



RESPUESTA A LA VERNALIZACIÓN EN *BRACHYPODIUM DISTACHYON* (L.) P. BEAUV. Bassi, Martín

Laboratorio de Biología Evolutiva y Molecular de Plantas (BEMP) – Instituto de Ciencias Agropecuarias (IciAgro) del Litoral - FCA-UNL-CONICET
Director/a: Uberti Manassero, Nora Graciela
Codirector/a: Gaido, Jimena

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Gramíneas, floración, temperatura ambiente.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado una gran plasticidad fenotípica que les permite adaptar su desarrollo a las condiciones ambientales cambiantes. Cada especie vegetal tiene una temperatura óptima de crecimiento, existe un rango alrededor de esta temperatura en el cual pueden sobrevivir y reproducirse. *Brachypodium distachyon* es una gramínea templada, que se encuentra naturalmente adaptada a diferentes entornos y ecosistemas alrededor del mar mediterráneo (López-Álvarez y col., 2015). La plasticidad sobre la floración de *B. distachyon* en respuesta a la temperatura ambiente, indican una tendencia hacia una demora del momento de emergencia de la espiguilla cuando las plantas se cultivan a altas temperaturas (Boden y col., 2013; Li y col., 2019). Poco se sabe sobre los factores moleculares que regulan la respuesta a estos cambios de temperatura. (Boden y col. 2013) demostraron que la formación de los nucleosomas mediados por la histona H2A.Z es importante en la coordinación de la sensibilidad a los cambios de temperatura durante el desarrollo del grano. Por su parte BdVIL4, una proteína VRN3-like, es capaz de inhibir la floración en respuesta a altas temperaturas, a través de la represión del miRNA156 (An y col., 2015). La respuesta a la vernalización ha sido más estudiada. Se sabe que *BdVRN1* se acumula en hojas y ápices luego de una exposición prolongada al frío (vernalización), y se considera responsable de promover el adelanto en el tiempo de floración mediado por frío en plantas de *B. distachyon* (Ream y col., 2014; Li y col., 2016). A su vez, *BdVRN1* y *BdFUL2* serían capaces de formar dímeros con proteínas SEP (Li y col., 2016), entre las cuales se encuentra *BdPAP2*. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican que plantas con mayores niveles de expresión de *BdPAP2* (de ahora en más llamadas *BdPAP2/ADN-T*) presentan un adelanto en el tiempo de floración respecto a las plantas control (denominadas *Bd21.3*). Sin embargo, este adelanto desaparece cuando ambos genotipos se ven expuestos a un proceso de vernalización (Gonzalo y col., comunicación personal).

Título del proyecto: “Estudios funcionales de *BdPAP2* y su rol en la arquitectura de la inflorescencia de *Brachypodium distachyon*”
Instrumento: CAI+D Joven
Año de la convocatoria: 2016
Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral.
Director/a: Uberti Manassero, Nora.



OBJETIVOS

1. Estudiar los cambios en el tiempo de floración de plantas de *B. distachyon* Bd21.3 y BdPAP2/ADN-T a diferentes temperaturas, considerando la exposición previa (o no) de las semillas a vernalización.
2. Analizar la expresión de *BdPAP2* en las condiciones mencionadas.

METODOLOGÍA

Respuesta a vernalización y temperatura ambiente

Las semillas fueron colocadas en placas húmedas a 4°C, durante una semana en el caso de las semillas control (C), 4 semanas en caso de las vernalizadas (V). Se analizaron las líneas Bd21.3 (genotipo control) y las mutantes BdPAP2/ADN-T (genotipo que cuenta con una inserción en *BdPAP2* que promueve la expresión de este gen). Luego de la vernalización, las semillas fueron pasadas de las placas a macetas con sustrato estéril, y crecidas en cámaras de cultivo con condiciones de iluminación de día largo, con una intensidad de luz 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, a temperaturas diurnas de 23 o 29°C respectivamente. En todos los ensayos se usó un N de plantas igual o mayor a 10.

El análisis fenotípico implicó la determinación del día a floración, contabilizando a partir del día de germinación, así como la determinación del número de hojas totales al momento de floración (Derbyshire y Byrne, 2013).

Los datos obtenidos fueron analizados y comparados mediante el análisis de ANOVA y Test de Tukey con el software Microsoft Excel ® (2019).

