

**MASTER EN BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS**

**REGULACIÓN ESPACIAL DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR  
GIBERELINAS**

**Trabajo Final de Máster**

**Autor:**

**Juan Camilo Álvarez Mahecha**

**Directores:**

**Miguel Ángel Blázquez Rodríguez**

**David Alabadí**



**D. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez**, Investigador Científico del CSIC,

**D. David Alabadí**, Científico titular CSIC,

Ambos en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria titulada **REGULACIÓN ESPACIAL DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR GIBERELINAS** ha sido realizada por **JUAN CAMILO ALVAREZ MAHECHA** bajo nuestra dirección y constituye su trabajo final de master.

Por tanto **AUTORIZAMOS** la presentación y defensa de este trabajo.

Para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente documento en Valencia a diez de Julio de dos mil doce.

**Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez**

**D. David Alabadí**

## **ÍNDICE**

<b><u>RESUMEN</u></b> .....	4
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	5
<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	6
<b><u>ANTECEDENTES</u></b> .....	7
<b><u>MATERIALES Y METODOS</u></b> .....	11
1. Material bacteriano.....	11
2. Material vegetal.....	12
3. Vectores utilizados.....	13
4. Métodos de Biología Molecular.....	15
5. Metodología de plantas.....	20
6. Análisis fenotípico de plantas mutantes y líneas transgénicas.....	21
<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	22
Construcción de plásmidos y transformación de plantas.....	22
Análisis de expresión de gai-1GFP.....	29
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	33
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	34

## RESUMEN

Uno de los componentes clave en la ruta de señalización por giberelinas (GAs) son las proteínas DELLA las cuales regulan a nivel molecular una amplia gama de procesos dentro de la planta. Para tratar de analizar su función en tejidos concretos en esta investigación se diseñó un abordaje de *enhancer trap* basado en el promotor mínimo 35S para generar líneas de patrones de expresión específicos de tejido para *gai-1GFP* en *Arabidopsis thaliana*. En total se generaron 737 líneas transgénicas independientes de las cuales 236 (32%) presentaban al menos una característica similar al mutante *gai-1*. Al correlacionar parcialmente la expresión de esta proteína de fusión con el fenotipo en cada línea se podría establecer una relación entre el bloqueo de la señal de GAs en epidermis con la inhibición de la elongación del hipocótilo.

## INTRODUCCION

Las giberelinas (**GAs**) participan en la regulación de numerosos procesos en la vida de una planta. Sin embargo, la señalización de GAs se basa únicamente en un conjunto limitado de elementos de señalización específicos de esta ruta para controlar esta colección tan amplia de procesos celulares: tres receptores de GA (GIDa, GID1b, GID1c) y 5 proteínas DELLA en *Arabidopsis* (GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3) pero incluso más reducido en otras especies vegetales. Una hipótesis que explica esta multiplicidad de funciones consiste en que el resultado de señalización por GAs depende del contexto que rodea a las proteínas DELLA: (1) el tipo celular en el que se expresan, y (2) el conjunto de proteínas disponibles con las que interactúan. Por supuesto, ambos aspectos están interrelacionados, puesto que tipos celulares distintos contienen colecciones diferentes de proteínas.

En la actualidad se hace necesario tratar de entender cómo las proteínas DELLA de *Arabidopsis* pueden ejercer distintas funciones celulares dependiendo de las proteínas con las que interactúan, y del tipo celular en el que actúan. Para estudiar estos aspectos, se proponen análisis de funciones de la señalización de GAs que sean específicas del tipo celular. En el laboratorio se están siguiendo diversos abordajes con el fin de dirigir la expresión de los elementos de la ruta de señalización de GAs a tejidos y órganos concretos de la planta y mi contribución se centra en la expresión no sesgada de *gai-1* mediante un *enhacer trap*, para seleccionar y estudiar aquellas localizaciones que alteren el fenotipo de la planta.

## OBJETIVOS

Realizar un rastreo de tipo *enhancer trap* que permita obtener líneas con patrones de expresión específicos de tejido para la señalización por giberelinas.

- Generar líneas de expresión de la proteína de fusión *gai-1GFP* en tejidos concretos que sean útiles como herramienta para estudios posteriores.
- Realizar una correlación entre la expresión de *gai-1GFP* y el fenotipo.

## ANTECEDENTES

La mayor parte del conocimiento generado en torno a la ruta de señalización por giberelinas a nivel molecular se ha obtenido gracias a los estudios tanto genéticos como morfológicos realizados en *Arabidopsis* y arroz.

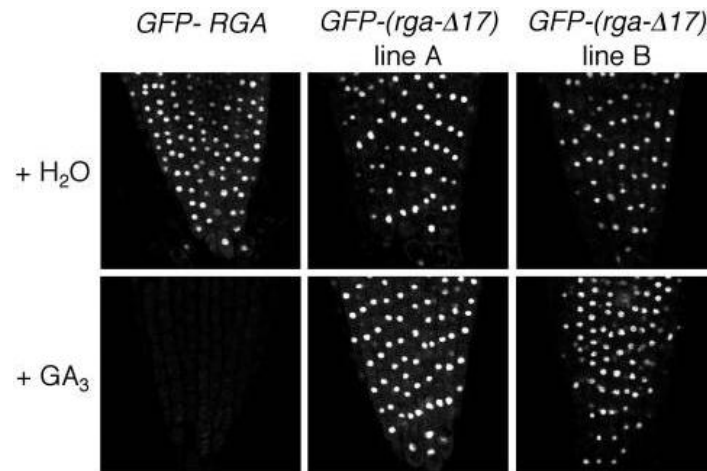
Se ha visto que uno de los elementos clave en esta ruta lo conforma un conjunto de proteínas de la familia GRAS denominados proteínas DELLA, compuesto en *Arabidopsis* por de 5 miembros (GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3) (Fleet and Sun, 2005.).

Estas proteínas presentan su actividad en el núcleo donde actúan regulando la actividad transcripcional de ciertos genes, aunque no lo hagan de manera directa. Se sabe además, que poseen dominios de interacción proteína –proteína tales como repeticiones de leucina que les permiten modular directamente la actividad de ciertos factores de transcripción.

Un ejemplo de esto es la regulación por parte de las DELLA de genes relacionados con el crecimiento y desarrollo mediante su interacción con miembros de las proteínas PIF (Phytochrome Interacting Factor) de la familia de factores de transcripción bHLH (basic Helix Loop Helix) (de Lucas et al. 2008, Feng et al 2008). Según estas investigaciones, se evidenció que esta interacción previene la unión de los PIF a las cajas G de sus promotores diana impidiendo la correcta expresión de ciertos genes relacionados con el crecimiento.

