



EL ROL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE TIPO HD-ZIP I DE ARABIDOPSIS EN CONDICIONES DE HIPERGRAVEDAD

Bude, José

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL-CONICET-UNL

Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Directora: Cabello, Julieta Virginia

Codirectora: Raminger, Betina Lorena

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: Hipergravedad, HD-Zip I, Arabidopsis

INTRODUCCIÓN

Las plantas evolucionaron bajo estímulos medioambientales en constante cambio y, por esta razón, establecieron mecanismos de adaptación a estos estímulos. A pesar de que la fuerza de gravedad es constante en toda la superficie terrestre, la carga mecánica de la fuerza gravitacional sobre los organismos es muy diferente entre la tierra y el agua. Las plantas acuáticas que colonizaron la tierra hace más de 500 millones de años atrás, desarrollaron una serie de adaptaciones para lograr sobrevivir a 1g de gravedad (Kenrick y Crane 1997). Más específicamente tuvieron que adaptarse al estrés mecánico producido por la ausencia de la fuerza de flotación en la tierra. Por esta razón, una de las primeras respuestas de las plantas para sobrevivir a 1 g fue el endurecimiento de sus paredes celulares (Soga y col., 2013). Tamaoki y col. (2013) estudiaron el efecto de la hipergravedad en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a esta condición y encontraron que la hipergravedad induce la expresión de genes involucrados en el endurecimiento de las paredes celulares, en vías de síntesis y señalización de las auxinas, etc.

Sorprendentemente, entre los genes regulados, aparecen dos que codifican para factores de transcripción de la familia HD-Zip I de Arabidopsis: ATHB12 y ATHB53. De ambos FTs existen estudios de la respuesta de estos genes a estrés abiótico y a diferentes eventos del desarrollo en Arabidopsis, pero no existe en la bibliografía estudios acerca de la respuesta de estos genes a condiciones gravitatorias diferentes a 1g. Si bien entre los genes regulados, se encontraban solo ATHB12 y ATHB53, decidimos estudiar también a sus homólogos: ATHB7 (homólogo de ATHB12), ATHB21 y ATHB40 (homólogos de ATHB53) y ATHB5 por su cercanía filogenética a ATHB7 y 12

OBJETIVOS

Título del proyecto: Rol de los factores de transcripción de tipo HD-Zip I en la respuesta a hipergravedad.

Instrumento: PEIC+D.

Año convocatoria: 2022.

Organismo financiador: Ministerio de Ciencia de la Provincia de Santa Fe.

Directora: Cabello, Julieta Virginia



El objetivo general de este trabajo es averiguar qué rol cumplen los factores de transcripción tipo HD-zip I (ATHB7, ATHB12, ATHB21, ATHB40, ATHB53) de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de hipergravidad

Los objetivos puntuales son:

- 1) Evaluar la expresión de ATHB5, 7, 12, 21, 40 y 53 en condiciones de hipergravidad. Este objetivo se llevará a cabo utilizando 2 técnicas; por un lado, mediante histoquímica, se observará la variación de la expresión del gen reportero GUS en plantas de 7, 14 y 21 días transformadas con las construcciones *PrATHB5:GUS*, *PrATHB7:GUS*, *PrATHB12:GUS*, *PrATHB21:GUS*, *PrATHB40:GUS* y *PrATHB53:GUS*. Por otro lado, se cuantificarán los transcritos de estos genes mediante RT-qPCR luego del tratamiento de plantas WT con 300g.
- 2) Evaluar la función de los HD-Zip I en hipergravidad, observando cambios fenotípicos como la longitud de los hipocotilos y el área de los cotiledones, luego de realizar tratamientos de hipergravidad con plantas que sobreexpresan ATHB5, 7 y 12, como así también sus respectivas mutantes simples *athb5*, *athb7*, *athb12* y la mutante doble *athb7-12*.
- 3) Evaluar el efecto de la hipergravidad en el desarrollo de la raíz principal y raíces laterales, observando cambios en sus respectivas longitudes como así también el número de raíces laterales, en plántulas que sobreexpresan ATHB5, 7 y 12 sus mutantes simples respectivas doble *athb7-12*, las mutantes dobles *athb21-40*, *athb40-53*, y la mutante triple *athb21-40-53*.
- 4) Evaluar la función de los genes ATHB5, 7 y 12 observando cambios fenotípicos en plantas adultas, como la longitud de la vara floral, diámetro del tallo, la cantidad de ramificaciones, la cantidad de vainas y finalmente la producción de semillas, luego de realizar tratamientos de hipergravidad con plantas que sobreexpresan ATHB5, 7 y 12, mutantes simples *athb5*, *athb7* y *athb12*

