



Adaptación del meristemo radicular a condiciones de estrés osmótico: un enfoque integrado desde la expansión celular hasta la expresión génica

TESIS MAESTRIA PEDECIBA

Área: Biología. Subárea: Biología Celular y Molecular



Estudiante: Selene Píriz Pezzutto

Orientadora: Mariana Sotelo Silveira

Co-orientadora: María Martha Sainz

Tribunal:

Presidente: Inés Ponce de León

Vocales: Miguel Arocena

Magdalena Vaio

DICIEMBRE, 2023

Agradecimientos

Realmente es difícil escribir este apartado sin emocionarme, pues implica el cierre de una etapa crucial en mi vida, de cambios, ¡muchos cambios! Estoy agradecida con todas aquellas personas que conozco y conocí a lo largo de mi vida y de mi carrera aunque ya no pertenezcan a mi presente, porque todas ellas dejaron su pequeño granito en mí y contribuyeron a formarme como persona y como profesional. Sin embargo, considero muy importante agradecer de una forma más personalizada a ciertas personas, que me ayudaron, me apoyaron y me valoraron a lo largo de esta etapa. En primer lugar, me gustaría agradecer a Marian, mi tutora, mi mentora, a quien admiro enormemente, como profesional y como persona, que además ha sido (y es) un fuerte pilar para mí, no sólo académicamente sino personalmente. Gracias por las enseñanzas, las charlas, los consejos, la paciencia y sobre todo, gracias por tu empatía, por tu confianza, por tu ayuda y por tenderme una mano cuando más lo necesité. ¡Hacemos un excelente equipo! También quiero agradecer a Martita, mi co-tutora otro gran pilar de este proceso. Otra gran profesional a la que admiro muchísimo. Martita gracias por tus enseñanzas, tus correcciones, tus consejos y gracias por la confianza que me das para afrontar el nuevo proceso que se viene: el Doctorado. Tuve y tengo el mejor equipo de tutoras que se puede pedir... ¡GRACIAS!

No puedo dejar de agradecer a Omar, por la confianza y la ayuda que me brindó a lo largo de todo este proceso. Gracias por incluirme en tu grupo Omar, ha sido muy importante para mi crecimiento académico y personal.

El siguiente agradecimiento es hacia la persona que me acompaña desde hace siete años, y se ha vuelto realmente una parte muy importante en mi vida. Gracias Lea, mi amor, por todo lo que hiciste y haces por mí siempre. Gracias por tu apoyo incondicional, por las risas, por tu amor, por todo. Comparto mis días con la mejor persona que pude haber escogido. Hacemos el mejor equipo.

Fundamental es el agradecimiento hacia mis hermanas, Pame y Vane y mis sobrinas Pauli y Guille, quienes me han acompañado y apoyado muchísimo a lo largo de este duro proceso. Gracias por los momentos compartidos, las salidas, los consejos y el cariño que siempre me brindan. También son pilares fundamentales en mi vida y sin ellas, no hubiera sido lo mismo.

También quiero agradecer a mis lab amig@s más especiales, a Carlita Silva que aunque ya no trabaja más en el lab, ha sido y es una persona muy especial para mí. Gracias por todas las charlas, y por tus enseñanzas Carlita.

También voy a agradecer a mi amiga Vale, por su cariño, por preocuparse por mí siempre y por las charlas que hemos compartido. También a Carlita Filippi, por el apoyo y aliento que siempre me da, y porque las tardes sin ella no son lo mismo. A Flor Sena por confiar en mí siempre, y por todas las charlas que hemos compartido. También agradecer a Maurito, a Andrés y a Mati

Nion por ser personas tan auténticas y confiables. Siempre es un gusto compartir con ustedes y han sido eslabones muy importantes durante estos años.

Quiero agradecer a todas y cada una de las personas del laboratorio de bioquímica que fueron y son parte del proceso, por cada día compartido, por cada charla, cada experimento y cada enseñanza. Estoy muy agradecida con ustedes porque absolutamente todos han contribuido a mi formación personal y académica. Gracias!

Obviamente que no voy a dejar de agradecer a Anto y a Vicky, mis mejores amigas, mis hermanas de la vida. Gracias por siempre siempre estar ahí cuando las necesito. Las adoro!

Gracias a Fati, Lou, Euge, Ale, Lu Leites y Lu colantuono por su amistad inquebrantable. Aunque no nos vemos tan seguido, la amistad permanece. Las quiero mucho!

Gracias Tere, por apoyarme durante todos estos años, por ser tan excelente amiga y compañera. Sin vos este proceso no hubiera sido lo mismo.

Especialmente gracias al tribunal que aceptó corregir mi trabajo. Estoy segura que sus consejos serán muy importantes en mi carrera profesional.

A PEDECIBA por aceptarme en su programa y a las entidades financiadoras, ANII y CAP por confiar en mí y permitirme trabajar de lo que más amo en el mundo, la biología molecular.

Pero fundamentalmente voy a agradecer a papá y a mamá, a quienes les dedico este trabajo. Y aunque hoy no están físicamente conmigo, sin su apoyo no hubiera logrado llegar a donde estoy.

Gracias por enseñarme a luchar por lo que quiero. Gracias por su amor incondicional y por hacer lo imposible, posible. Gracias por cuidarme desde las sombras... GRACIAS.

Índice

Abreviaturas	7
Resumen	9
1. Introducción	11
1.1 El crecimiento de la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i> es impulsado por la expansión anisotrópica de las células en el meristemo radicular.	11
1.2 La expansión celular está regulada por las características de la pared celular.	13
1.3 Regulación de la síntesis de brasinosteroides en <i>Arabidopsis</i>	16
1.4 Los brasinosteroides y el crecimiento de la raíz primaria.	19
1.5 Interacción entre auxinas y brasinosteroides en la elongación celular.	20
1.6 Antecedentes de los genes de la familia <i>TTL</i>	21
1.6.1 Caracterización de <i>tll1</i> en condiciones control.	24
1.6.2 Caracterización de <i>tll1</i> en condiciones de shock osmótico.	24
2. Hipótesis.....	26
Objetivo General:	26
Objetivo específico 1.	26
Objetivo específico 2.	26
Objetivo específico 3.	26
3. Materiales y métodos.....	27
3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.	27
3.3 Tratamiento en gradiente osmótico.	28
3.4 Tratamiento con hormonas.	29
3.5 Análisis de las tasas de crecimiento.....	29
3.6 Análisis del meristemo proximal.....	30
3.7 Cálculo de parámetros de crecimiento primario de la raíz.....	30
3.8 Análisis de GUS.....	30
3.9 Genotipado de <i>tll1</i>	31

3.9.1 Extracción de ADN genómico.	31
3.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final.	32
3.9.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	33
3.10 Ensayos de expresión diferencial de genes.	34
3.10.1 Extracción de ARN.	34
3.10.2 Síntesis de ADNc.	35
3.10.3 RT-qPCR.....	35
3.10.4 Cálculo de eficiencia de primers.....	37
3.10.5 Ajuste de CT de gen housekeeping y experimentos de expresión diferencial de genes.	37
3.11 Preparación de la muestra y extracción de ARN para análisis de transcriptoma.....	39
3.12 Puesta a punto de preparación de librerías para ARN-seq para plataformas de secuenciación nueva generación Illumina.....	40
3.13 Puesta a punto de ensayos de inmunopurificación de polisomas.....	40
3.13.1 Confirmación de la presencia de RPL18 en la línea sobreexpresante <i>35S::HF-RPL1840</i>	
3.13.2 Obtención del extracto proteico y cuantificación SDS-PAGE y Western blot.	41
3.13.2.1 Elaboración de geles de poliacrilamida.....	41
3.13.2.2 Western blot.....	42
3.13.3 Generación de la línea <i>t11 x 35S::HF-RPL18</i> mediante cruzamiento.	42
3.14 Software y bases de datos utilizados.....	43
4. Resultados	44
4.1 Tasa de crecimiento de las raíces de Col-0 y <i>t11</i> en condiciones de gradiente osmótico. .	44
4.2 Análisis del MP de raíces de Col-0 y <i>t11</i> bajo condiciones de gradiente osmótico.	46
4.3 Predicción de los motivos de unión a la región promotora de <i>TTL1</i>	51
4.4 Análisis del MP de raíces de Col-0 y <i>t11</i> en respuesta a distintas hormonas e inhibidores.	52
4.4.1 Respuestas a hormonas e inhibidores en condiciones de crecimiento control.....	52
4.4.2 Respuestas a hormonas e inhibidores en condiciones de crecimiento en shock osmótico.	54

4.5 Patrón de expresión de <i>TTL1</i> en raíces sometidas a hormonas e inhibidores hormonales.	56
4.6 Ensayos de expresión diferencial de genes.	58
4.6.1 Evaluación de la expresión de los genes <i>TTL</i> en raíces de Col-0 y <i>tll1</i> en condiciones control, shock osmótico (-1,2 MPa de potencial osmótico) y gradiente osmótico (0 a -1,2 MPa de potencial osmótico).	59
4.6.2 Evaluación de la expresión de los genes <i>CESA</i> en raíces de Col-0 y <i>tll1</i> en condiciones control, en shock osmótico (-1,2 MPa de potencial osmótico) y en gradiente osmótico (0 a -1,2 MPa de potencial osmótico).	60
4.6.3 Evaluación de la expresión de los genes <i>TIPO PECTATO LIASA 12</i> , <i>Expansina A1</i> , <i>AHA1</i> y <i>AHA2</i> en raíces de Col-0 y <i>tll1</i> en condiciones control, en shock osmótico (-1,2 MPa de potencial osmótico).	62
4.6.4 Evaluación de la expresión de genes involucrados en la vía de señalización y de biosíntesis de brasinosteroides en raíces de Col-0 y <i>tll1</i> en condiciones control y de estrés osmótico.	64
4.6.5 Evaluación de la expresión de <i>CYCD3;1</i> en raíces de Col-0 y <i>tll1</i> en condiciones control y de estrés osmótico.	66
4.7 Puesta a punto de extracción de ARN a partir de pocas células y generación de librería de ADNc para ARN seq.	67
4.7.1 Extracción de ARN de pocas células.	68
4.7.2 Depleción del ARN ribosomal (ARNr).	68
4.7.3 Fragmentación del ARN.	69
4.7.4 Hibridación y ligación de adaptadores.	69
4.7.5 Reacción de retrotranscripción.	69
4.7.6 Amplificación del ADNc e indexado.	69
4.8 Puesta a punto de ensayos de inmunopurificación de polisomas.	70
4.8.1 Confirmación de la presencia de RPL18 en la línea sobreexpresante <i>35S::HF-RPL18</i> .	70
4.8.2 Confirmación de la detección de la proteína RPL18.	71
5. Discusión	73
5.1 El gradiente osmótico produjo una menor reducción en la tasa de crecimiento de las raíces de Col-0 y <i>tll1</i> comparado al shock osmótico.	73

5.2 La expresión de <i>TTL1</i> es inhibida por el shock osmótico en raíces de Col-0.....	74
5.3 El MP del mutante <i>tll1</i> no presenta el fenotipo de expansión celular exacerbada luego del crecimiento de las raíces durante 25 días en el gradiente osmótico.	75
5.4 <i>TTL1</i> podría formar parte de un mecanismo “de afuera hacia dentro” controlando la progresión del ciclo celular en el MP de raíz de Arabidopsis.	76
5.5 Relación de <i>TTL1</i> con las hormonas que controlan el crecimiento de la raíz de Arabidopsis	79
6. Conclusiones.....	83
7. Perspectivas	84
Bibliografía.....	85
Anexo.....	96

Abreviaturas

$\mu\text{g} / \text{mL}$ – Microgramo por mililitros
 μM – Micromolar
35 S – Promotor del ARN del virus del mosaico de la coliflor (CaMV)
ABA- Ácido abscísico
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ADNc – ADN copia
AIA – Ácido Indol Acético
ARN – Ácido Ribonucleico
ARNm – ARN mensajero
ARNr – ARN ribosomal
BAK1 – BRI1-Associated-Kinase1
BAP – Bencil Amino Purina
BES1 - BRI1 Ems Supresor 1
BIN2 – BR insensitive 2
BKI1 - BRI1-KINASE INHIBITOR
BL- Brasinolide
BRs - Brasinosteroides
BRL- BRI1-LIKE
BSU – Supresor de BRI1
BSKs- Quinasas señalizadoras de BRs
BZR1 - Brassinazole resistant 1
CCS – Complejo Celulosa Sintasa -
CESA – Celulosa Sintasa
CN – Campestanol
Col-0 – Columbia
CPD - *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF*
CQ – Centro quiescente
CR - Campesterol
CYCD – Ciclina tipo D
CYS - Cisteína
DET2 - DETIOLATED 2
dNTP – Deoxinucleótido 5' trifosfato
DWF4 - DWARF4
eBL- Epibrasinolide
EDTA – Ácido etineldiamino tetraacético
GUS – Gen reportero codificante para la enzima β – glucuronidasa
h – Hora/s

HCl – Ácido Clorhídrico
K₃Fe(CN)₆ – Ferricianuro de Potasio
K₄Fe(CN)₆·3H₂O – Ferrocianuro de Potasio
LB Salk – Primer Left Border de T-DNA de Salk Institute
LiCl- Cloruro de litio
M – Molar
mg / L – Miligramos por litro
MgCl₂ – Cloruro de Magnesio
Microscopía DIC – Microscopía de contraste de interferencia diferencial
mM – Milimolar
MP – Meristemo Proximal
MPa – Megapascal
MS – Murashige and Skoog
Na⁺ - Sodio
NaCl – Cloruro de Sodio
NCM – Nicho de Células Madre
PAC - Paclbutazole
PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCZ – Propiconazole
PRC 1-1 (prc 1-1) – Procuste 1
SDS – Dodecilsulfato sódico
RT-qPCR- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción
Taq. Pol. DNA – Polimerasa de ADN de *Thermus aquaticus*
T-DNA – ADN de transferencia
TRLX – Tioredoxina
TTL – Tetratrico-peptide Thioredoxin Like
TTL1 / 1,3,4 (ttl1 / ttl1,3,4) – Tetratrico – peptide Thioredoxin Like 1/ 1, 2, 3
TTL# - TRANSTHYRETIN-LIKE (El “#” es para diferenciarlo de Tetratrico-peptide Thioredoxin Like)
UV – Ultravioleta
WS- Wassilewskija
WOX5 - WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5
Y2H – Doble híbrido de levadura
ZD– Zona de Diferenciación
ZE – Zona de elongación
ZT – Zona de Transición

Resumen

El meristemo radicular 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 estrés como el osmótico. El estrés osmótico limita la habilidad de las células de absorber agua provocando un retraso del crecimiento. Nuestro grupo viene trabajando con el mutante de *Arabidopsis ttl1* y ha caracterizado el crecimiento de la raíz del mutante en condiciones de crecimiento control y de shock osmótico. En la caracterización realizada se observó que *ttl1* tiene un menor número de células corticales en el meristemo proximal (MP), una longitud menor de la célula madura y paredes celulares más elásticas en la zona de elongación del meristemo radicular en comparación a Col-0 en raíces crecidas en condiciones de crecimiento control. Cuando las raíces de *ttl1* son sometidas a un shock osmótico de 7 días se observó que desaceleran su tasa de crecimiento debido a una disminución en el número de células corticales en el MP y a una reducción en el largo de la célula madura. Además, se observó que *ttl1* tiene un fenotipo de expansión exacerbada de las células epidérmicas de la zona de elongación (ZE) del meristemo radicular en raíces crecidas en condiciones de shock osmótico. El presente trabajo se basa en la hipótesis de que existe una respuesta fenotípica y transcripcional diferencial del meristemo radicular del mutante *ttl1* de *Arabidopsis* en condiciones de estrés osmótico. Los objetivos específicos fueron: 1) Caracterización del meristemo de raíces de Col-0 y *ttl1* y evaluación de su capacidad de recuperación en condiciones de crecimiento en gradiente osmótico; 2) Análisis de la expresión de genes de la familia *TTL*, genes de síntesis y señalización de brasinosteroides, síntesis y remodelación de pared y ciclo celular en raíces de *ttl1* en condiciones control y de estrés osmótico.

Los resultados mostraron que las tasas de crecimiento de las raíces de Col-0 y *ttl1* crecidas en el gradiente osmótico se desaceleraron menos que en el shock osmótico. Además, se observó una menor disminución en el número de células en el MP y el largo de la célula madura con respecto a lo ocurrido en el shock osmótico. En el crecimiento en gradiente osmótico la menor tasa de crecimiento de la raíz de *ttl1* fue asociada a un menor número de células en el MP, que pasan más tiempo en la ZT (Zona de Transición) y que alcanzan una menor longitud en su madurez. A diferencia del crecimiento en shock osmótico, durante el crecimiento en gradiente osmótico no se observó la expansión radial exacerbada en las células epidérmicas de la ZE de *ttl1*.

También comprobamos transcripcionalmente que en condiciones control los genes de biosíntesis de pared celular primaria en el mutante *ttl1* tienen niveles de expresión más bajos que el genotipo silvestre lo que es concordante con la mayor flexibilidad de las paredes celulares de las células epidérmicas de la ZE del mutante. La expresión de los genes *CESAs* en el gradiente osmótico podría explicar la ausencia del fenotipo de expansión celular exacerbada en *ttl1*. En condición control, los patrones de expresión de genes vinculados a síntesis y señalización de BRs podrían sugerir que *ttl1* tiene niveles menores de auxinas y brasinosteroides. La pérdida de integridad de la pared celular en el mutante *ttl1*, sumado a los patrones de expresión de los

genes que integran el Complejo Celulosa Sintasa y la *CYCD3;1* sugieren que el gen *TTL1* podría estar involucrado en un mecanismo “de afuera hacia adentro” controlando la progresión del ciclo celular en el MP de Arabidopsis.

Palabras clave: *TTL1*, arabidopsis, meristemo proximal, estrés osmótico

1. Introducción

1.1 El crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* es impulsado por la expansión anisotrópica de las células en el meristemo radicular.

La raíz juega un rol fundamental en el suministro de agua, la adquisición de nutrientes y el anclaje en el suelo. Es capaz de adaptar su crecimiento en respuesta a estímulos biológicos, así como a estímulos abióticos incluyendo el déficit hídrico. La arquitectura final que alcanza la raíz es la consecuencia de la actividad de los meristemos que se adaptan para responder a las condiciones medioambientales (Kolb *et al.*, 2017).

La estructura simple de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) la ha convertido en un órgano modelo para estudiar diversos procesos fisiológicos, de desarrollo y de tolerancia y adaptación frente a diferentes tipos de estreses ambientales (Cederholm *et al.*, 2012; Masson *et al.*, 2002).

Transversalmente la raíz se estructura en epidermis, córtex y endodermis, capas celulares que se organizan en cilindros concéntricos que rodean la estela central (sistema vascular más periciclo). Por fuera de la epidermis se encuentra la columella y la columella lateral cuya función es proteger el meristemo de la raíz a medida que explora el suelo (Cederholm *et al.* 2012; **Figura 1**).

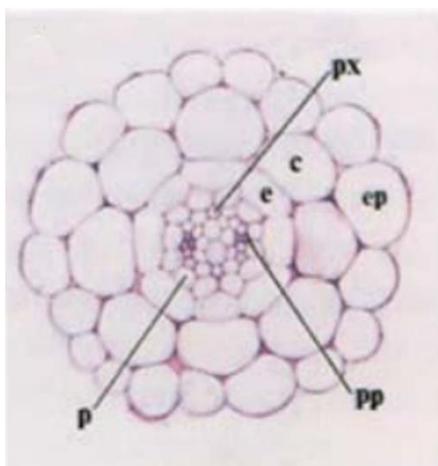


Figura 1. Eje transversal de la raíz primaria de *Arabidopsis*. ep: epidermis. c: córtex. e: endodermis. p: periciclo. px: protoxilema. pp: profloema. Imagen extraída de Scheres *et al.*, 2002.

En meristemo apical de la raíz (MAR) primaria de *Arabidopsis* existe un pequeño número de células madre multipotentes (o células iniciales) que generan todos los tipos celulares de este órgano. Existen cuatro tipos de células iniciales: 1) las que dan origen a las células epidérmicas y

la columella lateral; 2) las que originan la collumela; 3) las que dan origen al córtex y endodermis; y 4) las que originan la estela central (Scheres *et al.*, 2002). Las células madre rodean el centro quiescente (CQ), un par de células mitóticamente inactivas. El CQ envía señales celulares no autónomas a las células madres inhibiendo su diferenciación (Perilli & Sabatini, 2010). En conjunto el CQ y las propias células madre forman el nicho de las células madre (NCM) (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Scheres *et al.*, 2002). En la **Figura 2** se muestra el eje longitudinal de la raíz primaria de *Arabidopsis*, la cual se organiza en cuatro zonas de desarrollo: 1) el meristemo proximal (MP) que se extiende desde el CQ a la primera célula elongada; donde células isodiamétricas con alta actividad mitótica comienzan a expandirse radialmente, definiendo el ancho de la raíz; 2) La zona de transición (ZT), donde las células que están cerca de MP continúan teniendo alta actividad mitótica, mientras que las células de la parte distal sufren expansión anisotrópica en el eje longitudinal; 3) Zona de elongación (ZE), donde la tasa de elongación celular aumenta exponencialmente; 4) Zona de diferenciación (ZD), donde las células completamente elongadas son desplazadas, adquieren su identidad celular definitiva y no se elongan más (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Cederholm *et al.*, 2012). El crecimiento de la raíz alcanza un régimen estacionario que es el resultado de un balance delicado de división celular, elongación y diferenciación (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Scheres *et al.*, 2002).

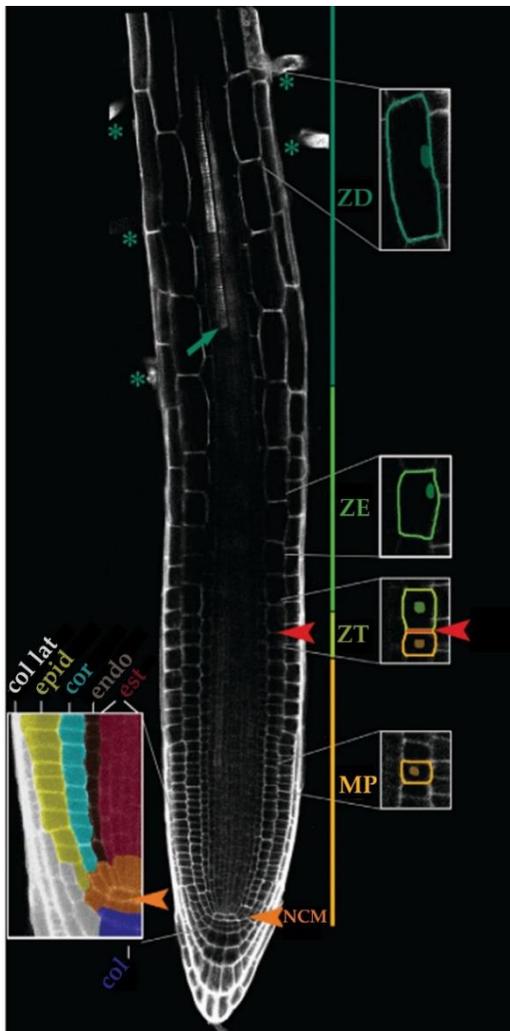


Figura 2. Eje longitudinal de la raíz primaria de Arabidopsis. NCM: Nicho de Células Madre. MP: Meristemo Proximal. ZT: Zona de Transición. ZE: Zona de Elongación. ZD: Zona de Diferenciación. Las flechas rojas indican el límite entre el MP y la ZT. La flecha verde muestra los primeros vasos del xilema visibles en el tejido vascular. Los asteriscos indican pelos radiculares. El recuadro de la izquierda muestra la organización de los tejidos radiculares: columela (col), columela lateral (col lat), epidermis (epid), córtex (cor), endodermis (endo) y estela (est). Imagen adaptada de Salvi *et al.*, 2020.

1.2 La expansión celular está regulada por las características de la pared celular.

Las células de las plantas, como las de muchos procariontes y hongos, están encapsuladas por paredes celulares. Las células meristemáticas, se caracterizan por poseer paredes celulares primarias delgadas (0.1-1 μm de espesor) que consisten mayoritariamente en polisacáridos complejos y una cantidad pequeña de proteínas. Algunos tipos celulares, una vez alcanzado su tamaño final, producen una capa de pared celular secundaria cuya estructura y composición es de alta especificidad de acuerdo con la función celular que se llevará a cabo (Höfte & Voxeur, 2017; Cosgrove, 2005). La composición genérica de la pared celular primaria de Arabidopsis puede ser descripta como: 15-40% de celulosa, 20-30% de hemicelulosa, y 30-50% de pectinas (Cosgrove & Jarvis, 2012). De los tres componentes, la celulosa es el que posee una alta fuerza de tensión que impide y/o dirige la expansión celular.

Las microfibrillas de celulosa están compuestas por cadenas lineales de β -1,4 glucano. Alrededor de 18 cadenas son empaquetadas en microfibrillas de un ancho aproximado de \sim 3 nm. La celulosa es sintetizada por un complejo proteico membranoso que es parte de la familia *CELULOSA SINTASA A (CESA)* que se mueve usando los microtúbulos como guía (Cosgrove, 1997). En el genoma de *Arabidopsis* existen 10 miembros de la familia *CESA*. Al complejo funcional de síntesis de celulosa, se lo conoce como roseta. Cada roseta tiene 6 subunidades y cada subunidad está compuesta por tres proteínas *CESA* diferentes. Para la síntesis de la pared celular primaria se requiere a *CESA1*, *CESA3* y *CESA6* (Cosgrove, 2005). Los mutantes en los genes *CESA1 (rsw1-1)* y *CESA3 (ixr1-2)* presentan defectos severos en la síntesis de pared celular, mientras que el mutante de *CESA6 (prc1)* presenta un fenotipo suave debido a la redundancia funcional con los genes *CESA6-like* (Allen *et al.*, 2021), así como menor contenido de celulosa cristalina (Williamson *et al.*, 2001; Fagard *et al.*, 2000; Arioli *et al.*, 1998).

Si bien la presencia de la pared celular confiere ventajas como un exosqueleto robusto y la protección frente a factores bióticos y abióticos, la misma representa un desafío para la expansión celular (Gorgues *et al.*, 2022). Para que las células de las plantas puedan expandirse la estructura de la pared celular tiene que aflojarse (Cosgrove, 2005), un proceso que es mediado por las proteínas llamadas α -EXPANSINAS (EXPAs) que están ubicadas en la propia pared celular y son activadas por un pH bajo en el apoplasto (Cosgrove, 2005; Sampedro & Cosgrove, 2005). Las expansinas rompen enlaces de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y entre estas y demás componentes de la pared celular (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2002; Cosgrove, 2000), así habilitan la expansión celular dirigida por la turgencia. Se ha demostrado que en el meristemo de raíz de *Arabidopsis* las bombas de protones ancladas en las membranas AHA1 y AHA2 crean las condiciones de pH necesarias para que la proteína EXPA1 afloje las paredes celulares y como consecuencia se dé la elongación celular (Pacifici *et al.*, 2018). Una vez elongadas, las paredes celulares de las células deben ser re-sintetizadas incorporando nuevos polímeros o modulando su interacción para mantener la forma y el tamaño alcanzado. Este mecanismo es esencial durante la aclimatación al estrés osmótico o salino (Xin *et al.*, 2022; Rui & Dinneny, 2020). Cualquier cambio en el gradiente osmótico, ya sea por aumento o disminución del potencial hídrico en el medio externo o cambios en la concentración interna de solutos, conduce a cambios directos en la turgencia que pueden modificar el volumen celular y la rigidez de los tejidos. Es por esto, que, para permitir el crecimiento por expansión, las células tienen que mantener un diálogo constante entre las propiedades físicas de la pared celular, la concentración de solutos y la turgencia (Gorgues *et al.*, 2022). La naturaleza exacta de las señales que le permiten a las plantas percibir los cambios en la disponibilidad de agua todavía no están claramente definidos. A nivel celular, cambios en la osmolaridad externa impactan directamente en las propiedades mecánicas de la pared celular y/o membrana (Gorgues *et al.*, 2022, **Figura 3**).

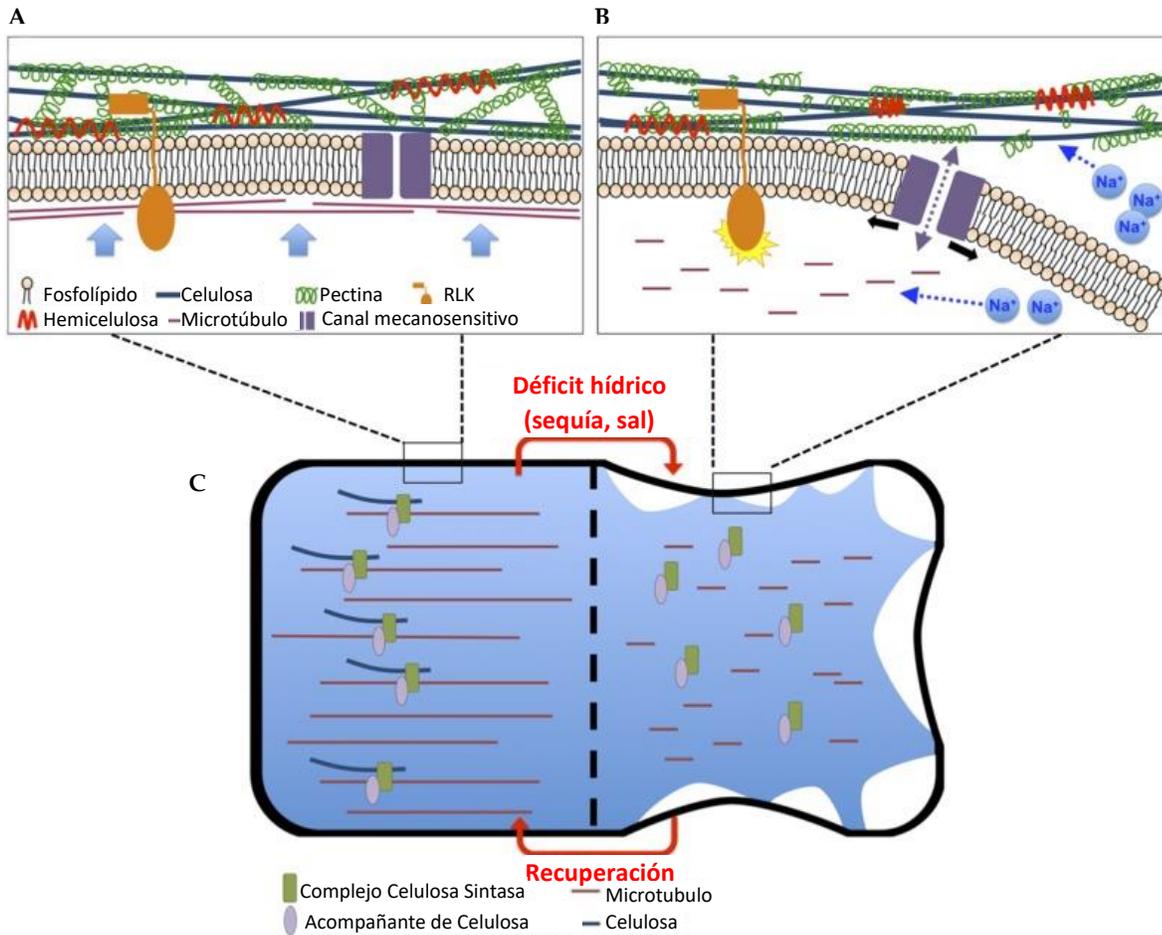


Figura 3. Cambios en la pared celular primaria en condiciones de déficit hídrico. **A.** Estructura de la pared celular. La pared celular primaria consiste mayoritariamente de microfibrillas de celulosa, hemicelulosa y pectina. La orientación de las microfibrillas es determinada por el arreglo de los microtúbulos. El arreglo actual sugiere que la hemicelulosa se une a las fibrillas de celulosa y las pectinas forman una red que cubre la celulosa. Las flechas azules indican presión de turgencia. **B.** Cambios en las propiedades de la pared celular en condiciones de déficit hídrico. **C.** Bajo déficit hídrico, la pared celular se deforma y se disocia de la membrana plasmática. La síntesis de celulosa es interrumpida debido a la depolimerización de los microtúbulos en esas condiciones. Distintos tipos de estreses pueden inducir cambios únicos adicionalmente al efecto general causado por la pérdida de agua en la célula. Por ejemplo, los iones Na^+ pueden interrumpir el entrecruzamiento de la pectina, así como el arreglo de los microtúbulos. Cambios en la integridad de la pared celular pueden ser monitoreados directamente por RECEPTOR-LIKE KINASES (RLKs) o indirectamente por canales mecanosensitivos localizados en las membranas. Imagen adaptada de (Gorgues *et al.*, 2022).

Figura 4. Ilustración de la vía de síntesis de brasinosteroides (BRs). La vía comienza con el precursor Campesterol (CR) y las vías mayoritarias de síntesis de BRs están sobreiluminadas con colores diferentes. La vía de oxidación temprana C-22 es independiente de campestanol y está sobreiluminada en Amarillo. Existen dos vías dependientes de campestanol (CN): la vía de oxidación C-6 temprana y tardía. La vía temprana de oxidación de C-6 (en verde) sufre oxidación C-6 delante de C-22. La vía de oxidación C-6 tardía (púrpura) hidroxila C-22 adelante de C-6. Las líneas punteadas indican más de un paso enzimático. Esquema modificado de Chung & Choe, 2013.

