



PLANTILLA PARA PRESENTACIÓN DE RESUMEN EXTENDIDO

ESTUDIOS FUNCIONALES DE *BdPAP2* Y SU ROL EN LA REGULACIÓN DE LOS TIEMPOS DE FLORACIÓN EN *Brachypodium distachyon*.

Eusebi, Delfina¹, Gunthardt, María Margarita¹

¹Laboratorio de Biología Evolutiva y Molecular de Plantas - Departamento de Biología Vegetal - Facultad de Ciencias Agrarias - UNL

Director/a: Uberti Manassero, Nora Graciela

Codirector/a: Muchut, Sebastián Elías

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Gramíneas, Meristemas, AP1.

INTRODUCCIÓN

B. distachyon, una gramínea miembro de la subfamilia Pooideae, es una hierba anual, silvestre, endémica del Mediterráneo y Medio Oriente, que pocos años atrás comenzó a emplearse como planta modelo de investigación para el estudio de cereales templados y otras gramíneas relacionadas. La secuenciación de su genoma, junto con la facilidad de cultivo, tamaño pequeño y ciclo de vida corto, ayudó a *B. distachyon* a alcanzar su potencial como sistema modelo para el desarrollo de nuevos cultivos utilizados como fuente de energía y alimentos.

Dada la relevancia de las gramíneas en el contexto social, conocer las vías que regulan la floración y la producción de granos en estas especies es importante para el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento y cultivo. El primer paso en el proceso hacia la floración es la transición del meristema vegetativo (MV) a meristema de inflorescencia (MI) o reproductivo. En gramíneas, diversos estudios han relacionado la función de las proteínas de tipo SEP, y específicamente de PAP2, con la regulación de los meristemas. En *Oryza sativa* (arroz), la combinación entre la ausencia de expresión de *PAP2* y los bajos niveles de expresión de los genes ortólogos de *AP1* genera plantas que no logran realizar la transición de MV a MI, posiblemente debido a una disminución en los niveles de expresión de *FT* (Kobayashi y col., 2012). En concordancia, recientemente se ha reportado una vía de regulación conservada entre *A. thaliana* y arroz, que determina el tiempo de floración y la arquitectura de la inflorescencia en ambas especies. En *A. thaliana* SOC1, SVP, AGL24 y SEP4, todas proteínas MADS-box, presentan funciones redundantes y regulan negativamente a *TFL1* en el MI, a través de la formación de dímeros con *AP1*. Lo mismo ocurre con sus ortólogos en arroz, los cuales determinan la arquitectura de la inflorescencia a través de la regulación de *RCN4*, homólogo de *TFL1* (Liu y col., 2013). En *B. distachyon* se encuentra una copia del gen homólogo a *PAP2* de arroz (Wei y col., 2014) y cuatro copias de genes homólogos a *AP1* de *A. thaliana*, de los cuales solo *BdVRN1* y *BdFUL2* estarían involucrados en la regulación del tiempo de floración y serían

capaces de formar dímeros con proteínas SEP (Li y col., 2016). Por su parte, *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).

En base a lo descripto, el presente trabajo propone realizar estudios tendientes a determinar la relación entre *BdPAP2* y las proteínas tipo *AP1* en el control de la especificación de los meristemas y la regulación del tiempo de floración en *B. distachyon*. Así mismo, los ensayos de expresión de *BdPAP2* en un organismo heterólogo como *A. thaliana*, contribuirán a determinar el grado de conservación funcional de las vías de regulación en las que se encuentran involucrados los genes SEP de las angiospermas en general.

OBJETIVOS

1. Estudiar los cambios en el tiempo de floración y los niveles de expresión del gen blanco *TFL1* ocasionados al expresar *BdPAP2* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes en el gen *AP1*.
2. Analizar el efecto de la vernalización sobre los cambios en el tiempo de floración y en los niveles de expresión del gen blanco *RCN4* en dos líneas mutantes de *B. distachyon* con niveles alterados de *BdPAP2*.

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 Graciela.

METODOLOGÍA

Objetivo 1: Para estudiar los cambios en el tiempo de floración y los niveles de expresión del gen blanco *TFL1*, se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes en el gen *AP1* (*ap1-11*) con la construcción *35SCaMV::BdPAP2*. Esto se realizó mediante la técnica de inmersión floral descrita por Clough y Bent (1998), la cual consiste en sumergir las inflorescencias de *A. thaliana* en una solución de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene la construcción mencionada. Para aumentar el número de óvulos inmaduros capaces de ser transformados, se realizaron cortes específicos de las inflorescencias, por encima del último nomófilo, 3 veces consecutivas durante la semana previa al momento de la inmersión floral.

