



EL DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana* FRENTE A CONDICIONES ADVERSAS Y EL PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP **Canello, Alejo**

*Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL, CONICET-UNL), Laboratorio de Biología Molecular (LBM-IAL).
Centro Científico Tecnológico Santa Fe (CCT-Santa Fe). Colectora Ruta Nacional N° 168 km. 472.
Director/a: Ivana Lorena Viola
Codirector/a: Antonela Lucía Alem*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Estrés abiótico, ABA, TCP

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. Los factores de transcripción juegan un papel clave en esta adaptación, lo que los convierte en moléculas de interés para comprender los mecanismos que emplean las plantas para tolerar el estrés. Un grupo importante son las proteínas de la familia TCP, exclusivas de plantas, que ejercen efectos sobre múltiples aspectos del desarrollo. Además, traducen señales endógenas y ambientales en respuestas de crecimiento y adaptativas (Viola y col., 2023). 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 que culminan en la tolerancia hacia el estrés (Chen y col., 2020). A partir de estudios realizados en nuestro laboratorio encontramos evidencias que indican que las proteínas TCP actuarían como reguladores de la respuesta a salinidad y la hormona de respuesta a ABA. Observamos que plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* presentan una inhibición mayor en el crecimiento de la raíz principal y en el establecimiento de plántulas frente a ABA en comparación a plantas salvajes. Por otro lado, plantas que sobreexpresan *TCP15* presentan menor sensibilidad a la hormona. Por último, mediante el uso de sistemas de genes reporteros se observó que la expresión transcripcional de *TCP14* y *TCP15* se inhibe frente a tratamiento con ABA. Sin embargo, se desconoce en gran medida el papel de los factores de transcripción TCP en la respuesta a estrés abiótico, como salinidad, así como los mecanismos moleculares mediante los cuales se integrarían a las vías de regulación de la hormona ABA.

OBJETIVOS

En base a lo expuesto, este trabajo tiene como objetivo la realización de estudios funcionales de las proteínas TCP de *Arabidopsis thaliana* en respuesta al estrés abiótico. Se busca entender su relación con la vía de ABA en la modulación de programas de desarrollo y

Título del proyecto: Mecanismos moleculares involucrados en la adaptación de *Arabidopsis thaliana* al estrés abiótico

Instrumento: PIP2022-2024. Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Ivana Viola



crecimiento vegetal frente a cambios ambientales, así como los mecanismos moleculares involucrados. Para esto se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el papel de *TCP14* y *TCP15* en respuesta a salinidad.
2. Identificar genes regulados directa o indirectamente por las proteínas TCP en estudio durante la respuesta a la hormona de respuesta a estrés abiótico ABA.
3. Dilucidar los mecanismos moleculares de acción de *TCP15* durante la respuesta a ABA.

METODOLOGÍA

Material vegetal: Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), mutantes dobles *tcp14-4 tcp15-5*, plantas sobreexpresantes de *TCP15* y plantas que expresan *TCP15* en forma inducible por estradiol, todas caracterizadas previamente en nuestro laboratorio (Viola y col., 2016; Camoirano y col., 2020; Alem y col., 2022).

Estudios fenotípicos: Estudios de longitud de la raíz principal: las semillas fueron sembradas en placas de cultivo cuadradas con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 0.5X agarizado al 1%. Las placas fueron incubadas en orientación vertical a 22°C bajo fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, durante 48 hs y luego transferidas a placas de cultivo con medio MS 1X 0,8% agar-agar adicionado con NaCl 0; 150 y 300 mM por 7 días. Establecimiento en presencia de NaCl: las semillas se dispusieron en placas con MS 0,5X suplementado con NaCl 150 mM y sacarosa 1% y se crecieron en 16 h de luz/8 h de oscuridad a 22°C.

Preparación y análisis de ARN: La preparación de ARN se realizó utilizando el reactivo TRIzol seguido de precipitación con LiCl. La retrotranscripción se realizó con un cebador oligo (dT) y la enzima MMLV transcriptasa reversa (Promega). La PCR en tiempo real se realizó en un aparato StepOne (Applied Biosystems) con cebadores específicos (ANEXO I) y SYBR Green. La expresión de los genes se calculó utilizando el método $\Delta\Delta C_t$.

Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP): Se realizó utilizando anticuerpos anti-GFP (Abcam ab6556) o anti-IgG (Abcam ab6702). La cuantificación se realizó mediante qPCR con el kit comercial iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Una fracción de cromatina sonicada sin inmunoprecipitar se procesó en paralelo y se consideró como la muestra de entrada (input).

