

DOI: 10.2436/20.1501.02.91

Organismes modificats genèticament
(Josep M. Casacuberta, ed.)*Treballs de la SCB. Vol. 61 (2010) 31-45*

PLANTES TRANSGÈNIQUES EN RECERCA

JAUME F. MARTÍNEZ-GARCÍA^{1, 2} I JORDI BOU-TORRENT²¹*Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats*²*Departament de Genètica Molecular, Centre de Recerca en Agrigenòmica*

Adreça per a la correspondència: Jaume F. Martínez-García. Departament de Genètica Molecular, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB). C. De Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona. Tel.: 934 006 189. Adreça electrònica: jmgmg@cid.csic.es.

RESUM

El conjunt d'aproximacions presentades en aquest article il·lustra alguns dels usos més habituals de les plantes transgèniques en la recerca, que han permès, i encara permeten, respondre moltes preguntes genuïnes de gran interès biològic difícilment resolubles per altres aproximacions. Per això es pot afirmar que les plantes transgèniques han revolucionat la recerca bàsica i aplicada en el camp de la biologia vegetal. La seua utilització ens està ajudant a entendre millor com uns organismes tan fascinants i plàstics com les plantes es formen i, en interaccionar amb el medi, responen alterant la seua forma o fisiologia. Encara ens queda molt per conèixer, i l'ús de plantes transgèniques en la nostra recerca encara té molt a dir. Esbrinar més o menys depèn, en gran mesura, de la imaginació dels investigadors.

Paraules clau: col·lecció de mutants, genètica inversa, mutant d'inserció T-DNA.

TRANSGENICS IN PLANT RESEARCH

SUMMARY

The different strategies summarized in the manuscript illustrate some of the most common uses of transgenic plants in research. They have allowed answering several questions of great biological importance that cannot be easily addressed by other approaches. For that reason it is probably correct to state that transgenic plants have revolutionized basic and applied research in plant biology. Its utilization is helping us to better understand how these fascinating and plastic organisms are formed and, when interacting with the environment, responding by changing their form and/or physiology. We still have a

lot to learn, and usage of transgenic plants in our research still has a lot to give. To discover more or less depends, partially, on the imagination of researchers.

Key words: mutant collection, reverse genetics, T-DNA insertional mutant.

LA FUNCIO GÈNICA EN PLANTES: UN REPTE EN LA RECERCA

Igual com en altres camps de la biologia, una pregunta bàsica de gran interès per a molts dels laboratoris que treballen en biologia vegetal és adreçar la base genètica de la forma i el funcionament de les plantes. La genètica proporciona l'estratègia adequada, ja que permet comparar el fenotip d'individus genèticament quasi idèntics, en els quals l'única diferència es troba en l'existència d'un o pocs gens desregulats. Per adreçar aquesta qüestió fonamental, la genètica ofereix dues aproximacions alternatives: *a)* establir quins són els gens clau en la regulació d'un procés determinat i *b)* esbrinar quina és la funció d'un gen o grup de gens en el funcionament en general d'una planta o en un procés determinat d'interès. Aquestes dues estratègies genètiques es coneixen com a *genètica directa* (en anglès, *forward genetics*) i *genètica inversa* (en anglès, *reverse genetics*). En el cas de la biologia vegetal, totes dues estratègies impliquen l'ús habitual de plantes transgèniques.

Arabidopsis thaliana és, sense dubte, l'espècie model més i millor desenvolupada, i per tant aquesta planta capdavantera en la recerca bàsica en plantes serà l'objecte principal d'anàlisi en aquest article. Des de ja fa uns quants anys, *Arabidopsis* l'estan utilitzant molts laboratoris del món com a organisme model per a l'estudi d'un rang ampli de problemes d'interès bàsic o aplicat en biologia vegetal. Això es deu principalment a la facilitat de créixer d'aquesta planta, al bon coneixement a escala fisiològica i morfològica, a l'abundància i dispo-

nibilitat de mutants, a la facilitat de transformació genètica i a la gran disponibilitat d'eines genètiques i genòmiques desenvolupades arran de la consecució de la seqüència del seu genoma l'any 2000 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Hi ha una pàgina web (The Arabidopsis Information Resource, TAIR; www.arabidopsis.org) que manté actualitzada una base de dades genètiques i moleculars per a aquesta planta, que inclou la seqüència completa del genoma i l'estructura dels gens que el conformen, informació sobre els productes genètics, metabolisme, expressió genètica, mapes genètics, estocs de llavors de diverses col·leccions, publicacions, enllaços a altres pàgines web d'interès i informació sobre la comunitat científica que treballa amb *Arabidopsis*.

