



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Estudio del rol de la ARN helicasa ISE2 en la regulación
de los plasmodesmos (PD) y en la señalización
cloroplasto-núcleo-PD en plantas de *Arabidopsis thaliana***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Ciencias Biológicas

Lic. NICOLÁS CARLOTTO

Director: **Dr. Ken Kobayashi**

Directora Asistente: **Dra. Sonia Wirth**

Consejero de Estudios: **Dr. Omar Coso**

Lugar de trabajo: **Laboratorio de Agrobiotecnología (Grupo Biología Molecular Vegetal Aplicada)**, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular (DFBMC) – Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental Aplicada (IBBEA), FCEN UBA – CONICET

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina – Mayo de 2019

Estudio del rol de la ARN helicasa ISE2 en la regulación de los plasmodesmos (PD) y en la señalización cloroplasto-núcleo-PD en plantas de *Arabidopsis thaliana*

RESUMEN

INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 (ISE2) codifica una presunta helicasa de ARN de tipo DEVH-box originalmente identificada a partir de una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la apertura de los plasmodesmos (PD). La delección de *ISE2* afecta también la actividad de los cloroplastos, disminuye la acumulación de pigmentos fotosintéticos y altera la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis. En este trabajo demostramos la localización cloroplástica de ISE2 y estudiamos su rol en el procesamiento del ARN plastídico y, consecuentemente, en las funciones de los PD. Los ARN cloroplásticos de tipo II conteniendo intrones muestran un empalme defectuoso en las mutantes *ise2* y en plantas con *ISE2* silenciado, lo que compromete la viabilidad del plástido. Además, ensayos de inmunoprecipitación de ARN sugieren que ISE2 interactúa *in vivo* con varios ARNs regulados por empalme. Finalmente, mostramos que la mutante *clpr2* (con defectos en una subunidad del complejo de proteasas Clp en el cloroplasto) también exhibe un funcionamiento anormal de los PD durante la embriogénesis, apoyando la idea de que el procesamiento de ARN cloroplástico es requerido para regular la comunicación célula a célula en las plantas.

PALABRAS CLAVE: Plasmodesmos – Cloroplasto – Helicasa de ARN – Comunicación intercelular – Señalización retrógrada

**Studying the role of ISE2 RNA helicase on plasmodesmata
(PD) regulation and on chloroplast-nucleus-plasmodesmata
signalling in *Arabidopsis thaliana***

ABSTRACT

INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 (ISE2) encodes a putative DEVH-box RNA helicase originally identified through a genetic screening for *Arabidopsis* mutants altered in plasmodesmata (PD) aperture. Depletion of *ISE2* also affects chloroplasts activity, decreases accumulation of photosynthetic pigments and alters expression of photosynthetic genes. In this work, we show the chloroplast localization of ISE2 and decipher its role in plastidic RNA processing and, consequently, PD function. Group II intron-containing RNAs from chloroplasts exhibit defective *splicing* in *ise2* mutants and *ISE2*-silenced plants, compromising plastid viability. Furthermore, RNA immunoprecipitation suggests that ISE2 binds in vivo to several *splicing*-regulated RNAs. Finally, we show that the chloroplast *clpr2* mutant (defective in a subunit of a plastidic Clp protease) also exhibits abnormal PD function during embryogenesis, supporting the idea that chloroplast RNA processing is required to regulate cell-cell communication in plants.

KEYWORDS: Plasmodesmata – Chloroplast – RNA helicase – Intercellular communication – Retrograde signalling

AGRADECIMIENTOS

A mis viejes. Por estar siempre. Por ser como son. Porque sin su apoyo difícilmente hubiera llegado a este momento. Y porque a medida que pasa el tiempo, más los comprendo como personas, y más los quiero como padre y madre.

A Barbi mi compañera, por haber experimentado enteramente a su lado esta etapa. Por el amor y por mostrarme otras formas de ver las cosas. Y por bancarme, incluso durante la escritura, que estuve imbancable.

A Barbi mi hermana, porque en estos años supimos reencontrarnos.

A familia y amigxs, por ser lo fundamental de la vida.

Al Bono y al Bowie, por el amor interespecífico.

A la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Por la educación pública, gratuita y de primer nivel. Por formarme en muchos aspectos, además del académico.

Al CONICET, por darme la oportunidad, durante cinco años, de aprender como becario qué es esto de hacer ciencia.

Al Banco Central de la República Argentina, por permitirme comenzar mi camino en la ciencia con tranquilidad.

A la organización del IPMB 2015 y a Eduardo Zabaleta por invitarme a dar mi primera charla en un congreso internacional.

A Jorge Muschietti, Ezequiel Petrillo, José Estévez, Omar Coso, Alberto Kornblihtt, Martín Mecchia (y el resto de los jurados propuestos) por la predisposición para que pueda cumplir con los requerimientos del doctorado.

A compañeros y compañeras del IFIBYNE, CM1 y iGem. A la secretaría del DFBMC y personal no docente de la FCEN. Al IBBEA. A Paula, Fabio y Sara por permitirme disponer del microscopio.

A Dani Hochbaum y Martincho del IDH (Instituto Daniel Hochbaum) y a Martín Edreira, porque siempre que los necesité, estuvieron ahí.

A Caro Pérez Castro y grupo y al IBIOBA por la grandísima mano que me brindaron. A Ale Atorresi, por ser una copada y por su ayuda desinteresada.

A Fer Bravo y grupo y al INGEBI, por tener siempre las puertas abiertas, y porque el paper no hubiera salido sin su apoyo. A Euge Segretin por la buena onda de siempre.

A EMBO, al Institut des Sciences du Végétal, a Martín Crespi y a Fede Ariel, por la mejor experiencia que me dio el doctorado.

A Comisión Fulbright Argentina y Ministerio de Educación de la Nación, a la University of Delaware, al Delaware Biotechnology Institute, a Jung Youn Lee y a mi gran amigo Xu, por la otra mejor experiencia que me dio el doctorado.

Al laboratorio de Agrobiotecnología y anexos, por darme la oportunidad durante nueve años de trabajar en ciencia. A compañeros y compañeras de AGBT, del presente y del pasado; a Leo Cossio por el glamour; a Franco Lencina por su meticulosidad; a Garri y Luisma por ser dos grandes personas.

A Magda y Quimey por permitirme ayudarlos en sus inicios como científicos.

A mis amiguitos Franco y Musik, por su amistad.

A Sonia, por mostrarme con su ejemplo cómo se deben hacer las cosas de la manera correcta en el trabajo de laboratorio.

A Nico Furman. Por ser mi maestro de mesada, por todos los años de compañerismo y por la gran amistad que nos une.

Al Maestro Kobayashi. Por ser un gran científico, pero sobre todo por ser un excelente ser humano. Porque lo siga motivando intentar ser un sensei de la vida, y porque su objetivo para conmigo siempre fue claro: mi aprendizaje y crecimiento, como científico y como persona.

A papá y mamá...

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla i.1	Resumen de mecanismos de regulación de los PD	19
Tabla 2.1	Genes nucleares seleccionados para silenciar en <i>N. benthamiana</i> por VIGS.....	118
Figura i.1	Plasmodesmos	5
Figura i.2	Esquema de la regulación del SEL del PD a través de la homeostasis de calosa	13
Figura i.3	Caracterización del gen <i>ISE2</i> y el efecto de su mutación o silenciamiento.....	26
Figura i.4	Etapas del procesamiento de ARN en el cloroplasto	35
Figura i.5	Señales retrógradas asociadas con las mutantes <i>gun</i>	39
Figura i.6	Formación y detoxificación de ROS	43
Figura 1.1	Fenotipos de la línea <i>ISE2</i> -OE doble homocigota para la mutación y el transgén <i>CaMV35S</i> _ISE2:GFP, y de la línea <i>ISE2</i> -SUP	71
Figura 1.2	Expresión de la proteína <i>ISE2</i> :GFP en plantas <i>ISE2</i> -OE e <i>ISE2</i> -SUP	73
Figura 1.3	Localización de <i>ISE2</i> en cloroplastos de plantas <i>ISE2</i> -OE	74
Figura 1.4	Localización intraplastídica de <i>ISE2</i> :GFP.....	75
Figura 1.5	Localización de <i>ISE2</i> :GFP en nucleoides de plantas <i>ISE2</i> -OE.....	77
Figura 1.6	Colocalización de <i>ISE2</i> :GFP y marcadores de nucleoides	78
Figura 1.7	Análisis del splicing de genes cloroplásticos por RT-PCR	81
Figura 1.8	Caracterización de <i>clpr2-2</i> y análisis de los ARNr de las líneas de <i>Arabidopsis</i> usadas	83
Figura 1.9	Análisis del procesamiento de <i>rpl2</i> y <i>atpF</i> por Northern blot	85
Figura 1.10	Análisis del procesamiento de <i>rps12</i> y <i>clpP1</i> genes por Northern blots	87
Figura 1.11	Análisis del procesamiento de transcritos de <i>ycf3</i> por Northern blot	89
Figura 1.12	Cuantificación de los niveles de intrón relativos a los niveles de exón en los transcritos cloroplásticos	91
Figura 1.13	Cuantificación de ARN unidos a <i>ISE2</i> -GFP luego de inmunoprecipitación (RIP)	93

Figura 1.14	Nivel de apertura de los PD en embriones <i>clpr2-2</i>	94
Figura 1.15	Modelo del efecto del cloroplasto en la regulación de los PD.....	101
Figura 2.1	Ensayos de medición de permeabilidad basal en hojas de <i>Arabidopsis</i> mediante la técnica de DANS	108
Figura 2.2	Tinción de depósitos de calosa y análisis de sintetasas de calosa por RT-PCR en las tres líneas de <i>Arabidopsis</i>	111
Figura 2.3	Efecto de daño mecánico en la permeabilidad basal en hojas de <i>Arabidopsis</i> mediante la técnica de DANS.....	112
Figura 2.4	Splicing alternativo en genes localizados en el PD.....	115
Figura 2.5	Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	117
Figura 2.6	Fenotipos de plantas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas mediante VIGS.....	121
Figura 2.7	Análisis por RT-PCR del nivel de silenciamiento en las plantas tratadas con VIGS para cada gen seleccionado.....	122
Figura 2.8	Validación del <i>gating</i>	124
Figura 2.9	Gating GFP y GFP2X en plantas tratadas con VIGS.....	126
Figura 2.10	Tinción de calosa en plantas tratadas con VIGS	127
Figura 2.11	Uso del biosensor Hyper para medir los niveles de H ₂ O ₂	130
Figura 2.12	Alteración de la morfología celular en ISE2-V.....	131
Figura 2.13	Citoesqueleto en las líneas GUS-V e ISE2-V	133

ABREVIATURAS

NOTA: A lo largo de la tesis los genes se escriben con caracteres mayúscula cursiva, los genes mutados se escriben con caracteres minúscula cursiva y las proteínas con caracteres mayúscula. Por ejemplo: ***ISE2*** es el gen que codifica la proteína ***ISE2***; ***ise2*** es el gen mutado (o el organismo mutante). Por otro lado, los genes codificados en el genoma del cloroplasto se escriben con el formato de genes bacterianos, con tres letras en minúscula cursiva más un número y/o una letra mayúscula y las proteínas con la primer letra mayúscula y luego en minúscula sin cursiva. Por ejemplo ***rpl2*** y ***clpP1*** son los genes que codifican las proteínas ***Rpl2*** y ***ClpP1***.

A/ATP	nucleótido de adenina (adenosín trifosfato)
C	nucleótido de citosina (citidina trifosfato)
G	nucleótido de guanina (guanosín trifosfato)
T	nucleótido de timina (timidina trifosfato)
U	nucleótido de uracilo (uridin trifosfato)
°C	grados Celsius
μl	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
2XGFP	dos moléculas de GFP expresadas en tándem
35S	promotor 35S del CaMV
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
CALS	<i>callose synthases</i> (calosa sintetasas)
CFDA	carboxi fluorescein diacetato
cm	centímetro

CP	cloroplasto
d.p.g.	días post germinación
Da/kDa	kiloDaltons/Daltons
DANS	<i>Drop AND See</i>
DE	desvío estándar
DO	densidad óptica
<i>emb</i>	embryonic defective
EtBr	bromuro de etidio
FITC	fluoresceína iso tiocianato
<i>g</i>	aceleración equivalente a fuerza de gravedad
g	gramos
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (proteína fluorescente verde)
<i>gun</i>	<i>genomes uncoupled</i> (genomas desacoplados)
h	horas
h. p. i.	horas post infiltración
HPTS	<i>hidroxi pyren trisulfonic acid</i> (ácido 8-hidroxipiren-1,3,6-trisulfónico)
IgG	inmunoglobulina G
IntDen	densidad integrada de niveles de gris
ISE	<i>increased size exclution limit</i> (SEL aumentado)
ISE2-OE	<i>ISE2 overexpressing</i> (sobreexpresante)
ISE2-SUP	<i>ISE2</i> suprimido
l	litros
LB	Luria Bertani
LHCB	<i>light harvesting complex</i> (complejo de captación de luz)
M	molar
m/v	masa en volumen (g cada 100 ml)
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
MP	membrana plasmática
MS	Murashige-Skoog
N	normal
NB	Northern blot
nm	nanómetros
ONPS	<i>organelle-nucleus-PD signaling</i>
PAGE	<i>poli acrilamide gel electroforesis</i>
Pb/kPb	pares de bases nucleotídicas
PCR	<i>polimerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PD	plasmodesmos
PDGB	PD β ,1-3 glucanasas
PDLP	<i>PD located proteins</i> (proteínas localizadas en el PD)

PM	peso molecular
PPR	repeticiones de pentatricopéptidos
PQ	plastoquinona
qPCR	<i>quantitative</i> PCR (PCR cuantitativa de tiempo real)
RBCL	subunidad mayor de RUBISCO (codificada en plastoma)
RBCS	subunidad menor de RUBISCO (codificada en núcleo)
RE	retículo endoplasmático
RFP	<i>red fluorescent protein</i> (proteína roja fluorescente)
RH	<i>RNA helicase</i> (helicasa de ARN)
RIP	<i>RNA immuno precipitation</i> (inmunoprecipitación de ARN)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (especies reactivas de oxígeno)
RT-PCR	PCR de retro transcripción
RUBISCO	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
s. p. g.	semanas post germinación
SA	<i>salicylic acid</i> (ácido salicílico)
SAM	<i>shoot apical meristem</i> (meristema apical del brote)
SC	solución
SEL	<i>size excludion limit</i> (límite de tamaño por exclusión)
s. p. i.	semanas post infiltración
T. esp.	temperatura específica
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i> (virus del mosaico del tabaco)
TRV	<i>Tobacco Rattle Virus</i>
V	voltios
v/v	ml cada 100 ml de SC
VIGS	<i>virus induced gene silencing</i> (silenc. génico inducido por virus)
WB	<i>Western blot</i>
WT	<i>wild type</i> (línea salvaje)

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	viii
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
i.1 Plasmodesmos	1
i.1.1 Estructura	2
i.1.2 Transporte célula a célula	6
i.1.2.1 Transporte local pasivo	7
i.1.2.2 Transporte local activo	8
i.1.3 Clasificación	9
i.1.4 Regulación	11
i.1.4.1 Depósitos de calosa	11
i.1.4.2 RE-Golgi	14
i.1.4.3 Especies reactivas de oxígeno	14
i.1.4.4 Citoesqueleto	15
i.1.4.5 Niveles de calcio	17
i.1.4.6 Pared celular	17
i.1.4.7 Cambios en la estructura del PD	18
i.2 El embrión como modelo de estudio de los PD	21
i.3 Caracterización de la mutante <i>ise2</i>	23
i.4 Señalización Organela-Núcleo-PD (ONPS)	27
i.5 Cloroplastos	28
i.5.1 El genoma del cloroplasto y los nucleoides	29
i.5.2 Regulación de la expresión génica en cloroplastos	30
i.5.2.1 Corte y “poda” de transcritos primarios	30
i.5.2.2 Edición del ARN	31
i.5.2.3 Intrones cloroplásticos	31
i.5.3 Proteínas de unión a ARN y ARN helicasas	33
i.5.4 Proteostasis en el cloroplasto	36
i.5.5 El cloroplasto como sensor y señalizador	37

i.5.5.1 Tetrapirroles (<i>gun2-6</i>)	38
i.5.5.2 Expresión génica del cloroplasto (<i>gun1</i>)	40
i.5.5.3 Actividad traduccional del cloroplasto	40
i.5.5.4 Otras señales retrógradas	40
i.5.5.5 Especies reactivas de oxígeno y estado redox de los cloroplastos	42
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	47
m.1 Material Vegetal y condiciones de crecimiento	47
m.1.1 Esterilización húmeda de semillas	48
m.1.2 Esterilización seca de semillas	49
m.2 Cepas bacterianas	49
m.2.1 Preparación y transformación de bacterias termocompetentes (Método Hannahan)	50
m.2.2 Preparación y transformación de bacterias electrocompetentes	51
m.3 Técnicas y métodos básicos de biología molecular	52
m.3.1 Aislamiento de ADN plasmídico	52
m.3.2 Precipitación de ADN con polietilenglicol	54
m.3.3 Precipitación de ADN con acetato de amonio	54
m.3.4 Corte de ADN con enzimas de restricción	54
m.3.5 Extracción de ADN genómico	55
m.3.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	55
m.3.7 Síntesis de ADNc	55
m.3.8 PCR	56
m.3.9 Electroforesis en geles de agarosa	57
m.3.10 Western blot	57
m.4 Northern Blot	59
m.5 Infiltración de <i>N. benthamiana</i> con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	60
m.6 Purificación de cloroplastos	61
m.7 Ensayo de inmunoprecipitación del ARN	62
m.8 Ensayo de carga de colorante (<i>dye loading</i>)	64
m.9 Tinción de calosa y cuantificación	64
m.10 DANS (Drop And See)	65
m.11 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	65

Capítulo 1

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ISE2 E IDENTIFICACIÓN DE SUS ARN

BLANCO	67
1.1 Introducción	69
1.2 Objetivos específicos.....	69
1.3 Resultados	69
1.3.1 La sobreexpresión de ISE2-GFP deriva en un silenciamiento génico espontáneo y un fenotipo clorótico	69
1.3.2 Localización intracelular de ISE2	73
1.3.3 Localización intraplástica de ISE2:GFP	75
1.3.4 ISE2-GFP es necesaria para el <i>splicing</i> de intrones de tipo II en el cloroplasto.....	79
1.3.5 ISE2:GFP interactúa con los ARN blanco <i>in vivo</i>	92
1.3.6 Defectos en el <i>splicing</i> de transcritos cloroplásticos se asocian a una apertura plasmodesmal aumentada durante el desarrollo embrionario.....	94
1.4 Discusión.....	95
1.4.1 Localización de ISE2 en el CP	95
1.4.2 Rol de ISE2 en el procesamiento de ARN cloroplástico	96
1.4.3 Mutante <i>clpr2</i>	100
1.4.4 Desarrollo del CP y regulación de los PD	101

Capítulo 2

ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA MUTACIÓN/SILENCIAMIENTO DE ISE2 Y DE OTROS GENES CON FUNCIÓN EN EL PROCESAMIENTO DE ARN

PLASTÍDICO SOBRE LA SEÑALIZACIÓN CLOROPLASTO-NÚCLEO-PD	103
2.1 Introducción	105
2.1.1 Estado redox de los CP y regulación de los PD.....	105
2.2 Objetivos específicos.....	106
2.3 Resultados	107
2.3.1 El silenciamiento de <i>ISE2</i> en hojas de plantas adultas de <i>Arabidopsis</i> no presenta un aumento del SEL en los PD pero influye sobre los niveles de calosa y su densidad. ...	107
2.3.2 El <i>splicing</i> alternativo de genes nucleares asociados a PD no se ve modificado al silenciar <i>ISE2</i> en <i>Arabidopsis</i>	113
2.3.3 Construcciones VIGS.....	115
2.3.4 Fenotipos de plantas silenciadas por VIGS	119

2.3.5 El silenciamiento de <i>ISE2</i> , <i>RH3</i> y <i>CLPR2</i> en hojas de <i>N. benthamiana</i> provoca un incremento de la permeabilidad de los PD y menores niveles de calosa.....	123
2.3.6 Estado redox del cloroplasto	128
2.3.7 Alteración de la morfología celular.....	130
2.4 Discusión	134
2.4.1 Efecto del silenciamiento de <i>ISE2</i> en la comunicación intercelular de hojas adultas de <i>Arabidopsis</i>	134
2.4.2 Splicing alternativo de genes de localización plasmodesmal	135
2.4.3 VIGS de genes con función en el cloroplasto en <i>N. benthamiana</i>	136
2.4.4 Los PD se hallan desregulados en hojas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas por VIGS.....	137
2.4.5 Cuáles son las señales retrógradas que podrían funcionar en la regulación de los PD?	139
2.4.6 Especies reactivas de oxígeno	140
2.4.7 Volumen celular y citoesqueleto	141
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	143
BIBLIOGRAFIA	145
APÉNDICE A. OLIGONUCLEÓTIDOS	159
APÉNDICE B. APÉNDICE ESTADÍSTICO	163
APÉNDICE C. MACROS IMAGEJ.....	169

INTRODUCCIÓN GENERAL

Uno de los grandes eventos en la historia evolutiva fue la emergencia de organismos eucarióticos multicelulares. Estos organismos no forman un grupo monofilético, ya que la transición a la vida multicelular surgió independientemente en distintos clados. Sin embargo, cada una de estas transiciones tuvo que cumplir con los siguientes requerimientos comunes: (1) adhesión célula-célula y (2) comunicación intercelular (Niklas y Newman, 2013). En el caso de las plantas y algas, existe una pared celular, compuesta por celulosa, hemicelulosa y polisacáridos, que otorga rigidez y adhesión pero que también genera una barrera adicional entre las células (Popper *et al.*, 2011). A lo largo de la evolución, surgieron canales nanoscópicos que atraviesan la pared y comunican los citoplasmas de células vegetales contiguas, permitiendo sortear esta barrera para poder establecer la comunicación intercelular (Brunkard y Zambryski, 2017). Estos canales son denominados plasmodesmos y representan una estructura esencial para la vida vegetal ya que (1) no se conocen mutantes que carezcan completamente de plasmodesmos, y (2) mutaciones que alteran el funcionamiento de los mismos son embrión defectivas o letales.

i.1 Plasmodesmos

Los plasmodesmos (PD) fueron descubiertos en 1879 por Eduard Tangle mientras estudiaba los cotiledones de *Strychnos nuxvomica*. A contramano del paradigma de la época que consideraba a las células como entidades aisladas, propuso que estos “ductos conductivos” permitían a las células comunicarse entre sí para unirse en una entidad de mayor orden (Köhler y Carr, 2006). Los PD son canales nanoscópicos

presentes en todas las plantas terrestres (Brunkard y Zambryski, 2017). Se generan a partir de la continuidad de las membranas plasmática (MP) y el retículo endoplasmático (RE) de dos células adyacentes, formando poros que atraviesan la pared celular y permiten una comunicación de los citoplasmas y de las membranas de ambas células. Tienen un diámetro de 20-40 nm y una longitud de hasta cientos de nm (Ehlers y Kollmann, 2001) (Fig. 1A). Son estructuras dinámicas que cumplen diversas funciones en el desarrollo de la planta, así como en su relación con el medio ambiente, debiéndose esto a que actúan como compuertas que regulan la comunicación intercelular (Sager y Lee, 2014).

La importancia de los PD puede apreciarse analizando la filogenia. En todos los linajes parenquimatosos cuyas células se encuentran separadas por paredes celulares de celulosa, existen estructuras análogas a los PD. Sin embargo, estas estructuras (PD o tipo PD) no son homólogas, es decir evolucionaron en paralelo, indicando que su existencia es esencial para la emergencia de organismos parenquimatosos en clados que sólo estaban formados por organismos unicelulares o filamentosos (Brunkard y Zambryski, 2017).

i.1.1 Estructura

Estructuralmente, pueden reconocerse las siguientes características generales: la membrana plasmática (MP) cubriendo las paredes del PD, el RE, la manga citoplasmática y los “radios” transversales (Fig. 1B) (Nicolas *et al.*, 2017).

La MP cubre las paredes del PD, creando de esta forma una continuidad entre las MP de las células comunicadas por el canal. Sin embargo, la MP del PD se encuentra enriquecida en esteroides y esfingolípidos comparado a la MP propiamente dicha (Grisson

et al., 2015), formando lo que se conoce como *lipid rafts* (traducido del inglés como balsas lipídicas). En plantas, estas balsas lipídicas se caracterizan por la presencia de un grupo de proteínas con función en la comunicación intercelular denominadas remorinas. Además, pueden reconocerse microdominios de proteínas enriquecidas en los PD (Faulkner, 2013). Las proteínas ancladas a la MP por glicosil fosfatidil-inositol (GPI) se acumulan en el PD debido a la alta afinidad de las proteínas GPI por membranas ricas en esteroides y esfingolípidos. Las proteínas con dominios transmembrana se localizan en el PD mediante péptidos-señal de anclaje a RE, junto a un dominio transmembrana de cierta longitud y secuencia, y dominios específicos contiguos al transmembrana (Tesis doctoral Dr. Xu Wang (Wang & Lee, 2017)).

La membrana del RE se haya comprimida en el interior del canal plasmodesmal formando una estructura denominada desmotúbulo. El desmotúbulo corre como un eje longitudinal de 15 nm de diámetro a lo largo del PD y se asocia a proteínas de la familia RETICULON (RTN3-6) (Knox *et al.*, 2015; Kriechbaumer *et al.*, 2015). Estas proteínas son las encargadas de mantener el estado de compresión de las membranas del RE y se presume que interactúan con proteínas ancladas a la MP del PD. En el desmotúbulo, la compresión de las membranas del RE es generalmente alta, aunque en algunos PD el desmotúbulo tiene un lumen visible (Barton *et al.*, 2011; Crawford y Zambryski, 2000; Oparka *et al.*, 1999).

La manga citoplasmática es el espacio entre el desmotúbulo y la MP del PD. En la zona media del PD la manga citoplasmática se ensancha formando la “cavidad central”, mientras que en los extremos del PD la manga es más estrecha, denominándose a estas zonas como el “cuello” del PD (Roberts y Oparka, 2003).

La manga citoplasmática se encuentra atravesada por estructuras de tipo “radios” que se anclan en el desmotúbulo y en la MP del PD. Aunque aún se desconoce la identidad de estas estructuras, una teoría ampliamente aceptada indica que su rol es controlar el ancho de la manga, separando el desmotúbulo de la MP (Nicolas *et al.*, 2017). También se identificaron proteínas de actina y miosina en la manga citoplasmática, e inhibidores de miosina afectan la comunicación por PD en *Tradescantia virginiana* (Radford y White, 2011). Estos “radios” podrían, entonces, ser moléculas de miosina ancladas en una membrana (del RE en el desmotúbulo o MP) y unidas a actina en la otra. Los radios están dispuestos de forma helicoidal, lo cual reduce la manga citoplasmática produciendo microcanales de entre 3-4 nm de diámetro. Se piensa que estos radios pueden formar parte de una estructura regulatoria del pasaje de moléculas por el PD, y que muchos virus pueden controlar para favorecer su propagación (Roberts y Oparka, 2003).

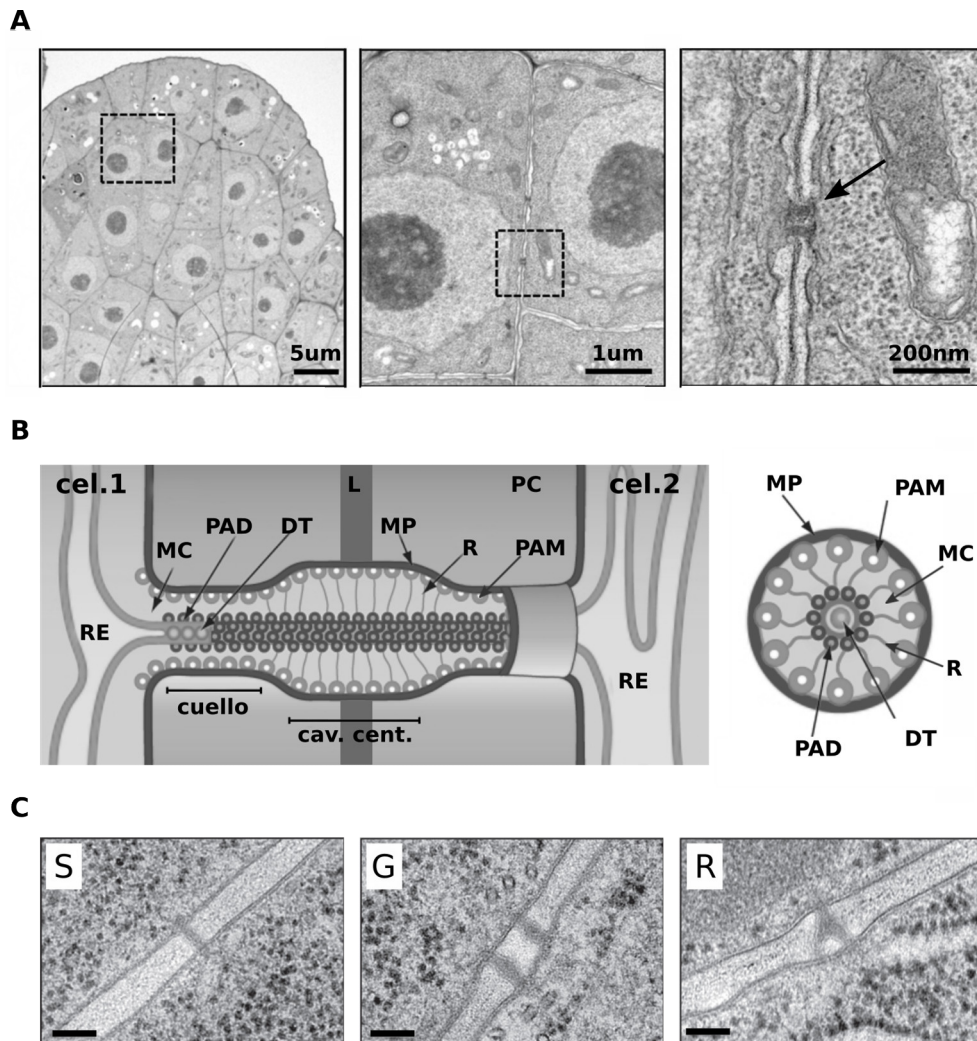


Figura i.1. Plasmodesmos. **(A)** Imágenes de microscopía de transmisión electrónica mostrando un PD simple en el contexto de meristema apical de *A. thaliana*. Los recuadros punteados indican una zona de interés, aumentada en la imagen a su derecha. Flecha en recuadro final mostrando un PD simple conectando dos células. Se puede observar la pared celular y la laminilla media. Extraído de Kraner *et al.* (2017) **(B)** Dibujo esquemático de corte longitudinal y transversal de un PD simple. Extraído de Roberts y Oparka,(2003). RE retículo endoplasmático MC manga citoplasmática PAD proteínas asociadas al desmotúbulo DT desmotúbulo L laminilla media MP membrana plasmática R radios PAM proteínas asociadas a la membrana plasmática PC pared celular cav. cent. cavidad central **(C)** Imágenes de microscopía de transmisión electrónica de embriones de *A. thaliana* mostrando un PD simple (S), dos PD gemelos (G) y un PD ramificado en forma de Y (R). Extraído de Stonebloom *et al.* (2009). Escala 100nm

i.1.2 Transporte célula a célula

Teóricamente, la comunicación por PD entre las células de un organismo permitiría que todas se conecten en un gran citoplasma continuo (simplasto). No obstante, los PD son canales dinámicos que pueden modificar su permeabilidad o su frecuencia, regulando el transporte molecular entre dos células contiguas. Incluso, la regulación de los PD en determinados momentos del desarrollo puede dar lugar a la formación de “dominios simplásticos”: grupos de células aisladas que dividen funcionalmente el simplasto y entre las cuales las moléculas pueden propagarse libremente, mientras que entre dominios la propagación molecular está muy restringida (Roberts y Oparka, 2003). El transporte molecular intercelular través del PD se denomina “transporte simplástico”. Contrariamente, el “transporte apoplástico” se da en el espacio extracelular a través de las paredes e involucra receptores de membrana y eventos de endo y exocitosis (Stahl y Simon, 2013).

Para analizar el transporte molecular a través del PD, es necesario tener en cuenta dos aspectos: la zona y el modo mediante los cuales las moléculas atraviesan el canal. En cuanto a la zona por la cual se intercambian moléculas por los PD, la mayor parte es por la manga citoplasmática (Gallagher *et al.*, 2014; Nicolas *et al.*, 2017). También puede darse el transporte a través del desmotúbulo, principalmente por la membrana de RE, y algunos casos por el lumen (Barton *et al.*, 2011). El transporte a través de la MP se haya en discusión. En cuanto al modo del transporte, éste puede ser pasivo (no selectivo) o activo (selectivo).

i.1.2.1 Transporte local pasivo

El transporte pasivo se da principalmente por la manga citoplasmática. La permeabilidad de los PD al transporte pasivo se mide de acuerdo al tamaño máximo que puede tener una molécula para atravesar la manga. Este parámetro se denomina “límite de exclusión por tamaño” (SEL por las siglas en inglés de *size exclusion limit*) y se reporta en unidades de kiloDaltons (kDa). No obstante, la capacidad de una molécula de atravesar pasivamente la manga dependerá no sólo del tamaño molecular, sino también de su forma y dimensiones (radio de Stokes), la carga y la naturaleza bioquímica (Dashevskaya *et al.*, 2008; Ehlers y Kollmann, 2001; Lucas y Lee, 2004). También la forma del PD influye en la permeabilidad. Por ejemplo, a mayor longitud o mayor ramificación, menos permeable es el PD (Heinlein y Epel, 2004).

Moléculas solubles en el citoplasma con características adecuadas (tamaño menor al SEL, radio Stokes, etc.) podrán transportarse pasivamente por la manga citoplasmática mediante difusión. Sondas fluorescentes, colorantes, agua, iones, hormonas, azúcares, algunos ARN y algunas proteínas (como GFP, del inglés *green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde) se mueven utilizando este tipo de transporte (Brunkard *et al.*, 2015). Existen reportes en los cuales, además, se muestra una unidireccionalidad en el transporte pasivo célula a célula (Christensen *et al.*, 2009).

Los modelos actuales asumen que a mayor distancia entre el desmotúbulo y la MP del PD, es decir manga citoplasmática de mayor diámetro, mayor es la permeabilidad del PD. No obstante, Nicolas *et al.* (2017) postulan que, a pesar de que en PD secundarios (los formados luego de la citoquinesis, Sección i.1.3) se observa un espacio muy reducido entre el desmotúbulo y la MP, el tráfico molecular no se vio limitado.

El transporte pasivo de moléculas a través del lumen del desmotúbulo fue también fue reportado. A pesar de haber un número menor de casos, experimentos de microinyección de marcadores fluorescentes en el lumen del RE han demostrado que moléculas de tamaño pequeño (hasta 10 kDa) pueden propagarse célula a célula por esta vía (Barton *et al.*, 2011). Incluso, se ha observado que este movimiento tiene lugar entre células en las cuales el movimiento de moléculas citoplasmáticas se encuentra impedido (Barton *et al.*, 2011).

Algunos virus, como el TMV (del inglés *Tobacco mosaic virus*, virus del mosaico del tabaco), pueden propagarse intercelularmente mediante difusión lateral por la membrana del RE gracias a su proteína de movimiento anclada a la misma (Guenoun-Gelbart *et al.*, 2008). La membrana del RE también puede ser utilizada por moléculas hidrofóbicas para el pasaje intercelular. Por ejemplo, Grabski *et al.* (1993) demostraron que sondas lipídicas y fosfolipídicas localizadas predominantemente en el RE pudieron transportarse intercelularmente en raíces de soja.

i.1.2.2 Transporte local activo

El otro tipo de movimiento a través de los PD es el transporte activo o selectivo. Las proteínas que muestran este tipo de transporte generalmente pueden interactuar con componentes del PD para aumentar el SEL y facilitar el traspaso través del mismo (Crawford y Zambryski, 2002). Esto es típico de las proteínas de movimiento virales (Lee *et al.*, 2005) y de algunas proteínas endógenas de las plantas, como factores de transcripción (Lucas y Lee, 2004).

El pasaje de moléculas mayores al SEL mediante transporte activo también puede darse con proteínas chaperonas que desestabilizan la estructura terciaria de las

proteínas blanco. Luego de atravesar el PD, vuelven a plegarse recuperando su estructura nativa. Se cree que esto ocurre con el factor de transcripción KNOTTED1 (KN1) (Kragler *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2011).

Se han identificado proteínas asociadas a los microtúbulos que promueven el transporte de KN1 (Winter *et al.*, 2007). En el mismo sentido, se cree que moléculas de miosina VIII pueden utilizar con los filamentos de actina que recorren longitudinalmente el PD para transportar complejos macromoleculares (Oparka, 2004). La miosina VIII es una proteína que se encuentra únicamente en plantas y posee dominios de unión a calmodulina. Por lo tanto, se cree que puede estar bajo regulación de los niveles de Ca^{2+} (Oparka, 2004).

i.1.3 Clasificación

De acuerdo a la estructura, existen 3 tipos de PD: simples, intermedios o gemelos, y ramificados (Fig. i.1C). Esta definición se relaciona con el número de canales que forman el PD y el número de cuellos que se hallan comunicados por los canales. Los PD simples consisten en un único canal atravesando la pared celular, con dos cuellos, uno a cada lado de la misma. Los PD gemelos son PD simples separados por una distancia menor a 100 nm. Los PD ramificados poseen tres o más cuellos comunicados por canales atravesando la pared celular. Forman estructuras en forma de Y, H u otras más complejas incluyendo una cavidad central comunicando todos los canales. (Roberts y Oparka, 2003).

Los PD simples son típicos de algas y musgos, representando estructuras evolutivas más antiguas. En cambio, los PD ramificados se encuentran extendidos en todas las plantas vasculares (Brunkard y Zambryski, 2017). No obstante, todos los PD se

originan inicialmente como PD simples, y pueden modificarse a gemelos o ramificados. Esta transformación puede darse de tres formas: (1) mediante la unión de dos PD simples; (2) mediante extensión de la pared celular que provoca la fisión del PD simple pero sin llegar a separarlo en dos; y (3) por medio de vesículas con material de pared celular que atrapan hebras del RE mientras son transportadas a la MP (esta forma de generar PD ramificados puede ser a partir de PD primarios o generando PD *de novo*) (Oparka *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001; Ehlers y Kollmann, 2001). Existe otro tipo de PD llamado “PD embudo” que conecta tubos cribosos del protofloema y células del periciclo del floema. El cuello es más grande en el extremo de los tubos cribosos, lo cual permite una descarga de solutos más eficiente hacia las células del periciclo (Ross-Elliott *et al.*, 2017).

Los PD pueden ser clasificados de acuerdo a su origen en PD primarios y PD secundarios si son formados durante o luego de la citoquinesis respectivamente (Ehlers y Kollmann, 2001).

Los PD primarios se generan durante la división celular a partir de hebras del RE que atraviesan el fragmoplasto. Vesículas de Golgi con material de la pared celular atrapan las hebras del RE mientras se forma la laminilla media, la pared celular y las nuevas MP. Así, cada hebra del RE atrapada se comprime formando el desmotúbulo de un nuevo PD simple, que conecta los sistemas de RE de las dos nuevas células. Se forma la membrana plasmática con el material derivado de las vesículas de Golgi. No se conoce qué determina la densidad de PD primarios en las paredes celulares formadas durante la citoquinesis, pero se asume que las hebras de RE son atrapadas aleatoriamente, y que las nuevas paredes celulares contienen un número similar de PD (Faulkner *et al.*, 2008).

Los PD secundarios se desarrollan *de novo*, independientemente de la citoquinesis, entre células que sufren una elongación extensiva para compensar la posible “dilución” de PD primarios, y entre células que no están relacionadas citoquinéticamente y por lo tanto no están comunicadas por PD primarios. Un ejemplo de esto son las células de la epidermis y del mesófilo de la hoja. Al multiplicarse por divisiones clonales independientes, no forman PD simples sino que se comunican por PD secundarios. Estos también se forman cuando se generan injertos artificialmente, para comunicar el vástago con el pie; algo similar ocurre con plantas parásitas como *Cuscuta odorata* (Ehlers y Kollmann, 2001).

i.1.4 Regulación

Los PD comprenden la interacción de cuatro compartimentos subcelulares: pared celular, MP, RE y citosol. En este sentido, tienen el potencial de integrar la señalización simplástica, apoplástica y de endomembranas, y coordinar la comunicación intercelular. La regulación de los PD resulta, entonces, indispensable para la planta a lo largo de su desarrollo y en la interacción con el ambiente. Existen muchos mecanismos mediante los cuales los PD pueden modular el transporte intercelular (activo o pasivo). A continuación se listan los principales.

i.1.4.1 Depósitos de calosa

La deposición de calosa es quizás el mecanismo de regulación de la apertura plasmodesmal más conocido y estudiado (Amsbury *et al.*, 2017; Storme y Geelen, 2014). La calosa es un polisacárido β -1,3-glucano que se deposita en la pared celular a la altura del cuello del PD, regulando el espacio entre el desmotúbulo y la membrana plasmática.

En contraste con la celulosa (β -1,4-glucano) que forma estructuras altamente cristalinas, la calosa se acumula de forma más desordenada, en estructuras helicoidales amorfas con propiedades similares a geles (Amsbury *et al.*, 2017).

Numerosos estudios marcan una correlación entre el nivel de deposición de calosa y el SEL de los PD, y está ampliamente aceptado que la permeabilidad del mismo disminuye a mayores niveles de calosa (Storme y Geelen, 2014). Determinados estímulos endógenos o extracelulares influyen en la transcripción o la actividad de enzimas modificadoras de calosa localizadas en los PD (deficiencia de nutrientes, exceso de metales, ataque de patógenos). Estas enzimas pertenecen a dos grupos con actividades opuestas: unión/síntesis de calosa y degradación de calosa, cuyo efecto es el cierre y apertura de los PD respectivamente (Fig. i.2).

En *Arabidopsis* existen doce genes que codifican calosa sintetasas (*CALLOSE SYNTHASES*, *CALS*), también llamadas sintetasas de glucanos (*GLUCAN SYNTHASE-LIKE*, *GSL*). Son similares a las sintetasas de celulosa, con múltiples pasos transmembrana, un dominio extracelular y un dominio citosólico de unión a UDP-glucosa. Cinco de estas enzimas han sido encontradas asociadas con los PD: *GSL8/CALS10*, *GSL7/CALS7*, *GSL12/CALS3*, *CALS1* y *CALS8* (Cui y Lee, 2016; Guseman *et al.*, 2010; Sager y Lee, 2014). Estas enzimas se encuentran en complejos proteicos que degradan sacarosa a UDP-glucosa, la cual es utilizada por las *CALS* como sustrato para sintetizar calosa y transferirla a través de la MP hacia el apoplasto, principalmente en la zona del cuello del PD (Amsbury *et al.*, 2017). También existen proteínas que no poseen la actividad sintetizadora pero que son capaces de unirse a calosa y estabilizar su deposición en el PD (*PLASMODESMATA CALLOSE-BINDING PROTEINS*, *PDCBs*). Estas proteínas se anclan vía GPI quedando asociadas a la monocapa extracelular de la MP del PD (Maule *et*

al., 2013; Simpson *et al.*, 2009; Zavaliev *et al.*, 2016). Tanto las CALS/GSL como las PDCB aumentan los niveles de calosa en la zona del PD y por lo tanto disminuyen el SEL del mismo.

Las enzimas opuestas a las anteriores degradan calosa mediante un dominio glicosil hidrolasa 17. En *Arabidopsis* se identificaron 50 enzimas degradadoras de calosa, algunas de las cuales han sido encontradas en la zona de los PD (Storme y Geelen, 2014; Amsbury *et al.*, 2017). Estas enzimas son β -1,3-glucanasas que aumentan el SEL del PD y se denominan PLASMODESMATA β -1,3-GLUCANASAS (PDBGs). Al igual que las PDCBs se hayan en la monocapa extracelular de la MP del PD, ancladas por GPI. Las tres PDBGs más estudiadas en *Arabidopsis* son AtBG_pap en hojas (Levy *et al.*, 2007) y PDBG1/2 en raíces (Benitez-Alfonso *et al.*, 2013).

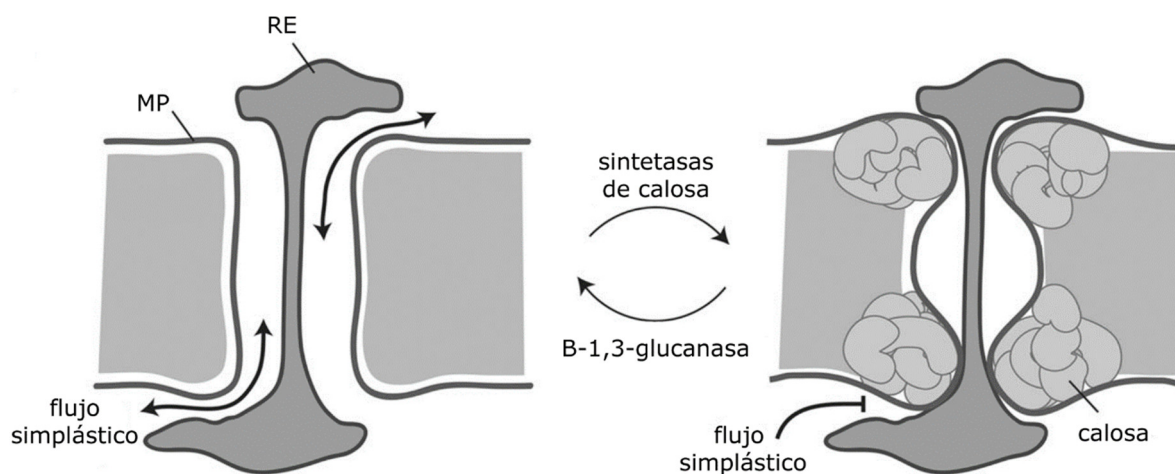


Figura i.2. Esquema de la regulación del SEL del PD a través de la homeostasis de calosa. La acción antagonista de las enzimas calosa sintetasa y β -1,3-glucanasa regula el tamaño de exclusión límite de los plasmodesmos a través del depósito o la degradación, respectivamente, de calosa entre la pared celular y la membrana plasmática (Adaptado de Maule *et al.* (2012))

i.1.4.2 RE-Golgi

La vía secretoria RE-Golgi es fundamental para el correcto funcionamiento de los PD ya que muchas proteínas la utilizan para dirigirse a los mismos (Sun *et al.*, 2019).

Recientemente se descubrió la proteína CHOLINE TRANSPORTER 1 (CHER1) como fundamental para el correcto direccionamiento de vesículas del aparato trans-Golgi hacia los PD (Kraner *et al.*, 2017a; Kraner *et al.*, 2017b).

El grupo de las llamadas proteínas de localización en PD (PLASMODESMATA LOCALIZED PROTEINS; PDLPs) son proteínas transmembrana de tipo 1 que utilizan la vía secretoria para dirigirse a los PD a los cuales están asociadas. Las más estudiadas son las PDLP1 y PDLP5. PDLP1 regula la deposición de calosa en células infectadas por hongos y su expresión correlaciona con dominios simplásticos en el meristema apical del brote (SAM, del inglés *shoot apical meristem*) en *Arabidopsis* (Bayer *et al.*, 2008; Caillaud *et al.*, 2014). PDLP5 está involucrada en las respuestas frente a patógeno dependientes de ácido salicílico (SA, del inglés *salicylic acid*), promoviendo (de forma aún desconocida) la expresión de *CALS1* y *CALS8*. Estas enzimas aumentan los niveles de calosa en el PD e impiden la progresión de la infección (Cui y Lee, 2016; Lee *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

i.1.4.3 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) comprenden otro mecanismo con funciones en la regulación plasmodesmal. Las ROS, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anión superóxido (O₂⁻) y el oxígeno singulete (¹O₂) actúan como mensajeros cuando son producidos en ráfagas controladas durante

respuestas a estreses. Además, enzimas que generan ROS funcionan en procesos de remodelación de la pared celular (Liu *et al.*, 2014).