Además de los niveles internos de BRs en la planta, la ruta de señalización de BRs es de vital importancia para regular diversos procesos biológicos como la elongación celular (Zhu *et al.*, 2013). A pesar de los esfuerzos de muchos laboratorios para encontrar los componentes de la vía de señalización de BRs, la misma no está tan bien caracterizada como la vía de biosíntesis. A diferencia de los receptores de hormonas esteroideas en animales que funcionan como activadores transcripcionales, el receptor de BRs es un receptor de membrana de tipo LRR quinasa denominado BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1) (Li & Chory, 1997). BRI1 tiene 3 homólogos en Arabidopsis, de los cuales BRL1(BRI1-LIKE1) and BRL3 (BRI1-LIKE3) son receptores de BRs en la vasculatura (Caño-Delgado *et al.*, 2004). Otros componentes de la vía de señalización son las proteínas que interactúan con BRI1: BRI1-ASSOCIATED-KINASE1 (BAK1), BRI1-KINASE INHIBITOR (BKI1) y TRANSTHYRETIN-LIKE (TTL[#]); así como las quinasas señalizadoras (BSKs) y componentes río abajo como las proteínas BSU1, 14-3-3 y factores de transcripción como *BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1* (BES1) (Clouse, 2011). La unión de brasinosteroides a BRI1 promueve su interacción con BAK1 y la actividad quinasa, que iniciará una cascada de señalización que finalizará con modificaciones en la expresión génica (Zhu *et al.*, 2013, **Figura 5**).

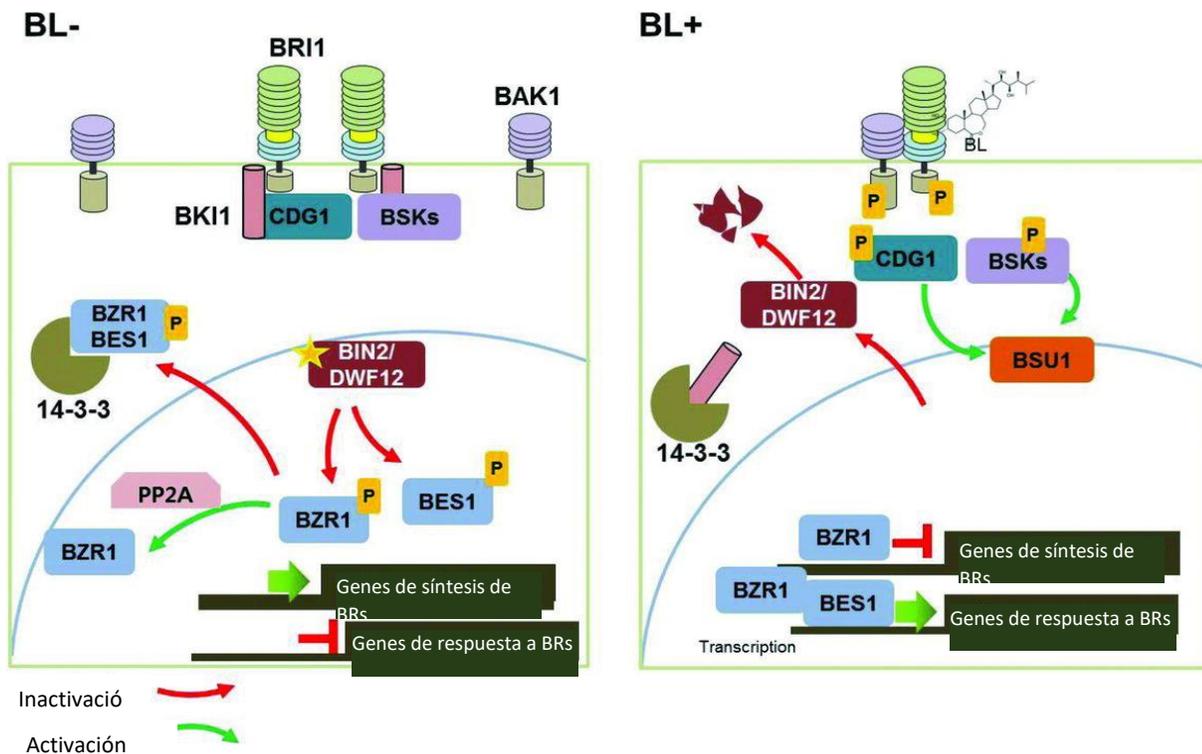


Figura 5. La vía de señalización por brasinosteroides (BRs). En ausencia de BL (BL-), BKI1, que se une a CDG1 y BSKs en el citoplasma, interacciona con la forma inactiva de BRI1 para prevenir la unión de BAK1 a BRI1. La proteína constitutivamente activa BIN2, fosforila sus sustratos: BZR1 y BES1, que son factores de transcripción específicos de BRs. Las formas fosforiladas de estos factores de transcripción no entran al núcleo y son retenidas por proteínas 14-3-3 en el citoplasma. En presencia de BL (BL+), BL se une a BRI1, que induce auto y transfosforilación de BKI1 y BAK1. BKI1 fosforilado se disocia de BRI1 y es retenido por las proteínas 14-3-3. BAK1 y BRI1 forman heterodímeros y la cascada de fosforilación secuencial transmite la señal a través de CDG1 y BSKs. CDG1 y BSK1 fosforilados son liberados del receptor BRI1 y activan a la proteína fosfatasa BSU1. BSU1 activado inhibe a BIN2/DWF12 a través de la defosforilación de la Tyr200 de BIN2. Liberados de BIN2, BZR1 y BES1 regulan transcripcionalmente a sus genes blanco. Dependiendo del contexto de las secuencias cercanas a la secuencia de reconocimiento de BZR1 (BRRE), BZR1 y BES1 pueden inducir o reprimir la expresión de sus genes blanco. Las líneas rojas que terminan en una línea perpendicular indican inactivación y las flechas verdes indican activación. Figura modificada de Chung & Choe, 2013.

Las respuestas transcripcionales generadas por genes responsivos a brasinosteroides permiten que la planta crezca y se adapte ante señales internas y externas, incluyendo la tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Vriet *et al.*, 2012). Las respuestas frente al estrés en plantas están estrechamente relacionadas con procesos de desarrollo, pero la interacción entre estas vías todavía no se comprende de manera cabal.

El patrón de expresión limitado de *DWF4* a tejidos mitóticamente activos y el enriquecimiento de BRs activos en tejidos que expresan *DWF4*, indican que la actividad de *DWF4*, que es regulada principalmente a nivel transcripcional, determina el flujo de la vía de síntesis de brasinosteroides. Para mantener la homeostasis de BRs, los niveles de ARNm correspondientes a genes de la vía de biosíntesis de BRs, debe aumentar o disminuir para modular los niveles de BRs. El transcripto de *DWF4* se acumula en los mutantes deficientes en la señalización de BRs, así como después del tratamiento con un inhibidor de la síntesis de BRs (Brz). Contrariamente, la aplicación de epi-BL (epi-Brasinolide) disminuye rápidamente los niveles de transcripto de *DWF4*. La transcripción de *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF (CPD)* también exhibe una respuesta rápida frente a la aplicación de epi-BL y Brz. Sin embargo, *DETIOLATED 2 (DET2)* solo responde a Brz. La expresión de la mayoría de los genes de la vía no es afectada en el mutante *bri1-401*, lo que sugiere que la regulación negativa requiere al receptor BRI1. Curiosamente, la respuesta transcripcional normal de *DWF4* en *bri1-401* frente a epi-BL y Brz sugiere que hay un mecanismo no identificado que regula la transcripción de *DWF4* (Tanaka *et al.*, 2005).

1.4 Los brasinosteroides y el crecimiento de la raíz primaria.

Es bien conocido que los BRs, al igual que las auxinas, giberelinas y citoquininas, juegan un papel importante en la regulación del crecimiento a través de la promoción de la elongación y/o la división celular (González-García *et al.*, 2011). Los BRs regulan la expresión génica, estimulan la división, elongación y diferenciación celular. En particular en raíz, los BR promueven el crecimiento de la raíz activando la expansión celular, controlando el número de células en el meristemo y la progresión del ciclo celular; así como la modulación de la división celular en el centro quiescente (González-García *et al.*, 2011).

La progresión del ciclo celular normal en el ápice radicular está controlada por la señalización de BRs que mantiene el balance entre la renovación de las células madre y la velocidad de diferenciación y elongación de su progenie. La reducción de la señalización por BRI1 (como en los mutantes *bri1-116*) reduce tanto la elongación celular como la entrada en la fase M del ciclo celular, conduciendo a la producción de meristemos más pequeños y por lo tanto una pérdida parcial en la actividad de renovación de las células madres distales. La evidencia combinada de que tanto las plantas que sobre-expresan *BES1* como las plantas tratadas con BL presentan una salida prematura del ciclo celular y una aceleración de la diferenciación indican que los BRs son perjudiciales para el tamaño del meristemo y el crecimiento de la raíz. En el NCM, los BRs cumplen un rol exclusivo en la renovación del centro quiescente y la diferenciación de células madres aguas arriba de reguladores de la dinámica de las células madres conocidos como *WOX5* (González-García *et al.*, 2011; Hacham *et al.*, 2011). Los BRs promueven la actividad mitótica y la expresión de la *CYCLIN D3* y *CYCLIN B1* en el meristemo de raíz (González-García *et al.*, 2011; Hacham *et al.*, 2011). La percepción de BRs en la epidermis es suficiente para controlar el crecimiento de la raíz y el tamaño del meristemo (Hacham *et al.*, 2011).

Durante la fase de elongación celular es necesaria una síntesis elevada de celulosa para reconstruir la pared celular (Refrégier *et al.*, 2004). Se ha observado que los mutantes deficientes en síntesis o percepción de BRs contienen menos celulosa que los genotipos silvestres (Xie *et al.*, 2011). La expresión de los genes *CESA* relacionados a síntesis de pared celular primaria está disminuida en estos mutantes, y solo es inducida por la aplicación externa de BRs en los mutantes deficientes en la síntesis de esta hormona (Xie *et al.*, 2011). Además, se sabe que el factor de transcripción *BES1* se puede asociar a los promotores de la mayoría de los genes *CESA* relacionados con la síntesis de pared primaria (Xie *et al.*, 2011). Durante el crecimiento primario de la raíz, la señalización por BR activa la transcripción de *BES1* y promueve la asociación de *BES1* a los motivos E-box (*CANNTG*) en los promotores de los genes *CESA1*, *CESA3* y *CESA6* para activar su expresión y la síntesis de celulosa en las células de la zona de elongación (**Figura 6**) lo que promueve el crecimiento (Novaković *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2011).

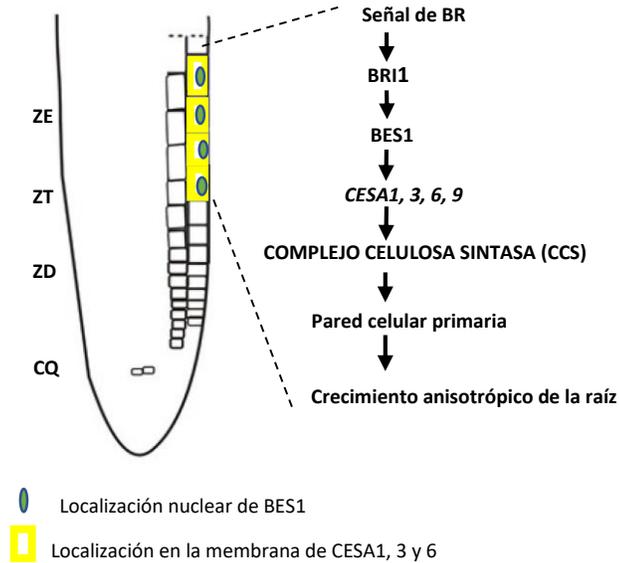


Figura 6. Modelo que ilustra el mecanismo de regulación de la expresión de los genes *CESA* durante el crecimiento de la raíz. La señalización por brasinosteroides (BR) activa la transcripción del factor de transcripción BES1 y promueve su unión a los motivos E-box (CANNTG) de los promotores de los genes *CESA1*, *CESA3* y *CESA6* para inducir su expresión durante la fase de elongación en el crecimiento primario de la raíz. Figura modificada de Xie *et al.*, 2011.

1.5 Interacción entre auxinas y brasinosteroides en la elongación celular.

Se ha demostrado que las auxinas y BRs actúan de manera antagónica en el proceso de elongación celular en la raíz. Análisis transcriptómicos en plantas silvestres de *Arabidopsis* mostraron que los genes inducidos por BRs pero reprimidos por auxinas tienden a estar relacionados a la organización y biogénesis de la pared celular y al transporte de agua, mientras que los genes reprimidos por BRs e inducidos por auxinas tienden a estar involucrados en la biogénesis de los ribosomas (Chaiwanon & Wang, 2015). A nivel celular, el tratamiento con auxinas en plantas silvestres reduce la elongación celular y aumenta la expansión radial en la zona meristemática, aumentando las dimensiones de la punta de la raíz en el eje radial, a la inversa que lo observado con la aplicación de BRs. Además, el tratamiento con auxinas inhibe dramáticamente la elongación celular en la ZE (Chaiwanon & Wang, 2015). Las raíces silvestres tratadas con BRs mostraron una iniciación temprana de elongación celular en la ZT, mientras que la aplicación de auxinas no produjo cambios en la iniciación de la elongación, sino una

menor capacidad de elongación en la ZE, en comparación al crecimiento sin hormonas (Chaiwanon & Wang, 2015).

1.6 Antecedentes de los genes de la familia *TTL*.

El gen *Tetratricopeptide Thioredoxin-Like1 (TTL1)* fue identificado a partir de “screenings” genéticos de mutantes con un crecimiento radicular reducido y una expansión radial exacerbada de las células epidérmicas de la ZE bajo concentraciones elevadas de NaCl (Rosado *et al.*, 2006). Los genes *TTL* en *Arabidopsis* codifican una familia de cuatro proteínas (*TTL1*, *TTL2*, *TTL3* y *TTL4*) específicas de plantas terrestres que poseen una arquitectura modular en común, conteniendo seis dominios TPR distribuidos en posiciones específicas de la secuencia, y un extremo C-terminal que presenta homología a tioredoxinas (TRLX) de clase *h* pero que carece de un residuo de Cisteína (Cys) en el sitio activo requerido para la actividad reductasa. (**Figura 7A**). Los dominios TPR son motivos conservados de 34 aminoácidos que forman una estructura secundaria helicoidal y son clasificados como módulos de interacción proteína-proteína. En plantas, los dominios TPR están involucrados en respuestas a fitohormonas, desarrollo radicular, distribución de plástidos y maquinaria fotosintética (Xin *et al.*, 2022; Bhuiyan *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2014; Lakhssassi *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011; Rosado *et al.*, 2006; Schapire *et al.*, 2006; Jacobsen *et al.*, 1996). Se predice que las proteínas *TTL* interactúan y funcionan como co-chaperonas de Hsp90, gracias a la identificación de aminoácidos conservados en sus motivos TPR conocidos como abrazaderas de carboxilato (Xin *et al.*, 2022; Lakhssassi *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 2010; Rosado *et al.*, 2006). Desde el punto de vista filogenético la familia *TTL* se divide en dos clados, donde uno contiene al par *TTL1/TTL2* y el otro al par *TTL3/TTL4*. Cada clado se habría generado por duplicación de un gen ancestral (Lakhssassi *et al.*, 2012; Rosado *et al.*, 2006; **Figura 7B**).

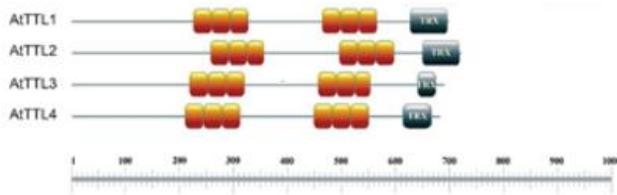
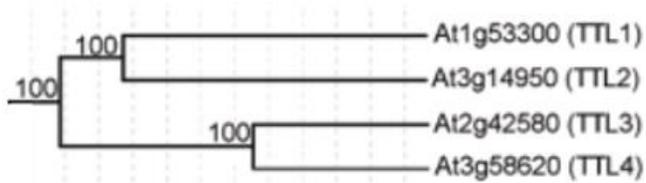
A**B**

Figura 7. A. Localización de los dominios TPR (anaranjados) y TRLX (negros) característicos en los cuatro miembros de la familia TTL. Imagen tomada de Prasad *et al.*, 2010. **B.** Relación filogenética entre los cuatro TTLs. TTL1 y TTL2 pertenecen a un clado y TTL3 y TTL4 a otro. Se indican valores de bootstrap. Imagen extraída de Rosado *et al.*, 2006.

El gen *TTL2* de *Arabidopsis* no posee expresión en la raíz en comparación con *TTL1*, *TTL3* y *TTL4* que presentan una localización ubicua en dicho órgano. Los mutantes simples *ttl2* no presentan fenotipo de hipersensibilidad radicular al exponerlos a concentraciones incrementales de manitol, a diferencia de *ttl1*, *ttl3* y *ttl4* que si muestran un fenotipo de hipersensibilidad a 300 mM y 400 mM manitol. Esto sugiere que un gen *TTL* ancestral tuvo un rol importante en la tolerancia al estrés osmótico y luego de una duplicación segmental, *TTL2* modificó su función original. *TTL2* se expresa específicamente en el gametofito masculino. El mutante *ttl2* posee defectos en la transmisión del polen, lo que provoca una reducción en la fertilidad de la planta (Lakhssassi *et al.* 2012).

Las investigaciones en raíz se han enfocado en el estudio funcional de *TTL1*, *TTL3* y *TTL4* utilizando simples, dobles y triples mutantes para ello (Xin *et al.*, 2022; Kesten *et al.*, 2022 ; Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Amorim-Silva *et al.*, 2019; Lakhssassi *et al.*, 2012; Rosado *et al.*, 2006). El triple mutante *ttl1ttl3ttl4* es el genotipo que presenta mayor hipersensibilidad al estrés osmótico en comparación a los mutantes simples y dobles, sugiriendo que los genes *TTL* poseen funciones similares en la tolerancia al estrés osmótico. Sin embargo, en experimentos de dosis génica se descubrió que estos genes no son completamente redundantes, sino que la respuesta al estrés osmótico depende de la contribución individual de cada *TTL*. En adición a esto,

Lakhssassi *et al.* 2012 demostró que *ttl4* fue el único mutante que incrementó el crecimiento de la raíz y el peso fresco de sus cotiledones en concentraciones moderadas de NaCl, además las plántulas de este mutante presentaron un aumento significativo en el contenido de Na⁺. Esto sugiere que *TTL4* sufrió un proceso de neofuncionalización que lo distingue del resto de las *TTLs* y que *ttl4* es capaz de mejorar la tolerancia de la planta al NaCl ya sea mediante un transporte optimizado del Na⁺ a larga distancia o aumentando la capacidad de las plántulas para compartimentalizarlo.

Por otro lado, un estudio reciente de nuestro grupo, evidenció que al menos un ortólogo de *TTL* en soja (*Glycine max*) presenta expresión diferencial en condiciones de restricción hídrica a nivel traduccional (Sainz *et al.*, 2022), confirmando la función de estos genes durante la adaptación a distintos tipos de estrés abiótico.

Según análisis fenotípicos, moleculares y genéticos, se ha demostrado que los genes *TTL1*, *TTL3* y *TTL4* además de su rol en la tolerancia al estrés abiótico, son reguladores positivos de la señalización por BRs y su expresión es inducida específicamente por la aplicación de esta hormona (Amorim-Silva *et al.* 2019; Prasad *et al.*, 2010).

Durante los últimos años el grupo de investigación liderado por Miguel-Ángel Botella (Universidad de Málaga, España) se dedicó al estudio de la proteína TTL3 cuyo gen es el más expresado en raíz entre los genes de la familia *TTL*. TTL3 se ha identificado como un compañero de interacción del dominio citoplasmático fosforilado de un receptor tipo quinasa de la familia BRI con un rol importante en el desarrollo del sistema vascular (Amorim-Silva *et al.*, 2019; Lakhssassi *et al.*, 2012; Ceserani *et al.*, 2009). Amorim-Silva *et al.*, 2019 demostraron que TTL3 interactúa con las formas constitutivamente activas de BRI1, BSU1 y BZR1, además de que se asocia *in-vivo* con la mayoría de los componentes involucrados en la señalización de BRs. También mostraron por primera vez que, frente al estímulo de BRs en las células, TTL3 es reclutado desde el citosol hacia la membrana plasmática, donde actuando como andamiaje, es capaz de amplificar y estabilizar la señal inicial de la hormona. A su vez reportaron que TTL3 es una proteína de membrana periférica que muestra una localización dual en el citosol y en la membrana plasmática como parte del Complejo Celulosa Sintasa (CCS) (Pedersen *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021; Davis *et al.*, 2010; Paredez *et al.*, 2006).

Kesten *et al.* 2022 demostraron que TTL3: 1) interactúa directamente con CESA1 exclusivamente en la membrana plasmática; 2) posee interacciones con los microtúbulos; 3) es esencial en la regulación de los microtúbulos y en la dinámica del CCS para permitir la biosíntesis de la celulosa durante el estrés salino. Los dos últimos resultados fueron confirmados por (Xin *et al.*, 2022), que además demostraron que TTL3 se asocia a endomembranas. Condiciones que causan alteraciones en el contenido de celulosa como alta salinidad o alteraciones genéticas en el CCS, desencadenan el reclutamiento de TTL3 desde el citosol al CCS en la membrana plasmática, permitiendo la estabilización de los microtúbulos (Kesten *et al.*, 2022).

Con respecto a TTL1, recientemente Kesten *et al.*, 2022 mostraron la localización dual de esta proteína en el citoplasma y en la membrana plasmática principalmente en las células de la ZE de la raíz. Esto podría sugerir que TTL1, al igual que TTL3, es una proteína periférica de membrana que co-migra con el CCS. Este grupo también encontró mediante experimentos de dobles híbridos en levaduras (Y2H) que TTL1 es capaz de interactuar directamente con CESA1. Además, los valores de epistasis calculados en el trabajo previo de nuestro grupo sugieren que *TTL1* y *CESA6* podrían participar secuencialmente en la formación de la pared celular (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021).

1.6.1 Caracterización de *tll1* en condiciones control

Nuestro grupo se ha centrado en entender los mecanismos de desarrollo de las raíces para adaptarse al estrés osmótico a través del uso de las respuestas de *tll1*. Debido a que el mutante *tll1*, se encuentra en fondo *Columbia-0* (Col-0), el mismo se utilizó como genotipo silvestre. En condiciones control la tasa de crecimiento de la raíz de Col-0 no es diferente a la del mutante *tll1* (**Figura 8A**). En condiciones control Col-0 cuenta en promedio con 43 ± 5 células en su MP (**Figura 8B**) y el largo de la célula madura posee en promedio 147 ± 16 μM . Sin embargo, *tll1* cuenta en promedio con 33 ± 5 células en su MP (**Figura 8B**) y el largo de la célula madura es en promedio de 101 ± 15 μM . Trabajos previos de nuestro grupo han reportado que el mutante *tll1* presenta las paredes celulares de las células en elongación más elásticas que Col-0 incluso en condiciones control (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021).

1.6.2 Caracterización de *tll1* en condiciones de shock osmótico.

No se detectan diferencias morfológicas en la organización del MP de *tll1* ni en condiciones control ni de estrés osmótico (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021, **Figura 8B** y **8C**); sin embargo, el crecimiento en condiciones de shock osmótico reduce la tasa de crecimiento de la raíz primaria (**Figura 8A**) mediante la inhibición de la elongación celular seguida de una reducción en el número de células en el meristemo proximal (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021, **Figura 8C**). Bajo estrés hiper-osmótico y salino, la epidermis y el córtex celular de las raíces de *tll1* se hinchan radialmente (al igual que las raíces de *tll3*) probablemente por una disrupción en la síntesis y deposición de celulosa, hemicelulosa, pectinas y/o modificación de sus interacciones. Esto genera una alteración en el crecimiento anisotrópico de este órgano (Xin *et al.*, 2022; Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Cajero-Sanchez *et al.*, 2019; Rosado *et al.*, 2006, **Figura 8C**). A partir de datos de AFM, nuestro grupo detectó que bajo condiciones de estrés osmótico, las paredes celulares de *tll1* no alcanzan la magnitud de rigidez de Col-0. Esto sugiere un posible rol de *TTL1* en el mantenimiento de las propiedades físicas de la pared celular necesario para un crecimiento

radicular apropiado durante el estrés osmótico. En este proceso, también estaría involucrada la homeostasis entre auxinas y BR (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021).

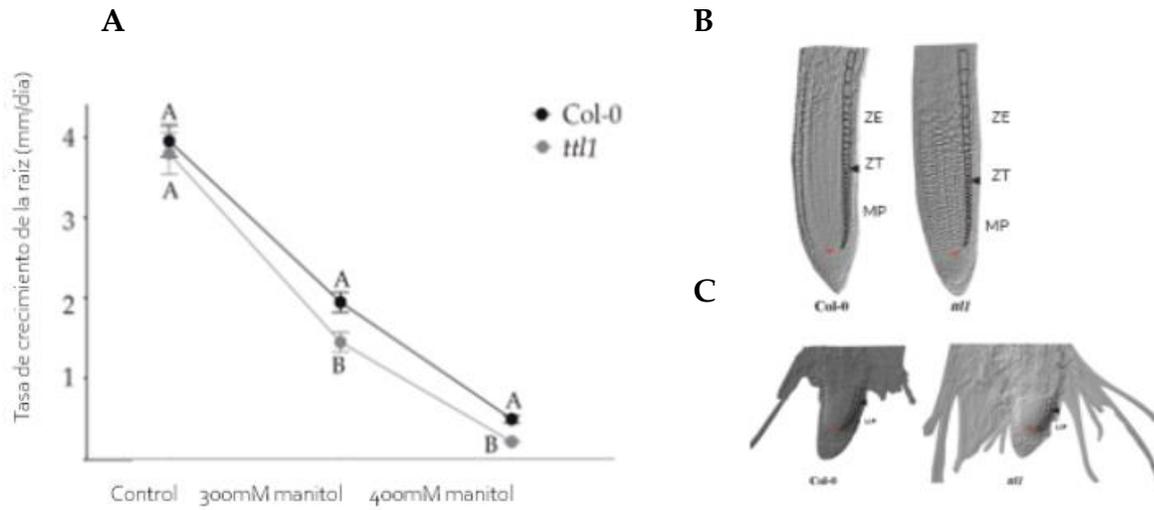


Figura 8. A. Tasa de crecimiento de raíces de Col-0 y *ttl1* en condición control, en 300 mM y en 400 mM manitol. Letras diferentes son diferencias estadísticamente significativas (t Student $p < 0.001$; $n = 30$). **B.** Corte longitudinal de las raíces primarias de Col-0 y *ttl1* indicando las zonas de desarrollo en condición control y **C.** en estrés osmótico (-1,2MPa). MP: Meristemo Proximal. ZT: Zona de transición. ZE: Zona de elongación. Imagen adaptada de Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021.

Cuando una raíz explora el suelo puede ser que no se encuentre inmersa en una situación en donde toda la raíz esté expuesta al mismo potencial osmótico. Por eso en este trabajo simulamos una situación en donde la raíz va encontrando paulatinamente potenciales osmóticos crecientes. En esta tesis se realizó una comparación entre el crecimiento en shock osmótico con datos obtenidos por Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021 y el crecimiento de las raíces en un gradiente osmótico.

2. Hipótesis

Existe una respuesta fenotípica y transcripcional diferencial del meristemo radicular del mutante *tll1* de Arabidopsis en condiciones de estrés osmótico.

Objetivo General: Entender el rol de *TTL1* en raíces de Arabidopsis durante la adaptación al estrés osmótico.

Objetivo específico 1. Caracterización del meristemo de raíces de Col-0 y *tll1* y evaluación de su capacidad de recuperación en condiciones de crecimiento en gradiente osmótico.

Objetivo específico 2. Análisis de la expresión de genes de la familia *TTL*, genes de síntesis y señalización de brasinosteroides, síntesis y remodelación de pared y ciclo celular en raíces de *tll1* en condiciones control y de estrés osmótico.

Objetivo específico 3. Con el fin de evaluar la existencia de correlación entre los genes que se transcriben y los que se traducen activamente, realizaremos experimentos de inmunopurificación de polisomas mediante la técnica TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification), en raíces de Col-0 y *tll1* crecidas bajo condiciones control, de shock y gradiente osmótico.

3. Materiales y métodos

3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se utilizó la línea original de inserción T-DNA SALK_063943 (para *TTL1*; AT1G53300), las líneas marcadoras *pTTL1::GUS*, *DR5::GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997), *ttl1 x DR5::GUS* (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021) y la línea sobreexpresante *35S::HF-RPL18* (CS66056, stock ABRC) (Zanetti *et al.*, 2005). Debido a que los mutantes, líneas marcadoras y sobreexpresantes se encuentra en fondo *Columbia-0* (Col-0), el mismo se utilizó como genotipo silvestre.

En una cámara de flujo laminar las semillas se sumergieron en 70% etanol durante siete minutos, luego en hipoclorito de sodio 20% con TWEEN®20 (Sigma, número de catálogo: P1379-100mL) por siete minutos, y por último se realizaron 5 lavados con agua milli-Q estéril.

Las semillas estériles se sembraron en medio Murashige and Skoog (Murashige & Skoog, 1962), **Tabla 1 del Anexo**) + 1,5% sacarosa + 1,2% agar con un pH de 5,7 en placas de petri cuadradas de 12.0 cm x 12.0 cm. Las mismas se estratificaron por 48 h en oscuridad a 4°C.

Previo a la siembra de las semillas, el medio de cultivo fue esterilizado en autoclave por 20 min a 121°C. El medio de cultivo descrito fue considerado como el medio control. Para los ensayos en maceta se utilizó como sustrato una mezcla de relación 3:1:1 de turba, perlita y vermiculita respectivamente. Las macetas utilizadas poseían un tamaño de 25 cm de largo x 15 cm de ancho. Después de la estratificación, las placas sembradas se pasaron a una cámara del tipo biotróon con condiciones controladas: fotoperiodo de día largo 16 h luz/ 8 h oscuridad, intensidad lumínica de 50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura de 22°C y 60% de humedad relativa. Después de siete días post-germinación, las plántulas fueron redistribuidas a diferentes tratamientos.

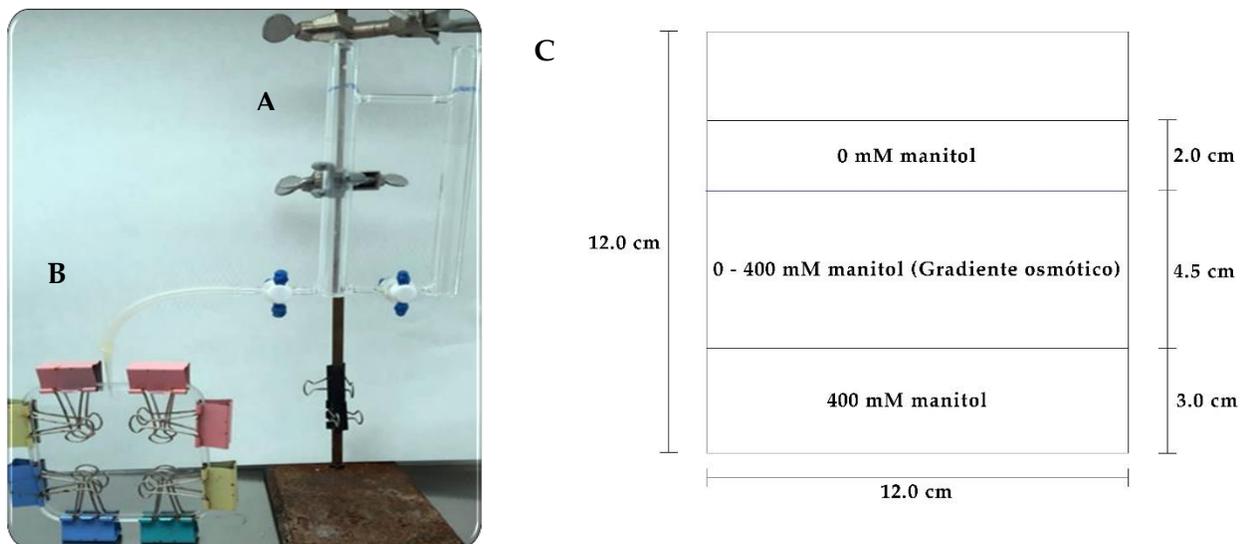
3.2 Tratamiento de shock osmótico

Las plántulas de 7 días post-germinación se transfirieron a placas que contenían medio MS + 1,5% + 1,2% agar pH 5.7 + 400mM manitol. Este medio de cultivo genera un potencial osmótico de -1.2 MPa.

3.3 Tratamiento en gradiente osmótico.

Utilizando un gradientómetro (**Figura 9A**) y un recipiente vertical con las mismas dimensiones de una placa de petri de 12.0 cm x 12.0 cm (**Figura 9B**) generamos el medio de cultivo sólido de una extensión de 4.5 cm. El gradiente osmótico se estableció a través de la mezcla de dos medios, uno sin manitol y el otro con 400 mM manitol. Esta mezcla produce potenciales osmóticos crecientes desde 0 MPa hasta -1,2 MPa. Las placas para el crecimiento de las plantas se armaron colocando de manera secuencial 1 bloque de medio con 400 mM de manitol (3.0 cm), 1 bloque de medio con gradiente osmótico (4.5 cm) y 1 bloque de medio sin manitol (2.0 cm) (**Figura 9C**). Para la preparación de los medios se trabajó en cámara de flujo laminar y se utilizaron materiales y medios esterilizados en autoclave o luz ultravioleta dependiendo de las características de los mismos (ver **nota 1** en **Anexo**).

La formación del gradiente fue evaluada utilizando el colorante Rojo Congo y mediante ensayos de germinación de semillas como se puede observar en la **Figura 1** del **Anexo**.



Se colocaron 5 a 6 plántulas de 7 días post germinación por genotipo en la misma placa. Las puntas de las raíces se colocan en 0 mM de manitol en el límite de entrada al gradiente. Se tomaron fotografías todos los días para medir el crecimiento de las raíces en el gradiente osmótico y se correlacionó el potencial osmótico alcanzado por las raíces a través del tiempo apoyándonos en una regla (**Figura 10**) que correlaciona la concentración de manitol con

potenciales osmóticos estimados utilizando un osmómetro crioscópico modelo OSMOMAT 030 (Gonotech, Berlin, Germany).

