

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**



TRABAJO FIN DE GRADO

**Desarrollo de un sistema de expresión
inducible y específica de tejido en
*Arabidopsis thaliana***

Samuel Daniel Lup

Director: José Manuel Pérez Pérez

Departamento de Biología Aplicada

Área de Genética

Curso 2015-16



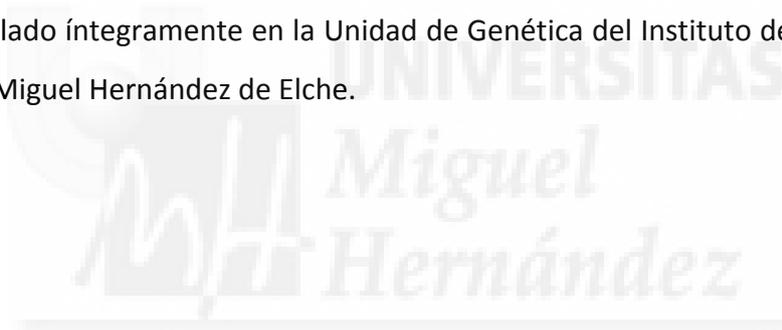
Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández

JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ, Profesor Titular de Universidad en el área de conocimiento de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HAGO CONSTAR

que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y recoge fielmente la labor realizada por el alumno Samuel Daniel Lup. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'JMP', is written over a horizontal line.

José Manuel Pérez Pérez

Elche, 6 de septiembre de 2016

RESUMEN

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado es contribuir a la disección genética del proceso de formación *de novo* de órganos a partir de tejidos diferenciados, utilizando la crucífera *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo. En este trabajo se ha desarrollado y validado una aproximación experimental que permite la expresión de forma inducible de factores de transcripción implicados en la regeneración de tejidos en respuesta a herida y en el desarrollo embrionario temprano a partir de distintos tejidos radiculares. Se ha obtenido una colección de 62 líneas transformantes T2 de *Arabidopsis thaliana* que serán de utilidad para entender las bases genéticas de la totipotencia celular en células vegetales.

PALABRAS CLAVE: regeneración, *Arabidopsis thaliana*, sistema GAL4/UAS, *LEC2*, *WIND1*, *RKD4*.



ABSTRACT

The objective of this work is to contribute to the genetic dissection of *de novo* organ formation from differentiated tissues, using *Arabidopsis thaliana* as a model system. In this work we implemented and fully validated a novel experimental approach allowing the expression of transcription factors involved in tissue regeneration after wounding and early embryo development in different root domains and in an inducible manner. We have obtained a collection of 62 *Arabidopsis thaliana* T2 transformants which will be useful to understand the genetic bases of plant cell totipotency.

KEYWORDS: regeneration, *Arabidopsis thaliana*, GAL4/UAS system, *LEC2*, *WIND1*, *RKD4*.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objeto de estudio	1
1.2. La dediferenciación en las células vegetales.....	1
1.2.1. Desdiferenciación y herida.....	1
1.2.2. Desdiferenciación y embriogénesis somática	2
1.3. Reguladores genéticos del proceso de dediferenciación.....	3
1.3.1. Familia LEC2 (AFL)	4
1.3.2. Familia WIND.....	4
1.3.3. Familia RKD	5
1.4. Sistema de expresión inducible específica de tejido	6
1.5. Vector pPLV34	7
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	9
3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	10
3.1. Material vegetal.....	10
3.2. Cultivos en cajas de Petri	10
3.3. Aislamiento de ADN genómico	12
3.4. Genotipado de la generación T1.....	12
3.5. Clonación	13
3.6. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	14
3.7. Secuenciación y análisis de las secuencias	14
3.8. Observación microscópica y escaneo de placas	15
3.9. Pruebas estadísticas	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Análisis <i>In-Silico</i> de los genes candidato.....	16
4.1.1. Familia RKD	16
4.1.2 Familia LEC2	17
4.1.3. Familia WIND.....	19
4.2. Clonación de genes de la familia LEC2.....	19
4.3. Selección de los transformantes en la T1	22
4.4. Análisis de la segregación en la generación T2.....	24
4.5. Análisis fenotípico de la inducción en la generación T2	27
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	29
5.1. Conclusiones	29
5.2. Proyección futura	30
6. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Promotores seleccionados para el sistema de inducción específica de tejido.....	8
Tabla 2	Secuencia de los cebadores M13_Fw y M13_Rv.....	13
Tabla 3	Parejas de cebadores utilizados para la clonación de los genes candidato de la familia LEC2.....	20
Tabla 4	Purificación y preparación de los insertos.....	21
Tabla 5	Purificación y preparación del vector pPLV34.....	21
Tabla 6	Caracterización de las colonias de <i>E. coli</i> obtenidas tras la transformación.....	21
Tabla 7	Listado de transformantes de Arabidopsis que se han analizado en este trabajo...	24
Tabla 8	Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en la generación T2.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Alineamiento del dominio RWP-RK de los genes <i>RKD1</i> a <i>RKD5</i>	7
Figura 2	Sistema GVG/UAS utilizado en este trabajo.....	8
Figura 3	Vector pPLV34.....	9
Figura 4	Alineamiento de los genes de la familia RKD de Arabidopsis.....	16
Figura 5	Datos de expresión de la familia LEC2.....	18
Figura 6	Alineamiento de los genes de la familia WIND de Arabidopsis.....	19
Figura 7	Imágenes del proceso de clonación.....	22
Figura 8	Selección T1.....	23
Figura 9	Raíces de T2 creciendo en medio con DEX.....	27
Figura 10	Gráfico de cajas y bigotes de la longitud de la raíz principal.....	28



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETO DE ESTUDIO

El grupo del Prof. José Manuel Pérez-Pérez pretende contribuir a la comprensión del control genético de la regeneración de órganos vegetales mediante el estudio de la función de distintos factores de transcripción implicados en procesos como la desdiferenciación y la totipotencia celular. El objeto de estudio en este trabajo es la crucífera *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), el sistema modelo por excelencia del desarrollo vegetal (Page y Grossniklaus, 2002).

Comprender los mecanismos moleculares que controlan la regeneración de órganos a partir de tejidos adultos y su regulación es de interés fundamental en agricultura ya que esta información podría contribuir a optimizar los procesos de propagación vegetativa de variedades élite, así como incrementar la tasa de éxito de estos procesos en especies recalcitrantes.

1.2. LA DESDIFERENCIACIÓN EN LAS CÉLULAS VEGETALES

La desdiferenciación celular consiste en la reversión del destino celular desde un estado determinado de diferenciación a otro estado menos diferenciado, análogo al de una célula madre (*stem cell*). Aunque se da también en animales, es un proceso mucho más frecuente en plantas (Sugiyama, 2015). El estudio de este fenómeno en células vegetales se inició a principios del siglo XX (Sugiyama, 2015), desde entonces la desdiferenciación de las células vegetales ha atraído mucho interés como proceso clave para entender el la plasticidad y el desarrollo de las plantas.

1.2.1. DESDIFERENCIACIÓN Y HERIDA

Cuando una planta sufre un daño físico, y bajo las condiciones adecuadas, las células adyacentes al lugar de la herida proliferan para formar una masa desorganizada de células en división conocida como callo; la formación de este callo puede conducir a la formación de un tejido cicatrizal, a la regeneración del tejido dañado (*tissue reunion*) o bien a un proceso de organogénesis. Por otro lado, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales diferenciados, como hojas o raíces, en concentraciones altas de auxinas y citoquininas promueve la formación de callos. Se considera que tanto la formación de los callos inducidos hormonalmente como la de los callos inducidos por herida requieren un paso inicial de desdiferenciación celular.

Además, este proceso no es poco frecuente en el curso normal del desarrollo de una planta (Sugiyama, 2015), sin necesidad de una situación de estrés (hormonal o por herida).

La regeneración de estructuras complejas en organismos multicelulares tras herida requiere de la actuación de un programa genético que integra los procesos de muerte celular programada, desdiferenciación celular, proliferación celular y diferenciación celular. La regeneración de órganos en algunos metazoos, como en salamandras o en tritones, depende de la producción de una masa indiferenciada de células proliferantes, el blastema, que posteriormente se diferencia de nuevo hacia los distintos tejidos que forman la extremidad. El blastema se produce a partir de células pluripotentes preexistentes o bien mediante la desdiferenciación de células diferenciadas (Kragl, et al., 2009). A diferencia de los animales, las células vegetales se consideran totipotentes, ya que se puede generar un callo a partir de células diferenciadas cultivadas *in vitro*, y a partir de este una planta entera utilizando diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas (Skoog y Miller, 1957). Sin embargo, resultados recientes sugieren que al igual que en muchos ejemplos en animales, la regeneración de algunos tejidos vegetales implica a poblaciones especiales preexistentes de células pluripotentes con un potencial de diferenciación restringido (Sugimoto et al., 2011).

Actualmente se acepta que un callo se podría formar tanto a partir de una población preexistente de células madre (Sugimoto et al., 2010, 2011) como de células que sufren un proceso de desdiferenciación, y no se descarta que las células madre puedan tener un papel en la inducción de la desdiferenciación en las células cercanas. Otros estudios consideran que la regeneración y/o desdiferenciación no requiere de un nicho funcional de células madre en plantas (Sena et al., 2009), así que hasta el momento la relación entre células madre y desdiferenciación permanece incierta.

1.2.2. DESDIFERENCIACIÓN Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática es la formación de una planta adulta a partir de una sola célula somática, demostrando así su totipotencia. Este fenómeno se ha observado en muchas especies vegetales y se han descrito una gran variedad de protocolos de inducción de embriones somáticos (Thorpe y Stasolla, 2001; Williams y Maheswaran, 1986). La fase inicial de la embriogénesis somática también es un proceso de desdiferenciación celular.

1.3. REGULADORES GENÉTICOS DEL PROCESO DE DESDIFERENCIACIÓN

Múltiples descubrimientos apoyan la hipótesis de que existen genes relacionados con células madre que están también implicados en la desdiferenciación (Jopling et al., 2011; Yadav et al., 2010). Un ejemplo son las familias génicas WUSCHEL (WUS) y NO APICAL MERISTEM (NAM), cuyo papel en el mantenimiento de la identidad de las células madre está ampliamente estudiado. Genes de ambas familias se expresan a niveles elevados durante la desdiferenciación en peciolos foliares (Liu et al., 2010). En otros estudios se ha constatado que el gen *WUS* se sobreexpresa en líneas celulares en proliferación (Iwase et al., 2011a), además de que su sobreexpresión mediante el uso de las herramientas de la ingeniería genética resulta en la formación de callos y embriones somáticos ectópicos (Zuo et al., 2002).

La sobreexpresión de otros genes que codifican factores de transcripción relacionados con la totipotencia celular, incluyendo *RKD1* y *RKD2* (Koszegi et al., 2011), *RKD4* (Waki et al., 2011), *LEC1* y *LEC2* (Guo et al., 2013), *AGL15* (Thakare et al., 2008) y *BBM* (Srinivasan et al., 2007) es suficiente para inducir la formación de callos en ausencia de hormona exógena (Ikeuchi et al., 2013). Genes de la familia LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) implicados en el mantenimiento del meristemo apical del tallo también parecen estar implicados en el proceso de desdiferenciación (Liu et al., 2010), entre ellos, *ADVENTITIOUS ROOTLESS1 (ARL1)* de arroz está involucrado en la desdiferenciación mediada por hormonas de las células del periciclo a partir de las que se desarrollan las raíces adventicias en esta especie (Liu et al., 2005).

