

EL GEN CRK33 ES REGULADO POR GIBERELINAS DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO *Arabiopsis Thaliana*

*CRK33 GENE IS REGULATED BY GIBERELINES DURING THE DEVELOPMENT FRUIT IN *Arabiopsis Thaliana**

Cristina Arellano Villagómez

Tecnológico Nacional de México en Celaya
krizztina_13@hotmail.com

Lorenzo Guevara Olvera

Tecnológico Nacional de México en Celaya
lorenzo.guevara@itcelaya.edu.mx

Humberto Ramírez Medina

Tecnológico Nacional de México en Celaya
hramirez@conacyt.mx

Paulina Mayell Mejía Ponce

CINVESTAV-IPN Irapuato
paulina.mejia@cinvestav.mx

Juan Gabriel Ramírez Pimentel

Tecnológico Nacional de México en Roque
garamirez@itroque.edu.mx

Gerardo Acosta García

Tecnológico Nacional de México en Celaya
gerardo.acostal@itcelaya.edu.mx

Resumen

El fruto representa una parte importante en la dieta humana y animal. En *Arabidopsis thaliana*, el fruto es un excelente modelo de estudio por la forma de desarrollo y los tejidos que lo conforman. Sin embargo, aun es poca la información que se tiene sobre la regulación de su desarrollo, forma y tamaño. Existen un grupo de quinasas tipo receptor (RLK's) que participan en diversas etapas del desarrollo de la planta, a pesar de que pocas se han caracterizado funcionalmente se sabe que participan en la transducción de señales. Sin embargo, no se ha reportado su función durante el desarrollo del fruto.

En el presente proyecto se aborda el estudio del gen *CRK33*, perteneciente a la familia de genes que codifican para proteínas quinasas de tipo receptor de RLK en plantas. En estudios recientes se ha reportado la participación e importancia de los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas en el desarrollo del fruto, entre ellas las giberelinas. Hasta el momento, se ha demostrado que el gen *CRK33* se expresa en las hojas y frutos cuando son tratados con giberelinas exógenas, sugiriendo que éstas últimas lo regulan, no obstante, se están llevando a cabo análisis que confirmen lo antes mencionado. Por otro lado, se analizan los productos de las cruces de la línea mutante *salk-cr33* con líneas marcadoras del desarrollo del fruto a fin de encontrar cambios en el patrón de expresión.

Palabras Clave: Fruto, gen *CRK33*, giberelinas.

Abstract

*The fruit represents an important part in the human and animal diet. In *Arabidopsis thaliana*, the fruit is an excellent study model because of the way of development and the tissues that make it up, however, there is little information about the regulation and induction of it. There is a group of receptor-type kinases (RLK's) involved in various stages of plant development, although few have been functionally characterized as being involved in signal transduction. However, their function has not been reported during fruit development.*

*The present project addresses the study of the *CRK33* gene, belonging to the family of genes coding for protein kinases of receptor type RLK in plants.*

*Recent studies have reported the participation and importance of plant growth regulators or phytohormones in the development of the fruit, including gibberellins. So far, it has been demonstrated that the *CRK33* gene is expressed in leaves and fruits when treated with exogenous gibberellins, suggesting that the latter regulates it, however, analyzes are being carried out confirming the aforementioned. On the other hand, the products of the crosses of the *salk-cr33* mutant line with fruit development marker lines are analyzed in order to find changes in the expression pattern.*

Keywords: Fruit, *CRK33* gene, gibberellins.

1. Introducción

El fruto de *Arabidopsis thaliana* (silicua) es el sistema modelo de estudio para plantas dehiscentes, sin embargo, aún se desconocen todos los mecanismos genéticos y moleculares que regulan la identidad de sus células y la forma y tamaño. En la presente investigación se estudia cómo se regula la formación del fruto con la finalidad de generar conocimiento y contribuir al entendimiento.

Existen un grupo de quinasas tipo receptor (RLK's) que participan en diversas etapas del desarrollo de la planta, a pesar de que, pocas se han caracterizado funcionalmente se sabe que participan en la transducción de señales. Sin embargo, no se ha reportado su función durante el desarrollo del fruto. Los receptores tipo cinasas (RLK's) son proteínas transmembrana con un dominio transmembrana extracelular (N-terminal) y un dominio citoplasmático C-terminal Ser/Thr cinasa. El genoma de *Arabidopsis* contiene más de 610 RLKs homólogas y representa el 2.5% de los genes que codifican proteínas en el organismo. Todas las proteínas CRK's contienen dos copias del dominio extracelular C-8X-C-2X-C. El dominio C-terminal quizá participa en la formación de la estructura tridimensional de las proteínas mediante enlaces disulfuro [6,7].

