

ESTUDIO DEL ROL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *AtHB5* EN EL TRANSPORTE DE AZÚCARES DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

Raminger, Lorena.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral – CONICET.
Directora: Cabello, Julieta Virginia.

Área: Ciencias Biológicas.

INTRODUCCIÓN.

Los factores de transcripción (FTs) son proteínas capaces de reconocer secuencias específicas en los genes que actúan como sus blancos, unirse a ellas y desencadenar una cascada de señalización activando o reprimiendo vías de transducción de señales. Estos FTs se dividen en familias y subfamilias en base a las diferencias que presentan en las estructuras de sus dominios de unión a ADN, los procesos fisiológicos en los que participan y las estructuras de los genes que los codifican. Una de dichas familias, llamada HD-Zip, se caracteriza por la presencia de un homeodominio (HD) asociado a un cierre de leucinas (LZ, del inglés Leucine Zipper). La familia HD-Zip se divide a su vez en 4 subfamilias (I a IV) de acuerdo a la conservación del dominio HD-Zip, el tamaño, la presencia de otros dominios y la estructura de los genes que codifican las proteínas (Ariel et al., 2007).

AtHB5 es un factor de transcripción de tipo HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*, reprimido por estrés hídrico y por la presencia de ABA (Söderman y col., 1994) y regulador negativo de genes regulados por auxinas (De y col., 2013). Estudios previos realizados en este laboratorio mostraron que el tallo principal de las plantas *athb5* es más ancho y lignificado que el de las plantas WT. Estas plantas tienen menos acumulación de almidón en las hojas de roseta que en las plantas WT. Las plantas *35S:AtHB5* presentan un fenotipo opuesto, caracterizado por una mayor concentración de almidón en las hojas en roseta y menor en las caulinares respecto de las WT. Estos resultados llevaron a pensar que *AtHB5* estaría involucrado en el transporte de azúcares solubles a través de la vara principal de *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS.

El objetivo principal es dilucidar la función de *AtHB5* en el transporte de azúcares solubles a través de la vara principal de *Arabidopsis thaliana*

METODOLOGÍA.

Para la realización de los ensayos se utilizaron plantas wild-type (WT) de *Arabidopsis thaliana* de ecotipo Columbia-0, como también dos líneas mutantes en el gen *AtHB5* (*athb5 mut 1* y *athb5 mut2*) obtenidas del banco de mutantes ABRC (www.arabidopsis.org) y tres líneas con distintos niveles de sobreexpresión de este FT (*4-AT5*, *13-AT5* y *K-AT5*).

Las técnicas utilizadas en este plan de trabajo son de uso habitual en el laboratorio y

Título del proyecto: Obtención de plantas transgénicas con menor contenido de lignina, potencialmente útiles para la obtención de biocombustibles.

Instrumento: CONICET

Año de convocatoria: 2015 - 2016

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2015); Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 2016)

Director/a: Cabello, Julieta Virginia.

normalmente siguen protocolos debidamente establecidos de Ingeniería Genética (Ausubel y col., 1983; Sambrook y col., 1989) y Biotecnología Vegetal. Esto incluye la realización de clonados moleculares en vectores binarios adecuados para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y posterior transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* por el método de floral dip (Clough y Bent, 1998) y expresión en plantas. Los estudios de expresión de los transgenes se hicieron por la técnica de RT-PCR cuantitativa.

Los cortes histológicos se llevaron a cabo mediante técnicas de inclusión en parafina, tomando muestras del tallo de la planta, siguiendo el protocolo descrito en Moreno-Piovan et al., 2017. La cuantificación del área lignificada se realizó utilizando el programa ImageJ.

Los niveles de almidón, glucosa y sacarosa se cuantificaron siguiendo la técnica de Strand y col., 1999. Las mediciones se realizaron con un kit de determinación de glucosa enzimática a una absorbancia de 505 nm.

La callosa presente en hojas de *Arabidopsis thaliana*, se observó luego de teñir con colorante azul de anilina. La observación se realizó con un microscopio de fluorescencia (Leica).

Finalmente, la cuantificación del largo de raíces se realizó sobre plántulas de 6 días, crecidas en oscuridad y con un medio MS al que se le agregó sacarosa al 4%, utilizando como control osmótico un medio con MS + sorbitol en la misma molaridad.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Las plantas mutantes *athb5* tienen tallos más anchos con mayor área xilemática que las WT: Luego de la caracterización fenotípica de las plantas mutantes *athb5* pudimos observar que presentan tallos más anchos y más lignificados que sus pares WT, mientras que las líneas sobreexpresantes mostraron tallos más angostos y menos lignificados que las WT. La cuantificación de estos niveles de lignificación muestra que la cantidad de lignina asociada a xilema en relación con el área xilemática total del tallo es mayor para las mutantes *athb5*; y menor para las sobreexpresantes *ATHB5*. La tinción con Safranina/Fast Green permitió ver mayor cantidad de haces xilemáticos en plantas mutantes *athb5* con respecto a las WT, y una menor cantidad de los mismos en las líneas sobreexpresantes (Figura 1)