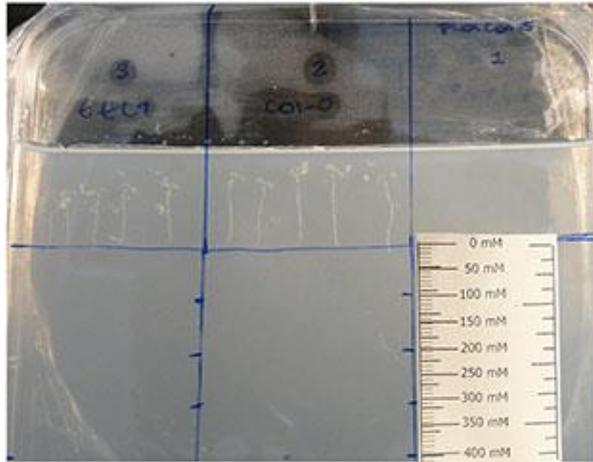


Figura 10. Imagen que muestra cómo se sembraron las plántulas en las placas de cultivo con gradiente osmótico. Las plántulas se colocan en 0 mM de manitol y las puntas de las raíces se ubican en la entrada al gradiente. Se muestra la regla que correlaciona las concentraciones de manitol con los potenciales osmóticos medidos con el osmómetro modelo OSMOMAT 030 (Gonotech, Berlin, Germany).

3.4 Tratamiento con hormonas.

Se realizaron experimentos con hormonas y algunos inhibidores de hormonas: Auxinas (0,1 μ M IAA - Ácido indolacético, Sigma, número de catálogo: I8639.5G), citoquininas (1 μ M BAP - 6-Bencilaminopurina, Sigma, número de catálogo: B3408-1G), Brasinosteroides (0,2 μ M eBL - epiBrasinolide, Sigma, número de catálogo: E1641-2MG), Giberelinas (1 μ M Ga-3 - Ácido giberélico, Sigma, número de catálogo: G7645-1G), el inhibidor de brasinosteroides (0,5 μ M PCZ- Propiconazole, Supelco, número de catálogo: 45642) y el inhibidor de Giberelinas (1 μ M PAC - Paclobutazole, Supelco, número de catálogo: 46046).

Las concentraciones indicadas de hormonas e inhibidores fueron añadidas al medio de cultivo control y al medio suplementado con 400mM de manitol.

3.5 Análisis de las tasas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento de Col-0 y *tll1* se realizaron para el experimento de gradiente osmótico. El crecimiento de las raíces fue monitoreado y fotografiado diariamente durante 25 días. Las imágenes fueron tomadas con una cámara fotográfica digital Sony® Cyber-shot DSC-HX1. El largo de las raíces se midió desde el hipocótilo hasta la punta de la raíz utilizando el programa libre Image J Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

3.6 Análisis del meristemo proximal.

Las raíces fueron clareadas con una solución compuesta por 8 volúmenes de hidrato de cloral, 3 volúmenes de agua destilada y 1 volumen de glicerol.

Una vez clareadas, las raíces se montaron en un portaobjeto con 40 μL de la solución de hidrato de cloral y se cubrieron con un cubreobjeto.

Los preparados de microscopía fueron observados y fotografiados con el Microscopio de Epifluorescencia ZEISS – AXIO Imager. M2. Con óptica DIC (Contraste de Interferencia Diferencial) o Nomarski.

Para el análisis del meristemo proximal se contaron las células del córtex y se tomaron las medidas de largo y ancho de las mismas, desde el centro quiescente hasta la primera célula elongada. Este punto fue considerado como el inicio de la ZE, la cual se extendió hasta el primer pelo radicular. La última célula de la ZE fue considerada como la célula más elongada o “célula madura” cuyo largo y ancho fue medido (Perilli & Sabatini, 2010).

3.7 Cálculo de parámetros de crecimiento primario de la raíz.

El cálculo de parámetros se realizó según (Cole *et al.*, 2014) para las raíces crecidas en gradiente osmótico.

- a- Tasa de crecimiento de la raíz: (longitud al día 25 – longitud al día de entrada a 300 mM manitol) / número de días.
- b- Tasa de producción celular: $a/$ promedio de la longitud de la célula madura
- c- Longitud del ciclo celular: $((\text{Cantidad de células en MP}/b) * \ln(2))$
- d- Intervalo entre células consecutivas de la ZT a ZE: $1/b$

3.8 Análisis de GUS.

Se evaluaron tres líneas reporteras con promotores de genes fusionados a la β -glucoronidasa (GUS): *TTL1:GUS*, *DR5:GUS* y *ttl1 x DR5:GUS*. Plántulas de estas líneas fueron sometidas a una combinación de estrés y hormonas para evaluar la actividad GUS al realizar la reacción histoquímica con el X-Gluc *in-vivo*. Los tratamientos experimentales para cada línea fueron:

- Control
- Control + 1 μM Ga-3
- Control + 1 μM PAC
- Control + 1 μM BAP
- Shock osmótico (400mM manitol)
- Shock osmótico + 1 μM Ga-3
- Shock osmótico + 1 μM PAC
- Shock osmótico + 1 μM BAP

Luego de 30 min en cada tratamiento, se procedió a realizar la tinción de GUS, para esto se modificó el protocolo de (Weijers *et al.*, 2001). Los tejidos fueron fijados por una hora en 90% acetona a -20°C. Luego se lavaron dos veces por cinco minutos con buffer fosfato 0.1 M pH 7.0 en condiciones de vacío. Posteriormente los tejidos se infiltraron con buffer de tinción (**Tabla 1**) por diez minutos bajo condiciones de vacío y después las muestras se incubaron durante toda la noche (16 h) a 37°C. Al día siguiente los tejidos teñidos con GUS fueron fijados en una mezcla 3:1 de etanol y ácido acético. Luego fueron clareados y montados en una gota de una solución v/v 1:1 de hidrato de cloral y 20 % ácido láctico.

Tabla 1. Composición para 1mL del buffer de tinción utilizado para evaluar la actividad GUS.

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer fosfato 0.1 M pH 7.0	500
EDTA 0.5 M	2
Tritón 10X	10
X-Gluc (40 mM) (Thermo Scientific, número de catálogo: R0851)	25
K ₃ Fe(CN) ₆ (stock 10 mM)	100
K ₄ Fe(CN) ₆ (stock 5.1 mM)	196
Agua ultra pura	167

3.9 Genotipado de *tll1*.

Para confirmar la presencia de la inserción de T-DNA en homocigosis en el gen *TTL1* se realizó el genotipado del mutante.

3.9.1 Extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN genómico se colectaron una o dos hojas de entre 1 cm y 3 cm de longitud de plantas creciendo en sustrato. Estas fueron maceradas con nitrógeno líquido, luego se añadieron 175 μL de Shorty buffer (**Tabla 2**), se continuó macerando hasta obtener una mezcla homogénea y se agregaron 175 μL más de buffer. La mezcla se centrifugó por 10 min a 13.000 x g. A 100 μL de sobrenadante se le agregó 175 μL de isopropanol fresco, se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 13.000 x g. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 10-15 minutos al aire libre. Luego el pellet con el ADN se resuspendió en

100 μ L de buffer TE (Tris/EDTA) pH 8.0. Se tomó 1 μ L de las muestras de ADN como molde para las PCRs subsecuentes y se guardaron para su conservación a -20°C .

Tabla 2. Componentes del Shorty buffer

Componente	Concentración
Tris/HCl pH 9.0	0.2 M
LiCl	0.4 M
EDTA	25 mM
SDS	1%

3.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final.

Las reacciones de PCR para amplificar el ADN se realizaron en un volumen final de 10 μ L con el kit Taq DNA polymerase, recombinant (5U/ μ L) (Thermo Scientific, n° de catálogo: EP0406) según la **Tabla 3**. En la **Tabla 2** del **Anexo** se listan las secuencias de los cebadores utilizados. La mezcla se incubó en el termociclador Labcycler 48 de SensoQuest. En la **Tabla 4** se exponen los pasos de ciclado utilizado.

En el caso de *ttl1* como es una línea SALK, para genotiparlo es necesario utilizar dos juegos de primers. Un par correspondiente a la amplificación del gen de *TTL1*, y otro par utilizando un primer Forward (Fw en adelante) que sea complementario al T-DNA insertado en el mutante (LB SALK) y uno Reverse (Rv en adelante) complementario al gen *TTL1* (Koiwa *et al.*, 2006; Rosado *et al.*, 2006).

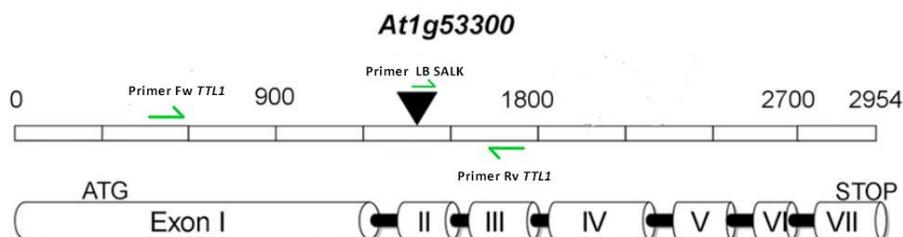


Figura 11. Secuencia de ADN del gen *TTL1* (At1g53300). La flecha negra indica el lugar de inserción del

T-DNA, que da lugar al mutante *ttl1*. Las flechas verdes indican la ubicación de los primers utilizados para genotipar a *ttl1*. Imagen adaptada de Rosado *et al.*, 2006.

Tabla 3. Reactivos utilizados en una reacción de PCR de 10 μ L.

Reactivos	Volumen	Concentración final
10X Taq Buffer	1 μ L	1X
25 mM MgCl ₂	0.6 μ L	1.5 mM
10 mM dNTPs	0.2 μ L	0.2 mM de cada uno
10 μ M Fw Primer	0.2 μ L	0.2 μ M
10 μ M Rv Primer	0.2 μ L	0.2 μ M
ADN molde	1 μ L	10pg - 1 μ g
Taq DNA Polimerasa	0.05 μ L	1.25 U
H ₂ O	6.75 μ L	

Tabla 4. Paso del ciclado de PCR utilizado

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°	90 segundos	1
Desnaturalización	95°	30 segundos	35
Temperatura "annealing"	Dependiente de primers (tm- 5°C)		35
Extensión	72°	1 minuto/Kb	35
Extensión final	72°	5 minutos	1

3.9.3 Electroforesis en gel de agarosa.

El ADN se corrió en un gel horizontal de agarosa 1% en buffer TAE 1X (**Tabla 3 Anexo**), con 0.2 mM de SyberTMSafeDNA gel stain (Invitrogen, número de catálogo: S33102). Antes de cargar el ADN en el gel, se los mezcló con 2 μ L de DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific™, número de catálogo: R0611).

Las muestras fueron sembradas en el gel junto a un marcador de peso molecular (MPM). Dependiendo del tamaño del amplicón se utilizaron dos MPM: GeneRuler 100bp plus DNA

Ladder (Thermo Scientific™, número de catálogo: SM0321); o GeneRuler 1Kb DNA Ladder, (Thermo Scientific™, número de catálogo: SM0311).

Se corrió el gel a 100 mV en buffer TAE 1X durante 45 min. La visualización del gel se llevó a cabo en el equipo Dyalight Dual Intensity UV Transilluminator.

En la electroforesis resultante del genotipado del mutante *tll1* se espera no obtener bandas en el carril donde se cargó la PCR con los primers para amplificar *TLL1*, sin embargo es deseado obtener una banda en el carril donde se cargó la PCR con el primer Fw complementario al T-DNA (LB SALK) y Rv complementario a *TLL1*. En la **Figura 2** del **Anexo** se muestra un patrón típico de bandas resultante del genotipado de *tll1*.

3.10 Ensayos de expresión diferencial de genes.

En la **Figura 12** se muestra un esquema general de los pasos a seguir para realizar un experimento de RT-qPCR que se describen a continuación.

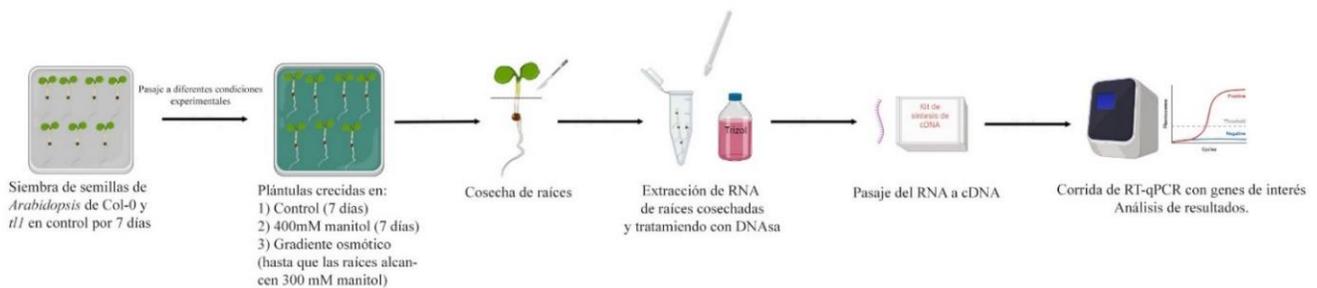


Figura 12. Esquema general de un experimento de RT-qPCR.

3.10.1 Extracción de ARN.

Para los experimentos en medio control y en shock osmótico (400 mM manitol) se utilizaron tres réplicas biológicas, cada una con 50 - 60 raíces de plántulas crecidas durante siete días en cada condición. Para el experimento en gradiente también se contó con tres réplicas biológicas, cada una con 6 - 7 raíces de plántulas crecidas durante 25 días en el gradiente. El MP de estas raíces se encontraba en el rango de 300 - 400 mM manitol. El largo alcanzado por las raíces en este experimento fue suficiente para extraer la cantidad de ARN necesaria para realizar ADN copia (ADNc).

A partir de las muestras colectadas se realizó la extracción de ARN con TRIzol™ (Invitrogen™, número de catálogo: 15596026) según las instrucciones del fabricante. El pellet de ARN se disolvió en 20 µL de agua tratada con DEPC libre de nucleasas (Invitrogen™, número de catálogo AM9915G). Se tomó una alícuota de 1 µL de los ARN para control y se procedió al tratamiento con ADNasa.

El ARN fue sometido a un tratamiento con ADNasa I libre de ARNasas (NEB®, número de catálogo M0303S). A 20 µL de ARN se le agregaron 2 µL de buffer 10X y 0.5 µL de enzima (5 unidades) y se incubó a 37°C por 10 min en thermoblock, luego se añadieron 2 µL de EDTA 50 mM. La enzima se inactivó por calor a 75°C por 10 min.

A efectos de evaluar la integridad y cantidad del ARN extraído se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. El procedimiento seguido fue igual que en el punto 3.9.3. En cada pocillo se cargó 1 µL de ARN y 0.2 µL buffer de carga 6X. Además del ARN obtenido luego del tratamiento con ADNasa, también se corrieron las alícuotas tomadas previamente a este proceso a efectos de descartar la degradación del ARN generado por una contaminación durante el tratamiento. En la **Figura 3 del Anexo** se puede ver el perfil de bandas de muestras de ARN obtenido luego de realizar una electroforesis en gel de agarosa 1%.

3.10.2 Síntesis de ADNc.

Las estimaciones de concentraciones de ARN se realizaron en base a la visualización de las bandas obtenidas en los geles de agarosa y su comparación con el MPM de 100 pb Plus (Thermo Scientific™, número de catálogo: SM0321) de referencia. Estas estimaciones se usaron para la generación de los ADNc. La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo con el kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, número de catálogo: 18090050) utilizando oligo d(T)₂₀ y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el fin de evaluar la correcta síntesis del ADNc se realizaron RT-PCRs (PCR a tiempo final semicuantitativa) según el punto 3.9.2 y 3.9.3 utilizando primers de actina (**Tabla 2 Anexo**) para diferenciar la amplificación de ADN genómico de la de ADNc (**Figura 4 Anexo**).

3.10.3 RT-qPCR.

Se utilizaron dos kits diferentes:

- PoweUp™SYBR™ Green Master Mix for qPCR (Applied Biosystems™, número de catálogo: A25742)
- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master MIX (2X) (Thermo Scientific™, número de catálogo: K0222).

Las reacciones de ambos kits se configuraron del mismo modo según la **Tabla 5**.

Se utilizaron las tiras de ocho tubos MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL junto a las tapas MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips (Applied Biosystems™, números de catálogo: 4358293 y 4323032 respectivamente).

Tabla 5. Componentes necesarios para configurar una reacción de RT-qPCR de 10 μ L.

Reactivos	Volumen	Concentración final
PoweUp TM SYBR TM Green Master Mix (2x)/ Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master MIX (2X)	5 μ L	1X
10 μ M Fw Primer	0.6 μ L	0.6 μ M
10 μ M Rv Primer	0.6 μ L	0.6 μ M
AND molde	1 μ L	\leq 500 ng
Agua libre de nucleasas	2.8 μ L	

El termociclador utilizado fue el QuantStudioTM 5 Real-Time PCR System, 96-well, 0.1 mL Applied BiosystemsTM, número de catálogo: A28138). Los programas de ciclado y de las curvas de disociación se muestran en la **Tabla 6** y **7** respectivamente.

Tabla 6. Programas de ciclado utilizados con cada kit de RT-qPCR.

	PoweUp TM SYBR TM Green Master Mix (2x)		Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master MIX (2X)		
Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Activación UDG	50	2 min	50	2 min	1
Desnaturalización inicial	95	2 min	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	95	15 s	40
“Annealing”/Extensión	60	1 min	60	1 min	

Tabla 7. Condiciones de la curva de disociación utilizada con ambos kits de RT-qPCR.

Paso	Tasa de variación (°C/ s)	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1.6	95	15 s
2	1.6	60	1 min
3	0.15	95	15 s

3.10.4 Cálculo de eficiencia de primers.

Antes de realizar los experimentos de expresión diferencial de genes, es necesario calcular la eficiencia de los primers de los genes de interés. Para esto se mezclaron diferentes ADNc y se realizaron 6 diluciones seriadas 1/10. Luego se configuraron 12 reacciones de RT-qPCR según la **Tabla 6** correspondientes a dos réplicas técnicas de cada dilución.

Luego de la corrida se extrajeron los valores de CT de cada muestra y se procedió a calcular el promedio de las réplicas técnicas de cada muestra. Después se graficó una curva estándar conformada por los logaritmos del valor de las diluciones vs el promedio de los CT de las muestras para cada dilución. El resultado esperado es una recta cuyo R^2 sea próximo a 1 y la pendiente obtenida a partir de la ecuación de la recta sea próxima a -3.32, ya que este valor asume una eficiencia de primers del 100%. Luego de obtener la pendiente de la recta, se utilizó dicho valor en la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) * 100.$$

En la **Tabla 4** del **Anexo** se muestra la eficiencia de los primers utilizados en este trabajo.

3.10.5 Ajuste de CT de gen housekeeping y experimentos de expresión diferencial de genes.

Para cada ensayo de RT-qPCR se consideraron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Antes de comenzar con los ensayos de expresión diferencial de genes se realizó el ajuste de CT del gen *housekeeping* para todas las muestras. Para ello se realizó una corrida de RT-qPCR con las réplicas biológicas y técnicas de cada genotipo (Col-0 y *tll1*) en las tres condiciones experimentales (control, shock y gradiente osmótico) con los primers del gen *RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA* (Geng *et al.*, 2013) de Arabidopsis que fue utilizado como gen *housekeeping*. Se extrajeron los valores de CT de la corrida de las muestras y se buscó que en la próxima corrida de RT-qPCR el gen *housekeeping* amplificara aproximadamente en los mismos valores de CT en todas las muestras (entre 18 y 20). Esto se logró mediante la ecuación:

$$\text{Ajuste CT} = 2^{(\text{ct que quiero} - \text{ct que tengo})}.$$

Para los cálculos del fold-change o tasa de cambio de la expresión de los diferentes genes evaluados, se siguió el método $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ propuesto por Livak (Livak & Schmittgen, 2001). Es importante mencionar que si las eficiencias de los pares de primers que se utilizaron en un ensayo de expresión diferencial de genes no poseen una eficiencia similar y entre el 90% y el 110%, entonces para calcular el fold-change es necesario aplicar el ajuste matemático de Pfaffl (Pfaffl, 2001). En cada corrida de qPCR se incluyeron los primers para amplificar el gen *housekeeping*. Las muestras de Col-0 en control se usaron como condición calibradora para normalizar los ΔCT de las muestras de Col-0 en shock y gradiente osmótico, y de *tll1* en control,

shock y gradiente osmótico. Además en cada experimento, se incluyó un control negativo con ausencia de molde de ADNc.

En la **Figura 5A** del **Anexo** se ejemplifican las curvas que se obtuvieron a partir de un experimento de RT-qPCR. Las curvas de disociación se utilizaron como un indicador de una correcta amplificación (**Figura 5B** del **Anexo**). En la **Tabla 8** se indican las secuencias de los primers utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

Tabla 8. Secuencia de primers utilizados en los experimentos de RT-qPCR

Gen a amplificar	Secuencias de los primers
<i>RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA (AT4G37830)</i>	Fw: 5'- GCG ATT GTA CGT TCA GCT CTT TC-3'
	Rv: 5'- GTG CTC TTT GTT GTG CTT CAC C-3'
<i>CESA1 (AT4G32410)</i>	Fw: 5'- TCA TCA TAC CCG AGA TAA GCA AC-3'
	Rv: 5'- ACG ACT GGT AGC CAA CTG TTT AC-3'
<i>CESA3 (AT5G05170)</i>	Fw: 5'- CGT GCT GAC AGG ACC AGT ATT-3'
	Rv: 5'- CTT ACT CGT GGG AAG GGA GAG G-3'
<i>CESA6 (AT5G64740)</i>	Fw: 5'- ACA GCA CAG AAA GTG CCT GAG-3'
	Rv: 5'- GGA GCA TTT GAT AGA ACC CCA-3'
<i>TTL1 (AT1G53300)</i>	Fw: 5'- GCTAGCCAAATCGATCCAAG-3'
	Rv: 5'-AGCTCCCCATCTTTCCATCT-3'
<i>TTL3 (AT2G42580)</i>	Fw:5'- ATG GTG GAT GTG GAG GAG AG-3'
	Rv: 5'- AGC AGA GCC AAA CTC CAA AA-3'
<i>TTL4 (AT3G58620)</i>	Fw: 5'-ACCCGCTGTCACTTCTCAGT-3'
	Rv: 5'- CTAACGGAGGCTCGTGTAGC-3'
<i>PECTATO LIASA12 (AT5G04310)</i>	Fw: 5'-CGG AAG GTG ACG TTA TGG TT-3'
	Rv: 5'-TCA ATG TGA AAA GCC CAT CA-3'
<i>CSLA9 (AT5G03760)</i>	Fw: 5'-TCG GTT TAC TCG AAG GAG GA-3
	Rv: 5'-GAT TGC TTG TGC GAA AAG GT-3'
<i>EXPANSINA 1 (AT1G69530)</i>	Fw: 5'-AAG GCT ATG GAA CCA ACA CG-3
	Rv: 5'-ATT TTC GCC ACT GGA ATT G-3'
<i>AHA1 (AT2G18960)</i>	Fw: 5'-AAT TTT CGC CAC TGG AAT TG-3'
	Rv: 5'-ACC AAC TCC TTG ACC TGG TG-3'

<i>AHA2</i> (AT4G30190)	Fw: 5'-TGC TCA AAG GAC ACT TCA CG-3'
	Rv: 5'GCC CTT TAG CTT CAC GAC TG-3'
<i>CYCD3:1</i> (AT4G34160)	Fw: 5'-CCTCTCTGTAATCTCCGATTCAA-3'
	Rv: 5'- AAAGGGTTTGCATCAATCACG-3'
<i>BES1</i> (AT1G19350)	Fw: 5'- CGA GTT GGT GAT CCA CAC AAT A-3'
	Rv: 5'-GGA GGA AGC GAT GAA GGA ATA C -3'
<i>BAK1</i> (AT4G33430)	Fw: 5'-GTC AGA AAG TAG TGT CGC CA-3
	Rv: 5'-ACT TGT AGC GTC AGG ACA GC-3'
<i>DWF4</i> (AT3G50660)	Fw: 5'- GTG GGT GGA AAG TGT TAC CG-3
	Rv: 5'-CTG TTG CCA TCT CCA AGG AT -3 '
<i>CPD</i> (AT5G05690)	Fw: 5'-AGC AAC TCG GTA ACG ACA GG-3'
	Rv: 5'- CAG AGA GTG CAA CCC TAG CC-3

3.11 Preparación de la muestra y extracción de ARN para análisis de transcriptoma.

Se crecieron plántulas en placas de Petri cuadradas durante 7 días sobre tafeta de seda previamente colocada sobre el medio de crecimiento descrito en la sección 4.2. La disección se realizó bajo el estereomicroscopio Olympus SZ61 (Olympus, Tokyo, Japan). Se realizó la disección del meristemo proximal de raíz a 0.5 mm desde la punta, incluyendo la cofia y la zona de división celular, **Figura 2**). Se colectaron alrededor de 300 puntas para cada replica biológica y se usaron 3 réplicas biológicas independientes para el análisis transcriptómico. Las puntas de raíces fueron colocadas en 50 µL de buffer de extracción del kit ARCTURUS™ PicoPure™ RNA Isolation Kit (Applied Biosystems™, número de catálogo: KIT0204) en la tapa del tubo de microcentrífuga previamente rotulado y rápidamente congelados en nitrógeno líquido. Las puntas fueron maceradas con un pistilo. El ARN total fue extraído siguiendo las instrucciones del fabricante del kit ARCTURUS, eluyendo las muestras en un volumen final de 14 µL. La concentración de ARN fue determinada en un Qubit™ 4 (Invitrogen™, número de catálogo: Q33240), y la calidad de las muestras fue evaluada usando el Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

3.12 Puesta a punto de preparación de librerías para ARN-seq para plataformas de secuenciación nueva generación Illumina.

Se utilizaron 400 ng de ARN total para depletar el ARN ribosomal utilizando riboPOOL Kit_v1-4 (siTOOLS Biotech GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ARN total se hibridizó con sondas de ADN biotiniladas diseñadas para hibridar con ARN ribosomal (ARNr) perteneciente al citoplasma y organelos celulares, permitiendo la remoción con esferas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Una vez finalizada la remoción del ARNr, se limpiaron los concentrados de buffers y sales del ARN remanente mediante precipitación con etanol y purificación a través de esferas SPRI.

10 ng de ARN depletado de ARNr fueron utilizados para generar la librería utilizando Collibri Stranded RNA library Prep Kit for Illumina™ Systems (Invitrogen™, n° de catálogo: A39003024). Se fragmentó el ARN utilizando ARNase III a 30°C durante 3 minutos para obtener fragmentos de aproximadamente 300 pb. Estos fragmentos fueron purificados para hibridar con la mezcla de adaptadores (es un set de oligonucleótidos de ARN/ADN con secuencias monohebras degeneradas en un extremo y una secuencia definida en el otro). Una vez hibridados, los adaptadores son ligados. A partir de la población de ARN con adaptadores ligados se sintetizan ADNc con la enzima SuperScript IV. Luego el ADNc es amplificado a través de PCR incorporando los adaptadores compatibles con secuenciación Illumina, generando librerías listas para secuenciación de lectura única o pareada.

3.13 Puesta a punto de ensayos de inmunopurificación de polisomas.

3.13.1 Confirmación de la presencia de RPL18 en la línea sobreexpresante 35S::HF-RPL18

Las líneas 35S::HF-RPL18 y *ttl1 x 35S::HF-RPL18* serán utilizadas para realizar ensayos a futuro de inmunopurificación de polisomas mediante la técnica TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification, (Jin & Xiao, 2018; Zanetti *et al.*, 2005).

Las semillas comerciales 35S::HF-RPL18 adquiridas del ABRC stock (<https://abrc.osu.edu/>, Zanetti *et al.*, 2005) fueron genotipadas para confirmar la presencia de RPL18. En la **Figura 13** se muestra la construcción 35S:: HF-RPL18 y se indica la posición de los primers utilizados para comprobar la presencia de RPL18.

Las plantas positivas para RPL18 se conservaron para semillar y además se colectó material vegetal para extraer proteínas totales.

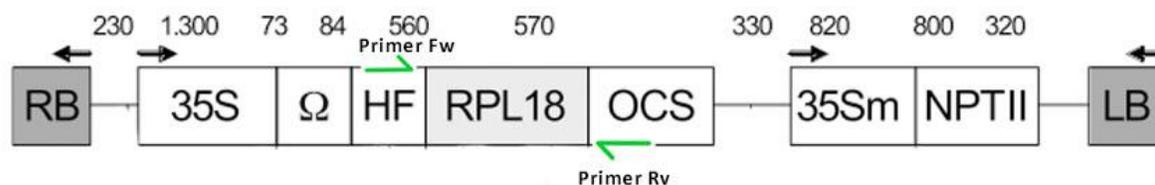


Figura 13. Esquema de la construcción *35S::HF-RPL18*. *35S*: promotor fuerte 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), *HF*: etiqueta His-FLAG, *OCS*: terminador 3'OCS, *NPTII*: gene de resistencia a kanamicina, LB: left border (borde izquierdo) del T-ADN, RB: right border (borde derecho) del T-DNA, *35Sm*: 820 nt del promotor fuerte 35S del CaMV, números: longitudes nucleotídicas estimadas para las secuencias de ADN. Las flechas negras indican la dirección de la transcripción. Las flechas verdes indican la posición de los primers forward y reverse utilizados para verificar la presencia de la construcción en las plantas de *Arabidopsis*. Imagen adaptada de Mustroph *et al.*, 2009.

3.13.2 Obtención del extracto proteico y cuantificación SDS-PAGE y Western blot.

A partir de 50-60 mg de hojas de plantas de las líneas de interés se realizó una extracción de proteínas totales. Las hojas fueron congeladas en nitrógeno líquido y maceradas hasta obtener un polvo fino. A este macerado se le añadió buffer de extracción de proteínas (**Tabla 5 Anexo**) en una relación 5:1 (buffer: tejido), y se centrifugó a 4°C y a 13.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf de 1,5 mL nuevo y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones. Se volvió a traspasar el sobrenadante a un eppendorf nuevo. Luego se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford (SIGMA, n° de catálogo: B6916-500 mL). Se partió de una curva de calibración con BSA (0 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL y 1,4 mg/mL). Una vez conocida la concentración de proteína en cada muestra, se diluyeron las muestras más concentradas a efectos de igualar las concentraciones a cargar en el gel de poliacrilamida, además se añadieron 5 µL de buffer de carga con SDS (**Tabla 6 Anexo**). Por último, antes de cargar las muestras en el gel, estas se calentaron a 95°C por 5 min para desnaturalizar las proteínas. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron rápidamente en hielo.

3.13.2.1 Elaboración de geles de poliacrilamida.

Se elaboraron dos geles de poliacrilamida al 12% (**Tabla 7A y B Anexo**), uno para evaluar la calidad y concentración del extracto proteico mediante tinción con azul de Coomassie y el otro para transferir a una membrana de PVDF (Roche, número de catálogo: 03010040001) mediante western blot.

Las muestras se cargaron en el gel de carga, y se corrieron con buffer de corrida (**Tabla 8 Anexo**) a 80 mV hasta que alcanzaron el gel de corrida, una vez allí el voltaje se subió a 100 mV, y el gel corrió por 45-60 min más. Luego se transfirió uno de los geles a un recipiente con solución de

commissie (**Tabla 9 Anexo**) y se dejó en agitación por una hora. Luego se descartó la solución y se realizaron cuatro lavados en agitación con solución de desteñido (**Tabla 10 Anexo**).

3.13.2.2 Western blot.

El segundo gel corrido se sumergió en buffer de transferencia (**Tabla 11 A y B Anexo**) durante 10 min junto con dos papeles Whatman, dos esponjas, y una membrana de PVDF activada previamente en metanol. Se armó el dispositivo de transferencia, se lo colocó en la cuba y se transfirió durante una hora a 100 mV. Una vez finalizada la transferencia, se desmontó el dispositivo y la membrana se tiñó con rojo Ponceau al 0.5% (**Tabla 12 Anexo**) hasta que apareció la señal. Se lavó con agua destilada y se incubó con TBS (**Tabla 13 Anexo**) durante 10 min en agitación a temperatura ambiente, se descartó la solución y se lavó dos veces más.

Posteriormente se bloqueó la membrana con solución de bloqueo 5% [5 g leche en polvo descremada/100 mL TTBS (TBS 1X + Tween 20 0.05%)] durante 1 h a temperatura ambiente. Esta solución se descartó y se realizaron tres lavados de 10 min con TTBS.

Con el objetivo de detectar la proteína RPL18 marcada con la etiqueta His-FLAG, se añadió la solución del anticuerpo primario anti FLAG (dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Sigma, número de catálogo: F3165) a la membrana y se la incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se descartó la solución del anticuerpo y se lavó la membrana tres veces por 10 min con TTBS.

Luego se agregó la solución del anticuerpo secundario conjugado a una peroxidasa (HRP), anti mouse para el anticuerpo primario anti FLAG (dilución 1:80.000 en solución de bloqueo. Sigma, número de catálogo A9044). Se incubó la membrana durante una hora a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados consecutivos de 10 min con TTBS.

