

## 29. Ciencia, Tecnología, e Innovación

### **Estudios funcionales de BdPAP2 de *Brachypodium distachyon* en la determinación de meristemas de inflorescencia**

Gonzalo, Lucía<sup>1</sup>; Muchut, Sebastián<sup>2</sup>; Uberti Manassero, Nora<sup>2</sup>

<sup>1</sup> autor; <sup>2</sup> orientador

[luciigonzalo@gmail.com](mailto:luciigonzalo@gmail.com); [sebamuchu@yahoo.com.ar](mailto:sebamuchu@yahoo.com.ar); [norauberti@yahoo.com.ar](mailto:norauberti@yahoo.com.ar)

Laboratorio de Estudios Moleculares de Plantas - Departamento de Biología Vegetal

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Litoral

#### **Resumen**

Aumentar el rendimiento de producción de cultivos agrícolas es de suma importancia para lograr abastecer la creciente población mundial. *Brachypodium distachyon* es una gramínea que ha sido establecida recientemente como planta modelo de cultivos templados. En este trabajo estudiamos la función de BdPAP2 de *B. distachyon* para determinar el rol que cumple en la regulación de la identidad de los meristemas y la arquitectura de la inflorescencia. Por tal motivo, estudiamos el fenotipo de plantas mutantes insercionales de *B. distachyon* (mutBdPAP2) y de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 que expresan BdPAP2 bajo el control del promotor 35SCaMV. En el análisis se hizo énfasis en tiempo de floración y número de hojas al momento de la transición. En las plantas 35S::BdPAP2, la inserción del gen de interés se corroboró por PCR sobre ADN genómico, y los niveles de transcripto se cuantificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Utilizando esta técnica se determinaron también los niveles de expresión de *SOC1*, *FT* y *TFL1*, genes responsables de las transiciones de fase e identidad de los meristemas. Nuestros estudios indican que la sobreexpresión de BdPAP2 en *A. thaliana* aumenta los niveles de expresión de *SOC1* y *FT*, en tanto que disminuye los de *TFL1*. Esto se condice con los fenotipos observados, tanto en plantas 35S::BdPAP2 como en las mutBdPAP2, que muestran una floración anticipada con respecto a las plantas control. En conjunto, estos resultados nos permiten inferir una posible conservación funcional en las vías que regulan la identidad de los meristemas de inflorescencia y el tiempo de floración entre ambas especies modelo.

**Palabras clave:** *Brachypodium distachyon*, TFL1, RCN4, AP1, tiempo de floración.

## Introducción

La familia de las gramíneas (Poaceae) es una de las más grandes dentro de las angiospermas, con más de 11000 especies ampliamente distribuidas en todo el planeta (Watson y Dallwitz, 1992). Entre estas especies se encuentran la caña de azúcar, el maíz, el arroz y el trigo, los cuatro cultivos de mayor producción en el mundo. Incluso la leche, uno de los productos agrícolas más vendido, proviene de animales alimentados mayormente a base de gramíneas. Estos datos demuestran que las gramíneas cumplen un rol relevante en la nutrición humana, y las sitúa como posibles candidatos para suplir la gran demanda de energía que se prevé para el 2050, cuando la población ronde los 9 billones de personas (FAO, 2012). El desafío de aumentar la producción de los cultivos con menos insumos, acceso limitado al agua y confinando las zonas de producción agrícola en pòs de conservar la biodiversidad, requiere que los cultivos presenten rendimientos que hasta ahora no se han alcanzado (Bevan y col., 2010).

*Brachypodium distachyon*, es una gramínea miembro de la subfamilia Pooideae, es una hierba anual, silvestre, endémica del Mediterráneo y Medio Oriente, que poco tiempo 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. Esto ha llevado al desarrollo de un método de transformación altamente eficiente, acceso a colecciones de germoplasma, marcadores genéticos, un mapa de ligamiento genético, bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos, mapas físicos, colecciones de mutantes, ensayos de microarreglos y bases de datos digitales que promueven y facilitan el uso de *B. distachyon* por parte de la comunidad científica (The International *Brachypodium* Initiative, 2010).

