

MECANISMOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO DURANTE EL DESARROLLO DEL GAMETOFITO FEMENINO EN *Arabidopsis thaliana*

*MECHANISMS OF GENE SILENCING DURING THE
DEVELOPMENT OF THE FEMALE
GAMETOPHYTE IN *Arabidopsis thaliana**

Guadalupe Merced Barrón Solís

Tecnológico Nacional de México en Celaya
ibqlupita@gmail.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

Aurea Bernardino Nicanor

Tecnológico Nacional de México en Celaya
aurea.Bernardino@itcelaya.edu.mx

Andrea Preciado Fernández

Tecnológico Nacional de México en Tepic
angupreciadofe@ittepic.edu.mx

Miranda Sofía Morales López

Tecnológico Nacional de México en Celaya
14031480@itcelaya.edu.mx

Juan Gabriel Ramírez Pimentel

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

Gerardo Acosta García

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

Resumen

Silenciar un gen significa disminuir la expresión del mismo y a partir de los efectos, afectar su función, actuando a diferentes niveles, por ejemplo, silenciamiento

transcripcional (TGS), silenciamiento post-transcripcional (PTGS) y traduccional. Los cuales, presentan elementos comunes mediados por ARNs pequeños (RNAs), que proporcionan especificidad y se acomplejan con proteínas efectoras del silenciamiento génico. Recientemente se reportó la participación de ARNs pequeños en la determinación de la identidad de la célula madre de la megaspora. En este trabajo se plantea una estrategia para estudiar las rutas de silenciamiento que participan en la regulación de la identidad celular durante el desarrollo del gametofito femenino. Para lo anterior se generaron líneas silenciadoras del gen *GUS* (*GUSRNAi*). Posteriormente se seleccionaron algunas de estas líneas para ser cruzadas con los marcadores del desarrollo del gametofito femenino. Se obtuvieron imágenes que reflejaron la actividad de las líneas marcadoras durante el desarrollo reproductivo. En las plantas de la línea *GUSRNAi; Marcadora* se observó una expresión atenuada o nula del marcador de identidad. Lo anterior demostró la capacidad de las líneas para llevar a cabo silenciamiento génico en células del gametofito femenino.

Palabras clave: Gametogénesis, linaje celular, ARNs.

Abstract

Silencing a gene means decreasing its expression affecting its function, acting at different levels, for example transcriptional silencing (TGS), post-transcriptional silencing (PTGS) and translational silencing. They present common elements mediated by small RNAs (RNAs), which provide specificity and form complexes with gene silencing effector proteins. The participation of small RNAs in the determination of the identity of the megaspore mother cell was recently reported. In this work, a strategy is proposed to study the gene silencing pathways involved in the regulation of cell identity during the development of the female gametophyte. For this, we generated silencing lines of the GUS gene (GUSRNAi). Subsequently, some of these lines were selected to be crossed with the developmental marker of the female gametophyte, ET2209. Images that reflected the activity of the marker lines during reproductive development were obtained. While in plants GUSRNAi;ET2209 we observed an attenuated or null expression of the identity cell marker. The above

demonstrated the ability of these lines to carry out gene silencing in female gametophyte cells.

Keywords: Gametogenesis, cell lineage, RNAs.

1. Introducción

Las flores son los órganos especializados de la reproducción sexual de las plantas fanerógamas y el gineceo o pistilo es el aparato reproductor femenino. Dentro del pistilo está el ovario, donde se encuentran los óvulos. A partir de las estructuras reproductivas masculinas (estambres) y femeninas (carpelos), dentro de estas estructuras, se forman por meiosis los gametos masculinos o granos de polen y así como los femeninos, o el gametofito femenino (saco embrionario) [1,2,3]. El gametofito femenino es una estructura necesaria para la reproducción sexual de la planta, este se desarrolla dentro del óvulo y al fecundarse por el grano de polen da lugar a la formación de las semillas.

Los mecanismos de silenciamiento génico actualmente han despertado el interés científico; estudios anteriores al descubrimiento del ARN interferente (ARNi) demostraron que realmente existe una relación entre el silenciamiento transcripcional y el post transcripcional, ya que el ARNi puede actuar a nivel nuclear alterando los patrones de formación de la cromatina y a nivel citoplasmático mediante la hidrólisis de ARNs mensajeros (mRNAs), o el impedimento de la traducción [5]. Dichas alteraciones pueden repercutir en eventos biológicos durante el desarrollo de la planta.

