

El gen *DOFG4* de *Arabidopsis* participa en la regulación de la germinación de la semilla mediada por ABA

L. OÑATE-SÁNCHEZ, C. BARRERO, P. RUEDA,
J. VICENTE-CARBAJOSA, P. CARBONERO

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. de Biotecnología-Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas-Universidad Politécnica de Madrid. ETSI Agrónomos. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid, España.

Introducción

La semilla es un órgano clave en el ciclo de vida de las plantas y su capacidad para permanecer en estado de quiescencia y germinar sólo cuando las condiciones ambientales son favorables ha representado una ventaja evolutiva y permitido el desarrollo de la agricultura. La germinación comienza con una absorción de agua que permite la expansión celular y reiniciar el metabolismo. En sentido estricto, la germinación termina cuando la elongación del eje embrionario permite a la radícula penetrar la cubierta de la semilla. Durante la fase postgerminativa, las sustancias de reserva almacenadas en la semilla son utilizadas para el crecimiento de la plántula hasta que ésta es capaz de fotosintetizar.

Los ácidos giberélico (GA) y abscísico (ABA) son las dos hormonas más importantes en el control de la germinación. Diferentes factores ambientales y genéticos son capaces de afectar al balance ABA/GA y el descenso de los niveles de ABA e incremento de los de GA durante la germinación reflejan su papel negativo y positivo, respectivamente, en este proceso. En cereales, los genes de hidrolasas que movilizan las sustancias de reserva responden al GA mediante un motivo en *cis* tripartito conservado llamado GARC que es reconocido por factores de transcripción (TFs) de las familias MYB (R2R3 y R1) y DOF. Sin embargo, el GARC no parece estar presente en los promotores inducibles por GA en dicotiledóneas (Ogawa et al., 2003) y las diferencias en la respuesta a ABA entre la capa de aleurona de cereales y el endospermo de las dicotiledóneas (Penfield et al., 2006), apunta a la existencia de mecanismos de regulación diferentes. Estamos abordando el estudio de estos mecanismos mediante dos aproximaciones diferentes para identificar y caracterizar elementos en *cis* y factores de transcripción implicados en la germinación de la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana*.

Resultados y Discusión

Identificación y caracterización de TFs tipo DOF implicados en la germinación

La activación de genes de hidrolasas durante la germinación de semillas de monocotiledóneas está controlada principalmente por el factor de transcripción GAMYB, inducible por GA, que reconoce el elemento GARE del complejo GARC presente en los promotores de los genes regulados (Sun y Gubler, 2004). Junto con GAMYB, los TFs tipo DOF, SAD, BPBF, DOF17 y DOF19, son reguladores negativos, excepto SAD que es activador, de esta respuesta mediante su unión a la caja de pirimidinas presente en el complejo GARC (Isabel-LaMoneda et al., 2003; Mena et al., 2002; Moreno-Risueño et al., 2007). En *Arabidopsis*, los TFs tipo DOF, DAG1 y DAG2 son reguladores negativo y positivo, respectivamente, de la germinación (Gualberti et al., 2002). Para tratar de identificar otros TFs tipo DOF involucrados en esta regulación realizamos PCRs cuantitativas en tiempo real (RT-qPCR) sobre muestras de semillas de *Arabidopsis* en germinación con oligonucleótidos específicos de genes de la familia DOF (Figura 1). Los genes *DAG1* (dato no mostrado) y *DAG2* presentaban cinéticas semejantes de expresión con una inducción gradual, alcanzando sus niveles máximos en la etapa postgerminativa (≥ 48 horas). El gen *BME3*, TF dedo de zinc tipo GATA, es un regulador positivo de la germinación cuyos mRNAs comienzan a acumularse un poco antes de la germinación (Liu et al., 2005). De todos los genes DOF analizados el gen *DOFG4* presentaba una inducción temprana y alcanzaba niveles máximos de expresión a las 6 horas de la germinación, lo que sugería que podría desempeñar un papel en fases tempranas de la germinación y diferente a la de otros genes caracterizados.

Mediante experimentos de hibridación *in situ* se demostró que el mRNA de *DOFG4* está presente en el embrión en etapas tempranas de germinación (Figura 2). En tinciones de plantas transgénicas con el promotor de *DOFG4* fusionado a GUS se observó que la actividad del promotor se localiza principalmente en el sistema vascular a partir de la etapa postgerminativa (dato no mostrado).