Hasta el momento se ha determinado que la función ejercida por las GAs radica en la liberación del freno impuesto por las proteínas DELLA, (Peng et al, 1997; Silverstone et al, 1998; Lee et al, 2002; Wen and Chang, 2002. El modelo que se ha descrito en la literatura se basa en la acumulación de una proteína de fusión

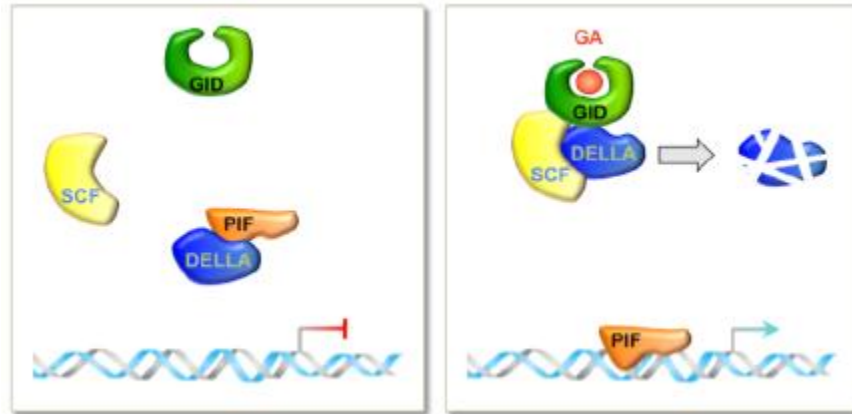
DELLA-GFP en el núcleo de las células cuando se tratan plántulas con paclobutrazol, un inhibidor de la síntesis de GAs. Mientras que esta acumulación se revierte rápidamente tras la aplicación de GAs (Dill et al, 2001) (Figura 1).



**Figura 1.** Expresión de rga-Δ17-GFP en raíces de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en medio MS+paclobutrazol las cuales son tratadas con GA<sub>3</sub>. Se puede apreciar que rga-Δ17 es resistente a la degradación de RGA dependiente de GAs.

La naturaleza de este modelo se ha descrito en el sentido de que las GAs al interactuar con los receptores GID1 (Giberellic Acid insensitive Dwarf1) modifican su configuración permitiéndoles reconocer el dominio DELLA generando un complejo con SLEEPY1 (SLY1), la cual es una proteína de tipo F-box necesaria para la formación del complejo SCF que ubiquitina las DELLA marcándolas para su posterior degradación vía proteasoma (McGinnis et al, 2003) (Figura 2).





**Figura 2.** Modelo propuesto para la ruta de señalización por GAs.

Una delección de 17 aminoácidos en la región N terminal de GAI y RGA que incluye el motivo DELLA ocasiona que la proteína sea incapaz de interactuar con el complejo GID1-GA y así mismo sea insensible a la degradación inducida por GAs (Griffiths et al, 2006). Los mutantes *gai-1* y *rga-Δ17* presentan un fenotipo dominante similar al ocasionado por la deficiencia de GAs pero en este caso no puede ser revertido con la aplicación de GAs de forma exógena (Peng et al, 1997; Dill et al, 2001).

Las GAs además de regular la expansión celular de las estructuras vegetativas también son determinantes en otros tipos de procesos como la germinación, el tiempo de floración y el establecimiento del fruto. Análisis de tipo molecular han permitido confirmar lo anterior y han revelado otras funciones tales como la represión de la fotomorfogénesis en la oscuridad, defensa contra patógenos, la tolerancia al estrés abiótico y la conservación de la identidad meristemática.

Una pregunta que conviene plantear es cómo hacen las proteínas DELLA para mostrar esta multiplicidad a nivel funcional. Una explicación que se ha propuesto se basa en la redundancia genética entre los receptores GID1 y el número de proteínas DELLA la cual se ha analizado con mutantes de pérdida de función (Cheng et al, 2004). Se ha visto por ejemplo, que la elongación del tallo es un proceso controlado por GAI y RGA debido a que sus respectivos mutantes de

perdida de función suprimen el enanismo causado por la deficiencia de GAs. (Dill, Sun, 2001; King *et al*, 2001). Por otra parte la incapacidad de germinar de mutantes deficientes en GAs se puede suprimir generando mutantes nulos de RGL2 pero no en otras proteínas DELLA reflejando así la importancia de dicho elemento en este proceso (Lee *et al*, 2002; Cao *et al*, 2005).

Estos resultados podrían relacionar las implicaciones de la ruta de señalización por GAs y una redundancia génica en *Arabidopsis*, pero no en otras especies como por ejemplo tomate y arroz, donde hasta el momento solo se han encontrado un gen para el receptor y un gen codificando una proteína DELLA.

De acuerdo con este concepto, se ha generado una hipótesis en la cual las DELLA participan en diferentes procesos gracias a su capacidad de interactuar con diversos elementos. En efecto, se ha visto que estas proteínas regulan el crecimiento a través de su interacción con los factores de transcripción PIF, pero así mismo podrían regular el establecimiento del fruto, el tiempo de floración u otros eventos interactuando con otros factores de transcripción regulando la expresión de genes implicados en los procesos correspondientes, o con otros elementos pertenecientes a otras rutas de señalización hormonal (ABA, Etileno, Auxinas, etc.). En relación a esto se ha visto que las GAs pueden contrarrestar el efecto de las citoquininas en el control de la identidad del meristemo (Jasinski *et al*, 2005), reprimir el proceso de fotomorfogénesis en la oscuridad conjuntamente con los brasinosteroides (Alabadí *et al*, 2004), así como la formación y conservación del gancho apical (Achard *et al*, 2003). En este contexto se podría establecer un punto que integre diferentes vías de señalización.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Material bacteriano

#### Medios de cultivo bacterianos

Medio LB (Luria-Bertani-Medium) pH 7.0: 1% Triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1.5 de Agar.

#### Suplementos

Elementos de Selección	Stock	Disolvente	Concentración de trabajo	
			<i>E. coli</i>	<i>A. tumefasciens</i>
Kanamicina	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O	50 µg/ml	50 µg/ml
Espectinomicina	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O	100 µg/ml	
Rifampicina	20 mg/ml	Metanol 90%		100 µg/ml
Gentamicina	100 mg/ml		50 µg/ml	

#### Condiciones de cultivo de microorganismos

Se realizaron tanto cultivos líquidos como sólidos para los microorganismos. Las condiciones de incubación tanto para *E. coli* como *A. tumefasciens* fueron de 37°C 17 horas y 28°C dos días respectivamente.

Para una conservación prolongada de las cepas bacterianas se elaboraron glicerizados en tubos estériles de 2 ml. Añadiendo 700  $\mu$ l de cultivo líquido bacteriano y 300  $\mu$ l de glicerol al 50% para una concentración final de este último a 35%. Una vez realizado el proceso en condiciones de esterilidad los tubos se congelaron en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2. Material vegetal**

Para realizar el rastreo se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg erecta (L-er). El análisis de expresión transitoria se realizó transformando hojas de *Nicotiana benthamiana*.

