

EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HD ZIP I *AtHB16* Y SU ROL EN EL DESARROLLO FLORAL

María Florencia Perotti¹

Cientibecaria¹ – Laboratorio de Biología Vegetal, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Área: Ciencias Biológicas. Sub-área: Biología

INTRODUCCION

Las plantas responden a variaciones del ambiente con respuestas fenotípicas que maximizan el crecimiento. Parte de estas respuestas incluyen mecanismos fisiológicos que atenúan los efectos nocivos del ambiente que afectan su crecimiento y desarrollo. Esas respuestas específicas incluyen rearrreglos transcripcionales controlados por proteínas de unión al ADN conocidas como factores de transcripción (FTs). La identificación de FTs implicados en diferentes cascadas de señalización ha sido un campo de investigación muy activo en las últimas dos décadas en biotecnología vegetal. El interés generalizado por esta estrategia tiene un gran impacto: *desde un punto de vista básico* como estrategia para identificar elementos moleculares clave en las respuestas de las plantas a diferentes estímulos ambientales; y *desde un punto de vista aplicado* porque estos FTs podrían servir para manipular respuestas específicas de las plantas minimizando los efectos secundarios sobre otras vías de señalización (Vasil et. al., 2003).

Los FTs son proteínas capaces de reconocer y unir secuencias de ADN específicas presentes en las regiones regulatorias de genes blanco. En general, estas proteínas presentan una estructura de dos dominios: un dominio de unión al ADN y otro de unión a 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). De esta manera, los FTs cumplen un rol central en la coordinación de la expresión génica de todo ser vivo. Los FTs son especialmente abundantes en plantas, representando aproximadamente el 6 % del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Riechmann et al., 2000). La familia HD-ZIP es exclusiva de plantas y está compuesta por cuatro subfamilias (Ariel et al. 2007). Varios genes de la subfamilia tipo I han sido estudiados y vinculados a respuestas de tolerancia a estrés abiótico. Aunque se especula que estos HD-ZIP tipo I cumplan funciones específicas, no existe mucha información sobre la regulación que puedan ejercer sobre respuestas de desarrollo, como la floración.

El LBV comenzó a estudiar la función de todos los HD-ZIP tipo I para los que se desconoce su función. En este marco, mi trabajo vinculado a la Cientibeca busca investigar la función del gen *AtHB16*. El análisis filogenético de la secuencia proteica de *AtHB16* indica un alto grado de similitud con la secuencia de *AtHB6*, otro factor de transcripción HD ZIP I (Arce et. al, 2011).

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcional y molecularmente al factor de transcripción HD ZIP I *AtHB16*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo el estudio de la función del gen *AtHB16*, se plantearon dos estrategias principales: 1) **Silenciamiento génico** usando un microRNA artificial (Schwab et. al., 2006), dado que para los genes *AtHB16* y *AtHB6* no existen mutantes insercionales. En plantas el proceso de silenciamiento génico es específico y dependiente de la secuencia del microRNA, de esta manera, uno puede manipular este fenómeno para crear microRNAs

Proyecto acreditado en el que se enmarca la investigación: “Prospección de genes con potencial biotecnológico utilizando como herramienta a plantas de *Arabidopsis* expresando ectópicamente HaHB4.2” ANPCyT Código de proyecto: PICT -2013-0099. Director del proyecto: Javier E. Moreno. Autores Investigadores: Raquel L. Chan y Javier E. Moreno. Director del autor: Javier E. Moreno.

artificiales (amiR) que silencien un gen o un grupo de genes endógenos. La expresión ectópica y constitutiva del microRNA genera líneas que presentan bajos niveles de expresión del gen blanco; 2) Obtener **plantas transgénicas sobreexpresantes** del gen en background ecotipo *Col-0* y, sabiendo que los HD ZIP tipo I son blancos del silenciamiento génico de la planta, en otro background ecotipo *Col-0 rdr6* que contiene una mutación que silencia la maquinaria de silenciamiento de Arabidopsis permitiendo obtener una sobreexpresión considerablemente mayor que por la estrategia anterior.

