

## Caracterización *in silico* de los motivos de ADN asociados a la expresión diferencial del gen de la ornitina descarboxilasa en la macroalga roja *Grateloupia imbricata* durante el desarrollo *in vitro* del cistocarpo

Montserrat Montero-Fernandez, Rafael R. Robaina & Pilar Garcia-Jimenez\*

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, CP: 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias, España.

\* pilar.garcia@ulpgc.es

### RESUMEN

La formación de las estructura reproductoras, cistocarpos, en la macroalga roja *Grateloupia imbricata* está influenciada por estímulos, tanto exógenos como endógenos, siendo las poliaminas y el etileno los principales responsables de la inducción *in vitro* del cistocarpo. La síntesis de poliaminas es catalizada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) cuya regulación a nivel celular se da tanto a nivel proteosómico como transcripcional. Sin embargo, el conocimiento sobre las vías de regulación génica en macroalgas, así como los factores que influyen la misma, es todavía escaso. Para intentar obtener un mayor conocimiento sobre los complejos procesos de regulación, en este estudio se ha obtenido parte de la región 5' del gen de la ornitina descarboxilasa en la macroalga roja *Grateloupia imbricata* (*GiODC*), analizado e identificado *in silico* los motivos presentes en la misma y se ha monitorizado las variaciones de expresión de dicho gen bajo tratamientos diferentes de fotoperiodo, etileno y metil jasmonato mediante qRT-PCR. Los resultados muestran la presencia de motivos conservados en la región 5' que podrían afectar la expresión transcripcional de *GiODC* así como patrones diferentes de expresión en función del tiempo y el tipo de inductor.

### INTRODUCCIÓN

La formación de las estructura reproductoras, cistocarpos, en la macroalga roja *Grateloupia imbricata* está influenciada por estímulos exógenos (salinidad, temperatura o fotoperiodo) y endógenos (auxinas, citoquininas, etileno (ET) o poliaminas (PAs)) [1]. Se ha comprobado que la variación en los niveles endógenos de PAs se correlaciona con la esporulación y el desarrollo de los cistocarpos en *G. imbricata* [2,3,4] y que tratamientos de 15 min de ET inducen carposporogénesis en *G.imbricata* y alteran los niveles endógenos de putrescina en el alga roja *Pterocladia capillacea* [5]. Asimismo, estudios previos de qRT-PCR mostraron que la ODC en *G.imbricata* (*GiODC*; Acc.#FJ223132) se expresa diferencialmente en los talos fértiles e infértiles [6] y mediante estudios de hibridación *in situ* se confirmó que dicha expresión decae abruptamente en la parte apical de los talos fértiles comparado con la basal donde nunca aparecen los cistocarpos [6]. Parece por tanto que son las PAs y el ET los principales inductores de la formación *in vitro* del cistocarpo. La síntesis de PAs está mediada por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17) [3], la cual incorpora un grupo aminopropil a la putrescina proveniente de la descarboxilación de la S-adenosil metionina (SAM), compuesto involucrado también en la biosíntesis de etileno [7].

En este contexto, creemos que la regulación de *GiODC*, la cual es clave para entender el proceso reproductivo en algas. Por tanto, los objetivos principales de este estudio

han sido i) la obtención y caracterización de la región 5'-*GiODC* y ii) el seguimiento de la expresión génica bajo tratamientos con diferentes inductores (fotoperiodo, ET y Metil Jasmonato (MeJa)).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención de parte de la 5'UTR-*GiODC* se obtuvo ADN de *G.imbricata* mediante el método CTAB, posteriormente amplificado mediante el método de PCR inversa (iPCR) modificado [8]. Se obtuvo una única banda, la cual se purificó y fue secuenciada. Dicha secuencia se analizó con bases de datos específicas para regiones promotoras (Tabla 1).

Tabla 1: Bases de datos usadas en la identificación de motivos *in silico*

Bases de datos				
MEME	Jaspar	GOMO	AmiGO	FEX
	Core Plantae			
UTRdb & UTRsite	RBPD	Consite	The Eukaryotic Promoter	GENEMARK

Para los estudios de expresión génica mediante qRT-PCR, los talos de *G.imbricata* fueron clasificados atendiendo a la presencia (fértil) o no (infértil) de cistocarpos. Los talos

fértiles pero sin cistocarpos visibles (fertilizados) fueron seleccionados y sometidos a diferentes tratamientos de inducción (Fig. 1). Para los análisis de expresión se extrajo ARN con su consiguiente síntesis a cDNA. Se usaron triplicados de cada tratamiento y como control muestras sin tratamiento pero mantenidas bajo las mismas condiciones de cultivo.