### **Condiciones de cultivo en el invernadero**

Las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en condiciones de día largo (16 horas de luz, y 8 horas de oscuridad), con un rango de temperatura entre  $21-23^{\circ}\text{C}$  y una humedad de 50%. La fuente de luz fueron tubos fluorescentes que emiten luz blanca fría, con una intensidad de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$  (Sylvania estándar F58W/133-T8)

Las semillas se incubaron previamente a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad durante 7 días con fines de estratificación y posteriormente se sembraron en bandejas de plástico con una mezcla de turba: perla: perlita (1:1:1) previamente esterilizada a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Las bandejas se cubrieron de plástico el cual se empezó a agujerear paulatinamente a partir de la formación del primer par de hojas de las semillas germinadas hasta que al cabo de 5 días se retiró por completo. Las bandejas se regaron semanalmente con la solución nutritiva Hoagland n°1 suplementada con oligoelementos.

Las semillas producidas se recogieron luego que las plantas terminaron su ciclo vital, secándolas posteriormente a 37°C durante 3 días y almacenándolas dentro de una cámara con una temperatura de 10°C y una humedad del 25% en oscuridad.

### **Medios de cultivo para las plantas**

Se utilizó el medio Murashige & Skoog (MS) con sacarosa pH 5.5 para germinar las semillas obtenidas en placas de Petri en condiciones estériles. La composición del medio MS (Duchefa) con vitaminas fue de 2.2 gr/l, sacarosa 10g/l. Se ajustó el pH a 5.5 con KOH y se añadió 8g/l de agar bacteriológico.

Como suplemento se utilizó Glufosinato amónico (BASTA) a una concentración de trabajo de 35 µg/ml para realizar la selección de los transformantes.

### **Condiciones de cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* de *A. thaliana* se realizó en cajas de Petri que se incubaron en cabinas con condiciones de día largo (16 horas de luz, 8 horas en oscuridad) y una temperatura constante de 25°C. La luz fue suministrada por tubos fluorescentes de intensidad de 90 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup>.

## **3. Vectores utilizados**

En la tabla 3 se detallan los vectores utilizados en este trabajo.

**Tabla 3** Listado de vectores utilizados.

<b>Vector</b>	<b>Características</b>
pCR®8.0/GW/TOPO	Vector intermediario utilizado para clonar fragmentos amplificados mediante PCR teniendo como objetivo introducirlos posteriormente en otros vectores mediante reacciones GATEWAY™. Confiere resistencia a Espectinomicina. <a href="http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K250020">http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K250020</a>
pCR® 2.1	Vector intermediario utilizado para clonar fragmentos amplificados mediante PCR teniendo como objetivo introducirlos posteriormente en otros vectores mediante reacciones GATEWAY™. Confiere resistencia a Kanamicina y Ampicilina, permite selección por sistema lacZα. <a href="http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf">http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf</a>
pHTsGFPTYGnos-T	Vector intermediario utilizado para fusionar sGFPnos-T a un producto de PCR por clonaje clásico.
pEarleyGate100	Vector de expresión en planta con sitios de recombinación del sistema GATEWAY™, presenta un promotor 35S que permite la sobreexpresión de la construcción introducida. Confiere resistencia a Kanamicina en bacterias y de BASTA en planta. <a href="http://sites.bio.indiana.edu/~pikaardlab/pEarleyGate%20plasmid%20vectors%20copy/Table%20of%20vectors.html">http://sites.bio.indiana.edu/~pikaardlab/pEarleyGate%20plasmid%20vectors%20copy/Table%20of%20vectors.html</a>
pMDC123	Vectores de transformación en planta compatibles con el sistema GATEWAY™. No presenta ni promotores y terminadores cerca del cassette de recombinación. Confiere resistencia a Cloranfenicol en bacterias y a BASTA en planta. <a href="http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html">http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html</a>

#### **4. Métodos de Biología Molecular**

##### **Aislamiento de DNA plasmídico y purificación de ácidos nucleicos**

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema Miniprep kit E.Z.N.A de QIAGEN siguiendo las recomendaciones dadas por la casa comercial. Para las preparaciones de plásmidos de *A. tumefaciens* se obtuvo un rendimiento bajo por esta técnica, por lo tanto, se procedió a transformar células de *E. coli* con 1  $\mu$ l de esta preparación de DNA. Una vez obtenidas las colonias transformadas se procedió a purificar el DNA plasmídico con el sistema arriba mencionado.

##### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se añadieron 1-1.25  $\mu$ M de cada primer (tabla), 1.25 Mm. De una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleico; 0.5 ExTaq polimerasa; tampón de PCR 1X y 200 ng de DNA molde. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con una incubación inicial de 95°C 2 min seguida de 35 ciclos de 95°C 30 segundos. T de anillamiento 30 segundos y 72°C T extensión; con una incubación final de 72 °C 10 min (Tabla 4).

Para comprobar que la reacción de PCR había fusionado, se analizó 1/10 (5 $\mu$ M) del volumen de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 4.** Condiciones de la PCR establecidas en esta investigación.

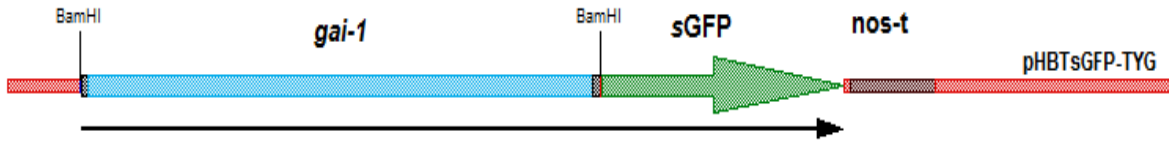
PCR con Pwo polimerasa	PCR Colonia	PCR Fragmento Largo	PCR Fragmento pequeño	PCR Solapante
94°C-10 min  <b>35 ciclos:</b> 94°C-30 seg. 56°C-30 seg. 72°C-2 min  72°C-10 min  10°C-indefinido.	95°C-5 min  <b>30 ciclos:</b> 95°C-1min 54°C-1.5 min  72°C-1min  72°C-5min	95°C-5min  <b>30 ciclos:</b> 95°C-30 seg. 50°C-20 min 72°C-1 min 40 seg.  72°C-10 min  4°C indefinido.	95°C-5 min  <b>30 ciclos:</b> 95°C-20 seg. 50°C-20 seg. 72°C-10 min  72°C  4°C-indefinido.	94°C-2 min.  <b>10 ciclos:</b> 94°C-15 seg. 50°C-30 seg.  72°C-2 min. 72°C-10 min. 4°C-indefinido.  94°C-1 min.  <b>15 ciclos:</b> 94°C-15 seg. 50°C-30 seg.  72°C-2 min.  72°C-10 min.  4°C indefinido.