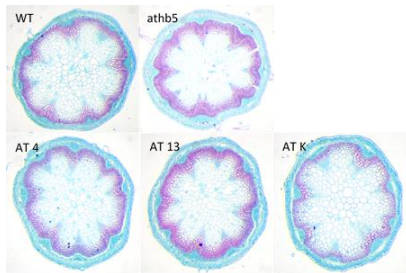


Figura 1: Tinción diferencial con Safranina/Fast Green de xilema (violeta) y floema (azul) sobre cortes histológicos de tallos de plantas WT, mutantes *athb5* y tres líneas sobreexpresantes.

Las plantas 35S:*AtHB5* acumulan azúcares solubles en sus rosetas: Con el objetivo de averiguar la cantidad de azúcares solubles en estas plantas, se tomaron muestras de hojas de roseta y de la primera, segunda y tercera ramificación. Las plantas mutantes *athb5* tienen menor cantidad de glucosa en sus rosetas que las WT, y las sobreexpresantes una mayor concentración (Gráfico 1). Este resultado se ve invertido en la última hoja de la vara floral, donde las líneas sobreexpresantes muestran una menor concentración de glucosa que las WT y la línea mutante una concentración mayor. Lo mismo se observa en el caso de la sacarosa.

La sacarosa es la forma en que la planta transporta, vía floema, los azúcares desde los tejidos fuente hasta los llamados sumidero. Si este transporte se ve disminuido la sacarosa comienza a acumularse en un tejido determinado, como sucede en las hojas de roseta de

las plantas sobreexpresantes, donde su excesiva acumulación lleva a su conversión a almidón, la forma de acumulación de azúcares de reserva, lo que explica la ya reportada mayor acumulación de este polímero allí.

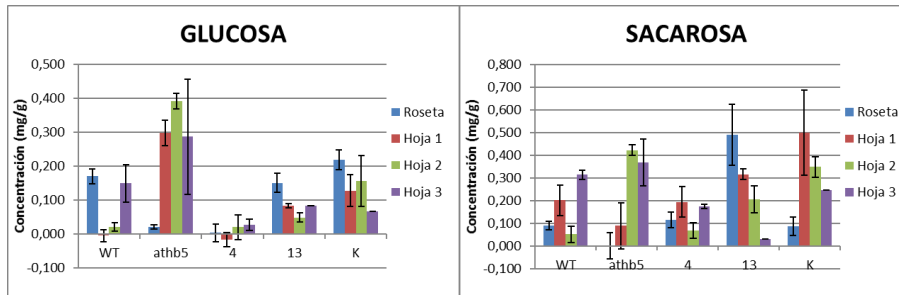


Gráfico 1: cuantificación de glucosa y sacarosa en líneas WT, *athb5* y sobreexpresantes. Las mediciones se muestran en mg. de azúcar por g. de tejido.

AtHB5 regula otros HD-Zip de la misma subfamilia: Con el objetivo de dilucidar la función regulatoria de *AtHB5*, realizamos extracciones de ARN y posterior cuantificación de los niveles de expresión de *AtHB5* y otros miembros de la misma subfamilia como *AtHB6* y *AtHB16*. Los resultados muestran que los niveles de *AtHB5* van disminuyendo a medida que nos acercamos al ápice de la planta. La expresión de *AtHB6* aumenta en las plantas *athb5*, particularmente en la hoja 3, y disminuye en la sobreexpresante (Gráfico 2). Con *AtHB16* sucede lo opuesto, se induce en sobreexpresantes y disminuye en mutantes *athb5*, lo que sugeriría que *AtHB5* interactúa positivamente con *AtHB16*. Estos resultados podrían deberse a que *AtHB5* ejerce su acción solo sobre uno de estos dos factores de transcripción, que se regulan entre sí. Como estudio complementario, realizamos cruza entre las plantas transformadas con los promotores de *AtHB6* y *AtHB16* con las plantas *athb5* y *35S:AtHB5*. Luego de realizar la tinción histoquímica, pudimos observar que la sobreexpresión de *AtHB5* inhibe la expresión del promotor de *AtHB16* en raíces (Figura 2).

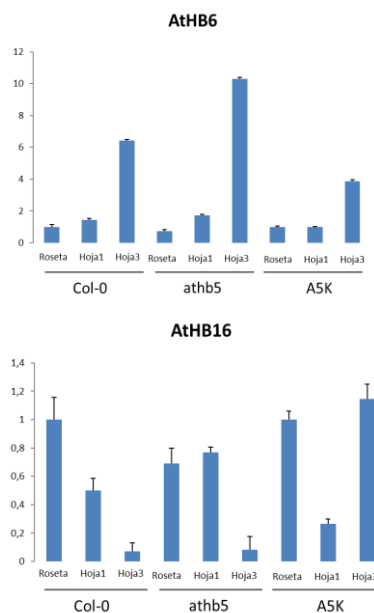


Gráfico 2: cuantificación de los niveles de expresión de *AtHB6* y *AtHB16* en plantas WT, *athb5* y *K-AT5*.



