

La inhibición de la expresión del gen *AtCDC5* altera la actividad celular proliferativa en el meristemo y la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* L.

Enrique Martínez-de la Cruz y José López Bucio

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH

Resumen

El gen *AtCDC5* codifica para un factor de transcripción que regula la transición de las fases G2 a M del ciclo celular en plantas y es importante en los tejidos con potencial proliferativo como son los meristemas del follaje y de la raíz. En *Arabidopsis thaliana*, la mutación de este gen es letal, sin embargo, su función puede ser estudiada mediante la técnica de ARN de interferencia (ARNi). En este trabajo se investigó la participación del gen *AtCDC5* en la regulación de la arquitectura de la raíz mediante el análisis de plantas de *Arabidopsis* que expresan el gen *AtCDC5* en antisentido (*AtCDC5*-RNAi). La disminución en la expresión de *AtCDC5* causó una inhibición del crecimiento de la raíz primaria, una formación reducida de raíces laterales y un crecimiento limitado de las mismas.

Estos resultados correlacionan con una menor densidad de primordios de raíces laterales. Además, las plantas *AtCDC5*-RNAi desarrollan meristemos de menor tamaño y manifiestan una expresión disminuida del gen de identidad meristemática *AtPRZ1:uidA* en las regiones proliferativas de la raíz y el follaje. Nuestros resultados indican que el gen *AtCDC5* es importante para la morfogénesis vegetal y para la regulación de la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Palabras clave: *AtCDC5*, arquitectura de la raíz, raíces laterales, ciclo celular.

Abstract

The *AtCDC5* gene encodes a transcription factor that regulates the transition from G2 to M phases of cell cycle in plants and is important in tissues with proliferative potential such as the root and apical meristems. In *Arabidopsis thaliana*, mutation of this gene is lethal, but their function can be studied by the technique of RNA interference (RNAi). In this work, the role of *AtCDC5* in regulating root system architecture was investigated through the analysis of *Arabidopsis* plants that express an *AtCDC5* antisense construct (*AtCDC5*-RNAi). Decrease in *AtCDC5* expression caused an inhibition of primary root growth, reduced formation of lateral roots and limited growth of these structures, which correlates with a lower density of lateral root primordia. In addition, *AtCDC5*-RNAi plants developed smaller meristems and expressed the meristem marker *AtPRZ1:uidA* at lower levels in root and shoot meristems. Our results indicate that the *AtCDC5* gene is important for plant morphogenesis and for regulating root system architecture in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: *AtCDC5*, root architecture, lateral roots, cell cycle.

Introducción

La raíz es un órgano fundamental para las plantas que participa en la captación de agua y de nutrientes, en el anclaje al suelo y en las interacciones con el ambiente. Las raíces laterales y los pelos radiculares son estructuras que aumentan la superficie de absorción radical (López-Bucio et al., 2003). El programa de desarrollo y crecimiento en esta especie, como la mayoría de las angiospermas, depende del balance en la división, elongación y diferenciación celular que permiten la formación de los diferentes tejidos y órganos.

La división celular ocurre en los meristemos y está bajo el control del ciclo celular. Mediante el uso de *Arabidopsis thaliana* se han identificado varios genes que participan en el ciclo celular en plantas, entre los que se incluye el gen *PROPORZ1* (*PRZ1*). Este gen codifica una proteína adaptadora del complejo transcripcional que comúnmente regula la expresión de genes durante el ciclo celular (Gutiérrez 2009). La expresión del gen *PRZ1* se localiza en las zonas del meristemo de los brotes y en la punta de la raíz, así como en los primordios de raíces laterales, según se evidenció por la generación de líneas transgénicas que expresan

el promotor fusionado al gen reportero de la beta glucoronidasa (GUS) (Sieberer et al., 2003).

