



Encuentro
de Jóvenes
Investigadores

MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA ADAPTACIÓN DE *Arabidopsis thaliana* AL ESTRÉS ABIÓTICO

Canello, Alejo

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL, CONICET-UNL) (IAL), Laboratorio de Biología Molecular (LBM-IAL). Centro Científico Tecnológico Santa Fe (CCT-Santa Fe). Colectora Ruta Nacional N°168 km. 472.

Directora: Viola, Ivana Lorena
Codirectora: Alem, Antonela Lucía

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Estrés, TCP, Adaptación

INTRODUCCIÓN

La aclimatación de las plantas al estrés abiótico depende de la regulación de complejas redes bioquímicas y moleculares involucradas en la percepción y la respuesta a la condición ambiental adversa. Uno de los componentes clave en esta adaptación son los factores de transcripción, por lo que constituyen un grupo de moléculas de interés para comprender los mecanismos que emplean las plantas para tolerar el estrés. Las proteínas de la familia TCP son factores de transcripción exclusivos de plantas que ejercen efectos sobre múltiples aspectos del desarrollo, como la germinación, la embriogénesis y la morfogénesis de hojas y flores, entre otros, pero no son reguladores de desarrollo estáticos, sino que traducen diversas señales endógenas y ambientales en respuestas de crecimiento y adaptativas (Uberti-Manassero y col., 2013; Viola y col., 2016; Ferrero y col., 2019; Camoirano y col., 2020; Alem y col., 2022). El estrés abiótico, como salinidad y sequía, desencadena la biosíntesis de ABA (ácido abscísico), hormona que actúa como una señal molecular que media las respuestas adaptativas al estrés activando varias cascadas de señalización específicas y regulando diferentes procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento de las plantas que culminan en la tolerancia hacia el estrés (Chen y col., 2020; Ali y col., 2021). En *Arabidopsis thaliana*, especie en estudio en este trabajo, un aumento en los niveles de ABA genera un efecto inhibitorio sobre la germinación, el establecimiento de las plántulas, la elongación de la raíz principal, la apertura de estomas y la floración, induce la biosíntesis de antocianinas, entre otros (Chen y col., 2020; Ali y col., 2021). En base a nuestros estudios sabemos que varios

Título del proyecto: Estudio de los mecanismos moleculares de acción de factores de transcripción de la familia TCP de *Arabidopsis thaliana*

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director/a: Ivana Viola



de estos procesos son controlados por los factores de transcripción TCP14 y TCP15 de *Arabidopsis thaliana* (Viola y col., 2016; Lucero y col., 2017; Ferrero y col., 2019; Camoirano y col., 2020; Alem y col., 2022). Sin embargo, a pesar de la función conocida de estas proteínas como reguladoras cruciales para asegurar el óptimo desarrollo de las plantas, se desconoce su papel en la respuesta a estrés abiótico y a ABA. A fin de abordar el estudio de la relación que existe entre el accionar de estas proteínas y la respuesta de las plantas a estrés abiótico nos planteamos los objetivos que se enumeran a continuación.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Realización de estudios estructurales y funcionales de proteínas TCP de *Arabidopsis thaliana* durante la respuesta a estrés abiótico con el fin de dilucidar el papel que juegan, en conjunto con vías hormonales, en la modulación de los programas de desarrollo y crecimiento vegetal en respuesta a cambios en las condiciones del ambiente, así como los mecanismos moleculares a través de los cuales actúan.

Objetivos Particulares:

1. Estudiar el papel de las proteínas TCP14 y TCP15 en la respuesta a la hormona ácido abscísico (ABA).
2. Identificar genes cuya expresión esté regulada directa, o indirectamente, por las proteínas TCP en estudio.

METODOLOGÍA

Material vegetal: Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), como plantas salvajes, y líneas mutantes simples y dobles en los genes *TCP14* y *TCP15* (*tcp14-6*, *tcp15-3* y *tcp14-4 tcp15-5*) y plantas sobreexpresantes de TCP15 (*35S::TCP15*) que han sido previamente caracterizadas a nivel fenotípico y molecular en nuestro laboratorio (Viola y col., 2016; Ferrero y col., 2019; Camoirano y col., 2020; Alem y col., 2022).

