

**RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y EL
CRECIMIENTO VEGETAL EN DISTINTOS TEJIDOS DE
Arabidopsis thaliana,
Troncoso*, D. Valentina**

**Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL- UNL-CONICET)
Director/a: Coronel, Florencia
Codirector/a: Welchen, Elina*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Citocromo c- Crecimiento- Señalización a distancia.

INTRODUCCIÓN

La respiración celular es esencial para la obtención de energía por parte de la mayoría de los seres vivos. En organismos eucariotas, la respiración ocurre en las mitocondrias mediante el proceso de transporte de electrones acoplado a la síntesis de ATP. En nuestro laboratorio estudiamos el papel de la vía respiratoria dependiente de citocromo c (CYTC), una pequeña hemoproteína del espacio intermembrana que participa en el transporte de electrones. Utilizando como modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*, hemos aislado mutantes insercionales en cada uno de los dos genes que codifican CYTC en esta planta: *CYTC-1* y *CYTC-2*. Mientras que las plantas mutantes en *CYTC-2* no presentan alteraciones fenotípicas significativas, las mutantes en *CYTC-1* presentan raíces más cortas, menor diámetro de roseta y un retraso en el crecimiento que resulta en el requerimiento de un mayor número de días para que las plantas alcancen la etapa reproductiva (Welchen et al, 2012, Racca et al, 2018). Por otra parte, la sobreexpresión de *CYTC-1* utilizando el promotor constitutivo 35SCaMV produce un efecto contrario al de la mutación, es decir mayor longitud de raíces, aumento en el tamaño de las rosetas y un menor número de días necesarios para alcanzar la etapa reproductiva (Racca et al, 2018). Estos resultados permitieron postular que los niveles de CYTC afectan el crecimiento vegetal y que el gen *CYTC-1* sería el principal responsable de la regulación del desarrollo vegetativo en *Arabidopsis*. El gen *CYTC-1* se expresa principalmente en regiones meristemáticas y tejidos en proliferación, como el ápice del tallo y de las raíces, mientras que el gen *CYTC-2* se expresa principalmente en haces vasculares, anteras y polen (Welchen y Gonzalez, 2005).

Teniendo en cuenta que se ha demostrado la existencia de señales que se originan en las mitocondrias y que impactan en el funcionamiento celular global (Kleine y Leister, 2016),

Título del proyecto: EFECTO CELULARES Y SISTEMICOS DE LAS
ALTERACIONES DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN PLANTAS

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Gonzalez, Daniel H.



planteamos que la actividad de *CYTC-1* en regiones meristemáticas y tejidos en proliferación sería clave para asegurar el correcto crecimiento y desarrollo vegetal. Para investigar de qué manera *CYTC* afecta el crecimiento de diferentes tejidos, generamos herramientas de complementación utilizando mutantes nulas en *CYTC-1* transformadas con construcciones que permiten expresar este gen bajo el control de distintos promotores específicos de tejido. Estos promotores permiten la restauración de la actividad de *CYTC-1* en áreas específicas como el meristema apical del tallo, células en división, la vasculatura y primordios florales y de hojas. El estudio de las plantas que contienen estas construcciones nos permitirá establecer el papel del *CYTC* en la regulación del crecimiento en distintos tejidos y tipos celulares de la planta y su relación con el crecimiento de otros órganos o tejidos.

OBJETIVOS

- Analizar los efectos de la expresión de *CYTC* en tejidos específicos sobre el crecimiento vegetal, tanto a nivel local como sistémico.

METODOLOGÍA

Materiales: Plantas con genotipo salvaje (WT), mutantes *cytc-1a* y líneas transformantes estables con las construcciones pSUC2:CI, pCYCb1:CI y pSTM:CI.

Confirmación de la presencia del transgén mediante PCR.

En las líneas transformantes obtenidas se confirmó la integración del transgén mutante *cytc-1a* en el genoma vegetal por medio de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando cebadores específicos (Welchen et al, 2012) y del transgén correspondiente a cada promotor utilizando los cebadores que se detallan a continuación. Se incluyeron en el ensayo plantas WT como controles negativos.

Oligonucleótido (5´-3´)	Secuencia
pSTM (F)	CTTCCCTCTCCCCCATAAC
pSUC2 (F)	ACGTGTCACGAAGATACCCT
pCYCB1.1 (F)	ACAATCAGACCGTTGGGGTT
CYTC1 (R)	GGCCTCGAGTTCACTTAGGCGCAGTAGATTC

Caracterización morfológica de los genotipos bajo estudio.

