

Informe final publicable de proyecto

Identificación de las redes de regulación génica asociadas a las respuestas de tolerancia/sensibilidad del meristemo de raíz al estrés osmótico.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156503

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2023

BORSANI CAMBÓN BORSANI, Omar (Responsable Técnico - Científico)

CASARETTO DE GREGORIO, Esteban (Investigador)

EASTMAN ROGÉ, Guillermo (Investigador)

RAUSCHERT, Inés (Investigador)

SAINZ GANDOLFO, Maria Martha (Investigador)

SOTELO SILVEIRA, José Roberto (Investigador)

SOTELO SILVEIRA, Mariana (Investigador)

PÍRIZ PEZZUTTO, Selene (Becario)

PIRIZ PEZZUTTO, Selene (Becario)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA (Institución Proponente) \\

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" \\

FACULTAD DE AGRONOMÍA. FUNDACIÓN DR. EDUARDO ACEVEDO

Resumen del proyecto

Las raíces deben enfrentar uno de los ambientes más complejos en la tierra: el suelo, cuyas propiedades fisicoquímicas pueden variar dramáticamente en la escala de micras exponiéndolas a distintos tipos de estrés como el osmótico. Este estrés, limita la habilidad de las células de absorber agua provocando un retraso o detención del crecimiento. La caracterización y análisis de la variación de los genes que se expresan nivel célula específica han permitido que distintos grupos de investigación hayan avanzado en la comprensión de la capacidad del meristemo, conjunto de células del ápice radicular encargadas del crecimiento de la raíz, de adaptarse y re-direccionar el crecimiento en este ambiente cambiante. Resultados de nuestro grupo señalan respuestas específicas de las células epidérmicas del meristemo radicular a condiciones de estrés hídrico. Este proyecto analizó y caracterizó las respuestas de hipersensibilidad al estrés osmótico en la epidermis del meristemo radicular de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, utilizando además un mutante afectado en la tolerancia al estrés osmótico. Los resultados mostraron por un lado una clara participación del gen mutado (*ttl1*) en los mecanismos de adaptación de la raíz al estrés. Estos mecanismos involucran cambios en la dinámica de la pared celular, en este sentido hemos podido identificar que las propiedades físicas de la pared de las células del meristemo cambian para adaptarse a la situación de déficit hídrico. Estos cambios son causados por una regulación diferencial de los genes que codifican para varias enzimas de síntesis de componentes de la pared, además de la participación de proteínas que regulan la multiplicación celular y las vías de señalización de hormonas como los brasinoesteroides. El proyecto logró una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en la plasticidad de los meristemos radiculares, especialmente en las respuestas a los cambios en el contenido de agua

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Biología del Desarrollo
Palabras clave: desarrollo de raíz / estrés abiótico / traductoma /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las plantas son organismos sésiles, es decir no pueden moverse del lugar en donde se desarrollan, esto determina que deban enfrentar todos los cambios ambientales que surgen sin poder evitarlos como lo haría un organismo que puede moverse y encontrar otro lugar más adecuado para soportar dichos cambios. Esto determina además que las plantas deben obtener todos sus recursos del lugar donde se encuentra. En este sentido las raíces de las plantas son las responsables de explorar el suelo para la adquisición de agua y nutrientes vitales para la sobrevivencia. La exploración del suelo determina que las raíces deben percibir ("sentir") donde se encuentra el agua para poder dirigirse a zonas donde puedan absorberla. Desde hace mucho tiempo se intentando determinar como la raíz percibe el agua y que determina el desarrollo en una condición de escasez de agua. Este conocimiento permitiría mejorar la capacidad de las plantas de tolerar la sequía mediante la capacidad de explorar el suelo en busca de agua. El extremo terminal de la raíz se denomina meristemo radicular y es el tejido que determina la capacidad de crecer de la raíz. Darwin en su tratado sobre el movimiento de las plantas ya hipotetizaba que era en ese conjunto de células que conforman el meristemo donde se radicaría la capacidad de la raíz de percibir los cambios en el ambiente. Este tejido debe enfrentar uno de los ambientes más complejos en la tierra: el suelo, cuyas propiedades fisicoquímicas pueden variar dramáticamente en la escala de micras exponiendo a las raíces a distintos tipos de estreses entre ellos el hídrico. La caracterización de las repuestas del meristemo puede llevarse delante de varias formas una de ellas es el análisis de la variación en la expresión de gens a nivel célula específica lo que han permitido que distintos grupos de investigación el avance en la comprensión de la capacidad del meristemo radicular de adaptarse y re-direccionar su crecimiento en este ambiente cambiante. Resultados de nuestro grupo y de otros investigadores señalan respuestas específicas de las células epidérmicas del meristemo radicular a condiciones de estrés salino/hídrico. Este proyecto busca analizar y caracterizar las respuestas al estrés hídrico en la epidermis del meristemo radicular de *Arabidopsis*, una especie de planta modelo, muy estudiada a nivel internacional. Por otro lado, el análisis de la expresión génica a nivel transcripcional y traduccional permitirá identificar programas de expresión génica que conducen a las respuestas coordinadas y dirigidas a retomar el crecimiento de la raíz cuando enfrenta una condición de déficit hídrico. Este proyecto se basa en la hipótesis de que las respuestas de hipersensibilidad al estrés osmótico del meristemo de raíz de mutantes de *Arabidopsis* permitirán identificar los programas de expresión génica que conducen a la posibilidad de retomar el crecimiento cuando una raíz se encuentra en una condición de estrés hídrico en el suelo. Datos obtenidos en nuestro grupo relacionados con las propiedades físicas de la pared celular de las células epidérmicas de la zona de elongación de las raíces de *Arabidopsis* muestran un comportamiento diferencial en condiciones control y de estrés hídrico. Se conoce que los cambios en el crecimiento y desarrollo de la raíz en