En ensayos de inmunolocalización se han detectado peroxidasas en la zona cambial de *Solanum lycopersicum*. Estas enzimas utilizan H_2O_2 y 1O_2 como sustratos para producir radicales hidroxilos ($^{\bullet}OH$) que funcionan alterando y debilitando la pared celular (posiblemente por la activación de hidrolasas). De esta forma se afecta la permeabilidad y la remodelación del PD (Ehlers y van Bel, 2010). Por otro lado, un gran número de peroxidasas de clase III y otras proteínas con capacidad potencial de regular el estado redox (oxigenasas, oxidasas, oxidoreductasas y tioredoxinas) fueron encontradas en ensayos de proteómica de PD en *Arabidopsis* (Fernandez-Calvino *et al.*, 2011). Sorpresivamente, la tioredoxina TRX-h9 de *Arabidopsis* localizada en la membrana plasmática puede dirigirse hacia las zonas de los PD, lo cual fue propuesto como un mecanismo para evitar la propagación de estrés oxidativo (Meng *et al.*, 2010).

Además, el estado redox y los niveles de especies reactivas de oxígeno en las organelas endosimbióticas, cloroplastos (CP) y mitocondrias, afectan la comunicación intercelular por PD. Este tema será tratado con mayor profundidad en secciones posteriores.

i.1.4.4 Citoesqueleto

Además de su rol en el transporte intracelular, el citoesqueleto posee funciones en el transporte intercelular vía PD (White y Barton, 2011).

Tanto actina como miosina han sido inmunolocalizadas en los PD (Baluška *et al.*, 2004; Radford y White, 1998-2011). La proteína FORMIN2 en *Arabidopsis* es responsable del anclaje de actina a los PD y su mutación afecta la permeabilidad de los

mismos (Diao *et al.*, 2018). Existen reportes de la función regulatoria de actina y miosina sobre el SEL del PD aunque el mecanismo aún no se conoce. Algunos autores sugieren que el aparato de actinmiosina puede constreñir o relajar el poro del canal, dado que se ha postulado que los radios observados transversalmente en la manga citoplasmática son moléculas de miosina ancladas a filamentos de actina en el desmotúbulo. En cambio, otros autores sugieren que el rol del aparato de actinmiosina tiene que ver con el transporte de moléculas unidas a miosina desplazándose por los filamentos de actina a lo largo del poro (Roberts y Oparka, 2003). Existen reportes que apoyan una u otra hipótesis, por lo tanto aún no existe consenso con respecto a este tema.

La proteína motora miosina es la proteína de unión a actina más encontrada en PD. La más abundante es la miosina VIII que se encuentra a lo largo de todo el canal (Radford y White, 1998) y su rol estaría más relacionado con direccionar vesículas u otras cargas específicas al PD o a través del mismo (Sager y Lee, 2014).

Los filamentos de actina son importantes para la propagación célula a célula de los virus (Oparka, 2004; Pitzalis y Heinlein, 2018). El silenciamiento génico de actina inducido por virus (VIGS, del inglés *virus induced gene silencing*) en plantas de tabaco o *Nicotiana benthamiana* redujo el transporte intercelular del TMV. En el mismo sentido, Su *et al.* (2010) demostró que el virus del mosaico del pepino (CuMV, del inglés *Cucumber mosaic virus*) y TMV cortan los filamentos de actina y aumentan el SEL de los PD de células de *N. benthamiana*. Además, demostró que las proteínas de movimiento del virus sólo cortan los filamentos en los PD, pudiendo discriminar entre éstos y los filamentos citoplasmáticos (Su *et al.*, 2010).

El rol de la tubulina en los PD fue menos estudiado. Aunque es poco probable que existan microtúbulos a lo largo del PD, algunos reportes indican que la interacción

de las proteínas de movimiento virales requieren de los microtúbulos para la efectiva propagación célula a célula del ARN viral (Oparka, 2004; Pitzalis y Heinlein, 2018). Además, los microtúbulos también parecen ser requeridos para el correcto movimiento simplástico de moléculas endógenas como el factor de transcripción SHORTROOT, que interactúa con KINESINA G, proteína motora que se mueve a lo largo de los microtúbulos (Sager y Lee, 2014).

i.1.4.5 Niveles de calcio

Las respuestas a Ca^{2+} representan otro mecanismo por el cual la apertura del PD puede ser regulada (Sager y Lee, 2014). El calcio citoplasmático se ve involucrado en numerosas vías de señalización como un mensajero secundario, y fue asociado a cambios en la permeabilidad plasmodesmal: el aumento de calcio citosólico libre estimula el cierre de los PD, en los cuales se identificaron muchas enzimas sensibles a calcio. Las más importantes son proteínas tipo centrina, que fueron localizadas en los cuellos de PD de raíces de cebolla y coliflor. La actividad contráctil de las centrinas en presencia de Ca^{2+} se propone como método de cierre de los PD (Sager y Lee, 2014).

i.1.4.6 Pared celular

La pared celular también participa de la regulación de la apertura de los PD, los cuales están rodeados por microdominios de pared celular con composición y propiedades mecánicas especiales (Knox y Benitez-Alfonso, 2014). Las zonas enriquecidas en PD (en inglés *pit fields*) están reducidas en el contenido celulósico y enriquecidas en pectinas (Tilsner *et al.*, 2016). Las pectinas forman un gel hidratado que

es más laxo que las fibras de celulosa y facilitan la generación de PD secundarios (Cosgrove, 2005; Faulkner *et al.*, 2008). Pectin-metil-esterasas y pectinasas fueron detectadas en el proteoma de PD (Fernandez-Calvino *et al.*, 2011) y podrían contribuir a la relajación de la pared celular, lo cual permitiría oscilaciones físicas del PD más fácilmente.

i.1.4.7 Cambios en la estructura del PD

La estructura del PD puede cambiar en respuesta a estímulos externos o internos durante el desarrollo, lo que deriva en una permeabilidad modificada. En este sentido, los PD pueden ocluirse completamente, cambiar de simple a ramificado o abrirse completamente desintegrando el desmotúbulo (Sager y Lee, 2014).

La transición de un PD simple a su forma ramificada generalmente reduce el SEL del PD. Se desconoce cómo se gatilla esta transición, y también la causa del menor SEL observado; pero existen numerosos reportes en los cuales tejidos con un mayor número de PD ramificados muestran un transporte simplástico reducido (Oparka *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001). La transición fuente – sumidero de las hojas durante su maduración viene acompañada de una transición de los PD hacia formas ramificadas, lo cual se correlaciona con un descenso del SEL en el tejido fuente (Oparka *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001). Se cree que esto ayuda a la exportación e importación de los fotosintatos en los tejidos fuente – sumidero respectivamente. Sin embargo, existen casos en los cuales un aumento de PD ramificados correlaciona con un aumento del SEL. Esto sucede para las mutaciones *ise2* e *ise1* en embriones de *Arabidopsis* (Kobayashi *et al.*, 2007; Stonebloom *et al.*, 2009) y para el silenciamiento de *ISE2* e *ISE1* en hojas adultas de *N. benthamiana* (Burch-Smith y Zambryski, 2010). En los embriones, al tener

paredes celulares más finas, la ramificación de los PD podría favorecer el transporte simplástico en vez de restringirlo, como sucede en células de hojas fuente maduras. Esto podría explicar el fenotipo observado en embriones *ise2* e *ise1*. No obstante, aún no se conoce la causa del efecto contrario observado para PD ramificados en estos dos casos.

Las investigaciones desarrolladas en los últimos años demuestran que en la regulación de los PD intervienen variados y complejos mecanismos, muchos de los cuales aún no son comprendidos totalmente. La Tabla i.1 muestra un resumen de los mecanismos de regulación de PD (de las secciones anteriores y de otros), su modo de acción conocido hasta la fecha y en que procesos están involucrados.

Tabla i.1. Resumen de mecanismos de regulación de los PD

Mecanismo regulación PD	Modo de acción	Ejemplos	(REF)
Depósitos de calosa	Enzimas sintetizadoras y degradadoras de calosa ubicadas en la MP del PD aumentan o disminuyen los niveles de calosa en el espacio apoplástico en la zona del cuello, reduciendo o aumentando el SEL del PD.	Patógenos y estreses bióticos	Cui y Lee (2016)
		Desarrollo de raíz, raíces laterales y tejido vascular	Vaten <i>et al.</i> (2011) Benitez-Alfonso <i>et al.</i> (2013)
		Maduración de los frutos	Roongsattham <i>et al.</i> (2016)
		Establecimiento de nódulos simbióticos en raíces de leguminosas	Gaudioso-Pedraza <i>et al.</i> (2018)
		Cese de la dormición de brotes por degradación de calosa permitiendo pasaje de FLOWERING LOCUS T	Rinne <i>et al.</i> (2001)

Composición lipídica de membranas del PD	La MP del PD está enriquecida en esteroides y esfingolípidos, formando balsas lipídicas que favorecen el direccionamiento de proteínas con dominios especiales	La proteína REM, enriquecida en balsas lipídicas, interviene en la protección frente a virus	Fu <i>et al.</i> (2018)
RE-Golgi	Las vesículas de la vía secretoria ayudan en el direccionamiento de proteínas que actúan en los PD	CHER1 direcciona vesículas al Trans-Golgi	Kraner, Link, <i>et al.</i> (2017)
		Las proteínas PDLs se localizan en PD por vía secretoria	Lee <i>et al.</i> (2011a); Wang <i>et al.</i> (2013)
Especies reactivas de oxígeno	1) ROS activan cascadas de señalización	Activación de enzimas hidrolizadoras de pared celular para la abscisión de tejidos	Bar-Dror <i>et al.</i> (2011)
	2) ROS apoplásticas alteran la integridad de la pared celular	Zona cambial del tomate	Ehlers y van Bel (2010)
	3) ROS en CPs y mitocondrias tiene efectos opuestos en la permeabilidad de los PD	Mutantes <i>ise1, ise2, gat1</i>	Benitez-alfonso <i>et al.</i> (2009); Stonebloom <i>et al.</i> (2012)
Citoesqueleto	1) Los filamentos de actina junto a moléculas de miosina VIII pueden modificar la constricción o relajación de la apertura de la manga citoplasmática	La despolimerización de actina aumenta el cuello de PD en <i>Nephrolepis exaltata</i>	White <i>et al.</i> (1994)
	2) Los elementos del citoesqueleto pueden transportar cargas a través del PD	La proteína SHR se mueve unida a KINESIN G a lo largo de microtúbulos para el transporte célula a célula	Spiegelman <i>et al.</i> (2018)
	3) El citoesqueleto puede direccionar proteínas o complejos proteicos u organelas al PD	Los filamentos de actina son usados por virus para dirigirse a los PD	Harries <i>et al.</i> (2009)
Niveles de calcio	El aumento del calcio citosólico libre estimula el cierre de los PD mediante la constricción de proteínas centrinas en el cuello del PD	Se inmunolocalizó un complejo de centrinas en PD de raíces de cebolla y coliflor.	Blackman <i>et al.</i> (1999)
Pared celular	Variaciones en la composición de la pared celular permiten modificaciones estructurales de los PD	El metabolismo de pectinas afecta la estabilidad del PD	Brecknock <i>et al.</i> (2011)
Quinasas y chaperonas	Muchas proteínas requieren de modificaciones postraduccionales para atravesar el PD	La Proteína SHR promueve el transporte simplástico del ARNm SHR a través de los PD	Nakajima <i>et al.</i> , (2001)

<i>Turgencia y presión</i>	La turgencia de la célula es inversamente proporcional a la permeabilidad de sus PD.	Raíces aumentan permeabilidad del PD para promover transporte de azúcar a tejidos estresados osmóticamente	Schulz (1995)
	1) PD simples a ramificados	Transición fuente sumidero	Roberts <i>et al.</i> (2001)
<i>Cambios en la estructura del PD</i>	2) Oclusión del PD	Desarrollo de estomas	Guseman <i>et al.</i> (2010)
	3) Degradación del desmotúbulo	Transporte en masa de fotosintatos por el floema y entre la célula madre del polen y el tapete.	Van Bel <i>et al.</i> (2002)
<i>Sitios de contacto de membranas</i>	Modificaciones del ancho de la manga citoplasmática,	Proteínas SYTA-1 anclan RE con MP del PD y regulan el pasaje de virus	Levy <i>et al.</i> (2015)

i.2 El embrión como modelo de estudio de los PD

En las secciones anteriores se describieron las características principales de los PD, haciéndose énfasis en los mecanismos de regulación. Tal como se planteó, son organelas tan importantes en el desarrollo de una planta que mutaciones que afectan las funciones de los mismos resultan generalmente letales o con embriogénesis defectiva.

La embriogénesis de las angiospermas puede ser dividida en dos fases distintas (Goldberg *et al.*, 1994). La primera fase es la morfogénesis, durante la cual se establece el plan básico del cuerpo de la planta. La segunda fase es la maduración, que involucra crecimiento y expansión celular, y acumulación de macromoléculas que permitirán tolerar el período de desecación y el crecimiento de la plántula durante la germinación. La morfogénesis comienza con el cigoto cuyas sucesivas divisiones dan lugar a las distintas etapas de desarrollo del embrión: preglobular, globular, corazón, torpedo,

cotiledón-lineal (torpedo temprano), cotiledón-curvado (torpedo-tardío) y embrión maduro.

Los embriones WT de *Arabidopsis* consisten de un único dominio simplástico en el cual todas las células se hayan conectadas por PDs de un SEL mayor a 0,5 kDa. Esto fue determinado luego de incubar embriones con ácido 8-hidroxipiren-1,3,6-trisulfónico (HPTS) de masa molecular 524 Da (Kim *et al.*, 2002). El HPTS penetra en células dañadas al momento de expulsar los embriones de la cubierta seminal, y se propaga completamente por el embrión. Como es un colorante hidrofílico, el único camino de propagación es el simplástico a través de los PD. La propagación completa de HPTS se da en cualquier estadio embrionario.

Cuando se evaluaron marcadores de mayor peso molecular (fluorescein-isotiocianato (FITC) unido a dextranos de peso molecular mayor a 10 kDa), se encontró que a partir del estadio torpedo, los embriones muestran un descenso del SEL impidiendo la propagación del colorante (Kim *et al.*, 2002), que queda confinado a las células dañadas durante la manipulación del embrión.

Con el objetivo de estudiar la regulación de los PD, Kim *et al.* (2002) decidieron realizar una búsqueda de mutantes con PD alterados utilizando embriones de *Arabidopsis* como modelo. Se utilizaron 13000 líneas mutantes generadas con etil metano sulfonato (EMS) en las cuales se buscaron fenotipos de morfogénesis defectiva del embrión segregando en las silicuas en desarrollo. La premisa de esta búsqueda era que una alteración de las funciones de los PD deriva necesariamente en embriogénesis defectiva, y por lo tanto, al no ser posible encontrar mutantes con alteraciones de PD en plantas adultas, la búsqueda dentro de la población de líneas embrio-defectivas

aumentaba la probabilidad del éxito. Se encontraron cerca de 5000 líneas con este tipo de fenotipo, y fueron mantenidas y propagadas como heterocigotas.

De las 5000 líneas preseleccionadas, se buscó aquellas que efectivamente presentaran alteración de los PD. Para eso, Kim *et al.* (2002) evaluaron el SEL de los embriones en estadio torpedo utilizando dextrano-FITC de tamaño mayor a 10 kDa y seleccionaron las líneas en las cuales el colorante fue capaz de propagarse en el embrión. Esto indicaba que los embriones no regulaban el SEL de los PD, el cual permanecía siendo mayor a 10 kDa más allá del estadio torpedo. Las líneas seleccionadas fueron denominadas *ise* por las siglas en inglés de *increased size exclusion limit*, indicando que el SEL de los embriones mutantes *ise* estaba aumentado comparado a lo que se observa en embriones WT torpedo en los cuales FITC-dextrano de 10 kDa no se propaga. La línea mutante *ise2* fue caracterizada en profundidad por Kobayashi *et al.* (2007) (Fig. i.3A).

i.3 Caracterización de la mutante *ise2*

El mapeo del gen *ISE2* mostró que la mutación *ise2* (*background* Landsberg) era alélica a la mutación *embryonic defective 25* (*emb25,background* Columbia), identificada previamente en un *screening* de embriogénesis defectuosa (Franzmann *et al.*, 1995).

Los embriones *ise2* homocigotas se muestran translúcidos a lo largo de todo su desarrollo. En cambio, los embriones WT de *Arabidopsis* muestran una coloración verde a partir del estadio corazón, con plástidos indiferenciados que comienzan a desarrollar grana y a transformarse en CPs. Luego, en el estadio torpedo, los embriones *ise2* muestran una morfología anormal comparada a WT: cotiledones de menor tamaño y con bordes irregulares, e hipocótilo y radícula de mayor tamaño relativo (Kobayashi *et al.*, 2007) (Fig. i.3A).

Se observó que las plántulas *ise2* pueden crecer en medio Murashige Skoog (MS) 1% sacarosa, aunque de forma más lenta comparado con las WT. Luego de 14 días de germinadas, las plántulas WT presentan cotiledones verdes completamente expandidos, hojas verdaderas y raíz desarrollada, mientras que las plántulas *ise2* son más pequeñas, con hojas de color blanco a verde pálido, y menor cantidad de raíces laterales (Fig. i.3C). Las hojas verdaderas son pequeñas y se desarrollan en forma de brócoli. Además, las plántulas *ise2* son más resistentes y más duras que las WT al manipularlas con pinzas. Pueden generar estructuras inflorescentes pero son estériles (Kobayashi *et al.*, 2007).

Sorprendentemente los embriones *ise2* mostraron un 15% de PD ramificados, en contraste con sólo 5% en embriones WT. Estos PD ramificados se encontraron distribuidos a lo largo de todo el embrión y en todos los estadios analizados. Embriones de la línea *emb25* mostraron un porcentaje similar de PD ramificados.

Mediante clonado posicional se aisló el gen *ISE2*, que correspondió con el gen AT1G70070. Los análisis filogenéticos y la búsqueda de motivos conservados concluyeron que *ISE2* codifica una ARN helicasa con dominio DEVH dentro de la superfamilia II de ARN helicasas (Kobayashi *et al.*, 2007). El gen *ISE2* está estructurado con seis exones con una región codificante de 3513 nucleótidos (1171 aminoácidos). La mutación *ise2* es un cambio de base transicional (citocina a timina) en el primer exón, generando un cambio de la glutamina 61 a un codón stop prematuro (Fig. i.3B); mientras que la mutación *emb25* es un cambio de base transicional (guanina a adenina) en el segundo exón, en la región de la caja DEVH, generando el cambio del ácido aspártico en la posición 275 por una asparagina, lo cual afectaría la actividad helicasa de ISE2 (Fig. i.3B).

La mutación *ise2* fue complementada con éxito mediante la expresión de una fusión *ISE2:GFP* en forma constitutiva, observándose en las plantas complementadas focos de *ISE2:GFP* asociados a los CP. El análisis de la secuencia aminoacídica de *ISE2* utilizando el algoritmo de predicción de localización plasmática ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) mostró que los primeros 58 aminoácidos de *ISE2* constituyen un péptido señal de direccionamiento al CP (Kobayashi *et al.*, 2007).

La caracterización de las mutantes *ise* encontradas en la búsqueda de Kim *et al.*, (2002) no se limitó a *ise2*. En un trabajo de Stonebloom *et al.*, (2009) se realizó la caracterización de la mutante *ise1*. *ISE1* codifica una ARN helicasa de la superfamilia II tipo DEAD-box. Además del fenotipo embrionario aberrante y de los PD con SEL aumentado durante la transición de corazón a torpedo, los embriones *ise1* mostraron una mayor frecuencia de PD ramificados y gemelos respecto a WT. Sorprendentemente, *ISE1* mostraba localización mitocondrial.

Las mutaciones *ise1* e *ise2* en homocigosis son embrión defectivas y por tanto su efecto sobre la comunicación intercelular sólo se había podido estudiar en embriones de *Arabidopsis*. A fin de hacerlo en hojas desarrolladas, Burch-Smith y Zambryski (2010) utilizaron la técnica de VIGS para mimar las mutaciones *ise1* e *ise2* mediante el silenciamiento génico en plantas adultas de *N. benthamiana*.

El silenciamiento de *ISE1* o *ISE2* provocó un fenotipo clorótico en las hojas y aumentó la frecuencia de PD entre las células epidermales y del mesófilo (Fig. i.3D). En ambos casos, la comunicación intercelular simplástica aumentó significativamente, utilizando tanto una fusión de dos moléculas de GFP sintetizadas en tándem (2XGFP, Peso Molecular (PM): 54 kDa) como una fusión entre GFP y la proteína p30 de

movilización del virus TMV. El silenciamiento de *ISE2* también derivó en CP con menor cantidad de grana y menor acumulación de gránulos de almidón (Fig. i.3D).

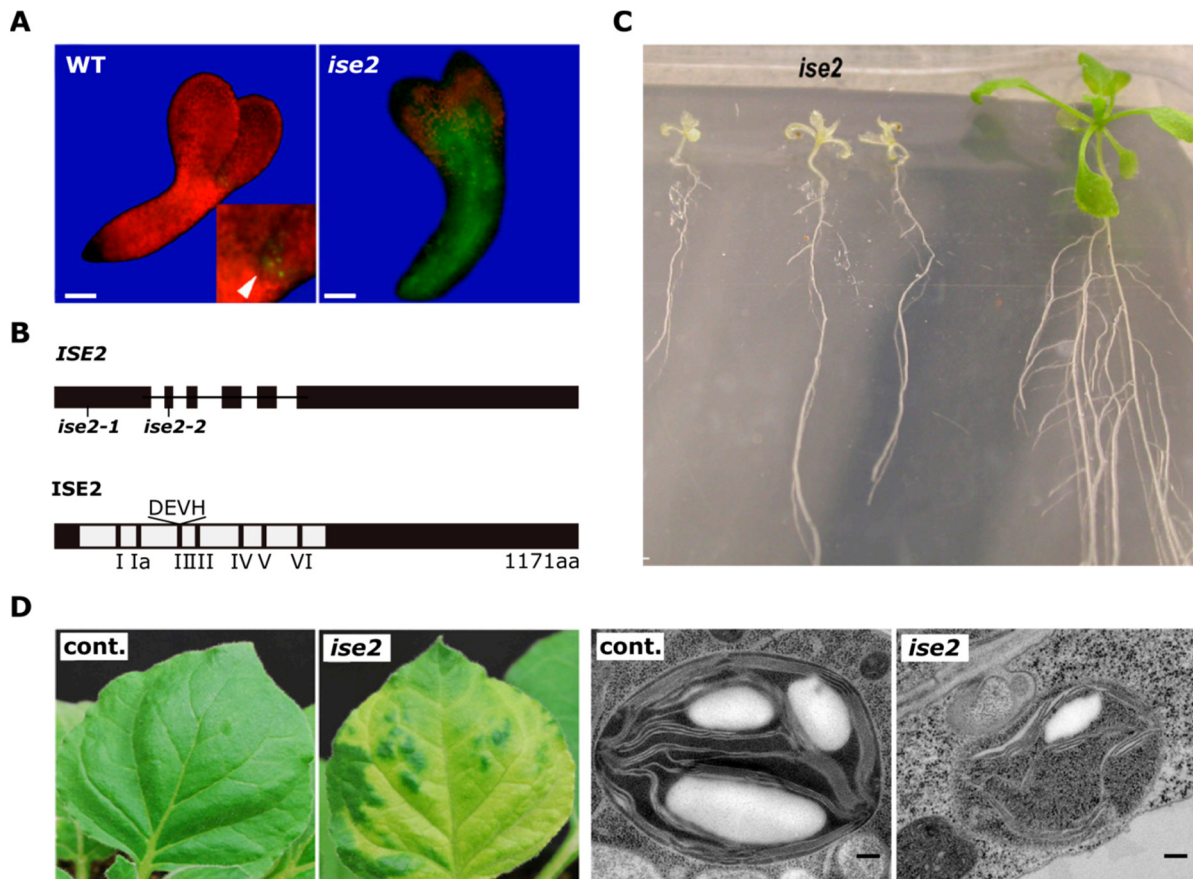


Figura i.3. Caracterización del gen *ISE2* y el efecto de su mutación o silenciamiento. (A) Embriones WT e *ise2*. En rojo autofluorescencia de clorofila bajo luz UV. Verde colorante FITC-dextrano 10 kDa. Se observa en el embrión *ise2* una mayor propagación del colorante accediendo al interior de las células del hipocótilo y cotiledones. En el embrión WT se muestra un detalle de las lesiones donde el colorante penetró pero no se propagó. Pueden observarse los cotiledones aberrantes en el embrión *ise2*. Escala 50 μ m (B) Esquema del gen *ISE2* representando exones con cajas e intrones con líneas y detallando las regiones donde se encuentran las mutaciones *ise2-1* (*ise2*; glutamina pos 61 (CAG) $\rightarrow$ STOP (TAG)) e *ise2-2* (*emb25*; ácido aspártico pos 275 DEVH box (GAT) $\rightarrow$ asparagina (AAT)). Esquema de la secuencia aminoacídica mostrando el péptido señal en negro, los dominios helicasa dentro de la región blanca con la posición de DEVH box en el dominio II, y el extremo C terminal en negro. (C) Fenotipo de plántula *ise2* y WT de 3 semanas de desarrollo. (D) Hojas y cloroplastos de *N. benthamiana* silenciados por VIGS. cont. control de silenciamiento nulo. *ise2* silenciamiento de *ISE2*. Escala en cloroplastos 200 nm. (A-C) Adaptado de Kobayashi *et al.* (2007). (D) Adaptado de Burch Smith y Zambrisky (2011).

i.4 Señalización Organela-Núcleo-PD (ONPS)

La pregunta que surgía a partir de los trabajos con *ise1* e *ise2* era: de qué manera mutaciones en genes cuyos productos se encontraban asociados a diferentes organelas podían exhibir el mismo efecto sobre la función y formación de los PD.

Para responder esta pregunta, Burch-Smith *et al.* (2011) decidieron estudiar el perfil de expresión génica de los embriones *ise1* e *ise2*, y embriones WT como control. Extrajeron ARN de semillas en desarrollo con embriones homocigotas para cada mutación (o embriones WT). Luego, utilizaron un chip de microarreglos de ADN para identificar genes que mostraran una diferencia de expresión (mayor o menor) de dos veces o más respecto al WT. Se concentraron luego en genes que estuvieran relacionados con el crecimiento y desarrollo del embrión, genes asociados a los PD o con función en la síntesis de pared celular, genes nucleares cuyas proteínas sintetizadas se translocan al CP o mitocondria; y genes codificados en el genoma plasmídico o mitocondrial. Sorprendentemente, la mayoría de los genes desregulados, tanto en *ise1* como en *ise2*, pertenecía a genes nucleares asociados a los plástidos.

Basándose en los resultados de este trabajo, y en los mecanismos de señalización descriptos entre mitocondrias, CP y el núcleo (Bobik y Burch-Smith, 2015; Inaba *et al.*, 2011), los autores propusieron un modelo que postula que: (1) el CP regula genes nucleares que poseen funciones en la fisiología de PD, y (2) el CP podría actuar directamente sobre los PD para regular su actividad. Este modelo fue denominado “señalización organela-núcleo-PD” (ONPS, del inglés *Organelle Nucleus Plasmodesmata Signalling*).

i.5 Cloroplastos

De acuerdo a la teoría endosimbiótica, los primeros eucariotas fotosintéticos se originaron más de 1000 millones de años atrás a partir de cianobacterias que fueron endocitadas por células eucariotas. Este evento derivó en ventajas para ambos organismos, que evolucionaron en una simbiosis estable dando lugar al supergrupo Plantae (Price *et al.*, 2012). Con el tiempo, el endosimbionte perdió su autonomía dado que la mayoría de sus genes fueron transferidos al núcleo de la célula huésped. De esta forma, el endosimbionte fotosintetizador se transformó en una organela de la célula eucariota, aunque manteniendo parte de su genoma original. Esta organela puede modificarse dependiendo del tejido y del desarrollo de la planta, adoptando distintas funciones. Al conjunto de estas distintas formas se lo denomina “plástidos”; el CP es el plástido más conocido dado que al sintetizar clorofila es el responsable de la fotosíntesis oxigénica y del color verde de la mayoría de las plantas.

La maduración de los plástidos indiferenciados (proplástidos) a CP tiene lugar durante la embriogénesis, específicamente en el estadio torpedo. Además, en este estadio aumenta el número de CP, lo que se acompaña de una acumulación de pigmentos fotosintéticos y metabolitos esenciales como vitaminas, hormonas y lípidos (Bryant *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2010). Los CP son organelas estructuralmente complejas. Poseen tres membranas lipídicas (externa e interna de la envoltura, y tilacoidal) y tres compartimientos acuosos (espacio intermembrana de la envoltura, estroma y lumen del tilacoide) (Jarvis y Robinson, 2004).

i.5.1 El genoma del cloroplasto y los nucleoides

En las plantas terrestres, el genoma de los CP (plastoma) contiene entre 120-130 genes altamente conservados con funciones que incluyen: (1) genes codificando componentes de la maquinaria de expresión génica (ARN polimerasas, proteínas ribosomales, ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomales (ARNr)); (2) genes relacionados con la fotosíntesis; y (3) genes codificando proteínas con funciones diversas (Barkan, 2011). El resto de las más de 3000 proteínas necesarias para el funcionamiento del CP se encuentran codificadas en el núcleo y se translocan a la organela una vez sintetizadas en el citoplasma (Jensen y Leister, 2014).

El plastoma, es una molécula circular de ADN con un tamaño molecular de 120-190 kPb, dependiendo la especie, y está organizado en un par de regiones duplicadas invertidas separadas por dos regiones de única copia. Cada CP de las células del mesófilo puede contener hasta 300 plastomas, que se organizan en estructuras denominadas nucleoides, cada uno conteniendo 10-20 copias del genoma (Jensen y Leister, 2014).

Los nucleoides son asociaciones de ADN, ARN y proteínas, en los cuales se encuentran todas las enzimas necesarias para la transcripción, replicación y segregación del plastoma (Powikrowska *et al.*, 2014). El número y posición de los nucleoides depende del estado de desarrollo de los plástidos. Dado que muchas proteínas de unión al ARN fueron identificadas en los nucleoides, se cree que la maduración y protección del ARN sucede en los mismos, mientras que la traducción y la degradación ocurre en el estroma (Germain *et al.*, 2013)

i.5.2 Regulación de la expresión génica en cloroplastos

La transcripción en los CP de la mayoría de las plantas de tierra depende de dos tipos de ARN polimerasas – ADN dependientes: una codificada en el plastoma (PEP, del inglés *plastid encoded polimerase*) y otra codificada en el genoma nuclear (NEP, del inglés *nucleus encoded polimerase*). Factores endógenos y exógenos como la luz, temperatura, hormonas, tipo y desarrollo de plástido, ritmos circadianos y fotoperíodo pueden afectar el nivel de transcripción (Liere *et al.*, 2011).

Sin embargo, la regulación de la expresión génica en CP se da mayormente por eventos postranscripcionales que pueden afectar la traducibilidad o la estabilidad de los transcriptos (Germain *et al.*, 2013). Los transcriptos cloroplásticos son sintetizados como operones policistrónicos que se procesan para dar unidades funcionales menores, lo cual ocurre de forma cotranscripcional y asociado a los nucleoides (Powikrowska *et al.*, 2014; Germain *et al.*, 2013). Este procesamiento conserva muchas características procariotas debido al origen cianobacteriano de los plástidos, pero también existen diferencias, como el mecanismo de maduración, la existencia de intrones y la edición del ARN. En todos estos procesos participan un enorme conjunto de proteínas de unión a ARN.

i.5.2.1 Corte y “poda” de transcriptos primarios

Los transcriptos policistrónicos son procesados por endonucleasas (ARNasa E/J) en regiones intercistrónicas y por exonucleasas en sus extremos 5' (ARNasa J) y 3' (ARNasa II y PNPasa). Las exonucleasas se detienen en sitios con estructuras secundarias de ARN o en sitios con proteínas unidas al ARN (principalmente enzimas

con dominios de pentatricopéptidos (PPR)). Las endonucleasas clivan los transcriptos primarios en regiones identificadas por proteínas de unión a ARN (como las PPR). Cada fragmento resultante es pasible de ser nuevamente procesado (Stern *et al.*, 2010).

i.5.2.2 Edición del ARN

La edición del ARN se refiere al cambio de bases C -> U en posiciones determinadas de los ARNm del CP, lo cual altera el aminoácido codificado en el plastoma. En total, pueden encontrarse 20-50 eventos de edición entre todos los genes codificados en el plastoma dependiendo de la especie. La función de la edición parece ser siempre la restauración de un codón para un aminoácido ampliamente conservado aunque los sitios de edición no suelen conservarse entre especies. Todos los factores de edición que se conocen son codificados por el núcleo (Germain *et al.*, 2013).

i.5.2.3 Intrones cloroplásticos

Una característica importante de los plástidos es la existencia de aproximadamente 20 intrones distribuidos en algunos genes del plastoma. No son ortólogos a los de cianobacterias sino que fueron adquiridos durante la evolución de las plantas terrestres como elementos genéticos móviles que se volvieron inmóviles (Germain *et al.*, 2013).

Existen dos tipos de intrones (I y II) en las organelas de las plantas, que se diferencian por sus mecanismos de corte y empalme (*splicing*), y por elementos estructurales conservados. Los intrones de tipo I son eliminados en dos pasos de trans-esterificación que liberan un intrón lineal. Los intrones de tipo II se clasifican en IIa o IIb de acuerdo a

una estructura conservada de seis dominios de hélice conectados por un núcleo central. Son eliminados mediante dos pasos de trans-esterificación que liberan el intrón en forma de lazo (salvo para el intrón de *trnV* que se libera lineal). Existen 20 intrones de tipo II en los plastomas de *Arabidopsis* y tabaco, y un solo intrón de tipo I (en el gen *trnL*). Además, el gen *rps12* contiene un intrón que es procesado en trans, es decir que los exones 1 y 2 son codificados por dos operones distintos que se ensamblan luego del procesamiento del intrón (Jacobs y Kuck, 2011; Jarmoskaite y Russell, 2014; Michel *et al.*, 1989).

El procesamiento de los intrones requiere el plegamiento del ARN en estructuras tridimensionales, un proceso que es asistido por proteínas denominadas factores de *splicing*. Estos factores pueden clasificarse en dos grupos: antiguas maturasas codificadas en el intrón y proteínas de origen evolutivo más reciente derivadas de la célula huésped (Stern *et al.*, 2010).

La única maturasa presente en las plantas de tierra es la maturasa K (*matK*), que se encuentra codificada en el intrón de tipo II del gen *trnK* y promueve el procesamiento de este y de otros intrones.

Se han identificado más de 16 factores de *splicing* cloroplásticos codificados en el núcleo, cuyas funciones se encuentran conservadas entre los ortólogos de *Arabidopsis* y maíz, lo cual indica que son evolutivamente anteriores a la divergencia mono y dicotiledónea (Germain *et al.*, 2013). Estos factores no guardan relación con los componentes del complejo de *splicing* nuclear. En cambio, poseen motivos de unión a ARN inusuales que se encuentran predominantemente (o únicamente) en proteínas localizadas en organelas: CRM, PORR, APO, PPR (que también participan de la edición de ARN) y OPR (Barkan, 2011)

No existe una maquinaria de *splicing* general para el procesamiento de intrones cloroplásticos, sino que los factores actúan en distintas combinaciones para promover la eliminación de subgrupos de intrones. La relación entre moléculas de ARN no procesadas y moléculas con intrones removidos depende de la eficiencia del *splicing* para cada intrón. Esta eficiencia varía en respuesta a señales ambientales, como las condiciones de luz (Barkan, 1989; Deshpande *et al.*, 1997), y en respuesta al desarrollo y al órgano a considerar (Valkov *et al.*, 2009), aunque se desconoce si tiene algún rol regulatorio en el CP.

i.5.3 Proteínas de unión a ARN y ARN helicasas

El procesamiento del ARN en el CP requiere de una extensa batería de proteínas de unión a ARN codificadas en el núcleo. Estas proteínas pueden clasificarse de acuerdo a los dominios conservados, encontrándose proteínas con dominios de PPR, proteínas con motivos de reconocimiento de ARN (RRM), proteínas con motivos en el extremo C terminal (CRM), proteínas con dominios de función desconocida (DUF) y ARN helicasas (RH) (Kroeger *et al.*, 2009; Majeran *et al.*, 2012; Ruwe *et al.*, 2011; Schmitz-Linneweber y Small, 2008; Asakura *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2012; Longevialle *et al.*, 2008; Melonek y Mulisch, 2010). Entre estas, las más abundantes en plantas son las proteínas PPR, pudiendo hallarse más de 450 codificadas por el genoma nuclear, todas direccionadas a mitocondrias y/o CP, mientras que en otros eucariotas están representadas en un menor número. Las proteínas PPR participan en todos los pasos del procesamiento del ARN, uniéndose de una forma dependiente de la secuencia nucleotídica a cada transcripto (Germain *et al.*, 2013; Tillich *et al.*, 2010)

Otro importante grupo de proteínas de unión al ARN en el CP es el de las ARN helicasas (RH, del inglés *RNA helicase*), al cual pertenece la proteína ISE2. Estas enzimas actúan como chaperonas utilizando ATP para modificar la arquitectura del ARN y las interacciones con proteínas en complejos de ribonucleoproteínas (RNP) (Jarmoskaite y Russell, 2014). Al igual que las proteínas PPR, se ha asociado a las RH con la mayoría de los aspectos del metabolismo de ARN (Linder y Fuller-Pace, 2013; Linder y Owtttrim, 2009). Incluso, se ha propuesto que las RH pueden actuar como centros de reclutamiento para el establecimiento de complejos de unión ARN-proteínas (Linder y Fuller-Pace, 2013; Linder y Owtttrim, 2009). Por ejemplo, RH desestabilizan estructuras secundarias de ARN y permiten el acceso de nucleasas para la degradación.

De acuerdo a la secuencia y estructura, la mayoría de las RH se pueden asignar a las Superfamilias (SF) 1 y 2, siendo el segundo grupo el mayoritario (Bobik *et al.*, 2017). La secuencia consenso de un dominio helicasa sirve para dividir las RH de la SF2 en tres familias principales: DEAD, DEAH/RHA y Superkiller 2 (Nawaz y Kang, 2017). En el genoma de *Arabidopsis* se hallan codificadas más de 100 RH de la SF2, de las cuales 58 contienen un dominio tipo DEAD (Burch-Smith *et al.*, 2011; Linder y Fuller-Pace, 2013), siete de las cuales (RH3, RH22, RH26, RH39, RH47, RH50 y RH58) se localizan en el CP (Nawaz y Kang, 2017). RH3 fue detectada en las fracciones enriquecidas de nucleoides cloroplásticos y tiene actividad en el *splicing* de intrones de tipo II y en la maduración de la subunidad 50S de los ribosomas plastídicos (Asakura *et al.*, 2012). RH22 y RH39 parecen ser requeridas para la correcta maduración de ARN plastídico ribosomal (Chi *et al.*, 2012). Además de ISE2, otras dos RH con dominios DEAH/RHA fueron reportadas previamente en *Arabidopsis*: MTR4 (AT1G59760) localizada en el núcleo y necesaria para la biogénesis de ARNr, y AtHELPS (AT3G46960), involucrada en las respuestas a

estrés por falta de potasio (Lange *et al.*, 2011). Sin embargo, ISE2 es la única RH codificada en el núcleo y translocada al CP que no pertenece a la familia DEAD (Olinares *et al.*, 2010).

La Fig. i.4 presenta un resumen de los pasos de procesamiento del ARN en CP.

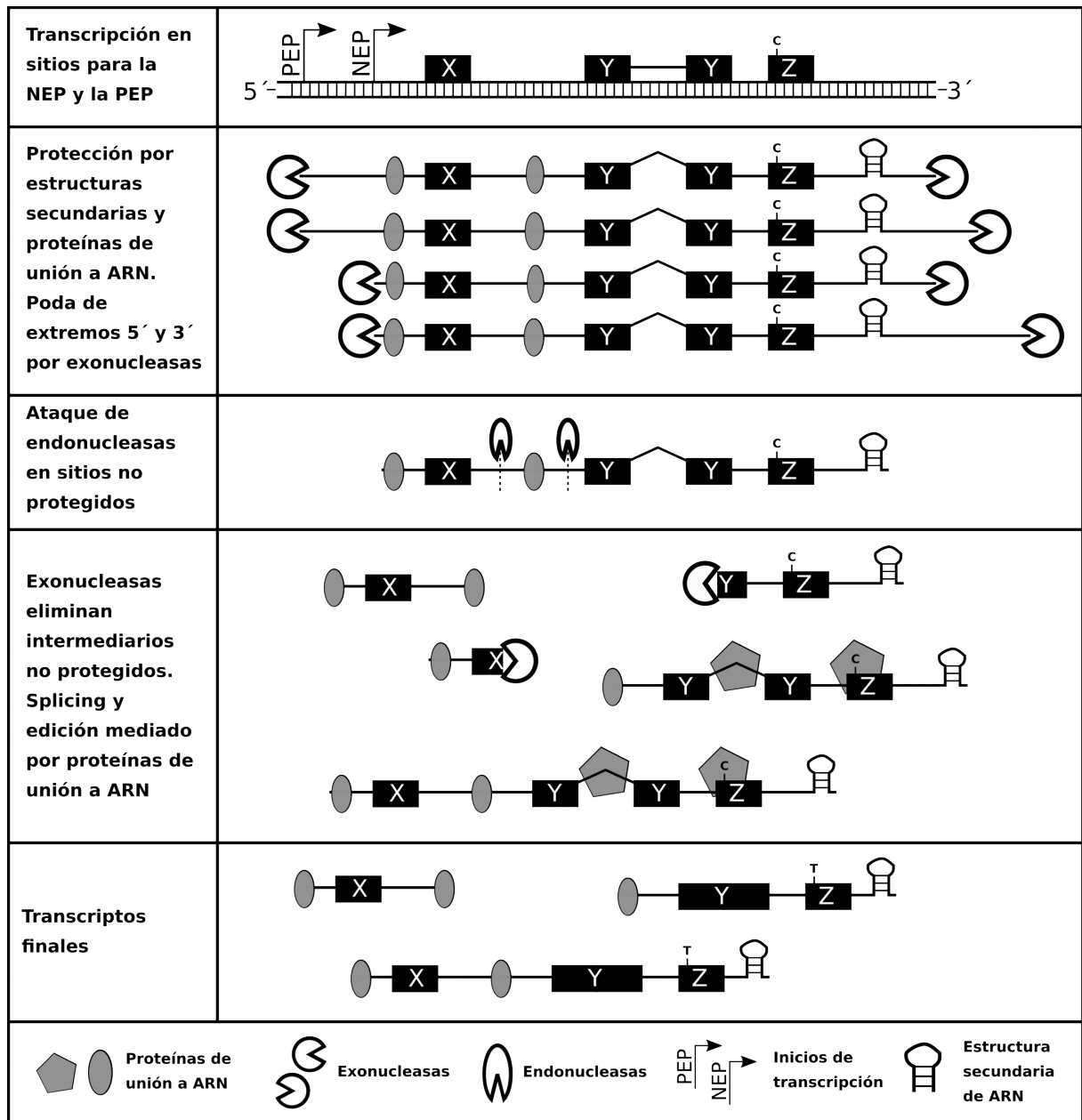


Figura i.4. Etapas del procesamiento de ARN en el cloroplasto. Los transcriptos cloroplásticos son sintetizados en forma de operones policistrónicos que son procesados para dar unidades funcionales menores. Los procesos que se muestran en la figura no están ordenados secuencialmente, sino que todos suceden cotranscripcionalmente.

i.5.4 Proteostasis en el cloroplasto

La proteostasis en el CP comprende la síntesis, la importación y degradación, y el reciclado de proteínas (van Wijk, 2015). Las síntesis de proteínas depende de ribosomas 70S tipo bacterianos que están formados por la subunidad 50S (ARNr23S, 5S, 4.5S, y 33 proteínas) y la subunidad 30S (ARNr16S y 24 proteínas) y que reconocen sitios de inicio de la traducción en los ARNm maduros (Shine Dalgarno y otros) (Tiller y Bock, 2014; van Wijk, 2015). Factores de iniciación y elongación codificados en el núcleo, en su mayoría proteínas con dominios PPR, promueven la traducción interactuando con el extremo 5' no codificante de los transcritos. Esta interacción libera sitios de unión de ribosomas y es un importante punto de regulación de la traducción (Barkan, 2011; Yi Sun y Zerges, 2015).

Distintos mecanismos regulan la tasa de traducción. Algunos ejemplos son el estado redox del cloroplasto y estreses abióticos como temperatura y alta luz. También existe un mecanismo de autorregulación mediante retroalimentación negativa (Siniauskaya *et al.*, 2015).

Las proteínas codificadas en el núcleo e importadas al CP poseen un péptido señal en el extremo N terminal, que les permite ser translocadas mediante los complejos TIC/TOC de la envoltura cloroplástica (van Wijk, 2015).

Distintas señales marcan a las proteínas del CP para su degradación: modificaciones post traduccionales, daño, pérdida de algún cofactor, un cambio en la oligomerización o mal plegado. Sobre estas proteínas actúan sistemas de degradación específicos, entre ellos el complejo CLP, DEG, FTSH y LON. Por último, oligopeptidasas generan aminoácidos libres actuando sobre los productos de degradación de proteínas, que pueden jugar un rol en la señalización retrógrada (van Wijk, 2015).

i.5.5 El cloroplasto como sensor y señalizador

Conjuntamente a la fotosíntesis oxigénica, los CP cumplen muchas otras funciones, como la síntesis de aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos, la producción de hormonas como ácido abscísico, ácido jasmónico y SA, la síntesis de carotenoides, tocoferoles y metabolitos secundarios, así como la asimilación de nitrógeno, azufre y la producción de almidón (Bobik y Burch-Smith, 2015). Por lo tanto, resulta necesario que el funcionamiento del CP y del resto de la célula estén sincronizados. Para esto existen mecanismos de acoplamiento entre el genoma nuclear y el del plastoma conocidos como **señalización anterógrada y señalización retrógrada**.

La señalización anterógrada se refiere a la regulación que ejerce el núcleo sobre la expresión génica de los plástidos, la cual surge debido a la gran cantidad de factores de la maquinaria de la expresión génica plastídica que se encuentran codificados en el núcleo. Entre estos factores se encuentran: proteínas con dominios pentatricopéptidos, tetratricopéptidos, factores sigma (subunidades de la ARN polimerasa codificada en el plastoma), proteínas ribosomales y la subunidad pequeña de la RuBisCo (Ribulosa 1-6 bisfosfato carboxilasa) (Berry *et al.*, 2013).

La señalización retrógrada se refiere a la comunicación del estado fisiológico del plástido al núcleo y que, directa o indirectamente, generan respuestas sobre la expresión génica nuclear (Chan *et al.*, 2016). En plantas adultas, las señales retrógradas modulan un amplio rango de procesos fisiológicos, como respuestas a estrés, *splicing* alternativo y ritmos circadianos (Petrillo *et al.*, 2014; Woodson y Chory, 2008).

Se pueden diferenciar dos tipos de señalización retrógrada: biogénicas y operacionales. La señalización biogénica se da mientras el CP se desarrolla. La señalización operacional actúa en respuesta a cambios en el ambiente que son sentidos

por CP completamente desarrollados (Bobik y Burch-Smith, 2015). Mediante la señalización biogénica el CP coordina el ensamblado de los componentes plastídicos e intenta asegurar el normal desarrollo de la organela. En cambio, el efecto de las señales retrógradas operacionales es realizar ajustes en el CP si estos se ven fuertemente afectados (Chan *et al.*, 2016).

Muchos genes nucleares responden a la señalización retrógrada modificando su expresión. Los más estudiados son los llamados PhANGs (del inglés *photosynthesis associated nuclear genes*, genes nucleares asociados con la fotosíntesis). Ejemplo de estos PhANGs son la familia de genes del complejo antena *LHCB* o la subunidad menor de la RUBISCO *RBCS* (Inaba *et al.*, 2011). Cada combinación de señales retrógradas afecta de forma diferente la expresión génica nuclear, aunque han sido identificados 39 genes que son regulados por la mayoría de las señales retrógradas (Gläßer *et al.*, 2014). Las mutantes denominadas *gun* (del inglés *genomes uncoupled*, genomas desacoplados) se caracterizan por no presentar coordinación entre la expresión génica nuclear y la expresión génica plastídica, y sirvieron para identificar las primeras señales retrógradas del CP al núcleo (Susek *et al.*, 1993).

Las siguientes cinco secciones son una breve descripción de algunas señales retrógradas conocidas.

i.5.5.1 Tetrapirroles (*gun2-6*)

Cinco de las seis mutantes *gun* presentan mutaciones en genes de la biosíntesis de tetrapirroles. Los tetrapirroles son precursores de la clorofila y del grupo hemo. En la Fig. i.5 puede observarse en qué etapa de la biosíntesis de los tetrapirroles está ubicada cada mutación. La mutante *gun1* presentaría fallas en el precursor de los tetrapirroles

por un mal procesamiento del ARNt Glu. La falta de Mg-proto IX en las mutantes *gun4* y *gun5* y el exceso de hemo en las mutantes *gun2*, *gun3* y *gun6* se correlacionó con la imposibilidad de reprimir los PhANGs.