En todos los casos se utilizó el software GraphPad Prism 6 para analizar los datos y producir los gráficos. En todos los experimentos se emplearon semillas que procedían de plantas que fueron cultivadas en las mismas condiciones a fin de evitar efectos artefactuales no relacionados con las diferencias genéticas entre las distintas líneas. Cada experimento se repitió al menos 3 veces y en cada uno de ellos se analizaron 3 réplicas biológicas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Durante nuestro estudio del papel de las proteínas TCP en el desarrollo de *Arabidopsis* en respuesta a estrés abiótico observamos que plantas mutantes en *TCP14* y *TCP15* son más tolerantes al crecimiento en altas concentraciones NaCl, mientras que las que sobreexpresan *TCP15* son más sensibles. Estos hallazgos sugieren que las proteínas TCP participarían de la adaptación al crecimiento en NaCl. A fin de estudiar en más detalle la relación que existe entre el accionar de las proteínas TCP y la respuesta de las plantas a estrés abiótico analizamos la capacidad de crecimiento de la raíz principal y de establecimiento frente a salinidad de plántulas con niveles alterados de *TCP14* y *TCP15*. Observamos que las mutantes dobles en *TCP14* y *TCP15* (*tcp14 tcp15*) presentan una mayor inhibición en la capacidad de elongación de la raíz principal y en la capacidad de establecimiento en presencia de NaCl que las plantas salvajes (**Figura 1A y 1B**). Lo que sugiere que las mutantes en *TCP14* y *TCP15* presentan una mayor sensibilidad a NaCl que las plantas salvajes.

Dado que la hormona ABA está involucrada en la respuesta adaptativa de las plantas a estrés

abiótico, como salinidad, analizamos la capacidad de establecimiento de las plántulas mutantes *tcp14 tcp15* en presencia de esta hormona y observamos que, de modo similar a lo que ocurre en presencia de NaCl, las mutantes *tcp14 tcp15* presentan una mayor sensibilidad que las plantas salvajes (**Figura 1D**). Además, observamos que se produce un mayor retraso en el crecimiento de la raíz principal de la mutante *tcp14 tcp15* que en las plantas salvajes cuando plántulas de 3 días son transferidas a medios con distintas concentraciones de ABA (**Figura 1C**). Esto indica que las mutantes *tcp14 tcp15* presentan un fenotipo de hipersensibilidad a ABA durante el desarrollo de las plántulas. Para confirmar estas observaciones, evaluamos la sensibilidad a ABA de plantas que sobreexpresan TCP15 (35S::TCP15). Observamos que, de manera opuesta a las mutantes *tcp14 tcp15*, las plantas que sobreexpresan TCP15 son menos sensibles a ABA que las plantas salvajes (**Figura 1C y Figura 1D**).

En conjunto, estos resultados indican que estas proteínas participarían en la respuesta de las plantas a ABA.

A fin de dilucidar los mecanismos moleculares involucrados, se realizaron estudios de expresión génica en los que encontramos que la expresión del gen de biosíntesis de ABA *ABA1* se encuentra afectada en la mutante *tcp14 tcp15*, mientras que la expresión de los genes de respuesta a ABA *ABI4*, *ABI5*, *EM1*, *EM6*, *RAB18* y *RD29A* se encuentra significativamente aumentada en comparación con las plantas salvajes (**Figura 1E**). Por otra parte, la expresión de los reguladores negativos de la vía de señalización de ABA *WRKY40*, *RAV1* y *AFP2* se encuentra significativamente afectada en esta mutante en comparación con las plantas salvajes (**Figura 1F**). Además, observamos que la expresión de *RAV1* y *AFP2* es significativamente mayor en las plantas que sobreexpresan TCP15 (**Figura 1F**). Estos resultados sugieren que TCP14 y/o TCP15 actuarían como reguladores negativos de la respuesta a ABA.

Los factores de transcripción reconocen secuencias específicas de ADN corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción para regular la expresión de sus genes blanco. Dado que los genes *WRKY40*, *RAV1* y *AFP2* poseen sitios de unión TCP en sus regiones promotoras, decidimos evaluar si TCP15 se une a estos promotores *in vivo* en plantas. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) pudimos confirmar que TCP15 se asocia a las cajas TCP en los promotores de *WRKY40*, *RAV1* y *AFP2* (**Figura 1G**). Estos resultados, junto con los ensayos fenotípicos, sugieren que TCP14 y TCP15 serían componentes importantes del módulo regulatorio que controla el crecimiento de las plantas en respuesta a ABA y estrés abiótico.

En conjunto, nuestros resultados nos permiten plantear un modelo donde TCP14 y TCP15 afectarían negativamente la vía de señalización de ABA en condiciones normales, donde, en condiciones normales, TCP14 y TCP15 afectarían negativamente la vía de señalización de ABA a través de inducir directamente la expresión de *WRKY40*, *AFP2* y *RAV1* que inhiben la respuesta a esta hormona a través de reprimir la expresión de los genes de respuesta a ABA *ABI4* y *ABI5*, que a su vez inducen la expresión de *EM1*, *EM6*, *RD29A* y *RAB18*, entre otros. Mientras que, en situaciones de estrés abiótico, el aumento en los niveles de ABA afectaría a las proteínas TCP y los reguladores negativos de la respuesta a ABA, conduciendo así a la respuesta ante las condiciones ambientales adversas.