Altres espècies vegetals, de les quals s'ha seqüenciat tot el genoma o una bona part, s'estan establint com a espècies model complementàries a *Arabidopsis*, com és el cas de l'arròs com a model de plantes monocotiledònies, i *Medicago truncatula* com a espècie model de lleguminoses. En el cas de l'arròs, espècie amb el genoma totalment seqüenciat i uns protocols de transformació genètica ben establits, s'estan desenvolupant molt ràpidament moltes eines de genètica inversa paregudes a les que descriurem més avant per a *Arabidopsis* (<http://orygenesdb.cirad.fr>) (Krishnan *et al.*, 2009). En el cas de *M. truncatula*, amb només un 60 % del genoma seqüenciat (<http://www.medicago.org>) però amb protocols de transformació genètica eficients, s'han començat a iniciar programes per establir eines de genètica funcional com col·leccions de mutants per inserció de T-DNA

o transposons (Benedito *et al.*, 2008; Young i Udvardi, 2009).

Amb aquesta massiva quantitat d'informació, el repte és adreçar i assignar la funció biològica a tots els gens d'un organisme. En alguns casos, la funció es pot definir amb molta seguretat basant-se en la similitud de la seua seqüència i expressió amb la de gens d'altres espècies de funció coneguda. Quan es tracta de gens dels quals no hi ha dades funcionals, com ara veurem, la generació i utilització de plantes transgèniques és bàsica per adreçar-ne la funció.

GENÈTICA CLÀSSICA: DE LA FUNCIO AL GEN

La genètica directa és una eina molt poderosa per identificar gens implicats en un procés biològic concret. Per exemple, gens que controlen el desenvolupament floral es poden identificar buscant plantes mutants que presenten flors amb una morfologia alterada (Simpson i Dean, 2002); gens implicats en la biosíntesi de les hormones vegetals giberel·lines es poden identificar buscant mutants nans que requereixen per créixer normalment l'aplicació exògena en el medi de la GA3, una giberel·lina bioactiva (Yamaguchi, 2008); i plantes deficientes en els fotoreceptors de llum roja i roja llunyana, anomenats *fitocroms*, es poden identificar buscant mutants que siguen cecs a llum monocromàtica d'aquestes longituds d'ona (Fankhauser i Casal, 2004). Una vegada que la mutació que confereix el fenotip s'ha identificat, les anàlisis genètiques permeten establir si el defecte responsable del fenotip s'hereta, si depèn d'un sol gen (és a dir, si és monogènic), si el caràcter mutant és recessiu (cosa que suggereix que probablement es tracta d'una mutació de pèrdua de funció en el gen responsable) i

finalment, amb l'ús d'estratègies de genètica molecular, aïllar el gen mutat responsable del fenotip observat. Així, la genètica directa inicia l'estudi des de la funció per arribar a conèixer el gen que la regula.

Cronològicament, la genètica directa va ser la primera a desenvolupar-se, i per això, després de l'aparició de les estratègies de genètica inversa (vegeu l'apartat següent) també s'anomenà *genètica clàssica*. L'ús de la genètica clàssica per estudiar la funció de gens es basa en l'establiment d'un cribratge per a la cerca i identificació senzilla de plantes mutants. Els cribratges genètics requereixen: *a)* l'establiment del fenotip mutant, sustentat en un bon coneixement previ de la fisiologia i morfologia de la planta utilitzada (Fankhauser i Casal, 2004) i *b)* la mutagènesi de plantes que introduïska canvis a l'atzar en el genoma, base de la variabilitat fenotípica. Inicialment, les poblacions mutagenitzades es van generar mitjançant tractaments de les llavors amb agents químics, com l'etilmetanosulfonat (EMS), que introdueixen canvis o mutacions puntuals en la seqüència de DNA, i físics, com les radiacions amb neutrons, que normalment provoquen eliminacions de petites seqüències del genoma. Amb la posada a punt de les tècniques de transformació genètica, la generació de poblacions de plantes transgèniques mutagenitzades per la inserció de seqüències de T-DNA ha guanyat terreny en espècies susceptibles de ser transformades amb eficiència i facilitat relativa, com és el cas d'*Arabidopsis*.