Por último se incubó la membrana con el sustrato Clarity™ Western ECL substrate (BioRad, número de catálogo: 170-5061) o Supersignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, número de catálogo: 34095) y se la reveló con el Blot Scanner c-Digit® de Li-cor®

3.13.3 Generación de la línea *ttl1* x *35S::HF-RPL18* mediante cruzamiento.

Una vez confirmada la presencia de la proteína RPL18 por western blot se procedió a cruzar la línea *35S::HF-RPL18* con el mutante *ttl1*. Se utilizó a *ttl1* como donador de polen. Esta elección se debió a que las plantas de la línea comercial *35S::HF-RPL18* resultaron ser plantas semi-estériles que poseían un menor número de granos de polen en comparación con una flor de Col-0. Por esta razón los gineceos desnudos de plantas de 35 días en el estadio 12 (Smyth *et al.*, 1990) pertenecientes a la línea *35S::HF-RPL18* se utilizaron como receptores del polen del mutante *ttl1*. Hasta este punto se llegó en este trabajo, de todas formas en el futuro las semillas obtenidas de la cruce (F1) se crecerán en sustrato hasta obtener semillas. Estas semillas (F2) se sembrarán

para obtener las plantas doble homocigotas, con una predicción de proporción de 1/6 de la progenie de este genotipo (Cuadrado-Pedetti, Tesis de Maestría, 2020). Se colectará y congelará en nitrógeno líquido, material vegetal de las plantas cuando las hojas de las rosetas alcancen entre 1 a 3 cm de largo. Se extraerá ADN de dicho material y se analizarán los dobles homocigotas por genotipado de T-DNA (**Figura 11**) y presencia de RPL18 (**Figura 13**). La cruce generada se nombrará *tll1 x 35S::HF-RPL18*.

3.14 Software y bases de datos utilizados.

Las fotografías de microscopía fueron tomadas con el Zeiss – ZENpro-Imaging Software del microscopio utilizado. El análisis fotográfico se realizó en el paquete de procesamiento de imágenes Fiji del software ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>). El compilado y edición de algunas imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop 2021 versión 22.3.0.

El tratamiento gráfico y estadístico de datos se realizó con el programa Excel del paquete Microsoft Office Professional Plus 2013.

El análisis estadístico de las tasas de crecimiento de Col-0 y *tll1* se realizó mediante un ANOVA y se consideró significativo un *p*-valor < 0.001. Las demás comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba T de Student considerando un resultado significativo cuando el *p*-valor < 0.05.

Se utilizó la base de datos de libre acceso de Arabidopsis, TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) para obtener las secuencias de ADN y ARNm de los genes de interés, así como también para el uso de las herramientas que esta base de datos brinda como el BLAST o la integración que incluye del eFP browser.

La base de datos eFP browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Regeneration>) fue utilizada para visualizar los niveles de expresión de *TLL1* luego de la aplicación de diversas hormonas.

La evaluación *in-silico* de los primers utilizados se realizó con los software online OligoAnalyzer de IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) y con la herramienta Primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

La evaluación *in-silico* de promotores se realizó con el software públicamente disponible PlantPAN 4.0 (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/plantpan4/index.html>).

La visualización de secuencias de ADN y de primers se realizó en el software libre SnapGene™ Viewer versión 7.0.3.

4. Resultados

En los estudios previos de Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Lakhssassi *et al.*, 2012; Rosado *et al.*, 2006, existe evidencia de que la ausencia del gen *TTL1* causa hipersensibilidad al estrés osmótico, lo que genera una desaceleración en la tasa de crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* y un fenotipo de expansión celular exacerbada en las células del MP. Para entender el rol de *TTL1* en las respuestas transcripcionales de las raíces durante la adaptación al estrés osmótico, en este trabajo se estudió el crecimiento en un medio de gradiente de potenciales osmóticos, el cual simula un suelo en el que las raíces van encontrando cada vez menos disponibilidad de agua. Para ello se utilizaron datos obtenidos previamente del crecimiento de las raíces bajo condiciones de shock osmótico (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021), y se los comparó con los datos obtenidos a lo largo de este trabajo del crecimiento primario de las raíces bajo condiciones de gradiente osmótico (0 a -1,2 MPa de potencial osmótico).

4.1 Tasa de crecimiento de las raíces de Col-0 y *tll1* en condiciones de gradiente osmótico.

La tasa de crecimiento de la raíz primaria depende de un balance delicado entre división, expansión y diferenciación celular (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Chaiwanon *et al.*, 2016; Cederholm *et al.*, 2012).

Para evaluar el crecimiento de la raíz primaria de *tll1* en condiciones crecientes de potencial osmótico (0 a -1.2 MPa; 0 a 400 mM manitol) se midió la longitud total de las raíces de las plántulas a partir del día en que se las colocó en el gradiente (día siete post germinación) por 25 días para obtener las curvas de crecimiento.

La primera observación interesante fue que a potenciales osmóticos crecientes las raíces de muchas plántulas se curvaban buscando el agua (**Figura 14**), algunas raíces llegaron a 300 mM manitol y otras a 400 mM manitol, en el período de 25 días, lo que nos llevó a calcular las tasas de crecimiento por rango de concentraciones de manitol (0-50 mM; 200-300 mM y 300-400 mM manitol, **Figura 15**).

La segunda observación fue que las tasas de crecimiento de las raíces crecidas en el gradiente osmótico se desaceleraban menos que en el shock osmótico. La longitud final de la raíz primaria de Col-0 luego de 25 días creciendo en el gradiente fue 6.154 ± 1.02 cm y su tasa de crecimiento fue de 0.262 ± 0.02 cm/día. La longitud final de la raíz primaria de *tll1* en el gradiente fue de 5.345 ± 0.884 cm y la tasa de crecimiento fue 0.215 ± 0.02 cm/día. Los resultados obtenidos en el gradiente osmótico se compararon con las tasas de crecimiento de Col-0 y *tll1* obtenidas por Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021 en condiciones control y de shock osmótico (**Figura 15**). Luego de 25 días de crecimiento en gradiente osmótico la tasa de crecimiento de Col-0 fue un 44% menor

a la tasa 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 crecientes en comparación a su tasa de crecimiento en condiciones control (*ttl1*: 0.38 ± 0.01 cm/día). En cambio, la reducción en la tasa de crecimiento observada luego de 7 días a un potencial osmótico de -1.2 MPa fue de 88% para Col-0 y 95% para *ttl1* en comparación a la tasa en crecimiento control.

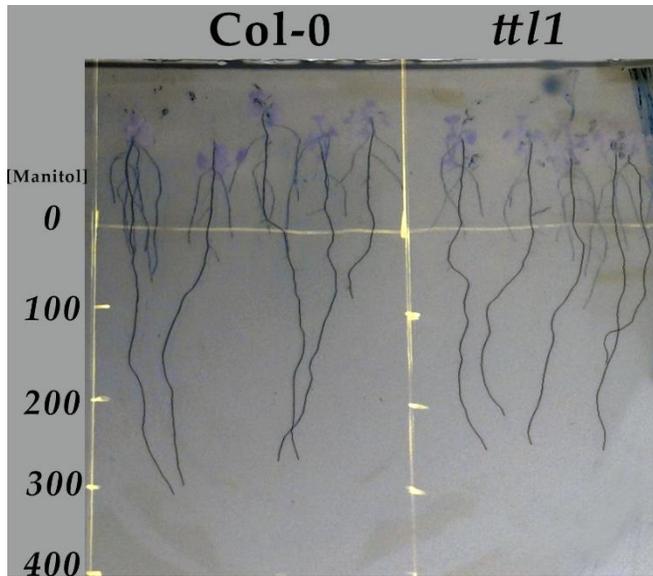
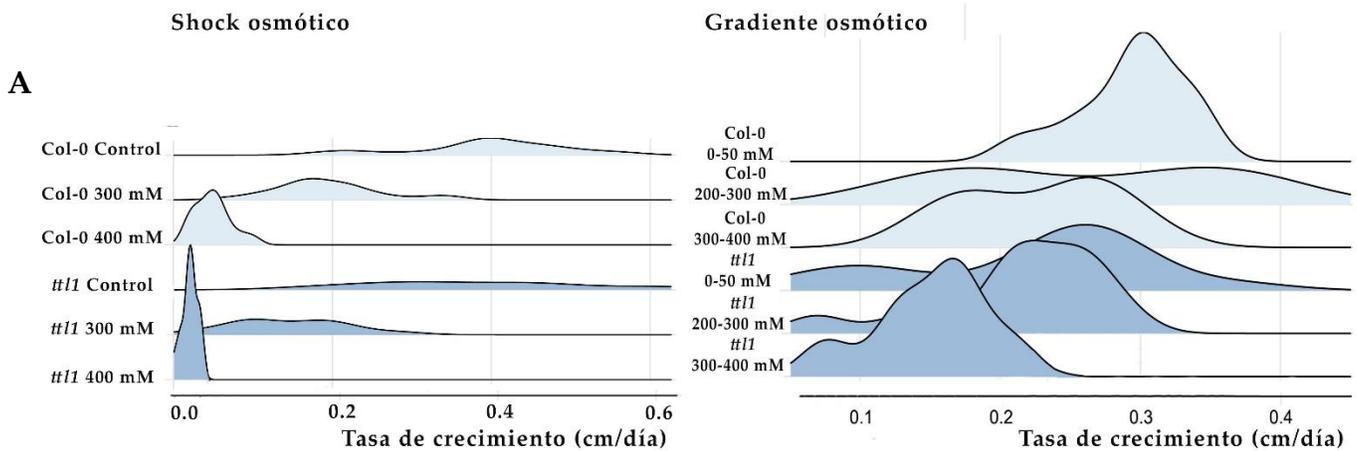


Figura 14. A potenciales osmóticos crecientes las raíces de muchas plántulas se curvan buscando agua. Se muestran las plántulas de Col-0 y *ttl1* en el gradiente osmótico en el día 10.



B

	Control	300 mM manitol	400 mM manitol		0-50 mM manitol	200-300 mM manitol	300-400 mM manitol
Col-0 vs <i>ttl1</i>	NS	*	*	Col-0 vs <i>ttl1</i>	*	*	*

Figura 15. El crecimiento en gradiente osmótico genera una desaceleración del crecimiento menos abrupta que el crecimiento en shock osmótico. A. Frecuencias poblacionales de las tasas de crecimiento

de la raíz de Col-0 y *tll1* en condiciones de shock osmótico (400 mM manitol, datos de Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021) y gradiente osmótico (0-400 mM manitol). Con respecto a Col-0 control, bajo condiciones de shock osmótico (400 mM manitol) Col-0 redujo su tasa de crecimiento 88% y *tll1* 95%. Sin embargo, bajo condiciones de gradiente osmótico Col-0 desaceleró su tasa de crecimiento un 44% y *tll1* un 62% en comparación a sus tasas de crecimiento en condiciones control. La representación se realizó con el paquete “ggridges” del software R. Se utilizó un n>10 plantas por cada genotipo en cada condición experimental evaluada. **B.** Tablas con las significancias resultantes de las comparaciones estadísticas entre Col-0 y *tll1* para cada tratamiento. El análisis realizado fue ANOVA y se consideró significativo un *p*-valor < 0.001.

4.2 Análisis del MP de raíces de Col-0 y *tll1* bajo condiciones de gradiente osmótico.

Se analizó el MP de raíces crecidas durante 25 días en el gradiente osmótico utilizando microscopía con óptica Nomarski. En la **Figura 16** se muestra la estructura del MP de las raíces de Col-0 y *tll1* que alcanzaron el rango de 300-400 mM manitol tras crecer durante 25 días en el gradiente osmótico. No se observa el fenotipo de expansión radial exacerbada en las células del meristemo de *tll1*, que sí se ve en condiciones de shock osmótico (**Figura 8C**), es decir que no se observa una interrupción en el crecimiento anisotrópico de las células epidérmicas de la zona de elongación.

Se cuantificó el número de células corticales del MP desde las células madre iniciales cercanas al centro quiescente hasta la primera célula elongada delimitante de la ZT (Perilli & Sabatini, 2010, **Figura 17A**). Para Col-0, el número de células en el MP fue en promedio de 43 ± 5 células en condiciones de crecimiento control. Luego de 25 días de crecimiento en el gradiente osmótico se observó que el número de células en el MP de Col-0 se redujo un 49% (el MP contaba en promedio con 22 ± 4 células; **Figura 17A**), a diferencia de lo observado luego de 7 días de crecimiento a -0.7 MPa y -1.2 MPa de potencial osmótico en donde se observó un 30% y 72% de reducción, respectivamente (Cuadrado-Pedetti *et al.* 2021).

El número de células en el MP de *tll1* en condición control fue en promedio de 33 ± 5 células. El mutante redujo el número de células del MP en 51% (el MP contaba en promedio con 21 ± 3 células; **Figura 17A**) con respecto a Col-0 control, cuando creció durante 25 días en el gradiente osmótico. Contrariamente luego de 7 días de crecimiento a -0.7 MPa y -1.2 MPa de potencial osmótico, el mutante redujo el número de células en el MP en un 42% y 76% con respecto a Col-0 control, respectivamente (Cuadrado-Pedetti *et al.* 2021).

Otro parámetro evaluado fue el largo de la célula madura (célula más elongada en la ZE, Perilli & Sabatini, 2010). En las raíces de Col-0 crecidas durante 25 días en el gradiente osmótico, el largo de la célula madura fue de $75.38 \pm 14.5 \mu\text{m}$, lo que representa una reducción de un 49%

con respecto al crecimiento en condiciones control ($146.53 \pm 16.02 \mu\text{m}$), mientras que este parámetro en la raíz de *ttl1* fue de $82.89 \pm 9.06 \mu\text{m}$, lo que representa una reducción del 43% con respecto a Col-0 control (**Figura 17B**). Este parámetro no fue diferente estadísticamente entre Col-0 y *ttl1* (T. Student p -valor < 0.05). El crecimiento durante 7 días en shock osmótico provocó una reducción del largo de la célula madura en un 76% (el largo de la célula madura era de $35.92 \pm 7.22 \mu\text{m}$) y 73% (el largo de la célula madura era de $39.45 \pm 6.54 \mu\text{m}$) para Col-0 y *ttl1*, respectivamente (**Figura 17B**). Este parámetro no fue diferente estadísticamente entre Col-0 y *ttl1* (T. Student p -valor < 0.05).

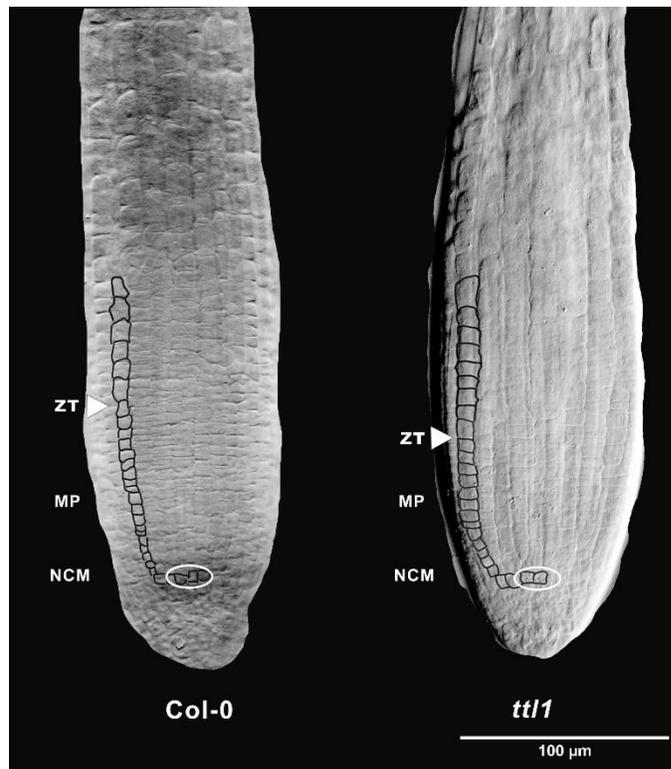


Figura 16. *ttl1* no presenta el fenotipo de expansión celular exacerbada en su MP luego de 25 días de crecimiento en gradiente osmótico. Estructura del MP de las raíces de Col-0 y *ttl1* que alcanzaron el rango de 300-400 mM manitol luego de crecer durante 25 días en el gradiente osmótico. NCM: Nicho células madre. MP: Meristemo proximal. ZT: Zona de transición. Imágenes tomadas con el Microscopio de Epifluorescencia ZEISS – AXIO Imager. M2. Con óptica Nomarski y un aumento 20X.

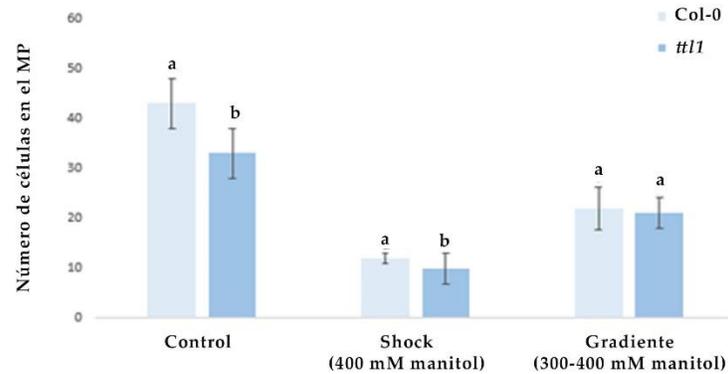
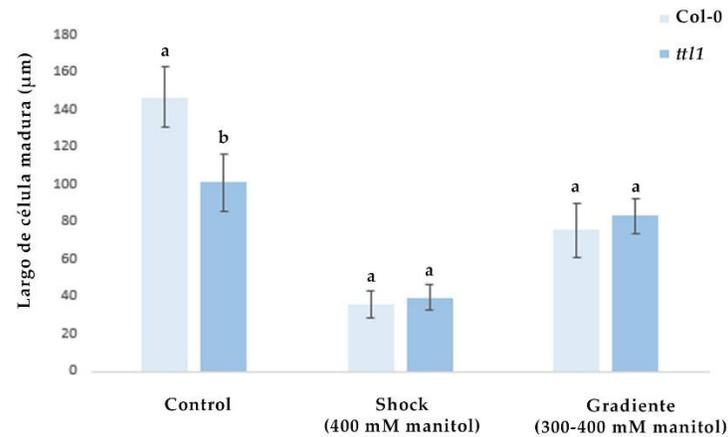
A**B**

Figura 17. El crecimiento en gradiente osmótico generó una disminución menos abrupta en el número de células en el MP y en el largo de las células maduras en Col-0 y *ttl1*. En **A** número promedio de células en el MP y en **B** longitud promedio de la célula madura de raíces de Col-0 y *ttl1* en condiciones control, de shock osmótico (datos tomados de Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021) y de gradiente osmótico. Con respecto a Col-0 en control, en condiciones de shock osmótico (400 mM manitol) Col-0 redujo su número de células en el MP en 72% y *ttl1* en 76%. Sin embargo, en el rango de 300 – 400 mM manitol, Col-0 sufrió una reducción del 49% en el número de células del MP y *ttl1* del 51%. Las raíces de Col-0 en shock osmótico (400 mM manitol) sufrieron una reducción en el largo de la célula madura del 76% y las de *ttl1* del 73% con respecto a las raíces de Col-0 en condición control. Sin embargo, las raíces de Col-0 crecidas durante 25 días en el gradiente osmótico experimentaron una disminución en el largo de la célula madura de 49%, mientras que la reducción del largo de la célula madura de *ttl1* con respecto a Col-0 control fue del 43%. Se utilizó un n > 10 plantas de cada genotipo para cada condición. Letras diferentes (a y b) corresponden a significancia estadística evaluada mediante Test de Student ($p < 0.05$). Las barras de error corresponden al desvío estándar.

El número de células corticales del MP fue utilizado para estimar la tasa de producción celular y la duración del ciclo celular de las raíces de Col-0 y *ttl1* crecidas durante 25 días en el gradiente osmótico (**Tabla 9**).

En condiciones control la tasa de crecimiento de Col-0 y *ttl1* no fue estadísticamente diferente según la prueba T. Student (p -valor < 0.05). Sin embargo, la tasa de producción celular en *ttl1* fue significativamente mayor, pero el largo del ciclo celular y el tiempo que demoraron las células en pasar de la ZT a la ZE fue menor en comparación a Col-0 (**Tabla 9**).

El crecimiento durante 25 días en gradiente osmótico provocó una disminución en la tasa de producción celular del MP de las raíces de Col-0 en comparación al crecimiento en condiciones control, al igual que el largo del ciclo celular (**Tabla 9**). Sin embargo, el tiempo que demoraron las células en pasar de la ZT a la ZE aumentó en comparación a lo observado en condiciones de crecimiento control.

Por otro lado, cuando *ttl1* fue crecido durante 25 días en gradiente osmótico redujo su tasa de producción celular pero aumentó el largo del ciclo celular y el tiempo en que demoran en pasar de la ZT a la ZE en comparación a lo observado cuando es crecido en condiciones control (**Tabla 9**). El crecimiento en gradiente osmótico provocó una disminución estadísticamente significativa [según T. Student (p -valor < 0.05)] de la tasa de producción celular de *ttl1* con respecto a Col-0, así como un aumento en el largo del ciclo celular y en el tiempo en que las células de la ZT demoraron en pasar a la ZE (**Tabla 9**).

Tabla 9. Parámetros de crecimiento en el MP en raíces de Col-0 y *ttl1* en condiciones de crecimiento control y de gradiente osmótico. Se utilizó un $n \geq 10$ plantas de cada genotipo para cada condición. Letras diferentes entre Col-0 y *ttl1* indican diferencias estadísticamente significativas según Test de Student ($p < 0.05$).

Parámetros de crecimiento de MP	Control	
	Col-0	<i>ttl1</i>
Tasa de crecimiento ($\mu\text{m/h}$)	162.5 \pm 5.0 (a)	158.3 \pm 4.58 (a)
Tasa de producción celular (cel/h)	1.25 \pm 0.21 (a)	1.76 \pm 0.39 (b)
Largo del ciclo celular (h)	24.6 \pm 4.9 (a)	13.7 \pm 3.7 (b)
Intervalo entre células consecutivas de la ZT a ZE (h)	0.82 \pm 0.13 (a)	0.59 \pm 0.14 (b)

Parámetros de crecimiento de MP	Gradiente osmótico (0 a -1,2 MPa, 300-400mM manitol)	
	Col-0	<i>ttl1</i>
Tasa de crecimiento ($\mu\text{m/h}$)	54.0 \pm 14.5 (a)	41.5 \pm 16.3 (b)
Tasa de producción celular (cel/h)	0.78 \pm 0.24 (a)	0.52 \pm 0.22 (b)
Largo del ciclo celular (h)	18.6 \pm 6.7 (a)	25.0 \pm 4.3 (b)
Intervalo entre células consecutivas de la ZT a ZE (h)	1.42 \pm 0.21 (a)	1.8 \pm 0.38 (b)

En resumen, la reducción en la tasa de crecimiento de Col-0 luego de 25 días en gradiente osmótico con respecto al control, se debió al menor número de células en el MP, resultado de

una menor tasa de producción celular acompañada de un aumento en el tiempo que demoran las células en pasar de la ZT a la ZE, y además una disminución en el largo de la célula madura. *ttl1* luego del crecimiento durante 25 días en el gradiente osmótico, sufrió una reducción en su tasa de crecimiento como consecuencia de una menor tasa de producción celular y un ciclo celular más largo que resultó en un menor número de células en el MP, además de un aumento en el tiempo que demoraron las células en pasar de la ZT a la ZE, seguida por una menor longitud de la célula madura.

4.3 Predicción de los motivos de unión a la región promotora de *TTL1*

La presencia de motivos de unión de factores de transcripción involucrados en las vías de señalización de hormonas en la región promotora de *TTL1* podría implicar la posibilidad de activación o represión del gen *TTL1* en presencia de las hormonas.

Analizamos la región promotora de *TTL1* en busca de motivos de regulación en respuesta a las hormonas que regulan el crecimiento del MP de raíz en *Arabidopsis*. Encontramos motivos para brasinosteroides, auxinas y citoquininas de los cuales se presenta su ubicación en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Predicción de los motivos de unión a 2000 pb de la región promotora de *TTL1*. La tabla muestra la posición de los motivos predichos que resultaron del análisis utilizando PlantPAN 4.0 (Chow *et al.*, 2019). CANNTG corresponde al motivo responsivo a BRs (Novaković *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2017), TGTCTC es el motivo responsivo a auxinas (Miranova *et al.*, 2014) y AGATHY (Xie *et al.*, 2018) es el motivo de responsivo a citoquininas. A: Adenina. C: Citosina. G: Guanina. T: Timina. N: Base no especificada. H: A, C o T. Y: base pirimidínica (C o T). Se utilizó la el software público Plant.PAN 4.0

CANNTG

Position	Strand	Hit sequence	Located in Tandem repeat	Located in CpG island
143	+	caagtg	NO	NO
269	+	catgtg	NO	NO
318	-	catgtg	NO	NO
714	+	catttg	NO	NO
753	-	catgtg	NO	NO
786	-	catatg	NO	NO
824	-	catatg	NO	NO
1002	-	catttg	NO	NO
1066	-	catttg	NO	NO
1147	-	cacatg	NO	NO
1332	-	catatg	NO	NO
1462	+	caaatg	NO	NO
1561	-	cagatg	NO	NO
1741	-	caactg	NO	NO
1834	+	cagttg	NO	NO

TGTCTC

Position	Strand	Hit sequence	Located in Tandem repeat	Located in CpG island
1635	+	tgtctc	NO	NO

AGATHY

Position	Strand	Hit sequence	Located in Tandem repeat	Located in CpG island
311	-	agattt	NO	NO
885	+	agatat	NO	NO
915	-	agattc	NO	NO
936	-	agatct	NO	NO
1226	+	agatac	NO	NO
1356	-	agatat	NO	NO
1475	+	agattt	NO	NO
1811	+	agattt	NO	NO
1927	-	agatat	NO	NO

4.4 Análisis del MP de raíces de Col-0 y *tll1* en respuesta a distintas hormonas e inhibidores.

4.4.1 Respuestas a hormonas e inhibidores en condiciones de crecimiento control.

Se evaluó la respuesta del MP al tratamiento con las siguientes hormonas: 1 μM BAP, 1 μM Ga₃, 0,1 μM AIA, 0,2 μM BL y los siguientes inhibidores hormonales 0,5 μM PCZ y 1 μM PAC. En la **Figura 18** se muestran las imágenes obtenidas por microscopía con óptica Nomarski del efecto de la exposición por 24 h a los tratamientos en medio de crecimiento control. En condiciones de crecimiento control, Col-0 tiene más células en el MP que *tll1*. En la sección C de la **Figura 18** se muestra el número de células en el MP de Col-0 y *tll1* luego de la exposición a los tratamientos antes mencionados. Ambos genotipos respondieron reduciendo el número de células en el MP ante los tratamientos con respecto a Col-0 control (**Figura 18C**). Además, conservaron las diferencias estadísticamente significativas entre el número de células a excepción del tratamiento con 0.5 μM PCZ (**Figura 18C**). Col-0 respondió a los tratamientos con 1 μM Ga-3, 1 μM PAC y 0.2 μM BL reduciendo el número de células con respecto al tratamiento control, sin embargo *tll1* mantuvo el mismo número de células que en el control.

Curiosamente, la aplicación de 1 μM BAP y 0.1 μM AIA al medio control generó la máxima reducción en el número de células en el MP de *tll1* con respecto a Col-0 en condiciones control.

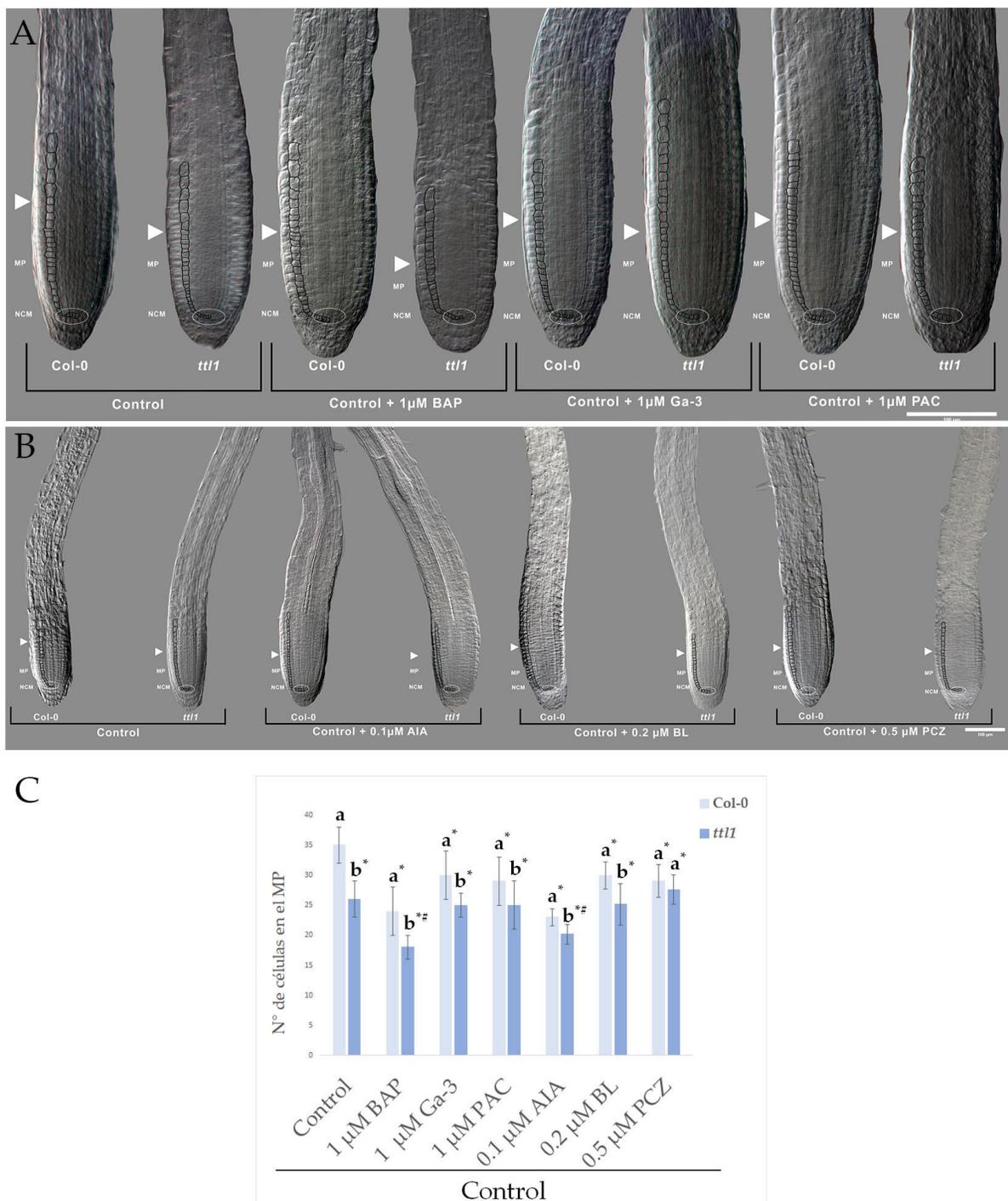
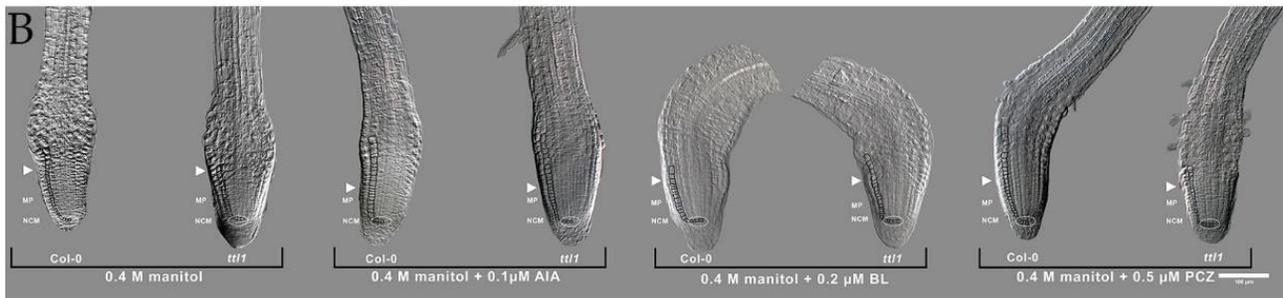
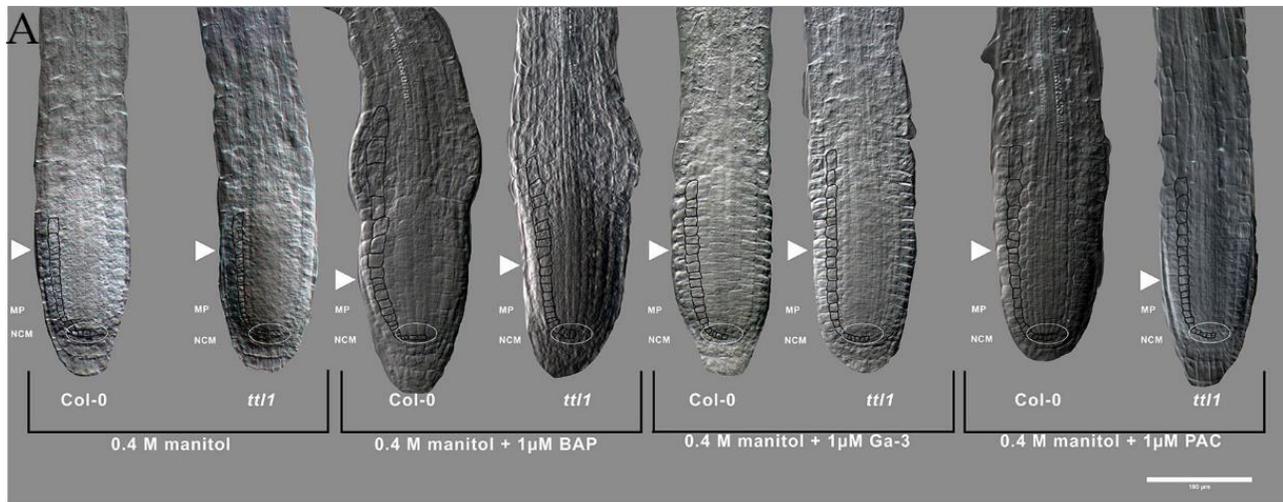


Figura 18. Los tratamientos control suplementados con 1 μ M BAP y 0.1 AIA μ M son los que provocaron una mayor reducción del número de células en el MP de *tt11*. Número de células en el MP de raíces de Col-0 y *tt11* sometidas durante 24 h a un medio de cultivo control suplementado con hormonas (BAP, Ga-3, AIA o BL) o inhibidores hormonales (PAC o PCZ). Imágenes tomadas con el Microscopio de Epifluorescencia ZEISS – AXIO Imager. M2. Con óptica Nomarski. En **A** las fotos fueron tomadas con un aumento 20X, y en **B** las imágenes se tomaron a 10X. Se utilizó un $n \geq 8$ raíces en cada

genotipo para cada condición. Se indica barra de escala correspondiente a 100 μm . MP: Meristemo Proximal; NCM: Nicho de las Células Madre. La flecha blanca indica la Zona de Transición (ZT). En C se muestra el gráfico resultante de la cuantificación de las células del MP. Las barras de error corresponden al desvío estándar. Letras diferentes indican significancia estadística entre ambos genotipos en un misma condición experimental. Los “*” indican significancia estadística con respecto a Col-0 control. Los “#” indican significancia estadística con respecto a *ttl1* control y se indican (cuando corresponde) sólo para *ttl1*. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba T. Student (p value < 0,05).

