

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LA FAMILIA HD-ZIP I EN PLANTAS DE MAÍZ

Gudiño Virginia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL) (UNL-CONICET)

**Área:** Ciencias Biológicas  
**Sub-Área:** Biotecnología  
**Grupo:** X

Palabras claves: Expresión génica, estrés abiótico, maíz.

### INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es una especie de gramínea anual originaria de América que presenta metabolismo de tipo C4. Junto con el trigo y el arroz, es uno de los cereales con mayor volumen de producción a nivel mundial. Su uso más conocido es en la industria alimenticia, pero también se utilizan productos derivados para producir papel, pegamentos, bioetanol, fármacos y cosméticos, entre otros. En Argentina el maíz representa el 24 % de la producción total de granos del país, siendo el segundo cultivo más importante después de la soja. Dada la relevancia que esto le otorga, a lo largo del tiempo se han desarrollado y aplicado diferentes tecnologías que permitieron mejorar el germoplasma y el proceso productivo.

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 (FT) de vías de transducción de señales. Los FT son proteínas capaces de reconocer y unir secuencias de ADN específicas presentes en regiones regulatorias de genes blancos. Estas proteínas presentan al menos dos dominios: uno de unión al ADN y otro de interacción con proteínas, siendo este último el que media, directa o indirectamente, la activación o represión de la transcripción al unirse a proteínas de la maquinaria transcripcional basal (Brivanlouy col., 2002). Los FT se clasifican en familias principalmente por el dominio de unión a ADN, también se pondera la estructura génica y la presencia de otros motivos y dominios conservados (Riechmann y col., 2003). Entre las familias de FT de plantas, la llamada HD-Zip se caracteriza por la presencia de un homeodominio (HD), responsable de la unión a ADN, asociado a un cierre de leucinas (LZ, del inglés *leucine zipper*), que actúa como dominio de dimerización. La familia HD-Zip se divide a su vez en 4 subfamilias (I a IV, Ariel y col., 2007; Capella y col., 2015).

En el laboratorio donde se lleva a cabo este trabajo, se estudian las respuestas de las plantas a las condiciones medioambientales y, en particular, la participación de los FT de la familia HD-Zip I en estas respuestas en condiciones normales y cuando las plantas se enfrentan a estrés abiótico.

### OBJETIVO

Identificar un factor de transcripción de tipo HD-Zip I de maíz que resulte interesante para modular su expresión.

### METODOLOGÍA

#### **Cultivo de plantas de maíz y toma de muestra para evaluar expresión génica**

Se utilizaron semillas de maíz de genotipo B73. Las plantas se crecieron en un invernáculo con fotoperiodo regulado (16 hs luz, 8 hs oscuridad). Al momento en que las

Proyecto: PICT START UP 3779. "Obtención de plantas transgénicas de maíz, arroz y soja con características de alta productividad y tolerancia a estrés abiótico"

Director del proyecto: Raquel Lía Chan

Director del tesinista: Jesica Raineri

Co-Director del tesinista: Julieta Cabello

plantas tenían dos hojas completamente expandidas (estadio de desarrollo V2) se procedió a tomar muestras de raíces, tallos y hojas para evaluar la expresión de genes en condiciones de crecimiento óptimas. En todos los casos se trabajó con triplicados/cuadruplicados biológicos.

### Generación de estrés hídrico

Las plantas en estadio V2 se saturaron con agua durante 8 hs, luego se retiró el excedente y se dejaron de irrigar para generar el estrés hídrico severo. Se tomaron muestras de forma periódica durante el ensayo.

### Análisis del fenotipo de las plantas

**Consumo de agua de las plantas:** Las macetas se identificaron individualmente, se tomó su peso al inicio del ensayo y se siguió el mismo de forma periódica.

**Pérdida de agua en hojas:** Se tomó el peso de porciones de hojas completamente expandidas (P0). Dichas hojas se pusieron a rehidratar y se volvieron a pesar (Pn). La pérdida de agua se cuantificó como el porcentaje del peso respecto al inicial.

### Extracción y cuantificación de ARN

Las extracciones de ARN se realizaron utilizando el reactivo Trizol® (Invitrogen™) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Las concentraciones y purezas de los ARN obtenidos se determinaron por medio del equipo Nano Drop®.

### Análisis de expresión génica

Se cuantificaron los transcritos por transcripción reversa (RT) seguida de PCR en tiempo real (RT-qPCR). Los niveles de expresión del gen *ZmAct2*, se usaron para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés.

## RESULTADOS

Debido a la existencia de 17 FT de tipo HD-Zip I identificados en plantas de maíz, se decidió estudiar aquellos genes homólogos a *AtHB7, 12, 13, 23, 5* y *16*, que han sido caracterizados en el laboratorio donde se desarrolló el presente trabajo (Capella y col., 2015; Ré y col., 2012; Ribone y col., 2015; Perotti y col., 2017). Se realizó una búsqueda en bases de datos de publicaciones de filogenias y alineamientos de secuencias para de este modo seleccionar los genes homólogos (Harris y col. 2011; Zhao y col., 2011). *ZmHDZ 4, 6, 9* y *12* como homólogos a *AtHB7* y *12*; y *ZmHDZ 5, 11, 13* y *14* como homólogos a *AtHB13* y *23*. En los casos de *AtHB5* y *AtHB16*, no se localizaron homólogos putativos debido a que pertenecen a un clado en el que no hay representantes en maíz. Además, se eligió un gen, *ZmHDZ 14*, el cual pertenece a un clado en el que no hay representantes en Arabidopsis.