El factor de transcripción AP2/ERF, WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION1 (*WIND1*) y sus homólogos *WIND2*, 3 y 4 promueven la desdiferenciación celular en *Arabidopsis* (Iwase et al., 2011b), sin embargo, la relación entre los genes *WIND* y los nichos de células madre no está confirmada. Los genes *WIND* operan a través de las vías de señalización por citoquininas. Mientras que las auxinas pueden inducir la formación de callos por sí solas (Li et al., 2011a), las citoquininas no son capaces, lo cual apunta a la existencia de múltiples vías de señalización regulando la desdiferenciación celular.

En este Trabajo Fin de Grado centramos la atención en tres de las familias génicas mencionadas, la familia *LEC2 (AFL)*, *WIND* y *RKD*.

1.3.1. FAMILIA LEC2 (AFL)

En *Arabidopsis*, los genes *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3)*, *FUSCA3 (FUS3)* y *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* forman parte de una familia de factores de transcripción que contienen el dominio B3 (Stone et al., 2001; Luerssen et al., 1998; Giraudat et al., 1992) conocida como familia AFL. Estos tres genes, junto a dos genes más tipo *LEC1 (LEC1 y LEC1-LIKE)* forman una red de factores de transcripción que controla la maduración de las semillas, conocida como red LAFL (Jia et al., 2013). La expresión post-embrionaria ectópica de *LEC2* revierte el estado de diferenciación de las células y confiere características embrionarias a las plantas; esto puede resultar en la formación de estructuras similares a embriones en la superficie de las hojas (Harada et al., 2001; 1998). De manera similar, la expresión de *FUS3* es suficiente para activar una cascada de genes generalmente expresados durante la maduración embrionaria (Baumlein et al., 2000). La sobreexpresión en la epidermis de *FUS3* induce la formación de hojas con caracteres del cotiledón (Gazzarrini et al., 2004). Durante la sobreexpresión de *ABI3* la activación de la cascada de genes embrionarios es menos pronunciada, pero suficiente para inducir la producción de la proteína de reserva SSP (*seed storage protein*) en las hojas.

En vista de la capacidad de los genes de esta familia para transformar células diferenciadas a células con caracteres embrionarios hemos decidido estudiar esta familia en este Trabajo de Fin de Grado. Nos centraremos en un clado de 63 genes filogenéticamente cercanos a *LEC2*, al que llamaremos familia LEC2.

1.3.2. FAMILIA WIND

Se conocen 4 genes de la familia WIND (WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION), nombrados de *WIND1* a *WIND4*. La sobreexpresión dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor de cualquiera de los 4 genes causa la formación de callos de manera ectópica. En estos experimentos, los niveles de expresión de *WIND1* se han correlacionado con el grado de inducción de los callos, observándose desde leves anomalías morfológicas foliares en plántulas en las líneas de menor expresión hasta la formación de callos pocos días tras la germinación en las líneas con mayor expresión del transgén (Iwase et al., 2011a). La sobreexpresión de *WIND1* en tejidos maduros, como la raíz, también da lugar a la formación de callos ectópicos (Iwase et al., 2011a). Las líneas que presentan una inserción de ADN-T interrumpiendo los genes que se han identificado son mutantes nulos (no pueden

sobrevivir), excepto para *WIND4* (Iwase et al., 2011a). Se ha visto que la expresión de *WIND1* se induce rápidamente tras una herida y que ésta inicia el proceso de dediferenciación celular y la formación de callos en respuesta a herida (Iwase et al., 2011a). La sobreexpresión de este gen bajo el promotor 35S es suficiente para inducir la proliferación celular desorganizada manteniendo las células en un estado dediferenciado en ausencia de herida.

Como ya hemos comentado, *WIND1* actúa a través de la vía de señalización celular mediada por citoquinas induciendo la dediferenciación y la formación de callos; la implicación de esta ruta de señalización resulta inesperada dado que la formación de callos en *Arabidopsis* se promueve con medios ricos en auxinas (Van Lijsebettens, 1988). Curiosamente, se ha visto cierto solapamiento entre los genes sobreexpresados en los callos inducidos por *WIND1* y los callos inducidos con auxinas exógenas, lo cual sugiere la existencia de características y rutas de señalización compartidas entre ambos tipos de callo.

1.3.3. FAMILIA RKD

El genoma de *Arabidopsis* contiene 14 genes RWP-RK (Schäuser et al., 2005) que se subdividen en proteínas tipo NIN (*NIN-like proteins*) y proteínas RKD. La familia RKD constituye un conjunto de 5 genes que codifican factores de transcripción que contienen un dominio proteico RWP-RK altamente conservado (Figura 1). Además de ese dominio no se observan otras regiones conservadas en los genes RKD. Los factores de transcripción RKD están involucrados en la regulación del desarrollo de los gametos femeninos y su expresión ectópica induce un perfil de transcripción génica característico de este tipo celular (Koszegi et al., 2011). Los estudios realizados con *RKD4* sugieren su importancia para el desarrollo embrionario de *Arabidopsis* (Waki et al., 2011), además los genes *RKD1* y *RKD2* se expresan a niveles elevados en los gametos femeninos (Koszegi et al., 2011). Se ha conseguido inducir el desarrollo de tejidos con características embrionarias gracias a la sobreexpresión de *RKD4* en raíces (Waki et al., 2011). Además, sospechamos que los genes *RKD* actúan aguas arriba de los genes *LEC2* debido al fenotipo más fuerte que produce su sobreexpresión en comparación con la sobreexpresión de *LEC2*. Por ese motivo hemos desarrollado un protocolo experimental para el estudio de los genes de esta familia. Los genes *RKD* también se han visto implicados en procesos de respuesta al nitrógeno (Chardin et al., 2014).

```

RKD1  SKTLSKETISLYFYMPITQAARELNIGLTLKRRCRELGIRWPHRKLMSLQKLIISNVKELE
RKD2  PTTLSKETVSRIFYMPITQAAIALNVGLTLKRRCRELGIRWPHRKLMSLNTLISNVKELQ
RKD3  INNMSREMMKQYFYMPITKAAKELNIGVTLKRRCRELGIPRPHRKLTSLNALIANLKDLL
RKD4  QDKLEMSEIKQFFDRPIMKAAKELNVGLTVLKKRCRELGIRWPHRKLKSLNSLIKNLKNVG
RKD5  VAELSLEELSKYEDLTIVEASRNKLVGLTVLKKRCREFGIPRPHRKLKSLDCLIHDLQREA

```

Figura 1. Alineamiento del dominio RWP-RK de los genes *RKD1* a *RKD5*. Los aminoácidos idénticos están resaltados en negrita con un fondo verde, los aminoácidos similares están resaltados en azul. Tomado de Koszegi et al. (2011), con modificaciones.

1.4. SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE ESPECÍFICA DE TEJIDO

Con el objetivo de llevar a cabo el estudio presentado en esta memoria se ha ideado en el laboratorio de José Manuel Pérez Pérez un sistema de expresión génica inducible y específico de tejido, basado en el sistema GVG de expresión inducible presentado por Aoyama et al. (1997). Este sistema se basa en el mecanismo de regulación mediante receptores de hormonas esteroideas presente en vertebrados. Se utiliza un factor de transcripción quimérico llamado GVG, que está formado a partir del dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4 de levadura, el dominio de transactivación de la proteína VP16 del virus del herpes simple y el receptor de glucocorticoides de la rata (GR). Para la inducción del sistema de expresión se usa dexametasona (DEX), un glucocorticoide sintético potente. Cuando la dexametasona se une al dominio GR de la proteína quimérica en las membranas celulares de las células que la expresan, ésta es liberada de su unión al citoesqueleto y se desplaza al núcleo. Una vez en el núcleo, el dominio GAL4 se une específicamente a las secuencias reguladoras *UAS*, localizadas en la región promotora del gen que se desea expresar, y el dominio de transactivación VP16 activa la transcripción del gen situado aguas abajo de la región *UAS*. Los experimentos de puesta a punto del sistema llevados a cabo por Aoyama et al. (1997) regulaban la transcripción del gen de la luciferasa (*LUC*), una proteína luminiscente, con 6 secuencias *UAS* en el promotor y con la quimera GVG bajo el control de un promotor 35S (Figura 2A).

El sistema que hemos utilizado en este trabajo utiliza el mismo factor de transcripción quimérico pero regulado por promotores de tejidos específicos. De esta manera, la quimera GVG se expresa solo en las células designadas por el promotor específico y la inducción con

DEX solo se llevará a cabo en esos tejidos. Utilizando este sistema, podemos poner cualquier gen de interés (GDI) bajo el control de un promotor de interés (PDI) (Figura 2B).

Hemos seleccionado 4 promotores en base a su patrón de expresión en tejidos específicos de la raíz de *Arabidopsis*, con niveles de diferenciación variando desde células completamente diferenciadas (epidermis) hasta células madre indiferenciadas (centro quiescente) (Tabla 1).

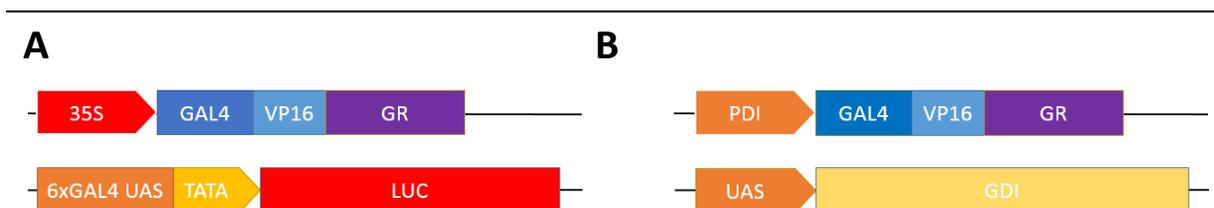


Figura 2. Sistema GVG/UAS utilizado en este trabajo. (A) Constitución genética del sistema GVG original. (B) Constitución genética del sistema GVG utilizado en este trabajo. Tomado, con modificaciones de Aoyama et al. (1997).

Tabla 1. Promotores seleccionados para el sistema de inducción específica de tejido

Promotor	Patrón de expresión en raíces	Referencias
<i>WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5 (WOX5)</i>	Centro quiescente	Kong et al. (2015)
<i>SCARECROW (SCR)</i>	Endodermis y centro quiescente	Della Rovere et al. (2015)
<i>PIN-FORMED2 (PIN2)</i>	Epidermis y células del córtex	Jásik et al. (2013)
<i>CYCLIND4;1 (CYCD4;1)</i>	Células iniciales del córtex y la endodermis	Nieuwland et al. (2009)

1.5. VECTOR PPLV34

Como hemos visto en el apartado anterior, la utilización del sistema de expresión inducible presentado requiere del uso de plantas genéticamente modificadas que incorporen dos construcciones: (1) la que contiene el promotor de interés (PDI) controlando la transcripción de la quimera GVG y (2) a que contiene el gen de interés (GDI) bajo la regulación de las secuencias reguladoras *UAS* (Figura 2B). Para este trabajo contamos con una colección de líneas transformantes de *Arabidopsis* que tienen la quimera GVG bajo la regulación de una variedad de promotores (Tabla 1). Usaremos estas líneas como punto de partida y llevaremos a cabo su transformación genética con el segundo inserto necesario (*ProUAS:GDI*). Para llevar a cabo esta transformación necesitamos un vector apropiado; hemos decidido trabajar con el vector pPLV34 (Figura 3). Este vector forma parte de una colección de vectores para la clonación independiente de ligación o LIC (*ligation independent cloning*) presentado por De Rybel et al. (2011) y tiene una longitud de 5606 pares de bases; presenta

una secuencia *UAS* aguas arriba de la secuencia *LIC*, que es donde se introduce el inserto. En la Figura 3 se indica que este vector contiene un gen que codifica la resistencia al antibiótico kanamicina, que permite la selección de los transformantes en *Escherichia coli* que incorporan este vector, un gen que confiere resistencia a higromicina para la selección de transformantes en *Arabidopsis thaliana* y los extremos LB (*left border*) y RB (*right border*) del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* que dirige la integración del inserto en el genoma de la planta.

