



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola d'Enginyeria Agroalimentària
i de Biosistemes de Barcelona



Regulació dels factors de transcripció de resposta a l'etilè (ERFs) per conjugació de SUMO

Treball final de grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autora:
Paula Lebrato Rangel

Tutora Acadèmica:
Dra. Lidia Lozano Luis

Tutores externes:
Dra. L. Maria Lois, Diana Fuertes

Resum

Les plantes, durant tot el seu cicle de vida, s'enfronten a nombrosos reptes en el desenvolupament, incloent fer front a diferents estressos abiòtics i biòtics. Entre els diversos mecanismes de regulació i defensa de les plantes, la modificació posttraduccional de les proteïnes anomenada SUMOilació és un dels més importants. Tot i que es coneix que està implicada en diverses funcions cel·lulars (com la transcripció, la traducció i l'estabilitat del genoma) i de l'organisme (com la resposta a diferents estressos), encara queden moltes funcions regulades per la SUMOilació per entendre.

El present treball es centra a estudiar la importància de la regulació mitjançant conjugació de SUMO de tres factors de transcripció de resposta a l'hormona etilè (*ERFs*, de l'anglès ethylene-responsive transcription factor). Els *ERFs* participen en la resposta induïda per l'hormona etilè i controlen el desenvolupament de la planta i les respostes a alguns estressos, i la seva activitat es pot veure afectada per la SUMOilació. En aquest estudi s'han fet un seguit d'experiments per analitzar si existeixen diferències fenotípiques entre plantes d'*Arabidopsis thaliana* silvestre i sobreexpresores dels gens *ERF2*, *ERF6* i *ERF104* en les seves formes SUMOilables o no, i plantes mutants de pèrdua de funció d'aquests gens. L'anàlisi fenotípic s'ha realitzat tant en absència d'estrès com en presència de diferents tipus d'estrès com ara salí, osmòtic, presència d'etilè o de metalls pesants.

Amb aquest estudi hem determinat que en absència d'estrès els gens *ERF2*, *6* i *104* no regulen ni el desenvolupament ni la capacitat fotosintètica de les plantes. En condicions d'estrès, sí que vam determinar el paper que juguen els *ERFs* d'aquest estudi. Es conclou que per exposició d'etilè els gens *ERF2*, *6* i *104* no tenen un efecte sobre l'allargament de l'hipocòtil. Amb metalls pesants trobem com la SUMOilació d'*ERF2* sí que confereix tolerància als metalls coure, cadmi i bor, la SUMOilació d'*ERF6* i *104* confereix únicament tolerància al coure i la SUMOilació d'*ERF104* afecta negativament la tolerància al cadmi. Per últim, els *ERFs* mencionats anteriorment no van resultar tenir cap paper en la tolerància a l'estrès salí o osmòtic.

Resumen

Las plantas, durante todo su ciclo de vida, se enfrentan a numerosos retos en el desarrollo, incluyendo hacer frente a distintos estreses abióticos y bióticos. Entre los distintos mecanismos de regulación y defensa de las plantas, la modificación postraducciona l de las proteínas llamada SUMOilación es uno de los más importantes. Aunque se conoce que está implicada en varias funciones celulares (como la transcripción, la traducción y la estabilidad del genoma) y del organismo (como la respuesta a diferentes estreses), todavía quedan muchas funciones reguladas por la SUMOilación por comprender.

El presente trabajo se centra en estudiar la importancia de la regulación mediante conjugación de SUMO de tres factores de transcripción de respuesta a la hormona etileno (*ERFs*, del inglés ethylene-responsive transcription factor). Los *ERFs* participan en la respuesta inducida por la hormona etileno y controlan el desarrollo de la planta y las respuestas a algunos estreses, y su actividad puede verse afectada por la SUMOilación. En este estudio se han realizado una serie de experimentos para analizar si existen diferencias fenotípicas entre plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestre y sobreexpresoras de los genes *ERF2*, *ERF6* y *ERF104* en sus formas SUMOilables o no, y plantas mutantes de pérdida de función de estos genes. El análisis fenotípico se ha realizado tanto en ausencia de estrés como en presencia de distintos tipos de estrés como salino, osmótico, presencia de etileno o de metales pesados.

Con este estudio hemos determinado que en ausencia de estrés los genes *ERF2*, *6* y *104* no regulan ni el desarrollo ni la capacidad fotosintética de las plantas. En condiciones de estrés, sí que hemos determinado el papel que juegan los *ERFs* de este estudio. Se concluye que por exposición de etileno los genes *ERF2*, *6* y *104* no tienen un efecto sobre el alargamiento del hipocótilo. Con metales pesados encontramos como la SUMOilación de *ERF2* sí confiere tolerancia a los metales cobre, cadmio y boro, la SUMOilación de *ERF6* y *104* confiere únicamente tolerancia al cobre y la SUMOilación de *ERF104* afecta negativamente a la tolerancia al cadmio. Por último, los *ERFs* mencionados anteriormente no resultaron tener ningún papel en la tolerancia al estrés salino u osmótico.

Abstract

Plants, throughout their life cycle, are subjected to numerous challenges in development such as biotic or abiotic stress. Among different regulation and defense mechanisms of plants, the post-translational modification of proteins called SUMOylation is one of the most important. Although it is known that it is involved in several cellular functions (such as transcription, translation and genome stability) and in the organism (such as the response to different stresses), there are still many functions regulated by SUMOylation to be understood.

The present thesis focuses on the study of the importance of the SUMO conjugation-based regulation of three ethylene-responsive transcription factors (*ERFs*). *ERFs* take part in the ethylene-induced response aside from controlling plant development and stress response, and their activity can also be affected by SUMOylation. In this study, multiple tests have been conducted in order to analyze the possible phenotypic differences between *Arabidopsis thaliana* wild-type and overexpressed of the genes *ERF2*, *ERF6* and *ERF104* plants in their SUMOylated forms or not, and loss-of-function mutant plants for these genes. A phenotypic analysis has been carried out in both absence and presence of multiple types of stress such as saline, osmotic and the presence of ethylene or heavy metals.

The study has concluded that, in the absence of stress, *ERF2*, *6*, *104* genes do not regulate either the plants development or its photosynthetic capacity. In contrast, under stress conditions, it has been proved that *ERFs* from this study played an important role. This is, these genes not having any effect on hypocotyl elongation due to ethylene exposure. On the other hand, in presence of heavy metals SUMOylation of *ERF2* does not provide tolerance to copper, cadmium and boron. Moreover, SUMOylation of *ERF6* and *104* only confers tolerance to copper. Also, SUMOylation of *ERF104* negatively affects tolerance to cadmium. Finally, the previously mentioned *ERFs* did not appear to have any role in saline or osmotic stress tolerance.

Índex

Índex de figures	8
Índex de taules	10
Símbols i acrònims	11
Glossari	13
Agraïments	14
1. Introducció	15
1.1. Les modificacions postraduccionals	15
1.2. La ubiquitina, la família de proteïnes similars a la ubiquitina (UBLs) i la proteïna Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)	16
1.3. La SUMOilació	17
1.4. Implicacions biològiques de SUMO en plantes	19
1.4.1. La SUMOilació i les respostes de les plantes a l'estrès abiòtic	20
1.4.2. La SUMOilació i les respostes de les plantes a l'estrès biòtic	20
1.5. Factors de transcripció de resposta a l'etilè.	21
1.6. Arabidopsis thaliana com a planta model	22
1.7. Antecedents	23
2. Objectius	28
3. Materials i mètodes	29
3.1. Material vegetal	29
3.1.1. Plantes silvestres	29
3.1.2. Plantes trangèniques	29
3.2. Cultiu de plantes en cambres de creixement	31
3.2.1. Sembra i substrat de cultiu vegetal	31
3.2.2. Condicions de cultiu	31
3.3. Cultiu in vitro de plantes	32
3.3.1. Sembra i medi de cultiu in vitro	32
3.3.2. Condicions de cultiu in vitro	34
3.4. Metodologies	34
3.4.1. Assaig de fenotipat de les plantes en condicions normals (absència d'estrès)	34
3.4.2. Assaigs de fenotipat de les plantes a la resposta a l'estrès	36
3.4.3. Tractament de dades	37

4. Resultats	38
4.1 Anàlisi del fenotip de plantes amb diferents nivells d'expressió dels gens ERFs i SUMOilables o no en condicions normals (absència d'estrès)	38
4.2 Anàlisi del fenotip de plantes amb diferents nivells d'expressió dels gens ERFs i SUMOilables en condicions d'estrès	43
5. Discussió	51
6. Conclusions	54
7. Bibliografia	55

- Índex de figures

Figura 1. Representació de l'estructura 3D de les proteïnes humanes ubiquitina, SUMO1 i SUMO2/3.

Figura 2. El cicle de la SUMOilació i deSUMOilació.

Figura 3. Esquema de les implicacions biològiques de SUMO en plantes.

Figura 4: Nivells d'expressió relatius del gen *ERF2* respecte al gen de la *UBIQUITINA (UBC)* en diferents línies SUMOilables (native) i no SUMOilables (SUMO deficient) sobreexpressores d'*ERF2*.

Figura 5: Nivells d'expressió relatius del gen *ERF6* respecte al gen de la *UBIQUITINA (UBC)* en diferents línies SUMOilables (native) i no SUMOilables (SUMO deficient) sobreexpressores d'*ERF6*.

Figura 6: Nivells d'expressió relatius del gen *ERF104* respecte al gen de la *UBIQUITINA (UBC)* en diferents línies SUMOilables (native) i no SUMOilables (SUMO deficient) sobreexpressores d'*ERF104*.

Figura 7: Exemple de safata per a l'assaig de fenotipat de les plantes en absència d'estrès.

Figura 8: Anàlisi de l'àrea relativa de la roseta.

Figura 9: Anàlisi de la longitud relativa de la planta.

Figura 10: Anàlisi de longitud relativa de la l'arrel.

Figura 11: Anàlisi relativa de l'inici de la floració.

Figura 12: Anàlisi de la capacitat fotosintètica.

Figura 13: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant l'etilè.

Figura 14: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant coure en plantes sobreexpressores d'*ERF2*.

Figura 15: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant coure en plantes sobreexpressores d'*ERF104*.

Figura 16: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant coure en plantes sobreexpressores d'*ERF6*.

Figura 17: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant cadmi en plantes sobreexpressores

d'*ERF2*.

Figura 18: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant cadmi en plantes sobreexpressores d'*ERF104*.

Figura 19: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant bor en plantes sobreexpressores d'*ERF2*.

Figura 20 :Anàlisi de la resposta de l'estrès davant NaCl en plantes sobreexpressores d'*ERF104*

- **Índex de taules**

Taula 1. Resum del material vegetal utilitzat.

Taula 2. Tipus de compost afegits al medi, concentració estoc i concentracions finals de treball.

Taula 3 . Tractaments d'estrès realitzats en el present treball i respostes mesurades.

- Símbols i acrònims

ACC: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, àcid 1-aminociclopropà-1-carboxílic.

ADN: àcid desoxiribonucleic.

ARN: àcid ribonucleic.

ATP: adenosina trifosfat.

c/v: amb vitamines.

Col-0: columbia-0 / ecotip silvestre d'*Arabidopsis thaliana*.

EIN: ethylene-insensitive, insensible a l'etilè.

ERF: ethylene-responsive transcription factor, factor de transcripció de resposta l'etilè.

HR: hypersensitive response, resposta hipersensible.

JA: jasmonic-acid, àcid jasmonic.

K: aminoàcid Lisina.

LD: long-day conditions, condicions de dia llarg.

Milli-Q: aigua bidestil·lada-desionitzada.

MS: medi de cultiu de plantes *in vitro* Murashige i Skoog.

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns, patrons moleculars associats a patògens.

PCR: polymerase chain reaction, reacció en cadena de la polimerasa.

PTI: pAMP-Triggered immunity, Immunitat activada per PAMP.

PTM: post-translational modifications, modificacions postraduccionals.

ROS: reactive oxygen species, espècies reactives d'oxigen.

SAE1: subunitat petita de l'enzim activador de SUMO (E1).

SAE2: subunitat gran de l'enzim activador de SUMO (E1).

SUMO: small Ubiquitin-like Modifier.

T-DNA: transfer DNA, ADN de transferència.

UB: ubiquitina.

UBLs: ubiquitin-Like proteins, proteïnes semblants a la ubiquitina.

UFD: ubiquitin-fold domain, domini de la ubiquitina plegada.

UNITATS

L: litre, mL: mil·lilitre, μ L: microlitre.

M: Molar, mM: millimolar, μ M: micromolar.

$^{\circ}$ C: graus centígrads

- Glossari

Abiòtic: Dit de l'estructura o el procés esdevingut sense la intervenció d'éssers vius.

Alifàtic: Compost orgànic que disposa d'una cadena oberta com estructura de les seves molècules.

Biòtic: Relatiu o pertanyent a la vida.

Element regulador en cis: Regions no codificants de l'ADN que regulen la transcripció dels gens propers.

Floral-dip: Mètode de transformació vegetal que consisteix en la immersió de les flors de plantes en un cultiu d'*Agrobacterium tumefaciens* que conté un transgen d'interès durant uns segons. Permet la transformació d'*Arabidopsis thaliana* sense haver de passar per cultiu *in vitro*.

Fosforilació: Procés químic en el qual s'incorpora d'un grup fosfat a una molècula.

Gens constitutius: També denominats gens de manteniment, en anglès *housekeeping*. Codifiquen proteïnes necessàries per al metabolisme bàsic cel·lular i es caracteritzen per tenir nivells d'expressió constant en totes les cèl·lules i condicions d'un mateix organisme.

Glicosilació: Procés químic en el qual s'afegeix un carbohidrat a una altra molècula.

Heterodimèric: Molècula formada per de dos monòmers diferents.

Homozigot: Dit de l'individu diploide els al·lels del qual són iguals per a un locus cromosòmic determinat.

In silico: Fet per ordinador o via simulació computacional.

Nitrosilació: Procés químic en el qual s'incorpora un grup covalent d'un fragment "nitrosil" d'òxid nítric en una altra molècula.

Patogen: Que causa malaltia.

Planta sobreexpresora: Planta que expressa un gen en nivells més elevats que la corresponent planta silvestre.

Planta transgènica: Planta que conté un transgen. Planta que introdueix un o diversos gens nous per modificar la funció d'un gen propi.

Senescència: Procés d'envelliment.

Transesterificació: Intercanvi d'un grup orgànic R d'un èster amb el grup orgànic R d'un alcohol.

- **Agraïments**

Aquest treball no hauria estat possible sense l'ajuda de diverses persones que han estat present al llarg del seu desenvolupament. Ha sigut un viatge llarg, no pas fàcil, però ple d'aprenentatge tan personal com professionalment, per això m'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que han estat al meu costat.