### Expresión génica en condiciones control

A partir de los resultados obtenidos de los ensayos de RT-qPCR se confeccionó la **Tabla 1**, en la que se muestran los órganos en los que se detectó la expresión de los distintos genes estudiados. Se indican asimismo los homólogos correspondientes de Arabidopsis. El ensayo fue repetido con resultados muy similares.

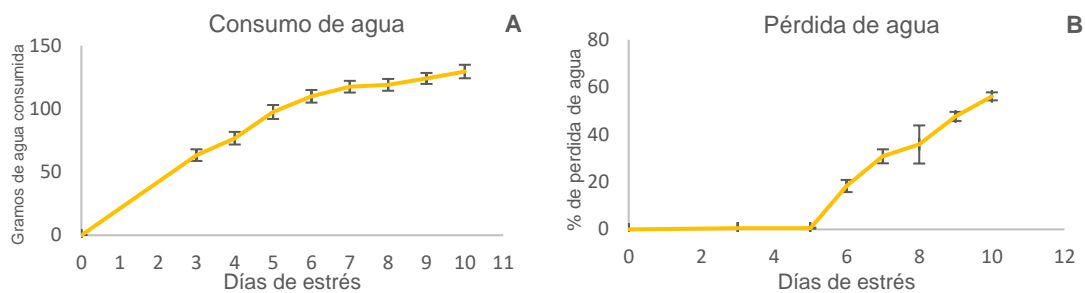
		Hoja	Tallo	Raíz
AtHB 7 y 12	ZmHDZ4	+++		
	ZmHDZ6			
	ZmHDZ9	+++	+++	
	ZmHDZ12			
AtHB 13 y 23	ZmHDZ5T1			
	ZmHDZ5T2			
	ZmHDZ11	++	+++	
	ZmHDZ13	++	+++	+
	ZmHDZ14	+	+++	

**Tabla 1:** Tejidos en los que se detecta la expresión génica. Representado con +, ++ y +++ indicando una menor y mayor expresión, respectivamente. En los casos en los que no hay información es debido a que no se detectó la presencia del transcripto en el ensayo. Se indican además los homólogos putativos de Arabidopsis.

La información presente en la base de datos, "MaizeGDB" (*Maize Genetics and Genomics Database*), permitió establecer que los patrones de expresión evaluados en nuestro laboratorio en condiciones normales de desarrollo se correlacionan. En base a este análisis se continuó trabajando con muestras correspondientes a las hojas y tallos de la planta.

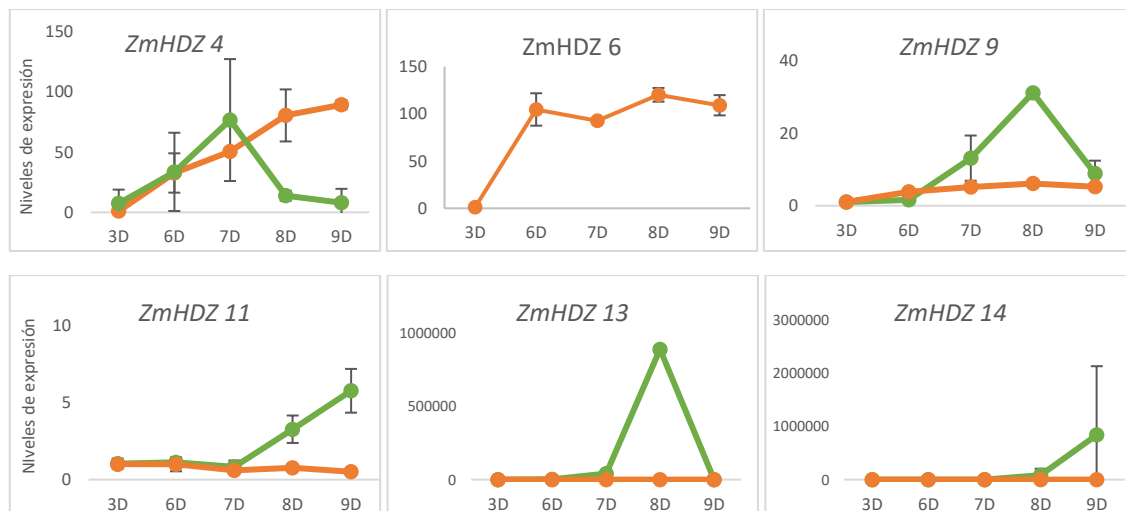
### Expresión génica en plantas en estrés hídrico

Con el objeto de realizar ensayos de estrés hídrico y para determinar el nivel de estrés al que está sometida la planta en cada punto, se midió el consumo de agua de las plantas y la pérdida de agua en hojas (**Figura 1**). Como se observa en la **Figura 1 A** hay un marcado consumo de agua en los primeros días y, avanzado el ensayo, se pone de manifiesto una falta de agua disponible para ser tomada por la planta. En relación con estas observaciones, la **Figura 1B** muestra que a medida que la planta deja de tener agua disponible, cuando el estrés es más severo, hay una mayor pérdida de agua en las hojas.