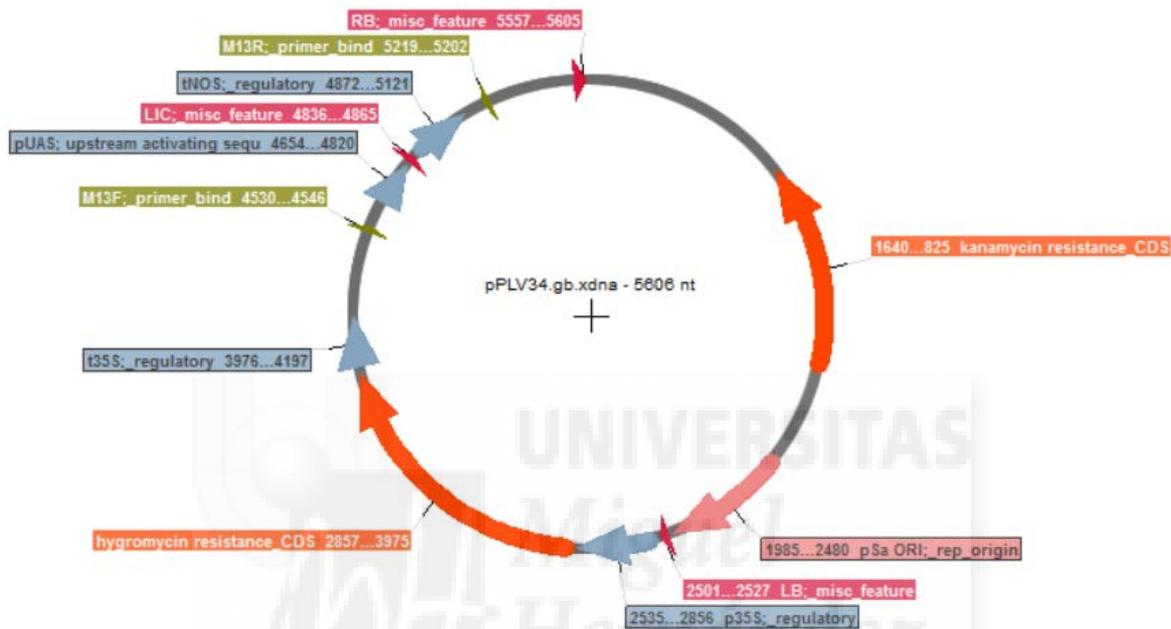


Figura 3. Vector pPLV34. Algunas de cuyas características se describen en el texto.



ANTEDECENTES Y OBJETIVOS

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

A pesar de la importancia de la desdiferenciación en todos los procesos de regeneración en plantas, así como en el desarrollo normal o en la reproducción asexual de algunas especies, la red regulatoria de genes implicados en estos procesos aún no se conoce en detalle. Este Trabajo Fin de Grado pretende desarrollar las herramientas necesarias para estudiar la implicación de algunos de los factores de transcripción a la desdiferenciación de células vegetales, así como para validar la funcionalidad del sistema de expresión inducible específica de tejido utilizado.

Los objetivos que se persiguen en este Trabajo Fin de Grado son los siguientes:

- Selección de genes candidato implicados en procesos de desdiferenciación celular.
- Obtener y caracterizar construcciones para varios genes de la familia LEC2 en los vectores adecuados que permitan la expresión específica de tejido e inducible.
- Seleccionar y caracterizar transformantes en la generación T1 que contengan las construcciones de los genes *WIND1*, *WIND3*, *RKD2*, y *RKD4* en el sistema de expresión específica de tejido e inducible.
- Obtener la generación T2 de los transformantes seleccionados y llevar a cabo un análisis de segregación de los transgenes, así como evaluar el efecto de la inducción de los transgenes sobre su fenotipo.
- Evaluar la funcionalidad del sistema de expresión inducible específico de tejido que se ha utilizado en este trabajo.



PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.1. MATERIAL VEGETAL

Para el comienzo de los experimentos que se describen en esta memoria se partió de una colección de transformantes de *Arabidopsis thaliana* que expresan la proteína GVG bajo la regulación de distintos promotores, facilitada por el Dr. Jian Xu de la Universidad Nacional de Singapur. Hemos utilizado para este trabajo las líneas *ProWOX5:GVG*, *ProSCR:GVG*, *ProPIN2:GVG*, y *ProCYCD4;1:GVG*, seleccionadas en base a los patrones de expresión específicos de cada gen (Tabla 1). En nuestro estudio se ha incluido también la estirpe silvestre Col-0, para utilizarla como referencia.

El laboratorio disponía de semillas T1 resultantes de la transformación por infiltración floral con *Agrobacterium tumefaciens* de las líneas de *Arabidopsis* anteriormente mencionadas. Las construcciones utilizadas para la transformación incluían la región codificante de los genes *WIND1*, *WIND3*, *RKD2* y *RKD4*, que se había clonado previamente en el vector pPLV34 (De Rybel et al., 2011). En este trabajo se obtendrán las construcciones necesarias para desarrollar líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresen algunos genes pertenecientes a la familia LEC2 (*AT3G18960*, *AT4G01580*, *AT2G35310* y *AT5G58280*). Las semillas se conservaron a 4°C durante, al menos, una semana, para romper la dormancia y favorecer su germinación.

3.2. CULTIVOS EN CAJAS DE PETRI

Las semillas fueron esterilizadas mediante su inmersión con agitación durante 10 min en una disolución acuosa del 40% de lejía comercial (NaClO al 4% m/v) y 3 µL/mL de una disolución del 1% v/v de Tritón X-100. A continuación, se retiró la disolución anterior y se realizaron tres lavados sucesivos con agua estéril.

Para la selección de los transformantes de la generación T1, los cultivos se iniciaron en cajas de Petri de 120 × 120 × 10 mm, que contenían 65 mL de medio de germinación sin azúcar (GM0) y con 25 mg/L de higromicina y 50 mg/L de cefotaxima. Para la preparación de 1 L de este medio de cultivo se añaden a 900 mL de agua: 2,15 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa), 0,5 g de MES monohidrato (ácido 2-[N-morpholino]etano sulfónico) y 2 mL de una mezcla de vitaminas Gamborg B5 (Duchefa). A continuación, se ajusta el pH a 5,7 con KOH 1 M, se añaden 6,5 g de agente gelificante *Plant agar* (Duchefa) y se ajusta el volumen a

1 L. El medio se esteriliza mediante autoclave (121°C durante 20 min) y se atempera a unos 50°C antes de añadir 500 µL de higromicina 50 mg/mL y 1 mL de cefotaxima 50 mg/mL. Finalmente, el medio se dispensa en las cajas de Petri en condiciones asépticas utilizando una cabina de flujo laminar horizontal (Telstar AH100).

Para la siembra en masa de las semillas de la T1 en cajas de Petri se utilizó una solución de agarosa al 0,2% m/v (0,2 g agarosa en 100 mL de agua) como agar de cobertera. Las semillas se sumergieron en esta solución y a continuación fueron dispersadas con una pipeta en tres líneas paralelas en la placa. En cada placa se sembraron semillas de una única línea transformante. Las cajas fueron precintadas con papel autosellante *Parafilm*. Para evitar la contaminación de las cajas de Petri, las siembras se realizaron con material estéril en una cabina de flujo laminar horizontal. Una vez inoculadas las semillas en las cajas de Petri, se estratificaron a 4°C en oscuridad durante 24 h para sincronizar su germinación. Las cajas se incubaron en vertical a 22±1°C en una cámara de cultivo Panasonic MLR-352 y permanecieron 12 días en luz continua (50 µmol m⁻² s⁻¹). Las plántulas resistentes al antibiótico de la generación T1 se trasplantaron a cajas de Petri con medio GM0 con antibióticos y se trasplantaron a macetas individuales que contenían una mezcla equivolumétrica de perlita y turba. Finalmente, se confirmó la presencia de la inserción en las plantas mediante la extracción de su ADN genómico y la amplificación por PCR de la secuencia *UAS* del vector pPLV34 utilizando los cebadores M13_Fw y M13_Rv (Tabla 2).

Para comprobar la presencia en la T1 de la resistencia a fosfotricina propia de las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas para la transformación (*ProWOX5:GVG*, *ProSCR:GVG*, *ProPIN2:GVG*, y *ProCYCD4;1:GVG*) hemos sembrado una muestra reducida de las semillas (una placa sembrada en masa por línea utilizada para la transformación) en cajas de Petri de 120 × 120 × 10 mm, que contenían 65 mL de medio de germinación sin azúcar (GM0) y con 25 mg/L de fosfotricina y 50 mg/L de cefotaxima.

Para el análisis de la segregación de la resistencia al antibiótico (higromicina) en la generación T2, se utilizaron cajas de Petri cuadradas con 65 mL de medio sólido GM al 1% de sacarosa (10 g de sacarosa en 1 L de medio) y 300 µL/L de higromicina. Las plantas crecieron durante 14 días en horizontal en las condiciones indicadas anteriormente, y a continuación se realizó el recuento de plántulas resistentes y sensibles de cada línea.

Para estudiar el fenotipo causado por la inducción por dexametasona de las líneas seleccionadas de la generación T2, las plántulas crecieron en cajas de Petri en vertical con medio GM durante 5 días y se transfirieron a continuación a cajas de Petri con medio GM con 10 μ M de dexametasona para la inducción de los transgenes. El fenotipo de las plántulas se analizó 7 días después de la inducción.

3.3. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO

El aislamiento de ADN genómico utilizado en este trabajo se hizo mediante el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983), con las modificaciones indicadas a continuación. Se introducen una o dos hojas de una planta en un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL y se añaden 200 μ L de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, Na₂EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M). Se macera el material vegetal con un palillo de polipropileno y se añaden 300 μ L del tampón de extracción y 35 μ L de SDS al 20%. A continuación, se incuba la muestra en un baño termostático a 65°C durante 10 min, se añaden 130 μ L de KOAc 5M y se incuba en hielo durante 5 min. La muestra se centrifuga durante 15 min a 13.300 rpm (16.300 g) en una microfuga. El sobrenadante se transfiere a un tubo *Eppendorf* vacío y se deja 15 min a -20°C con 640 μ L de isopropanol y 60 μ L de NaOAc 3 M antes de centrifugar otra vez durante 15 min a 13.300 rpm. Se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado con 300 μ L de etanol al 70%, se centrifuga una vez más durante 5 min tras lo cual se deja secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender el precipitado en 50 μ L de agua y almacenarlo a 4°C.

