

## ROL DE PROTEÍNAS MADS-BOX EN EL ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LA FLOR DE GRAMÍNEAS

Gigena Virginia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (FBCB-CONICET)

<sup>2</sup>Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas UNL

Directora: Reinheimer Renata

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

La formulación del modelo de desarrollo floral “ABCDE” representa uno de los avances más significativos en el estudio de la biología de las plantas (Bowman et al. 1989; Coen & Meyerowitz 1991; Weigel & Meyerowitz 1994). El modelo predice que, en *Arabidopsis* y *Antirrhinum* (ambas especies son eu-dicotiledóneas), la combinación de cinco clases de genes homeóticos determina la identidad de los órganos florales. Todos los genes que integran el modelo pertenecen a la familia de factores de transcripción MADS-box de tipo MIKC, excepto *AP2*. Las proteínas MADS BOX se caracterizan por poseer un dominio MADS-BOX con función de unión al DNA, un dominio I que permite la formación selectiva de dímeros de unión al DNA, un dominio K con función de dimerización de proteínas debido a sus residuos hidrofóbicos y un C-terminal poco conservado entre las diferentes proteínas, que está involucrado en la activación transcripcional o formación de complejos de factores de transcripción (Becker, 2003).

Hasta qué punto se puede extender el modelo de desarrollo floral basado en flores de eu-dicotiledóneas a las gramíneas (monocotiledóneas) es una pregunta aún abierta. Las gramíneas son morfológicamente únicas entre las Angiospermas, dado que sus flores están altamente modificadas y agrupadas en estructuras evolutivamente novedosas conocidas con el nombre de espiguillas (Clifford 1987). El eje de cada espiguilla sostiene 2 brácteas externas y estériles (glumas) y contienen, dependiendo de la especie, desde 1 a 40 flores (Clifford 1987). Una flor típica lleva un gineceo central, 3 o 6 estambres, pero carece de tépalos convencionales. En su lugar, los órganos fértiles están rodeados por 2 o 3 órganos, por lo general, similares a glándulas denominados lodículas y 2 estructuras semejantes a brácteas estériles llamadas lemma y palea. La palea se localiza por fuera de las lodículas sobre el eje floral, mientras que la lemma parece nacer de la raquilla sosteniendo los órganos florales. La palea es morfológicamente diferente de la lemma, presentando en la mayoría de las gramíneas, dos nervaduras bien marcadas o a veces sólo una como la lemma.

Título del proyecto: Desarrollo y diversificación de inflorescencias de Gramíneas: rol de los genes de meristema APO1 y RFL/FLO/APO2

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2013

Organismo financiador: FONCyT

Director/a: Renata Reinheimer

Evidencia genética reciente indica que las lodículas son homólogas al verticilo de protección interno (pétalos) (Ambrose et al., 2000; Whipple et al, 2004; Whipple & Schmidt 2006); sin embargo, la homología de la lemma y palea aún es desconocida. Algunos autores suponen que la palea es derivada de dos tépalos fusionados y existe cierta evidencia genética a favor de esta hipótesis (Stebbins, 1956; Ambrose et al., 2000; Luo et al., 2005; Jin et al., 2011). Sin embargo, la posición y morfología de la lemma y la palea es tan diferente con respecto a los tépalos convencionales, que muchos autores optaron por sugerir que dichos órganos no forman parte de los verticilos florales (Clifford, 1987).

En particular, dos preguntas centrales e interrelacionadas surgen de analizar los datos publicados hasta el momento: 1) ¿es la palea un verticilo de protección modificado? y 2) ¿la palea resultó de la fusión de dos o tres órganos diferentes?. Es por ello que, para tratar de comenzar a responder a estas cuestiones, en este plan de trabajo proponemos caracterizar la evolución molecular y los patrones de expresión de proteínas MADS-box candidatas en gramíneas. Asimismo, proponemos estudiar el efecto que tiene sobreexpresar dichas proteínas en *Arabidopsis thaliana* como forma de aproximarnos a comprender la homología de la palea con los verticilos de protección de eudicotiledóneas.

## OBJETIVOS

El objetivo de este plan de trabajo es determinar el rol de las proteínas MADS-box en el origen y evolución de la flor de gramínea. A través de su estudio se busca determinar en grado de conservación del modelo de desarrollo floral ABCDE entre eudicotiledóneas y monocotiledóneas-gramíneas.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

### Evolución molecular de MADSPALEA1

Con el objetivo de reconstruir la evolución molecular de la proteína MADSPALEA1 (MP1) y determinar las homologías entre los genes, se buscaron secuencias de los genes que codifican para los homólogos en gramíneas. Para ello se realizaron búsquedas BLAST y BLASTP empleando las secuencias MP1 de arroz en las siguientes bases de datos: (1) colección de nucleótidos y secuencias genómicas de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), (2) secuencias de proteínas no redundantes de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) y (3) phytozome (<http://www.phytozome.net>).

Las secuencias obtenidas de las búsquedas fueron alineadas usando el software MUSCLE, y corregidas manualmente usando el software MEGA6 (Tamura et al., 2013). Los árboles filogenéticos fueron generados usando la Inferencia Bayesiana (IB) en MrBayes 3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). Los modelos de IB se estimaron usando MrModelTest 2.2 (Nylander, 2004). A partir de la topología obtenida se identificaron los homólogos directos de MP1 en gramíneas. En base a dicho alineamiento se diseñaron los cebadores necesarios para los estudios de expresión y generación de plantas de *Arabidopsis* transgénicas (Actividad 2 y 3) empleando el servidor PrimerBLAST (Ye et al., 2012). Para identificar dominios conservados, el alineamiento de las secuencias peptídicas fueron analizadas utilizando el software MEME disponible en forma gratuita en la web (Multiple Em for Motif Elicitation; <http://meme-suite.org/tools/meme>; Bailey et al., 2009).