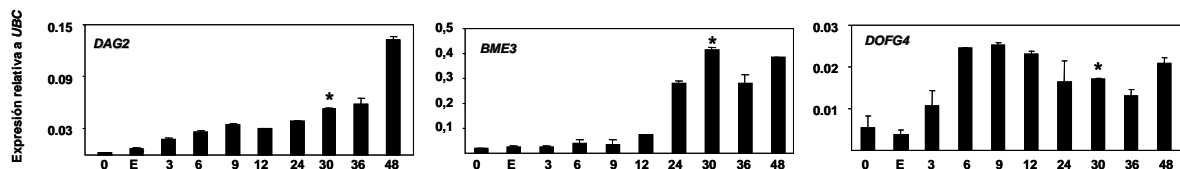


Figura 1. Cuantificación de la expresión de los genes DAG2, BME3 y DOFG4 durante la germinación de semillas de *Arabidopsis* mediante RT-qPCR. En abscisas se representan horas de germinación a 22°C (16h luz-8h oscuridad) tras la estratificación (48 horas a 4°C en oscuridad; E); 0: semilla seca; *: horas en alcanzar un 50% de germinación.

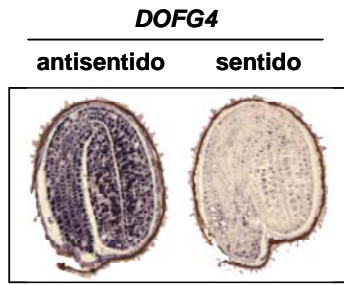


Figura 2. Hibridación *in situ* en semillas en germinación con sondas sentido y antisentido del gen *DOFG4*.

Se confirmó la existencia de un mutante de inserción TDNA (SALK) en el gen *DOFG4* y se verificó la disminución de los niveles de su mRNA en comparación con plantas silvestres (Figura 3A y 3B). Se analizaron estas plantas (*kodofg4*) mediante ensayos de germinación en los que se evaluaron diferentes estímulos y condiciones: estratificación, luz, azúcares, paclobutrazol (PAC), ABA y GA. Las plantas *kodofg4* resultaron ser más sensibles a ABA durante la germinación (Figura 3C). Plantas con expresión constitutiva (promotor 35S) de *DOFG4* (*DOFG4oex*) presentan un tamaño considerablemente inferior a las silvestres (Figura 4A y 4B). Ensayos preliminares de germinación con dos líneas no segregantes de plantas *DOFG4oex* parecen indicar una menor sensibilidad a ABA en comparación con el control silvestre (Figura 4C). En conjunto, estos resultados indican que *DOFG4* podría ser un regulador de las respuestas a ABA durante la germinación. Para confirmar o rechazar esta hipótesis estamos realizando análisis globales de expresión génica con micromatrices durante la germinación de plantas *kodofg4* y *DOFG4oex*.

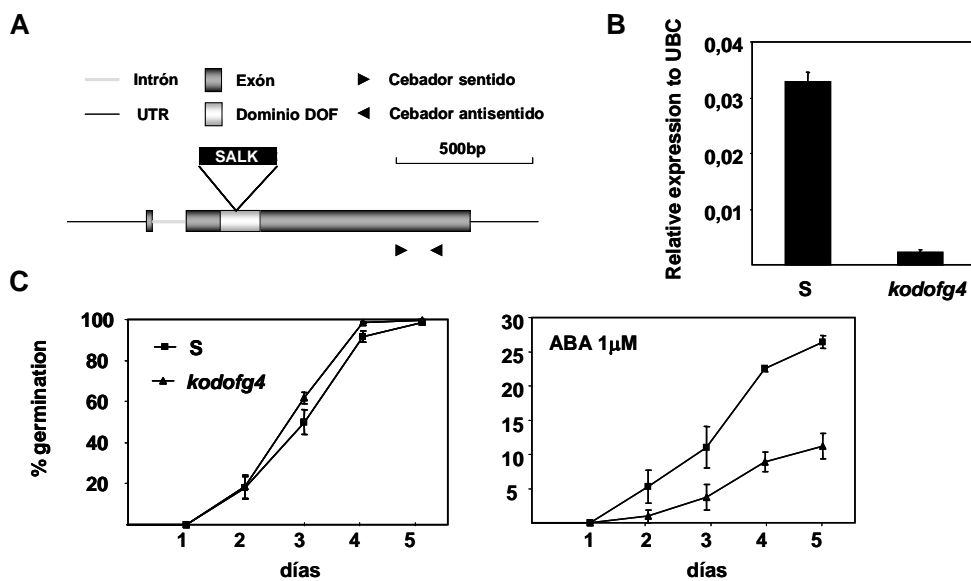


Figura 3. Caracterización de un mutante de inserción en el gen *DOFG4*. **A**, esquema mostrando la estructura génica de *DOFG4* y la posición de la inserción. **B**, cuantificación del RNA de *DOFG4* mediante RT-qPCR en plantas de 15 días silvestres (S) y el mutante de inserción *kodofg4*. Los cebadores empleados están representados como puntas de flecha

en el apartado A. C, Ensayos de germinación en presencia o ausencia de ABA utilizando semillas de plantas silvestres (S) y plantas *kodofg4*. Los porcentajes de germinación representan la media y errores estándar de 3 réplicas biológicas de 100 semillas cada una.

