasshauer et al., 1998). Estas proteínas también pueden ser categorizadas según su ubicación, si están incluidas en la membrana de vesículas de secreción se las denomina v-SNARES o, si están en la membrana destino o *target*, t-SNARES. La fusión de membranas requiere el ensamblaje de un complejo trans-SNARE que contiene un dominio R-SNARE en la membrana vesicular y tres dominios Q-SNARE (Qa,b,c) en la membrana destino.

La familia R-SNARE por Vesicle Associated Membrane-Proteins 7 (VAMP7) está compuesta, en *Arabidopsis thaliana*, por dos subconjuntos. Cuatro genes VAMP71 y ocho genes VAMP72. **(Fig. 4)** La mayoría de ellos comparten una estructura común compuesta por un dominio Longina N-terminal (LD) seguido por el dominio R-SNARE (RD), que finaliza con un dominio C-terminal anclado a membrana. VAMP721 y su homólogo más cercano, VAMP722, son fuerte y ubicuamente expresados en todas las etapas de desarrollo y tejidos de *A. thaliana* (Lipka et al., 2007; Uemura et al., 2019). Ambas proteínas están principalmente localizadas en vesículas y forman diferentes complejos con sus socios Q-SNARE afines, los Qa-SNARE SYP121/PEN1 en secreción general (Kwon et al., 2008) o SYP111/KNOLLE (Qa), NPSN11 (Qb), SYP71 (Qc) y SNAP33 (Qbc) durante la citocinesis (El Kasmi et al., 2023).

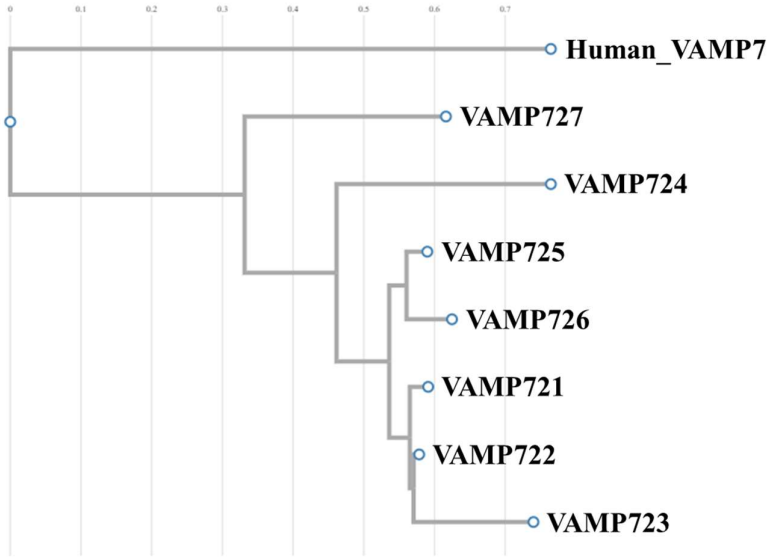

Figura 4 – Árbol filogenético de las proteínas de la familia VAMP72. Se incluye la proteína VAMP7 de humanos. El alineamiento y la reconstrucción filogenética se realizaron usando la herramienta GenomeNet (https://www.genome.jp/tools/ete/).

Si bien la pérdida de VAMP721 o VAMP722 no conduce a un fenotipo aparente en *A. thaliana*, el genotipo mutante doble *VAMP721-/- VAMP722-/-* es letal y su deleción muestra defectos severos de citocinesis en plántulas (El Kasmi et al., 2013; Zhang et al., 2011). Los mutantes 'homo-heterocigotos' *VAMP721+/- VAMP722-/-* y *VAMP721-/- VAMP722+/-* muestran una apariencia de tipo salvaje en condiciones normales de crecimiento, pero son haploinsuficientes en respuestas a estreses bióticos y abióticos (Kwon et al., 2008; Yi et al., 2013).

Análisis estructurales del VAMP7 de mamíferos, ortólogo de VAMP721 en plantas, revelaron que el RD determina la interacción con los socios de Q-SNARE, mientras que el LD tiene efectos reguladores que determinan la localización subcelular a través de interacciones adicionales con otras proteínas (Martinez-Arca et al., 2003). VAMP7 tiene dos configuraciones principales: un estado "cerrado" (conformación fusogénicamente inactiva) con el LD plegado hacia el RD **(Fig. 5),** o "abierto", con el RD disponible para interactuar con los socios de Q-SNARE. Ensayos *in vitro* mostraron que la autoinhibición de VAMP7 (que ocurre en estado cerrado) no es completa, ya que la proteína puede formar espontáneamente complejos SNARE *in vitro*. Esta capacidad aumenta cuando la proteína se ve privada de su LD, lo que respalda la importancia de esta última para la regulación espacio-temporal de la fusión de vesículas (Martinez-Arca et al., 2003). En VAMP7 la fosforilación del residuo tirosina 45 (homóloga a tirosina 57 en VAMP721/2 en *A. thaliana*) favorece el estado abierto de la proteína y aumenta su actividad. (Burgo et al., 2013)

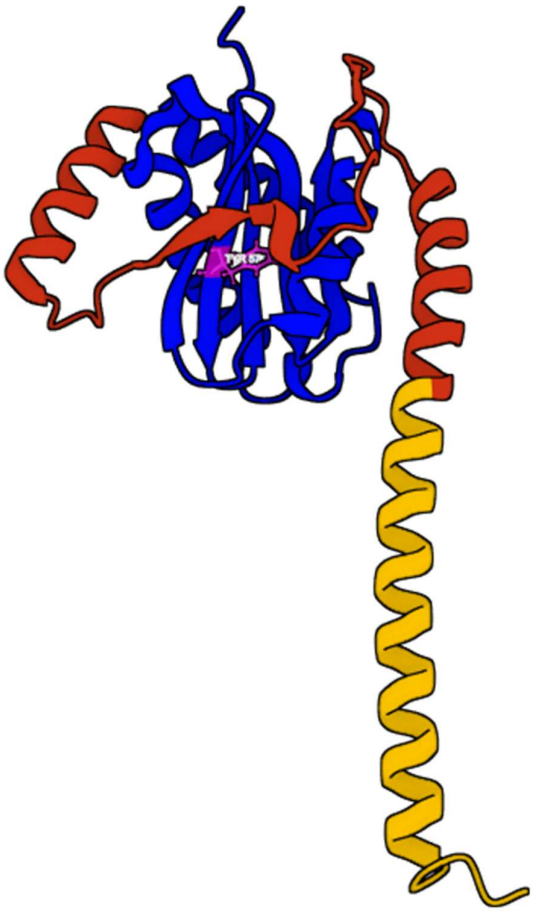

Figura 5 – Esquema de VAMP721 en su estado cerrado. En amarillo se distingue el dominio transmembrana, en azul el dominio longina y en rojo el dominio R-SNARE visualizados como *cartoon* para distinguir hélices alfa y laminas plegadas beta. En fucsia se distingue la tirosina en la posición 57 "TYR 57" en un modelo de barras y esferas. Simulación realizada con AlphaFold2 (Jumper et al., 2021)

La tirosina (Y) es un aminoácido cuya cadena lateral es un grupo p-hidroxibenzólico que consiste en un anillo aromático y un grupo hidroxilo fosforilable que le confiere cierta polaridad, aunque se lo clasifica como un aminoácido no polar. En el caso de la tirosina 57 de VAMP721, el anillo aromático le permite estabilizar la estructura tridimensional de la lámina beta en la que está inmersa, mediante el alineamiento de su nube electrónica con las de otros residuos aromáticos cercanos. Estas uniones hidrofóbicas que favorecen el estado cerrado de la proteína se ven impedidas por

la fosforilación de la tirosina, que le confiere carga y disminuye de gran manera su hidrofobicidad. En resumen, cuando este residuo se fosforila disminuye la hidrofobicidad de la región y se ve favorecido el estado abierto de la proteína, facilitando su unión a otras proteínas SNARE y, por ende, su actividad fusogénica.

La fusión de membranas mediada por VAMP721 consta de varios pasos secuenciales. **(Fig. 6, A)** Inicialmente, la vesícula que contiene VAMP721 localiza su membrana destino (en este caso, otra vesícula durante la fusión homotípica) con la ayuda de factores de *tethering*. Una vez que ambas membranas están unidas, una parte de las moléculas de VAMP721 puede abrirse espontáneamente. La fosforilación posterior impide que VAMP721 se cierre, desplazando el equilibrio hacia moléculas de VAMP721 abiertas y listas para interactuar con sus socios Q-SNARE. El ensamblaje correcto de los complejos TRANS paralelos impulsa la fusión de membranas, quedando ahora todos los SNAREs en disposición CIS (es decir, todos en la misma membrana y por ende no fusogénicos). Los complejos son luego desensamblados (con gasto de ATP) por un complejo de chaperonas NSF/αSNAP para su reutilización. En este punto, la fosforilación se debe eliminar rápidamente para evitar el reensamblaje de los complejos CIS dada la cercanía que tienen las proteínas recién desensambladas. Ahora, VAMP721 puede reciclarse para participar en otra ronda de fusión. (Cermesoni et al., 2024).

La mutación puntual del residuo tirosina 57 por aspartato ($VAMP721^{Y57D}$) que imita la fosforilación constitutiva tiene un efecto de dominancia negativa, bloqueando la fusión de membranas (Ricardi et al., 2023), lo cual interfiere con el crecimiento de las raíces, la secreción normal y la citocinesis incluso en plantas del tipo salvaje. Como se ilustra en la **figura 6 B**, hemos propuesto que existen dos posibles causas moleculares para este efecto;

1- La formación constante de complejos CIS: debido a la imposibilidad del cierre de $VAMP721^{Y57D}$ existe principalmente en una conformación abierta. Las vesículas unidas por factores de *tethering* no se fusionan debido al reensamblaje inmediato de los complejos CIS (por dos SNAREs en la misma membrana), lo que finalmente conduce a un bloqueo de la fusión.

2- Un modelo alternativo consiste de vesículas que portan $VAMP721^{Y57D}$ y este interactúa con sus Q-SNAREs correspondientes antes de que ocurra el *tethering* y esto

lleva a la formación de complejos trans antiparalelos que no son fusogenicos por su orientacion, lo que también conduce al bloqueo de la fusión. (Cermesoni et al., 2024)

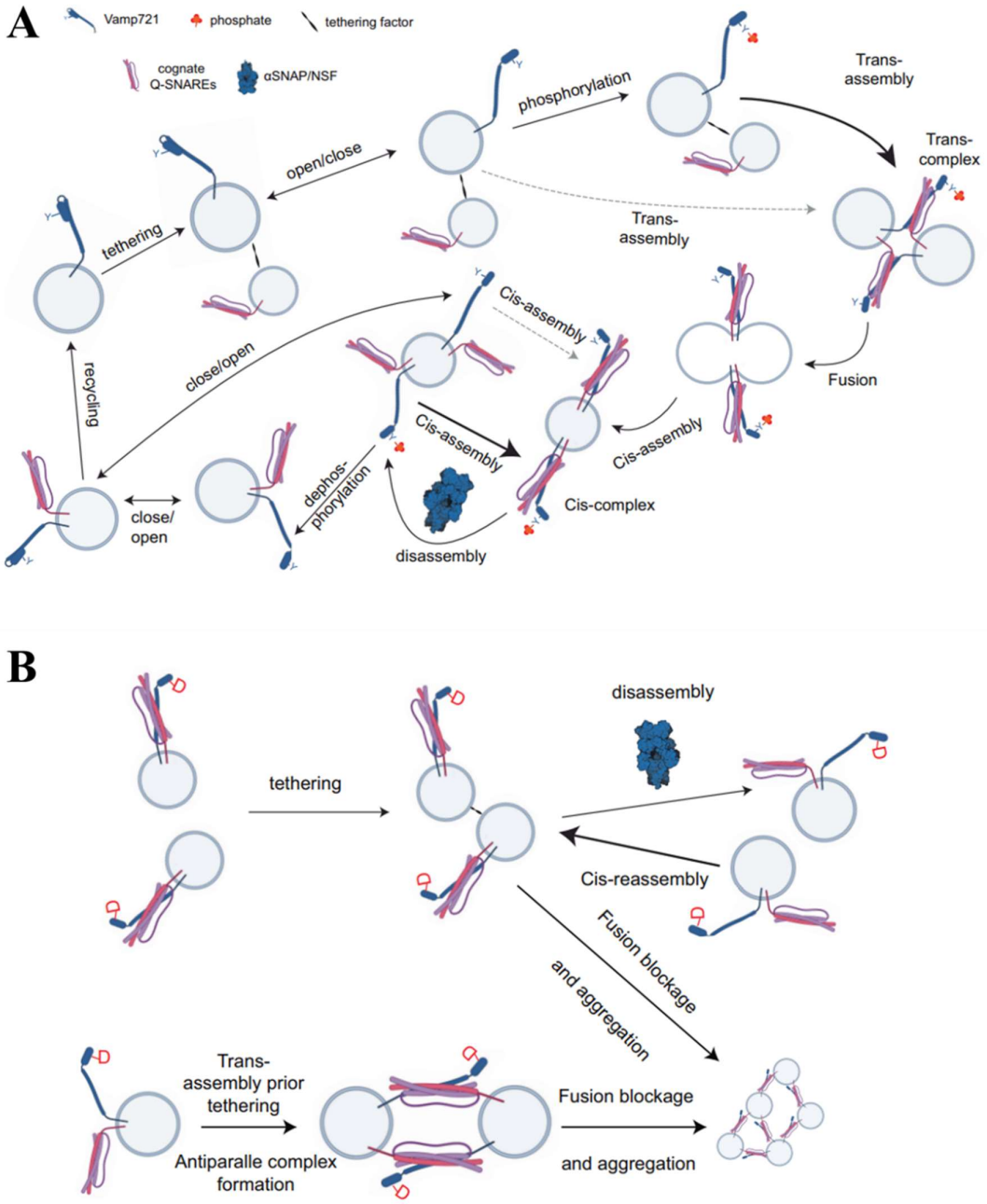

Figura 6- Modelo de regulación de la actividad de VAMP721 por fosforilación (Tomado de Cermesoni et al., 2024). **(A)** Modelo simplificado de la actividad de VAMP721. αSNAP/NSF: complejo con actividad de chaperonas que desarma los complejos en CIS. **(B)** Modelo de actividad de la mutante fosfomimética VAMP721^{Y57D}.

Por otro lado, las mutantes que no se pueden fosforilar VAMP721^{Y57A} y VAMP721^{Y57F} rescatan el fenotipo letal doble mutante (*VAMP721-/- VAMP722-/-*) únicamente en homocigosis. En cambio, complementando plantas del genotipo doble mutante con el gen *wild-type* solo es necesaria una copia del gen para cubrir las necesidades de transporte vesicular y restaurar el fenotipo al *wild-type*. El hecho de que estas mutantes necesiten de una mayor dosis génica para rescatar el fenotipo revela la importancia del paso regulatorio de fosforilación en el cual participa la Y57 y podría estar implicando que VAMP721^{Y57A} y VAMP721^{Y57F} son menos activas que VAMP721.

4. Objetivos e hipótesis

La primera hipótesis de esta tesina es que la dosis génica de VAMP721 influye en la tasa de elongación y largo final del hipocotilo en condiciones de crecimiento que requieren tráfico vesicular elevado y rápida expansión y división celular. El objetivo relacionado a esta hipótesis es evaluar el efecto de la dosis génica de VAMP721 en skotomorfogénesis. Durante este programa de crecimiento, que se asocia con un tráfico vesicular elevado, las plantas se desarrollan en ausencia de luz.

La segunda hipótesis es que la mutación puntual de la tirosina 57 de VAMP721, aminoácido clave para la activación de la proteína, genera un cambio fenotípico en la germinación y crecimiento de las plantas. Para comprobar esta hipótesis, se busca evaluar el efecto de mutaciones puntuales de la tirosina 57 de VAMP721, VAMP721^{Y57A} y VAMP721^{Y57F}, en el avance de las etapas de germinación, tasa de elongación y largo final del hipocotilo en el contexto de skotomorfogénesis en relación con plantas control rescatadas con la proteína *wild-type*.

Finalmente, es posible que hubieran otros fenotipos solo visibles en plantas completamente desarrolladas que resultaran enmascarados por la imposibilidad de las plántulas carentes de VAMP712/2 de llegar a estadios tardíos de maduración. Por este motivo, el tercer objetivo de esta tesina es la obtención de mutantes condicionales carentes de VAMP721/2 como herramienta para evaluar la relevancia y función de estos genes en diferentes estadios del desarrollo.

5. Materiales y Métodos

5.a. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las líneas *wild-type* y mutantes de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo son todas de fondo genético Columbia-0. Las plantas se cultivaron en suelo a 22 °C y en condiciones de luz diurna prolongada (16/8 hs luz/oscuridad). Las líneas de inserción de T-DNA *vamp721* / *vamp722* corresponden a las accesiones SALK_106594 y SALK_103189, respectivamente, y se caracterizaron en Kwon et al., 2008.