La reconstrucción filogenética muestra que MP1 sigue un patrón de evolución similar al de las especies de gramíneas. Asimismo, no se han identificado duplicaciones y pérdidas de genes en la familia, confirmando que MP1 es copia única en los genomas de las especies analizadas. A partir de la topología obtenida se identificaron los homólogos directos de MP1 en gramíneas y se diseñaron los cebadores necesarios para la generación de plantas de Arabidopsis transgénicas empleando el servidor PrimerBLAST (Ye et al., 2012).

### Genómica funcional de MP1

Para evaluar la homología de la palea con los verticilos de protección de flores de eudicotiledóneas se propuso, como punto de partida, observar el efecto de sobreexpresar MP1 en plantas de Arabidopsis Col-0 transformadas con construcciones que contengan homólogos de MP1 bajo el control del promotor constitutivo. Inicialmente, las secuencias codificantes de los genes *MP1* de arroz y *Setaria viridis* se obtuvieron a partir de ADN copia generado de ARN extraído de inflorescencias, seguida de amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para ser clonados por cortes de restricción en el vector de entrada pENTR3C (Mann et al., 2012). Luego de confirmar la identidad de las secuencias por secuenciación, se recombinó dicho vector de entrada con un vector de destino diseñado para el clonado mediante sistema Gateway, pANIC 6A (Mann et al., 2012), usando LR clonase II (Life Technologies). La expresión del gen de interés está bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz. Actualmente contamos con el clonado adecuado para proceder a transformar plantas Col-0 utilizando el método de inmersión floral con *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Las plantas transgénicas, serán seleccionadas en base a su resistencia al antibiótico higromicina. En las plantas resistentes se analiza la presencia del gen insertado en el genoma mediante PCR empleando oligonucleótidos que amplifican un fragmento del *cassette* de higromicina y los niveles de expresión de las fusiones correspondientes mediante RT-PCR en tiempo real. Luego se evaluará el fenotipo de las líneas transgénicas homocigotas obtenidas con especial énfasis en el desarrollo floral. También se evaluará si otros aspectos del crecimiento o del desarrollo de las plantas se ven afectados por la presencia del transgen. De ser necesario se recurrirá a evaluar los cambios morfológicos por medio de microscopía electrónica de barrido.

El resultado más directo que buscamos es observar cambios morfológicos o fusión de órganos en los verticilos de protección (sépalos y pétalos) de las flores de plantas de Arabidopsis que sobreexpresan los genes *MP1*. De confirmarse estos resultados, podríamos comenzar a tener una idea más próxima sobre la homología de la palea con respecto a los verticilos florales de las eudicotiledóneas. Asimismo, los resultados obtenidos en este plan de trabajo aportarán datos valiosos que guiarán futuras investigaciones para profundizar el conocimiento que se tiene de la temática planteada.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Ambrose B. A., Lerner D. R., Ciceri P., Padilla C. M., Yanofsky M. F. and Schmidt R. J. 2000. Molecular and genetic analyses of the Silky1 gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. *Molecular Cell*, 5, 569–579.
- Bailey T. L., Bodén M., Buske F. A., Frith M., Grant C. E., Clementi L., Ren J., Li W. W. and

- Noble W. S.** 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37, W202-W208.
- Becker A. and Theiben G.** 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 464–489.
- Bowman J. L., Smyth D. R. and Meyerowitz E. M.** 1989. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1, 37–52.
- Clifford H. T.** 1987. Spikelet and floral morphology. In: SODERSTROM T. R., HILU K. W., CAMPBELL C. S. & BARKWORTH M. E. *Grass Systematics & Evolution*. Washington, DC: Smithsonian Institution. 21–30.
- Clough S. J. and Bent A. F.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16, 735-743.
- Coen E. S. and Meyerowitz E. M.** 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353, 31–37.
- Huelsenbeck J. P. and Ronquist F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Informatics Applications Note*, 17, 754-755.
- Jin Y., Luo Q., Tong H., Wang A., Cheng Z., Tang J., Li D., Zhao X., Li X., Wan J., Jiao Y., Chu C. and Zhu L.** 2011. An AT-hook gene is required for palea formation and floral organ number control in rice. *Developmental Biology*, 359, 277-288.
- Luo Q., Zhou K., Zhao X., Zeng Q., Xia H., Zhai W., Xu J., Wu X., Yang H. and Zhu L.** 2005. Identification and fine mapping of a mutant gene for palealess spikelet in rice. *Planta*, 221, 222–230.
- Mann D. G., Lafayette P. R., Abercrombie L., King Z. R., Mazarei M., Halter M. C., Poovaiah C. R., Baxter H., Shen H., Dixon R. A., Parrott W. A. and Stewart Jr C. N.** 2012. Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 226-236.
- Nylander, J.A.A.** 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- Stebbins G.** 1956. Taxonomy and the evolution of genera, with special reference to the family *Gramineae*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 10, 235-245.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Weigel D. and Meyerowitz E. M.** 1994. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, 78, 203–209.
- Whipple C. J., Ciceri P., Padilla C. M., Ambrose B. A., Bandong S. L. and Schmidt R. J.** 2004. Conservation of B-class floral homeotic gene function between maize and *Arabidopsis*. *Development*, 131, 6083–6091.
- Whipple C. J. and Schmidt R. J.** 2006. Genetics of grass flower development. *Advances in Botanical Research*, 44, 385–424.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.** 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13-134.