Un desavantatge de la mutagènesi per inserció de T-DNA respecte a la induïda per tractament amb agents químics i físics és la gran inversió inicial en temps i mà d'obra requerida per a la generació de les poblacions mutagenitzades, ja que el procés d'obtenció de les plantes transgèniques implica l'aïllament de milers de línies inde-

pendents. Així, per a les insercions de T-DNA les plantes s'han de transformar amb el T-DNA (generació M0), seleccionar les plantes transgèniques (generació M1), fer-les créixer i deixar-les autopollinitzar per produir la generació M2, en la qual els individus mutants es poden identificar. S'ha estimat que el nombre mitjà d'insercions de T-DNA per planta M1 és d'1,5, per la qual cosa s'han de cribrar poblacions mutagenitzades molt grans per poder identificar un nombre raonable de possibles mutants. No obstant això, la raó principal de l'estesa d'aquesta estratègia és l'avantatge que proporciona l'ús del T-DNA com a agent inductor de la mutació per a la identificació posterior del gen afectat gràcies a la facilitat per aïllar les seqüències flanquejants al lloc d'inserció. El gen que causa el fenotip mutant s'espera que siga el gen localitzat al voltant del lloc d'inserció del T-DNA, i que aquest siga la causa del fenotip mutant. Afortunadament, algunes poblacions de mutants per inserció del T-DNA estan disponibles públicament i poden ser utilitzades per diferents laboratoris en cribratges genètics diversos.

Tal com ja s'ha comentat, les plantes utilitzades en un cribratge gènic, independentment del mutagen emprat, provenen normalment de llavors en la generació M2 (prenent com a M0 la generació mutagenitzada per l'agent emprat), perquè la majoria dels fenotips mutants resulten de mutacions recessives. Així, la primera generació de plantes mutagenitzades (M1), en ser heterozigotes per a totes les mutacions, no mostrarien cap fenotip si aquest és provocat per gens recessius. Si, al contrari, alguns dels fenotips seleccionats a partir de les poblacions mutagenitzades són dominants, podrien ser detectades en un cribratge de la generació M1, ens estalviaríem una generació i es reduiria la inversió en temps (vegeu més avall les col·leccions

d'*activation tagging*, *enhancer-trap* i *gene-trap*). No obstant això, la majoria dels cribratges es duen a terme en poblacions M2, ja que permetrien l'aïllament de mutants recessius i dominants al mateix temps.

GENÈTICA INVERSA: DEL GEN A LA FUNCIO

Amb la disponibilitat de tota la seqüència del genoma d'*Arabidopsis* i la informació sobre els patrons d'expressió dels gens presents en els microxips, que permeten observar l'expressió de quasi tots els gens del genoma d'un organisme, tant en diferents genotips com en resposta a canvis en les condicions ambientals o estressos, diferents grups de recerca van mostrar interès en l'estudi de la funció de gens concrets, la seqüència o l'expressió dels quals suggeria un paper en un procés biològic particular. De nou la genètica va proporcionar l'estratègia per respondre aquestes qüestions, en permetre analitzar si plantes mutants que mancaven del gen d'estudi es comportaven de manera diferent que les plantes silvestres (no mutants). En aquest cas, l'ús de mutants com a eina per investigar la funció d'un gen rep el nom de *genètica inversa*, perquè l'origen de l'estudi és un gen del qual es vol esbrinar la funció en la planta (estudi iniciat des del gen per arribar a conèixer la funció).

Per tant, identificar amb facilitat plantes mutants en gens concrets és bàsic en la utilització de la genètica inversa com a estratègia d'anàlisi en la recerca. La popularització de la genètica inversa va ocórrer en dos passos consecutius. En primer lloc, la generació de plantes transgèniques amb relativa facilitat en *Arabidopsis* va permetre la generació de col·leccions de milers de plantes mutants. Aquestes línies estaven inicialment disponibles per fer-ne ús en

cribratges moleculars encaminats a identificar línies individuals a partir de bateries de línies d'inserció (Parinov *et al.*, 1999). Posteriorment, es van iniciar les anàlisis massives de les regions flanquejants del lloc d'inserció del T-DNA, que van proporcionar col·leccions catalogades de mutants de T-DNA.

LES COL·LECCIONS CATALOGADES DE MUTANTS DE T-DNA COM A BASE DE LA GENÈTICA INVERSA

El Laboratori d'Anàlisi del Genoma de l'Institut Salk (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, SIGnAL), a San Diego (Califòrnia, Estats Units) va iniciar un programa per a l'obtenció d'una biblioteca catalogada (*sequence-index*) de mutacions en el genoma d'*Arabidopsis*. El SIGnAL va utilitzar mètodes de seqüenciació del genoma per identificar els llocs d'inserció del T-DNA en el genoma d'*Arabidopsis* en totes les línies disponibles. S'analitzaren les plantes transformades amb el T-DNA de les col·leccions d'Alonso/Crosby/Ecker, compostes per centenars de milers de línies transgèniques independents, i les seqüències de les regions frontereres al T-DNA obtingudes s'alinearen amb la seqüència del genoma d'*Arabidopsis* combinada amb la seua anotació (l'anotació del genoma, amb l'ús de tècniques bioinformàtiques combinades amb dades experimentals disponibles, permet indicar la posició de gens, introns i exons i regions intergèniques en la seqüència del genoma d'*Arabidopsis*) (Alonso *et al.*, 2003). Aquestes dades es van fer disponibles al públic en general via una pàgina web (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) que proveeix mètodes per a la cerca de les línies concretes disponibles a la base de dades que posseeixen