METODOLOGÍA

Se emplearán plantas *Arabidopsis thaliana* en distintos estadios de su ciclo de desarrollo (plántulas de 7 días sembradas en placas como así también plantas de 21 días de edad en estadio vegetativo y de 30-35 días en estadio reproductivo sembradas en macetas con tierra), cultivadas en cámaras de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad).

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal cuenta con las líneas mutantes simples *athb5*, *athb7*, *athb12*, mutantes dobles *athb7-12*, *athb21-40*, *athb40-53* y la mutante triple *athb21-40-53*, las líneas sobreexpresantes *35S:AtHB5*, *35S:AtHB7* y *35S:AtHB12*. También se dispone de líneas que tienen clonado el promotor de cada uno de los genes mencionados, dirigiendo la expresión del gen reportero GUS, para llevar a cabo los ensayos de histoquímica.

En todos los ensayos, el tratamiento de hipergravidad se realizará centrifugando placas de Petri de 5 cm de diámetro o macetas de 6 cm de diámetro durante 24 horas a 300G. Como control se utilizarán plantas sembradas y crecidas en las mismas condiciones y sometidas luego a oscuridad durante las 24h que dure el tratamiento de 300g.

RESULTADOS

Ensayos con plántulas de 7 días de edad.

La hipergravedad induce la expresión de ATHB5 y 12.

Los ensayos de histoquímica realizados con plantas *PrAtHB5:GUS* de 7 días de edad indican que hay un aumento de expresión del gen reportero GUS en el hipocotilo y pecíolo de los cotiledones de plantas tratadas con 300g, en comparación a su control (1g) en oscuridad. Paralelamente, se midió la expresión de ATHB5, mediante RT-qPCR, y se observó que este gen aumenta su expresión en plantas WT tratadas con 300g respecto de su control.

Respecto a los resultados con ATHB12, los ensayos de histoquímica de plántulas transformadas con *PrAtHB12:GUS* muestran aumenta la expresión del gen reportero luego del tratamiento con 300g. Las medidas de expresión de ATHB12, mediante RT-qPCR, muestran un aumento en los niveles del transcripto en las plantas tratadas con 300g luego de 1h de recuperación post-centrifugación frente a su respectivo control.

La hipergravedad reprime la expresión de ATHB53, mientras que no modifica la de ATHB21 y 40.

Los ensayos de histoquímica realizados con plántulas transformadas con la construcción *PrAtHB53:GUS* muestran una pérdida de expresión del gen reportero en el tip de la raíz principal, mientras que los ensayos de histoquímica con plántulas transformadas con la construcción *PrAtHB40:GUS* y *PrATHB21:GUS* no muestran variaciones en la expresión del gen reportero.

Con el objetivo de evaluar la función de estos HD-Zip I en condiciones de hipergravedad, las plantas que los sobreexpresan y sus respectivas mutantes fueron sometidas a 300g para luego cuantificar la longitud de sus hipocótilos y raíces principales inmediatamente después del tratamiento como así también 48 hs post centrifugación.

Los resultados de análisis de longitud de hipocotilos no son concluyentes, por lo que volverán a ensayarse.