El gen *AtCDC5* es un miembro de una familia de factores de transcripción denominada Myb R2R3. Este gen participa en la división celular durante las fases de transición de G2/M del ciclo celular (Lin et al., 2006). Existen homólogos de *AtCDC5* en *S. cerevisiae* y *S. pombe* que participan en la regulación de diversos procesos mitóticos y en la transición de G2/M (Glover et al., 1998; Nigg et al., 1981; Ohi et al., 1994). En células humanas, la sobreexpresión de *hCDC5* acorta la fase G2 y reduce el tamaño de las células (Bernstein y Coughlin, 1998), sugiriendo un papel importante en la regulación del avance de G2 y la entrada en la mitosis. Un estudio sobre la caracterización funcional del gen *CDC5* en *Arabidopsis thaliana* reveló niveles altos de expresión en células proliferativas que generan los brotes del follaje, así como en el meristemo de la raíz y del follaje (Hirayama y Shinozaki, 1996). La mutación del gen *AtCDC5* causa la muerte de la planta, sin embargo, su función ha podido ser estudiada mediante la disminución de expresión utilizando la técnica de ARN de interferencia. Este es un proceso de silenciamiento de la expresión de los genes que consiste en la introducción de un ARN de doble cadena (ARNds) que induce la degradación de una secuencia específica de ARN mensajero (ARNm) complementario (Frechetl, 2005). En un trabajo previo se generaron plantas *AtCDC5*-RNAi, en donde la expresión de *AtCDC5* fue reducida por RNA de interferencia. Se encontró que la fase de transición de G2 a M (G2/M) fue afectada en las plantas *AtCDC5*-RNAi. Adicionalmente, la funcionalidad del meristemo del follaje fue alterada en las plantas *AtCDC5*-RNAi, lo que causa una reducción en la formación de hojas (Lin et al., 2007). Hasta la fecha, no se han reportado efectos en la arquitectura de la raíz por la disminución de los niveles de expresión de este gen, que pueden incluir alteraciones en el crecimiento de la raíz primaria o en la formación de raíces laterales; esto nos ha motivado a investigar la funcionalidad de *AtCDC5* sobre el desarrollo radicular utilizando las líneas *AtCDC5*-RNAi reportadas por Lin et al. (2007) y el uso de genes reporteros de las transiciones G2/M del ciclo celular que se expresan en la raíz, en tres aspectos: (1) La división celular en los meristemos de la raíz, (2) La formación de raíces laterales y, (3) La relación de este gen con la expresión de *AtPRZ1:GUS*, un marcador del ciclo celular de la transición G2/M. Nuestros resultados evidencian una participación clave del gen *AtCDC5* en la división celular y la regulación de la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis thaliana*.

Materiales y métodos

Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0), la línea transgénica *PRZ1:GUS* (Sieberer et al., 2003) y la mutante silenciada en antisentido *AtCDC5*-RNAi (Lin et al., 2007). Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) por 5 minutos y cloro al 20% por 7 minutos. Posteriormente se realizaron 5 enjuagues con agua destilada esterilizada y las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri con agar con medio MS

0.2x (Murashige y Skoog, 1962). El medio MS (mezcla de sales basales Murashige & Skoog, Cat M5524) se adquirió en la casa Sigma. El fitagar (grado de micropropagación) se adquirió en la casa Phytotechnology (Shawnee Mission, KS, USA). Las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad, una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura de 22 °C.

Análisis de crecimiento

En los diferentes bioensayos, el crecimiento de la raíz primaria se registró utilizando una regla. El número de raíces laterales se determinó mediante el conteo de raíces laterales presentes en la raíz primaria mediante el uso de un microscopio estereoscópico (Leica MZ6), desde el ápice hasta la zona de transición entre la raíz y el tallo. La densidad de raíces laterales se determinó dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria. Para todos los experimentos, los datos se analizaron estadísticamente en el programa Estadística 8.0.

Análisis histoquímico de la actividad de GUS

Para determinar los efectos de la disminución en la expresión de *AtCDC5* sobre la expresión de *AtPRZ1::GUS*, un marcador del ciclo celular, se realizó la cruce de la línea transgénica *AtPRZ1::GUS*, con la mutante silenciada en antisentido *AtCDC5-RNAi* para obtener plantas *AtCDC5/PRZ1::GUS*, las cuales fueron teñidas con X-Gluc 0.1% (5-bromo-4-cloro-indol, β -D-glucuronido), que es el sustrato de la enzima, en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH 7) con 2 mM de ferricianuro de potasio, durante 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y se fijaron con 0.24 N HCl en metanol 20% (v/v) durante 60 min a 62 °C. La solución se sustituyó por NaOH 7% (v/v) en etanol al 60% durante 20 min a temperatura ambiente. Las plantas se hidrataron con tratamientos de etanol a 40, 20 y 10% (v/v). Finalmente, se sustituyó el etanol por glicerol 50% (v/v). Las plántulas así procesadas se incluyeron en portaobjetos para su análisis. Los primordios de las raíces laterales y la expresión de *AtPRZ1::uidA* en raíz y el follaje se analizaron en preparaciones semi-permanentes de plántulas utilizando un microscopio compuesto (Axiostar Zeiss Pluss) en aumentos de 100x o 400x. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital SONY DSC-S75 3.3 adaptada al microscopio y procesados con el software Zeiss, AxioVision 4AC.