En primer lloc, voldria agrair a la Dra. L. Maria Lois per l'oportunitat de formar part d'un laboratori i d'un grup d'excel·lència com el seu. També vull agrair als companys veïns del Riechmann lab, han fet que l'estança al CRAG sigui excel·lent. En segon lloc, agrair a la Diana Fuertes, pel seu acompanyament i supervisió en tot moment. Gràcies per tots els consells i ajudes que m'has donat en el meu primer pas per un laboratori, per la teva amabilitat i sobretot per haver-me transmès els coneixements científics de la millor manera. Seràs una gran doctora. D'altra banda, també volia agrair al Dr. Jordi Pérez, moltes gràcies per tots els consells i per haver-me transmès que significa tenir passió per la ciència. Finalment, vull agrair a la meua companya i sobretot amiga, Paloma Álvarez. Aquest viatge no hauria estat el mateix sense tu.

1. Introducció

1.1. Les modificacions postraduccionals

El dogma central de la biologia molecular afirma que la informació genètica flueix en una sola direcció: de l'ADN a l'ARN i d'aquest a proteïna (Crick, 1970). Les proteïnes són polímers formats per la unió d'aminoàcids ordenats específicament que adopten una estructura tridimensional que permet diferenciar unes molècules d'unes altres i d'aquesta manera desenvolupar funcions diferents.

A la regulació de la síntesi d'aquestes molècules se l'anomena regulació de l'expressió gènica o genètica. Als organismes que es troben molt dependents de les condicions del seu entorn, la regulació de l'expressió gènica i per tant la producció de proteïnes ha de permetre'ls respondre a les modificacions mediambientals amb l'objectiu de garantir la seva supervivència. La utilització d'una part o una altra de la seva dotació genètica els hi facilitarà adaptar-se adequadament al seu entorn (Merino Pérez et al., 2020).

Les proteïnes són les efectores de gran part de les funcions fisiològiques a l'interior de les cèl·lules i el seu paper en el medi extracel·lular també és fonamental. L'estructura i funció de les proteïnes no està únicament regulada per la seva síntesi o degradació, sinó també per canvis químics que modifiquen les proteïnes un cop sintetitzades. Aquestes variacions és coneixen com modificacions postraduccionals (també conegudes com PTM de les sigles en anglès de post-translational modifications) i són produïdes generalment per enzims especialitzats amb posterioritat a la biosíntesi d'una proteïna. Aquestes modificacions poden tenir lloc mitjançant l'addició de petites molècules com grups fosfat o acetil, glúcids, lípids, ubiquitina, etc., existint més de 200 tipus de PTMs diferents (Jensen, 2006). Així doncs, qualsevol proteïna del proteoma d'un organisme pot modificar-se després o durant la traducció. D'aquesta manera, les PTMs incrementen el repertori de proteïnes cel·lulars i, en conseqüència, generen una gran font de variació més enllà de la que ve determinada per l'ADN o la variació dels nivells d'ARN (Kerscher et al. 2006). A més, les PTMs són importants per regular l'activitat, l'estabilitat i la localització intracel·lular de les proteïnes (Bayer et al., 1998).

Així doncs, entendre com, quan i el perquè té lloc aquesta modulació proteica és essencial per comprendre el funcionament dels organismes.

1.2. La ubiquitina, la família de proteïnes similars a la ubiquitina (UBLs) i la proteïna *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO)

La ubiquitina va ser la primera proteïna identificada com a modificador posttraduccional en eucariotes i està present en diferents teixits i organismes. Des del seu descobriment, tota una família sencera de petites proteïnes relacionada amb aquesta ha sigut descrita i nomenada com "Ubiquitin like proteins" (UBLs). La ubiquitina és el representant més destacat dels modificadors post-traduccional amb estructura conservada entre les espècies. La seva unió és un procés reversible i té lloc mitjançant una cascada enzimàtica que es coneix com a ubiquitinació. La unió de la ubiquitina als seus substrats permet la degradació d'aquests, regulant d'aquesta manera la vida mitjana de les proteïnes (Kerscher et al., 2006).

La proteïna SUMO, de l'anglès *S*mall *U*biquitin-like *M*odifier, és un petit polipèptid format per uns cent aminoàcids que, des de que va ser descobert l'any 1996, s'ha convertit en un membre molt important de modificadors postranscripcionals.

Tot i que SUMO i la ubiquitina tan sols presenten un 18% de similitud de la seva seqüència d'aminoàcids, comparteixen la mateixa estructura terciària ben definida denominada *ub-Fold* (UFD) caracteritzada per un plegament de fulles β entorn d'una hèlix α (plec $\beta\beta\alpha\beta\beta\beta$ típic) i un C-terminal doble de glicerina (Bayer et al., 1998) (Figura 1).

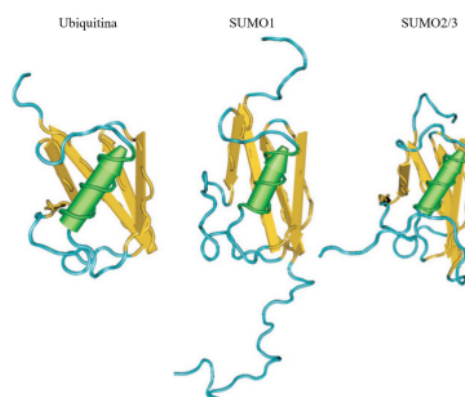


Figura 1. Representació de l'estructura 3D de les proteïnes humanes ubiquitina, SUMO1 i SUMO2/3. (Adaptada de Martin et al., 2007)

Tot i que SUMO i ubiquitina tenen una estructura similar, difereixen en la seva funció. La ubiquitina majoritàriament està relacionada amb el control de la vida mitjana de les proteïnes. En canvi, la funció de la proteïna SUMO és molt variable i dependent a la proteïna modificada. Algunes de les modificacions de proteïnes per la conjugació de la proteïna SUMO han estat ben caracteritzades i existeixen diversos estudis que mostren la seva vinculació a diferents processos com el manteniment i la remodelació de la cromatina, la reparació i replicació de l'ADN, el transport subcel·lular, la regulació transcripcional i la senyalització cel·lular (Heun, 2007).

1.3. La SUMOilació

La SUMOilació es un procés mecànicament similar al de conjugació de la ubiquitina. De forma anàloga al procés d'ubiquitinació, la conjugació de SUMO amb proteïnes diana implica l'acció seqüencial dels enzims activadors (E1), conjugadors (E2) i lligases (E3) (Lois et al., 2003). Aquest procés consta de quatre etapes: la maduració, l'activació, la conjugació, la lligació i la desSUMOilació (Figura 2). Primerament, SUMO és sintetitzada com proteïna precursora que necessita ser processada per exposar el motiu C-terminal (Glicina-Glicina, Gly-Gly) comunament conservat. Aquest pas es mediat per les ULPs (*Ubiquitin-like proteases*, proteases de tipus cisteïna específiques de SUMO) (Johnson & Gupta, 2001). L'activació de SUMO comença amb una reacció dependent d'ATP catalitzada per l'enzim activador heterodimèric E1 (SAE1 / SAE2) que dona com a resultat la proteïna SUMO adenilada. Seguidament, SUMO és transferida a la cisteïna catalítica present en l'enzim conjugador E2 mitjançant una reacció de transesterificació. En la tercera reacció, SUMO és unida a la proteïna diana mitjançant un enllaç isopeptídic entre l'extrem C-terminal del modificador i el grup ϵ -amino d'un residu de Lisina en el substrat.

En la majoria dels casos la SUMOilació té lloc en un residu de lisina contingut en la seqüència consens $\Psi KxE/D$ (on Ψ és un residu alifàtic (Isoleucina, Valina o Leucina); K : lisina; X: qualsevol aminoàcid; E/D: glutamat o aspàrtic) (Bernier-Villamor et al., 2002). Aquest pas final és facilitat per l'enzim lligasa E3 que interactua amb SUMO transferida des de l'enzim E2 fins al substrat. L'última etapa del procés és la desSUMOilació, fent de la SUMOilació un procés reversible.

Aquesta etapa de desconjugació és catalitzada per la mateixa família de proteases que duen a terme la maduració.

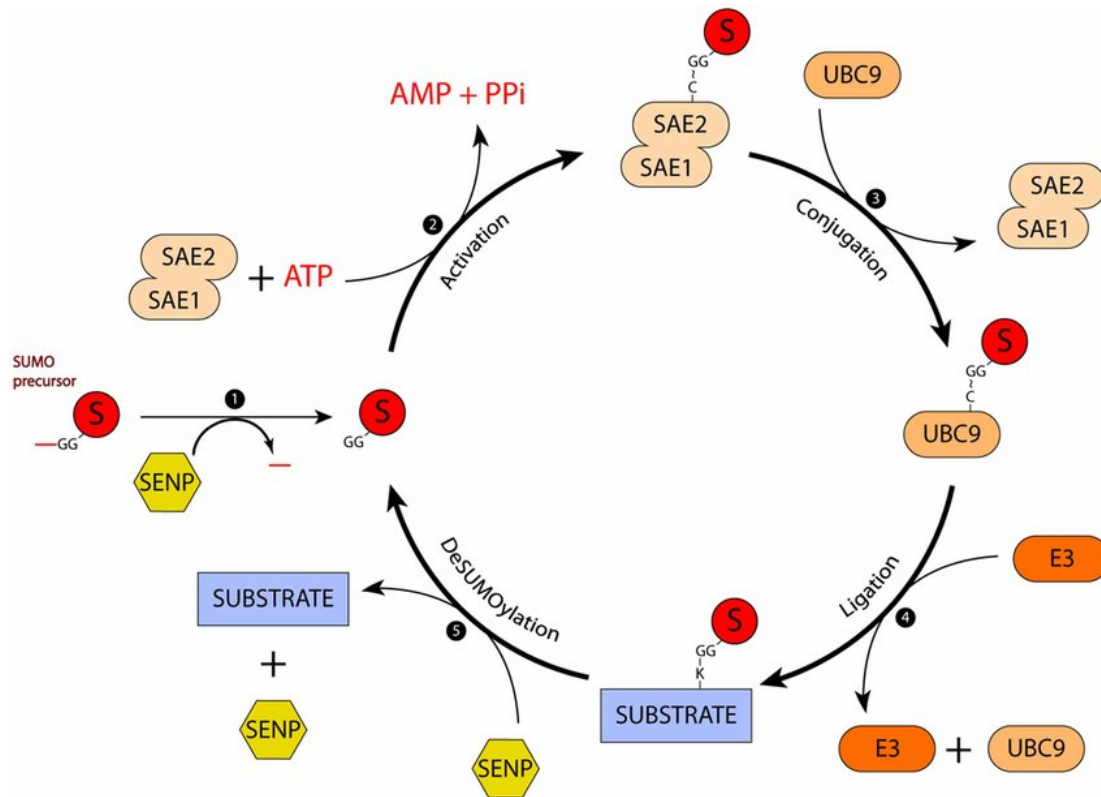


Figura 2. Cicle de la SUMOilació i deSUMOilació. (1) Processament del precursor de SUMO per les proteases de SUMO (SENP). (2) Exposició de la di-glicina de SUMO i formació d'un enllaç tioèster amb una cisteïna catalítica de SAE2 d'una manera dependent d'ATP. (3) Reacció de transesterificació on SUMO passa de l'enzim activador heterodimèric E1 (SAE1 / SAE2) a l'enzim de conjugació E2 (UBC9). (4) Unió de SUMO a la proteïna diana (aquí indicada com a SUBSTRATE) mitjançant l'enzim E2, procés on també intervé l'enzim E3 lligasa. (5) Trencament de l'enllaç isopeptídic amb el substrat per les proteases SENP. ATP, adenosina trifosfat; C, carboni; GG, di-glicina; SENP, proteases específiques de sentrina; S, SUMO. Font: Talamillo et al., 2020.

1.4. Implicacions biològiques de SUMO en plantes

La unió de SUMO a les proteïnes dianes pot provocar-los un canvi d'activitat ja que pot generar o bloquejar superfícies d'interacció de la proteïna diana. Aquestes modificacions postraduccionals mediades per SUMO tenen com a conseqüència diferents efectes biològics en les plantes (Kurepa et al., 2003). S'ha demostrat que la SUMOilació juga un paper fonamental en processos de desenvolupament i defensa de les plantes, a més d'estar implicada en la regulació de les respostes a l'estrès abiòtic, biòtic i les respostes hormonals (Figura 3).

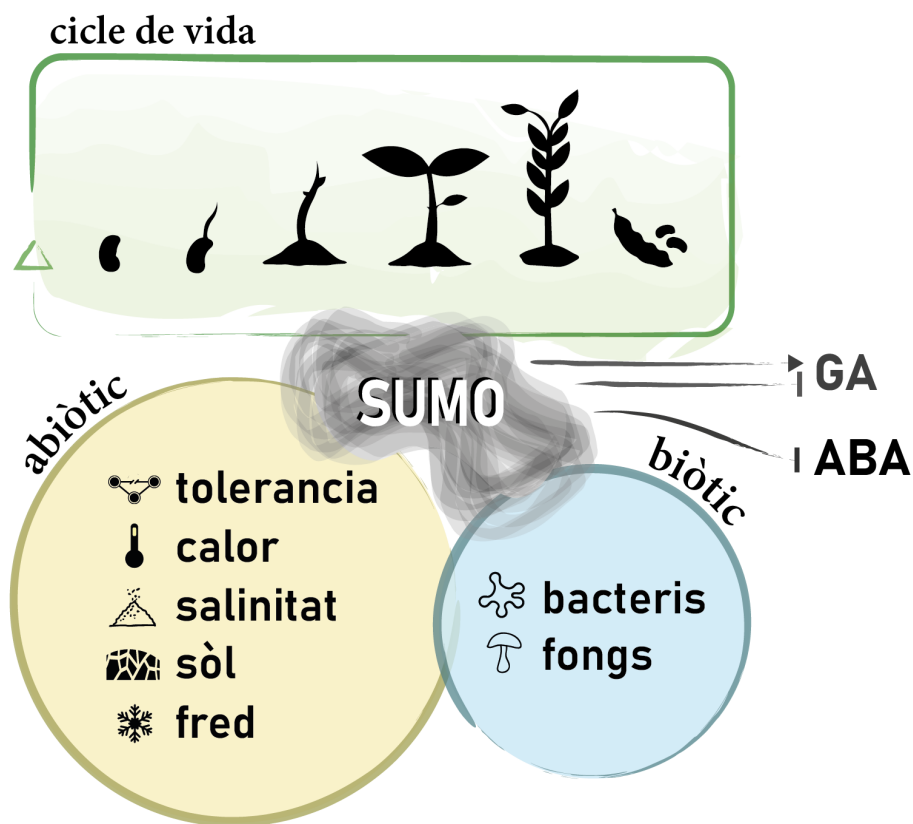


Figura 3. Esquema de les implicacions biològiques de SUMO en plantes (Elaboració pròpia).

