

BdiRCN4 interviene en el mantenimiento de caracteres juveniles de la morfología externa e interna de la inflorescencia

Machado Rodrigo

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

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: BdiRCN4, inflorescencia, anatomía

INTRODUCCIÓN

La proteína BdiRCN4 de *Brachypodium distachyon*, homóloga a TFL1 de *Arabidopsis thaliana*, regula la identidad de los meristemas retrasando la transición del meristema vegetativo a meristema de inflorescencia, e inhibiendo la formación de flores (Ratcliffe y col., 1998). Plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan BdiRCN4 presentan inflorescencias con el eje principal más grueso y con mayor número de ramificaciones que las plantas salvajes. El mayor número de ramas de las inflorescencias en plantas BdiRCN4 se relaciona con el mantenimiento por más tiempo del meristema de inflorescencia, y con la prolongación del ciclo de vida de estas plantas (90-100 días) respecto a las plantas salvajes (60 días). Por otra parte, las inflorescencias de plantas BdiRCN4 presentan brácteas en lugar de flores, y solo eventualmente florecen (Machado y col., en preparación).

El crecimiento en grosor (=crecimiento secundario) en tallos de dicotiledóneas resulta de la generación de tejido secundario por parte de meristemas laterales como el cambium y el felógeno, los cuales surgen entre tejido primario, ya avanzado el desarrollo de la planta (Esau, 1977). A pesar del breve ciclo de vida y la condición herbácea de *A. thaliana*, varios de sus órganos como raíz, hipocotilo y tallo de la inflorescencia desarrollan cambium vascular y crecimiento secundario (Nieminen y col., 2015). Los tallos de estructura primaria de *A. thaliana*, corresponden a una eustela típica, en la cual se presentan haces vasculares (HV) dispuestos en forma de anillo interrumpido por regiones de parénquima. El parénquima de las regiones interfasciculares conecta la zona central del órgano (médula) con la región periférica (córtex). Los HV en *A. thaliana* son siempre colaterales, con xilema localizado hacia la médula, y floema hacia el córtex. El crecimiento secundario en estas plantas comienza con el surgimiento del cambium vascular entre floema y xilema primario (=cambium fascicular), y con la generación por parte del cambium de xilema secundario hacia el centro del órgano, y de floema secundario hacia la periferia. Tardíamente entre los HV surge el cambium interfascicular, como consecuencia de un proceso de desdiferenciación de las células de parénquima ubicadas en las regiones interfasciculares. Este cambium tardío genera los mismos tejidos de conducción secundarios producidos por el cambium fascicular, determinando de esta manera que la estructura secundaria del tallo de la inflorescencia presente el sistema vascular dispuesto como un anillo continuo.

OBJETIVOS

Determinar de qué manera las plantas transgénicas BdiRCN4 adquieren tallos de mayor diámetro que las plantas salvajes, analizando de manera comparativa secciones transversales de los ejes de las inflorescencias de estas plantas y de plantas control de *A. thaliana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies Vegetales

Se utilizaron plantas de *A. thaliana*, 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.

Condiciones de cultivo

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 plantas por maceta.

Análisis de ácidos nucleicos

Para analizar la presencia del transgén en plantas 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.

Análisis Anatómicos

Para la obtención de los preparados histológicos, se tomaron muestras de la región basal del tallo de la inflorescencia de plantas sobreexpresantes BdiRCN4 y de plantas salvajes de 33 días de edad. Las muestras fueron fijadas en FAA (Formol:Ácidoacético:Alcohol etílico 70%, 10:5:85, v/v/v) por 48 hs., deshidratadas a través de una serie creciente de etanol, clarificadas con xilol, e incluidas en parafina (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Ruzin, 1999).

Los bloques de parafina con las muestras en su interior, fueron cortados transversalmente a 10µm de espesor, mediante la utilización de un micrótopo de rotación. Las secciones obtenidas fueron teñidas utilizando doble coloración de safranina-*fastgreen*, y finalmente fueron montadas con bálsamo de Canadá (Johansen, 1940).

Todos los preparados fueron observados bajo un microscopio Leica DM1000, y fotografiados con una cámara digital Canon EOS REBEL T2i adaptada al equipo.

RESULTADOS

Los estudios anatómicos muestran que plantas control de 33 días de edad presentan ejes de las inflorescencias con 7-8HV, fibras en la región interfascicular, cambium vascular, y formación de tejido de conducción secundario. Por otra parte, a igual tiempo de vida, plantas BdiRCN4 presentan los ejes de las inflorescencias con mayor

número de HV (cerca de 14), carecen de fibras interfasciculares, y mantienen la estructura primaria de eustela típica, sin indicios de formación de cambium vascular y de crecimiento secundario (Fig. 1).

El mayor grosor de las plantas transformantes en relación al control, es consecuencia del incremento de tejido parenquimático, principalmente de la médula, y del número de HV primarios generados por el meristema fundamental y por el procambium respectivamente, y no así de la formación de tejidos secundarios derivados de meristemas laterales.