3.4. GENOTIPADO DE LA GENERACIÓN T1

Para la determinación del genotipo de la generación T1 hemos llevado a cabo reacciones de PCR utilizando la polimerasa *GoTaq* (Promega). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 μ L con los siguientes reactivos: 1,56 μ L agua destilada estéril, 2 μ L del tampón 5 \times , 1,6 μ L de MgCl 25 mM, 0,8 μ L de una mezcla de dNTPs a 2mM, 1,6 μ L del cebador *forward* a 10 μ M, y 1,6 μ L del cebador *reverse* a 10 μ M, 0,04 μ L de la polimerasa *GoTaq*, y 0,8 μ L del ADN genómico molde. El programa de PCR utilizado fue: 94°C 3 min, [94°C 30 s, 58°C 20 s, 72°C 60 s] \times 40 ciclos, 72°C 5 min, y se mantuvo finalmente a 12°C por tiempo indefinido. Los cebadores utilizados en la amplificación son M13_Fw y M13_Rv, que hibridan en las regiones comunes de los insertos, provenientes del vector pPLV34 (Figura 3).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores M13_Fw y M13_Rv

M13_Fw :	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13_Rv :	CAGGAAACAGCTATGACC

3.5. CLONACIÓN

La clonación de los genes de interés se inició con una PCR utilizando la polimerasa *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (NEB) en las condiciones especificadas por el fabricante. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 μ L con los siguientes reactivos: 9,6 μ L de agua estéril, 4 μ L del tampón 5 \times HF, 3,2 μ L de una mezcla de dNTPs a 2mM, 2 μ L del cebador *forward* a 10 μ M, y 2 μ L del cebador *reverse* a 10 Mm, 0,2 μ L de la polimerasa, y 1 μ L del ADN genómico molde. El programa de PCR utilizado fue: 98°C 30 s, [98°C 10 s, 65°C 30 s, 72°C 80 s] \times 35 ciclos, 72°C 5 min, y se mantuvo finalmente a 12°C por tiempo indefinido. Los cebadores para la amplificación que se utilizaron en este trabajo (Tabla 3) fueron diseñados con adaptadores en los extremos 5' para la posterior integración de los fragmentos de ADN amplificados en el vector pPLV34 tal y como está descrito por De Rybel et al. (2011). Las muestras fueron reamplificadas utilizando el mismo protocolo para incrementar la concentración de producto de partida. Los tamaños de los productos de PCR se visualizaron cargando alícuotas de 1 μ L del producto de PCR en un gel de agarosa preparado al 0,8% (m/v) teñido con 1,5 μ L de *Safeview*/100 mL gel, comparando las bandas con el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermofisher) tras cada amplificación. Los fragmentos de PCR se purificaron de un gel de agarosa 0,8% utilizando el kit *GenElute Gel Extraction Kit* (Sigma) en las condiciones especificadas por el fabricante. La concentración final de los productos de PCR se determinó utilizando el Nanodrop (Thermo-Fisher).

El vector pPLV34 se purificó por cuadruplicado a partir de un cultivo *overnight* de *Escherichia coli* DH5 α transformante disponible en el laboratorio en 3 mL de medio LB líquido con una concentración 25 mg/L kanamicina utilizando el kit *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Para preparar 1 L de medio LB se añaden a 800 mL de agua destilada: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto

de levadura y 10 g de NaCl, se ajusta el pH a 7,5 con NaOH 5M, se enrasa a 1 L y se autoclava. Los productos de la purificación se observaron en un gel de agarosa al 0,8% (m/v) teñido con 1,5 μ L *Safeview*/100 mL gel utilizando el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo-Fisher) para comprobar los tamaños. La concentración final de los vectores purificados se determinó utilizando el Nanodrop (Thermo-Fisher). 5 μ L del vector purificado fueron tratados con 0,5 μ L de *HpaI* (Thermo Scientific), 1,5 μ L de su tampón a 10 \times , y agua autoclavada hasta 15 μ L utilizando el protocolo especificado por el proveedor (2h, 37°C) para su linearización.

Los fragmentos de PCR purificados y los vectores purificados y tratados con *HpaI* fueron tratados a continuación con la polimerasa T4; añadiendo un nucleótido de citosina a los vectores linearizados y un nucleótido de guanina a los productos de PCR.

Previo a la reacción de hibridación (*annealing*) hemos utilizado un kit de purificación de ADN *GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up* (EURX) para facilitar los pasos de hibridación y transformación posteriores. Para la reacción de hibridación hemos incubado durante 2 h a 22°C una mezcla de: 45 ng de producto de PCR, 3 μ L del vector pPVL34 purificado (~15 ng), 1,8 μ L del tampón 10 \times de la T4 ligasa y 0,2 μ L de T4 ligasa, en un volumen total de 18 μ L.

3.6. TRANSFORMACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*

La transformación se ha llevado a cabo mediante el kit de células quimiocompetentes *One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó un choque térmico de 30 min a 42°C seguido de 2 min en hielo. Las células se cultivaron en cajas de Petri de medio LB con kanamicina y se seleccionaron colonias resistentes para confirmar la presencia de la inserción por PCR. Finalmente se guardaron los clones de *E. coli* que fueron positivos en una disolución al 20% de glicerol a -65°C.

3.7. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

La secuenciación de los clones obtenidos se ha encargado a la empresa Stab Vida, que utiliza el método de secuenciación de Sanger. Hemos especificado la región a secuenciar con los cebadores M13_Fw y M13_Rv que flanquean la región codificante de los genes en el plásmido pPLV34. Las secuencias recibidas de Stab Vida fueron visualizadas y pre-tratadas con el programa Chromas para su posterior alineamiento con las secuencias de referencia

generadas mediante una simulación realizada con Serial Cloner. El alineamiento se llevó a cabo con la herramienta online MUSCLE.

3.8. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y ESCANEADO DE PLACAS

Las observaciones de rutina se llevaron a cabo con una lupa trinocular Motic SMZ-168, equipada con una cámara fotográfica Nikon D3200. Para el escaneo de las placas de Petri hemos utilizado el escáner Epson V330 Photo a su máxima resolución.

3.9. PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Los parámetros estadísticos (media, desviación estándar, etc.) los hemos calculado mediante el Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc., USA) utilizando además sus funciones gráficas para la representación de los histogramas. Para comparar los distintos genotipos entre sí se ha utilizado la prueba de rango múltiple de LSD.

Para los estudios de segregación hemos utilizado la prueba del Chi-Cuadrado con ayuda de una herramienta online (<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/AVG/chicuadrado/Tabla11.htm>).





RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS *IN-SILICO* DE LOS GENES CANDIDATO

4.1.1. FAMILIA RKD

Para comenzar, hemos llevado a cabo un alineamiento de las secuencias de las proteínas de los 5 genes de la familia RKD de *Arabidopsis* para determinar las relaciones de similitud entre ellos (Figura 4).

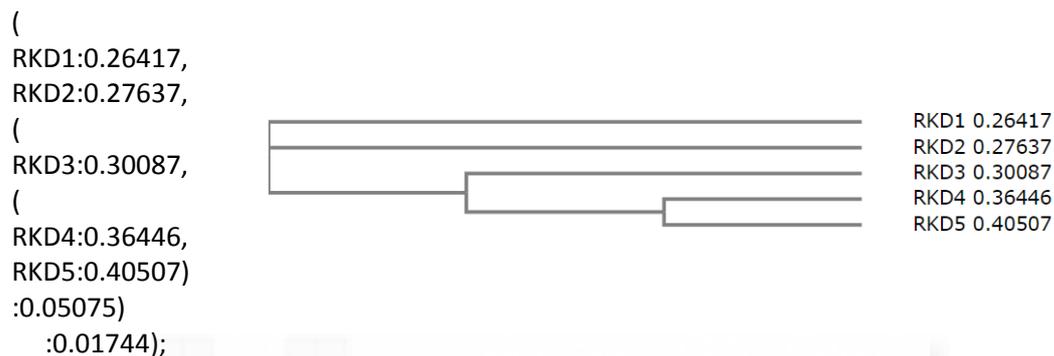


Figura 4. Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de las secuencias de las proteínas de la familia RKD de *Arabidopsis*.

La mayoría de la información disponible es sobre el gen *RKD4* así que lo utilizaremos como referencia para la selección de genes candidato. Podemos observar que el gen *RKD5* es el que más similitud guarda con *RKD4*, seguido por *RKD3*. *RKD1* y *RKD2* son más parecidos entre sí pero menos parecidos al resto de genes de la familia. También hemos estudiado el patrón de expresión de cada gen utilizando la herramienta del *Arabidopsis eFP browser* (Winter et al., 2007) pero solo encontramos información de *RKD5* y *RKD2*. *RKD2* se expresa sobre todo en el polen maduro mientras que *RKD5* se expresa en distintas fases del desarrollo embrionario. En vista a los resultados previos obtenidos con *RKD4* (Waki et al., 2011) hemos decidido seleccionar este gen para nuestro estudio, esperando obtener resultados similares para validar el sistema de expresión inducible utilizado. También hemos seleccionado estudiar el gen *RKD2* como representante del clado *RKD1-RKD2* ya que son los que más se diferencian del resto y pueden resultar más informativos. El patrón de expresión de *RKD5* puede parecer interesante para el estudio de su implicación en la desdiferenciación pero hemos decidido descartarlo en base a su elevado parecido a *RKD4* y su excesivo tamaño (1.957 pb) que dificultaría el proceso de clonación.

4.1.2 FAMILIA LEC2

La familia LEC2 está formada por un clado de 63 genes filogenéticamente relacionados con *LEC2*. Hemos comenzado el estudio construyendo un mapa de calor a partir de los datos de expresión disponibles en el *Arabidopsis eFP browser* para 57 de estos genes. A partir de estos datos se preparó un archivo Excel y se empleó el paquete *heatmap* de R (<http://www.rproject.org/>) para calcular las matrices de distancias entre los genes (filas) y entre los datos de expresión (columnas), estableciendo su agrupación jerárquica y obteniendo un dendograma (Figura 5A). Los datos de expresión utilizados incluyen experimentos de regeneración de tejidos tras inducción hormonal (Che et al., 2006), formación de callo a partir de distintos explantos (Sugimoto et al., 2010) y regeneración del meristemo radicular tras herida (Sena et al., 2009).

A partir de este mapa de calor hemos seleccionado 10 genes candidato para ser estudiados en base a su comportamiento: *AT3G18960*, *AT4G01580*, *AT1G16640*, *AT5G42700*, *AT4G32010*, *AT1G28300* (*LEC2*), *AT1G26680*, *AT2G35310*, *AT5G58280* y *AT3G61970*. A continuación, hemos obtenido los datos de expresión específica de tejido disponibles en línea (*Arabidopsis eFP Browser*) de la raíz para encontrar patrones de expresión que sugieran un papel de los genes en el desarrollo de este órgano.

Tras observar los patrones de expresión en la raíz de los genes candidato y sus relaciones filogenéticas hemos seleccionado los genes *AT3G18960*, *AT4G01580*, *AT2G35310* y *AT5G58280* como objeto de estudio (Figura 5B). Los genes *AT3G18960* y *AT4G01580* presentan un patrón tisular muy similar, con su expresión máxima localizada en las células del córtex de la región meristemática y en las células del centro quiescente. El gen *AT2G35310* se expresa, de manera preferente, en el tejido vascular de la zona de elongación de la raíz primaria. Por su parte, el gen *AT5G58280* se expresa en el tejido vascular de la zona de las células madre de la raíz. Estos patrones de expresión relacionados con células madre y/o regiones en proliferación celular sugieren la implicación de los genes en el mantenimiento de la desdiferenciación.