En las plantas Wild-type (WT) la hipergravedad provoca un arresto en el crecimiento de su raíz principal, dando valores de longitud que son un 40% menores a los del grupo control, mientras que las plantas *35S:AtHB5* exhiben un arresto de crecimiento de la raíz principal frente a su control ligeramente superior (45%) al del genotipo WT. En contraste, la línea mutante *athb5* experimenta un arresto del crecimiento de su raíz principal frente a su control inferior (16%) al del genotipo WT. Las plantas *35S:AtHB12* parecerían comportarse de igual manera frente al efecto del tratamiento con 300g que el genotipo WT, mientras que. la línea mutante *athb12* demuestran un arresto en el crecimiento de la raíz principal frente a su control superior al genotipo WT. Por último, las plantas *35S:AtHB7* son ligeramente más sensibles a la centrifugación comparado al genotipo WT, mientras que la línea mutante *athb7* exhibe un arresto del crecimiento de su raíz principal inferior al del genotipo WT.

En el caso de las líneas que expresan de manera diferencial a *AtHB21*, *40* y *53* se comportan de manera similar al genotipo WT.

Todas las líneas sobreexpresantes y mutantes que fueron sometidas a 300g desarrollaron una menor cantidad de raíces laterales frente a sus respectivos controles.

Ensayos con plantas de 14 días de edad.

AtHB12 se induce por hipergravedad en las hojas de roseta.

Los ensayos de histoquímica realizados con plantas transformadas con *PrAtHB12:GUS* indican que el tratamiento con 300g induce la expresión del gen reportero GUS en estas plantas. Paralelamente, los análisis de expresión medidos por RT-qPCR utilizando hojas de roseta de plantas de 14 días de edad, indica que *AtHB12* experimenta un ligero incremento en sus niveles de transcritos luego de recuperarse una hora post centrifugación (300g), con respecto a su control (1g).

El resto de los genes no modifica su patrón de expresión en este estadio.

Ensayos con plantas adultas.

La hipergravedad reprime la expresión de AtHB21, 40 y 53 en el botón floral.

Los ensayos de histoquímica realizados con plantas transformadas con *PrAtHB21:GUS*, *PrAtHB40:GUS* y *PrAtHB53:GUS* muestran que la hipergravedad reprime la expresión del gen reportero GUS en el botón floral de las plantas transformadas con *PrAtHB21:GUS* y *PrAtHB53:GUS*, mientras que las plantas *PrAtHB40:GUS* no modifica su patrón de expresión frente al tratamiento con 300g.

El análisis de expresión de estos genes por RT-qPCR realizada con muestras del botón floral de plantas de 21 días de edad, indica que *AtHB21*, 40 y 54 son reprimidos luego del tratamiento con hipergravedad.

Los ensayos de histoquímica realizados con plantas transformadas con *PrAtHB5:GUS* y *PrAtHB12:GUS* muestran que la hipergravedad induce la expresión del gen reportero en las plantas transformadas con *PrAtHB12:GUS*, mientras que en las plantas *PrAtHB5:GUS* no se modifica el patrón de expresión. Sin embargo, el análisis de expresión por RT-qPCR usando rosetas de plantas de 21 días de edad, indica que los niveles de transcritos de *ATHB5* y *ATHB12* no se modifican frente al tratamiento con 300g.

Fenotipo en plantas adultas

Se evaluaron algunos parámetros fenotípicos en plantas adultas de algunos de los genotipos descritos, como ancho del tallo principal, longitud de la vara floral, cantidad de ramificaciones, cantidad de vainas y cantidad de semillas por planta. Si bien estos resultados son preliminares, no existirían diferencias significativas entre las plantas tratadas y control para ninguno de los genotipos analizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Kenrick, P., Crane, P.** 1999. The Origin and Early Diversification of Land Plants - A Cladistic Study. *Geological Magazine*, 136, 213-220.
- Soga, K.** 2013. Resistance of plants to gravitational force. *Journal of Plant Research*, 126, 589-596.
- Tamaoki, D., Karahara I., Nishiuchi, T., Wakasugi, T., Yamada, K., Kamisaka S.** 2014. Effects of hypergravity stimulus on global gene expression during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 16, 179-186.
- Yang, F., Mitra, P., Zhang, L., Prak, L., Verhertbruggen, Y., Kim, J., Sun, L., Zheng, K., Tang, K., Auer, M., Scheler, H., Loque, D.**, 2013. Engineering secondary cell wall deposition in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 11, 325-335.