1.4.1. La SUMOilació i les respostes de les plantes a l'estrès abiòtic

La SUMOilació es un procés essencial davant els diferents estressos ambientals ja que indueixen una acumulació dràstica de conjugats SUMO. En plantes, aquesta acumulació de conjugats s'ha pogut observar en la planta model *Arabidopsis thaliana* (d'ara en endavant arabidopsis) com a resposta a elevades o baixes temperatures, sequera, salinitat, sucres, exposició a metalls pesants, incubació en peròxid d'hidrogen, etanol i cannavanina (Miura et al., 2005).

Diversos estudis han mostrat que existeix una relació inversa entre l'elevada conjugació i la baixa quantitat de SUMO lliure i que aquesta correlaciona amb la duració i la intensitat de l'estrès. En altres paraules, es podria dir que la SUMOilació actua transitòriament, ja que la quantitat de conjugats comença a disminuir un cop finalitza l'aplicació de l'estrès (Kurepa et al., 2003).

1.4.2. La SUMOilació i les respostes de les plantes a l'estrès biòtic

Les plantes s'enfronten constantment a una multitud d'estressos biòtics que involucren una mirada de patògens microbians i herbívors. En els cultius, les infeccions per patògens donen com a resultat pèrdues agronòmiques significatives en tot el món, el que representa una amenaça per a la seguretat alimentària (Sharma et al., 2021). Per tal de protegir-se de les infeccions, les plantes han desenvolupat diversos mecanismes per tal de percebre l'atac de patògens i desenvolupar ràpidament programes específics de resposta i defensa.

Les plantes compten amb diferents línies de defensa (morfològiques, bioquímiques i moleculars) contra agents biòtics. La primera línia es basa en els patrons moleculars associats a patògens o microbis (PAMPs, de pathogen-associated molecular patterns), que són els determinants moleculars que desencadenen respostes immunitàries induïbles (Cook et al., 2015). La segona s'anomena resposta hipersensible (HR, hypersensitive response) i és més específica que l'anterior, ja que dirigeix la mort cel·lular programada de les cèl·lules vegetals infectades mitjançant la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS, reactive oxygen species) (Jones & Dangl, 2006).

Tot i que les línies de defensa mencionades anteriorment són útils, poden ser suprimides i finalitzar amb cèl·lules vegetals infectades. Per aquesta raó, l'estudi dels mecanismes de

modificació postraduccional com són la fosforilació, la ubiquitinació, la SUMOilació, la nitrosilació i la glicosilació han estat en el punt de mira en els últims anys, i s'ha revelat que tenen una considerable importància i implicació en les respostes de defensa de les plantes envers a patògens (Stulemeijer & Joosten, 2008).

1.5. L'etilè i els factors de transcripció de resposta a l'etilè

Com s'ha mencionat anteriorment, les plantes s'adapten constantment als canvis ambientals i la regulació de l'expressió gènica és un dels processos més importants en el control de les respostes a aquests canvis i, per tant, del desenvolupament vegetal. Un pas rellevant en el control de les respostes a l'estrès és l'activació o repressió transcripcional dels gens.

En la modulació de l'expressió gènica és necessària la presència de seqüències reguladores properes als gens (element regulador en cis) i de proteïnes reguladores. Aquestes proteïnes, conegudes com a factors de transcripció, s'uneixen a les seqüències reguladores de l'ADN i activen o reprimeixen la transcripció dels gens. Els factors de transcripció tenen funcions fonamentals en quasi tots els processos biològics com el desenvolupament, el creixement i les respostes a estrès, i s'assumeix que han tingut un paper preponderant en l'evolució de les espècies (Tiessen et al., 2009).

L'etilè és una hormona vegetal (fitohormona) gasosa que influeix en diferents processos de creixement i desenvolupament de les plantes, incloses la germinació, la senescència, l'abscisió de fulles i flors, l'allargament cel·lular, la maduració del fruit, la modulació i la resposta a una gran varietat d'estressos (Mattoo & Suttle, 2018). L'etilè ha estat ben definit en la regulació de l'allargament de l'hipocòtil, creixement i diferenciació radicular i desenvolupament foliar. Atès que l'etilè regula múltiples aspectes del desenvolupament de les plantes i les respostes a l'estrès, el resultat de la seva senyalització necessita una modulació adequada segons les condicions espai-temporals i ambientals (Ecker et al., 1995). Les proteïnes encarregades de la regulació transcripcional de la resposta a aquesta hormona s'anomenen factors de transcripció de resposta a l'etilè (ERFs, de l'anglès ethylene-responsive transcription factors). Aquestes proteïnes són membres de la superfamília AP2/ERF, una de les famílies més grans i rellevants de factors de transcripció de plantes. Les proteïnes ERF poden unir-se a la caixa GCC (AGCCGCC), un element regulador en cis que es troba en els promotors de molts gens induïbles per la senyalització àcid jasmònic/etilè (JA/Et) i que estan relacionats amb la patogènesi.

D'aquesta manera els ERFs poden afectar positiva o negativament regulant la transcripció (Moffat et al., 2012). Les proteïnes ERF són molècules fonamentals en la modulació de diversos processos de desenvolupament de les plantes i juguen paper crucial en la immunitat d'aquestes. També s'ha demostrat que diversos activadors transcripcionals ERF confereixen major resistència a l'estrès i a malalties quan és sobreexpressen i disminueixen la resistència quan es reprimeixen (Huang et al., 2016). Morfològicament s'han evidenciat canvis en plantes sobreexpresores de gens *ERFs*, on la sobreexpressió d'aquests donava com a resultat plantes més grans que les salvatges (augment d'altura, roseta i arrels lleugerament més grans). En canvi plantes mutants de pèrdua de funció dels gens *ERF* obtenien un creixement reduït de les plantes en comparació amb les salvatges (Bolt et al., 2017). Diversos factors de transcripció de tipus ERFs també s'han relacionat amb mecanismes fotosintètics com el control estomàtic de la difusió i assimilació de CO₂. Tot i que encara queda identificar i caracteritzar funcionalment nous factors de transcripció que regulin l'expressió de gens associats amb la fotosíntesi i el metabolisme relacionat (Saibo et al., 2009).

En *arabidopsis* la família *ERF* està formada per un alt nombre de gens, alguns dels quals han estat caracteritzats. Un exemple és *ERF2*, que és induït ràpidament després del tractament amb etilè i la seva expressió és suficient per conferir resistència a alguns patògens (Berrocal-Lobo et al., 2002). *ERF5* i *ERF6* actuen com a reguladors positius de la defensa mitjançada per JA i s'indueixen molt ràpidament i específicament després d'una exposició sobtada a estrès osmòtic. També trobem *ERF104*, que juga un paper crucial en la resistència a patògens bacterians no adaptats (Bethke et al., 2009). Fora d'aquesta família però relacionats amb la percepció/senyalització de l'etilè trobem els factors de transcripció ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3) i ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE1 (EIL1), els dobles mutants dels quals (*ein3/eil1*) presenten insensibilitat completa a l'etilè, demostrant així que són reguladors clau de la senyalització d'aquest, concretament, de la seva percepció (Dolgikh et al., 2019).

1.6. *Arabidopsis thaliana* com a planta model

Arabidopsis thaliana, coneguda comunament com a aràbidopsis, és una planta herbàcia de la família de les angiospermes que s'ha convertit en el sistema model d'elecció per a la investigació en biologia vegetal.

Aràbidopsis és una planta de camp no destacable a simple vista. Les plàntules d'aràbidopsis crescudes en foscor presenten un fenotip caracteritzat pel desenvolupament d'hipocòtils llargs i cotiledons tancats, mentre que en presència de llum presenten hipocòtils curts i cotiledons expandits i verds. És petita, mesura entre deu i trenta centímetres d'altura sense incloure l'arrel. Les fulles es troben en disposició de roseta a la base i compta amb una tija allargada i simple. Les flors són molt petites i hermafrodites de color blanc que s'agrupen formant petits grups de flors o inflorescències. *A. thaliana* segueix un patró de desenvolupament determinat segons estiguin cultivades en llum o en obscuritat (Meinke et al., 1998).

1.7. Antecedents

El present treball de fi de grau s'ha realitzat al Centre de Recerca Agrigenòmica (CRAG), al grup d'investigació *Protein regulation in development and stress* dirigit per la Dra. L. Maria Lois. L'objectiu del laboratori és estudiar les bases biològiques i mecanicistes de la regulació de les proteïnes mitjançant la conjugació de SUMO. En aquest context, el present treball comprèn una part del desenvolupament de la tesis doctoral de Diana Fuertes "*SUMOylation at the crosstalk between development and defense response*".

Prèviament a la meua estança al laboratori Diana Fuertes va fer una selecció *in silico* basada en la creació d'una base de dades de substrats de SUMO a partir de bibliografia sobre el SUMOiloma. Després, amb l'ajuda del programari R va crear dues llistes que contenen proteïnes relacionades amb les funcions de defensa i desenvolupament. De totes les proteïnes identificades com a possibles substrats de SUMO va fer una selecció d'aquelles que eren més convenients per validar en assaigs d'expressió *in vitro*.

De tots els gens que codificaven les proteïnes que va trobar, aquest treball es centra solament en els gens *ERFs*, concretament en tres factors de transcripció: *ERF2*, *ERF6* i *ERF104*. Com s'ha mencionat anteriorment, els gens *ERF* juguen un paper molt important en el desenvolupament i la defensa de les plantes, i la seva sobreexpressió pot millorar aquesta resposta.

Obtenció de plantes transgèniques

Per poder realitzar l'anàlisi funcional d'aquests factors de transcripció per regulació de SUMO, Diana Fuertes va generar les plantes transgèniques que s'han utilitzat per aquest treball i que es descriuen a continuació. A les plantes derivades de successos de transformació independents les anomenem línies i els adjudiquem un número.

- Plantes de guany de funció o sobreexpresores

Línies transgèniques de guany de funció o sobreexpresores dels gens escollits (*ERF2*, *ERF6* i *ERF104*). Per a la generació d'aquestes plantes van transformar *A. thaliana* ecotip Columbia-0 mitjançant la tècnica *floral-dip* amb diferents cultius d'*Agrobacterium tumefaciens* que contenien vectors recombinants portadors del promotor constitutiu 35S del virus del mosaic de la coliflor fusionat al gen en qüestió (*ERF2*, *ERF6* o *ERF104*), a més a més del gen de selecció per resistència a Higromicina (Hyg).

- Plantes mutants de pèrdua de funció

Les línies mutants o de pèrdua de funció utilitzades corresponen al mutants de tipus SALK, els quals tenen una inserció de T-DNA (de l'anglès transfer DNA) interrompent el gen en concret. Les llavors van ser adquirides al Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

- **Plantes mutants no SUMOilables**

Per poder realitzar l'anàlisi funcional de la SUMOilació en proteïnes diana és necessari disposar de plantes SUMOilables i no SUMOilables o deficientes en SUMOilació per poder-les comparar entre sí.

Per a l'obtenció de línies sense la funció de SUMOilació es van utilitzar plantes d'*A. thaliana* ecotip Columbia-0 que contenen el vector recombinant portador del promotor constitutiu 35S del virus del mosaic de la coliflor fusionat al gen en qüestió (*ERF2*, *ERF6* o *ERF104*) a més del gen de selecció per resistència a Higromicina (Hyg) i se'ls va fer un procediment anomenat mutagènesi dirigida. Mitjançant amplificació PCR, es va substituir un nucleòtid per un altre per obtenir un canvi en la seqüència aminoacídica de la proteïna substrat que fa possible la SUMOilació. És necessari que el nou aminoàcid presenti les mateixes condicions fisicoquímiques per a que no es produeixi cap problema amb la proteïna (mal plegament, etc), per això el canvi d'aminoàcid va ser de lisina a arginina.

Anàlisi d'expressió i justificació de línies utilitzades

Els gens de referència endògena (*Housekeeping genes* o *HKGs*) utilitzats en les anàlisis d'expressió del tipus PCR quantitativa s'utilitzen com a controls endògens que permeten la correcció de variacions experimentals, causades per components inhibidors, transcripció inversa (*reverse transcription*, RT), eficiència o qualitat del material de partida, etc. (Infante et al., 2008). El gen de referència que trobem en aquest treball per normalitzar l'expressió dels gens *ERFs* i d'aquesta manera escollir les línies per als experiments va ser el gen de la *UBIQUITINA*.

A cada línia amb la capacitat de SUMOilació (nativa) li correspon una línia no SUMOilable (amb la lisina mutada), amb nivells d'expressió similars per poder comparar en els experiments. Trobem línies amb nivells d'expressió alts i baixos (Figures 4, 5 i 6). En aquestes figures es mostren les línies escollides per al present treball. Encerclades en verd fosc s'indiquen les línies amb major nivell d'expressió, mentre que en verd clar s'encerclen aquelles de menor expressió.

Per a la línia *ERF6* 7.4 (Figura 5) no es va obtenir cap línia no SUMOilable amb els mateixos nivells d'expressió amb qui correlacionar-la, però es va utilitzar per que contenia uns nivells d'expressió d'*ERF6* molt elevats, que poden ser interessants, en comparació amb les altres línies.

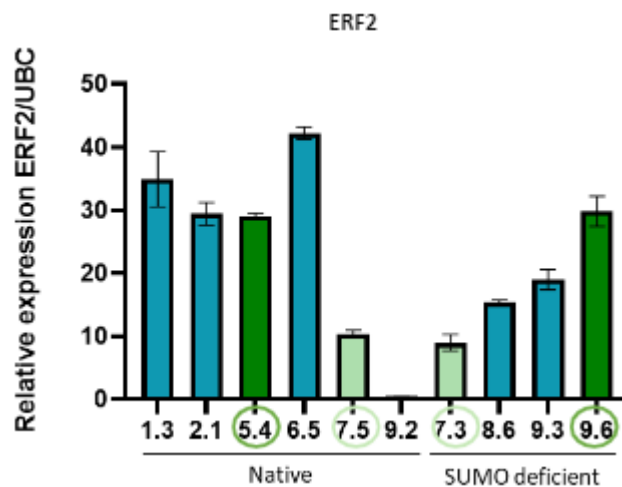


Figura 4: Nivells d'expressió relatiu del gen *ERF2* respecte al gen de la *UBIQUITINA (UBC)* en diferents línies SUMOilables (native) i no SUMOilables (SUMO deficient) sobreexpressores d'*ERF2*. Encerclades s'indiquen les línies escollides per al present treball: en verd fosc les de major nivell d'expressió i en verd clar les de menor (Diana Fuertes,2022).