1) Diseño de microRNAs artificiales (amiRs). Se diseñaron microRNAs artificiales individuales para los genes *AtHB16* (amiR16), *AtHB6* (amiR6) y un tercer microRNA dirigido a ambos genes (amiR16/6). Para tal fin se recurrió al software Web MicroRNA Designer (WMD3 disponible en wmd3.weigelworld.org). Para la selección del amiR se siguieron los siguientes criterios: 1) que no presente genes blanco alternativos (*off-targets*), 2) que el microRNA reconozca preferentemente el extremo 5' de la región codificante para que el silenciamiento sea más eficiente y 3) en el caso del amiR16/6 que reconozca una región común para ambos genes. **Construcción y clonado del amiR.** El protocolo utilizado se basó en una serie de Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuyos amplicones combinados permiten obtener el microRNA en el vector binario pNB47 que permite la transformación directa de plantas de Arabidopsis (Schwab R. et al., 2006). Este vector posee un promotor fuerte (35S: CamV) que dirige la expresión constitutiva del microRNA en toda la planta. La construcción fue secuenciada para confirmar la secuencia con el marco correcto de lectura. **Transformación de plantas mediante el método de inmersión floral utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.** Se llevó a cabo una transformación estable de plantas de Arabidopsis ecotipo *Col-0* mediante el método de inmersión floral (Clough et al., 1998). El ADN-T se inserta aleatoriamente en el genoma. Para desligar problemas asociados al sitio de inserción, se aislaron 15 líneas independientes con una sola copia en el genoma. **Selección de plantas transgénicas.** La selección de las plantas transformadas se realizó en placas con medio MS 0.5%-Agar 0.9% suplementado con el antibiótico Kanamicina (50 µg/mL). En la misma placa y a manera de control fueron incluidas semillas de genotipo salvaje. Cerca de 50 líneas independientes resistentes a la selección fueron trasplantadas a tierra hasta obtener una nueva filial de semillas. **Identificación de líneas silenciadas.** La identificación de líneas transgénicas con bajo niveles de acumulación de transcripto para estos HD ZIP se realizó por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). ARN total de cada línea transgénica fue purificado a partir de tejido foliar y floral de plantas adultas. La extracción de ARN total se realizó con el reactivo de TRIZOL y se procedió con la reacción de retrotranscripción. Brevemente, a 1 µg de ARN total se agregó oligo (dT) y enzima transcriptasa reversa II M-MLV (Promega). Los niveles de ARNm fueron cuantificados por qPCR utilizando al gen de actina como normalizador.

2) Expresión ectópica y constitutiva del gen *AtHB16*. La secuencia codificante completa (882 pb) de *AtHB16* fue clonada en el vector pEntr-D-Topo (Invitrogen), secuenciada, para luego ser recombinada al vector pFK247 utilizando tecnología GATEWAY. El promotor fuerte 35S del vector pFK247 dirige la expresión constitutiva de una fusión traduccional GFP-ATHB16. **Transformación de plantas mediante el método de inmersión floral utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.** *Idem* protocolo anterior. Esta construcción fue usada para transformar los ecotipos *Col-0* y *rdr6*. Dado que el mutante *rdr6* es deficiente en el proceso de silenciamiento post-transcripcional, esperamos que el nivel de acumulación del transcripto del transgén sea superior a los observados en el ecotipo *Col-0*. **Selección de plantas transgénicas.** La selección de plantas transformadas se llevó a cabo sembrando las semillas T1 en tierra y regadas con BASTA LIBERTY. En cada caso, fueron seleccionadas unas 50 líneas independientes. **Identificación de líneas**