### Elaboración del *enhancer trap*

Se utilizó como molde la construcción pCR2.1+*gai-1* para integrar por PCR y mediante el diseño de dos oligonucleótidos (Tabla5), dos sitios de restricción de la enzima BamHI en ambos lados del gen, y así, poder sacar este fragmento por digestión con la enzima BamHI y eliminar el codón de parada. Mediante electroforesis se separó y purifico la banda generada correspondiente. Paralelamente se sometió a digestión el plásmido pHBTsGFPTYG con la enzima de restricción BamHI para linearizarlo.

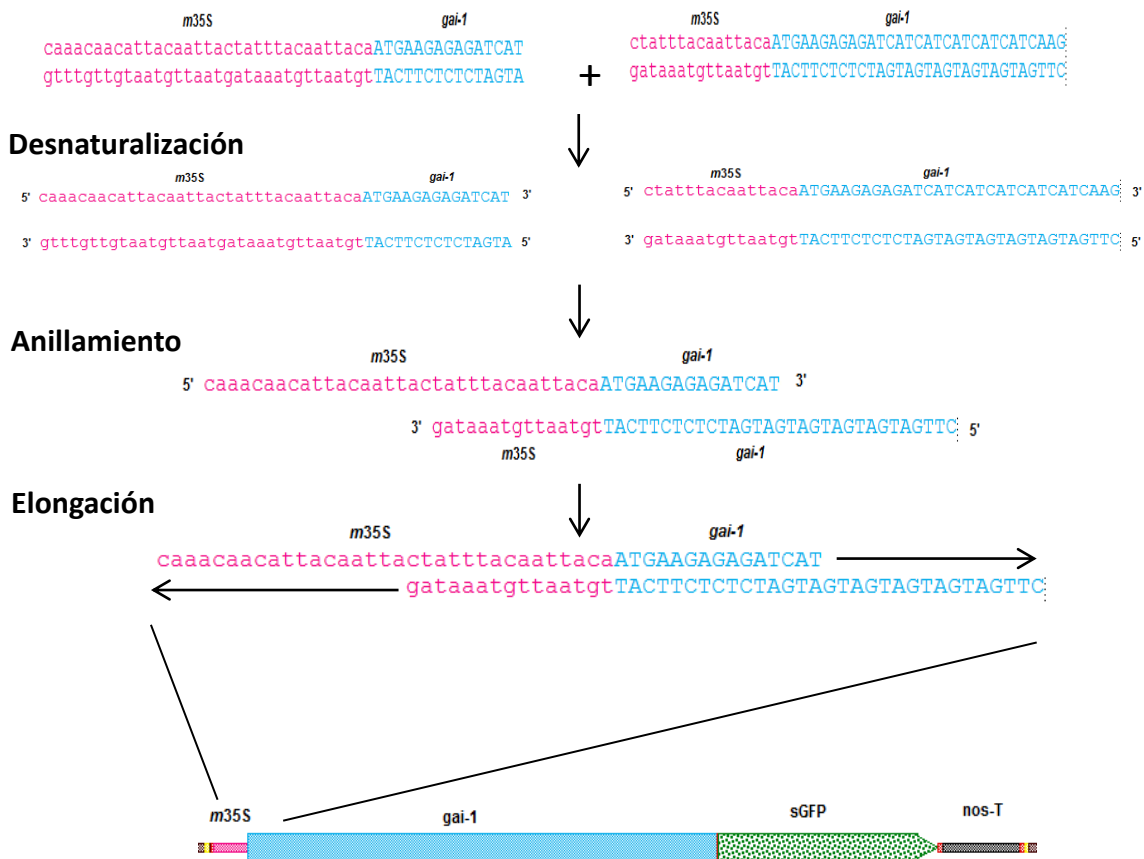
Mediante una reacción de ligación se integró el fragmento de *gai-1* dentro de pHBTsGFPTYG de tal forma que se obtuvo un vector conteniendo *gai-1* fusionado en pauta con sGFP y unido al terminador de la nopalina sintasa (nos-T).





Para integrar el promotor mínimo *m35S* a la anterior construcción se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos; uno para amplificar un producto que consistía de la región *m35S* pero integrando los primeros nucleótidos de *gai-1* y otros dos oligonucleótidos para generar un fragmento consistente de los últimos nucleótidos del *m35S* unidos a la región 5' de *gai-1*.

Una vez obtenidos los dos fragmentos se procedió a realizar una PCR solapante entre ellos (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema general de la PCR solapante diseñada para la elaboración del *enhancer trap*.

El fragmento obtenido de la PCR solapante se introdujo dentro del vector pCR®8.0/GW/TOPO para introducir los sitios de recombinación GATEWAY en ambos lados de la construcción.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos diseñados en esta investigación.

Nombre Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
GAI+m35SF	5'CAATTACTATTTACAATTACAATGAAGAGAGATCAT CAT3'	Introduce un pequeño fragmento del m35S en la región 5' del gen <i>gai-1</i> .
NOSTR	5'GATCTAGTAACATAGATGAC3'	
m35SF	5'CAAGACCCTTCCTCTATAT3'	Amplifica el fragmento corto que contiene el promotor mínimo 35S
m35S+GAIR	5'ATGATGATCTCTCTTCATTGTAATTGTAAATAGTAA TTG3'	Introduce un pequeño fragmento del gen <i>gai-1</i> en la región 3' del promotor mínimo 35S.
BamHIGAI-DF	5'GATCCATGAAGAGAGATCATCATC3'	Introduce sitio de restricción BamHI en la región 5' de <i>gai-1</i> .
GAI-DBamHIR	5'GATCCATTGGTGGAGAGTTTCCAAG3'	Introduce sitio de restricción BamHI en la región 3' de <i>gai-1</i> .

### **Clonaje de fragmentos de DNA mediante el sistema GATEWAY.**

Para la clonación utilizando el sistema GATEWAY se mezclaron 50-150 ng del vector que contiene el fragmento de interés, 150 ng del vector de destino, 2 µl de la enzima LR clonase™II (Invitrogen) y tampón TE a pH 8.0 hasta un volumen final de 10 µl. La acción se incubó por 12 horas a 25°C. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 µl de proteinasa K y se incubó a 37°C por 10 minutos.

### **Secuenciación de DNA y análisis de secuencias obtenidas.**

Las reacciones de secuenciación estuvieron a cargo del servicio de secuenciación del instituto de biología molecular y celular de plantas (UPV-CSIC, Valencia), con el sistema “BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit” de Applied Biosystems”. La reacción de secuenciación se analizó en termocicladores “ABI geneAmp PCR System 9700” y la resolución y análisis de los productos se realizó en un secuenciador capilar “ABI 3100” de “Applied Biosystems”.