Uno de los mayores grupos RLK está formado por el dominio de la función RLK 26 desconocida (DUF26), también llamada ricas en receptor cisteína quinasas (CRKs), las cuales desempeñan un papel importante en la regulación de la defensa de patógenos y muerte celular programada. Por otro lado, se ha reportado a las giberelinas como reguladores del crecimiento y desarrollo de plantas, ya que éstas controlan una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo la germinación de semillas, expansión de las hojas, elongación del tallo y raíz, inducción floral y el desarrollo de la flor [2,3,4]. El tratamiento con giberelinas de pistilos no polinizados promueve la iniciación del fruto, probablemente por imitación de la producción de giberelinas luego de la fecundación de los óvulos [1,5].

En este trabajo se analizó la regulación de las giberelinas sobre la expresión del gen CRK33 durante el desarrollo del fruto. Lo anterior con la finalidad de entender cuál es la función de las CRKs en el patrón de desarrollo del fruto en *Arabidopsis thaliana*.

2. Métodos

Material biológico

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* que fueron utilizadas en éste estudio son: líneas tipo silvestre, ecotipo Columbia 0 (Col-0) y la línea insercional de T-DNA para el gen CRK33 (salk-cr33).

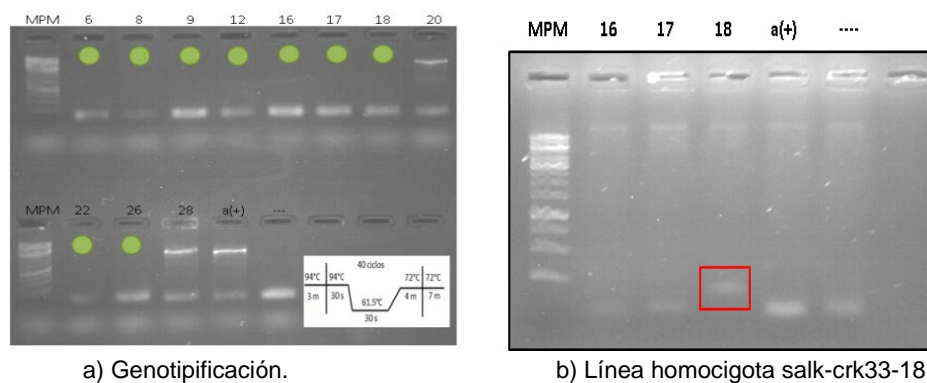
Tratamiento con giberelinas

Se llevó a cabo un tratamiento con GA3 (ácido giberélico) con una concentración 10 mM, asperjado de manera exógena en diferentes horas en tejidos de la planta *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Col-0, posteriormente, se realizó la extracción de RNA y síntesis de cDNA para analizar la expresión del gen CRK33 en respuesta al estímulo de las giberelinas. Se realizó la extracción de RNA de tejido de hoja basal, boton floral y silicua, mediante el kit comercial ZR RNA MicroPrep (ZYMO RESEARCH) y se verificó la calidad del RNA, posteriormente se midió la concentración del ácido ribonucleico, mediante un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y se llevó a cabo la síntesis del cDNA, el cual se usó como templado para los análisis de expresión, mediante la técnica RT-PCR (Transcripción Reversa –PCR).

3. Resultados

Genotipificación

Mediante la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos del gen CRK33 se lograron obtener 9 posibles líneas homocigotas (figura 1a), posteriormente se corroboró mediante una amplificación por PCR con el oligonucleótido reverso del gen CRK33 y el oligonucleótido específico del T-DNA (Lbb1.3) la obtención de una línea homocigota, como se puede observar en la figura 1b. La figura 1a muestra la genotipificación, amplificación por PCR del gen CRK33 de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Col-0 y la figura 1b muestra la línea homocigota salk-cr33-18. Carril 18: línea homocigota; carril a y --: control negativo.



a) Genotipificación. b) Línea homocigota *salk-cr33-18*.
Figura 1 Identificación de líneas homocigotas para *crk33*.