Las líneas transgénicas estables ya se encontraban disponibles en el laboratorio y habían sido obtenidas por transformación por *floral dipping* utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens.* Estas plantas se construyeron sobre fondo genético Columbia-0 mutado con inserciones de T-DNA como se detalla en el párrafo anterior. Los nombres de las plantas transgénicas utilizadas se detallan en la tabla 1. Las plantas transgénicas utilizadas presentan el promotor endógeno de VAMP721 río arrida de la proteína VAMP721 fusionada en su extremo N-terminal a GFP-MYC. Todas las líneas son homocigotas para su correspondiente transgén. Se evaluaron tres líneas independientes de VAMP721^{Y57A}, cuatro de VAMP721^{Y57F} y dos de VAMP721.

Nombre	Construcción	Fondo genético
VAMP721^{Y57A}	pVAMP::GFP-VAMP721^{Y57A}	*VAMP721-/- VAMP722-/-*
VAMP721^{Y57F}	pVAMP::GFP-VAMP721^{Y57F}	
VAMP721	pVAMP::GFP-VAMP721	

Tabla 1 – Genotipos de *A. thaliana* mutantes puntuales de la tirosina 57 de VAMP721.

Para evaluar el efecto de la dosis génica se utilizaron semillas progenie por autofecundación de plantas de genotipo *VAMP72 -/+ VAMP722-/-*, heterocigotas para el alelo T-DNA de VAMP721.

5.b. Ensayos de crecimiento en oscuridad

Se sembraron semillas de *A. thaliana* de los genotipos requeridos para cada ensayo en cajas plásticas cuadradas de 12 cm en 70 ml de medio Murashige-Skoog (MS) 0,5X y agar al 0,8% en condiciones de esterilidad en flujo laminar de uso exclusivo para material vegetal.

Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con gas cloro durante 3 horas o al momento de plaquear con etanol 70% durante 3 minutos. La esterilización con gas

cloro se lleva a cabo en una desecadora cerrada y bajo campana, para generar el gas cloro se dispusieron 100 ml de hipoclorito de sodio 4 % + 1 ml de ácido clorhídrico 37 % en un recipiente abierto dentro de la desecadora junto con las semillas en tubos de 1,5 ml. Luego de un periodo de esterilización de 3 horas se dejaron ventilar bajo campana durante 30 minutos más. La esterilización con etanol 70% se llevó a cabo dentro del flujo laminar, las semillas se dispusieron sobre un papel, se rociaron con una solución de etanol 70 %, se dejaron secar y se utilizaron inmediatamente.

Las semillas luego pasaron por un proceso de vernalización en oscuridad durante 5 días (120 horas) a 4 °C para favorecer la sincronización de la germinación, luego se realizaron diferentes protocolos para cada ensayo, detallados en las secciones siguientes.

5. b.i. Efecto de la dosis génica en el crecimiento en oscuridad

Luego del periodo de vernalización se estimuló la germinación (hora 0) con un shock lumínico de 20 horas para el ensayo de etiolación para evaluar el efecto de la dosis génica. Tras el shock lumínico se dispusieron las placas dentro de bolsas opacas y dentro de una caja para mantener las plantas en un ambiente de oscuridad durante todo el transcurso del experimento solo sacándolas de la bolsa opaca para tomar las fotografías a las 48, 62, 72 y 96 horas post estimulación (hpe). **(Fig. 7)** Las fotografías se tomaron en un cuarto oscuro iluminado solo con luz verde para no estimular la fotomorfogénesis y mantener el fenotipo etiolado.

El ensayo se realizó por triplicado. A partir de las fotos tomadas entre las tres repeticiones se midió el largo de hipocotilo y se calculó la tasa máxima de elongación del hipocotilo en plántulas de los genotipos *VAMP721+/- VAMP722-/-* (heterocigotas), *VAMP721+/+ VAMP722-/-* (homocigotas) y Columbia-0 (*wild-type*). En este ensayo se tomaron como control a las plantas del genotipo *wild-type* Columbia-0 que representarían una dosis génica de 4 alelos sanos (*VAMP721+/+ VAMP722+/+)*.

El genotipo de cada plántula fue determinado posteriormente mediante extracción de ADN y análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según los protocolos detallados en las secciones 5.d.i y 5.d.ii.

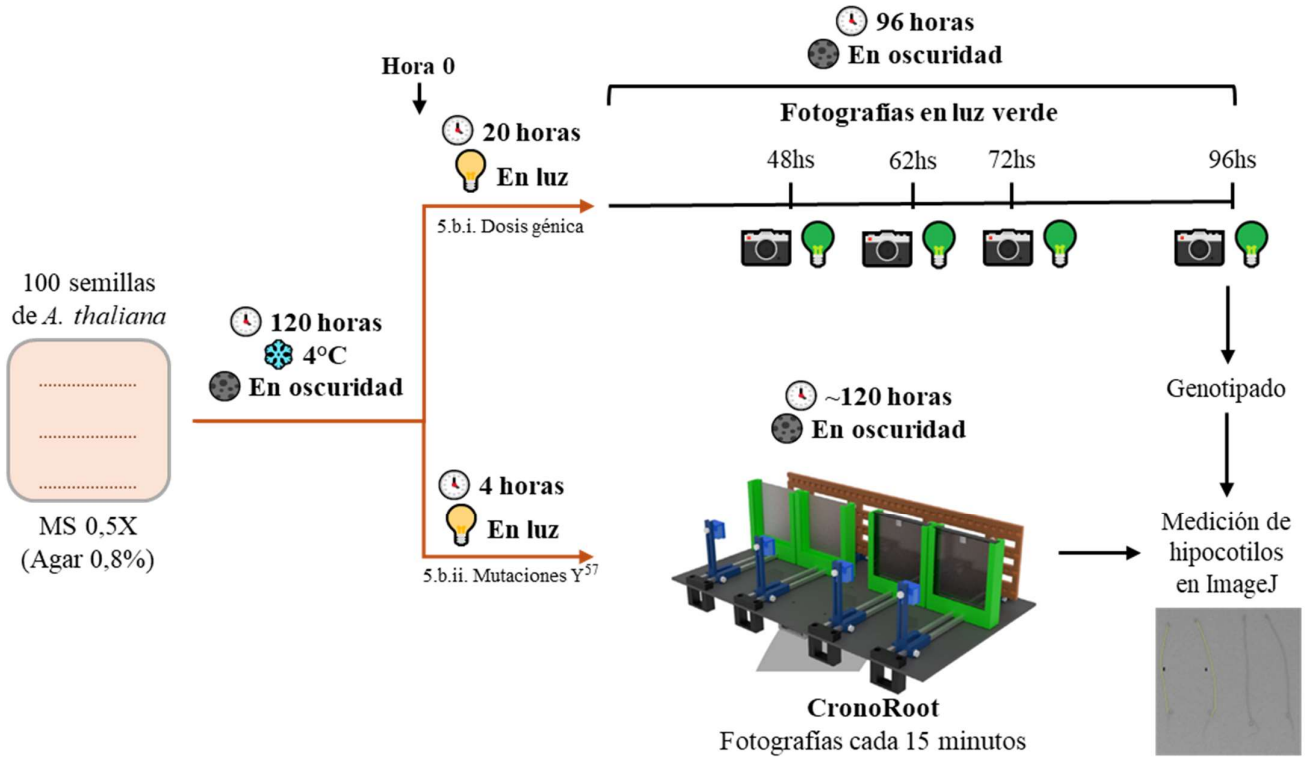

Figura 7 – Flujo de trabajo para los ensayos de etiolación. Se sembraron 100 semillas de *A. thaliana* de los genotipos correspondientes en placas cuadradas con medio MS 0,5X y agar 0,8%. Fueron dejadas en oscuridad y frío durante 5 días hasta que se estimuló la germinación con luz. Las plantas utilizadas en el ensayo de dosis génica se llevaron a luz durante 20 hs, luego se pusieron en oscuridad, se tomaron fotografías en luz verde a las 48, 62, 72 y 96 hs y posteriormente se genotiparon. Las plantas utilizadas en el ensayo del efecto de las mutaciones puntuales de la tirosina 57 se llevaron 4 hs a luz y luego se dispusieron en el CronoRoot (Gaggion et al., 2021) durante 120 hs tomando fotos cada 15 minutos. Los hipocotilos de todas las plantas fueron medidos en ImageJ.

5.b.ii. Efecto de mutaciones puntuales de la tirosina 57 de VAMP721 en el crecimiento en oscuridad

En el ensayo de crecimiento etiolado de las plántulas rescatadas con mutaciones puntuales de VAMP721 se realizó un shock lumínico de 3 horas de luz. La captura de imágenes se realizó utilizando el equipo CronoRoot (Gaggion et al., 2021). En el mismo se dispusieron las placas como indica la **figura 7** y se tomaron fotografías cada 15 minutos a lo largo de 5 días. Al finalizar este ensayo las plantas fueron descartadas.

Se estudió el fenotipo de plántulas mutantes homocigotas (*VAMP721-/- VAMP722-/-*) complementadas con distintas construcciones de la proteína VAMP721 con mutaciones puntuales del aminoácido tirosina 57, VAMP721^{Y57A} y VAMP721^{Y57F}. **(Tabla 1)** Entonces, las plantas homocigotas mutantes VAMP721^{Y57A} y VAMP721^{Y57F} cuentan con un residuo alanina o fenilalanina, respectivamente, en lugar de tirosina en la posición 57 y no poseen ninguna copia funcional del gen excepto por las adicionadas por transgénesis.

Los resultados de este ensayo se analizaron en relación con plántulas de genotipo doble mutante homocigotas (*VAMP721-/- VAMP722-/-*) rescatadas con VAMP721, de manera de mantener la dosis génica equivalente entre la planta con la modificación y el control.

5.c. Obtención de datos y análisis computacional

5.c.i. Medición de hipocotilos utilizando ImageJ y obtención de la tasa máxima de elongación

Las mediciones del hipocotilo de las plántulas se realizaron por medio del software ImageJ (https://imagej.net/ij/download.html). Se calibró la escala midiendo uno de los laterales de las cajas de plástico en las que se germinaron las semillas. Se analizó la velocidad o tasa máxima de crecimiento al calcular la diferencia entre mediciones espaciadas cada 24 horas y seleccionar la máxima entre esos valores para independizar el análisis del tiempo de inicio de la germinación.

5.c.ii. Análisis estadístico utilizando GraphPad Prism

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism v8.4.3 para Windows, GraphPad Software. La normalidad de los resultados obtenidos fue evaluada por el test de Shapiro-Wilk. Los valores en los gráficos de barras corresponden a la media ± error de la media (SEM). Para mostrar la distribución de los datos obtenidos, se agregan además gráficos de violín. Se realizaron ANOVA de un factor utilizando genotipo como variable independiente. Las diferencias se consideraron significativas para p-valor < 0,05.

5.d. Genotipados

Los genotipos (*VAMP721+/- VAMP722-/-* y *VAMP721+/+ VAMP722-/-*) se determinaron tras la extracción de ADN genómico de las plantas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **(Fig. 8)**

Como ya se mencionó, las plantas de genotipo *VAMP721-/- VAMP722-/-* no pasan del estadio de germinación y, ciertamente, no elongan el hipocotilo. Por esta razón, esas plántulas no han sido analizadas y como su genotipo es evidente a simple vista no se consideró necesario genotiparlas.

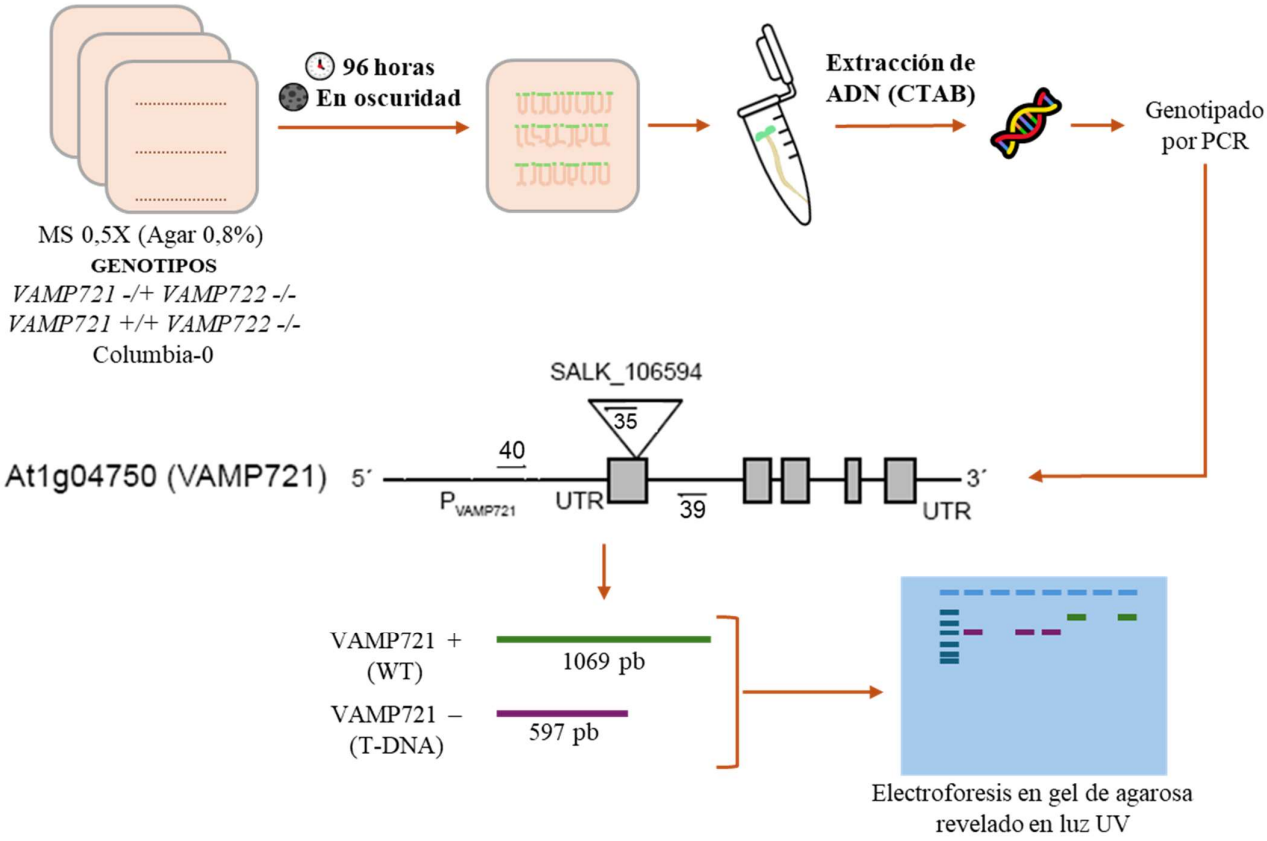

Figura 8 - Flujo de trabajo para los genotipados. Se sembraron 100 semillas de *A. thaliana* por placa cuadrada con medio MS 0,5 X y agar 0,8 %. Se realizó el ensayo de etiolación: se llevaron a luz durante 20 hs, luego se pusieron en oscuridad y se tomaron fotografías en luz verde a las 48, 62, 72 y 96 hs. Luego del ensayo se genotiparon para determinar la dosis génica de cada planta. At1g04750: Esquema del gen VAMP721 con los primers utilizados. SALK_106594 es el T-DNA que genera al alelo mutado.

De esta manera, el objeto de estudio serán las plántulas de dosis génica = 1, *VAMP721-/+ VAMP722-/-*, o de dosis génica = 2, *VAMP721+/+ VAMP722-/-*. Como todas las plantas estudiadas tendrán al menos una copia del gen VAMP721, lo más eficiente es evaluar primero si tienen el alelo *knock-out* del gen VAMP721, que presenta el T-DNA, y posteriormente realizar la PCR para el alelo *wild-type*. En el caso de que ninguna de las dos amplificaciones generara producto de PCR, tras varios intentos

variando reactivos, se podría determinar que la extracción de ADN de esas plantas no fue eficaz y se descartarían las muestras y los datos asociados a ellas.

5.d.i. Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

Una vez finalizados los ensayos de etiolación las plantas se dejaron en luz al menos una semana para que continúen su crecimiento aumentando la biomasa disponible para facilitar la extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico de las plantas de *A. thaliana* de los genotipos *VAMP721+/+ VAMP722-/-* y *VAMP721-/+ VAMP722-/-* se realizó siguiendo el protocolo de extracción con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) establecido por Murray y Thompson (1980). Debido a que la extracción se realiza a partir de plántulas de aproximadamente 10 días de edad y que al haber sido sometidas al crecimiento en oscuridad presentan un tamaño muy pequeño, los reactivos se utilizaron al cuarto de su volumen original. Primero se colocaron las muestras en nitrógeno líquido y se molió el tejido de la plántula entera, añadiendo 100 µl de buffer CTAB y mezclando. La mezcla se incubó en un baño de agua a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 µl de una solución de cloroformo:isomílico (24:1) y se mezcló por inversión. Se centrifugaron las mustras durante 10 o 15 minutos y se transfirieron 50 µl de la fase acuosa a un tubo nuevo, añadiendo 35 µl de isopropanol (0,7 vol). Las muestras se incubaron a -20 °C durante 30 minutos o toda la noche. Luego, se centrifugaron a -4 °C durante 15 minutos, descartando el sobrenadante y conservando el pellet. Se realizó un lavado con etanol al 70 % y se centrifugó durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y dejando secar el tubo. Finalmente, se añadieron 50 µl de agua destilada al pellet.

