ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP ARABIDOPSIS THALIANA EN LA RESPUESTA A NITRATO

Eckell, Candela

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

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: factores de transcripción TCP, señalización de nitrato, expresión génica

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de la familia TCP son factores de transcripción exclusivos de plantas que ejercen efectos sobre una gran cantidad de aspectos del desarrollo como la embriogénesis, la germinación, el desarrollo de hojas, la formación de ramificaciones laterales, la morfogénesis floral, la germinación, la senescencia, el ritmo circadiano, la regulación del ciclo celular y la señalización hormonal (**Uberti Manassero et al**., 2013; **Dhaka et al**., 2017). Las proteínas de esta familia contienen un motivo muy conservado, denominado TCP, que está involucrado en la interacción con el ADN y la formación de dímeros. En base a la similitud de secuencia dentro y fuera de este dominio las proteínas que lo contienen se dividen en dos clases: I y II (**Cubas et al**., 1999). En nuestro laboratorio nos hemos dedicado a estudiar el funcionamiento de las proteínas TCP como coordinadoras del desarrollo en plantas en respuesta a señales internas y del medioambiente.

En cuanto al nitrógeno este es un componente esencial para la planta y su adquisición es crucial para su crecimiento y desarrollo. El nitrato (NO_3^-) es una de las formas más comunes de nitrógeno disponible para las plantas en el suelo. A diferencia del amonio (NH_4^+), el nitrato es más fácilmente absorbido por las raíces y es menos tóxico en altas concentraciones. El nitrato no solo es esencial para la síntesis de aminoácidos y proteínas, sino que también influye en otros aspectos del crecimiento vegetal (como la fotosíntesis y la arquitectura de la planta) y el desarrollo durante el ciclo de vida de la planta (Figura 1.) Este diagrama representa las principales transiciones de la fase de desarrollo controladas por el nitrato. (**Fredes et al**., 2019).

En este proceso, ya se ha reportado que una de las proteínas de la familia TCP de clase I, específicamente TCP 20 es un regulador clave, afecta la vía de señalización sistémica que dirige el desarrollo de las raíces laterales durante la búsqueda de nitrato. Además, bajo falta de nitrato, TCP20 también controla la expresión de genes clave sensibles a los nitratos, del ciclo celular y la división celular en el meristema de la raíz. (**Peizhu et al**.,2017).

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

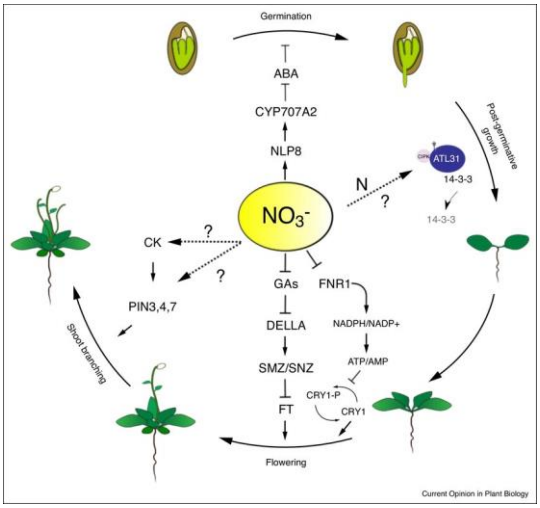

Figura 1. Cambios en la fase de desarrollo provocados por el nitrato durante el ciclo de vida de la planta. **Fredes et al**., 2019.

TCP20 contribuye a la proliferación celular, lo que es esencial para el desarrollo de raíces laterales que es especialmente importante en condiciones de escasez de nitrato, donde la planta necesita expandir su sistema radicular para buscar más eficientemente este nutriente.

En principio, un análisis de datos de expresión global de plantas que expresan una forma represora de TCP15 bajo el control de su propio promotor (*p15::TCP15-EAR*) realizado en nuestro laboratorio nos permitió observar que un grupo significativo de genes inducidos por nitrato se encuentra reprimido en estas plantas, mientras que lo contrario ocurre con los genes reprimidos por nitrato.

