

XIX ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNL
14 y 15 de Octubre de 2015, SANTA FE.

Estudios funcionales sobre el rol del factor de transcripción AtTCP15 en el desarrollo de los estambres en flores de *Arabidopsis thaliana*

Victoria, Gastaldi*

Cientibecaria. Lic. En Biotecnología, FCB, UNL. LBM-IAL (CONICET-UNL)

Área temática: Cs. Biológicas

Sub-área: Biología

INTRODUCCIÓN

A diferencia de la mayoría de las especies de Angiospermas que presentan polinización cruzada (reproducción alógama), las flores de *Arabidopsis thaliana* se autopolinizan (sistema reproductivo autógeno). Esto ocurre previo a la antesis floral (apertura de los ciclos de protección) y para ello es necesaria una sincronización de eventos ontogenéticos extensamente caracterizados para esta especie (Smyth y col., 1990).

En *A. thaliana*, los primordios de los cuatro estambres largos aparecen durante el estadio floral 6 y continúan creciendo durante el estadio 7 donde se diferencian el filamento y la antera. El estadio 8 comienza precisamente cuando se diferencian los lóculos de la antera. Los estambres crecen rápidamente durante los estadios 9 a 12. Durante el estadio 11, el gineceo desarrolla las papilas estigmáticas (encargadas de recibir el polen), que en el estadio 13 serán receptivas. Paralelamente, los estambres crecen en longitud para sobrepasar al gineceo y así polinizarlo justo antes de que se produzca la antesis floral en el estadio 13 (Smyth y col., 1990). El correcto desarrollo y crecimiento del estambre es entonces esencial para que se produzca en forma adecuada la fecundación.

En nuestro laboratorio se han realizado numerosos aportes al estudio de la familia de factores de transcripción TCP, específica de plantas (Viola y col., 2011; 2012; Uberti-Manassero y col., 2012; 2013). Considerando que las plantas p15::TCP15-EAR presentan diversas alteraciones en el desarrollo, entre ellas la longitud del filamento del estambre, en el laboratorio se ha realizado un análisis global de la expresión génica en estas plantas utilizando microarreglos de ADN para determinar qué genes estarían involucrados en dichos procesos (Uberti-Manassero, 2013). Entre los genes con expresión alterada, se encontraron varios genes de respuesta a auxinas de la familia SAUR; entre ellos, se destaca SAUR63 debido a que se ha reportado recientemente que promueve la elongación del filamento del estambre (Chae y col., 2012). La elongación del filamento del estambre es mediada por giberelinas (GA) (Cheng y col., 2004). Plantas mutantes con pérdida de función de genes de biosíntesis de GA presentan filamentos más cortos (Cheng y col., 2004; Plackett y col., 2011; Song y col., 2013). Considerando que GA y TCP15 promueven el desarrollo del filamento comenzamos a investigar si GA y TCP15 actúan en la misma vía o en vías paralelas, promoviendo la elongación del filamento. Una de las plantas con fenotipo de filamentos de estambres cortos en la vía de GA, es la mutante con pérdida de función

El plan de trabajo presentado se encuadra en la temática correspondiente al Proyecto de Investigación y Desarrollo titulado "El papel del factor de transcripción AtTCP15 en el desarrollo de los estambres en *Arabidopsis thaliana*" ha sido acreditado ante ANPCyT Código de Proyecto: 0751. Director: Daniel H. Gonzalez. Director: Daniel H. Gonzalez y Co-Director: Leandro E. Lucero

de GA20ox1. KNAT1 (factor de transcripción perteneciente a la familia KNOX) reprime en forma directa la expresión de esta enzima importante en la biosíntesis de GA en *A. thaliana* (Barley y col., 2002). Sin embargo, hasta ahora no se ha reportado si KNAT1/BP esta involucrado en el desarrollo del filamento, aunque se ha registrado el desarrollo de flores de plantas que sobreexpresan KNAT1, observándose filamentos de estambres más cortos (Ori y col., 2000).

OBJETIVOS

Los objetivos que nos propusimos en el presente plan de trabajo son:

1. Estudiar alteraciones en el desarrollo de los estambres ocasionadas al expresar en plantas de *Arabidopsis thaliana* la proteína AtTCP15 fusionada a un dominio represor o bajo el control de un promotor constitutivo.
2. Identificar genes cuya expresión esté regulada directa o indirectamente por la proteína en estudio.
3. Estudiar el vínculo existente entre la vía hormonal de giberelinas, que participa en el desarrollo de estambres, y la proteína AtTCP15.
4. Identificar los mecanismos moleculares por los cuales AtTCP15 actúa en el desarrollo de estambres.