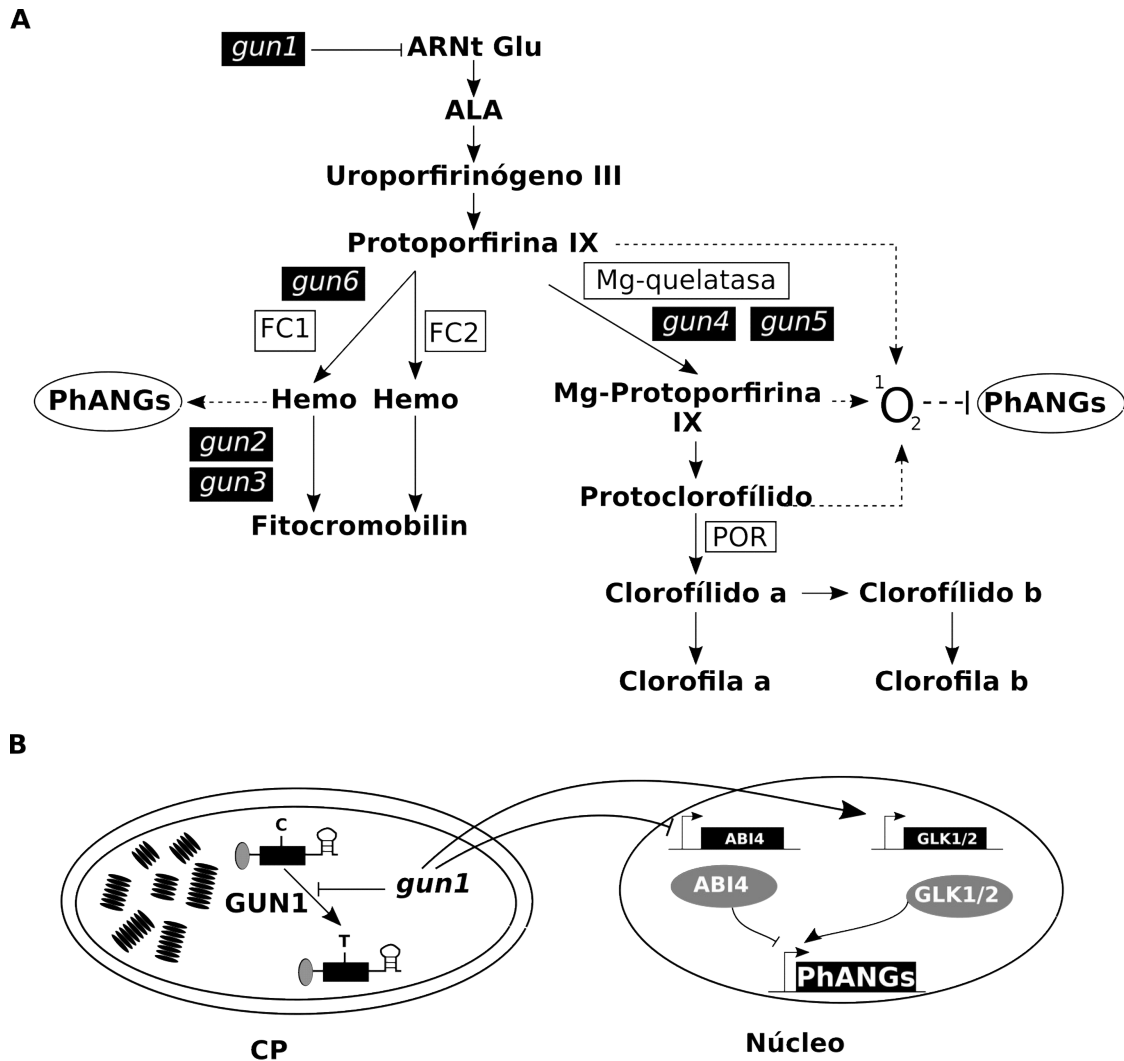


Figura i.5. Señales retrógradas asociadas con las mutantes *gun*. (A) Biosíntesis de tetrapirroles. ALA ácido 5-aminolevulínico. POR protoclorofílido óxido reductasa FC ferro chelatas. Recuadradas en blanco proteínas relevantes de la vía biosintética. Recuadradas en negro las mutaciones que impactan en la señalización retrógrada. Adaptado de Terry y Smith (2013) (B) La mutación *gun1* afecta la edición en el CP. En tratamientos con NF no puede generar las señales para disminuir la expresión de los PhANGs.

i.5.5.2 Expresión génica del cloroplasto (*gun1*)

GUN1 es una proteína PPR localizada en los plástidos. La señalización retrógrada dependiente de GUN1 es parcialmente diferente de las *gun2-6*. Aunque la transducción de la señal retrógrada de la rama de GUN1 no está del todo identificada, se sabe que los factores de transcripción que actuarían en esta señal son los GLK1/2 (Brunkard y Burch Smith, 2018) (Fig. i.5B). Un reciente trabajo reportó que GUN1 interactúa con el factor de edición del ARN MORF2 (MULTIPLE ORGANELLAR RNA EDITING FACTOR) e interviene en la edición de 11 genes plastídicos (Zhao *et al.*, 2019).

i.5.5.3 Actividad traduccional del cloroplasto

La actividad traduccional de los CP genera una señal retrógrada que puede afectar la anatomía y morfología de la planta (Siniauskaya *et al.*, 2015). Plántulas tratadas con cloranfenicol, antibiótico que inhibe la traducción en los CP, muestran un descenso en la expresión de PhANGs, particularmente en *LHCB* y *RBCS*. Mutaciones que afectan la importación de proteínas al CP mediante el complejo TIC/TOC también generan una señalización retrógrada mediada por GUN1 y GLK1/2 (Inaba *et al.*, 2011).

i.5.5.4 Otras señales retrógradas

Los **carotenoides** son productos de la vía biosintética de los isoprenos y actúan en los complejos antena como pigmentos accesorios para ampliar el espectro de absorción de luz y como protectores frente a estrés oxidativo por oxígeno singlete generado en el FSII (Brunkard y Burch-smith, 2018). Sin embargo, derivados de los carotenoides han sido propuestos como partícipes de la señalización retrógrada,

principalmente frente a exceso de $^1\text{O}_2$. El producto de oxidación del β -caroteno, llamado β -ciclocitral, es un compuesto volátil cuya acumulación en *Arabidopsis* correlaciona con el aumento de $^1\text{O}_2$ en estrés por alta luz.

La fosfatasa **SAL1** ubicada en mitocondrias y CP regula el nivel de 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (**PAP**) mediante su desfosforilación a adenosin monofosfato (AMP) (Pornsiriwong *et al.*, 2017). La inhibición de SAL1 aumenta los niveles de PAP, que a su vez se transloca del CP al núcleo donde actúa regulando la expresión génica mediante efectos inhibitorios sobre exoribonucleasas (Estavillo *et al.*, 2011).

El **metileritritol ciclodifosfato** (MEcPP) es un precursor isoprenoide que promueve la expresión de los genes *HPL* (*HIDROXIPERÓXIDO LIASA*) y *ICS1* (*ISOCORISMATO SINTETASA 1*). HPL interviene en la síntesis de oxilipinas en el CP como ácido jasmónico. ICS1 es una enzima clave en la síntesis de ácido salicílico (SA). La acumulación de MEcPP sería una señal retrógrada operacional inducida por daño mecánico y estrés de alta luz. (Xiao *et al.*, 2012).

WHIRLY es una proteína de bajo peso molecular que une ADN simple cadena e interviene en el procesamiento de ARN en el CP. WHIRLY se encuentra tanto en el CP como en el núcleo y se ha propuesto que WHIRLY1 provee información al núcleo sobre el estado redox del CP, aunque se desconoce el mecanismo (Bobik y Burch-Smith, 2015).

La coordinación de la expresión génica entre el CP y el núcleo puede ser mediada por los **niveles de azúcar** en ambos compartimentos. Los niveles de dihidroxiacetona fosfato (DHAP), intermediario del ciclo de Calvin-Benson, serían sensados tanto por el CP como por el citosol, regulando la expresión génica nuclear (Häusler *et al.*, 2014).

En el CP se sintetizan muchas **hormonas** que tienen roles en la respuesta frente a estreses, por lo cual pueden ser consideradas como señales retrógradas operacionales. El ácido jasmónico (JA), el ácido absísico (ABA) y el ácido salicílico (SA) se producen en el CP (Koussevitzky *et al.*, 2007). El ácido salicílico es muy importante en la defensa frente a ataque de patógenos, aumentando su producción y promoviendo la translocación de la proteína cloroplástica NRIP1 (NON PATHOGEN RELATED PROTEIN 1) al núcleo donde activa la transcripción de genes de defensa, como por ejemplo PDLP5. La inducción de PDLP5 aumenta la deposición de calosa en los PD mediante la acción de CALS1 (Cui y Lee, 2016).

i.5.5.5 Especies reactivas de oxígeno y estado redox de los cloroplastos

Las ROS y el estado redox del CP constituyen otro tipo de señalización retrógrada de gran importancia: la mayoría de las señales retrógradas anteriores dependen de la producción de alguna ROS. Además, la producción de ROS en el CP es una consecuencia inevitable del transporte de electrones fotosintético en un ambiente con oxígeno y de la presencia de pigmentos fotosensibles que producen y consumen oxígeno. La producción moderada de ROS actúa como mecanismo de señalización, mientras que un exceso de ROS es peligroso para la célula porque puede generar el gatillado de muerte celular programada. Sin embargo, en el CP existen mecanismos de detoxificación de ROS. En la Fig. i.6 se muestran los principales sitios de producción de ROS y los mecanismos antioxidantes.

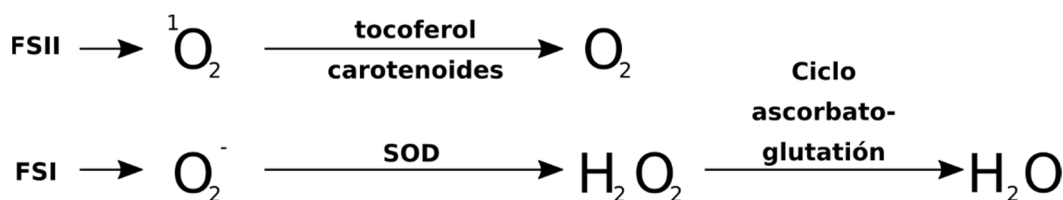


Figura i.6. Formación y detoxificación de ROS. FSII, fotosistema 2; FSI, fotosistema 1; SOD, superóxido dismutasa.

Las ROS pueden ser sensadas por mecanismos que aún no están del todo claros, y regulan así genes nucleares. H_2O_2 podría comportarse como la señal retrógrada dada su vida media relativamente alta (Caplan *et al.*, 2015). En cambio, la vida media corta de ${}^1\text{O}_2$ y O_2^- obliga que estos requieran de mecanismos de transducción de señales (Shapiguzov *et al.*, 2012).

No se conoce en profundidad las vías de señalización mediadas por H_2O_2 . Se cree que es una combinación de difusión desde el CP (por medio de acuaporinas en la envoltura cloroplástica) y vías indirectas como la señalización por ABA por ejemplo. Recientemente se propuso que H_2O_2 se relocaliza del CP al núcleo vía estrómulos (extensiones del CP con contenido estromal) (Caplan *et al.*, 2015). No obstante, H_2O_2 es poco probable que sea la señal en sí misma. En cambio, compuestos sensibles a ROS podrían mediar la señalización al núcleo.

Las respuestas celulares a cada ROS particular están altamente especializadas. Por ejemplo, la producción de H_2O_2 en el CP genera efectos distintos a la producción de H_2O_2 en otras organelas, incluso el citosol. Y las respuestas nucleares de plantas *flu* (acumulación de ${}^1\text{O}_2$) y plantas tratadas con paraquat (acumulación de H_2O_2 / O_2^-) presentan diferencias notorias (Shapiguzov *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓN GENERAL

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la función de la ARN helicasa ISE2 en CP y vincularla con su rol en la regulación de los PD y en la vía de señalización ONPS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los ARN blanco de ISE2.

Estudiar el impacto de la mutación/silenciamiento de *ISE2* y de otros genes con función en el procesamiento de ARN plastídico sobre la vía de señalización ONPS.

HIPÓTESIS

- 1) ISE2 interviene en el procesamiento de ARNs cloroplásticos indispensables para el desarrollo normal del CP.
- 2) la desregulación de las funciones de los PD en embriones mutantes *ise2* es causada por la falta o la falla de alguna señal desde los CP al núcleo debido a las alteraciones ocasionadas por la mutación.
- 3) mutantes de otros genes nucleares dirigidos a CP, con fenotipos de embriogénesis defectuosa y/o CP mal o poco desarrollados similares a los de la mutante *ise2*, presentan alteraciones de las funciones de PD acorde al modelo ONPS.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

MATERIALES Y MÉTODOS

m.1 Material Vegetal y condiciones de crecimiento

El crecimiento de plantas se realizó en cuartos de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas (h) luz – 8 h oscuridad bajo luz blanca fluorescente a una temperatura ambiente de 22-24 °C.

Para el trabajo con plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* se sembraron aproximadamente 50 semillas en macetas de 10 cm de diámetro llenas con una premezcla de sustrato Growmix Multipro (Terrafértil) hasta 2 cm debajo del borde. El sustrato fue prehumedecido por capilaridad ubicando la maceta en bandejas con agua destilada y luego de sembrar las semillas se cubrieron las macetas con papel film y se ubicaron en cuartos de cultivo. Para las semillas de *Arabidopsis* se realizó un paso previo de estratificación que consiste en una incubación en oscuridad a 4°C durante dos días. Luego de una semana, cuando los cotiledones ya emergieron, se equiparó paulatinamente la humedad dentro de la maceta con la humedad ambiente generando agujeros en el papel film a lo largo de un día, quitando completamente el papel al final del mismo. Al día siguiente se transfirieron las plántulas a macetas individuales cuidando de no dañar las raíces durante la manipulación, se regó sobre el sustrato para que las raíces entren en contacto con el mismo y se regresaron las bandejas a los cuartos de cultivo. Las macetas individuales fueron vasos descartables de plástico blanco de 180 ml y de 300 ml para *Arabidopsis* y *N. benthamiana* respectivamente. De acuerdo a la necesidad de cada experimento, se sembraron 2 – 3 plántulas por maceta si no se requería utilizar plantas muy desarrolladas, o 1 plántula por maceta si se requería utilizar plantas grandes.

El riego se realizó siempre con agua destilada en la bandeja conteniendo las macetas y una vez por semana se regó con solución (SC) de fertilizante Hakaphos Rojo (Compo Expert) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para los ensayos de *Dye loading*, se utilizaron plantas heterocigotas *ise2* y *clpr2-2* (Salk_016774) que fueron identificadas observando la proporción de embriones verde:blanco de 3:1 en las semillas en desarrollo dentro de las silicuas.

Para obtener plantas homocigotas *ise2* y *clpr2-2*, semillas cosechadas desde plantas heterocigotas fueron esterilizadas y sembradas en placas de Petri con medio agar MS (4,43 g/l MS, 3% m/v sacarosa, pH 5,8 con NaOH, 15 g/l agar). Las placas fueron selladas con papel film para mantener la humedad, se estratificaron las semillas y luego se pasaron a los cuartos de cultivo en condiciones estándar de crecimiento.

Para obtener plantas ISE2-SUP se crecieron dos macetas con semillas ISE2-OE en cada tanda de germinación y se transfirieron cinco plantas a cada maceta individual. Al momento de observar el fenotipo de silenciamiento se descartaron las restantes plantas de la maceta.

m.1.1 Esterilización húmeda de semillas

Aproximadamente 100 semillas se alicuotaron en un tubo de 1,5 ml e incubaron 1 minuto (min) con 750 µl de isopropanol que luego se descartó. Se agregaron 750 µl de SC de lavandina (50% v/v de 55 g/l lavandina, 0,05% Tween20) y se realizó una incubación de 5 min homogeneizando la SC esporádicamente. Luego se descartó la SC de lavandina y se realizaron un enjuague y tres lavados de 5 min con agua bidestilada estéril.

m.1.2 Esterilización seca de semillas

Tubos de 1,5 ml, destapados y conteniendo las semillas a esterilizar, se ubicaron dentro de una campana de vacío junto a un vaso de precipitados conteniendo 10 ml de 1N HCl. Se agregaron 20 ml de lavandina (55g/l) y tapó inmediatamente la campana, sellando los bordes y la abertura para vacío con papel film. Se incubaron las semillas durante toda la noche en el ambiente saturado de cloro y al día siguiente se destapó la campana bajo flujo laminar.

m.2 Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* y la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, que porta el gen de resistencia a rifampicina en el genoma y el gen de resistencia a gentamicina en el plásmido pTic58.

Para el crecimiento de bacterias se utilizó el medio rico Luria Bertani (LB) (1% m/v NaCl, 1% m/v Peptona o Tripteína, 0,5% extracto de levadura, pH 7). Para cultivos líquidos se realizó un inóculo de bacterias en medio LB líquido, suplementado con antibióticos en caso de ser necesario, en un recipiente de un volumen al menos 10 veces mayor al volumen de LB. Se incubó en agitación a 200 revoluciones por minuto (r. p. m.) a una temperatura de 37°C para *E. coli* y de 28°C para *A. tumefaciens* (temperatura específica T. esp.). Para aislamiento de colonias o mantenimiento de estrías se estriaron o inocularon bacterias en placas de Petri con medio LB adicionado con agar 1,5% y se incubaron a la T. esp 24 h para *E. coli* y 48 h para *Agrobacterium*.

Para la conservación a largo plazo, se mezclaron 600 μ l de un cultivo saturado crecido durante toda una noche con 400 μ l de 50% glicerol estéril (concentración final 20% glicerol) en un tubo de 1,5 ml y se guardó en ultrafreezer a -70°C. Para la

conservación a corto plazo se crecieron las bacterias en placas con medio LB adicionado con 1,5% agar y los correspondientes antibióticos y se guardaron a 4°C hasta un mes para *E. coli* y a temperatura ambiente y oscuridad hasta un mes para *Agrobacterium*.

Los antibióticos utilizados fueron ampicilina (alícuota 1000X = 100 mg/ml en agua), gentamicina (alícuota 1000X = 50 mg/ml en agua) kanamicina (alícuota 1000X = 50 mg/ml en agua) higromicina (alícuota 1000X = 50 mg/ml en agua) rifampicina (alícuota 500X = 50 mg/ml en agua o DMSO), espectinomicina (alícuota 1000X = 100mg/ml en agua) estreptomicina (alícuota 1000X = 100mg/ml en agua).

m.2.1 Preparación y transformación de bacterias termocompetentes (Método Hannahan)

Se inocularon 10 ml de LB con una colonia bacteriana de la cepa de interés desde una placa fresca y se incubaron en agitación a T. esp. hasta el siguiente día. Los 10 ml se agregaron a 190 ml de LB y se incubó nuevamente a T. esp. hasta obtener una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0,5 – 0,7. Se enfrió el cultivo en hielo durante 15-30 min y se distribuyó en mamaderas (previamente esterilizadas con etanol 70% y enjuagadas con agua destilada estéril). Se centrifugó 10 min a 2500 *g* y 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados en 80 ml finales de buffer TB estéril frío (10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, llevar a pH 6,7 y 55 mM $MnCl_2$. Esterilizar por filtrado). Se repitió la centrifugación y resuspendieron los precipitados en 20 ml final de buffer TB estéril frío y se agregó DMSO para concentración final de 7% v/v (aproximadamente 1,4 ml). Se dejó reposar la resuspensión final por 10 min en hielo y se alicuotaron 50 µl de bacterias en tubos de 1,5 ml estériles y fríos. Se congelaron los tubos en N_2 líquido y almacenó en ultrafreezer a -70°C.

Para la transformación de bacterias termocompetentes, se descongeló en hielo 50 µl de bacterias y se agregó 1-5 µl de ADN plasmídico, se incubó 30 min en hielo y se realizó un golpe de calor sumergiendo el tubo con las bacterias y ADN 30 segundos en un baño térmico a 42°C. Inmediatamente se regresó el tubo al hielo por 90 segundos. Se agregó 950 µl de LB, se incubó 1 hora a T. esp. y se centrifugó 3 min a 4000 *g*. Se resuspendió el precipitado en 100 µl de sobrenadante remanente y se plaqueó en medio LB agar suplementado con el antibiótico de selección. Las placas se incubaron a T. esp. 24 hs para *E.coli* y 48 hs para *Agrobacterium*.

m.2.2 Preparación y transformación de bacterias electrocompetentes

Se inocularon 10 ml de LB con una colonia bacteriana de la cepa de interés desde una placa fresca y se incubaron en agitación a T. esp. hasta el siguiente día. Los 10 ml se agregaron a 190 ml de LB y se incubaron nuevamente a T. esp. hasta obtener una DO_{600nm} de 0,5 – 0,7. Se enfrió el cultivo en hielo durante 15-30 min y se distribuyó en mamaderas (previamente esterilizadas con etanol 70% y enjuagadas con agua destilada estéril). Se cosecharon las bacterias centrifugando 10 min a 4000 *g* y 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 200 ml final de H₂O bidestilada estéril fría. Se repitió la cosecha y resuspensión en H₂O. Se centrifugó 10 min 4000 *g* y 4°C y se resuspendió el precipitado en 20 ml final de 10% glicerol estéril frío. Se repitió la centrifugación y descarte del sobrenadante y se resuspendió el precipitado final en 2 ml de 10% glicerol. Se dejó reposar la resuspensión final por 10 min en hielo y se alicuotó 50 µl de bacterias en tubos de 1,5 ml estériles y fríos. Los tubos se congelaron en N₂ líquido y almacenaron en ultrafreezer a -70°C.

Para la transformación de bacterias electrocompetentes, se esterilizó la cuba de electroporación con etanol 70%, se enjuagó con agua estéril y se introdujo en hielo. Se descongeló en hielo 50 μ l de bacterias electrocompetentes y se agregó 1-5 μ l de ADN plasmídico. Luego de incubar 5 min en hielo, se pasó la mezcla de ADN y bacterias a la cuba de electroporación (BioRad; 0,2 cm) y se aplicó un campo eléctrico de 2,5 kV por 5 milisegundos utilizando un electroporador *Gene Pulser* (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso eléctrico, las células se dejaron recuperar mediante el agregado de 950 μ l de LB y una incubación de 1 h a T. esp. Finalmente se centrifugó 3 min a 4000 *g*. Se resuspendió el precipitado en 100 μ l de sobrenadante remanente y se plaqueó en medio LB agar sólido suplementado con el antibiótico de selección. Las placas se incubaron a T. esp. 24 hs para *E.coli* y 48 hs para *Agrobacterium*..

m.3 Técnicas y métodos básicos de biología molecular

m.3.1 Aislamiento de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico en pequeña escala, se inoculó una colonia aislada de *E. coli* portando el plásmido de interés en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubó a 37°C y 200 r. p. m. durante toda la noche. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron durante 10 min a 4000 *g*. El precipitado se resuspendió en 300 μ L de solución P1 de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 μ g/mL ARNasa A). Luego, se agregaron 300 μ L de solución P2 de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente entre 3 y 5 min. A continuación, se agregaron 300 μ L de solución P3 de neutralización (fría) (3 M acetato de potasio, pH 5,5), se homogeneizó por agitación vigorosa y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó por 10 min a 16.000 *g* a

temperatura ambiente. El sobrenadante se trasvasó a otro tubo y se incubó 10 min a 37°C para que actúe la ARNasa (cuando se necesitó una extracción de alta pureza, posterior a la incubación a 37°C se agregó 500 µL de una solución formada por 24 partes de cloroformo y una parte de alcohol isoamílico, se centrifugó 5 min a 16.000 *g* y se tomó el sobrenadante que se trasvasó a otro tubo). Se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó durante 10 min a 16.000 *g* a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70% y se centrifugó nuevamente por 3 min a 16.000 *g*. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, para luego resuspenderlo en 30 µL de H₂O bidestilada autoclavada. En los casos en los que se necesitó una extracción de alta pureza y no se realizó el paso de cloroformo:isoamílico, se precipitó el ADN plasmídico con polietilenglicol o con acetato de amonio.

A lo largo de la Tesis también se trabajó con kits comerciales para extracción de ADN plasmídico en los que el paso de precipitación de isopropanol es reemplazado por el pasaje a través de una columna de sílica. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos pTRV1 y pTRV2 fueron cedidos por el Dr. Sebastián Asurmendi, Instituto de Investigación Biotecnológica, INTA Castelar.

El plásmido de expresión de GFP fue desarrollado en el laboratorio.

El plásmido de expresión de GFP2X fue cedido por el Dr. Andrew Breakspear (The John Innes Centre, Norwich, Inglaterra).

Los plásmidos de expresión de CHUP1:RFP, NRIP1:RFP y Hyper fueron cedidos por el Dr. Jeffrey Caplan del Delaware Biotechnology Institute, Newark, DE, EEUU.

El plásmido de expresión de SWIB6:RFP fue cedido por la Dra. Karin Krupinska, Botanisches Institut Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

m.3.2 Precipitación de ADN con polietilenglicol (PEG)

Al volumen final de 30 μ l de una extracción de ADN plasmídico se agregó 8 μ l de 4M NaCl y 40 μ l de 13% PEG 8000 autoclavado. Se mezcló e incubó 20 min a -20 o -70°C. Luego se centrifugó 15 min a 16.000 *g* y 4°C. Se removió el sobrenadante, lavó el precipitado con 500 μ l de 70% etanol y volvió a centrifugar 3 min a 16.000 *g*. Se removió el sobrenadante, secó el precipitado y resuspendió en 20 μ l de agua bidestilada.

m.3.3 Precipitación de ADN con acetato de amonio

Se agregó a la solución con el ADN a precipitar 0,5 volúmenes de 7,5M acetato de amonio pH7 y 3,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó precipitar 15 min a -70°C o 30 min a -20°C y se centrifugó 10 min a 16.000 *g*. Se lavó el precipitado con 500 μ L de 70% etanol y volvió a centrifugar 3 min a 16.000 *g*. Se descartó el sobrenadante, secó el precipitado y resuspendió en 20 μ L de agua bidestilada.

m.3.4 Corte de ADN con enzimas de restricción

Para cada enzima de restricción se siguieron las instrucciones del fabricante. En general se mezcló 1 μ g de ADN, 2 μ l de 10X buffer, 1 unidad de enzima (o 5 para linearizar plásmidos) y se llevó a 20 μ l e incubó 2 horas a 37°C.

m.3.5 Extracción de ADN genómico

Se cosechó 100-300 mg de tejido que fue homogeneizado en mortero o en tubo de 1,5 ml (con mazo de polipropileno) usando N₂ líquido. Se agregó 65 µl de buffer CTAB (100 mM Tris.HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% p/v CTAB, 2% v/v β-mercaptoetanol) preparado en el momento y precalentado a 65°C, y se incubó la muestra 30 min a 65°C. Se agregó 300 µl de una SC con 24 partes de cloroformo y una parte de alcohol isoamílico y se mezcló por inversión. Luego, se centrifugó dos min a velocidad máxima en una microcentrífuga y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se agregó ARNasa a una concentración final de 100 µg/ml e incubó 30 min a 37°C. Se agregó 0,7 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión e incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a velocidad máxima 15 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y lavó con 500 µl de 70% etanol frío. Se centrifugó 3 min a 16.000 *g*, descartó el sobrenadante, secó el precipitado y resuspendió el ADN en 50 µl de agua bidestilada esterilizada.

m.3.6 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total de hojas y plántulas fue extraído usando el reactivo RNazol RT Reagent (Molecular Research Center) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

m.3.7 Síntesis de ADNc

El ARN total fue tratado con RQ1 DNAsaI (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. 1 µg de este ARN fue usado como molde para la síntesis de ADNc usando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y oligo-dTs, hexámeros

aleatorios de oligonucleótidos o primers específicos para los genes de CP. El ADNc fue diluido cuatro veces y se utilizaron 4 µl como molde para cada reacción de PCR o qPCR. Como control de no contaminación con ADN genómico u organelar, por cada reacción de síntesis de ADNc se realizó una réplica agregando agua en lugar de transcriptasa reversa, se diluyó cuatro veces y se usaron 4 µl en reacciones control de PCR o qPCR.

m.3.8 PCR

Todas las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se efectuaron en una mezcla conteniendo 1X buffer de reacción según el fabricante, 2 – 4 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 mM de cada oligonucleótido específico y 1,25 unidades de enzima *Taq* polimerasa. La cantidad de ADN dependió de cada PCR: 1 – 5 ng si el molde fue un plásmido, 100 ng si el molde fue ADN genómico y 4 µl de si el molde fue ADNc dilución 1/4 para las PCR de retrotranscripción semicuantitativa (RT-PCR) y para las PCR cuantitativas de tiempo real (qPCR). Para las PCR de colonias bacterianas se usaron 10 µl de agua donde se remojó la punta de un escarbadiante con el que se “picó” cada colonia de bacterias. Para las reacciones de qPCR se agregó 0,75 µl del stock de SyBR Green. Se usó en general un programa con 3-5 min de desnaturalización a 95°C; 30 ciclos (o 45 para qPCR) de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a temperatura de hibridación, y tiempo necesario por ciclo (de acuerdo al tamaño del fragmento a amplificar y la procesividad de la enzima) a 72°C; y finalmente 3-5 min a 72°C. La temperatura de hibridación se calcula para cada par de oligonucleótidos y en general se usó 3-5°C menos que la menor temperatura media de fusión de cada par de oligonucleótidos. Para las reacciones de qPCR se realizó un ciclo de curva de fusión final desde 95°C hasta 40°C disminuyendo 0,5°C en cada paso y observando la fluorescencia del producto de PCR.

Los análisis de *splicing* fueron realizados de acuerdo a (Babiychuk *et al.*, 2011).

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR se listan en el apéndice A.

Las cicladoras más utilizadas fueron MyCycler™ (BioRad) para PCR y RT-PCR, y iCycler (BioRad) para qPCR.

m.3.9 Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizaron geles de entre 1 y 2% de agarosa en solución TAE 1X (Tris-ácido acético 40 mM, pH 8, EDTA disódico 2 mM); con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (EtBr). Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 Voltios/cm y a temperatura ambiente. Las muestras para sembrar se prepararon adicionando a la solución de ADN buffer de siembra 10X (glicerol 50%, 10 mM EDTA pH 8, 0,5% azul de bromofenol/xilencianol). Los geles fueron fotografiados utilizando luz ultravioleta (UV) de 365 nm en transiluminador (Syngene) conectado a una PC.

m.3.10 Western blot

Para extracciones de proteínas seguidas de cuantificación, se molió 100-200 mg de tejido procesándolo en mortero con N₂ líquido y se agregó 200 µl de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS, 10mM EDTA pH 8). Se mezcló y centrifugó 10 min a máxima velocidad, conservando el sobrenadante, que se cuantificó de acuerdo al método de Bradford. Se agregó 1/3 volumen de 4X buffer Laemmli (50 mM Tris HCl pH 6,8, 100 mM β-mercaptoetanol, 2% SDS, 10% glicerol y 0,5% azul de bromofenol). Para extracciones de proteínas sin cuantificación, se tomaron 3 a 4 discos de hojas y se molieron con mini mazo de polipropileno en tubos de 1,5 ml con 150 µl de 4X buffer

Laemmli y se agregó 450 µl de agua. Las muestras en 1X buffer Laemmli se incubaron 5 min a 95°C, y las que fueron molidas en buffer Laemmli fueron centrifugadas a máxima velocidad en microcentrífuga y se recuperó el sobrenadante para eliminar restos de tejido. Se armaron los geles desnaturalizantes de poliacrilamida en soportes adecuados, agregando primero la mezcla para el gel separador (10% acrilamida/bisacrilamida (29,2%/0,8%), 0,375 M Tris HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio, 0,04% Temed) y luego la mezcla para el gel concentrador (3% acrilamida/bisacrilamida (29,2%/0,8%), 0,125 M Tris HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amonio, 0,04% Temed). Luego se sembró en los geles igual cantidad de proteína total de cada muestra y se realizó la electroforesis entre 80 y 125 voltios constantes en buffer Tris-Glicina (25 mM Tris HCl pH 8,8, 190 mM glicina, 0,1% SDS). Para la tinción con azul de *Coomasie* los geles se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en solución de tinción (0,05% Coomasie Brilliant Blue R250, 40% metanol, 10% ácido acético). Luego se efectuaron varios lavados con una solución conteniendo 50% de metanol y 10% de ácido acético (o agua destilada y hervor en microondas) hasta desteñir el gel y observar las bandas específicas de proteínas. Para la inmunodetección, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™Hybond ECL) 1 hora a 100 voltios en buffer de transferencia (25mM TrisHCl pH 7,5, 192 mM glicina, 20% metanol). Las membranas se tiñeron con SC de rojo Ponceau (0,5% m/v Rojo Ponceau, 1% v/v ácido acético glacial) para confirmar transferencia y se lavaron con agua. Luego, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave en *buffer* TTBS (100mM TrisHCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) suplementada con 5% m/v de leche en polvo descremada. Luego, se agregó el anticuerpo primario contra GFP (ab290; Abcam) en una dilución 1:10.000 en *buffer* TTBS-leche. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente en agitación

suave y se realizaron tres lavados de 5 min en *buffer* TTBS. Luego se agregó el anticuerpo secundario anti Inmunoglobulina G de conejo unidos a peroxidasa de rabanito (HRP) como proteína reveladora (Santa Cruz Biotechnologies SC 2004) en una dilución 1:15.000 en *buffer* TTBS leche. Se realizaron tres lavados de 5 min en *buffer* TTBS. Se expusieron las membranas en placas de rayos-X y luego las mismas fueron reveladas utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Pierce).

m.4 Northern Blot

Para los ensayos de Northern Blot, 5-10 µg de ARN total por muestra se separaron por electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes de ARN. La composición de los geles fue 1% agarosa, 6% (2M) formaldehído y 1X buffer MOPS (3-(N-Morpholino) ácido propanosulfónico) (10X MOPS: 0,4 M MOPS, 0,1 M Acetato de sodio, 0,01 M EDTA, pH 7). El buffer de corrida fue 1X MOPS. Estos geles fueron transferidos a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham) por “blotting” en capilaridad con buffer 2X Salino de Citrato de Sodio (2X SSC) a partir de 10X SSC (1,5 M NaCl 0,15 M citrato trisódico dihidrato, pH 7). Las membranas fueron “crosslinkeadas” mediante dos pulsos de luz UV de 1200 Joules cada uno en horno de hibridación UV Stratalinker 2400 (Stratagene). Para la detección por hibridación, sondas de ADN correspondientes a un fragmento intrónico o un fragmento exónico de cada gen evaluado fueron amplificadas por PCR con oligonucleótidos específicos y marcadas mediante el sistema de marcación al azar Prime-a-gene (Promega). Se desnaturalizaron 25 ng del fragmento utilizado como molde por incubación a 95°C durante 5 min y se mezclaron con 400 µg/ml de seroalbúmina bovina (BSA), 5 unidades de ADN polimerasa I Klenow, 20 µM de dATP, dGTP y dTTP, 50 µCi (333 nM) de α-32P dCTP 3000 Ci/mmol

y el buffer de marcación 5X conteniendo los oligonucleótidos iniciadores en un volumen final de 50 µl. Esta mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo calentando a 95°C durante 2 min y agregado de EDTA a una concentración final de 20 mM. Se utilizaron columnas elutip-d (Schleicher & Schuell) según las indicaciones sugeridas por los fabricantes. Se desnaturalizó la sonda purificada por 10 min y se la colocó en hielo durante 10 min. Se prehibridó la membrana de nylon en 13 ml de solución de hibridación de Church (0,5 M buffer sodio fosfato pH 7,2, 0,15 M EDTA pH 8, 7% m/v SDS) a 65°C. Luego se agregó todo el volumen de sonda al tubo de hibridación, y se incubó *over night* a 65°C. Se recuperó el *buffer* Church con la sonda y se mantuvo a -20°C para posteriores usos. A las membranas de nylon hibridadas se le realizaron los siguientes lavados: (1) enjuague con buffer 2X SSC 0,1% SDS a temperatura ambiente, (2) 15 min con mismo buffer a temperatura ambiente, (3) 15 min con buffer 2X SSC 0,1% SDS a temperatura de hibridación, y (4) 15 min con buffer 0,2X SSC 0,1% SDS a temperatura de hibridación. La astringencia de los lavados va de menor a mayor. La detección de las bandas que hibridaron con las sondas se realizó por exposición de las membranas a placas de rayos X (Kodak) y posterior revelado.

m.5 Infiltración de *N. benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens*

La tercera y cuarta hojas desde el ápice en plantas de 3-4 s. p. g. (semanas post germinación) fueron infiltradas con suspensiones de *A. tumefaciens* GV3101 transformadas con el plásmido binario de trabajo en cada caso. Las agrobacterias transformadas se cultivaron en medio LB líquido a 28°C en agitación a 200 rpm durante toda una noche. Se cosecharon mediante centrifugación 10 min a 3800 *g*, se resuspendieron en buffer de infiltración (10 mM MES pH 5,7, 10 mM MgCl₂ y 200 µM

acetosiringona) y se llevaron a una $DO_{600} = 0,25$ con buffer de infiltración. Las resuspensiones se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por dos horas y luego se infiltró la cara abaxial de las hojas seleccionadas utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja. Las plantas infiltradas se regresaron a los cuartos o cámaras de cultivo por 48 hs.

Para el gatillado de VIGS, las resuspensiones de agrobacterias portando los plásmidos pTRV1 y pTRV2+fragmento de gen a silenciar se llevaron a una $DO_{600} = 0,25$. Cada resuspensión de agrobacterias portando algún plásmido pTRV2 particular fue combinada con igual volumen de resuspensión de agrobacterias portando el plásmido pTRV1. Estas combinaciones fueron infiltradas en la tercera y cuarta hoja de plantas de 2 s. p. g. Las plantas se regresaron al cuarto o cámara de cultivo como mínimo dos semanas, momento en el que se comienzan a observar los fenotipos de silenciamiento.

Para los ensayos de *gating*, las resuspensiones de agrobacterias portando los plásmidos de expresión de GFP o GFP2X se llevaron a una $DO_{600} = 1 \times 10^{-4}$ previo a la infiltración de las hojas. Esta dilución alta genera eventos de transformación lo suficientemente separados para poder contar células individuales 48 horas post infiltración (h. p. i.). En caso de propagación exitosa de la proteína fluorescente desde la célula transformada a las adyacentes, la primera puede diferenciarse, en general, por una mayor intensidad de fluorescencia.

m.6 Purificación de cloroplastos

La purificación diferencial de CP se realizó a partir de 5-10 g de tejido de hoja fresca por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa. El tejido fue homogeneizado por rotura mecánica suave a 4°C en 50 ml de buffer BH10 (30 mM Tris-

HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂ y 10% sacarosa) y filtrado con tres capas de tela tipo tul. Luego se centrifugó 10 min a 3800g y 4°C. El pellet conteniendo a los CP fue resuspendido en 2ml de BH10 suplementado con inhibidores de proteasas (E complete mini - Roche) y fue sembrado sobre un gradiente prearmado con 8 ml de BH60, 8 ml de BH40 y 8 ml de BH20 (sacarosa 60%-40%-20%, respectivamente). Luego de centrifugar el gradiente durante 20 min a 3800 *g* y 4°C, se colectó la fracción de CP intactos que migra hasta la interfaz entre BH60 y BH40. Las imágenes de fluorescencia de los cloroplastos intactos fueron adquiridas con el microscopio confocal Zeiss AxioObserverZ1-LSM710 y procesadas con el software ZEN 2011 Black edition o el software de licencia libre FIJI (ImageJ).

m.7 Ensayo de inmunoprecipitación del ARN

Purificaciones de CP intactos de plantas ISE2-OE o WT (2 ml aproximadamente) fueron lisadas por congelamiento en N₂ líquido sumergiéndolas 3 veces durante 30 segundos; luego fueron resuspendidas en 3 ml de buffer de Co-Inmunoprecipitación (buffer CoIP - 20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM MgCl₂, 0,5% NP40, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 20U/ml de inhibidor de ARNasa (*RNAseOUT*, Invitrogen) e inhibidor de proteasas) y descargadas varias veces desde una jeringa de 21 galgas (gauge) de diámetro interior. Este lisado fue dividido en 3 microtubos de 1,5ml y centrifugadas por 10 min a 11000 *g* y 4°C. El sobrenadante libre de restos de membranas (input) fue utilizado para la reacción de inmunoprecipitación de ARN (RIP, del inglés *RNA immunoprecipitation*) llevada a cabo en el robot compacto Diagenode IP-Star SX-86 mediante una modificación del protocolo Direct-ChIP. Se utilizaron 50 µl de micropartículas Dynabeads®-Protein A (*Novex 10008D*; LifeTechnologies) para el

reconocimiento y unión a anticuerpos anti-IgG como control negativo (Millipore) y a anticuerpos anti-GFP (632381; Clontech). Las micropartículas fueron aisladas con un magneto y lavadas tres veces por 5 min a 4°C con buffer de lavado #1 (150 mM NaCl, 1% Triton, 0,5% NP-40, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5) y una vez con buffer de lavado #2 (20 mM Tris-HCl pH 8) y fueron resuspendidas en 100 µl de buffer proteinasa K (100 mM Tris-HCl pH7,4, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA). Luego del tratamiento con Proteinasa K (AM2546; Ambion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, las micropartículas fueron removidas con un magneto y los sobrenadantes transferidos a microtubos de 2 ml. Se extrajo ARN de 200-600 µl de los sobrenadantes del paso anterior utilizando 1ml de TriReagent® (Sigma-Aldrich T9424) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Por recomendación de la Dra. Alice Barkan (especialista en procesamiento de ARN en CP, Institute of Molecular Biology, University of Oregon, EEUU) no se utilizó ningún método para uniones covalentes (*crosslinking*) en el tejido fuente de CP.

Para las reacciones de qPCR luego de la síntesis de ADNc a partir del ARN extraído en el paso anterior se utilizó el mix de qPCR SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ABI) con 1 µl de cDNA por cada reacción de qPCR. Se realizó triplicado técnico para cada reacción. Se utilizó la cicladora de qPCR CFX96 Touch Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad). Los oligonucleótidos utilizados son listados en el apéndice correspondiente. Los niveles de amplificación de cada gen fueron relativizados a los niveles de amplificación de ubiquitina (U-box domain-containing protein - AT5G15400) o de actina 2 (AT3G18780). Se calculó la media y el desvío estándar de cada triplicado. Los niveles de expresión relativos se calcularon con el método de $2^{-\Delta CT}$.

m.8 Ensayo de carga de colorante (*dye loading*)

Los ensayos de “*dye loading*” fueron realizados de acuerdo a Kim *et al.* (2002) y a Kobayashi *et al.* (2007). Se solubilizó 2,5 mg de dextranos conjugados con fluoresceína isotiocianato (FITC – Sigma) en 500 µl de agua y se filtraron para recuperar sólo las moléculas mayores a 10 kDa (filtros Amicon) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Se extrajeron embriones desde semillas en desarrollo generando presión sobre las mismas con un cubreobjeto. Se mantuvieron los embriones en medio 0,5X MS líquido que luego se secó para agregar la cantidad necesaria de colorante para embeber todos los embriones. Se incubó 5 min y se realizaron 5 lavados con 0,5X MS. Los embriones fueron luego observados bajo microscopio de epifluorescencia.

m.9 Tinción de calosa y cuantificación

Para *Arabidopsis*, la cuarta y quinta hoja de roseta de plantas de 4 s. p. g. fueron cortadas y fijadas en etanol 96% durante toda la noche, con uno o dos cambios de etanol durante la fijación. Se realizaron tres enjuagues en SC de glicina (0,6 M glicina pH 9,5 (llevado a pH con NaOH)) y se incubó las hojas en SC de glicina suplementada con 0,1% azul de anilina toda la noche. Antes de montar las hojas en el portaobjeto se realizó un enjuague en SC de glicina. El montado puede hacerse entre dos cubreobjetos para poder voltear la muestra en caso de estar observando la cara adaxial. La cara abaxial de las hojas fue observada en microscopio confocal usando un objetivo de inmersión en agua de 40x. Las imágenes se detectaron con un objetivo C-Apochromat X40/1.20-W Korr UV-VIS-IR con 405-nm laser de diodo y un filtro de *band-pass* de emisión de 420- 480 nanómetros (nm).

m.10 DANS (Drop And See)

El ensayo de DANS (por las siglas en inglés para Drop ANd See) se realiza en la cuarta y quinta hoja de roseta de plantas de 4 s. p .g. Brevemente, se deposita 1 µl de 1 mM CFDA (Sigma-Aldrich, Cat#124387-19-5) en la cara adaxial de las hojas (se usaron 4 gotas por hoja). Luego de 5 min de incubación, se removió la gota con pipeta, se cortó la hoja y se enjuagó con agua destilada por 30 segundos. Luego, se observó la cara abaxial en microscopio confocal Zeiss LSM 5 DUO con una lente Fluar X5/0,25. Para asegurar una deposición homogénea del CFDA sobre la superficie de la hoja, antes de cada experimento se chequeó que el halo de penetración del colorante en la cara adaxial era similar en todas las líneas o tratamientos. Se promedió el diámetro mayor y el diámetro menor para cada halo. Cada halo fue tratado como una réplica independiente.

Los ensayos de DANS con y sin daño fueron realizados en la misma planta. Al cortar la hoja del tratamiento sin daño para observar al microscopio, se hicieron unas pequeñas lesiones con pinza en la punta de la hoja siguiente. 30 min después se usó esa hoja para el tratamiento con daño.

m.11 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

Para el clonado de los vectores que gatillan el silenciamiento génico inducido por virus, se diseñaron oligonucleótidos a partir del genoma de *S. lycopersicum* para amplificar fragmentos de regiones no conservadas de los genes ortólogos a los seleccionados en *A. thaliana*. Se utilizó ADNc de *N. benthamiana* como molde de reacción y *Pfu* polimerasa (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos amplificados se clonaron en los vectores de entrada del sistema Gateway pEntry-D-TOPO (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se

chequearon los fragmentos clonados por secuenciación Sanger. Luego, se realizó la reacción de LR clonase entre los vectores pEntry-D-TOPO con cada fragmento y el vector pTRV2, que es el vector binario que junto a pTRV1 gatillan el VIGS en plantas transformadas, y que es un vector de destino del sistema Gateway (Invitrogen). Luego de confirmar por secuenciación los fragmentos clonados en los pTRV2, se transformaron bacterias competentes de *Agrobacterium*

Capítulo 1

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ISE2 E IDENTIFICACIÓN DE SUS ARN BLANCO

** Gran parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en la revista con referato Plant, Cell and Environment (Carlotto et al., 2016).*

Carlotto, N., Wirth, S., Furman, N., Ferreyra Solari, N., Ariel, F., Crespi, M., y Kobayashi, K. (2016). The chloroplastic DEVH-box RNA helicase INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 involved in plasmodesmata regulation is required for group II intron *splicing*. *Plant, Cell and Environment*, 39(1), 165–173. <https://doi.org/10.1111/pce.12603>

*** Parte de los resultados correspondientes a este capítulo fueron realizados en estadías cortas de investigación en laboratorios externos por parte del autor de la tesis.*

- Laboratorio de ARN's no codificantes - Institut des Sciences du Végétal - CNRS1 (ISV-CNRS1) - Gif sur Yvette – France. Director: Dr. Martín Crespi. Fecha: Octubre a Diciembre 2014. Financiamiento: Programa EMBO Short Term Fellowship.

- Delaware Biotechnology Institute, University of Delaware, Newark, Delaware, EEUU. Directora: Dra. Jung-Youn Lee. Fecha: Agosto a Octubre 2017. Financiamiento: Programa de Becas Fulbright – Min. Educación y Deportes becas para estancias de investigación en Universidades de EUA 2017.

1.1 Introducción

Al momento de comenzar este trabajo de tesis, se sabía que la mutante *ise2* tiene una morfogénesis defectuosa del embrión en *Arabidopsis* y no puede regular correctamente el SEL de los PD. Además, se sabía que el gen *ISE2* posee dominios de ARN helicasa, un péptido señal de translocación al CP y que la sobreexpresión de la proteína de fusión ISE2:GFP se localiza en forma de gránulos asociados a los CP. En hojas de *N. benthamiana*, el silenciamiento de *ISE2* genera un mayor número de PD secundarios entre células epidermales y del mesófilo, y aumenta el transporte macromolecular de p30-2XGFP y 2XGFP. Los CP de las hojas silenciadas muestran una menor cantidad de grana, dando hojas cloróticas. Por último, embriones *ise2* (e *ise1*) muestran una desregulación masiva de genes nucleares con translocación al CP.