Niveles de expresión de *BdPAP2*

Los niveles de expresión de *BdPAP2* fueron determinados por PCR cuantitativa en Tiempo Real (qPCR), tal como se describe en el protocolo especificado para Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Mix suministrado con ROX como colorante de referencia (Agilent). Como molde se utilizó ADN copia obtenido a partir de la retrotranscripción de ARNm total extraído de plantas al día de floración. Como gen de referencia se utilizó *SamDC* (Hong y col., 2008).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Respuesta a vernalización y temperatura ambiente

El análisis fenotípico del desarrollo y tiempo de floración de las plantas de *B. distachyon* crecidas en diferentes condiciones de temperatura y vernalización arrojaron resultados sumamente interesantes, los cuales pueden observarse en la Fig. 1.

En primer lugar, podemos observar un retraso estadísticamente significativo del tiempo de floración de las plantas Bd21.3 en función del aumento de la temperatura de crecimiento. Esto se observa tanto en los días a floración (25,39 días a 23°C vs 35,22 días a 29°C, puntos celestes) como en la cantidad de hojas desarrolladas por las plantas al momento de la floración (13 hojas a 23°C vs 31 hojas a 29°C, barras celestes). Cuando las semillas Bd21.3 son vernalizadas, hay un adelanto en el tiempo de floración y una disminución en el número de hojas producidas (puntos y barras azules). Este resultado concuerda con lo reportado por (Li y col. 2016), donde el tratamiento de vernalización provoca la aceleración de la floración, de la mano con un aumento de la expresión de *BdVRN1*. Sin embargo, el efecto de la temperatura ambiente sigue estando presente, ya que las plantas vernalizadas crecidas a 29°C florecen después y con un mayor número de hojas que aquellas crecidas a 23°C (puntos y barras azules).

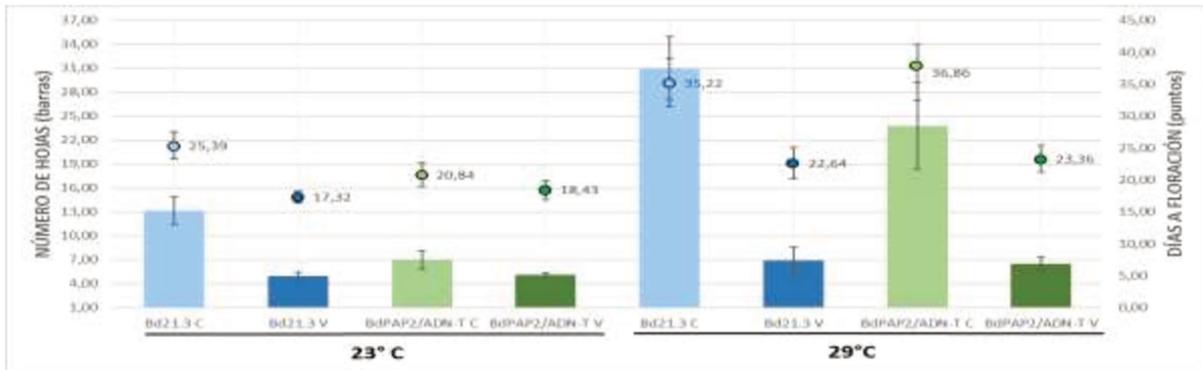


Figura 1: Floración y número de hojas en respuesta a vernalización y temperatura ambiente.

Análisis fenotípico del tiempo de floración de plantas de *B. distachyon* Bd21.3 y BdPAP2/ADN-T, vernalizadas (V) y control (C), en condiciones de crecimiento de 23°C y 29°C, respectivamente.

Las mutantes insercionales BdPAP2/ADN-T crecidas a 23°C muestran un claro adelanto de la floración respecto a las plantas Bd21.3, tanto en días como en número de hojas (barras y puntos verde claro respecto a barras y puntos celestes). Cuando las semillas de BdPAP2/ADN-T son vernalizadas, las plantas se comportan como plantas control vernalizadas, desapareciendo la diferencia en los tiempos de floración.

De manera similar a lo que ocurre con las plantas control, los individuos BdPAP2/ADN-T crecidos a 29°C desarrollan mayor número de hojas y retrasan su floración respecto a aquellos crecidos a 23°C. A 29°C, ambos genotipos florecen al mismo tiempo ($P = 0,394182$, α de 0,05), pero las plantas BdPAP2/ADN-T siguen presentando un menor número de hojas respecto a las plantas control (puntos y barras celeste y verde claro).

Al igual que como se observó a 23°C, las plantas vernalizadas Bd21.3 y BdPAP2/ADN-T no muestran diferencias en días a floración y número de hojas (barras y puntos azules y verdes oscuro).