METODOLOGÍA

En base a las hipótesis planteadas, realizamos una caracterización fenotípica de estambres de las plantas con niveles alterados de TCP15, SAUR63, y KNAT1/BP. Para ello, se crecieron plantas de *Arabidopsis thaliana* salvajes (WT), p15::TCP15-EAR, 35S::TCP15, *tcp15*, *tcp14tcp15*, pSAUR63::SAUR63::GUS, *bp* y 35S::KNAT1 en condiciones de día largo (16hs de luz/8hs de oscuridad). Bajo estas condiciones de cultivo se midió la longitud de los estambres, comparando siempre con plantas WT. Además, obtuvimos imágenes mediante microscopia electrónica de barrido para estudiar en detalle el filamento del estambre.

Se caracterizó detalladamente el patrón de expresión de TCP15, SAUR63 y KNAT1/BP mediante la utilización de genes reporteros.

Por otra parte, cuantificamos los niveles de transcripto de dichos genes para determinar si la expresión de estos es afectada en los diferentes genotipos en estudio. Se tomaron muestras de flores para estudiar los niveles de expresión de SAUR63 y TCP15. Se realizaron extracciones de ARN total utilizando el reactivo comercial TRIZOL (*Invitrogen*). Mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real evaluamos los niveles de expresión de los diferentes genes estudiados, utilizando primers específicos.

Con la finalidad de establecer si TCP15 participa en la vía mediada por GA para promover el desarrollo del estambre, tratamos plantas WT y la mutante *tcp14tcp15* con un inhibidor de la biosíntesis de GA (PAC, 10 μ M). Se tomaron muestras de flores 2 hs después de la aplicación y luego medimos los niveles de expresión de SAUR63 y TCP15. Además, contamos con la mutante *ga1-3* de la vía de GA, la cual nos permitirá medir la expresión de los genes en estudio.

RESULTADOS

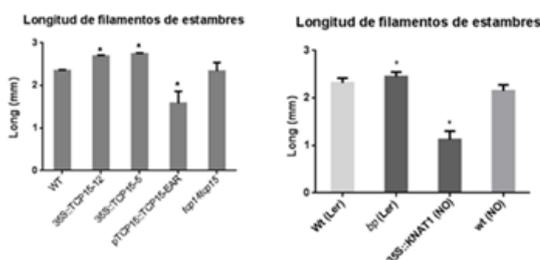


Figura 1: Cuantificación de longitud de filamentos de estambres. * indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto a sus controles según test de Student.

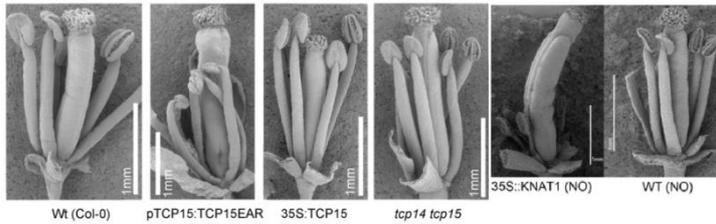


Figura 2. Fenotipo de flores de plantas con niveles alterados de TCP15 y KNAT1. Imágenes tomadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Como se puede observar, a partir de las figuras 1 y 2, la proteína KNAT1 es un inhibidor de la elongación del filamento debido a que su sobreexpresión lleva a una disminución en la altura de los filamentos, mientras que una mutación en dicho gen lleva a un aumento en la elongación del filamento. Por el contrario, las GA y TCP15 actuarían como un inductor del desarrollo de los filamentos de estambres.

La proteína KNAT1 se expresa en filamentos de estambres a partir de la antesis floral, es decir luego del estadio 13, que es el estadio en el cual se produce la apertura de la flor.

El patrón de expresión de TCP15 conferido por la fusión al gen reportero GUS (Uberti-Manassero y col., 2012), indica que se expresa en numerosos órganos de la planta, destacando su expresión en los filamentos de estambres, que es el órgano de interés en este estudio.

El hecho de que las anomalías morfológicas ocurra en los mismos órganos donde se detecta la expresión de ambos genes es un indicio de que su función está asociada a estos órganos.

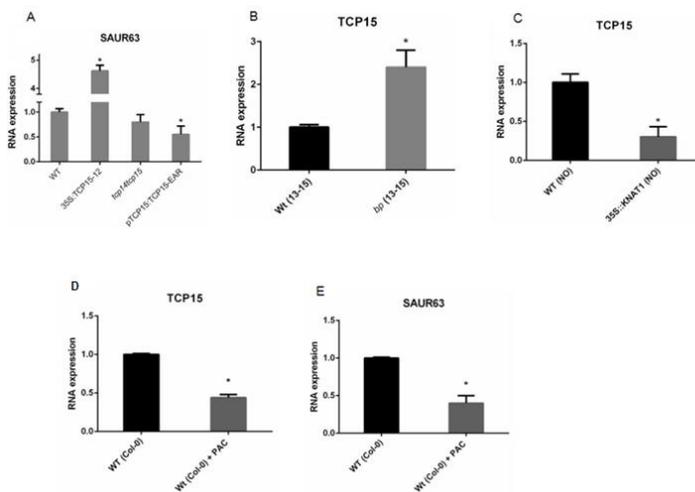


Figura 3: Valores obtenidos mediante RT-qPCR por triplicado biológico. * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a sus controles según test de Student.