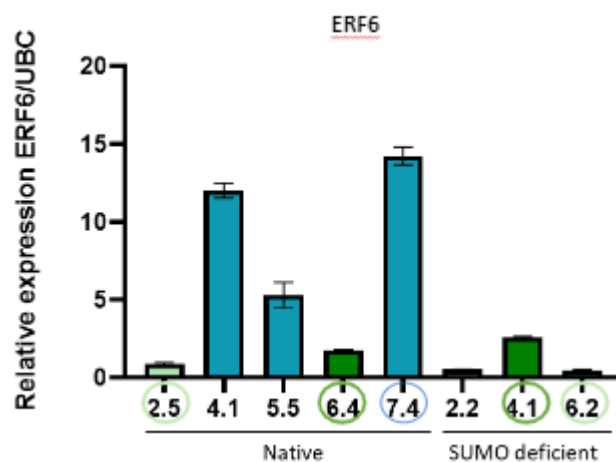


Figura 5: Nivells d'expressió relatiu del gen *ERF6* respecte al gen de la *UBIQUITINA (UBC)* en diferents línies SUMOilables (native) i no SUMOilables (SUMO deficient) sobreexpressores d'*ERF6*. Encerclades s'indiquen les línies escollides per al present treball: en verd fosc les de major nivell d'expressió i en verd clar les de menor (Diana Fuertes,2022).

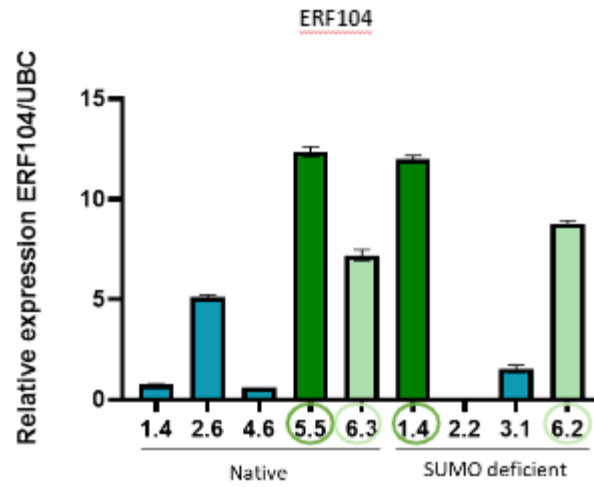


Figura 6: Nivells d'expressió relatius del gen *ERF104* respecte al gen de la *UBIQUITINA (UBC)* en diferents línies SUMOilables (native) no SUMOilables (SUMO deficient) sobreexpressores d'*ERF104*. Encerclades s'indiquen les línies escollides per al present treball: en verd fosc les de major nivell d'expressió i en verd clar les de menor (Diana Fuertes,2022).

2. Objectius

La proteïna SUMO modula diversos processos biològics del desenvolupament i també les respostes de defensa davant diferents estressos biòtics i abiòtics en plantes. Tot i que s'ha descobert que la regulació per SUMO és molt important, els detalls d'aquesta regulació són encara poc coneguts.

En aquest context, l'objectiu general d'aquest treball és l'estudi de l'efecte de la SUMOilació en la regulació dels factors de transcripció *ERF* en la modulació del desenvolupament durant les respostes de defensa de les plantes.

L'abordatge d'aquest objectiu general s'ha dut a terme mitjançant el desenvolupament dels següents objectius concrets:

- Analitzar si existeixen diferències fenotípiques entre plantes d'*arabidopsis* silvestres, sobreexpressores dels gens *ERFs* SUMOilables i no SUMOilables cultivades en condicions normals (absència d'estrès) i en condicions d'estrès abiòtic.
- Estudiar l'efecte de la SUMOilació en plantes *arabidopsis* que sobreexpressen els gens *ERF2*, *ERF6* i *ERF104*.

3. Materials i mètodes

En aquest apartat es descriuen els materials i mètodes de major rellevància per al desenvolupament i realització d'aquest treball.

3.1. Material vegetal

El material vegetal utilitzat en aquest treball va consistir en ecotips silvestres i plantes mutants i transgèniques d'*Arabidopsis* (Taula 1).

3.1.1. Plantes silvestres

L'ecotip silvestre d'*Arabidopsis thaliana* utilitzat va ser Columbia-0 (Col-0). En els experiments es va utilitzar com a control durant la caracterització del fenotip de les plantes.

3.1.2. Plantes transgèniques

- **Plantes de guany de funció o sobreexpresores:** Plantes d'*Arabidopsis* que sobreexpressaven els gens *ERF2*, *ERF6*, i *ERF104* en el fons genètic Columbia-0 (Col-0). Dins d'aquest grup trobem les plantes SUMOilables i les no SUMOilables (mutants per a la lisina sense la capacitat de SUMOilació).
- **Plantes mutants de pèrdua de funció:** Plantes d'*Arabidopsis* mutants de pèrdua de funció en el fons genètic Columbia-0 (Col-0). Aquestes plantes van ser utilitzades com a control en els experiments de caracterització fenotípica. Dins d'aquest grup trobem els dobles mutants *ein3/eil1* i *erf5/erf6* i el mutant simple *erf104*, deficitaris en la resposta o la sensibilitat a l'etilè.

Taula 1. **Resum del material vegetal utilitzat.** El símbol (+) fa referència al nivell d'expressió dels diferents gens *ERFs* en les diferents plantes respecte a plantes silvestres. =, nivell d'expressió del corresponent gen igual que el nivell de les plantes silvestres ; +; nivell d'expressió superior al de les plantes silvestres, ++; encara més expressió que +, 0, expressió nul.la..

Tipus de planta			Genotip	Nivell d'expressió		
				<i>ERF2</i>	<i>ERF6</i>	<i>ERF104</i>
Transgèniques	Guany de funció/ sobreexpresores	SUMOilables (SUMO native)	<i>ERF2</i> 5.4	++	=	=
			<i>ERF2</i> 7.5	+	=	=
			<i>ERF6</i> 2.5	=	+	=
			<i>ERF6</i> 6.4	=	++	=
			<i>ERF6</i> 7.4	=	+++	=
			<i>ERF104</i> 5.5	=	=	++
		<i>ERF104</i> 6.3	=	=	+	
		No SUMOilables (SUMO deficient)	<i>ERF2K</i> 7.3	+	=	=
			<i>ERF2K</i> 9.6	++	=	=
			<i>ERF6K</i> 2.2	=	+	=
			<i>ERF6K</i> 4.1	=	++	=
			<i>ERF104K</i> 1.4	=	=	++
	<i>ERF104K</i> 6.2		=	=	+	
	Mutants de pèrdua de funció	<i>ein3 / eil1</i>		=	=	=
		<i>erf5 / erf6</i>		=	0	=
<i>erf104</i>		=	=	0		

3.2. Cultiu de plantes en cambres de creixement

3.2.1. Sembra i substrat de cultiu vegetal

El substrat de germinació i creixement de les plantes va ser una barreja de torba, perlita i vermiculita en proporció 3:1:1 col·locada en testos rodons.

3.2.2. Condicions de cultiu

Un cop sembrades les llavors es van estratificar durant 2 dies (foscor a 4^aC). Les plantes que es van fer créixer per analitzar els fenotips sota condicions normals (absència d'estrès) han estat cultivades en cambres de llum contínua o dia llarg (Long day conditions, LD), amb 16 h de llum i 8 h de foscor, una temperatura de 22 ± 2°C i una humitat relativa del 65% .

3.3. Cultiu *in vitro* de plantes

Els diferents assaigs de resposta a l'estrès es van realitzar en condicions de cultiu *in vitro*. Abans de sembrar les llavors, aquestes es van desinfectar amb una solució de lleixiu al 20% i Triton X-100 al 1%. Es van netejar durant un minut en aquesta solució (tres repeticions) i a continuació es van rentar amb aigua Milli-Q durant trenta segons (tres repeticions).

3.3.1. Sembra i medi de cultiu *in vitro*

El medi de germinació i creixement de les plantes en plaques de Petri de cultiu *in vitro* va ser Murashige & Skoog (MS) amb vitamines al 0,5% c/v (el qual correspon a la meitat de la concentració del medi canònic MS) suplementat amb diferents components que indueixen a l'estrès i que s'expliquen a continuació.

-ACC: Es va utilitzar ACC (àcid 1-Aminociclopropà-1- carboxílic) perquè és un precursor d'etilè. Després d'una sèrie de reaccions a partir de l'aminoàcid metionina l'ACC es transforma en etilè.

-Metalls pesants: Es van utilitzar diferents metalls pesants perquè provoquen estrès oxidatiu i alguns efectes tòxics que impedeixen el creixement de les plantes.

-D-mannitol: Es va emprar manitol perquè és un compost que s'utilitza com a osmoregulador, ja que pot actuar com a solut compatible en la cèl·lula simulant condicions d'estrès osmòtic o sequera lleu.

NaCl: El clorur de sodi es va fer servir per produir estrès salí.

El tipus de compost, les concentracions de les solucions estoc o inicials utilitzades i les concentracions finals de treball es mostren a la taula 2.

Taula 2. Tipus de compost afegits al medi, concentració estoc i concentracions finals de treball.

	Compost	Estoc	Concentració final
	ACC	50 mM	0,5 µM
			1 µM
	CuSO ₄	100 mM	10 µM
			20 µM
			30 µM
			50 µM
M e t a l l s	MnCl ₂	500 mM	200 µM
			500 µM
			750 µM
	ZnSO ₄	500 mM	100 µM
			200 µM
			300 µM
p e s a n t s	CoCl ₂	500 mM	25 µM
	H ₃ BO ₄	500 mM	200 µM
			500 µM
			750 µM
	CdCl ₂	500 mM	5 µM
			10 µM
			15 µM
			30 µM
	D-mannitol	1 M	25 mM
	NaCl	5 M	50 mM
			75 mM
			100 mM
			150 mM

3.3.2. Condicions de cultiu *in vitro*

Un cop sembrades les llavors es van estratificar durant 2 dies (foscor a 4°C). En el cas concret de l'experiment amb etilè, posteriorment a l'estratificació es van sotmetre a un pols de llum durant dues hores per induir la germinació, i a continuació es van deixar créixer en foscor.

Les condicions de cultiu *in vitro* van ser de llum contínua o bé 12 h de llum i 12 h de foscor, temperatura de 22 ±2°C i una humitat relativa del 65%.

3.4. Metodologies

3.4.1. Assaig de fenotipat de les plantes en condicions normals (absència d'estrès)

Per analitzar el fenotip de les plantes en condicions normals de cultiu (absència d'estrès) el disseny experimental va consistir en la sembra de cinc plantes de cada línia a analitzar fent tres rèpliques biològiques. Cada una de les tres rèpliques es va col·locar en una cambra de creixement. Les tres cambres utilitzades tenien les mateixes condicions de cultiu, a fi d'evitar qualsevol alteració fenotípica provocada per l'efecte de la cambra.

Durant el procés de creixement de les plantes es va realitzar un registre fotogràfic setmanal per analitzar els següents paràmetres fenotípics al cap de 21 dies: l'àrea de la roseta (cm²), la longitud de l'arrel (cm) i de la planta (cm) i el temps d'inici de floració (comptabilitzat com a dies transcorreguts des de la germinació fins a que les plantes presenten al centre de la roseta el botó floral amb una tija de més d'un centímetre de llarg) i la capacitat fotosintètica.

En la figura 7 podem veure un exemple de la disposició dels testos amb les plantes germinades i desenvolupades en fase vegetativa (roseta).



Figura 7: Exemple de safata per a l'assaig de fenotipat de les plantes en absència d'estrès.

Un altre paràmetre que es va mesurar va ser la capacitat fotosintètica de les plantes per poder analitzar si la sobreexpressió dels gens *ERFs*, la seva repressió o la capacitat de SUMOilació afectaven en el procés d'obtenció d'energia d'aquestes. La fotosíntesi és un procés primordial en el qual les plantes fan la conversió de matèria inorgànica en matèria orgànica, gràcies a l'energia lumínica. Com que les plantes depenen d'aquesta transformació energètica per a la seva subsistència, estudiar com varia aquest paràmetre és important, ja que pot ajudar a entendre processos d'adaptació a canvis desfavorables de les plantes.

La fluorescència de la clorofil·la és un indicador molt sensible de la fotosíntesi. Per mesurar la capacitat fotosintètica de les plantes es va utilitzar el mesurador de clorofil·la IMAGING-PAM sèrie M. Seguidament amb el programa ImagingWinGigE es va obtenir la informació quantitativa de la conversió d'energia fotosintètica per poder comparar els resultats.

3.4.2. Assaigs de fenotipat de les plantes en resposta a diferents estressos

Per estudiar la resposta de totes les plantes a diferents condicions d'estrès es va seguir el següent disseny experimental: es van sembrar entre 20-30 llavors de cada línia en plaques de Petri amb el medi amb els suplementos corresponents per a cada tractament. En cada experiment també es van sembrar llavors en medi MS sense suplementos com a control. Es va fer únicament una repetició biològica per a cada condició d'estrès.

Cada estrès diferent està relacionat i actua de manera especial i diferent sobre un paràmetre fenotípic específic, per això el paràmetre fenotípic a analitzar i la durada de l'experiment varia depenent del tractament aplicat.

En l'experiment amb ACC, després de deixar les llavors sota un pols de llum durant dues hores, es van deixar créixer durant tres dies en foscor i es va mesurar la llargada de l'hipocòtil. Amb metalls pesants les plantes es van deixar créixer durant vuit dies i es va mesurar la llargada de l'arrel. I en els experiments amb NaCl i D-mannitol es va mesurar l'àrea de la roseta de les plantes després de deu dies (Taula 3).

Taula 3 . **Tractaments d'estrès realitzats en el present treball i respostes mesurades.** Es mostren els diferents tractaments, els paràmetres a mesurar (cm) i la duració de l'experiment (dies).

Tractament	Paràmetres a mesurar (cm)	Duració de l'experiment (dies)
Etilè (ACC)	Hipocòtil	3
Metalls pesants	Llargada arrel	8
Estrès salí (NaCl)	Àrea roseta	10
Estrès osmòtic (D-mannitol)	Àrea roseta	10

3.4.3. Tractament de dades

Tots els paràmetres fenotípics mencionats anteriorment, la tija, l'arrel, l'hipocòtil i l'àrea de la roseta de les plantes, s'han mesurat amb ImageJ. Aquest és un programari lliure de processament d'imatges en Java desenvolupat en els Institut Nacionals de Salut i el Laboratori d'Instrumentació Òptica i Computacional (LOCI, Universitat de Wisconsin). El paràmetre fenotípic inici de floració es va fer calculant el percentatge de floració de cada línia considerant aquelles plantes que contenien més d'1 cm de llarg de botó floral. La capacitat fotosintètica es va mesurar amb el mesurador fotosintètic Imaging-PAM. Els instruments GigE de la sèrie M d'IMAGING-PAMP estan totalment controlats pel programari ImagingWinGigE. Aquest sistema i software va ser creat per l'empresa alemanya Heinz Walz GmbH, un dels principals productors mundials de sistemes de mesura de fotosíntesis. El programari utilitzat per al tractament de les dades d'aquest treball ha estat el GraphPad Prism 9.5.0. GraphPad Prism és un programa estadístic que forma part de Dotmática, líder mundial en R+D de programari científic. Combina gràfics científics, ajusts complets de corbes (regressió no lineal), estadístiques comprensibles i organització de dades. Actualment, GraphPad Software està ubicat en San Diego, Califòrnia.