La selección de las plantas transformantes se llevó a cabo en un medio de MS suplementado con antibiótico kanamicina. Una vez seleccionadas, se transfirieron a macetas con sustrato fértil y se crecieron en cámara de cultivo con condiciones de día largo (16 horas de luz a 24°C, 8 horas de oscuridad a 18°C). La inserción del gen de interés se detectó mediante PCR sobre ADN genómico, utilizando oligonucleótidos específicos para *BdPAP2*. Actualmente, las plantas de esta primera filial se encuentran en la etapa reproductiva. Una vez formadas las vainas y

maduras las semillas, se recolectarán independientemente y se analizarán el número de inserciones por línea y el nivel de expresión del gen de interés. Así mismo, se realizará un análisis fenotípico preliminar de la segunda filial, haciendo énfasis en la edad de la planta al momento de floración, así como en el número de hojas desarrolladas hasta dicho momento. En paralelo, se tomarán muestras de plantas de 12 días de edad, para evaluar los niveles de expresión del gen blanco *TFL1*.

Objetivo 2: Se realizaron análisis fenotípicos de las dos líneas mutantes con niveles alterados de expresión de *BdPAP2*. La línea mutante SNP posee una mutación puntual que genera un cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en el último nucleótido del ante-último exón del gen *BdPAP2*. El cambio nucleotídico se encuentra en un sitio indispensable para el correcto corte y empalme, lo cual implicaría un procesamiento incorrecto del ARNm, derivando en una disminución de la expresión de *BdPAP2*. Por otra parte, la segunda línea estudiada presenta una inserción de ADN-T en el segundo intrón de *BdPAP2*, el cual acarrea una secuencia capaz de reclutar la maquinaria de transcripción y promover la expresión del gen. Datos previos obtenidos en el laboratorio indican que la expresión de *BdPAP2* en estas plantas es aproximadamente cinco veces mayor que en las plantas control.

Ambas líneas mutantes trabajadas serán comparadas con la línea salvaje 21.3 en sus tiempos de floración.

La vernalización de las plantas fue llevada a cabo según las condiciones descritas por Li y colaboradores (2016), las cuales consisten en conservar las semillas humedecidas durante 1 mes a 4°C. El análisis fenotípico abarcó: número de hojas totales contabilizadas cada 2-3 días, número de hojas totales al momento de floración, y día a floración contabilizando a partir del día de germinación.

Los niveles de expresión del gen blanco *RCN4*, así como los niveles de *BdPAP2*, fueron cuantificados por PCR Cuantitativa en Tiempo Real (qPCR), utilizando como molde ADN copia obtenido a partir de la retrotranscripción de ARNm total extraído de plantas de 18 días. Como gen de referencia se utilizó *SamDC* (Hong y col., 2018).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Objetivo 1: Las plantas de *A. thaliana* mutantes en el gen *AP1* (*ap1-11*) fueron transformadas exitosamente con la construcción 35SCaMV::*BdPAP2*. La inserción del gen de interés se corroboró mediante extracción de ADN genómico seguido de PCR con oligonucleótidos específicos para *BdPAP2*. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa donde, como se observa en la Figura 1, se obtuvieron los fragmentos correspondientes del tamaño esperado. Cuatro de las cinco líneas evaluadas acarrean el gen de interés.

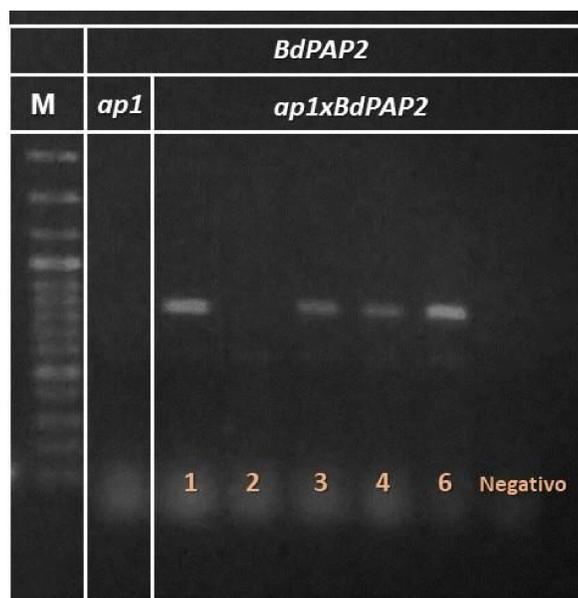


Figura 1. Análisis genotípico de plantas mutantes *ap1* transformadas con *BdPAP2*. La foto corresponde a una electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos al amplificar el gen de interés con oligonucleótidos específicos. M, marcador de peso molecular; *ap1*, control sobre ADN genómico de *ap1* sin transformar; calles 1 a 6, ADN genómico de plantas *ap1* transformadas; negativo, control negativo sin ADN genómico.