OBJETIVOS

Objetivo General:

En base a lo expuesto, los datos presentes en la bibliografía y los resultados previos obtenidos en el laboratorio nos proponemos como objetivo estudiar el papel que tienen las proteínas TCP de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta a distintos niveles de nitrato.

Objetivos Específicos:

1. Estudiar el papel de las proteínas TCP14 y TCP15 en la expansión de cotiledones frente a las variaciones de la concentración de nitrato.
2. Analizar el patrón de expresión de TCP 14 y TCP15 usando fusiones al gen reportero gus (plantas *pTCP14::TCP14-GUS* y *pTCP15:TCP15-GUS* disponibles en nuestro laboratorio) frente a la respuesta a nitrato.
3. Medición de la expresión de genes de respuesta a nitrato en función de la variación de la concentración de nitrato.

METODOLOGÍA

Material vegetal: Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), como plantas salvajes, y líneas mutantes simples, dobles y triples en los genes *TCP 8*, *TCP14* y *TCP15*(*tcp14-6*, *tcp15-3* y *tcp14-4 tcp15-3*, *tcp8-1 tcp14-4 tcp15-3*) que han sido

previamente caracterizadas a nivel fenotípico y molecular en nuestro laboratorio (**Viola et al**., 2016; **Ferrero et al**., 2019; **Camoirano et al**., 2020; **Alem et al**.,2022).

Estudios fenotípicos: Para los ensayos de expansión de los cotiledones las semillas de los genotipos a analizar fueron esterilizadas y luego vernalizadas durante 4 días a 4 °C en oscuridad. A continuación, fueron sembradas en placas de cultivo con medio MS 1X sin nitrato de potasio (KNO3) o medio MS 1X con 5mM nitrato, respectivamente + 0,8% agar-agar.
La germinación fue inducida colocando las placas de cultivo bajo luz blanca (90 µmol m-2 s-1) durante 5 h a 22 °C. Luego, las placas fueron envueltas en varias capas de láminas de aluminio y colocadas en oscuridad total. a 22 °C por 48 h.
Las plántulas se expusieron luz blanca durante 3,6, y 12 días a una temperatura de 22 °C. Finalizado este tratamiento, las plántulas fueron colocadas sobre agarosa y fotografiadas. Las mediciones del área de los cotiledones se realizaron usando ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij, National Institutes of Health). Para cada genotipo se analizaron 40 plántulas por cada condición ensayada.
Ensayos de actividad β-glucuronidasa por histoquímica: Plántulas de 7 días tratadas crecimiento MS 1X sin nitrato de potasio (KNO3) y luego transferidas durante 3 días a un medio MS 1X con 5 mM de nitrato de potasio (KNO3) o medio MS sin nitrato respectivamente. Se colocaron en 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 y se visualizaron con Lupa Leica MZ10F.

RESULTADOS

En el ensayo de expansión de cotiledones inducida por iluminación (aumento del tamaño de los mismos), observamos que las plantas mutantes en los genes *TCP14* y *TCP15* presentan un defecto significativo en este proceso. En particular, el tamaño de los cotiledones de las plantas cultivadas en medios con diferentes concentraciones de nitrato de potasio (KNO3) mostró que las mutantes *tcp14 tcp15* tienen una respuesta deficiente a la falta de nitrato.

Además, las plantas mutantes triples *tcp8 tcp14 tcp15* presentaron cotiledones de tamaño similar al de las plantas silvestres (wt), indicando que *TCP8*, *TCP14* y *TCP15* pueden interactuar funcionalmente en las vías que regulan la expansión de cotiledones.

Por otra parte, mediante ensayos de actividad β-glucuronidasa por histoquímica se logró observar la expresión de *TCP14* y *TCP15* en cotiledones en desarrollo y en semillas germinantes. Este análisis mostró que la expresión de *TCP14* y *TCP15* se induce en condiciones de deficiencia de nitrato y disminuye con un tratamiento de 5 mM de nitrato.