Estudios fenotípicos: Para los estudios de longitud de la raíz principal, semillas de los genotipos en estudio fueron sembradas en placas de cultivo cuadradas (12 cm de lado) con medio de cultivo Murashige y Skoog basal suplementado con vitaminas (M519) (MS) de PhytoTechnology Laboratories 0.5X agarizado al 1%. Las placas fueron incubadas en orientación vertical a 22°C bajo fotoperiodo de día largo, 16 h de luz blanca ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 8 h de oscuridad, durante 48 hs y luego fueron transferidas a placas de cultivo conteniendo medio MS 1X 0,8% agar-agar adicionado con ABA 0; 15 y 30 μM . Luego de 7 días de crecimiento, las placas fueron fotografiadas y se procedió a realizar la medición de la longitud de la raíz principal (desde la parte inferior de la semilla hasta la punta de la raíz principal). En cada experimento se analizaron 15 plántulas por genotipo y se realizaron 3 réplicas biológicas. Para evaluar el porcentaje de establecimiento en presencia de ABA, 40 semillas de cada genotipo se dispusieron en placas con medio MS 0,5X agar-agar 0,8%(p/v) suplementado con ABA 0,2; 0,5; y 1 μM . Las placas de cultivo se incubaron en condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad) y 22°C. Las plántulas fueron fotografiadas a distintos días luego de la germinación utilizando una cámara digital (Panasonic DMC-FZ35) y en las imágenes obtenidas se analizó el número de semillas totales sembradas, número de plántulas germinadas y número de plántulas con cotiledones verdes y expandidos. Se consideró como plántulas establecidas aquellas que presentaban cotiledones verdes y expandidos.

Ensayos de actividad β -glucuronidasa por histoquímica: plántulas de 5 días tratadas con ABA 10 μM fueron transferidas a una solución de citrato-HCL (pH 7), Tritón X-100 0,1% y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido) 2 mM, se sometieron a vacío entre 5-15 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 16 h. Luego, se las colocó etanol 70% para decolorar los tejidos y se fotografiaron con cámara LUMIX DMC-FZ35 (Panasonic) y Lupa Leica MZ10F.

Preparación y análisis de ARN: La preparación de ARN se realizó utilizando el reactivo TRIzol seguido de precipitación con LiCl. La retrotranscripción (RT) se realizó con un cebador oligo (dT) y la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega) utilizando 1.5-2.0 μg de ARN total. La PCR en tiempo real (qPCR) se realizó en un aparato StepOne (Applied Biosystems) usando los cebadores específicos enumerados en el ANEXO I y SYBR Green. La expresión de los genes se calculó en relación con ACTINA (*ACT2* y *ACT8*) utilizando el método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Los resultados presentados son de tres réplicas biológicas, cada una de las cuales consta de un conjunto de 15 plántulas.

En todos los casos se utilizó el software GraphPad Prism 6 para analizar los datos y producir los gráficos. Se compararon todas las combinaciones de tratamientos y genotipos utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Tukey para analizar si las diferencias eran estadísticamente significativas. En todos los experimentos se emplearon semillas que procedían de plantas que fueron cultivadas en las mismas condiciones y al mismo tiempo a fin de evitar efectos artefactuales no relacionados con las diferencias genéticas entre las distintas líneas. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

En todos los genotipos analizados se observó una reducción en el largo de la raíz principal ante el tratamiento con la hormona ABA (**Figura 1A**). Observamos que las mutantes dobles *tcp14 tcp15* mostraron una mayor inhibición en la capacidad de elongación de la raíz principal que las plantas salvajes, mientras que las plantas que sobreexpresan TCP15 fueron menos sensibles a ABA que las plantas salvajes, lo que sugiere que estas proteínas participarían en la respuesta a ABA. Dado que las mutantes simples en TCP14 y TCP15 no presentaron diferencias significativas con las plantas salvajes (**Figura 1A**), TCP14 y TCP15 actuarían en forma redundante en este proceso. Cuando se analizó la capacidad de establecimiento de los genotipos en estudio en presencia de ABA observamos que, las mutantes *tcp14 tcp15* presentan una menor sensibilidad a ABA que las plantas salvajes (**Figura 1B**). Estos estudios sugieren que las proteínas TCP participarían en la respuesta a ABA.

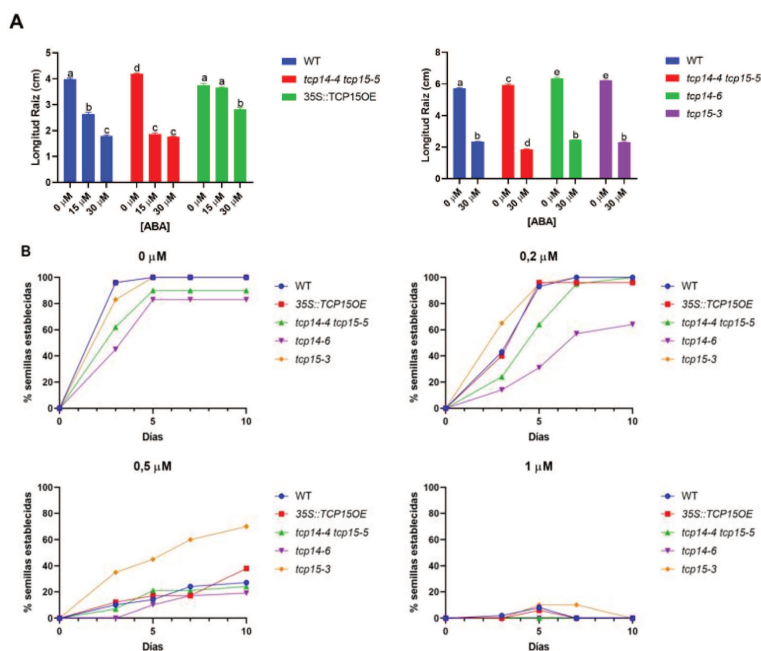


FIGURA 1. (A,B) Efecto de ABA exógeno sobre la longitud de la raíz principal (A) y la capacidad de establecimiento (B) de plántulas de los genotipos indicados. En A, las letras distintas indican diferencias significativas. En B, el título de cada gráfico indica la concentración de ABA del tratamiento. Los puntos indican el porcentaje de semillas establecidas con respecto al paso de los días. Todos los experimentos