El posterior análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el programa SeqMan Pro™ de LaserGene®.

### **Transformación de células competentes de *E. coli* y *A. tumefaciens* por electroporación.**

Se adicionó 1µl de DNA dentro de 50 µl de células electro-competentes homogenizando. La mezcla se introdujo dentro de cubetas de 0.1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente introducida en hielo y luego se sometió a un pulso eléctrico. Para ello se utiliza el aparato GenePulse™ (BioRad), con los siguientes parámetros.

Luego del pulso eléctrico generado por el aparato se añadió a la cubeta 800 µl de LB sin antibióticos y luego se transfirió la mezcla a un tubo de 2 ml, incubando a 37°C por 1 hora para *E. coli* y 2 horas a 28°C para *A. tumefaciens*. Transcurrido

dicho tiempo se dispersaron las células en medio LB solido suplementado con el antibiótico de selección correspondiente.

<b>Células</b>	<b><math>\Omega</math></b>	<b><math>\mu\text{F}</math></b>	<b>kV</b>
<i>E. coli</i>	<b>200</b>	<b>25</b>	<b>1.8</b>
A. <i>tumefasciens</i>	<b>400</b>	<b>25</b>	<b>1.5</b>

## **5. Metodología de plantas**

### **Esterilización de semillas**

Las semillas se esterilizaron con dos concentraciones de etanol. En primer lugar se colocaron en un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 900  $\mu\text{l}$  de una solución de etanol 70% (v/v) y 0.005 % Tritón X-100 (v/v) por 10 minutos. Luego de eliminar la solución anterior, se añadieron 900  $\mu\text{l}$  de Etanol 96% (v/v) durante 1 min. Seguido de esto se pipetea las semillas en etanol y se dispersan en un papel de filtro estéril hasta la evaporación del etanol, luego al doblar el papel se permitió la dispersión uniforme de las semillas sobre el medio de cultivo (en condiciones de asepsia). Finalmente se sellaron las placas con Micropore™ y se incubaron a 4°C durante 7 días en oscuridad, pasados estos días se incubaron durante 5 días en condiciones tanto de luz y oscuridad hasta su análisis.

### **Selección de plantas transgénicas**

Para la selección de transformantes primario (T1), las semillas una vez esterilizadas se sembraron en placas de Petri de 15 cm de diámetro con medio de cultivo MS mas el agente de selección BASTA tras 12-15 de siembra las plántulas resistentes son claramente distinguibles de las no transgénicas

debido a su color verde, mayor tamaño y crecimiento radicular. En este punto se transfieren a condiciones de invernadero.

## **6. Análisis fenotípico de plantas mutantes y líneas transgénicas.**

### **Fotografía de aumento**

Para generar fotografías de la roseta, tallo o planta completa se utilizó la cámara Lumix. En el caso de estructuras más pequeñas, para obtener imágenes de mayor aumento se utilizó una lupa binocular provista de iluminación externa de luz blanca y fría. conectadas además a una cámara digital Nikon y una lupa binocular Leica MZ16Z conectada a un ordenador provisto con el software de análisis de imagen Leica Application Suite.

### **Microscopia confocal**

Para el análisis de expresión de GFP se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH), compuesto por un microscopio invertido DMIR2 y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de laser (458 nm, 488 nm, 514 nm y 534 nm). La proteína GFP se excitó con un laser de 488 nm, y su emisión se recogió en una longitud de onda entre 500-520 nm (máximo de emisión a 509 nm). La clorofila se excito con el mismo laser, y su emisión se recogió entre 660-690 nm. La identidad de la señal se confirmó mediante un barrido de longitudes de onda ( $\lambda$ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Construcción de plásmidos y transformación de plantas.

La finalidad de este trabajo consistió en realizar un rastreo de tipo *enhancer-trap* basado en el promotor mínimo 35S por medio de la expresión de la versión dominante de la proteína DELLA GAI, *gai-1* unida a GFP (proteína fluorescente verde) en plantas de tipo silvestre. La idea es que si este transgén se ubica cerca de elementos *cis* que dirigen la expresión hacia lugares relevantes para la regulación de una respuesta en particular, entonces la línea generada mostrará un fenotipo similar al del mutante *gai-1*. La idea consiste en generar suficientes líneas que expresen esta proteína en distintos dominios de expresión que en conjunto cubran el patrón de expresión normal de *GAI* (Figura 3). El abordaje se basó en una estrategia similar que se empleó con éxito para revelar las funciones específicas de tejido del fitocromo B (PHYB) en relación con la expresión de FLOWERING LOCUS T (FT) (Endo et al, 2005).

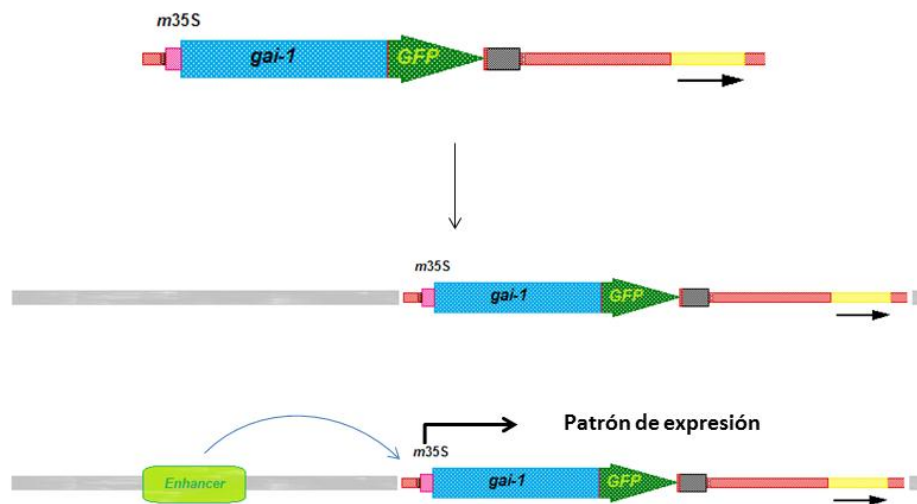
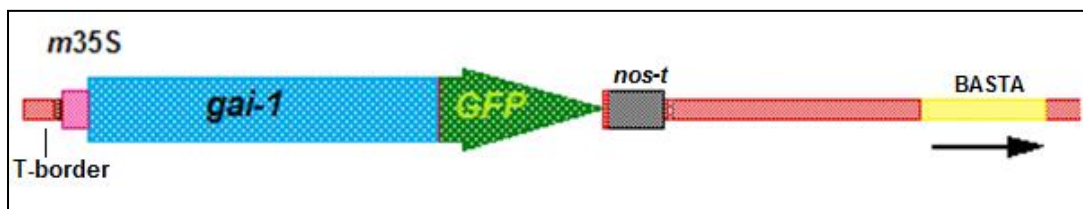


Figura 3. Esquema presentado para el abordaje utilizado en este trabajo.

