

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ATHB40.

Mora, Catia Celeste¹

¹Laboratorio de Biología Vegetal, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, factores de transcripción, *AtHB40*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas responden a las variaciones del ambiente generando cambios moleculares y fisiológicos capaces de atenuar los efectos de las condiciones adversas que afectan su crecimiento y desarrollo. Algunas de estas respuestas específicas se dan por la regulación mediada por factores de transcripción (FTs) de vías de transducción de señales.

Los FTs son proteínas capaces de reconocer y unir secuencias de ADN específicas presentes en regiones regulatorias de genes blancos. En general, estas proteínas presentan dos dominios: uno de unión al ADN y otro de interacción con proteínas, este último es el que media, directa o indirectamente, la activación o represión de la transcripción al unirse a proteínas de la maquinaria transcripcional (Brivanlou - Darnell et al. 2002). Los FTs son especialmente abundantes en plantas, representando aproximadamente el 6 % de los genes de *Arabidopsis thaliana* (Riechmann et al., 2000). La caracterización funcional de los FTs permite identificar cuáles juegan un papel importante en las respuestas de plantas a diferentes estímulos ambientales. Este conocimiento puede, en ciertas ocasiones, utilizarse para generar herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de cultivos en sus respuestas frente a distintos tipos de estrés (Vasil et. al., 2003).

La familia HD-Zip (homeodominio-cierre de leucinas) es exclusiva de plantas, sus miembros poseen un dominio de unión a ADN de tipo caja homeótica (del inglés, *homeobox*) seguido de un dominio de tipo cierre de leucinas (LZ, del inglés *leucine zipper*) que les permite formar homo- o heterodímeros, condición necesaria para la unión a ADN. La familia de FTs HD-Zip está compuesta por cuatro subfamilias (Ariel et al. 2007). Particularmente, los miembros de la subfamilia I han sido estudiados y vinculados principalmente a respuestas de tolerancia a estrés abiótico.

En el laboratorio en el que se desarrolla la cientibeca, se estudian los FTs HD-Zip tipo I; en forma particular el objetivo de este trabajo es la caracterización funcional del gen *AtHB40* del cual se desconoce su papel.

OBJETIVOS

Proyecto: Caracterización funcional de los factores de transcripción AtHB22 y AtHB40. Un estudio particular sobre su participación en la respuesta a estrés abiótico mediadas por JUB.

Director del proyecto: Raquel Lía Chan

Director del becario/tesista: Pamela Anahí Ribone

El objetivo principal de este trabajo es el de caracterizar funcional y molecularmente al factor de transcripción HD ZIP I *AtHB40*.

METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el estudio de la función del gen *AtHB40*, se plantearon tres estrategias principales: 1) **Obtención de líneas mutantes *athb40***. Se adquirieron semillas de mutantes insercionales en *AtHB40* de la línea SALK (ABRC, <http://www.arabidopsis.org>; Columbus, OH, USA) para luego obtener plantas homocigotas. 2) **Obtención de plantas transgénicas sobreexpresantes** del gen *AtHB40* en fondo *Col-0* 3) Aislamiento de la región promotora de *AtHB40* y **obtención de plantas transformadas con este promotor fusionado al gen reportero GUS** en fondo *Col-0*.

Selección de plantas mutantes homocigotas

La selección de las plantas silenciadas se realizó en placas con medio MS 0.5X-Agar 0.9 % suplementado con el antibiótico kanamicina (50 µg/ml). Se sembraron semillas de las tres líneas de mutantes adquiridas (SALK_015635, SALK_115125 y SALK_048332) y se trasplantaron las plántulas resistentes a la selección. La homocigosis se determinó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo a Sessions y colaboradores (2002). Se comprobó la no expresión de *AtHB40* por RT-PCR cuantitativa utilizando los controles adecuados.

Expresión ectópica y constitutiva del gen *AtHB40*.

Para obtener plantas que expresen de forma ectópica y constitutiva el gen *AtHB40* se generó una construcción en la que el promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S) dirige la expresión de *AtHB40*. Para ello la secuencia codificante de *AtHB40* (649 pb) se amplificó mediante PCR utilizando como molde cDNAs de *Arabidopsis thaliana*. El amplicón obtenido fue subclonado en el vector *pGEM-T Easy* (Promega) y posteriormente se clonó en los sitios *SacI* y *KpnI* del vector *pBI122*. **Transformación de plantas mediante el método de inmersión floral utilizando *Agrobacterium tumefaciens***: Las transformaciones estables de plantas de *Arabidopsis* se realizaron mediante el método de inmersión floral (Clough et al., 1998). **Selección de plantas transgénicas T1**. La selección de las plantas transformadas se realizó en placas con medio MS 0.5 x-Agar 0.9 % suplementado con el antibiótico kanamicina (50 µg/ml). Teniendo en cuenta que el ADN-T se inserta aleatoriamente en el genoma, se aislaron 15 líneas con inserciones independientes para posteriores análisis.