Expresión del gen *CRK33* en la línea *salk-cr33-18*

Se llevó a cabo un análisis de expresión de *CRK33* en las etapas de botón floral y silicua de la línea *salk-cr33* y silvestre ecotipo *Col-0*. Se observó la expresión de *CRK33* en botones florales de ambas líneas (figura 2). Sin embargo, resulta interesante la ausencia de expresión de *CRK33* en silicua de la línea homocigota *salk-cr33*, lo que sugiere la existencia de mecanismos importantes que regulan el patrón de expresión de *CRK33* en el sitio de inserción del T-DNA después de la fecundación. En figura 2, se muestran cuatro carriles: Carril 1 Botón floral *Col-0*; Carril 2 Silicua *Col-0*; Carril 3 Botón floral *crk33* y Carril 4 Silicua *crk33*; además se observa el MPM, marcador de tamaño 1 kb.

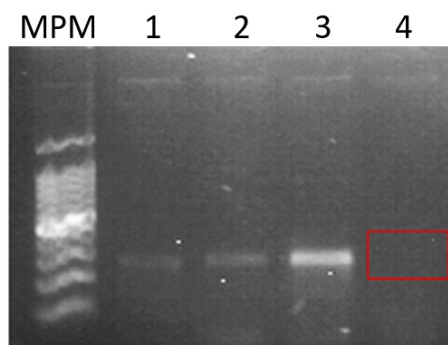


Figura 2 Expresión del gen *CRK33* en la línea insercional *salk-cr33* y *Col-0*.

Expresión del gen *CRK33* en líneas mutantes de giberelinas

Para analizar la regulación de *CRK33* por giberelinas se analizó su expresión durante el desarrollo floral en dos mutantes de la biosíntesis de giberelinas, *ga4-1*

y *gll-1*, las cuales tienen disminuidos los niveles de giberelinas endógenas. Se llevó a cabo un análisis de expresión, mediante RT-PCR y se encontró que *CRK33* no se expresa en líneas mutantes de giberelinas (figura 3), lo que sugiere, que dicho gen está regulado por giberelinas. En figura 3 Se observa que no hay expresión del gen *CRK33* en la línea *ga4-1* y *gll-1*.

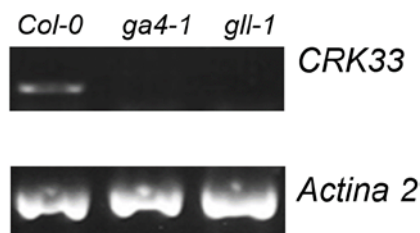


Figura 3 Expresión del gen *CRK33* en mutantes de giberelinas.

Tratamiento con giberelinas exógenas

Para analizar si la expresión de *CRK33* también afectada por las giberelinas exógenas, se realizaron tratamientos con GA_3 y se analizó la expresión después de tiempo determinados. En la figura 4 se observa el análisis de expresión del gen *CRK33* en hojas basales a las 2 y 4 horas posteriores a su tratamiento; por lo que se observó una expresión transitoria de *CRK33*. La figura 4a muestra el análisis de expresión del gen *CRK33* en hoja basal tratada con GA_3 . RT-PCR del gen *CRK33* en hojas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo *Col-0*. Se muestra en figura 4b el análisis de expresión del gen *CRK33* en silicuas tratadas con GA_3 . RT-PCR del gen *CRK33* en fruto de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo *Col-0*. Se realizaron aplicaciones de giberelinas a una concentración de 10 mM.

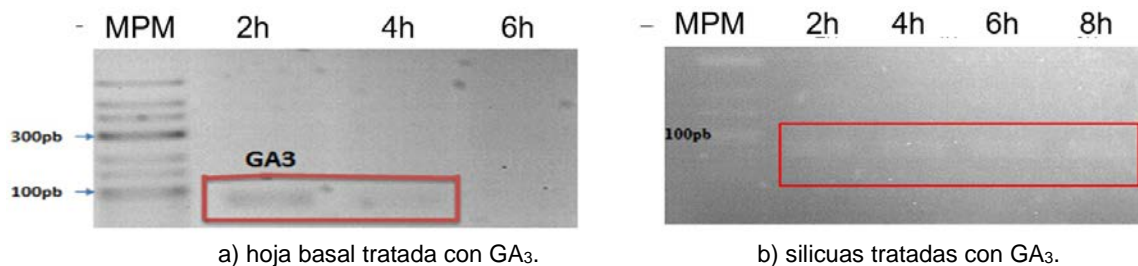


Figura 4 Expresión de *CRK33* con tratamientos de giberelinas (GA_3).