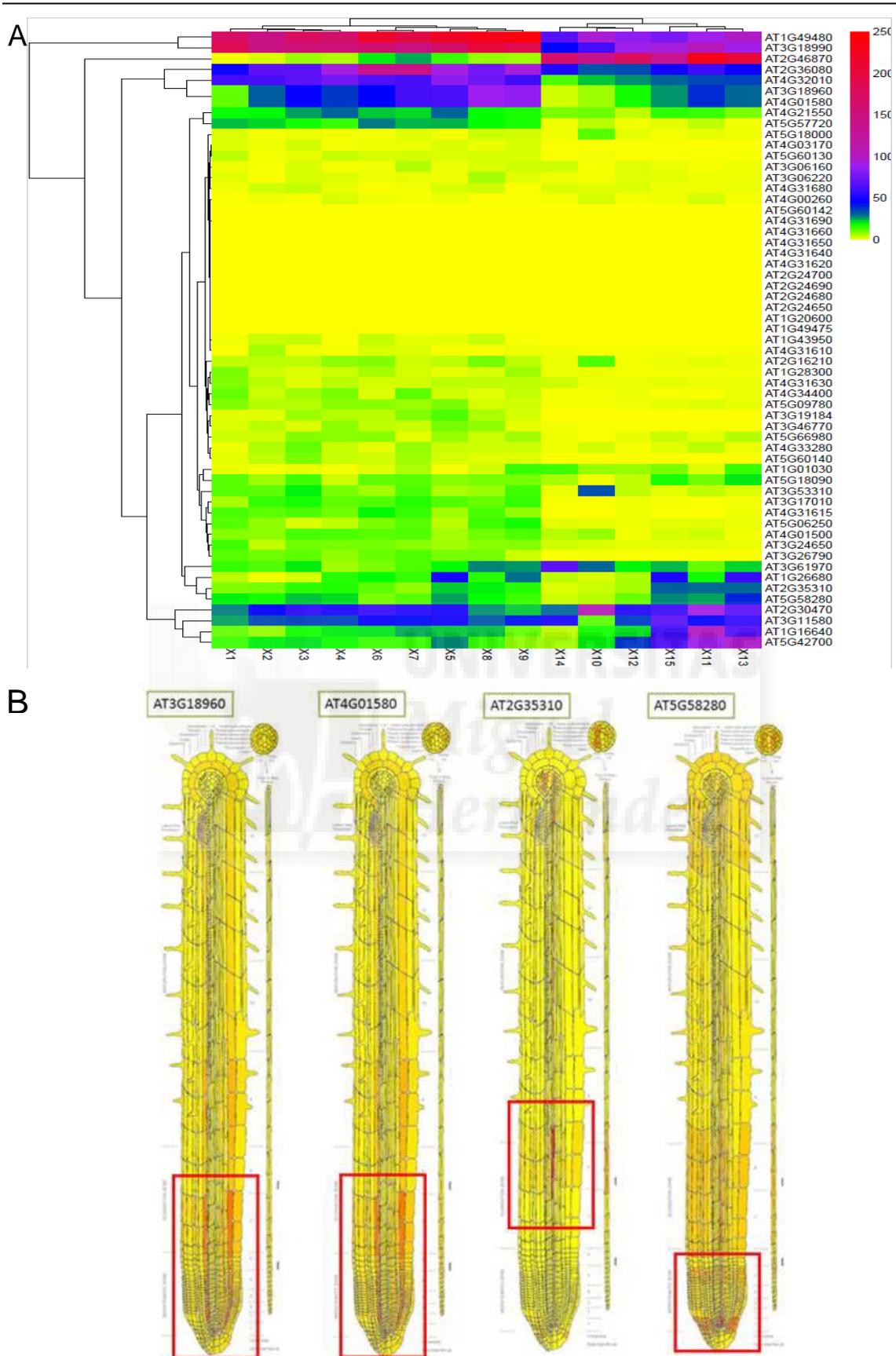


Figura 5. Datos de expresión de la familia LEC2.

4.1.3. FAMILIA WIND

Hemos llevado a cabo un alineamiento de las secuencias de las proteínas de los 4 genes que se conocen de la familia WIND para determinar las relaciones de similitud entre sus secuencias (Figura 6).

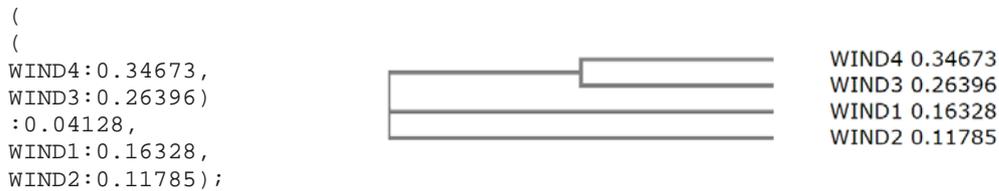


Figura 6. Árbol filogenético construido a partir del alineamiento de las secuencias de las proteínas de la familia WIND de Arabidopsis.

Podemos observar que los genes *WIND4* y *WIND3* son los que mayor similitud de secuencia presentan entre sí, seguidos por *WIND1* y *WIND2*. Hemos elegido a *WIND1* como objeto de estudio en vista a que los resultados publicados anteriormente ya confirman su implicación en el proceso de desdiferenciación celular. También hemos elegido trabajar con *WIND3* como representante del clado formado por *WIND3-WIND4* y cuyo estudio nos permita arrojar luz sobre la implicación de estos genes en la desdiferenciación celular.

4.2. CLONACIÓN DE GENES DE LA FAMILIA LEC2

El proceso de clonación se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente; los genes seleccionados (*AT3G18960*, *AT4G01580*, *AT2G35310* y *AT5G58280*) fueron amplificados con los cebadores apropiados (Tabla 3), que incluyen los adaptadores adecuados para la posterior incorporación al vector pPLV34. El vector se obtuvo a partir de *minipreps* y se linearizó con la enzima *HpaI*. Tanto los productos de PCR como los vectores linearizados fueron tratados con la polimerasa T4, añadiendo un nucleótido de citosina a los vectores linearizados y un nucleótido de guanina a los productos de PCR. A continuación, los productos de PCR y el vector linearizado fueron tratados con un kit de purificación de ácidos nucleicos y finalmente se llevó a cabo la reacción de hibridación en la que los insertos se introducen en los vectores preparados. Una vez obtenidos los vectores con los insertos apropiados se llevó a cabo la transformación de células de *Escherichia coli* quimiocompetentes y su

cultivo posterior en medio con kanamicina. El día siguiente a la transformación y siembra en placa, se contaron las colonias obtenidas a partir de cada transformación y se comprobó la presencia del inserto por PCR en cada colonia. Finalmente se hizo una selección de las colonias que resultaron positivas en la prueba por PCR y se almacenaron en glicerol a -80°C .

Hemos estabilizado 6 construcciones de los 4 genes seleccionados (*AT3G18960*, *AT4G01580*, *AT2G35310* y *AT5G58280*) en el vector pPLV34 en células de *Escherichia coli* para su futura transformación en *Agrobacterium tumefaciens* y, posteriormente, *Arabidopsis thaliana*. Estos clones son: AT3G18960.1, AT3G18960.5, AT4G01580.7, AT5G58280.7, AT5G58280.9, AT2G35310.1. A pesar de la intención inicial de obtener clones por duplicado de cada uno de los genes, en dos de los casos el proceso experimental no lo hizo posible. La integridad de la secuencia de estos clones ha sido comprobada tras su secuenciación mediante la herramienta de alineamientos múltiples MUSCLE y se ha podido confirmar la ausencia de mutaciones puntuales que alteren la pauta de lectura abierta de los genes.

Tabla 3. Parejas de cebadores utilizados para la clonación de los genes candidato de la familia LEC2.

Nombre del cebador	Secuencia del adaptador	Secuencia del cebador que hibrida en el gen candidato ^a	Tamaño esperado del producto de PCR ^b
AT3G18960_F AT3G18960_R	TAGTTGGAATGGGTTTCGAA TTATGGAGTTGGGTTTCGAAC	ATGGTTACAACCCAAAACACG TTATCCCCTGAAGACTCTCTTG	990
AT4G01580_F AT4G01580_R	TAGTTGGAATGGGTTTCGAA TTATGGAGTTGGGTTTCGAAC	ATGGTTATTACCCGAAACATG TTATCCCCTGAGGACTCTCTTG	917
AT5G58280_F AT5G58280_R	TAGTTGGAATGGGTTTCGAA TTATGGAGTTGGGTTTCGAAC	ATGGCCATGGCCTATGAGG TTATGCTTTCCTCTCCTTAG	1372
AT2G35310_F AT2G35310_R	TAGTTGGAATGGGTTTCGAA TTATGGAGTTGGGTTTCGAAC	ATGGCTAGAAACAGTGACAATG TTAGGGTTTTGAGACAAAGAG	1501

^a Los cebadores abarcan toda la región codificante de los genes, desde el codón de inicio hasta el codón de parada. ^b El tamaño esperado del producto de PCR, en pb, incluye el tamaño de la región codificante sumando las secuencias que aportan los adaptadores.

La Tabla 4 muestra los datos obtenidos a lo largo del proceso de preparación de los insertos tras los pasos de amplificación, extracción del gel de agarosa y purificación con el kit *GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up* de EURX. Podemos apreciar que el paso de

extracción del gel reduce la concentración en el caso de los dos genes más concentrados, pero no en los otros dos casos, probablemente debido a la estimación visual de las concentraciones de los productos de amplificación en el gel. También apreciamos la pérdida de concentración durante el paso de purificación en el caso de todos los genes.

Tabla 4. Purificación y preparación de los insertos.

Gen	Producto de amplificación ^a	Extracción del gel ^b	Purificación ^b
AT3G18960	67	21,9	4,1
AT4G01580	80	28,4	9,1
AT5G58280	6,7	16,0	3,5
AT2G35310	10	16,5	4,5

La concentración (en ng/ μ L) se estimó a partir de la visualización en un gel de agarosa^a, o mediante su cuantificación en un espectrofotómetro NanoDrop^b.

En la Tabla 5, se muestran las concentraciones del vector pPLV34 a lo largo de los distintos pasos del proceso de preparación. Tras la *miniprep* hemos seleccionado las dos muestras más concentradas (m1, m2) para proceder al paso de digestión con *HpaI*, que se realizó por duplicado para cada muestra. A continuación, para el paso de purificación se escogieron las dos muestras tratadas con *HpaI* de mayor concentración (m1.2, m2.1) que se mezclaron durante la purificación. El producto final de la purificación fue el utilizado para la reacción de hibridación.

Tabla 5. Purificación y preparación del vector pPLV34.

Después de la <i>miniprep</i>		Digestión con <i>HpaI</i>		Después de la purificación	
Muestra	Concentración	Muestra	Concentración	Muestra	Concentración
m1	55,6	m1.1	9,1	m1.2 + m2.1	5
m2	64,8	m1.2	12,0		
m3	44,4	m2.1	11,5		
m4	53,4	m2.2	7,8		

La concentración (en ng/ μ L) se estimó mediante su cuantificación en un espectrofotómetro NanoDrop.

Tabla 6. Caracterización de las colonias de *E. coli* obtenidas tras la transformación.

Gen	Resistentes ^a	Con inserto confirmado por PCR	Con vector pero sin inserto	Falsos positivos
AT3G18960	25	21	2	2
AT4G01580	21	19	1	1
AT5G58280	12	3	1	8
AT2G35310	3	1	2	0

^a Recuento de colonias transformantes creciendo sobre un medio con kanamicina (Figura 7B).