sobreexpresantes. La identificación de líneas con mayor nivel de expresión se llevó a cabo por observación detectando directamente la fusión traduccional usando un microscopio confocal Leica Modelo TCS SP8. **Caracterización fenotípica de plantas 35S::AtHB16 y plantas silenciadas amiR.** En todos los casos, las plantas se cultivaron en condiciones de día largo correspondiente a 16 hs luz/ 8 hs oscuridad y con una temperatura de 21°C. La caracterización fenotípica de las líneas silenciadas incluyó la medición semanal del diámetro de roseta, número de hojas, longitud del tallo principal, número de tallos secundarios y ramas (Boyes et al., 2010). Durante la fase reproductiva, se monitoreó la fertilidad y el desarrollo floral.

RESULTADOS

Caracterización de líneas amiR6, amiR16 y amiR6/16. La estrategia de construcción de los amiRs se llevó a cabo exitosamente logrando obtener plantas transgénicas silenciadas para los genes de estudio. Las líneas amiR16 generación T2 fueron seleccionadas por presentar bajos niveles de expresión de *AtHB16* respecto de plantas salvajes. Durante la etapa vegetativa, estas líneas mostraron fenotipos indistinguibles del genotipo salvaje. En cambio, durante la etapa reproductiva, cuatro líneas independientes presentaron un fenotipo de esterilidad parcial o total (Figura 1 B-D). La observación de la morfología floral permitió detectar diferentes grados de penetrancia del fenotipo en el desarrollo normal del gineceo y de los estambres. Las líneas amiR16 A y B presentaron un único gineceo con estigmas asimétricos adicionales (Figura 1. G-H). A pesar de la malformación, estos gineceos fueron fértiles cuando fueron fecundadas artificialmente usando polen de plantas salvajes. Al mismo tiempo estas líneas amiR A y B, y las líneas amiR16 C y D exhibieron anteras no dehiscentes (Figura 1 F).

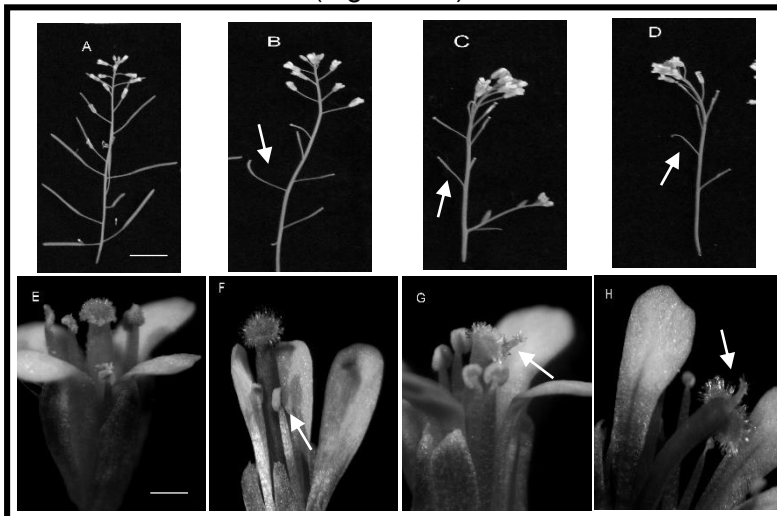
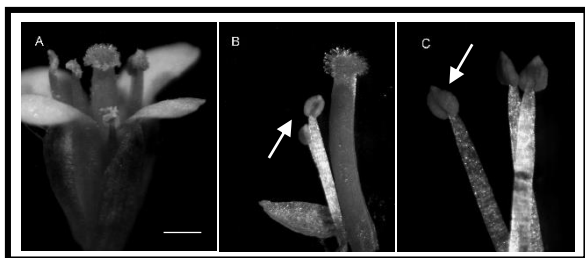


Figura 1. Morfología de inflorescencias. (A y E) Inflorescencia de planta salvaje. (B y F) Inflorescencia de línea amiR16 C. (C y G) Inflorescencia de línea amiR16 A. (D y H) Inflorescencia de línea amiR16 B. Referencia: Línea blanca equivalente a 5 mm.

