

EVOLUCIÓN DE LOS CO-REPRESORES TRANSCRIPCIONALES TOPLESS DE GRAMÍNEAS

Bellino Carolina¹

¹*Cientibecaria, Laboratorio de Genética Evolutiva del Desarrollo, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral
IAL-UNL-CONICET
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL*

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: REL2, gramíneas, inflorescencia

INTRODUCCIÓN

La familia gramíneas (Poaceae o informalmente llamadas “pastos”) abarca aproximadamente unas 11.000 especies entre las que se encuentran destacados cereales que constituyen una parte muy importante de la base nutricional de la humanidad (GPWGII, 2012). Las especies de gramíneas se distribuyen en 13 subfamilias, tres de ellas evolucionaron tempranamente y el resto se agrupan en dos grandes linajes: el clado BEP y el clado PACMAD (GPWGII, 2012).

Las gramíneas son morfológicamente únicas entre las Angiospermas, dado que se caracterizan por tener flores altamente modificadas, agrupadas en estructuras llamadas espiguillas (Cheng y col., 1983; Clifford 1987; Ikeda y col., 2004). Las espiguillas se encuentran distribuidas sobre distintos sistemas de ramificación de inflorescencias. La morfología de la inflorescencia de las gramíneas es conocida por ser extremadamente variable entre las especies, compleja en su desarrollo, además de ser genética y agrónomicamente importante (Malcomber y col., 2006). Recientemente se describió un mecanismo molecular a través del cual los meristemas axilares pueden adquirir el carácter determinado en la inflorescencia de maíz (Gallavotti et al., 2010). En este modelo, RAMOSA1 (RA1) y RAMOSA1 ENHANCER LOCUS2 (REL2) forman un complejo, interaccionando vía los motivos EAR (“Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression”) de RA1 y el dominio CTLH (C-terminal to lysencephaly type1-like homology, LisH) de REL2. El complejo RA1/REL2 se une al promotor de un gen blanco (probablemente LIGULESS1 (LG1), Eveland et al., 2014) para promover la condición determinada en los meristemas axilares de la inflorescencia. RAMOSA1 es un factor de transcripción que pertenece a la clase de las proteínas “Cys2-His2 zinc finger subclase EPF” formada por 175 aminoácidos (525 pares de bases; no posee intrones) (Vollbrecht et al., 2005). La proteína está compuesta por el dominio “zinc finger” y corriente abajo se encuentran dos dominios represores EAR (LxLxL). Es interesante remarcar que RA1 es un locus que fue seleccionado durante el proceso de domesticación de maíz (Sigmon and Vollbrecht, 2010). Sin embargo, su evolución a lo largo de las

Proyecto: Este proyecto se inserta en el proyecto marco PICT-2013-0757 denominado “Desarrollo y diversificación de inflorescencias de Gramíneas: rol de los genes de meristema APO1 y RFL/FLO/APO2”.

Director del proyecto: Reinheimer Renata

Director del becario: Reinheimer Renata

Angiospermas aún no está clara. En particular, RA1 está ausente en los genomas de especies del clado BEP.

En lo que respecta a REL2, está compuesto por 1141 aminoácidos (3426 pares de bases; 25 intrones) y es homólogo funcional del co-represor transcripcional TOPLESS (TPL) de Arabidopsis (Long et al., 2006; Gallavotti et al., 2010). La organización de los dominios conservados de REL2 se asemeja a TPL. El N-terminal se caracteriza por la presencia de dos dominios, el dominio LisH (lyssencephaly type1-like) y el dominio CTLH (C-terminal de LisH). Corriente abajo del dominio CTLH le sigue una región rica en prolina de función desconocida, a la que le continúan 11 regiones repetitivas WD40 (también conocidos como repeticiones beta-transducina, dominio importante en la interacción proteína-proteína) (Gallavotti et al., 2010).

Considerando la importancia del circuito Ramosa durante el desarrollo de la inflorescencia de maíz y la compleja evolución de RAMOSA1 en las gramíneas, nos propusimos comenzar a explorar en qué medida REL2 acompaña esa complejidad.

OBJETIVOS

Ampliar el conocimiento sobre las divergencias en los mecanismos moleculares que confieren determinación a los meristemas axilares de la inflorescencia de gramíneas.