Las líneas analizadas corresponden a la primera generación de plantas transformadas. En la siguiente generación se analizará la segregación del gen de resistencia al antibiótico en cada línea, a fin de seleccionar aquellas que posean solo una inserción. Así mismo, se procederá a evaluar el tiempo de floración de las líneas transformantes en comparación con plantas *ap1-11* y plantas control.

Objetivo 2: El análisis fenotípico de la línea SNP de *B. distachyon* arrojó los siguientes resultados: las plantas mutantes, con menores niveles de expresión de *BdPAP2*, presentan un retraso en el tiempo de floración respecto a las plantas control 21.3 ($27,2 \pm 1,8$ vs $22,8 \pm 1,7$). Los resultados se analizaron utilizando una prueba T ($p \leq 0,05$), la cual confirmó que la diferencia en el tiempo de floración de ambas líneas es estadísticamente significativa. Es interesante mencionar que, si bien las líneas presentan diferencias en el tiempo de floración, el número de hojas totales al momento de la floración es similar en ambas líneas ($18,03 \pm 4,42$ vs $17,78 \pm 3,25$).

Este resultado sugiere que *BdPAP2* actuaría como promotor de la transición de meristema vegetativo a reproductivo en *B. distachyon*.

	Línea salvaje	Línea SNP
Día de floración	27,19 +/- 1,86	22,78 +/- 1,66
Nº Hojas Totales	18,03 +/- 4,42	17,78 +/- 3,25

Tabla 1. Análisis fenotípico de plantas de *B. distachyon* mutantes de la línea SNP. Los resultados corresponden al promedio de las muestras analizadas y su desviación estándar.

La Figura 2 ejemplifica el retraso en el tiempo de floración observado en las plantas mutantes SNP respecto a las salvajes (21.3).

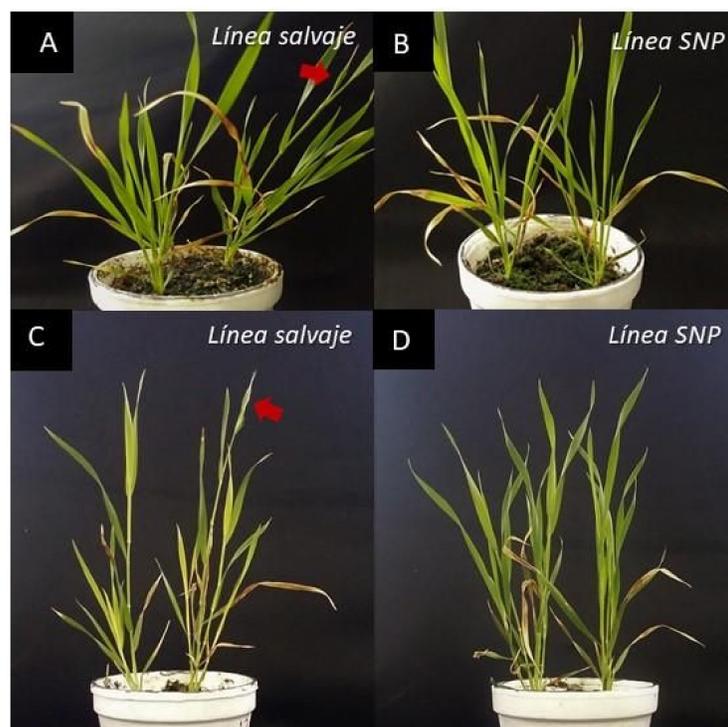


Figura 2. Plantas de *B. distachyon*, líneas salvaje y SNP. A-B) Plantas de 25 días. C-D) Plantas de 28 días. Las flechas rojas indican la espiguilla en las plantas salvajes.

Por otro lado, el análisis fenotípico de la línea de *B. distachyon* con inserción de ADN-T presentó los resultados que se muestran en el Tabla 2.

