

EL ROL DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL Y LA PROTEÍNA CYT-C EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETAL

Roldán, Facundo

Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL-CONICET).

Director/a: Gonzalez, Daniel H.

Codirector/a: Mansilla, Natanael

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: mitocondria, raíz, arabidopsis

INTRODUCCIÓN

El proceso de respiración resulta esencial para la obtención de energía por parte de la mayoría de los seres vivos. En organismos eucariotas, este proceso es llevado a cabo en las mitocondrias y resulta fundamental para la obtención de energía (Welchen et al., 2014). En la membrana interna mitocondrial existen cuatro complejos multiproteicos y una hemoproteína soluble, el Citocromo c (CYTc), los que posibilitan el transporte de electrones desde coenzimas reducidas al oxígeno molecular (O_2), acoplando este proceso a la síntesis de ATP por parte de la ATP sintasa o Complejo V.

Además, las mitocondrias serían organelas capaces de percibir y señalar el estado energético celular, coordinando el desarrollo a través de la interacción con diferentes vías reguladoras del crecimiento. Un punto clave de interconexión son los mecanismos de acción de distintas hormonas vegetales (Racca et al., 2018,). Por otro lado, distintas proteínas con localización mitocondrial han sido involucradas en procesos celulares no canónicos, como la defensa de las plantas frente al ataque por patógenos bacterianos o resistencia al daño oxidativo generado por estreses abióticos como exposición a UV-B y el estrés salino.

En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes que codifican para CYTc denominados *CYTc1* (At1g22840) y *CYTc2* (At4g10040) que presentan una estructura intrón/exón conservada y una identidad entre proteínas superior al 90%. Sin embargo, análisis de sus promotores demostraron diferencias en los patrones de expresión, por lo que su diferencia funcional sería generada por la expresión tejido-específica (Welchen et al., 2005, 2009, 2012).

Título del proyecto: "Interacciones entre la función mitocondrial y vías hormonales reguladoras del crecimiento en plantas"

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Daniel H. Gonzalez

En los últimos años han surgido numerosas evidencias señalando que los niveles de nutrientes y el balance metabólico constituyen el núcleo central para la regulación del crecimiento y desarrollo en plantas (Lastdrager et al., 2014). Se conoce que el crecimiento de la raíz principal es un proceso regulado por múltiples estímulos. La longitud final de la raíz es regulada coordinando la tasa de división celular, el número de células en división, la velocidad de elongación y la longitud celular final (Ubeda-Tomás et al., 2012). Diferentes hormonas vegetales tienen un papel importante en el control del crecimiento, división y diferenciación celular en raíces. Entre ellas, las giberelinas (GAs) controlan la proliferación celular en el meristema proximal en raíces y el ácido abscísico (ABA) está asociado con el mantenimiento del estado las células del centro quiescente y la elongación celular en la zona de diferenciación (Takatsuka & Umeda, 2014; Dietrich et al., 2017).

Se ha reportado que las GAs poseen un rol importante en el fenotipo de las mutantes de *CYTc*, que presentan desarrollo retrasado con respecto a plantas salvajes. Se propone que la disminución de la producción energética o de la actividad mitocondrial impacta en la homeostasis de GAs, fenómeno que sería responsable del crecimiento más lento. En concordancia, el tratamiento con GAs de manera exógena es capaz de rescatar algunos de los fenotipos de estas mutantes. (Racca et al., 2018). En adición, datos recientes de nuestro laboratorio indicarían que la reducción de los niveles de *CYTc* impactaría en la señalización/homeostasis mediada por ABA, alterando la germinación en plantas.

OBJETIVOS

Estudiar el rol que cumple la función mitocondrial, a través de la proteína *CYTc*, en el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Se evaluarán líneas de la especie *Arabidopsis thaliana* que presentan una disminución en los niveles de la proteína *CYTc* y se analizará cómo esta alteración afecta el crecimiento de raíces.

1. Analizar el impacto de la disminución del *CYTc* en el crecimiento y morfología celular de raíces de *A. thaliana*.
2. Analizar el impacto de diferentes condiciones de crecimiento (nutrientes, pH, hormonas) sobre el crecimiento de raíces de plantas de *A. thaliana* mutantes en *CYTc*.
3. Generar plantas de *A. thaliana* transformadas con el gen *CYTc-1* bajo el control de los promotor propio del gen (*pCYTc1::CYTc1*) y evaluar cómo el patrón de expresión afecta el desarrollo y crecimiento en líneas "wild-type" (Wt) y mutantes en *CYTc*.

