

# LA METILACIÓN DEL ADN MODULA LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LAS ELEVADAS TEMPERATURAS

**Maián Garro**

*Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET/UNL)*

Director: Dr. Matías Capella

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Epigenética, estrés abiótico, *Arabidopsis thaliana*

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático trajo aparejado un incremento en las temperaturas que influyen en forma directa al desarrollo y la producción vegetal. Al ser organismos sésiles, las plantas evolucionaron sofisticados mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir en ambientes desfavorables por tiempos limitados. A elevadas temperaturas que aún se encuentran dentro del rango fisiológico (por ejemplo, entre 24°C y 30°C para la planta modelo *Arabidopsis thaliana*), las plantas experimentan cambios morfológicos y de desarrollo tendientes a reducir la exposición a temperaturas potencialmente dañinas, que en conjunto se denominan “termomorfogénesis” (Casal and Balasubramanian, 2019). Entre tales alteraciones se pueden mencionar la elongación del hipocótilo y de los pecíolos, la inducción de la hiponastía y la floración temprana. La reprogramación transcripcional que resulta en los cambios morfológicos y arquitecturales inducidos por la termomorfogénesis es regulada principalmente por el factor de transcripción de tipo bHLH PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4). Las temperaturas entre 24°C y 30°C afectan a PIF4 en múltiples niveles, que incluyen cambios en su expresión, niveles proteicos, y su función como factor de transcripción mediante la modificación de los estados de la cromatina y la unión al ADN (Delker et al., 2022). Mucha evidencia sugiere que varias fitohormonas (como las auxinas, los brasinosteroides y las giberelinas) cumplen un papel crítico en la regulación de la termomorfogénesis mediada por PIF4. Por ejemplo, PIF4 activa en forma directa la expresión de genes de biosíntesis de auxinas (como aquellos pertenecientes a la familia *YUCCA*) durante la termomorfogénesis, lo incrementa los niveles de la fitohormona en los tejidos aéreos con la consiguiente elongación del hipocótilo (Sun et al., 2012).

Título del proyecto: Identificación de condiciones ambientales y factores que afectan la estabilidad de secuencias repetitivas en *Arabidopsis thaliana*.

Instrumento: PICT (GRF I)

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: ANPCyT

Director: Capella, Matías

Con respecto a la regulación transcripcional, se demostró recientemente que la inducción de los niveles de transcrito de *YUCCA2* durante la respuesta de termomorfogénesis es regulada por la metilación del ADN en el contexto CG (Fonouni-Farde et al., 2022). La metilación del ADN es una modificación epigenética conservada en eucariotas y procariontes, que es importante para la regulación génica y para mantener la estabilidad del genoma. En plantas, involucra principalmente la adición de un grupo metilo a bases de citosina en los contextos CG, CHG y CHH (donde H puede ser A, T o C). Esta modificación en la cromatina se establece por el mecanismo de metilación del ADN dirigido por ARN, que requiere de la metiltransferasa DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2) y de proteínas involucradas en la generación y función de ARN pequeños de interferencia (Matzke and Mosher, 2014). A su vez, la metilación del ADN en los contextos CG, CHG y CHH son mantenidos por METHYLTRANSFERASE 1 (MET1), CHROMOMETHYLASE 3 (CMT3)/CMT2, y DRM2/CMT2, respectivamente. A pesar de su importancia en la respuesta a estrés abiótico (Liu and He, 2020), aún se desconoce si la metilación del ADN en el contexto CHG y CHH cumple alguna función durante el proceso de termomorfogénesis.

## OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es evaluar el papel que cumple la metilación del ADN en la respuesta de las plantas a las elevadas temperaturas.

## METODOLOGÍA

En este proyecto, se trabajó con plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* ecotipos Columbia 0 (Col-0), Sha y Nossen. A su vez, se utilizó la mutante insercional *drm1-2 drm2-2 cmt3-11* (*ddc*; CS16384). El cultivo de plantas se realizó en cámara de cultivo con iluminación y temperatura controladas, y condiciones de fotoperíodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Los ensayos para análisis de hipocótilos se llevaron a cabo en placas estériles con medio de cultivo Murashige & Skoog (MS), donde las plántulas se crecieron a 22°C durante 3 días para luego ser expuestas a 22°C (control) o 29°C por 3 días más. La inhibición de la metilación del ADN se realizó cultivando las plántulas en medio MS agar suplementado con 5-azacitidina 50 µM. Los ensayos con luz roja se realizaron creciendo plántulas salvajes y mutantes a 22°C o 29°C durante 5 días, envolviendo las placas en 3 capas de papel celofán rojo. Para el análisis de los hipocótilos, al menos 25 plántulas por placa de cada genotipo fueron escaneadas, y la longitud de los hipocótilos se cuantificó utilizando el software ImageJ. El estudio de la distribución de auxinas en plántulas salvajes se evaluó analizando el patrón de expresión del gen reportero que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*), regulado

por un promotor artificial sensible a la presencia de la hormona (denominado *DR5*) mediante reacciones histoquímicas.