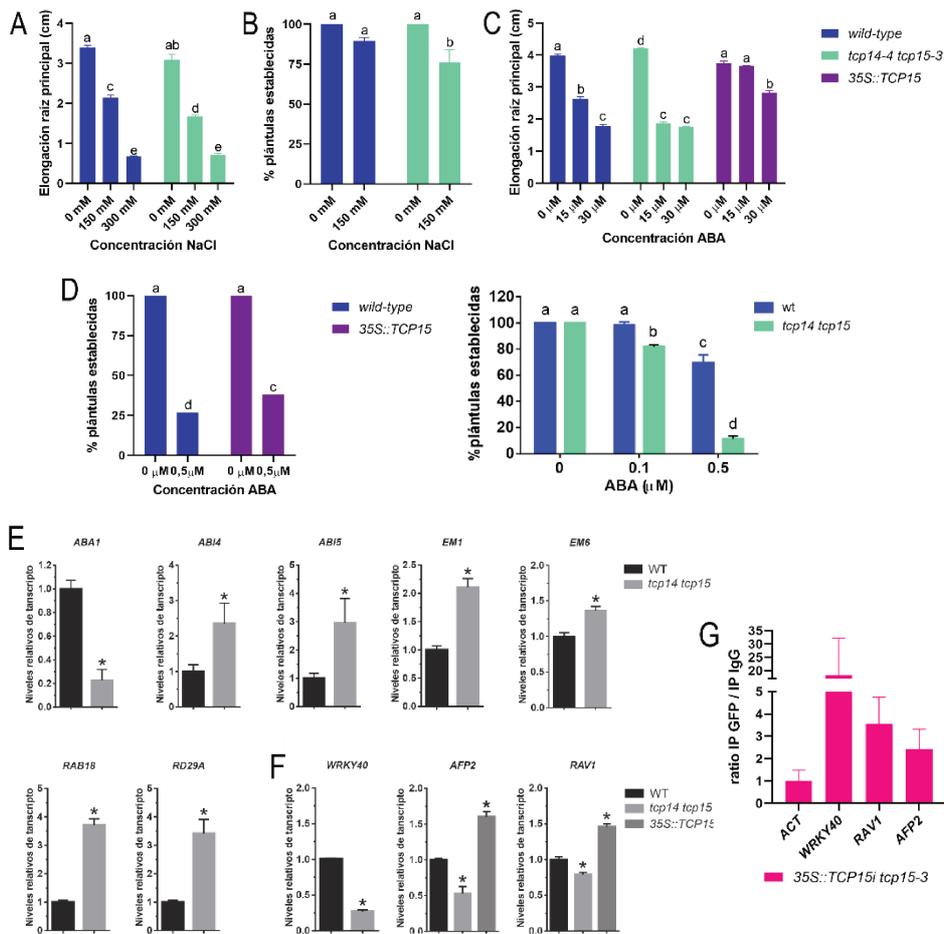


Figura 1. (A-D) Efecto de NaCl y ABA exógeno sobre la longitud de la raíz principal (A,C) y la capacidad de establecimiento (B,D) de plántulas de los genotipos indicados. **(E,F)** Análisis cuantitativo por RT-qPCR de los niveles de transcripción de los genes de la vía de síntesis y señalización de ABA en plantas salvajes (WT), mutantes *tcp14 tcp15* y sobreexpresantes de TCP15. Los valores se expresan relativos a las plantas salvajes. Las barras indican la media \pm SEM de tres muestras biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tipo salvaje. **G)** Experimento de inmunoprecipitación de la cromatina Análisis de la unión de TCP15 a los promotores de *WRKY40*, *RAV1* y *AFP2* por ChIP-qPCR. El gen *ACT* se utilizó como control negativo. A-G. Las barras indican el promedio \pm SEM de tres réplicas biológicas. Las letras y asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$; ANOVA y $P < 0.05$; prueba t de Student, respectivamente). Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares.

BIBLIOGRAFÍA

- Alem AL, Ariel FD, Cho Y, Hong JC, Gonzalez DH, Viola IL.** (2022) TCP15 interacts with GOLDEN2-LIKE 1 to control cotyledon opening in Arabidopsis. *Plant Journal* 110, 748-763.
- Camoirano A, Arce AL, Ariel FD, Alem AL, Gonzalez DH, Viola IL.** (2020) Class I TCP transcription factors regulate trichome branching and cuticle development in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 71, 5438-5453.
- Chen K, Li GJ, Bressan RA, Song CP, Zhu JK, Zhao Y.** (2020) Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *J Integr Plant Biol* 62, 25-54.
- Viola IL, Alem AL, Jure RM, Gonzalez DH.** (2023) Physiological Roles and Mechanisms of Action of Class I TCP Transcription Factors. *Int J Mol Sci.* 24, 5437.
- Viola IL, Camoirano A, Gonzalez DH.** (2016) Redox-Dependent Modulation of Anthocyanin Biosynthesis by the TCP Transcription Factor TCP15 during Exposure to High Light Intensity Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 170, 74-85.