5.d.ii. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar regiones específicas de una muestra de ADN. Se utilizó como muestra de ADN el extraído por la técnica de extracción de ADN genómico detallada en la sección 5.d.i. Los *primers* o cebadores específicos utilizados amplifican una región del gen VAMP721 *wild-type* de 1069 pb y una región de T-DNA de 592 pb que genera el alelo mutado en las plantas hetero-homocigotas *VAMP721-/+ VAMP722-/-*, con el objetivo de distinguir homocigotas y heterocigotas para el gen *VAMP721*. **(Tabla 2)**

	Forward	**Reverse**
T-DNA	ATTTTGCCGATTTCGGAAC **(#35)**	ATCAACCAAAGCTACCACGG **(#40)**
Wild-type	CAGGTTCTAAACAATGCAGAGC **(#39)**	ATCAACCAAAGCTACCACGG **(#40)**

Tabla 2 - *Primers* para los genotipados por PCR.

Con el objetivo de minimizar contaminaciones, para preparar la *master-mix* de PCR se utilizan pipetas de uso especial para reactivos de PCR (excepto para la muestra de ADN). La *master-mix* es detallada en la tabla 3.

Agua libre de nucleasas	6,1 µl
Buffer Taq polimerasa	0,6 µl
Cloruro de magnesio	0,4 µl
dNTPs 10mM	0,4 µl
Primers específicos 10µM	0,4 µl
Taq polimerasa	0,1 µl
ADN muestra	1,0 µl

Tabla 3 – *Master-mix* para PCR.

El programa de PCR para el genotipado inicia con una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto. A continuación, se lleva a cabo un ciclo de amplificación de los fragmentos que se repite 35 veces, comenzando con una desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, seguida de una hibridación de los primers a 57 °C durante 15 segundos y, finalmente, una elongación a 72 °C durante 30 segundos. Para concluir, se realiza una elongación final a 72 °C durante 7 minutos.

5.d.iii. Electroforesis en gel de agarosa

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% (1 gr de agarosa por cada 100ml de buffer TAE) con bromuro de etidio 0,4 ng/µl a 100V durante 25 minutos. Las bandas de ADN con el intercalante se revelaron en lámpara de luz UV.

5.e. Pruebas de germinación

Las pruebas de germinación se realizaron utilizando plantas de genotipo *VAMP721-/- VAMP722-/-* rescatadas con las proteínas VAMP721^{Y57A} y VAMP721^{Y57F} llevadas a homocigosis para establecer si existen diferencias en la velocidad de germinación que puedan estar asociadas a la mutación.

De manera similar a los ensayos de crecimiento en oscuridad, para las pruebas de germinación se sembraron 25 semillas de *A. thaliana* en cajas plásticas cuadradas de 12 cm en 70 ml de medio Murashige-Skoog (MS) 0,5X y agar al 0,8% en condiciones de esterilidad en flujo laminar de uso exclusivo para material vegetal. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con gas cloro durante 3 horas o al momento de plaquear con etanol 70 % durante unos minutos. Las semillas luego pasaron por un proceso de vernalización en heladera durante 120 horas a 4 °C para favorecer la sincronización de la germinación. Pasado este periodo se dejaron crecer en luz continua a 18 °C aproximadamente y se determinó el estadio de germinación de cada semilla alcanzado a las 24 y 48 horas. **(Fig. 9)**

Los estadios de germinación según (Boyes et al. 2003) se muestran en la **figura 9**, siendo el estadio "0" la imbibición de la semilla, el "0,1" la ruptura de la caliptra que ocurre al emerger la radícula, "0,5" la aparición de los cotiledones y/o del hipocotilo y finalmente el estadio "0,7" que es la apertura de los cotiledones.

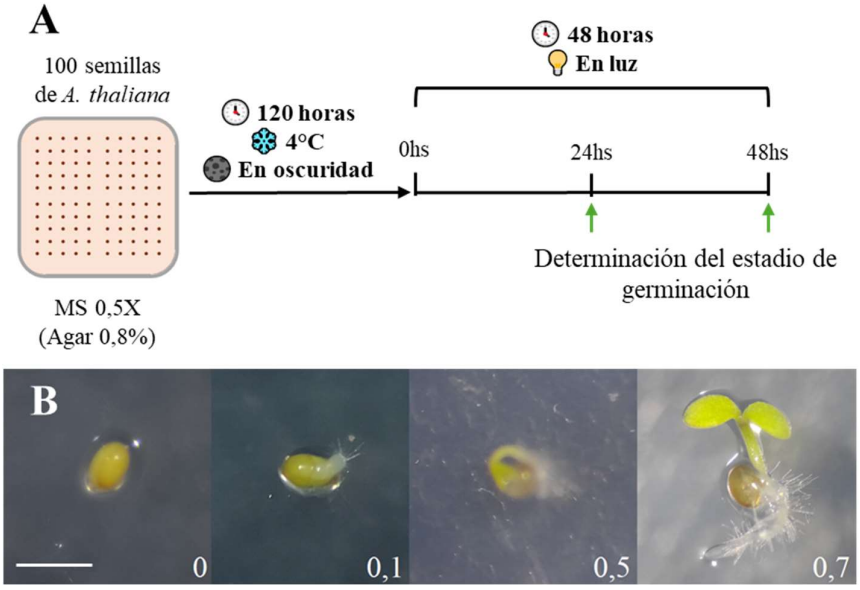

Figura 9 – Ensayo de germinación (A) Flujo de trabajo para las pruebas de germinación. Se sembraron 100 semillas de *A. thaliana* en placas cuadradas con medio MS 0,5 X y agar 0,8 %, se dejaron en oscuridad y frío durante 120 horas y luego se dejaron germinar a luz durante 48 horas registrando el estadio de germinación a las 24 hs y a las 48 hs. **(B)** Imágenes con aumento de las plántulas en distintos estadios de germinación, adaptado de Boyes 2003. Barra de escala = 1 mm

Se realizaron dos réplicas para el genotipo Columbia-0, cuatro réplicas para las plantas de genotipo *VAMP721-/- VAMP722-/-* rescatadas con el transgén sin modificar, VAMP721, siete réplicas para plantas de genotipo VAMP721^{Y57A} y seis réplicas para plantas de genotipo VAMP721^{Y57F}.

5.f. Clonado para edición génica inducible de VAMP721-GFP mediante CRISPR/Cas9

El hecho de que el genotipo *VAMP721-/- VAMP722-/-* resulte letal en estadios posteriores a la germinación de la plántula limita el estudio de la proteína en plantas adultas por genética reversa. Esto llevó al diseño de plantas editadas genéticamente con la tecnología CRISPR/Cas9 para eliminar el gen VAMP721 en estadios posteriores del desarrollo, bajo la inducción por estradiol de la síntesis de la maquinaria CRISPR/Cas9. La transgénesis se realizó en plantas de fondo genético *VAMP721-/- VAMP722-/-* transformadas con VAMP721 fusionada a GFP y MYC en su extremo N-terminal. Estas líneas homocigotas ya se encontraban disponibles en el laboratorio y su genotipo ha sido mantenido durante muchas generaciones.

Para obtener los plásmidos finales que se utilizaron para transformar las plantas del genotipo mencionado, se realizaron dos clonados secuenciales para modificar distintas regiones de los vectores: el primer clonado se llevó a cabo mediante una reacción LR del método Gateway y el segundo, por Gibson Assembly.

5.f.i. Clonado LR Gateway

En un clonado por la técnica Gateway, un inserto se mueve hacia un vector a través de un proceso de recombinación en dos pasos que aprovecha las reacciones de integración y escisión utilizando los sitios de unión attL y attB. **(Fig. 10)** En el primer paso, una reacción BP, se crea un clon de entrada que contiene el inserto de ADN flanqueado por dos sitios attL. El segundo paso, una reacción LR, crea un clon de expresión que contiene el inserto de ADN flanqueado por dos sitios attB. El clonado descripto en esta tesina se realizó mediante una reacción LR.

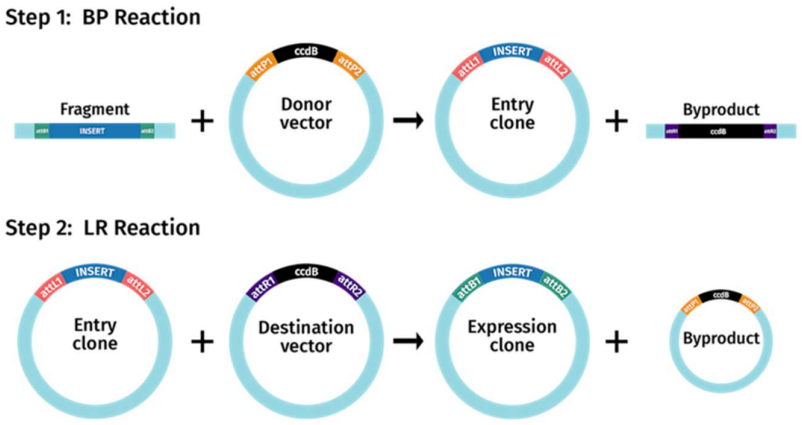

Figura 10 – Esquema de clonado por Gateway. (Tomado de SnapGene)

El primer clonado se realizó a partir del vector *destination* pRU319 (Ursache et al., 2021), en el cual se clonaron de manera individual dos fragmentos de ADN que codifican para dos sets de guías de ARN cada uno, para dirigir a la proteína Cas9 en paralelo hacia VAMP721 y hacia GFP. **(Fig 11. 1°)** De esta manera, se busca eliminar del genoma un fragmento de ADN lo suficientemente grande como para que, al expresarse la proteína Cas9 en la planta, se pierda tanto la proteína VAMP721 como la fluorescencia generada por GFP **(Fig. 12)**. Todos los clonados mencionados se realizaron dentro de los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) del plásmido, los cuales limitan la zona que será transferida a *A. thaliana* mediante transformación con *A. tumefaciens*.

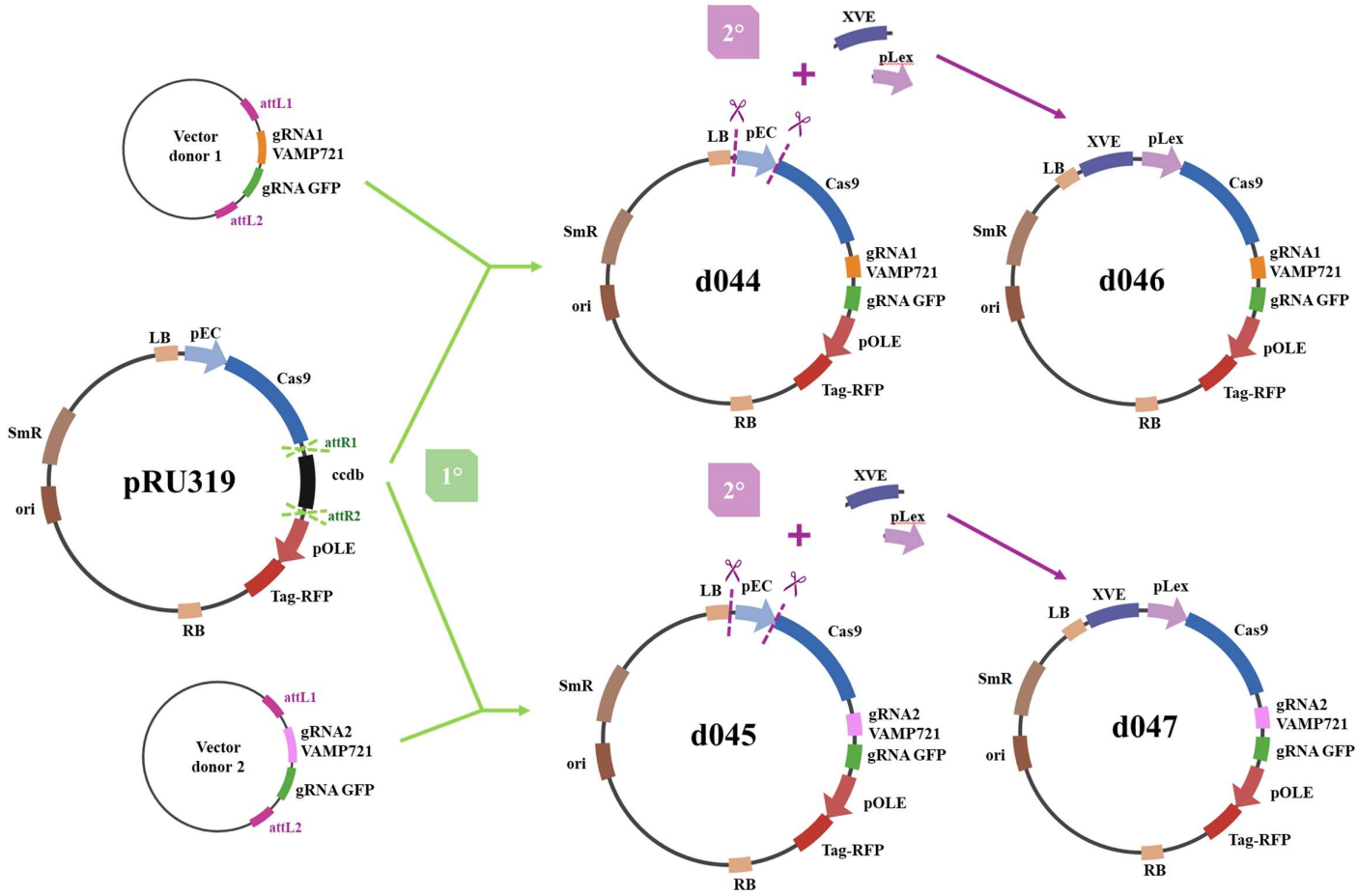

Figura 11 – Diseño de los clonados para obtener los vectores d046 y d047. (1°) Clonados por LR de Gateway (2°) Clonados por Gibson Assembly. ori: origen de replicación bacteriano, SmR: Gen de resistencia a espectinomicina, LB/RB: bordes izquierdo y derecho para la transferencia de ADN a la planta mediada por *A. tumefaciens*, pEC: promotor de célula huevo, Cas9: secuencia codificante de la proteína Cas9, pOLE: promotor de semilla, Tag-RFP: proteína fluorescente roja, gRNA VAMP721/GFP: secuencia codificante de los RNA guía y scaffold para guiar a la proteína Cas9 a estas regiones, XVE: secuencia codificante del factor de transcripción quimérico XVE activable por estradiol con región de unión al promotor pLex, pLex: promotor inducible por XVE.

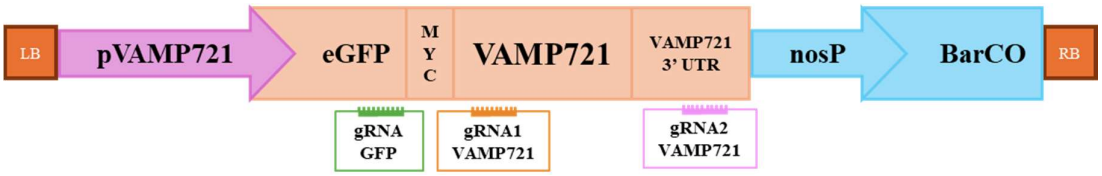

Figura 12 - T-DNA presente en las plantas rescatadas con VAMP721. (Ricardi et al., 2023) Se muestran los sitios de unión de los tres gRNAs y el gen de resistencia al herbicida BASTA (BarCO).

Para corroborar la inserción del fragmento en el vector, el mismo fue digerido con la enzima de restricción NcoI que genera un patrón de bandas diferencial para el vector sin recombinar y para el vector con el inserto (**d044** y **d045**). Además, el vector **pRU319** posee entre sus sitios attR1 y attR2 la secuencia codificante para la proteína **ccdB**, que es tóxica para las bacterias *Escherichia coli*. De manera que, si alguna bacteria hubiera sido transformada con el vector no recombinado, no sobrevivirá. Se transformó *E. coli* con estos vectores como se detalla en la sección 5.f.iii..

Como se puede observar en la **figura 11**, todos los vectores generados a partir de pRU319 cuentan con un *casette* de resistencia a espectinomicina para la selección de bacterias que porten el plásmido. Los plásmidos obtenidos producto de la reacción LR, **d044** y **d045**, presentan dentro de los bordes LB y RB: la enzima Cas9 bajo control del promotor de óvulo (pEC, *egg-cell promoter*), dos *casettes* de expresión de gRNA dirigida a VAMP721 (diferentes entre d044 y d045) con su respectivo RNA *scaffold*, una gRNA dirigida a GFP con su respectivo RNA *scaffold*, y la proteína fluorescente roja bajo control del promotor de semilla pOLE. La utilidad de este último sistema es facilitar el screening de las semillas en la primera generación de plantas transgénicas.