condiciones de sequía son aspectos clave de la respuesta de tolerancia (Liu et al., 2005). Algunos de estos cambios pueden ser consecuencia de alteraciones en las células de la epidermis de la raíz. Por lo tanto, una aproximación dirigida a identificar cambios en la tasa de traducción de genes específicos, hasta ahora desconocidos, de células epidérmicas de la raíz permitirá en el futuro el uso de estos genes como fuente de tolerancia a sequía. En este contexto, los objetivos específicos del proyecto estuvieron enfocados a un meristemo sometido a estrés hídrico en el cual se plantea caracterizar y evaluar las respuestas de desarrollo relacionadas con la capacidad de recuperación; por otro lado, se generó una lista de genes sujetos a control transcripcional que expliquen la resiliencia del meristemo, y, por último, se generará una lista de genes sujetos a control traduccional en células epidérmicas de raíz. Es así que este proyecto pretende llegar hasta la identificación precisa de un grupo reducido de genes que podrían asociarse con los mecanismos de adaptación del meristemo radicular al estrés hídrico. La comprobación del rol de estos genes abre una línea de trabajo futuro mediante análisis funcional. Un impacto bien definido del proyecto es la mejor comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en la plasticidad de los meristemos radiculares, especialmente en las respuestas a los cambios en el contenido de agua del suelo.

Metodología/Diseño del estudio

Para lograr los resultados esperados se plantearon una serie de ensayos se con plantas de Arabidopsis, un genotipo silvestre (Col-0) y *tll1* como genotipo mutante hipersensible a estrés hídrico a nivel del meristemo.. Las plantas se cultivaron en cámaras en condiciones óptimas de crecimiento con temperatura, luz y humedad controladas.

Se llevó adelante un análisis comparativo de la velocidad de crecimiento de los meristemos radiculares de Col-0 y el mutante *tll1* en plántulas a partir del quinto día de crecimiento in vitro, en condiciones control y de estrés osmótico inducido por una molécula que simula un estrés hídrico como lo es el polietilenglicol (PEG), la cual retiene el agua lo que impide la absorción de la molécula de agua por la planta. Se caracterizó el meristemo a las 3, 8 y 24 hs de exposición al estrés osmótico. Esta caracterización implicó la cuantificación del tamaño del meristemo proximal, el tamaño de las células en cada zona del meristemo, la tasa de división y elongación celular. El tamaño del meristemo se medirá como el número de células meristemáticas presentes en el córtex desde el centro quiescente hasta la primera célula elongada. Para cada experimento, se analizaron un mínimo de 90 plantas y se realizarán tres réplicas independientes para asegurar la significancia estadística. Se analizaron las semejanzas y diferencias de *tll1* con respecto a Col-0, además, se obtuvieron mapas de elasticidad de la pared celular a través de microscopía de fuerza atómica (AFM; modelo microscopio: Bioscope Catalyst (Bruker Instruments, USA) del meristemo radicular de Col-0 y *tll1* durante el crecimiento en condiciones de estrés osmótico y control. Se utilizaron plántulas de 7 días de edad para obtener estos mapas siguiendo el protocolo de Feng et al., 2018, con pequeñas modificaciones: punta (DNP-10, Bruker; cantiléver A)