se repitieron 3 veces con resultados similares. WT, plantas salvajes; *tcp14 tcp15*, plantas *tcp14-4 tcp15-3*.

Para obtener información sobre el efecto de ABA sobre la expresión de TCP15 se analizó el patrón de expresión de TCP15 usando fusiones al gen reportero *gus* (plantas *pTCP15::TCP15-GUS* disponibles en nuestro laboratorio) frente al tratamiento con ABA. Se observó una disminución en actividad transcripcional de *TCP15* (resultados no mostrados), lo que sugiere que la expresión de *TCP15* sería inhibida por ABA.

A fin de estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el accionar de las proteínas TCP durante la respuesta a ABA se evaluó el efecto del tratamiento con ABA sobre la expresión de genes regulados por esta hormona. Observamos que la expresión de *ABI5* se encuentra significativamente aumentada en las plántulas mutantes dobles *tcp14 tcp15* (**Figura 2**). A su vez, observamos que la expresión de los genes que codifican para factores de transcripción reguladores negativos de la respuesta a ABA *AFP2* y *RAV1* se encuentra disminuida en la mutante *tcp14 tcp15*, mientras que las plantas que sobreexpresan TCP15 muestran niveles aumentados de los transcritos de estos genes (**Figura 2**). Esto hace pensar que TCP15 regularía la señalización de ABA y que, dado que TCP15 actúa como un activador transcripcional, la expresión de estos genes podría estar regulada por TCP15 directamente. En conclusión, los estudios presentados sugieren que las proteínas TCP participarían como reguladores negativos de la respuesta a ABA.

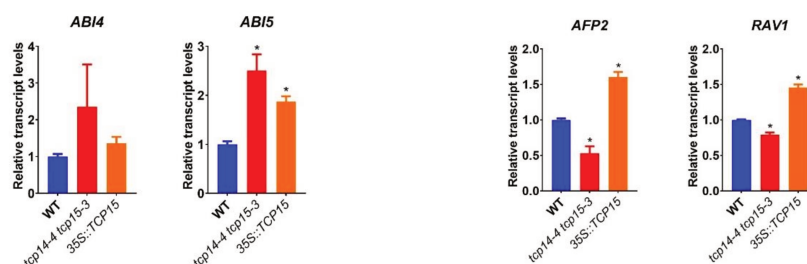


Figura 2. Niveles relativos de transcritos de los genes indicados, medidos por RT-qPCR, en plántulas de 5 días de los genotipos indicados. Las barras representan los datos obtenidos de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con las plantas salvajes (WT). Los experimentos se repitieron 3 veces con resultados similares.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Alem AL, Ariel FD, Cho Y, Hong JC, Gonzalez DH, Viola IL.** TCP15 interacts with GOLDEN2-LIKE 1 to control cotyledon opening in Arabidopsis. *Plant J.* 2022 May;110(3):748-763.
- Ali F, Qanber G, Li F, Wang Z.** Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *J Adv Res.* 2021 Mar; 35:199-214.
- Camoirano A, Arce AL, Ariel FD, Alem AL, Gonzalez DH, Viola IL.** Class I TCP transcription factors regulate trichome branching and cuticle development in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 2020 Sep 19;71(18):5438-5453.
- Chen K, Li GJ, Bressan RA, Song CP, Zhu JK, Zhao Y.** Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *J Integr Plant Biol.* 2020;62(1):25-54.
- Ferrero V, Viola IL, Ariel FD, Gonzalez DH.** Class I TCP Transcription Factors Target the Gibberellin Biosynthesis Gene GA20ox1 and the Growth-Promoting Genes HBI1 and PRE6 during Thermomorphogenic Growth in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2019 Aug 1;60(8):1633-1645.
- Lucero LE, Manavella PA, Gras DE, Ariel FD, Gonzalez DH.** Class I and Class II TCP Transcription Factors Modulate SOC1-Dependent Flowering at Multiple Levels. *Mol Plant.* 2017;10(12):1571-1574.
- Manassero NG, Viola IL, Welchen E, Gonzalez DH.** TCP transcription factors: architectures of plant form. *Biomol Concepts.* 2013 Apr;4(2):111-27.
- Viola IL, Camoirano A, Gonzalez DH.** Redox-Dependent Modulation of Anthocyanin Biosynthesis by the TCP Transcription Factor TCP15 during Exposure to High Light Intensity Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2016 Jan;170(1):74-85.