METODOLOGÍA

En el presente trabajo se emplearon mutantes insercionales por T-DNA en uno o ambos genes que codifican para la proteína *CYTc*, denominadas mutante simple *1a* (mutante nula en el gen *CYTc-1*) y mutante doble *1b2b* (mutante con niveles reducidos en el gen *CYTc-1* y nula en el gen *CYTc-2*), ambas con niveles de expresión de *CYTc* disminuidos (Welchen y col., 2012). Se evaluó cómo la deficiencia de *CYTc* afecta el desarrollo de la raíz y la morfología de los diferentes tipos de células que la conforman. Se efectuó una evaluación diaria del crecimiento de la misma, con el objetivo de poder establecer una cinética de crecimiento para evaluar si las plantas presentan distintas tasas de crecimiento y si las mismas son afectadas de forma diferencial por diferentes condiciones de pH (5.8 y 7.0) y frente a tratamientos con sacarosa (1%), GA3 (1, 10 y 100 μ M) y ABA (0.01, 0.1 y 1 μ M). Además, se analizó por microscopía láser confocal qué ocurría a nivel tisular con distintas

zonas de la raíz principal (zona mitótica, de diferenciación y de células elongadas) en las mutantes en *CYTc* tanto en condición control como bajo el efecto de diferentes concentraciones de GA3 y ABA.

CONCLUSIONES

En comparación a líneas salvajes, los resultados demuestran que tanto la mutante simple (*1a*) como la mutante doble (*1b2b*) presentan un crecimiento más lento de la raíz principal, diferencia que se incrementa a lo largo del tiempo. Esto se debe a que la tasa de crecimiento de las plantas mutantes es menor. Notoriamente, las mutantes en *CYTc* presentaron una reducción en el número de las células zona mitótica (ZM) y un menor número de células en la zona de diferenciación (ZD). Las células maduras y completamente elongadas (CE), que constituyen cerca del 90% del tamaño total de raíz, fueron significativamente más cortas, diferencia probablemente responsable del menor largo de raíz principal de mutantes en *CYTc* (Fig. 1).

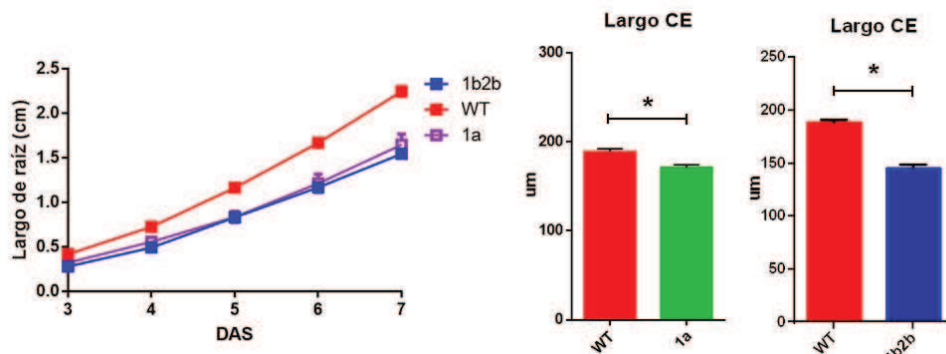


Fig. 1. Crecimiento de raíz principal en días luego de siembra (DAS) y largo de células elongadas de raíz principal (CE) de líneas Wt, 1a y 1b2b.

Se ha reportado, que un aumento de pH estimula el crecimiento de raíz principal en plantas salvajes. Sin embargo, este cambio en las condiciones ensayadas tiene un menor efecto en la mutante 1a y nulo efecto en la mutante 1b2b, lo que sugeriría que la deficiencia de *CYTc* afectaría la magnitud de esta respuesta (Fig. 2).

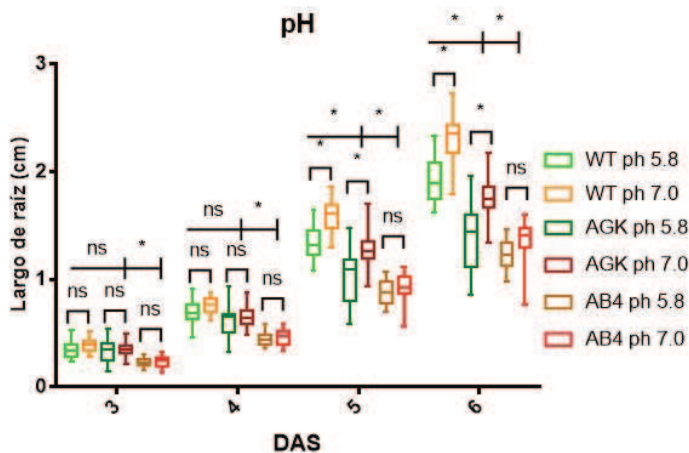


Fig. 2. Crecimiento de raíz principal en DAS en líneas Wt, 1a y 1b2b bajo condiciones de pH 5,8 y 7,0.