CONCLUSIONES

El resultado del análisis del fenotipo de cotiledones sugiere que las proteínas TCP14 y TCP15 podrían actuar como promotoras del crecimiento en respuesta a nitrato. TCP8, sin embargo, podría tener un rol diferente al de TCP14 y TCP15 en la expansión de cotiledones y la respuesta al nitrato, ya que su mutación combinada con tcp14 y tcp15 resultó en una recuperación del fenotipo al de las plantas wt.

De esta forma, estos resultados sumados a los datos de expresión global de los genes que son regulados por TCP15 y por la disponibilidad de nitrógeno, sugieren que TCP8, TCP14 y TCP15 estarían involucrados en la regulación del crecimiento en función de la disponibilidad de nitrato, coordinando así la respuesta al nitrato con la disponibilidad de energía.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

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.

Dening Yeb,1, and Nigel M. Crawforda. (2017) Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. PNAS.

Peizhu Guana, Juan-José Ripolla, Renhou Wanga, Lam Vuonga, Lindsay J. Bailey-Steinitza, Uberti Manassero, N.G., Viola, I.L., Welchen, E. and Gonzalez, D.H. (2013) TCP transcription factors: Architectures of plant form. Biomol. Concepts, 4.

Peizhu Guana, Rongchen Wanga,1, Philippe Nacryb, Ghislain Bretonc, Steve A. Kayd, Jose L. Pruneda-Paza, Ariea Davania, and Nigel M. Crawford (2014) Nitrate foraging by *Arabidopsis* roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. PNAS.

Takatoshi Kiba,a,1 Jun Inaba,a Toru Kudo,b Nanae Ueda,a Mineko Konishi,c Nobutaka Mitsuda,d Yuko Takiguchi. (2018) Repression of Nitrogen Starvation Responses. The Plant Cell, Vol. 30: 925–945.

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.

XXVII Encuentro de Jóvenes Jóvenes Investigadores

1 al 4 de octubre de 2024 | Santa Fe Argentina

ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN TCP ARABIDOPSIS THALIANA EN LA RESPUESTA A NITRATO

Eckell, Candela

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

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: factores de transcripción TCP, ~~factores de transcripción, TCP, nitrógeno~~señalización de nitrato, expresión génica

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de la familia TCP son factores de transcripción exclusivos de plantas que ejercen efectos sobre una gran cantidad de aspectos del desarrollo como la embriogénesis, la germinación, el desarrollo de hojas, la formación de ramificaciones laterales, la morfogénesis floral~~, el desarrollo de polen~~, la germinación, la senescencia, el ritmo circadiano, la regulación del ciclo celular y la señalización hormonal (**Uberti Manassero et al.**, 2013; **Dhaka et al.**, 2017). Las proteínas de esta familia contienen un motivo muy conservado, denominado TCP, que está involucrado en la interacción con el ADN y la formación de dímeros. En base a la similitud de secuencia dentro y fuera de este dominio las proteínas que lo contienen se dividen en dos clases: I y II (**Cubas et al.**, 1999). En nuestro laboratorio nos hemos dedicado a estudiar el funcionamiento de las proteínas TCP como coordinadoras del desarrollo en plantas en respuesta a señales internas y del medioambiente.

En cuanto al nitrógeno este es un componente esencial para la planta y su adquisición es crucial para su crecimiento y desarrollo. El nitrato (NO_3^-) es una de las formas más comunes de nitrógeno disponible para las plantas en el suelo. A diferencia del amonio (NH_4^+), el nitrato es más fácilmente absorbido por las raíces y es menos tóxico en altas concentraciones. El nitrato no solo es esencial para la síntesis de aminoácidos y proteínas, sino que también influye en otros aspectos del crecimiento vegetal (como la fotosíntesis y la arquitectura de la planta) y el desarrollo durante el ciclo de vida de la planta (Figura 1.) Este diagrama representa las principales transiciones de la fase de desarrollo controladas por el nitrato. (**Fredes et al.**, 2019).