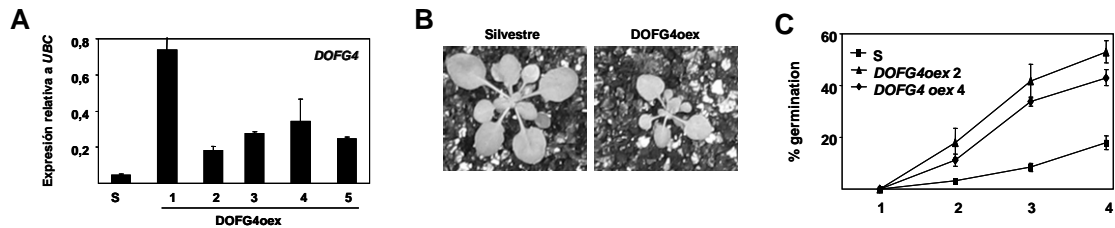


Figura 4. Caracterización de plantas con sobreexpresión del gen *DOFG4*. A, cuantificación de la expresión del gen *DOFG4* en plantas *DOFG4oex* mediante RT-qPCR. B, fenotipo de plantas *DOFG4oex*. C, ensayos de germinación en presencia o ausencia de ABA con semillas de plantas silvestres (S) y plantas *DOFG4oex*.

Identificación de elementos en cis y reguladores involucrados en la germinación de semillas de la dicotiledónea Arabidopsis thaliana.

Hemos realizado un análisis global de la expresión génica durante la germinación de las semillas de *Arabidopsis* mediante hibridación con micromatrices de Affymetrix y hemos incorporado a este análisis perfiles existentes en bases de datos públicas. Como resultado identificamos genes con alta expresión, y en algunos casos, específica durante la germinación de la semilla. Hemos confirmado y caracterizado las cinéticas de expresión de los genes identificados mediante RT-qPCR en muestras de semillas en germinación de *Arabidopsis*. Algunos de los genes analizados muestran elevada expresión y cinéticas diferentes aunque solapantes, y representan clases génicas involucradas en aspectos importantes de la germinación como remodelación celular, síntesis de GA, catabolismo de lípidos y proteínas, etc. Seleccionamos el gen de una lipasa (LIP) para caracterizar su promotor e identificar elementos funcionales en *cis* y sus posibles TFs en *trans* (Figura 5). Mediante análisis *in silico* se identificaron motivos consenso para factores de transcripción previamente descritos así como otros no descritos previamente. Entre estos motivos destacan 2 dianas para TFs tipo DOF y una para TFs tipo bZIP muy próximas. En función estos análisis se prepararon delecciones del promotor y se fusionaron al gen delator de la luciferasa para analizar la contribución de estos elementos a la expresión del gen. Se generaron plantas transgénicas con las construcciones mencionadas y se cuantificó la actividad luciferasa *in vivo* durante la germinación. Los resultados muestran que la delección de regiones que contenían los sitios DOF y bZIP produce cambios notables en la actividad del delator *in vivo* durante la germinación.

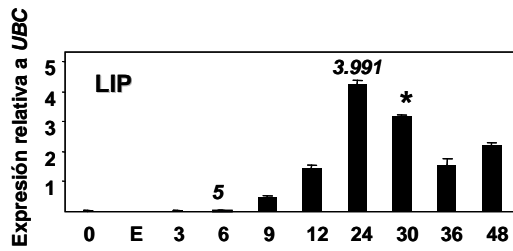


Figura 5. Cuantificación de la expresión del gen LIP durante la germinación de semillas de Arabidopsis mediante RT-qPCR. Los números en *itálica* dentro del histograma representan los niveles de inducción relativos a la muestra E. El resto de la leyenda es como en la figura 1.