En esta parte del proyecto se experimentó y se incluyó con un sistema de inducción de estrés distinto y no evaluado hasta el momento por ningún grupo, el sistema consistió en crecer las plantas en una condición de gradiente creciente de concentración de una molécula capaz de generar estrés osmótico creciente. En este caso se utilizó manitol como estresante, las raíces a medida que iban creciendo y explorando el sustrato se encontraban con ambientes cada vez más estresante, esto podría simular una situación mas real como la que se pueden encontrar la raíz en el suelo. Esta aproximación dio resultados sorprendentes y podría cambiar el paradigma de como pensamos que los meristemos se adaptan a una situación cambiante de estrés.

Actividades específicas propuestas en la primera fase:

- 1- Caracterización del crecimiento del meristemo radicular de plántulas de Col-0 y *tll1* en condiciones control y de estrés osmótico.
- 2- Obtención de mapas de elasticidad del meristemo radicular de plántulas Col-0 y *tll1* en condiciones control y de estrés osmótico.

En una segunda fase del proyecto y una vez que se caracterizó las respuestas del meristemo de la raíz en el silvestre y el mutante y se determinó las condiciones óptimas para analizar las respuestas diferencial entre ellos. Se realizó un análisis transcriptómico del meristemo proximal de raíz de Col-0 y *tll1* crecidos en las condiciones control y de estrés osmótico.

Luego que las plántulas se sometieron a las condiciones de estrés y se procedió a diseccionar el meristemo proximal según el protocolo establecido por Krishnamurthy et al., 2018. Se utilizaron tres raíces independientes como réplicas biológicas para cada tratamiento. El ARN total de las muestras se aislaron usando un kit y las bibliotecas para RNA-seq se construyeron de acuerdo a Juntawong et al., 2014, y la secuenciación masiva se realizó en MACROGEN, Corea del Sur.

Los genes expresados diferencialmente entre Col-0 y *tll1* en las distintas condiciones experimentales serán usados para análisis posteriores.

Actividades específicas propuestas en la segunda fase:

- 3- Aislamiento del ARN total del meristemo proximal de raíces Col-0 y *ttl1* en condiciones control y de estrés osmótico.
- 4- Generación de bibliotecas para RNA-seq, secuenciación masiva y análisis de datos.

En una tercera fase del proyecto, la más desafiante consistió en la identificación de los genes sometidos a control traduccional, es decir, los ARNm que están siendo traducidos a proteínas de manera diferencial en células epidérmicas de la raíz en condiciones de estrés osmótico se utilizará el método Ribo-seq. Para esto se requiere la obtención de las fracciones polisómicas que se realizará mediante el método TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification). Para el aislamiento selectivo de polisomas de estas células, la expresión de la proteína de fusión FLAG-RPL18 estará dirigida por promotores específicos de epidermis: WEREWOLF. Se obtuvieron plantas transgénicas en fondo Col-0 y *ttl1*. Una vez que se obtengan las semillas transgénicas, las plantas se cultivarán durante 5 días en condiciones control (medio MS-Agar) y luego serán transferidas a placas con medio MS-Agar suplementado con un gradiente de potencial osmótico de 0 a -0.7 MPa, a modo de simular el encuentro de la raíz con una situación de este tipo en el suelo. El aislamiento de las fracciones polisómicas de raíces se realizará de acuerdo con la metodología descrita para plántulas de *Arabidopsis* (Zanetti et al., 2005). Los polisomas obtenidos tendrán sus ribosomas inmovilizados en el ARNm, que luego serán digeridos con nucleasas para eliminar las secuencias no protegidas. Los fragmentos de ARNm resultantes se purificarán con TRIZOL (Juntawong et al., 2014). La construcción de las bibliotecas de ADN copia a partir de los fragmentos de ARNm protegidos por los ribosomas se realizará de acuerdo con Ingolia, 2010 y su secuenciación (método Ribo-seq) se realizará en Hi-seq de Illumina. Además, debe determinarse en paralelo la abundancia de los ARNm a través de RNA-seq para diferenciar entre genes sujetos a regulación transcripcional o traduccional. Esto se realizará de la misma forma que lo indicado en la segunda fase. Se analizarán tres muestras biológicas de cada una de las condiciones experimentales (control y 3, 8 y 24 hs de exposición al estrés osmótico). Los genes expresados diferencialmente entre Col-0 y *ttl1* en las distintas condiciones experimentales serán usados para análisis posteriores.

