

EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AtHB20 DE ARABIDOPSIS THALIANA TIENE UNA FUNCIÓN ESENCIAL EN EL DESARROLLO DE RAÍCES

Murguía, José Pablo

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL (UNL-CONICET)

Directora: Miguel, Virginia Natalí

Codirectora: Spies, Fiorella Paola

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: AtHB20, Arabidopsis, raíz

INTRODUCCIÓN

Las plantas se enfrentan constantemente a cambios ambientales, lumínicos y nutricionales. Dado que no pueden desplazarse para mejorar sus condiciones de crecimiento, desencadenan numerosos mecanismos de señalización y comunicación celular para afrontar y tolerar las situaciones desfavorables. Dependiendo de la señal percibida, se ponen en juego interacciones únicas entre diferentes moléculas biológicas. También se activan proteínas reguladoras, llamadas factores de transcripción (FTs), que inducen o reprimen de manera coordinada la transcripción de otros genes de respuesta, modificando el entorno transcripcional (Aarts y Fiers, 2003). La magnitud y tipo de respuesta depende de la especie vegetal y de los factores externos en cuestión, pero siempre, en los primeros pasos de las vías de señalización, intervienen los FTs. Estas proteínas se caracterizan por tener un dominio de unión a ADN, a través del cual se unen a sus secuencias de ADN blanco y de esta manera activan o reprimen vías de transducción de señales completas, modificando así el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma de la planta. Además del dominio de unión a ADN, los FTs tienen un dominio de activación/represión y otros dominios con funciones muy variadas como interactuar con otras proteínas o sufrir modificaciones postraduccionales (González y col., 2016). Las características del dominio de unión a ADN, la presencia de otros motivos, y la estructura génica, permiten clasificar a los aproximadamente 2000 FTs identificados en Arabidopsis, en familias y subfamilias (Riechmann, 2002). Una de estas familias que sólo existe en el reino *plantae* es la familia HD-Zip, cuyos miembros se caracterizan por tener un homeodominio (HD), responsable de la unión al ADN, asociado a un cierre de leucinas (Zip, *Leucine zipper* por sus siglas en inglés) a través del cual pueden homo- o hetero- dimerizar con otros miembros de la misma familia u otras familias, lo que permite una regulación muy fina de acuerdo a las interacciones generadas (Perotti y col., 2017). A su vez esta familia se divide en 4 subfamilias (I a IV) de acuerdo a características

Título del proyecto: Regulación de eventos del desarrollo vegetal en respuesta a factores externos.
Participación de los factores de transcripción de la familia homeodominio-cierre de leucinas tipo I
Instrumento: PICT
Año convocatoria: 2017
Organismo financiador: MINCyT
Directora: Chan, Raquel Lía

estructurales, funciones y procesos fisiológicos, entre otros aspectos (Capella y col., 2015). En el laboratorio en el que se desarrolla este trabajo se han estudiado diferentes FTs HD-Zip pertenecientes a la subfamilia I. Estos estudios, indicaron que estos FTs participan en distintas eventos del desarrollo tanto en condiciones normales de crecimiento como en respuesta a factores externos (Capella y col., 2015, Perotti y col. 2017). Uno de los miembros de la familia poco estudiado es AtHB20 que pertenece a la subfamilia HD-Zip I y tiene un gen parálogo, *AtHB3*, muy poco estudiado también (Perotti y col., 2017). Se ha reportado que AtHB20 podría actuar como un regulador negativo del crecimiento de la raíz primaria, posiblemente mediante interacción con el FT AtHB13 (Silva y col., 2016). Las raíces son los órganos de anclaje de las plantas y las responsables no sólo de la absorción de agua y nutrientes sino de percibir las señales del suelo. Según las bases de datos públicas (ePlant, de la Universidad de Toronto), *AtHB20* se expresa en raíces y dicha expresión es modificada por diferentes factores abióticos como déficit hídrico y salinidad. Asimismo, su expresión se ha detectado a través de secuenciación de células individuales en el córtex, la epidermis, la columela, el floema, el xilema, y el capuchón de la raíz lateral. Si bien esta información está en las bases de datos, no existen estudios funcionales de *AtHB20* en raíces. En el laboratorio en el que se desarrollará este trabajo, previamente se han generado las construcciones genéticas necesarias para llevar a cabo la caracterización funcional de *AtHB20*. Se aislaron y clonaron dos versiones de la región promotora del gen en cuestión dirigiendo la expresión de los genes reporteros *GFP* (*Green Fluorescent Protein*, Proteína Verde Fluorescente) y *GUS* (Enzima β -Glucuronidasa). A continuación se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* y se obtuvieron líneas homocigotas. También se obtuvieron líneas transgénicas homocigotas que expresan la región codificante del gen bajo el promotor fuerte y constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (*35S*) y se obtuvieron cuatro líneas mutantes insercionales (*athb20*) del banco de semillas del ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*).

OBJETIVOS

- Evaluar el patrón de expresión del gen *AtHB20* utilizando las plantas transgénicas homocigotas *promotorAtHB20:GUS* mediante reacción histoquímica de la enzima β -Glucuronidasa en condiciones control y con tratamiento hormonal y estrés salino.
- Estudiar características fenotípicas distintivas de las plantas sobreexpresantes y mutantes de *AtHB20* en raíz.