1.2 Objetivos específicos

Estudiar la función molecular de ISE2 e identificar sus ARN blanco.

1.3 Resultados

1.3.1 La sobreexpresión de ISE2-GFP deriva en un silenciamiento génico espontáneo y un fenotipo clorótico

Para estudiar la función de ISE2, utilizamos una línea transgénica estable (ISE2-OE) disponible en el laboratorio y que sobreexpresa la proteína de fusión ISE2:GFP bajo la regulación del promotor constitutivo CaMV35S. Esta línea, que complementa la mutación, se obtuvo por transformación de la línea mutante *ise2-2* heterocigota (*emb25* ecotipo Col-0) con la construcción CaMV35S_ISE2:GFP (Kobayashi *et al.*, 2007). De

manera que se lograron seleccionar líneas doble homocigotas para la mutación y el transgén, y una de estas, la línea A4, es la que utilizamos y denominamos ISE2-OE (OE del inglés *over-expressing*: sobreexpresante). Las plantas ISE2-OE crecen normalmente y son fenotípicamente indistinguibles de las plantas WT. No obstante, en todas las poblaciones de plantas ISE2-OE, se observó entre un 3% y 5% de individuos con fenotipo clorótico y bordes aserrados (Fig. 1.1A). La clorosis fue detectada en cualquier estadio de la planta, pero en general se observó en una etapa temprana de desarrollo (dos a seis hojas verdaderas), propagándose desde la base de hojas totalmente expandidas o en expansión, hacia el resto de la planta, incluyendo inflorescencias.

Una hipótesis planteada fue que este fenotipo se debía al silenciamiento postranscripcional del transgén debido a que: (1) en ausencia del transgén, se volvería evidente el fenotipo clorótico de la mutante *ise2-2*; (2) la clorosis se propagaba a tejidos que previamente eran verdes; (3) que la sobreexpresión de un transgén aumenta las chances de que se gatille el mecanismo de silenciamiento. Las plantas que presentaban este fenotipo fueron denominadas ISE2-SUP. Para facilitar la lectura se referirá a estas plantas como una línea independiente, a pesar que en realidad son plantas que surgen y pertenecen originalmente a la línea ISE2-OE. También se referirá a la mutante *ise2-2* (*emb25*) simplemente como *ise2*.

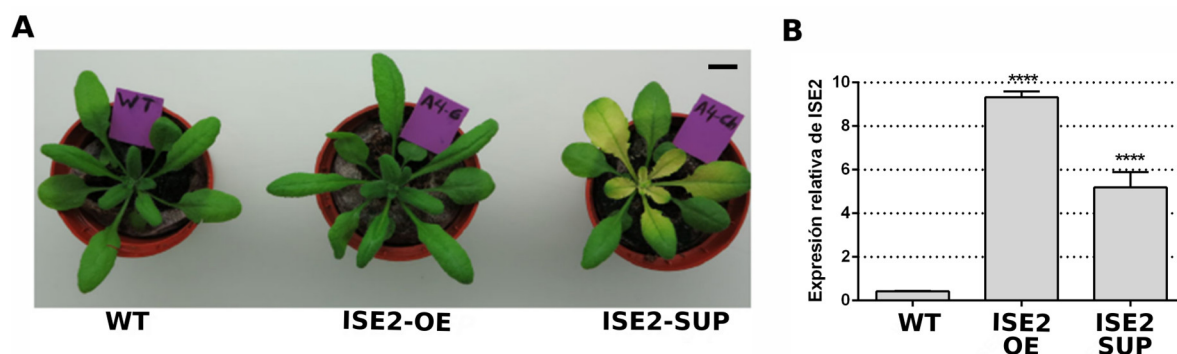


Figura 1.1. Fenotipos de la línea ISE2-OE doble homocigota para la mutación y el transgén CaMV35S_ISE2:GFP, y de la línea ISE2-SUP. A) Se muestran los fenotipos de plantas de 3 semanas de edad. Las plantas ISE2-SUP surgen espontáneamente dentro de la población de ISE2-OE, identificándose por el fenotipo clorótico que puede observarse en la fotografía. Escala 1cm **B)** Niveles de expresión de *ISE2* (línea WT) o *ISE2* + *ISE2:GFP* (líneas ISE2-OE e ISE2-SUP) determinados por qPCR y relativos a actina (método ΔCt). Se muestra la media y desvío estándar (DE) de tres plantas por línea. Se realizó un ANOVA seguido de test de Tukey. Se encontraron diferencias significativas entre las tres líneas. * $P < 0,05$.

La cuantificación por qPCR de los niveles de ARNm de *ISE2* en las plantas ISE-OE e ISE-SUP, mostró que la expresión de *ISE2* fue significativamente mayor tanto en muestras ISE2-OE como en muestras ISE2-SUP comparado con muestras WT (Fig. 1.1B). La expresión de *ISE2* entre ISE2-OE e ISE2-SUP también resultó estadísticamente diferente, lo que explicaría las diferencias fenotípicas entre ambas líneas. En este contexto, se asumió que los niveles remanentes de transcritos de *ISE2:GFP* detectados en las hojas cloróticas de ISE2-SUP resultaban insuficientes para rescatar el fenotipo mutante, y por lo tanto la clorosis estaría fenocopiando la mutación *ise2-2*.

Para apoyar lo anterior se evaluó la expresión de la proteína ISE2:GFP en las plantas ISE2-OE e ISE2-SUP. El perfil de proteínas detectadas por tinción con azul de *coomasie* en geles de poliacrilamida desnaturalizantes mostró una disminución en la intensidad de algunas bandas entre la línea ISE2-SUP y las líneas WT e ISE2-OE. Entre estas, se pueden identificar la banda de 53 kDa correspondiente a la subunidad mayor

del complejo RUBISCO (RBCL), codificada en el genoma plastídico (Sato *et al.*, 1999), y una banda de 24 kDa correspondiente al complejo de captación de luz LHCII (del inglés *light harvesting complex*) o complejo antena (Fig. 1.2A). Ambas deficiencias sugieren defectos en los CP, lo cual explicaría la clorosis de las plantas ISE2-SUP.

Previo a este trabajo, se realizaron intentos de producir anticuerpos contra ISE2 pero no fueron exitosos para revelar la proteína endógena ni la sobrepresada. Por tal motivo, luego de la transferencia de las proteínas separadas por electroforesis a membranas de nitrocelulosa, se incubó con anticuerpos anti-GFP y se reveló la presencia de la fusión ISE2:GFP sólo en las plantas ISE2-OE, mientras que en las plantas ISE2-SUP no se detectó la proteína recombinante (Fig. 1.2B).

Con este resultado se pudo confirmar que la línea ISE2-OE expresa cantidades muy superiores de la proteína ISE2:GFP comparado a la línea ISE2-SUP. Esta última línea no contaría con niveles suficientes de ISE2:GFP para compensar el fondo (*background*) genético con la mutación *ise2* en homocigosis.

En hojas ISE2-OE, las observaciones en microscopía óptica de fluorescencia sugerían que la intensidad de la señal de ISE2:GFP era menor en plantas adultas comparado con plántulas o plantas de 2 s. p. g. A fin de confirmar esto, se estudiaron los niveles de expresión de ISE2:GFP en plantas ISE2-OE de distinto estadio de desarrollo: 2, 3 y 4 s. p. g. La intensidad de las bandas específicas de ISE2:GFP resultó menor para las plantas de mayor desarrollo (Fig. 1.2C). Debido a que la expresión de ISE2:GFP se encuentra regulada por el promotor CaMV35S, la disminución observada en plantas más maduras podría reflejar algún tipo de regulación postranscripcional o postraduccional.

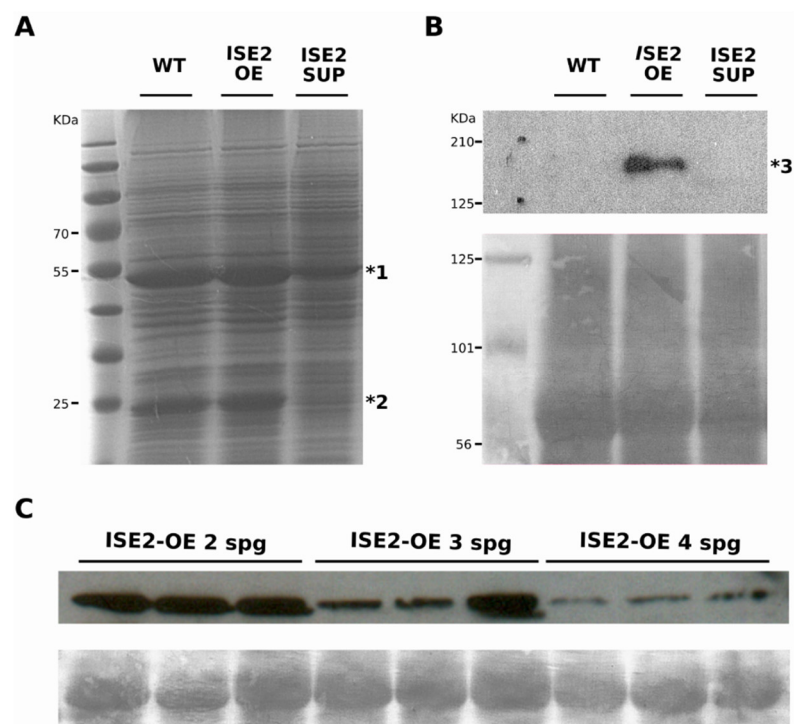


Figura 1.2. Expresión de la proteína ISE2:GFP en plantas ISE2-OE e ISE2-SUP. Extractos de proteínas totales de hojas de las líneas de *Arabidopsis* ISE2-OE e ISE2-SUP y de control WT fueron separados por PAGE-SDS 10% y **(A)** revelados por tinción con azul de Coomassie o **(B-C)** transferidos a membranas de nitrocelulosa y revelados por incubación con un anticuerpo anti-GFP. Los asteriscos indican la posición de las bandas correspondientes a 1: subunidad grande del complejo RuBisCO (54 kDa), 2: complejo antena LHC (24 kDa), 3: ISE2:GFP (154 kDa). **(C)** Inmunodetección de ISE2:GFP en extractos de triplicados de hojas ISE2-OE de 2, 3 y 4 s. p. g. Debajo de los WB (B) y (C) se muestra la banda de RBCL de la tinción con rojo Ponceau como control de carga y transferencia. En (A) y (B), la primera calle corresponde al marcador de peso molecular y se indican los pesos moleculares en KDa.

1.3.2 Localización intracelular de ISE2

Aunque algunos resultados previos (Burch-Smith *et al.*, 2011; Burch-Smith y Zambryski, 2010; Kobayashi *et al.*, 2007) indicaban que ISE2 estaría asociada y tendría una función en los CP, no se había confirmado su localización intracelular.

Con el objetivo de confirmar la localización cloroplástica de ISE2, observamos hojas de ISE2-OE por microscopía confocal, detectando focos discretos de ISE2:GFP en forma de gránulos que colocalizaron con los CP (identificados por la fluorescencia roja

de la clorofila) (Fig. 1.3A). Esto concuerda con resultados anteriores de imágenes en tiempo real de hojas de *N. benthamiana* expresando transitoriamente *ISE2:GFP* (Burch-Smith y Zambryski, 2010).

Luego, realizamos los ensayos de inmunodetección utilizando extractos de proteínas de CP aislados de plantas ISE2-OE. La inmunodetección con anticuerpos anti-GFP demostró la presencia de la proteína ISE2:GFP en los CP de las plantas ISE2-OE (Fig. 1.3B).

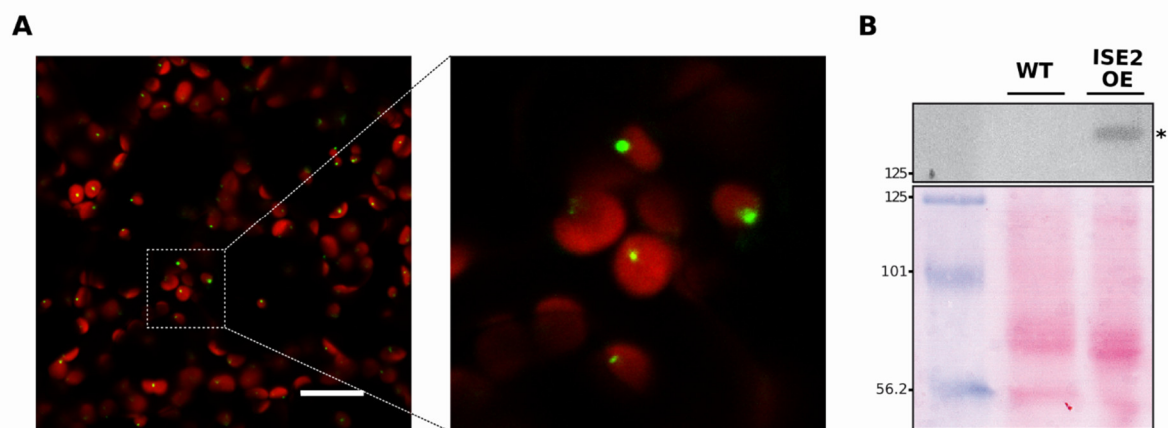


Figura 1.3. Localización de ISE2 en cloroplastos de plantas ISE2-OE. A) Imágenes de microscopio confocal en la que se observan gránulos de fluorescencia verde correspondientes a ISE2:GFP colocalizando con los CP (fluorescencia roja de clorofila) en mesófilo de hojas ISE2-OE. Escala 20 μ m. B) Western *blot* de proteínas de CP de líneas WT e ISE2-OE revelado con anticuerpos anti-GFP. El asterisco indica la banda de 154 kDa esperada para ISE2:GFP. Tinción con Rojo Ponceau como control de carga. La primera calle corresponde al marcador de peso molecular y se indican los pesos moleculares en KDa.

1.3.3 Localización intraplastídica de ISE2:GFP

Para estudiar la localización de ISE2:GFP dentro del CP, se utilizó el marcador de estroma NRIP1 (N RECEPTOR INTERACTING PROTEIN 1) y el marcador de membrana externa del cloroplasto CHUP1 (CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1) (Caplan *et al.*, 2015) fusionados a la proteína roja fluorescente RFP (del inglés *red fluorescent protein*). Se coexpresó ISE2:GFP con cada uno de los marcadores mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* y se observaron las hojas transformadas por microscopía confocal.

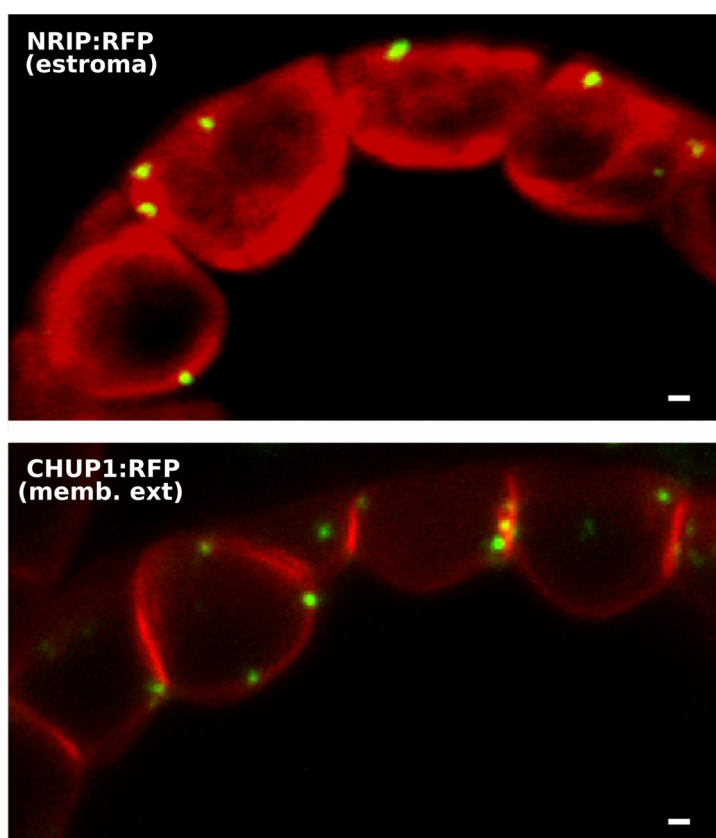


Figura 1.4. Localización intraplastídica de ISE2:GFP. Transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana* con construcciones para la sobreexpresión de ISE2:GFP, NRIP1:RFP (RFP fusionado al marcador de estroma del cloroplasto NRIP1) y CHUP1:RFP (RFP fusionado al marcador de membrana externa del cloroplasto CHUP1). Las imágenes son convoluciones de máxima intensidad de tres secciones en el plano z, cubriendo 3 μm de espesor. Escala 1 μm .

Se observó a CHUP1:RFP principalmente en la periferia de los CP, como era esperado. En cambio, NRIP1:RFP mostró una amplia dispersión en el interior del CP (estroma), con zonas sin fluorescencia que corresponderían a grana tilacoidal (Fig. 1.4). Los gránulos de ISE2:GFP se observaron principalmente en la periferia de los CP aunque parecían colocalizar con las señales de ambos marcadores de RFP.

Dado que ISE2 contiene dominios conservados de RH (Kobayashi *et al.*, 2007) y dado que otras RH de CP se asocian a los nucleoides (Asakura *et al.*, 2012), se evaluó si ISE2:GFP se localiza en los nucleoides plastídicos. Para ello se utilizó el marcador fluorescente DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN y por lo tanto es útil para el revelado del ADN que se acompleja en los nucleoides. Se realizó la tinción con DAPI de CP aislados de la línea ISE2-OE y se observaron en microscopio confocal revelando diferentes zonas con tinción positiva para este marcador, lo cual concuerda con la existencia de un gran número de nucleoides en cada CP (Fig. 1.5). La señal de ISE2:GFP se identificó en uno (o muy pocos) gránulos por CP, tal como se observan habitualmente en hojas de ISE2-OE (Fig. 1.5). En general, los gránulos de ISE2:GFP colocalizaron con zonas con tinción positiva de DAPI (Fig. 1.5 filas inferiores). Sin embargo, algunos gránulos no presentaron una colocalización evidente con los nucleoides teñidos (Fig. 1.5 fila superior), aunque se hallaron siempre ubicados cerca a los mismos, indicando una posible asociación.

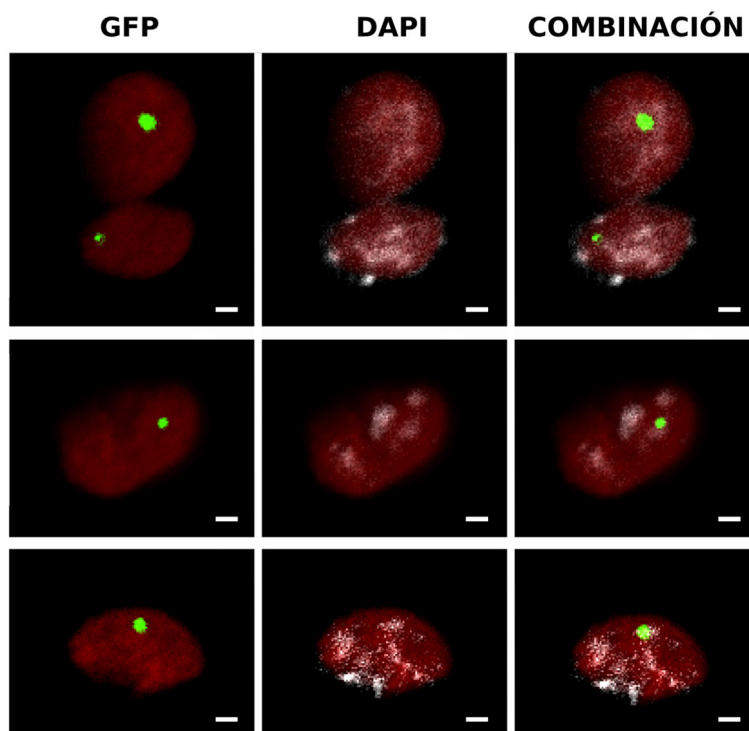


Figura 1.5. Localización de ISE2:GFP en nucleoides de plantas ISE2-OE. Los CP purificados de hojas de la línea ISE2-OE, se incubaron con una solución de DAPI al 0,1% para teñir el ADN plastídico y los nucleoides. Se muestran imágenes de tres grupos de CP representativos, obtenidas por microscopio confocal detectando la fluorescencia de ISE2:GFP (canal verde), fluorescencia de ADN teñido con DAPI (gris) y fluorescencia de clorofila (rojo). Escala 1µm

A fin de corroborar la co-localización con los nucleoides, se co-expresó ISE2:GFP junto con la proteína SWIB6:RFP mediante transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana*. SWIB6 es una proteína que se asocia a los nucleoides (Melonek *et al.*, 2012). Al igual que en las tinciones con DAPI, se observó que algunos gránulos de ISE2:GFP presentaron una colocación estricta con la señal de SWIB6:RFP, mientras que otros se ubicaron de una forma asociada o cercana a los nucleoides (Fig. 1.6). Además, se observó más de un gránulo de ISE2:GFP por cada CP, lo que se repitió en todas las transformaciones transitorias de *N. benthamiana* con ISE2:GFP.

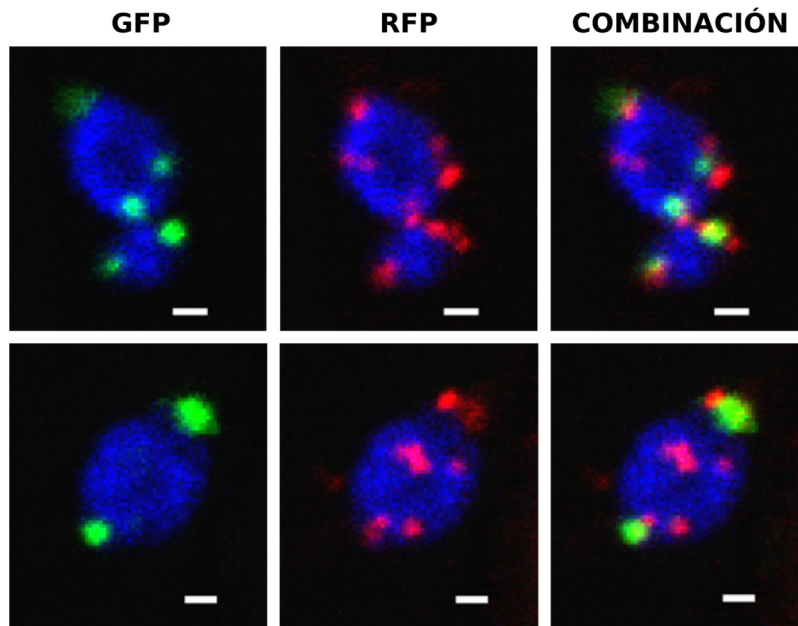


Figura 1.6. Colocalización de ISE2:GFP y marcadores de nucleoides. Se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de células del mesófilo de plantas de *N. benthamiana* transformadas transitoriamente con construcciones para la sobreexpresión de ISE2:GFP y el marcador de nucleoides de CP SWIB6 fusionado a RFP (SWIB6:RFP). Clorofila (canal cian), ISE2:GFP (canal verde/GFP) y SIWB6:RFP (canal rojo/RFP). Escala 1µm

En base a la inmunodetección positiva de ISE2:GFP en CP extraídos de la línea ISE2-OE y a las observaciones de localización *in situ* obtenidos en esta tesis (Fig. 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6), y a las evidencias previas de presencia de una secuencia de localización plastídica en *ISE2*, se postula que ISE2:GFP se encuentra en el estroma del CP, asociado a los nucleoides. Dado que ISE2:GFP fue capaz de transcomplementar la mutación *ise2*, se asume que esta ubicación también corresponde a la proteína ISE2 nativa.

1.3.4 ISE2-GFP es necesaria para el *splicing* de intrones de tipo II en el cloroplasto

El gen *BELAYA SMERT* (*BSM*) codifica una proteína con función en la terminación de la transcripción en CP. En un trabajo previo (Babiyshuk *et al.*, 2011) se reportó que la mutante *bsm* de *Arabidopsis* presenta un fenotipo de embriogénesis defectuosa muy similar al fenotipo de *ise2*. Ambas líneas germinadas *in vitro* son similares en cuanto a tamaño reducido, clorosis y morfología “callosa”. Además, el silenciamiento inducido de *BSM* en plantas adultas causó un fenotipo clorótico variegado (zonas verdes y zonas blancas) muy similar al fenotipo de la línea ISE2-SUP. Así como *ISE2*, el gen *BSM* es nuclear pero la proteína de fusión BSM:GFP se localiza en forma de gránulos en el CP. Cuando se estudió el *splicing* de genes cloroplásticos conteniendo intrones, se determinó que en *bsm* ocurrían defectos en el procesamiento de algunos transcritos cloroplásticos.

Por otra parte, hay que recordar que algunas RH con dominios DEAD o DEVH de CP o mitocondria han sido asociadas con el procesamiento de ARN en *Arabidopsis* (sección i.5.3). Dado que ISE2 posee dominios de RH y se asocia a los nucleoides del CP, se indagó si la mutación o el silenciamiento postranscripcional de *ISE2* podrían relacionarse con alteraciones en el procesamiento del ARN plastídico, particularmente en el *splicing* de intrones. Para esto, se comenzó analizando los patrones de bandas amplificadas mediante RT-PCR de los transcritos de cuatro genes cloroplásticos que contienen intrones (Fig. 1.7), tal cual se reportó en Babiyshuk *et al.*, (2011).

En los transcritos de la subunidad F de la ATP sintetasa (*atpF*) y de la proteína L2 ribosomal (*rpl2*) (ambos con intrones de subtipo IIa), se detectó un incremento de bandas correspondientes a los transcritos intermediarios no procesados que retienen

el intrón, tanto en *ise2* como en ISE2-SUP, comparado con WT (Fig. 1.7 A-B). Esto mismo se observó cuando se analizó el perfil de *splicing* del ARNm de la proteína ribosomal S12 (*rps12*), que sufre la remoción de un intrón subtipo IIb por *trans-splicing*, y el *splicing* dependiente de MATK de un intrón de subtipo IIa. Observamos que el *trans-splicing* de *rps12* ocurre de forma casi normal en las líneas ISE2-SUP e *ise2*, a pesar que también detectamos bandas de mayor tamaño correspondientes a transcritos inmaduros no procesados, presumiblemente debido a la retención del intrón tipo IIa (Fig. 1.7C). Finalmente, analizamos el transcripto de la subunidad P1 del complejo Caseinolítico proteasoma (*clpP1*) que contiene un intrón de subtipo IIa independiente de MATK y, por lo tanto, independiente del estado de traducción del CP, además de un intrón de subtipo IIb. Consistentemente, fueron detectadas bandas de mayor tamaño en muestras de hojas de plantas ISE2-SUP e *ise2*, que correspondían con el tamaño de transcritos no procesados, estimado en 1100 pb (Fig. 1.7D).

Los resultados de los ensayos de RT-PCR de la Fig. 1.7 ofrecieron una prueba indirecta de la deficiencia en el procesamiento de transcritos cloroplásticos en la línea ISE2-SUP e *ise2*. A fin de corroborar estos resultados se analizaron los patrones de procesamiento del ARN en ensayos de Northern *Blot* (NB).

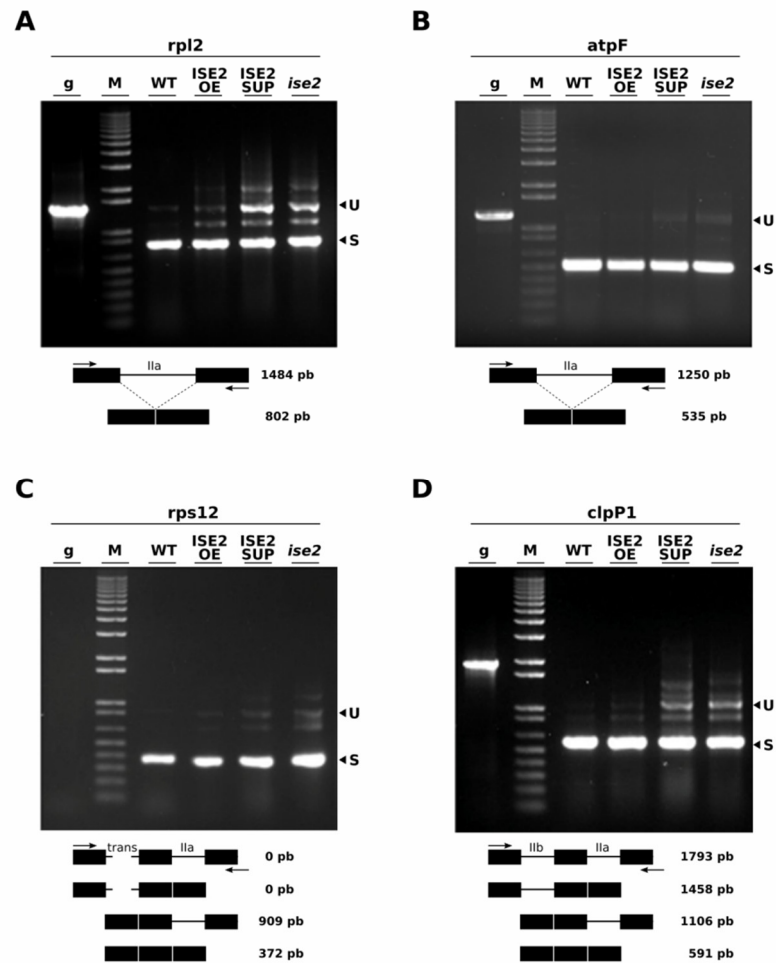


Figura 1.7. Análisis del splicing de genes cloroplásticos por RT-PCR. Se sintetizó ADNc de los genes plastídicos **(A)** *rpl2*, **(B)** *atpF*, **(C)** *rps12*, y **(D)** *clpP1* utilizando primers específicos para cada uno. Se analizó la presencia de intermediarios completamente procesados (s) o no procesados (u) mediante amplificación por PCR de acuerdo a Babiychuk *et al.* (2011). Debajo de cada panel se encuentran dibujos esquemáticos de la estructura intrón-exón, tipo de intrón y tamaños estimados de las distintas variantes de transcritos de los genes estudiados. Las flechas señalan la posición de los oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR. Se confirmó la identidad de la banda mayor para *rpl2* (U) mediante purificación, clonado y secuenciación. g: producto de amplificación de tamaño completo utilizando ADN genómico como molde. M: Marcador de ADN 1 Kb plus (Invitrogen Life Technologies). El mismo patrón de amplificación por PCR fue observado para al menos dos plantas independientes de cada línea analizada.

Debido a los distintos pasos de procesamiento de los transcriptos primarios policistrónicos en los CP, los patrones de ARN revelados resultan complejos, dificultando su interpretación. Por este motivo, se buscó incluir en el ensayo una muestra control proveniente de una línea mutante que mostrara una deficiencia en el procesamiento de los ARN plastídicos, y que además mostrara un fenotipo similar a *ise2*. De esta manera, se seleccionó a la mutante *clpr2-2* (Asakura *et al*, 2012). El gen *CLPR2* codifica uno de los componentes del complejo proteasoma Clp, cuya función es la degradación y reciclado de proteínas en el CP y está formado por varias subunidades codificadas en el núcleo y una subunidad codificada en el plastoma (ClpP1) (Nishimura *et al.*, 2015). La línea homocigota utilizada (*clpr2-2*) muestra un fenotipo defectuoso muy similar a *ise2* (Fig. 1.8A). Además, se confirmaron los defectos en el procesamiento de ARN plastídico en la mutante *clpr2-2* en ensayos de RT-PCR con las mismas condiciones que las de la Fig. 1.7 (Fig. 1.8B).

El patrón de bandas de ARNr obtenido por tinción de geles desnaturalizantes de ARN con bromuro de etidio reveló una disminución en los niveles de ARNr 23S y 16S de las muestras *ise2* y *clpr2-2* (Fig. 1.8C). En hojas ISE2-SUP el nivel de ARNr 23S también está disminuido comparado a hojas ISE2-OE y WT. Esto sugiere defectos en el procesamiento de los ARN ribosomales en ausencia de ISE2 o CLPR2. Como los ARNr son estables únicamente si pueden integrarse a ribosomas, la acumulación de ARNr puede servir para estimar las cantidades de ribosomas en el CP (Tiller y Bock, 2014). Por lo tanto, podría concluirse que en las líneas *ise2*, *clpr2-2* e ISE2-SUP, la cantidad de ribosomas cloroplásticos se encuentra reducida, y la síntesis proteica muy probablemente afectada.

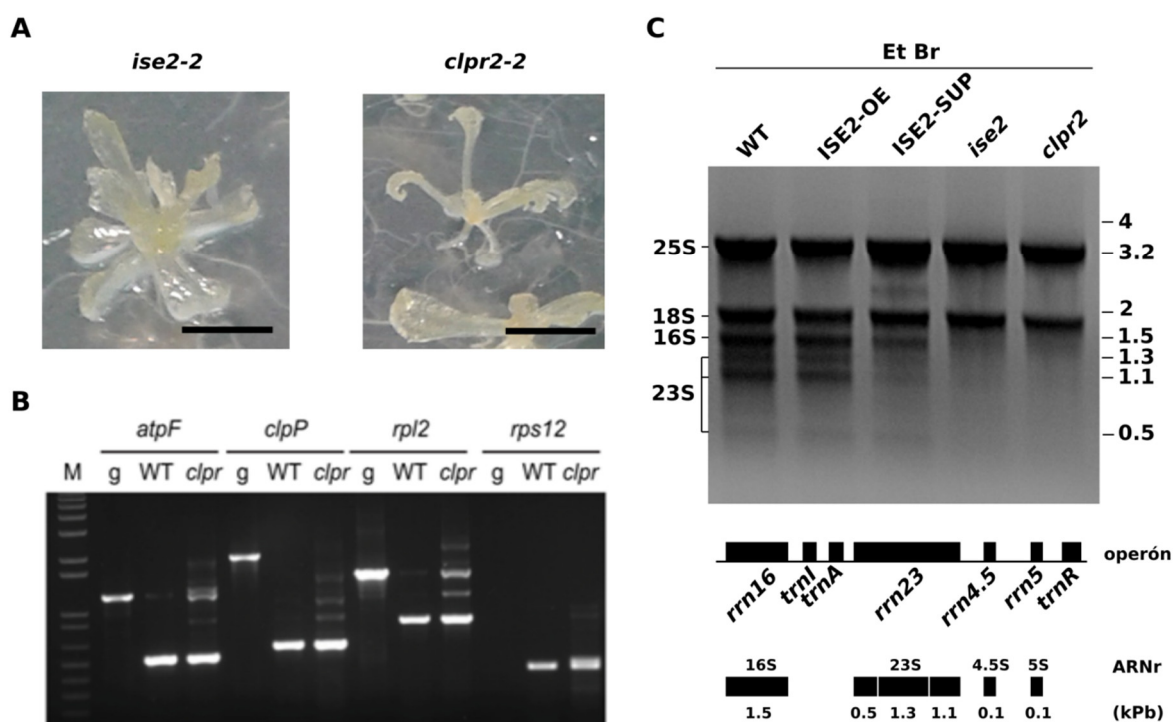


Figura 1.8. Caracterización de *clpr2-2* y análisis de los ARNr de las líneas de Arabidopsis usadas. **A)** Plántulas de las línea mutante *ise2* y *clpr2-2* respectivamente, crecidas en medio MS agar 1%, 2 s. p. g. Escala 5 mm. **B)** RT-PCR de genes cloroplásticos usando como molde ADN genómico (g) o ADNc WT y ADNc *clpr2-2* sintetizados con oligonucleótidos específicos para cada gen **C)** 3 µg de ARN total de cada muestra fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% desnaturalizante de ARN y revelado con bromuro de etidio (EtBr). A la izquierda del gel se marcan los ARNr a los que corresponde cada banda, y a la derecha los tamaños en kb de cada ARNr. Debajo del gel se muestra el operón en el cual se hallan los ARNr cloroplásticos, y los productos procesados (Grahl *et al.*, 2016)

El ARN total, luego de la separación por electroforesis en el gel de agarosa, fue transferido a membranas de nylon que se incubaron con las sondas de ADN radiactivas complementarias a un fragmento de un intrón o de un exón para cada gen cloroplástico evaluado. En la Fig. 1.9 se muestran los resultados para *rpl2* y *atpF*, en la Fig. 1.10 para *rps12* y *clpP1*, y en la Fig. 1.11 los resultados para *ycf3* que incluyeron a las muestras de plantas ISE2-OE e ISE2-SUP.

La membrana expuesta a la **sonda intrónica de *rpl2*** reveló una gran cantidad de bandas intensas en las muestras mutantes, mientras que en la muestra WT las bandas son apenas visibles, lo cual indica una mayor acumulación de transcritos no procesados reteniendo intrón en *ise2* y *clpr2-2* (Fig. 1.9A). En las muestras de estas líneas también puede observarse una banda muy intensa entre 0,5 kPb y 1 kPb que fue asignada al intrón eliminado. Por lo tanto, las plantas mutantes tienen una baja eficiencia de *splicing* y también de reciclado de intrones procesados. En el revelado de la membrana expuesta a la **sonda exónica de *rpl2***, en las tres muestras se observan dos bandas entre 1,5 y 2,5 kPb que fueron asignadas a las variantes sin intrón y con intrón respectivamente de los transcritos de *rpl2*. La intensidad de las mismas es mayor en las líneas mutantes, lo cual indica una mayor acumulación de este transcrito. En las muestras mutantes también hay bandas de mayor peso molecular, lo que indica que además del *splicing*, el procesamiento por nucleasas del operón inicial también estaría alterado.

La membrana incubada con la sonda **exónica de *atpF*** reveló una clara disminución del transcrito maduro sin intrón en las dos líneas mutantes (Fig. 1.9B). La membrana incubada con la **sonda intrónica de *atpF*** reveló bandas muy tenues en las tres calles. En la muestra WT se observa una banda nítida entre 1 y 1,5 kPb, que no se pudo asignar a alguna variante del transcrito de *atpF*. Al igual que en *rpl2*, se observa una banda nítida entre 0,5 y 1 kPb en la muestra *ise2*, asignada al intrón de *atpF* procesado (Fig. 1.9B).

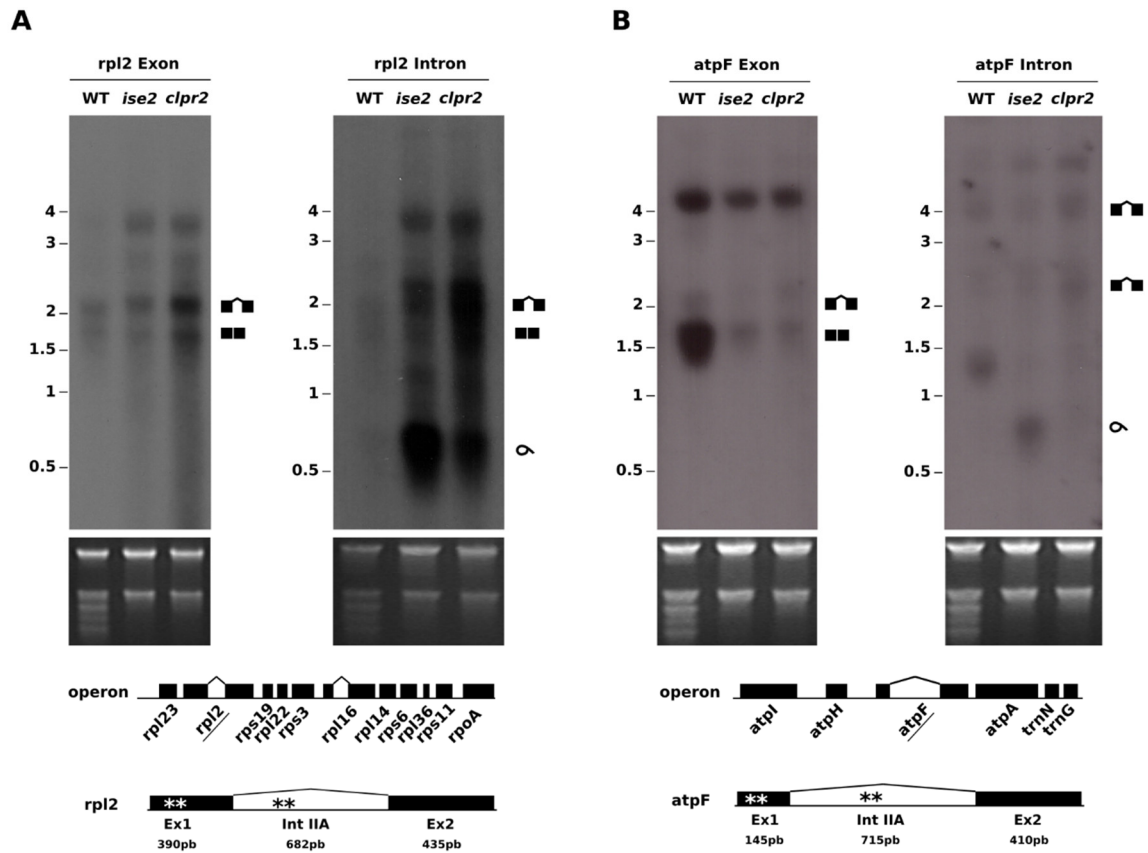


Figura 1.9. Análisis del procesamiento de *rpl2* y *atpF* por Northern blot. 3µg de ARN total extraído de plántulas de las líneas indicadas se separaron en geles de agarosa 1% en condiciones desnaturizantes, se transfirieron a membranas de nylon y se revelaron con sondas radiactivas correspondientes a un exón y un intrón de **(A)** *rpl2* y **(B)** *atpF*. Los tamaños de bandas fueron estimados con las bandas de ARN ribosomales de los geles desnaturizantes. Debajo de las membranas se muestra como control de carga un fragmento de los geles teñidos con EtBr. Los esquemas debajo de las membranas representan el operón en el cual se transcribe inicialmente cada gen, y el gen con los tipos y tamaños de intrones y exones. Los asteriscos indican la región aproximada donde hibrida cada sonda. Los esquemas a la derecha de cada membrana representan variantes de *splicing* estimadas a partir del patrón de bandas y basadas en el trabajo de Hammani y Barkan (2014) con maíz.

La membrana incubada con la **sonda exónica de *rps12*** reveló pocas bandas. La isoforma del transcripto sin intrones mayor a 1,5 kPb presenta una banda más intensa en las líneas mutantes. En la muestra WT puede observarse una banda tenue correspondiente a una isoforma del transcripto sin intrones menor a 1,5 kPb, que está ausente en las otras calles (Fig. 1.10A). La membrana incubada con la **sonda intrónica de *rps12*** reveló bandas de distintas versiones de transcripto sin *splicing*, ausentes en la calle WT. Además, y como se vio en los revelados anteriores, hay una clara acumulación de intrón procesado sin degradar en las dos líneas mutantes (Fig. 1.10A).

La membrana hibridada con la **sonda exónica de *clpP1*** reveló una gran diferencia entre el patrón de bandas de *ise2* comparado con WT y *clpr2-2*. En el primer caso, se observan bandas de tamaños desde menos de 0,5 kPb hasta más de 4 kPb. En cambio, en WT y *clpr2-2* hay dos bandas principales que pudieron ser asignadas al transcripto sin intrones y a una variante del transcripto sin el segundo intrón (Fig. 1.10B). La membrana incubada con la **sonda intrónica de *clpP1*** reveló un amplio patrón de bandas en *ise2* y *clpr2-2*, mientras que en WT sólo se observan tres bandas. Nuevamente se obtuvo una banda intensa asignada al intrón procesado sin degradar en ambas líneas mutantes (Fig. 1.10B).

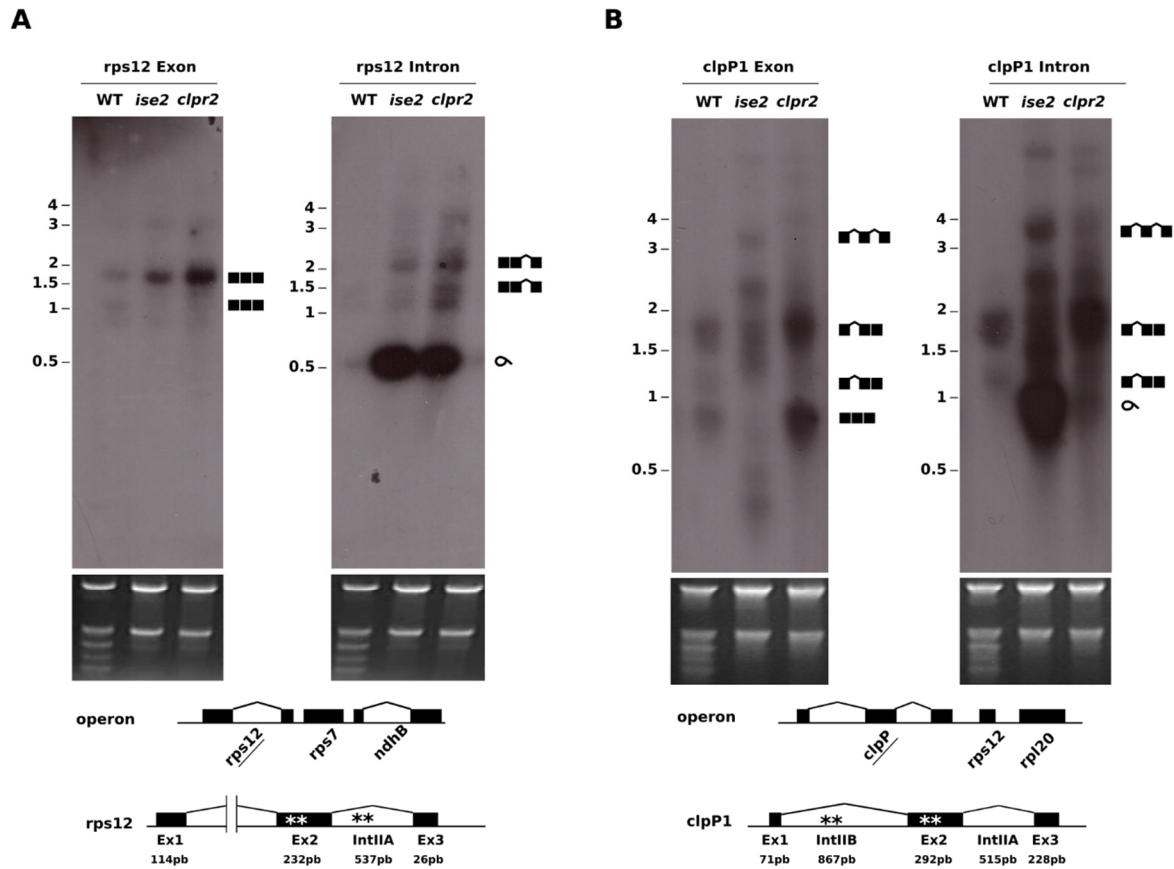


Figura 1.10. Análisis del procesamiento de *rps12* y *clpP1* genes por Northern blots. 3µg de ARN total extraído de plántulas de las líneas indicadas se separaron en geles de agarosa 1% en condiciones desnaturalizantes, se transfirieron a membranas de nylon y se revelaron con sondas radiactivas correspondientes a un exón y un intrón de **(A)** *rps12* y **(B)** *clpP1*. Los tamaños de bandas fueron estimados con las bandas de ARN ribosomales de los geles desnaturalizantes. Debajo de las membranas se muestra como control de carga un fragmento de los geles teñidos con EtBr. Los esquemas debajo de las membranas representan el operón en el cual se transcribe inicialmente cada gen, y el gen con los tipos y tamaños de intrones y exones. Los asteriscos indican la región aproximada donde hibrida cada sonda. Los esquemas a la derecha de cada membrana representan variantes de *splicing* estimadas a partir del patrón de bandas y basadas en el trabajo de Kuroda y Maliga (2018) con tabaco.

