



ESTUDIO DE COMPLEMENTACIÓN FENOTÍPICA DEL MUTANTE *athb13-2* DE *Arabidopsis thaliana* CON EL GEN *MpC1HDZ* DE *Marchantia polymorpha* Fariás, Santiago¹

¹Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL-UNL

²Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Director: Moreno, Javier

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Evolución, Factor de Transcripción, Sequía.

INTRODUCCIÓN

La manipulación de los mecanismos de tolerancia a estrés de las plantas es un campo muy activo de investigación en biología por su fuerte perspectiva tecnológica. Particularmente, los factores de transcripción de la clase I de la familia HDZ de diferentes especies angiospermas, como AtHB13 de *Arabidopsis thaliana* (Cabello et al. 2012), han sido involucrados en respuesta de aclimatación al ambiente. En nuestro laboratorio se los estudia por su contribución a las respuestas a estrés abiótico como la sequía, salinidad, inundación y frío. Para comprender si la función de estos FTs estuvo ligada al proceso de adaptación de las plantas al ambiente terrestre, nos propusimos estudiar el gen *C1HDZ* (*MpC1HDZ*) de *Marchantia polymorpha*, una especie basal en la evolución de las plantas terrestres (Romani et al. 2018). En este trabajo investigamos si el gen *MpC1HDZ* puede restituir total o parcialmente las funciones del gen *AtHB13* en el mutante *athb13-2*, que lleva una copia no funcional del factor de transcripción.

OBJETIVOS

- Transformar el mutante *athb13-2* de *Arabidopsis thaliana* con el gen *MpC1HDZ* de *Marchantia polymorpha*.
- Evaluar si el gen *MpC1HDZ* puede revertir la susceptibilidad al estrés hídrico observados en *athb13-2*.

Título del proyecto: “Estudio funcional del gen *C1HDZ* de *Marchantia polymorpha* y sus implicancias evolutivas en las respuestas de aclimatación de plantas terrestres”

Instrumento: ANPCyT

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Director: Moreno, Javier

METODOLOGÍA

Generación y selección de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas transgénicas fueron generadas por el método de *floral dip* (Clough, Bent 1998) empleando el vector PFK247 que dirige la expresión del gen MpC1HDZ con un promotor viral fuerte 35S fusionado en el extremo N-terminal a GFP. La selección de las plantas transformadas se realizó en macetas con tierra suplementadas con el herbicida BASTA dado que el T-DNA cuenta con el gen de resistencia BAR. En la misma maceta y a manera de control fueron incluidas semillas de genotipo salvaje. Las plántulas de 10 días visiblemente resistentes al herbicida fueron transferidas a macetas independientes hasta la cosecha de sus semillas. En todos los casos, las plantas fueron cultivadas en condiciones de día largo correspondiente a 16hs luz y 8hs de oscuridad, con una temperatura de 21 °C.

Para la selección de líneas homocigotas se evaluó la segregación de las plantas resistentes, y se seleccionaron aquellas que siguieron una genética mendeliana. Aquellas plantas con una sola inserción del gen se denominaron genotipo PHOX. Posteriormente, para confirmar la inserción del transgén se realizó una PCR sobre ADN genómico donde se amplificó el gen MpC1HDZ, seguida de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