Actividades específicas propuestas para la tercera fase:

- 5- Generación de las construcciones genéticas (HF-RPL18) para la transformación de *Arabidopsis*.
- 6- Generación de plantas transgénicas (Col-0 y *ttl1*) que expresen la proteína FLAG-RPL18 específicamente en células de la epidermis.
- 7- Crecimiento de las plantas transgénicas seleccionadas previamente en la generación T2 en condiciones de estrés osmótico.
- 8- Aislamiento de las fracciones polisómicas de las células epidérmicas de raíz crecidas en condiciones control y de estrés osmótico.
- 9- Purificación de los fragmentos de ARNm protegidos por los ribosomas.
- 10- Generación de bibliotecas para RNA-seq y Ribo-seq, secuenciación masiva y análisis de datos.

Resultados, análisis y discusión

Nuestro grupo viene trabajando con el mutante de *Arabidopsis* *ttl1*, hipersensible al estrés osmótico que se caracteriza por tener un fenotipo de expansión exacerbada del meristemo radicular (Rosado et al., 2006, Lakhssassi et al., 2012 y Cuadrado-Pedetti et al., 2021). Resultados previos mostraron que *ttl1* presenta paredes celulares más elásticas en la zona de elongación de la raíz, lo que podría estar explicando parte del fenotipo observado en condiciones de shock osmótico (Cuadrado-Pedetti et al., 2021). En este trabajo desarrollamos un método que nos permitió cuantificar el crecimiento de la raíz primaria de Col-0 y los mutantes *ttl* en condiciones de disponibilidades decrecientes de agua, simulando una situación posible de un suelo en condiciones de déficit hídrico. Utilizando un gradientómetro establecimos un gradiente osmótico con concentraciones crecientes de manitol (0 a 400 mM) que genera potenciales osmóticos decrecientes (0 a -1.2 MPa) en placas de petri. Los resultados obtenidos en el gradiente osmótico se compararon con las tasas de crecimiento de Col-0 y *ttl1* obtenidas por Cuadrado-Pedetti et al., 2021 en condiciones control y de shock osmótico. Luego de 25 días de crecimiento en gradiente osmótico la tasa de crecimiento de Col-0 fue un 44% menor a la tasa de crecimiento observada en condiciones de crecimiento control (Col-0: 0.395 ± 0.01 cm/día). La tasa de crecimiento del mutante *ttl1* experimentó una reducción del 62% luego de crecer durante 25 días en potenciales osmóticos decrecientes en comparación a su tasa de crecimiento en condiciones control (*ttl1*: 0.38 ± 0.01 cm/día). Ni Col-0, ni *ttl1* experimentaron la reducción en la tasa de crecimiento observada luego del crecimiento por 7 días a un potencial osmótico de -1.2 MPa (88% para Col-0 y 95% para *ttl1* comparado a la tasa en crecimiento control). La desaceleración del crecimiento observada en el gradiente osmótico se puede explicar por una menor reducción de las células en el meristemo proximal (MP) de la raíz. Mientras que en shock osmótico de -1.2MPa Col-0 reduce un 72% el número de células en el MP y *ttl1* un 79%, en el gradiente osmótico la reducción en el número de células en el MP fue de 33% y 37% para cada genotipo respectivamente. Curiosamente, a diferencia del crecimiento en shock osmótico, durante el crecimiento en gradiente osmótico no se observó la expansión radial exacerbada en *ttl1*.