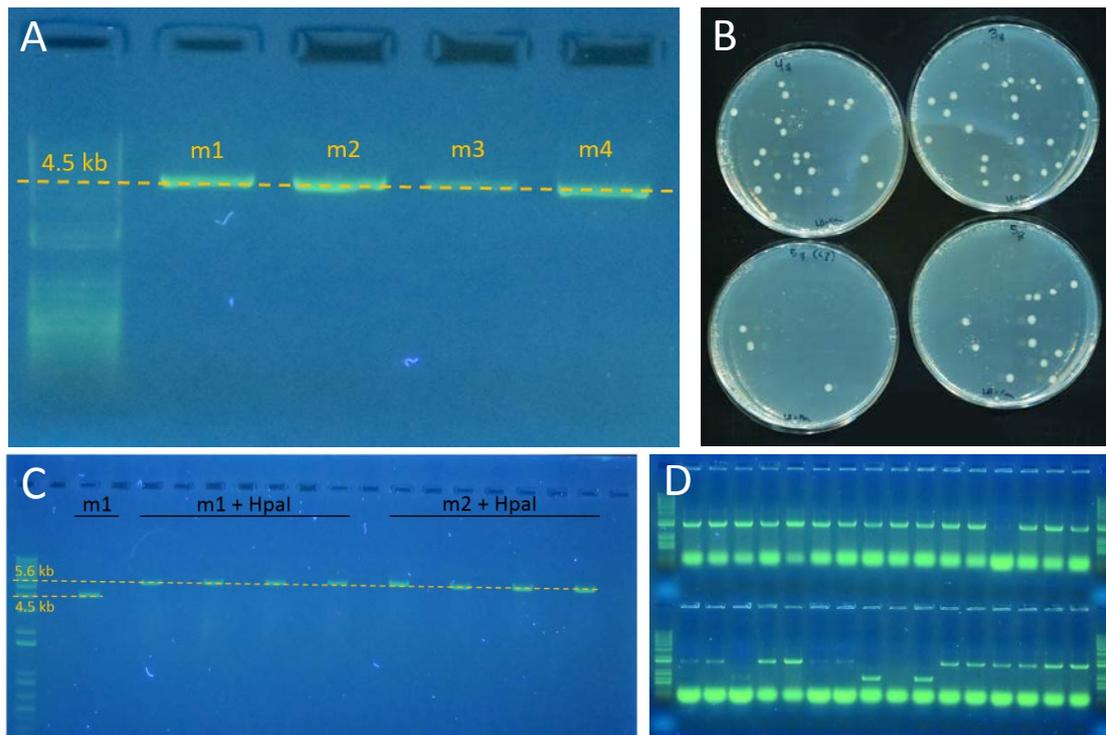


Figura 7. Imágenes del proceso de clonación. (A) Resultado de la purificación del vector pPLV34. Las calles 2 a 5 muestran el vector superenrollado, muestras m1 a m4. (B) Colonias transformantes creciendo en medio LB con kanamicina. (C) Vector pPLV34 tras su digestión con *HpaI*. Las digestiones se hicieron con las muestras m1 y m2, por cuadruplicado. m1: vector sin digerir. (D) Un ejemplo de los productos de PCR de colonias individuales.

4.3. SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES EN LA T1

Hemos llevado a cabo la siembra en masa de las semillas de la generación T1 de las transformaciones realizadas en el laboratorio previamente a mi llegada, incluyendo las construcciones de los genes *WIND1*, *WIND3*, *RKD2* y *RKD4* en el vector pPLV34. La selección se inició comprobando la presencia en la T1 de la resistencia a fosfotricina propia de las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas para la transformación (a excepción de Col-0). La presencia de la resistencia a fosfotricina está ligada a la presencia de la construcción que contiene la proteína GVG bajo la regulación del promotor de interés en las plantas. Esta comprobación se hizo en una muestra reducida de las semillas (una placa sembrada en masa por línea utilizada para la transformación) y los resultados confirmaron la identidad de las plantas utilizadas.

A continuación, se llevó a cabo la siembra en masa con agar de cobertera de las semillas de la T1 en medio con higromicina y cefotaxima. La resistencia a higromicina

está ligada a la presencia del gen de interés bajo la regulación de secuencias *UAS* mientras que la cefotaxima se utiliza para inhibir el crecimiento del *Agrobacterium tumefaciens* que pueda estar presente en las semillas como consecuencia de la transformación. Las plántulas que crecían en este medio fueron trasplantadas a otro medio de las mismas características para poder llevar a cabo su crecimiento disponiendo de un mayor espacio, este trasplante también sirve como otro filtro de selección de resistentes al renovar la higromicina del medio de cultivo. Finalmente, las plántulas resistentes que mostraron un crecimiento normal fueron trasplantadas a macetas con tierra donde terminaron su desarrollo. Alrededor de 80 plantas llegaron hasta la fase de maceta, de las cuales se confirmó la presencia del transgén por PCR en un total de 62 plantas (Figura 8), que se dejaron secar para finalmente recoger y almacenar sus semillas para su uso en el futuro. Entre las 62 plantas en las que se confirmó la presencia del inserto existen 17 combinaciones no redundantes de promotor y gen.

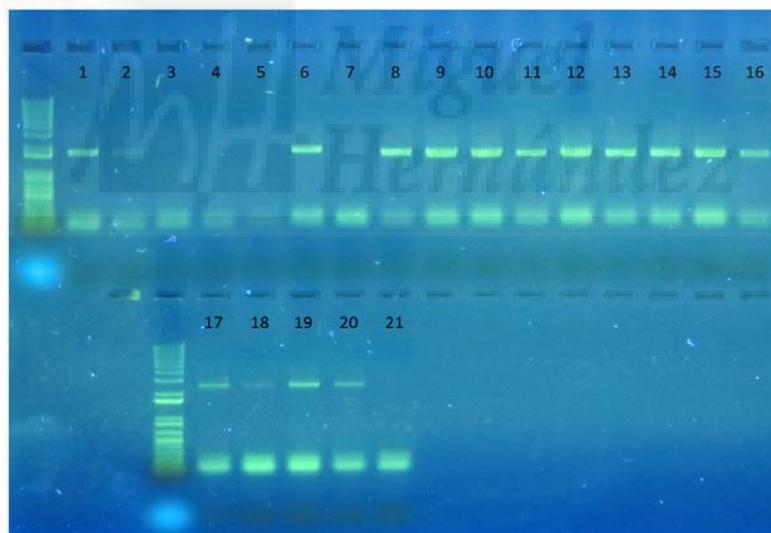


Figura 8. Selección T1. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% para el genotipado por PCR de una muestra de la generación T1. Podemos ver la amplificación con éxito de bandas en las muestras 1, 2, 6 y 8-20 y la falta de banda en las muestras 3-5, y 7. La muestra 21 es un control negativo.

Tabla 7. Listado de transformantes de Arabidopsis que se han analizado en este trabajo

Promotor	Gen	Planta	Promotor	Gen	Planta
<i>CYCD4;1</i>	<i>RKD2</i>	2.1	<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	2.1
<i>CYCD4;1</i>	<i>RKD2</i>	4.1	<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	2.2
<i>CYCD4;1</i>	<i>RKD2</i>	1.21	<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	2.3
<i>WOX5</i>	<i>RKD2</i>	2.1	<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	1.2
<i>WOX5</i>	<i>RKD2</i>	2.2	<i>SCR</i>	<i>WIND1</i>	2.3
<i>WOX5</i>	<i>RKD2</i>	4.1	<i>SCR</i>	<i>WIND1</i>	1.2
Ninguno (Col-0)	<i>RKD5</i>	3.1	<i>SCR</i>	<i>WIND1</i>	1.4
Ninguno (Col-0)	<i>RKD5</i>	1.2	<i>SCR</i>	<i>WIND1</i>	2.1
Ninguno (Col-0)	<i>RKD5</i>	3.1	<i>SCR</i>	<i>WIND1</i>	1.8
<i>CYCD4;1</i>	<i>RKD5</i>	2.2	<i>WOX5</i>	<i>WIND1</i>	1.2
<i>CYCD4;1</i>	<i>RKD5</i>	2.1	<i>WOX5</i>	<i>WIND1</i>	2.5
<i>CYCD4;1</i>	<i>RKD5</i>	4.8	<i>WOX5</i>	<i>WIND1</i>	2.4
<i>CYCD4;1</i>	<i>RKD5</i>	3.1	<i>WOX5</i>	<i>WIND1</i>	2.2
<i>PIN2</i>	<i>RKD5</i>	1.2	<i>WOX5</i>	<i>WIND1</i>	1.4
<i>SCR</i>	<i>RKD5</i>	1.1	<i>WOX5</i>	<i>WIND1</i>	1.3
<i>WOX5</i>	<i>RKD5</i>	4.8	Ninguno (Col-0)	<i>WIND3</i>	1.4
Ninguno (Col-0)	<i>WIND1</i>	2.2	Ninguno (Col-0)	<i>WIND3</i>	1.3
Ninguno (Col-0)	<i>WIND1</i>	3.2	Ninguno (Col-0)	<i>WIND3</i>	3.2
Ninguno (Col-0)	<i>WIND1</i>	1.9	Ninguno (Col-0)	<i>WIND3</i>	3.1
Ninguno (Col-0)	<i>WIND1</i>	3.6	Ninguno (Col-0)	<i>WIND3</i>	3.4
Ninguno (Col-0)	<i>WIND1</i>	3.1	<i>CYCD4;1</i>	<i>WIND3</i>	2.1
Ninguno (Col-0)	<i>WIND1</i>	3.6	<i>CYCD4;1</i>	<i>WIND3</i>	2.2
<i>CYCD4;1</i>	<i>WIND1</i>	1.3	<i>CYCD4;1</i>	<i>WIND3</i>	2.3
<i>CYCD4;1</i>	<i>WIND1</i>	1.1	<i>PIN2</i>	<i>WIND3</i>	4.1
<i>CYCD4;1</i>	<i>WIND1</i>	2.15	<i>PIN2</i>	<i>WIND3</i>	4.2
<i>CYCD4;1</i>	<i>WIND1</i>	1.2	<i>PIN2</i>	<i>WIND3</i>	4.4
<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	1.7	<i>PIN2</i>	<i>WIND3</i>	4.3
<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	2.6	<i>SCR</i>	<i>WIND3</i>	2.2
<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	2.4	<i>SCR</i>	<i>WIND3</i>	2.1
<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	1.8	<i>SCR</i>	<i>WIND3</i>	1.3
<i>PIN2</i>	<i>WIND1</i>	1.6	<i>WOX5</i>	<i>WIND3</i>	4.1

4.4. ANÁLISIS DE LA SEGREGACIÓN EN LA GENERACIÓN T2

La generación T2 consiste en las semillas generadas por autofecundación recogidas tras la desecación de las plantas T1. Las semillas fueron conservadas a 4°C durante una semana, para romper la dormancia y favorecer la germinación de manera sincrona. A continuación, se sembraron a razón de 81 semillas por placa en un medio con higromicina y se llevó a cabo el recuento de plantas resistentes a los 11 días (Tabla 7). Como resultado de una autofecundación de una T1 esperamos encontrar segregaciones de 3 plantas resistente por cada planta sensible en la T2 (segregación 3:1) en el caso de que solo exista una inserción y de 15 resistentes y 1 sensible (segregación 15:1) en caso de que haya dos inserciones no ligadas. También hemos

encontrado alguna segregación 1:1 o 2:1 que se podrían explicar con la presencia de algún alelo letal embrionario o gametofítico, o bien puede ser debido a un número insuficiente de plantas analizadas debido a que, en algunas de las líneas, muchas de las semillas no germinaron.