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. Diversos estudios sobre la evolución molecular, en conjunto con estudios funcionales y de expresión en diferentes especies de gramíneas, sugieren que los genes *MADS* han jugado un rol central en la evolución y diversificación de las diferentes formas de inflorescencias de gramíneas (Malcomber y col., 2006). En particular, los genes *SEPALLATA* (*SEP*) han sufrido repetidas duplicaciones luego del origen de las gramíneas dando lugar a

cinco linajes. Entre ellos los subclados PAP2 (también llamado OsMADS34), OsMADS5 y OsMADS1, pertenecientes al clado LOFSEP, no tienen homólogos directos con otras angiospermas y son exclusivos de gramíneas (Malcomber y Kellogg, 2005). Por su parte, estudios recientes han revelado que SEP y AP1/FUL regulan de manera conjunta la transición de meristema vegetativo (MV) a meristema de inflorescencia (MI) en gramíneas (Chen y Dubcovsky 2012; Kobayashi y col., 2012).

*Arabidopsis thaliana*, es por excelencia la planta modelo de investigación de dicotiledóneas, y de su estudio se ha obtenido gran parte del conocimiento de las vías que regulan la transición de MV a MI. Ésta transición de fase está controlada por sofisticadas redes reguladoras que monitorean los cambios en el medioambiente, asegurando que la floración ocurra en condiciones que maximicen el éxito reproductivo y la producción de semillas. Las vías de señalización involucradas en la transición son: vernalización, fotoperiodo y reloj circadiano, vía de la temperatura ambiente, vía autónoma, vía de las giberelinas y vía de la edad (Fornara y col., 2010). Durante la inducción floral se producen diversos cambios morfológicos en las plantas, asociado con cambios drásticos en la expresión de ciertos genes, entre los que se encuentra *SUPPRESSOR OF*

*OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) que codifica un factor de transcripción de tipo MADS box. *SOC1* es considerado un integrador floral, ya que en él converge la información proveniente de las diversas vías de señalización (Buchanan y col., 2015). De acuerdo a diversos estudios, la activación de *SOC1* puede ocurrir a través de la vía de las GIBERELINAS (GA), mediada por factores de la vía de la edad y/o directamente por *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). De la misma manera, su represión está dada por factores de las vías de vernalización y de la temperatura ambiente, y es directamente inhibido por *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) y *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*). La activación de *SOC1* desencadena cambios en la expresión de genes a medida que el MV se transforma en MI, induciendo la expresión de *LEAFY* (*LFY*), *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE* (*SPL*) y *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*). En el MI, *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) se expresa en el centro mismo, controlando los niveles de expresión de *AP1* y *LFY* garantizando el mantenimiento de pool de células indiferenciadas que aseguren el crecimiento indeterminado de la inflorescencia. Hacia los laterales del MI, la expresión de *TFL1* disminuye, y *AP1* y *LFY* promueven la formación de los meristemas florales (Fornara y col., 2010), determinando de este modo la arquitectura de la inflorescencia.

Recientemente se ha reportado una vía de regulación conservada entre *A. thaliana* y *Oryza sativa* (arroz), que determina la arquitectura de la inflorescencia en ambas plantas. En *Arabidopsis* SOC1, SVP, AGL24 y SEPALLATA4 (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 el presente trabajo realizamos estudios funcionales de BdPAP2, homólogo a PAP2 (OsMADS34) de arroz, en un organismo heterólogo como *A. thaliana*, con el fin de comprobar si la vía de regulación común entre arroz y *A. thaliana* se encuentra también conservada en *B. distachyon*.

## Objetivos

El objetivo general de este trabajo de investigación es determinar la función de BdPAP2 en la regulación de los meristemas de *B. distachyon*. En particular, se pretenden determinar las vías de regulación génica en las que participa BdPAP2, así como el grado de conservación funcional que presente con sus homólogos en angiospermas en la

determinación de la arquitectura de las inflorescencias.