METODOLOGÍA

Se utilizarán distintas estrategias experimentales que incluyen ensayos con plantas transgénicas disponibles en el laboratorio: líneas *promotorAtHB20:GFP:GUS*, *35S:AtHB20* y líneas mutantes *athb20*.

Técnicas específicas a utilizar:

- Búsqueda en la base de datos ePlant de la Universidad de Toronto (<http://bar.utoronto.ca/>).
- Reacciones de histoquímica para analizar el patrón de expresión de *AtHB20* en distintas condiciones en raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* de distintos

estadios, transformadas con un segmento del promotor de *AtHB20* fusionado al gen reportero *GUS* (*promotorAtHB20:GUS*).

- Extracción de ARN vegetal de raíces y evaluación de la concentración e integridad/calidad mediante espectrofotometría.
- Síntesis de ADNc y PCR cuantitativa en tiempo real mediante reacciones de retro-transcripción (RT) seguidas de PCR, utilizando enzimas específicas, reactivos y equipamiento para tal fin.
- Cultivo de plantas en placas verticales en esterilidad con medio de cultivo de plantas Murashige & Skoog (MS) y en condiciones de fotoperiodo de día largo. Cuando corresponda, también agregado de hormonas o tratamiento con agentes causales de estrés.
 - Fenotipado de longitud de raíz primaria: se midió la longitud de las mismas en distintos días con el fin de realizar una cinética de crecimiento.
 - Estímulo hormonal con auxinas: se agregaron distintas concentraciones de auxinas (1 μM y 10 μM de Ácido Indol-Acético, IAA) y también de ácido N-1-naftiltalámico (NPA), que es un inhibidor del transporte de auxinas, durante 8 y 12 horas a plantas de 7 días post-germinación.
 - Ensayo de estrés salino: se suplementó el medio MS con una concentración de 150 mM de Cloruro de Sodio, NaCl, durante 4, 24 y 48 horas a plantas de 6 días post-germinación.
- Microscopía confocal para análisis de raíces primarias de plantas de 8 días post-germinación para visualizar diferencias en el tamaño o el número de células. Para ello se tiñeron las raíces con yoduro de propidio. Se cuantificó el número de células en la zona de transición de la raíz primaria.
- Amplificación de fragmentos de ADN y detección de transgenes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Electroforesis en geles de agarosa.
- Cultivo de plantas en tierra.
- Microscopía óptica y de fluorescencia.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Búsqueda en la base de datos ePlant de la Universidad de Toronto: se obtuvo como resultado que *AtHB20* se expresa en la raíz embrionaria (1 día post siembra). Además, se encontró que en el estadio de planta adulta, presenta un máximo de expresión en la raíz principal. Con respecto a condiciones de estrés abiótico, la expresión de *AtHB20* disminuye en aproximadamente un 46% luego de 12 horas de estrés salino, según ésta base de datos pública.

Patrón de expresión de *AtHB20* en condición control: se observó que *AtHB20* se expresa en sistema vascular de raíces en los estadios analizados.

Cuantificación de los niveles de expresión de *AtHB20* en plantas salvajes y sobreexpresantes para *AtHB20*: Se seleccionaron tres líneas sobreexpresantes de *AtHB20* de baja, media y alta sobreexpresión.

Fenotipado de longitud de raíz primaria de plantas mutantes y sobreexpresantes de *AtHB20*: las tres líneas mutantes independientes presentaron una mayor longitud de raíz primaria respecto a las plantas control Col-0, mientras que las tres líneas sobreexpresantes

independientes evaluadas presentaron una menor longitud de raíz primaria respecto a las Col-0.

Patrón de expresión de *AtHB20* en plantas sometidas a estímulo hormonal con auxinas: se observó una inducción de la expresión de *AtHB20* en la zona de elongación de la raíz.

Número de células en la zona de transición de la raíz primaria de plantas mutantes de *AtHB20*: las tres líneas mutantes independientes presentaron un mayor número de células en la zona de transición de raíz primaria respecto a las plantas control Col-0.

Patrón de expresión de *AtHB20* en plantas sometidas a estrés salino: se observó una inducción de la expresión de *AtHB20* en la zona de elongación de la raíz.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Aarts, M. G. M., Fiers, M. W. E. J. 2003. What drives plant stress genes? Trends in Plant Science 8, 99-102.

Capella, M., Ribone, P. A., Arce, A. L., Chan, R. L. 2015. Homeodomain–Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants. In “Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects”. Chapter 7. Edited by Daniel González, Academic Press/Elsevier.

Gonzalez, D. H. 2016. Introduction to Transcription Factor Structure and Function. In: Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects, pp. 3- 11. DOI: 10.1016/B978-0-12-800854-6.00001-4.

Perotti, M. F., Ribone, P. A., Chan, R. L. 2017. Plant transcription factors from the Homeodomain-Leucine Zipper family I. Role in development and stress responses. IUBMB Life 69, 280-289.

Riechmann, J. L. 2002. Transcriptional regulation: a genomic overview. The *Arabidopsis* Book. American Society of Plant Biologists.

Silva, A. T., Ribone, P. A., Chan, R. L., Ligterink, W., Hilhorst, H. W. 2016. A predictive coexpression network identifies novel genes controlling the seed-to-seedling phase transition in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 170, 2218-2231.