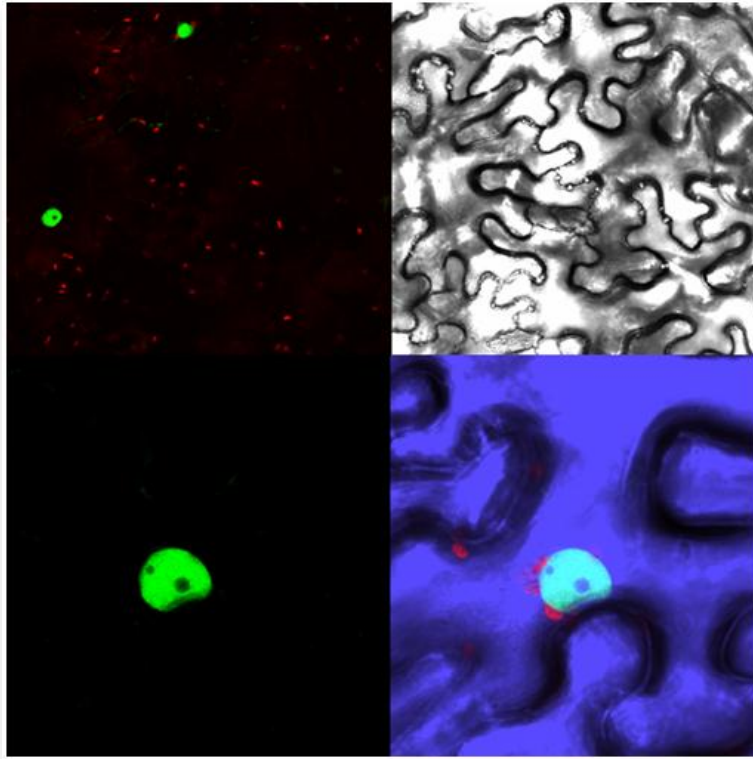
Para realizar esto, se elaboró una construcción que presenta el marco abierto de lectura (ORF) de *gai-1* fusionado a GFP bajo el control de un promotor mínimo 35S cerca de la región 5' del DNA de transferencia. Esta construcción se basa en el vector *pMDC123* del sistema de clonación GATEWAY™, para esto, el ORF de *gai-1* se amplificó por PCR tomando como molde un vector que poseía dicha secuencia, posteriormente introduciendo el producto de PCR generado en el plásmido pCR2.1 de TA Cloning®. Luego de verificar la identidad y la ausencia de mutaciones en el fragmento amplificado, mediante digestión con la enzima de restricción BamHI se retiró el segmento *gai-1* y se ligó al vector *pHBT95:sGFP-nos*. El promotor mínimo de 60 pb *m35S* se fusionó al segmento *GAI-1:sGFP-nos* por medio de PCR solapante y el fragmento completo se transfirió al vector *pMDC123 Gateway™*. Para aumentar la posibilidad de activación del transgén por parte de algún elemento del genoma de *Arabidopsis*, el sitio de policlonaje entre la región 5' y el sitio de recombinación attR1 se eliminaron por digestión. Así, en la construcción final el promotor mínimo se ubica cerca de la región 5' del T-DNA. (Figura 4).



**Figura 4.** Construcción final del *enhacer trap* de *gai-1GFP*.

Para evaluar la funcionalidad de *m35Sgai-1-GFP* se analizó la expresión transitoria de la proteína producida en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Para esto se subclonó esta construcción en un vector que contenía un 35S completo que indujera la expresión del *gai-1GFP* (debido a que el promotor *m35S* por si solo no es funcional) y luego se realizó la transformación vía *agrobacterium tumefaciens* encontrando una señal fuerte de la proteína fluorescente en núcleos (Figura 5). Tanto su localización (*GAI* actúa a nivel de núcleo) como la señal producida

permitieron validar la funcionalidad de la construcción y así dar vía libre a la siguiente etapa de la investigación.



**Figura 5.** Expresión transitoria de *gai-1GFP* en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Se transformaron botones florales de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *L-er* vía *A. tumefaciens*, las semillas producidas se sometieron a selección con el agente BASTA (glufosinato de amonio). Las plántulas resistentes se trasplantaron luego a condiciones de invernadero y durante aproximadamente dos meses se evaluaron distintos caracteres morfológicos (Figura 6).

Finalmente se obtuvieron 737 líneas independientes de las cuales 236 (32%) presentaron por lo menos una característica fenotípica similar al mutante *gai-1* (Tabla 1).





**Figura 6.** Selección de transformantes y su cultivo en invernadero.

**Tabla 1.** Resumen de las características fenotípicas presentes en las líneas generadas en este estudio.

<b>Característica Fenotípica</b>	<b>Número de líneas</b>
<b>Hojas muy pigmentadas</b>	122
<b>Enanismo</b>	200
<b>Hojas de la roseta pequeñas</b>	127
<b>Silicuas ligeramente torcidas</b>	94
<b>Flores con pistilos atrofiados, y sépalos, pétalos y estamen poco desarrollados</b>	26
<b>Tamaño de la silicuas reducido</b>	103
<b>Acumulación de botones florales</b>	57

Dentro de las características fenotípicas obtenidas se pudo observar una marcada tendencia a la disminución graduada del tamaño de la planta que en algunos casos presentó un enanismo severo acompañado de una notable pigmentación de las estructuras vegetativas, en otros casos la inhibición del crecimiento no fue tan marcada generando plantas semi-enanas (Figura 7). Las anomalías florales producidas en algunos casos resultaban en estructuras incompletas que no desarrollaban fruto y en otros se presentaba una acumulación de botones florales exagerada. (Figura 8). Algunas líneas desarrollaban silicuas de pequeño tamaño con un ligero torcimiento en su estructura y en otros casos al final del ciclo reproductivo se apreciaba una deficiencia en el proceso de dehiscencia al momento de obtener las semillas (Figura 9).