En este trabajo se presenta una estrategia para el análisis de los mecanismos de silenciamiento durante el desarrollo del gametofito femenino maduro, con la finalidad de conocer si las rutas del silenciamiento intervienen en la regulación del desarrollo del gametofito femenino.

Las líneas silenciadoras generadas podrán ser empleadas en conjunto con efectores del silenciamiento seleccionados que permitan distinguir los mecanismos de silenciamiento que regulan determinada etapa del gametofito femenino y la identidad de las células del gametofito femenino.

2. Métodos

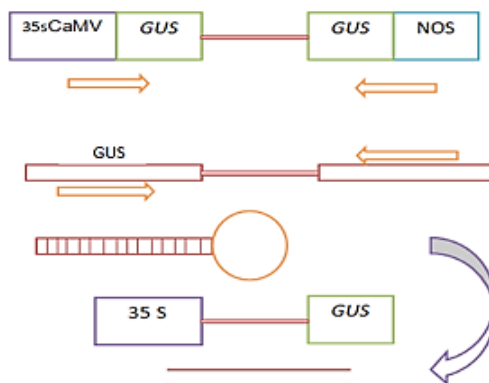
Semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre ecotipo *Columbia* (Col-0), líneas silenciadoras *GUS-RNAi*, *ET2209* del desarrollo del gametofito femenino. Técnicas empleadas: Emasculación, para las cruzas manuales; Clareos del tejido mediante la solución de clareo (Solución de clareo: ácido láctico:glicerol 20%:20% respectivamente) para los análisis de fenotipo; Tinción GUS, análisis de la expresión del gen marcador GUS. Para la confirmación de la presencia del gen *GUS* se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

- NOS-AS1 5'ATTGCCAAATGTTTGAACGA
- NOS-S1 5'TCGTTCAAACATTTGGCAAT.
- GUS-AS1 5'TTGCCAGAGGTGCGGATTCA.
- GUS-S1 5'ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCC.

Mientras que las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 5', y 35 ciclos de 95 °C por 30'', 56 °C por 1' y 72 °C por 2'.

3. Resultados

Se estableció una estrategia (figura 1), en la cual mediante la generación de un repetido invertido para el gen reportero *GUS* dirigido por el promotor constitutivo 35SCaMV, se obtuvo una colección de líneas silenciadoras las cuales se han denominado *GUS-RNAi*. Para lo anterior se clonó la región codificante completa del gen *GUS* en el vector pFGC5941, en los sitios *Nco* I y *Asc* I en sentido y en *Bam*H I y *Xba* I en antisentido. Una vez obtenida esta construcción se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 (figura 1a). Se obtuvieron veinte líneas (*GUS-RNAi*); para analizar cuál de estas líneas era buena silenciadora se cruzaron con líneas sobreexpresantes del gen *GUS* (*35S::GUS*). Como resultado de esta cruce se obtuvieron 10 líneas (*GUS-RNAi*; *35S::GUS*) con distinto grado de silenciamiento (figura 1b). Las líneas *GUS-RNAi*-3, -5, -6 y -7 fueron capaces de abatir completamente la expresión del gen *GUS*. A partir de estos análisis se seleccionó la línea *GUS-RNAi*-6 como buena silenciadora para los siguientes análisis.



a) Construcción del vector con el promotor CaMV35S para dirigir la expresión del repetido invertido.



b) Expresión de las líneas silenciadoras, línea expresante y de la cruz.

Figura 1 Estrategia para el análisis del silenciamiento génico en *A. thaliana*.

Para poder analizar la presencia del gen *GUS*, en plantas producto de las cruzas, se establecieron sus condiciones de amplificación. Para esto, se realizó extracción de ADN de hojas de roseta (basales), por el método de isopropanol. Se realizó un PCR para la amplificación del gen *GUS* (figura 2). Carril 1- marcador de tamaño 1 kb. Carriles 2 al 5- líneas 35S::GUSRNAi;35S::GUS. Gel de agarosa al 1.2%.