## Materiales y Métodos

Para lograr cumplir el objetivo descripto, se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0), las cuales se transformaron utilizando el método de inmersión floral descripto por Clough y Bent (1998). Las plantas de interés, denominadas 35S::BdPAP2, se obtuvieron infectando plantas salvajes Col-0 con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que poseía la construcción 35SCaMV::BdPAP2 y un gen que brinda resistencia al antibiótico kanamicina, clonada en un vector binario derivado del pBI121 previamente obtenido en el laboratorio. Como plantas control para los ensayos de fenotipado se utilizarán plantas Col-0 transformadas con el vector binario pBI121 original. Estas plantas presentan resistencia al antibiótico kanamicina y expresan la proteína beta-glucoronidasa bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), pero no presentan alteraciones fenotípicas comparadas con las plantas Col-0 sin transformar.

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas (primera filial) fueron cosechadas, desinfectadas con una solución de etanol 70% por 5 minutos, lavandina 5% - SDS 1% en agua por 15 minutos, y lavadas con agua estéril y se estratificaron por 48hs a 4°C. Luego de

dicho tiempo se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo MS 0,5X (Murashige y Skoog, 1962) agarizado, suplementado con 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 plantas resistentes al antibiótico se colocaron en macetas con tierra fértil y se cultivaron en las condiciones descriptas. De éstas, se obtuvieron 15 líneas independientes. Para continuar los estudios, se seleccionaron 4 de las líneas anteriores, teniendo en cuenta el fenotipo de las plantas y el resultado del análisis genómico de las mismas. Se cosecharon las semillas de estas plantas (segunda filial), y se crecieron como se describió anteriormente.

El análisis fenotípico de plantas de *A. thaliana* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Boyes y col. (2001), contabilizando momento de floración (en día y número de hojas de roseta) y periódicamente el largo de tallo, número de hojas, número de tallos laterales, ramas secundarias y días a senescencia.

Se realizaron extracciones de ADN genómico de las plantas de *A. thaliana* en estudio para corroborar la presencia del trasgen *BdPAP2*. Para ello, se empleó el método descrito por Li y Chory (1998). El ADN genómico se utilizó como molde para

amplificar la secuencia de interés por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos. Los productos de amplificación se corroboran utilizando la técnica de separación electroforética en gel de agarosa (Ausubel, 1988).

A los 22 días de edad de las plantas, comenzando a contar desde que se dispusieron en medio MS 0,5X, se realizó una extracción de ARN total de planta completa, utilizando reactivo TransZol Up (Genbiotech), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se tomaron muestras de plantas control y 35S::BdPAP2 que aún no habían sufrido la transición de MV a MI.

La integridad del ARN obtenido se corroboró por separación electroforética en gel de agarosa 1% (Ausubel, 1988), y la concentración de las muestras obtenidas fue corroborada por absorción espectrofotométrica a 260 nm, y su pureza evaluada utilizando el resultado de la relación de absorbancia a 260/280 nm. Posteriormente se realizaron reacciones de retro-transcripción en volumen final de 20µl, con 3 µg de ARN y siguiendo las especificaciones del fabricante de la transcriptasa reversa ImProm-II (Promega) y oligonucleótido poliT, el cual es capaz de hibridar en las colas de poliA de los ARN mensajeros.

Se realizaron reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR); para ello se utilizó un termociclador AriaMx

Real Time PCR System (Agilent Technologies). Las reacciones se realizaron en volumen final de 20  $\mu$ l, conteniendo: 1) 10  $\mu$ l de buffer de reacción, el cual contiene la enzima de reacción, el fluoróforo y los cuatro dNTPs necesarios (Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix de Agilent); 2) 5  $\mu$ l de una dilución del producto de la transcripción reversa previamente descrita; 3) 0,4  $\mu$ l de diluciones de los oligonucleótidos correspondientes; 4) 0,3  $\mu$ l de fluoróforo de referencia ROX; y 5) 3,9  $\mu$ l de agua de calidad biología molecular. Oligonucleótidos para *ACTINAS* (Charrier y col., 2002) fueron utilizados para referenciar la concentración de ADN copia (ADNc) en cada una de las muestras. Por su parte, se utilizaron oligonucleótidos para los integradores florales *SOC1* y *FT*, así como para *TFL1* y *BdPAP2*. La fluorescencia se midió a 60°C durante 40 ciclos. Los niveles relativos de expresión se determinaron utilizando el método de Ct comparativo. Los resultados se presentan como triplicados biológicos y técnicos, y son analizados con la prueba t de Student.