En este proceso, ya se ha reportado que una de las proteínas de la familia TCP de clase I, específicamente TCP 20 es un regulador clave~~ en la vía de señalización sistémica que controla la arquitectura del sistema radicular en Arabidopsis~~, ~~. TCP 20 se une al promotor y activa la expresión del gen NRT1.1 (transportador de nitrato 1.1), el cual codifica una proteína que actúa como transportador de auxinas (grupo de hormonas) y como sensor de nitratos,~~ afecta~~ndo así~~ la vía de señalización sistémica que dirige el desarrollo de las raíces laterales durante la búsqueda de nitrato. Además, bajo falta de nitrato, TCP20 también controla la expresión de genes clave sensibles a los nitratos, del ciclo celular y la división celular en el meristema de la raíz. (**Peizhu et al.**,2017).

Con formato: Fuente: 9 pto
Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial
Con formato: Fuente: 10 pto, Negrita
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: 10 pto, Negrita
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial
Con formato: Fuente: 10 pto, Negrita
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: 10 pto, Negrita
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial
Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial
Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial
Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: 10 pto, Negrita
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: 10 pto, Negrita
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: 10 pto
Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial

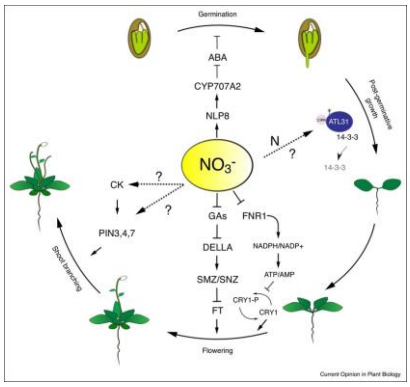

Figura 1. Cambios en la fase de desarrollo provocados por el nitrato durante el ciclo de vida de la planta. **Fredes et al.**, 2

Con formato: Fuente: Negrita

~~Además, bajo falta de nitrato, TCP20 también interactúa con los factores de transcripción NLP6 y NLP7, controlando la expresión de genes clave sensibles a los nitratos y regulando la expresión del gen del ciclo celular CYCB1;1 y la división celular en el meristema de la raíz. TCP~~

TCP20 contribuye a la proliferación celular, lo que es esencial para el desarrollo de raíces laterales que es especialmente importante en condiciones de escasez de nitrato, donde la planta necesita expandir su sistema radicular para buscar más eficientemente este nutriente.

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial

En principio, un análisis de datos de expresión global de plantas que expresan una forma represora de TCP15 bajo el control de su propio promotor (*p15::TCP15-EAR*) realizado en nuestro laboratorio nos permitió observar que un grupo significativo de genes inducidos por nitrato se encuentra reprimido en estas plantas, mientras que lo contrario ocurre con los genes reprimidos por nitrato. ~~(Figura 2).~~

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial, Cursiva

Con formato: Fuente: (Predeterminada) Arial

	15EAR up (736)	15EAR down (537)
N_up (2167)	0 (53)	9.2 (96)
N_down (1264)	22.7 (163)	0 (12)

Título del proyecto: “Mecani s en la adaptación de Arabidopsis thaliana al estrés

Instrumento: PIP2022-2024. Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Ivana Viola

OBJETIVOS

Objetivo General:

En base a lo expuesto, los datos presentes en la bibliografía y los resultados previos obtenidos en el laboratorio nos proponemos como objetivo estudiar el papel que tienen las proteínas TCP de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta a distintos niveles de nitrato.

Objetivos Específicos:

1. Estudiar el papel de las proteínas TCP14 y TCP15 en la expansión de cotiledones frente a las variaciones de la concentración de nitrato.
2. Analizar el patrón de expresión de TCP 14 y TCP15 usando fusiones al gen reportero gus (plantas *pTCP14::TCP14-GUS* y *pTCP15:TCP15-GUS* disponibles en nuestro laboratorio) frente a la respuesta a nitrato.
3. Medición de la expresión de genes de respuesta a nitrato en función de la variación de la concentración de nitrato.