Totes les dades dels diferents assaigs es van sotmetre prèviament a test de normalitat i homogeneïtat de variàncies. Consegüentment, es va efectuar una ANOVA d'un factor per a estudiar els diferents factors independentment. L'agrupació de dades es va dur a terme amb el mètode de Tukey. Per comparar els resultats obtinguts amb les variables de les plantes SUMOilables vs les no SUMOilables, totes les dades es van sotmetre a la prova de Mann-Whitney, una prova no paramètrica que compara les distribucions de dos grups no emparellats. Aquest test es va fer amb un nivell de confiança del 95% i amb un valor de P d'una cua.

Quan diem que el tractament de dades i l'anàlisi estadística de tots els paràmetres fenotípics es va realitzar de manera relativa, ens referim al fet que es van normalitzar les dades. La normalització d'aquestes va significar l'ajust dels valors mitjans de diferents escales respecte a una escala comuna. D'aquesta manera els gràfics obtinguts no presenten unitats, ja que s'obtenen valors adimensionals.

4. Resultats

- 4.1 Anàlisi del fenotip de plantes amb diferents nivells d'expressió dels gens *ERFs* i SUMOilables o no en condicions normals (absència d'estrès)

Amb l'objectiu de veure si existeixen diferències en el fenotip de les plantes adultes crescudes en condicions normals degudes a la sobreexpressió dels gens *ERF2*, *ERF6* i *ERF104* i/o a la susceptibilitat de les proteïnes que codifiquen de ser SUMOilades, es van cultivar plantes sobreexpressores de cadascun dels gens *ERF* en les seves variants SUMOilables (no mutades) i no SUMOilables (mutades, indicat amb K). Com a controls es van utilitzar plantes silvestres Col-0 i mutants relacionats amb la sensibilitat o la resposta a l'etilè.

Com s'ha mencionat en la introducció, s'ha descrit que la sobreexpressió o la pèrdua de funció d'alguns gens *ERFs* pot afectar al creixement de les plantes. Per aquesta raó als 21 dies de creixement de les plantes anteriorment citades es van analitzar els següents paràmetres fenotípics: l'àrea relativa de la roseta (Figura 8), la longitud relativa de la tija (Figura 9), longitud relativa de l'arrel (Figura 10), el temps de floració o floració relativa (Figura 11) i la capacitat fotosintètica (Figura 12). La línia *ERF6* 7.4, que mostra uns nivells d'expressió molt elevats, es va eliminar de l'anàlisi estadístic per no tenir una línia sense capacitat de SUMOilació amb els mateixos nivells d'expressió per comparar-la. (Figura 5).

Respecte a l'àrea de la roseta, Col-0 va mostrar un rang ampli de valors, la mitjana dels quals vam considerar com a 1 (Figura 8). La línia mutant *ein3/eil1* va desenvolupar una roseta més petita que les plantes Col-0, resta de mutants i sobreexpressores. El fet de que *ein3/eil1* mostri rosetes més petites suggereix que aquesta pèrdua de funció regula negativament el desenvolupament foliar de les plantes. Les línies mutant *erf5/erf6* i *erf104* de pèrdua de funció d'*ERF6* i *ERF104* respectivament, van mostrar uns valors molt similars als de Col-0 i en comparació amb les línies sobreexpressores, tampoc van mostrar diferències significatives. A l'analitzar les plantes de sobreexpressió totes van mostrar valors entre 0,9 i 1,3 d'àrea relativa de roseta i no es va veure distinció entre si aquestes eren SUMOilables o no. Per tant, sembla que la sobreexpressió dels gens *ERF2*, *ERF6* i *ERF104* no afecta a l'àrea de la roseta. A més, en les línies sobreexpressores no existeixen diferències significatives entre les línies SUMOilables i

les no SUMOilables, conclouent d'aquesta manera que la SUMOilació de les proteïnes ERFs estudiades en aquest treball no afecta l'àrea de la roseta de les plantes, i suggerint que la senyalització de l'hormona etilè a través dels factors de transcripció *ERF2*, *6* i *104* no té un paper en la regulació de l'àrea de la roseta (Figura 8).

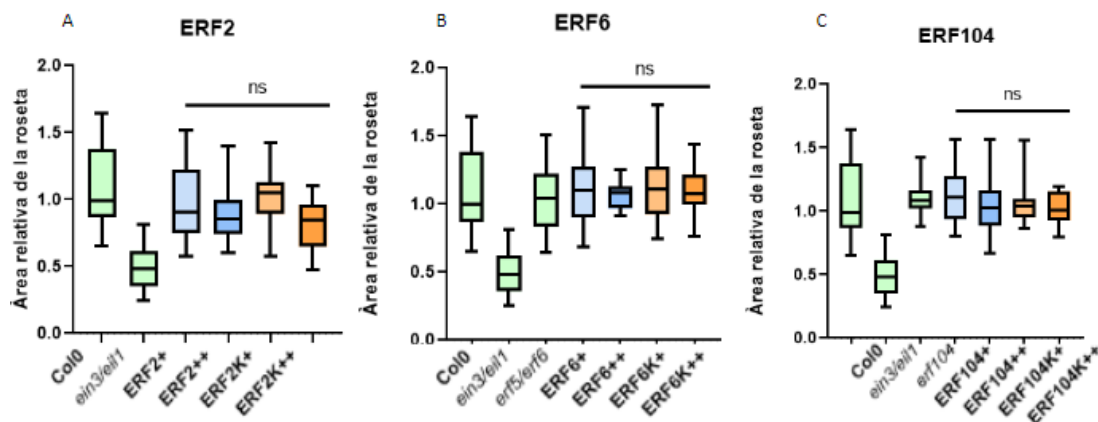


Figura 8: Anàlisi de l'àrea relativa de la roseta. Plantes silvestres Col-0, mutants *ein3/eil1*, *erf5/erf6* i *erf104* i sobreexpressores d'*ERF2* (A), *ERF6* (B) i *ERF104* (C). ns: no significatiu segons el test de Mann Whitney.

Pel que fa a la longitud de la tija principal de les plantes, es va observar un patró similar al de la roseta (Figura 9). Les plantes silvestre Col-0 va mostrar un valor mig de 1,05 de longitud relativa de la tija. Pel que fa a les plantes mutants, *ein3/eil1* va desenvolupar una tija més curta que Col-0 i que la resta de plantes sobreexpressores, mentre que els mutants *erf5/erf6* i *erf104* van mostrar valors semblants a les plantes silvestres i a la resta de plantes sobreexpressades. El fet que el mutant *ein3/eil1* tingui arrels més curtes suggereix que aquesta pèrdua de funció regula negativament el desenvolupament de l'allargament radicular.

Entre les plantes silvestres i les de sobreexpressió no es van trobar diferències significatives. En les plantes de sobreexpressió d'*ERF2* veiem una diferència significativa ($p < 0,0242$) en la longitud de la tija entre la línia SUMOilable *ERF2++* i la no SUMOilable *ERF2K++*, més curta (Figura 9A). En les plantes sobreexpressores d'*ERF6* i *ERF104* no es van observar diferències significatives en la longitud de la tija principal entre les plantes SUMOilables i no SUMOilables (Figura 9). Així doncs, la SUMOilació d'*ERF2* sembla actuar de manera positiva sobre la longitud de la tija, mentre que la d'*ERF6* i *ERF104* no sembla tenir cap efecte.

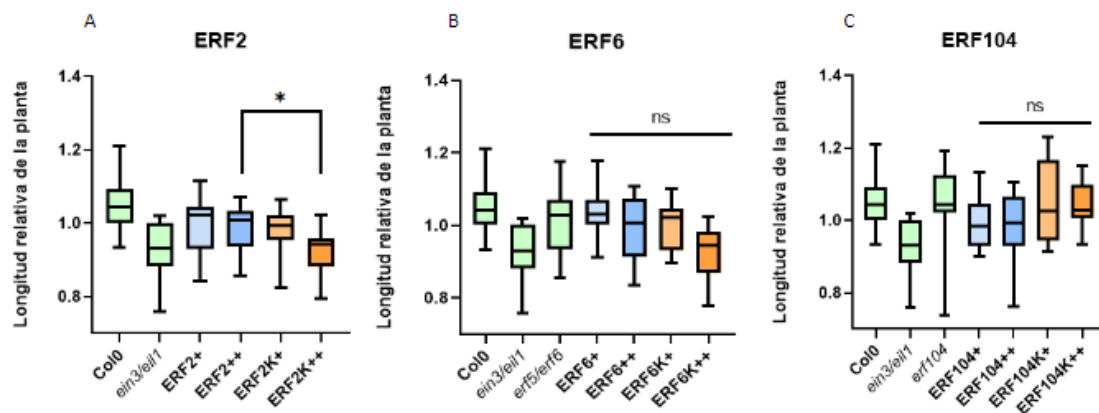


Figura 9: **Anàlisi de la longitud relativa de la planta.** Plantes silvestres Col-0, mutants *ein3/eil1*, *erf5/erf6* i *erf104* i sobreexpressores d'*ERF2* (A), *ERF6* (B) i *ERF104* (C). ns: no significatiu segons el test de Mann Whitney; *: ($p < 0,05$) segons el test de Mann Whitney.

Pel que fa a la longitud de l'arrel observem un patró similar al de la roseta i la longitud del tija de les plantes (Figura 10). Les plantes silvestres van desenvolupar arrels amb valors entre 1-1,3 de llargada relativa. La línia mutant *ein3/eil1* va obtenir valors inferiors a Col-0 i a la resta de plantes sobreexpressores, suggerint que ser deficient en la senyalització de l'etilè provoca una regulació negativa en el desenvolupament de l'allargament radicular. En canvi les línies *erf5/erf6* i *erf104* van presentar arrels amb valors molt semblants a Col-0 i a les plantes sobreexpressades. Entre la planta silvestre i les plantes de sobreexpressió no es van visualitzar diferències significatives en la longitud de l'arrel. Tampoc es van veure diferències entre les plantes SUMOilables i les que no (Figura 10). Així doncs, podem concloure que malgrat que la senyalització de l'hormona etilè afecta la longitud de l'arrel, aquest efecte no es realitza a través dels factors de transcripció ERF, 6 i 104.

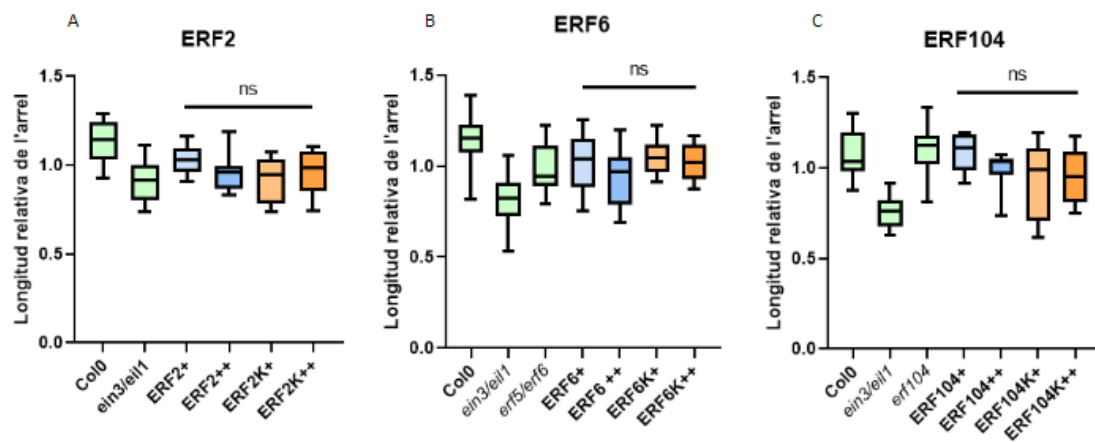


Figura 10: **Anàlisi de longitud relativa de l'arrel.** Plantes silvestres Col-0, mutants *ein3/eil1*, *erf5/erf6* i *erf104* i sobreexpressores d'*ERF2* (A), *ERF6* (B) i *ERF104* (C). ns: no significatiu.

Al cap de 21 dies podem observar com Col-0 va mostrar un valor de floració mitjà el qual vam considerar 1 (Figura 11). La línia mutant *ein3/eil1* no va arribar a florir, per això no apareixen valors. Aquest fet suggereix que ser deficient en la senyalització de l'etilè provoca una regulació negativa en l'inici de floració de les plantes. Les línies *erf5/erf6* i *erf104* van presentar valors molt semblants a Col-0, però molt menors que els de les plantes sobreexpressores.

En *ERF2*, les plantes sobreexpressores van obtenir valors lleugerament majors en l'inici de floració que la planta silvestre. I tot l'estadística no ser significativa entre les plantes SUMOilables i no SUMOilables, sembla aparèixer una tendència on la SUMOilació té un paper en l'inici de floració positiu (accelera el procés) en les plantes sobreexpressores del gen *ERF2*. En *ERF6* les plantes sobreexpressores van obtenir valors lleugerament majors en l'inici de floració que la planta silvestre. Entre les plantes SUMOilables i no SUMOilables, sembla aparèixer una tendència contrària a les plantes d'*ERF2*, on la SUMOilació té un paper en l'inici de floració negatiu (retarda el procés) en les plantes sobreexpressores del gen *ERF6*. En *ERF104* les plantes SUMOilables i les no SUMOilables van mostrar resultats semblants entre elles i amb les plantes silvestres. Així, podem concloure que *ERF104* no té un paper en determinar l'inici de floració de les plantes, mentre que la SUMOilació d'*ERF2* sí, i de manera positiva i la SUMOilació d'*ERF6* de manera negativa. (Figura 11).

Aquestes dades es mostren en un gràfic de diagrama de violí que permet a més de visualitzar les dades, veure la densitat de probabilitat que tenen aquestes plantes de florir.

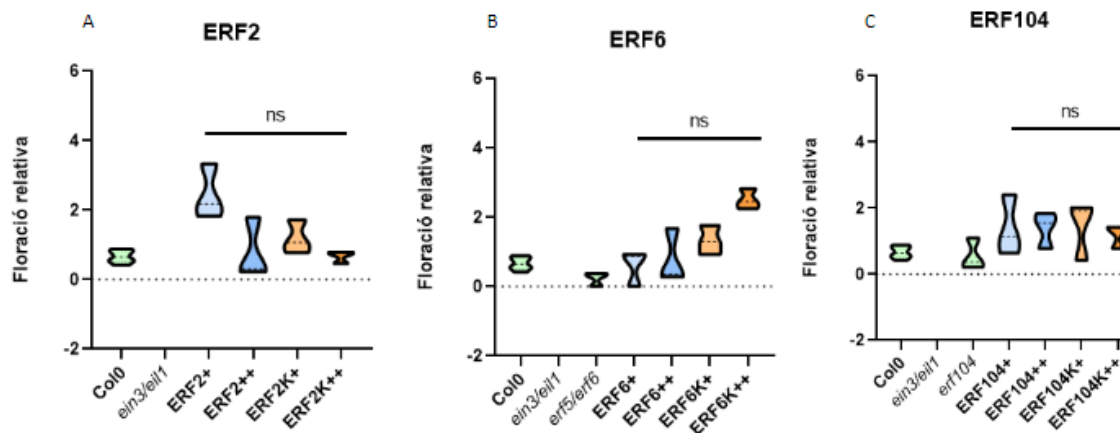


Figura 11: Anàlisi relativa de l'inici de la floració. Plantes silvestres Col-0, mutants *ein3/eil1*, *erf5/erf6* i *erf104* i sobreexpressors d'*ERF2* (A), *ERF6* (B) i *ERF104* (C). ns: no significatiu.

