

LA SOBREENPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HAHB4 DE GIRASOL MODIFICA EL DESARROLLO DE LAS RAÍCES DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Josefina Lovatto

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Directora: Carolina Attallah

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: HaHB4, *Arabidopsis thaliana*, raíces

INTRODUCCIÓN

HaHB4 es un factor de transcripción (FT) de girasol miembro de la familia HD-Zip (del inglés, *homeodomain-leucine zipper*), exclusiva de plantas. Esta familia se divide en 4 subfamilias, siendo HaHB4 miembro de la subfamilia I (Ariel et al., 2007).

HaHB4 se encuentra particularmente asociado a la respuesta de las plantas ante estrés hídrico y salino (Dezar et al., 2005a, 2005b). Se ha demostrado su participación en las vías de señalización de las hormonas ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico (Manavella et al., 2006, 2008b). Las plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan HaHB4 presentan tolerancia a estrés abiótico, lo que generó gran expectativa por transferir esta característica a cultivos de interés agronómico. Recientemente, se ha reportado que plantas de soja que sobreexpresan este FT mostraron una mayor productividad en ensayos a campo, especialmente en ambientes secos y cálidos de Argentina (Ribichich et al., 2020).

Dezar y col., 2005a reportaron la expresión de la β -glucuronidasa (GUS) bajo la dirección de un fragmento de aproximadamente 1000 pb correspondientes a la región promotora de HaHB4 en raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Luego, se demostró que dicho promotor presenta 2 motivos de expresión en raíces funcionalmente activos (Manavella et al., 2008a). A pesar de que las raíces son las encargadas de detectar la falta de agua y transmitir las señales correspondientes al resto de la planta, hasta el momento no se ha estudiado más en profundidad la incidencia de HaHB4 en este órgano.

Resulta fundamental estudiar las consecuencias de la sobreexpresión de HaHB4 sobre la arquitectura radicular, y la dependencia del fenotipo de la raíz de estas plantas en la detección de la falta de agua y/o la respuesta a altas temperaturas.

Título del proyecto: Desarrollo de herramientas biotecnológicas para introducir mejoras en especies vegetales de interés agronómico.

Instrumento: CAI+D.

Año de la convocatoria: 2020.

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral.

Directora: Carolina Attallah.

OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo abarcan:

- Estudiar el fenotipo de las raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan HaHB4, dirigidas tanto por el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) como por un fragmento de aproximadamente 1000 pb correspondiente a la región promotora de HaHB4.
- Analizar la respuesta de las raíces de plantas que sobreexpresan HaHB4 ante el aumento de la temperatura.

METODOLOGÍAS

Se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan HaHB4 bajo el promotor 35S del CaMV (p35S:H4) y bajo un fragmento del propio promotor (pH4:H4). Se sembraron en placas de cultivo cuadradas y se colocaron en forma vertical en cámara de cultivo climatizada (Aralab) con el fin de controlar las condiciones de crecimiento. Se realizaron mediciones diarias del crecimiento de las raíces primarias y la aparición de raíces secundarias. Se evaluó la respuesta de las plantas 35S:H4 y pH4:H4 en condiciones normales de crecimiento (23°C) y frente al calor (29°C), comparadas con plantas *wild-type* (WT).

Se determinó la longitud y tasa de crecimiento de las raíces principales, número y longitud de las raíces secundarias, tanto emergentes como emergidas.

Se utilizó un N = 10 para cada uno de los genotipos y condiciones evaluadas, contabilizando un total de 60 plantas.

Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el test de ANOVA, seguido del test de Tukey para detectar diferencias entre ellos ($p < 0,05$). Los resultados se informan como media \pm Error Estándar de la Media (EEM) para cada grupo.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

En las figuras 1A y 1B se observa la relación en la longitud de la raíz principal de las plantas 35S:H4 y pH4:H4 respecto de las plantas WT, hasta el día 11 luego de la siembra. Las determinaciones se realizaron en plantas crecidas en condición control (23°C) y calor (29°C). Para las plantas 35S:H4, se observa que en condición control no hay diferencia en la longitud de la raíz principal, mientras que bajo estrés por calor los valores de la proporción respecto de las plantas WT están por encima de 1, evidenciando una tendencia a alargar en mayor proporción su raíz principal. En el caso de las plantas pH4:H4, en condición control dicha proporción es levemente menor a 1, lo cual indica una tendencia a presentar raíces principales más cortas que las plantas WT. Dicha tendencia desaparece en la condición de estrés por calor. Si bien, no hay diferencias significativas estadísticamente, se observa una tendencia en estos resultados que podría confirmarse incrementando el número de plantas analizadas.