METODOLOGÍA

Material vegetal: Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), como plantas salvajes, y líneas mutantes simples, dobles y triples en los genes *TCP 8*, *TCP14* y *TCP15*(*tcp14-6*, *tcp15-3* y *tcp14-4*, *tcp15-3*, *tcp8-1 tcp14-4 tcp15-3*) que han sido previamente caracterizadas a nivel fenotípico y molecular en nuestro laboratorio (**Viola et al**., 2016; **Ferrero et al.**, 2019; **Camoirano et al.**, 2020; **Alem et al.**,2022).

Estudios fenotípicos: Para los ensayos de expansión de los cotiledones las semillas de los genotipos a analizar fueron esterilizadas y luego vernalizadas durante 4 días a 4 °C en oscuridad. A continuación, fueron sembradas en placas de cultivo con medio MS 1X sin nitrato de potasio (KNO3) o medio MS 1X con 5mM nitrato, respectivamente + 0,8% agar-agar.
La germinación fue inducida colocando las placas de cultivo bajo luz blanca (90 µmol m-2 s-1) durante 5 h a 22 °C. Luego, las placas fueron envueltas en varias capas de láminas de aluminio y colocadas en oscuridad total. a 22 °C por 48 h.
Las plántulas se expusieron luz blanca durante 3,6, y 12 días a una temperatura de 22 °C. Finalizado este tratamiento, las plántulas fueron colocadas sobre agarosa y fotografiadas. Las mediciones del área de los cotiledones se realizaron usando ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij, National Institutes of Health). Para cada genotipo se analizaron 40 plántulas por cada condición ensayada.
Ensayos de actividad β-glucuronidasa por histoquímica: Plántulas de 7 días tratadas crecimiento MS 1X sin nitrato de potasio (KNO3) y luego transferidas durante 3 días a un medio MS 1X con 5 mM de nitrato de potasio (KNO3) o medio MS sin nitrato respectivamente. Se colocaron en 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 y se visualizaron con Lupa Leica MZ10F.

RESULTADOS

En el ensayo de expansión de cotiledones inducida por iluminación (aumento del tamaño de

Con formato

Con formato

Con formato

Comentado [CE1]: Las TCP se colocan en minúsculas cuando son mutantes como se aclara acá

Con formato

Con formato

Comentado [CE2]:

Comentado [CE3R2]: Es correcto citar de esta forma.

Código de campo cambiado

Con formato

los mismos), observamos que las plantas mutantes en los genes *TCP14* y *TCP15* presentan un defecto significativo en este proceso. En particular, el tamaño de los cotiledones de las plantas cultivadas en medios con diferentes concentraciones de nitrato de potasio (KNO3) mostró que las mutantes *tcp14 tcp15* tienen una respuesta deficiente a la falta de nitrato.

Además, las plantas mutantes triples *tcp8 tcp14 tcp15* presentaron cotiledones de tamaño similar al de las plantas silvestres (wt), indicando que *TCP8*, *TCP14* y *TCP15* pueden interactuar funcionalmente en las vías que regulan la expansión de cotiledones.

Por otra parte, mediante ensayos de actividad β-glucuronidasa por histoquímica se logró observar la expresión de *TCP14* y *TCP15* en cotiledones en desarrollo y en semillas germinantes. Este análisis mostró que la expresión de *TCP14* y *TCP15* se induce en condiciones de deficiencia de nitrato y disminuye con un tratamiento de 5 mM de nitrato.

CONCLUSIONES

El resultado del análisis del fenotipo de cotiledones sugiere que las proteínas TCP14 y TCP15 podrían actuar como promotoras del crecimiento en respuesta a nitrato. TCP8, sin embargo, podría tener un rol diferente al de TCP14 y TCP15 en la expansión de cotiledones y la respuesta al nitrato, ya que su mutación combinada con tcp14 y tcp15 resultó en una recuperación del fenotipo al de las plantas wt.

De esta forma, estos resultados sumados a los datos de expresión global de los genes que son regulados por TCP15 y por la disponibilidad de nitrógeno, sugieren que TCP8, TCP14 y TCP15 estarían involucrados en la regulación del crecimiento en función de la disponibilidad de nitrato, coordinando así la respuesta al nitrato con la disponibilidad de energía.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

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.

Dening Yeb,1, and Nigel M. Crawforda. (2017) Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. PNAS.