Pel que fa a la capacitat fotosintètica, després de 10 dies des de la germinació de les llavors les plantes ja tenien una roseta prou gran com per analitzar-la. És van mesurar totes les línies amb mesurador fotosintètic Imaging-PAM. El mateix programa realitza una expressió numèrica adimensional resultat de la divisió del paràmetre $Y(II)$ i el número de plantes sembrades que permet estimar la seva capacitat fotosintètica.

Totes les plantes, Col-0, mutants de pèrdua de funció i plantes sobreexpressores van mostrar valors similars de capacitat fotosintètica (Figura 12). No es van observar diferències significatives en la capacitat en cap cas. La conclusió dels resultats va ser que els gens *ERF2*, *6* i *104* no regulen l'expressió de gens relacionats amb la fotosíntesi i que la capacitat de SUMOilació tampoc afecta a la capacitat fotosintètica de les plantes.

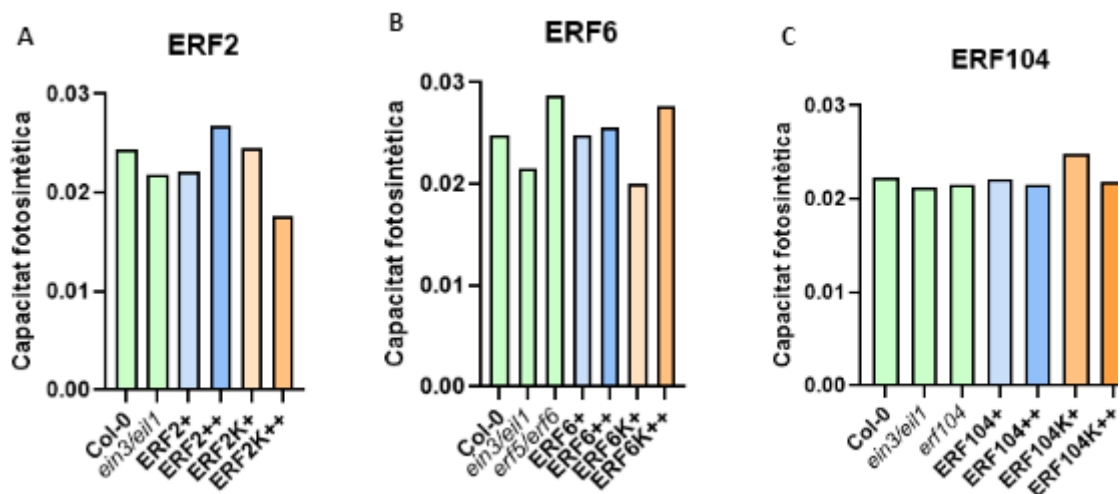


Figura 12: Anàlisi de la capacitat fotosintètica. Plantes silvestres Col-0, mutants *ein3/eil1*, *erf5/erf6* i *erf104* i sobreexpressores d'*ERF2* (A), *ERF6* (B) i *ERF104* (C).

- 4.2 Anàlisi del fenotip de plantes amb diferents nivells d'expressió dels gens *ERFs* i SUMOilables en condicions d'estrès

- Resposta a l'estrès per etilè

En l'experiment amb el tractament amb ACC (precursor d'etilè) l'objectiu va ser analitzar l'hipocòtil de les plantes després de tres dies de creixement, ja que com s'ha mencionat en la introducció l'etilè induïx canvis morfològics típics de plantes crescudes en fosc com la inhibició de l'allargament de l'hipocòtil.

Aquests resultats no es van quantificar, ja que a simple vista es va observar que no existien diferències en l'hipocòtil entre les diferents plantes (silvestre, mutants de pèrdua de funció i sobreexpressores SUMOilables o no). Les plantes d'*ERF2*, *ERF6* i *ERF104* es van analitzar de la mateixa manera i es va veure que totes les plantes seguien el mateix patró. La figura 13 mostra com a exemple el creixement de plantes Col-0, *ein3/eil1* i les plantes d'*ERF104* en presència diferents concentracions del precursor d'etilè ACC. De les 20-30 llavors que es van sembrar i analitzar, es mostren únicament 4 plantes de cada grup per poder visualitzar l'efecte de l'etilè més clarament.

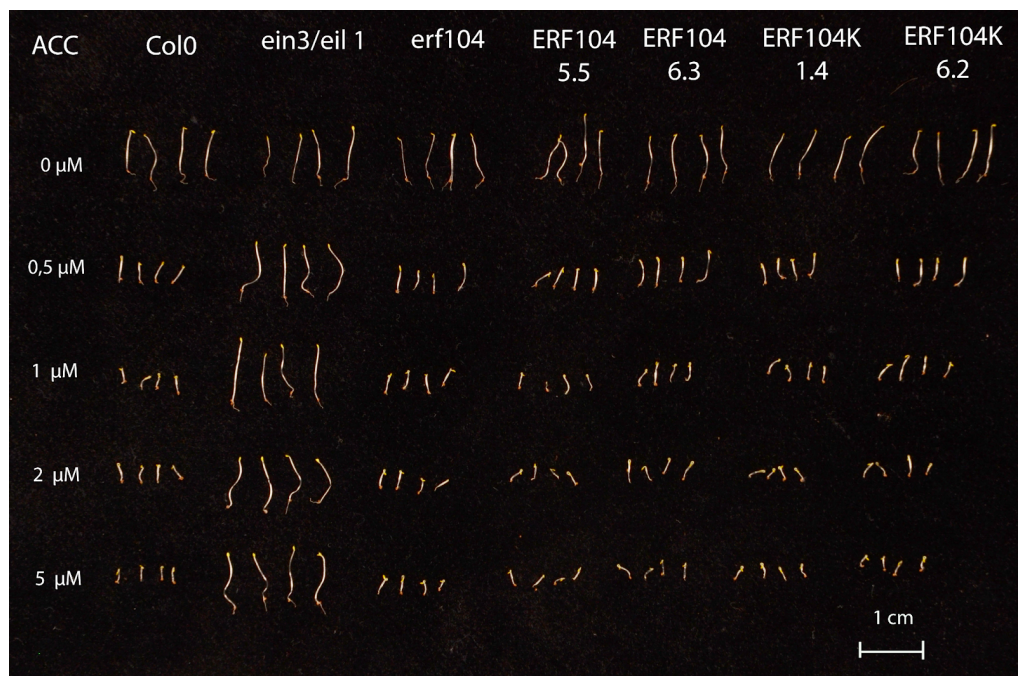


Figura 13: **Anàlisi de la resposta de l'estrès davant l'etilè.** Fotografia de plàntules representatives de les diferents línies sobreexpressores d'*ERF104* després de 3 dies de creixement en presència de diferents concentracions d'ACC (indicades a l'esquerra). Controls: Col-0, *ein3/eil1* i *erf104*. Línies SUMOilables (*ERF104 5.5* i *ERF104 6.3*) i línies no SUMOilables (*ERF104K 1.4* i *ERF104K 6.2*).

Les plantes silvestres en absència d'etilè (0 μM d'ACC) van desenvolupar un hipocòtil allargat, degut al seu creixement en foscor. A mesura que es va augmentar la concentració d'ACC es va observar una inhibició progressiva del creixement de l'hipocòtil (Figura 13). La línia mutant *ein3/eil1* va mostrar hipocòtils llargs tant presència de diferents concentracions d'ACC com no. Aquest resultat era esperable ja que aquests mutants són insensibles a l'etilè, per tant no són capaços de detectar-lo quan es produeix o quan és present al medi. Les línies mutants *erf5/erf6* i *erf104* van respondre de la mateixa manera que Col-0, la qual cosa indica que la inducció dels gens *ERF6* i *ERF104* per etilè no té un efecte sobre l'allargament de l'hipocòtil. En el cas de les plantes de sobreexpressió, la llargada l'hipocòtil es va veure reduïda a mesura que la concentració d'ACC augmentava, i no es van veure diferències amb la planta silvestre. Tampoc es van veure diferències entre les línies SUMOilables i les que no, indicant que l'inhibició del creixement de l'hipocòtil per etilè no té lloc a través de *ERF2*, *6* i *104* ni de la seva SUMOilació.

- **Resposta a l'estrès per metalls pesants:**

En l'experiment per estudiar l'efecte dels metalls pesants sobre el creixement de les plantes l'objectiu va ser analitzar la longitud d'aquestes després de vuit dies. En general, en situacions silvestres, l'augment de les concentracions dels metalls provoca una disminució gradual de la longitud de les arrels.

A part de mesurar la longitud de l'arrel es va calcular la taxa d'inhibició (%) o taxa de reducció entre les plantes crescudes en medi MS control i les plantes crescudes amb una certa concentració de metalls pesants, per veure quan es redueix aquesta.

Dels diferents metalls pesants que van estar exposades les plantes solament es van veure diferències en els tractaments amb el coure, cadmi i Bor (Figures 14-16).

En el cas del coure es van observar diferències fenotípiques amb 30 μM de CuSO_4 . Les plantes sobreexpressores d'*ERF2* van desenvolupar una arrel més petita que la varietat silvestre i com era d'esperar, la llargada de l'arrel va disminuir en ser exposada amb coure. Tot i la diferència sigui mínima, en les plantes SUMOilables (*ERF2+* i *ERF2++*) la reducció de la llargada de l'arrel va ser menor que en les no SUMOilables (*ERF2K+* i *ERF2K++*), ja que veiem una taxa d'inhibició de l'arrel menor en les plantes que tenen la capacitat de SUMOilació (Figura 15).

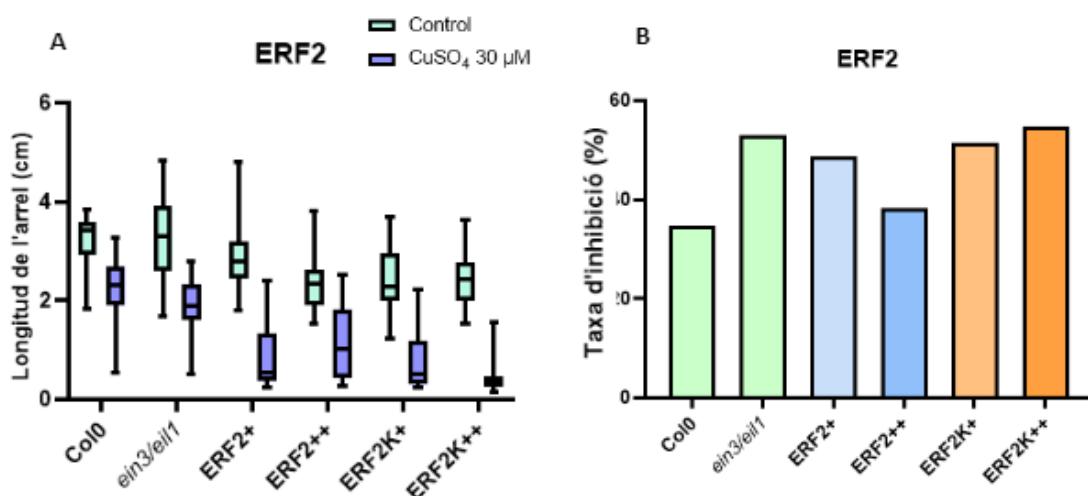


Figura 14: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant coure en plantes sobreexpressores d'*ERF2*. Longitud de l'arrel (cm) en medi MS control (verd) i amb 30 CuSO_4 μM (blau) (A) i taxa d'inhibició (%) (B)

En l'anàlisi que incloïa les plantes sobreexpressores d'*ERF6*, la línia mutant *erf5/erf6* va arribar a uns valors de llargada molt semblants als de Col0 (3-4 cm) i la seva taxa d'inhibició de l'arrel va ser del 35%. En aquest cas sí que podem apreciar clarament la tendència de que la taxa d'inhibició de les línies SUMOilables (*ERF6+*, *ERF6++* i *ERF6+++*) és menor que en les línies no SUMOilables (*ERF6K+* i *ERF6K++*). Com a excepció tenim la línia SUMOilable *ERF6+++* que com es va mencionar anteriorment, conté uns nivells d'expressió elevats. L'arrel d'aquesta línia es va veure molt afectada per els 30 μM de CuSO_4 i per això els valors de la taxa d'inhibició arriben fins al 80% (Figura 15).

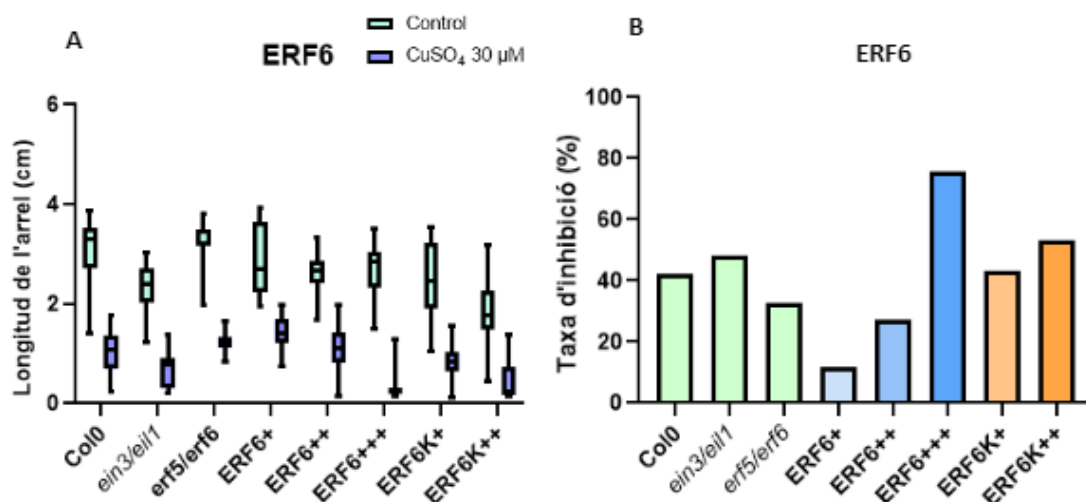


Figura 15: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant Coure en plantes sobreexpressores d'*ERF104*. Longitud de l'arrel (cm) en medi MS control (verd) i amb 30 CuSO_4 μM (blau) (A) i taxa d'inhibició (%) (B).

En les plantes d'*ERF104* la línia mutant *erf104* va arribar també a uns valors de llargada molt semblants als de la varietat silvestre i la seva taxa d'inhibició de l'arrel en ser exposada al coure va ser del 35%. En les plantes de sobreexpressió la tendència mencionada anteriorment la veiem més clara en les línies amb major nivell d'expressió. És a dir, la línia SUMOilable *ERF104++* va obtenir una taxa d'inhibició menor que la línia no SUMOilable *ERF104K* (Figura 16).

