

BdiRCN4 REGULA LA IDENTIDAD DE LOS MERISTEMAS EN *Brachypodium distachyon*

Machado, Rodrigo

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral

Área temática del proyecto: Ciencias biológicas; sub-área: Biotecnología; grupo X

Palabras clave: regulación de meristemas, TFL1, *Brachypodium distachyon*

INTRODUCCIÓN

En las plantas superiores, la transición de fase entre el estado vegetativo y reproductivo del meristema apical (SAM por sus siglas en inglés) está finamente regulada por diversas vías que integran las señales generadas por estímulos internos y externos (Hanano y Goto, 2011). TERMINAL FLOWER1 (TFL1) controla el tiempo de floración y la arquitectura de la inflorescencia en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), actuando como un regulador negativo del cambio de fase del SAM en la transición del meristema vegetativo (MV) a meristema de inflorescencia (MI), así como en la transición de MI a meristema floral (MF) (Ratcliffe y col., 1998).

Por otra parte, LEAFY (LFY) juega un rol determinante en la identidad del meristema floral, y junto a APETALA1 (AP1) reprimen a TFL1, suprimiendo la indeterminación y promoviendo la formación de los órganos florales (Ratcliffe y col., 1999). A su vez, TFL1 reprime a AP1 y LFY en los MI, manteniendo el meristema indeterminado característico de *Arabidopsis* (Ratcliffe et al 1998). El equilibrio que se establece entre TFL1 y los genes de identidad floral es el factor que regula la arquitectura de las inflorescencias. Por tanto, se podría establecer que mínimas variaciones en este equilibrio podrían ser las responsables de las variación de la arquitectura reproductiva entre distintas especies de plantas con flores (Prusinkiewicz y col., 2007).

En el presente trabajo realizamos análisis funcionales de BdiRCN4, homólogo a TFL1 en *Brachypodium distachyon* (*Brachypodium*). Los resultados obtenidos en esta instancia de investigación aportarán conocimiento sobre las vías de regulación que controlan la floración en gramíneas. La utilización de *Brachypodium* como planta modelo permitirá extrapolar los resultados obtenidos a otras especies de gramíneas como las megatérmicas, de gran interés agronómico en nuestra región socio-económica. Sumado a esto, los estudios de expresión de BdiRCN4 en un sistema heterólogo como *Arabidopsis*, permitirán evaluar el nivel de conservación funcional de TFL1/BdiRCN4 entre mono y dicotiledóneas.

OBJETIVOS

Realizar estudios funcionales de BdiRCN4, a partir del análisis de plantas mutantes de *Brachypodium distachyon*, y plantas sobreexpresantes de *Arabidopsis thaliana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies Vegetales

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis*, ecotipo Columbia-0 (Col-0). Las plantas control fueron transformadas con el vector binario pBI121. Las plantas 35S::BdiRCN4 fueron transformadas con la construcción 35SCaMV::BdiRCN4 clonada en el vector binario pBI121.

Por otra parte, se utilizaron plantas de *Brachypodium*. Las plantas control corresponden a la línea 21.3. Las mutantes insercionales de BdiRCN4 fueron transformadas con la secuencia enhancer mínima del promotor 35SCaMVx4, de acuerdo a lo descrito en Bragg y col. (2012).

Condiciones de cultivo

Arabidopsis: se recolectaron las semillas de las plantas transformadas, se esterilizaron y se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962) y 50 µg/ml de kanamicina. Las placas se llevaron a cámara de cultivo con condiciones de temperatura e iluminación de día largo, 16h de luz a 24°C y 8h de oscuridad a 21°C. Al cabo de 14 días, las plántulas seleccionadas se pasaron a macetas con tierra:perlita:vermiculita(2:1:1 v/v), de 3 a 5 plantas por maceta.