También se contó con semillas de *B. distachyon* de plantas control, que se denominaron 21.3, y de líneas mutantes insercionales, denominadas mutBdPAP2, las cuales poseen en el gen *BdPAP2* una inserción entre el exón 1 y el exón 2; en la inserción se incorpora un gen que brinda resistencia a higromicina, y cuatro

secuencias repetidas del enhancer del promotor 35SCaMV. Estas semillas fueron gentilmente cedidas por el Dr. John Vogel, del DOE Joint Genome Institute, Estados Unidos.

Las semillas de las plantas mutantes insercionales se desinfectaron siguiendo la misma metodología empleada para semillas de *A. thaliana*, se colocaron en placas de Petri con medio de cultivo MS 0,5X (Murashige and Skoog, 1962) y 50  $\mu$ g/ml de higromicina y pasaron un proceso de estratificación de 7 días a 4°C. Luego se llevaron a cámara de crecimiento, manteniendo las condiciones descriptas para *A. thaliana*. A los 5 días se pasaron a macetas con tierra fértil.

El análisis fenotípico de las plantas de *B. distachyon* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Derbyshire y Byrne (2013), midiendo momento de floración (en día y número de hojas) y periódicamente el número de hojas, número de ramificaciones basales, la altura de planta, el largo de inflorescencia y el número de espiguillas.

## Resultados y Discusión

Las cuatro líneas independientes de *A. thaliana* 35S::BdPAP2, pertenecientes a la segunda filial, se denominaron 35S::BdPAP2 1, 35S::BdPAP2 2, 35S::BdPAP2 3 y 35S::BdPAP2 1. Como se puede observar en la Figura I (A-D), todas las líneas 35S::BdPAP2 florecen entre 8 y 15

días antes que las plantas control. Coherentemente, las plantas transgénicas desarrollan menos hojas de roseta ( $5 \pm 0,53$ ;  $5 \pm 0,53$ ;  $6 \pm 0,83$ ;  $5 \pm 0,74$ ), al momento de floración respecto a las plantas control ( $11 \pm 1,64$ ). Estos datos se muestran en la tabla 1.

A fin de corroborar la inserción del gen de interés en las líneas de plantas 35S::BdPAP2 estudiadas, se realizaron extracciones de ADN genómico para utilizar como molde de una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos para *BdPAP2*. En la Figura I (E) se muestran los productos de amplificación obtenidos, separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la imagen se observa la presencia de una banda de aproximadamente 700 pb, la cual corresponde al tamaño de la región codificante de *BdPAP2*. La calle que no presenta banda corresponde al control negativo realizado con ADN genómico de plantas control.

Posteriormente, se realizaron extracciones de ARN total a fin de estudiar los niveles de expresión de diversos genes de interés. En la Figura I (F) se muestra el resultado de la extracción de ARN, donde se observan claramente las bandas correspondientes a la subunidad mayor y menor de ARN ribosomal, lo cual permite estimar la integridad del ARN mensajero de interés.

Para estimar los niveles de expresión de *BdPAP2* en las plantas transgénicas, se utilizó como referencia la línea 35S::BdPAP2 2, ya que fue la que presentó los menores niveles de amplificación del gen blanco. Cabe aclarar que no se utiliza como referencia la muestra correspondiente a las plantas control, ya que no cuentan con el gen *BdPAP2* en su genoma. Para comparar los niveles de expresión de los demás genes analizados en las diferentes muestras, se determinaron arbitrariamente como 1 los niveles de expresión obtenidos en las plantas control. Como se observa en el gráfico de la Figura I (G), todas las líneas 35S::BdPAP2 expresan elevados niveles de expresión de *BdPAP2*, corroborando que la inserción en el genoma está siendo correctamente transcrita.