Figura 2: a la izquierda plántula transformada con promotor de *AtHB16*, a la derecha cruza de promotor *AtHB16* con *K-AT5*.



Figura 3: a la izquierda, promotor *AtHB6* fusionado a GUS; a la derecha cruza de promotor *AtHB6* con *athb5*.

La diferencia entre estos resultados y los obtenidos por cuantificación por qPCR (donde la sobreexpresión de *AtHB5* hacía aumentar la expresión de *AtHB16*) pueden deberse a que la regulación ejercida por *AtHB5* sobre el promotor de *AtHB16* depende de en las distintas etapas del desarrollo.

Las mutantes *athb5* permiten que el promotor de *AtHB6* se exprese en haces vasculares de cotiledones (Figura 4), estos datos se conciben con los mayores niveles de expresión de *AtHB6* cuantificados por qPCR en mutantes de *AtHB5*.

La disminución en el transporte de azúcares en las plantas 35S:AtHB5 podría deberse a la acumulación de callosa en su sistema vascular: Una de las causas de la disminución del transporte de azúcares es la deposición de callosa en los haces vasculares. Las plantas sobreexpresantes de *AtHB5* acumulan mayor cantidad de callosa en el floema que sus pares WT (Figura 4) lo que podría ser el motivo de la distribución de azúcares en sus hojas.

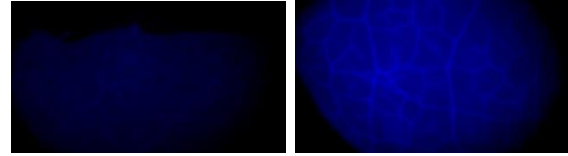


Figura 4: Izquierda vasculatura de hojas WT; derecha, 13-AT5.

Las plantas 35S:AtHB5 presentan raíces más cortas que las plantas WT: Sabíamos, por resultados previos, que las plantas *athb5* tienen raíces más largas y las 35S:AtHB5 más cortas que las plantas WT. Con el objetivo de dilucidar si estas plantas presentan una diferencia en la captación de azúcares externos las crecimos en oscuridad durante 6 días, en presencia o ausencia de Sacarosa y Sorbitol. En oscuridad, las plantas utilizan toda la energía disponible para la elongación del hipocotilo en detrimento del crecimiento de la raíz. En esta condición no se observaron diferencias entre los genotipos. Pero cuando agregamos sacarosa al medio, observamos que las plantas *athb5* son capaces de incorporarla, transportarla y crecer sus raíces en mayor proporción que las plantas WT, mientras que con las líneas 35S:AtHB5 sucede lo opuesto (Gráfico 3).

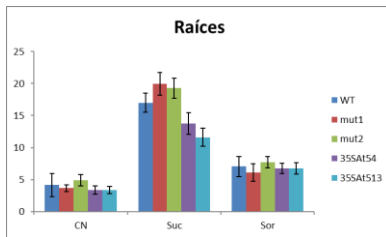


Gráfico 3: cuantificación del largo de raíces de plantas mutantes y sobreexpresantes de *AtHB5* crecidas en oscuridad v sacarosa 4%.

En conclusión, *AtHB5* estaría regulando negativamente el transporte de azúcares en *Arabidopsis thaliana* favoreciendo la acumulación de callosa. También demostramos que *AtHB5* regula a sus HD-Zip I más cercanos evolutivamente, *AtHB6* y *AtHB16*.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA.

- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL., 2007 "The true story of the HD-Zip family". Trends in Plant Science. 12: 419-426.
- Söderman E, Mattsson J, Svenson M, Borkird C, Engström P, 1994 "Expression patterns of novel genes encoding homeodomain-leucine zipper proteins in *Arabidopsis thaliana*". Plant Mol. Biol. 26: 145-154.
- De S, Lau S, Ehrismann JS, Axiotis I, Kolb M, Kientz M, Weijers D, Jürgens G, 2013 "Transcriptional repression of *BODENLOS* by HD-ZIP transcription factor *HB5* in *Arabidopsis thaliana*". J Exp Bot. 64: 3009-3019.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1983 "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons, N.Y.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press", Cold Spring Harbor, N.Y.
- Clough SJ, Bent AF, 1998 "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*" 16: 735-743.
- Moreno-Piovanos GS, Moreno JE, Cabello JV, Arce AL, Otegui ME, Chan RL, 2017 "A role for *LAX2* in regulating xylem development and lateral-vein symmetry in the leaf". Annals of Botany. 120(4):577-590
- Strand A, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardeström P, Stitt M, 1999 "Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway". Plant Physiol. 119:1387-1398.