Resultados y Discusión

Efecto de la inhibición de la expresión de *AtCDC5* en el crecimiento de la raíz primaria

Para determinar el efecto de la inhibición de *AtCDC5* en el crecimiento de la raíz se germinaron plantas de una línea que expresa el gen de *Arabidopsis* en antisentido (*AtCDC5*-RNAi) en medio MS 0.2x que contiene todos los nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de adicionar sacarosa como fuente de carbono y agar como agente solidificante. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente, se sembraron en cajas de Petri (30 a 40 semillas por placa) que contenían medio de Murashige y Skoog (MS). Las cajas se colocaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas. En la figura 1A, se presenta una fotografía representativa de las plantas normales (Col-0) y de plantas antisentido *AtCDC5*-RNAi, a los 10 días después de la germinación. Se observa que la inhibición del gen *AtCDC5* afecta drásticamente la arquitectura de las plantas *AtCDC5*-RNAi, causando un acortamiento de la raíz primaria y una formación reducida de raíces laterales (Fig. 1B). Como se describió previamente por Lin et al. (2007), las plantas en antisentido forman un menor número de hojas comparadas con las plantas normales del ecotipo Columbia (Col-0) (Fig. 1A). Esto sugiere que además de los defectos evidentes en el desarrollo del follaje, tanto el crecimiento de la raíz primaria como la formación de raíces laterales están afectados por la expresión en antisentido de *AtCDC5*.

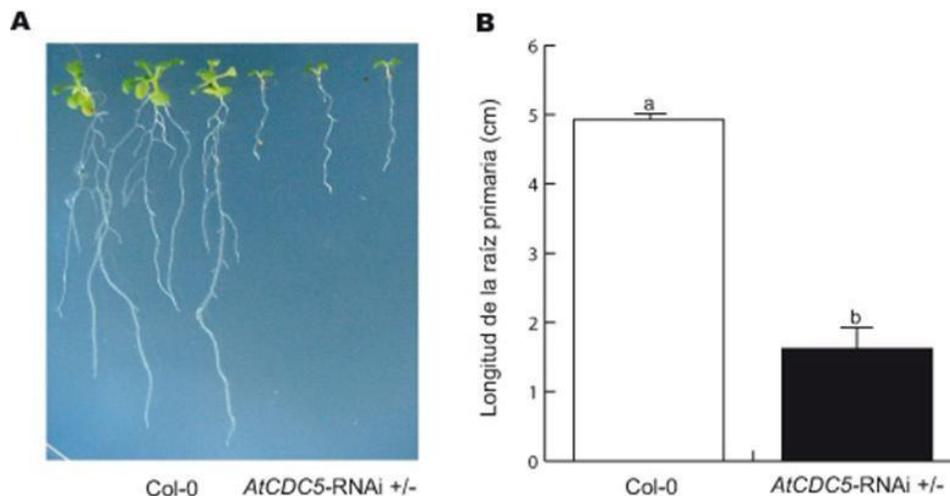


Figura 1. Efecto de la inhibición de la expresión de *AtCDC5* en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. (A) Fenotipo general de las plantas de 10 días de edad. (B) Longitud de la raíz primaria de plantas normales (Col-0) y plantas transgénicas que expresan un ARN interferente (*AtCDC5*-RNAi).

Efecto de la inhibición del gen *AtCDC5* en el desarrollo de las raíces laterales

Las raíces laterales y los pelos radiculares son estructuras que aumentan la superficie de absorción radical y ayudan en el anclaje de la planta al suelo (López-Bucio et al., 2003). Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se procedió a cuantificar el número de raíces que se forman en las plantas silvestres (Col-0) y en plantas *AtCDC5*-RNAi. Se observó que las plantas transgénicas *AtCDC5*-RNAi presentan una reducción de alrededor del 90% en el número de raíces laterales (Fig. 2A) y un crecimiento limitado de las mismas (Fig. 2B). Para determinar la causa de la formación reducida del número de raíces laterales en las