Así mismo, las líneas transgénicas muestran mayores niveles de expresión de los integradores florales *SOC1* y *FT*, respecto a las plantas control. Este resultado es coherente con el fenotipo observado de floración acelerada. Sumado a esto, se puede observar que los niveles de expresión de *TFL1* en las plantas 35S::BdPAP2 están significativamente disminuidos respecto a las plantas control. Como se mencionó en la introducción, *TFL1* es el responsable de mantener las células indiferenciadas en el meristema reproductivo, a fin de garantizar el crecimiento indeterminado de

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina  
las inflorescencias (Fornara y col., 2010).

17, 18 y 19 de octubre de 2018

También se ha visto que plantas mutantes *ttl1* de *A. thaliana* presentan un adelanto en el tiempo de floración (Shannon y Meeks-Wagner, 1991), al tiempo que plantas que sobreexpresan TFL1 desarrollan sus inflorescencias de manera significativamente más tarde que las plantas control (Ratcliffe y col., 1998). En nuestro caso en particular, es posible que BdPAP2 sea capaz de regular negativamente la expresión de *TFL1*, de manera similar a lo que se ha reportado para SEP4, homólogo de BdPAP2 en *A. thaliana* (Liu y col., 2013). Dado que en el proceso de regulación génica la relación

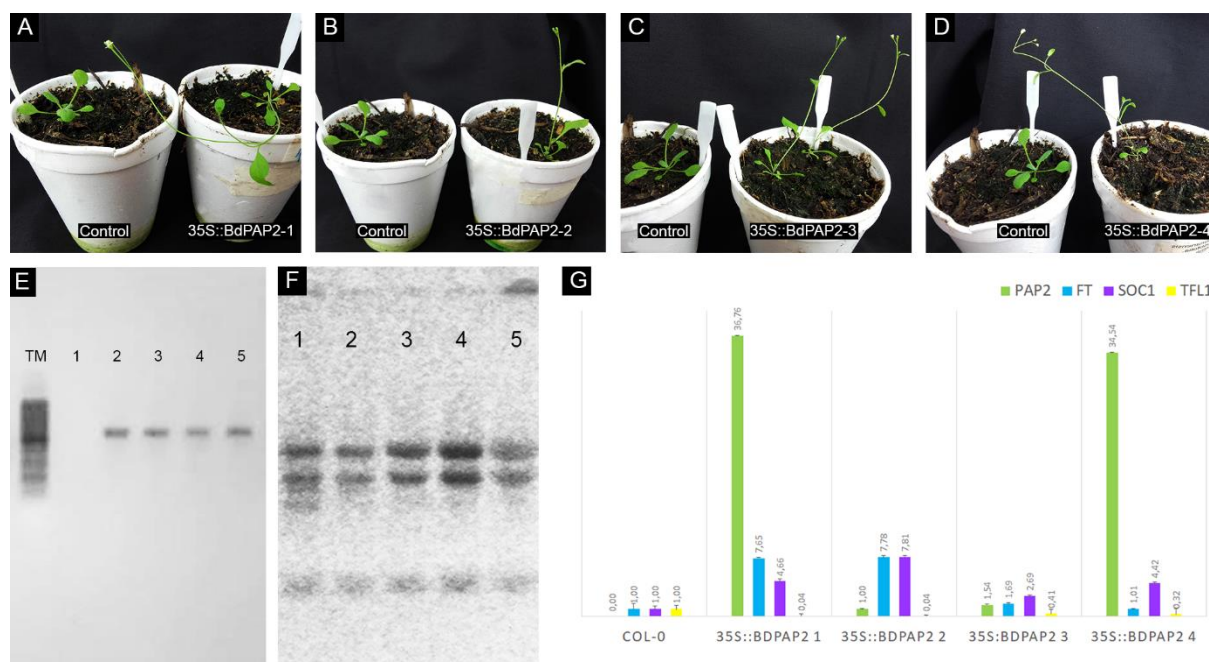


Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

de concentraciones de las diferentes proteínas juega un rol importante en la transición y determinación de los meristemas, es probable que la combinación de bajos niveles de expresión de *TFL1* y los altos niveles de *SOC1* y *FT* sean motivo suficiente para promover que las plantas 35S::BdPAP2