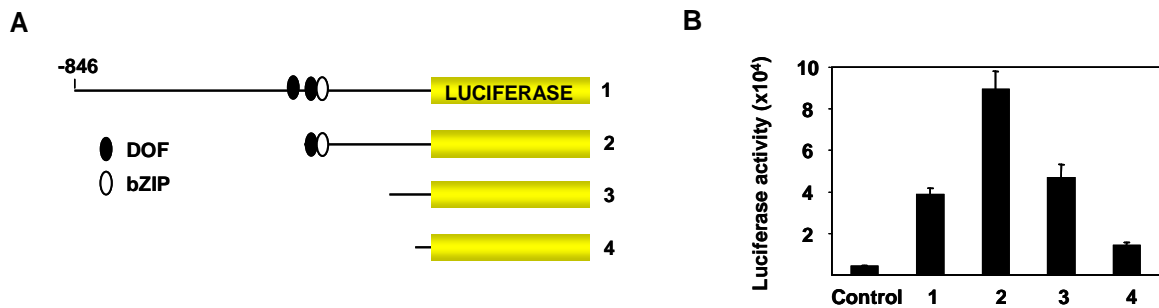


Figura 6. Análisis de la expresión del promotor del gen LIP. **A**, esquema de las construcciones generadas para la transformación estable de plantas de Arabidopsis. **B**, Cuantificación de la expresión de la luciferasa mediante una cámara CCD digital refrigerada durante la germinación de las semillas de las plantas transgénicas generadas (valores medios y errores estándar de al menos 10 líneas para cada construcción).

Las cinéticas de expresión de los mRNAs de *DOFG4* y *LIP* eran compatibles con la hipótesis de que el primero fuera un regulador del segundo. Para comprobarlo realizamos RT-qPCR sobre muestras de mRNAs de plantas *DOFG4oex*. Los resultados muestran que 3 de las 5 líneas analizadas presentan una reducción en la expresión la lipasa en comparación con el control (S, silvestre). En una de las 5 líneas no se pudo detectar el transcrito, quizá debido a su baja abundancia (Figura 7). Estos resultados indican que DOFG4 pudiera actuar como un regulador negativo del gen LIP durante la fase vegetativa del crecimiento. El papel regulador durante la germinación de la semilla está siendo analizado.

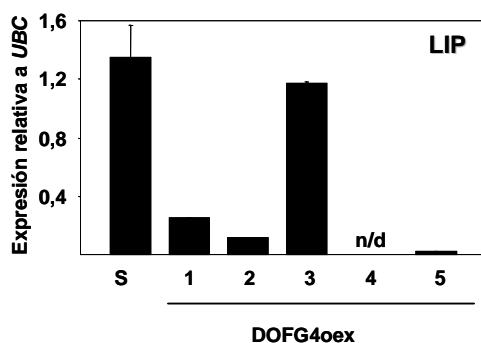


Figura 7. Cuantificación de la expresión del gen LIP en plantas *DOFG4oex* mediante RT-qPCR. S: plantas silvestres; 1 a 5: diferentes líneas de plantas *DOFG4oex*. n/d: no detectado.

Agradecimientos

Inmaculada Gude proporcionó excelente asistencia técnica. Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC BMC2006-07258), Universidad Politécnica de Madrid (UPM-M 0700204101), Fundación Genoma España trilateral TRI21/REGULATORS y Marie Curie International Reintegration Grant (36524) a LO. L.O., C.B. y P.R. están financiados respectivamente por un contrato Ramón y Cajal del MEC, un contrato Juan de la Cierva-UPM y una beca FPI del MEC.

Bibliografía

- Gualberto G, Papi M, Bellucci L, Ricci I, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Victorioso P** (2002) Mutations in the dof zinc finger genes DAG2 and DAG1 influence with opposite effects the germination of Arabidopsis seeds. *Plant Cell*, **14**, 1253–1263.
- Isabel-LaMoneda I, Díaz I, Martínez M, Mena M, Carbonero P** (2003) SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like thiol protease gene in the aleurone of germinating seeds. *Plant J* **33**, 329-340.
- Liu P, Koizuka N, Martin RC, Nonogaki H** (2005) The BME3 (Blue Micropylar End 3) GATA zinc finger transcription factor is a positive regulator of Arabidopsis seed germination. *Plant J* **44**, 960-971.
- Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamoneda I, Carbonero P** (2002) A role for the dof transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. *Plant Physiol* **130**, 111–119.
- Moreno-Risueño MA, Díaz I, Carrillo L, Fuentes R, Carbonero P** (2007) The HvDOF19 transcription factor mediates the abscisic acid-dependent repression of hydrolase genes in germinating aleurone. *Plant J* **51**, 352-365.
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2003) Gibberellin biosynthesis and response during arabidopsis seed germination. *Plant Cell* **15**, 1591–1604.
- Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA** (2006) Arabidopsis ABA insensitive 4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* **18**, 1887–1899.
- Sun T, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants *Annu Rev Plant Biol* **55**, 197–223.