**Figura 7.** Fenotipos generados donde se pueden apreciar los diferentes grados de enanismo.



**Figura 8.** Distintas variaciones de las estructuras florales obtenidas en el rastreo.

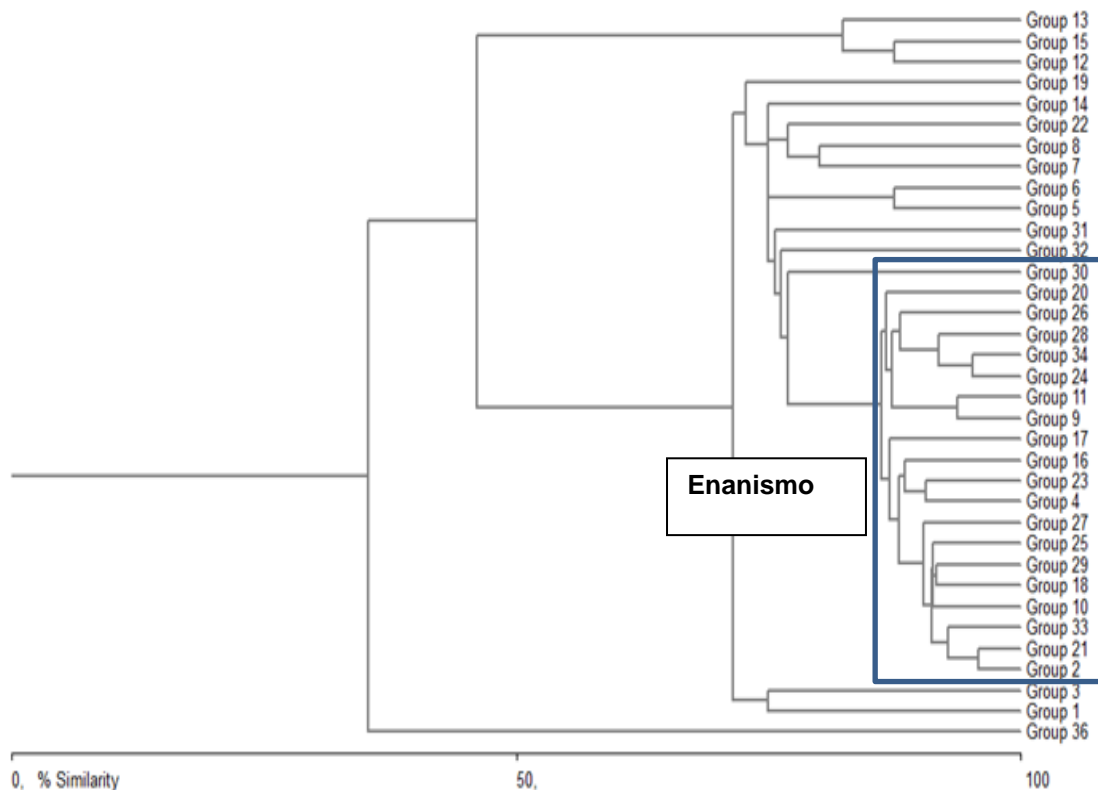


**Figura 9.** Cambios a nivel de la estructura del fruto.

El hecho de que las líneas obtenidas presentaran una amplia gama de variaciones estructurales permite evidenciar que la proteína *gai-1GFP* se está expresando en algunos tejidos particulares de la planta dependiendo de la línea ya que no todas presentaron en su totalidad las características fenotípicas del mutante *gai-1*,

incluso se generaron líneas con defectos mas severos. Esto indica en algún sentido que al abordaje ha sido eficiente para los fines de la investigación.

Debido al amplio número de líneas generadas y a que muchas de ellas compartían rasgos fenotípicos, se procedió a realizar un agrupamiento jerárquico que las ordenara en conjuntos para facilitar el posterior análisis. Para esto se estableció un valor a cada caracter fenotípico que a su vez se asignaba a cada línea, los datos se introdujeron dentro de una matriz que se procesó mediante el programa *BioDiversityPro* generando un cladograma (Figura 10) en el cual el grupo 1 corresponde al fenotipo del mutante *gai-1* y el grupo 36 al fenotipo silvestre. Esto a su vez permitiría establecer una correlación entre las diferentes características morfológicas y la expresión de GFP en un tejido determinado. Esta clasificación se utilizó en el resto del trabajo para establecer prioridades según el rasgo fenotípico y comenzar el análisis de microscopia confocal.



**Figura 10.** Clúster jerárquico de las líneas obtenidas con base en sus características fenotípicas.



## 2. Análisis de expresión de gai:1GFP

Se analizaron 104 líneas de tipo enano en función de encontrar expresión de GFP en hipocótilo, para esto se han observado *seedlings* etiolados germinados en oscuridad en el microscopio de fluorescencia confocal obteniendo hasta el momento 54 líneas con expresión positiva para GFP tanto en epidermis (18 líneas) como en varios tejidos (36 líneas). (Tabla 2).

Analizado la expresión de las líneas positivas para GFP, 18 de ellas presentaron señal solo en epidermis y las otras 36 tanto en epidermis como en otros tejidos. Figura 11. Correlacionando este patrón de expresión con el fenotipo enano de los mutantes analizados se podría pensar que al imponer un bloqueo específico de la señalización de GAs en células epidérmicas sería suficiente para generar una inhibición en la elongación de los tejidos más internos del hipocotilo. Hasta el momento se analizaron 10 líneas que poseen características morfológicas similares al silvestre que no presentan expresión de GFP en el hipocotilo lo cual aporta poca información en este contexto. Tampoco se han encontrado de momento casos con expresión de GFP en otros tejidos diferentes a epidermis y que a su vez presentaran un fenotipo no enano o similar al silvestre, un resultado que también encajaría con la hipótesis mencionada.