17, 18 y 19 de octubre de 2018

sufran la transición de MV a MI de manera anticipada. Actualmente se están realizando los esfuerzos tendientes a determinar si la regulación de estos genes mediada por BdPAP2 ocurre de manera directa o indirecta, y si se encuentran otras proteínas involucradas en el proceso.



**Figura 1. (A-D)** Las plantas de *A. thaliana* 35S::BdPAP2 poseen adelantado el tiempo de floración respecto a las Col-0. **(E)** Gel de agarosa 1% en transiluminador UV: TM: marcador de tamaño molecular; 1: producto de PCR sobre ADN genómico de Col-0; 2: producto de PCR sobre ADN genómico de 35S::BdPAP2 1; 3: producto de PCR sobre ADN genómico de 35S::BdPAP2 2; 4: producto de PCR sobre ADN genómico de 35S::BdPAP2 3; 5: producto de PCR sobre ADN genómico de 35S::BdPAP2 4. **(F)** Gel de agarosa 1% en transiluminador UV, con extracciones de ARN total: 1: Muestra Col-0; 2: Muestra 35S::BdPAP2 1; 3: Muestra 35S::BdPAP2 2; 4: Muestra 35S::BdPAP2 3; 5: Muestra 35S::BdPAP2 4. **(G)** Resultados de qPCR.

Línea	Edad al momento de floración	Número de hojas de roseta al momento de floración
Col-0	31 ± 2,17	11 ± 1,64
35S::BdPAP2 1	16 ± 2,60	5 ± 0,53
35S::BdPAP2 2	23 ± 2,22	5 ± 0,53
35S::BdPAP2 3	22 ± 2,43	6 ± 0,83
35S::BdPAP2 4	21 ± 2,96	5 ± 0,74

**Tabla 1.** Datos del fenotipado de plantas Col-0 y 35S::BdPAP2 de *A. thaliana*.

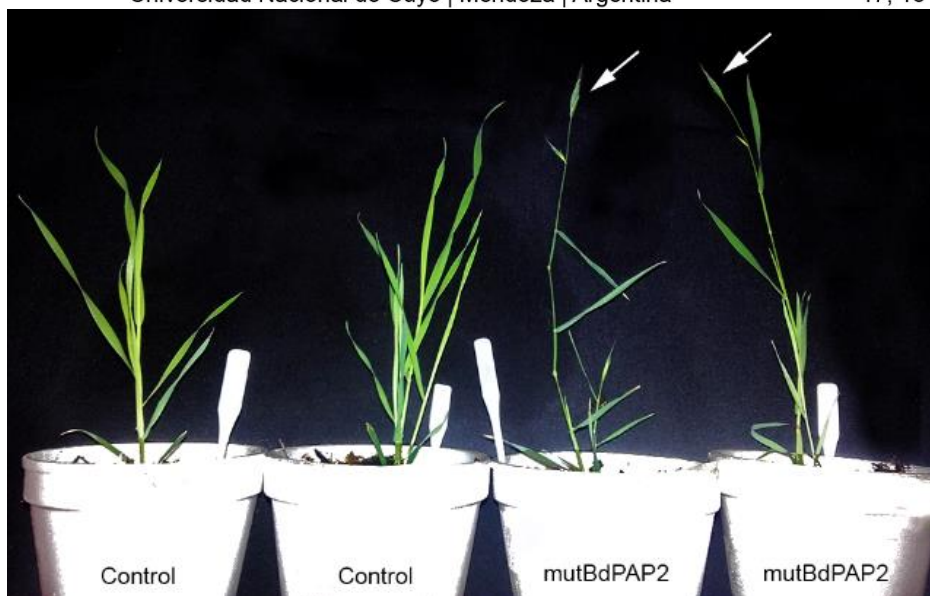
Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