La figura 2 muestra la relación de la longitud total de las raíces secundarias, determinada el día 11 post-siembra, respecto de las plantas WT, en ambas condiciones ensayadas. Como se puede observar, las plantas pH4:H4 presentan una mayor longitud total de raíces secundarias cuando están expuestas al calor. Relacionando este resultado con lo anterior, podemos decir que las plantas 35S:H4 tienden a alargar más su raíz principal respecto de las plantas WT cuando están expuestas al calor pero no muestran diferencias respecto de la elongación de las raíces secundarias. Por otro lado, si bien las plantas pH4:H4 no muestran diferencias en la elongación de su raíz principal cuando están expuestas al calor, sí presentan diferencias en la longitud total de sus raíces secundarias.

No se observaron diferencias significativas respecto de las raíces secundarias emergentes y emergidas, en ninguno de los genotipos ni condiciones ensayadas. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de las raíces primarias. Como conclusión, se logró determinar una diferencia en el desarrollo del sistema radicular de las plantas que sobreexpresan HaHB4 cuando están expuestas al calor. Esta característica no había sido estudiada hasta el momento en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Además, resultan muy interesantes las diferencias observadas en las raíces de las plantas que sobreexpresan el FT bajo la dirección de un fragmento del promotor propio y un promotor fuerte como el 35S del CaMV, en una condición de estrés. Como perspectivas de trabajo, se propone evaluar por PCR cuantitativa (qPCR) la expresión de transcritos relacionados con la respuesta a estrés abiótico y el desarrollo radicular, haciendo énfasis en el desarrollo de las raíces primarias y secundarias diferencialmente.

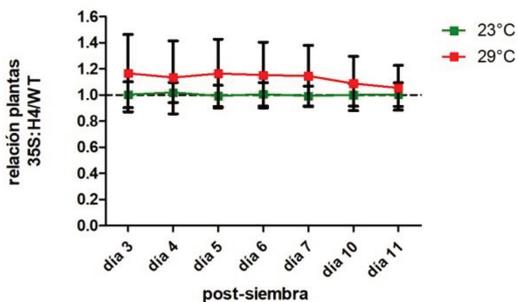


Figura 1-A: Longitud de la raíz principal de las plantas 35S:H4 en condición control (23°C) y calor (29°C) en relación a las plantas WT.

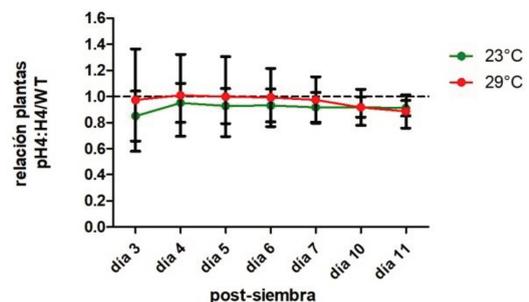


Figura 1-B: Longitud de la raíz principal de las plantas pH4:H4 en condición control (23°C) y calor (29°C) en relación a las plantas WT.

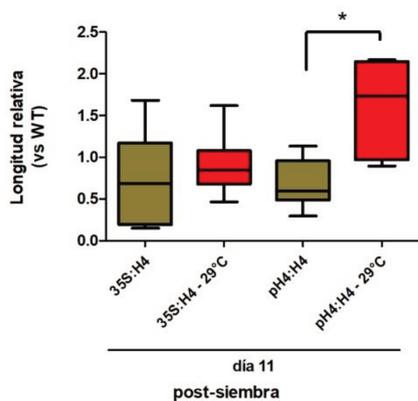


Figura 2: Longitud total de las raíces secundarias de las plantas 35S:H4 y pH4:H4, en condición control y calor, respecto de las plantas WT. Mediante (*) se indican diferencias significativas ($p < 0,05$) determinadas empleado test de ANOVA seguido de test de Tukey.

BIBLIOGRAFÍA

- Ariel F. D., Manavella P.A., Dezar C. A., and Chan R. L.,** 2007. "The true story of the HD-Zip family," Trends Plant Sci., vol. 12, no. 9, pp. 419–426.
- Dezar C. A., Fedrigo G. V., and Chan R. L.,** 2005a. "The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene Hahb4 directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA," Plant Sci., vol. 169, no. 2, pp. 447–456.
- Dezar C. A., Gago G. M., González D. H., and Chan R. L.,** 2005b. "Hahb-4 , a sunflower homeobox-

leucine zipper gene , is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants,” *Transgenic Res.*, vol. 14, pp. 429–440.

Manavella P. A. et al., 2006. “Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor,” *Plant J.*, vol. 48, pp. 125–137.

Manavella P. A., Dezar C. A., Ariel F. D., and Chan R. L., 2008a. “Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 10, pp. 860–867.

Manavella P. A., Dezar C. A., Bonaventure G., Baldwin I. T., and Chan R. L., 2008b. “HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses,” *Plant J.*, vol. 56, no. 3, pp. 376–388.

Ribichich K. F. et al., 2020. “Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4,” *J. Exp. Bot.*, vol. 71, no. 10, pp. 3142–3156.