4.4.2 Respuestas a hormonas e inhibidores en condiciones de crecimiento en shock osmótico.

Cuando se combinó el crecimiento en 400 mM de manitol con las hormonas e inhibidores de crecimiento (**Figura 19**), se observó que la respuesta de ambos genotipos solo fue diferencial frente a 1 μM BAP, 1 μM PAC y 0.5 μM PCZ. La aplicación de BAP provocó una disminución estadísticamente significativa en el número de células en ambos genotipos siendo menor en *ttl1* con respecto a su crecimiento sólo en manitol. La aplicación de PAC provocó una disminución estadísticamente significativa en el número de células del MP de *ttl1* comparado a su MP en manitol. Mientras que la aplicación de PCZ redujo significativamente el número de células en ambos genotipos comparado con el tratamiento con manitol. Los tratamientos con 400 mM manitol suplementados con los inhibidores hormonales (PAC y PCZ) fueron los que ocasionaron la mayor reducción de células corticales en el MP de *ttl1* con respecto a Col-0 en 0.4 mM manitol, siendo 54% la reducción celular para el primer inhibidor, y 51% para el segundo. La aplicación de AIA en combinación con manitol, provocó una disminución estadísticamente significativa del número de células en ambos genotipos con respecto al tratamiento con manitol, sin embargo la aplicación de BL solo redujo significativamente el número de células en el MP de *ttl1*. El tratamiento con Ga3 en combinación con manitol no tuvo efecto sobre el número de células de ningún genotipo.



C

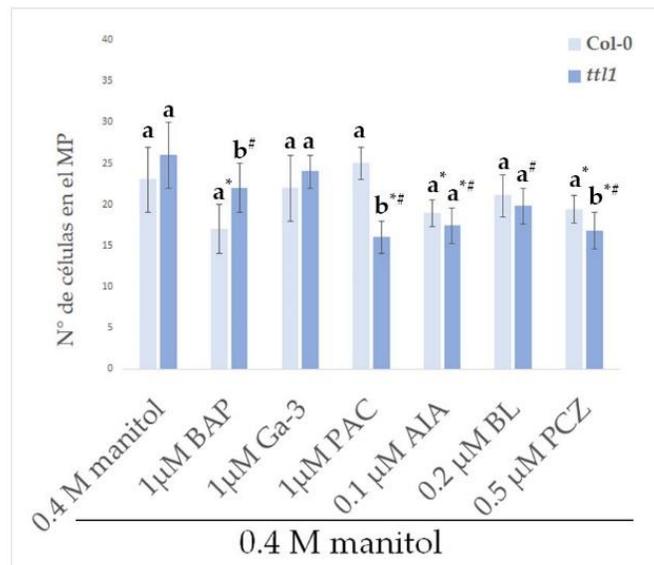


Figura 19. Los tratamientos en shock osmótico suplementados con los inhibidores hormonales PAC y PCZ fueron los que generaron la mayor reducción de células en el MP de *ttl1*. Número de células en el MP de raíces de Col-0 y *ttl1* sometidas durante 24 h a un medio de cultivo con 0.4 M manitol suplementado con hormonas (BAP, Ga-3, AIA o BL) o inhibidores hormonales (PAC o PCZ). Imágenes

tomadas con el Microscopio de Epifluorescencia ZEISS – AXIO Imager. M2. Con óptica Nomarski. En **A** las fotos de microscopía fueron tomadas con aumento 20X, mientras que en **B** las imágenes se tomaron con un aumento de 10X. Se utilizó un $n \geq 8$ raíces en cada genotipo para cada condición. Se indica barra de escala correspondiente a 100 μm . MP: Meristemo Proximal; NCM: Nicho de las Células Madre. La flecha blanca indica la Zona de Transición (ZT). En **C** se muestra el gráfico resultante de la cuantificación de las células del MP. Las barras de error corresponden al desvío estándar. Letras diferentes indican significancia estadística entre ambos genotipos en una misma condición experimental. Los “*” indican significancia estadística con respecto a Col-0 en 0.4 M manitol. Los “#” indican significancia estadística con respecto a *tll1* en 0.4 M manitol y se indican (cuando corresponde) sólo para *tll1*. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante la prueba T. Student (p value < 0,05).

4.5 Patrón de expresión de *TTL1* en raíces sometidas a hormonas e inhibidores hormonales.

A modo de obtener información acerca de la expresión de *TTL1* frente a diferentes condiciones hormonales hemos indagado en el software público eFPbrowser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Regeneration>, (Winter *et al.*, 2007). La **Figura 20** muestra los niveles de expresión de *TTL1* luego de 30 min, 1 h o 3 h de la aplicación de citoquininas (zeatina), giberelinas (Ga-3), auxinas (IAA) o brasinosteroides (brasinolide) a un medio de cultivo control. La zeatina provoca un aumento en la expresión de *TTL1* luego de una hora de su aplicación. Luego de 3 h de la aplicación de Ga-3 es cuando se observa el mayor aumento en la expresión de *TTL1*. Sin embargo, la expresión de este gen se mantuvo constante en los tres tiempos estudiados luego de la adición de IAA al medio. El brasinolide fue la hormona que más potenció la expresión de *TTL1*. Aunque se observa que a los 30 min ya existe un aumento moderado de la expresión de este gen con respecto al control, al cabo de 3 h es cuando se observa el mayor nivel de expresión.

Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021 ensayó el patrón de expresión de la línea reportera *pTTL1::GUS* en control y shock osmótico frente a diferentes condiciones hormonales (auxinas y Brasinosteroides) y al inhibidor de brasinosteroides propiconazole. Con el fin de continuar con el estudio de los efectos de otras hormonas vegetales en el patrón de expresión de la línea reportera, se evaluó la expresión de *pTTL1::GUS* en plántulas de 7 días post germinación sometidas por 30 min a medios de cultivo control y con 400 mM manitol suplementados con 1 μM Ga-3, 1 μM BAP y 1 μM de PAC (**Figura 21**).

En el medio control la expresión de *TTL1* se visualiza en el NCM y en las células más próximas a este. Con BAP la expresión de *TTL1* se da en todas las capas celulares del MP, al igual que en el caso de suplementación con PAC. Con Ga-3 la expresión de *TTL1* se restringió a la estela del

MP y al NCM.

En el medio suplementado con 400 mM manitol, *TTL1* se expresó en córtex endodermis y estela. Cuando se añadió BAP o PAC a este medio, la expresión de *TTL1* se dio en el NCM y en la epidermis. Sin embargo, la suplementación con Ga-3 en el medio con manitol generó que la expresión de *TTL1* ocurriera en todas las capas celulares del MP.

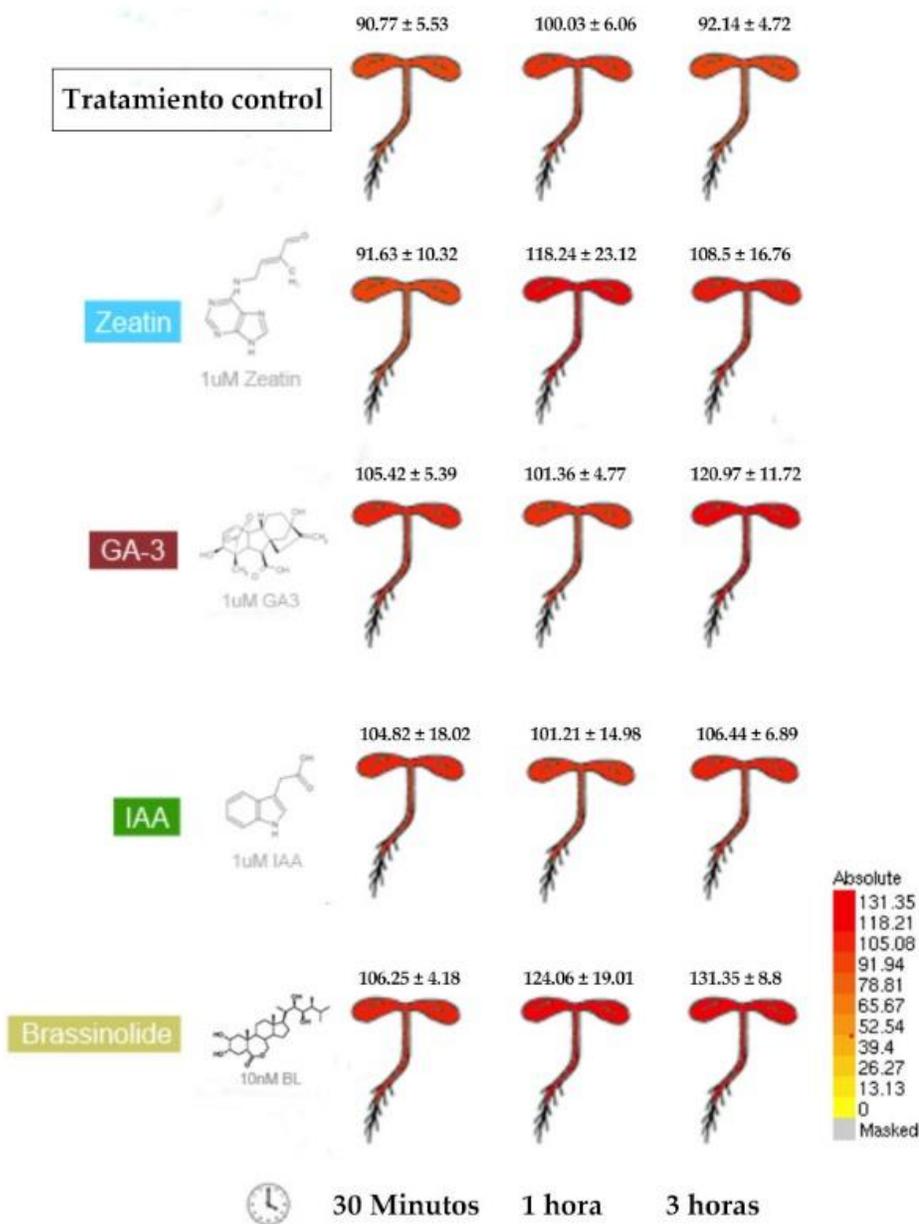


Figura 20. Niveles de expresión de *TTL1* luego de 30 minutos, una o tres horas de la aplicación de citoquinas, giberelinas, auxinas y brasinosteroides. El brasinolide es la hormona que provoca el mayor aumento en la expresión de *TTL1*. Los datos fueron obtenidos de la base de datos públicamente disponible eFP browser (Winter *et al.*, 2007).

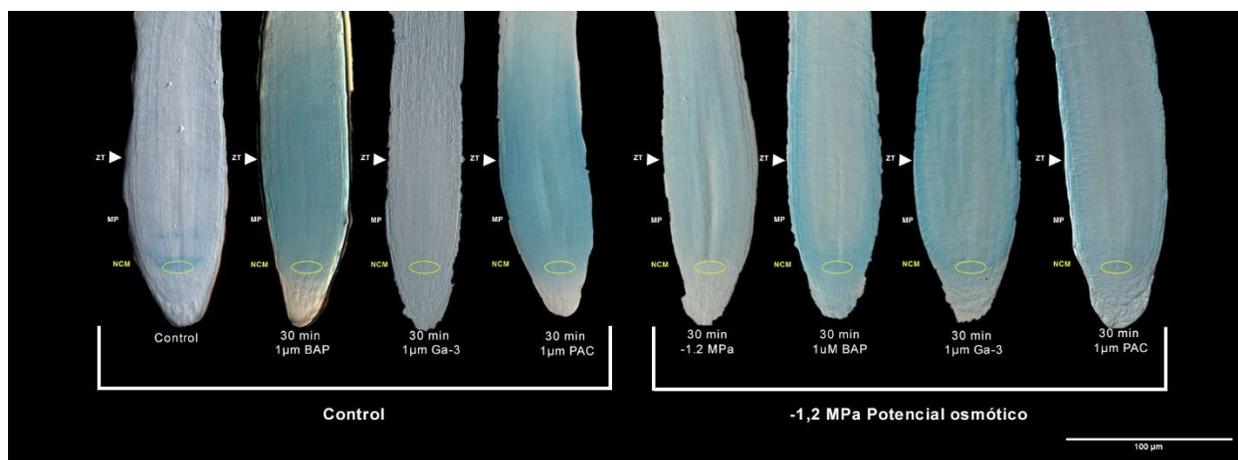


Figura 21. El patrón de expresión de *pTTL1::GUS* es diferente entre la condición control y el shock osmótico. Patrón de expresión de las raíces de la línea reportera *pTTL1::GUS* sometidas al crecimiento durante 30 minutos en medios de cultivo control y con 400 mM manitol (-1.2 MPa potencial osmótico) suplementados con 1 μ M Ga-3, 1 μ M PAC y 1 μ M BAP. La tinción con el sustrato X-Gluc se realizó por 16 h. Imágenes tomadas con el Microscopio de Epifluorescencia ZEISS– AXIO Imager. M2. Con óptica Nomarski y un aumento 20X. Se utilizó un $n \geq 8$ raíces para cada genotipo en cada tratamiento.

4.6 Ensayos de expresión diferencial de genes.

En trabajos previos del grupo se identificó, a través de microscopía de fuerza atómica, que el mutante *tll1* tiene las paredes celulares más elásticas que el genotipo silvestre, lo que explica el fenotipo de expansión exacerbada de las células en la zona de elongación observado en el mutante. Esta evidencia, sumada a la comprobación de existencia de interacción genética entre *TTL1* y *CESA6*, componente del complejo CCS encargado de sintetizar pared celular primaria en el meristemo apical de raíz, pusieron en evidencia el rol de *TTL1* en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021). A su vez, la supresión de la expresión de *TTL1* y la vía de señalización de BRs en respuesta al estrés osmótico y al tratamiento con BRs, sumado a la evidencia de interacción *in vivo* de *TTL3* con la mayoría de las proteínas de la vía de señalización de BRs (Amorin-Silva *et al.* 2019) y la interacción *TTL1* con *CESA1* (Kesten *et al.*, 2022) sugieren un rol de *TTL1* mediando la adaptación al estrés osmótico a través de la homeostasis de auxinas y brasinosteroides (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021).

En el presente trabajo pusimos el foco en tratar de entender las respuestas transcripcionales del mutante *tll1* relacionadas al mantenimiento de la integridad de la pared celular del MP durante la adaptación al estrés osmótico y mediado por brasinosteroides. Para ello evaluamos mediante ensayos de RT-qPCR la expresión de los siguientes genes: 1) genes de la familia *TTL* que se expresan en raíz primaria; 2) genes relacionados con la síntesis de componentes de la pared

celular: *CESA1*, *CESA3*, *CESA6*; *CESA9* ; 3) genes relacionados con la remodelación de la pared celular durante la expansión anisotrópica *TIPO PECTATO LIASA 12 (PLL12)*, *Expansina A1*, *AHA1* y *AHA2*; 4) genes relacionados con la síntesis y señalización de brassinosteroides *DWF4*, *CPD*, *BAK1*, *BES1*; 5) genes relacionados a ciclo celular y expansión celular *CYCD3;1*, cuyos resultados presentamos a continuación.

4.6.1 Evaluación de la expresión de los genes *TTL* en raíces de Col-0 y *tll1* en condiciones control, shock osmótico (-1,2 MPa de potencial osmótico) y gradiente osmótico (0 a -1,2 MPa de potencial osmótico).

Para entender el rol de *TTL1* en la adaptación al estrés osmótico analizamos su expresión en raíces de Col-0 y *tll1* crecidas en condiciones control, en condiciones de shock y de gradiente osmótico (**Figura 22**) y la expresión de los miembros de su familia *TTL3* y *TTL4* que se expresan en raíz (Lakhssassi *et al.*, 2012; Rosado *et al.*, 2006). Los resultados mostraron que en raíces de Col-0 crecidas en el shock osmótico la expresión de *TTL1* es significativamente menor en comparación con la situación control. Sin embargo, en el gradiente osmótico, la expresión de *TTL1* se mantuvo a los niveles observados en condiciones de crecimiento control (**Figura 22**). En raíces de Col-0 crecidas en shock osmótico la expresión de *TTL3* y *TTL4* no presentó diferencias significativas con respecto a los niveles en condiciones de crecimiento control (**Figura 22**).

En raíces de *tll1* crecidas en condiciones control, la expresión de *TTL3* es significativamente menor a la expresión en raíces de Col-0. Sin embargo, en las raíces de *tll1* sometidas a shock osmótico, la expresión de *TTL3* aumenta significativamente con respecto a su expresión en ambos genotipos crecidos en medio control. Tanto en las raíces de Col-0 y *tll1* crecidas en gradiente osmótico, se observó un aumento significativo en la expresión de *TTL3* con respecto a la expresión del mismo gen en ambos genotipos crecidos en la condición control.

Sólo se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión de *TTL4* en raíces de *tll1* crecidas en shock osmótico en comparación al crecimiento en medio control.

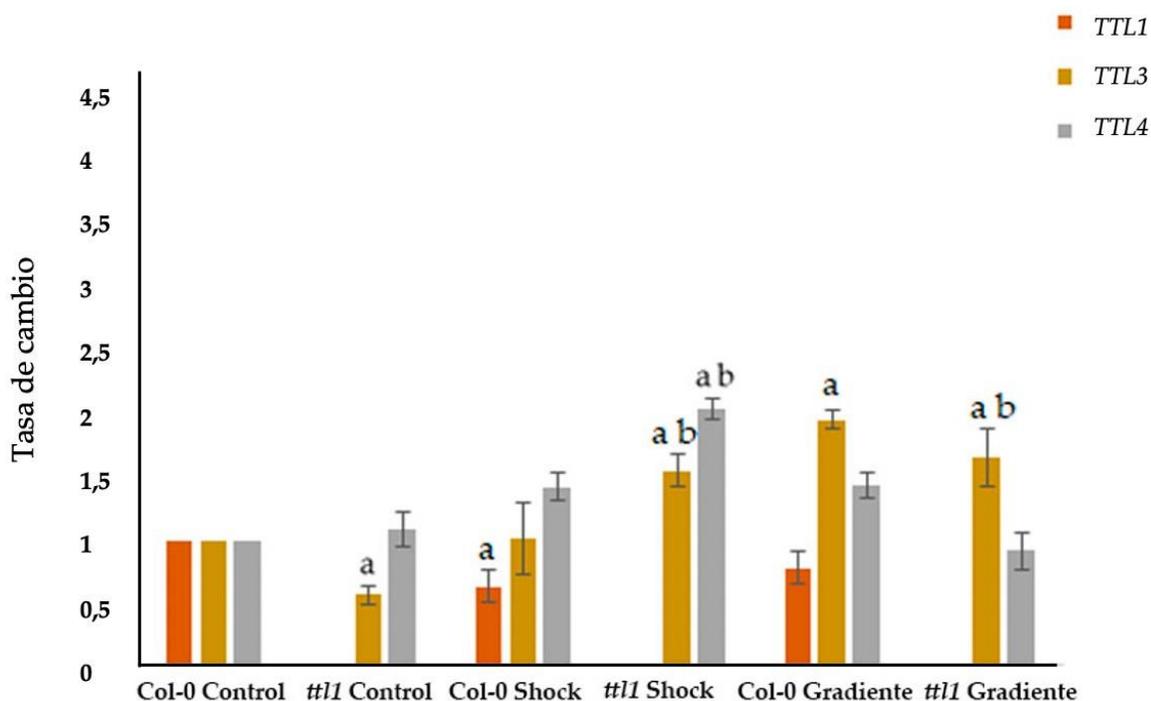


Figura 22. El mutante *ttl1* tiene un patrón de expresión de los genes *TLL3* y *TLL4* diferente a Col-0 tanto en crecimiento control como en estrés osmótico. Niveles normalizados de expresión de los genes *TLLs* en Col-0 y *ttl1* en control, shock (-1.2 MPa de potencial osmótico) y gradiente osmótico (0 a -1.2 MPa de potencial osmótico) obtenidos mediante RT-qPCR. En cada experimento se utilizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. En los experimentos control y de shock osmótico se utilizó un $n \geq 50$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. En los experimentos en gradiente osmótico se utilizó un $n \geq 6$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. Las barras de error corresponden al desvío estándar. La letra “a” indica significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de Col-0 en control. La letra “b” refiere a significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de *ttl1* en control, y se indica (cuando corresponde) sólo para *ttl1* en las condiciones de estrés osmótico. El gen *RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA* (AT4G37830) fue utilizado como *housekeeping*.

4.6.2 Evaluación de la expresión de los genes *CESA* en raíces de Col-0 y *ttl1* en condiciones control, en shock osmótico (-1,2 MPa de potencial osmótico) y en gradiente osmótico (0 a -1,2 MPa de potencial osmótico).

Evaluamos mediante experimentos de RT-qPCR los niveles de expresión de cuatro genes clave en la síntesis de celulosa de la pared celular primaria de la raíz de Arabidopsis: *CESA1*, *CESA3*, *CESA6* (componentes del CCS) y *CSLA9* que puede suplir la función de alguna de las anteriores.

En condiciones de crecimiento control, los niveles de expresión de *CESA1*, *CESA6* y *CSLA9* son significativamente menores en las raíces de *ttl1* con respecto a los niveles en las raíces de Col-0. En condiciones de shock osmótico, la expresión de *CESA6* y *CSLA9* en raíces de Col-0 fue significativamente menor a la observada en el medio control, al igual que en *ttl1*. Es de destacar, que en las raíces de *ttl1* crecidas en shock osmótico se detectó un aumento en la expresión de *CESA6* y *CSLA9* con respecto a la observada para el mismo genotipo en medio de crecimiento control. Los niveles de expresión de *CESA1* en raíces de *ttl1* crecidas en shock osmótico alcanzaron los niveles observados en las raíces de Col-0 crecidas en condiciones control. Curiosamente en condiciones de crecimiento de shock osmótico, los niveles de expresión de *CESA3* fueron significativamente mayores comparados a los niveles de expresión en la raíces de ambos genotipos crecidos en medio control, siendo mayor el incremento en el mutante (**Figura 23**).

En raíces de Col-0 crecidas en condición de gradiente osmótico, *CESA3* fue el único gen que vio afectada su transcripción, presentando un aumento estadísticamente significativo con respecto a la situación control. Algo similar ocurrió en las raíces de *ttl1* crecidas en el gradiente osmótico, en donde los niveles de expresión de *CESA1* y *CESA6* permanecieron iguales a los observados en las raíces de Col-0 crecidas en medio control; mientras que los niveles de expresión de *CESA3* aumentaron significativamente con respecto a los observados en raíces de Col-0 crecidas en medio control. De manera interesante, al comparar los niveles de expresión de estos dos genes con respecto a los observados en raíces de *ttl1* crecidas en medio control, notamos un aumento estadísticamente significativo. Por último, si se comparan los niveles de expresión de *CSLA9* en el mutante crecido en condiciones de gradiente osmótico con respecto al genotipo silvestre crecido en medio control, se observa una reducción estadísticamente significativa (T. Student, $p < 0.05$) de su expresión (**Figura 23**).

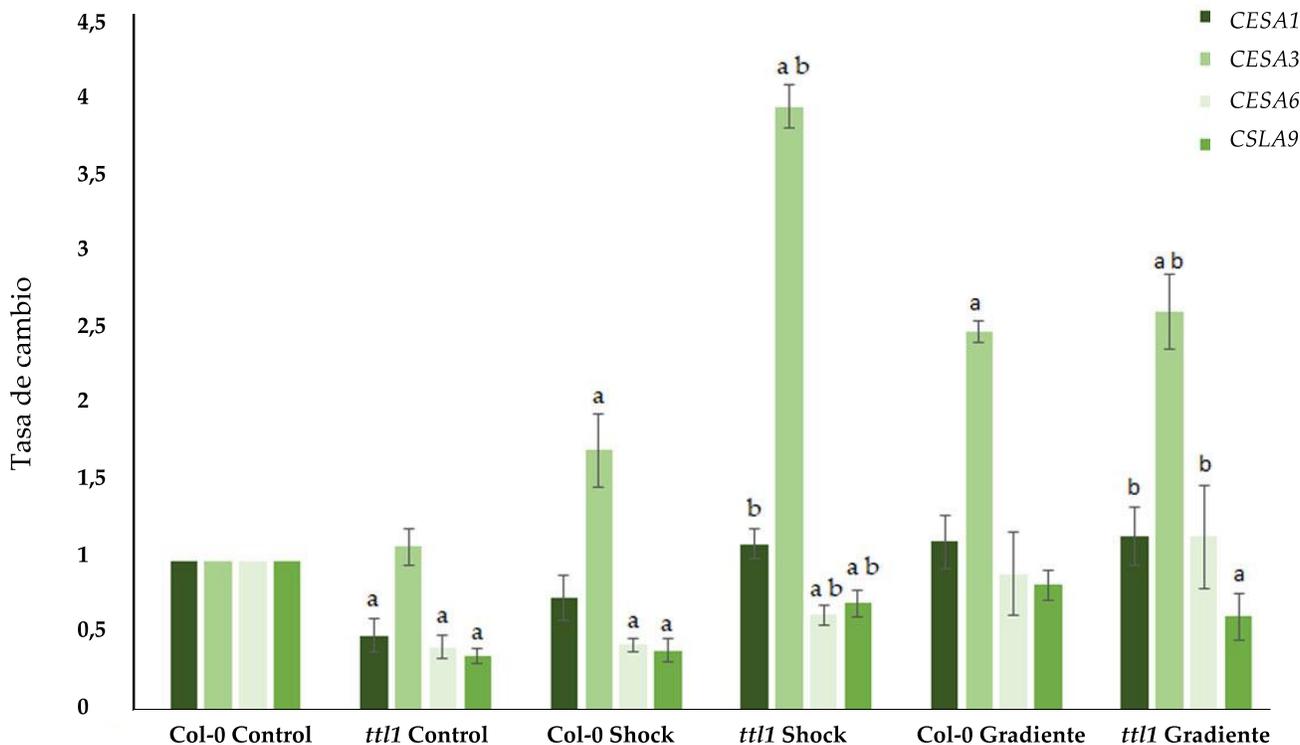


Figura 23. El patrón de expresión de genes vinculados a la síntesis de pared celular en las raíces de Col-0 y *ttl1* es diferente entre el crecimiento bajo condiciones de shock y de gradiente osmótico. Niveles normalizados de expresión de los genes *CESAs* en Col-0 y *ttl1* en control, shock (-1.2 MPa de potencial osmótico) y gradiente osmótico (0 a -1.2 MPa de potencial osmótico) obtenidos mediante RT-qPCR. En cada experimento se utilizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. En los experimentos control y de shock osmótico se utilizó un $n \geq 50$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. En los experimentos en gradiente osmótico se utilizó un $n \geq 6$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. Las barras de error corresponden al desvío estándar. La letra “a” indica significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de Col-0 en control. La letra “b” refiere a significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de *ttl1* en control, y se indica (cuando corresponde) sólo para *ttl1* en las condiciones de estrés osmótico. El gen *RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA* fue utilizado como *housekeeping*.

4.6.3 Evaluación de la expresión de los genes *TIPO PECTATO LIASA 12*, *Expansina A1*, *AHA1* y *AHA2* en raíces de Col-0 y *ttl1* en condiciones control, en shock osmótico (-1,2 MPa de potencial osmótico).

Para explorar si los cambios en las propiedades físicas de las paredes celulares observados en el mutante *ttl1* se deben a otros actores claves en la síntesis y remodelamiento de la pared celular evaluamos la expresión mediante RT-qPCR de los siguientes genes: *TIPO PECTATO LIASA 12* (*PLL12*), *Expansina A1* (*EXPA1*), *AHA1* y *AHA2*. Estos genes son clave en los procesos de crecimiento de raíz y presentan expresión diferencial en el estrés salino (Geng *et al.*, 2013). En la **Figura 24** se muestran los niveles de expresión de estos cuatro genes en Col-0 y *ttl1* en condiciones control y de shock osmótico. No se detectaron cambios en la expresión del gen *TIPO PECTATO LIASA12* en ninguno de los dos genotipos en las condiciones ensayadas. Algo similar ocurrió con el gen *Expansina 1*, cuya expresión únicamente aumentó con respecto a la situación control, al someter a *ttl1* a condiciones de shock osmótico. Los niveles de expresión de los genes *AHA1* y *AHA2* en las raíces de *ttl1* 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 *ttl1* 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.

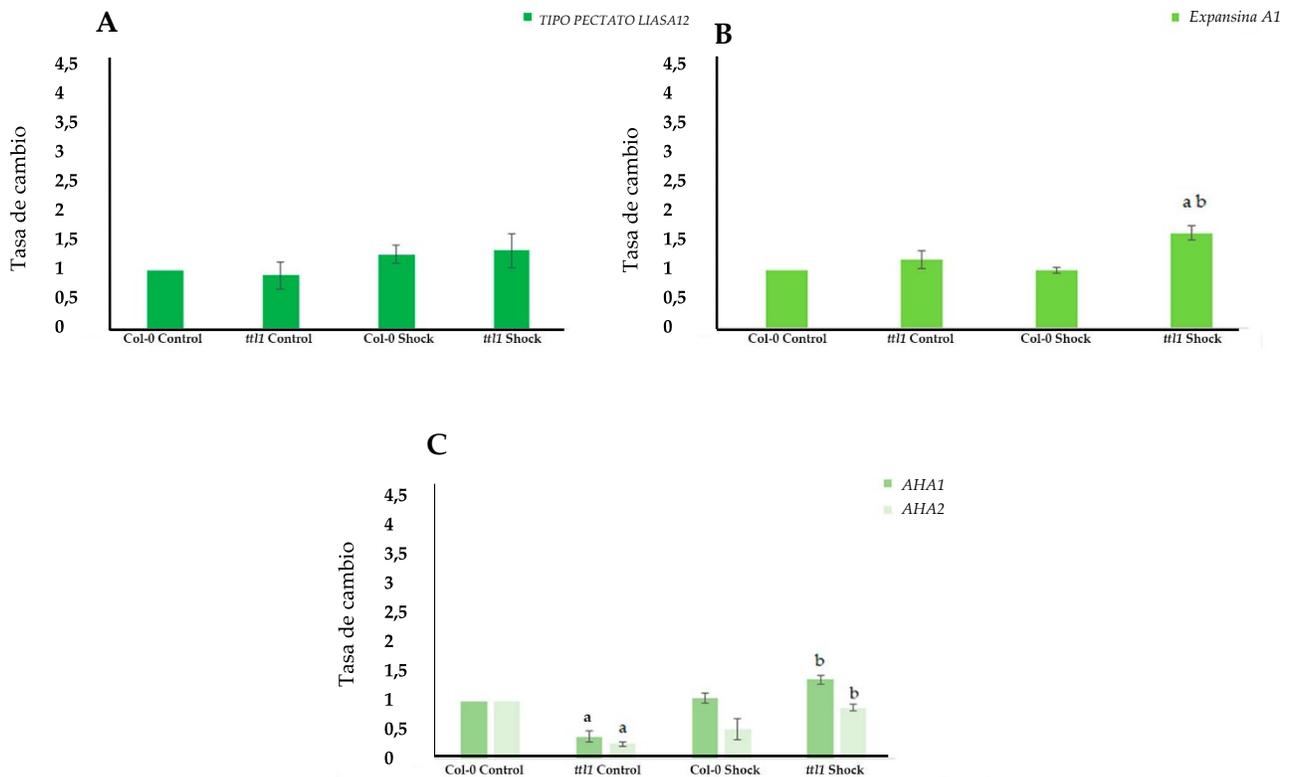


Figura 24. *ttl1* presenta mayores niveles de expresión de *Expansina 1*, *AHA1* y *AHA2* en condiciones de shock osmótico con respecto al control. Niveles normalizados de expresión de los genes *TIPO PECTATO LIASA 12* (A), *Expansina 1* (B), *AHA1* y *AHA2* (C) en Col-0 y *ttl1* en control y shock osmótico (-1.2 MPa de potencial osmótico) obtenidos mediante RT-qPCR. En cada experimento se utilizaron tres

réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Se utilizó un $n \geq 50$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. Las barras de error corresponden al desvío estándar. La letra “a” indica significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de Col-0 en control. La letra “b” refiere a significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de *tll1* en control, y se indica (cuando corresponde) sólo para *tll1* en las condiciones de estrés osmótico. El gen *RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA* fue utilizado como *housekeeping*.

4.6.4 Evaluación de la expresión de genes involucrados en la vía de señalización y de biosíntesis de brasinosteroides en raíces de Col-0 y *tll1* en condiciones control y de estrés osmótico.

Se evaluó la expresión del co-receptor de membrana *BAK1*, así como la expresión del factor de transcripción *BES1* que se une a los promotores de genes responsivos a brasinosteroides (Kim *et al.*, 2009, **Figura 25**).