El estrés osmótico limita la habilidad de las células de absorber agua provocando un retraso o detención del crecimiento de la raíz. Para hacer frente a este tipo de estrés las propiedades de la pared celular y su ajuste son esenciales, además de un componente fundamental para el control del desarrollo. Durante el crecimiento regulado, las células de las plantas pierden sus paredes que luego se re-sintetizan incorporando nuevos polímeros o modulando su interacción para evitar fallas a largo plazo. Este mecanismo es esencial durante la aclimatación al estrés osmótico o salino (Xin et al., 2022; Rui & Dinneny, 2019). Es por este argumento sumado al hecho de que *tll1* presenta paredes celulares más elásticas (Cuadrado-Pedetti et al. 2021) que decidimos estudiar mediante

mediante qRT-PCR la expresión de genes que codifican para proteínas de síntesis de polisacáridos de la pared celular primaria: CELULOSA SINTASA 1 (CESA1), CELULOSA SINTASA 3 (CESA3), CELULOSA SINTASA 6 (CESA6) y TIPO CELULOSA SINTASA A9 (CSLA9) en raíces de Col-0 y *tll1* crecidas en condiciones control y estrés osmótico. En los resultados obtenidos se observó que el mutante *tll1* expresa significativamente menos CESA1, CESA3, CESA6 y de CSLA9 que Col-0 en condiciones de crecimiento control. Sin embargo, luego de 7 días bajo shock osmótico (-1.2 MPa) el mutante *tll1* expresa CESA1 al mismo nivel que Col-0 en condiciones control, CESA6 y CSLA9 aumentan su expresión con respecto al mutante en condiciones de crecimiento control sin llegar a los niveles de expresión de Col-0 en dicha condición. El gen que aumenta más su expresión en el mutante sometido a shock osmótico es CESA3 que supera los niveles observados en Col-0 en condiciones de crecimiento control.

Para que las células de las plantas puedan expandirse la estructura de la pared celular tiene que aflojarse (Cosgrove et al. 2005), un proceso que es mediado por la EXPANSINA 1 en el meristemo radicular, activadas por la acidificación del apoplasto inducida por las bombas de protones AHA1 y AHA2 (Cosgrove et al., 2005; Pacifici et al. 2018). En este trabajo se observó que los niveles de expresión de EXPANSINA 1 únicamente aumentó con respecto a la situación control, al someter a *tll1* a condiciones de shock osmótico.

Los niveles de expresión de los genes AHA1 y AHA2 en las raíces de *tll1* en condiciones de crecimiento control son significativamente menores con respecto a los niveles en las raíces de Col-0. Los niveles de expresión de AHA1 y AHA2 permanecieron invariables en las raíces de Col-0 crecidas en shock osmótico, sin embargo, en las raíces del mutante *tll1* se observó un aumento significativo de la transcripción de los mismos llegando a los niveles encontrados en raíces de Col-0 crecidas en medio control. Estos resultados sugieren que el rol de TLL1 está más relacionado a la síntesis de la celulosa que a la disrupción de la pared celular durante la expansión celular.

Es bien conocido que los brasinosteroides (BRs) juegan un papel importante en la regulación del crecimiento a través de la promoción de la elongación y/o la división celular (Gonzalez et al., 2009). La progresión del ciclo celular normal en el ápice radicular está controlado por la señalización de BRs, promoviendo la actividad mitótica y la expresión de la CYCLIN D3 y CYCLIN B1 (González-García et al., 2011; Hacham et al., 2011) lo que mantiene el balance entre la renovación de las células madres y la velocidad de diferenciación y elongación de su progenie. La señalización por BRs activa la transcripción del factor de transcripción BES1 y promueve su unión a los motivos E-box de los promotores de los genes CESA1, CESA3 y CESA6 para inducir su expresión durante la fase de elongación en el crecimiento primario de la raíz (Xie et al. 2011). Encontramos en el promotor de TLL1 motivos E-box, lo que hizo que decidiéramos estudiar en el mutante *tll1* la expresión de genes de biosíntesis (DWF4, CPD/DWF3) y señalización (BAK1, BES1) por BRs.

En condiciones de crecimiento control, los niveles de expresión de DWF4 y CPD/DWF3 en raíces de *tll1* son significativamente menores a los observados en las raíces de Col-0 control. En condiciones de shock osmótico, los niveles de expresión de en raíces de Col-0 son significativamente menores a los niveles observados en raíces de Col-0 crecidas en medio control. En esta condición no se observan cambios en los niveles de expresión de estos genes en las raíces de *tll1*.

Curiosamente, en condiciones de crecimiento en gradiente osmótico, las raíces de *tll1* tiene niveles de expresión de DWF4 y CPD/DWF3 significativamente menores a los observados en las raíces de *tll1* crecidas en condiciones control.