5.f.ii. Clonado por Gibson Assembly

El clonado para generar los plásmidos **d046** y **d047 (Fig. 11, 2°)** se realizó mediante la técnica de Gibson Assembly (GA). Mediante esta técnica de clonado, se unen dos o más fragmentos por sus extremos complementarios, que, de ser necesario, son previamente añadidos a cada inserto por PCR. La reacción se llevó a cabo en un tubo de 0,6 ml y consistió de una incubación de 1 hora a 50°C con la *master mix* de GA que contiene: ADN exonucleasa T5 (actividad 5′-3′exonuceasa), PFu (ADN polimerasa de fusión con alta procesividad y actividad de *proof reading*) y Taq ligasa (ligasa termoestable de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*). **(Fig. 13)**

Durante esta incubación en primer lugar el ADN es digerido por la ADN exonucleasa 5' de la molécula quedando un extremo protruyente en la otra hebra, a partir de esto los extremos complementarios de los fragmentos se unen en un *annealing* muy fuerte. Luego la ADN polimerasa copia el fragmento de ADN faltante de la hebra complementaria y el *nick* es sellado por la ADN ligasa.

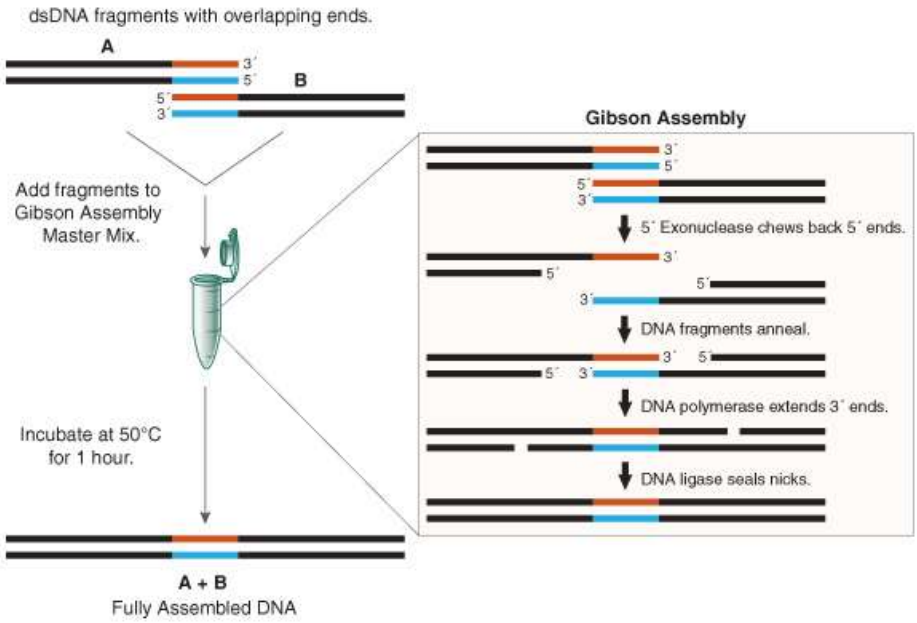

Figura 13 - Esquema de los pasos de clonado por Gibson Assembly. (Tomado de NEB)

Debido a que es fundamental que la activación de la maquinaria CRISPR/Cas9 sea inducible, es necesario reemplazar el promotor pEC para hacer que la enzima pueda expresarse en cualquier tejido, pero solo tras la administración de un inductor exógeno para las plantas, como lo es el estradiol. Con este objetivo se reemplazó el promotor pEC por el promotor pLex y además se incluyó en la construcción la secuencia codificante para el factor de transcripción quimérico XVE bajo control del promotor constitutivo de ubiquitina. El promotor pLex es un promotor exógeno en *A. thaliana* y es inducible por la unión de la proteína XVE, cuya actividad como activador transcripcional es dependiente de estradiol. De esta forma, la edición génica sería activada solo tras la inducción con estradiol y en el momento deseado.

Para eliminar el promotor pEC, se digirieron los vectores d044 y d045 con la enzima KpnI y luego, mediante la técnica de GA, se clonó en su lugar el promotor pLex

y la secuencia codificante de XVE bajo el promotor de ubiquitina. Como se esquematiza en la **figura 14**, ambos fragmentos se amplificaron por PCR a partir de un vector templado utilizando *primers* específicos para cada uno de ellos. **(Tabla 4)** Adicionalmente, en la PCR se les añade a los fragmentos los extremos protruyentes para poder insertarse en el vector **d044/5** digerido con KpnI. Estos fragmentos fueron previamente purificados por el protocolo de purificación de producto de PCR de QIAgen detallado a continuación.

El programa de PCR consiste de una desnaturalización inicial a 98 ºC durante 30 segundos. A continuación, se lleva a cabo un ciclo de amplificación de los fragmentos que se repite 35 veces, comenzando con una desnaturalización a 98 ºC durante 10 segundos, seguida de una hibridación de los primers a 60 ºC para amplificar el fragmento XVE o a 67 ºC para amplificar el fragmento de pLex. Las temperaturas de hibridación se mantienen durante 15 segundos y, finalmente, cada ciclo concluye con una elongación a 72°C durante 2 minutos. Para concluir, se realiza una elongación final a 72 °C durante 2 minutos más. La *master-mix* utilizada en esta reacción de PCR se detalla en la tabla 5.

	Forward	**Reverse**
XVE	CATGATTACGAATTCGGTACAGTCTAGCT CAACAGAGCTT (#731)	TTGAACGATCGATGTTTTACTCCTCATATT AACT (#732)
pLex	GAGGAGTAAAACATCGATCGTTCAAACAT TTGGCA (#733)	ATGGCGCGCCGAATTGGTACGGCTAGAGT CGACTAGCTTC (#734)

Tabla 4 - *Primers* específicos para la amplificación de XVE y pLex con extremos complementarios.

Agua libre de nucleasas	32,5 µl
Buffer Q5U polimerasa	10 µl
dNTPs 10mM	1,0 µl
Primers específicos 10µM	2,5 µl
Q5U polimerasa	0,5 µl
ADN muestra	2,0 µl

Tabla 5 – *Master-mix* para amplificar los fragmentos XVE y pLex por PCR.

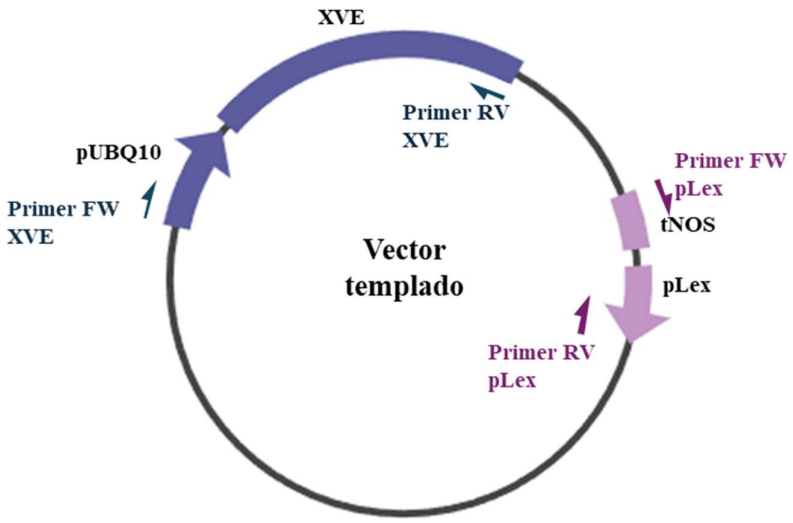

Figura 14 – Amplicones de PCR XVE (3903 pb) **y pLex** (682 pb).

Para purificar el ADN producto de PCR, primero se añadieron 5 volúmenes de buffer PB (clorhidrato de guanidinio e isopropanol) y 10 µl de acetato de sodio 3 M a la muestra de PCR. **(Tabla 6)** Luego, se transfirió la mezcla a una columna de purificación en un tubo de 2 ml, la cual se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se añadieron 750 µl de buffer PE a la columna y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente, repitiendo este paso dos veces, asegurándose de que la columna esté completamente seca. Se transfirió la columna a un tubo de 1,5 ml y se añadieron 30 µl de buffer EB en el centro de la membrana para eluir el ADN. Se dejó reposar durante 1 minuto y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó la columna. La concentración del producto final de cada purificación se midió en NanoDrop One/OneC UV-Vis de ThermoFisher Scientific.

Para proceder con el clonado fue necesario conocer la concentración del vector d044/5, que se cuantifico por intensidad de la banda, proporcional a la masa del ADN sembrado, en gel de agarosa comparando contra bandas de ADN de concentración conocida.

Los vectores con el promotor pLex y la secuencia codificante de la proteína XVE río abajo del promotor constitutivo de ubiquitina (pUBQ10) se denominaron **d046** y **d047**, generados a partir de **d044** y **d045**, respectivamente. **(Fig. 11)** Los vectores se corroboraron por digestión con NcoI y revelado del producto en gel de agarosa 0,8% para

poder distinguir dos bandas de 1.868 pb y 1.697 pb entre sí. El patrón de bandas se diferencia con el de los vectores d044 o d045 de manera de distinguir entre ellos. Tras la obtención de clones positivos se realizó una purificación de ADN plasmídico (sección 5.f.iii.) y se secuenciaron los plásmidos obtenidos.

5.f.iii. Transformación génica de *Escherichia coli* y purificación de ADN plasmídico

La transformación de *Escherichia coli* se llevó a cabo tanto para la amplificación de los vectores d044/5 como d046/7. La transformación de *E. coli* se realizó por el método de electroporación. Las bacterias competentes conservadas en glicerol a -80 °C se descongelaron e incubaron durante 20 minutos con 1 ul del plásmido a transformar, agregado en esterilidad. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador Gene Pulser/Micro Pulser, en cubetas cuadradas de 0,2 cm. Las bacterias se dejaron recuperar en 1 ml de medio LB en un tubo de 1,5 ml durante 40 minutos a 37 °C y luego se sembraron en agar 1 % selectivo con espectinomicina.

La purificación de ADN plasmídico bacteriano se llevó a cabo según el protocolo de Inbio HighWay. El día anterior a realizar el protocolo se preparó un cultivo bacteriano a partir de una colonia de bacterias que portan el plásmido de interés, esta colonia se presume que se formó a partir de una única bacteria transformada con el plásmido. En este paso se inocularon 5 ml de medio LB suplementado con espectinomicina con una colonia de la bacteria que contiene el plásmido a purificar. El cultivo se incubó durante 12 a 16 horas a 37 °C en agitador termostatizado. Una vez obtenido el cultivo, se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 g en microtubos de 1,5 ml y se descartó completamente el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron los sedimentos bacterianos en 250 µl de buffer de resuspensión **(Tabla 6)**. Luego se agregaron 250 µl de buffer de lisis y se agitaron 5 veces por inversión, evitando usar vortex a partir de este punto para no degradar el ADN. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para luego añadir 350 µl de buffer de neutralización para neutralizar el lisado, inmediatamente se mezclaron por inversión varias veces, lo que formará un precipitado blanco. A continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 12,000 g y se colocó cada muestra en una minicolumna en un tubo colector. Luego, se agregó el sobrenadante a la minicolumna, evitando que pase sedimento, y se centrifugaron durante 1 minuto a 12,000 g. El líquido que pasó hacia el tubo colector se descartó (*flow-though*) y se colocó la columna en el mismo tubo.

Para el lavado se agregaron 500 µl de buffer de lavado 1 sobre las paredes de la minicolumna y se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 g, descartando el filtrado y colocando la columna de nuevo en el tubo colector. Después, se agregaron 700 µl de buffer de lavado 2 sobre las paredes de la minicolumna y se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 g, descartando el filtrado y colocando nuevamente la columna en el tubo colector. Luego, se centrifugaron durante 3 minutos a 12,000 g para eliminar restos de buffer de lavado. A continuación, se agregaron 50 µl de buffer de elución sobre el centro de la membrana de sílica, y se incubó durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron durante 2 minutos a 12,000 g para eluir el ADN plasmídico en el microtubo. Luego de medir la concentración por Nanodrop, las muestras se conservaron a - 4 °C.

Buffer de resuspension (Buffer P1)	TRIS 50 mM EDTA 10 mM
Buffer de lisis (Buffer P2)	NaOH 0.2 M SDS 1 %
Buffer de neutralización (BN)	Tiocianato de guanidinio 4 M Acetato de sodio 0,5 M
Buffer de lavado 1 (BL1 o PB)	Tiocianato de guanidinio 5 M Isopropanol 30 %
Buffer de lavado 2 (BL2)	TRIS 20 mM HCl (pH = 7,5) Etanol 80 %

Tabla 6 – Buffers para la purificación de ADN plasmídico y purificación de producto de PCR.

5.f.iv. Transformación génica de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de *Agrobacterium tumefaciens* se realizó siguiendo el mismo protocolo que para la transformación de *E. coli* con la excepción de que en el paso de recuperación se incubó durante 2 horas y a 30 °C. Las bacterias transformadas se dejaron crecer en placas de medio LB 1 % agar con los antibióticos rifampicina, gentamicina y espectinomicina como proceso de selección.

Para la confirmación de la correcta transformación de *A. tumefaciens* se hizo un checkeo por *plasmid rescue*, este procedimiento consiste en la transformación de *E. coli*

a partir del ADN plasmídico de *A. tumefaciens* transformada y un último paso de confirmación por digestión del ADN plasmídico de *E. coli* transformada. El objetivo de esto es sobrepasar la mala eficiencia de la purificación de ADN plasmídico de *A. tumefaciens*, la cual es suficiente como para obtener producto con el cual transformar *E. coli* pero no para realizar un *screening* en un gel de agarosa.

Una vez verificados mediante patrones de restricción se eligió un clon de *A. tumefaciens* para cada plásmido para proseguir con las transformaciones.

5.f.v. Floral dipping de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas transformadas son de fondo genético Columbia-0 *VAMP721-/- VAMP722-/-* y poseen el transgén VAMP721 fusionado a GFP y MYC en su extremo N-terminal. Antes de la transformación se cortaron todas las silicuas presentes en la planta de manera de minimizar el porcentaje final de semillas no transformadas.

Las líneas transgénicas se generaron utilizando el protocolo estándar de inmersión floral (Clough y Bent, 1998) utilizando la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*. El fundamento de esta técnica es exponer las flores de *A. thaliana*, particularmente los óvulos, a una solución de la bacteria que contiene el plásmido de interés (d046 y d047) para que la misma introduzca el fragmento de ADN limitado por los bordes LB y RB en el plásmido.

El protocolo consiste en la inoculación de medio líquido Luria-Bertani (medio LB) con los antibióticos correspondientes (en este caso rifampicina, gentamicina y espectinomicina) con un escarbadientes estéril con el cual se raspa la colonia de bacterias que portan el plásmido. Luego de dos días de crecimiento se prepara una solución de *floral dipping* con el medio de cultivo con las bacterias, 80 ml de sacarosa en agua destilada a concentración final 5 % y detergente Silwet 500 µl/l. La solución se coloca en recipientes donde se sumergen durante 30 segundos las flores de *A. thaliana* a transformar. Las plantas se dejan durante 1 día en posición horizontal en una caja cubierta con papel de aluminio para mantener la humedad y permitir la infección bacteriana.

5.f.vi. *Screening* de semillas transgénicas

Las semillas que porten el T-DNA se seleccionaron en lupa de fluorescencia ZEISS SteREO Discovery.V8 gracias a la expresión de proteína de fusión OLE1 con la proteína roja fluorescente (OLE1-TagRFP) bajo control de un promotor específico de semilla (pOLE). Las imágenes capturadas se tomaron bajo una longitud de onda de excitación de

574,5 nm a 599,5 nm y de emisión de 612 a 682 nm y un espejo dicroico con corte en 605nm.

6. Resultados

6.a. Efecto de la dosis génica de VAMP721 en elongación de hipocotilo

En este ensayo se analizó el largo de hipocotilo y se calculó la tasa máxima de elongación de 847 plántulas, 300 plántulas de genotipo *VAMP721+/- VAMP722-/-* (dosis génica = 1), 69 plántulas de genotipo *VAMP721+/+ VAMP722-/-* (dosis génica = 2) y 478 plántulas de genotipo *wild-type* Columbia-0 (*VAMP721+/+ VAMP722+/+*, dosis génica = 4*)*. Para poder relacionar la velocidad de elongación del hipocotilo y el largo final alcanzado con la dosis génica de cada plántula fue necesario realizar un genotipado de cada plántula individualmente. Se genotiparon en total aproximadamente 400 plántulas a lo largo de las tres repeticiones del experimento, manteniéndose la identidad de cada plántula en particular para asignar las mediciones y agrupar los datos por genotipo.