Para el análisis de la segregación de la generación T2 hemos elegido una muestra de 20 líneas de las 62 transformantes confirmadas. La selección se llevó a cabo principalmente en función de la disponibilidad de las semillas, incluyendo las semillas de las primeras plantas T1 en ser sembradas y secarse. Hemos determinado que el número mínimo de plantas necesarias para determinar de forma estadísticamente significativa la segregación es de 47 plantas. Para esto hemos utilizado la fórmula $N \geq \lg P_F / \lg(1 - P)$, donde N es el tamaño de muestra necesario, P_F es la probabilidad de fallo (0,05 en nuestro caso) y P es la frecuencia genotípica de la clase menos representada (sensible al antibiótico). Hemos aplicado esta fórmula en el caso de dos inserciones no ligadas (P toma el valor de 1/16), ya que se necesitarán más plantas para confirmar esta segregación que para confirmar la segregación 3:1 de las plantas con una sola inserción (solo se necesitan 11 plantas en este caso). Finalmente, los resultados se sometieron a un test de Chi cuadrado para comprobar a que segregación se ajustan los datos de cada línea.

Como podemos ver en la Tabla 8, hemos identificado un total de 12 líneas que presentan una segregación de 3 resistentes y 1 sensible con el suficiente número de datos para ser estadísticamente significativo. De la misma manera hemos identificado 3 líneas con una segregación 15:1 confirmada en su descendencia y una línea que también parece seguir esta segregación, pero de la que no hay datos suficientes (47 plantas) para confirmarlo con seguridad. Finalmente tenemos 3 líneas para las cuales los datos sugieren segregaciones 1:1 y una línea para la cual los datos sugieren una segregación 2:1; desconocemos el motivo exacto por el que encontramos estas segregaciones, pero podrían deberse a la presencia de un alelo letal embrionario que se hubiera generado durante el proceso de transformación.

Para futuros experimentos hemos elegido trabajar con las líneas que presentan solo una inserción, o bien dos inserciones no ligadas.

Tabla 8. Análisis de la segregación de la resistencia a higromicina en la generación T2.

Línea T1	Resistentes	Sensibles	Total	Segregación	Chi-cuadrado	Número de inserciones
Col-0 WIND1 1.9	46	17	63	3:1	0,084	1
Col-0 WIND3 1.3	56	21	77	3:1	0,279	1
CYCD4;1 WIND1 1.3	39	18	57	3:1	1,515	1
PIN2 WIND1 1.6	54	16	70	3:1	0,241	1
PIN2 WIND1 1.7	65	15	80	3:1	1,667	1
WOX5 WIND1 1.4	41	19	60	3:1	1,422	1
WOX5 WIND1 2.5	71	22	93	3:1	0,058	1
WOX5 WIND1 1.2	71	29	100	3:1	0,853	1
SCR WIND1 1.8	76	25	101	3:1	0,000	1
PIN2 RKD5 1.2	80	32	112	3:1	0,762	1
PIN2 WIND1 1.2	13	4	17	3:1	0,000	1
SCR WIND1 1.4	15	7	22	3:1	0,402	1
PIN2 WIND1 1.8	77	2	79	15:1	1,922	2; no ligadas
SCR WIND1 1.2	69	8	77	15:1	1,925	2; no ligadas
Col-0 RKD5 1.2	56	3	59	15:1	0,268	2; no ligadas
CYCD4;1 WIND1 1.2	25	1	26	15:1	0,542	2; no ligadas
CYCD4;1 WIND1 1.1	52	29	81	2:1	0,222	1; ¿letalidad embrionaria?
SCR WIND3 1.3	31	25	56	1:1	2,880	1; ¿letalidad gametofítica?
Col-0 WIND3 1.4	17	15	32	1:1	0,125	1; ¿letalidad gametofítica?
WOX5 WIND1 1.3	10	16	26	1:1	1,385	1; ¿letalidad gametofítica?

4.5. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA INDUCCIÓN EN LA GENERACIÓN T2

Hemos llevado a cabo un rápido análisis fenotípico de los transformantes para determinar si el sistema de inducción utilizado es funcional. Para ello hemos seleccionado dos de las líneas de segregación 3:1 de las que teníamos semillas disponibles: *ProWOX5:WIND1* 1.4 y *ProSCR:WIND1* 1.4. Hemos sembrado estas plantas junto con un control Col-0 en medio GM y las hemos crecido en vertical durante 5 días, a continuación, hemos trasplantado las plantas a placas con medio de inducción MS con una concentración 10 μ M de dexametasona donde se han dejado crecer 7 días más. Finalmente hemos observado las raíces al microscopio en busca de una manifestación fenotípica de la inserción.

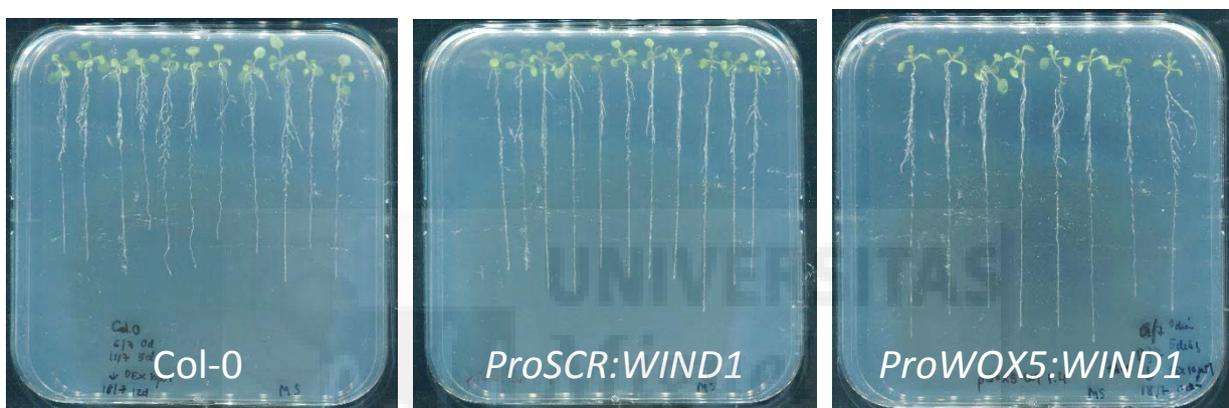


Figura 9. Raíces de T2 creciendo en medio con DEX. Plantas de 12 días de edad tras crecer 7 días en un medio con dexametasona.

Con ayuda del paquete estadístico Statgraphics hemos determinado que existen diferencias estadísticamente significativas en la longitud de las raíces principales de las distintas líneas (Figura 9); las plantas *ProWOX5:WIND1* 1.4 presentan raíces significativamente más largas que las plantas *ProSCR:WIND1* 1.4, y estas a su vez presentan raíces más largas que el control Col-0. Estos resultados concuerdan con los esperados para la sobreexpresión del gen *WIND1*, que está implicado en la desdiferenciación celular. Esta sobreexpresión puede estar aumentando la proliferación celular en los meristemas de la raíz causando un crecimiento anormal de las raíces.

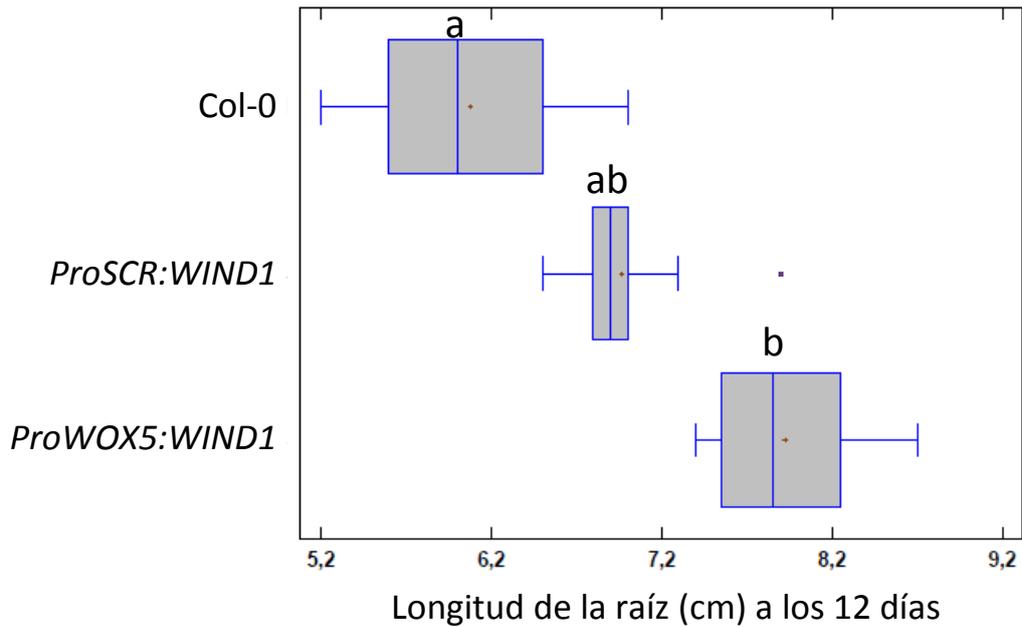


Figura 10. Gráfico de cajas y bigotes de la longitud de la raíz principal. Las plántulas de 5 días fueron trasplantadas a un medio con dexametasona y crecieron durante 7 días más. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los genotipos analizados.



CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

5.1. CONCLUSIONES

- Hemos creado una selección de genes teniendo en cuenta sus patrones de expresión, relaciones filogenéticas y los datos conocidos hasta la fecha, con potencial para estar implicados en los procesos de desdiferenciación y regeneración.
- Hemos desarrollado un protocolo para la siembra, selección y caracterización genética de transformantes en generación T1 de *Arabidopsis thaliana* con resistencia a higromicina.
- Hemos desarrollado un sistema de expresión inducible específica de tejido basado en el sistema GVG/UAS.
- Hemos obtenido 6 construcciones estables de los genes *AT3G18960*, *AT4G01580*, *AT2G35310* y *AT5G58280* en el vector pPLV34 para la futura ampliación de la T1 tratada en este trabajo.
- Hemos obtenido una colección de 62 transformantes T2 para combinaciones de los genes *WIND1*, *WIND3*, *RKD2* y *RKD5* con los promotores *ProWOX5*, *ProSCR*, *ProPIN2* y *ProCycD4;1*. 17 de estas combinaciones son no redundantes. A continuación, hemos analizado una muestra de 20 transformantes escogidos al azar, de los cuales 10 presentan una sola inserción y 3 tendrían 2 inserciones no ligadas.
- Hemos hecho una evaluación rápida de la funcionalidad del sistema de expresión inducible específico de tejido propuesto encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las muestras que sugieren que el sistema es efectivo.

5.2. PROYECCIÓN FUTURA

Este Trabajo Fin de Grado inicia una línea de investigación novedosa en el laboratorio del Dr. José Manuel Pérez Pérez; hemos obtenido una colección de transformantes cuyo futuro análisis en profundidad (genético y fenotípico) podrá revelar información desconocida hasta el momento sobre la dediferenciación celular en *Arabidopsis thaliana*. Los análisis de segregación realizados en este trabajo pueden ser respaldados o sustituidos por experimentos de *Southern blot* para la determinación del número de insertos en las 62 líneas obtenidas. A estas 62 líneas deberán sumarse otras procedentes de la transformación de *Arabidopsis thaliana* con los vectores obtenidos en este trabajo. A continuación, sería necesaria una caracterización fenotípica completa de las líneas para finalmente determinar su implicación en la dediferenciación y establecer relaciones jerárquicas entre los genes seleccionados.