Fig. 1. Representación esquemática de los tratamientos de inducción (etileno, metil jasmonato y fotoperíodo) de los cistocarpos en el alga roja *Grateloupia imbricata*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica de iPCR se obtuvo una banda de 602 nt. El alineamiento de la misma con la secuencia de *GiODC* (Acc. # FJ223132, GenBank) mediante el software EMBOSS Water reveló un solapamiento parcial que produjo un incremento de 429 nt hacia el extremo 5'-*GiODC*. El análisis *in silico* identificó, entre otros, los siguientes motivos: *Myc2*, *Myc3* y *Myc4* (respuesta a jasmonatos) [9], *DOF* (luz) [10] y *Abi4*, *SMZ* y *RAV1* (etileno) [11], candidatos potenciales a afectar la regulación transcripcional de *GiODC*.

Los resultados de expresión de *GiODC* muestran dos patrones diferentes en función i) del tipo de inductor y ii) la temporalidad. Para el tratamiento de ET y fotoperíodo 12 h luz: 12 h oscuridad, la mayor concentración de transcritos ocurre tras el periodo de estimulación (no cistocarpos visibles); confirmando lo obtenido en estudios previos donde se ha demostrado que el desarrollo del cistocarpo afecta la expresión de *GiODC* y que esta disminuye según aumenta el grado de desarrollo del mismo [6]. Por otro lado, el tratamiento con MeJa presenta un máximo en la expresión de *GiODC* con la aparición de los primeros cistocarpos (final del periodo de aparición) (Fig. 2).

Tratamiento	Elicitor period	Disclosure period
<b>Fotoperíodo</b>		
12-h luz/12-h oscuridad	11.7 ± 0.84 (*)	0.84 ± 0.10
6-h luz/18-h oscuridad	1.12 ± 0.13	1.11 ± 0.12
18-h luz/6-h oscuridad (control)	1.00 ± 0.11	1.10 ± 0.13
<b>Etileno</b>		
15-min tratamiento	450 ± 1.3 (*)	1.1 ± 0.14
Control (no etileno)	1.00 ± 9.10 <sup>-3</sup>	0.99 ± 0.10
<b>Metil jasmonato</b>		
1-h tratamiento	1.35 ± 0.2	37.13 ± 0.11 (*)
Control (sin MeJa)	1.00 ± 0.11	1.09 ± 0.10

Los datos se presentan en relación a la expresión observada para los talos control al final del periodo de elicitación. Cada valor es la media ± DE de tres experimentos independientes. \* Indica diferencias significativas entre las muestras tratadas y control para cada inductor (p < 0.05).

Fig. 2. Expresión normalizada de *GiODC* al final de los periodos de estimulación y aparición bajo los tratamientos de fotoperíodo, 15 min de etileno y 1 h con Metil Jasmonato.

Este resultado está actualmente siendo discutido ya que parece implicar la compleja activación de diferentes vías fisiológicas. Los resultados obtenidos en este trabajo suponen una buena herramienta inicial para comenzar a profundizar en las vías y factores implicados en el proceso de regulación de *GiODC* durante el proceso reproductivo.

## AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MINECO, BFU 2010-017248). Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información Gobierno de Canarias (ACIISI) y Fondo Social Europeo.

## REFERENCIAS

- García-Jiménez P, Brito-Romano O, Robaina R R. 2013. Production of volatiles by the red seaweed *Gelidium arbuscula* (Rhodophyta) emission of ethylene and dimethyl sulfide. *J. Phycol.* 49:661–669.
- Guzmán-Urióstegui A, Robledo D, Robaina R R. 2002. Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 38:1169–1175.
- Sacramento AT, García-Jiménez P, Alcázar R, Tiburcio A.F, Robaina R R. 2004. Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 40:887–894.
- Sacramento AT, García-Jiménez P, Robaina R R. 2007. Spermine induces cystocarp development in marine alga. *Plant Growth Regul.* 53:47–154.
- García-Jiménez P, Robaina R R. 2012. Effects of ethylene on tetrasporogenesis in *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 48 (3):710–715.
- García-Jiménez P, García-Maroto F, Garrido-Cárdenas JA, Ferrandiz C, Robaina R R. 2009. Differential expression of the ornithine decarboxylase gene during carposporogenesis in the thallus of the red seaweed *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae). *J. Plant Physiol.* 166:1745–1754.
- Miyazaki JH, Yang SF. 1987. Metabolism of 5-methylthioribose to methionine. *Plant Physiol.*, 84(2):277–81.
- Silver J, Keeritake, V. 1989. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J. Virol.* 63(5):1924–1928.
- Schweizer F, Fernández-Calvo P, Zander M, Diez-Díaz M, Fonseca S, Glauser, G, et al. 2013. Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell.* 25:3117–3132.
- Kagale S, Links MG, Rozwadowski K. 2010. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 152:1109–1134.
- Licausi F, Ohme-Takagi M, Perat P. 2013. AP2/ERF transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol.* 199:639–649.