En condiciones de crecimiento control, las raíces de *tll1* tienen niveles de expresión significativamente mayores de BAK1 en comparación con la expresión en raíces de Col-0. Sin embargo, en condiciones de crecimiento en shock osmótico los niveles de expresión de BAK1 fueron iguales a los de las raíces de Col-0 crecido en medio control para las raíces de ambos genotipos. Los niveles de expresión del factor de transcripción BES1 fueron significativamente mayores en raíces de *tll1* crecidas en medio control al igual que lo observado para los niveles de expresión de BAK1. Cuando se estudió la expresión de la CYCD3:1 encontramos que en condiciones de crecimiento control, los niveles de expresión de CYCD3:1 en raíces de *tll1* fueron significativamente menores a los niveles de expresión en las raíces de Col-0. Sin embargo, en condiciones de shock osmótico, los niveles de expresión de CYCD3:1 aumentó significativamente en las raíces de ambos genotipos en comparación a los niveles de expresión en las raíces de Col-0 crecidas en medio control. Estos resultados explican en parte lo observado en el gradiente osmótico en donde el mutante *tll1* redujo su tasa de producción celular, pero aumentó el largo del ciclo celular y el tiempo en que demoran en entrar a la ZT y ZE en comparación a lo observado cuando es crecido en condiciones control.

Además de estudiar de manera dirigida la expresión de los genes mencionados durante el proyecto trabajamos en la puesta a

punto de extracción de ARN a partir de pocas células, de generación de librerías de secuenciación y obtención de material para inmunopurificación de polisomas. Con respecto a esta parte llegamos a poner a punto el método de extracción de pocas células a partir del meristemo proximal de la raíz de Arabidopsis (0,5 mm de longitud) utilizando el kit Arcturus pico pure RNA y llegamos a realizar dos librerías utilizando el kit Collibri Stranded RNA library Prep Kit for Illumina™ Systems (Invitrogen™, n° de catálogo: A39003024). El resultado de las librerías fue de muy bajo rendimiento, insuficiente para enviar a secuenciar. Es por esta razón que decidimos cambiar de librería para SMART-seq mRNA Library de TAKARA, en los próximos meses podremos tener los datos generados con esta librería. Por último, estamos en proceso de obtención de plantas de *tll1* con HF-RPL18 para realizar los ensayos de inmunoprecipitación de polisomas y generar las librerías de ARN que están siendo traducidos en el meristemo proximal de raíz.

Conclusiones y recomendaciones

El proyecto ha permitido incursionar en un área de conocimiento poco explorado por la comunidad científica vinculada al estudio de la biología de las plantas en situaciones de estrés. La aproximación utilizada ha permitido identificar una serie de procesos que son responsables de la capacidad del meristemo, zona de la raíz que determinan el crecimiento, de adaptarse a condicione de estrés ambiental cambiante. En el caso del estrés inducido por déficit hídrico, la pared celular parece tener un rol clave en dicha adaptación, cambio en las propiedades físicas de la pared de las distintas células determinan que una célula que no podría elongarse por falta de entrada de agua a las mismas, puedan revertir esta situación mediante cambios en la elasticidad de la pared. Esta capacidad de modificar las propiedades de la pared tiene dinámicas distintas según el meristemo se enfrente a una situación de shock osmótico (hídrico) o si este se estable en forma gradual. Esto lo determinamos utilizando el sistema de crecimiento en gradiente de potencial, este punto es clave ya que hasta el momento no hay referencias que indique que la raíz se comporta distinto frente a un establecimiento distinto del estrés. Esto abre toda una línea de trabajo dirigida a identificar cuáles son los mecanismos que están presentes en esa situación de adaptación gradual. Nuestros resultados ya muestran algunos resultados preliminares que indican que los cambios en la expresión de algunos genes relacionados con proteínas que controla las propiedades físicas de la pared serían responsables de esta respuesta. Como ya se había reportado las vías de señalización están controlados por un balance de hormonas en las células del meristemo, este balance parece ser percibido distinto en ambas situaciones.

Una vez que se tenga todo el cuadro completo de los genes que están siendo regulados de forma diferencial mediante la secuenciación de las librerías de genes diferencialmente expresados en las distintas condiciones de crecimiento, se podrá construir la red de control génico que se pretendía como objetivo en el proyecto. Es claro que para acciones futuras es necesario tener esta información ya que deberá ser el punto de partida para comprender que mecanismo están operando a nivel de meristemo que permite esa adaptación rápida y dinámica a los cambios frente al estrés. En el futuro próximo se utilizará la información generada en esta planta modelo en el análisis de las respuestas frente a estrés en plantas cultivadas. En este sentido datos preliminares obtenidos en raíces de soja sometida a déficit hídrico muestran cambios a nivel de expresión de genes relacionados a pared celular lo que indicaría una respuesta similar al observado en esta planta modelo (Martha Sainz et al. manuscrito en preparación).