Para cada plántula, primero se realizó el genotipado para detectar el alelo que presenta la inserción de T-DNA que genera el *knock-out* del gen endógeno *VAMP721* (alelo - o mutado). El objetivo de seguir este flujo de trabajo fue minimizar los análisis innecesarios, ya que las plantas a genotipar podían ser únicamente de genotipo *VAMP721-/+ VAMP722-/-* o *VAMP721+/+ VAMP722-/-*, es decir, que tenían una o dos copias inalteradas de *VAMP721*, respectivamente. Entonces, se llevó a cabo el análisis de PCR para detectar si la plántula posee el alelo mutado y solo si la PCR resulta negativa para ese alelo se realizó la PCR para detectar el alelo *wild-type.* En caso de que ambas reacciones de PCR resultaran negativas, realizando siempre los controles correspondientes, se descartó la muestra asumiendo una extracción de ADN fallida.

Las plántulas de genotipo doble mutante (*VAMP721-/- VAMP722-/-*) fueron eliminadas del análisis ya que no brindan información relevante al mismo. El fenotipo letal se observa a simple vista ya que presentan un hipocotilo corto y su desarrollo queda detenido en el estadio de germinación. **(Fig. 15)** Se observó que de 400 plantas genotipadas solo se confirmó el genotipo de 69 como *VAMP721+/+ VAMP722-/-*, mientras que las *VAMP721-/- VAMP722-/-* representaron una población muchísimo menor en tamaño, habiéndose observado solamente 15 entre las cerca de 400 semillas. De esta manera, se calcula que la progenie procedente de autofecundación de una planta *VAMP721-/+ VAMP722-/-* en nuestras condiciones de cultivo genera: un 17,25% de plántulas de genotipo *VAMP721+/+ VAMP722-/-*, un 79% *VAMP721-/+ VAMP722-/-*, y un 3,75% *VAMP721-/- VAMP722-/-*.

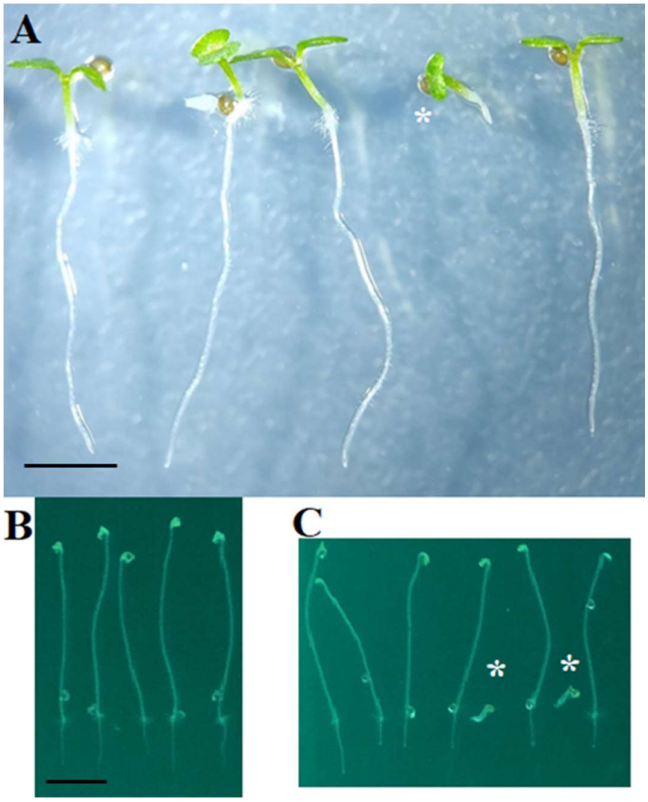

Figura 15 - Fenotipo representativo de **(A)** Plántulas progenie de *VAMP721-/+ VAMP722-/-* crecidas en luz blanca continua. **(B)** Plántulas etioladas de genotipo wild-type Columbia-0 y **(C)** Plántulas etioladas progenie de *VAMP721-/+ VAMP722-/-*. Los asteriscos (*) señalan las plántulas de posible genotipo *VAMP721-/- VAMP722-/-*. Barras de escala (A y B) = 1 mm

En la **figura 16** se muestra un gel de agarosa 1 % representativo, donde se realizó una electroforesis por 25 minutos del producto de PCR de los genotipados para ambos alelos para las mismas plantas. En este caso para las plantas numeradas desde la "6-17" hasta la "6-33" se realizaron las dos PCR en paralelo porque eran las últimas de la réplica. Se pueden observar todos los genotipos revelados en este ensayo, por ejemplo, la planta "6-22" muestra que no posee un alelo *knock-out* pero sí al menos uno *wild-type* de manera que se clasificó como *VAMP721+/+ VAMP722-/-*. La planta "6-21" se clasificó como genotipo *VAMP721-/+ VAMP722-/-*, ya que presenta tanto un alelo *knock-out* como uno *wild-type*. La calle rotulada "C+" dentro de las muestras genotipadas para T-DNA representa un control positivo para el alelo *knock-out* y la calle rotulada "C+" dentro de las del genotipado WT representa el control de uno *wild-type*. En este genotipado también se puede observar que la plántula "6-25" no muestra producto de PCR en ninguna de las

dos reacciones, por lo que se descartaron la muestra y los datos relacionados al no poder genotiparse, este resultado se atribuye que la extracción de ADN no tuvo éxito.

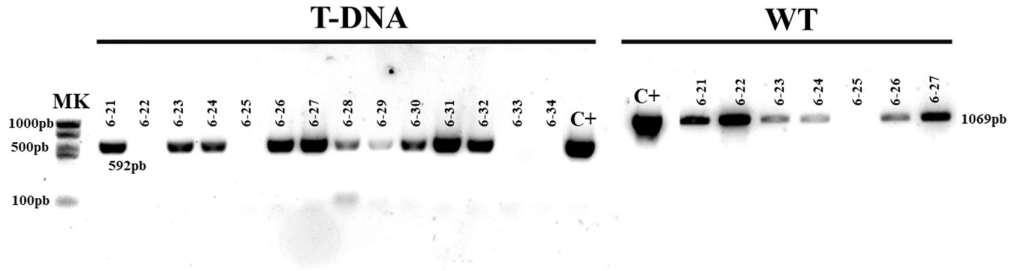

Figura 16 - Genotipado de plántulas progenie de madre *VAMP721-/+ VAMP722-/-*. Gel de agarosa 1 %. Producto de PCR de genotipado del alelo con la inserción de T-DNA (primers 35 y 40). Producto de PCR de genotipado del alelo *wild-type* (primers 39 y 40). MK: marcador de peso molecular.

Como se ilustra en la **figura 17**, en cuanto al largo del hipocotilo a las 96 horas post-estimulación (hpe), se hallaron diferencias significativas con un p-valor < 0,0001 al comparar las plántulas de genotipo heterocigota (*VAMP722-/- VAMP721-/+*) y homocigota (*VAMP722-/- VAMP721+/+*) contra aquellas del genotipo *wild-type* Columbia-0 (*VAMP722+/+ VAMP721+/+).* Las plantas que cuentan con dos copias inalteradas del gen *VAMP721* presentan un hipocotilo un 17% más corto que las *wild-type* y aquellas que cuentan con una sola copia inalteradas del gen *VAMP721* muestran un hipocotilo un 20% más corto.

No se observaron diferencias significativas en el largo del hipocotilo a las 96 hpe al comparar las plantas que tienen una sola copia del gen *VAMP721* con las que tienen dos, aunque sí se podría ver una tendencia a un menor largo en las plántulas que cuentan con un solo alelo del gen. (p-valor < 0.34)

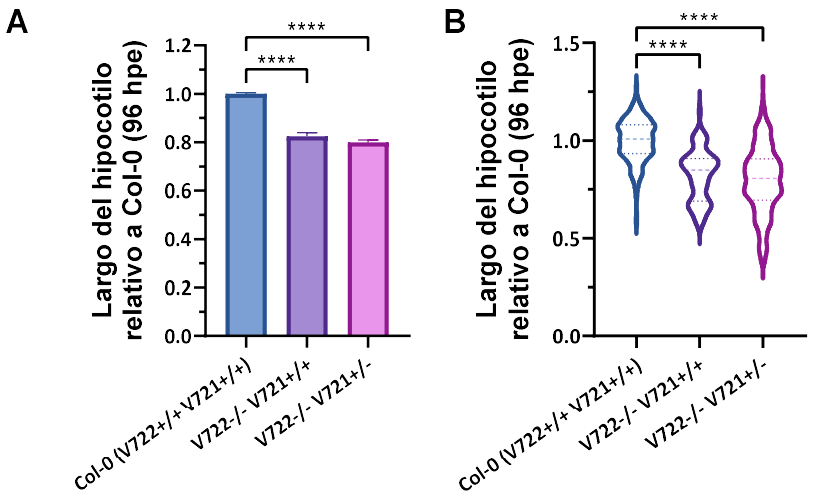

Figura 17 - Efecto de la dosis génica de *VAMP721* en elongación de hipocotilo. Largo del hipocotilo a las 96 hpe relativo a Col-0. **(A)** Media del largo del hipocotilo a las 96 horas post-estimulación de la germinación (hpe) relativo al largo del hipocotilo de las plántulas *wild-type* Columbia-0 (*VAMP722+/+ VAMP721+/+)*. Las barras de error representan el error de la media (SEM). **(B)** Gráfico de violín del largo del hipocotilo relativo a Col-0. (****** = p-valor < 0,0001** por análisis estadístico ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples.) **(n=478, 69, 300)**

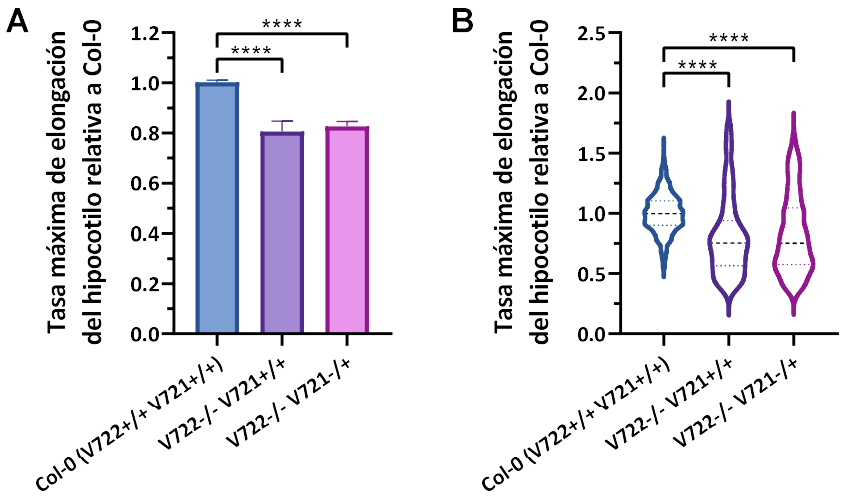

Figura 18 – Efecto de la dosis génica de *VAMP721* en elongación de hipocotilo. Tasa máxima de elongación del hipocotilo relativa a Col-0. **(A)** Media de la tasa máxima de elongación del hipocotilo relativa a Col-0 (*VAMP722+/+ VAMP721+/+*). Las barras de error representan el error de la media (SEM). **(B)** Gráfico de violín de la tasa máxima de elongación del hipocotilo relativa a Col-0. (****** = p-valor < 0,0001** por análisis estadístico ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples.) **(n=478, 69, 300)**

La tasa máxima de elongación del hipocotilo **(Fig. 18)** se encontró entre las 72 hpe y las 48 hpe para la mayoría de las plántulas de todos los genotipos, denotando un comportamiento de elongación acelerada del hipocotilo pasadas 48 hs del shock lumínico. Tanto las plántulas de genotipo *VAMP722-/- VAMP721*+/+ como de genotipo *VAMP722-/- VAMP721-/+* presentaron una tasa máxima de elongación significativamente más lenta que las plántulas *wild-type* (p-valor < 0.0001), pero, al igual que en el caso del largo relativo a las 96 hpe, no se hallaron diferencias significativas entre las plántulas que poseen una o dos copias de *VAMP721*.

6.b. Efecto de la mutación puntual de la tirosina 57 de VAMP721

El efecto de la mutación puntual en el residuo tirosina 57 de VAMP721 se evaluó en plantas carentes de VAMP721/2 endógena mediante pruebas de germinación y mediante ensayos de crecimiento etiolado.

En la **figura 19** se muestra la fluorescencia de plántulas con distintas versiones de la proteína VAMP721, fusionada a GFP y MYC por su extremo N-terminal, y una plántula control de genotipo Columbia-0. Las plántulas rescatadas con las distintas versiones de VAMP721 son de fondo genético carente de *VAMP721/2*. Cualitativamente, se observaron niveles de fluorescencia similares para las plántulas que expresan la proteína VAMP721 (n=50), VAMP721^{Y57A} (n=75) y VAMP721^{Y57F} (n=50). Se observa fluorescencia en todos los órganos de la planta, pero mayoritariamente en el ápice meristemático apical y en el ápice de la raíz.

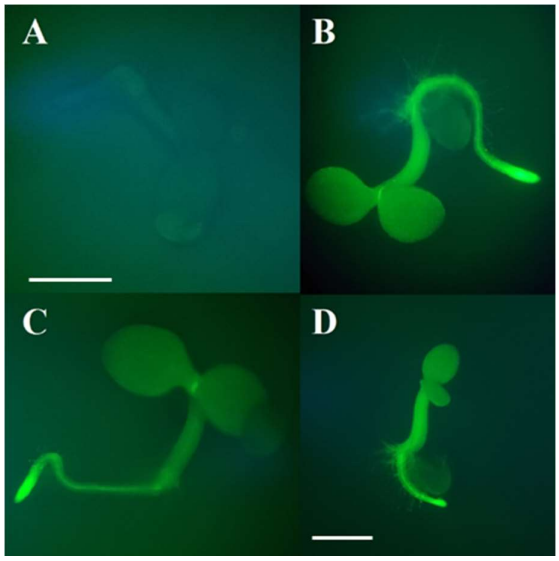

Figura 19 – Fluorescencia de GFP en plántulas *wild-type* y rescatadas con VAMP721. (A) Columbia-0 (control negativo) **(B)** VAMP721 **(C)** VAMP721^{Y57A} **(D)** VAMP721^{Y57F}. Las plantas B, C y D tienen fondo genético *VAMP721-/- VAMP722-/-*. Barras de escala (A, B, C y D) = 1 mm

6.b.i. Ensayos de germinación

Se realizaron dos réplicas para el genotipo Columbia-0, cuatro réplicas para las plantas de genotipo VAMP721, siete réplicas para plantas de genotipo VAMP721^{Y57A} y seis réplicas para plantas de genotipo VAMP721^{Y57F}.

En la **figura 20** se ilustra el porcentaje de plántulas en cada estadio a las 24 o 48 horas post estimulación. El análisis estadístico consta de una prueba de Kruskal-Wallis, ya que los datos mostraron no ajustarse a una distribución normal, y una posterior comparación múltiple entre genotipos por el test de Dunn. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos al analizar los porcentajes de plántulas de cada genotipo que habían alcanzado cada estadio en los tiempos mencionados. (p-valor > 0,999)

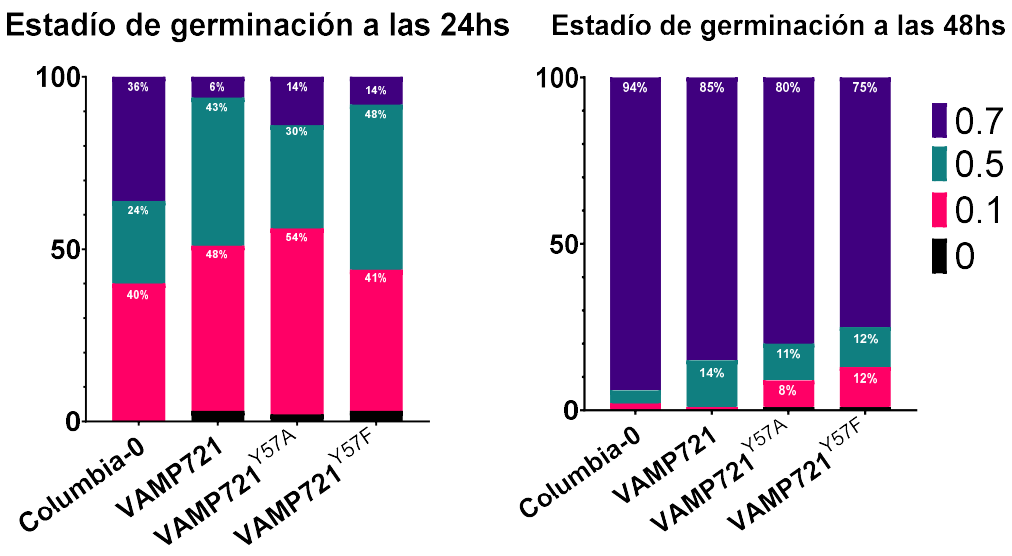

Figura 20 – Pruebas de germinación. Porcentaje de plántulas en cada estadio de germinación a las 24 y 48 hpe. Número de réplicas por genotipo = 2, 4, 7, 6

6.b.ii. Elongación de hipocotilo

Se evaluó la elongación del hipocotilo en plantas de genotipo VAMP721, VAMP721^{Y57A} y VAMP721^{Y57F}. **(Fig. 21 y 22)**

Se evaluó el largo a las 96 horas relativo al control rescatado con la proteína *wild-type* y se encontraron diferencias significativas entre todos los genotipos analizados: las plantas control mostraron un largo de hipocotilo mayor que sus contrapartes que poseen el residuo tirosina 57 mutado, tanto por alanina como por fenilalanina. Las plantas con mutación por fenilalanina presentan el largo de hipocotilo más corto de los tres genotipos, seguido por las mutantes por alanina y las plantas control presentaron el hipocotilo más largo de los evaluados.