Se analizaron las características fenotípicas de las plantas durante las distintas etapas del desarrollo: longitud de raíces, número y tamaño de hojas, tiempo necesario para el paso a estadio reproductivo (Boyes et al. 2001). El material se fotografió y se realizaron las cuantificaciones utilizando el software ImageJ.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Con el fin de analizar el efecto de la complementación de la actividad del gen *CYTC-1* en tejidos específicos, obtuvimos tres construcciones que dirigen la expresión del mismo bajo el control de los promotores de los genes STM (At1g62360), que permite la expresión en el meristema apical del tallo (Wang et al, 2008), CYCb1;1 (At4g37490), que dirige la expresión en células en división (Cason y Hetherington, 2014), y SUC2 (At1g22710), que permite la expresión en vasculatura (Millar et al, 2011). En la Figura 1A se exponen los patrones de expresión de cada promotor. Las

construcciones obtenidas fueron introducidas en la mutante nula *cytc-1a* en forma estable. En primer lugar, confirmamos la presencia de las distintas construcciones en las líneas bajo estudio y confirmamos que las mismas eran mutantes homocigotas *cytc-1a* mediante PCR (Figura 1B). Posteriormente, realizamos análisis fenotípicos para evaluar los efectos de la expresión del gen *CYTC-1* en diferentes tejidos sobre el crecimiento de las mutantes *cytc-1a* (Figura 1C-F).