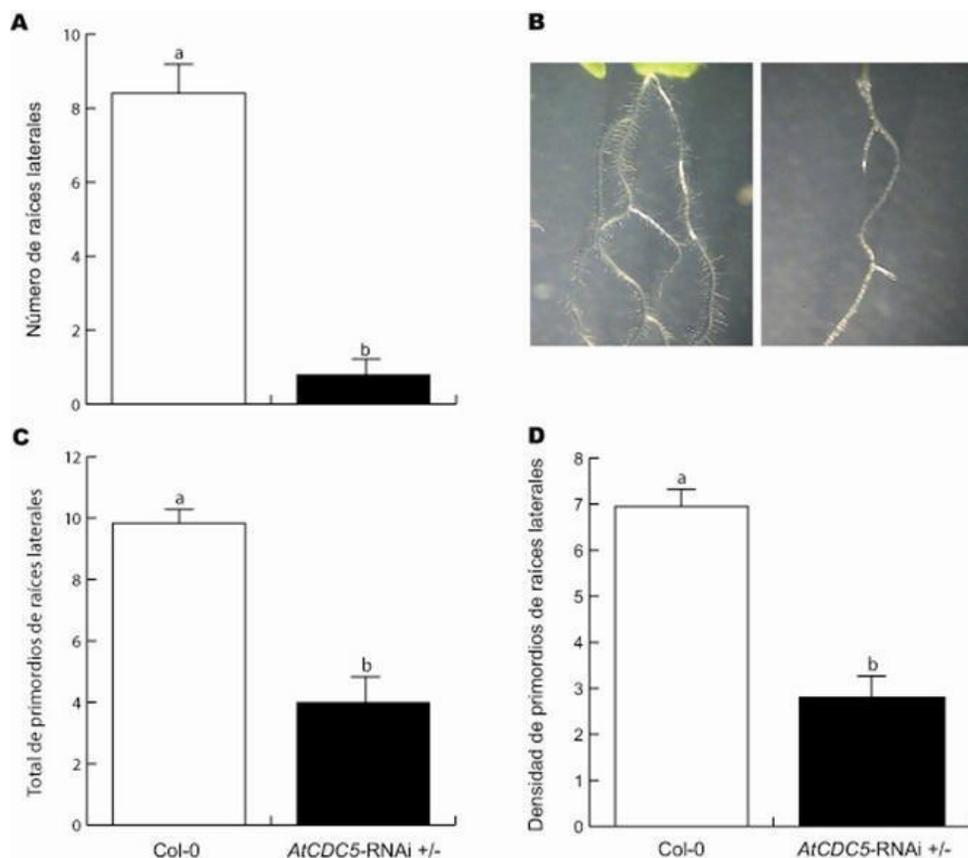


Figura 2. Efecto de la inhibición de la expresión de gen *AtCDC5* en la formación de raíces laterales y en primordios de raíces laterales. Se presentan fotografías representativas de una planta de 10 días de edad de un ecotipo silvestre (*Col-0*) y de una planta transgénica que expresa un ARN interferente para el gen *AtCDC5*. (A) Cuantificación de raíces laterales. (B) Fotografías al microscopio estereoscópico de las raíces laterales de plantas silvestres y expresantes de un ARN interferente para *AtCDC5*. (C, D) Cuantificación total y densidad de primordios de raíces laterales en plantas silvestres (*Col-0*) y *AtCDC5*-RNAi).

La inhibición de la expresión del gen *AtCDC5* altera la actividad celular proliferativa...

plantas *AtCDC5*-RNAi, se procedió a la cuantificación de primordios. Los primordios son los precursores de las raíces laterales que se forman a partir del periciclo. Se encontró que las plantas *AtCDC5*-RNAi producen un menor número de primordios y por lo tanto el total de primordios es menor comparado con las plantas silvestres en todas sus fases de desarrollo (Fig. 2C). La densidad de primordios es un parámetro que nos indica la capacidad de proliferación celular del periciclo, se obtiene dividiendo el número de primordios entre la longitud de la raíz primaria. Como se observa en la figura 2D la densidad de primordios en las plantas *AtCDC5*-RNAi es mucho menor que en las plantas silvestres. Esto sugiere que *AtCDC5* es importante para la activación del periciclo y la formación de los meristemos de las raíces laterales, ambos procesos son fundamentales para la ramificación normal de la raíz.

