



Caracterización de la mutante *tin14* insensible a trehalosa de *Arabidopsis thaliana*.

Benjamín Hernández, Cecilia Zampedri, Ramón Suárez, Gabriel Iturriaga, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, fax 777-329 70 30, iturri@uaem.mx

Palabras claves: *Arabidopsis*, estrés osmótico, *TFIIB*

Introducción. Los organismos sometidos al estrés abiótico responden ajustando su metabolismo y patrón de crecimiento para adaptarse. A nivel molecular estos cambios se reflejan en una alteración de la expresión génica, siendo los factores de transcripción un elemento clave (1). Un número significativo de factores de transcripción están involucrados en la adaptación al estrés osmótico. En nuestro laboratorio se aislaron 15 mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensibles a trehalosa (*tin*), una de ellas (*tin14*) posee la inserción del T-DNA en el gen que codifica para el factor de transcripción *TFIIB*. Este factor participa en la transcripción basal dependiente de la RNA polimerasa II, y existe evidencia de que podría estar relacionado con la respuesta al estrés osmótico.

En este trabajo se estudiará el posible papel del factor de transcripción *TFIIB* en el estrés abiótico y en la señalización por azúcares en la mutante *tin 14* de *A. thaliana*.

Metodología. Se analizará la cosegregación de los fenotipos (resistencia a kanamicina e insensibilidad a trehalosa) de la mutante *tin 14* y se obtendrán líneas homocigas de ésta para caracterizar el fenotipo de la mutante. Se analizará la regulación de *TFIIB* a nivel de la transcripción por RT-PCR y QPCR. Por último, se determinarán por microarreglos los genes blanco regulados por *TFIIB*.

Resultados y discusión. Se realizaron cuatro construcciones génicas pTFIIB.2, pANTITFIIB.2, pTFIIBCDs.2 y pTFIIBPRM.2 para transformar *A. thaliana* y así poder complementar con el gen silvestre, silenciar el gen expresando *TFIIB* en antisentido, sobreexpresar el factor *TFIIB* y estudiar el promotor de dicho gen. Para conocer si la mutación en el gen *TFIIB* estaba implicada en el estrés abiótico se realizaron experimentos de germinación a plantas silvestres y mutantes en plantas heterocigas. Los experimentos de germinación utilizando NaCl no revelaron diferencias significativas, posiblemente debido a que el efecto tóxico de la sal se anula por la presencia del alelo silvestre del gen *TFIIB*, o bien a que la mutación no tiene efecto de silenciamiento del fenotipo. En el caso del sorbitol las diferencias en 200mM y 400mM no son significativas, mientras que en el caso de 600mM y 1000mM las diferencias sí son significativas siendo mayor el porcentaje de germinación en el caso de las plantas mutantes. Esto podría sugerir

que la mutación en el factor de transcripción podría favorecer la resistencia al estrés.

Por los datos obtenidos por RT-PCR se puede observar la inducción del gen en las condiciones de estrés osmótico por NaCl a 120, 240 minutos. Pero no se demostró inducción por NaCl a los treinta minutos del tratamiento. En el caso del estrés por sorbitol, la expresión del gen se demostró en toda la cinética a partir de 0.5, 2 y 4 horas. Estos resultados preliminares sugieren que el gen de *TFIIB* está implicado en el estrés por choque osmótico y que la inducción del gen es distinta en el choque osmótico por NaCl y sorbitol. Siendo la respuesta tardía en el caso de la NaCl, que solo fue detectada hasta los 120 y 240 minutos. Mientras que en el caso del sorbitol la inducción del gen fue a partir de los 30 minutos y durante toda la cinética, lo cual apunta a una inducción más temprana del gen por ese estímulo. El análisis informático "meta-profile analysis" (microarreglo virtual) demuestran la expresión del gen de *TFIIB* en las condiciones de estrés por frío, estrés tardío por sequía en raíz, estrés osmótico temprano en la parte aérea, estrés osmótico tardío de raíz además de estrés por salinidad temprano y tardío en raíz, aunque la magnitud de inducción del gen por estrés salino tardío en raíz es mayor. Los resultados concuerdan con los resultados obtenidos por RT-PCR ya que en los primeros 30 minutos no se detectó la inducción del gen por NaCl, mientras que en el caso del tratamiento con sorbitol, desde 30 minutos hasta los 240 minutos sí se encontró la inducción del gen *TFIIB*.

Conclusiones. Con los resultados obtenidos hasta el momento se puede decir que *TFIIB* está implicado en el estrés osmótico, como lo demostraron experimentos y el análisis bioinformático. Esto nos permite continuar con los estudios posteriores del gen generando plantas transgénicas de *A. thaliana* con las diferentes construcciones.

Agradecimiento. Financiado por CYTED, España, proyecto 107PIC0312.

Bibliografía. Fujita, M., Mizukado, S., Fujita, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Matsui, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2007). Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-Expressor (FOX) gene hunting system. *Biochem Biophys Res Commun.* 364(2):250-257.