Niveles de expresión de BdPAP2

El análisis de los niveles de expresión de *BdPAP2* se hizo sobre los dos genotipos estudiados, utilizando las plantas crecidas a 29°C.

Los niveles de *BdPAP2* (Fig. 2) aumentan drásticamente en plantas control Bd21.3 expuestas a vernalización, respecto al mismo genotipo no vernalizado. Esto indica que *BdPAP2* es un gen que responde positivamente a la vernalización.

Las plantas BdPAP2/ADN-T presentan mayores niveles de expresión basales de *BdPAP2* que las Bd21.3, pero no se observa un aumento de la expresión cuando este genotipo es expuesto a vernalización.



Figura 2: Análisis de expresión de *BdPAP2*.

Expresión relativa de *BdPAP2* determinada por qPCR en los genotipos estudiados, control y vernalizadas (C y V al final del genotipo, respectivamente), en plantas crecidas a 29°C.

Estos resultados nos inducen a pensar en dos hipótesis posibles respecto a la función de *BdPAP2* en la regulación de la floración mediada por vernalización. Está claro que *BdPAP2* responde a vernalización, porque sus niveles aumentan drásticamente cuando las semillas del genotipo Bd21.3 son expuestas al frío. Las plantas *BdPAP2/ADN-T* hay una respuesta fenotípica a la vernalización, pero no se observa el aumento de expresión de *BdPAP2*. Esto indicaría que existen factores que actuarían en paralelo a *BdPAP2*, responsables de la respuesta observada. Es posible que uno de los factores involucrados sea *BdVRN1*, aunque la relación entre ambas proteínas aún debe ser dilucidada.

CONCLUSIONES

- La vernalización de los genotipos de *B. distachyon* estudiados provoca un adelanto significativo en el tiempo de floración dentro del mismo genotipo, independientemente de la temperatura a la que se cultiven las plantas.
- En los genotipos Bd21.3 y *BdPAP2/ADN-T*, un aumento de la temperatura de crecimiento provoca un retraso en el tiempo de floración y un aumento en el número de hojas producidas.
- Los niveles de expresión *BdPAP2* en los genotipos con y sin vernalización demuestran que este es un gen de respuesta a vernalización, pero que actuaría en paralelo con otros factores, a fin de promover la floración en respuesta a una exposición prolongada al frío

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

1. **An, Y., Guo, Y., Liu, C., & An, H.** (2015). *BdVIL4* regulates flowering time and branching through repressing miR156 in ambient temperature dependent way in *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 92-99.
2. **Boden, S. A., Kavanová, M., Finnegan, E. J., & Wigge, P. A.** (2013). Thermal stress effects on grain yield in *Brachypodium distachyon* occur via H2A. Z-nucleosomes. *Genome biology*, 14(6), 1-14
3. **Derbyshire, P., & Byrne, M. E.** (2013). MORE SPIKELETS1 is required for spikelet fate in the inflorescence of *Brachypodium*. *Plant physiology*, 161(3), 1291-1302.
4. **Hong, S. Y., Seo, P. J., Yang, M. S., Xiang, F., & Park, C. M.** (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC plant biology*, 8(1), 1-11.
5. **Li, M., Kennedy, A., Huybrechts, M., Dochy, N., & Geuten, K.** (2019). The effect of ambient temperature on *Brachypodium distachyon* development. *Frontiers in plant science*, 10, 1011.
6. **Li, Q., Wang, Y., Wang, F., Guo, Y., Duan, X., Sun, J., & An, H.** (2016). Functional conservation and diversification of APETALA1/FRUITFULL genes in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia plantarum*, 157(4), 507-518.
7. **López-Alvarez, D., Manzaneda, A. J., Rey, P. J., Giraldo, P., Benavente, E., Allainguillaume, J., & Catalán, P.** (2015). Environmental niche variation and evolutionary diversification of the *Brachypodium distachyon* grass complex species in their native circum-Mediterranean range. *American Journal of Botany*, 102(7), 1073-1088.
8. **Microsoft Corporation.** (2019). Microsoft Excel. Retrieved from <https://office.microsoft.com/excel>
9. **Ream, T. S., Woods, D. P., Schwartz, C. J., Sanabria, C. P., Mahoy, J. A., Walters, E. M., Kaeppler, H. F. y Amasino, R. M.** (2014). Interaction of photoperiod and vernalization determines flowering time of *Brachypodium distachyon*. *Plant physiology*, 164(2), 694-709.