El análisis estadístico de la tasa máxima de elongación del hipocotilo resultó significativo al comparar contra el control las plantas que poseen la proteína VAMP721 mutada, pero ambas mutantes mostraban una velocidad máxima de crecimiento similar entre ellas.

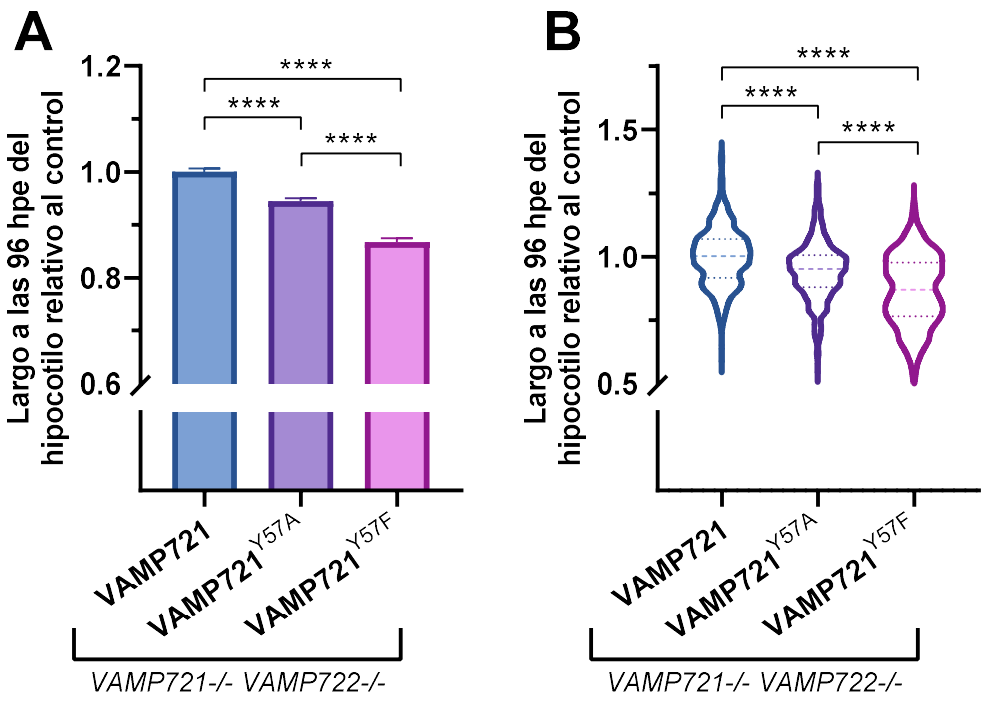

Figura 21 - Efecto de mutaciones en VAMP721^{Y57}. Largo del hipocotilo relativo al control. (A) Media del largo del hipocotilo relativo al largo de las plántulas rescatadas con el gen *wild-type* (VAMP721 en fondo genético *VAMP722-/- VAMP721-/-*). Las barras de error representan el error de la media (SEM). **(B)** Gráfico de violín del largo del hipocotilo relativo al control. (****** = p-valor < 0,0001** por análisis estadístico ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples.) **(n=300, 368 y 320)**

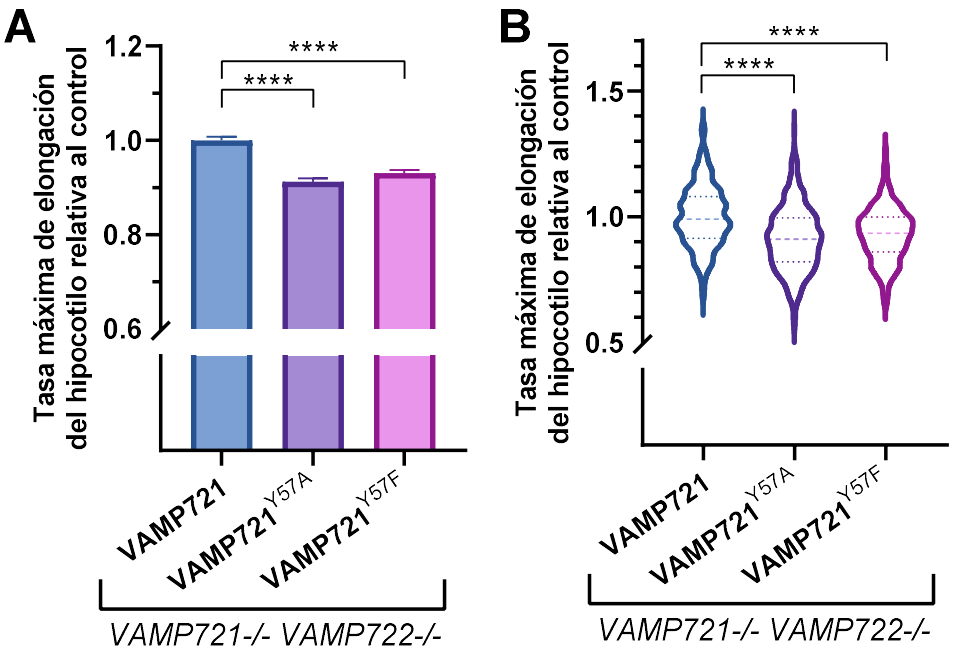

Figura 22 – Efecto de mutaciones en VAMP721^{Y57}. Tasa máxima de elongación del hipocotilo relativa al control. (A) Media de la tasa máxima de elongación del hipocotilo relativo a la de plántulas rescatadas con el gen *wild-type* (VAMP721 en fondo genético *VAMP722-/- VAMP721-/-*). Las barras de error representan el error de la media (SEM). **(B)** Gráfico de violín de la tasa máxima de elongación del hipocotilo relativa al control. (****** = p-valor < 0,0001** por análisis estadístico ANOVA de un factor y test de Tukey para comparaciones múltiples.) **(n=247, 338 y 264)**

6.c. Clonado para edición génica inducible de VAMP721-GFP mediante CRISPR/Cas9

Para el primer clonado se utilizó el vector **pRU319** como vector de partida. El primer clonado consistió en una reacción LR de la técnica de clonado Gateway para reemplazar la secuencia codificante de la proteína tóxica para bacterias, CcdB, por dos pares de guías que habían sido diseñadas para dirigir a la enzima Cas9 simultáneamente hacia la región codificante de VAMP721 y de GFP, en plantas transgénicas de fondo genético *VAMP721-/- VAMP722-/-* complementadas con la construcción pVAMP721::GFP:VAMP721. De esta manera, al momento de la activación se eliminará del genoma vegetal un fragmento que incluya la secuencia codificante de la proteína GFP

y de VAMP721. Los vectores producto de este primer clonado se denominaron **d044** y **d045** y difieren solo en la secuencia de las guías de gRNA contra *VAMP721* que poseen.

Una vez llevada a cabo la reacción LR, se transformaron por separado bacterias *E. coli* competentes con los plásmidos obtenidos y se purificó el ADN plasmídico de cada colonia proveniente de un único evento de transformación. Con el objetivo de confirmar que estas bacterias hayan sido transformadas correctamente y porten el plásmido con el inserto, y no con el plásmido sin modificar, se realizó un *screening* por digestión con la enzima de restricción NcoI. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa para evidenciar las bandas de ADN y asignarle a cada fragmento un peso molecular mediante el uso de un marcador de peso molecular. En paralelo se corrieron también alícuotas de ambos vectores sin digerir como control negativo de la digestión. Como las bacterias fueron cultivadas en placas de medio LB agar 1 % suplementado con espectinomicina como agente de selección, siendo que el plásmido les otorga a las bacterias resistencia a este compuesto bacteriostático, solo producirán colonias aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido.

Por los resultados expuestos en la **figura 23** se puede evidenciar que todas las muestras sometidas a digestión con NcoI contienen el vector clonado exitosamente. Esto se corrobora al comparar el peso de los fragmentos que permitirían diferenciar entre el vector sin modificar (**pRU319**) y los vectores modificados (**d044** y **d045**). Adicionalmente, como este *screening* se realizó a partir del producto de purificación de ADN plasmídico bacteriano y en el clonado se reemplazó la secuencia codificante de la proteína tóxica CcdB por el inserto de interés, era esperable que ninguna de las colonias obtenidas producto de la transformación contenga el plásmido sin modificar, ya que la incorporación de este plásmido en la bacteria resultaría en la muerte de la misma.

En las calles correspondientes a los vectores sin cortar se pueden observar al menos dos bandas de ADN que corresponden a las distintas conformaciones del vector, cuya migración en el gel de agarosa se ve afectada por su forma y no solo por su carga. Esto ocurre porque el ADN plasmídico es circular y en este caso se puede encontrar principalmente en dos formas denominadas topoisómeros; en una forma relajada circular o en una forma superenrollada en la cual se encuentra tan compactado que reduce la resistencia del medio al movimiento de la molécula, avanzando más rápidamente y por lo tanto migrando más distancia en el gel.

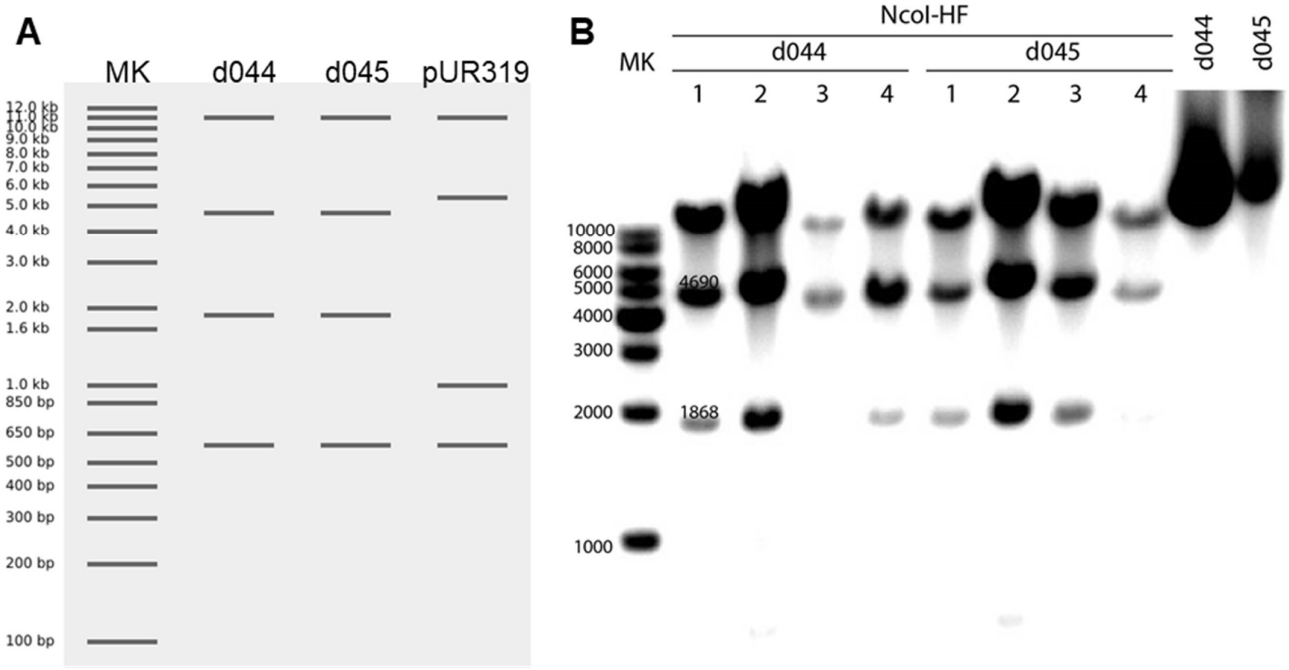

Figura 23 – *Screening* de d044 y d045 por digestión con NcoI. (A) Digestión virtual de los vectores. **(B)** *Screening* de d044/5 por digestión con la enzima de restricción NcoI en gel de poliacrilamida revelado en luz UV. MK: marcador de peso molecular. Las últimas dos calles corresponden a controles negativos con los vectores no digeridos.

Los vectores **d044** y **d045** purificados poseen la proteína Cas9 bajo control de un promotor de óvulo, por lo cual el paso siguiente fue reemplazar este promotor de manera que la transcripción de la proteína Cas9 fuera inducible por un compuesto exógeno y administrable a las plantas, que en este caso es estradiol. El siguiente paso consistió en reemplazar el promotor de ovario, pEC, de **d044/5** por la secuencia codificante de la proteína XVE bajo control de un promotor constitutivo y, por otro lado, el promotor pLex río arriba de la secuencia codificante de Cas9.

En primer lugar, para obtener estos insertos se partió desde un vector que poseía ambas secuencias (V414). Con este vector como molde, se realizó una PCR con *primers* específicos de manera de agregar, en los bordes correspondientes, extremos protruyentes para poder introducirlos en los plásmidos **d044/5**. El producto de PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 1% junto con un marcador de peso molecular, el gel fue revelado con luz UV y se observaron bandas del peso esperado. **(Fig. 24)**

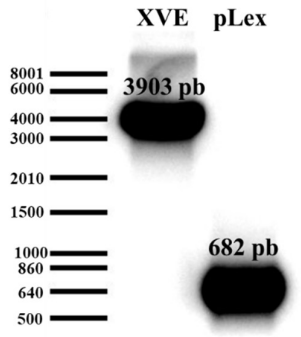

Figura 24 – Producto de PCR de XVE y pLex. Gel de agarosa 1% sometido a electroforesis revelado en luz UV.

Se llevo a cabo el protocolo de purificación de producto de PCR y se cuantificaron las muestras, obteniéndose una concentración de 119,4 ng/µl para el fragmento codificante de XVE con un promotor constitutivo y de 103,8 ng/µl para el fragmento que codifica el promotor pLex. Posteriormente, la cuantificación de pLex fue corroborada por Qubit para utilizarla como patrón en la cuantificación por gel de los vectores.

Para eliminar el promotor de ovario, pEC, de los vectores **d044** y **d045** se digirieron los vectores con la enzima de restricción KpnI. Luego, para poder calcular las cantidades de cada fragmento para la reacción de GA, se cuantificaron cada uno de los vectores por comparación en gel de agarosa con una muestra de concentración conocida. **(Fig. 25, A)** Para esto, se confeccionó una curva de calibración con los datos de intensidad de banda medidos en ImageJ utilizando diluciones seriadas del producto de PCR de pLex. Se realizaron dos réplicas técnicas **(Fig. 25, B)** y se utilizó la curva de mejor índice de correlación para calcular la concentración de cada uno de los vectores digeridos. Teniendo en cuenta el volumen de cada vector que se sembró en el gel y el largo en pares de bases de los mismos, se calcularon las concentraciones de los vectores como 30,5 ng/µl para **d044** y 27 ng/µl para **d045**.

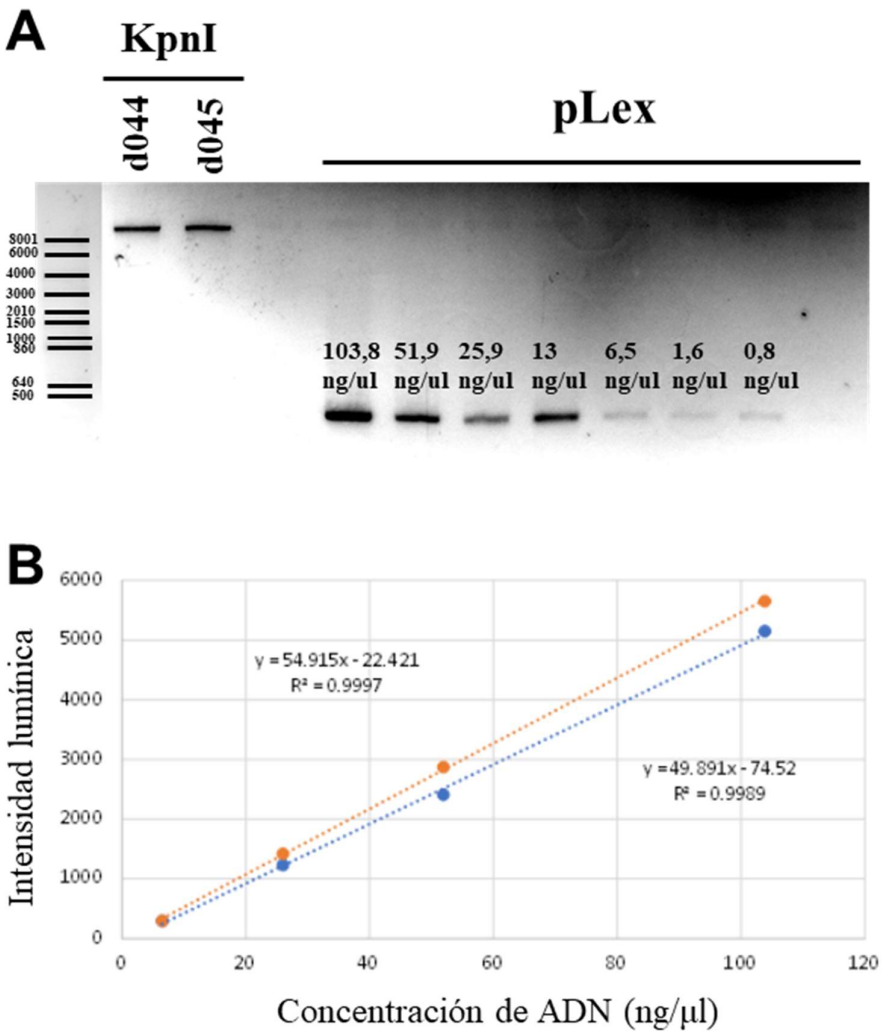

Figura 25 – Cuantificación por gel de d044 y d045. (A) Cuantificación de los vectores **d044** y **d045** digeridos con la enzima de restricción KpnI en gel de poliacrilamida revelado en luz UV. **(B)** Curva de calibración de la intensidad de las bandas de ADN en relación a la concentración de ADN de la muestra. Las curvas naranja y azul corresponden a réplicas técnicas.