La membrana incubada con la **sonda exónica de *ycf3*** reveló mayor acumulación de bandas correspondientes a los isoformas de transcritos sin procesar, que tienen tamaños mayores a 1,5 kPb en *ise2* y *clpr2-2*. En la membrana incubada con la **sonda intrónica de *ycf3***, estas mismas bandas fueron reveladas aunque en mayor intensidad, mientras que en WT sólo hay algunas bandas muy tenues. La banda correspondiente a la variante de *splicing* con ambos intrones (de acuerdo a Asakura y Barkan, 2007) es mucho más intensa en las líneas mutantes comparado a WT. Nuevamente, en *ise2* se observa una banda asignada a intrones procesados sin degradar. En *clpr2-2* esta banda es más tenue, mientras que en WT está ausente (Fig. 1.11A). En la Fig. 1.11B se muestra un ensayo de NB equivalente al anterior, pero en el que se agregaron las muestras de ISE2-OE e ISE2-SUP. La membrana incubada con la sonda exónica de *ycf3* así como la incubada con la sonda intrónica de *ycf3* revelaron un patrón de bandas similar a WT para la muestra ISE2-OE, y un patrón de bandas similar a *ise2* para ISE2-SUP. En la segunda membrana las bandas de las muestras ISE2-SUP, *ise2* y *clpr2-2* resultaron tan intensas que fue difícil identificar bandas individuales, lo cual indica una acumulación muy alta de transcritos sin procesar en las muestras con ausencia de *ISE2* o *CLPR2*.

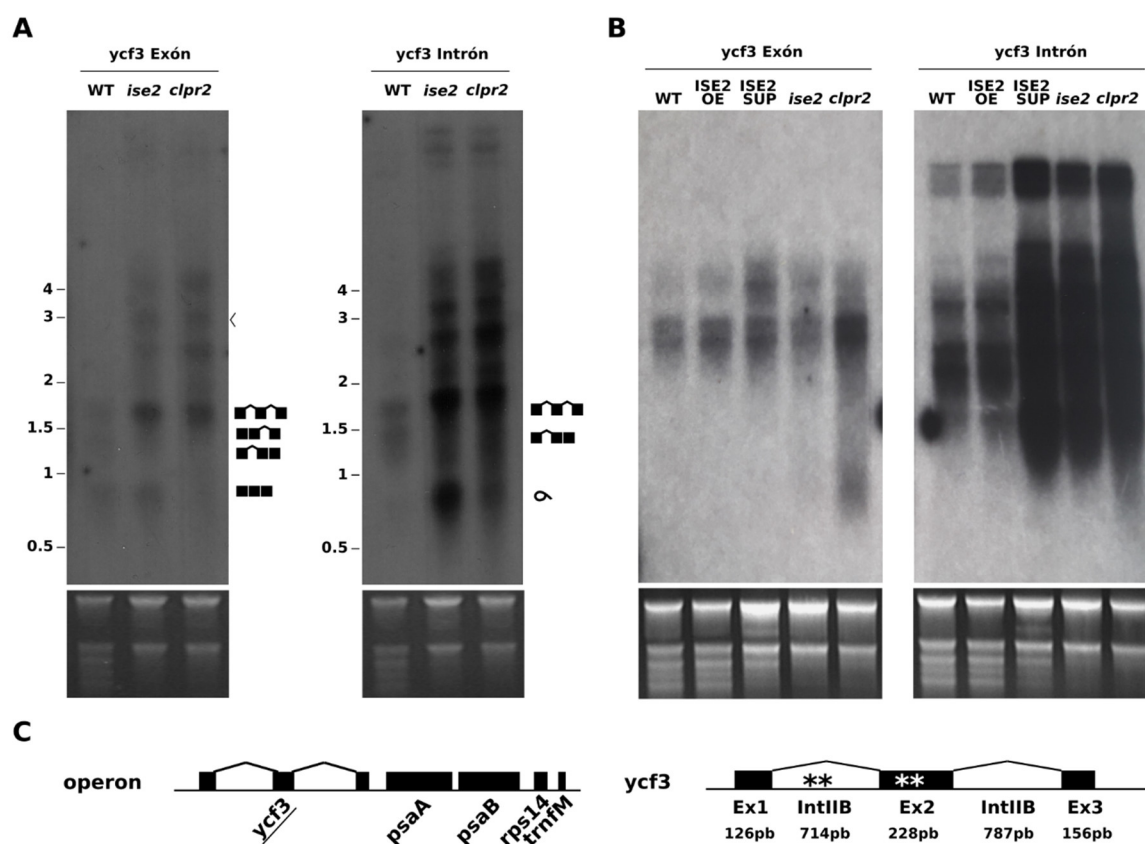


Figura 1.11. Análisis del procesamiento de transcritos de *ycf3* por Northern blot.

A) 3µg de ARN total extraído de plántulas de las líneas indicadas se separaron en geles de agarosa 1% en condiciones desnaturalizantes, se transfirieron a membranas de nylon y se revelaron con sondas radiactivas correspondientes a un exón y un intrón de *ycf3*. Luego fueron reveladas por exposición en placa radiográfica. Los tamaños de bandas fueron estimados con las bandas de ARN ribosomales de los geles desnaturalizantes. Debajo de las membranas se muestra como control de carga un fragmento de los geles teñidos con EtBr. **B)** Se repitió el NB con las sondas *ycf3* incluyendo las líneas ISE2-OE e ISE2-SUP. **C)** Los esquemas representan el operón en el cual se transcribe inicialmente cada gen, y el gen con los tipos y tamaños de intrones y exones. Los asteriscos indican la región aproximada donde hibrida cada sonda. Los esquemas a la derecha de cada membrana representan variantes de *splicing* estimadas a partir del patrón de bandas y basadas en el trabajo de Asakura y Barkan (2007) con maíz.

Finalmente, se cuantificaron por qPCR los niveles de exones e intrones de los transcriptos de los genes evaluados en los NB, utilizando los mismos oligonucleótidos con los que se generaron las sondas radiactivas. Los ADNc usados como molde se sintetizaron utilizando hexámeros de nucleótidos de ADN al azar, que podrían hibridar tanto con transcriptos procesados y no procesados, como también con intrones libres. Por lo tanto, en las reacciones donde se usaron oligonucleótidos complementarios a intrones, la amplificación por qPCR es una estimación de los niveles de transcriptos sin procesar más los niveles de intrones libres sin degradar. Se calculó la relación I/E relativizando la amplificación intrónica a la amplificación exónica mediante el método de ΔC_t .

La relación I/E para los cuatro genes evaluados fue significativamente mayor en ISE2-SUP e *ise2* comparado al control WT, mientras que ISE2-OE no mostró diferencias con la línea control (Fig. 1.12). La relación I/E en la muestra *clpr2-2* fue significativamente mayor a WT en todos los genes salvo para *clpP1*. Esto indicaría que el *splicing* del intrón 1 de *clpP1* no se vio afectado en mutantes *clpr2-2*, y las diferencias observadas en el NB de la Fig. 1.10B se deberían a defectos en el *splicing* del otro intrón o a distintos niveles totales de transcriptos.

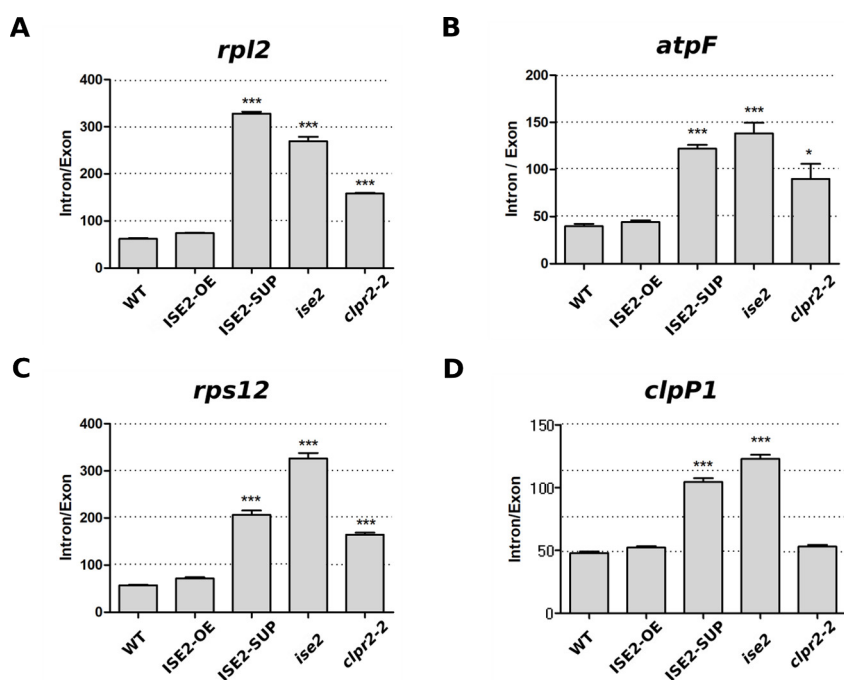


Figura 1.12. Cuantificación de los niveles de intrón relativos a los niveles de exón en los transcritos cloroplásticos. Se realizaron reacciones de qPCR los genes cloroplásticos **(A)** *rpl2*, **(B)** *atpF*, **(C)** *rps12* y **(D)** *clpP1*. Se reporta la relación entre el nivel de amplificación de un segmento intrónico y el nivel de amplificación de un segmento exónico para cada gen, de acuerdo al método de ΔCt . Los ADNc fueron sintetizados con hexámeros de nucleótidos al azar. La barra de error corresponde al DE de triplicados técnicos. Se realizó un ANOVA seguido de test de Tukey * $P < 0,05$.

En base a los resultados de las Fig. 1.8 a la Fig. 1.12, se concluye que la ausencia de ISE2 o de CLPR2 altera el *splicing* de intrones en particular, y el procesamiento de transcritos cloroplásticos en general, disminuyendo los niveles de ARNr y la eficiencia de *splicing*.

1.3.5 ISE2:GFP interactúa con los ARN blanco *in vivo*

Para evaluar si el efecto de ISE2 sobre el procesamiento de transcriptos cloroplásticos se debe a una interacción directa con el ARN, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de ARN (RIP, del inglés *RNA immunoprecipitation*) usando extractos de CP de plantas ISE2-OE y extractos de CP de plantas WT como control. Se utilizaron anticuerpos anti-IgG (inmunoglobulina G) como control de la inmunoprecipitación inespecífica y anticuerpos anti-GFP para la inmunoprecipitación específica de ISE2:GFP. Se extrajo el ARN total de la fracción inmunoprecipitada para ambos anticuerpos y se analizó por qPCR la presencia de transcriptos específicos, relativizando la amplificación en la muestra con inmunoprecipitación específica a la muestra con inmunoprecipitación inespecífica (GFP/IgG) (Fig. 1.13A).

La relación GFP/IgG para todos los genes evaluados (*rps12*, *atpF*, *clpP1*, *rps12*, *ycf3*) fue superior por más de un orden de magnitud en las muestras ISE2-OE respecto a WT, lo que indicó que ISE2 interactúa con ARNm del CP (Fig. 1.13B). Con el objetivo de estudiar si esta interacción es específica para transcriptos con intrones, se amplió el análisis incluyendo genes sin intrón. La relación GFP/IgG resultó mayor para los genes conteniendo intrón (Fig. 1.13C). Agrupando los valores de la relación de amplificación GFP/IgG de los cinco genes con intrón por un lado y de los cinco genes sin intrón por otro, encontramos una diferencia significativa entre ambos (Fig. 1.13D). Se concluyó entonces que existe una interacción directa de ISE2:GFP (o posibles complejos proteicos de los que ISE2:GFP participe) con transcriptos cloroplásticos, y que esta interacción es mayor si los transcriptos contienen intrones.

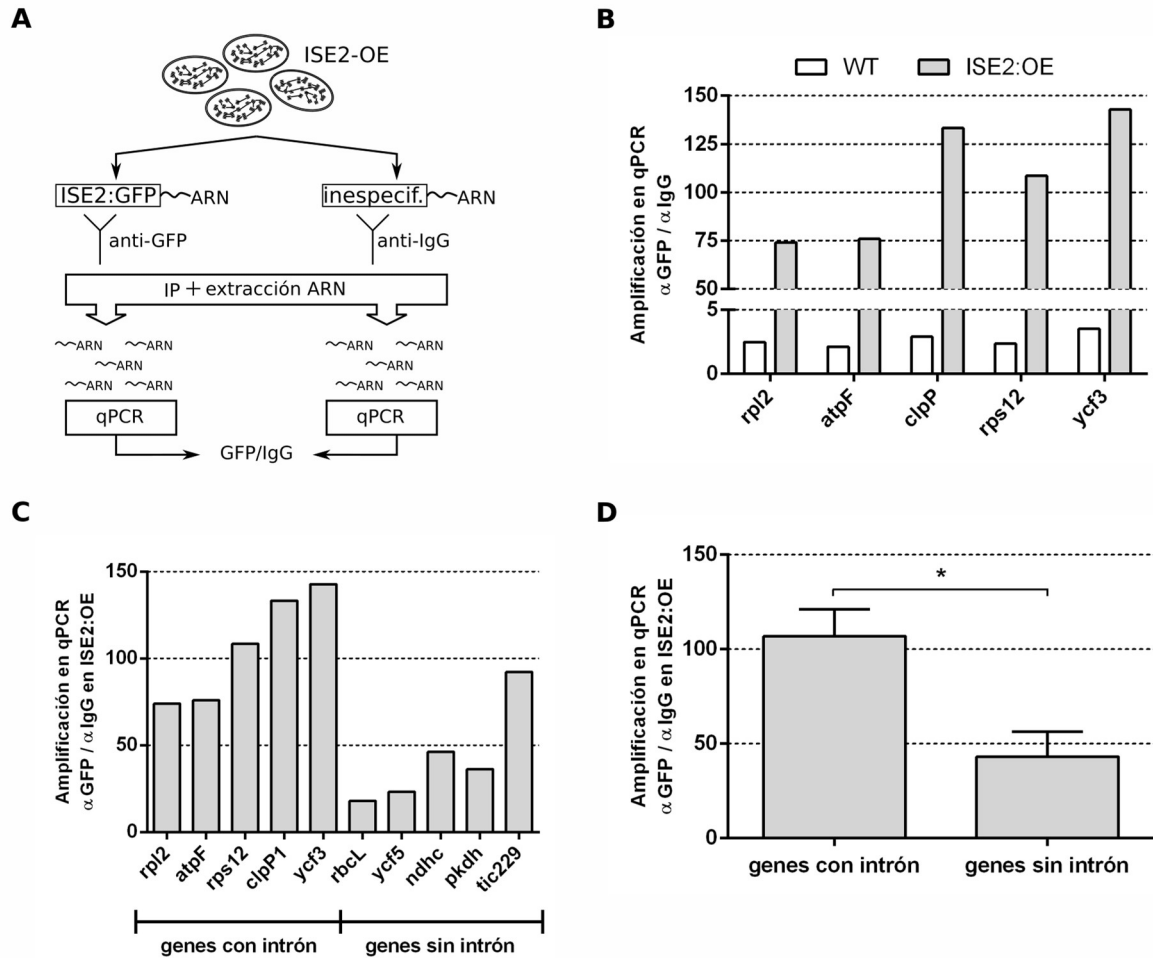


Figura 1.13. Cuantificación de ARN unidos a ISE2-GFP luego de inmunoprecipitación (RIP). (A) Se cuantificaron por qPCR los niveles de transcritos cloroplásticos obtenidos a partir de ARN extraído de muestras inmunoprecipitadas específicamente con anticuerpos anti-GFP (qPCR 1) o inespecíficamente con anti-IgG (qPCR 2). Se relativizó la amplificación de la qPCR1 con la de la qPCR2 (GFP/IgG). Todos los valores fueron normalizados a los niveles de referencia de ARN total en el input (muestra antes de inmunoprecipitar) utilizando el método de $2\Delta Ct$. inespecif: inespecífico. IP: inmunoprecipitación **B)** Amplificación de genes conteniendo intrón en las muestras ISE2-OE y WT. **C)** Amplificación de genes cloroplásticos con y sin intrón en la muestra ISE2-OE. **D)** Se agruparon los valores del gráfico anterior de acuerdo a la presencia o ausencia de intrón y se obtuvo una diferencia significativa al aplicar un test t de Student. $p < 0,05$.

1.3.6 Defectos en el splicing de transcritos cloroplásticos se asocian a una apertura plasmodesmal aumentada durante el desarrollo embrionario.

Además de su fenotipo defectivo y pálido, la mutante *ise2* presenta dos características principales: (1) defectos en la disminución del SEL en el embrión a partir de la etapa torpedo; (2) alteraciones en el procesamiento y *splicing* de transcritos cloroplásticos en plántulas crecidas *in vitro*. La pregunta que surge a partir de estas dos observaciones es si las alteraciones en el procesamiento de transcritos están asociadas con el fenotipo de PD. Las plántulas *clpr2-2* revelaron defectos en el procesamiento de transcritos. Por lo tanto, para responder esta pregunta, se analizó el SEL de los PD en embriones *clpr2-2* en estadio torpedo mediante ensayos de carga de colorante.

Notablemente, el 70% de los embriones *clpr2-2* en el estadio torpedo mostraron un fenotipo de carga de colorante, cifra similar a la obtenida con embriones *ise2* (Fig. 1.14). La mayoría de los embriones WT o heterocigotas *ise2* no presentaron una carga positiva del colorante (menos del 10% del total de embriones testeados resultaron positivos). Se concluyó que los embriones *clpr2-2* tienen un SEL aumentado en el estadio torpedo comparado a WT.

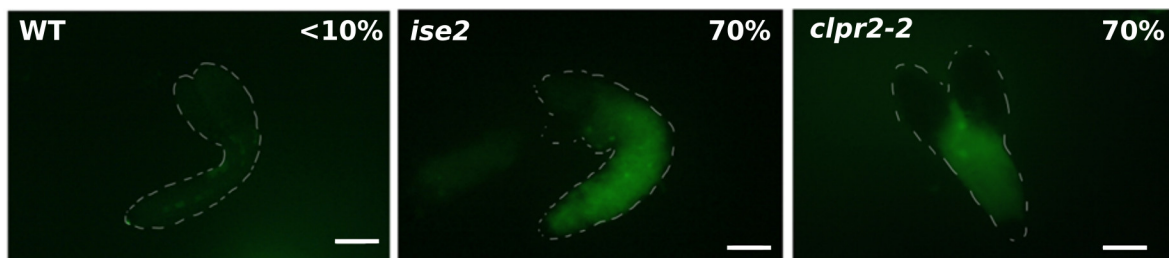


Figura 1.14. Nivel de apertura de los PD en embriones *clpr2-2*. Se analizó el SEL de los PD de embriones WT, *ise2* y *clpr2-2* mediante ensayos de carga de colorante. Se muestran imágenes representativas para cada línea utilizada. Las imágenes fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia. En total, 24 embriones WT, 22 embriones *clpr2-2* y 25 embriones *ise2* fueron incluidos en los análisis. Se indica el porcentaje de embriones con carga positiva en cada línea. Escala 50 μ m

1.4 Discusión

En este capítulo, se demostró que ISE2:GFP es dirigida a los CP de *Arabidopsis* y *N. benthamiana*, localizándose en asociación con algunos nucleoides donde tendría funciones en el *splicing* de transcritos cloroplásticos. La mutación o silenciamiento de *ISE2* provoca alteraciones del *splicing* y afecta la regulación de los PD en la transición corazón torpedo de los embriones. De la misma manera, la mutación de *CLPR2*, que codifica una subunidad del complejo proteasoma Clp cloroplástico, muestra un fenotipo similar al de *ise2* en cuanto al procesamiento de ARNm plastídicos y la regulación de PD embrionarios.

1.4.1 Localización de ISE2 en el CP

El transgén *ISE2:GFP* pudo rescatar completamente el fenotipo mutante *ise2-2*. Por lo tanto, se asumió que tanto la localización como la función de la proteína de fusión ISE2:GFP son equivalentes a la proteína endógena ISE2.

Previamente, un análisis proteómico de organelas identificó péptidos derivados de ISE2 en fracciones correspondientes a los nucleoides de CP de *Arabidopsis* (Majeran *et al.*, 2012). Además, la disposición granular/en focos dentro del CP, como la que fue observada para ISE2:GFP, fue también observada para otra helicasa de ARN tipo DEAD-box, RH39, la cual participa del procesamiento de ARNr 23S (Nishimura *et al.*, 2010); así como para el factor terminador de la transcripción mitocondrial BELAYASMERT (mTERF/BSM) (Babiychuk *et al.*, 2011). Por lo tanto, basándose en estos antecedentes, y los resultados obtenidos en este capítulo, se concluye que ISE2 se localiza en CP, específicamente en nucleoides.

Los ensayos de co-expresión con marcadores de estroma y membrana externa del CP (Fig. 1.4) revelaron una colocación parcial de los gránulos de ISE2:GFP con ambos marcadores. Los ensayos de co-expresión de ISE2:GFP con marcadores de nucleoides (Fig. 1.6) evidenciaron una asociación preferencial de ISE2 con nucleoides asociados a la envoltura. Los nucleoides plastídicos se anclan a la envoltura interna de la organela en estadios tempranos del desarrollo de los CP, cuando tiene lugar la replicación (Powikrowska *et al.*, 2014) y luego muchos de estos nucleoides migran al estroma y la membrana tilacoidal. Esto quizás sugeriría que ISE2 actúe más durante el desarrollo inicial del CP.

1.4.2 Rol de ISE2 en el procesamiento de ARN cloroplástico

Basándonos en distintos trabajos en los cuales se reportó que proteínas de unión al ARN dirigidas al CP mostraron un rol en el procesamiento de ARN (Asakura, 2012; Chi *et al.*, 2012; Longevialle *et al.*, 2008; Melonek y Mulisch, 2010), se planteó si ISE2 cumplía este rol. Particularmente nos interesó el trabajo de Babiychuk *et al.*, 2011, en el cual defectos en el *splicing* de intrones cloroplásticos generaban un fenotipo clorótico muy similar al que observamos en la línea ISE2-SUP. Por lo tanto, se comenzó estudiando el estado de *splicing* en ISE2-SUP e *ise2* y se compararon con las líneas WT e ISE2-OE.

Ensayos de RT-PCR mostraron que la mutación o silenciamiento de ISE2 genera una mayor acumulación de transcritos conteniendo intrones. Esto fue estudiado con más detalle en los ensayos de NB, utilizando plántulas de *ise2* germinadas *in vitro*. Inicialmente, la intención fue utilizar conjuntamente alguna mutante parecida a ISE2 en cuanto a los dominios helicasa conservados, como control. Con ese fin, evaluamos a las

mutantes *rh3* y *otp51*. RH3 es una ARN helicasa con dominio DEAD box con funciones en el *splicing* de intrones tipo II y la biogénesis de ribosomas (Asakura, 2012). OTP51 es una proteína con dominios de PPR requerida para el *splicing* del intrón 2 de *ycf3* (Longevialle *et al.*, 2008). Sin embargo, las mutantes homocigotas *rh3* arrestaban su desarrollo en el estadio globular, mientras que las mutantes *otp51* no mostraron un fenotipo distintivo, por lo cual no se podían diferenciar las heterocigotas u homocigotas sin la mutación. Finalmente, se eligió la mutante *clpr2-2* que había sido reportada con defectos en el procesamiento de ARN en el CP. Otro motivo por el cual se seleccionó esta mutante de *clpr2* fue porque en el proteoma de *clpr2-1* no se observaron cambios en los niveles de ISE2 comparado a WT (Zybailov *et al.*, 2009), por lo que podría asumirse que los efectos que se observen en *clpr2-2* son independientes de ISE2. Los resultados obtenidos mostraron que las plantas *clpr2-2* tenían un fenotipo similar a *ise2* crecidas *in vitro*. El patrón de bandas ribosomales en los geles desnaturalizantes resultó muy similar al de *ise2*. Asimismo, los ensayos de RT-PCR confirmaron lo reportado por Asakura *et al.*, (2012) con respecto a los defectos de *splicing*.

Los resultados de los NB fueron claros y en todos los genes evaluados (salvo *clpP1*) las muestras pertenecientes a las dos mutantes resultaron en mayor cantidad de bandas y más intensas cuando se utilizó la sonda que hibrida con los intrones. A su vez, las bandas obtenidas con sondas intrónicas siempre fueron más tenues en la línea WT. Esto indica que no sólo habría más especies de ARN sin procesar, sino que los niveles de estos transcritos precursores fueron mayores en los plástidos de las mutantes. En esta dirección, los NB reflejaron que los intrones eliminados en forma de lazo se acumulaban en gran medida en las mutantes *ise2* para todos los genes evaluados (esto también se observó con *clpr2-2* aunque en menor medida y no en todos los genes). Esta

acumulación de transcriptos sin procesar y de intrones liberados se confirmó luego con los ensayos de qPCR (Fig. 1.12).

La regulación génica en el CP es mayormente postranscripcional, y está dada principalmente por la tasa de degradación por exo y endonucleasas. Proteínas de unión a ARN (especialmente proteínas con dominios de PPR) protegen a las moléculas de ARN del ataque de nucleasas. Pero otra forma de protección del ataque de nucleasas son las estructuras secundarias que se forman en regiones intergénicas de cada operón (o transcriptos con cierto nivel de procesamiento). Estas estructuras secundarias se forman constitutivamente, además, en los intrones del CP (Barkan, 2011). Las ARN helicasas como ISE2 utilizan energía en forma de ATP para separar hebras de ARN que se encuentran hibridadas entre sí. Se concluye, entonces, que ISE2 actuaría sobre estructuras secundarias de ARN en el CP desestabilizándolas para permitir la unión de factores de *splicing* o el ataque de nucleasas.

Reforzando lo anterior, los ensayos de RIP demostraron no sólo que ISE2 se une a transcriptos cloroplásticos, sino que esta unión es significativamente mayor en transcriptos que poseen intrones. Es decir, transcriptos con mayor cantidad de estructuras secundarias están enriquecidos en el pegado de ISE2.

Bobik *et al.*, (2017) amplió nuestro estudio sobre la función de ISE2 en el CP y reportó que ISE2 interviene en distintos aspectos del procesamiento de ARN, confirmando nuestros resultados. En este trabajo, utilizaron las líneas ISE2-OE e ISE2-SUP y pudieron determinar que seis sitios de editado en seis genes cloroplásticos diferentes están específicamente afectados por el silenciamiento de *ISE2*. Esto también fue descubierto para hojas de *N. benthamiana* con silenciamiento postranscripcional de *ISE2* mediante VIGS (McCray, 2017). Además, mediante reacciones de qPCR, Bobik *et al.*,

(2017) encontraron que tanto en ISE2-SUP como en *ise2*, transcriptos que codifican elementos de la maquinaria fotosintética se encontraban disminuidos, mientras que transcriptos involucrados en la transcripción y traducción en el CP estaban aumentados. En relación a esto, propusieron que ISE2 actuaría modificando la transcripción o estabilidad de los ARN, como se pudo determinar previamente en los resultados de NB de esta Tesis.

Asimismo también asociaron a ISE2 con el procesamiento de los ARNr. En los ensayos de esta Tesis, se observó que tanto *ise2* como ISE2-SUP mostraban un patrón de bandas de ARNr alterados, con menor cantidad relativa de ARNr 23S y, en menor medida, 16S. Posteriormente, Bobik *et al.*, (2017) demostraron con ensayos de NB que efectivamente los ARNr no son procesados correctamente en ISE2-SUP. Esto fue asociado con una menor acumulación general de proteínas en el CP de ISE2-SUP comparado a ISE2-OE y WT. También se pudo observar en el resultado del gel de proteína teñido con *coomasie blue* que había un descenso de los niveles de LHCB. El gen *LHCB* es fuertemente regulado por señales retrógradas del CP al núcleo, lo cual indicaría que ISE2-SUP presenta una desregulación de alguna señal retrógrada.

Al igual que en el presente trabajo, Bobik *et al.*, (2017) realizaron un ensayo de RIP. En lugar de determinar los transcriptos con reacciones de qPCR, los autores del trabajo secuenciaron todo el ARN extraído de las muestras de ISE2-OE inmunoprecipitadas. Los resultados reflejaron que ISE2 se asocia con 111 moléculas de ARN correspondientes al 57% del total de genes en el CP. Todos los intrones tipo II estuvieron representados en esta secuenciación, además de muchos genes con sitios de edición.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo demuestran que el rol de ISE2 en el CP es de una proteína que desestabilizaría las estructuras secundarias y la unión de proteínas asociadas a los ARN, regulando su procesamiento.

1.4.3 Mutante *clpr2*

Los resultados obtenidos sugieren que la mutante *clpr2-2* también presenta metabolismo de ARN plastídico afectado en plántulas de *Arabidopsis* crecidas *in vitro*. Este fenotipo fue más evidente en algunos genes, como *rpl2* y *rps12*, mientras que en *clpP1* sólo se observaron diferencias en las cantidades de ARNm, que resultaron mayores a WT.

Las cuantificaciones por qPCR (Fig. 1.12) nos permitieron confirmar que las relaciones de amplificación I/E fueron significativamente mayores en *clpr2-2* con respecto al WT indicando la existencia de una mayor cantidad de transcritos sin procesar en la mutante. Asimismo, en la qPCR de *clpP1* no se observaron diferencias con respecto a la WT, lo cual confirma también los resultados del NB para este gen.

Con los datos disponibles, no es posible descartar que en la mutante *clpr2-2* los niveles de *ISE2* no estén siendo afectados. Tampoco puede descartarse lo contrario: que la mutación *ise2* no esté afectando la formación del complejo Clp (por ejemplo, el procesamiento de la subunidad *clpP1* es anormal en *ise2*). Sin embargo, se demostró que la mutación de cualquiera de los dos genes deriva en una desregulación de los PD en embriones.

1.4.4 Desarrollo del CP y regulación de los PD

El modelo ONPS propone la existencia de señales retrógradas que controlan la transcripción de genes nucleares asociados al PD (Burch-Smith *et al.*, 2011). Los resultados de este capítulo no sólo apoyan al modelo, sino aportan pruebas que el desarrollo normal del CP es requerido para la correcta regulación de los PD en embriones de *Arabidopsis* (Fig 1.15).

La señalización retrógrada del CP al núcleo abarca un gran número de procesos diferentes y genera respuestas variadas en las plantas. En el Capítulo 2 se muestra el trabajo que se realizó con el objetivo de identificar las señales retrógradas que participan del modelo ONPS y de entender cómo la ausencia de *ISE2* afecta al PD.

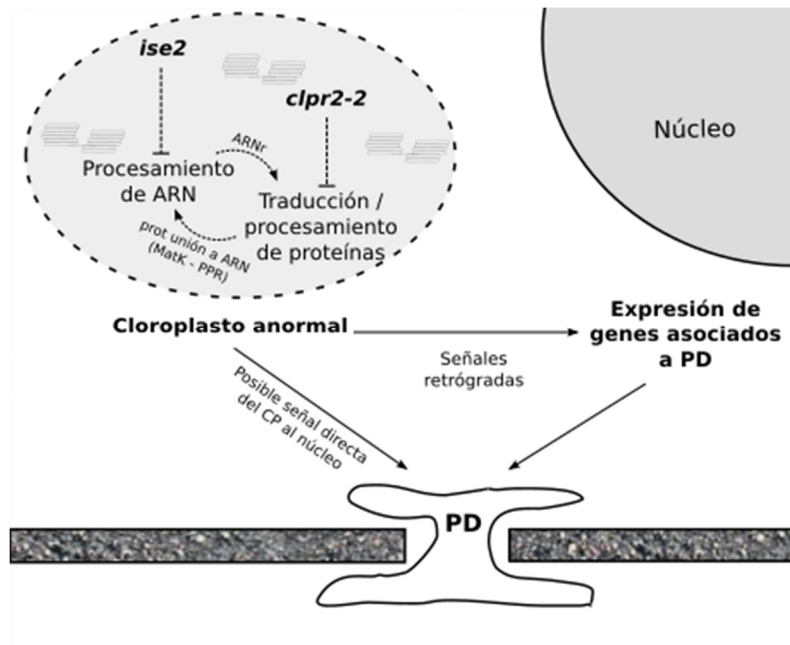


Figura 1.15. Modelo del efecto del cloroplasto en la regulación de los PD. En las mutantes *ise2-2* y *clpr2-2*, los defectos en el *splicing* de ARN o en el procesamiento/traducción de proteínas derivan en un desarrollo anormal del cloroplasto y a una desregulación del PD (SEL). Esta desregulación podría estar mediada por señales retrógradas que controlan presuntos genes nucleares relacionados al PD, por una señal directa del cloroplasto al PD, o por ambas.

Capítulo 2

ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA MUTACIÓN/SILENCIAMIENTO DE ISE2 Y DE OTROS GENES CON FUNCIÓN EN EL PROCESAMIENTO DE ARN PLASTÍDICO SOBRE LA SEÑALIZACIÓN CLOROPLASTO-NÚCLEO-PD

** Parte de los resultados correspondientes a este capítulo fueron realizados en estancias cortas de investigación en laboratorios externos por parte del autor de la tesis.*

- Laboratorio de ARN's no codificantes - Institut des Sciences du Végétal - CNRS1 (ISV-CNRS1) - Gif sur Yvette – France. Director: Dr. Martín Crespi. Fecha: Octubre a Diciembre 2014. Financiamiento: Programa EMBO Short Term Fellowship.

- Delaware Biotechnology Institute, University of Delaware, Newark, Delaware, EEUU. Directora: Dra. Jung-Youn Lee. Fecha: Agosto a Octubre 2017. Financiamiento: Programa de Becas Fulbright – Min. Educación y Deportes becas para estancias de investigación en Universidades de EUA 2017

2.1 Introducción

Los resultados del Capítulo 1 permitieron llegar a la conclusión de que el desarrollo anormal del CP en las mutantes *ise2* o *clpr2-2*, debido a un procesamiento defectuoso del ARN plastídico y/o a una proteostasis anormal del CP respectivamente, altera los PD durante la embriogénesis. Se propone evaluar, en base al modelo ONPS, si la alteración de PD ocurre durante la etapa adulta de plantas, cómo ocurre, y cuáles señales retrógradas regularían la expresión de genes con funciones en la regulación de los PD.

2.1.1 Estado redox de los CP y regulación de los PD

En la Sección i.4, a partir de los reportes con *ise1* e *ise2*, se planteó la pregunta acerca de qué manera mutaciones en genes cuyos productos se encontraban asociados a diferentes organelas (mitocondria y CP respectivamente) podían exhibir el mismo efecto sobre la función y formación de los PD. Algunos reportes indican que la generación de ROS en el CP estaría asociada a la regulación de los PD. El gen *GAT1* (del inglés *GFP arrested trafficking*, tráfico de GFP detenido), codifica una tioredoxina-m3 con funciones antioxidantes que es translocada al CP, y cuya mutación genera plántulas que acumulan mayores cantidades de calosa, muestran una propagación simplástica de GFP disminuida y acumulan mayores niveles de ROS en CP que las plántulas WT (Benitez-alfonso *et al.*, 2009).

Por otra parte, las mutantes *sxd1* de maíz (del inglés *sucrose export defective*, deficiente en exportación de sacarosa) muestran defectos en la exportación de fotosintatos en tejidos fuente y un transporte intercelular reducido debido a elevados niveles de calosa. Además, poseen niveles bajos de tocoferoles, que son uno de los

antioxidantes más importantes en hojas (Provencher *et al.*, 2001). El gen *SXD1* es el ortólogo a *VTE1* en *Arabidopsis*, que codifica la enzima TOCOFEROL CICLASA translocada al CP y encargada de la producción de tocoferoles (Provencher *et al.*, 2001). Por lo tanto, niveles reducidos de tocoferoles derivan en un aumento de las ROS en el CP y se correlacionan con el cierre de los PD por mayor deposición de calosa, aportando otra prueba que relaciona el balance redox y la regulación de los PD.

Finalmente, Stonebloom *et al.* (2012) demostraron que el silenciamiento de *ISE1* e *ISE2* en hojas de *N. benthamiana* provoca perturbaciones de los estados de oxidación de mitocondrias y CP. Para esto, utilizaron una versión de GFP sensible al estado redox de glutatión y direccionada al CP, mitocondria o citoplasma. Las hojas silenciadas de *ISE1* presentaron CP reducidos y mitocondrias oxidadas. Las hojas silenciadas de *ISE2* presentaron CP y citoplasma reducidos. Como había sido reportado antes, el silenciamiento de cualquiera de los dos genes provocó un aumento de la apertura plasmodesmal. También realizaron tratamientos con ácido salicílico hidroxámico (SHAM) y paraquat en plántulas de *Arabidopsis*, que oxidan mitocondrias o mitocondrias y CP respectivamente. El tratamiento con 200 μ M de SHAM aumentó la permeabilidad intercelular, mientras que el tratamiento con 1 μ M de paraquat redujo la permeabilidad plasmodesmal.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar qué señales retrógradas actúan sobre los PD. Además estudiar cuál/es de los mecanismos de regulación plasmodesmal estarían fallando en el fenotipo de aumento del SEL en *ise2* y *clpr2-2*.

2.3 Resultados

2.3.1 El silenciamiento de *ISE2* en hojas de plantas adultas de *Arabidopsis* no presenta un aumento del SEL en los PD pero influye sobre los niveles de calosa y su densidad.

El efecto de alteraciones en el procesamiento de ARN o de proteínas del CP sobre la regulación de los PD había sido evaluado en *Arabidopsis* únicamente en la etapa embrionaria (Carlotto *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2007). La línea ISE2-SUP presentaba una oportunidad para analizar el efecto del silenciamiento de *ISE2* sobre la comunicación simplástica en hojas adultas de *Arabidopsis*. Por lo tanto, se utilizó esta línea y las líneas WT e ISE2-OE con el fin de estudiar la permeabilidad de los PD mediante la técnica de DANS (del inglés *Drop ANd See*) dada su relativa sencillez.

La técnica consiste en cuantificar las dimensiones de los halos de difusión que se forman en la cara abaxial de las hojas luego de aplicar un colorante sobre la cara adaxial. Se utilizó 5(6)-carboxy fluorescein diacetato (CFDA), un colorante no fluorescente de peso molecular 460 Da permeable a membranas plasmáticas. Al depositarse sobre la hoja, penetra en las células epidermales, donde enzimas esterases clivan el CFDA volviéndolo fluorescente e impermeable a bicapas lipídicas (CF). Entonces; el CF sólo puede difundir simplásticamente a través de PD hacia las capas inferiores de células del mesófilo y por último a las células epidermales de la cara abaxial. Como control de la técnica, se recurrió a la línea PDL5OX de *Arabidopsis*, sobreexpresante de *PDL5* (del inglés *PD Located Protein 5*), proteína transmembrana de tipo I que se localiza en la membrana plasmática asociada a los PD (Wang *et al.*, 2013). *PDL5* es normalmente inducido a partir del aumento de SA frente al ataque de un patógeno para promover la

deposición de calosa en los PD por medio de las proteínas CALS1 y 8, lo que deriva en la disminución del SEL.

Contrariamente a lo esperado, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de los halos de propagación de CFDA en hojas WT, ISE2-OE e ISE2-SUP (Fig. 2.1), aunque el control de PD ocluidos en PDL5OX resultó en un tamaño de halos significativamente menor respecto a las otras tres líneas, como se reportó previamente (Wang *et al.*, 2013).

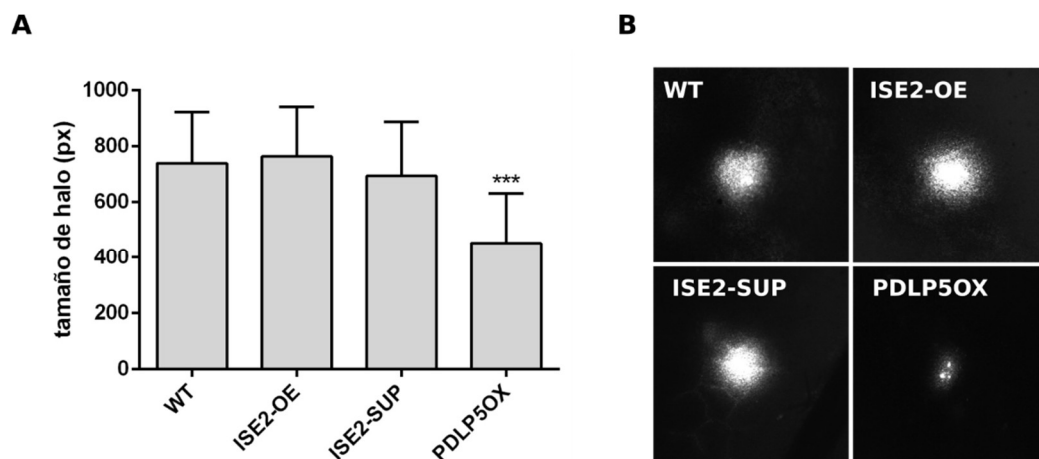


Figura 2.1. Ensayos de medición de permeabilidad basal en hojas de *Arabidopsis* mediante la técnica de DANS. (A) Se midieron los halos de propagación del colorante CFDA en más de 10 plantas por línea utilizada. Por cada planta se utilizaron dos hojas en las que se descargaron cuatro gotas del colorante. Las mediciones de todos los halos de cada línea fueron agrupados y se calculó la media y DE. Se realizó ANOVA y contraste por Tukey. PDL5OX resultó significativamente menor al resto. * $P < 0,05$. **(B)** Ejemplos de halos para cada línea utilizada. En el apéndice estadístico se muestran los datos crudos de la figura.

Aunque se determinó que la técnica de DANS es funcional para medir la permeabilidad basal, el silenciamiento de *ISE2* no derivó en una permeabilidad significativamente distinta a la sobreexpresión de *ISE2*.

Dado que la comunicación intercelular a través de los PD está fuertemente regulada por los depósitos de calosa en el cuello del PD, se realizaron tinciones de calosa en hojas de las líneas WT, ISE2-OE e ISE2-SUP utilizando azul de anilina. La calosa teñida se reveló mediante microscopía confocal y se identificaron los depósitos en los PD utilizando el programa de procesamiento de imágenes Volocity (Fig. 2.2A). Se midió la densidad integrada (IntDen) de cada depósito de calosa, parámetro que tiene en cuenta tanto la intensidad como el área de los depósitos detectados en cada imagen. De esta forma, se refleja mejor la cantidad de calosa por PD comparado a lo que reflejaría la intensidad media de calosa (Liarzi y Epel, 2005). Aunque se obtuvieron diferencias leves en la acumulación de calosa en las tres líneas evaluadas, éstas fueron significativas (Fig. 2.2 B-C). La línea ISE2-SUP presentó PD con mayor cantidad de calosa depositada (Fig. 2.2C), seguida por WT y luego ISE2-OE. También se cuantificó la densidad de depósitos de calosa, contando el número de PD identificados en cada imagen de cada línea. Los resultados siguieron la misma tendencia a los de cantidad de calosa, aunque la diferencia de número de PD por imagen en ISE2-SUP respecto a las otras dos líneas fue mucho mayor (Fig. 2.2D).

Los resultados indicaron que el silenciamiento de *ISE2* en hojas adultas de *Arabidopsis* deriva en un mayor número de PD por área, aunque acumulando mayor cantidad de calosa. Sin embargo, el ensayo de DANS no corroboró el aumento de la permeabilidad en las hojas silenciadas. Esto podría deberse a que la acumulación de calosa compensó el mayor número de PD y la propagación de CFDA neta fue la misma

El descenso de la permeabilidad de los PD en la línea PDL50X utilizada como control en la Fig. 2.1 fue asociado con un aumento en los niveles de calosa (Cui y Lee, 2016). Esto se produce por la activación de sintetasas de calosa a partir de la acción de

la proteína PDLP5. Las sintetasas de calosa que forman parte de esta vía de señalización son *CALS1*, *CALS8* y *CALS10*. Para evaluar si en el aumento de los niveles de calosa en ISE2-SUP interviene alguna de estas enzimas, se semicuantificó mediante RT-PCR la transcripción de *PDLP5* y las tres sintetasas de calosa (Fig. 2.2E). Los niveles de transcripto de *CalS1* parecen estar aumentados con respecto a las otras dos líneas, lo cual podría explicar la mayor cantidad de calosa por PD en ISE2-SUP. Sin embargo, los niveles de transcripto de *PDLP5* son similares en todas las muestras, por lo tanto el aumento de la transcripción de *CalS1* sería independiente a la vía de *PDLP5* (Cui y Lee, 2016). Esto se diferenciaría de la transcripción en embriones, ya que Burch-Smith *et al.* (2011) encontraron que PDLP5 tiene aumentada su transcripción 5,5 veces con respecto al embrión WT. Se asume que la leve disminución en la intensidad de la banda de actina en ISE2-OE se debe a errores en el sembrado de las muestras en el gel de agarosa porque de lo contrario se podría interpretar que el resto de los genes tienen aumentada su transcripción, lo cual no sería coherente con los niveles de calosa menores en ISE2-OE comparado a las otras dos muestras. De cualquier manera, se espera confirmar estos resultados por qPCR posteriormente.

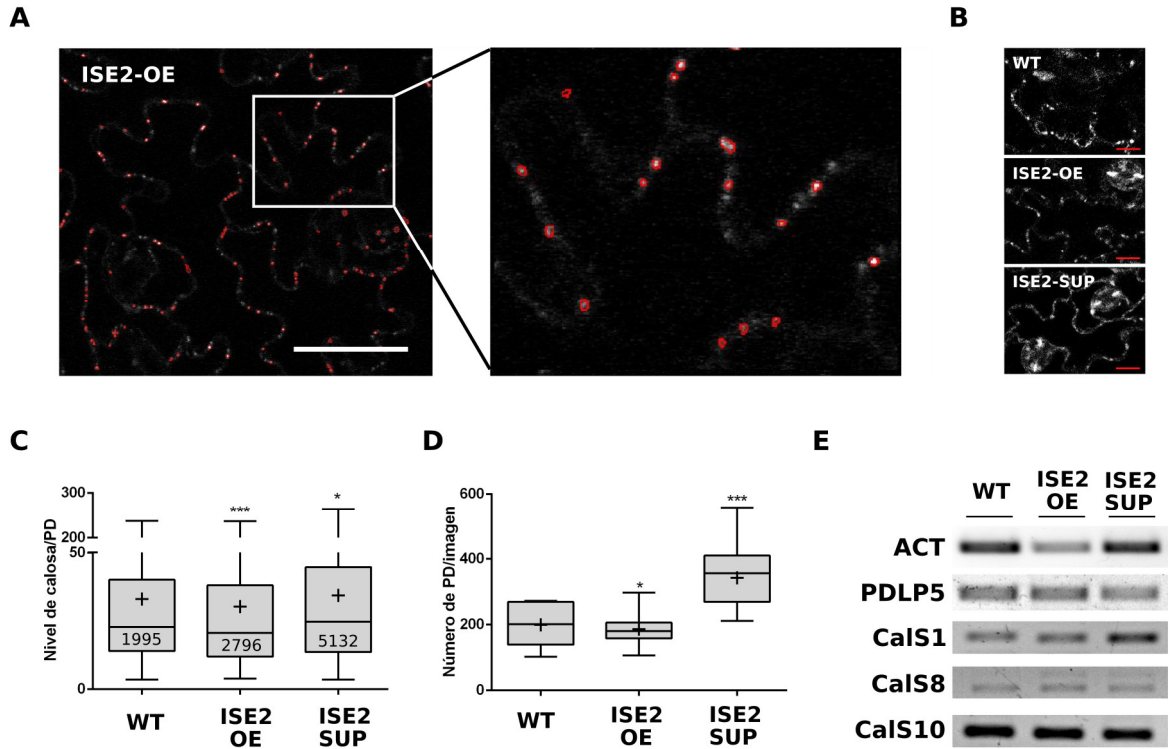


Figura 2.2. Tinción de depósitos de calosa y análisis de sintetasas de calosa por RT-PCR en las tres líneas de *Arabidopsis*. Hojas pertenecientes a tres plantas para ISE2-OE e ISE2-SUP y dos plantas para WT fueron teñidas con azul de anilina. Se tomaron cinco imágenes por cada planta mediante microscopía confocal. **(A-B)** Mediante el software Volocity se identificaron automáticamente los depósitos de calosa en cada imagen y se cuantificaron. **(C)** Se utilizó la densidad integrada (IntDen) en píxeles de cada depósito de calosa identificado para realizar un análisis de Kruskal-Wallis seguido de un método de contraste de Dunn entre las tres líneas. * $P < 0,05$. Se indica dentro de las cajas la cantidad de depósitos identificados por línea. **(D)** Se realizó el mismo análisis con el número de depósitos identificados por imagen. Se tomaron 10 réplicas para WT y 15 para ISE2-OE e ISE2-SUP. **(C-D)** Los gráficos de cajas indican: borde inferior de caja: cuartil 25 de los datos; borde superior: cuartil 75; línea horizontal en el interior de la caja: mediana; símbolo de suma en el interior de la caja: media; barra inferior: dato mínimo; barra superior: dato máximo. **(E)** RT-PCR para amplificación específica de *ACTINA*, *PDL5*, *CALS1*, *CALS8* y *CALS10*.