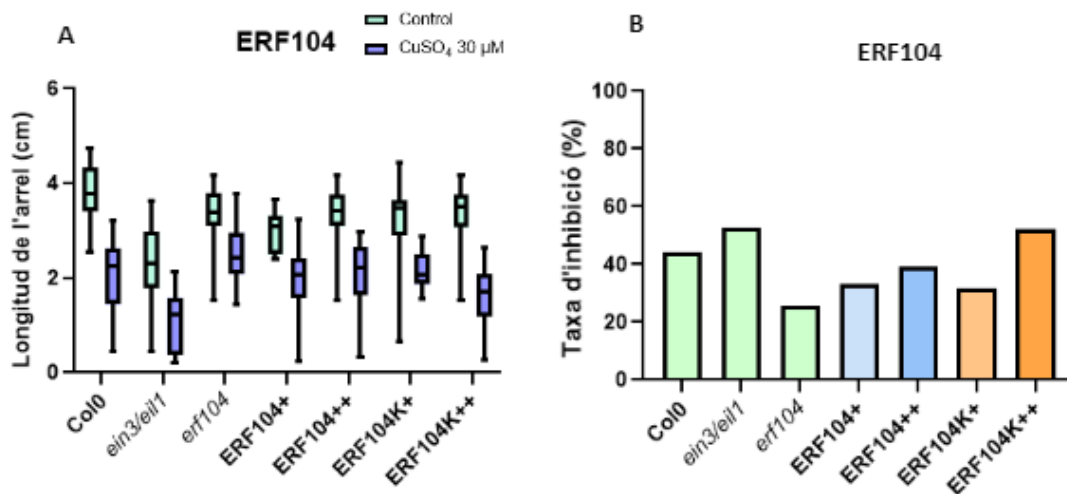


Figura 16: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant Coure en plantes sobreexpressores d'ERF6. Longitud de l'arrel (cm) en medi MS control (verd) i amb 30 CuSO_4 μM (blau) (A) i taxa d'inhibició (%) (B).

D'aquesta manera, segons els resultats exposats sembla que la SUMOilació d'ERF2, ERF6 i ERF104 afecta de manera positiva la resistència de les plantes al coure.

En el cas del cadmi es van veure diferències en 15 μM de CdCl_2 . (Figures 17-19). Les plantes sobreexpressores d'ERF2 van mostrar una llargada de l'arrel menor que la varietat silvestre Col-0, tot i que els valors no són valors molt llunyans i totes ronden entre els 3 cm de llargada. Centrant-nos en les plantes de sobreexpressió, veiem que la taxa d'inhibició de les plantes SUMOilables es molt menor que la taxa d'inhibició de les línies no SUMOilables. Cal destacar el valor de la línia SUMOilable amb major nivell d'expressió (*ERF2++*) que quasi manté la mateixa llargada tant en medi MS control com en medi amb 15 μM de CdCl_2 amb una taxa d'inhibició del 5% (Figura 17).

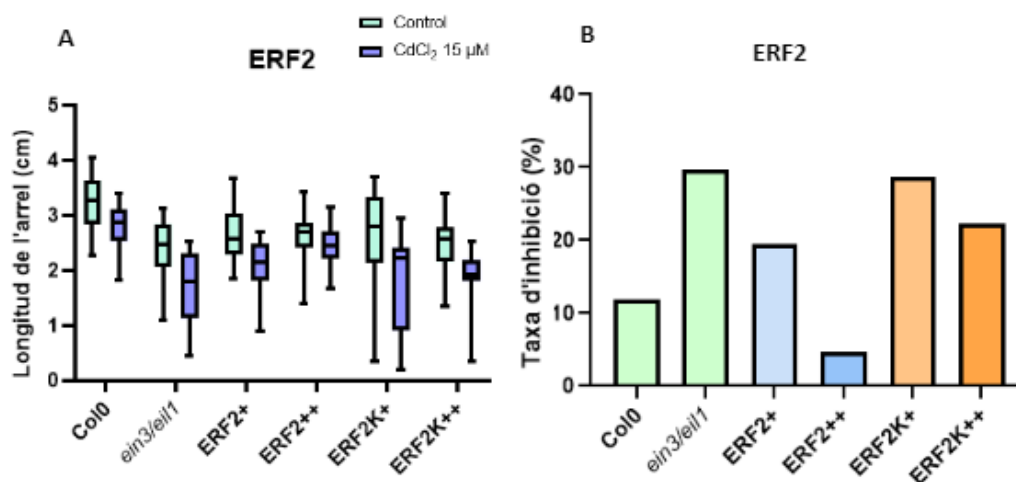


Figura 17: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant cadmi en plantes sobreexpressores d'*ERF2*. Longitud de l'arrel (cm) en medi MS control (verd) i amb 30 CuSO_4 μM (blau) (A) i taxa d'inhibició (%) (B).

En el cas d'*ERF104*, la línia *erf104* va arribar a uns valors de llargada de l'arrel molt semblants als de la varietat silvestre i no es va veure quasi afectada per l'exposició al cadmi, mostrant una taxa d'inhibició de l'arrel del 18%. Pel que fa a les plantes de sobreexpressió, van mostrar valors mitjans de llargada inferiors a la varietat silvestre tot i no ser destacables. En comparar les plantes sobreexpressores observem un patró contrari a *ERF2* en ser exposat a 15 μM de CdCl_2 . Trobem una taxa d'inhibició de les plantes SUMOilables molt major a la taxa d'inhibició de les no SUMOilables.

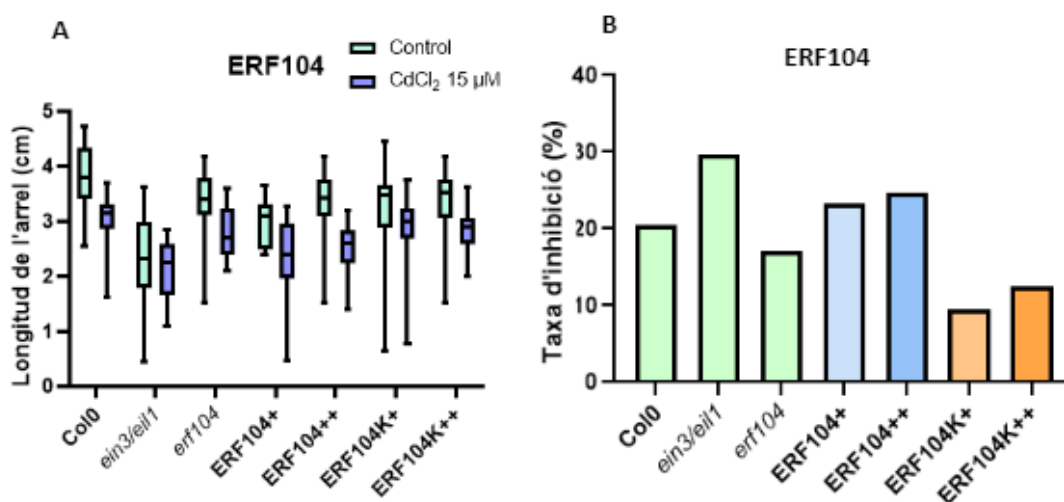


Figura 18: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant cadmi en plantes sobreexpressores d'*ERF104*. Longitud de l'arrel (cm) en medi MS control (verd) i amb 15 CdCl_2 μM (blau) (A) i taxa d'inhibició (%) (B).

Aquests resultats ens porten a concloure que la SUMOilació d'ERF2 sembla afectar positivament a la resistència al cadmi mentre que la SUMOilació d'ERF104 l'afecta negativament i la SUMOilació d'ERF6 no l'afecta.

En el cas del Bor es van veure diferències en 750 μM de H_3BO_4 i solament es van apreciar diferències en les plantes d'ERF2 (Figura 19). Les plantes Col-0 van desenvolupar unes arrels més llargues que les plantes transgèniques, amb una mitjana de 5 cm en medi MS control i de 4 cm en medi amb 750 μM H_3BO_4 . L'arrel de la varietat silvestre no es va veure molt afectada a l'exposició d'aquest metall per això la seva taxa d'inhibició va ser del 15%. La línia mutada *ein3/eil1* va desenvolupar arrels més curtes que Col-0. Aquesta línia sí que es va veure afectada per l'exposició al bor i la llargada de l'arrel va disminuir quasi el 50% del seu valor inicial. En comparació amb Col-0 la llargada de l'arrel en les plantes de sobreexpressió van ser d'un valor més baix, tot i que tampoc molt destacable. Dins d'aquest grup, la llargada de l'arrel de les plantes sobreexpressores amb la capacitat de SUMOilació (*ERF2+* i *ERF2++*) no es va veure tan afectada com en les plantes no SUMOilables (*ERF2K+* i *ERF2K++*), per això observem una taxa d'inhibició més petita en les plantes SUMOilables (Figura 19B). Així, sembla que tenir la capacitat de SUMOilar ERF2 confereix a les plantes resistència al bor.

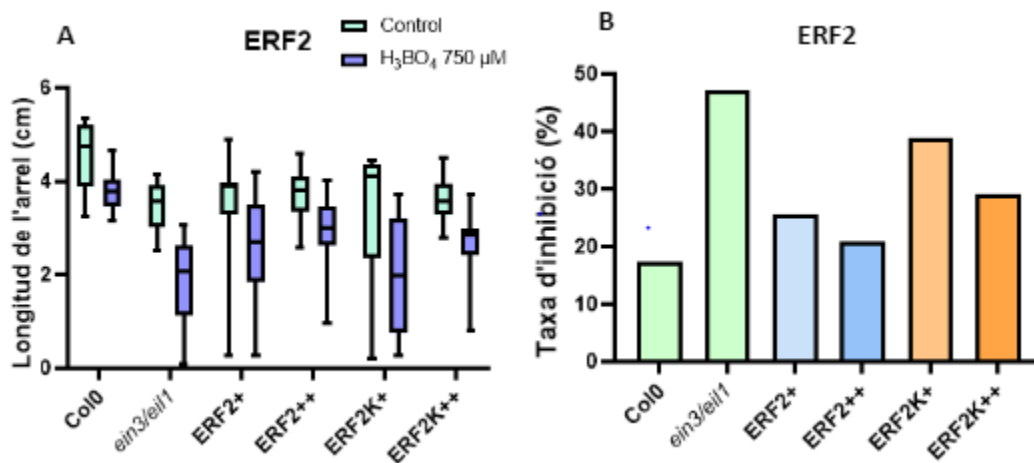


Figura 19: Anàlisi de la resposta de l'estrès davant bor en plantes sobreexpressores d'ERF2. Longitud de l'arrel (cm) en medi MS control (verd) i amb 15 CdCl_2 μM (blau) i taxa d'inhibició (%).

En el cas de Manganès, Zinc i cobalt no es van veure diferències significatives entre les diferents plantes (dades no mostrades).

- Resposta a l'estrès salí i osmòtic

En l'experiment per estudiar l'efecte de l'estrès salí i osmòtic sobre el creixement de les plantes es va analitzar l'àrea de la roseta de plantes de deu dies d'edat. En general, en plantes silvestres, aquests dos tipus d'estrès provoquen una disminució de l'àrea de la roseta de les plantes. L'acumulació d'aquests components en les plantes provoca danys en el teixit i senescència prematura de les fulles. Per induir estrès salí vam utilitzar NaCl i per induir estrès osmòtic, D-mannitol.

El creixement de la roseta en tots els casos va ser l'esperat i a mesura que augmentava la concentració de NaCl disminuïa l'àrea de la roseta. A partir de 100 mM de NaCl les plantes van mostrar intolerància significativa a l'estrès salí i no van ser capaces de sobreviure. Amb 25 mM de D-mannitol les plantes van obtenir una roseta molt reduïda en comparació en absència d'estrès.

La figura 20 mostra com a exemple el creixement de plantes Col-0, *ein3/eil1* i les plantes d'*ERF104* en medi control MS (A) i amb 150 mM NaCl (B).

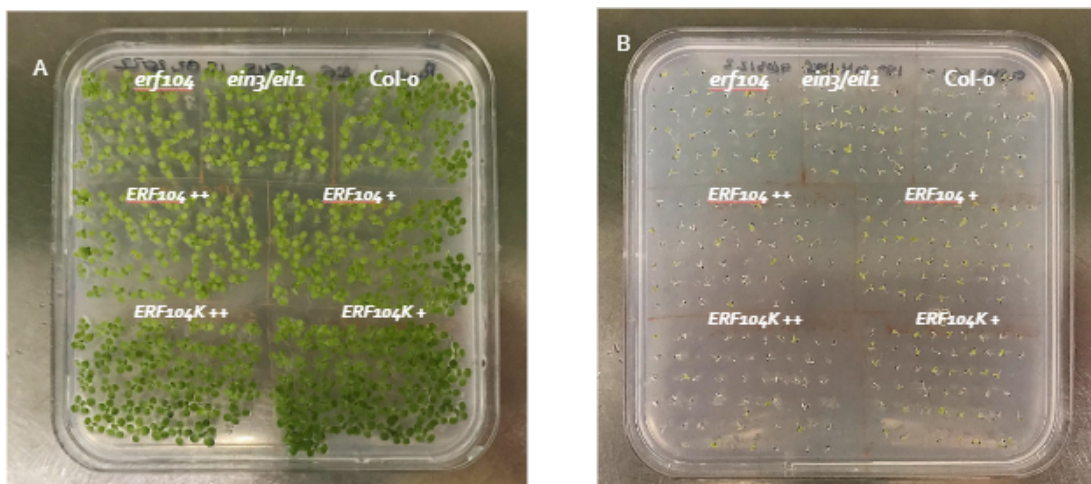


Figura 20 :Anàlisi de la resposta de l'estrès davant NaCl en plantes sobreexpressores d'*ERF104*. Fotografia de plàntules representatives de les diferents línies sobreexpressores d'*ERF104* després de 10 dies de creixement en medi control MS (A) i en presència de 150 mM NaCl (B). Controls: Col-0, *ein3/eil1* i *erf104*. Línies SUMOilables (*ERF104+* i *ERF104++*) i línies no SUMOilables (*ERF104K+* i *ERF104K++*).

Aquests resultats no es van quantificar, ja que fenotípicament a simple vista es va observar que no existien diferències significatives en l'àrea de la roseta de les diferents plantes. Ni front a estrès salí ni osmòtic no es van observar diferències en l'àrea de la roseta entre les plantes silvestres, mutants de pèrdua de funció i plantes de sobreexpressió d'*ERF2*, *6* i *104* SUMOilables i no SUMOilables.

Els resultats suggereixen que els factors de transcripció *ERF2*, *6* i *104* (i la seva SUMOilació) no tenen cap paper en la tolerància a l'estrès ni salí ni osmòtic, si més no en les condicions testades en aquest TFG.