Brachypodium: las semillas se dispusieron en placas de Petri con papel absorbente húmedo y se vernalizaron 10 días a 4°C. Luego se llevaron a cámara de crecimiento, manteniendo las condiciones descritas para *Arabidopsis*. A los 5 días se pasaron a macetas con sustrato fértil a razón de 2 o 3 plantas por maceta.

Transformación de plantas

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se transformaron utilizando el método de inmersión floral (Floral Dip), descrito por Clough y Bent (1998).

Análisis de ácidos nucleicos

Para analizar la presencia del transgén en plantas de *Arabidopsis* transformadas, se realizaron preparaciones de ADN genómico empleando el método descrito por Li y Chory (1998). Al ADN genómico obtenido se lo amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos y luego mediante separación electroforética en un gel de agarosa (Ausubel y col., 1987), se estimó la longitud de los fragmentos.

Para analizar niveles de expresión, se extrajo RNA total de *Brachypodium* y de *Arabidopsis*. Las extracciones de RNA se realizaron con reactivo Trizol (Invitrogen™), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de retro-transcripción se hicieron en volumen final de 20µl, con 1 µg de ARN y siguiendo las especificaciones del fabricante de la enzima MMLV (Promega).

Para cuantificar los transcritos se realizó una PCR semi-cuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para los genes de interés, y Actina2 como gen de referencia para normalizar los niveles de expresión (Charrier y col., 2002). Los niveles de expresión se determinaron en función de la intensidad de las bandas obtenidas al realizar electroforesis en geles de agarosa 2.5% (p/v).

Fenotipado

El análisis fenotípico de plantas de *Arabidopsis* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Boyes y col. (2001), midiendo periódicamente largo de tallo, número de

hojas, número de tallos laterales, ramas secundarias, momento de floración, senescencia, etc.

El análisis fenotípico en *Brachypodium* se realizó siguió el procedimiento descrito por Derbyshire y Byrne (2013), midiendo periódicamente número de hojas, número de ramificaciones basales, altura de planta, momento de floración, largo de inflorescencia, número de espiguillas, etc.

RESULTADOS

Plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan la construcción 35S::BdiRCN4

Se fenotiparon 10 plantas control y 31 plantas transformadas 35S::BdiRCN4. Las plantas transformadas exhibieron un retardo significativo en la transición de MV a MI respecto a las plantas control. Sumado a esto, se observó una marcada extensión del ciclo de vida, ya que las plantas control senescieron alrededor del día 60, en tanto que las transformadas continuaban verdes a los 105 días. (Tabla 1).

	Transición de MV a MI (días)	Senescencia completa (días)
Control	31,7	56
35S::BdiRCN4	48,18	105

Tabla 1: momento de transición de meristema vegetativo a meristema de inflorescencia y momento de senescencia completa en plantas control y plantas transformadas.

Una vez desarrollado el tallo principal de inflorescencia, se observó la morfología de las flores. Las plantas control presentaron flores típicas formadas por 4 sépalos, 4 pétalos, 6 estambres y 2 carpelos fusionados. En cambio, las plantas transformadas presentaron estructuras de tipo “flor sepaloide”, carentes de pétalos, estambres y carpelos. Solo una pequeña proporción de las líneas transformadas lograron revertir el fenotipo hacia el fin del ciclo de vida, y producir flores fértiles y silicuas (Fig. 1).



Figura 1: Plantas de 50 días. A-B, plantas control. C-D, plantas transformadas. Notar en C y D la ausencia de silicuas, así como las estructuras sepaloideas en su lugar.

Resultados preliminares obtenidos a través de PCR semi-cuantitativa demostraron que las plantas transformadas con flores sepaloideas tienen menores niveles de expresión de los genes del modelo ABCDE, entre ellos LFY, AP1 y PI (PISTILLATA) (información no mostrada)

Plantas mutantes de *Brachypodium distachyon*

Actualmente se están fenotipando 8 plantas control y 8 plantas mutantes. De manera similar a lo que ocurre con las plantas transformantes de *Arabidopsis*, las mutantes de *Brachypodium* exhiben un retardo en la transición de MV a MI. Asimismo, análisis anteriores mostraron que la mayoría de las plantas mutantes no son capaces de desarrollar espiguillas, y en caso de hacerlo, las mismas se generan hacia el final del ciclo de vida, con un menor número de antecios, generalmente estériles (Fig. 2).