Ensayos de estrés hídrico

Los ensayos de estrés hídricos fueron realizados con plantas de los genotipos Col-0 (tipo salvaje), *athb13-2* y PHOX, de 43 días de edad divididas al azar en dos grupos. Las plantas de un grupo fueron sometidas a un tratamiento de sequía durante dos semanas y luego fueron rehidratadas. Al quinto día de rehidratación se contabilizaron las plantas vivas y muertas (supervivencia), y se tomaron muestras de tejido para cuantificar la clorofila (Chory et al. 1994). Posteriormente, las plantas que sobrevivieron se dejaron semillar para analizar la producción.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los ensayos de supervivencia a estrés hídrico fueron realizados siguiendo protocolos ya establecidos en el laboratorio (Cabello et al. 2012, Ebrahimian-Motlagh et al. 2017). En coincidencia con datos previos, nuestros experimentos mostraron que el mutante *athb13-2* es más susceptible al tratamiento de sequía que el genotipo salvaje (Col-0) (Ebrahimian-Motlagh et al. 2017). Así observamos que sólo un 13% de plantas del mutante *athb13-2* logró sobrevivir al tratamiento de sequía, mientras que el 64% de las plantas salvajes sobrevivieron al tratamiento (Fig. 1, Tabla 1). La complementación de *athb13-2* con *MpC1HDZ* revirtió la susceptibilidad del mutante, incrementando la tolerancia intrínseca de *Arabidopsis* al estrés hídrico a niveles aún superiores al genotipo salvaje, donde las plantas *PHOX* alcanzaron una supervivencia del 84%. Sin embargo, aunque se observa una tendencia por parte de las plantas transgénicas de ser más tolerantes al estrés hídrico que el genotipo salvaje, esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa.

Tabla 1: Tasa de supervivencia de los diferentes genotipos luego de tratamientos severos de sequía.

Genotipo	Supervivencia (%)	Error estándar	N
Col-0	64	6	64
<i>athb13-2</i>	13	7	64
<i>PHOX</i>	84	12	64



Figura 1: Fotografía ilustrativa de las plantas al quinto día de la rehidratación posterior al tratamiento de sequía. Primera fila: Col-0; Segunda fila: *athb13-2*; Tercera fila: *PHOX*.

Como era de esperar, la sequía afectó negativamente a la producción medida como peso total de semillas. Aunque para este parámetro no observamos una interacción significativa entre el tratamiento y el genotipo de las plantas, sí observamos una tendencia por parte de las plantas *athb13-2* a disminuir más su producción bajo condiciones de sequía en comparación con las plantas Col y *PHOX* (Fig. 4).

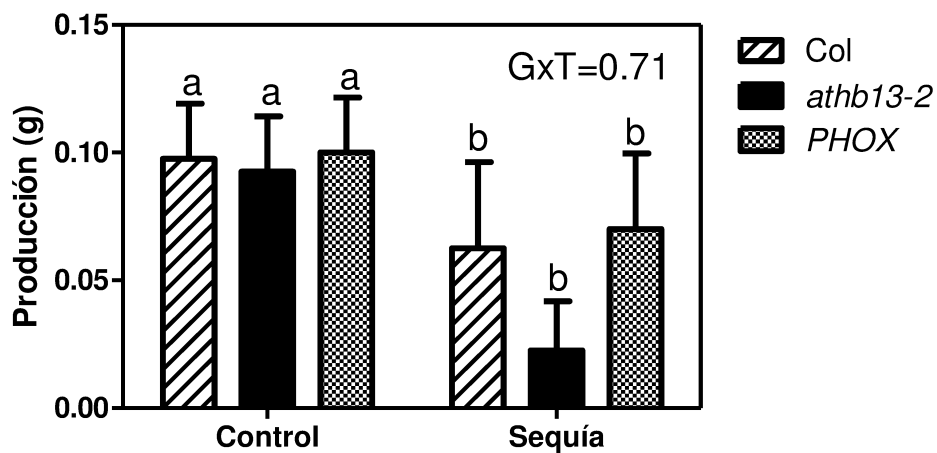


Figura 4: Producción para cada genotipo según el tratamiento aplicado (control o sequía). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los niveles de clorofila de la hoja vinculados al estado de senescencia foliar son una medida del nivel de estrés de la planta (Cabello et al. 2012). Para comparar la sensibilidad de los diferentes genotipos al estrés, pudimos observar que los niveles de clorofila en las plantas del genotipo *PHOX* disminuyeron en menor proporción al ser sometidas a condiciones de estrés hídrico severo respecto del genotipo salvaje y mutante (Fig. 5a). Al realizar una relación de clorofila total entre los tratamientos control y estrés hídrico para cada genotipo, se observó que ésta fue significativamente mayor para el genotipo *PHOX* en comparación con *athb13-2* y Col-0 (Fig. 5b).