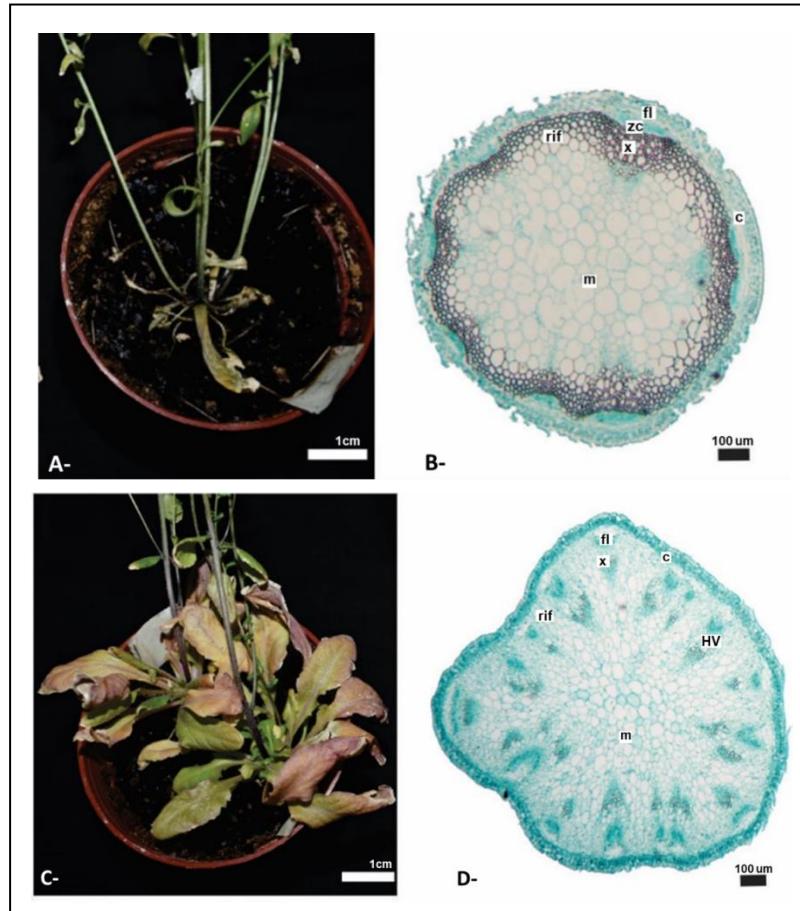


Figura 1. Plantas de *A. thaliana* de 33 días. **A-** Región basal de la inflorescencia de una planta control. **B-** Sección transversal del tallo de la inflorescencia de una planta control. **C-** Base de la inflorescencia de una planta BdiRCN4. **D-** Sección transversal del tallo de la inflorescencia de una planta BdiRCN4. Referencias: c, córtex; fl, floema; HV, haz vascular; m, médula; rif, región interfascicular; x, xilema; zc, región cambial.

Al momento en el cual los ejes de las inflorescencias de plantas control y plantas BdiRCN4 exhiben las características descritas (=33 días de edad), las plantas control presentan flores normales tanto a nivel exomorfológico como anatómico (Fig. 2), mientras que las plantas BdiRCN4 continúan ramificando y muestran un conjunto de filomas semejantes a brácteas, en lugar de los antofilos típicos (Fig. 2).

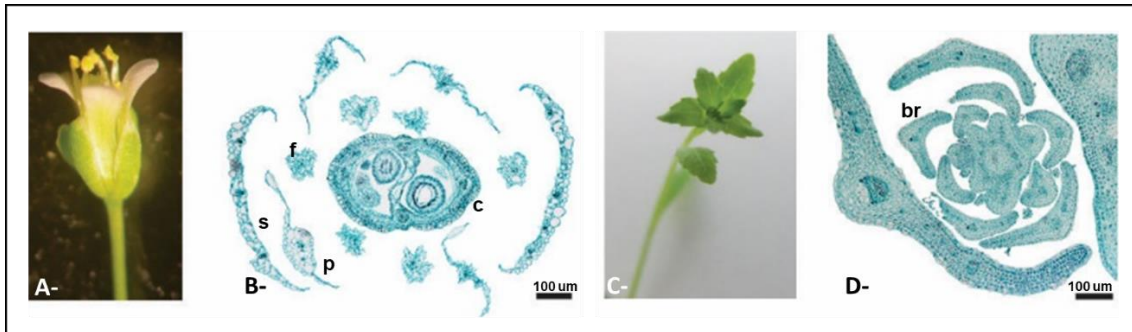


Figura 2. Plantas de *A. thaliana* de 33 días. **A y B-** Flores normales de plantas control. **C y D-** Braquiblastos formados por brácteas en lugar de antofilos de plantas BdiRCN4. Referencias: br, brácteas; c, carpelo; f, estambre; p, pétalo; s, sépalo.

CONCLUSIÓN

El presente estudio muestra que, aunque el diámetro del tallo de la inflorescencia de las plantas BdiRCN4 podría indicar un incremento del crecimiento secundario, estas plantas mantienen su estructura primaria. Esto implica que el retraso en la ontogenia de estas plantas es coincidente tanto a nivel exomorfológico como anatómico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **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.
3. **D'Ambrogio de Argüeso, A.** (1986). Manual de técnicas en histología vegetal, Ana D'Ambrogio de Argüeso.
4. **Esau, K.** (1977). *Anatomy of Seed Plants*. 2nd edn. J.
5. **Johansen, D. A.** (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p.
6. **Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
7. **Nieminen, K., Blomster, T., Helariutta, Y., & Mähönen, A. P.** (2015). Vascular cambium development. *The Arabidopsis Book*, 13, e0177.
8. **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.
9. **Ruzin, S. E.** (1999). *Plant microtechnique and microscopy* (Vol. 198). New York: Oxford University Press.