Para los estudios transcripcionales, las plántulas salvajes y mutantes fueron crecidas en placa a 22°C durante 4 días, para luego ser expuestas a 22°C (control) o 29°C por 24 h adicionales. Dichas muestras fueron utilizadas para extracciones de ARN total, y síntesis de ADNc por retrotranscripción seguido por PCR semi-cuantitativa en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos. Los niveles de expresión fueron calculados utilizando el método  $\Delta\Delta Ct$ , empleando la expresión del gen *PP2A.A3* como normalizador.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

Para evaluar si la metilación del ADN regula la respuesta de termomorfogénesis, evaluamos la elongación del hipocótilo en plántulas salvajes y mutantes triple *drm1 drm2 cmt3 (ddc)*; que carecen de metilación del ADN en los contextos CHG y CHH) al ser expuestas a 29°C. Como se demostró con anterioridad, las plántulas salvajes presentaron una longitud mayor del hipocótilo a 29°C comparado con su control a 22°C. Sin embargo, las mutantes *ddc* no elongaron el hipocótilo en condiciones de elevadas temperaturas. En forma complementaria, las plántulas salvajes crecidas en presencia de la droga 5-azacitidina, que inhibe la actividad de las ADN metiltransferasas, exhibieron hipocótilos más cortos que los controles al ser expuestas a 29°C. Resultados similares se obtuvieron al analizar plántulas de otros ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, como Sha y Nossen, crecidas en medios suplementados con 5-azacitidina. En conjunto, estos resultados indican que la metilación del ADN es necesaria para la elongación del hipocótilo en respuesta a las elevadas temperaturas.

Las auxinas son necesarias para el crecimiento de los hipocótilos en respuesta a las elevadas temperaturas (Casal and Balasubramanian, 2019), por lo que la metilación del ADN podría regular la respuesta de termomorfogénesis a través de dicha fitohormona. Para evaluarlo, se crecieron plántulas *DR5::GUS* en presencia o ausencia de 5-azacitidina, y se expusieron a 22°C o 29°C. Mientras que la actividad GUS mostró una inducción a 29°C comparado con 22°C, el tratamiento con la droga inhibió el pico de auxinas a elevadas temperaturas. Este resultado sugiere que la metilación del ADN regula los niveles de auxinas durante la termomorfogénesis.

Para comprender a nivel molecular cómo la metilación del ADN afecta la elongación del hipocótilo durante la termomorfogénesis, analizamos los niveles de transcripto mediante PCR cuantitativa de varios de los genes blanco de PIF4 en plántulas salvajes y mutantes *ddc* crecidas a 22°C por 4 días y expuestas a 29°C durante 24 horas. La expresión de varios de estos genes no se modificó en plántulas *ddc*, mientras que se indujeron en sus pares salvajes

expuestas a 29°C. A su vez, se observó un incremento de los niveles de transcripto de *PIF4* a 29°C tanto en las plántulas salvajes como en las mutantes *ddc*. Estos resultados sugieren que la metilación del ADN podría influir en la actividad de PIF4 durante la termomorfogénesis. El receptor de luz azul CRYPTOCHROME 1 (*CRY1*) inhibe la actividad de PIF4 a elevadas temperaturas, y su expresión se regula por la formación de un bucle en la cromatina mediada por la metilación del ADN (Arce et al., 2023; Ma et al., 2016). En base a esto, analizamos si la falta de respuesta a las elevadas temperaturas en las mutantes *ddc* se debe a una regulación diferencial de *CRY1*. En primer lugar, cuantificamos los niveles de transcripto de *CRY1*, que se inducen en plántulas salvajes expuestas a 29°C. En las mutantes *ddc* crecidas a 22°C, la transcripción de *CRY1* se encuentra elevada comparadas con sus controles salvajes, y dicha expresión se mantiene constante al ser expuestas a 29°C. Esto sugiere que las elevadas temperaturas regulan la expresión de *CRY1* en una manera dependiente de la metilación del ADN. Debido a que *CRY1* requiere de luz azul para activarse, analizamos el largo del hipocótilo de plántulas salvajes y mutantes *ddc* crecidas a 22°C o 29°C en luz roja. Las plántulas mutantes exhibieron una elongación del hipocótilo similar a sus pares salvajes, lo que sugiere que la falta de luz azul revierte la inhibición de la respuesta termomorfogénica observada en las mutantes *ddc*. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la metilación del ADN controla la respuesta de las plantas a las elevadas temperaturas mediante la regulación de la expresión del criptocromo *CRY1*.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Arce, A. L., Mencia, R., Cambiagno, D. A., Lang, P. L., Liu, C., Burbano, H. A., Weigel, D. and Manavella, P. A.** (2023). Polymorphic inverted repeats near coding genes impact chromatin topology and phenotypic traits in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Rep.* **42**,.
- Casal, J. J. and Balasubramanian, S.** (2019). Thermomorphogenesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **70**, 321–346.
- Delker, C., Quint, M. and Wigge, P. A.** (2022). Recent advances in understanding thermomorphogenesis signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **68**, 102231.
- Fonouni-Farde, C., Christ, A., Blein, T., Legascue, M. F., Ferrero, L., Moison, M., Lucero, L., Ramírez-Prado, J. S., Latrasse, D., Gonzalez, D., et al.** (2022). The *Arabidopsis* APOLO and human UPAT sequence-unrelated long noncoding RNAs can modulate DNA and histone methylation machineries in plants. *Genome Biol.* **23**, 181.
- Liu, J. and He, Z.** (2020). Small DNA Methylation, Big Player in Plant Abiotic Stress Responses and Memory. *Front. Plant Sci.* **11**,.
- Ma, D., Li, X., Guo, Y., Chu, J., Fang, S., Yan, C., Noel, J. P. and Liu, H.** (2016). Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 224–229.
- Matzke, M. A. and Mosher, R. A.** (2014). RNA-directed DNA methylation: An epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 394–408.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J. and Li, C.** (2012). PIF4-Mediated Activation of YUCCA8 Expression Integrates Temperature into the Auxin Pathway in Regulating *Arabidopsis* Hypocotyl Growth. *PLoS Genet.* **8**, e1002594.