**Figura 1: A.** Consumo de agua de las plantas en los distintos días del ensayo. **B.** Porcentaje del agua perdida en las hojas de las plantas sometidas al estrés.

Por otro lado, del análisis de la expresión de los genes en estas condiciones de crecimiento se determinó que varios de ellos están regulados, como se muestra en la **Figura 2**.



**Figura 2:** Niveles de expresión génica de las plantas sometidas a estrés hídrico. El color verde representa las medidas hechas en las hojas y con color naranja se muestran las curvas correspondientes a los tallos.

Se observó que la expresión de los genes *ZmHDZ 11* y *14* de las muestras de hojas, es regulada positivamente en respuesta a la sequía, en cambio *ZmHDZ 4*, *9* y *13* responden de manera diferente observándose un pico y luego una caída, indicando una expresión

génica inducida y posteriormente reprimida hacia el final del ensayo, cuando el estrés es más severo. *ZmHDZ 6* no ha podido ser detectado en hojas. Los patrones de expresión observados en las muestras de tallos son diferentes. La expresión de *ZmHDZ 4, 6 y 9* es inducida en estas condiciones de desarrollo, y en el caso de *ZmHDZ 11, 13 y 14* no se puso de manifiesto un cambio en sus niveles de transcritos, comparados con los tallos bajo condiciones normales de crecimiento.

En 2011 un grupo de investigación publicó un estudio sobre los patrones de expresión de los genes *ZmHDZ* de tipo I en hojas de tres semanas bajo estrés hídrico. Compararon los niveles de expresión de genes HD-Zip I en condiciones normales y sometidas a estrés hídrico leve, moderado y severo. Determinaron que las expresiones de algunos genes *ZmHDZ I* eran reguladas positivamente en respuesta a la sequía (*ZmHDZ4, 6, 9, 12 y 14*), mientras que las de los otros genes eran reguladas negativamente (*ZmHDZ5, 11 y 13*, Zhao y col., 2011).

De la comparación de los resultados con lo reportado, se observa en la mayoría de los casos una correlación en la regulación de la expresión génica. En el caso de *ZmHDZ 11 y 13* los resultados obtenidos son diferentes, lo que podría deberse a la forma en la que se llevó a cabo el estrés. Se dejó a las plantas con sus raíces al descubierto, sometiéndolas de esta forma a un estrés hídrico que no ocurre en su naturaleza; esto puede llevar a que los genes se regulen de forma diferencial por el cambio abrupto de condiciones.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó el gen *ZmHDZ 6*, el cual está regulado de específicamente en tallos en estrés hídrico. En plantas crecidas en condiciones normales, este gen no ha sido detectado, lo que indica que no se expresa, sometiendo las plantas a un ensayo de estrés hídrico tampoco se vio expresión en las hojas, al analizar los tallos se observó que la expresión es inducida en estas condiciones.

Sobre este gen seleccionado se hará un estudio más detallado del patrón de expresión en estadio reproductivo y se intentará aislar la región promotora para caracterizarla.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL** (2007) The true story of the HD-Zip family. Trends Plant Science. 12:419-426.

**Brivanlou A, Darnell JE Jr** (2002) Signal transduction and the control of gene expression. Science. 295:813-818.

**Capella M, Ribone PA, Arce AL, Chan RL** (2015) Arabidopsis thaliana Homeo Box 1 (AtHB1), a Homeodomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation. New Phytologist. 207:669-682.

**Harris JC, Hrmova M, Lopato S, Langridge P** (2011) Modulation of plant growth by HD-Zip class I and II transcription factors in response to environmental stimuli. New Phytologist, 190(4):823-837.

**Perotti MF, Ribone PA, Chan RL** (2017) Plant transcription factors from the homeodomain-leucine zipper family I. Role in development and stress responses. IUBMB life 69(5):280-289.

**Ré DA, Raud B, Chan RL, Baldwin IT, Bonaventure G** (2012) RNAi-mediated silencing of the HD-Zip gene *HD20* in *Nicotiana attenuata* affects benzyl acetone emission from corollas via ABA levels and the expression of metabolic genes. BMC Plant Biology. 12:60.

**Ribone PA, Capella M, Chan RL** (2015) Functional characterization of the homeodomain leucine zipper I transcription factor AtHB13 reveals a crucial role in Arabidopsis development. Journal of Experimental Botany, 66:5929-43.

**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.

**Zhao Y, Zhou Y, Jiang H, Li X, Gan D, Peng X, Zhu S, Cheng B** (2011) Systematic analysis of sequences and expression patterns of drought-responsive members of the HD-Zip gene family in maize. PloS One, 6(12), e28488.