Peizhu Guana, Juan-José Ripolla, Renhou Wanga, Lam Vuonga, Lindsay J. Bailey-Steinitza, Uberti Manassero, N.G., Viola, I.L., Welchen, E. and Gonzalez, D.H. (2013) TCP transcription factors: Architectures of plant form. Biomol. Concepts, 4.

Peizhu Guana, Rongchen Wanga,1, Philippe Nacryb, Ghislain Bretonc, Steve A. Kayd, Jose L. Pruneda-Paza, Ariea Davania, and Nigel M. Crawford (2014) Nitrate foraging by *Arabidopsis* roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. PNAS.

Takatoshi Kiba,a,1 Jun Inaba,a Toru Kudo,b Nanae Ueda,a Mineko Konishi,c Nobutaka Mitsuda,d Yuko Takiguchi. (2018) Repression of Nitrogen Starvation Responses. The Plant Cell, Vol. 30: 925–945.

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.

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Fuente: Cursiva

Comentado [CE4]:

Con formato: Fuente: 10 pto

Santa Fe,31 de agosto de 2024

Estimado Evaluador,

Le enviamos una versión revisada del resumen del trabajo titulado “Estudio del papel de los factores de transcripción TCP *Arabidopsis thaliana* en la respuesta a nitrato” realizado bajo la dirección de Ivana Viola. En la versión revisada, consideramos todas las recomendaciones realizadas por usted, las cuales se responden punto por punto a continuación. También se subió un archivo con “control de cambios” para ayudar en el proceso de revisión.

Comentarios del evaluador:

Comentario 1:
Hola Candela! Muy interesante el trabajo! Te dejo algunas observaciones: Separar título y autor mediante un enter. Idem filiación y directora. Arabidopsis thaliana es nombre científico, debe ir en cursiva.
Respuesta:
Como ha sugerido, hemos realizado estas modificaciones en la nueva versión del resumen.

Comentario 2:
Palabras clave: la finalidad es ampliar el rango de búsqueda de tu trabajo, por lo cual se recomienda que no coincida con términos utilizados en el título.
Respuesta:
Es una convención internacional para resúmenes y publicaciones científicas que, entre las palabras clave se encuentren términos relevantes presentes en el título para permitir la búsqueda del artículo e incorporar otras que incluyan aspectos no descriptos en el título. De acuerdo a sus recomendaciones, hemos modificado las palabras clave del trabajo para ampliar el rango de búsqueda del mismo, pero sin eliminar las que son esenciales para su correcta visibilidad.

Comentario 3:
Citas de más de un trabajo: Ordenar alfabéticamente por apellido de primer autor, por ejemplo en: …..(Uberti Manassero et al., 2013; Dhaka et al., 2017)….. (APA 7° ed) Y col?? -> Fulanito et al., 2016. TODAS LAS CITAS EN UN MANUSCRITO DEBEN TENER EL MISMO ESTILO!!
Respuesta:
Muchas gracias por la observación. No habíamos notado estos errores en la carga de las citas. Entendemos que responden a errores producidos en la importación de las citas por parte las bases de datos de bibliografía (como por ej., Mendeley). Hemos unificado el estilo de las mismas en la nueva versión del manuscrito. Por otra parte, si bien de acuerdo a las normas establecidas para la escritura de artículos científicos las citas bibliográficas se ordenan por año de publicación en cada referencia, hemos modificado la forma de citar las referencias de acuerdo a sus usos y costumbres en la nueva versión del resumen.

Comentario 4:
Introducción extensa, con mucha información que está escasamente soportada por bibliografía (párrafos 2, 3, 4 y 5 sin una sola cita). Recomendación: corta y al pie, es un resumen, clarificar las ideas y ser conciso. Aplica para todo el trabajo. No soy del área, me costó mucho seguir un hilo y encontrar la idea.
Respuesta:
Lamentamos que Ud. no sea del área de la biología molecular vegetal.
El propósito de una Introducción es poner en contexto al lector sobre el estado del arte del tema abordado y que ha conllevado al planteo de la/s pregunta/s e hipótesis del trabajo, así como los objetivos que se

proponen en consecuencia. De acuerdo a lo sugerido por Ud., hemos modificado la Introducción para que sea más concreta. Esperamos que esta nueva versión sea más clara.