El daño mecánico en hojas es el detonante de algunas señales retrógradas y, en particular, provoca una liberación de ROS a partir de la generación de H_2O_2 en el espacio extracelular. Esto deriva en el aumento de los niveles de calosa en PD y la reducción de la apertura plasmodesmal (Cui y Lee, 2016).

Con el fin de evaluar si las líneas ISE2-OE e ISE2-SUP son capaces de responder al estímulo de daño mecánico, se midió con la técnica de DANS la permeabilidad basal en hojas sometidas o no a daño (Fig. 2.3). Este estímulo afecta negativamente la permeabilidad del PD, con un pico de reducción de la permeabilidad 30 min luego de la aplicación del daño (Cui y Lee, 2016). De esta forma, se analizaron hojas de las líneas WT, ISE2-OE e ISE2-SUP sin dañar y hojas de las mismas plantas 30 min luego de ser dañadas (Fig 2.3A). En los tres casos se observó una leve disminución de la permeabilidad basal. En WT e ISE2-SUP, estas diferencias resultaron significativas.

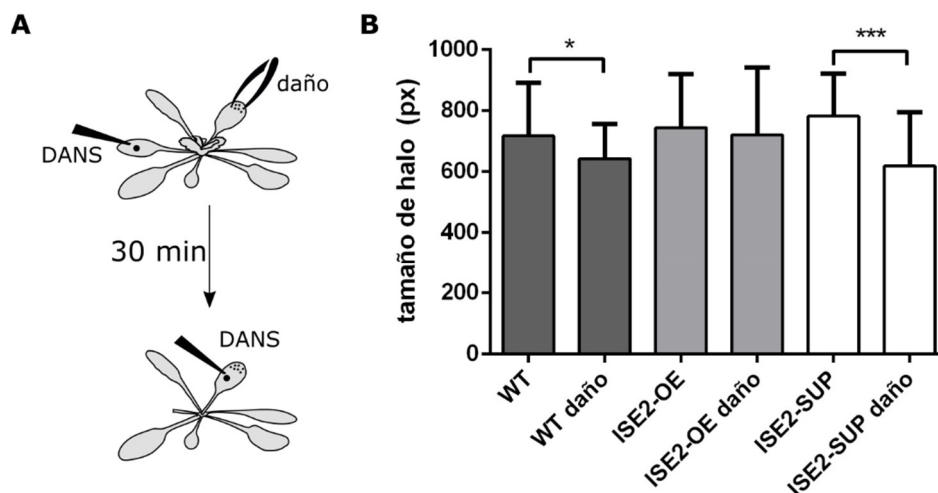


Figura 2.3. Efecto de daño mecánico en la permeabilidad basal en hojas de *Arabidopsis* mediante la técnica de DANS. (A) Se midieron los halos de propagación del colorante CFDA en más de 10 plantas por línea utilizada. El tratamiento de daño se basó en hacer pequeñas lesiones en la punta de las hojas a ensayar y se realizó inmediatamente después de medir la permeabilidad en otra hoja de la misma planta, sin dañar. El colorante se descargó 30 min después de las lesiones, tiempo en el cual el descenso de permeabilidad basal es mayor. Por cada planta se utilizaron dos hojas en las que se descargaron cuatro gotas del colorante. Se seleccionaron los halos positivos de los ocho por planta. **(B)** Las mediciones de todos los halos de cada línea se agruparon y se calculó la media y DE. Se realizó un test t de Student para comparar los tratamientos de daño o no daño. * $P < 0,05$. En el apéndice estadístico se muestran los datos crudos de la figura.

Los resultados de la Fig. 2.3 indican que ISE2 no participaría en la respuesta al daño mediante el cierre de PD, y que los PD pueden responder a este estímulo normalmente aún en ausencia de ISE2.

2.3.2 El *splicing* alternativo de genes nucleares asociados a PD no se ve modificado al silenciar *ISE2* en *Arabidopsis*

El estado de óxido reducción de la plastoquinona (PQ) genera una señal retrógrada que modula el *splicing* alternativo de algunos genes nucleares (Petrillo *et al.*, 2014). Se planteó la hipótesis de que esta señal también podría participar del ONPS, modulando el *splicing* alternativo nuclear de genes con funciones en los PD.

Thomas *et al.*, (2008) identificaron la familia de las PDLP, a la cual pertenece el gen *PDLP5* (Fig. 2.1 y 2.2). Estas proteínas, receptores transmembrana tipo 1, son direccionadas a la MP en la zona de los PD por la vía secretoria y poseen un único dominio transmembrana, con su extremo N-terminal en el espacio apoplástico extracelular, y su extremo C-terminal en el citoplasma. A partir de bases de datos de transcriptomas de *Arabidopsis* (<http://www.plantgdb.org/prj/ESTCluster/>), se analizaron los genes que codifican para las ocho proteínas PDLPs, particularmente en relación a las variantes de *splicing*. Cuatro de los genes *PDLP* presentan variantes de *splicing* alternativo: *PDLP4* (AT3G04370), *PDLP6* (AT2G01660), *PDLP7* (AT5G37660) y *PDLP8* (AT3G60720). Se decidió analizar más en detalle a *PDLP6* y *PDLP7*, ya que *PDLP8* posee tres variantes de *splicing* dificultando el análisis, mientras que el resto de los genes tiene sólo dos. Además, las dos variantes de *splicing* de *PDLP4* tienen la misma región codificante, por lo tanto se prefirió analizar en primer lugar a *PDLP6* y *PDLP7*.

Utilizando algoritmos para predecir dominios transmembrana (TMHMM Server v. 2.0 - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y péptidos señal (SignalP 3.0 Server - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) encontramos que la isoforma con intrón retenido de *PDLP6* codifica una proteína con péptido señal de retención al RE pero sin dominio transmembrana, por lo cual sería secretada al medio apoplástico. La isoforma con intrón removido tiene los dominios esperados para una proteína tipo receptor transmembrana. Los dos isoformas de *PDLP7* también poseen estos dominios, pero la versión con retención de un intrón agrega diez aminoácidos al extremo citosólico comparado a la versión con intrón removido.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la isoforma sin intrón, la isoforma con intrón y el último exón de los ARNm de *PDLP6* y *PDLP7* (Fig 2.4A). En primer lugar se analizó ADNc de muestras de las líneas WT, ISE2-OE e ISE2-SUP mediante RT-PCR con los tres pares de oligonucleótidos de *PDLP6* y *PDLP7*. Con este ensayo semicuantitativo no se encontraron diferencias en la acumulación de las variantes con y sin intrón (Fig 2.4B). Por lo tanto, continuamos con ensayos de qPCR, únicamente para *PDLP6*. En estos ensayos, se utilizó la amplificación del último exón para normalizar por el método de ΔC_t la amplificación de las versiones con intrón retenido (IR) y con intrón removido (SP). El análisis de cuatro reacciones de qPCR independientes (Fig. 2.4C) mostró una tendencia de la línea ISE2-SUP a presentar mayores valores de IR/SP. Esto indicaría que el silenciamiento de *ISE2* promovería la variante de *splicing* de *PDLP6* sin la eliminación de intrón. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las tres líneas evaluadas.

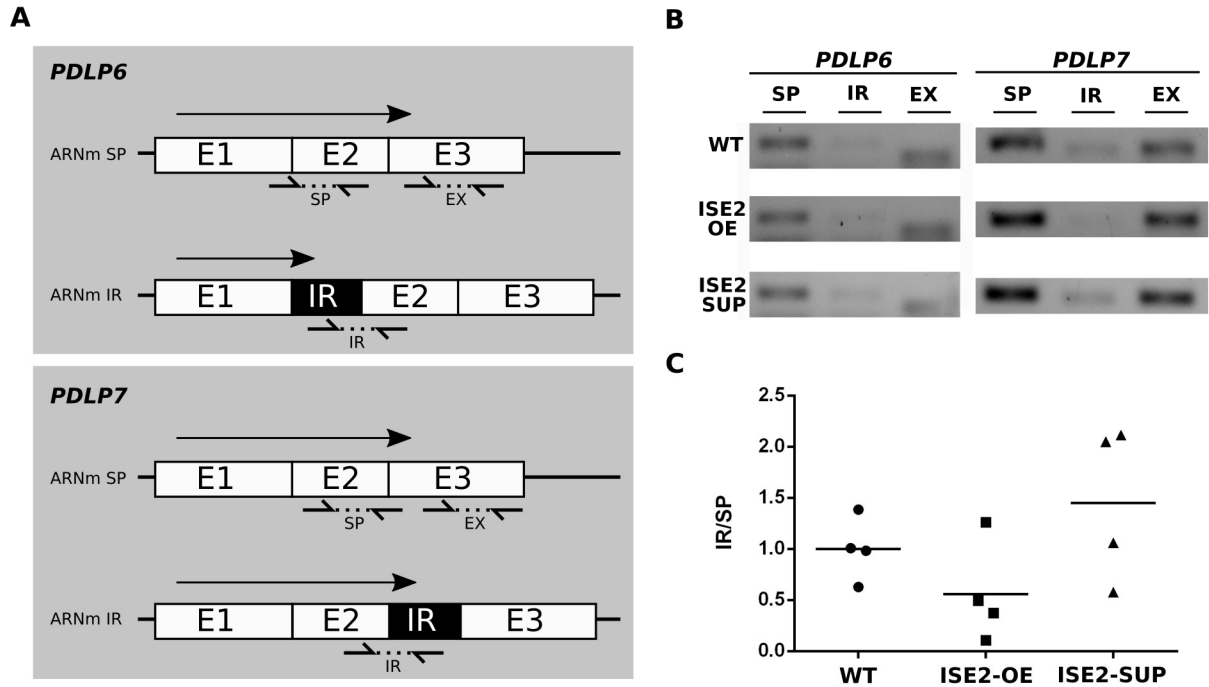


Figura 2.4. Splicing alternativo en genes localizados en el PD. (A) *Splicing* alternativo de *PDL6* y *PDL7*. Arriba de cada ARNm se esquematiza la región codificante, y debajo de cada ARNm se indica la zona aproximada de hibridación de los oligonucleótidos utilizados (B) RT-PCR amplificando las isoformas con intrón retenido, con intrón removido y el último exón de los ARNm de los genes *PDL6* y *PDL7*. (C) Análisis del *splicing* alternativo de *PDL6* mediante qPCR. Resultados de cuatro ensayos independientes en los que se calculó la relación entre la amplificación de la isoforma con intrón y la isoforma sin intrón (IR/SP), normalizando con la amplificación del último exón. Para este gráfico se calculó la media de IR/SP para la muestra WT, y se normalizó el resto de los valores con lo anterior. No se observaron diferencias significativas con un test de Kruskal Wallis ($p > 0,05$).

2.3.3 Construcciones VIGS

Para profundizar acerca de cómo el procesamiento de ARN del CP se relaciona con la regulación de los PD, se planteó la pregunta de si el silenciamiento o mutación de otros genes con funciones en el *splicing* de transcritos cloroplásticos, además de *ISE2*, resultaría en un aumento de la apertura plasmodesmal en hojas de plantas adultas. Sin embargo, muchas de las mutaciones que afectan el procesamiento de ARN en el CP resultan en fenotipos aberrantes o embrión-defectivos, dificultando el ensayo en *Arabidopsis*. Por lo tanto, se recurrió a la estrategia VIGS para poder utilizar hojas

adultas de *N. benthamiana* con niveles reducidos o ausentes de los genes a estudiar. Esta técnica se encuentra ampliamente difundida debido a que, justamente, permite estudiar el efecto del silenciamiento de genes que no podría realizarse en otro modelo (Ahn y Pai, 2008; Andres *et al.*, 2016; Yule Liu *et al.*, 2002; Stonebloom *et al.*, 2009). Para esto, se utiliza el virus *Tobacco Rattle Virus* (TRV) con su genoma dividido en dos vectores binarios de expresión: pTRV1 y pTRV2. En el primer vector se encuentra codificada la enzima ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) que le permite al virus replicarse. En el segundo vector, en el cual se encuentra codificada la proteína de la cápside del virus, se clona un fragmento de la secuencia del gen cuyo silenciamiento quiere ser estudiado. Los vectores se usan para transformar *A. tumefaciens*, que luego son coinfiltradas en hojas de plantas de 2-3 s. p. g. Cuando una célula es infectada por bacterias portando el pTRV1 y también por bacterias portando el pTRV2, todos los genes del virus son expresados en la misma célula, pudiendo por lo tanto ensamblarse, replicarse y propagarse. Esto activa el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional en la planta contra los ARN virales y los transcriptos del gen cuyo fragmento está clonado en el vector pTRV2.

Burch-Smith y Zambryski (2010) utilizaron esta técnica para silenciar *ISE1* e *ISE2*. En ambos casos, el resultado fue el aumento de la propagación simplástica de GFP2X a través de los PD, además de un mayor número de PD secundarios y CP con menor contenido de membrana tilacoidal. Por lo tanto, la técnica de VIGS fue útil para evaluar la regulación de los PD, silenciando *ISE2*. Los autores también secuenciaron el gen completo de *ISE2* en el genoma de *N. benthamiana*.

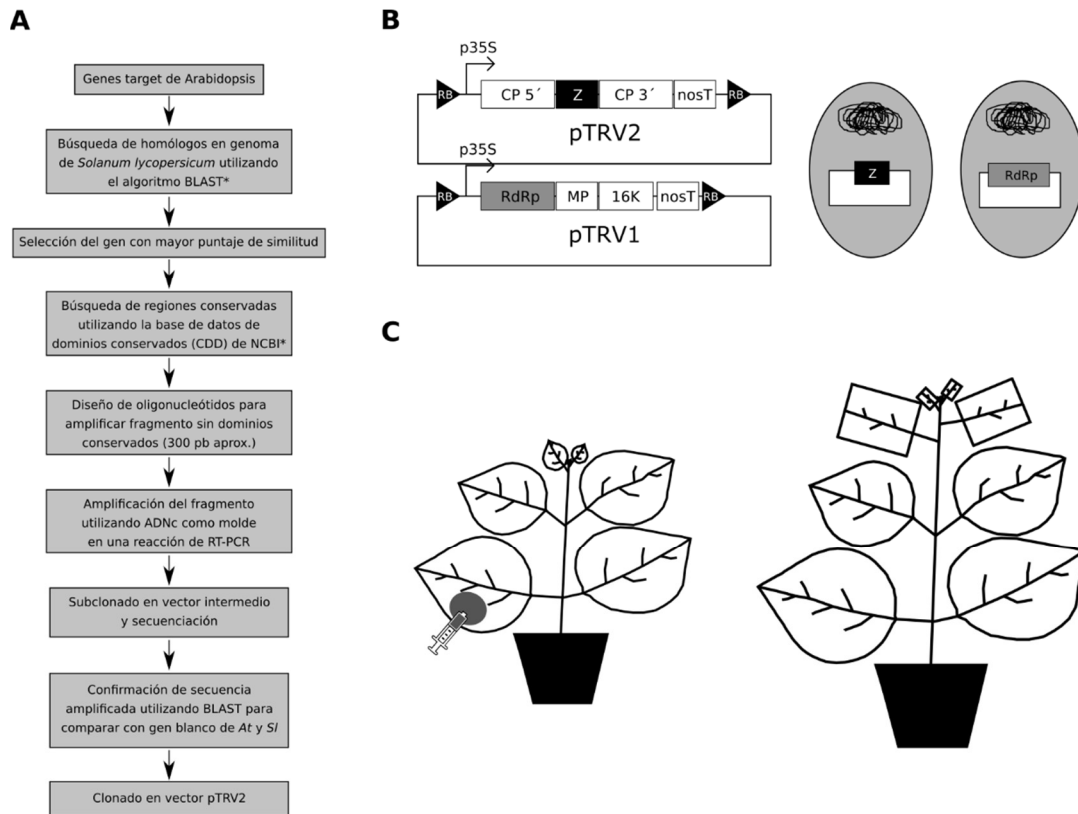


Figura 2.5. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). **(A)** Flujo de trabajo para la realización de los silenciamientos inducidos por el virus *Tobacco Ratlle Virus* (TRV) en plantas de *Nicotiana benthamiana*. **(B)** El fragmento amplificado del gen blanco es clonado junto al gen de la proteína de la cápside viral (CP) en el vector pTRV2. Luego, se transforman *A. tumefaciens* con pTRV2 con el fragmento clonado y con pTRV1 que es el vector que porta la ARN polimerasa ARN dependiente que permite la replicación del virus. **(C)** Se agroinfiltran hojas de *N. benthamiana* con una mezcla de las bacterias portando el pTRV2 y las que portan el pTRV1. Luego de dos semanas, el fenotipo de silenciamiento se hace visible en las hojas en desarrollo. En este caso, el silenciamiento del hipotético gen Z provoca una morfología rectangular de las hojas.

En base al trabajo de Germain *et al.*, 2013, se seleccionaron genes nucleares que han sido reportados con funciones en el *splicing* de transcritos cloroplásticos y que se diferencian en los intrones que procesan (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Genes nucleares seleccionados para silenciar en *N. benthamiana* por VIGS. Se seleccionaron genes de acuerdo a los intrones que procesan, de forma tal de poder provocar distintas alteraciones al procesamiento de ARN cloroplástico.

Gen	Locus	Mutante	Intrón								Crec.	Fen.	spp	Ref
			<i>rpl2</i>	<i>atpF</i>	<i>rps12-1</i>	<i>rps12-2</i>	<i>clpP1-1</i>	<i>clpP1-2</i>	<i>ycf3-1</i>	<i>ycf3-2</i>				
<i>ISE2</i>	AT1G70070	<i>ise2</i>	O	O	nd	O	O	nd	O	nd	i.v	C	<i>At</i>	1;2
<i>CLPR2</i>	AT1G12410	<i>clpr2-1</i>	X	nd	X	X	nd	nd	nd	nd	t	VP	<i>At</i>	3
		<i>clpr2-2</i>	O	O	nd	O	X	nd	O	nd	i.v	C	<i>At</i>	1
<i>RH3</i>	AT5G26742	<i>rh3-4</i>	O	nd	O	O	X	X	X	X	t	VP	<i>At</i>	3
<i>OTP51</i>	AT2G15820	<i>otp51-1/2</i>	X	O	X	X	X	X	O	X	i.v	C	<i>At</i>	4
<i>CFM2</i>	AT3G01370	<i>cfm2-2</i>	nd	X	nd	nd	X	O	O	nd	i.v	VP	<i>At</i>	5
<i>WHY1</i>	EU595664	<i>why1-1</i>	X	O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	t	C	<i>Zm</i>	6
		<i>why1-2</i>	X	O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	t	VP	<i>Zm</i>	6

INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 (*ISE2*); CASEINOLYTIC PROTEASE COMPLEX SUBUNIDAD 2 (*CLPR2*); RNA HELICASE 3(*RH3*); ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING 51 (*OTP51*); CRM FAMILY MEMBER 2 (*CFM2*); WHIRLY (*WHY*)

A. thaliana (*At*); *Zea mays* (*Zm*); no determinado (nd); clorótica (C); verde pálida (VP); tierra (t); in vitro (i.v)

[1] Cap1; [2] Bobik *et al.*, 2016; [3] Asakura *et al.*, 2012; [4] de Longevialle *et al.*, 2008; [5] Asakura y Barkan, 2007; [6] Prikryl *et al.*, 2008

Al momento del clonado en los vectores VIGS, aún no se encontraba disponible la secuenciación preliminar del genoma de *N. benthamiana* (<https://solgenomics.net/>). Por lo tanto, para el diseño de oligonucleótidos y posteriores pasos, se siguió el flujo de trabajo descrito en la Fig. 2.5A (salvo para *ISE2*, que se utilizaron los oligonucleótidos publicados en Burch-Smith y Zambryski, (2010)). La especie filogenéticamente más cercana a *N. benthamiana* con el genoma secuenciado, en ese momento, era *S. lycopersicum*, por lo tanto, se utilizó el genoma de esta especie para buscar los genes homólogos a los de *Arabidopsis* listados en la Tabla 2.1. Los genes obtenidos en la búsqueda anterior fueron evaluados de acuerdo a un algoritmo de dominios conservados para proteínas ([https:// www.ncbi.nlm.nih.gov /Structure /cdd /wrpsb.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar fragmentos de

aproximadamente 300 pb que se encontraran preferentemente fuera de los dominios conservados. Un fragmento del gen β -GLUCORONIDASA (*GUS*) de *Escherichia coli*, ausente en el genoma de *N. benthamiana*, se subclonó en el vector pTRV2 para usar como control negativo en los experimentos de VIGS.

2.3.4 Fenotipos de plantas silenciadas por VIGS

El silenciamiento por VIGS en *N. benthamiana* resulta efectivo a partir de las dos semanas post infiltración (s. p. i.) de los vectores pTRV1/2 y se evidenció en el tejido nuevo que emergió y se desarrolló desde el meristema apical. Por simplicidad, las plantas tratadas con VIGS serán nombradas únicamente por el gen blanco de silenciamiento (sin cursiva) seguido de un guión y la letra “V”. Por ejemplo, ISE2-V refiere a las plantas con *ISE2* silenciado mediante VIGS.

Las plantas GUS-V, OTP51-V y WHY1-V no mostraron un fenotipo a simple vista. Las hojas tienen un color verde indistinguible de plantas no tratadas con VIGS y la morfología de las hojas y el desarrollo de la planta son normales (Fig. 2.6).

Las plantas ISE2-V muestran un fenotipo clorótico, de acuerdo con Burch-Smith y Zambryski, 2010; y también de acuerdo a lo observado en la línea ISE2-SUP de *Arabidopsis*. El desarrollo de la planta se retardó un poco con respecto a GUS-V. La morfología de las hojas fue normal. Más de cuatro s. p. i. de los vectores VIGS, las hojas cloróticas comenzaron a mostrar parches verdes (Fig. 2.6).

Las plantas RH3-V también mostraron un fenotipo clorótico, aunque no completo como en ISE2-V, sino más bien una clorosis variegada (se observan zonas verdes y zonas cloróticas). La morfología de las hojas fue normal y el desarrollo de la planta fue un poco retardado al igual que ISE2-V (Fig. 2.6).

Las plantas CFM2-V mostraron un fenotipo clorótico leve y con variegación. La morfología de hojas y desarrollo de la planta fueron normales (Fig. 2.6).

Las plantas CLPR2-V mostraron el fenotipo más extremo. La clorosis de las hojas fue completa, al igual que ISE2-V, y mostraron una morfología alargada. Muchas plantas no fueron capaces de desarrollarse normalmente, deteniendo su crecimiento en estadios tempranos. No desarrollaron inflorescencias (Fig. 2.6).

En la Fig. 2.6 se observa, en el gel de agarosa de ARN desnaturalizante, que todas las líneas tienen las dos bandas de ARNr 25S y 18S, pero las líneas ISE2-V, RH3-V y CLPR2-V no tienen cantidades distinguibles de ARNr cloroplásticos 16S y 23S. Esto coincide con la clorosis de las hojas en estas tres líneas, lo cual ya se había observado en la Fig. 1.8 con las líneas ISE2-SUP, *ise2* y *clpr2-2*, y está de acuerdo con el hecho de que alteraciones de los ARNr derivan en fenotipos cloróticos (Hammani *et al.*, 2016).

Según los datos de la Tabla 2.1, las mutaciones de los genes seleccionados provocan un fenotipo clorótico, o al menos verde pálido. Esto es esperable dado que todos los genes poseen funciones en el procesamiento de ARN cloroplástico, y fallas en este mecanismo derivan en desarrollo anormal de los plástidos. El hecho de que OTP51-V y WHY1-V no tengan una diferencia de color con GUS-V, y que CFM2-V tenga un color verde con variegación pálida podría ser indicio de que el silenciamiento génico no fue eficiente.

Se diseñaron oligonucleótidos para confirmar el silenciamiento específico de cada gen mediante RT-PCR. Sin embargo, y a pesar de probar con diferentes secuencias, la amplificación de los genes *CFM2*, *OTP51* y *WHY1* no fue exitosa. Por lo tanto, y dado que los fenotipos de estas tres líneas no resultaron los esperados, continuamos

trabajando focalizados en GUS-V, ISE2-V, RH3-V y CLPR2-V. Los resultados de RT-PCR con muestras de estas líneas se presentan en la Fig. 2.7.

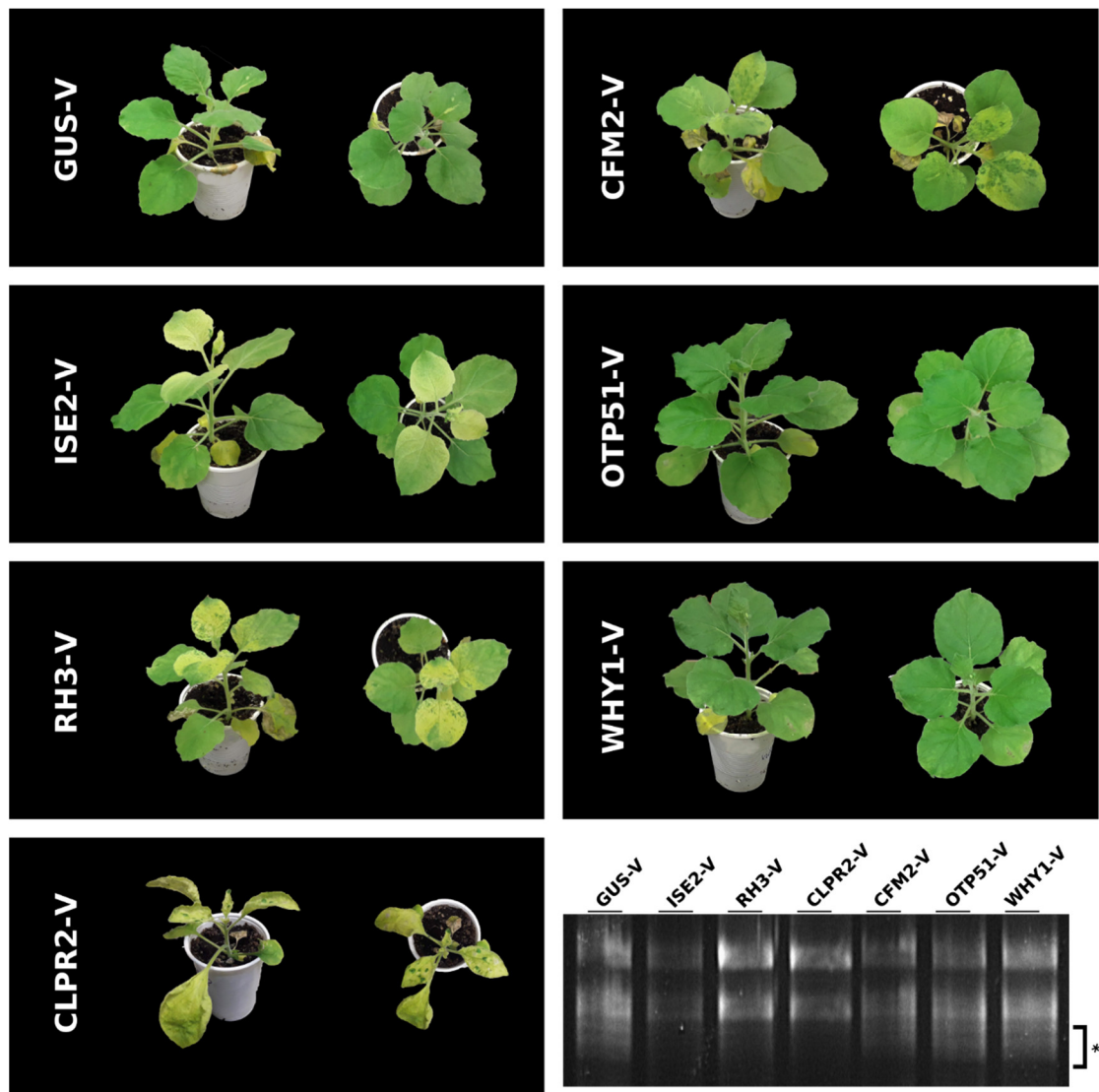


Figura 2.6. Fenotipos de plantas de *N. benthamiana* silenciadas mediante VIGS. Se muestran plantas de 5 s.p.g. y 3 s.p.i. de los vectores VIGS. Gel de agarosa 1% en condiciones desnaturizantes de ARN para cada línea. En las líneas ISE2-V, RH3-V y CLPR2-V se observa la correlación entre clorosis de las hojas y ausencia de bandas de ARN cloroplástico 16S y 23S identificadas con un asterisco a la derecha del gel.

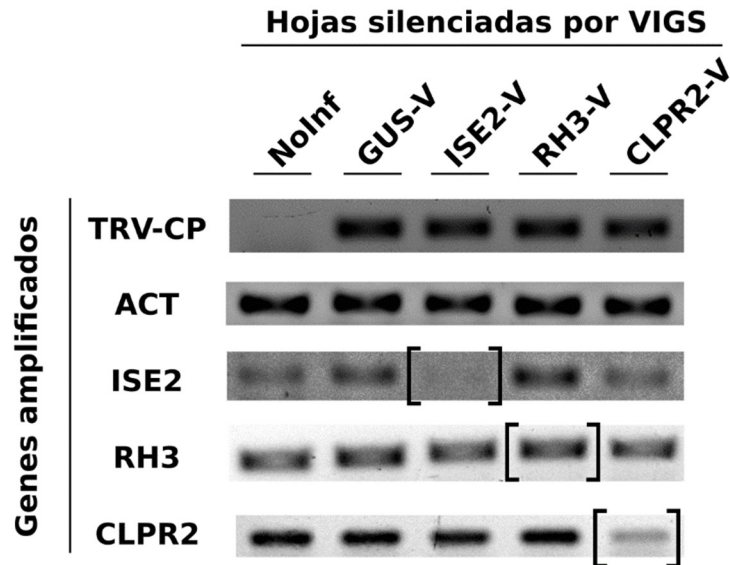


Figura 2.7. Análisis por RT-PCR del nivel de silenciamiento en las plantas tratadas con VIGS para cada gen seleccionado. Se extrajo ARN de las hojas mostrando fenotipo de silenciamiento, o de sus equivalentes en las plantas sin fenotipo evidente (NoInf y GUS-V). El fragmento de amplificación de cada par de oligonucleótidos se encuentra fuera de la región clonada en los pTRV2 correspondientes. Se amplificó *ACTINA* como control de cantidad de ADNc. TRV-CP amplifica los transcritos correspondientes a la proteína de la cápside del virus TRV. NoInf control de planta sin infectar por TRV. Los corchetes identifican el gen que se desea silenciar en cada línea.

Las amplificaciones positivas de transcritos de proteína de la cápside viral confirmaron la infección de las plantas tratadas con VIGS. *ACTINA* sirvió como control de síntesis de ADNc y carga.

El tratamiento de VIGS para silenciar *ISE2* fue efectivo, identificando una banda de amplificación apenas visible en la muestra ISE2-V.

RH3-V no mostró una disminución de los niveles de transcripción de *RH3*. Esto resultó sorprendente dado el fenotipo clorótico de las plantas RH3-V. La búsqueda de secuencias complementarias al fragmento clonado de *RH3* en el vector pTRV2 mediante la aplicación <https://vigs.solgenomics.net/> resultó en dos secuencias con alto porcentaje

de similitud. Estas secuencias están descritas como ARN helicasas con dominios DEAD *box* y poseen péptido señal de translocación al CP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/). Los oligonucleótidos para amplificar *RH3* muestran una complementariedad a las secuencias anteriores mayor a 80%, por lo cual se asumió que la amplificación sería específica para los dos genes identificados. Aún no se determinó la razón por la cual los niveles de transcritos de *RH3* no disminuyeron, aunque asumimos, basándonos en el fenotipo de RH3-V, que algún gen con funciones en el procesamiento de ARN en el CP efectivamente está siendo silenciado en RH3-V.

El tratamiento de VIGS para silenciar *CLPR2* mostró una disminución de la banda específica en la línea CLPR2-V. La banda de amplificación de *ISE2* también parece disminuida con respecto a GUS-V, aunque no con respecto a la muestra no infiltrada. Por el contrario, no se observó un descenso de los niveles de *CLPR2* en ISE2-V. Ganusova *et al.*, (2017) reportó que la transcripción de *ISE2* aumenta frente a la infección de *N. benthamiana* con TMV. Tanto TMV como TRV pertenecen a la familia *Viridiplantae*. Esto explicaría el aumento de los niveles de *ISE2* en GUS-V comparado a NoInf.

2.3.5 El silenciamiento de *ISE2*, *RH3* y *CLPR2* en hojas de *N. benthamiana* provoca un incremento de la permeabilidad de los PD y menores niveles de calosa

Se realizaron ensayos de *gating* en los cuales se mide el grado de propagación intercelular de GFP (u otra proteína reportera) a partir de células epidermales individuales y aisladas donde se expresa GFP. El ensayo de *gating* puede evaluarse de dos formas: (1) la distancia (en arcos concéntricos de células adyacentes) que se propaga la proteína fluorescente desde la célula donde se sintetiza; (2) si hubo o no propagación de GFP (MOV – NO MOV) desde la célula sintetizadora hasta alguna célula

vecina. Ambas formas representan una medida del nivel de apertura de los PD en ese tejido (Fig. 2.8A).

Con el fin de evaluar la funcionalidad de la técnica de *gating*, se comparó la propagación intercelular de GFP en plantas de 4 s. p. g. y plantas de 6 s. p. g. mediante agroinfiltración y expresión de GFP en hojas de *N. benthamiana*. El SEL de los PD en hojas disminuye durante la transición sumidero-fuente (Oparka *et al.*, 1999). Hojas jóvenes importadoras de fotosintatos poseen PD con un SEL alto y a lo largo del desarrollo, y cuando las hojas se vuelven exportadoras de fotosintatos, el SEL disminuye. No se encontraron focos de GFP de célula única en hojas jóvenes. En hojas maduras, se encontró un 40% de focos de célula única, es decir, que no presentó propagación de GFP a células vecinas (Fig. 2.8B). Con este resultado, replicamos la observación de la disminución del SEL en hojas maduras comparadas con hojas jóvenes y confirmamos la funcionalidad del ensayo de *gating* en nuestras condiciones.

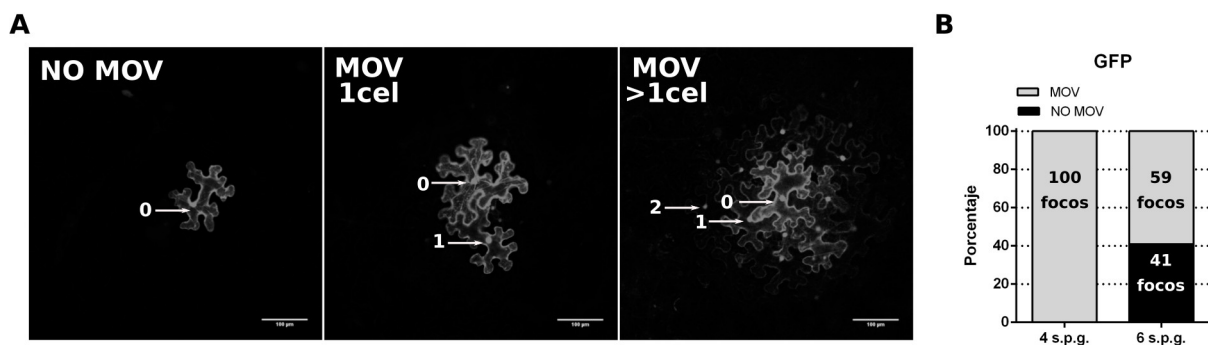


Figura 2.8. Validación del *gating*. (A) El ensayo de *gating* se basa en la identificación de células epidermales aisladas que expresen una proteína fluorescente. Luego, se cuenta la cantidad de células vecinas en arcos concéntricos a las cuales pudo propagarse la proteína fluorescente, o simplemente se registra si hubo o no propagación (MOV – NO MOV). (B) Se utilizaron plantas de 4 y 6 s. p. g. para validar la técnica de *gating* en nuestras condiciones. Se agroinfiltró la misma hoja en 2 plantas de 4 s.p.g. y en 2 plantas de 6 s.p.g. No se obtuvieron focos de NO MOV en las hojas de plantas jóvenes, confirmando la funcionalidad de la técnica del *gating*.

Luego de validar la técnica de *gating*, se midió el transporte macromolecular de GFP en hojas de plantas tratadas con VIGS. Se utilizaron cultivos de *Agrobacterium* portando plásmidos binarios de expresión de GFP y de GFP2X. En los ensayos con la versión simple de GFP, el porcentaje de focos con movilidad del reportero desde la célula infectada fue de aproximadamente 80% para todas las líneas, sin diferencias significativas. En los ensayos con GFP2X las tres líneas silenciadas ISE2-V, RH3-V y CLPR2-V mostraron una propagación simplástica significativamente mayor al control GUS-V (Fig. 2.9).

En la sección 2.2.1, donde se evaluó la permeabilidad de los PD en las líneas ISE2-OE e ISE2-SUP, no se habían encontrado diferencias significativas en la propagación de CFDA frente al silenciamiento de *ISE2*. El CFDA tiene un tamaño molecular de 460 Da. Los resultados del *gating* con GFP tampoco mostraron diferencias significativas en la apertura de los PD de hojas silenciadas para *ISE2*, *RH3* o *CLPR2*. El tamaño molecular de GFP es de 27 kDa. En cambio, al utilizar GFP2X (57 kDa de tamaño molecular), todas las hojas silenciadas presentaron un aumento significativo de la permeabilidad respecto a GUS-V. Podría concluirse entonces que el estado basal de los PD en hojas de *N. benthamiana* corresponde a un SEL superior a 27 kDa, a través de los cuales moléculas hasta al menos 27 kDa pueden movilizarse a células vecinas en un 80% de los casos. En cambio, moléculas de tamaño molecular entre 27 kDa y 54 kDa sólo se movilizan intercelularmente en un 30% de los casos aproximadamente. El silenciamiento de *ISE2*, *RH3* o *CLPR2* provoca un aumento del SEL de los PD e incrementa el porcentaje de movilización de moléculas entre 27kDa y 54kDa al 60% aproximadamente.

El aumento del SEL evaluado con GFP2X en ISE2-V ya había sido previamente demostrado por Burch-Smith y Zambryski, (2010). Sin embargo, en este trabajo ampliamos el estudio con las líneas RH3-V y CLPR2-V, que también muestran un aumento de la apertura plasmodesmal. Esto sería un indicio de que fallas importantes en el desarrollo de los CP, incluyendo una gran disminución de la síntesis de clorofila, derivan en un aumento de la apertura plasmodesmal.

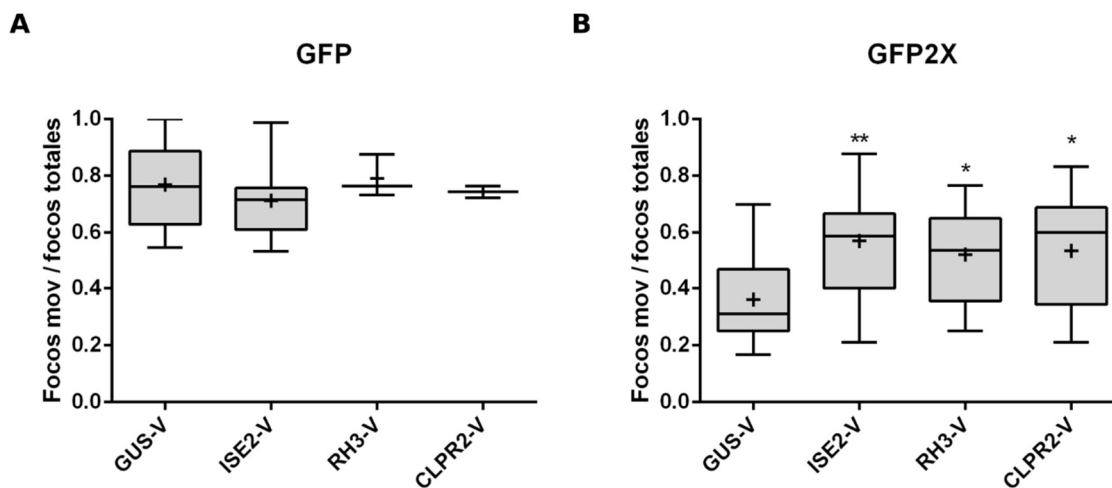


Figura 2.9. Gating con GFP y GFP2X en plantas tratadas con VIGS. Se agroinfiltraron hojas de las plantas silenciadas por VIGS con plásmidos de expresión de **(A)** GFP o **(B)** GFP2X. Se observaron las hojas a microscopio de epifluorescencia 48 h. p. i. Para cada hoja se calculó la fracción de focos con movimiento de GFP o GFP2X a células vecinas. Se tomaron más de 50 focos por hoja. Se utilizaron 3 plantas por línea VIGS por experimento. Se calculó la media de fracción de focos con movimiento por cada línea. Los gráficos de cajas indican: borde inferior de caja: cuartil 25 de los datos; borde superior: cuartil 75; línea horizontal en el interior de la caja: mediana; símbolo de suma en el interior de la caja: media; barra inferior: dato mínimo; barra superior: dato máximo. Se realizaron análisis de Kruskal Wallis seguido de contrastes de Dunn. * $P < 0,05$. En el apéndice estadístico se muestran los datos crudos de la figura

Para evaluar si el aumento de la permeabilidad plasmodesmal en las plantas silenciadas se debe a un descenso de los niveles de calosa, se tiñeron hojas con azul de anilina y se cuantificó la IntDen de calosa por cada PD mediante microscopía confocal. Las tres líneas silenciadas presentaron menores niveles de calosa comparado con GUS-V. El descenso de calosa fue leve pero significativo, por lo cual se concluyó que una menor acumulación de calosa aumentó la permeabilidad de los PD a GFP2X en las líneas ISE2-V, RH3-V y CLPR2-V.

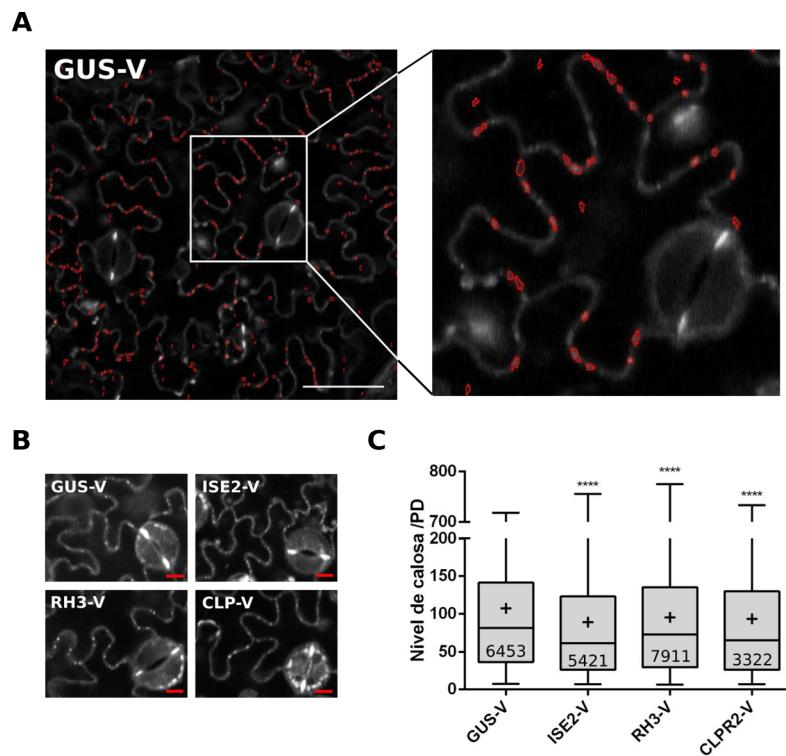


Figura 2.10. Tinción de calosa en plantas tratadas con VIGS. Se utilizaron hojas pertenecientes a tres plantas por línea. Se tomaron 10 imágenes por cada hoja en microscopio confocal. **(A)** Mediante un script de programación en ImageJ se identificaron automáticamente los depósitos de calosa en cada imagen. **(B-C)** Se utilizó la IntDen de cada depósito de calosa identificado para realizar un análisis de Kruskal-Wallis seguido de un método de contraste de Dunn entre las tres líneas silenciadas comparadas con el control GUS-V. $P < 0,05$. Los gráficos de cajas indican: borde inferior de caja: cuartil 25 de los datos; borde superior: cuartil 75; línea horizontal en el interior de la caja: mediana; símbolo de suma en el interior de la caja: media; barra inferior: dato mínimo; barra superior: dato máximo. Los números en las cajas indican la cantidad de réplicas.

Este resultado no concuerda con los mayores niveles de calosa detectados en las tinciones de ISE2-SUP de la Fig 2.2. Una posible causa podría ser que las células epidermales de *N. benthamiana* poseen CP, mientras que las células epidermales de *Arabidopsis* no poseen CP sino leucoplastos. Como la deposición de calosa depende en parte del CP, la respuesta al silenciamiento de *ISE2* podría ser diferente en la epidermis de cada especie.

2.3.6 Estado redox del cloroplasto

Como se planteó en la Introducción, cambios en el estado redox de mitocondria y CP modifican la apertura plasmodesmal de maneras contrarias: mitocondrias oxidadas y CP reducidos aumentan el SEL de los PD, mientras que CP oxidados disminuyen el SEL de los PD (Stonebloom *et al.*, 2012). Esto se determinó utilizando una forma de GFP direccionada al estroma del CP y sensible al estado redox estromal (roGFP), que responde al estado de oxidación del glutatión (Exposito-Rodriguez *et al.*, 2017), pero sin poder discriminar entre las distintas ROS cloroplásticas. Como el peróxido de hidrógeno podría ser una de las señales retrógradas, resultaba importante poder cuantificar específicamente los niveles de H₂O₂ en el CP para profundizar sobre el estado redox en ONPS. Se utilizó entonces el biosensor HyPer direccionado al CP con el fin de estudiar los niveles de H₂O₂ estromales en las plantas de *N. benthamiana* tratadas con VIGS.

El biosensor HyPer consiste de una molécula de Proteína Fluorescente Amarilla circularmente permutada (cpYFP) fusionada al dominio de unión de H₂O₂ del factor de transcripción OxyR de *Escherichia coli* (Exposito-Rodriguez *et al.*, 2017). Cuando este dominio es oxidado por H₂O₂, se genera un cambio conformacional en la proteína que modifica el pico de emisión de fluorescencia de cpYFP 405nm (HyPer reducido) a

488nm (HyPer oxidado). La relación entre ambas fluorescencias de emisión (488/405) es un índice del estado redox de HyPer y es directamente proporcional a los niveles de H₂O₂ del tejido.

Hojas de plantas tratadas con VIGS se agroinfiltraron con la construcción para expresar el biosensor HyPer con señal de translocación al CP. Luego de dos d. p. i., se tomaron imágenes de epidermis por microscopía confocal de forma de poder medir la relación entre las emisiones de Hyper oxidado y reducido (Fig. 2.11). Se utilizó una estrategia similar al reconocimiento de depósitos de calosa en *Arabidopsis*, pero ajustando el seteo del *software* Volocity para reconocer CP. Los CP de las líneas ISE2-V y CLPR2-V presentaron menores niveles de H₂O₂ comparado a GUS-V. Teniendo en cuenta que estas líneas también presentaron mayor permeabilidad a GFP2X en los ensayos de *gating*, estos datos concuerdan con los reportes de roGFP asociando menores niveles de ROS en los CP con una mayor permeabilidad de los PD. En cambio, RH3-V, que también presentó una mayor permeabilidad a GFP2X, resultó en mayores niveles de H₂O₂ comparado a GUS-V. Este resultado no era el esperado, ya que las tres líneas tienen silenciamiento en genes con funciones sobre el procesamiento de ARN o proteínas en el CP, con un fenotipo clorótico sin ARNr plastídica y un SEL aumentado. Sin embargo, cuando se evaluó el grado de silenciamiento de cada gen, RH3 presentó niveles normales de transcripción (Fig. 2.7). Por lo tanto, quizás el gen que está siendo silenciado actúa en otro proceso del metabolismo de los CP. Se necesitará de más estudios para confirmar estos resultados y para determinar el efecto observado en RH3-V.