Referencias bibliográficas

Abel Rosado, Arnaldo L. Schapire, Ray A. Bressan, Antoine L. Harfouche, Paul M. Hasegawa, Victoriano Valpuesta, Miguel A. Botella, The Arabidopsis Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein TTL1 Is Required for Osmotic Stress Responses and Abscisic Acid Sensitivity, *Plant Physiology*, Volume 142, Issue 3, November 2006, Pages 1113–1126, doi 10.1104/pp.106.085191

Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:850–861.

Cuadrado-Pedetti, M.B., Rauschert, I Sainz, M.M. Borsani, O. Sotelo-Silveira, M The arabidopsis tetratricopeptide thioredoxin-like 1 gene is involved in anisotropic root growth during osmotic stress adaptation x. *Genes*, 2021, 12(2), pp. 1–22, 236

Darwin, C. 1880 *The Power of Movement of Plant*. John Murray, Albemarle Street Ed. London.

Feng W, Kita D, Peaucelle A, Cartwright HN, Doan V, Duan Q, Liu M-C, Maman J, Steinhorst L, Thom IS-, et al (2018) The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca²⁺ Signaling. *Curr Biol* 28: 666–675

Gonzalez N, Beemster GT, Inzé D. David and Goliath: what can the tiny weed Arabidopsis teach us to improve biomass production in crops? *Current Opinion in Plant Biology*. 2009;12:157–164

González-García M. P., Vilarrasa-Blasi J., Zhiponova M., Divol F., Mora-García S., Russinova E., Caño-Delgado A. I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* 138, 849–859

Hacham Y., Holland N., Butterfield C., Ubeda-Tomas S., Bennett M. J., Chory J., Savaldi-Goldstein S. (2011). Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* 138, 839–848

Ingolia NT (2010) Genome-wide translational profiling by ribosome footprinting., 2nd ed. *Methods Enzymol*. doi: 10.1016/S0076-6879(10)70006-9

Juntawong P, Girke T, Bazin J, Bailey-Serres J (2014) Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E203-212

Krishnamurthy A, Ferl RJ, Paul A-L (2018) Comparing RNA-Seq and microarray gene expression data in two zones of the Arabidopsis root apex relevant to spaceflight. *Appl Plant Sci* 6: e1197

Lakhsassi N, Doblaz VG, Rosado A, del Valle AE, Pose D, Jimenez AJ, Castillo AG, Valpuesta V, Borsani O, Botella MA (2012) The Arabidopsis TETRATRICOPEPTIDE THIOREDOXIN-LIKE Gene Family Is Required for Osmotic Stress Tolerance and Male Sporogenesis. *Plant Physiol* 158: 1252–1266

Liu F, Andersen MN, Jacobsen SE, Jensen CR (2005) Stomatal control and water use efficiency of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during progressive soil drying. *Environ Exp Bot* 54: 33–40

Pacifici E, Di Mambro R, Dello Ioio R, Costantino P, Sabatini S. Acidic cell elongation drives cell differentiation in the Arabidopsis root. *EMBO J*. 2018;37(16):e99134.10.15252/embj.201899134
Plant Physiology, , 138(2), pp. 624–635

Rui, Y. and Dinneny, J.R. (2020), A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytol*, 225: 1428-1439. doi10.1111/nph.1616

Xie, Liqiong & Yang, Cangjing & Wang, Xuelu. (2011). Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*. 62. 4495-506. 10.1093/jxb/err164.

Xin, P., Schier, J., Šefrnová, Y., Dubrovsky, J. G., Vielle-Calzada, J., & Soukup, A. (2022). The arabidopsis tetratricopeptide repeat thioredoxin-like (ttl) family members are involved in root system formation via their interaction with cytoskeleton and cell wall remodeling. *The Plant Journal*, 112(4), 946-965. <https://doi.org/10.1111/tpj.15980>

Zanetti, M.E. , Chang, I.-F. Gong, F. Galbraith, D.W. Bailey-Serres, J. (2005) Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression

Licenciamiento

Reconocimiento-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-ND)