	Línea ADN-T control	Línea 21.3 control	Línea ADN-T vernalizada	Línea 21.3 vernalizada
Día de floración	20,81 +/- 1,80	25,39 +/-2,11	18,43 +/- 1,50	17,32 +/- 0,92
N° hojas totales	7,07 +/-1,38	13,41 +/-1,19	5,09 +/- 0,28	4,95 +/- 0,51
N° hojas en el eje principal	4,89 +/-0,57	5,83 +/- 0,83	5,08 +/- 0,28	4,95 +/- 0,51

Tabla 2. Análisis fenotípico de plantas de *B. distachyon* expuestas al tratamiento de vernalización. Se cuantificó el día de floración, el número de hojas totales y el número de hojas en el eje principal. Los resultados corresponden al promedio de las muestras analizadas y su desviación estándar.

Los análisis estadísticos corroborados mediante una prueba T indican que, en condiciones de crecimiento estándar (control), el adelanto en el tiempo de floración de la línea ADN-T es estadísticamente significativo. Esto indicaría que el aumento de la expresión de *BdPAP2* es capaz de promover la transición de meristema vegetativo a reproductivo. Considerando que los resultados obtenidos para ambas líneas son opuestos y complementarios, podemos decir que *BdPAP2* es un factor de transcripción que actúa como promotor de la floración en *B. distachyon*.

Por su parte, la vernalización elimina la diferencia en el momento de floración entre las líneas salvaje y ADN-T, observándose un adelanto en el tiempo de floración mediado por el tratamiento en ambas líneas, pero sin que haya diferencias significativas entre ellas.

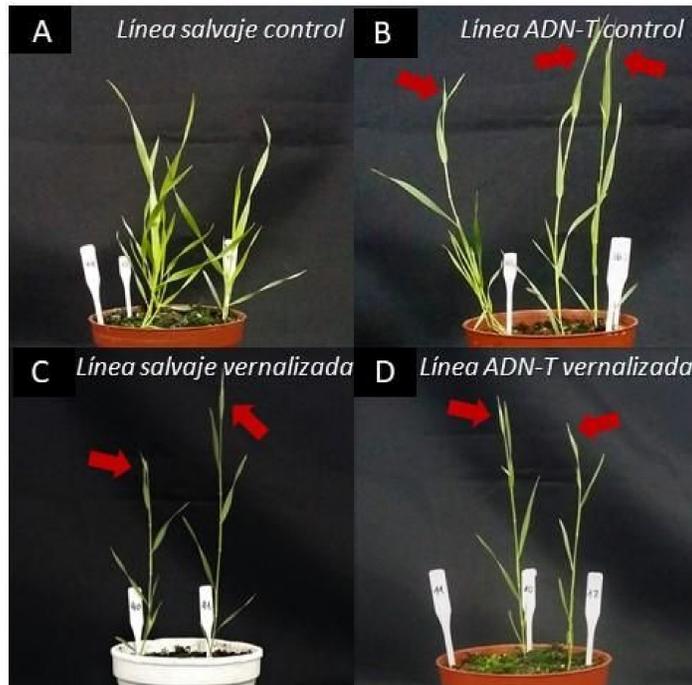


Figura 3. Plantas de *B. distachyon* líneas salvaje y ADN-T de 20 días. Se observan diferencias tanto en la presencia de espiguillas como en el número de hojas entre las plantas vernalizadas y las plantas control. Las flechas rojas indican las espiguillas.

Finalmente, es interesante destacar que el adelanto en el tiempo de floración mediado por el tratamiento de frío es estadísticamente significativo aún en las plantas de la línea ADN-T. Esto nos permitiría plantear la hipótesis de que la vía de regulación del tiempo de floración en la que participa *BdPAP2* es independiente a la vía controlada por la vernalización.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

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.

- 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), 112.
- Kobayashi, K., Yasuno, N., Sato, Y., Yoda, M., Yamazaki, R., Kimizu, M., Yoshida, H., Yoshiaki, N., & Kyojuka, J.** 2012. Inflorescence meristem identity in rice is specified by overlapping functions of three AP1/FUL-like MADS box genes and PAP2, a SEPALLATA MADS box gene. *The Plant Cell Online*, 24(5), 1848-1859.
- 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*.
- Liu, C., Teo, Z. W., Bi, Y., Song, S., Xi, W., Yang, X., Yin, Z., y Yu, H.** 2013. A conserved genetic pathway determines inflorescence architecture in *Arabidopsis* and rice. *Developmental Cell*, 24, 612-622. *Physiol. Plant.*, 157(4), 507 – 518.
- 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.
- Wei, B., Zhang, R. Z., Guo, J. J., Liu, D. M., Li, A. L., Fan, R. C., Mao, L., & Zhang, X. Q.,** 2014. Genome-Wide Analysis of the MADS-Box Gene Family in *Brachypodium distachyon*. *PloS one*, 9(1), e84781.