Además, se estudió la expresión de *DWF4* y *CPD/DWF3* dos genes claves en la biosíntesis de BR en *Arabidopsis* (Chung & Choe, 2013). Dicha expresión se evaluó en *tll1* en condiciones control, de shock y de gradiente osmótico (**Figura 26**).

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*.

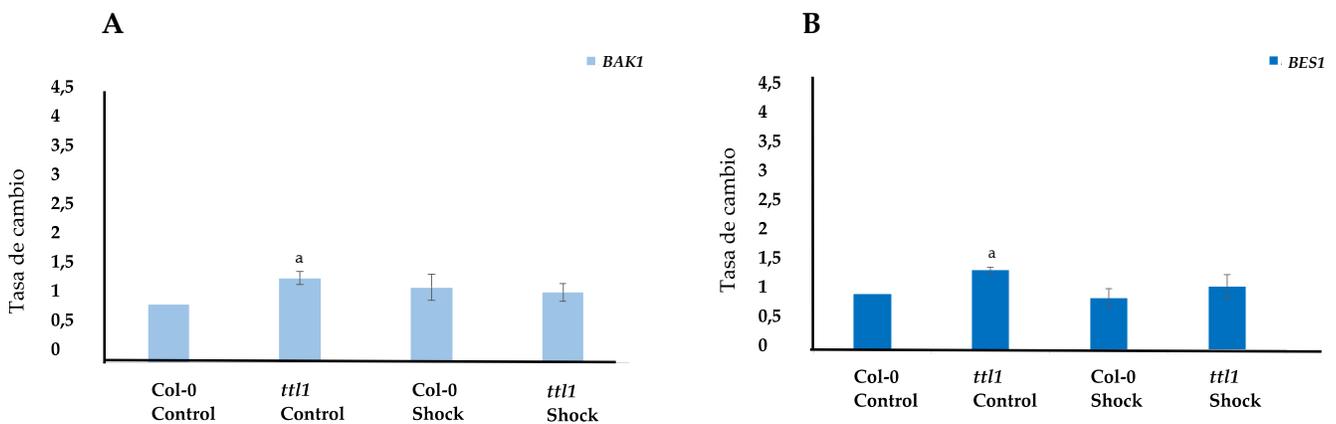


Figura 25. La transcripción de *BAK1* y *BES1* es mayor en *tll1* en condición control comparado con Col-0. Niveles normalizados de expresión de los genes *BAK1* (A) y *BES1* (B) en Col-0 y *tll1* en control y shock

osmótico (-1.2 MPa de potencial osmótico) obtenidos mediante RT-qPCR. En cada experimento se utilizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Se utilizó un $n \geq 50$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. Las barras de error corresponden al desvío estándar. La letra "a" indica significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de Col-0 en control. El gen *RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA* fue utilizado como *housekeeping*.

En condiciones de crecimiento control, los niveles de expresión de *DWF4* y *CPD/DWF3* en raíces de *ttl1* son significativamente menores a los observados en las raíces de Col-0 control.

En condiciones de shock osmótico, los niveles de expresión 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 *ttl1*.

Curiosamente, en condiciones de crecimiento en gradiente osmótico, las raíces de *ttl1* tienen niveles de expresión de *DWF4* y *CPD/DWF3* significativamente menores a los observados en las raíces de *ttl1* crecidas en condiciones control.

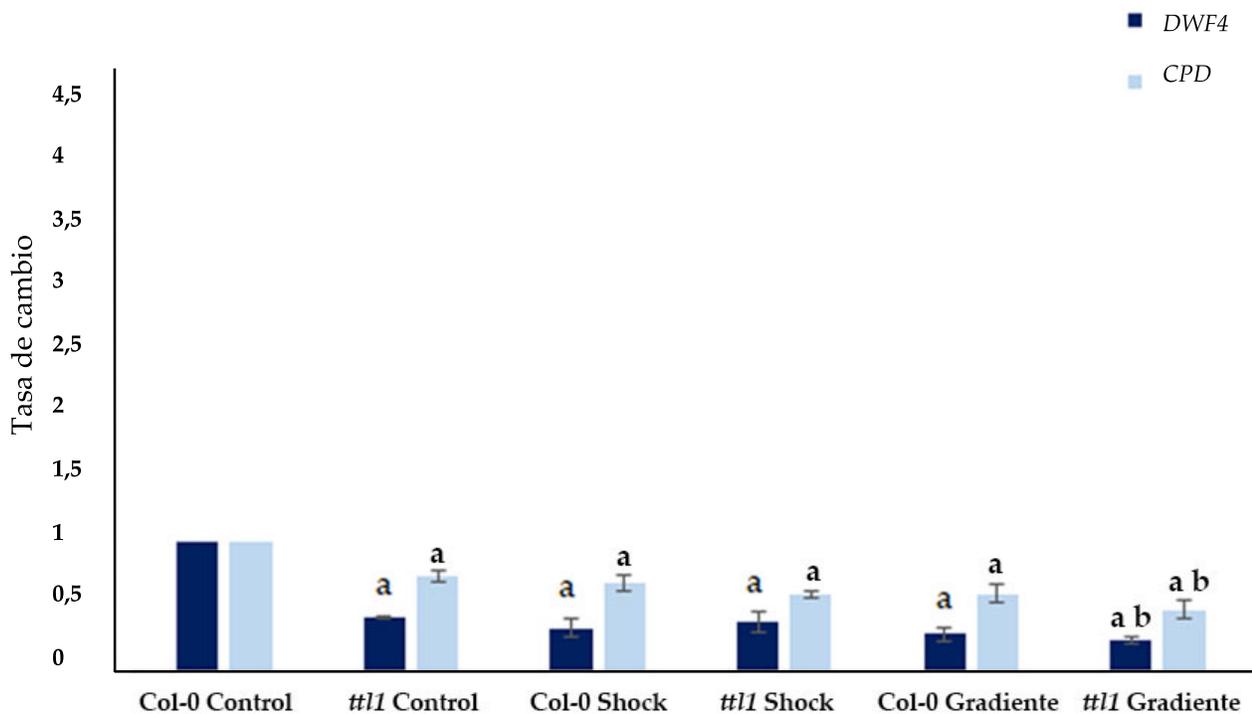


Figura 26. La expresión de genes vinculados a la biosíntesis de BRs es menor en Col-0 y *tll1* en todas las condiciones experimentales ensayadas en comparación con Col-0 control. Niveles normalizados de expresión de los genes *DWF4* y *CPD/DWF3* en Col-0 y *tll1* en control, shock (-1.2 MPa de potencial osmótico) y gradiente osmótico (0 a -1.2 MPa de potencial osmótico) obtenidos mediante RT-qPCR. En cada experimento se utilizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. En los experimentos control y de shock osmótico se utilizó un $n \geq 50$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. En los experimentos en gradiente osmótico se utilizó un $n \geq 6$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. La letra “a” indica significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de Col-0 en control. La letra “b” refiere a significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de *tll1* en control, y se indica (cuando corresponde) sólo para *tll1* en las condiciones de estrés osmótico. El gen *RELACIONADO A CITO Cromo C OXIDASA* fue utilizado como *housekeeping*.

4.6.5 Evaluación de la expresión de *CYCD3;1* en raíces de Col-0 y *tll1* en condiciones control y de estrés osmótico.

Para entender la relación de *TTL1* con la progresión del ciclo celular analizamos mediante experimentos de RT-qPCR la expresión del gen *CYCD3;1* que es un factor esencial en la transición de la fase G1 del ciclo celular a la fase S (Menges *et al.*, 2006, **Figura 27**).

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* aumentaron significativamente en las raíces de ambos genotipos en comparación a los niveles de expresión en las raíces de Col-0 crecidas en medio control.

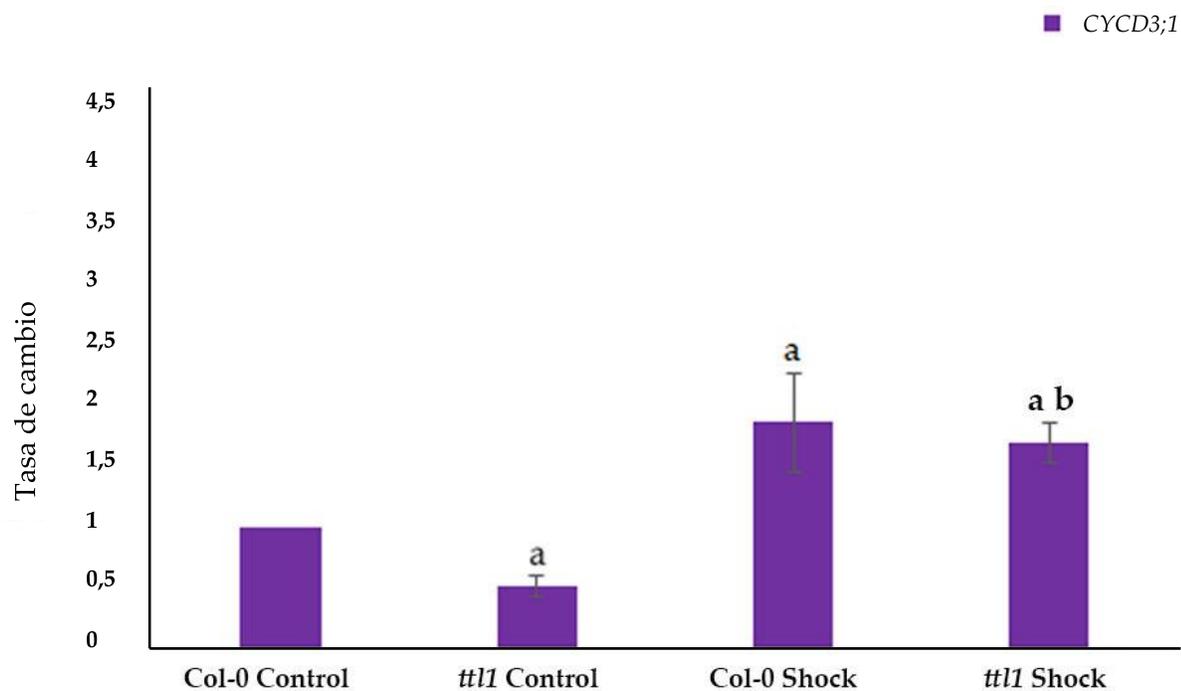


Figura 27. En condiciones control, en el mutante *ttl1* hay menor expresión del gen *CYCD3;1* con respecto a Col-0. Sin embargo, el shock osmótico generó un aumento en la transcripción de este gen en ambos genotipos estudiados. Niveles normalizados de expresión del gen *CYCD3;1* en Col-0 y *ttl1* en control y shock osmótico (-1.2 MPa de potencial osmótico) obtenidos mediante RT-qPCR. En cada experimento se utilizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas. Se utilizó un $n \geq 50$ raíces en cada réplica biológica para cada genotipo. Las barras de error corresponden al desvío estándar. La letra “a” indica significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de Col-0 en control. La letra “b” refiere a significancia estadística mediante la prueba T. Student ($p < 0.05$) con respecto a los niveles de expresión de *ttl1* en control, y se indica (cuando corresponde) sólo para *ttl1* en las condiciones de estrés osmótico. El gen *RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA* fue utilizado como *housekeeping*.

4.7 Puesta a punto de extracción de ARN a partir de pocas células y generación de librería de ADNc para ARN seq.

Con el fin de evaluar la existencia de correlación entre los genes que se transcriben y los que se traducen activamente en raíces de Col-0 y *ttl1* crecidas bajo condiciones control, de shock y gradiente osmótico, nos proponemos realizar experimentos de RNA-Seq y ensayos de inmunopurificación de polisomas mediante la técnica TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification, Jin & Xiao, 2018; Zanetti *et al.*, 2005).

4.7.1 Extracción de ARN de pocas células.

Se probó la disección de distinta cantidad de meristemos en Col-0 y diferentes métodos para romper el tejido antes de la extracción y probar el rendimiento del kit de extracción (ver **Materiales y métodos**) de ARN. Obtuvimos el mayor rendimiento (417 ng ARN total), disectando alrededor de 350 MP, cortando debajo de la lupa estereoscópica a 0,5 mm de la punta de la raíz de Col-0.

4.7.2 Depleción del ARN ribosomal (ARNr).

Utilizamos el kit riboPOOL el cual está diseñado para partir de inputs de ARN de 100ng a 5 μ g y depleta el 95% de los ARN ribosomales según las especificaciones del fabricante.

Trabajamos con una muestra que tenía 417 ng de ARN total cuantificada a través de Bioanalyzer (**Figura 28**) y un RIN de 6.9. Luego de la depleción tuvimos un rendimiento de 10,6 ng/ μ l, siendo el rendimiento total de 74.2 ng, que también fue cuantificada con Bioanalyzer (**Figura 28**), en este caso obtuvimos un RIN de 2.4.

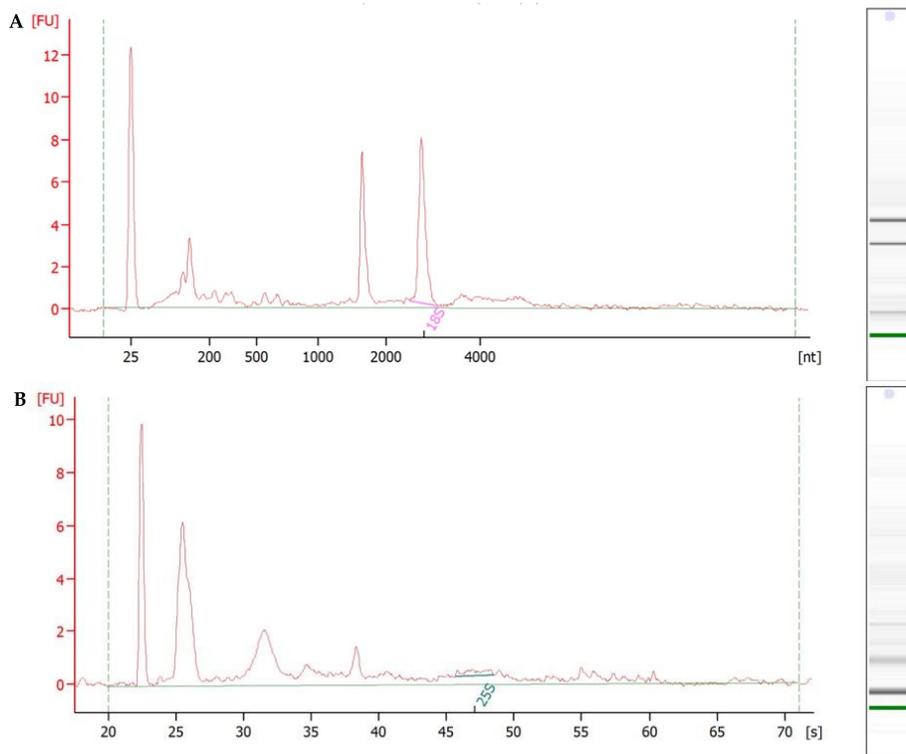


Figura 28. Electroferogramas de ARN antes (A) y después (B) de la depleción del ARN ribosomal (ARNr) obtenidos con Bioanalyzer.

4.7.3 Fragmentación del ARN.

Se fragmentaron los 74.2 ng de ARN depletado de ARNr utilizando RNAsa III por 3 min a 30°C para obtener fragmentos de 300 pb y se purificaron utilizando Dynabeads.

4.7.4 Hibridación y ligación de adaptadores.

El ARN limpio del paso anterior se hibridó con los adaptadores en el termociclador a 65 °C por 10 min, utilizando una rampa de enfriamiento de -0,5°C/s hasta llegar a 20°C por 5 min. Después se preparó la reacción de ligación y se incubó en el termociclador durante 15 min a 20°C.

4.7.5 Reacción de retrotranscripción.

Se retrotranscribió el ARN con los adaptadores ligados incubando la reacción con la enzima SuperScript IV en un termociclador a 50 °C por 10 min y 85 °C por 5 min. Una vez terminada la retrotranscripción se purificó el ADNc para amplificarlo.

4.7.6 Amplificación del ADNc e indexado.

Se preparó una reacción de PCR con el master mix de primer indexados utilizando de 12 a 14 ciclos de amplificación para inputs de ARN que estén entre 1 a 4 ng de ARN total.

Por último se purificó el ADNc indexado y se cuantificó a través de Bioanalyzer el resultado de la librería generada. En esta primera prueba obtuvimos muy bajo rendimiento en la librería generada por lo cual no se envió a secuenciar (**Figura 29**).

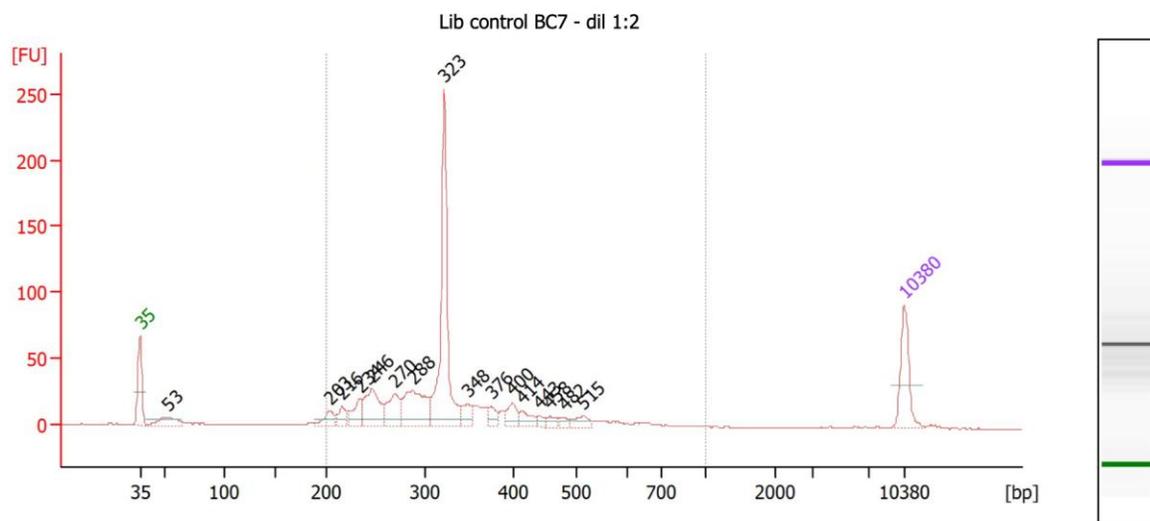


Figura 29. Electroferograma de ADNc generado utilizando Colibri Stranded RNA Library Prep kit.

4.8 Puesta a punto de ensayos de inmunopurificación de polisomas.

4.8.1 Confirmación de la presencia de RPL18 en la línea sobreexpresante 35S::HF-RPL18

Para los ensayos de inmunopurificación de polisomas, se adquirió desde el ABRC stock la línea sobreexpresante 35S::HF-RPL18 (Zanetti *et al.*, 2005). RPL18 es una proteína ribosomal, que al estar marcada con la etiqueta His-FLAG permitirá realizar una inmunopurificación de polisomas al utilizar un anticuerpo anti-FLAG. Plantas de esta línea fueron evaluadas mediante PCR en tiempo final según 3.9 y 3.13.1 para confirmar la presencia de la construcción HF-RPL18. En la **Figura 30** se muestra el patrón de banda obtenido de esta confirmación. A modo de control de la adecuada calidad del ADN extraído, para cada planta evaluada también se amplificó el gen de la ACTINA8. De esta forma, si el amplicón HF-RPL18 no era detectado en las plantas era seguro que se debía a la ausencia de este, y no a una incorrecta extracción del ADN. Las semillas producidas por las plantas confirmadas con la presencia de la construcción fueron conservadas, mientras que las plantas negativas para la construcción fueron descartadas.

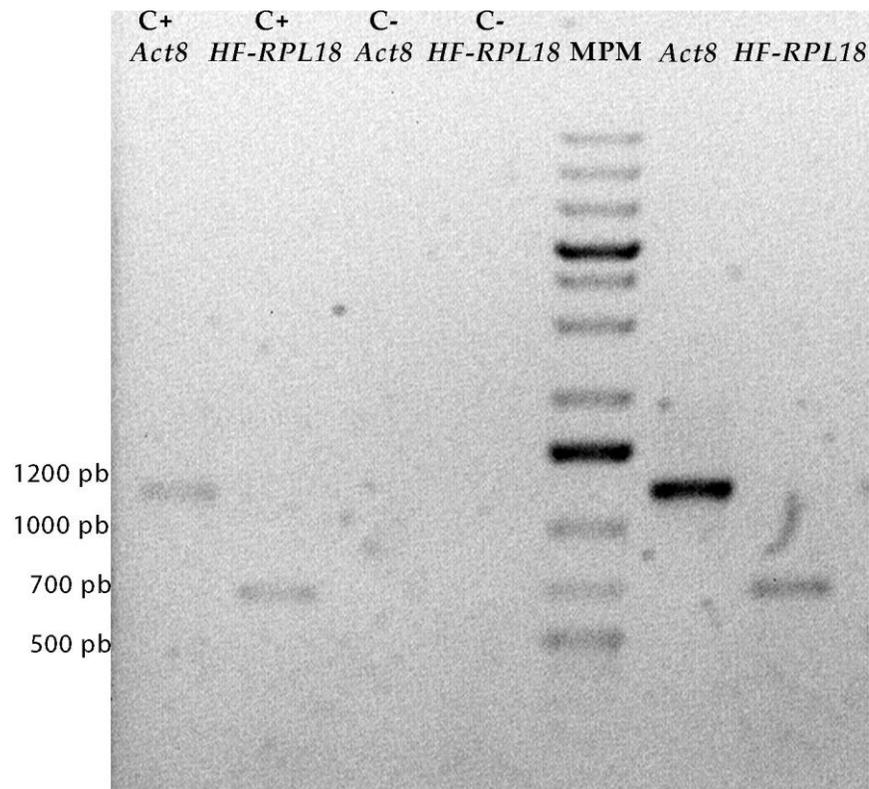


Figura 30. Patrón de bandas típico obtenido en una electroforesis en gel de agarosa 1% para la verificación de la presencia de la construcción HF-RPL18. C+ es el control positivo, en este se utilizó el ADN de plantas confirmadas previamente con la construcción. C- es el control negativo, en este se sustituyó el ADN en

las reacciones PCR por agua. *ACT8* corresponde a la amplificación de la *ACTINA8* a modo de control de calidad del ADN, cuyo amplicón ronda los 1200 pb. *HF-RPL18* es el amplicón que se espera obtener en las plantas transgénicas comerciales y posee un tamaño esperado de aproximadamente 700 pb. El MPM utilizado en este ensayo fue el GenRuler 1Kb plus. Se evaluó un n = 26 plantas.

4.8.2 Confirmación de la detección de la proteína RPL18.

A partir de las plantas confirmadas por PCR con la presencia de *RPL18* se colectaron entre 50 y 60 mg de material vegetal y se procedió a la extracción de proteínas según el punto 3.13.2. Se utilizó un extracto de proteínas de Col-0 a modo de control negativo. Se cuantificó mediante el método Bradford la concentración de proteína extraída, la cual estuvo entre en un rango entre 1.14 µg/µL y 2.17 µg/µL. El extracto de proteína fue evaluado en dos SDS-PAGE en paralelo con geles al 12% de acuerdo con el punto 3.13.2. Un gel fue teñido con azul de Commassie para determinar si la extracción había sido exitosa y el extracto no estaba degradado. El otro gel fue utilizado para realizar un western blot según el punto 3.13.4. La membrana fue teñida con rojo Ponceau para verificar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana (**Figura 31**). La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti FLAG (dilución 1:1000 en solución de bloqueo) durante toda la noche. Al día siguiente, luego de los lavados con TTBS, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-mouse (dilución 1:80.000 en solución de bloqueo) conjugado a HRP. Por último, se añadió el sustrato de la peroxidasa y se reveló la membrana. La **Figura 31** muestra que todas las plantas evaluadas de la línea sobreexpresante *35S::HF-RPL18* poseen la proteína RPL18 marcada con la etiqueta FLAG.

Una vez confirmada la presencia de RPL18 el siguiente paso fue generar las cruza con *ttl1*. Para ello se siguió el punto 3.13.3. Actualmente las semillas obtenidas de la crusa (F1) se sembraron en sustrato y serán genotipadas para encontrar plantas con la presencia de la construcción *HF-RPL18* y heterocigosis para *ttl1*. Aquellas plantas que cumplan con ambas características serán propagadas hasta la F2, donde se buscarán plantas dobles homocigota para *ttl1* y que contengan en su genoma la construcción *HF-RPL18*.

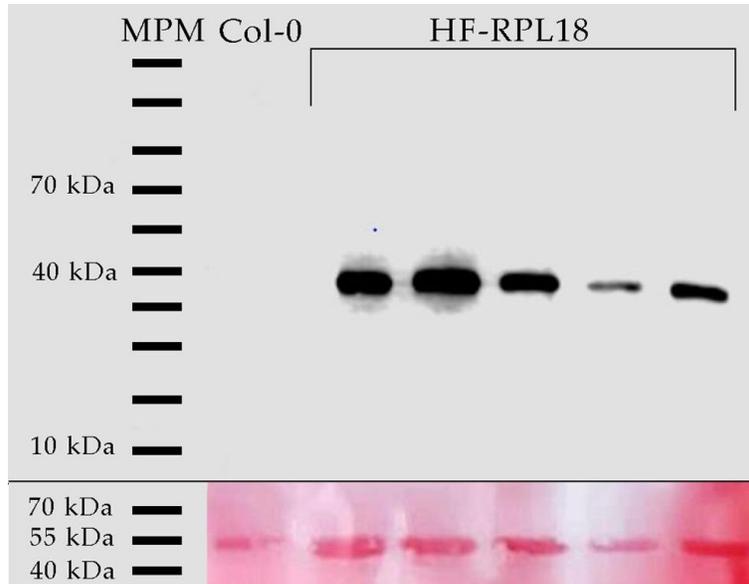


Figura 31. Confirmación de la proteína HF-RPL18 en la línea sobreexpresante *35S::HF-RPL18* mediante western blot, utilizando un anticuerpo primario anti FLAG. El tamaño de la proteína esperada es de 40 kDa aproximadamente. En la parte inferior se muestra la tinción de la membrana con rojo Ponceau a modo de control de carga. La banda que se observa corresponde a la subunidad mayor de la Rubisco. Se evaluó un $n = 5$ de plantas confirmadas previamente por PCR con la construcción *35S::HF-RPL18* (desde el segundo carril al sexto). Se utilizó Col-0 a modo de control negativo (primer carril). El PageRuler Prestained Protein Ladder fue el MPM utilizado.

5. Discusión

5.1 El gradiente osmótico produjo una menor reducción en la tasa de crecimiento de las raíces de Col-0 y *ttl1* comparado al shock osmótico.

El agua es un recurso esencial que puede limitar el crecimiento de las plantas. Su disponibilidad es inicialmente sensada por tejidos radiculares. La habilidad de las raíces para ajustar su fisiología y morfología bajo condiciones de déficit hídrico vuelve a este órgano un modelo útil para entender como las plantas responden al estrés hídrico (Yuan *et al.*, 2021; Dinnyen, 2019). Estudios previos han demostrado que el estrés osmótico reduce la tasa de crecimiento de la raíz primaria (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021; Cajero-Sanchez *et al.*, 2019; Rowe *et al.*, 2016). Estas investigaciones comparten la forma en que trabajan el estrés osmótico *in-vitro*: exponiendo a las raíces de las plántulas a un shock osmótico generado a partir de altas concentraciones homogéneas en un medio de manitol o polietilenglicol (PEG) con el fin de alcanzar altos potenciales osmóticos (-0.37 MPa, -0.7 MPa o -1.2 MPa). Sin embargo, cuando una raíz explora el suelo puede ser que no se encuentre inmersa en una situación en donde toda la raíz esté expuesta al mismo potencial osmótico. Por eso en este trabajo utilizamos un enfoque novedoso en donde simulamos una situación en donde el MP de la raíz se va encontrando paulatinamente con potenciales osmóticos crecientes, para estudiar el crecimiento primario de la raíz de Arabidopsis.

El largo de la raíz depende del balance entre la tasa de división y elongación celular. Generalmente, un alto número de células en el MP produce más células que se elongan y diferencian, dando como resultado una alta tasa de crecimiento de la raíz (Salvi *et al.*, 2020; Svolacchia *et al.*, 2020). Es por ello que estudiamos el perfil de células corticales contando el número de células en el MP y la longitud de la célula madura (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Cajero-Sanchez *et al.*, 2019; Cederholm *et al.*, 2012; Perilli & Sabatini, 2010). En trabajos anteriores hemos reportado que en condiciones de crecimiento control, *ttl1* tiene la misma tasa de crecimiento de la raíz que el genotipo silvestre, sin embargo, tiene un menor número de células en el MP y alcanza una longitud de la célula madura menor. Cuando las raíces de Col-0 y *ttl1* son crecidas en condiciones de shock osmótico, se produce una desaceleración en la tasa de crecimiento radicular en ambos genotipos, siendo mayor la desaceleración en el mutante. En condiciones de crecimiento en shock osmótico, la reducción en la tasa de crecimiento de la raíz de *ttl1* puede ser explicada por la inhibición en la elongación de las células en la ZE (medida como el largo de la célula madura) seguido de la reducción del número de las células en el MP dependiendo de la severidad del estrés osmótico (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Cajero-Sanchez *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2018; Geng *et al.*, 2013).

Sin embargo, durante el crecimiento en gradiente osmótico (rango 300-400mM manitol) observamos que tanto Col-0 como *tll1* redujeron menos la tasa de crecimiento de la raíz en comparación a la reducción observada en el shock osmótico (**Figura 15**) y esta reducción fue asociada a una pérdida en el número de células en el MP (**Figura 17A**), que pasan más tiempo en la ZT (**Tabla 9**) y que alcanzan una menor longitud en su madurez (**Figura 17B**).

En la bibliografía consultada no hemos encontrado investigaciones que utilicen un gradiente con potenciales osmóticos crecientes como el utilizado en esta tesis. Sin embargo, existen trabajos que reportan el uso de un gradiente hídrico con potenciales osmóticos decrecientes (-0.35 MPa a -0.08 MPa, Miao *et al.*, 2021, 2018; Saucedo *et al.*, 2012) que evidencian que la respuesta hidrotropica de las raíces de Arabidopsis es ecotipo dependiente (Miao *et al.*, 2018). En nuestros experimentos utilizando el gradiente de potenciales osmóticos crecientes se observó que a medida que las raíces alcanzaban mayores potenciales osmóticos, mostraban la respuesta hidrotropica al curvarse para intentar seguir creciendo en un entorno con mayor disponibilidad de agua, sin embargo, en un punto estas raíces continuaron su crecimiento hacia las zonas con mayores potenciales osmóticos, lo que sugiere una interacción entre el hidrotropismo y el gravitropismo. Esta respuesta también ha sido reportada en otra investigación en donde plantas silvestres detenían el crecimiento de la raíz al encontrar un potencial osmótico elevado y lo reorientaban curvándose hacia una zona de mayor disponibilidad de agua (Eapen *et al.*, 2003). Resultados similares a los nuestros fueron encontrados al someter a la raíz del genotipo silvestre de Arabidopsis a un gradiente de temperatura creciente (González-García *et al.*, 2023) y a un gradiente de distancias de germinación de semillas a un medio contaminado con metales (Bochicchio *et al.*, 2015).

5.2 La expresión de *TTL1* es inhibida por el shock osmótico en raíces de Col-0.

Evaluamos la expresión de *TTL1* en raíces del genotipo silvestre crecido en condiciones de shock osmótico y de gradiente osmótico. El crecimiento de las raíces de Col-0 en condiciones de shock osmótico provocó una disminución significativa de los niveles de expresión de *TTL1* en comparación al crecimiento en condiciones control. Estos resultados coinciden con la expresión reportada en los datos públicos de microarreglos presentados en el Electronic Fluorescent Pictograph browser (eFPbrowser, Winter *et al.*, 2007) durante la exposición de plántulas de Col-0 a un shock osmótico de 300mM de manitol (Kilian *et al.*, 2007). Sin embargo, en las raíces de Col-0 crecidas en el gradiente osmótico no se observaron variaciones de los niveles de expresión de *TTL1* (**Figura 22**). La expresión de *TTL3* en raíces de Col-0 no se vio afectada por el shock osmótico, resultado coincidente a lo observado los datos públicos del eFPbrowser (Winter *et al.* 2007; Kilian *et al.*, 2007). Sin embargo, en condiciones de gradiente osmótico, la expresión de este gen aumentó significativamente con respecto al control (**Figura 22**). Además, evaluamos la

expresión de *TTL3* y *TTL4* en las raíces del mutante *ttl1* crecidas en condiciones de shock y gradiente osmótico (**Figura 22**). Las raíces de *ttl1* crecidas en condiciones control tienen niveles de expresión de *TTL3* menores a los de Col-0.

Las raíces de *ttl1* crecidas en ambas condiciones de estrés osmótico tuvieron niveles de expresión de *TTL3* significativamente mayores a los niveles de expresión en las raíces del genotipo silvestre crecidas en medio control. Los niveles de expresión de *TTL4* solo se incrementaron significativamente en las raíces de *ttl1* crecidas en shock osmótico con respecto a las raíces de Col-0 crecidas en la misma condición. En el eFPbrowser también se reportó un aumento en la expresión de *TTL4* luego del crecimiento de raíces de Col-0 por 24 h en shock osmótico (300 mM manitol, Winter *et al.* 2007; Kilian *et al.*, 2007).

El aumento de los niveles de expresión de *TTL3* y *TTL4* en el mutante *ttl1* crecido en condiciones de shock osmótico podría implicar un mecanismo de regulación compensatoria, en el que ambos genes suplen a *TTL1* en su ausencia.

5.3 El MP del mutante *ttl1* no presenta el fenotipo de expansión celular exacerbada luego del crecimiento de las raíces durante 25 días en el gradiente osmótico.