Por otro lado, se eligieron plantas T1 amiR6 que presentaron bajos niveles de expresión de *AtHB6* respecto a plantas salvajes. Dichas líneas silenciadas amiR6 presentaron fenotipos morfológicos y de desarrollo normales durante la fase vegetativa y reproductiva.

Las plantas T1 amiR16/6, seleccionadas por presentar bajos niveles de expresión de *AtHB6* y *AtHB16*, exhibieron fenotipos normales de desarrollo vegetativo. Sin embargo, durante la fase reproductiva 4 líneas independientes T1 presentaron esterilidad parcial. Las flores de estas líneas amiR16/6 presentaron anteras no dehiscentes (Figura 2 B-C.).



Fotografía 2. Morfología de flores. (A) Flor de planta salvaje. (B) Gineceo y estambres de plantas *amiR16/6*. (C) Estambres de plantas *amiR16/6*. Referencia: Línea blanca equivalente a 5 mm.

Caracterización de líneas con expresión ectópica de *AtHB16*. Durante la fase vegetativa los cambios fenotípicos detectados en las plantas T1 35S::*AtHB16* background *Col-0* fueron un menor diámetro de roseta y un aserrado en sus hojas. Del mismo modo pero en forma exacerbada, estos cambios se observaron en plantas T1 35S::*AtHB16* background *rd6*. Por otro lado, en etapa reproductiva sólo las plantas T1 35S::*AtHB16* background *rd6* mostraron un fenotipo de esterilidad parcial o total vinculado a estambres con filamentos de menor longitud que no alcanzarían a fecundar el gineceo.

DISCUSIÓN

Los genes *AtHB6* y *AtHB16* poseen una alta similitud de secuencia y se especula con que deriven de un evento de duplicación génica. Sin embargo, la utilización de las líneas silenciadas para estudiar su función permitió establecer que sólo el silenciamiento de *AtHB16* es suficiente para modificar el normal desarrollo de los órganos reproductivos masculino y femenino florales. Dada la importancia de algunas hormonas, como auxinas y citoquininas durante el desarrollo floral, en la actualidad me encuentro evaluando el rol que podrían jugar estas hormonas en el mecanismo de acción de *AtHB16*. Paralelamente, planeo continuar con la caracterización fenotípica de líneas con expresión ectópica de *AtHB16* que podrían aportar información novedosa y complementaria sobre el mecanismo molecular de acción por el que *AtHB16* regula el desarrollo floral.

BIBLIOGRAFÍA

- Arce AL, Raineri J, Capella M, Cabello JV, Chan RL ,2011. Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors; a potential source of functional diversity. BMC Plant Biol 11:42.
- Ariel F, Manavella P, Dezar C, Chan R., 2007 The true story of the HD-Zip family. Trends Plant Sci., 12:419-426.
- Boyes, DC.; Zayed, AM.; Ascenzi, R.; McCaskill, AJ.; Hoffman, NE.; Davis, KR. and Görlach, J., 2001. *Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants*. Plant Cell, 13, 1499-1511
- 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. Plant J. 16, 735-743
- Riechmann, J.L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Ziang, C.-Z.; Keddie, J.; Adam, L.; Pineda, O.; Ratcliffe, O.J.; Samaha, R.R.; Creelman, R.; Pilgrim, M.; Broun, P.; Zhang, J.Z.; Ghandehari, D.; Sherman, B.K.; Yu, G.-L. , 2000. *Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes*. Science, 290:2105-2110.
- Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., and Weigel D., 2006. Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis. The Plant Cell, Vol. 18, 1121–1133
- Vasil IK, 2003. The science and politics of plant biotechnology a personal perspective. Nat Biotechnol 21:849-851.