



La sobreexpresión del factor de transcripción Hahb-10 de girasol altera la respuesta a la luz en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Eva C. Rueda, Carlos A. Dezar, Adriana E. Tron, Natalia Ceaglio, Raquel Chan y Daniel Gonzalez.
Catedra de Biología Celular y Molecular. Fac. de Bioq. y Cs. Biol. Universidad Nacional del Litoral. CC 242 Paraje El Pozo. 3000 Santa Fe. E-mail: rchanXfbc.unl.edu.ar

Resumen

En el presente trabajo se analizó el efecto de la sobreexpresión del factor de transcripción Hahb-10 de girasol en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Hahb-10 pertenece a una familia de reguladores del desarrollo relacionados con la respuesta de las plantas a distintas condiciones ambientales. Las plantas que sobreexpresan Hahb-10 presentaron una mayor coloración en sus hojas y cotiledones bajo determinadas condiciones de iluminación, además de una menor longitud de raíz. Al ser germinadas en oscuridad y luego transferidas a la luz, se observó un mayor porcentaje de sobrevivencia y un mejor desarrollo de las plantas transgénicas con respecto a los controles. La sobreexpresión de Hahb-10 también produjo una mayor tolerancia a las alteraciones en las condiciones de iluminación y que podría conferir a las mismas mayor tolerancia a determinadas condiciones ambientales.

Introducción

El desarrollo de los seres vivos está determinado por un programa secuencial de expresión génica. Este programa está gobernado por una serie de proteínas reguladoras de la expresión que actúan como factores de transcripción. Una característica distintiva de las plantas es que pueden alterar su desarrollo en respuesta a condiciones ambientales, de modo de adaptarse a las mismas. El conocimiento de los factores que gobiernan estas respuestas puede ser útil, de acuerdo a esto, para la producción de plantas con ventajas adaptativas para sobrevivir en determinadas condiciones. En nuestro laboratorio estamos estudiando una familia de factores de transcripción característicos de plantas denominada Hd-Zip. Se piensa que estos factores están precisamente involucrados en la respuesta adaptativa de las plantas a diversas condiciones ambientales. En el presente trabajo hemos estudiado la función del factor de girasol Hahb-10 mediante su expresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos indican que este factor estaría relacionado con la respuesta de las plantas a la luz, confiriendo a las mismas mayor tolerancia a condiciones extremas de iluminación.

Materiales y Métodos

Se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0. El cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* se realizó en una cámara con iluminación y temperatura controladas (seis tubos fluorescentes de luz blanca y GroLux intercalados, a una distancia de 70 cm de las plantas; 22-24°C de temperatura; 16 h de fotoperiodo). El ADNc completo de Hahb-10 fue clonado en el vector pBI121 bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Los clones obtenidos fueron utilizados para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizando el método de inmersión (floral dip) descrito por Clough y Bent (1998). El análisis fenotípico se realizó en plántulas crecidas en placas de Petri que contenían medio MS y 0,8 % agar, y en plantas adultas crecidas en macetas con tierra.

Resultados

Para estudiar la función del factor de transcripción Hahb-10 de girasol, se procedió a expresar el mismo en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Con ese fin, se clonó el ADNc completo del mismo, aislado de una biblioteca de girasol, bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor presente en el vector binario pBI121. Esta construcción fue introducida mediante *Agrobacterium tumefaciens* en plantas de *Arabidopsis*. En las transformantes se presentaron resistencia a kanamicina se verificó la presencia del gen mediante PCR y su expresión utilizando experimentos de northern (Fig. 1). Tres líneas independientes (línea 2, 26 y 27) que presentaron una buena expresión del transgen fueron reproducidas hasta obtener homocigotas y posteriormente analizadas.

Al ser cultivadas en placas de Petri en medio MS, las plantas transgénicas mostraron una coloración verde más pronunciada que las plantas control y, además, se observó una disposición

diferente de los cotiledones (Fig. 2A). La diferente coloración también se observó en hojas de plantas cultivadas en tierra (Fig. 2B) en distintos períodos del desarrollo (Fig. 2B y 2C). Las hojas de plantas transgénicas presentaron, además, una forma más aplanada con respecto a los controles. Notoriamente, esta diferencia fenotípica no fue observada al cultivar las plantas en otras condiciones de iluminación (luz fluorescente blanca). Esto indicaría que el efecto observado depende de algún factor adicional que está presente solo en determinadas condiciones de iluminación, o bien que la sobreexpresión de Hahb-10 produce una alteración de la respuesta de las plantas a la luz. Por otra parte, la medida del largo de la raíz en plántulas de 5 días de germinación indicó que la sobreexpresión de Hahb-10 produce una disminución en la longitud de la raíz principal (Figura 3).

	WT	35S-hahb10
Longitud de la raíz (mm)	10,43 +/- 1,50	8,25 +/- 1,50
Número de plantas analizadas	100	100

Las plantas transformadas o sin transformar fueron crecidas en medio MS en placas de Petri. El largo de la raíz fue medido después de 5 días de germinación en cámara de cultivo en condiciones controladas.