17, 18 y 19 de octubre de 2018

Para corroborar los resultados obtenidos en *A. thaliana*, estudiamos la función de BdPAP2 en plantas mutantes insercionales de *B. distachyon*. La inserción en el gen *BdPAP2* podría estar aumentando la expresión del mismo, ya que presenta 4 copias en tándem de la secuencia enhancer del promotor 35SCaMV. En teoría, dicha región es capaz de atraer la maquinaria de transcripción y favorecer la expresión de los genes cercanos. Si bien se ha corroborado la presencia de la inserción a partir de la selección de las plantas en antibiótico higromicina y mediante PCR sobre ADN genómico (datos no mostrados), impedimentos técnicos nos han impedido determinar aún los niveles de expresión de *BdPAP2* en estas plantas. Sin embargo, resultados preliminares del fenotipado muestran que

las plantas mutBdPAP2 adelantan el momento de floración respecto a las plantas control 12 días, como se puede observar en las imágenes de la Figura II. La edad de las plantas mutBdPAP2 y control, así como el número de hojas que poseen al momento de floración, se puede observar en la tabla 2. Estos resultados son coincidentes con los observados en *A. thaliana*, lo cual nos permitiría inferir cierto grado de conservación funcional entre ambas especies, al menos relacionado con el control de los tiempos de floración.

Como se mencionó en la introducción, Liu y colaboradores (2013) hallaron una vía de regulación conservada entre *A. thaliana* y arroz, que determina la arquitectura de sus inflorescencias. En *A. thaliana*, dímeros de SOC1/AP1, SVP/AP1,



**Figura II.** Las plantas *B. distachyon* mutBdPAP2 poseen adelantado el tiempo de floración respecto a las Control. Las flechas blancas señalan las flores de dichas plantas.

Línea	Edad al momento de floración	Número de hojas al momento de floración
Control 21.3	41 ± 2,36	19 ± 3,65
mutBdPAP2	29 ± 1,31	9 ± 2,15

**Tabla 2.** Datos del fenotipado de plantas Control y mutBdPAP2 de *B. distachyon*.

AGL24/AP1 y SEP4/AP1 se unen a la secuencia CCAAAAATGGAAA presente en la región reguladora 3' del gen *TFL1* (Li y col., 2015), generando un loop que une la región aguas debajo del codón de terminación de este gen con la región reguladora 5' del mismo, y resultan en la represión de expresión de *TFL1*. PAP2 de arroz, homólogo a SEP4, interaccionaría con OsMADS14, OsMADS15, y OsMADS18, homólogos de AP1, logrando una regulación similar sobre los tres homólogos de *TFL1* en arroz, *RICE CENTRORADIALIS* (*RCN1/2/4*), especialmente sobre *RCN4*. De acuerdo a lo reportado (Wei y col, 2014), en *B. distachyon* existen 3 homólogos de *TFL1* denominados *BdRCN1*, *BdRCN2* y

*BdRCN4*. Análisis bioinformáticos preliminares de las secuencias reguladoras de dichos genes, tanto hacia la región 5' como 3' de los mismos, muestran que *RCN4* posee la secuencia CCAAAAATGGAAA conservada en su región reguladora 3'. Esta información permitiría inferir que la regulación de *TFL1* mediada por el dímero SEP4/AP1 que ocurre en *A. thaliana* y arroz podría encontrarse también conservada en *B. distachyon*. Estudios posteriores de interacción proteína-proteína, proteína-ADN y 3C PCR nos permitirán corroborar o refutar esta hipótesis y echar luz sobre el grado de conservación funcional de las vías de regulación génica de la floración entre angiospermas.