Expresión de genes reporteros bajo el control del promotor de *AtHB40*.

Un fragmento de 1989 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHB40* se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos específicos a partir de ADN genómico de plantas salvajes. El amplicón obtenido se clonó en el vector *pEntrD-Topo* (Invitrogen), y luego se introdujo en el vector *pKGWFS7* mediante tecnología GATEWAY. Esta construcción permite obtener plantas en las que el promotor de *AtHB40* dirige la expresión de los genes reporteros *GFP* y *GUS*.

Caracterización fenotípica de plantas mutantes de *AtHB40*

En todos los casos, las plantas se cultivaron en placas con medio MS 0.5 x-Agar 0.9 % a 21 °C en condiciones de día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad). La caracterización fenotípica de las líneas mutantes incluyó la medición de área foliar expuesta y la longitud de las raíces. En ambos ensayos fueron sembradas plantas Col 0 a modo de control. Para la cuantificación del área foliar expuesta se tomaron fotografías a los 15 días. Para la medición de la longitud de las raíces se crecieron las plantas en placas verticales y se fotografiaron. En ambos casos se procesaron las imágenes con el software ImageJ.

Ensayo de sequía en plantas mutantes de *athb40*

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en macetas de 10 cm de diámetro con sustrato Klasmann TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH) en condiciones de día largo a una temperatura de 21 °C. En todos los ensayos se utilizaron plantas Col 0 a modo de control. **Pérdida de agua en hojas:** desde la salida del botón floral en las plantas, éstas se sometieron a estrés severo (suspensión total del riego). Periódicamente se cortaron hojas, se pesaron y se sumergieron en agua durante al menos 5 h; luego se pesaron nuevamente. Esto se repitió hasta registrar la muerte de las plantas.

RESULTADOS:

Obtención de plantas homocigotas mutantes *athb40*

Se seleccionaron dos plantas homocigotas, una para cada una de las mutantes adquiridas. Con las semillas de estas plantas se realizaron los subsiguientes análisis.

AtHB40 regula negativamente la elongación de la raíz principal y la expansión de las hojas

Para caracterizar las plantas mutantes obtenidas se evaluó el área foliar expuesta de las mismas. Los resultados obtenidos muestran que las plantas mutantes *athb40* de 15 días presentan un área mayor que las plantas de genotipo salvaje *Col 0* (Figura 1-A).

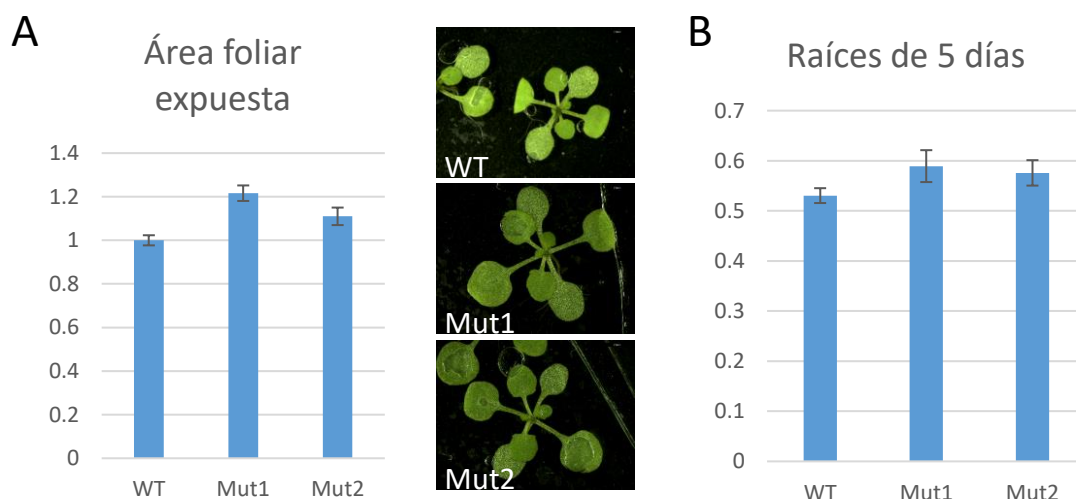


Figura 1: **A:** a la izquierda se muestra la cuantificación del área foliar expuesta de plantas Col 0 y dos líneas mutantes *athb40*. En el centro se muestran fotografías ilustrativas de las utilizadas para la cuantificación del área expuesta. **B:** medidas de longitud de raíces de plantas mutantes *athb40* y Col 0 a los 5 días de germinadas las semillas.