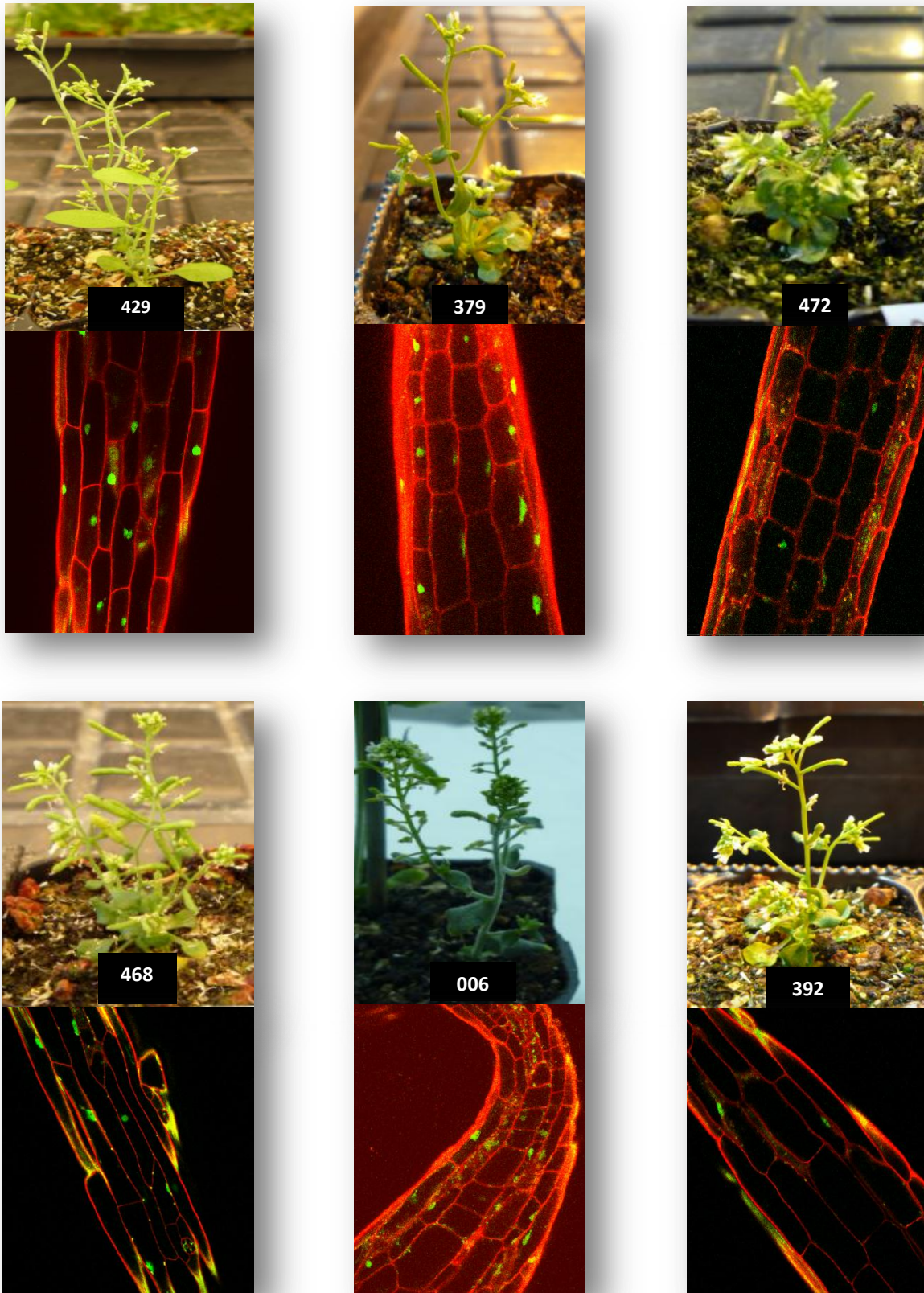


Figura 11. Expresión de *gai-1GFP* en hipocótilos de seedlings etiolados visto en un microscopio confocal de fluorescencia.

**Tabla 2. Resumen de líneas analizadas y su patrón de expresión**

Total líneas	Fenotipo	Número de líneas	Líneas analizadas	GFP	Patrón de expresión
737	Distinto al silvestre	220	94 (Enanas)	54	Epidermis (18 líneas)  Epidermis y otros tejidos (36 líneas)
	Normal	517	10	-	

Savaldi *et al.* (2007) analizaron la expresión de genes tanto de biosíntesis como de percepción de brasinosteroides bajo el control de un promotor específico de epidermis (*ML1*) en sus respectivos mutantes con fondos biosintéticamente nulos, evidenciando que con solo generar una señal en este tejido en particular era suficiente para revertir el fenotipo enano de estos mutantes a uno similar a un silvestre.

En un caso de relacionado, Ubeda *et al.* (2009) bloquearon la síntesis de GAs en tejidos concretos de la raíz encontrando que inhibir esta señal en la endodermis era suficiente para que la raíz cesara su crecimiento.

Hasta el momento los resultados han sido afines a los objetivos establecidos en el sentido de que se han obtenido líneas con rasgos morfológicos particulares y que a su vez se han visto correlacionados con la expresión de la proteína de fusión integrada en el genoma de *Arabidopsis*. El abordaje es concordante con la metodología utilizada por Endo, *et al* (2005) para la generación de líneas de patrones de expresión para la proteína PHYB-GFP en la cual se generaron 336 transformantes primarios de los cuales se obtuvieron 74 líneas (22%) positivas para GFP.

Para continuar con la investigación se propone analizar la expresión de *gai-1*GFP en otros tejidos y órganos de la planta (hoja, tallo, ápice, etc.) que permitan obtener nuevas líneas de patrones de expresión para esta proteína y que sean útiles como herramienta para dilucidar la función o el papel que juega la ruta de señalización por GAs en tejidos o tipos celulares concretos. Para esto se propone utilizar abordajes complementarios como la expresión del gen en cuestión dirigida por algunos promotores específicos de tejido tales como *ML1*, *SUC2*, *RbcS2b*, etc.

Igualmente, es necesario obtener plantas que expresen GAI-GFP dirigido por su promotor propio (GAI::*gai-1*:GFP) como herramienta útil que permita analizar los dominios de expresión propios en la planta y que permitan comprobar si los fenotipos observados por la expresión de *gai-1* en un tejido concreto refleja un papel endógeno de dicha proteína, o si se trata de una ganancia de función por expresión ectópica en tejidos en los que normalmente no hay proteínas DELLA.



## **CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que el uso de metodologías tales como el enhancer trap sirve como herramienta útil para analizar la expresión de las proteínas DELLA en determinados contextos celulares lo cual permitirá en futuras investigaciones establecer los mecanismos por los cuales las giberelinas regulan determinados procesos en las plantas.

## BIBLIOGRAFIA

**de Lucas M, Prat S.** Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Aug;18(4):295-303. Epub 2008 Jul 17.

**Dill A, Jung HS, Sun TP 2001.** The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 20;98(24):14162-7.

**Endo et al.** Phytochrome B in the Mesophyll Delays Flowering by Suppressing FLOWERING LOCUS T Expression in Arabidopsis Vascular Bundles. *The Plant Cell*, Vol. 17, 1941–1952, 2005.

**Fleet CM, Sun TP, A DELLAcate balance:** the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol.* 2005 Feb;8(1):77-85.

**Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG.** Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2006 Dec;18 (12):3399-414. Epub 2006 Dec 28.

**Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J.** Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. **Genes Dev.** 2002 Mar 1;16(5):646-58.

**Mark Curtis & Ueli Grossniklaus (2003)** A Gateway TM cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plants. *Plant Physiology* 133:462-469

**McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun TP, Steber CM.** The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell.* 2003 May;15(5):1120-30.

**Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP.** The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 1997 Dec 1;11(23):3194-205.

**Ubeda-Tomas S. et al.** Gibberellin Signaling in the Endodermis Controls Arabidopsis Root Meristem Size. *Current Biology* 19, 1194–1199, July 28, 2009.

**Savaldi-Goldstein S. et al.** The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* Vol 446| 8 March 2007.