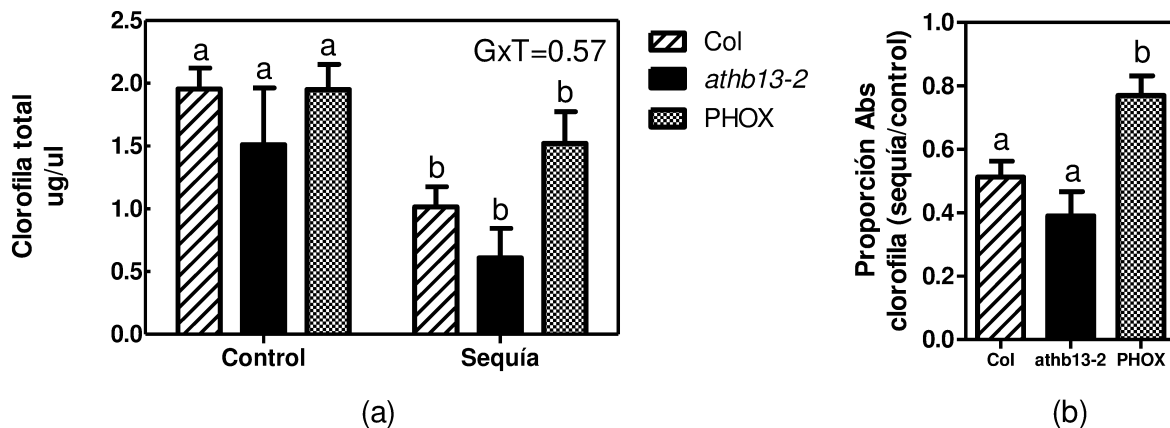


Figura 5: (a) Relación de Clorofila total entre los distintos tratamientos para cada genotipo. (b) Proporción de la absorbancia por clorofila (sequía/control) para cada genotipo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los resultados preliminares descritos anteriormente indican que las plantas *PHOX* toleran mejor el tratamiento de sequía que las plantas *athb13-2*, lo que apoya nuestra hipótesis de que el gen *MpC1HDZ* puede revertir la pérdida de función ocasionada por la mutación del gen *AtHB13*.

Dado que la expresión ectópica del gen *MpC1HDZ* genera fenotipos similares a los de la sobreexpresión de otros C1HDZ de angiospermas, incluyendo el mayor aserrado de las hojas y mayor tolerancia a estrés hídrico, sugieren que los blancos de la regulación de estos factores de transcripción están altamente conservados entre las plantas terrestres. Esperamos que este trabajo contribuya a comprender el grado de conservación de los mecanismos de respuesta al ambiente de las plantas terrestres y determinar el rol que jugaron los genes C1HDZ durante la evolución de estas respuestas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Cabello JV, Arce AL, Chan RL.** 2012. *The homologous HD-Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis-related and glucanase proteins.* Plant J 69:141-153.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.* Plant J 16:735-743.
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M.** 1994. *A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis (det mutants have an altered response to cytokinins).* Plant Physiol 104:339-347.
- Ebrahimian-Motlagh, S., Ribone, P. A., Thirumalaikumar, V. P., Allu, A. D., Chan, R. L., Mueller-Roeber, B., & Balazadeh, S.** 2017. *JUNGBRUNNEN1 confers drought tolerance downstream of the HD-Zip I transcription factor AtHB13.* Front Plant Sci, 8, 2118.
- Romani F, Reinheimer R, Florent SN, Bowman JL, Moreno JE.** 2018. *Evolutionary history of HOMEODOMAIN LEUCINE ZIPPER transcription factors during plant transition to land.* New Phytol 219:408-421.