Se tomarán muestras de las plantas fenotipadas a fin de determinar los niveles de expresión de BdiRCN4, así como de los genes homólogos a los genes de identidad floral de *Arabidopsis*.

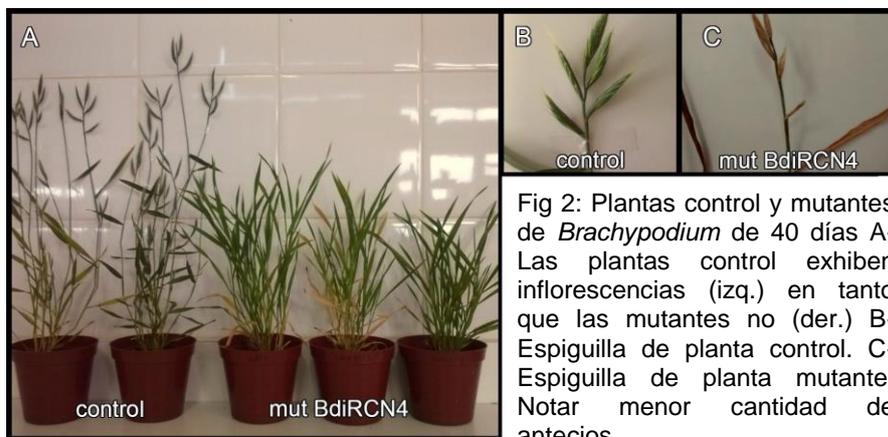


Fig 2: Plantas control y mutantes de *Brachypodium* de 40 días A- Las plantas control exhiben inflorescencias (izq.) en tanto que las mutantes no (der.) B- Espiguilla de planta control. C- Espiguilla de planta mutante. Notar menor cantidad de antecios.

CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos tanto en *Brachypodium* como en *Arabidopsis*, podríamos decir que BdiRCN4 estaría regulando la transición de MV a MI, así como la identidad del meristema de inflorescencia. Debido a que estas funciones son similares a las cumple TFL1 en *Arabidopsis*, se podría postular que la función de estos genes se encuentra conservada entre mono y dicotiledóneas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis* a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499-1510.
2. Bragg, J. N., Wu, J., Gordon, S. P., Guttman, M. E., Thilmony, R., Lazo, G. R., Gu, Y.Q., & Vogel, J. P. (2012). Generation and characterization of the Western Regional Research Center *Brachypodium* T-DNA insertional mutant collection. *PLoS One*, 7(9), e41916.
3. Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., & Kreis, M. (2002). Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology*, 130(2), 577-590.
4. Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, 16(6), 735-743.
5. Derbyshire, P., & Byrne, M. E. (2013). MORE SPIKELETS1 is required for spikelet fate in the inflorescence of *Brachypodium*. *Plant physiology*, 161(3), 1291-1302.
6. Hanano, S., & Goto, K. (2011). *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *The Plant Cell*, 23(9), 3172-3184.
7. Li, J., & Chory, J. (1998). Preparation of DNA from *Arabidopsis*. *Arabidopsis Protocols*, 55-60.
8. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
9. Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L. D., & Coen, E. (2007). Evolution and development of inflorescence architectures. *Science*, 316(5830), 1452-1456.
10. Ratcliffe O.J., Bradley D.J., Coen E.S. (1999) Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development*, 126: 1109-1120.
11. Ratcliffe, O. J., Amaya, I., Vincent, C. A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. S., & Bradley, D. J. (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, 125(9), 1609-1615.