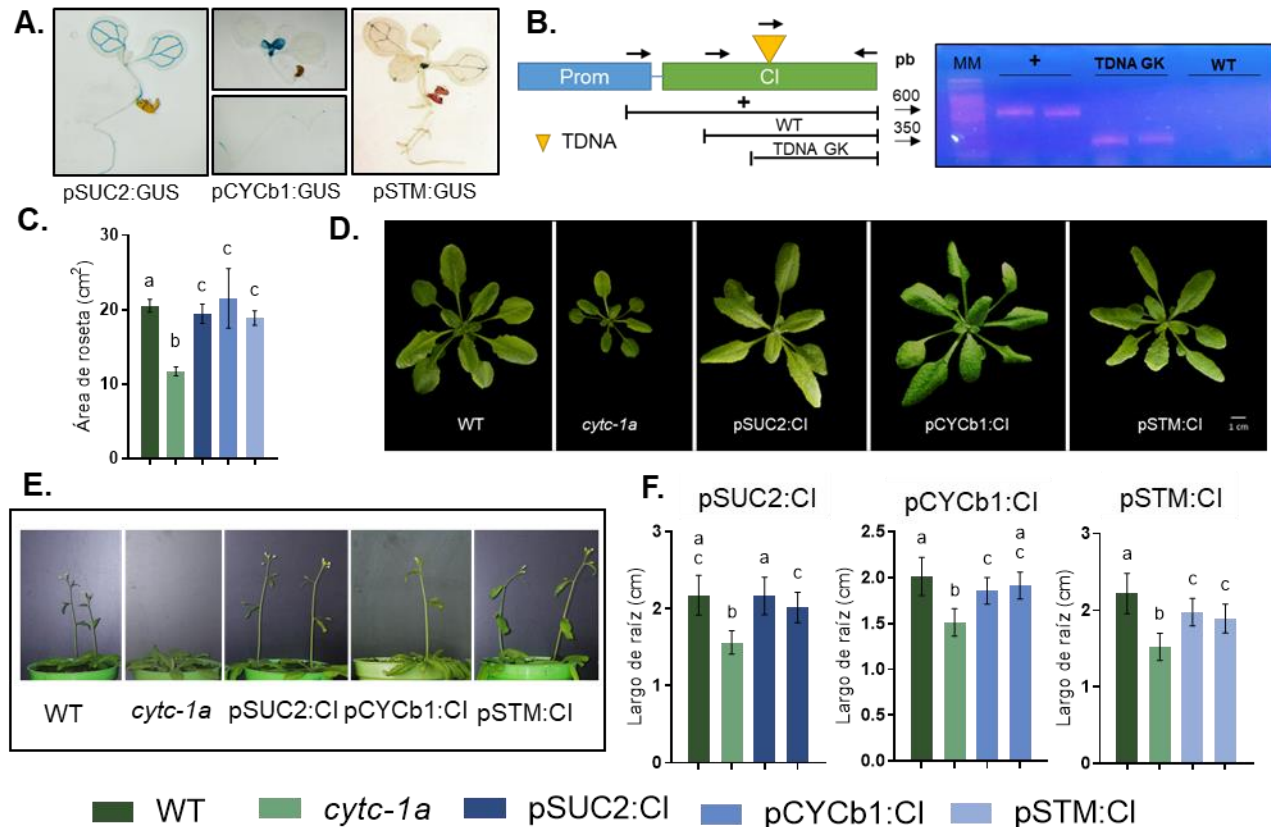


Figura 1: (A) Patrones de expresión conferidos por diversos promotores fusionados al gen reportero *GUS*. (B) Imagen representativa del análisis mediante PCR de las plantas transformadas: (+) indica la amplificación del fragmento correspondiente a la construcción pSTM:Cl (dos líneas independientes), en las construcciones pSUC2:Cl y pCYCb1:Cl se obtuvieron resultados similares; "TDNA GK" indica el amplicón correspondiente a la inserción de T-DNA en la mutante *cytc-1a*; "WT" indica el resultado obtenido al utilizar cebadores que amplifican el alelo salvaje de *CYTC-1*, que no se observa en estas plantas, confirmando que son mutantes homocigotas. (C) Cuantificación del tamaño de roseta de plantas WT, mutantes y complementadas (pSTM:Cl; pSUC2:Cl; pCYCb1:Cl) crecidas durante 19 días bajo fotoperíodo de día largo: 16 hs de luz/8 hs de oscuridad. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; ANOVA; $n = 11$). (D) Imagen representativa de las rosetas de las plantas analizadas en (C). Escala: 1cm. (E) Imagen representativa de plantas WT, mutantes y complementadas luego del pasaje a estadio reproductivo. (F) Cuantificación de la longitud de la raíz de plántulas de 7 días crecidas en medio MS suplementado con agar 1%, bajo las mismas condiciones de crecimiento detalladas en (C). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; ANOVA; $n = 20$).

Nuestros resultados muestran que la expresión de *CYTC* en el meristema apical del tallo, células en proliferación o la vasculatura de la planta es capaz de recuperar el crecimiento de la roseta y anular el retraso en el tiempo de floración, llevando estos parámetros a los niveles de plantas salvajes (Figura 1C-E). Por otra parte, al analizar la longitud de las raíces, observamos que las construcciones pSUC2:CI y pCYCb1:CI recuperaron el crecimiento a niveles de plantas WT (Figura 1F). Notoriamente, se observó el mismo efecto al expresar *CYTC-1* en células en proliferación, que se hallan en el extremo apical de la raíz, como al expresar este gen en la vasculatura, es decir en porciones más diferenciadas, que se hallan en la parte superior (Figura 1A). Además de esto, se observó recuperación del crecimiento de las raíces en las plantas complementadas con la construcción que contiene el promotor del gen *STM* (Figura 1F) que dirige la expresión al meristema apical del tallo (Figura 1A). Este resultado indica que la expresión de *CYTC-1* en la parte aérea de la planta impacta en el crecimiento radicular, es decir que *CYTC* parece activar un mecanismo de señalización a distancia que regula el crecimiento de la raíz en función de los niveles de *CYTC* presentes en el meristema apical del tallo. Actualmente, estamos intentando entender cuál es la naturaleza de esta señal.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Boyes, D. C.,** Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Gorlach, J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, **13**(7), 1499-1510.
- Cason SA, Hetherington AM.,** 2014 Phytochrome B is required for lightmediated systemic control of stomatal development. *Curr Biol* **24**(11), 1216-21.
- Kleine T, Leister D.,** 2016 Retrograde signaling: Organelles go networking. *Biochim Biophys Acta* **1857**, 1313-1325
- Millar AH,** Whelan J, Soole KL, Day DA., 2011 Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **62**, 79-104.
- Racca S,** Welchen E, Gras DE, Tarkowská D, Turečková V, Maurino VG, & Gonzalez DH., 2018 Interplay between cytochrome c and gibberellins during Arabidopsis vegetative development. *Plant J.* **94**, 105-121.
- Wang JW,** Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D., 2008 Dual Effects of miR156 Targeted SPL Genes and CYP78A5/KLUH on Plastochron Length and Organ Size in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **20** 1231-1243.
- Welchen E, Gonzalez DH.,** 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. *Plant Physiol* **139**, 88-100.
- Welchen E,** Hildebrandt TM., Lewejohann D, Gonzalez DH., & Braun HP., 2012 Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochim Biophys Acta* **1817**, 990-1001.
- Welchen E,** García L, Mansilla N, Gonzalez DH., 2014 Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements. *Front Plant Sci* **4**, 551