A) Niveles de expresión de AtSAUR63 en flores de plantas con niveles alterados de TCP15. B) Niveles de expresión de AtTCP15 en flores de plantas con bajos niveles de KNAT1/BP. C) Niveles de expresión de AtTCP15 en flores de plantas con niveles elevados de

KNAT1/BP

D) Niveles de expresión de AtTCP15 en flores de plantas WT tratadas y no tratadas con PAC 10 μ M.

E) Niveles de expresión de AtSAUR63 en flores de plantas WT tratadas y no tratadas con PAC 10 μ M.

Los resultados de las figuras 3A y 3B, sugieren que los niveles de expresión de TCP15 son reducidos por KNAT1. Considerando que en la región promotora de TCP15 se presenta la secuencia reconocida por factores de transcripción KNOX, podemos pensar que KNAT1 reprime su expresión en forma directa. Para poder afirmar esto último vamos a realizar ensayos que nos permitan detectar interacción proteína-ADN, tal como EMSA (electrophoresis mobility shift assay) y simple híbrido en levaduras.

Observando la figura 3C concluimos que TCP15 es un inductor de la expresión de SAUR63. De la misma manera que para KNAT1, vamos a llevar a cabo otros ensayos que nos permitan deducir si la inducción del SAUR63 por TCP15 es de manera directa

[Escribir texto]

o no. La no diferencia en las muestras de la doble mutante *tcp14tcp15*, al igual que la falta de fenotipo en estambres, podría deberse a la redundancia de función dentro de esta familia de factores de transcripción

Por último, analizando los resultados de la figura 3D y 3E, se puede concluir que GA inducen la expresión de AtTCP15 y de AtSAUR63.

CONCLUSIONES

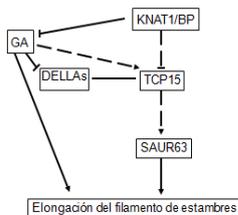


Figura 4: Modelo de trabajo propuesto. Líneas sólidas representan vías de regulación reportadas en la bibliografía, y líneas discontinuas hipótesis propuestas en este trabajo.

A partir de nuestros resultados podemos concluir que, TCP15 promovería el desarrollo del filamento del estambre a través de SAUR63. Paralelamente se propone un nuevo actor en este proceso, KNAT1, como un represor de la elongación del filamento mediante la regulación negativa de TCP15 en forma directa y/o a través de la vía de GA. Los resultados obtenidos hasta ahora, permitirían postular a TCP15 como un modulador de un complejo crosstalk entre GA y auxinas en el proceso de desarrollo estudiado.

BIBLIOGRAFÍA

Chae, K.; Isaacs, C.G.; Reeves, P.H.; Maloney, G.S.; Muday, G.K.; Nagpal, P. y Reed, J.W. (2012) Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA63 promotes hypocotyl and stamen filament elongation. *The Plant Journal* 71: 684–97.

Cheng H.; Qin, L., Lee, S. ; Fu, X.; Richards, D.E. ; Cao, D. ; Luo, D. ; Harberd, N.P; y J. Peng. 2004. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131, 1055-1064

Daviere, J.M.; Wild, M.; Regnault, T.; Baumberger, N.; Eisler, E.; Genschik, P.; and P. Achard. 2014. Class I TCP-DELLA Interactions in Inflorescence Shoot Apex Determine Plant Height. *Current Biology* 24, 1923–1928.

Ori, N.; Eshed, Y.; Chuck, G.; Bowman, J.L.; y S. Hake. 2000. Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* 127, 5523-5532.

Plackett, A.R.G.; S. G. Thomas, Wilson, Z.A.; y P. Hedden. 2011. Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends in Plant Science* 16, 10: 568-578.

Song, S.; Tiancong, Q.; Huang, H.; D. Xie. 2013. Regulation of Stamen development by Coordinated Actions of Jasmonate, Auxin and Gibberellin in Arabidopsis. *Molecular Plant*, en prensa.

Smyth, D.R.; Bowman, J.L.; y E.M. Meyerowitz. 1990. Early Flower Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 2: 755-767

Uberti-Manassero N. G., L.E. Lucero, I.L. Viola, A.C. Vegetti and D.H. Gonzalez. 2012. The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *Journal of Experimental Botany*, 63: 809–823.

Uberti-Manassero, N.G.; Viola, I.L.; Welchen, E.; y D.H. Gonzalez. 2013. TCP transcription factors: architectures of plant form. *Biomolecular Concepts*, 4: 111–127.