Efecto de la inhibición de la expresión de *AtCDC5* en la estructura del meristemo de la raíz primaria

Los sitios principales de la división celular en las plantas son los meristemos de la raíz principal, de las raíces laterales y el meristemo del follaje. La producción de nuevas células, seguido por eventos de crecimiento y diferenciación conduce a la formación de nuevas estructuras, incluyendo raíces y hojas y al incremento de la biomasa vegetal. Para analizar el efecto de la inhibición del gen *AtCDC5* en la división celular, se cuantificó la longitud de los meristemos de la raíz primaria en plantas silvestres (Col-0) y en las líneas *AtCDC5*-RNAi. Se

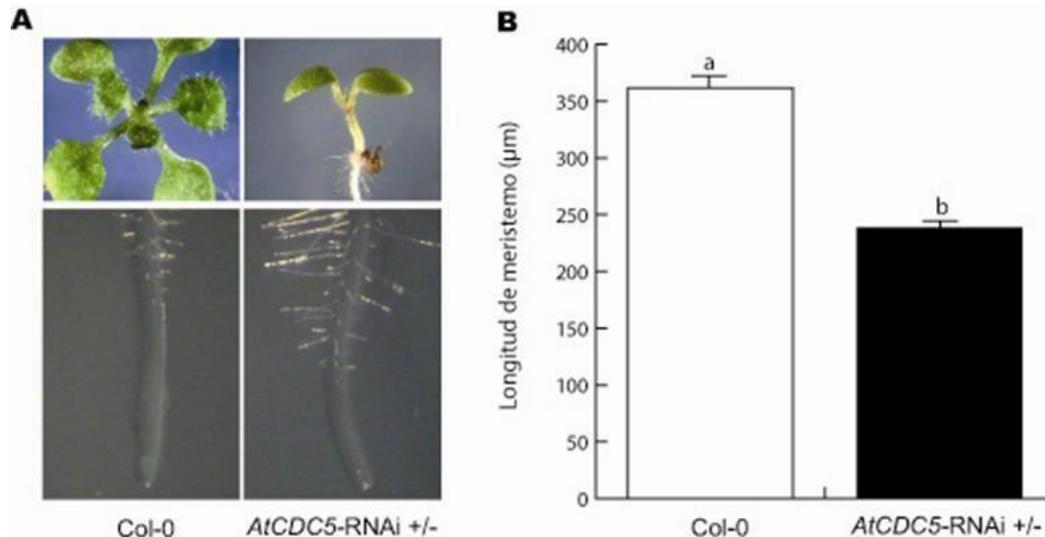


Figura 3. Efecto de la inhibición de la expresión de *AtCDC5* en la estructura del meristemo de *Arabidopsis thaliana*. (A) Zona de la región meristemática de la raíz de plantas silvestres y expresantes de un ARN interferente para *AtCDC5* (aumento de 40x). Notar la formación de pelos radiculares cerca del ápice de la raíz en las plantas *AtCDC5*-RNAi. (B) Longitud del meristemo de la raíz primaria de las plantas a los 10 días de edad.

encontró que las plantas antisentido forman meristemos de menor tamaño, un 34% más cortos comparados con los meristemos de las plantas silvestres (Fig. 3A, B). La reducción en el tamaño de los meristemos coincide con la formación de pelos radiculares cerca del ápice de la raíz primaria, lo que indica que la actividad mitótica disminuye con la inhibición del gen *AtCDC5*, y se promueve la diferenciación celular.

Efectos de la disminución en la expresión del gen *AtCDC5* en la expresión del marcador *AtPRZ1:GUS*

La mutación en el gen *proporz* (*PRZ1*) afecta la arquitectura de la raíz inhibiendo la transición G2-M del ciclo celular probablemente mediante su interacción con *AtCDC5* (Sieberer et al., 2003). Para conocer la función del gen *AtCDC5* a nivel molecular durante el desarrollo de la raíz y su relación con la expresión de *AtPRZ1*, se utilizaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el marcador *AtPRZ1:uidA*. Se realizaron cruza-mientos de plantas *AtCDC5*-RNAi con plantas *AtPRZ1:uidA* para movilizar el gen reportero a las plantas con expresión disminuida de *AtCDC5*. Las plántulas fueron teñidas con X-Gluc y colocadas en preparaciones semi-permanentes y analizadas en el microscopio en aumento de 400x. Mediante esta metodología, se investigaron los cambios en la expresión de *AtPRZ1:uidA* en plantas transgénicas que expresan este marcador (controles) y en plantas *AtCDC5*-RNAi. Con particular énfasis, se comparó la expresión de *AtPRZ1:uidA* en el meristemo del follaje, en el meristemo de la raíz primaria y en el meristemo de las raíces laterales. Como se observa en la figura 4 los niveles de expresión de *AtPRZ1:uidA* disminuyen en todas las regiones analizadas en las plantas *AtCDC5*-RNAi (Fig. 4D-F), lo que coincide con la