Al verse alterada la respuesta a la luz, se decidió someter a las plantas a distintas condiciones de iluminación para analizar el efecto de estos tratamientos en plantas transgénicas y controles. Al germinar las plantas en oscuridad durante distintos tiempos no se observaron diferencias fenotípicas significativas. Sin embargo, luego de pasar las plantas así germinadas a condiciones de iluminación, las plantas transgénicas se desarrollaron mucho más eficientemente (Fig. 4). Esto indicaría que la sobreexpresión de Hahb-10 confiere una mayor sobrevivencia en condiciones de oscuridad. Esto podría estar relacionado con un mejor aprovechamiento de nutrientes en oscuridad o, alternativamente, con una mayor tolerancia al estrés producido durante el pasaje a condiciones de iluminación.

Como se observa en la Figura 5, la sobreexpresión de Hahb-10 también produce plantas más resistentes al tratamiento con altas intensidades de luz, que son inhibitorias para el crecimiento de plantas no transformadas. En este caso, la exposición de las plantas a una distancia de 18 cm de la fuente de luz durante 1 día produjo una considerable disminución en el desarrollo de plantas control al ser analizadas 5 días después del tratamiento. Esta inhibición no fue observada en las plantas transgénicas. Las diferencias se hicieron mucho mayores cuando la exposición a la luz continua se realizó durante 5 días consecutivos. En este último caso, la observación 5 días después arrojó un resultado que se puede apreciar en la figura 4: las plantas control sucumben casi en su totalidad mientras que las transformadas sobrevivieron en un 87%.

Discusión

La sobreexpresión del factor de transcripción Hahb-10 de girasol produce cambios fenotípicos detectables en plantas de *Arabidopsis thaliana*. La mayoría de las variaciones observadas están relacionadas con la respuesta de las plantas a la iluminación, lo que indicaría que Hahb-10 sería un mediador de esta respuesta. En forma notoria, las plantas transgénicas presentaron mayor resistencia bajo determinadas condiciones de iluminación. Además de ser necesaria como fuente energética, la luz produce cambios en el desarrollo de las plantas y genera cierto tipo de estrés debido a la formación de radicales libres. La mayor tolerancia conferida por Hahb-10 podría estar relacionada, de acuerdo a esto, con una menor producción o una mejor detoxificación de estos radicales libres. En el caso de la sobreiluminación, también es posible que se produzca un aumento de la temperatura de las plantas durante el tratamiento. Actualmente, se está analizando la respuesta de las plantas que sobreexpresan Hahb-10 a condiciones de estrés térmico y oxidativo para poder determinar mediante qué mecanismos se produce el aumento de tolerancia observado.



Referencias

- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Plant J. 16, 735-743.
- Gonzalez, D.H., Valle, E.M., Gago, G., Chan, R.L. (1997) Biochim. Biophys. Acta 1351, 137-149

Figura 4

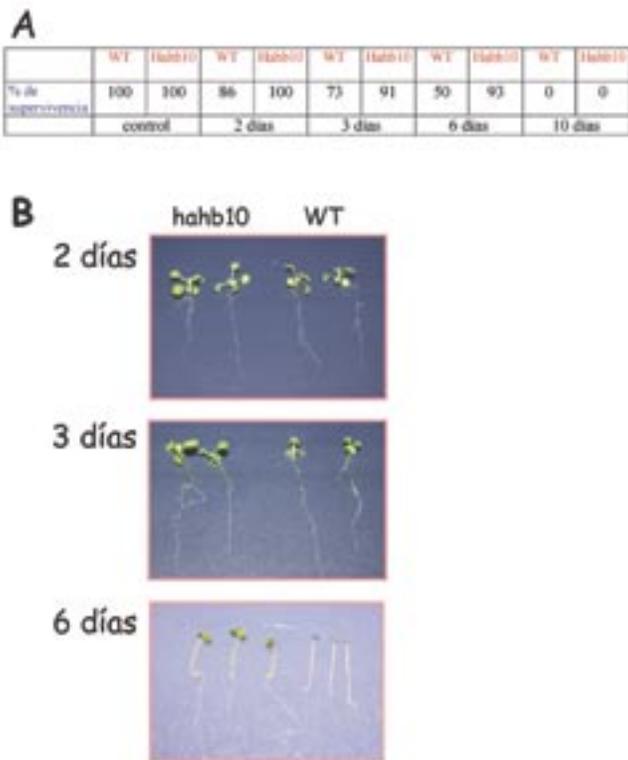


Figura 5

	WT	Hahb10	WT	Hahb10	WT	Hahb10	WT	Hahb10	WT	Hahb10
% de supervivencia	100	100	86	100	73	91	50	93	0	0
	control		2 días		3 días		6 días		10 días	