Se optó por no realizar un paso de purificación del vector desde el gel porque se consideró que la concentración del mismo ya era demasiado baja siendo que este proceso la disminuiría aún más. Entonces se llevó a cabo la reacción de GA utilizando el vector digerido con KpnI pero no purificado. En esta reacción se busca agregar a los vectores **d044** y **d045** la secuencia codificante de la proteína XVE bajo control del promotor de ubiquitina y el promotor pLex para el gen de la proteína Cas9. Logrado esto, los vectores pasaran a llamarse **d046** (a partir de **d044**) y **d047** (a partir de **d045**).

Una vez terminada la reacción de GA, se transformaron bacterias *E. coli* electrocompetentes y mediante un screening por *colony*-PCR **(Fig 26)** se observó que fue mayor la eficiencia de la reacción de GA con el plásmido **d047**, obteniéndose 9 clones positivos en este *screening*, mientras que con el plásmido **d046** solo 3 clones de los 10 evaluados resultaron ser positivos. Como se buscaba diferenciar entre bacterias que tuvieran el plásmido **d046/7** de aquellas que tuvieran **d044/5**, la *colony*-PCR se realizó contra el fragmento del promotor pLex.

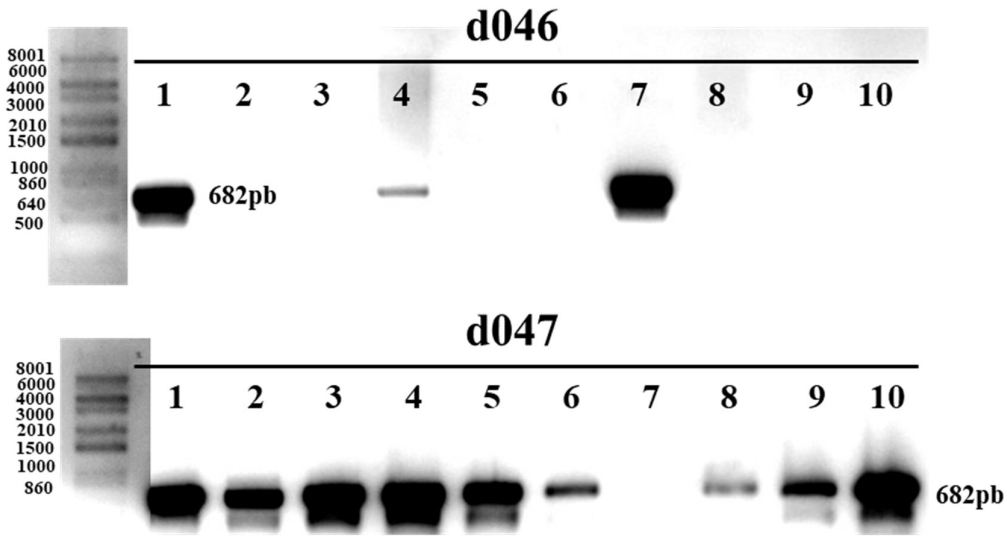

Figura 26 – *Screening* por *colony*-PCR de d046 y d047. Producto de PCR para el fragmento de pLex a partir de *E. coli* transformadas con los plásmidos d046 y d047. Gel de poliacrilamida con bromuro de etidio revelado en luz UV.

Una vez finalizada la *colony*-PCR se seleccionaron 3 clones de cada vector y se realizó un *screening* adicional por digestión con la enzima de restricción NcoI, esperando distinguir entre aquellos clones que tengan los vectores d044/5 y los que tengan d046/7. **(Fig. 27)** En este caso se identificó un solo clon positivo para d046 y tres para d047.

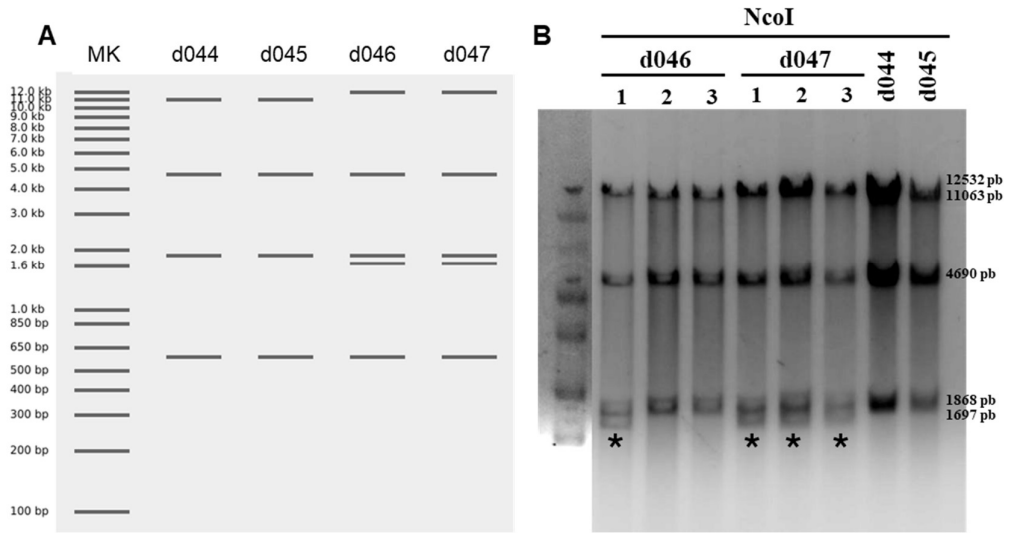

Figura 27 – *Screening* de d046 y d047 por digestión con NcoI. (A) Digestión virtual de los vectores. **(B)** *Screening* de d046/7 por digestión con la enzima de restricción NcoI en gel de poliacrilamida con bromuro de etidio revelado en luz UV. Se utilizaron los vectores purificados d044 y d045 como controles negativos. Los asteriscos (*) marcan los clones positivos para d046 o d047.

Finalmente, los clones que resultaron positivos en ambos *screenings* fueron secuenciados exitosamente, obteniéndose los dos vectores d046 y d047 con dos pares de guías de RNA, la enzima Cas9 bajo control del promotor pLex, que es inducible por el factor de transcripción XVE que, a su vez, es activado por estradiol. Todos los fragmentos se encuentran entre los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) reconocibles por *A. tumefaciens* para el paso de transgénesis vegetal. **(Fig. 28)**

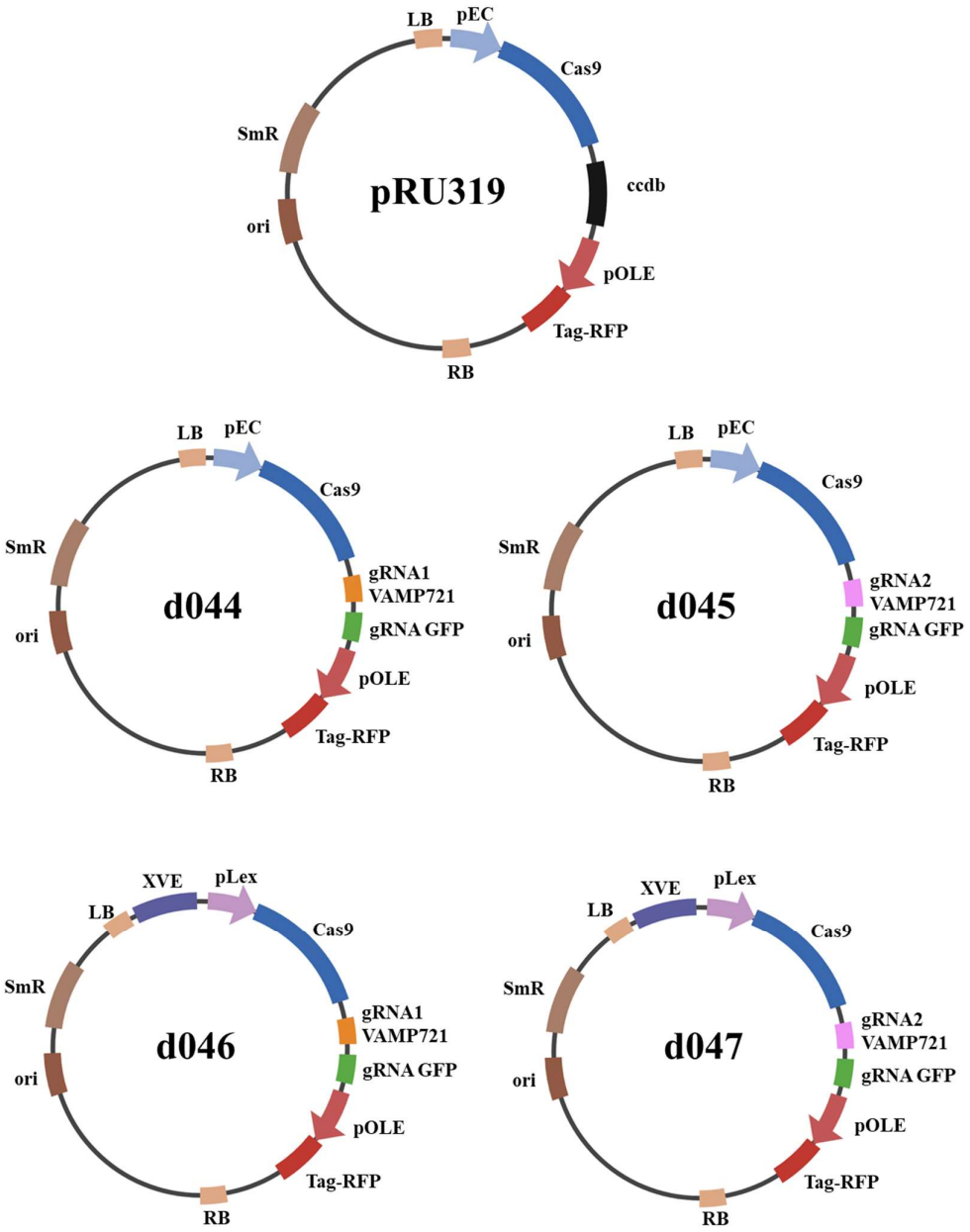

Figura 28 – Vectores pRU319, d044, d045. d046 y d047.

Una vez amplificados los vectores fueron transformados en *A. tumefaciens* por electroporación satisfactoriamente. Se obtuvieron colonias independientes de las bacterias transformadas al plaquearlas en medio LB 1 % agar suplementado con rifampicina, gentamicina y espectinomicina. A partir de estas colonias se realizó un cultivo en medio LB líquido con los antibióticos mencionados para purificar los plásmidos y transformar nuevamente *E. coli* para corroborar que la transformación de *A. tumefaciens* haya sido exitosa.

Por último, se realizó la transformación por *floral dipping* de óvulos de *A. thaliana* de genotipo VAMP721. La transformación de *A. thaliana* se llevó a cabo en ocho plantas en total, cuatro de cada una de las dos líneas independientes disponibles en el laboratorio. Las semillas obtenidas por autofertilización de estas flores portadoras del T-DNA se seleccionaron en lupa de fluorescencia ya que expresan la proteína fluorescente roja (TagRFP) fusionada a la proteína de semilla OLE1 bajo control del promotor de semilla pOLE. **(Fig. 29)**

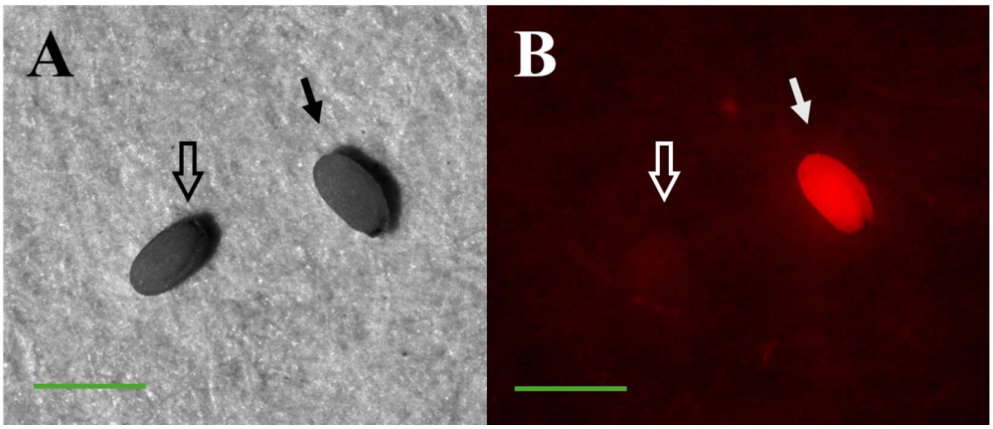

Figura 29 – Selección de semillas de *A. thaliana* progenie de planta transformada con d046 basada en la expresión de pOLE::OLE1-TagRFP específica de semilla. La flecha rellena indica la semilla fluorescente positiva y la flecha vacía indica la semilla negativa. **(A)** Iluminadas con luz blanca. **(B)** Imagen de epifluorescencia. ($\lambda_{exitación}$ = 574,5 – 599,5 nm; $\lambda_{emisión}$ = 612 – 682 nm). Barra de escala en A y B = 1 mm

7. Discusión y conclusiones

Para una mejor organización de la sección y para facilitar el entendimiento, se discutirán por separado los resultados de los ensayos correspondientes a cada objetivo de la tesina.

7.a. Efecto de la dosis génica de VAMP721

En nuestros ensayos, al analizar el genotipo de la progenie de plantas *VAMP721-/+ VAMP722-/-* se observaron los desvíos a las leyes de Mendel que ya habían sido reportados para estos dos locus que no se encuentran ligados (Kwon et al., 2008). Si se cumpliesen las leyes de herencia mendeliana se debería observar un 25% de genotipo *VAMP721+/+ VAMP722-/-*, un 50% *VAMP721-/+ VAMP722-/-*, y un 25% *VAMP721-/- VAMP722-/-*, pero al analizar los genotipados las proporciones genotípicas observadas son muy diferentes. Se registró que un 17,25% de las plantas eran de genotipo *VAMP721+/+ VAMP722-/-*, un 79% de genotipo *VAMP721-/+ VAMP722-/-*, y un 3,75% de genotipo *VAMP721-/- VAMP722-/-*. Estos resultados tampoco coinciden con los reportados previamente, quienes, a pesar de reportar desvíos en la herencia, observaron frecuencias del 38%, 49% y 13%, respectivamente. (Zhang et al., 2015)

Este fenómeno podría ser explicado en parte por un paso inconsciente de selección al momento de sembrar las semillas para realizar el ensayo, si la falta de la proteína tuviera alguna influencia en la calidad de la semilla y se pasara por alto un sesgo al seleccionarlas. Esto es altamente probable ya que ha sido reportado que la embriogénesis se ve afectada por la falta de VAMP721 (Zhang et al., 2015), lo cual podría tener implicancias en el fenotipo de las semillas, aunque esto último aún no ha sido reportado.

Además, se debe tener en consideración que VAMP721 es una proteína cuya mutación acarrea una diferencia en la proporción de éxito de las gametas, ya que la elongación del tubo polínico en el gametofito masculino es un paso fundamental para el éxito reproductivo y, al ser un proceso de elongación celular, es altamente dependiente de la secreción. (Zhang et al., 2011) Como este proceso es dependiente también de las condiciones ambientales, podría explicar el desvío de las frecuencias genotípicas reportadas.

En cuanto a los resultados del análisis de la elongación de hipocotilo, al comparar las plantas control Columbia-0 (*VAMP721+/+ VAMP722+/+)* con las heterocigotas o

con las homocigotas (*VAMP721-/+ VAMP722-/-* o *VAMP721+/+ VAMP722-/-*, respectivamente) las plantas con cuatro copias del gen que codifica las proteínas homólogas mostraron tanto una tasa de elongación más alta como un largo final mayor que sus contrapartes con menor dosaje génico.