El estrés osmótico genera una reducción en el potencial hídrico externo, lo que provoca la salida del agua de las células y como consecuencia causa la disminución en su presión de turgencia. Este fenómeno es conocido como plasmólisis y su característica principal es la separación de la pared de la membrana celular. Sin embargo, el protoplasto es capaz de seguir unido a la pared a través de las hebras de Hecht (Rui & Dinneny, 2020; Yoneda *et al.*, 2020; Pont-Lezica *et al.*, 1993). A medida que continúa el estrés osmótico, la presión de turgencia de las células se recupera paulatinamente hasta alcanzar un estado estable que se equilibra con el potencial hídrico externo, lo cual redundaría en una disminución en la tasa de crecimiento de la raíz (Rui & Dinneny, 2020; Feng *et al.*, 2016), tal como hemos observado en nuestros experimentos en shock osmótico (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; **Figura 8A**). Es importante mencionar que a nivel celular en el genotipo silvestre, el estrés osmótico interrumpe el crecimiento anisotrópico de las células epidérmicas en la zona de elongación, las cuales se ensanchan radialmente (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021; Rui & Dinneny, 2020; Cajero-Sanchez *et al.*, 2019; Dinneny *et al.*, 2008). Sin embargo, al someter a *ttl1* a condiciones de shock osmótico durante el mismo tiempo, Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021 observó que la expansión radial de las células del MP se daba de manera exacerbada en comparación a Col-0 (**Figura 8C**). Curiosamente, no observamos la expansión radial exacerbada en el MP de las raíces de *ttl1* crecidas durante 25 días en gradiente osmótico.

5.4 *TTL1* podría formar parte de un mecanismo “de afuera hacia dentro” controlando la progresión del ciclo celular en el MP de raíz de *Arabidopsis*.

La deposición de la pared celular en las plantas es uno de los procesos más importantes durante los pasos finales de la división celular. La citocinesis en plantas requiere de un mecanismo “de adentro hacia afuera” mediante el cual el ciclo celular controla por ejemplo el tráfico vesicular y el metabolismo de síntesis de la pared celular para permitir la formación *de novo* de la pared celular. La división celular comienza con la formación de un anillo denso de microtúbulos y filamentos de actinas que marca la futura zona de división y coordina la fusión de la nueva membrana sintetizada, separando a la nueva célula hija de las ya existentes. Las vesículas llevan enzimas biosintéticas así como precursores de la pared celular requeridos para sintetizar *de novo* la pared celular (Gigli-Bisceglia & Hamann, 2018). La celulosa, que es sintetizada a partir del CCS localizado en la membrana plasmática naciente, es detectada desde las primeras fases de la citocinesis. Sin embargo, se conoce poco de los mecanismos responsables de la regulación de la deposición de pared celular durante la división celular. Los brasinosteroides y la regulación transcripcional han sido implicados en la producción de celulosa durante la formación de la pared celular primaria (Gigli-Bisceglia & Hamann, 2018). El conocimiento de la regulación del ciclo celular en respuesta al estado de la pared celular es muy limitado. En *Arabidopsis*, la manipulación de la celulosa a través de la inhibición de la síntesis o mutaciones en los genes *CESAs* activa un set de genes de respuestas a daño de la pared celular (Gigli-Bisceglia & Hamann, 2018). Estas respuestas incluyen abultamiento de las células epidérmicas, cambios en la composición de la pared celular (incluyendo deposición de lignina) e inhibición del crecimiento entre otros (Gigli-Bisceglia & Hamann, 2018). Recientemente, se ha reportado que la inhibición de la síntesis de pared celular utilizando Isoxaben (inhibidor de las *CESAs*) produce un enlentecimiento de la progresión del ciclo celular en raíces de *Arabidopsis*, además de la reducción de los niveles de los transcritos de *CYCD3;1* y *CYCB1,1* (Gigli-Bisceglia *et al.*, 2018). Además, se conoce que estas respuestas son sensibles a cambios osmóticos y pueden ser suprimidas con co-tratamientos osmóticos. Lo que podría constituir un mecanismo de “afuera hacia dentro” que controla el ciclo celular luego de una distorsión de la integridad de la pared celular (**Figura 32**; Gigli-Bisceglia & Hamann, 2018).

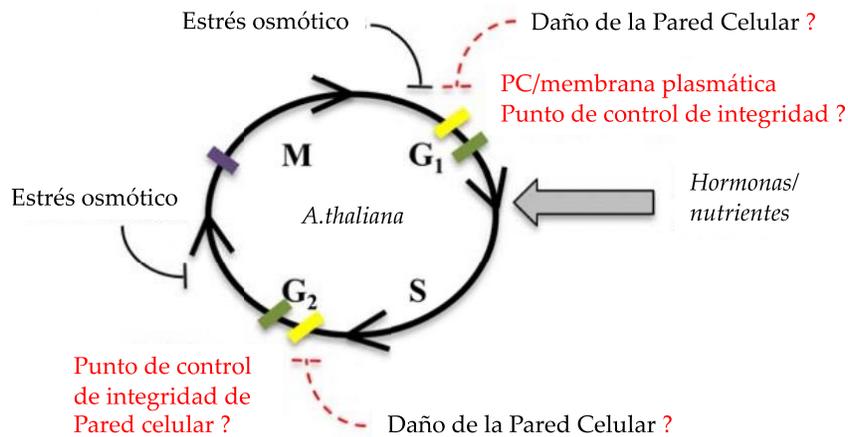


Figura 32. Representación esquemática de los eventos del ciclo celular en Arabidopsis. Los bloques de colores diferentes indican puntos de control para daño del ADN (verde), punto de control a ser caracterizado (amarillo); punto de control del huso mitótico (violeta). Las líneas que terminan en una línea perpendicular y las flechas indican inactivación o inducción de la progresión del ciclo celular por un estímulo externo. Figura modificada de Gigli-Bisceglia & Hamann, 2018.

Nuestro grupo ha reportado que las raíces del mutante *tll1* crecidas en condiciones control tienen las paredes celulares más flexibles que el genotipo silvestre en las células de la ZE de la raíz, un menor número de células en el MP y células maduras más cortas comparado al genotipo silvestre (Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021). En este trabajo encontramos que los niveles de expresión del gen *CYCD3;1* en las raíces de *tll1* crecidas en condiciones control fueron menores a los niveles observados en las raíces de Col-0 crecidas en la misma condición (Figura 27). Además, en nuestras condiciones de crecimiento en shock osmótico (400 mM manitol) observamos un aumento en los niveles de expresión de *CYCD3;1* en las raíces de ambos genotipos (Figura 27) al igual que lo observado por Gigli-Bisceglia *et al.*, 2018 en el genotipo silvestre crecido en estrés osmótico.

Por otro lado, en este trabajo analizamos la expresión de los genes *CESA1*, *CESA 3*, *CESA6* y *CSLA9* encargados de la síntesis de celulosa en la pared primaria (Figura 23).

Según datos del eFP Browser luego de someter a raíces de Col-0 a 300 mM de manitol por 24 h, la expresión de *CESA1*, *CESA3*, *CESA6* y *CSLA9* disminuye con respecto a la expresión en el medio sin manitol (Winter *et al.*, 2007). Nuestros resultados de los niveles de expresión de *CESA6* y *CSLA9* luego de someter las raíces de Col-0 a 400 mM de manitol durante 7 días coinciden con lo reportado en el eFP browser. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, los niveles de transcripción de *CESA1* se mantuvieron igual al tratamiento control. Mientras que los niveles de *CESA3* aumentaron significativamente. En condiciones de

gradiente osmótico, las raíces de Col-0 presentaron niveles de expresión significativamente mayores de *CESA3* con respecto a los observados en el medio de crecimiento control.

Es de destacar que en raíces de *tll1* crecidas en condiciones de crecimiento control los niveles de expresión de *CESA1*, *CESA6* y *CSLA9* son menores en comparación a Col-0. Sin embargo, en condiciones de crecimiento de shock osmótico se detectó un aumento de la expresión de *CESA1*, *CESA6*, *CSLA9*, siendo *CESA3* el que incrementó más sus niveles de expresión, en las raíces de *tll1* con respecto a los niveles observados en el mismo genotipo en condiciones control. Curiosamente, en raíces de *tll1* crecidas en el gradiente osmótico se observaron incrementos significativos de los niveles de expresión de *CESA1* y *CESA6* con respecto a los niveles en raíces de *tll1* crecidas en medio control. Los niveles de expresión de *CESA3* en las raíces crecidas en gradiente osmótico aumentaron significativamente con respecto a los niveles observados en raíces de ambos genotipos crecidas en medio control. Xie *et al.*, 2011 demostraron que *CESA3* no es responsivo a BRs, lo que sugiere que su regulación puede ser a partir de una vía alternativa, entre las cuales podemos incluir la percepción del estrés osmótico y/o la percepción de la integridad de la pared celular (Gigli-Bisceglia & Hamann, 2018). Esto podría explicar el aumento de los niveles de expresión de este gen en ambos genotipos en estrés osmótico. Además, en esta condición en *tll1* el aumento de la expresión de *CESA3* es mayor que en Col-0, lo que podría sugerir la existencia de un mecanismo compensatorio, en el que este gen aumenta su transcripción para compensar la menor expresión de los otros integrantes del CCS en ausencia de *TTL1*.

Por otro lado, evaluamos la expresión de genes involucrados en la remodelación de la pared celular: *PECTATO LIASA12*, *EXPA1*, *AHA1* y *AHA2* en raíces de ambos genotipos crecidos en condiciones control y de shock osmótico (**Figura 24**). No encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de la *PECTATO LIASA12* entre los genotipos en ninguna de las condiciones ensayadas, a diferencia de lo observado en los experimentos de estrés salino (Geng *et al.*, 2013). Tampoco encontramos diferencias en los niveles de expresión de *EXPA1* entre Col-0 y *tll1* en condición control. Sin embargo, la expresión de *EXPA1* se incrementó significativamente en el mutante *tll1* en el shock osmótico. Además, los niveles de expresión de *AHA1* y *AHA2* en las raíces de *tll1* son significativamente menores a los de Col-0 en condiciones de crecimiento control. Sin embargo, se incrementan en las raíces de *tll1* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Estos resultados podrían explicar en parte la incapacidad de rigidizar la pared celular de *tll1* en condiciones de estrés osmótico observados en el trabajo de Cuadrado-Pedetti *et al.* 2021 y el tránsito rápido hacia la diferenciación celular observado en el mutante *tll1* en condiciones de shock osmótico (Pacifi *et al.*, 2018).

En resumen, en condiciones control, la pérdida de integridad de la pared celular en el mutante *tll1*, medida por las alteraciones de sus propiedades físicas, sumado a los patrones de expresión

de los genes que integran el CCS (menor expresión de *CESA1*, *CESA6* y *CSLA9* con respecto a Col-0 control) y la menor expresión de la *CYCD3;1* sugieren que el gen *TTL1* podría estar involucrado en un mecanismo “de afuera hacia adentro” controlando negativamente la progresión del ciclo celular en el MP de Arabidopsis. Este mecanismo implicaría que una perturbación en la pared celular es capaz de ser sensada por los receptores allí presentes, los cuales desencadenarían una cascada de señalización que terminaría por activar genes vinculados a la progresión del ciclo celular como las ciclinas.

5.5 Relación de *TTL1* con las hormonas que controlan el crecimiento de la raíz de Arabidopsis

Las divisiones celulares en el MP y la elongación celular en la ZE contribuyen al crecimiento de la raíz, y su balance es fundamental en este proceso que está regulado principalmente por citoquininas, auxinas, brasinosteroides y giberelinas (Chaiwanon & Wang, 2015; Ubeda-Tomás et al., 2012; Beemster & Baskin, 1998). Si bien estas hormonas regulan diversos procesos por sí solas, existe evidencia de que hay cooperación y comunicación cruzada entre sus vías de señalización (Depuydt & Hardtke, 2011).

Los resultados del análisis del promotor de *TTL1* muestran que presenta motivos responsivos a citoquininas correspondientes a los que se unen los factores de transcripción ARR tipo B, auxinas y brasinosteroides (Nguyen *et al.*, 2016). Según el eFP browser la aplicación de zeatina a un medio control, induce la expresión de *TTL1* (**Figura 20**). Lo que coincide con nuestros resultados de los experimentos con la línea reportera *TTL1::GUS* (**Figura 21**). Al analizar el crecimiento de raíces de Col-0 y *ttl1* en un medio control suplementado con BAP durante 24 h (**Figura 18**), se observó que ambos genotipos reducen significativamente el número de células del MP, lo que coincide con lo reportado por (Dello Ioio *et al.*, 2007). Sin embargo, la reducción de células en el MP de *ttl1* es mayor, esto apoya la hipótesis antes propuesta de que *TTL1* podría estar controlando la progresión del ciclo celular en el MP de Arabidopsis. Bajo estrés osmótico (400 Mm manitol, -1.2 MPa potencial osmótico) *TTL1* se expresó en córtex, endodermis y estela. Sin embargo, al suplementar este medio con BAP la expresión de *TTL1* se dio en el NCM y en la epidermis (**Figura 21**). El análisis del crecimiento de raíces de Col-0 y *ttl1* en condiciones de shock osmótico y BAP muestran que ambos genotipos disminuyeron el número de células del MP, sin embargo, Col-0 fue quien tuvo la mayor reducción (**Figura 19**).

Según el eFP browser las giberelinas inducen la expresión de *TTL1* considerablemente luego de las 3 h de aplicación al medio (**Figura 20**). Esto no concuerda con los resultados obtenidos con la línea reportera *pTTL1::GUS*. Es posible observar que en este tiempo el número de células del

MP disminuyó con respecto al observado en Col-0 sin tratamiento, sin embargo, esta reducción es menor que la observada para otras hormonas lo que coincide con lo reportado por Hetherington et al., 2021 que dice que el efecto de las giberelinas es menor en el crecimiento de la raíz primaria.

Además, la expresión de *TTL1* es inducida por la acción de auxinas (**Figura 20**; Cuadrado-Pedetti et al., 2021). En este trabajo vimos que tanto Col-0 como *tll1* respondieron de la misma manera a las concentraciones de auxinas utilizadas, reduciendo el número de células en el MP. Por el contrario (Perilli & Sabatini, 2010) reportan que la adición de 0.1 nM AIA al medio resulta en el aumento del tamaño del MP, esta contradicción puede deberse a las dosis de AIA utilizadas. Es probable que la concentración que utilizamos en este trabajo sea inhibitoria del crecimiento, y por eso ocurre la reducción en el número de células del MP. Bajo condiciones de shock osmótico + IAA la reducción en el número de células en ambos genotipos resulta del efecto combinatorio de los dos tratamientos. Cuadrado-Pedetti et al., 2021 reportó que la respuesta a auxinas se ve disminuida luego de 7 días de shock osmótico en el mutante *tll1*.

En este trabajo observamos que en las raíces del mutante crecidas durante 7 días en medio control los niveles de expresión de dos genes de la vía de señalización por BRs (*BAK1* y *BES1*, **Figura 25**) son significativamente mayores en el mutante *tll1* en comparación a Col-0. Además, *tll1* tiene un MP más pequeño, una transición rápida de las células hacia la ZE y células maduras más cortas, similar a lo que ocurre con el mutante *bri1-116* y en el mutante *dwf4* que tiene reducida la señalización por BRs y a lo que ocurre con la sobreexpresión de *BES1* y el tratamiento con epi-BL (Chaiwanon & Wang, 2015; González-García et al., 2011; Hacham et al., 2011). Sin embargo, no encontramos cambios en el patrón de expresión de BZR1 en las células epidérmicas de la raíz de *tll1* en comparación con las de Col-0 (Cuadrado-Pedetti et al., 2021; Chaiwanon et al., 2015).

Por otro lado observamos que los niveles de expresión de dos genes de biosíntesis de BRs (*DWF4* y *CPD*, **Figura 26**) son significativamente menores en las raíces del mutante *tll1* crecidas durante 7 días en medio control en comparación con Col-0. Estos resultados concuerdan con la aplicación de epi-BL que disminuye rápidamente los niveles de transcripto de *DWF4* y *CPD*, y discrepa con lo que ocurre en mutantes deficientes en la percepción de BRs, que acumulan transcriptos de *DWF4* (Amorim-Silva et al., 2019; Tanaka et al., 2005). Por un lado los menores niveles de expresión de los genes de biosíntesis de BRs podrían sugerir que *tll1* es un mutante que posee más BRs que Col-0; sin embargo, los niveles de expresión de *BAK1* sugieren que los niveles de BRs son menores en el mutante. Estos datos sumados al fenotipo de *tll1* que es muy sutil y no se asemeja a los fenotipos de los mutantes deficientes en la síntesis y/o señalización de BRs que son enanos, nos hacen pensar en un desbalance entre la homeostasis de auxinas y BRs. La **Figura 33** muestra el modelo propuesto para *tll1* en condición control y relaciona auxinas y BRs. Como se mencionó anteriormente, *BES1* presenta niveles de expresión más elevados en *tll1* con

respecto a Col-0. Es sabido que BES1/BZR1 son factores de transcripción que inhiben la vía de biosíntesis de BRs (Chung & Choe, 2013), lo que coincide con la represión de *DWF4* y *CPD* observada en nuestros resultados. La represión de la vía de biosíntesis, daría como resultado una menor cantidad de BRs, y, por lo tanto, en un intento por tratar de sentir la hormona, la transcripción del co-receptor *BAK1* aumenta, como observamos en el mutante. La menor cantidad de BRs concuerda con el menor largo de la célula madura en *ttl1*. La transcripción de *BZR1/BES1* es reprimida por la hormona auxina (Chung & Choe, 2013). Los mayores niveles de expresión observados en *ttl1* de *BES1* con respecto a Col-0 sugieren que hay una menor cantidad de auxinas en el mutante. La menor cantidad de auxinas puede confirmarse en los experimentos que realizaron Cuadrado-Pedetti *et al.*, 2021 con las líneas reporteras *DR5::GUS* y *ttl1 x DR5::GUS*.

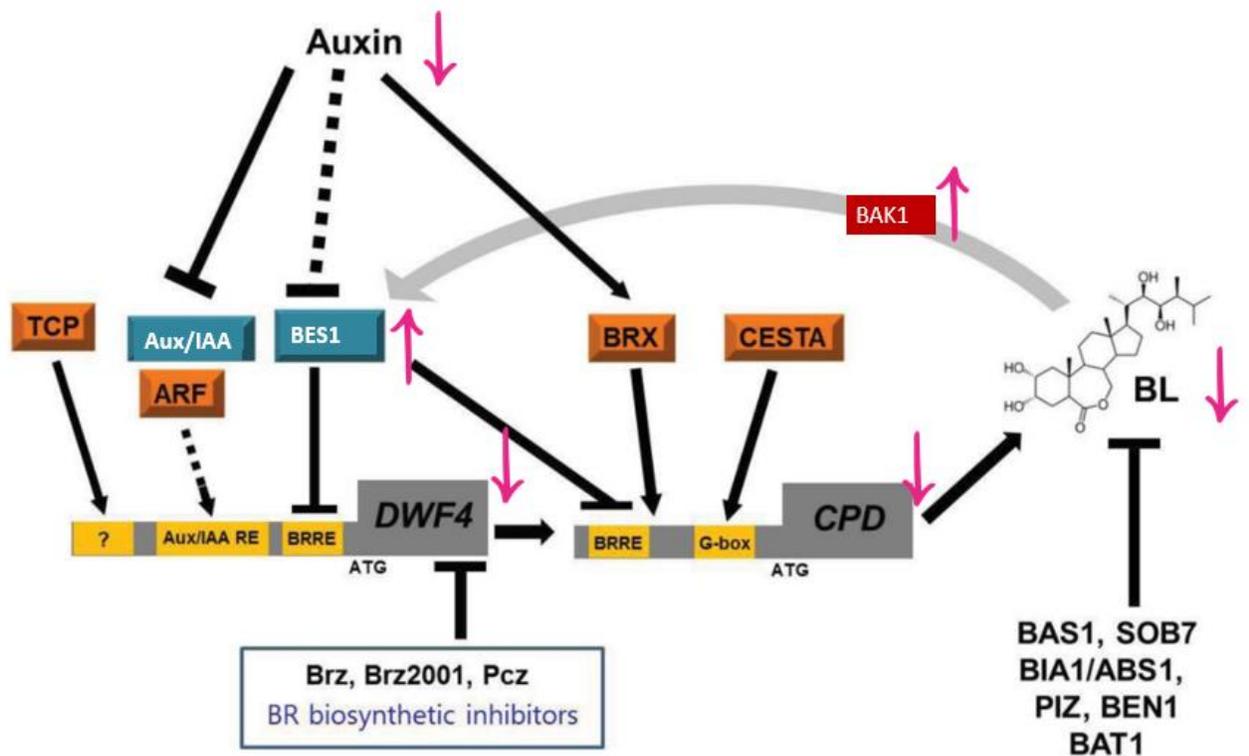


Figura 33. *ttl1* es un mutante con menos cantidad de BRs y auxinas en condición control. Modelo del mutante *ttl1* en condición control en relación a BRs y auxinas. Las flechas rosadas corresponden a los niveles de expresión de genes o cantidad de hormonas en *ttl1* con respecto a Col-0. Nuestros resultados muestran que *ttl1* posee más expresión de *BES1* que Col-0. Este factor de transcripción inhibe la vía de biosíntesis de BRs, lo que provoca que haya menos cantidad de esta hormona. Para poder sentirla *BAK1* se sobre-expresa. Los niveles de expresión de *BES1* sugieren una menor concentración de auxinas. Imagen adaptada de Chung & Choe, 2013.

En raíces de *ttl1* crecidas en shock osmótico los niveles de expresión de *BES1* y *BAK1* bajan a los niveles observados en las raíces de Col-0, lo que concuerda con la supresión de la vía de BRs observada por la exposición al estrés (Geng *et al.*, 2013) . Por otro lado, en las condiciones de shock osmótico los niveles de transcritos de *DWF4* y *CPD* fueron significativamente menores en raíces de Col-0 y en el gradiente osmótico sus niveles bajaron en *ttl1* similar a la represión temporal observada en condiciones de estrés salino (Geng *et al.*, 2013).

Para entender el rol de *TTL1* en condiciones de estrés osmótico, es de nuestro interés estudiar la expresión de los otros componentes de la vía de señalización de BRs para tener un panorama más completo de la homeostasis de BRs. Por otro lado, también debería estudiarse, a nivel transcripcional, el diálogo cruzado con otras hormonas como las auxinas y citoquininas que afectan tanto la expresión de *TTL1* como la tasa de producción celular en el meristemo de *ttl1*.

6. Conclusiones

En este trabajo analizamos el crecimiento de la raíz primaria del mutante *tll1* en condiciones crecientes de potencial osmótico, para evaluar las respuestas del MP cuando se va encontrando paulatinamente con menos disponibilidad de agua.

La tasa de crecimiento de las raíces del genotipo silvestre y del mutante se desaceleraron menos en el gradiente osmótico que en el shock osmótico en comparación a las tasas de crecimiento en condiciones control.

Durante el crecimiento en gradiente osmótico la menor tasa de crecimiento de la raíz de *tll1* (evaluada en el rango 300-400 mM manitol) fue asociada a una pérdida de células en el MP, que pasan más tiempo en la ZT y que alcanzan una menor longitud en su madurez.

A diferencia de lo observado en el crecimiento en shock osmótico, en el gradiente osmótico *tll1* no presentó el fenotipo de expansión exacerbada en el MP.

Comprobamos transcripcionalmente que en condiciones control los genes de biosíntesis de pared celular primaria en el mutante *tll1* tienen niveles de expresión más bajos que el genotipo silvestre lo que es concordante con la mayor flexibilidad de las paredes celulares de las células epidérmicas de la ZE del mutante. El aumento de la expresión de *TTL3* en *tll1* en condiciones de estrés osmótico podría indicar que *TTL3* está suplantando el rol de *TTL1* en su ausencia.

En condición control, *tll1* presenta mayor transcripción de los genes de señalización de BRs y menor expresión de genes relacionados a biosíntesis de estas hormonas, lo que sugiere que *tll1* podría ser un mutante con un desbalance en la homeostasis de auxinas y brasinosteroides. El patrón de los genes vinculados a BRs, en conjunto con la disminución en la expresión de la *CYCD3;1* con respecto a Col-0, concuerda con el menor número de células y el menor largo celular. La pérdida de integridad de la pared celular en el mutante *tll1*, sumado a los patrones de expresión de los genes que integran el Complejo Celulosa Sintasa y la *CYCD3;1* sugieren que el gen *TTL1* podría estar involucrado en un mecanismo “de afuera hacia adentro” controlando negativamente la progresión del ciclo celular en el MP de Arabidopsis.

En las condiciones de crecimiento de estrés osmótico, la expresión de los genes *CESAs* aumentan en *tll1* con respecto a lo observado en crecimiento en medio control, sin embargo, el patrón de expresión de estos genes es diferente a Col-0 lo que concuerda con el intento de aumentar la rigidez de las paredes celulares de *tll1* en esta condición, aunque no se alcance la magnitud de rigidez de las paredes celulares de Col-0. La expresión de los genes *CESAs* en el mutante *tll1* en las raíces crecidas en el gradiente osmótico podría explicar, en parte, porque no se ve el fenotipo de expansión celular radial exacerbada en las células de la ZE en *tll1*.

7. Perspectivas

Este trabajo de tesis es sólo una parte de un proyecto de investigación. Si bien se ha avanzado en la mayoría de los objetivos del mismo, aún queda mucho trabajo por delante. Por esta razón consideraré varios puntos dentro de este apartado.

1) Si bien hemos avanzado en la extracción de RNA para generar las librerías con el fin de realizar un experimento de RNA-Seq, aún nos falta seguir poniendo a punto las técnicas para lograr estandarizarlas. Una vez que esto ocurra, las muestras se enviarán a secuenciar y obtendremos una lista de genes sujetos a control de transcripción en Col-0 y *tll1* bajo condición control y de shock osmótico.

2) Nuestro grupo tiene interés en conocer el traductoma de *tll1*, por esta razón se realizarán ensayos de inmunopurificación de polisomas mediante la técnica TRAP. Tenemos plantas de *tll1* x 35S:HF::RPL18 de la generación F1 que serán evaluadas por PCR para verificar la presencia de la construcción y para encontrar heterocigotas para *tll1*. Luego, la F2 será sembrada y las plantas positivas para la construcción *HF::RPL18* serán genotipadas en busca de plantas homocigotas para *tll1*. Posteriormente, se evaluará la presencia de RPL18 en las plantas positivas mediante western blot. Una vez alcanzado ese punto, se procederá con la parte experimental de la inmunopurificación de polisomas y el envío a secuenciación. Esperamos obtener una lista de genes sujetos a regulación traduccional.

3) Con el fin de estudiar el interactoma de TTL1 se realizarán experimentos de proximity labeling.

Bibliografía

- 1- Allen, H., Wei, D., Gu, Y., & Li, S. (2021). A historical perspective on the regulation of cellulose biosynthesis. *Carbohydrate Polymers*, 252. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117022>
- 2- Amorim-Silva, V., García-Moreno, Á., Castillo, A. G., Lakhssassi, N., Del Valle, A. E., Pérez-Sancho, J., Li, Y., Posé, D., Pérez-Rodríguez, J., Lin, J., Valpuesta, V., Borsani, O., Zipfel, C., Macho, A. P., & Botella, M. A. (2019a). TTL Proteins Scaffold Brassinosteroid Signaling Components at the Plasma Membrane to Optimize Signal Transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 31(8), 1807. <https://doi.org/10.1105/TPC.19.00150>
- 3- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A. S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Höfte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., & Williamson, R. E. (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Science*, 279(5351), 717–720. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.279.5351.717/SUPPL_FILE/974564A_THUMB.GIF
- 4- Beemster, G. T. S., & Baskin, T. I. (1998). Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, 116(4), 1515–1526. <https://doi.org/10.1104/PP.116.4.1515>
- 5- Bhuiyan, N. H., Friso, G., Poliakov, A., Ponnala, L., & Van Wijk, K. J. (2015). MET1 is a thylakoid-associated TPR protein involved in photosystem II supercomplex formation and repair in Arabidopsis. *Plant Cell*, 27(1), 262–285. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132787>
- 6- Bochicchio, R., Sofo, A., Terzano, R., Gattullo, C. E., Amato, M., & Scopa, A. (2015). Root architecture and morphometric analysis of Arabidopsis thaliana grown in Cd/Cu/Zn-gradient agar dishes: A new screening technique for studying plant response to metals. *Plant Physiology and Biochemistry*, 91, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.010>
- 7- Cajero-Sanchez, W., Aceves-Garcia, P., Fernández-Marcos, M., Gutiérrez, C., Rosas, U., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., Sánchez, M. de la P., & Garay-Arroyo, A. (2019a). Natural root cellular variation in responses to osmotic stress in arabidopsis thaliana accessions. *Genes*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/genes10120983>
- 8- Caño-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vefeados, D., Mora-García, S., Cheng, J. C., Nam, K. H., Li, J., & Chory, J. (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in Arabidopsis. *Development*, 131(21), 5341–5351. <https://doi.org/10.1242/DEV.01403>

- 9- Cederholm, H. M., Iyer-Pascuzzi, A. S., & Benfey, P. N. (2012a). Patterning the primary root in Arabidopsis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), 675–691. <https://doi.org/10.1002/wdev.49>
- 10- Ceserani, T., Trofka, A., Gandotra, N., & Nelson, T. (2009). VH1/BRL2 receptor-like kinase interacts with vascular-specific adaptor proteins VIT and VIK to influence leaf venation. *Plant Journal*, 57(6), 1000–1014. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2008.03742.X>
- 11- Chaiwanon, J., Wang, W., Zhu, J. Y., Oh, E., & Wang, Z. Y. (2016). Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. *Cell*, 164(6), 1257–1268. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.01.044>
- 12- Chaiwanon, J., & Wang, Z. Y. (2015). Spatiotemporal brassinosteroid signaling and antagonism with auxin pattern stem cell dynamics in Arabidopsis roots. *Current Biology*, 25(8), 1031–1042. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.046>
- 13- Chow, C. N., Lee, T. Y., Hung, Y. C., Li, G. Z., Tseng, K. C., Liu, Y. H., Kuo, P. L., Zheng, H. Q., & Chang, W. C. (2019). PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1155–D1163. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1081>
- 14- Chung, Y., & Choe, S. (2013). The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in Arabidopsis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(6), 396–410. <https://doi.org/10.1080/07352689.2013.797856>
- 15- Clause, S. D., & Sasse, J. M. (1998). BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Arplant.49.1.427>, 49, 427–451. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.49.1.427>
- 16- Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 9, e0151. <https://doi.org/10.1199/TAB.0151>
- 17- Cole, R. A., McNally, S. A., & Fowler, J. E. (2014). Developmentally distinct activities of the exocyst enable rapid cell elongation and determine meristem size during primary root growth in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0386-0>
- 18- Cosgrove, DJ. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 2000 Sep 21; 407(6802), 321–326. doi: 10.1038/35030000. PMID: 11014181

- 19- Cosgrove, D. J. (1997). ASSEMBLY AND ENLARGEMENT OF THE PRIMARY CELL WALL IN PLANTS. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Cellbio.13.1.171*, 13, 171–201. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.13.1.171>
- 20- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005 6:11, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- 21- Cosgrove, D. J., & Jarvis, M. C. (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science*, 3(AUG), 32339. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2012.00204/BIBTEX>
- 22- Cuadrado-Pedetti, M. B., Rauschert, I., Sainz, M. M., Amorim-Silva, V., Botella, M. A., Borsani, O., & Sotelo-Silveira, M. (2021). *The Arabidopsis TETRATRICOPEPTIDE THIOREDOXIN-LIKE 1 Gene Is Involved in Anisotropic Root Growth during Osmotic Stress Adaptation.*
- 23- Cuadrado-Pedetti, Maria Belén. Tesis de maestría (2020).
- 24- Davis, J., Brandizzi, F., Liepman, A. H., & Keegstra, K. (2010). Arabidopsis mannan synthase CSLA9 and glucan synthase CSLC4 have opposite orientations in the Golgi membrane. *The Plant Journal*, 64(6), 1028–1037. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2010.04392.X>
- 25- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2007). Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology*, 17(8), 678–682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- 26- Depuydt, S., & Hardtke, C. S. (2011). Hormone Signalling Crosstalk in Plant Growth Regulation. *Current Biology*, 21(9), R365–R373. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.03.013>
- 27- Dinneny, J. R. (2019). Developmental Responses to Water and Salinity in Root Systems. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev-Cellbio-100617-062949*, 35, 239–257. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100617-062949>
- 28- Dinneny, J. R., Long, T. A., Wang, J. Y., Jung, J. W., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, S. M., Schiefelbein, J., & Benfey, P. N. (2008). Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science*, 320(5878), 942–945. <https://doi.org/10.1126/science.1153795>

- 29- Eapen, D., Barroso, M. L., Campos, M. E., Ponce, G., Corkidi, G., Dubrovsky, J. G., & Cassab, G. I. (2003). A no hydrotropic response Root Mutant that Responds Positively to Gravitropism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(2), 536–546. <https://doi.org/10.1104/PP.011841>
- 30- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., & Dinneny, J. R. (2016). Growing out of stress: The role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *Plant Cell*, 28(8), 1769–1782. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00182>
- 31- Fujioka, S., & Yokota, T. (2003). Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Arplant.54.031902.134921>, 54, 137–164. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.54.031902.134921>
- 32- Geng, Y., Wu, R., Wee, C. W., Xie, F., Wei, X., Chan, P. M. Y., Tham, C., Duan, L., & Dinneny, J. R. (2013). A Spatio-Temporal Understanding of Growth Regulation during the Salt Stress Response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(6), 2132. <https://doi.org/10.1105/TPC.113.112896>
- 33- Gigli-Bisceglia, N., Engelsdorf, T., Strnad, M., Vaahtera, L., Khan, G. A., Jamoune, A., Alipanah, L., Novák, O., Persson, S., Hejatko, J., & Hamann, T. (2018a). Cell wall integrity modulates arabidopsis thaliana cell cycle gene expression in a cytokinin-and nitrate reductase-dependent manner. *Development (Cambridge)*, 145(19). <https://doi.org/10.1242/dev.166678>
- 34- Gigli-Bisceglia, N., & Hamann, T. (2018). Outside-in control – does plant cell wall integrity regulate cell cycle progression? *Physiologia Plantarum*, 164(1), 82–94. <https://doi.org/10.1111/PPL.12744>
- 35- González-García, M. P., Conesa, C. M., Lozano-Enguita, A., Baca-González, V., Simancas, B., Navarro-Neila, S., Sánchez-Bermúdez, M., Salas-González, I., Caro, E., Castrillo, G., & del Pozo, J. C. (2023). Temperature changes in the root ecosystem affect plant functionality. *Plant Communications*, 4(3). <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100514>
- 36- 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(5), 849–859. <https://doi.org/10.1242/DEV.057331>