METODOLOGÍA

Con el objetivo de reconstruir la evolución molecular de REL2 y determinar las homologías entre los genes, se buscaron secuencias que codifican para los homólogos de la familia TPL de gramíneas. Para ello se realizaron búsquedas BLAST y BLASTP empleando las secuencias TPL de Arabidopsis y maíz en las siguientes bases de datos: (1) colección de nucleótidos y secuencias genómicas de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), (2) Gramene (<http://www.gramene.org>) y (3) Phytozome (<http://www.phytozome.net>). Estas secuencias fueron alineadas usando el software MUSCLE (Edgar, 2004), y corregidas manualmente usando el software MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Para suplementar las secuencias disponibles en la web se generaron secuencias adicionales de homólogos de REL2 en otras especies de gramíneas: *Lolium*, *Trigo*, *Setaria*, *Eleusine*, *Chasmantium*. Las plantas fueron cultivadas en las cámaras de crecimiento del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral. Para los RT-PCR, el RNA fue extraído de inflorescencias usando RNazol@RT (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones de fabricación. Para las reacciones de RT se usó la enzima M-MLV (PBL) siguiendo las instrucciones de fabricación. El oligo-dT se optimizó a 100µM. UBIQUITINA se usó como control positivo. Del alineamiento anterior, se diseñaron oligos degenerados para amplificar la secuencia de REL2 en dichas especies usando el software Primacode (Gadberry y col. 2005). Los productos amplificados fueron subclonados en el vector pGEM-T y verificados mediante secuenciación usando el servicio de MACROGEN Inc. Las secuencias obtenidas fueron incorporadas al alineamiento previo.

Los árboles filogenéticos se reconstruyeron mediante Inferencia Bayesiana (IB) en MrBayes 3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Los modelos de IB fueron estimados usando MrModelTest 2.2 (Nylander, 2004). A partir de la topología obtenida se identificaron los homólogos directos de REL2 en otras gramíneas. Para identificar cambios en la secuencia de aminoácidos en un contexto evolutivo, las transiciones de codones fueron optimizadas sobre los árboles obtenidos previamente usando Mesquite (Maddison and Maddison, 2010).

Por otro lado se buscaron motivos adicionales a los reportados en los genes de REL2 utilizando las secuencias proteicas de maíz, arroz y *Brachypodium*. Las predicciones

de motivos se realizaron utilizando el software MEME (Bailey y col. 2009). A su vez, dada la sospecha de que REL2 genera transcritos alternativos, utilizamos el predictor de splicing GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) para su análisis y predicción en las secuencias de arroz, trigo, Setaria, maíz y Brachypodium.

RESULTADOS

Con el objetivo de reconstruir la evolución molecular de REL2 se seleccionaron 64 secuencias correspondientes a genes TOPLESS en diversas especies de Angiospermas. Las secuencias se alinearon y se obtuvo una matriz de 4067 caracteres. Con este dataset se reconstruyó la evolución molecular de TPL en Angiospermas. Se obtuvo una filogenia altamente soportada donde TPL queda dividida en al menos 4 linajes (Figura 1). REL2 integra un clado conformado por secuencias de Dicotiledóneas y Monocotiledóneas. De la topología del árbol se deduce que: (1) REL2 es un gen de copia única en Angiospermas, excepto en *Panicum virgatum* (Pv, Figura 1) que parece tener dos copias y (2) no es homólogo a ninguno de los cinco TPL reportados para Arabidopsis.

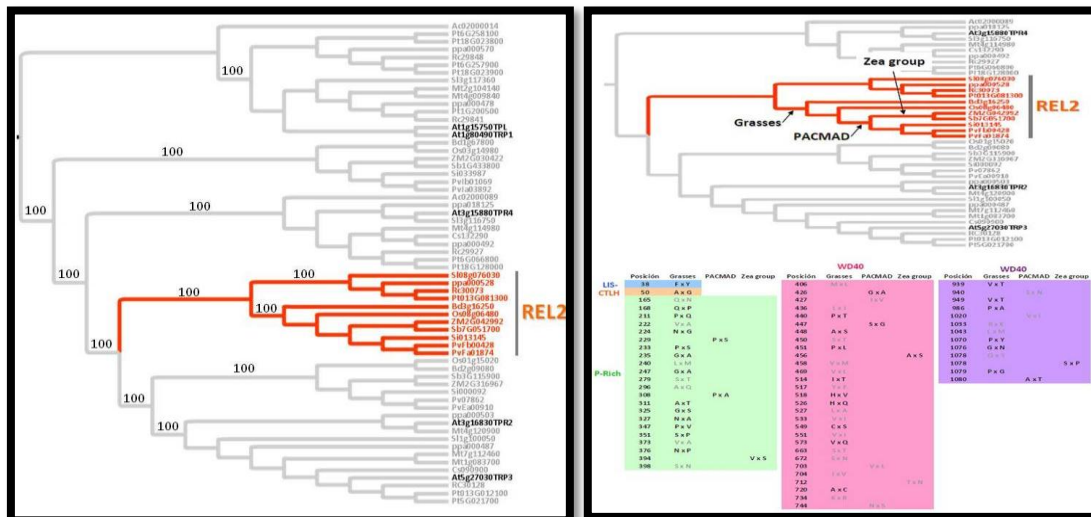


Figura 1: Topología del árbol consenso de **Figura 2:** Diversificación de aminoácidos mayoría de TOPLESS en Angiospermas. Los de REL2 a los largo de la evolución de las números arriba de las ramas indican valores de gramíneas. soporte de Bootstrap.

