

Resumen en castellano de la tesis: The abscission regulatory module INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) / HAESA (HAE)-like receptor kinases in Solanaceae species: Functional analysis in *Nicotiana benthamiana*

La abscisión es un proceso de separación celular activo, organizado y altamente coordinado. La activación del proceso de abscisión permite el desprendimiento de órganos vegetativos y reproductivos completos, mediante la modificación de la adhesión celular y la desintegración de las paredes celulares en lugares específicos del cuerpo de la planta, conocidos como zonas de abscisión (ZAs). En *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), la abscisión de órganos florales y hojas caulinares está regulada por la interacción entre el péptido hormonal INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA), un par de proteínas quinasas de tipo receptor redundantes, HAESA (HAE) y HAESA-LIKE2 (HSL2) y de correceptores de la familia SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (véanse revisiones recientes en Patharkar and Walker, 2018; Shi et al., 2019). Los péptidos IDA-like, como elementos de comunicación entre células, parecen estar involucrados en otros procesos de separación celular como la emergencia de raíces laterales de la raíz principal (Kumpf et al., 2013; Liu et al., 2018), el desprendimiento de la caliptra de la raíz (Shi et al., 2018), o incluso las respuestas a estreses bióticos y abióticos (Vie et al., 2015, 2017).

Además de en *Arabidopsis*, también se han identificado genes *IDA*-like en varias especies de cultivos. Se ha reportado que algunos de ellos presentaban una expresión elevada en ZAs en tomate (*SlIDA1*; Tucker y Yang, 2012), soja (*GmIDA2a*; Tucker y Yang, 2012), cítricos (*CitIDA3*; Estornell et al., 2015), palma aceitera (*EgllIDA5*; Stø et al., 2015), litchi (*LcIDL1*; Ying et al., 2016) o lupino amarillo (*LlIDA*; Wilmowicz et al., 2018), lo que sugiere que podrían conservar la función de *IDA* en la regulación de la separación celular durante la abscisión. También se ha demostrado que los péptidos sintéticos IDA son capaces de inducir la abscisión temprana de órganos florales en flores de *Arabidopsis* (Stenvik et al., 2008), y la abscisión de flores, frutos maduros y hojas en el lupino amarillo, la palma aceitera y el álamo, respectivamente (Wilmowicz et al., 2018; Tranbarger et al., 2019). Además, los homólogos *IDA* de cítricos (*CitIDA3*) y litchi (*LcIDA1*) son funcionales cuando se expresan heterológamente en *Arabidopsis*, produciendo una abscisión de órganos florales más temprana y rescatando la deficiencia de abscisión que presenta *ida2* (Estornell et al., 2015; Ying et al., 2016). De manera similar, la sobreexpresión ectópica de un homólogo *HAE*-like de litchi, *LcHSL2*, rescata completamente la abscisión de órganos florales en el mutante doble de *Arabidopsis hae hsl2* (Wang et al., 2019a).

El conocimiento sobre la maquinaria molecular que regula la abscisión en especies de plantas de importancia económica de la familia de las solanáceas es en la actualidad escaso. En esta investigación de doctorado se realizó un análisis funcional de los componentes del módulo de señalización de abscisión IDA-HAE en *N. benthamiana*. En la primera sección de este trabajo, se estudió el grado de conservación y la filogenia de las familias de genes *IDA*-like y *HAE*-like en especies relevantes del género *Solanum* (tomate, patata y berenjena), *Capsicum* (pimiento) y *Nicotiana* (*N. sylvestris*, *N. tomentosiformis*, *N. tabacum* y *N. benthamiana*).

Por otro lado, se analizó la expresión de estos genes en el aloploiploide *N. benthamiana*, con el fin de identificar miembros implicados en la abscisión y en la respuesta a condiciones de estrés abiótico, como la sequía. En la segunda sección, se evaluó el efecto del silenciamiento y la sobreexpresión de *NbenIDA1A* y *NbenIDA1B*, dos homeólogos *IDA*-like de *N. benthamiana* que se asociaron con la abscisión de la corola en la sección anterior, *NbenIDA1A/B*. Además, también se determinó el efecto sobre la abscisión de la corola del silenciamiento de la quinasa receptor-like (RLK) de repeticiones ricas en leucina (LRR), *NbenHAE.1*.

Los resultados muestran que las relaciones filogenéticas entre los miembros *IDA*-like de las solanáceas estudiadas, agruparon los dos pares de homeólogos de proteínas *NbenIDA1* y *NbenIDA2* con los prepro péptidos de *Arabidopsis* relacionados con la abscisión. El análisis de las regiones promotoras en busca de elementos reguladores reveló que estos dos pares de homeólogos contenían elementos de respuesta tanto hormonales como de respuesta a la sequía, aunque *NbenIDA2A* carecía de los elementos reguladores hormonales.

Los análisis de expresión génica también indican que el par de homeólogos *NbenIDA1* se regulan positivamente durante la abscisión de la corola. Los pares *NbenIDA1* y *NbenIDA2* mostraron una expresión diferencial tisular en condiciones de estrés hídrico, ya que los homeólogos *NbenIDA1* se indujeron en hojas estresadas, mientras que los homeólogos *NbenIDA2*, especialmente *NbenIDA2B*, se indujeron en raíces estresadas. En las plantas con crecimiento activo no estresadas, los nudos y los entrenudos fueron los tejidos con los niveles de expresión más altos de todos los miembros de la familia *IDA*-like y sus receptores *HAE*-like putativos.

El silenciamiento basado en VIGS del par de homeólogos *NbenIDA1* y *NbenHAE.1* suprimió la abscisión de la corola en flores de *N. benthamiana*. Este fallo en la abscisión de la corola fue causado por un bloqueo en la desintegración de la pared celular en la base de la corola, probablemente debido a la falta de inducción de las enzimas hidrolíticas relacionadas con la abscisión.

En contraste con el silenciamiento del par de homeólogos *NbenIDA1*, la sobreexpresión ectópica del homeólogo *NbenIDA1A* adelantó la senescencia y la abscisión de la corola y afectó negativamente al crecimiento de las plantas de *N. benthamiana*. En general, los resultados obtenidos utilizando la aproximación VIGS mostraron que el par de homeólogos *NbenIDA1* y el receptor *NbenHAE.1*, posiblemente actuando como un módulo de señalización similar al descrito en *Arabidopsis*, regulan la abscisión de la corola en las flores de *N. benthamiana*. Este es, por tanto, el primer ejemplo en una especie vegetal distinta de *Arabidopsis thaliana* que indica que el módulo de señalización de abscisión *IDA*-*HAE*/*HSL2* se conserva en las angiospermas.