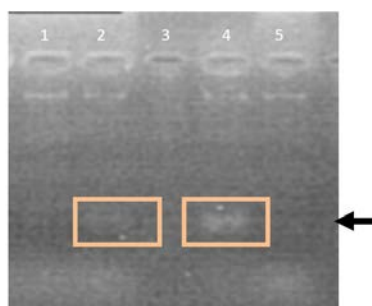


Figura 2 Análisis de PCR para el gen *GUS* en líneas 35S::GUSRNAi; 35S::GUS.

Para constatar que las líneas *GUSRNAi* eran capaces de llevar a cabo silenciamiento génico en células del gametofito femenino, la línea 35:*GUSRNAi* 6 se cruzó con el marcador ET2209, el cual tiñe el gametofito femenino desde la etapa

de cuatro núcleos hasta la etapa de madurez (figura 1a) [1]. Se realizó el análisis histoquímico de tinción *GUS*, en óvulos no fecundados, pudiendo constatar la acción de la línea silenciadora sobre la expresión del gen *GUS*; observando que la expresión desaparece en las líneas producto de la cruce (figura 3). a,b,c corresponden al gametofito femenino, aparato huevo (sinérgidas y célula huevo) y células antípodas, respectivamente.

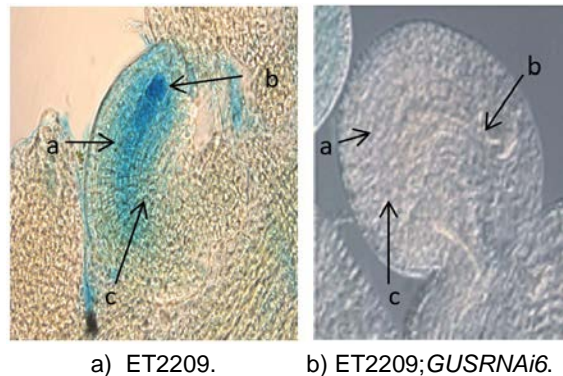


Figura 3 Tinción GUS de óvulos resultado de las cruces.

4. Discusión

Las líneas silenciadoras generadas mostraron diferentes grados de silenciamiento, esto puede deberse al sitio donde ocurrió la inserción en el genoma o al número de inserciones. El empleo de la línea ET2209, la cual expresa *GUS* en las células del gametofito femenino permitió demostrar la capacidad de estas líneas para silenciar genes involucrados en la regulación del desarrollo del gametofito femenino. Esto sugiere que al menos los mecanismos de silenciamiento por RNAi pueden ser abordados con estas líneas. Análisis futuros empleando estas líneas permitirán elucidar los principales efectores de la regulación génica mediante mecanismos que involucran RNAs pequeños. Por ejemplo, mediante cruces con mutantes como *rd6* o *ago9*, que han demostrado tener una función importante en estas etapas [4,5], pero que aún falta de manera fina identificar los puntos precisos de regulación.

Agradecimientos: Al CONACyT por Beca otorgada para los estudios de doctorado de GMBS y al Programa de Doctorado en Ciencia en Ingeniería Bioquímica.

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] Acosta-García, G., Autran, D., Vielle-Calzada J.Ph., Enhancer Detection and Gene Trapping as Tools for Functional Genomics in Plants, 27, 97-414, 2004.
- [2] Almeida, R., Allshire, R., RNA silencing and genome regulation. Trends in cell biology, 15, 251-258, 2005.
- [3] Bowman J.L., Baum, S.F., Eshed, Y., Puterill, J., Alvarez, J., Molecular genetics of gynoecium development in Arabidopsis. Current topics in developmental biology, 45, 155-205, 1999.
- [4] Olmedo, M.V., Durán, F.N., Arteaga, V.M., Demesa, A.E., Autran, D., Grimanelli, D.R., Lotkin, K., Martienssen, R.A., Philippe, J., y Calzada, J.Ph., Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. Nature, 464, 628-632, 2010.
- [5] Taochy, C., Gursansky, N.R., Cao, J., Fletcher, J.S., Dressel, U., Mitter, N., Tucker, M.R., Koltunow, M.G.A., John L. Bowman, J.L., Vaucheret, H., Bernard J. Carroll, B.J., A Genetic Screen for Impaired Systemic RNAi Highlights the Crucial Role of DICER-LIKE 2, Plant Physiology, 175, 1424–1437, 2017.