



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE UN GEN EXPRESADO EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTORES MASCULINOS EN FLORES DE *Melandrium Album*

**RICARDO ANTONIO ARAYA VERA
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

RESUMEN

La planta *Melandrium album* (*Silene latifolia*), es una especie dioica en la que los individuos producen flores estaminadas o pistiladas. Este dimorfismo sexual está asociado a la presencia o ausencia del cromosoma sexual Y, en forma análoga a lo observado en mamíferos. Puesto que en esta especie, los programas de organogénesis masculino y femenino están claramente disectados, ella es el modelo adecuado para analizar a nivel molecular el programa de desarrollo de las estructuras masculinas de la flor, en ausencia de los eventos implicados en la diferenciación femenina.

En especies hemafroditas, el desarrollo de los órganos reproductores sexuales masculinos ocurre a nivel del tercer verticilo floral. La correcta diferenciación de estambres y anteras en este tejido está bajo la modulación de los denominados genes de identidad de órganos. Tales genes han sido identificados y caracterizados, determinándose que codifican para factores de transcripción específicos, las proteínas MADS. Tales factores reconocen secuencias blanco específicas en los genes bajo su control y actúan en el desarrollo de las estructuras florales, de acuerdo a lo que se ha denominado el modelo ABC. Genes de identidad de órganos, ortólogos a los identificados en plantas hermafroditas, han sido también identificados en *M album*, sugiriendo un mecanismo regulatorio similar al modelo ABC. Sin embargo, ello no ha sido confirmado aún, por cuanto no se han aislado genes blanco para las proteínas MADS en esta especie.

El objetivo de esta tesis ha sido el aislamiento y caracterización de la región promotora de un gen expresado en etapas muy tempranas del desarrollo de estambres y anteras en *M album*. Se seleccionó como sustrato de este análisis al

gen identificado como K4. El cDNA correspondiente a este gen fue obtenido desde flores en estadios premeioticos mediante la técnica de "differential display" de mRNAs. El análisis de la expresión de este gen mediante RT-PCR, ha establecido que este gen es transcrito en las etapas preesporogénicas del desarrollo floral. El análisis de la secuencia del cDNA K4, ha revelado una homología de un 95% con el CCLS65, un cDNA obtenido desde flores macho en estadios premeioticos del desarrollo. De aquí en adelante el gen K4 se denominara MROS65.

A partir de la secuencia determinada para el cDNA K4, se sintetizó un oligonucleotido de 30 bases, complementario al extremo 5' de la región codificadora de este gen. Tal oligonucleotido fue empleado para amplificar, desde el DNA cromosomal, el fragmento "río arriba" a la región codificadora del gen *MROS65*. La técnica de "Single Specific Primer" o SSP-PCR, fue adaptada y utilizada para tal efecto. Tres bandas de amplificación, una de 600 pb y dos de 400 pb aproximadamente, fueron visualizadas. Tales fragmentos de DNA fueron clonados en el T-vector pBlueScript II SK(-) y su secuencia nucleotídica fue establecida. El análisis de las secuencias indicó que el clon pSKT65-1, que contiene una Banda de 351 pb posee elementos típicos de promotores eucarióticos, tales como "TATA box" y "CCAT box". Sin embargo, la característica mas interesante es la presencia en este fragmento de la secuencia CATTGG, muy similar a aquella definida como consenso para el sitio de unión de la proteína MADS AGAMOUS (CC(A/T)₄NNGG o CC(A/T)₆GG). Puesto que, de acuerdo al modelo ABC, *AGAMOUS* es uno de los genes de identidad de órganos involucrados en la modulación del desarrollo de estambres y anteras en el tercer verticilo floral de *Arabidopsis thaliana*, y que el correspondiente gen ortólogo *Sl,MI* ha sido identificado en *M. album*, este hallazgo sugiere que *MROS65* podría ser un gen Blanco de la regulación por factores de transcripción MADS. La confirmación de lo anterior a través de experimentos de unión del factor SLM1 a este fragmento de DNA, conjuntamente con un análisis mediante delecciones y/o mutagenesis, es la continuación de esta línea de estudios.

SUMMARY

Melandrium album (*Silene latifolia*) is a dioecious species with individuals producing either staminate or pistillate flowers. Analogously to mammals species, this sex dimorphism is correlated with the presence or absence of Y sex chromosome. Since in this plant the male and female organogenic programs are clearly dissected, is an adequate model to study, at the molecular level, the development of male floral structures, isolated from the events associated to the female differentiation. In hermaphroditic species, the development of male reproductive organs takes place at the third floral whorl. The proper differentiation of stamens and anthers in this tissue is under modulation by the organ identity genes. These genes have been identified and characterized. They encode for specific transcription factors, the MADS proteins, which recognizes and binds to specific target sequences in the genes under their control. The cooperative action of these factors according to the so called ABC model, leads the floral development. Organ identity genes homologous to that described in hermaphroditic plants have been determined in *Melandrium album*, suggesting a similar regulatory mechanism for this species. However, since no target genes for MADS proteins have been yet isolated, this assumption should be confirmed. This thesis is focussed to the isolation and characterization of the promoter region of a gene expressed very early in the stamen and anthers development in *M. album*. The K4 gene was selected for this study. The mRNA transcribed from this gene, was identified as specific from premeiotic stages by the differential display method. RTPCR analysis indicates that the K4 gene expression is restricted to the presporogenic stages in stamen development. The nucleotide sequence obtained for the K4 cDNA, revealed a 95% homology with CCLS65, a cDNA specific from *M. album* male flower, previously isolated. Here in after the K4 gene was referred as *MROS65*. From the sequence obtained for the K4 cDNA, a 30' oligonucleotide, complementary to the 5' end of the coding region, the 65 primer, was synthesized. This oligonucleotide was used as gene-specific primer for the amplification of *MROS65* upstream regions by the SSP-PCR technique. Three amplification bands, 600, 400 and 400 bp in size, were obtained and cloned into the pBluescript II SK(-)-T vector. The nucleotide sequence for such clones was established. The analysis of pSKT65-1 sequence, allows the identification on the 351 bp insert, of a TATA box and a

CCAT box, common elements in eukaryotic promoters. Moreover, the sequence CATTGG, very similar to the reported binding site for the AGAMOUS MADS protein (CC(A/T)₆GG), was also found. Since according to the ABC model, AGAMOUS is one of the organ identity genes modulating the development of stamens at the third floral whorl, this finding suggests that *MROS65* gene expression could be regulated by *SLM1*, the AGAMOUS homologous gene from *M. album*. Further experiments, including deletions and mutagenesis studies, as well as, DNA binding assays for SLM1 factor, should be done to confirm this assumption.