Mientras que en silicuas la expresión inducida por el tratamiento con giberelinas se mantuvo hasta las 8 horas (figura 4b), que fue el máximo tiempo analizado luego de la aplicación. Los análisis de expresión muestran que existe una regulación del gen *CRK33* por los niveles de giberelinas.

4. Discusión

La importancia del estudio de las redes que regulan la diferenciación celular de los tejidos del fruto se ha incrementado en los últimos años debido a la necesidad por implementar nuevas estrategias para incrementar la producción y calidad de los frutos en la agricultura para alimentación humana y animal.

Las hormonas son compuestos que funcionan en bajas concentraciones donde son capaces de señalar y controlar la respuesta, el crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos mediante la circulación a través de una parte o de todo un organismo. La acción de las hormonas implica procesos de transducción de señales. La transducción de señales implica la conversión de señales intracelulares o extracelulares en respuestas celulares. Dichos procesos de señalización se pueden separar en tres tipos según las distancias de transducción:

- Señalización de larga distancia (planta) o endocrina (animal) donde las señales y las células blanco están separadas por una gran distancia.
- Señalización paracrina donde las señales de las células y las células objetivo son células adyacentes.
- Señalización autocrina donde las células que producen la señal y las células objetivo son las mismas [7].

El crecimiento y desarrollo de las plantas está influenciado por las interacciones mutuas entre las hormonas vegetales. Las cinco hormonas vegetales clásicas son auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Las giberelinas (AG) estimulan el alargamiento de las plantas, promueven la floración y liberan la latencia de semillas / tubérculos. Se cree que las giberelinas se producen y funcionan en la misma célula por lo que actúan como unas señales autocrinas [3,7].

Son pocos los reportes donde se han descrito genes relacionados con las rutas de señalización, como las RLKs [8], reguladas por los niveles de hormonas. En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis de expresión del gen mediada por hormonas endógenas y exógenas. Nuestros resultados muestran que la expresión de CRK33 es dependiente de los niveles de las giberelinas, mostrando un nuevo camino para el entendimiento de la función de las giberelinas durante el desarrollo del fruto.

5. Revisores

Revisor 1

Nombre: Mario Martín González Chavira
Institución: INIFAP
Cédula Profesional: 1153385
Área de conocimiento: Biotecnología Vegetal
Correo electrónico: gonzalez.mario@inifap.gob.mx

Revisor 2

Nombre: Brenda Zulema Guerrero Aguilar
Institución: INIFAP
Cédula Profesional: 5663530
Área de conocimiento: Biotecnología
Correo electrónico: guerrero.brenda@inifap.gob.mx

6. Bibliografía y Referencias

- [1] Dorsey, E., Urbez, C., Blazquez, M. A., Carbonell, J. and Perez-Amador, M. A., Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberelin metabolism in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 58, 318-332, 2009.
- [2] Fleet, C.M., and Sun, T.P., A DELLA cate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 877–85, 2005.
- [3] Sun, T. P., The molecular mechanism and evolution of the GA-GID-DELLA signaling module in plants, *Curr. Biol.*, 21, 338-345, 2011.
- [4] Swain, S.M., and Singh, D. P., Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends Plant Sci*, 10, 123–129, 2005.

- [5] Vivian-Smith, A. and Koltunow, A. M., Genetic analysis of growth-regulator-induced parthenocarpy in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 121, 437-451, 1999.
- [6] Zhou, J.M., Yang, W.C., Receptor-like kinases take center stage in plant biology, *Science China Life Sciences*, Vol.59 No.9: 863–866, 2016.
- [7] Wang, Y.H., Irving, H.R., Developing a model of plant hormone interactions, *Plant Signaling & Behavior*, 6, 4, 494-500, 2011.
- [8] Grauwe, L., Vriezen, W.H., Bertrand, S., Phillips, A., Vidal, A. M., Hedden, P., Reciprocal influence of ethylene and gibberellins on response-gene expression in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 226, 2, 485–498, 2007.