5. Discussió

Els resultats d'aquest treball proporcionen informació útil per avançar en la comprensió de com actua la SUMOilació com a mecanisme de defensa postranscripcional i la importància de la regulació dels factors de transcripció ERF davant estressos abiòtics.

Sobre l'anàlisi del fenotip de plantes amb diferents nivells d'expressió dels gens *ERFs* amb capacitat de SUMOilació o sense en condicions normals (absència d'estrès) es van obtenir diversos resultats. Estudis previs havien revelat com la sobreexpressió d'alguns *ERFs* podia provocar a la planta canvis morfològics típics de plantes per tal de resistir o tolerar diferents estressos. Amb el present treball es va poder concloure que la senyalització de l'hormona etilè a través dels factors de transcripció ERF2, 6 i 104 no té un paper en la regulació de l'àrea de la roseta, longitud de la planta, longitud de l'arrel ni en la capacitat fotosintètica de les plantes.

En el treball es va confirmar com el factor de transcripció EIN3/EIL1 és un regulador clau de la senyalització de l'etilè. Els resultats que vam obtenir amb el mutant *ein3/eil1* van indicar que aquesta pèrdua de funció regula negativament el desenvolupament de la roseta, de l'allargament de la tija principal i radicular i l'inici de floració, en concordància amb els resultats de Ying Feng i col.laboradors al 2017.

Referent a l'anàlisi del fenotip de plantes amb diferents nivells d'expressió dels gens *ERFs* amb capacitat de SUMOilació o sense en condicions d'estrès, per una banda, en l'experiment amb etilè vam confirmar com la línia mutant *ein3/eil1* és insensible a l'etilè. Resultats similars van trobar Merchante y Stepanova (2017), on veien que aquest doble mutant no es veia afectat per l'addició d'ACC al medi. Per una altra banda, Hui Son i el seu grup d'investigació (2012) van estudiar el paper regulador que juga ERF5 en la resposta provocada per l'estrès induït per etilè. Aquests investigadors van exposar que les plantes sobreexpresores d'*ERF5* eren hipersensibles a l'etilè, ja que en comparació a les plantes silvestres presentaven hipocòtils més curts en presència d'aquesta hormona. En canvi, les plantes doble mutants *erf5/erf6* eren hiposensibles a l'etilè, ja que presentaven una longitud de l'hipocòtil major que les plantes silvestres i les sobreexpresores d'*ERF5*. Les dades van suggerir que ERF5 afecta la sensibilitat de les plantes a l'etilè i és un regulador positiu de la senyalització d'aquest (Hui Son et al., 2012). En el nostre cas vam treballar amb *ERF6* per estudiar si observàvem un comportament similar al d'*ERF5*,

però els resultats estadístics no van evidenciar que existissin diferències significatives entre les plantes de tipus silvestre i les sobreexpresores d'*ERF6*, i tampoc vam veure diferències entre si aquestes tenien la capacitat de SUMOilació o no. Sobre *ERF2* i *ERF104* no teníem informació prèvia sobre com afectaria l'etilè a l'hipocòtil d'aquestes plantes. Però amb el nostre experiment tampoc van evidenciar diferències entre les plantes de tipus silvestre i les sobreexpresores dels gens en qüestió, i tampoc vam veure diferències en si aquestes tenien la capacitat de SUMOilació o no. Per tant, semblaria que *ERF5* té un paper en la resposta provocada per l'estrès induït per etilè més important que el que puguin tenir *ERF2*, *6* i *104*.

Diversos estudis han destacat la possible implicació de l'etilè en l'adaptació o tolerància de les plantes a metalls tòxics, un exemple és el cas del grup d'investigació de Lu y Kirkham, que van suggerir que els genotips de plantes que sobreexpresaven gens que regulen la via de l'etilè eren més resistents als metalls que variants silvestres. En el nostre cas no vam poder afirmar aquest fet ja que la tendència observada va ser que la varietat de tipus silvestre arribava a desenvolupar arrels més llargues que les línies transgèniques, tant de pèrdua de funció com sobreexpresores. Però dins de les plantes de sobreexpressió amb la línia *ERF2++*, que contenia uns nivells d'expressió més alts, és va obtenir una taxa d'inhibició de l'arrel menor que en la línia *ERF2+* en els experiments amb coure, cadmi i Bor.

En l'estudi de la possible regulació dels *ERFs* mitjançant la conjugació SUMO vam obtenir resultats interessants amb alguns metalls. En el cas del coure, en totes les línies SUMOilables d'*ERF2*, *ERF6* i *ERF104* crescudes a 30 μM de CuSO_4 vam aconseguir un percentatge de reducció de l'arrel o taxa d'inhibició menor que en les línies no SUMOilables respecte a les plantes control crescudes en medi MS. És a dir, els resultats van demostrar que la SUMOilació d'*ERF2*, *ERF6* i *ERF104* regula positivament la resistència al coure.

En el cas del cadmi, amb la concentració de 15 μM de CdCl_2 , solament vam veure diferències en les línies *ERF2* i *ERF104*. En les plantes d'*ERF2*, les plantes amb capacitat de SUMOilació tenien una taxa de reducció d'arrel menor que les que mancaven aquesta capacitat. Cal destacar que la línia *ERF2++*, que conté uns nivells d'expressió més alts que les altres línies, va aconseguir un percentatge d'inhibició del 5%. És a dir, l'arrel d'aquesta línia es va mantenir quasi igual tant en el medi MS control com en el medi amb 15 μM de CdCl_2 . En el cas d'*ERF104*, es va veure el contrari, on les arrels de les plantes no SUMOilables aconseguien ser més llargues que les de

les SUMOilables. Aleshores, és pot conjecturar que la SUMOilació d'ERF2 regula positivament la resistència al cadmi mentre que la d'ERF104 ho fa negativament.

Amb el Bor, a una concentració de 750 μM de H_3BO_4 , es van obtenir resultats similars a l'experiment amb coure en la línia d' *ERF2*. La conclusió va ser també que la SUMOilació d'ERF2 sembla afectar positivament a la resistència al bor .

Pel que fa a l'estrès osmòtic, Dubois et al.(2013) van realitzar un estudi semblant amb les mateixes condicions inicials que nosaltres que van revelar que *ERF5* i *ERF6* són induïts per diversos estressos abiòtics. Van observar que el doble mutant *erf5/erf6* creixia millor sota estrès osmòtic que les plantes silvestres. En el nostre cas, tot i que no es van quantificar el resultat, no es van veure diferències ni amb les plantes sobreexpressores ni amb els mutants en comparació amb les silvestres, el que va suggerir que *ERF2*, *ERF6* i *ERF104* no tenen un paper principal o significatiu en la tolerància a l'estrès salí ni osmòtic. Per tant no podem demostrar que aquests factors de transcripció siguin reguladors del creixement de les fulles sota condicions d'estrès osmòtic o salí.

Sobre les tendències observades en els nostres experiments, s'haurien de realitzar més repeticions per veure si es podria arribar a aconseguir una significança vàlida. També es suggereix que tot i que sembla que SUMO afecta el fenotip de les plantes, existeixen molts altres reguladors que podrien tenir un paper més rellevant.

El coneixement sobre els factors de transcripció involucrats en respostes a estrès abiòtic és encara limitat. Es requereix amb urgència una investigació en aquesta àrea. Moltes plantes transgèniques que sobreexpressen factors de transcripció mostren una tolerància millorada a l'estrès abiòtic, però aquests resultats han d'analitzar-se acuradament, ja que normalment s'avaluen pocs paràmetres i les condicions de creixement/estrès dels assaigs de laboratori poden ser diferents de les condicions naturals del camp.

6. Conclusions

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball, es poden extreure les conclusions següents:

- En condicions normals (absència d'estrès) no existeixen diferències significatives sobre els paràmetres d'àrea de la roseta, longitud de la tija principal i de l'arrel entre plantes silvestres d' *A. thaliana* i plantes sobreexpresores dels gens *ERF2*, *6* i *104* SUMOilables i no SUMOilables.
- En absència d'estrès, la SUMOilació té un paper positiu (accelera el procés) en l'inici de floració de les plantes sobreexpresores del gen *ERF2* i un paper negatiu (retarda la floració) en les plantes sobreexpresores d'*ERF6*. I *ERF104* no té un paper en determinar l'inici de floració de les plantes.
- *ERF2*, *6* i *104* amb capacitat de SUMOilació i sense no regulen la capacitat fotosintètica de les plantes.
- La inducció dels gens *ERF2*, *ERF6* i *ERF104* per etilè no té un efecte sobre l'allargament de l'hipocòtil.
- La SUMOilació d'*ERF2* confereix tolerància als metalls coure, cadmi i bor, i la SUMOilació d'*ERF6* i *104* confereix únicament tolerància al coure.
- La SUMOilació d'*ERF104* afecta negativament la tolerància al cadmi.
- Els factors de transcripció *ERF2*, *ERF6* i *ERF104* no semblen tenir cap paper en la tolerància a l'estrès salí o osmòtic, almenys en les nostres condicions experimentals.

7. Bibliografia

Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J. (2007). Regulation of ethylene biosynthesis. In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 26, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s00344-007-0013-5>

Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. In *Plant Molecular Biology* (Vol. 69, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., & Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of Molecular Biology*, 280(2). <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1839>

Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., & Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, 108(3). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00630-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00630-X)

Berrocal-Lobo, M., Molina, A., & Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, 29(1), 23–32. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01191.X>

Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J. F., Pöschl, Y., Gust, A. A., Scheel, D., & Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 8067–8072. https://doi.org/10.1073/PNAS.0810206106/SUPPL_FILE/ST1.XLS

Bolt, S., Zuther, E., Zintl, S., Hinch, D. K., & Schmölling, T. (2017). ERF105 is a transcription factor gene of Arabidopsis thaliana required for freezing tolerance and cold acclimation. *Plant, Cell & Environment*, 40(1), 108–120. <https://doi.org/10.1111/PCE.12838>

Butts, I. A. E., Hilmarsdóttir, G. S., Zadmajid, V., Gallego, V., Støttrup, J. G., Jacobsen, C., Krüger-Johnsen, M., Politis, S. N., Asturiano, J. F., Holst, L. K., & Tomkiewicz, J. (2020). Dietary amino acids impact sperm performance traits for a catadromous fish, *Anguilla anguilla* reared in captivity. *Aquaculture*, 518. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734602>

Cook, D. E., Mesarich, C. H., & Thomma, B. P. H. J. (2015). Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>

Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 1970 227:5258, 227(5258), 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>

Dolgikh, V. A., Pukhovaya, E. M., & Zemlyanskaya, E. V. (2019). Shaping Ethylene Response: The Role of EIN3/EIL1 Transcription Factors. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1030. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01030/BIBTEX>

Dubois, M., Skirycz, A., Claeys, H., Maleux, K., Dhondt, S., De Bodt, S., Vanden Bossche, R., De Milde, L., Yoshizumi, T., Matsui, M., & Inzé, D. (2013). ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 acts as a central regulator of leaf growth under water-limiting conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(1). <https://doi.org/10.1104/pp.113.216341>

Ecker, J. R. (1995). The Ethylene Signal Transduction Pathway in Plants. *Science*, 268(5211), 667–675. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7732375>

Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., Gong, Y., Xin, Y., Zhu, Z., Wang, Y., & Guo, H. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(52), 13834–13839. https://doi.org/10.1073/PNAS.1711723115/SUPPL_FILE/PNAS.201711723SI.PDF

Fuertes, D. (2022). SUMOylation at the crosstalk between development and defense response. *Tesis en preparación*.

Heun, P. (2007). SUMO Organization of the nucleus. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 19, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.04.014>

Huang, P. Y., Catinot, J., & Zimmerli, L. (2016). Ethylene response factors in Arabidopsis immunity. *Journal of Experimental Botany*, 67(5). <https://doi.org/10.1093/jxb/erv518>

HUI SON G. H., WAN J., JIN KIM H., CANH NGUYEN X., SIK CHING W., CHAN HONG J., STACEY G. (2012). *Ethylene-Responsive Element-Binding Factor 5, ERF5, Is Involved in Chitin-Induced Innate Immunity Response*. MPMI. Vol. 25, pp: 48-60 <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0165>

Jensen, O. N. (2006). Interpreting the protein language using proteomics. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 6). <https://doi.org/10.1038/nrm1939>

Johnson, E. S., & Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, *106*(6). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00491-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00491-3)

Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. In *Nature* (Vol. 444, Issue 7117). <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Kerscher, O., Felberbaum, R., & Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093503>

Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D. Y., & Vierstra, R. D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of sumo1 and -2 conjugates is increased by stress. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(9). <https://doi.org/10.1074/jbc.M209694200>

Lois, L. M., Lima, C. D., & Chua, N. H. (2003). Small ubiquitin-like modifier modulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, *15*(6). <https://doi.org/10.1105/tpc.009902>

Lu, WP y Kirkham, MB (1991). Tolerancia genotípica a los metales según lo indicado por la producción de etileno. *Contaminación del suelo del aire del agua*. 57–58, 605–615. <https://doi.org/10.1007/BF00282924>

Mattoo, A. K., & Suttle, J. C. (2018). The plant hormone ethylene. In *The Plant Hormone Ethylene*. <https://doi.org/10.1201/9781351075763>

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5389). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.282.5389.662>

Merchante, C., & Stepanova, A. N. (2017). The triple response assay and its use to characterize ethylene mutants in arabidopsis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1573). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6854-1_

Merino Pérez, J., José, M., & Borge, N. (2020). *FISIOLOGÍA GENERAL REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA INTRODUCCIÓN*.

Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A. S., Raghothama, K. G., Baek, D., Koo, Y. D., Jin, J. B., Bressan, R. A., Yun, D. J., & Hasegawa, P. M. (2005). The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.0500778102>

Moffat, C. S., Ingle, R. A., Wathugala, D. L., Saunders, N. J., Knight, H., & Knight, M. R. (2012). ERF5 and ERF6 Play Redundant Roles as Positive Regulators of JA/Et-Mediated Defense against *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. *PLOS ONE*, 7(4), e35995. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035995>

Saibo, N. J. M., Lourenço, T., & Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103(4), 609–623. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCN227>

Sharma, M., Fuertes, D., Perez-Gil, J., & Lois, L. M. (2021). SUMOylation in Phytopathogen Interactions: Balancing Invasion and Resistance. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.703795>

Stulemeijer, I. J. E., & Joosten, M. H. A. J. (2008). Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00468.x>

Talamillo, A., Barroso-Gomila, O., Giordano, I., Ajuria, L., Grillo, M., Mayor, U., & Barrio, R. (2020). The role of SUMOylation during development. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 48, Issue 2). <https://doi.org/10.1042/BST20190390>

Tiessen, A., Gómez-Merino, F.C., T rejo-Téllez, L.I., López-Fabre, A., Padilla Chacón, D., Vargas-Ortiz, E., y Palacios-Rojas, N. (2009) Fundamentos y Metodología innovadoras para el Mejoramiento Genético de Maíz https://www.researchgate.net/publication/240585743_Factores_de_transcripcion