Comentario 5:
Objetivo general: Mejorar notablemente la redacción. Debe ser claro y conciso. "respuesta a nitrato" no es claro, mejorar la redacción para que se entienda si la respuesta es a distintos niveles de nitrato, a distintos momentos de aplicación de nitrato, a distintas formas de aplicación de nitrato, etc.
Respuesta:
Entendemos que al no ser del área de la biología de plantas hay términos o expresiones que le son ajenas al revisor. El término "respuesta a nitrato" es universalmente utilizado y aceptado en el campo de la biología vegetal para referirse a los mecanismos que desarrollan las plantas, tanto a nivel fisiológico como celular y molecular, para adaptarse a la disponibilidad de fuentes de nitrógeno para su crecimiento. Estas respuestas ocurren a muchos niveles y dependen de la fuente de nitrógeno (nitrato, amonio, etc), la concentración, biodisponibilidad, etc. A continuación, dejamos algunas citas de publicaciones en revistas de alto nivel internacional que le permitirán confirmar que los términos empleados en este trabajo, y particularmente en la sección Objetivos, se corresponden con los empleados comúnmente en la bibliografía:

- Delgado, L. D., Nunez-Pascual, V., Riveras, E., Ruffel, S., & Gutiérrez, R. A. (2024). Recent advances in local and systemic nitrate signaling in Arabidopsis thaliana. Current opinion in plant biology, 81, 102605. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102605
- Zhang, X., Zhang, Q., Gao, N., Liu, M., Zhang, C., Luo, J., Sun, Y., & Feng, Y. (2024). Nitrate transporters and mechanisms of nitrate signal transduction in Arabidopsis and rice. Physiologia plantarum, 176(4), e14486. https://doi.org/10.1111/ppl.14486
- Kobayashi, R., Ohkubo, Y., Izumi, M., Ota, R., Yamada, K., Hayashi, Y., Yamashita, Y., Noda, S., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2024). Integration of shoot-derived polypeptide signals by root TGA transcription factors is essential for survival under fluctuating nitrogen environments. Nature communications, 15(1), 6903. https://doi.org/10.1038/s41467-024-51091-5
- Lamig, L., Moreno, S., Álvarez, J. M., & Gutiérrez, R. A. (2022). Molecular mechanisms underlying nitrate responses in plants. Current biology : CB, 32(9), R433–R439. https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03.022
- Viola, I. L., Alem, A. L., Jure, R. M., & Gonzalez, D. H. (2023). Physiological Roles and Mechanisms of Action of Class I TCP Transcription Factors. International journal of molecular sciences, 24(6), 5437. https://doi.org/10.3390/ijms24065437

En el caso de las formas de aplicación de nitrógeno, los experimentos en plantas se realizan siempre agregando la fuente de nitrógeno, en este trabajo nitrato, al medio de cultivo. De acuerdo a nuestro entender, estas aclaraciones no se realizan en el planteo de Objetivos, sino que se detallan en la Metodología utilizada. La forma de aplicación de la fuente de nitrógeno y la metodología de realización de los experimentos está detallada en esa sección.

Comentario 6:
Objetivos son específicos (no particulares).
Respuesta:
Es correcto. Hemos realizado la modificación correspondiente en el texto.

Comentario 7:
ImageJ no se cita de esa manera. Revisar en el sitio web o googlear cómo citar ImageJ.
Respuesta:

La cita del software Image J es correcta. El sitio web mencionado en el resumen es correcto. Veánse por ejemplo: https://doi.org/10.1007/s11103-020-01075-y. Image J es un software desarrollado para análisis de imágenes científicas que en sus orígenes (llamado NIH Image) se encontraba en la web del National Institutes of Health (NIH) donde fue desarrollado. El sitio web mencionado en este resumen se usa en las publicaciones científicas y se encuentra activo. En la nueva versión del resumen, modificamos la cita del programa incluyendo a su desarrollador para mayor claridad.