Para evaluar si la región CTLH experimentó cambios en su secuencia de interacción con RA1 en diversas gramíneas, analizamos la evolución de la sustitución de nucleótidos no-sinónimos (que producen cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína). A partir de este análisis no pudimos detectar cambios significativos en la región CTLH que se correlacionen con la aparición de motivos EAR adicionales a lo largo de la evolución. La mayor diversificación de aminoácidos se observa en el origen de las gramíneas (Figura 2). Muchas de estas mutaciones permiten suponer un cambio importante en la conformación de la proteína de REL2 de gramíneas con respecto al del resto de las Angiospermas. En el análisis de motivos, se observan tres regiones altamente conservadas. Asimismo, se identificaron motivos adicionales de función desconocida ubicados entre los dominios LisH-CTLH y repeticiones WD40 (Figura 3). El predictor de splicing arrojó dos posibles transcritos para maíz, arroz y Brachypodium. Para arroz y Brachypodium, un transcripto corresponde a la región LisH-CTLH completa, mientras que el otro corresponde a una región perteneciente a las repeticiones de WD40. En el caso de Maíz, ambos transcritos contienen la región LisH-CTLH completa, sin embargo uno conserva regiones pertenecientes a WD40-repeat 1 y su alternativo, regiones pertenecientes a WD40-repeat 2.

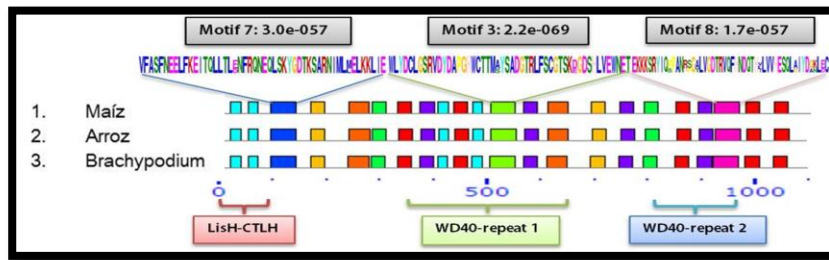


Figura 3: Motivos conservados en las secuencias de REL2.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a estos resultados, podemos decir que REL2 es copia única en la mayoría de las gramíneas. La región CTLH de REL2 no presenta signos de co-evolución con los sitios EAR de interacción de RA1. Sin embargo, la supuesta presencia de distintos transcritos y la conservación de ciertos motivos desconocidos entre los dominios LisH-CTLH y WD40 nos llevan a pensar que la función de este gen es mucho más compleja de lo que se conoce.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bailey T.L., Bodén M., Buske F.A., Frith M., Grant C.E., Clementi L., Ren J., Li W.W., Noble W.S.,** 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* 37:W202-W208.
- Cheng, P.C., Greyson, R.I., Walden, D.B.,** 1983. Organ initiation and the development of unisexual flowers in the tassel and ear of *Zea Mays*. *Am. J. Bot.* 70: 450–462.
- Clifford, H.T.,** 1987. Spikelet and floral morphology. In *Grass Systematics and Evolution*, T.R., Soderstrom, K.W., Hilu, C.S., Campbell, and M.E., Barkworth, eds (Washington, DC: Smithsonian Institute), pp. 21–30.
- Edgar, R.,** 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Eveland, A. L., Goldshmidt, A., Pautler, M., Morohashi, K., Liseron-Monfils, C., Lewis, M. W., ... & Olson, A.,** 2014. Regulatory modules controlling maize inflorescence architecture. *Genome research*, 24(3), 431-443.
- Gadberry M. D., Malcomber S. T., Doust A. N., Kellogg E. A.,** 2005. Primaclade - a flexible tool to find primers across multiple species. *Bioinformatics* 21: 1263-1264
- Gallavotti A., Long. J.A., Stanfield S., Yang. X., Jackson D., Vollbrecht E., Schmidt R.J.,** 2010. The control of axillary meristem fate in the maize ramosa pathway. *Development* 137: 2849–2856.
- Grass Phylogeny Working Group II.,** 2012. New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. *New Phytologist* 193: 304-312.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F.,** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ikeda, K., Sunohara, H., and Nagato, Y.,** 2004. Developmental course of inflorescence and spikelet in rice. *Breeding Sci.* 54: 147–156.
- Long J.A., Ohno C., Smith Z.R., Meyerowitz E.M.,** 2006. TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science* 312: 1520–1523.
- Maddison W.P., Maddison D.R.,** 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73.
- Malcomber, S.T., Preston, J.C., Reinheimer, R., Kossuth, J., and Kellogg E.A.,** 2006. Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Adv. Bot. Res.* 44: 426–481.
- Nylander J.A.A.,** 2004. MrModelTest 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Sigmon B., Vollbrecht E.,** 2010. Evidence of selection at the ramosa1 locus during maize domestication. *Molecular Ecology* 19: 1296–1311.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.,** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Vollbrecht E., Springer P.S., Goh L., Buckler VI E.S., Martienssen R.,** 2005. Architecture of floral branch systems in maize and related grasses. *Nature* 436: 1119-1126.