Los potenciales resultados que promete esta línea de investigación podrán arrojar luz sobre el fenómeno de plasticidad celular en plantas, la dediferenciación celular vegetal y la regeneración de órganos y tejidos. Más allá de esto, el sistema de expresión inducible presentado puede asentar las bases para el desarrollo de un sistema de inducción de embriogénesis somática en tejidos específicos para la propagación clonal de especies de interés, mediante la inducción de la sobreexpresión de genes clave para la dediferenciación en tipos celulares susceptibles.



BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aoyama T, Chua NH. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* marzo de 1997;11(3):605-12.
- Chardin C, Girin T, Roudier F, Meyer C, Krapp A. The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development. *J Exp Bot.* octubre de 2014;65(19):5577-87.
- Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol.* junio de 2006;141(2):620-37.
- De Rybel B, van den Berg W, Lokerse A, Liao C-Y, van Mourik H, Möller B, et al. A versatile set of ligation-independent cloning vectors for functional studies in plants. *Plant Physiol.* julio de 2011;156(3):1292-9.
- Della Rovere F, Fattorini L, D'Angeli S, Veloccia A, Del Duca S, Cai G, et al. *Arabidopsis* SHR and SCR transcription factors and AUX1 auxin influx carrier control the switch between adventitious rooting and xylogenesis in planta and in in vitro cultured thin cell layers. *Ann Bot.* marzo de 2015;115(4):617-28.
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P. The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell.* septiembre de 2004;7(3):373-85.
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM. Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell.* octubre de 1992;4(10):1251-61.
- Guo F, Liu C, Xia H, Bi Y, Zhao C, Zhao S, et al. Induced expression of AtLEC1 and AtLEC2 differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e71714.
- Iwase A, Mitsuda N, Ikeuchi M, Ohnuma M, Koizuka C, Kawamoto K, et al. *Arabidopsis* WIND1 induces callus formation in rapeseed, tomato, and tobacco. *Plant Signal Behav.* 2013;8(12):e27432.
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, et al. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 22 de marzo de 2011;21(6):508-14.
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, et al. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 22 de marzo de 2011;21(6):508-14.
- Iwase A, Ohme-Takagi M, Sugimoto K. WIND1: a key molecular switch for plant cell dedifferentiation. *Plant Signal Behav.* diciembre de 2011;6(12):1943-5.
- Jásik J, Boggetti B, Baluška F, Volkmann D, Gensch T, Rutten T, et al. PIN2 turnover in *Arabidopsis* root epidermal cells explored by the photoconvertible protein Dendra2. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e61403.
- Jia H, McCarty DR, Suzuki M. Distinct roles of LAFL network genes in promoting the embryonic seedling fate in the absence of VAL repression. *Plant Physiol.* noviembre de 2013;163(3):1293-305.
- Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* febrero de 2011;12(2):79-89.

- Kong X, Lu S, Tian H, Ding Z. WOX5 is Shining in the Root Stem Cell Niche. *Trends Plant Sci.* octubre de 2015;20(10):601-3.
- Koszegi D, Johnston AJ, Rutten T, Czihal A, Altschmied L, Kumlehn J, et al. Members of the RKD transcription factor family induce an egg cell-like gene expression program. *Plant J.* julio de 2011;67(2):280-91.
- Koszegi D, Johnston AJ, Rutten T, Czihal A, Altschmied L, Kumlehn J, et al. Members of the RKD transcription factor family induce an egg cell-like gene expression program. *Plant J.* julio de 2011;67(2):280-91.
- Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH, et al. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature.* 2 de julio de 2009;460(7251):60-5.
- Liu H, Wang S, Yu X, Yu J, He X, Zhang S, et al. ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J.* julio de 2005;43(1):47-56.
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MA, Lo R, Kwong RW, et al. Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell.* 26 de junio de 1998;93(7):1195-205.
- Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, Miséra S. FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/AB13-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* septiembre de 1998;15(6):755-64.
- Maheswaran G, Williams EG. Clonal propagation of Trifolium Pratense, T. Resupinatum and T. Subterraneum by direct somatic embryogenesis on cultured immature embryos. *Plant Cell Rep.* junio de 1986;5(3):165-8.
- Nieuwland J, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Sanz L, Murray JAH. The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in Arabidopsis by affecting the basal meristem region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 29 de diciembre de 2009;106(52):22528-33.
- Page DR, Grossniklaus U. The art and design of genetic screens: Arabidopsis thaliana. *Nat Rev Genet.* febrero de 2002;3(2):124-36.
- Reidt W, Wohlfarth T, Ellerström M, Czihal A, Tewes A, Ezcurra I, et al. Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. *Plant J.* marzo de 2000;21(5):401-8.
- Schauser L, Wieloch W, Stougaard J. Evolution of NIN-like proteins in Arabidopsis, rice, and Lotus japonicus. *J Mol Evol.* febrero de 2005;60(2):229-37.
- Sena G, Wang X, Liu H-Y, Hofhuis H, Birnbaum KD. Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature.* 26 de febrero de 2009;457(7233):1150-3.
- Sena G, Wang X, Liu H-Y, Hofhuis H, Birnbaum KD. Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature.* 26 de febrero de 2009;457(7233):1150-3.
- Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol.* 1957;11:118-30.
- Srinivasan C, Liu Z, Heidmann I, Supena EDJ, Fukuoka H, Joosen R, et al. Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (Nicotiana tabacum L.). *Planta.* enero de 2007;225(2):341-51.

- Stasolla C, Loukanina N, Ashihara H, Yeung EC, Thorpe TA. Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiol.* abril de 2001;21(6):359-67.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, et al. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 25 de septiembre de 2001;98(20):11806-11.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, et al. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 25 de septiembre de 2001;98(20):11806-11.
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* abril de 2011;21(4):212-8.
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* abril de 2011;21(4):212-8.
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell.* 16 de marzo de 2010;18(3):463-71.
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell.* 16 de marzo de 2010;18(3):463-71.
- Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *J Plant Res.* mayo de 2015;128(3):349-59.
- Thakare D, Tang W, Hill K, Perry SE. The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in Arabidopsis and soybean. *Plant Physiol.* abril de 2008;146(4):1663-72.
- Valvekens D, Van Montagu M, Van Lijsebettens M. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* agosto de 1988;85(15):5536-40.
- Waki T, Hiki T, Watanabe R, Hashimoto T, Nakajima K. The Arabidopsis RWP-RK protein RKD4 triggers gene expression and pattern formation in early embryogenesis. *Curr Biol.* 9 de agosto de 2011;21(15):1277-81.
- Yadav RK, Tavakkoli M, Reddy GV. WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. *Development.* noviembre de 2010;137(21):3581-9.
- Zuo J, Niu Q-W, Frugis G, Chua N-H. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant J.* mayo de 2002;30(3):349-59.



ANEXO



Review article

Wound signaling of regenerative cell reprogramming

Samuel Daniel Lup^a, Xin Tian^b, Jian Xu^b, José Manuel Pérez-Pérez^{a,*},¹^a Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche 03202, Alicante, Spain^b Department of Biological Sciences and NUS Centre for BioImaging Sciences, National University of Singapore, Singapore 117543, Singapore

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2016

Received in revised form 13 June 2016

Accepted 17 June 2016

Available online 17 June 2016

Keywords:

Wound healing

Graft formation

Root tip regeneration

Adventitious rooting

Dedifferentiation

ABSTRACT

Plants are sessile organisms that must deal with various threats resulting in tissue damage, such as herbivore feeding, and physical wounding by wind, snow or crushing by animals. During wound healing, phytohormone crosstalk orchestrates cellular regeneration through the establishment of tissue-specific asymmetries. In turn, hormone-regulated transcription factors and their downstream targets coordinate cellular responses, including dedifferentiation, cell cycle reactivation and vascular regeneration. By comparing different examples of wound-induced tissue regeneration in the model plant *Arabidopsis thaliana*, a number of key regulators of developmental plasticity of plant cells have been identified. We present the relevance of these findings and of the dynamic establishment of differential auxin gradients for cell reprogramming after wounding.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	178
2. Hormonal regulation of transcription factor-asymmetries during wound healing	179
2.1. Regulation of tissue repair in partially sectioned plant tissues	179
2.2. Cell-to-cell communication for graft formation and vascular reconnection	179
3. Root tip regeneration upon wounding	181
4. <i>De novo</i> root organogenesis from wounded tissues	184
5. Wound-induced transcription factors as molecular switches for plant cell dedifferentiation	185
Acknowledgements	186
References	186

1. Introduction

Regeneration of complex structures after an injury in multicellular organisms requires the initiation of a genetically-encoded developmental program for wound healing, programmed cell death, cell dedifferentiation, cell proliferation and new pattern formation [1]. Local responses at the site of the wound have important

roles in the initiation of regenerative processes [2]. New organ regeneration in some metazoans, such as salamanders and newts, depends on the production of a mass of undifferentiated and proliferating cells, the blastema, which later becomes re-specified [3]. This type of regeneration is called epimorphosis. The blastemal cells arise either by cell proliferation of resident stem cells or by dedifferentiation towards stem cell-like precursors. In contrast to most animals, plants cells were thought to be totipotent, as mature cells cultured *in vitro* with different auxin and cytokinin concentrations regenerate an entire new plant [4]. However, recent results suggest that, as in some examples in animals, the regeneration of some plant tissues involves special populations of resident pluripotent cells of restricted potential [5]. Alternatively, plant regeneration might arise through dedifferentiation, such as in callus formation [5]. We highlight below the similarities between different wound-induced cell reprogramming in plants and discuss about the key role of the phytohormone auxin in orchestrating diverse plant regeneration processes.

Abbreviations: ABCB, ATP binding cassette type B; ALF4, ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION4; AP2/ERF, APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR; ARF, AUXIN RESPONSIVE FACTOR; GH3, GRETCHEN HAGEN3; IAA, indole-3-acetic acid; LBD, LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN; NAC, NAM ATAF1/2 CUC2; PIN, PIN-FORMED; PLT, PLETHORA; PXY, PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM; QC, quiescent center; SCR, SCARECROW; SHR, SHORT ROOT; WIND, WOUND INDUCED DIFFERENTIATION; WOX, WUSCHEL RELATED HOMEBOX; WUS, WUSCHEL.

* Corresponding author.

E-mail address: jmperez@umh.es (J.M. Pérez-Pérez).¹ www.arolab.es.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este Trabajo de Fin de Grado ha sido posible gracias a la financiación por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO; proyectos AGL2012-33610 y BIO2015-64255-R) y por fondos FEDER de la Comisión Europea.

Al Dr. Jian Xu, de la Universidad de Singapur, por proporcionarnos semillas de las líneas de transactivación génica utilizadas en este trabajo.

A José Manuel Pérez, por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y haberme guiado de la mejor manera posible, haciendo que aprenda en cada momento.

A María de los Ángeles Fernández López, Sergio Ibáñez, Aurora Alaguero, Rebeca González, María Salud Justamante y José Manuel Pérez por hacerme sentir tan integrado en el equipo.

A Joan Villanova y Ana Belén Sánchez, por haberme enseñado todo durante mis primeros pasos en el laboratorio, por haber sido compañeros y amigos.

A mi madre y a mi hermana, por su apoyo y comprensión en las épocas más duras.