Respecto al tratamiento hormonal, el ABA a bajas concentraciones, se ha reportado que demuestra un efecto estimulador del crecimiento de la raíz, principalmente a la concentración de 0.01 μ M. Las mutantes en *CYTC* logran una reversión parcial del fenotipo de raíz corto con un aumento mayor en la tasa de crecimiento. Esto reflejaría que las mutantes en *CYTC* serían más sensibles a esta concentración de hormonas. Las CE presentaron un aumento en la longitud de las células en todas las líneas, con mayor impacto en las mutantes. Este último cambio sería el responsable de la recuperación parcial del largo de raíz de las mutantes (Fig. 3). El tratamiento exógeno con GA3 no presentó diferencias significativas en las tasas de crecimiento de raíz.

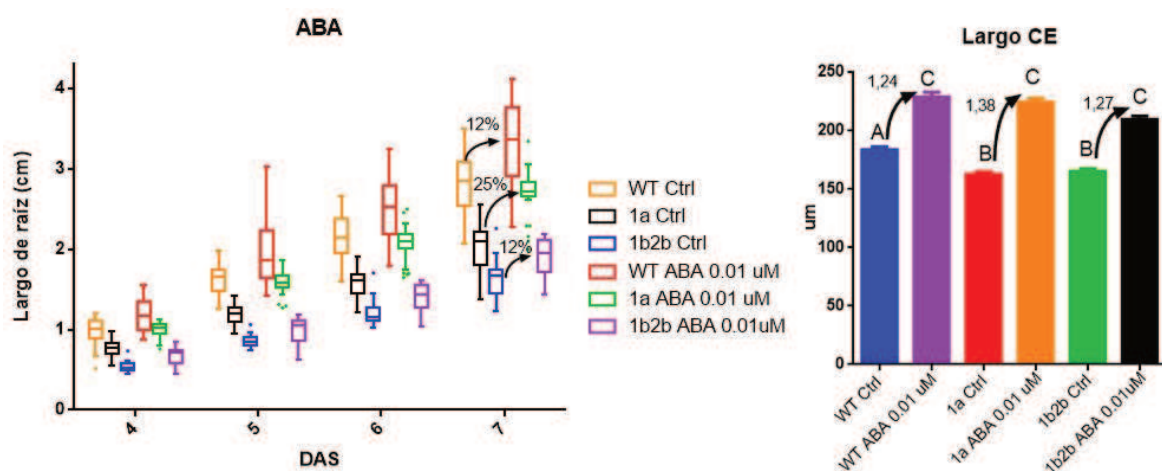


Fig. 3. Crecimiento de raíz principal en DAS y largo de CE bajo tratamiento con ABA 0,01 μ M con líneas Wt, 1a y 1b2b.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Dietrich, D., Pang, L., Bennett, M. J.** (2017). Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nature Plants*, 3, 17057.
- Lastdrager, J., Hanson, J., & Smeekens, S.** (2014). Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 799–807.
- Racca, S., Welchen, E., Gras, D. E., Tarkowská, D., Turečková, V., Maurino, V. G., & Gonzalez, D. H.** (2018). Interplay between cytochrome c and gibberellins during Arabidopsis vegetative development. *Plant Journal*, 94(1), 105–121.
- Takatsuka, H., & Umeda, M.** (2014). Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2633–2643.
- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G. T. S., & Bennett, M. J.** (2012). Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends in Plant Science*, 17(6), 326–331.
- Welchen, E., García, L., Mansilla, N., & Gonzalez, D. H.** (2014). Coordination of plant mitochondrial biogenesis: Keeping pace with cellular requirements. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–12.
- Welchen, E., Gonzalez, D. H., & Biologi, D.** (2005). Differential Expression of the Arabidopsis Cytochrome c Genes *Cytc-1* and *Cytc-2*. Evidence for the Involvement of TCP-Domain Protein-Binding Elements in Anther- and Meristem-Specific Expression of the *Cytc-1* Gene 1. *Plant Physiology*, 139(1), 88–100.
- Welchen, E., Hildebrandt, T. M., Lewejohann, D., Gonzalez, D. H., & Braun, H. P.** (2012). Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(7), 990–1001.