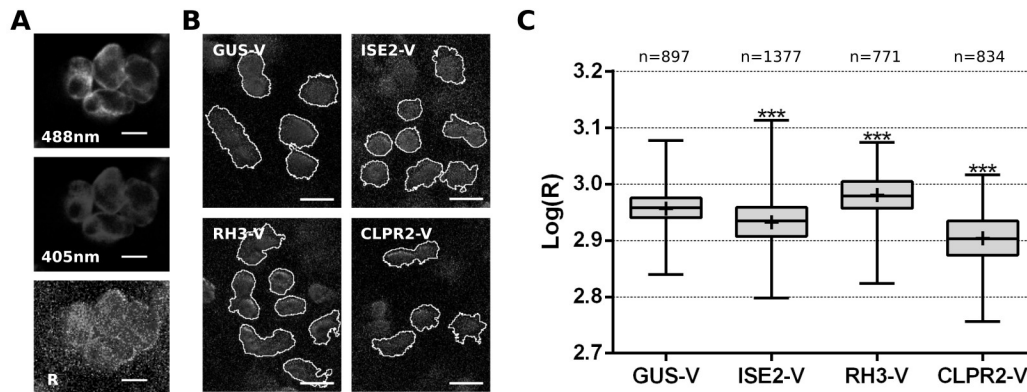


Figura 2.11. Uso del biosensor Hyper para medir los niveles de H_2O_2 . El biosensor Hyper direccionado al CP se expresó en las hojas de líneas VIGS mediante agroinfiltración para medir los niveles de H_2O_2 . Se tomaron 10 imágenes en microscopio confocal por cada hoja 48 h. p. i., utilizando tres plantas por cada línea. **(A)** Ejemplo de la fluorescencia de Hyper a cada longitud de onda y el resultado de calcular la relación entre ambas. **(B)** Mediante el software Volocity se identificaron automáticamente los cloroplastos en cada imagen. **(C)** Se calculó la relación entre la intensidad de fluorescencia a 488nm y la intensidad de fluorescencia a 405nm para cada cloroplasto, y se calculó la media y desvío estándar de todos los cloroplastos identificados para cada línea VIGS. Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis seguido de método de contraste de Dunn entre las cuatro líneas. * $P < 0,05$. Los gráficos de cajas indican: borde inferior de caja: cuartil 25 de los datos; borde superior: cuartil 75; línea horizontal en el interior de la caja: mediana; símbolo de suma en el interior de la caja: media; barra inferior: dato mínimo; barra superior: dato máximo. Barra de escala: $1\mu m$

2.3.7 Alteración de la morfología celular

Durante los ensayos de *gating* en las plantas ISE2-V, se observaban frecuentemente células con menor tamaño, morfologías atípicas, y sin el normal ensamblado que muestran las células epidermales. Además, podían observarse parches verdes que sobresalían del plano horizontal de la lámina y en los cuales el tejido no mostraba fenotipo clorótico de silenciamiento (Fig. 2.12A). Se hipotetizó que este efecto fuera debido a una mayor extensión o volumen de las células no silenciadas rodeadas de células silenciadas. Se decidió entonces medir el tamaño de las células epidermales en

las plantas GUS-V e ISE2-V. Las células de ISE2-V resultaron significativamente menores a las de IGUS-V (Fig. 2.12B).

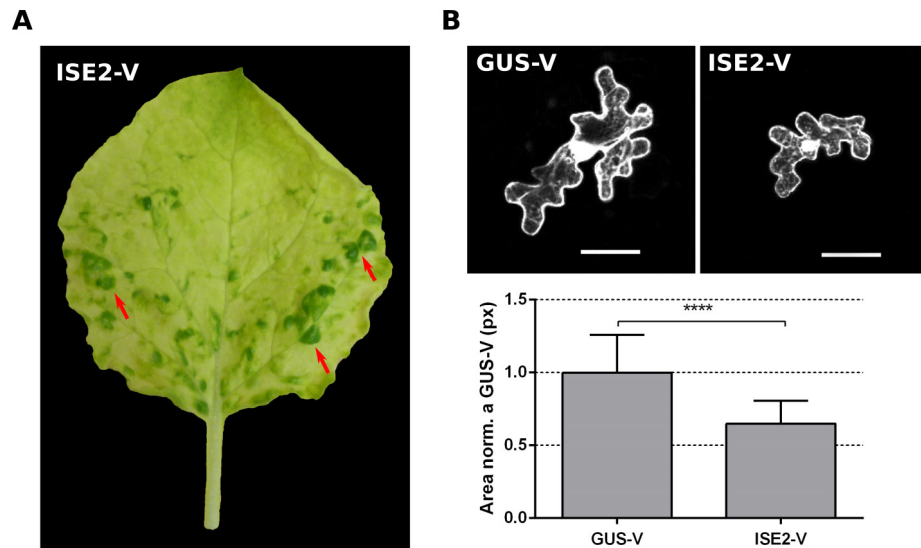


Figura 2.12. Alteración de la morfología celular en ISE2-V. A) Hoja de ISE2-V de más de 3 s. p. i. de VIGS. Las flechas indican regiones donde el tejido no se ve silenciado y forma especies de protuberancias que indican que la expansión celular podría ser mayor. B) Se midió el área de células epidermales aisladas expresando GFP en hojas de GUS-V e ISE2-V. Se utilizó 1 planta por línea VIGS en cada experimento. Se normalizaron los tamaños de las células al tamaño medio de las células GUS-V y se calculó la media y DE del área celular normalizada. Se realizó un test t de Student. En cinco experimentos independientes, el tamaño de las células ISE2-V fue significativamente menor al de GUS-V. Se muestra el resultado de uno de estos experimentos. * $p < 0,05$. Barra de escala: 50 μm . En el apéndice estadístico se muestran los datos crudos de la figura

El crecimiento de las células epidermales con su forma lobulada depende de diversos factores: la turgencia de la vacuola, los haces de microtúbulos en las zonas de no crecimiento de lóbulos, la red de actina densa en la zona de crecimiento de los lóbulos, regulación hormonal de auxina y citoquinina, y correcta deposición de materiales de la pared celular por sintetasas de celulosa (CESAs) que se trasladan desde

el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática por los filamentos de actina en forma miosina-dependiente (Jacques *et al.*, 2014).

Como un estudio preliminar, se investigó el estado del citoesqueleto en las células epidermales de GUS-V e ISE2-V. Para esto, se usó un vector binario para expresión de actina fusionada a GFP (ACT:GFP) y una línea de *N. benthamiana* transgénica que sobreexpresa tubulina fusionada a GFP (TUB:GFP). Por un lado, plantas de la línea TUB:GFP fueron agroinfiltradas para inducir VIGS de *GUS* e *ISE2*. Y por otro, plantas GUS-V e ISE2-V (generadas a partir de plantas de *N. benthamiana* WT) fueron agroinfiltradas con el vector de expresión de ACT:GFP.

Se analizó cualitativamente la expresión de ambas proteínas de fusión mediante microscopía confocal (Fig. 2.13). No se observaron diferencias en la expresión de ACT:GFP entre GUS-V e ISE2-V. Sin embargo, las plantas ISE2-V mostraron menor intensidad de la señal de TUB:GFP y una organización menos compleja de los microtúbulos comparado a GUS-V. Se descartaron posibles cambios de niveles de expresión de TUB:GFP o mayor exposición en la adquisición de la imagen, ya que se pudo observar que los estomas (que no presentan PD y por lo tanto no pueden recibir las señales de silenciamiento de *ISE2*) presentaron niveles similares de fluorescencia en ambas líneas. Análisis cuantitativos serán necesarios para confirmar estas observaciones y para estudiar la disposición tanto de los filamentos de actina como de los microtúbulos.

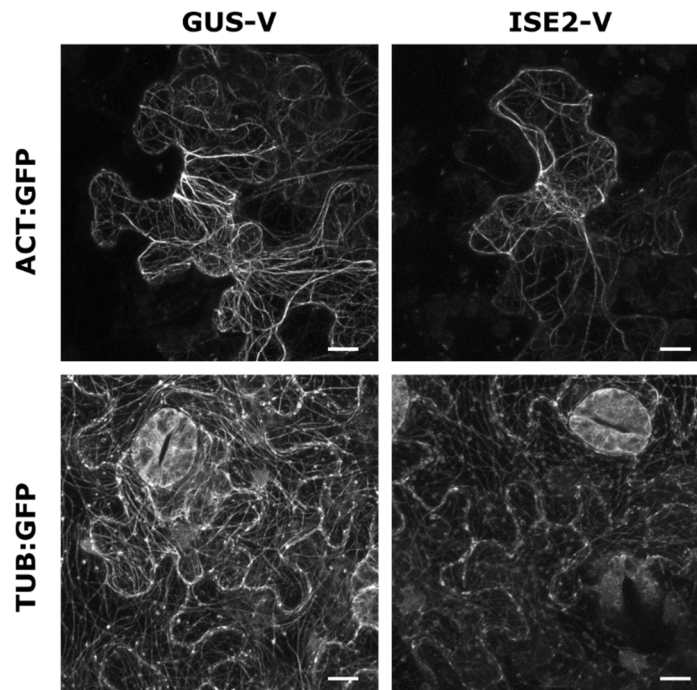


Figura 2.13. Citoesqueleto en las líneas GUS-V e ISE2-V. Se utilizó un vector binario para expresión de actina fusionada a GFP (ACT:GFP) en plantas GUS-V e ISE2-V WT. Luego de 48 h. p. i. se tomaron imágenes con microscopio confocal. Por otro lado, se utilizó una línea de *N. benthamiana* transgénica que sobreexpresa tubulina fusionada a GFP (TUB:GFP) y se agroinfiltraron plantas para inducir VIGS de *GUS* e *ISE2*. Luego de 2 s. p. i. de VIGS, se observaron las hojas al microscopio confocal. Se muestran las proyecciones de máxima intensidad de todas las imágenes en el plano z para cada tratamiento. Barra de escala: 10µm

2.4 Discusión

En este capítulo se utilizaron dos modelos de plantas distintos y se recurrió a diferentes experimentos con el objetivo de estudiar los efectos que provoca la falta de *ISE2* o de proteínas similares sobre la regulación de los PD en hojas de plantas adultas y de analizar qué señal retrógrada podrían intervenir en esta regulación.

2.4.1 Efecto del silenciamiento de *ISE2* en la comunicación intercelular de hojas adultas de *Arabidopsis*

Los ensayos de DANS no resultaron en diferencias en la propagación simplástica del colorante CFDA entre las líneas *ISE2*-OE, *ISE2*-SUP y WT, pero si con la línea *PDL5OX* y las tres restantes. Este resultado no coincidía con lo observado en embriones de *Arabidopsis* o plantas de *N. benthamiana* en ausencia de *ISE2*. Para evaluar si el silenciamiento de *ISE2* en hojas generaba algún efecto en la estructura de los PD, se cuantificó los niveles de calosa. Sorpresivamente, los niveles de calosa en *ISE2*-SUP resultaron significativamente mayores a *ISE2*-OE y WT, además de verse incrementada la frecuencia de PD en *ISE2*-SUP. Estos resultados confirman que *ISE2* participa en la formación de PD y en la cantidad de calosa que se depositan en hojas adultas.

Por otro lado, la técnica de DANS es sensible a cambios en la permeabilidad de los PD a causa de un estímulo de daño mecánico (Cui y Lee, 2016). Tanto WT como *ISE2*-SUP fueron capaces de responder al daño disminuyendo la permeabilidad de los PD, mientras que *ISE2*-OE no lo hizo. Esto podría indicar que la sobreexpresión de *ISE2* interferiría con la producción o propagación de H_2O_2 , o con los mecanismos de respuesta al mismo.

Los embriones *ise2* son incapaces de disminuir el SEL de los PD en el pasaje de estadio corazón a torpedo. En cambio, embriones WT muestran un descenso del SEL que define dominios simplásticos específicos. Esto fue descubierto en ensayos de *dye loading* donde los embriones son incubados con un colorante fluorescente que penetra por heridas generadas al expulsar los mismos fuera de la cubierta seminal. Se contemplan dos hipótesis con respecto a este fenómeno: (1) es un mecanismo natural de los embriones, o (2) es una respuesta a las heridas provocadas al ser expulsados de la cubierta seminal. Por lo tanto, la mutación *ise2* provocaría en el primer caso la incapacidad del embrión de responder a señales biogénicas del CP al núcleo, y en el segundo caso la incapacidad del embrión de responder a señales operacionales de los CP. El resultado de ISE2-SUP respondiendo al daño mecánico, asumiendo que lo que pasa en hojas adultas también pasa en los embriones, favorecería la hipótesis de las señales biogénicas regulando los dominios simplásticos del embrión.

2.4.2 *Splicing* alternativo de genes de localización plasmodesmal

El estado de óxido-reducción de PQ gatilla una señalización retrógrada que influye en el *splicing* alternativo de genes nucleares (Petrillo *et al.*, 2014). Las PDLs son proteínas asociadas a los PD con diferentes funciones y cuatro de los genes que codifican las PDLs muestran eventos de *splicing* alternativo. Por lo tanto se estudió si el silenciamiento de *ISE2* tendría alguna consecuencia en el *splicing* de *PDL6* y *PDL7*, los dos genes elegidos para estos ensayos. En el caso de observar alguna diferencia entre las muestras silenciadas en *ise2* y las no silenciadas, sería un indicio importante acerca de cómo ISE2 en particular, y el CP en general, influyen sobre la regulación de los PD.

Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el *splicing* de los dos genes evaluados entre las líneas WT, ISE2-OE e ISE2-SUP. Las modificaciones en el *splicing* reportadas por Petrillo *et al.*, (2014) fueron reveladas mediante tratamientos con condiciones muy particulares de luz constante. Quizás el silenciamiento de *ISE2* en hojas adultas no sea suficiente para generar un efecto sobre el *splicing* alternativo de los PDLPs, o alternatively, el ONPS no participa de la regulación de *splicing* alternativo de PDLPs.

Sin embargo, embriones *ise2* muestran una transcripción de PDLP6 dos veces mayor comparado a embriones WT según los datos del microarreglo de Burch-Smith *et al.*, (2011), aunque en este experimento no se analizaron variantes de *splicing*. Y dada la distinta funcionalidad aparente que presentan las isoformas de PDLP6 con intrón retenido o removido, la regulación del *splicing* podría ser muy importante en la etapa embrionaria.

2.4.3 VIGS de genes con función en el cloroplasto en *N. benthamiana*

La técnica de VIGS tiene ciertas limitaciones: posible supresión insuficiente de un gen para observar algún fenotipo, fenotipos de supresión enmascarados por redundancia funcional de otros genes, niveles de silenciamiento muy variables, silenciamiento cruzado (*off-target*) y efectos propios de la infección de TRV (Burch-Smith *et al.*, 2004; Ratcliff *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta estas limitaciones, y aunque no se logró evaluar todos los genes que se planteó en un principio, el silenciamiento de genes con función en el procesamiento de ARN plastídico mediante VIGS resultó una herramienta útil para responder muchas preguntas del Capítulo 2.

La técnica había sido validada para el estudio de las funciones plasmodesmales por Burch-Smith y Zambryski (2010). En ese trabajo, el silenciamiento tanto de *ISE2* como de *ISE1* derivó en un aumento del SEL de los PD en hojas de *N. benthamiana* y pudieron observarse un mayor número de PD secundarios y hojas cloróticas debido a CP no desarrollados y sin clorofila. En nuestro caso, el silenciamiento de *ISE2* mostró un fenotipo similar. Y también logramos obtener fenotipos cloróticos de silenciamiento de *RH3* y *CLPR2*, tal cual lo reportado para mutantes de *Arabidopsis* (Tabla 2.1). La falta de ARNr en estas tres líneas avaló el desarrollo anormal de los CP. Además, se confirmó molecularmente el silenciamiento de *ISE2* y de *CLPR2* mediante RT-PCR. Sin embargo, los transcritos de *RH3* en las plantas RH3-V se mantuvieron en niveles comparables a plantas control. Las limitaciones de la técnica de VIGS sumado a la falta de una secuenciación definitiva del genoma de *N. benthamiana* impidieron llegar a una conclusión acerca del motivo de esta falta de evidencia molecular. No obstante, se consideró útil continuar trabajando con estas plantas dado el fenotipo de las mismas.

2.4.4 Los PD se hallan desregulados en hojas de *N. benthamiana* silenciadas por VIGS

Los ensayos de *gating* dieron resultados interesantes con respecto al estado de los PD en las hojas silenciadas. En primer lugar, la propagación simplástica de GFP no mostró diferencias entre el control GUS-V y los tres silenciamientos específicos. En cambio, la propagación simplástica de GFP2X fue mayor en las tres líneas silenciadas. Esto se correlacionó además con niveles significativamente menores de calosa en ISE2-V, RH3-V y CLP-V. Se concluyó que el tamaño de GFP (27 kDa) es menor al SEL promedio de los PD en las cuatro líneas de VIGS. El porcentaje de movilización en todas las líneas

fue de un 80% de movilización. En cambio, al duplicar el tamaño de la proteína utilizando GFP2X (54 kDa), la movilización en WT disminuye casi a la mitad (por debajo del 40%), mientras que en las líneas de silenciamiento disminuye sólo al 60%, lo cual puede atribuirse a la menor deposición de calosa en estas últimas. De hecho los dominios simplásticos en el embrión fueron descubiertos utilizando variantes de distintas repeticiones en tándem de GFP (Kim *et al.*, 2002).

Bobik *et al.*, (2018) estudiaron las proteínas que interactúan con ISE2 en el CP. Para esto, recurrieron a un ensayo de doble híbrido y a un ensayo de incubación de ISE2 con extractos proteicos de hojas de *Arabidopsis* seguido de espectrometría de masas. Hallaron más de veinte proteínas en cada ensayo, identificándose en ambos la proteína cloroplástica 15 de unión a ribosoma (RPL15). El silenciamiento de *RPL15* por VIGS resultó en un fenotipo clorótico, en menores niveles de ARNr y por lo tanto menor cantidad de proteínas totales, y en el desarrollo anormal de las membranas tilacoidales. No obstante, los niveles de LHCB se mantuvieron a niveles WT. Importantemente, la propagación simplástica de GFP aumentó en las líneas RPL15-V comparado al control, tanto entre células epidermales como entre epidermis y mesófilo. En este trabajo lograron encontrar diferencias en la movilización de GFP entre líneas silenciadas ISE2-V y RPL15-V y la línea control GUS-V.

En principio, y dado que plantas cloróticas presentaban aumento de transporte por PD en ensayos de *gating*, contemplábamos la hipótesis de que el fenotipo clorótico era suficiente para provocar el efecto de aumento de SEL sobre los PD. Sin embargo, los resultados de la tesis doctoral de Tyra McCray (McCray, 2017) contradicen esta hipótesis. McCray trabajó, a partir de los ensayos de doble híbrido publicados en Bobik *et al.* (2018) con algunas de las proteínas que resultaron en una interacción positiva con

ISE2. Una de ellas, IPI1 (ISE2 INTERACTING PROTEIN 1) es una proteína con dominios PPR. Su silenciamiento por VIGS en *N. benthamiana* mostró un fenotipo clorótico, defectos en el procesamiento de ARNr cloroplásticos y defectos en la edición de algunos transcritos cloroplásticos. Sin embargo, y sorpresivamente, la propagación simplástica de GFP2X en hojas IPI1-V no resultó en diferencias con el control GUS-V, obteniendo un 40% de propagación en ambas líneas, contra una movilización mayor al 60% en ISE2-V (valores muy similares a los obtenidos en este capítulo para GUS-V e ISE2-V, respectivamente). Por lo tanto, la clorosis derivada de fallas en el desarrollo del CP no sería condición suficiente para desregular los PD.

2.4.5 Cuáles son las señales retrógradas que podrían funcionar en la regulación de los PD?

El estudio exhaustivo de las señales retrógradas que han llevado adelante un gran número de laboratorios durante los últimos años evidencia que las respuestas nucleares no se dan por la percepción de una única señal. En cambio, muy probablemente una multitud de señales retrógradas son percibidas por el núcleo, que debe integrar las mismas para poder generar una respuesta adecuada (Wu *et al.*, 2019). La regulación de los PD en respuesta a señales retrógradas probablemente también dependa de un conjunto de señales más que de un solo tipo de señalización.

Por ejemplo, Zhao *et al.*, (2019) asociaron a GUN1 con la edición de 11 genes plastídicos. En las mutantes *gun1*, la falla en la edición de estos sitios sería la causa de la no inhibición de PhANGs en el tratamiento con LYN, típico de *gun1*. Entre los genes cuya edición es ineficiente en esta mutante se hallan *rpoB* y *rpoC1*, que codifican subunidades de la PEP. Estudios anteriores habían indicado que mutaciones en los factores sigma de

la PEP también afectaban la señalización retrógrada. Zhao *et al.*, (2019) postularon que en la mutante *gun1* los cambios en la edición de *rpoB* y *rpoC1* afectan la actividad polimerasa de la PEP, resultando en una transcripción anormal de un set específico de genes plastídicos.

Los resultados de Bobik *et al.*, (2017), indican que ISE2 interviene en la edición de transcriptos cloroplásticos, incluidos *rpoA* y *rpoB*. Por lo tanto, la desregulación de los PD en ISE2-V podría estar respondiendo a señales identificadas en *gun1*.

Aunque la mutante *gun1* tiene un fenotipo normal en el desarrollo y coloración verde, sirve de ejemplo para demostrar que fallas en la edición de algunos genes cloroplásticos (función compartida también por ISE2), o en el mecanismo de importación del CP (función compartida también por el complejo Clp), pueden generar señales retrógradas alteradas que modifiquen la expresión de genes nucleares, en particular de PD.

2.4.6 Especies reactivas de oxígeno

El estado redox de los CP y las mitocondrias se ha asociado a la regulación de los PD (Stonebloom *et al.*, 2012). Mitocondrias oxidadas en ISE1-V e ISE2-V, y CP reducidos en ISE2-V correlacionan con un aumento de la apertura plasmodesmal. CP oxidados en *gat1* correlacionan con un descenso de la apertura plasmodesmal. Estas observaciones se realizaron con agentes sensibles al estado redox general de las organelas. Nuestros resultados confirmaron que los niveles de H₂O₂ en CP en ausencia de *ISE2* o *CLPR2* son menores que plantas no tratadas y esto correlacionó con la apertura de los PD. En cambio, RH3-V mostró niveles mayores de H₂O₂, lo cual resultó inesperado ya que también presentó aumento de la permeabilidad plasmodesmal. La falta de

silenciamiento específico de *RH3* podría ser la causa de que los niveles de H_2O_2 no sean los esperados. Alternativamente, se debería evaluar el rol de H_2O_2 plastídica en la regulación de PD, empleando mutantes de ROS, para confirmar o refutar su efecto sobre la comunicación intercelular.

2.4.7 Volumen celular y citoesqueleto

El menor tamaño y forma anormal de las células de la epidermis observadas en hojas de ISE2-V fue algo consistente a lo largo de los experimentos de *gating*. Las plántulas *ise2* se perciben con una dureza muy superior a plántulas WT, lo que indicaría que sus paredes se encuentran más densas y rígidas y esto podría explicar la diferencia de tamaño celular en ISE2-V y GUS-V. Además, 19 genes relacionados con la formación de la pared celular se encuentran significativamente desregulados en embriones *ise2*.

El citoesqueleto forma parte de la estructura de los PD, al menos con los filamentos de actina y las proteínas de miosina VIII corriendo a lo largo del eje del desmotúbulo, aunque no se ha descrito la presencia de microtúbulos. Los resultados indicarían que una formación ineficiente de las redes de microtúbulos en hojas ISE2-V, podría estar relacionado con el efecto del silenciamiento de *ISE2* sobre el SEL de los PD. Se requerirá de análisis cuantitativos para confirmar esto, además de evaluar las otras líneas VIGS.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

- 1) Se confirmó la localización de ISE2:GFP en el CP, aportando sólidas pruebas de su asociación con los nucleoides
- 2) ISE2 interviene en el *splicing* de intrones tipo II de transcriptos cloroplásticos y en el reciclado de intrones liberados, para lo cual interactúa directamente con los transcriptos.
- 3) La mutación *clpr2-2*, con efectos similares a *ise2* sobre el *splicing* cloroplástico, también provoca un defecto en la regulación de los PD en embriones torpedo.
- 4) Por todo lo anterior, se concluye que un mal desarrollo del CP, ya sea por deficiencias en el procesamiento de ARN o en la homeostasis de proteínas, genera un defecto sobre la regulación de los PD.
- 5) La ausencia de ISE2 no interfiere con la respuesta de los PD frente al daño. Por esto, puede concluirse que la propagación simplástica de moléculas mayores a 10 kDa en embriones mutante no es debido a la falta de una respuesta a las lesiones durante el ensayo de *dye-loading*.
- 6) El silenciamiento de *ISE2* en hojas adultas de *Arabidopsis* aumenta el depósito de calosa en los PD, y al mismo tiempo su densidad, que conjuntamente podría explicar que no haya ningún cambio en la tasa de difusión del colorante.
- 7) La ausencia de ISE2 en hojas adultas de *N. benthamiana* aumenta la propagación simplástica de moléculas de al menos 54 kDa, no observándose efecto para moléculas menores a 27 kDa

- 8) El silenciamiento de *ISE2* en hojas adultas de *N. benthamiana* disminuye también la acumulación de calosa en los PD. Aunque esta disminución es leve, podría explicar la conclusión anterior.
- 9) El silenciamiento de *ISE2* en hojas adultas de *Arabidopsis* no tendría efecto sobre el *splicing* alternativo de genes codificando proteínas localizadas en el PD (*PDLP6* y *PDLP7*).
- 10) El silenciamiento de *ISE2* o de *CLPR2* disminuye los niveles de H_2O_2 en los CP.
- 11) El silenciamiento de *ISE2* afecta la morfología de la célula, lo cual podría explicar en parte los efectos sobre los PD.

Perspectivas

- Confirmar el gen que está siendo silenciado en la línea RH3-V para poder explicar la causa de una mayor acumulación de H_2O_2 en CP con niveles similares de acumulación de calosa y permeabilidad simplástica que células de *ISE2-V* y *CLPR2-V*. Es decir, determinar si la relación entre el nivel de ROS de CP y calosa en PD es siempre directa, independientemente de si el gen silenciado es o no *RH3*.
- Generar plantas transgénicas con las dos variantes de *splicing* de *PDLP6* y *PDLP7* para analizar si se produce algún efecto sobre los PD.
- Realizar análisis cuantitativos de los microtúbulos en las líneas de silenciamiento por VIGS.
- Determinar el tamaño de las células epidermales de *ISE2-SUP*

BIBLIOGRAFIA

- Ahn, C. S., & Pai, H. S. (2008). Physiological function of IspE, a plastid MEP pathway gene for isoprenoid biosynthesis, in organelle biogenesis and cell morphogenesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, 66(5), 503–517. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9286-0>
- Amsbury, S., Kirk, P., & Benitez-Alfonso, Y. (2017). Emerging models on the regulation of intercellular transport by plasmodesmata-associated callose. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx337>
- Andres, R. J., Coneva, V., Frank, M. H., Tuttle, J. R., Samayoa, L. F., Han, S.-W., ... Kuraparthi, V. (2016). Modifications to a LATE MERISTEM IDENTITY1 gene are responsible for the major leaf shapes of Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613593114>
- Asakura, Y., & Barkan, A. (2007). A CRM Domain Protein Functions Dually in Group I and Group II Intron Splicing in Land Plant Chloroplasts. *The Plant Cell*, 19(December), 3864–3875. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055160>
- Asakura, Y., Galarneau, E., Watkins, K. P., Barkan, A., & van Wijk, K. J. (2012). Chloroplast RH3 DEAD Box RNA Helicases in Maize and Arabidopsis Function in Splicing of Specific Group II Introns and Affect Chloroplast. *Plant Physiology*, 159(July), 961–974. <https://doi.org/10.1104/pp.112.197525>
- Babiychuk, E., Vandepoele, K., Wissing, J., Garcia-diaz, M., Rycke, R. De, Akbari, H., ... Kushnir, S. (2011). Plastid gene expression and plant development require a plastidic protein of the mitochondrial transcription termination factor family. *PNAS*, 108(16), 6674–6679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103442108>
- Baluška, F., Šamaj, J., Hlavacka, A., Kendrick-Jones, J., & Volkmann, D. (2004). Actin-dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 463–473. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh042>
- Bar-Dror, T., Dermastia, M., Kladnik, A., Žnidarič, M. T., Novak, M. P., Meir, S., ... Lers, A. (2011). Programmed Cell Death Occurs Asymmetrically during Abscission in Tomato. *The Plant Cell*, 23(11), 4146–4163. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092494>
- Barkan, A. (1989). Tissue-Dependent Plastid RNA Splicing in Maize: Transcripts from Four Plastid Genes Are Predominantly Unspliced in Leaf Meristems and Roots. *The Plant Cell*, 1(4), 437. <https://doi.org/10.2307/3869104>
- Barkan, A. (2011). Expression of Plastid Genes : Organelle-Specific Elaborations on a Prokaryotic Scaffold 1. *Plant Physiology*, 155(April), 1520–1532. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171231>
- Barton, D. A., Cole, L., Collings, D. A., Liu, D. Y. T., Smith, P. M. C., Day, D. A., & Overall, R. L. (2011). Cell-to-cell transport via the lumen of the endoplasmic reticulum. *Plant Journal*, 66(5), 806–817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04545.x>
- Bayer, E., Thomas, C., & Maule, A. (2008). Symplastic domains in the Arabidopsis shoot apical meristem correlate with PDL1 expression patterns. *Plant Signaling & Behavior*, (May 2015), 1–4. <https://doi.org/10.4161/psb.3.10.6020>

- Benitez-alfonso, Y., Cilia, M., Roman, A. S., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S., & Jackson, D. (2009). Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *PNAS*, *106*(9), 3615–3620.
- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Pendle, A., Miyashima, S., Helariutta, Y., & Maule, A. (2013). Symplastic Intercellular Connectivity Regulates Lateral Root Patterning. *Developmental Cell*, *26*(2), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.010>
- Berry, J. O., Yerramsetty, P., Zielinski, A. M., & Mure, C. M. (2013). Photosynthetic gene expression in higher plants, 91–120. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9880-8>
- Blackman, L. M., Harper, J. D. I., & Overall, R. L. (1999). Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *European Journal of Cell Biology*, *78*(5), 297–304. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(99\)80063-6](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(99)80063-6)
- Bobik, K., & Burch-Smith, T. M. (2015). Chloroplast signaling within, between and beyond cells. *Frontiers in Plant Science*, *6*(October), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00781>
- Bobik, K., Fernandez, J. C., Hardin, S. R., Ernest, B., Ganusova, E. E., Staton, M. E., & Burch-smith, T. M. (2018). The essential chloroplast ribosomal protein uL15c interacts with the chloroplast RNA helicase ISE2 and affects intercellular trafficking through plasmodesmata. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.15427>
- Bobik, K., McCray, T. N., Ben Ernest, B., Jessica C. Fernandez, A., Howell, K. A., Lane, T., ... Tessa, B.-S. (2017). The chloroplast RNA helicase ISE2 is required for multiple chloroplast RNA processing steps in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, (1), epb. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Brecknock, S., Dibbayawan, T. P., Vesik, M., Vesik, P. A., Faulkner, C., Barton, D. A., & Overall, R. L. (2011). High resolution scanning electron microscopy of plasmodesmata. *Planta*, *234*(4), 749–758. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1440-x>
- Brunkard, J. O., & Burch-smith, T. M. (2018). Ties that bind : the integration of plastid signalling pathways in plant cell metabolism. *Essays in Biochemistry*, (October 2017), 1–13.
- Brunkard, J. O., Runkel, A. M., & Zambryski, P. C. (2015). The cytosol must flow: intercellular transport through plasmodesmata. *Current Opinion in Cell Biology*, *35*, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.03.003>
- Brunkard, J. O., & Zambryski, P. C. (2017). Plasmodesmata enable multicellularity: new insights into their evolution, biogenesis, and functions in development and immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *35*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.007>
- Bryant, N., Lloyd, J., Sweeney, C., Myouga, F., & Meinke, D. (2010). Identification of Nuclear Genes Encoding Chloroplast-Localized Proteins Required for Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *155*(4), 1678–1689. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168120>
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J., Martin, G., & Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *The Plant Journal*, 734–746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x>
- Burch-Smith, T. M., Brunkard, J. O., Choi, Y. G., & Zambryski, P. C. (2011). Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), E1451-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117226108>
- Burch-Smith, T. M., & Zambryski, P. C. (2010). Loss of INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT (ISE)1 or ISE2 increases the formation of secondary plasmodesmata. *Current Biology : CB*, 20(11), 989–993. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.064>
- Caillaud, M. C., Wirthmueller, L., Sklenar, J., Findlay, K., Piquerez, S. J. M., Jones, A. M. E., ... Faulkner, C. (2014). The plasmodesmal protein PDL1 localises to haustoria-associated membranes during downy mildew infection and regulates callose deposition. *PLoS Pathogens*, 10(10), e1004496. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004496>
- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., ... Dinesh-Kumar, S. P. (2015). Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity. *Developmental Cell*, 34(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.011>
- Carlotto, N., Wirth, S., Furman, N., Ferreyra Solari, N., Ariel, F., Crespi, M., & Kobayashi, K. (2016). The chloroplastic DEVH-box RNA helicase INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 involved in plasmodesmata regulation is required for group II intron splicing. *Plant, Cell and Environment*, 39(1), 165–173. <https://doi.org/10.1111/pce.12603>
- Chan, K. X., Phua, S. Y., Crisp, P., Mcquinn, R., & Pogson, B. J. (2016). Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annu. Rev. Plant Biol*, 67, 25–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111854>
- Chi, W., He, B., Mao, J., Li, Q., Ma, J., Ji, D., ... Zhang, L. (2012). The Function of RH22, a DEAD RNA Helicase, in the Biogenesis of the 50S Ribosomal Subunits of Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Physiology*, 158(2), 693–707. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186775>
- Christensen, N. M., Faulkner, C., & Oparka, K. (2009). Evidence for unidirectional flow through plasmodesmata. *Plant Physiology*, 150(1), 96–104. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137083>
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Crawford, K. M., & Zambryski, P. C. (2002). Non-Targeted and Targeted Protein Movement through Plasmodesmata in Leaves in Different Developmental and Physiological States. *Plant Physiology*, 125(4), 1802–1812. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1802>
- Crawford, Katrina M, & Zambryski, P. C. (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Current Biology*, 1032–1040.
- Cui, W., & Lee, J.-Y. (2016). Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nature Plants*, 2(April), 16034. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.34>
- Dashevskaya, S., Kopito, R. B., Friedman, R., Elbaum, M., & Epel, B. L. (2008). Diffusion of anionic and neutral GFP derivatives through plasmodesmata in epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*. *Protoplasma*, 234(1–4), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s00709-008-0014-7>
- Deshpande, N. N., Bao, Y., & Herrin, D. L. (1997). Evidence for light/redox-regulated splicing of psbA pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *RNA*, 3(1), 37–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990397> <http://www.pubmedcentral.nih.gov>

/articlerender.fcgi?artid=PMC1369460

- Diao, M., Ren, S., Wang, Q., Qian, L., Shen, J., Liu, Y., & Huang, S. (2018). Arabidopsis formin 2 regulates cell-to-cell trafficking by capping and stabilizing actin filaments at plasmodesmata. *ELife*, 7, 1–28. <https://doi.org/10.7554/elife.36316>
- Ehlers, K., & Kollmann, R. (2001). Primary and secondary plasmodesmata: Structure, origin, and functioning. *Protoplasma*, 216(1–2), 1–30. <https://doi.org/10.1007/BF02680127>
- Ehlers, Katrin, & van Bel, A. J. E. (2010). Dynamics of plasmodesmal connectivity in successive interfaces of the cambial zone. *Planta*, 231(2), 371–385. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1046-8>
- Estavillo, G. M., Crisp, P. A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., ... Pogson, B. J. (2011). Evidence for a SAL1-PAP Chloroplast Retrograde Pathway That Functions in Drought and High Light Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(11), 3992–4012. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091033>
- Exposito-Rodriguez, M., Laissue, P. P., Yvon-Durocher, G., Smirnoff, N., & Mullineaux, P. M. (2017). Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nat Communications*, 8(49), 4. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00074-w>
- Faulkner, C., Akman, O. E., Bell, K., Jeffree, C., & Oparka, K. (2008). Peeking into Pit Fields: A Multiple Twinning Model of Secondary Plasmodesmata Formation in Tobacco. *The Plant Cell*, 20(6), 1504–1518. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056903>
- Faulkner, Christine. (2013). Receptor-mediated signaling at plasmodesmata. *Frontiers in Plant Science*, 4(December), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00521>
- Fernandez-calvino, L., Faulkner, C., Walshaw, J., Saalbach, G., Benitez-alfonso, Y., & Maule, A. (2011). Arabidopsis Plasmodesmal Proteome. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018880>
- Franzmann, L. H., Yoon, E. S., & Meinke, D. W. (1995). Saturating the genetic map of Arabidopsis thaliana with embryonic mutations. *The Plant Journal*, 7(2), 341–350. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.7020341.x>
- Fu, S., Xu, Y., Li, C., Li, Y., Wu, J., & Zhou, X. (2018). Rice Stripe Virus Interferes with S-acylation of Remorin and Induces Its Autophagic Degradation to Facilitate Virus Infection. *Molecular Plant*, 11(2), 269–287. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.011>
- Gallagher, K. L., Sozzani, R., & Lee, C.-M. (2014). *Intercellular Protein Movement: Deciphering the Language of Development*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 30). <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-012915>
- Ganusova, E. E., Rice, J. H., Carlew, T. S., Patel, A., Perrodin-Njoku, E., Hewezi, T., & Burch-Smith, T. M. (2017). Altered Expression of a Chloroplast Protein Affects the Outcome of Virus and Nematode Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(6), 478–488. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-17-0031-R>
- Gaudioso-Pedraza, R., Beck, M., Frances, L., Kirk, P., Ripodas, C., Niebel, A., ... de Carvalho-Niebel, F. (2018). Callose-Regulated Symplastic Communication Coordinates Symbiotic Root Nodule Development. *Current Biology*, 28(22), 3562–3577.e6.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.031>

- Germain, A., Hotto, A. M., Barkan, A., & Stern, D. B. (2013). RNA processing and decay in plastids. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.1161>
- Gläßer, C., Haberer, G., Finkemeier, I., Pfannschmidt, T., Kleine, T., Leister, D., ... Mayer, K. (2014). Meta-Analysis of Retrograde Signaling in *Arabidopsis thaliana* Reveals a Core Module of Genes Embedded in Complex Cellular Signaling Networks. *Molecular Plant*, (March), 1167–1190. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu042>
- Goldberg, R. B., Paiva, G. De, & Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266, 605–614.
- Grabski, S., de Feijter, A. W., & Schindler, M. (1993). Endoplasmic Reticulum Forms a Dynamic Continuum for Lipid Diffusion between Contiguous Soybean Root Cells. *The Plant Cell*, 5(1), 25. <https://doi.org/10.2307/3869425>
- Grahl, S., Reiter, B., Gügel, I. L. L., Vamvaka, E., Gandini, C., Jahns, P., ... Rühle, T. (2016). The *Arabidopsis* Protein CGLD11 Is Required for Chloroplast ATP Synthase Accumulation. *Molecular Plant*, 9(6), 885–899. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.03.002>
- Grisson, M. S., Brocard, L., Fouillen, L., Nicolas, W., Wewer, V., Dörmann, P., ... Bayer, E. M. (2015). Specific membrane lipid composition is important for plasmodesmata function in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27(4), 1228–1250. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135731>
- Guenoune-Gelbart, D., Elbaum, M., Sagi, G., Levy, A., & Epel, B. L. (2008). Tobacco mosaic virus (TMV) Replicase and Movement Protein Function Synergistically in Facilitating TMV Spread by Lateral Diffusion in the Plasmodesmal Desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 335–345. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-3-0335>
- Guseman, J. M., Lee, J. S., Bogenschutz, N. L., Peterson, K. M., Virata, R. E., Xie, B., ... Torii, K. U. (2010). Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in *Arabidopsis* CHORUS (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8). *Development*, 174(1), 1731–1741. <https://doi.org/10.1242/dev.049197>
- Hammani, K., & Barkan, A. (2014). An mTERF domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. *Nucleic Acids Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gku112>
- Hammani, K., Takenaka, M., Miranda, R., & Barkan, A. (2016). A PPR protein in the PLS subfamily stabilizes the 5'-end of processed rpl16 mRNAs in maize chloroplasts. *Nucleic Acids Research*, 44(9), 4278–4288. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw270>
- Harries, P. A., Park, J.-W., Sasaki, N., Ballard, K. D., Maule, A. J., & Nelson, R. S. (2009). Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17594–17599. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909239106>
- Häusler, R. E., Heinrichs, L., Schmitz, J., & Flügge, U. I. (2014). How sugars might coordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities. *Molecular Plant*, 7(7), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu064>
- Heinlein, M., & Epel, B. L. (2004). Macromolecular Transport and Signaling Through

- Plasmodesmata. *International Reviews of Cytology*, 235, 93–164.
- Hsu, S., Belmonte, M. F., Harada, J. J., & Inoue, K. (2010). Indispensable Roles of Plastids in *Arabidopsis thaliana* Embryogenesis. *Current Genomics*, 338–349.
- Inaba, T., Yazu, F., Ito-Inaba, Y., Kakizaki, T., & Nakayama, K. (2011). *Retrograde Signaling Pathway from Plastid to Nucleus. International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 290). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386037-8.00002-8>
- Jacobs, J., & Kuck, U. (2011). Function of chloroplast RNA-binding proteins. *Cell Molecular Life Sciences*, 735–748. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0523-3>
- Jacques, E., Verbelen, J. P., & Vissenberg, K. (2014). Review on shape formation in epidermal pavement cells of the *Arabidopsis* leaf. *Functional Plant Biology*, 41(9), 914–921. <https://doi.org/10.1071/FP13338>
- Jarmoskaite, I., & Russell, R. (2014). RNA Helicase Proteins as Chaperones and Remodelers. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 697–725. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035546>
- Jarvis, P., & Robinson, C. (2004). Mechanisms of Protein Import and Routing in Chloroplasts. *Current Biology*, 14, 1064–1077. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.11.049>
- Jensen, P. E., & Leister, D. (2014). Chloroplast evolution , structure and functions. *F1000 Primer Reports*, 14(June), 1–14. <https://doi.org/10.12703/P6-40>
- Kim, I., Hempel, F. D., Sha, K., Pfluger, J., & Zambryski, P. C. (2002). Identification of a developmental transition in plasmodesmatal function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 129(5), 1261–1272. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874921>
- Knox, J. P., & Benitez-Alfonso, Y. (2014). Roles and regulation of plant cell walls surrounding plasmodesmata. *Current Opinion in Plant Biology*, 22, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.09.009>
- Knox, K., Wang, P., Kriechbaumer, V., Tilsner, J., Frigerio, L., Sparkes, I., ... Oparka, K. (2015). Putting the squeeze on plasmodesmata: A role for reticulons in primary plasmodesmata formation. *Plant Physiology*, 168(4), 1563–1572. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00668>
- Kobayashi, K., Otegui, M. S., Krishnakumar, S., Mindrinos, M., & Zambryski, P. (2007). INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT2 Encodes a Putative DEVH Box RNA Helicase Involved in Plasmodesmata Function during *Arabidopsis* Embryogenesis. *The Plant Cell*, 19(June), 1885–1897. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045666>
- Köhler, P., & Carr, D. J. (2006). A somewhat obscure discoverer of plasmodesmata : Eduard Tangl (1848 – 1905). *2nd ICESHS*, 12(2), 208–211.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., ... Chory, J. (2007). Signals from Chloroplasts Converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, 715(2007). <https://doi.org/10.1126/science>
- Kragler, F., Monzer, J., Shash, K., Xoconostle-Cázares, B., & Lucas, W. J. (1998). Cell-to-cell transport of proteins: Requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant Journal*, 15(3), 367–381. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00219.x>

- Kraner, M. E., Link, K., Melzer, M., Ekici, A. B., Uebe, S., Tarazona, P., ... Sonnewald, U. (2017a). Choline transporter-like1 (CHER1) is crucial for plasmodesmata maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1, 394–406. <https://doi.org/10.1111/tpj.13393>
- Kraner, M. E., Link, K., Melzer, M., Ekici, A. B., Uebe, S., Tarazona, P., ... Sonnewald, U. (2017b). Choline transporter-like1 (CHER1) is crucial for plasmodesmata maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 89(2), 394–406. <https://doi.org/10.1111/tpj.13393>
- Kraner, M. E., Muller, C., & Sonnewald, U. (2017). Comparative proteomic profiling of the choline transporter- like1 (CHER1) mutant provides insights into plasmodesmata composition of fully developed *Arabidopsis thaliana* leaves. *The Plant Journal*, 1, 696–709. <https://doi.org/10.1111/tpj.13702>
- Kriechbaumer, V., Botchway, S. W., Slade, S. E., Knox, K., Frigerio, L., Oparka, K. J., & Hawes, C. (2015). Reticulomics: Protein-protein interaction studies with two plasmodesmata-localised reticulon family proteins identify binding partners enriched at plasmodesmata, ER and the plasma membrane. *Plant Physiology*, 169(November), pp.01153.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01153>
- Kroeger, T. S., Watkins, K. P., Friso, G., van Wijk, K. J., & Barkan, A. (2009). A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4537–4542. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812503106>
- Kuroda, H., & Maliga, P. (2018). Overexpression of the clpP 5' Untranslated Region in a Chimeric Context Causes a Mutant Phenotype , Suggesting Competition for a clpP -Specific RNA Maturation Factor in. *Plant Physiology*, 1600–1606. <https://doi.org/10.1104/pp.004986>
- Lange, H., Sement, F. M., & Gagliardi, D. (2011). MTR4 , a putative RNA helicase and exosome co-factor , is required for proper rRNA biogenesis and development in *Arabidopsis thaliana*, 02. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04675.x>
- Lee, J.-Y., Wang, X., Cui, W., Sager, R., Modla, S., Czymmek, K., ... Lakshmanan, V. (2011a). A Plasmodesmata-Localized Protein Mediates Crosstalk between Cell-to-Cell Communication and Innate Immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(9), 3353–3373. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087742>
- Lee, Jung-Youn, Taoka, K., Yoo, B.-C., Ben-Nissan, G., Kim, D.-J., & Lucas, W. J. (2005). Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *The Plant Cell*, 17(10), 2817–2831. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.034330>
- Levy, A., Erlanger, M., Rosenthal, M., & Epel, B. L. (2007). A plasmodesmata-associated b -1 , 3-glucanase in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 669–682. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02986.x>
- Levy, A., Zheng, J. Y., & Lazarowitz, S. G. (2015). Synaptotagmin SYTA Forms ER-Plasma Membrane Junctions that Are Recruited to Plasmodesmata for Plant Virus Movement. *Current Biology*, 25(15), 2018–2025. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.015>
- Liarzi, O., & Epel, B. L. (2005). Development of a quantitative tool for measuring changes in the coefficient of conductivity of plasmodesmata induced by developmental, biotic, and abiotic signals. *Protoplasma*, 225(1–2), 67–76. <https://doi.org/10.1007/s00709-004-0079-x>

- Liere, K., Weihe, A., & Börner, T. (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition , function , and regulation. *Journal of Plant Physiology*, 168(12), 1345–1360. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.005>
- Linder, P., & Fuller-Pace, F. (2013). Looking back on the birth of DEAD-box RNA helicases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.03.007>
- Linder, P., & Owtrim, G. W. (2009). Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. *Trends in Plant Science*, 14(6), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.007>
- Liu, N., Lin, Z., Guan, L., Gaughan, G., & Lin, G. (2014). Antioxidant enzymes regulate reactive oxygen species during pod elongation in *pisum sativum* and *brassica chinensis*. *PLoS ONE*, 9(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087588>
- Liu, Yuelin, & Imai, R. (2018). Function of Plant DExD / H-Box RNA Helicases Associated with Ribosomal RNA Biogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 9(February), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00125>
- Liu, Yule, Schiff, M., & Marathe, R. (2002). Tobacco Rar1 , EDS1 and NPR1 / NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 30, 415–429.
- Longevialle, F. De, Hendrickson, L., Taylor, N. L., Delannoy, E., Lurin, C., & Badger, M. (2008). The pentatricopeptide repeat gene OTP51 with two LAGLIDADG motifs is required for the cis-splicing of plastid ycf3 intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 157–168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03581.x>
- Lucas, W. J., & Lee, J.-Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(9), 712–726. <https://doi.org/10.1038/nrm1470>
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., ... Wijk, K. J. Van. (2012). Nucleoid-Enriched Proteomes in Developing Plastids and Chloroplasts from Maize Leaves : A New Conceptual Framework for Nucleoid Functions 1. *Plant Physiology*, 158(January), 156–189. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188474>
- Maule, A. J., Gaudioso-Pedraza, R., & Benitez-Alfonso, Y. (2013). Callose deposition and symplastic connectivity are regulated prior to lateral root emergence. *Communicative and Integrative Biology*, 6(6). <https://doi.org/10.4161/cib.26531>
- Mccray, T. N., & Burch-smith, T. (2017). Unique Roles for ISE2 in Chloroplast RNA Metabolism and Regulation of Plasmodesmata- mediated Intercellular Trafficking. *Tesis Doctoral Universityt of Tennessee, Knoxville, EUA*.
- Melonek, J., Matros, A., Trösch, M., Mock, H.-P., & Krupinska, K. (2012). The core of chloroplast nucleoids contains architectural SWIB domain proteins. *The Plant Cell*, 24(7), 3060–3073. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099721>
- Melonek, J., Mulisch, M., Schmitz-Linneweber, C., Grabowski, E., Hensel, G., & Krupinska, K. (2010). Whirly1 in chloroplasts associates with intron containing RNAs and rarely co-localizes with nucleoids. *Planta*, 471–481. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1183-0>
- Meng, L., Wong, J. H., Feldman, L. J., Lemaux, P. G., & Buchanan, B. B. (2010). A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3900–3905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913759107>

- Michel, F., Kazuhiko, U., & Haruo, O. (1989). Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns - a review. *Gene*, 82(1), 5–30. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90026-7)
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., & Benfey, P. N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, 413(September), 307–311.
- Nawaz, G., & Kang, H. (2017). Chloroplast- or Mitochondria-Targeted DEAD-Box RNA Helicases Play Essential Roles in Organellar RNA Metabolism and Abiotic Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, 8(May), 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00871>
- Nicolas, W. J., Grison, M. S., & Bayer, E. M. (2017). Shaping intercellular channels of plasmodesmata: The structure-to-function missing link. *Journal of Experimental Botany*, 69(1), 91–103. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx225>
- Nicolas, W. J., Grison, M. S., Trépout, S., Gaston, A., Fouché, M., Cordelières, F. P., ... Bayer, E. M. (2017). Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves. *Nature Plants*, 3(7), 17082. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.82>
- Niklas, K. J., & Newman, S. A. (2013). The origins of multicellular organisms. *Evolution and Development*, 15(1), 41–52. <https://doi.org/10.1111/ede.12013>
- Nishimura, K., Ashida, H., Ogawa, T., & Yokota, A. (2010). A DEAD box protein is required for formation of a hidden break in Arabidopsis chloroplast 23S rRNA. *The Plant Journal*, 766–777. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04276.x>
- Olinares, P. D. B., Ponnala, L., & Wijk, K. J. Van. (2010). Megadalton Complexes in the Chloroplast Stroma of Arabidopsis thaliana Characterized by Size Exclusion Chromatography, Mass Spectrometry, and Hierarchical Clustering. *Journal of Proteomics*, 1594–1615. <https://doi.org/10.1074/mcp.M000038-MCP201>
- Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevink, P., Cruz, S. S., Roberts, I., Pradel, K. S., ... Epel, B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*, 97(6), 743–754. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80786-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80786-2)
- Oparka, Karl J. (2004). Getting the message across: How do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends in Plant Science*, 9(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.11.001>
- Petrillo, E., Herz, M. A. G., Fuchs, A., Reifer, D., Yanovsky, M. J., Simpson, C., ... Kornblihtt, A. R. (2014). A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing. *Science*, (April), 1–6. <https://doi.org/10.1126/science>
- Pitzalis, N., & Heinlein, M. (2018). The roles of membranes and associated cytoskeleton in plant virus replication and cell-to-cell movement. *Journal of Experimental Botany*, 69(1), 117–132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx334>
- Popper, Z. A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D. S., Willats, W. G. T., Tuohy, M. G., ... Stengel, D. B. (2011). Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 567–590. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103809>
- Pornsiriwong, W., Estavillo, G. M., Chan, K. X., Tee, E. E., Ganguly, D., Crisp, P. A., ... Pogson, B. J.