## Conclusiones

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que la sobreexpresión de *BdPAP2* genera una disminución de los transcritos de *TFL1*, así como un aumento en los niveles de expresión de *SOC1* y *FT*. Esto lleva a las plantas 35S::BdPAP2 a florecer de manera anticipada respecto a las plantas control, demostrando la función de BdPAP2 en la regulación de los meristemas reproductivos. Por su parte, la disminución de la expresión de *TFL1* podría deberse a la formación de un dímero entre BdPAP2 y AP1, capaz de unirse a la secuencia CCAAAAATGGAAA de la región reguladora 3' del mismo. Los resultados obtenidos, así como los ensayos propuestos a futuro, serán sustento de nuevos aportes que permitan comprender las complejas vías de regulación que controlan los meristemas en las distintas especies vegetales.

## Bibliografía

Ausubel, F. M. (1988). Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Current Protocols in Molecular Biology, 6-3.

Bevan, M.W., Garvin, D.F. y Vogel, J.P. (2010). *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. Current Opinion in Biotechnology, 21, 211–217.

Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., y 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.

Buchanan B. B., Gruissem W. y Jones R. L. (2015). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. (Lugar) American Society of Plant Biologists. Second edition.

Charrier, B., Champion, A., Henry, Y., y Kreis, M. (2002). Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Plant Physiology, 130(2), 577-590.

Chen, A., y Dubcovsky, J. (2012). Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering. PLoS genetics, 8(12), e1003134.

Clough, S. J., y Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The plant journal, 16(6), 735-743.

Derbyshire, P., y Byrne, M. E. (2013). MORE SPIKELETS1 is required for spikelet fate in the inflorescence of

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina  
*Brachypodium*. Plant

- physiology, 161(3), 1291-1302.
- FAO (2012) World Agriculture: towards 2030/2050. Alexandratos, N. y Bruinsma, J. Global Perspective Studies Team. Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- Fornara F., De Montaigu A., y Coupland G. (2010). SnapShot: Control of Flowering in *Arabidopsis*. Cell 141, April 3, 2010.
- Kobayashi, K., Yasuno, N., Sato, Y., Yoda, M., Yamazaki, R., Kimizu, M., Yoshida, H., Yoshiaki, N., y 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, J., y Chory, J. (1998). Preparation of DNA from *Arabidopsis*. *Arabidopsis* Protocols, 55-60.
- Li, Q., Wang, Y., Wang, F., Guo, Y., Duan, X., Sun, J. y An H. (2016). Functional conservation and diversification of *APETALA1/FRUITFULL* genes in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 157: 507–518.
- 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.
- Malcomber, S. T., y Kellogg, E. A. (2005). *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls. *Trends in plant science*, 10 (9), 427-435.
- Malcomber, S. T., Preston, J. C., Reinheimer, R., Kossuth, J., y Kellogg, E. A. (2006). Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Advances in Botanical Research*, 44, 425-481.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- 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.
- Shannon, S., y Meeks-Wagner, D. R. (1991). A mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *The Plant Cell*, 3(9), 877-892.
- The International *Brachypodium* Initiative (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina  
*Brachypodium distachyon*. Nature  
Vol 463| 11

Watson, L. y Dallwitz, M.J. (1992). In: The  
Grass Genera of the World. Edited  
by Wallingford CT. CAB  
International.

Wei, B., Zhang, RZ., Guo, JJ., Liu, DM., Li,  
AL., Fan, RC., Mao, L. y Zhang  
XQ. (2014). Genome-Wide  
Analysis of the MADS-Box Gene  
Family in *Brachypodium*  
*Distachyon*. PLoS ONE 9(1):  
e84781.

### Agradecimientos

Agradezco a la Facultad de  
Bioquímica y Ciencias Biológicas de la  
Universidad Nacional del Litoral por  
permitir formarme en mis estudios; a la  
Facultad de Ciencia Agrarias de la misma  
Universidad por poder llevar a delante mi  
formación en investigación; al Laboratorio

17, 18 y 19 de octubre de 2018  
de Estudios Moleculares de Plantas por el  
apoyo recibido; y a mi familia.

### Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Proyecto  
de Investigación y Desarrollo  
titulado “Estudios funcionales de BdPAP2  
y su rol en la arquitectura de la  
inflorescencia  
de *Brachypodium distachyon*”, PICT  
2015 N° 0333.