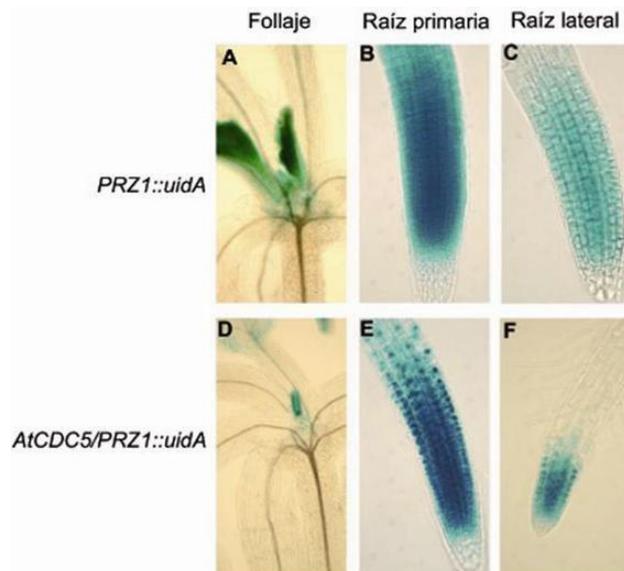


Figura 4. Efectos de la disminución en la expresión de *AtCDC5* en la expresión de *AtPRZ1:uidA*. (A-C) Expresión de *PRZ1:uidA* en plantas silvestres y en líneas *AtCDC5*-RNAi (D-F). Notar la disminución de la expresión del marcador en diferentes regiones de las plantas *AtCDC5*-RNAi.

inhibición en la formación de hojas y de raíces laterales observados en los experimentos anteriores. Estos resultados sugieren que el gen *AtCDC5* es un regulador positivo del desarrollo de la raíz y del follaje, actuando posiblemente durante la fase de transición de G2/M del ciclo del celular, afectando la división celular en los meristemos del follaje, en la raíz y en los meristemos de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Esto indica que *AtCDC5* interactúa genéticamente con *AtPRZ1* y confirma que ambos genes participan en la regulación del ciclo celular en las plantas.

En conclusión, nuestros resultados indican que el gen *AtCDC5* es importante para la morfogénesis vegetal y para la regulación de la arquitectura de la raíz, proceso mediado por alteraciones en la división celular en los meristemos y por la activación del periciclo para que ocurra la formación de raíces laterales. Además, el análisis de la expresión de *AtPRZ1:uidA* indica que *AtCDC5* es un regulador positivo de *proporz*, modificando sus niveles de actividad y sus dominios de expresión en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Agradecimientos:

Agradecemos a los Doctores C. Luschnig y L.J. Qu por la donación de las semillas *AtPRZ1:uidA* y *AtCDC5-RNAi*, respectivamente. JLB agradece al CONACYT y a la Coordinación de la Investigación Científica (CIC-UMSNH) por el financiamiento otorgado. E. Martínez de la Cruz recibió apoyo de la CIC-UMSNH como becario de Proyecto.

Literaturacitada

- Bernstein H. S. y S. R. Coughlin. 1998. A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *J. Biol. Chem.* 273: 4666-4671.
- Frechetl G. 2005. El ARN de interferencia. *Bioquímica* 30: 99 -100.
- Glover D.M., Hagan I.M. y A.A. Tavares. 1998. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* 12: 3777-3787.
- Gutiérrez C. 2009. The *Arabidopsis* cell division cycle. *The Arabidopsis book* 7: e0120. doi:10.1199/tab.0120.
- Hirayama T. y K. Shinozaki. 1996. A *cdc5*⁺ homolog of higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 13371-13376.
- Lin Z., Yin K., WankX., Liu M., Chen Z., Gu H. y L.J. Qu. 2006. Virus induced gene silencing of *AtCDC5* results in accelerated cell death in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 87-94.
- Lin Z., Yin K., Zhu D., Chen Z., Gu H. y L.J. Qu. 2007. *AtCDC5* regulates the G2 to M transition of the cell cycle and is critical for the function of *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Cell Res.* 17: 815-828.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. y L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.

- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nigg E. A. 1998. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 776-783.
- Ohi R., McCollum D., Hirani B., Den Haese G. J., Zhang X., Burke J. D., Turner K. y K. L. Gould. 1994. The *Schizosaccharomyces pombe* CDC5⁺ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *Embo J.* 13: 471-483.
- Sieberer T., Hauser M.T., Seifert G. J. y C. Luschnig. 2003. *PROPORZ1*, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Curr. Biol.* 13: 837-842.