Se evaluó también la longitud de la raíz principal. Para ello se procedió tal como se explica en Metodología y los resultados obtenidos se resumen en la Figura 1-B, en la que se muestra que las plantas mutantes *athb40* poseen raíces más largas que los controles correspondientes.

Las mutantes *athb40* son más susceptibles al estrés hídrico que sus controles

Los factores de transcripción HD-Zip I están en general relacionados con la tolerancia a distintos tipos de estrés abiótico, por lo que se realizó un ensayo de sequía severa en las plantas mutantes de *AtHB40*. Se vio una susceptibilidad de éstas dicho estrés,

comparadas con plantas control, pero esta diferencia es leve. En la figura 2 se grafica el porcentaje de agua perdido por las hojas de cada genotipo en diferentes tiempos.

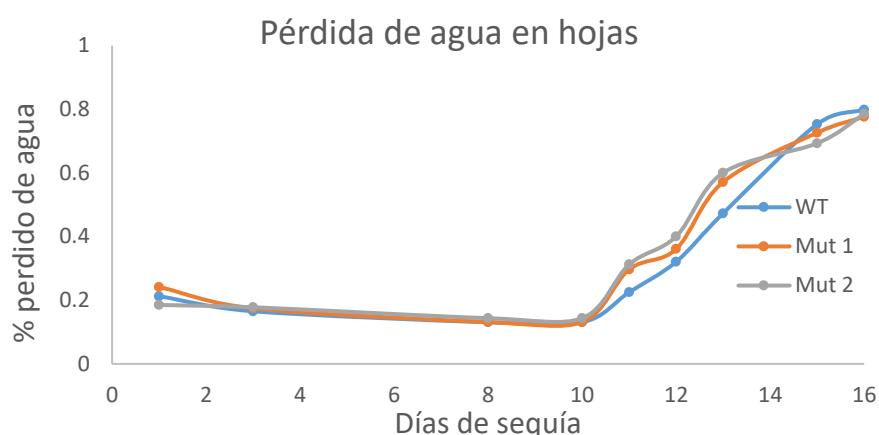


Figura 2: Porcentaje perdido de agua en hojas de los distintos genotipos estudiados en periodo de sequía severa.

Los primeros ensayos de caracterización fenotípica indican que *AtHB40* está involucrado en el desarrollo en condiciones normales de la planta en los primeros estadios de la misma. Tanto la medición de elongación de raíces como del área expuesta nos llevan a preguntarnos si los fenotipos diferenciales se generan por una mayor expansión celular, una mayor tasa de división celular o una combinación de ambos parámetros. Se están planeando nuevos ensayos para determinar esto.

Obtención de plantas sobreexpresantes del gen *AtHB40* y plantas *prAtHB40:GUS*

En ambos casos se generaron las construcciones necesarias descritas en Metodología, se corroboró la secuencia mediante secuenciación y se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* con esas construcciones. Posteriormente se realizó la transformación por inmersión floral de plantas Col 0 y actualmente nos encontramos seleccionando plantas de la primera generación.

Las plantas sobreexpresantes y aquellas portando el promotor fusionado a un gen reportero serán herramientas muy útiles para complementar los resultados obtenidos hasta el momento y determinar el accionar de *AtHB40*. Actualmente se está llevando a cabo la selección de plantas de la primera filial en ambos casos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison C, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, and Goff SA, 2002. A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell*, 14, 2985–2994.
- Ariel F, Manavella P, Dezar C, Chan R, 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science*, 12:419-426.
- Brivanlou A, Darnell JE Jr, 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295:813-818.
- Clough, SJ. and Bent, AF, 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16, 735-743.
- Ratcliffe, OJ; Samaha, RR; Creelman, R; Pilgrim, M; Broun, P; Zhang, JZ; Ghandehari, D; Sherman, BK; Yu, G-L, 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290:2105-2110.
- Riechmann, JL; Heard, J; Martin, G; Reuber, L; Ziang, C-Z; Keddie, J; Adam, L; Pineda, O; Vasil IK, 2003. The science and politics of plant biotechnology; a personal perspective. *Nature Biotechnology* 21:849-851.