- (2017). A chloroplast retrograde signal, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphate, acts as a secondary messenger in abscisic acid signaling in stomatal closure and germination. *ELife*, 6, 1–34. <https://doi.org/10.7554/eLife.23361>
- Powikrowska, M., Oetke, S., Jensen, P. E., & Krupinska, K. (2014). Dynamic composition , shaping and organization of plastid nucleoids. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00424>
- Price, D. C., Ball, S., Meuser, J. E., Schwacke, R., Henrissat, B., Rensing, S. A., ... Gross, J. (2012). Cyanophora paradoxa Genome Elucidates Origin of Photosynthesis in Algae and Plants. *Science*, 335(February), 843–847. <https://doi.org/10.1126/science.1213561>
- Provencher, L. M., Miao, L., Sinha, N., & Lucas, W. J. (2001). Sucrose Export Defective1. *The Plant Cell*, 13(May), 1127–1141.
- Radford, J. E., & White, R. G. (1998). Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *The Plant Journal*, 14(March), 743–750.
- Radford, J. E., & White, R. G. (2011). Inhibitors of myosin, but not actin, alter transport through Tradescantia plasmodesmata. *Protoplasma*, 248(1), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0244-3>
- Ratcliff, F., Baulcombe, D. C., Lane, C., & Nr, N. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, 25, 237–245.
- Rinne, P. L. H., Kaikuranta, P. M., & Van Schoot, C. Der. (2001). The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant Journal*, 26(3), 249–264. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01022.x>
- Roberts, A., & Oparka, K. (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell and Environment*, 26(1), 103–124. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00950.x>
- Roberts, I. M., Boevink, P., Roberts, A. G., Sauer, N., Reichel, C., & Oparka, K. J. (2001). Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma*, 218(1–2), 31–44. <https://doi.org/10.1007/BF01288358>
- Roongsattham, P., Morcillo, F., Fooyontphanich, K., Jantasuriyarat, C., Tragoonrung, S., Amblard, P., ... Tranbarger, T. J. (2016). Cellular and Pectin Dynamics during Abscission Zone Development and Ripe Fruit Abscission of the Monocot Oil Palm. *Frontiers in Plant Science*, 7(April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00540>
- Ross-Elliott, T. J., Jensen, K. H., Haaning, K. S., Wager, B. M., Knoblauch, J., Howell, A. H., ... Oparka, K. J. (2017). Phloem unloading in arabidopsis roots is convective and regulated by the phloempole pericycle. *ELife*, 6, 1–31. <https://doi.org/10.7554/eLife.24125>
- Ruwe, H., Kupsch, C., Teubner, M., & Schmitz-Linneweber, C. (2011). The RNA-recognition motif in chloroplasts. *Journal of Plant Physiology*, 168(12), 1361–1371. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.012>
- Sager, R., & Lee, J. Y. (2014). Plasmodesmata in integrated cell signalling: Insights from development and environmental signals and stresses. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6337–6358. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru365>
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., & Tabata, S. (1999). Complete Structure of the

- Chloroplast Genome of *thaliana* ssc. *DNA Research*, 290, 283–290. <https://doi.org/10.1093/dnares/6.5.283>
- Schmitz-Linneweber, C., & Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science*, 13(12), 663–670. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.001>
- Schulz, A. (1995). Plasmodesmal widening accompanies the short-term increase in symplasmic phloem unloading in pea root tips under osmotic stress. *Protoplasma*, 188(1–2), 22–37. <https://doi.org/10.1007/BF01276793>
- Shapiguzov, A., Vainonen, J. P., Wrzaczek, M., & Kangasjärvi, J. (2012). ROS-talk - how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Frontiers in Plant Science*, 3(December), 292. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00292>
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., & Maule, A. J. (2009). An Arabidopsis GPI-Anchor Plasmodesmal Neck Protein with Callose Binding Activity and Potential to Regulate Cell-to-Cell Trafficking. *The Plant Cell*, 21(February), 581–594. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060145>
- Siniauskaya, M. G., Davydenko, O. G., Danilenko, N. G., Lukhanina, N. V., & Shymkevich, A. M. (2015). Expression of the chloroplast genome: modern concepts and experimental approaches. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 19(5), 511–528. <https://doi.org/10.18699/vj15.068>
- Spiegelman, Z., Lee, C.-M., & Gallagher, K. L. (2018). KinG Is a Plant-Specific Kinesin That Regulates Both Intra- and Intercellular Movement of SHORT-ROOT. *Plant Physiology*, 176(1), 392–405. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01518>
- Stahl, Y., & Simon, R. (2013). Gated communities: Apoplastic and symplastic signals converge at plasmodesmata to control cell fates. *Journal of Experimental Botany*, 64(17), 5237–5241. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert245>
- Stern, D. B., Goldschmidt-clermont, M., & Hanson, M. R. (2010). Chloroplast RNA Metabolism. *Annual Review of Plant Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112242>
- Stonebloom, S., Brunkard, J. O., Cheung, A. C., Jiang, K., Feldman, L., & Zambryski, P. (2012). Redox States of Plastids and Mitochondria Differentially Regulate Intercellular Transport via Plasmodesmata. *Plant Physiology*, 158(January), 190–199. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186130>
- Stonebloom, S., Burch-smith, T., Kim, I., Meinke, D., Mindrinos, M., & Zambryski, P. (2009). Loss of the plant DEAD-box protein ISE1 leads to defective mitochondria and increased cell-to-cell transport via plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40).
- Storme, N. De, & Geelen, D. (2014). Callose homeostasis at plasmodesmata : molecular regulators and developmental relevance. *Frontiers in Plant Science*, 5(April), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00138>
- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., ... Yuan, M. (2010). Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco. *The Plant Cell*, 22(4), 1373–1387. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064212>

- Sun, Y., Huang, D., & Chen, X. (2019). Dynamic regulation of plasmodesmatal permeability and its application to horticultural research. *Horticulture Research*, 6(1), 47. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0129-3>
- Susek, R. E., Ausubel, F. M., & Chory, J. (1993). Signal transduction mutants of arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*, 74(5), 787–799. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90459-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90459-4)
- Thomas, C. L., Bayer, E. M., Ritzenthaler, C., Fernandez-Calvino, L., & Maule, A. J. (2008). Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biology*, 6(1), e7. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060007>
- Tiller, N., & Bock, R. (2014). The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Molecular Plant*, 7(7), 1105–1120. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu022>
- Tillich, M., Beick, S., & Schmitz-linneweber, C. (2010). Chloroplast RNA-binding proteins. *RNA Biology*, 7(2), 172–178.
- Tilsner, J., Nicolas, W., Rosado, A., & Bayer, E. M. (2016). Staying Tight: Plasmodesmal Membrane Contact Sites and the Control of Cell-to-Cell Connectivity in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67(February), 1–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111840>
- Valkov, V. T., Scotti, N., Kahlau, S., MacLean, D., Grillo, S., Gray, J. C., ... Cardi, T. (2009). Genome-Wide Analysis of Plastid Gene Expression in Potato Leaf Chloroplasts and Tuber Amyloplasts: Transcriptional and Posttranscriptional Control. *Plant Physiology*, 150(4), 2030–2044. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140483>
- Van Bel, A. J. E., Ehlers, K., & Knoblauch, M. (2002). Sieve elements caught in the act. *Trends in Plant Science*, 7(3), 126–132. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02225-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02225-7)
- van Wijk, K. J. (2015). Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. *Annual Review of Plant Biology*, 66(December 2014), 75–111. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115547>
- Vaten, A., Dettmer, J., Wu, S., Stierhof, Y. D., Miyashima, S., Yadav, S. R., ... Helariutta, Y. (2011). Callose Biosynthesis Regulates Symplastic Trafficking during Root Development. *Developmental Cell*, 21(6), 1144–1155. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.006>
- Wang, X., & Lee, J. Y. (2017). TOWARDS UNDERSTANDING OF PLASMODESMAL ASSOCIATION AND REGULATION USING PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 5 AS A MODEL. *Tesis Doctoral University of Delaware, Delaware, EUA*.
- Wang, X., Sager, R., Cui, W., Zhang, C., Lu, H., & Lee, J.-Y. (2013). Salicylic Acid Regulates Plasmodesmata Closure during Innate Immune Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(6), 2315–2329. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110676>
- White, R G, Badelt, K., Overall, R. L., & Vesik, M. (1994). Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma*, 2, 169–184.
- White, Rosemary G., & Barton, D. A. (2011). The cytoskeleton in plasmodesmata: A role in intercellular transport? *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5249–5266. <https://doi.org/10.1093/jxb/err227>
- Winter, N., Kollwig, G., Zhang, S., & Kragler, F. (2007). MPB2C, a microtubule-associated protein, regulates non-cell-autonomy of the homeodomain protein KNOTTED1. *The Plant Cell*,

- 19(10), 3001–3018. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.044354>
- Woodson, J. D., & Chory, J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature Reviews Genetics*, 9(5), 383–395. <https://doi.org/10.1038/nrg2348>
- Wu, G., Meyer, E. H., Richter, A. S., Schuster, M., Ling, Q., Schöttler, M. A., ... Bock, R. (2019). Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress. *Nature Plants*. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0415-y>
- Xiao, Y., Savchenko, T., Baidoo, E. E. K., Chehab, W. E., Hayden, D. M., Tolstikov, V., ... Dehesh, K. (2012). Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*, 149(7), 1525–1535. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.038>
- Xu, X. M., Wang, J., Xuan, Z., Goldshmidt, A., Borrill, P. G. M., Hariharan, N., ... Jackson, D. (2011). Chaperonins facilitate KNOTTED1 cell-to-cell trafficking and stem cell function. *Science*, 333(6046), 1141–1144. <https://doi.org/10.1126/science.1205727>
- Zavaliev, R., Dong, X., & Epel, B. L. (2016). Glycosylphosphatidylinositol (GPI) modification serves as a primary plasmodesmal targeting signal. *Plant Physiology*, 172(October), pp.01026.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01026>
- Zhao, X., Huang, J., & Chory, J. (2019). GUN1 interacts with MORF2 to regulate plastid RNA editing during retrograde signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820426116>
- Zybailov, B., Friso, G., Kim, J., Rudella, A., Asakura, Y., Sun, Q., & Wijk, K. J. Van. (2009). Large Scale Comparative Proteomics of a Chloroplast Clp Protease Mutant Reveals Folding Stress , Altered Protein Homeostasis , and Feedback Regulation of Metabolism. *Molecular and Cellular Proteomics*, 1789–1810. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900104-MCP200>

APÉNDICE A. OLIGONUCLEÓTIDOS

ISE2 Fw (HelC)	TGTTTCCACGGTGGCTAAAG	RT-PCR <i>ISE2</i>
ISE2 Rv (HelD)	TGAACCTCCTTTGGACAATAAA	RT-PCR <i>ISE2</i>
Act2 Fw	TCTCCTTGACGCCAGTGGT	RT-PCR actina
Act2 Rv	CAGTAAGGTCACGTCCAGCA	RT-PCR actina
ycf3 Fw	TTCGGGCATTAGAACGAAAC	RT-PCR
ycf3 Rv	TCCAATACTCAGCGGCTTG	RT-PCR
ycf3 RT	CGTGATCGTCAACCAATTC	Síntesis ADNc específicos
ycf3 Fw bis	GGAAGCATTACAGAATTATTATGAAGC	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
ycf3 Rv bis	TAAAAAGGGGTTTCGTTCTAATGCC	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
ycf3 Int1 Fw	ATGGTTCCCGTATTACAGATCAATCC	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
ycf3 Int1 Rv	CAT TTT AAT TAG TCC CAA TCC CAA CG	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
atpF Fw (atpFWD)	CCGATTCTTTCTGTTTACTTGGGTCA	RT-PCR - Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
atpF Rv (atpREV)	GTTATTTCTTTTCATCGTACCAAACATCC	RT-PCR
atpF RT (atpTS)	TTAATCAGTTATTTCTTTTCATCG	Síntesis ADNc específicos
atpF Rv bis	TCCAAAAAGATCAATACACCGAAAAAC	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
atpf Int Fw	AATAGGCTGGATTCACCCAGTGG	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
atpf Int Rv	CGG ACT TAC CAA AGA ATA ACG AAA GG	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
clpP Fw (clpPGATE5P)	ATGCCTATTGGCGTTCCAAAAGT	RT-PCR
clpP Rv (clpPGATE3P)	TTATTGAACCGCTACAAGATCAACAAT	RT-PCR
clpP RT	TTATTGAACCGCTACAAGATCAA	Síntesis ADNc específicos
clpP Fw bis	TTTAGGCCAAGAGGTTGATACCG	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
clpP Rv bis	ATAGCCATTCCAGATATTACCCATC	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
clpP1 Int1 Fw	ACGCGGTATTTGGTTTCATTTGTCC	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
clpP1 Int1 Rv	GGT TTT TTC TTG TTC CTG AAC GG	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
rpl2 Fw (RPLFWD)	ACAAAACCTTCTACCCCGAGCACA	RT-PCR - Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
rpl2 Rv (RPLREV)	CTACGGCGACGAAGAATCAAAGTCT	RT-PCR
rpl2 RT (RPLTS)	CTATTTACTACGGCGACGAA	Síntesis ADNc específicos
rpl2 Rv bis	TCTATGCCTTGCGGTAATTATTCC	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón

rpl2 Int Fw	GGATAGACCTCAACAGAAAAGTGAAG	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
rpl2 Int Rv	TATG GTT CTG TCG GTG CTT GAA AC	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
rps12 Fw (RPSFWD1)	ATGCCAACCATTAACAACCTTATTAGAAA	RT-PCR
rps12 Rv (RPSREV)	GGGCTCAAATCTTTTATTTTGGCTTTTT	RT-PCR
rps12 Fw bis	AGTTGCCAGAGTACGATTAACCTC	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
rps12 Rv bis	CATCTAGGGTTCCTCGAACAATG	Sonda exón NB - qPCR RIP y qPCR intrón/exón
rps12 Int2 Fw	ATTTGATGATGCCATGTGAATCGC	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
rps12 Int2 Rv	CTT TTG TCT CGT GGT AGC CTG C	Sonda intrón NB - y qPCR intrón/exón
ChP rbcL Fw bis	TATTTGCCAGAGAATTGGGAGTTC	qPCR RIP
ChP rbcL Rv	GTGAAGAAGTAGGCCATTATCTCG	qPCR RIP
ChP ycf5 Fw	GGTTAATG ATGCACGTAA GTATGATG	qPCR RIP
ChP ycf5 Rv bis	GGTCCGACTTTGCGAAATGTAATC	qPCR RIP
ChP psbK Fw	CCT TTT TTC AAG CAC TTT TTT AGT CG	qPCR RIP
ChP psbK Rv	TTA TCG AAA ACT TAC AGC GGC TTG	qPCR RIP
ChP tic214 (ycf1.2) Fw	TTA GCC AGA TTA GTC AAC ATT TAT ATG	qPCR RIP
ChP tic214 (ycf1.2) Rv bis	TTG CTG TAT CCA GAC TAA TAC CAA TC	qPCR RIP
ChP ndhC Fw	ATC AAG TGC TAT TCC TGT TTT GGC	qPCR RIP
ChP ndhC Rv bis	ATA ACG GAT TCT AAA TTG TAA CCA AGC	qPCR RIP
PDL5 Fw	CCGCTACGCCAACTTCACAG	RT-PCR
PDL5 NC Rv	ATCTGCAAGAACCCGGAGTACG	RT-PCR
CalS1_qRT_Pf	TGTACACATGTAAATGGCGTATGTG	RT-PCR
CalS1_qRT_Pr	GGACGCGAACTTATGGAAATG	RT-PCR
CalS8 RTPf	GTCAAGGCAGTAGACCTAGGA	RT-PCR
CalS8 RTPr	CATAAGCTCGTTCCTTCTATC	RT-PCR
CalS10_qRT_Pf	GGAAACAGTCCGTGAGTTTGG	RT-PCR
CalS10_qRT_Pr	AAGAGGAGCCGAGACTGGAAC	RT-PCR
AsPDLP6_F1 spl	CTAGAGCCAACGGCTATGGTG	RT-PCR y qPCR Splicing alternativo
AsPDLP6_R1 spl	TACCTCTCTCGCACGATTTTGC	RT-PCR y qPCR Splicing alternativo
AsPDLP6_F2 IR	TCTCCATCTTCTTTGCATAGAATTTAC	RT-PCR y qPCR Splicing alternativo
AsPDLP6_R2 IR	GCAAGTGTTTTCTCTATCTCATCG	RT-PCR y qPCR Splicing alternativo
AsPDLP6_F3 ex3	AAATGCGTAAAGGAGAAAGAAAAGC	RT-PCR y qPCR Splicing alternativo
AsPDLP6_R3 ex3	TACGATCACAAATCTAAACGGCG	RT-PCR y qPCR Splicing alternativo

PDL7 Sp Fw	GACGTTGCGGATCATCATAGGAC	RT-PCR Splicing alternativo
PDL7 Sp Rv	CCTTTGAGATCCACGTTCTTGCG	RT-PCR Splicing alternativo
PDL7 IR Fw	TTCTTTTCCTCAGAGGCGTTTGC	RT-PCR Splicing alternativo
PDL7 IR Rv	GAGACCATGCATGTAAGAAACATTTTGG	RT-PCR Splicing alternativo
PDL7 Ex Fw	AATGTCAAAGTTCTGAAGAATCGCAAG	RT-PCR Splicing alternativo
PDL7 Ex Rv	AGAAATAACGTTGACAGAATCCAAAGC	RT-PCR Splicing alternativo
ISE2 VIGS Nb Fw	CACC CTGGGGGAAGGTTGATACTTTGA	Clonado VIGS
ISE2 VIGS Nb Rv	CGA GAG ACC TTA TTC CTT TGG C	Clonado VIGS
RH3 VIGS SI Fw	CACCA AGA TTA CCA AGT TAC CTG C	Clonado VIGS
RH3 VIGS SI Rv	TTG AAA CAT GCA CCA CCA AAG C	Clonado VIGS
Clpr2 VIGS SI Fw bis	CACCTCTTCCAACATCTTCTTCCTCG	Clonado VIGS
Clpr2 VIGS SI Rv bis	GTC AAC TGG ATT TCT ATA GGG C	Clonado VIGS
CFM2 VIGS SI Fw	CACC AGT CTA TTG TAG CAA GTC C	Clonado VIGS
CFM2 VIGS SI Rv	TTC TGG TAG ACA TCC CTT CGG	Clonado VIGS
Otp51 VIGS SI Fw	CACCCATCTACAATCGCATGGTGC	Clonado VIGS
Otp51 VIGS SI Rv bis	GCT TCC TCC ACA TTT CCA TCC	Clonado VIGS
Why1 VIGS SI Fw	CACCGTCTGTCTTCTCTTTCTGC	Clonado VIGS
Why1 VIGS SI Rv	CAA AAA CCT TAG GCG TAG ATG C	Clonado VIGS
TRV CP Fw	CGGGCTAACAGTGCTCTTG	Chequeo VIGS
TRV CP Rv	CTCCCTTGGTTCGTCGTAAC	Chequeo VIGS
ISE2 Nb-RT Fw	GTCTCAAGCATACAATGATGCAGTAG	Chequeo VIGS
ISE2 Nb-RT Fw bis	GAAAAGGATAGCTCGTACAGAGGG	Chequeo VIGS
ISE2 Nb-RT Rv	CGCCGAATCTTCTCCTGAGTG	Chequeo VIGS
Clpr2 Nb-RT Fw	GCAACACGTGCACAAGTTACCATG	Chequeo VIGS
Clpr2 Nb-RT Rv	TCCAATGAAAATAACACGTTGCGGG	Chequeo VIGS
CFM2 Nb-RT Fw	TCAACCTCCTCCTGTAAAACCTCAAC	Chequeo VIGS
CFM2 Nb-RT Rv	CAACAGCAAGCACTGGTTGCTTC	Chequeo VIGS
RH3 Nb-RT Fw	TTCAGGGGGCCATCTTTGATCTTC	Chequeo VIGS
RH3 Nb-RT Rv	TCCCTGCTTGAAAACCTCCCATAG	Chequeo VIGS
RH3 Nb-RT Rv bis	GGCCCATCATCTTGTAAGCAGG	Chequeo VIGS
Otp51 Nb-RT Fw	CGGTCTAGAGGAATTGAAGAGAGC	Chequeo VIGS
Otp51 Nb-RT Rv	CTTCCATACGATAGACAAAAGCTTGAG	Chequeo VIGS
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Chequeo SALK <i>clpr2-2</i>

LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Chequeo SALK <i>clpr2-2</i>
rpl2_F3 unspl	AGCTTGTACAGTTTGGGAAGGGG	Splicing alternativo qPCR
rpl2_R3 unspl	GCTGCTCTAGCTAATTGTCCAC	Splicing alternativo qPCR
rpl2_F4 spl	GGAAATGCCCTACCTTTGACCG	Splicing alternativo qPCR
rpl2_R4 spl	GGCCGATTTCCCCTCTTTTGC	Splicing alternativo qPCR
rpl2_F5 ex2	CGGACAAGTGGGAAATGTTGGG	Splicing alternativo qPCR
rpl2_R5 ex2	AATTGGAGCCCTCCCTTCACC	Splicing alternativo qPCR

APÉNDICE B. APÉNDICE ESTADÍSTICO

Todos los experimentos en los cuales se realizaron análisis estadísticos se procedió con el siguiente criterio. Para muestras menores a 30 réplicas, se testeó normalidad con las pruebas de Shapiro Wilk, D'Agostino Pearson o Kolmogorov Smirnov. Si las subpoblaciones no rechazaban la hipótesis nula de normalidad o eran mayores a 30 réplicas (con lo cual se puede utilizar el teorema central del límite), se realizaron análisis paramétricos: test t de Student para comparar dos subpoblaciones, o ANOVA para comparar tres o más subpoblaciones. Para el caso de ANOVA, se chequeó también la normalidad de los residuos (método gráfico y analítico) y la homocedácea (homogeneidad de varianzas; método gráfico y analítico). Si no se rechazaban las hipótesis nulas de normalidad de residuos y homogeneidad de varianzas, en caso de detectar diferencias significativas con ANOVA, se procedió con un método de contrastes de Tukey. En los casos donde se usaron pruebas paramétricas, se graficó la media y desvío estándar de las subpoblaciones con histograma de barras.

Si las subpoblaciones eran menores a 30 réplicas y en las pruebas de normalidad se rechazaba la hipótesis nula de normalidad, se procedió con pruebas no paramétricas: las equivalentes al test t de Student fueron la prueba de Kolmogorov Smirnov para variables continuas, y la prueba de Mann Whitney para variables discretas ordinales; la prueba no paramétrica equivalente a ANOVA fue la prueba de Kruskal Wallis, más el método de contrastes de Dunn. En los casos donde se usaron pruebas no paramétricas, se realizaron gráficos de cajas y bigotes.

SCRIPTS PARA R

#Antes de empezar, cargar los paquetes agricolae, dunn.test, FSA, gplots, nortest, plyr, coin.

#Carga archivo

MI_ARCHIVO <- c("ARCHIVO.csv")

BASE <- read.csv(file=MI_ARCHIVO, sep="," , dec=".", header=TRUE)

#Si solo me interesan algunas columnas de la base original

BASE_a <- subset(BASE, select=c(NombreCol1,NombreCol2))

#Si solo me interesan algunas filas de la base original, de acuerdo a algun trat por ejemplo

BASE_b <- subset(BASE, Trat == "NombreTrat")

#Si tengo varias observaciones para cada replica de cada tratamiento y quiero hacer algún cálculo para cada réplica a partir de esas observaciones. Por ejemplo si tengo las líneas WT y ISE2-V, de cada una tengo 3 plantas, tomé varias imágenes de cada planta y en cada una encontré muchos PD a los cuales calculé la media de intensidad de calosa o la calosa total.

####Entonces, por ejemplo, puedo hacer una nueva BASE1 donde para cada línea, para cada planta, calculo la media (con FUN=mean) de la intensidad media de calosa de todos los PD de todas las imágenes de cada planta.

BASE1 <- aggregate(BASE\$CalosaIntMedia ~ BASE\$Planta + BASE\$Linea, data=BASE,FUN=mean)

####También puedo calcular el número de PD totales que encontré con FUN=length

#####Por ejemplo, el número de PD que encontré en cada imagen

BASE1 <- aggregate(BASE\$CalosaIntMedia ~ BASE\$Planta + BASE\$Linea + BASE\$Imagen, data=BASE,FUN=length)

#Asigno variable y factor

FACTOR <- BASE1[,#ColFactor]

VR <- BASE1[,#ColVariable]

#OPCIONAL: transformo la variable

VR_T <- log10(VR)

#histograma de frecuencias y boxplot de la VR

hist(VR)

boxplot(VR~FACTOR)

#Prueba para la igualdad de dos Varianzas poblacionales

**var.test(VR ~ FACTOR, ratio = 1, alternative
= c("two.sided"), conf.level = 0.95)**

#Prueba de Normalidad de Shapiro Wilks

shapiro.test(VR)

shapiro.test(VR ~ FACTOR)

Prueba de hipótesis para la media poblacional, con σ^2 desconocida

Si quiero comparar la media de una población con una media teórica (ej 7,35)

**t.test (VR, y=NULL, mu = 7.35, paired = FALSE, var.equal =FALSE,
conf.level = 0.95)**

si quiero saber si la media es menor a 7,35

```

t.test (VR, y=NULL, mu = 7.35, alternative = "less", paired = FALSE, var.equal =FALSE,
conf.level = 0.95)
#### si quiero saber si la media es mayor a 7,35
t.test (VR, y=NULL, mu = 7.35, alternative = "greater", paired = FALSE, var.equal =FALSE,
conf.level = 0.95)

# Pruebas para la igualdad entre dos medias poblacionales
# para dos muestras independientes, y desconocidas
#### la hipotesis nula es que  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  , es decir, que son iguales
#### si se rechaza, es que son distintas
#### aca FACTOR tiene 2 niveles nada mas
t.test(VR ~ FACTOR, alternative =
"two.sided", mu = 0, paired = FALSE, var.equal = TRUE, conf.level = 0.95)

# Pruebas para la igualdad entre dos medias poblacionales
# para dos muestras dependientes (o apareadas)
t.test (VR, FACTOR, alternative =
"two.sided", mu = 0, paired = TRUE, var.equal = TRUE, conf.level = 0.95)

# Prueba para dos muestras independientes de Wilcoxon o Mann Whitney
#### esta es la alternativa a la prueba de diferencia de medias cuando
#### no se cumplen los supuestos para la anterior, como por ejemplo, normalidad
wilcox_test(VR ~ FACTOR, distribution = "exact", conf.int = TRUE)

# Prueba de dos muestras dependientes de Wilcoxon.
#### para muestras pareadas
wilcox.test(VR1, VR2, paired = TRUE, alternative = "two.sided")

#ANOVA
ANOVA <- aov(VR ~ FACTOR)
TAB_ANOVA <- summary(ANOVA)
TAB_ANOVA
RESIDUOS <- ANOVA$residuals
####testeo normalidad de los residuos
##### Método gráfico QQ-Plot
qqnorm(RESIDUOS); qqline(RESIDUOS)
##### Método analítico: Test Shapiro (o Lilliefors para muestras muy grandes)
shapiro.test(RESIDUOS)
lillie.test(RESIDUOS)
####testeo homogeneidad de varianzas de los residuos
##### Método analítico: Bartlett
bartlett.test(ANOVA$residual ~ FACTOR)
##### Método gráfico: Gráfico residuos vs predichos
plot(ANOVA$fitted.values, RESIDUOS, xlab="predichos", ylab="residuos", abline(h = 0, col =
"orange"))
####si los datos tienen homocedacea y los residuos ajustan a normal
##### ---ANOVA no significativo -> no hay diferencias en las medias
##### ---ANOVA SIGNIFICATIVO -> Test de comparaciones multiples -> TUKEY
TUKEY <- HSD.test(ANOVA, "FACTOR")
TUKEY

```

```
plotmeans(VR ~ FACTOR)
```

```
####si los datos NO homocedacea y/o residuos NO ajustan a normal
```

```
#TEST DE KRUSKALL WALLIS (No paramétrico)
```

```
TAB_KW <- kruskal(VR, FACTOR)
```

```
TAB_KW
```

```
DUNN <- dunnTest(VR ~ FACTOR, data=BASE1)
```

```
DUNN
```

```
#Para sacar filas de outliers
```

```
BASE1 <- BASE1[-c(#fila01,#fila 02,#fila03),]
```

```
#Para guardar una base de datos como un archivo .csv
```

```
write.csv(BASE1, file="BASE1.csv")
```

```
#Para seleccionar solo una columna de una base de datos
```

```
COL <- c(BASE1[,#col])
```

```
#Para eliminar OUTLIERS por la regla de 1.5IQR
```

```
Q3 <- quantile(VR, 0.75)
```

```
Q1 <- quantile(VR, 0.25)
```

```
IQR <- Q3 - Q1
```

```
max_Valor <- Q3 + 1.5*IQR
```

```
min_Valor <- Q1 - 1.5*IQR
```

```
BASEOutliers <- subset(BASE1, VR>min_Valor & VR<max_Valor)
```

```
# Para eliminar valores nulos
```

```
MINIBASE <- na.omit(MINIBASE)
```


Datos Figura 2.1

	WT			ISE2-OE			ISE2-SUP			PDLP5OX		
	1067	649.103	753.1585	997.9775	278.87	676.984	503.216	934.6575	503.6025	540.47	221.384	440.71
	734.038	660.444	668.5645	1003.25	523.3645	704.7605	686.9255	724.5775	608.6775	760.183	350.521	327.5595
	630.519	670.3565	588.6885	914.586	517.9115	798.1345	686.9005	891.4845	762.957	841.851	256.173	410.2655
	679.5935	628.356	685.4035	824.6145	549.53	994.561	718.815	923.5885	821.4415	729.364	513.872	
	934.7695	855.732	732.0035	908.8645	615.6025	636.264	914.8575	858.005	790.1815	974.5805	566.2545	
	999.3375	585.236	750.236	1028.899	637.162	460.475	881.1685	948.817	842.6775	722.831	311.193	
	880.104	516.599	644.381	975.9005	461.1595	519.225	889.0805	937.006	901.1945	540.7455	510.2965	
	1075.346	584.029	626.8315	1138.397	813.899	545.7525	873.6675	853.2525	821.569	493.6	264.496	
	995.2295	774.005	620.713	851.2875	733.729	769.9645	762.028	1007.586	835.135	554.355	671.2085	
	567.0715	579.9765	574.5015	704.578	616.151	473.3975	1080.601	964.5515	773.6295	952.9255	545.3555	
	837.882	608.145	803.7995	881.324	664.701	591.5025	764.2895	507.3135	725.9065	626.3015	746.13	
	726.988	758.1495	543.5255	771.8505	880.7265	773.1985	807.704	678.799	647.1475	593.9585	446.988	
	812.076	569.3295	909.7095	559.8275	576.961	559.4625	747.894	497.525	856.7255		491.339	
	863.6055	370.246	1083.196	700.014	605.496	944.5745	819.709	350.0735	766.5925		340.599	
	911.1595	537.135	418.252	553.6455	877.288	758.762	1380.824	512.034	679.0175		342.562	
	927.1745	756.16	719.1065	605.7095	710.112	823.362	1133.264	351.8035	488.5805		242.259	
	652.9905	646.779	517.8635	796.0965	833.616	963.961		629.328	614.1905		398.128	
	434.7935	1005.682	668.399	644.9355	765.733	604.97		499.6825	799.1275		261.318	
	682.814	815.5515	525.766	703.092	723.2915	602.5065		731.237	938.5475		422.497	
	291.3215	937.8265	693.223	917.4475	1001.691	800.939		347.1735	729.1845		226.71	
	712.602	635.013	836.861	684.49	721.5065	977.924		287.0995	882.4575		437.551	
	455.6445	684.546	765.1825	470.975	805.9965	902.6645		323.896	954.9895		862.308	
	989.191	702.364	846.356	860.3635	589.7175	1060.557		381.1685	636.6865		803.783	
	483.3345	935.6015	1021.036	687.0125	633.146	778.2705		732.7475	676.1675		571.2965	
	887.446	831.5025	991.935	659.1175	774.5915	845.5885		684.049	745.209		737.9625	
	702.846	945.4535	1179.344	810.104	693.061	772.0365		649.8525	694.0115		590.544	
	646.2825	960.822	1037.246	976.1205	751.3205	755.382		384.8975	877.0985		261.2515	
	499.431	571.9515	932.7735	883.983	558.1895	819.6035		332.3755	685.8985		324.534	
	863.744	726.1535		764.896	858.7225	1079.066		307.627	920.3055		592.788	
Media	739.3562733			764.0524223			693.4611929			452.8074219		
DE	182.8949754			177.0983393			194.5239828			177.6653921		
n	86			103			70			32		
Cada celda corresponde a un halo de propagación de CFDA. Se agruparon los datos de 5 experimentos independientes												

Datos Figura 2.3

	WT		WT daño	ISE2-OE		ISE2-OE daño	ISE2-SUP	ISE2-SUP daño	
	753.1585	765.1825		580.921	796.0965	616.151	327.219	934.6575	515.212
	668.5645	846.356		458.6045	644.9355	664.701	441.587	724.5775	526.32
	588.6885	1021.036		736.314	703.092	880.7265	717.123	891.4845	616.8515
	685.4035	991.935		870.5205	917.4475	576.961	774.4835	923.5885	765.8785
	732.0035	1179.344		817.299	684.49	605.496	767.0005	858.005	424.0285
	750.236	1037.246		722.474	470.975	877.288	924.838	948.817	676.315
	644.381	932.7735		572.399	860.3635	710.112	711.2245	937.006	519.8795
	626.8315	863.744		884.025	687.0125	833.616	670.1175	853.2525	904.221
	620.713	726.1535		621.1625	659.1175	765.733	740.5325	1007.586	663.5575
	574.5015	649.103		593.099	810.104	723.2915	898.8445	964.5515	634.936
	803.7995	660.444		689.137	976.1205	1001.691	637.466	507.3135	965.2045
	543.5255	670.3565		764.3315	883.983	721.5065	990.845	540.47	530.755
	909.7095	628.356		570.988	676.984	805.9965	994.992	760.183	745.9135
	1083.196	855.732		626.5305	704.7605	589.7175	915.812	841.851	385.6585
	418.252			613.2305	798.1345	633.146	296.127	729.364	793.295
	719.1065			642.5505	994.561	774.5915		974.5805	656.3235
	517.8635			799.677	636.264	693.061		722.831	345.171
	668.399			648.1545	460.475	751.3205		503.6025	327.332
	525.766			540.2915	519.225	558.1895		608.6775	835.419
	693.223			707.787	545.7525	503.216		762.957	656.1905
	836.861			597.507	769.9645	686.9255		821.4415	508.313
	370.246			702.54	278.87	686.9005		790.1815	
	774.005			601.4315	523.3645	718.815		842.6775	
	579.9765			575.29	517.9115	914.8575		901.1945	
	608.145			452.143	549.53	881.1685		821.569	
	758.1495			529.506	615.6025	889.0805		835.135	
	569.3295			536.286	637.162	873.6675		773.6295	
	516.599			456.775	461.1595	762.028		725.9065	
	584.029			735.981	813.899	1080.601		647.1475	
	585.236			631.729	733.729	764.2895		856.7255	
					1133.264	807.704		766.5925	
					1079.066	747.894		679.0175	
					858.7225	819.709		488.5805	
					764.896	1380.824		614.1905	
					845.5885	755.382		799.1275	
					772.0365				
Media	716.77		642.62	744.24		720.55	781.67	618.89	
DE	175.11		114.42	176.29		221.63	140.48	176.94	
n	44		30	71		15	35	21	
Cada celda corresponde a un halo de propagación de CFDA. Se agruparon los datos de 3 experimentos independientes									

Datos Figura 2.9

	Focos mov / focos totales							
	GFP 1X				GFP2X			
	GUS-V	ISE2-V	RH3-V	CLPR2-V	GUS-V	ISE2-V	RH3-V	CLPR2-V
	0.6727273	0.5384616	0.7647059	0.7222222	0.25	0.2105263	0.25	0.2105263
	0.7647059	0.6551724	0.875	0.7647059	0.3023256	0.3333333	0.3181818	0.2307692
	0.5473684	0.7162162	0.7327189		0.1666667	0.3333333	0.25	0.3333333
	0.6266667	0.7710844			0.21875	0.625	0.5494506	0.6666667
	0.63	0.6702127			0.1803279	0.5555556	0.5952381	0.7042254
	0.9861111	0.5338983			0.2753623	0.5747126	0.5263158	0.375
	1	0.675			0.2608696	0.5882353	0.515625	0.8333333
	0.7619048	0.5660377			0.3902439	0.877193	0.6666667	0.5227273
	0.8539326	0.9733334			0.375	0.5434783	0.4680851	0.6956522
	0.8539326	0.987013			0.4725275	0.6097561	0.7666667	0.6666667
		0.7428572			0.40625	0.6329114	0.6	0.6333333
		0.7264438			0.3103448	0.7352941	0.7666667	0.5666667
		0.7162162			0.4666667	0.4		
					0.6333333	0.6666667		
					0.7	0.8666667		
n	10	13	3	2	15	15	12	12
Cada celda indica una réplica (planta) en la cual se contaron más de 50 focos de expresión de GFP, que se clasificaron como mov o no mov y luego se calculó la relación entre focos con movilidad de GFP y focos totales. Las réplicas surgen de 2 o 3 experimentos distintos. Se agruparon las réplicas de todos los experimentos								

Datos Figura 2.12

	ensayo 1				ensayo 2				ensayo 3				ensayo 4				ensayo 5			
	GUS	ISE2			GUS	ISE2			GUS	ISE2			GUS	ISE2			GUS	ISE2		
	599.344	817.635	605.089	538.069	691.256	259.882	371.555		210.938	269.532	430.149	511.491	267.464	191.637	240.58	146.83	420.498	228.861		
	677.852	603.174	725.723	721.894	616.578	716.149	386.72	379.827	315.029	392.925	204.045	317.097	120.635	147.519	548.026	388.789	231.619			
	647.215	1118.265	593.599	622.322	356.16	479.782	176.471	281.251	305.378	168.889	216.453	222.657	170.267	220.589	260.571	332.952	206.802			
	547.643	922.951	1062.735	551.473	503.602	184.054	312.961	157.859	388.099	288.145	237.823	166.821	245.406	248.163	167.51	355.7	143.383			
	492.113	603.174	492.113	428.923	472.965	735.297	250.92	165.442	470.131	247.474	437.042	161.306	132.354	200.598	127.528	340.535	120.635			
	637.641	674.023	1104.861	517.006	513.176	235.065	315.718	175.782	252.988	288.145	282.63	208.87	117.877	150.966	139.936	295.727	116.499			
	698.916	792.743	578.281	335.096	335.096	472.888	269.532	157.17	194.394	337.777	169.578	156.48	314.34	278.494	197.152	345.36	143.383			
	886.57	626.152	901.888	411.69	425.094	383.963	250.92	255.056	198.53	370.866	632.815	181.297	297.106	316.408	212.317	240.58	155.102			
	836.784	457.646	1104.861	532.325	660.619	565.26	373.623	260.571	270.911	192.326	421.877	272.29	315.718	427.607	175.782	214.385	192.326			
	809.976	612.748	806.146	296.8	469.135	350.185	401.197	288.145	261.26	121.324	433.596	341.224	187.501	183.365	197.152	294.349	217.832			
	811.891	522.751	679.767	369.564	394.456	612.748	237.133	229.551	238.512	403.265	511.491	179.918	253.678	826.52	190.258	153.034	148.898			
	622.322	449.987	649.13	532.325	576.366	410.847	361.215	258.503	325.369	394.303	293.659	161.995	301.932	170.957	188.19	204.045	355.011			
	886.57	878.91	767.85	317.863	765.935	775.509	570.621	539.065	215.074	292.97	569.396	164.063	322.612	352.253	159.238	287.455	315.029			
	850.186	921.037	957.419	599.344	291.055	622.475	358.457	352.943	188.19	662.457	206.113	330.194	508.045		198.53	212.317				
	907.633	1286.77	938.27	532.325	409.775		174.403	465.305	297.795	308.625	315.718	161.995	158.949		255.056	299.174				
	911.462	737.212	710.405	444.242	472.965		437.732	387.41	257.814	187.501	407.401	243.337	191.637		128.907	287.455				
	919.122	373.393	1041.671	568.707	461.476		210.938	859.762	245.406	253.678	186.122	197.152	210.938		261.26					
	861.677			578.281	536.154		288.145	407.401	326.058	338.467	238.512	173.714	273.669		204.734					
				425.094			497.015	208.181	191.637	276.426	481.16	368.108	241.959							
							453.587	293.659	308.625		228.172	158.549	181.297							
							202.666	375.691	397.75		203.356	188.19	226.104							
							158.549	385.342	634.883		274.358	161.995	224.725							
											543.89	255.056	489.432							
											470.131	141.315	221.968							
											725.187	177.85								
											335.02	224.725								
PROMEDIO	763.9095769			493.9244865		486.007429	320.912636		311.1798571		276.5800526		289.539923	208.832056	292.022188	198.106154				
DE	196.9498331			118.5164345		192.131882	111.089111		128.4688275		129.9301844		181.123502	94.1345956	72.5694315	72.903293				
n	52			37		14	22		63		76		13	18	16	13				

APÉNDICE C. MACROS IMAGEJ

// ANTES DE EMPEZAR SETEAR:

// 1) Edit>PasteControl>Transparent-zero. Para pegar los ROI sobre la imagen original

// 2) File>Import>Bio-Formats(Windowsless). Para setear los parametros al importar una imagen CZI y no tener que aceptar en cada imagen.

Macro Hyper en CP

// COMIENZO DEL SCRIPT

dir1 = getDirectory("Get Directory");

list = getFileList(dir1);

setBatchMode(true);

for (i = 0; i < list.length; i++) {

 showProgress(i + 1, list.length);

 open(dir1 + list[i]);

 // medir manualmente un CP: rolling debe ser mayor al radio promedio de CP.

 hyperstack = File.name;

 run("Duplicate...", "duplicate channels=5");

 original_file_name = File.nameWithoutExtension + "-1.lsm";

 selectWindow(File.name);

 close();

 selectWindow(File.nameWithoutExtension + "-1.lsm");

 run("8-bit");

 run("Subtract Background...", "rolling = 30");

 //File.name - The name of the last file opened using a file open dialog, a file save dialog,

 //drag and drop, or the open(path) function

 duplicated_file_name = File.nameWithoutExtension + "-2.lsm";

 //File.nameWithoutExtension - The name of the last file opened with the extension removed

 run("Duplicate...", "title = &duplicated_file_name");

 run("Mean...", "radius=3");

 //el filtro mean debe setearse entre 1 y 3, pero pref en 1 porque en 3 borrea mucho los PD

 run("Auto Local Threshold", "method=Mean radius=30 parameter_1=0 parameter_2=0 white");

 // el radio debe estar entre 10 y 30

 setOption("BlackBackground", false);

 run("Set Measurements...", "area mean min integrated display

 redirect=[&original_file_name] decimal=3");

 run("Analyze Particles...", "size=400-500000 pixel circularity=0.0-1.00 show=[Outlines] display exclude");

 run("Invert");

 run("RGB Color");

```

run("Copy");
selectWindow(File.nameWithoutExtension + "-1.lsm");
run("RGB Color");
run("Paste");
saveAs("Jpeg", dir1+duplicated_file_name);
close();}

```

Macro Depósitos de calosa en PD

```

// COMIENZO DEL SCRIPT
dir1 = getDirectory("Get Directory");
list = getFileList(dir1);
setBatchMode(true);
for (i = 0; i < list.length; i++) {
    showProgress(i + 1, list.length);
    open(dir1 + list[i]);
    //rolling debe ser mayor al radio promedio de PD calosa. Para esto, manualmente medir
    un par de PD
    //a menor radio, más oscurece la imagen
    run("Subtract Background...", "rolling = 30");
    original_file_name = File.name;
    //File.name - The name of the last file opened using a file open dialog, a file save dialog,
    //drag and drop, or the open(path) function
    duplicated_file_name = File.nameWithoutExtension + "-1";
    //File.nameWithoutExtension - The name of the last file opened with the extension
    removed
    run("Duplicate...", "title = &duplicated_file_name");
    //run("Mean...", "radius=1");
    //el filtro mean debe setearse entre 1 y 3, pero pref en 1 porque 3 borra mucho los PD
    run("Auto Local Threshold", "method=Bernsen radius=10 parameter_1=0 parameter_2=0
    white");
    // el radio debe estar entre 10 y 30
    setOption("BlackBackground", false);
    run("Set Measurements...", "area mean min integrated display
    redirect=[&original_file_name] decimal=3");
    run("Analyze Particles...", "size=20-100 pixel circularity=0.35-1.00 show=[Outlines]
    display exclude");
    run("Invert");
    run("RGB Color");
    run("Copy");
    selectWindow(File.name);
    run("RGB Color");
    run("Paste");
    saveAs("Jpeg", dir1+duplicated_file_name);
    close();}

```