De esta manera, es evidente que la dosis génica parecería tener un efecto en el fenotipo, tanto en el largo del hipocotilo como en la tasa máxima de elongación del mismo. El largo del hipocotilo se determinó a las 96 horas post-estimulación (hpe) del shock lumínico. Es importante considerar que diferencias en el tiempo de germinación o el hecho de que los hipocotilos siguen creciendo, podrían enmascarar el potencial de crecimiento final alcanzable por los genotipos. Por esta razón, consideramos más relevante para el análisis la tasa máxima de elongación, que es independiente del tiempo al que germinan las semillas.

Se esperaba que a menor cantidad de copias del gen de *VAMP721* se evidenciara una disminución en estas dos características, sin embargo, nuestros resultados no respaldan esta hipótesis ya que las plantas con una o dos copias de *VAMP721* presentaron fenotipos indistinguibles entre sí. Esto podría ser explicado por un efecto compensatorio por parte del alelo del tipo salvaje de *VAMP721* que ocurra a nivel de la transcripción o de la traducción, y por el cual un aumento en la tasa de alguno o ambos procesos complemente la carencia génica.

Si bien la identidad de secuencia de VAMP721 y VAMP722 es cercana al 92 % y se consideran redundantes en líneas generales, VAMP722 presenta una diferencia en su dominio longina debido a la adición de 9 aminoácidos que VAMP721 no posee, lo que podría sugerir una diferenciación en sus roles. De hecho, se sabe que al menos una parte de las vesículas VAMP721 y VAMP722 están involucradas en distintas vías exocíticas para transportar diferentes cargas (Yun et al., 2023) y se ha reportado que VAMP721 y VAMP722 secretan un subconjunto distinto de proteínas (Uemura et al., 2019), lo que respalda la hipótesis de que estas dos proteínas puedan estar especializadas en diferentes funciones dentro de las células mientras mantienen un alto grado de superposición funcional. Esta información sugiere que podrían existir vías exocíticas diferenciadas en las que VAMP721 y VAMP722 desempeñen funciones especializadas. Para evaluar la redundancia de VAMP722 en la elongación de hipocotilo, restaria realizar experimentos para analizar la dosis génica de VAMP722 y comparar con los resultados obtenidos en esta tesina.

7.b. Efecto de la mutación puntual de la tirosina 57 de VAMP721

Las variantes de VAMP721 elegidas presentan una modificación en la tirosina 57 por alanina (A) o fenilalanina (F), ambos aminoácidos no fosforilables. Como ya fue mencionado, la fosforilación de este residuo es importante para mantener el dominio longina abierto y el dominio de unión a SNARE disponible para interaccionar con otras proteínas de este tipo y permitir así la fusión de membranas. Entonces, con estas mutaciones se esperaba que la fusión de membranas dependiente de VAMP721 se viera afectada, y a su vez todos los procesos que dependen en cierta medida de ello, como es la elongación celular del hipocotilo.

En estas líneas, la dosis génica es la misma ya que trabajamos con líneas transgénicas homocigotas que complementan el fenotipo *VAMP721-/- VAMP722-/-* con diferentes variantes en el residuo 57 (VAMP721^{Y57A} o VAMP721^{Y57F}). Como punto de referencia, utilizamos las líneas transgénicas complementadas con VAMP721 también en homocigosis de forma de asegurar una dosis génica equiparable tanto en cantidad como en el hecho de utilizar VAMP721 como proteína de fusión a GFP. La fusión a GFP nos permitió confirmar de manera cualitativa que las plántulas presentaban la misma fluorescencia aparente y presuntamente expresaban la proteína de fusión en niveles similares. Con este control, determinamos que las diferencias fenotípicas que observamos se deben a deficiencias en la actividad de la proteína, y no a su abundancia.

Antes del análisis de elongación de hipocotilo en las plántulas con la proteína mutada, se hicieron pruebas de germinación de las semillas para evaluar si había alguna diferencia en el tiempo de germinación preexistente que pudiera afectar a la elongación del hipocotilo, pero no se encontraron diferencias significativas entre las semillas analizadas.

Como ya se mencionó, la tirosina es un aminoácido con un grupo p-hidroxibenzólico que le da cierta polaridad, aunque se clasifica como no polar. En la tirosina en posición 57 de VAMP721, el anillo aromático estabiliza la estructura de la lámina beta en el dominio longina.

Los resultados del ensayo de etiolación para las plantas de fondo genético *VAMP721-/- VAMP722-/-* rescatadas con las proteínas VAMP721, VAMP721^{Y57A} o VAMP721^{Y57F} indican que con esta mutación se ve afectado tanto el largo final alcanzado, como la tasa máxima de elongación del hipocotilo.

En cuanto al largo final del hipocotilo, se observaron diferencias significativas al comparar todos los genotipos entre sí, siendo las plantas con el hipocotilo más corto las que poseen la proteína VAMP721^{Y57F}, seguido por las VAMP721^{Y57A} y la mayor media resultó ser la correspondiente a las plantas que cuentan con el transgén con la proteína *wild-type*.

Estos resultados son consistentes con las hipótesis planteadas, ya que, al sustituir la tirosina por fenilalanina se elimina la posibilidad de fosforilación y la regulación de la apertura y cierre por este medio, es de esperar que ambas construcciones sean de menos actividad. Si bien ambas anulan la fosforilación las modificaciones alteran la polaridad del residuo de diferentes maneras. La fenilalanina aumentando aún más la hidrofobicidad de la región mientras que la alanina la dismuye al remover el residuo aromatico. Como ya se mencionó, esta tirosina se encuentra en el dominio longina, que al plegarse sobre el dominio SNARE constituye el estado cerrado de la proteína.

En este sentido, se propone que la fenilalanina podría estar favoreciendo el estado cerrado de VAMP721 ya que su mayor hidrofobicidad induce el plegamiento del dominio SNARE sobre el longina, desplazando el equilibrio hacia la forma cerrada de la proteína y afectando negativamente la capacidad de fusión de membranas. De hecho, se ha demostrado por ensayos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) que al reemplazar dos residuos aromáticos del dominio longina (tirosina 57 y fenilalanina 55) por alaninas se ve favorecido el estado abierto de VAMP721. Sin embargo, cuando se reemplaza únicamente la tirosina 57 por alanina se observa que la proteína se mantiene en un estado cerrado similar al del control sin modificaciones. (Zhang et al., 2017). En concordancia a los ensayos *in vitro*, obtuvimos similar efecto fisiológico de estas mutaciones donde VAMP721^{Y57A} fue un poco más activo que VAMP721^{Y57F}.

Por otro lado, la tasa máxima de elongación del hipocotilo también se vio afectada con la mutación de la tirosina 57. Las plantas que portan la versión de la proteína mutada por alanina o fenilalanina muestran de manera similar un descenso en la velocidad máxima de elongación respecto a las que presentan la proteína VAMP721. Como ya se discutió, se estima que esta respuesta puede deberse a que, como la fosforilación de la tirosina 57 en condiciones normales favorece el estado abierto de la proteína, en las mutantes no fosforilables se vería favorecido el estado cerrado del dominio longina sobre el SNARE, impidiéndose así el reconocimiento de otras proteínas SNAREs con las que interactúa VAMP721 para la fusión de membranas.

En conjunto, al analizar la tasa máxima de elongación y el largo final alcanzado del hipocotilo de las plántulas se propone que las plántulas con VAMP721^{Y57A} mantendrían la tasa máxima de elongación durante más tiempo y esto podría explicar un mayor largo final que las que cuentan con la mutación por fenilalanina (VAMP721^{Y57F}). Sin embargo, no se cuenta con mediciones de la tasa de elongación instantánea, por lo cual no se puede confirmar esta hipótesis por el momento.

De cualquier modo, si bien hemos observado que las variantes mutantes solo rescatan el fenotipo en homocigosis (Ricardi et al., 2023 y datos no publicados), es evidente que la fosforilación de la tirosina 57 no resulta vital para la viabilidad celular, lo cual podría sugerir la influencia de otros residuos en la transición entre el estado abierto y cerrado de la proteína.

7.c. Conclusiones y perspectivas

Nuestros resultados en conjunto muestran, en líneas generales, que tanto la dosis génica como la activación de VAMP721 por fosforilación son factores importantes para la elongación del hipocotilo, en especial dado que este es un proceso que requiere una alta secreción en la cual VAMP721 juega un rol fundamental. Esta tesina constituye el primer trabajo que muestra la influencia de la abundancia y nivel de actividad de VAMP721 en la expansión celular de hipocotilos y es, a excepción de un trabajo sobre respuesta inmune vegetal (Kim et al., 2021), el único que muestra un fenotipo claro para las mutantes simples VAMP722 -/-.

En base al trabajo que constituye esta tesina, se plantean múltiples perspectivas a futuro, las cuales incluyen; la realización de ensayos utilizando el software CronoRoot (Gaggion et al., 2021) para medición de hipocotilos, el cual se entrenó en base a la segmentación de imágenes utilizadas en esta tesina y también el análisis del efecto de estas mutaciones en otros procesos dependientes de tráfico vesicular como elongación de pelos radiculares o del tubo polínico.

Finalmente, queda pendiente la evaluación del fenotipo de plantas editadas genéticamente a partir de los plásmidos obtenidos, tras la inducción con estradiol en distintos estadios del desarrollo, en el reciclado de vesículas o en procesos fisiológicos altamente dependientes de la secreción vesicular, como es, por ejemplo, la respuesta inmune vegetal.

Durante el desarrollo de esta tesina de licenciatura, la tesinista adquirió conocimiento de las numerosas técnicas de biología molecular aquí detalladas y se lograron avances consistentes en la línea de investigación del laboratorio del Dr. Ricardi.

8. Referencias bibliográficas

Boyes, D.C., Adel M. Zayed, Robert Ascenzi, Amy J. McCaskill, Neil E. Hoffman, Keith R. Davis, Jörn Görlach (2001) Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. The Plant Cell, vol. 13, no. 7, pp. 1499–510, DOI: 10.1105/TPC.010011.

Burgo, A., Casano, A. M., Kuster, A., Arold, S. T., Wang, G., Nola, S., Verraes, A., Dingli, F., Loew, D., & Galli, T. (2013). Increased activity of the Vesicular Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor TI-VAMP/VAMP7 by Tyrosine Phosphorylation in the Longin Domain. Journal of Biological Chemistry, 288(17), 11960–11972. DOI: 10.1074/jbc.M112.415075.

Cermesoni, C., Grefen, C., & Ricardi, M. M. (2024). Where R-SNAREs like to roam - the vesicle-associated membrane proteins VAMP721 & VAMP722 in trafficking hotspots. Current opinion in plant biology, 81, 102571. DOI: 10.1016/j.pbi.2024.102571

El Kasmi, F., Wang, X., Tian, H., et al. (2013). SNARE complexes of different composition jointly mediate membrane fusion in Arabidopsis. Molecular Biology of the Cell, 24(12), 1-12. DOI: 10.1091/mbc.E13-02-0074

Enami, K., Ichikawa, M., Uemura, T., Kutsuna, N., Hasezawa, S., Nakagawa, T., Nakano, A., & Sato, M. H. (2009). Differential expression control and polarized distribution of plasma membrane-resident SYP1 SNAREs in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 50(2), 280–289. DOI: 10.1093/pcp/pcn197

Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(26), 15781–15786. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15781

Gaggion, N., Ariel, F., Daric, V., Lambert, É., Legendre, S., Roule, T., Camoirano, A., Milone, D., Crespi, M., Blein, T. (2021). ChronoRoot: High-throughput phenotyping by deep segmentation networks reveals novel temporal parameters of plant root system architecture. GigaScience. 10. DOI: 10.1093/gigascience/giab052

Ichikawa, M., Hirano, T., Enami, K., Fuselier, T., Kato, N., Kwon, C., Voigt, B., Schulze-Lefert, P., Baluška, F., & Sato, M. H. (2014). Syntaxin of plant proteins SYP123 and SYP132 mediate root hair tip growth in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 55(4), 790–800. DOI: 10.1093/pcp/pcu048

Jumper, J. Evans, R., Pritzel, A., et al. (2021) "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." Nature, 596, pages 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2

Jürgens, G. (2005). Cytokinesis in Higher Plants. Annual Review of Plant Biology, 56, 281-299. DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141636

Kim S, Kim H, Park K, Cho DJ, Kim MK, Kwon C, Yun HS. (2021) Synaptotagmin 5 Controls SYP132-VAMP721/722 Interaction for Arabidopsis Immunity to Pseudomonas syringae pv tomato DC3000. Mol Cells.; 44(9):670-679. DOI: 10.14348/molcells.2021.0100.

Kwon, C., Neu, C., Pajonk, S. et al. (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. Nature 451, 835–840. DOI: 10.1038/nature06545

Lipka, V., Kwon, C., & Panstruga, R. (2007). SNARE-ware: The role of SNARE-domain proteins in plant biology. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 23, 147–174. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506

Martinez-Arca, S., Rudge, R., Vacca, M., Raposo, G., Camonis, J., Proux-Gillardeaux, V., Daviet, L., Formstecher, E., Hamburger, A., Filippini, F., D'Esposito, M., & Galli, T. (2003). A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 100(15), 9011–9016. DOI: 10.1073/pnas.1431910100

Megías M, Molist P, Pombal MA. (2023) Atlas de histología vegetal y animal. http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html

More, K., Klinger, C. M., Barlow, L. D., & Dacks, J. B. (2020). Evolution and natural history of membrane trafficking in eukaryotes. Current Biology, 30(12), 1–12. DOI: 10.1016/j.cub.2020.03.068

Provart, N.J., Alonso, J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangl, J., Ehrhardt, D., Friesner, J.D., Frommer, W.B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., Shanklin, J., Somerville, C., Stitt, M., Torii, K.U., Waese, J., Wagner, D. and McCourt, P. (2016), 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. New Phytol, 209: 921-944. DOI: 10.1111/nph.13687

Ricardi MM, Wallmeroth N, Cermesoni C, Mehlhorn DG, Richter S, Zhang L, Mittendorf J, Godehardt I, Berendzen KW, von Roepenack-Lahaye E, Stierhof YD, Lipka V, Jürgens G, Grefen C. (2023) A tyrosine phospho-switch within the Longin domain of VAMP721 modulates SNARE functionality. Plant J. 2023 Dec;116(6):1633-1651. doi: 10.1111/tpj.16451.

Slane, D., Reichardt, I., El Kasmi, F., Bayer, M. and Jürgens, G. (2017), Evolutionarily diverse SYP1 Qa-SNAREs jointly sustain pollen tube growth in Arabidopsis. Plant J, 92: 375-385. DOI: 10.1111/tpj.

Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R., Nakano, A., Takeyasu, K., Sato, M. (2004). Systematic Analysis of SNARE Molecules in Arabidopsis: Dissection of the post-Golgi Network in Plant Cells. Cell structure and function, 29(1), 49-65. DOI: 10.1247/csf.29.49

Uemura, T., Nakano, R. T., Takagi, J., Wang, Y., Kramer, K., Finkemeier, I., Nakagami, H., Tsuda, K., Ueda, T., Schulze-Lefert, P., & Nakano, A. (2019). A Golgi-released subpopulation of the trans-Golgi network mediates protein secretion in Arabidopsis. Plant Physiology, 179(2), 519–532. DOI: 10.1104/pp.18.01228

Ursache, R., Fujita, S., Dénervaud Tendon, V. et al. (2021) Selección combinada de semillas fluorescentes y ensamblaje multiplexado de CRISPR/Cas9 para la generación rápida de múltiples mutantes de Arabidopsis. Plant Methods 17, 111. DOI: 10.1186/s13007-021-00811-9

Yi, C., Park, S., Yun, H. S., & Kwon, C. (2013). Vesicle-associated membrane proteins 721 and 722 are required for unimpeded growth of Arabidopsis under ABA application. Journal of Plant Physiology, 170(5), 529–533. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.11.001

Yun, H.S., Sul, W.J., Chung, H.S., Lee, J.-H. and Kwon, C. (2023), Secretory membrane traffic in plant–microbe interactions. New Phytol, 237: 53-59. DOI: 10.1111/nph.18470

Zhang, B., Karnik, R., Waghmare, S., Donald, N., & Blatt, M. R. (2017). VAMP721 conformations unmask an extended motif for K+ channel binding and gating control. Plant Physiology, 173(1), 536–551. DOI: 10.1104/pp.16.01549

Zhang, L., Zhang H., Liu P., Hao H., Jin J.B., et al. (2011) Arabidopsis R-SNARE Proteins VAMP721 and VAMP722 Are Required for Cell Plate Formation. PLOS ONE 6(10): e26129. DOI: 10.1371/journal.pone.0026129

Zhang, L., Li, W., Wang, T. (2015) Requirement of R-SNAREs VAMP721 and VAMP722 for the gametophyte activity, embryogenesis and seedling root development in Arabidopsis. Plant Growth Regul 77, 57–65 . DOI: 10.1007/s10725-015-0035-0