- 37- Gorgues, L., Li, X., Maurel, C., Martinière, A., & Nacry, P. (2022). Root osmotic sensing from local perception to systemic responses. In *Stress Biology* (Vol. 2, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00054-1>
- 38- 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*(5), 839–848. <https://doi.org/10.1242/DEV.061804>
- 39- Hetherington, F. M., Kakkar, M., Topping, J. F., & Lindsey, K. (2021). Gibberellin signaling mediates lateral root inhibition in response to K⁺-deprivation. *Plant Physiology*, *185*(3), 1198. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA093>
- 40- Höfte, H., & Voxeur, A. (2017). Plant cell walls. *Current Biology*, *27*(17), R865–R870. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.025>
- 41- Hu, Z., Xu, F., Guan, L., Qian, P., Liu, Y., Zhang, H., Huang, Y., & Hou, S. (2014). The tetratricopeptide repeat-containing protein slow green1 is required for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *65*(4), 1111–1123. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert463>
- 42- Jacobsen, S. E., Binkowski, K. A., & Olszewski, N. E. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis* (plant hormones/gibberellin response mutants). In *Plant Biology* (Vol. 93).
- 43- Jin, H. Y., & Xiao, C. (2018). An Integrated Polysome Profiling and Ribosome Profiling Method to Investigate In Vivo Translatome. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1712*, 1. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7514-3_1
- 44- Kesten, C., García-Moreno, Á., Amorim-Silva, V., Menna, A., Castillo, A. G., Percio, F., Armengot, L., Ruiz-Lopez, N., Jaillais, Y., Sánchez-Rodríguez, C., & Botella, M. A. (2022a). Peripheral membrane proteins modulate stress tolerance by safeguarding cellulose synthases. *Science Advances*, *8*(46). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABQ6971>
- 45- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., & Harter, K. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal*, *50*(2), 347–363. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2007.03052.X>
- 46- Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., Sun, Y., Burlingame, A. L., & Wang, Z. Y. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor

- kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology*, 11(10), 1254–1260. <https://doi.org/10.1038/ncb1970>
- 47- Koiwa, H., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (2006). Identification of plant stress-responsive determinants in arabidopsis by large-scale forward genetic screens. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1119–1128. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj093>
- 48- Kolb, E., Legué, V., & Bogeat-Triboulot, M. B. (2017). Physical root–soil interactions. *Physical Biology*, 14(6), 065004. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/AA90DD>
- 49- Kong, X., Liu, G., Liu, J., & Ding, Z. (2018). The Root Transition Zone: A Hot Spot for Signal Crosstalk. *Trends in Plant Science*, 23(5), 403–409. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2018.02.004>
- 50- Lakhssassi, N., Doblas, V. G., Rosado, A., del Valle, A. E., Posé, D., Jimenez, A. J., Castillo, A. G., Valpuesta, V., Borsani, O., & Botella, M. A. (2012a). The Arabidopsis tetratricopeptide thioredoxin-like gene family is required for osmotic stress tolerance and male sporogenesis. *Plant Physiology*, 158(3), 1252–1266. <https://doi.org/10.1104/PP.111.188920>
- 51- Li, J., & Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90(5), 929–938. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80357-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80357-8)
- 52- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- 53- Masson, P. H., Tasaka, M., Morita, M. T., Guan, C., Chen, R., & Boonsirichai, K. (2002). Arabidopsis thaliana: A Model for the Study of Root and Shoot Gravitropism. *The Arabidopsis Book*, 1(1), e0043. <https://doi.org/10.1199/tab.0043>
- 54- Menges, M., Samland, A. K., Planchais, S., & Murray, J. A. H. (2006). The D-Type Cyclin CYCD3;1 Is Limiting for the G1-to-S-Phase Transition in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(4), 893. <https://doi.org/10.1105/TPC.105.039636>
- 55- Miao, R., Wang, M., Yuan, W., Ren, Y., Li, Y., Zhang, N., Zhang, J., Kronzucker, H. J., & Xu, W. (2018). Comparative analysis of arabidopsis ecotypes reveals a role for brassinosteroids in root hydrotropism. *Plant Physiology*, 176(4), 2720–2736. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01563>

- 56- Miao, R., Yuan, W., Wang, Y., Garcia-Maquilon, I., Dang, X., Li, Y., Zhang, J., Zhu, Y., Rodriguez, P. L., & Xu, W. Low ABA concentration promotes root growth and hydrotropism through relief of ABA INSENSITIVE 1-mediated inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase 2. *Sci. Adv.* 2021 Mar 17; 7 (12): eabd4113. doi: 10.1126/sciadv.abd4113. PMID: 33731345; PMCID: PMC7968848
- 57- Mironova, V.V., Omelyanchuk, N.A., Wiebe, D.S. et al. Computational analysis of auxin responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* L. genome. *BMC Genomics* 15 (Suppl 12), S4 (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-S12-S4>
- 58- Murashige, T., & Skoog, F. (1962.). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant physiology*, 15, 473-497. doi: 10.1111
- 59- Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J. H., Holtan, H. E., Repetti, P. P., Galbraith, D. W., Girke, T., & Bailey-Serres, J. (2009). Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18843–18848. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0906131106>
- 60- Nguyen, K. H., Ha, C. Van, Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-González, M. A., Fujita, Y., Tran, U. T., Li, W., Tanaka, M., Seki, M., Schaller, G. E., Herrera-Estrella, L., & Tran, L. S. P. (2016). *Arabidopsis* type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), 3090–3095. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1600399113>
- 61- Novaković, L., Guo, T., Bacic, A., Sampathkumar, A., & Johnson, K. L. (2018). Hitting the Wall—Sensing and Signaling Pathways Involved in Plant Cell Wall Remodeling in Response to Abiotic Stress. *Plants* 2018, Vol. 7, Page 89, 7(4), 89. <https://doi.org/10.3390/PLANTS7040089>
- 62- Pacifici, E., Mambro, R. Di, Ioio, R. Dello, Costantino, P., & Sabatini, S. (2018). Acidic cell elongation drives cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *The EMBO Journal*, 37(16), 99134. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201899134>
- 63- Paredez, A. R., Somerville, C. R., & Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312(5779), 1491–1495. <https://doi.org/10.1126/science.1126551>
- 64- Pedersen, G. B., Blaschek, L., Frandsen, K. E. H., Noack, L. C., & Persson, S. (2023). Cellulose synthesis in land plants. *Molecular Plant*, 16(1), 206–231.

<https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2022.12.015/ATTACHMENT/F7BD7EB7-0568-484D-98EE-1FE7FB7E4342/MMC2.XLSX>

- 65- Perilli, S., & Sabatini, S. (2010). Analysis of root meristem size development. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 655, 177–187. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-765-5_12
- 66- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45>
- 67- Pont-Lezica R. F., McNALLY, J. G., & PICKARD, B. G. (1993). Wall-to-membrane linkers in onion epidermis: some hypotheses. *Plant, Cell & Environment*, 16(2), 111–123. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.1993.TB00853.X>
- 68- Prasad, B. D., Goel, S., & Krishna, P. (2010). Silico Identification of Carboxylate Clamp Type Tetratricopeptide Repeat Proteins in Arabidopsis and Rice As Putative Co-Chaperones of Hsp90/Hsp70. *PLoS ONE*, 5(9), 12761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012761>
- 69- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2002). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. In *Microbiol Mol Biol Rev* (Vol. 66, Issue 3). www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-
- 70- Refrégier, G., Pelletier, S., Jaillard, D., & Höfte, H. (2004). Interaction between Wall Deposition and Cell Elongation in Dark-Grown Hypocotyl Cells in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 135(2), 959–968. <https://doi.org/10.1104/PP.104.038711>
- 71- Rosado, A., Schapire, A. L., Bressan, R. A., Harfouche, A. L., Hasegawa, P. M., Valpuesta, V., & Botella, M. A. (2006). The Arabidopsis tetratricopeptide repeat-containing protein TTL1 is required for osmotic stress responses and abscisic acid sensitivity. *Plant Physiology*, 142(3), 1113–1126. <https://doi.org/10.1104/PP.106.085191>
- 72- Rowe, J. H., Topping, J. F., Liu, J., & Lindsey, K. (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *The New Phytologist*, 211(1), 225. <https://doi.org/10.1111/NPH.13882>
- 73- Rui, Y., & Dinneny, J. R. (2020). A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytologist*, 225(4), 1428–1439. <https://doi.org/10.1111/nph.16166>

- 74- Sainz, M. M., Filippi, C. V., Eastman, G., Sotelo-Silveira, J., Borsani, O., & Sotelo-Silveira, M. (2022). Analysis of Thioredoxins and Glutaredoxins in Soybean: Evidence of Translational Regulation under Water Restriction. *Antioxidants*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/antiox11081622>
- 75- Salvi, E., Mambro, R. Di, & Sabatini, S. (2020). Dissecting mechanisms in root growth from the transition zone perspective. *Journal of Experimental Botany*, 71(8), 2390–2396. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa079>
- 76- Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, 6(12), 1–11. <https://doi.org/10.1186/GB-2005-6-12-242/FIGURES/8>
- 77- Sasse, J. M. (2003). Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(4), 276–288. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0062-3>
- 78- Saucedo, M., Ponce, G., Campos, M. E., Eapen, D., García, E., Luján, R., Sánchez, Y., & Cassab, G. I. (2012). An altered hydrotropic response (ahr1) mutant of Arabidopsis recovers root hydrotropism with cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3587–3601. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERS025>
- 79- Schapire, A. L., Valpuesta, V., & Botella, M. A. (2006). TPR Proteins in Plant Hormone Signaling. *Https://Doi.Org/10.4161/Psb.1.5.3491*, 1(5), 229–230. <https://doi.org/10.4161/PSB.1.5.3491>
- 80- Scheres, B., Benfey, P., & Dolan, L. (2002a). Root Development. *The Arabidopsis Book*, 1(1), e0101. <https://doi.org/10.1199/tab.0101>
- 81- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2019>
- 82- Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2(8), 755. <https://doi.org/10.1105/TPC.2.8.755>
- 83- Svolacchia, N., Salvi, E., & Sabatini, S. (2020). Arabidopsis primary root growth: let it grow, can't hold it back anymore! *Current Opinion in Plant Biology*, 57, 133–141. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2020.08.005>

- 84- Symons, G. M., & Reid, J. B. (2004). Brassinosteroids Do Not Undergo Long-Distance Transport in Pea. Implications for the Regulation of Endogenous Brassinosteroid Levels. *Plant Physiology*, 135(4), 2196. <https://doi.org/10.1104/PP.104.043034>
- 85- Symons, G. M., Ross, J. J., Jager, C. E., & Reid, J. B. (2008). Brassinosteroid transport. *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 17–24. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERM098>
- 86- Tanaka, K., Asami, T., Yoshida, S., Nakamura, Y., Matsuo, T., & Okamoto, S. (2005). Brassinosteroid homeostasis in Arabidopsis is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiology*, 138(2), 1117–1125. <https://doi.org/10.1104/PP.104.058040>
- 87- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G. T. S., & Bennett, M. J. (2012). Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends in Plant Science*, 17(6), 326–331. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2012.02.002>
- 88- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9(11), 1963. <https://doi.org/10.1105/TPC.9.11.1963>
- 89- Vriet, C., Russinova, E., & Reuzeau, C. (2012). Boosting Crop Yields with Plant Steroids. *The Plant Cell*, 24(3), 842. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.094912>
- 90- Weijers, D., Franke-van Dijk, M., Vencken, R. J., Quint, A., Hooykaas, P., & Offringa, R. (2001). An Arabidopsis minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development*, 128(21), 4289–4299. <https://doi.org/10.1242/dev.128.21.4289>
- 91- Williamson, L. C., Ribrioux, S. P. C. P., Fitter, A. H., & Ottoline Leyser, H. M. (2001). Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 126(2), 875. <https://doi.org/10.1104/PP.126.2.875>
- 92- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS One*, 2(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000718>
- 93- Xie M, Chen H, Huang L, O'Neil RC, Shokhirev MN, Ecker JR. A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nat Commun*. 2018 Apr 23;9(1):1604. doi: 10.1038/s41467-018-03921-6. Erratum in: *Nat Commun*. 2018 May 22;9(1):2075. Erratum in: *Nat Commun*. 2023 Sep 26;14(1):5988. PMID: 29686312; PMCID: PMC5913131.

- 94- Xie, L., Yang, C., & Wang, X. (2011). Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 62(13), 4495. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERR164>
- 95- Xin, P., Schier, J., Šefrnová, Y., Kulich, I., Dubrovsky, J. G., Vielle-Calzada, J. P., & 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. *Plant Journal*, 112(4), 946–965. <https://doi.org/10.1111/tpj.15980>
- 96 -Yang, Y., Sage, T. L., Liu, Y., Ahmad, T. R., Marshall, W. F., Shiu, S. H., Froehlich, J. E., Imre, K. M., & Osteryoung, K. W. (2011). Clumped chloroplasts 1 is required for plastid separation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(45), 18530–18535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106706108>
- 97- Yoneda, A., Ohtani, M. O., Katagiri, D., Hosokawa, Y., & Demura, T. (2020). *Hechtian Strands Transmit Cell Wall Integrity Signals in Plant Cells*.
- 98- Yuan, T. T., Xiang, Z. X., Li, W., Gao, X., & Lu, Y. T. (2021). Osmotic stress represses root growth by modulating the transcriptional regulation of PIN-FORMED3. *New Phytologist*, 232(4), 1661–1673. <https://doi.org/10.1111/NPH.17687>
- 99- Zanetti, M. E., Chang, I.-F. F., Gong, F., Galbraith, D. W., Bailey-Serres, J., Zanetti, M. E., Chang, I.-F. F., Gong, F., Galbraith, D. W., & Bailey-Serres, J. (2005). Immunopurification of Polyribosomal Complexes of Arabidopsis for Global Analysis of Gene Expression 1[w]. *Plant Physiology*, 138(2), 624. <https://doi.org/10.1104/PP.105.059477>
- 100 - Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 251–272. <https://doi.org/10.1111/JIPB.13055>
- 101- Zhu, J., Sae-Seaw, J., & Wang, Z.-Y. (2013). Brassinosteroid signalling. *Development*, 140(8), 1615–1620. <https://doi.org/10.1242/DEV.060590>

Cibergrafía

Página: BioRender

Link: <https://www.biorender.com/>

Anexo

Nota 1. Esterilización de materiales para realizar el medio con gradiente osmótico. Es importante mencionar que si bien el gradientómetro es de vidrio y por tanto autoclavable, no así las placas verticales de acrílico donde se genera el gradiente. Estas últimas se esterilizaron con 70% etanol durante 20 minutos, se secaron con gases estériles y se las expuso a luz UV durante 15 minutos. Posteriormente se generó el medio de cultivo de gradiente osmótico en una cámara de flujo laminar en estas placas de acrílico y se traspasó con ayuda de una espátula (de 10 cm de ancho) estéril a las placas de Petri estériles definitivas. Por las razones antes mencionadas trabajamos en condiciones de semi-esterilidad por periodos largos (aproximadamente 25 días) por lo que se monitoreó diariamente las placas, a efectos de quitar contaminaciones que pudieran aparecer.

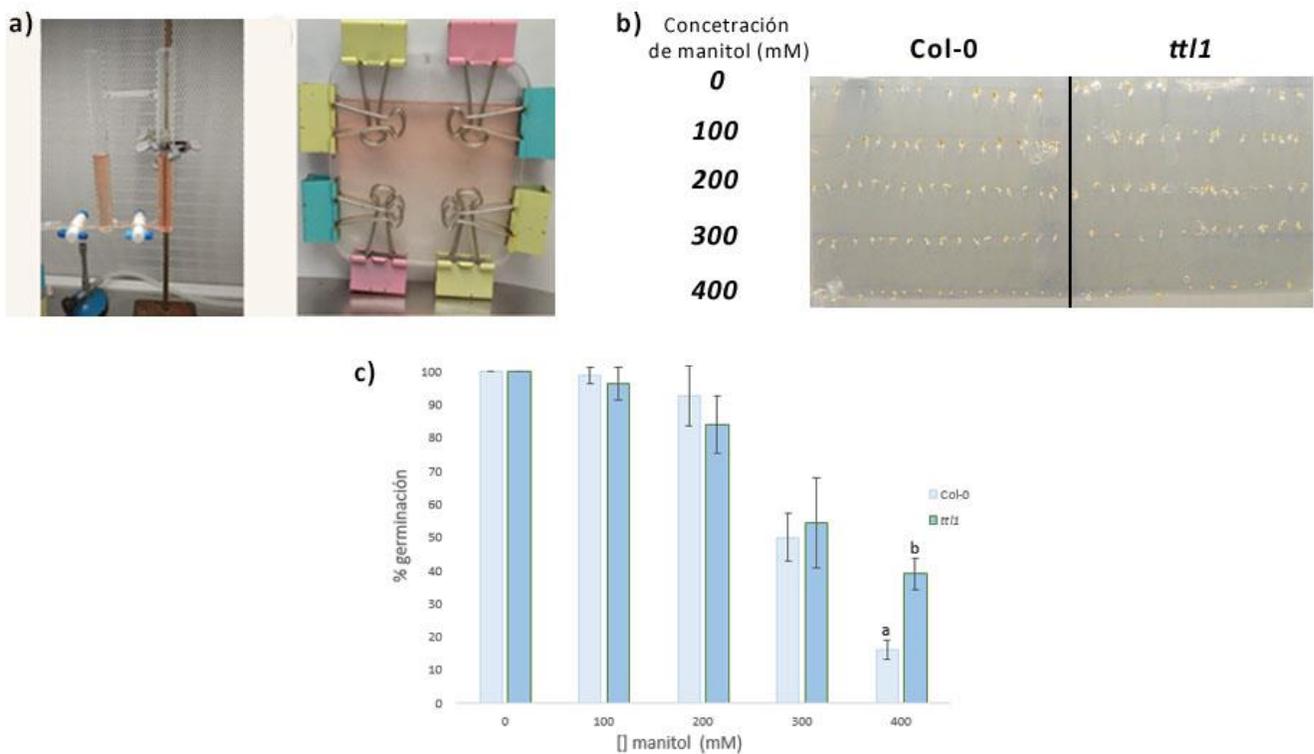


Figura 1. Verificación de la correcta formación del gradiente osmótico. En **a** método cualitativo a través del uso del colorante Rojo Congo en el medio sin manitol. En **b** se ve la imagen del ensayo de germinación de semillas en el medio con gradiente osmótico. En **c** se muestra la representación gráfica del porcentaje de germinación de las semillas de Col-0 y *ttl1* resultado del crecimiento en b. Se consideraron cuatro

réplicas biológicas, con un $n \geq 19$ semillas en cada franja de concentración de manitol por cada genotipo. Las letras indican significancia estadística mediante Test de Student con un p value < 0.05 .

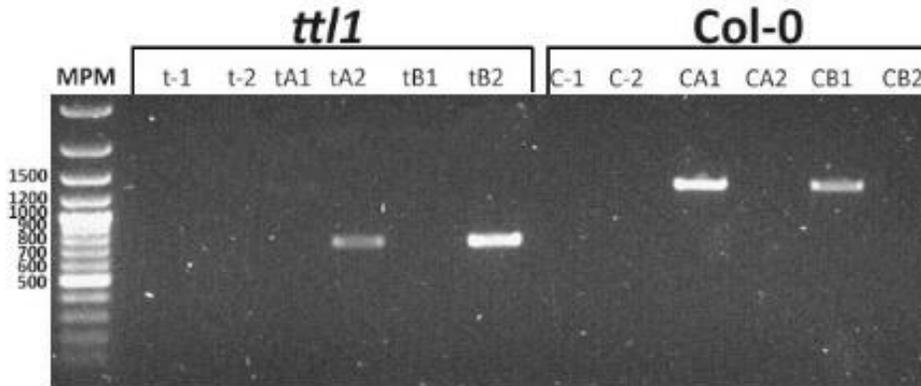


Figura 2. Perfil de bandas resultante de la genotipación de *ttl1*. Las letras t y C corresponden a *ttl1* y Col-0 respectivamente. Se evaluaron dos plantas por cada genotipo (A y B). t- y C- son controles negativos (PCR sin ADN genómico). Los “1” indican que el par de primers utilizado en la PCR fue el de amplificación de *TTL1*, mientras que los “2” indican que el par de primers utilizado en la PCR fue el de LB SALK y el rv de *TTL1*. El amplicón esperado en Col-0 es de 1261pb en el carril CA1 y CB1, que corresponden al gen *TTL1* sin la inserción del T-DNA (homocigosis para *TTL1*). La homocigosis para *ttl1* se corrobora al visualizar una banda de aproximadamente 750pb en los carriles tA2 y tB2. Si hubiera existido heterocigosis en alguna planta de *ttl1*, se deberían ver bandas en ambos carriles t.1 y t.2. El MPM utilizado fue el GenRuler de 100bp plus.

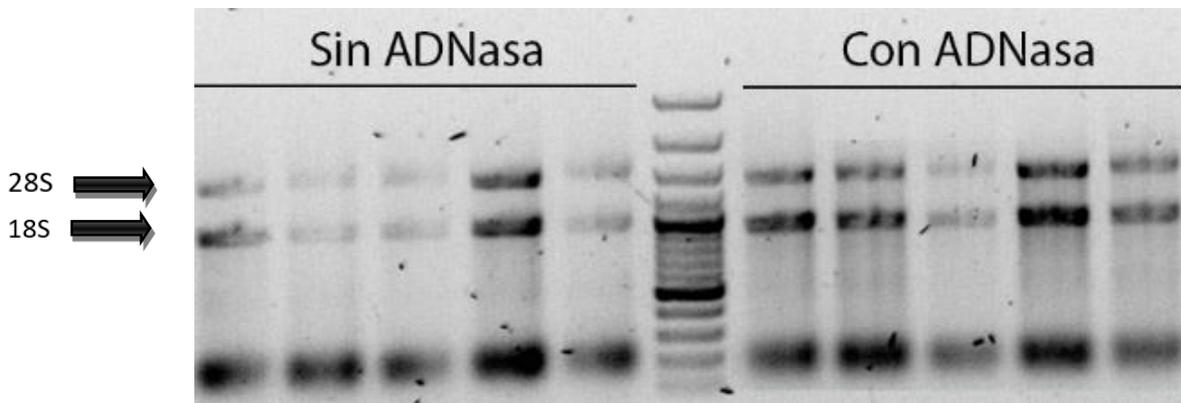


Figura 3. Perfil de bandas obtenido a partir de una extracción de ARN de raíces de Arabidopsis con TRIzol. En la electroforesis se corrieron las muestras de ARN obtenidas antes y después del tratamiento con ADNasa. Es posible visualizar los ARN ribosomales 28S y 18S. Se utilizó el GenRuler 100pb plus como MPM

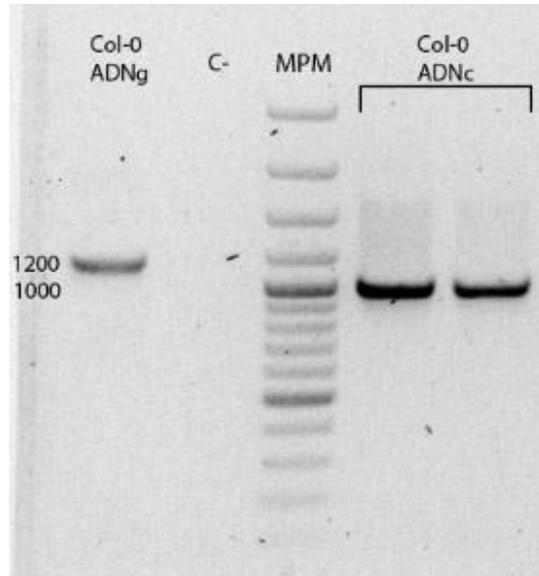


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% resultante de una amplificación por PCR del gen *ACTINA 8* utilizando ADN genómico (ADNg) o ADNc de Col-0 como molde a amplificar. Es posible distinguir diferentes tamaños entre las bandas de amplificación de ambos moldes (1200pb para el ADNg y 1000pb para el ADNc). Se utilizó el GenRuler 100pb plus como MPM

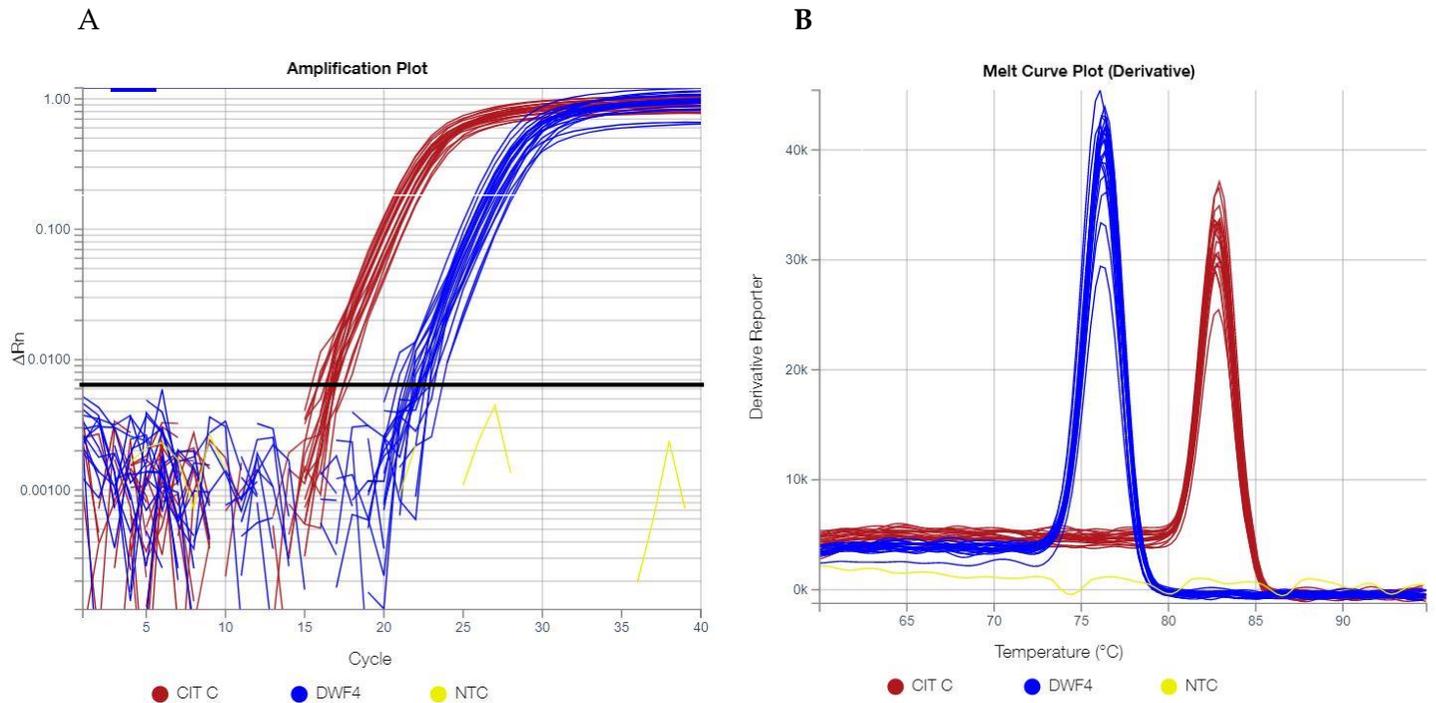


Figura 5. En **A** se muestra un ejemplo de las curvas de amplificación obtenidas en una corrida de RT-qPCR y en **B** se muestra un ejemplo de curva de disociación. Las curvas rojas corresponden al gen *RELACIONADO A CITOCROMO C OXIDASA*, las curvas azules al gen de biosíntesis de

brasinoesteroides *DWF4* y la curva amarilla corresponde al control negativo del experimento. La recta negra indica el umbral o threshold considerado.

Tabla 1. Componentes del medio Murashige and Skoog (Murashige & Skoog, 1962)

<i>Macronutrientes</i>	g/L	<i>Micronutrientes</i>	mg/L
<i>NH₄NO₃</i>	1.64	H ₃ BO ₃	6
<i>KNO₃</i>	1.90	CaCl ₂	0.023
<i>KH₂PO₄</i>	0.168	CuSO ₄	1.59
<i>CaCl₂</i>	0.44	Na ₂ EDTA	37.22
<i>MgSO₄ 7H₂O</i>	0.37	FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
		KI	0.83
		MnSO ₄ H ₂ O	15.1
		Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.24
		ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.628

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en las reacciones de PCR a tiempo final.

Primer	Secuencia primer	Función
TTL1DPCRF	5'- TGG ACT CAC CAC CAC CAC TA-3'	Genotipación de <i>ttl1</i>
TTL1DPCRR	5'- ACC GAG TCT GCG AAC AAG AT-3'	
LB SALK	5' TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G-3'	
MS1	5' GCG GTT TTC CCC AGT GTT GTT G-3'	Amplificación de <i>Actina8</i>
MS2	5' TGC CTG GAC CTG CTT CAT CAT ACT-3'	
Fw_HF-TAG	5'- CAC CAT GGG ACA TCA CCA TCA TCA CC- 3'	Verificación de presencia de RPL18 en las líneas 35s:: <i>HF-RPL18</i> y <i>ttl1</i> x 35s:: <i>HF-RPL18</i>
3' OCS_Rev	5' CAT GCG ATC ATA GGC GTC TCG-3'	

Tabla 3. Componentes del buffer TAE 50X

Componentes	Concentración
Tris base	242 g/L
Ácido acético glacial	57.1 mL/L
EDTA (pH 8.0)	100mL/L

Tabla 4. Eficiencia de los primers utilizados en los ensayos de RT-qPCR. Los juegos de primers que se utilizan para calcular un fold-change y poseen una eficiencia por fuera del rango óptimo entre 90%-110% (marcados en amarillo), necesitan una corrección matemática adicional basada en el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Gen que amplifica	Eficiencia
<i>RELACIONADO CITOCROMO C OXIDASA</i>	101%
<i>CESA1</i>	105%
<i>CESA3</i>	97%
<i>CESA6</i>	99%
<i>TTL1</i>	95%
<i>TTL3</i>	102%
<i>TTL4</i>	109%
<i>PECTATO LIASA12</i>	108%
<i>CSLA9</i>	83%
<i>EXPA1</i>	98%
<i>AHA1</i>	100%
<i>CYCD3:1</i>	95%
<i>AHA2</i>	97%
<i>BES1</i>	93%
<i>BAK1</i>	91%

<i>DWF4</i>	92%
<i>CPD</i>	87%

Tabla 5. Composición de buffer de extracción proteínas

Componente
Tris-HCl 50 mM pH 7.4
EDTA 1mM
Tritón 0,05%
Inhibidor de proteasa (cOmplete™ Mini, EDTA-free, n° catálogo: 118361700001): 1 pastilla/10 mL de buffer

Tabla 6. Composición buffer de muestra para proteínas (5X)

Componente
Tris- HCl 60mM pH 6.8
2 β-mercaptoetanol 14.4 mM
Glicerol 25%
Azul de bromofenol 0,1% (Millipore, n° catálogo: 108122)
SDS 0.1%

Tabla 7A. Componentes de la solución necesarios para preparar dos geles de corrida 12% a utilizar en un SDS-PAGE (15 mL finales)

Componente	Volumen (mL)
H ₂ O	4.9
30% mix de acrilamida (Acrylamide-bis ready-to-use solution 30% (37.5:1). Millipore, N° catálogo: 100639)	6.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	3.8
10% SDS	0.15

10% APS	0.15
TEMED	0.006

Tabla 7B. Componentes de la solución necesarios para preparar dos geles de carga a utilizar en un SDS-PAGE (5 mL finales)

Componente	Volumen (mL)
H ₂ O	3.4
30% mix de acrilamida	0.83
1.5 M Tris (pH 6.8)	0.63
10% SDS	0.05
10% APS	0.05
TEMED	0.005

Tabla 8. Composición del buffer de corrida utilizado en el SDS-PAGE (5X)

Componente
Tris 25 mM (sin ajuste pH)
Glicina 192 mM
SDS 0.1%

Tabla 9. Composición solución commassie

Componentes
0.1% Azul brillante R-25 (Sigma, n° de catálogo: B0149)
10% ácido acético
50% metanol
40% H ₂ O

Tabla 10. Composición de la solución de desteñido (1L)

Componente	Volumen (mL)
H ₂ O	450
Metanol	450
Ácido acético	100

Tabla 11A. Composición buffer de transferencia (8X)

Componente
Tris 25 mM
Glicina 192 mM

Tabla 11B. Composición buffer de transferencia (1X)

Componente	Volumen (mL)
Buffer transferencia (8X)	100
H ₂ O	700
Metanol	200

Tabla 12. Composición de solución rojo Ponceau

Componentes
1% ácido acético
0.5% rojo Ponceau (Sigma, n° de catálogo: P-3504) disuelto en H ₂ O destilada

Tabla 13. Composición del buffer TBS (10X)

Componente
Tris base 0.2 M
NaCl 1.5 M