Comentario 8:
TCP siempre en mayúscula o siempre en minúscula, no un mix.
Respuesta:
Entendemos que este comentario se debe a la lejanía del evaluador de la biología celular.
La nomenclatura que se utiliza en biología indica que los genes deben escribirse en mayúscula e itálica, por ej. ***TCP15***, mientras que las mutaciones en los mismos se indican en minúscula e itálica, por ej., ***tcp15-3***. Por otra parte, las proteínas se indican en mayúscula, por ej., **TCP15**, mientras que las construcciones génicas en mayúscula e itálica, por ej., ***35S::TCP15***. Por lo que las diferencias que observa en el manuscrito responden a que se mencionan genes o proteínas y no, a un mix.

Comentario 9:
Los resultados no están claramente presentados. No hay tablas ni figuras, no hay porcentajes ni datos obtenidos de mediciones en tus ensayos. Están expresados como conclusiones. MEJORAR ESO POR FAVOR!!
Respuesta:
El presente resumen forma parte de un trabajo que se espera enviar para su publicación en un futuro cercano y por la tanto los resultados son confidenciales. Debido a que en las ediciones anteriores del EJI los resúmenes se han publicado en internet, hemos consultado al Equipo organizador EJI 2024 (Secretaría de Ciencia, Arte y Tecnología de la UNL) al respecto y la respuesta recibida fue:

"Buenos días Candela,
Muchas gracias por comunicarse. Por un lado le informo que no es obligatorio incluir imágenes, gráficos u otros elementos visuales si no los considera necesarios para explicar su trabajo. Estos elementos se consideran herramientas adicionales para mejorar la comprensión del mismo. Tal vez, en la redacción de los lineamientos esto no quedó muy claro, por ello quería explicarlo."

En base a esta respuesta, realizamos el resumen sin la presentación de los resultados en formato de gráficos e imágenes. Estamos seguros que Ud. está al tanto del perjuicio que genera para las investigaciones que se llevan adelante en un laboratorio que se divulgue el detalle de las investigaciones que los estudiantes llevan a cabo, ya que de ser publicados en internet se invalidaría toda posibilidad posterior de registro de propiedad intelectual, patente o publicación científica. Por supuesto que los resultados serán presentados correctamente y en detalle en el poster y/o comunicación oral que se realice en el EJI 2024.

Comentario 10:
Recomendación: mostrar resultados en una sección y concluir en otra respondiendo a tus objetivos.
Respuesta:
De acuerdo a lo indicado, hemos separado la sección Resultados de Conclusiones. Hemos modificado las conclusiones para responder a los objetivos propuestos.

Comentario 11:
Referencias bibliográficas: Todas deben respetar un estilo, la forma de escribir los autores (nombres, iniciales, puntos y comas), los años, las revistas. Si un artículo tiene un nombre científico en el título, debe

ir con cursiva! Deben además estar ordenados alfabéticamente. Las indicaciones para autores de EJI son claras!! Vos las tenés que adecuar a tu manuscrito, no es un copiar y pegar, hay referencias con letras de filiaciones metidas en el medio! Espero tu avance y aguardo a disposición para lo que necesites! Saludos!

Respuesta:

Muchas gracias por las observaciones. No habíamos notado estas inconsistencias en las referencias bibliográficas. Pensamos que los cambios de estilo responden a errores en la importación de las citas desde las bases de datos. Hemos realizado las correcciones pertinentes en la nueva versión del manuscrito.

Consideramos que con estas modificaciones el resumen ha mejorado con respecto a su versión anterior y se aclararon los puntos planteados por Ud. Esperamos que esta nueva versión sea considerada adecuada para su exposición en el EJI 2024.

Quedamos a la espera de recibir su respuesta.

Atentamente,

Candela Eckell
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL)
Centro Científico Tecnológico CONICET Santa Fe
Colectora Ruta Nac. 168 km 0, Paraje el Pozo s/n 3000
Santa Fe, Argentina
Tel: +54 342 4511370 ext. 5021
correo electrónico: candeckell@gmail.com