una inserció de T-DNA al voltant del gen d'interès. A més, les llavors de les línies d'inserció per T-DNA es dipositaren en bancs de germoplasma internacionals, com ara l'*Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC; <http://abrc.osu.edu>) a la Universitat Estatal d'Ohio, als EUA, o el European *Arabidopsis* Stock Centre a la Universitat de Nottingham (NASC; <http://arabidopsis.info>) al Regne Unit. Més o menys al mateix temps, altres consorcis públics o privats van incrementar el nombre de línies disponibles per inserció de T-DNA, com ara les col·leccions SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library, generada per l'empresa de llavors Syngenta), Wisconsin (generada per la Universitat de Wisconsin) i GABI-KAT (generada al Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Colònia, Alemanya). S'ha estimat que les 379.674 línies catalogades a la pàgina web del SIGnAL, que també inclou la informació de les altres col·leccions esmentades, etiqueten 30.280 gens del 33.003 gens predits en el genoma d'*Arabidopsis* (Krishnan *et al.*, 2009). Aquesta facilitat en l'accés i distribució de les llavors dels mutants a tota la comunitat científica internacional ha permès l'anàlisi d'hipòtesis sobre la funció de gens concrets a un ritme sense precedents.

LES COL·LECCIONS DE MUTANTS DE T-DNA AL SERVEI DE LA GENÈTICA CLÀSSICA

A partir d'un cribratge genètic clàssic es poden trobar diversos mutants amb fenotips semblants. Després de les anàlisis genètiques es comú trobar que els diferents mutants corresponen a diferents al·lells o versions mutades del mateix gen. No obstant això, de vegades només es troba un sol al·lel mutant, fet que redueix la certesa que el fenotip mutat és causat per la pèrdua de

la funció en el gen identificat (és a dir, que es tracta d'un allel KO, de l'anglès *knock out*). A partir del gen identificat, una cerca en les col·leccions de mutants per T-DNA ofereix la possibilitat de trobar nous allels mutants en el gen d'interès i reanalitzar el fenotip d'aquestes noves línies. Si el fenotip mostrat pels diferents allels identificats coincideix, es pot afirmar amb certesa que el gen identificat per mitjà de la genètica clàssica és el responsable de la funció estudiada. Com a exemple es mostra el fenotip adult de plantes mutants en el gen *RIF1*. L'allel *rif1-1* va ser l'únic mutant identificat en un cribratge en què es buscaven plàntules amb fenotip «resistent a la inhibició per fosmidomicina» (*rif*, de l'anglès *resistant to inhibition by fosmidomycin*), un inhibidor específic de la biosíntesi d'isoprenoides plàstidics. A més del fenotip *rif*, detectat en estadi de plàntula, les plantes adultes mostren unes rosetes més petites i pallidesa en les fulles més joves. La identificació de dues línies addicionals en altres col·leccions de plantes mutades per inserció de T-DNA, indicades a la figura com els allels *rif1-2* i *rif1-3*, va mostrar un fenotip en estadi de plàntula (Flores-Perez *et al.*, 2008) i adult igual que el de l'allel mutant original *rif1-1* (vegeu la figura 1), fet que va permetre confirmar que tots els fenotips descrits per als mutants *rif1* són deguts a la pèrdua de funció del gen anomenat com a *RIF1*.

LA SOBREEXPRESSIÓ GÈNICA: UNA ESTRATÈGIA COMPLEMENTÀRIA PER ALS ESTUDIS DE LA FUNCIÓ GÈNICA

L'obtenció de línies de plantes amb nivells reduïts o nuls (mutants KO) en l'expressió d'un sol gen com una eina per entendre la funció gènica del gen afectat

també s'ha complementat normalment amb la generació de plantes transgèniques amb nivells incrementats del gen d'estudi (sobreexpressió constitutiva) o expressant-lo en teixits o cèl·lules en què normalment no s'expressa (expressió ectòpica). Aquesta aproximació pot respondre a preguntes com ara si els nivells d'expressió del gen són limitants per a certs processos, si la regulació de l'expressió temporal o espacial es requereix per a la funció normal, o si els canvis en l'abundància d'una proteïna són deguts a canvis en l'expressió del gen que la codifica, indicatius de la seua regulació transcripcional, o de l'estabilitat de l'mRNA o de la proteïna, indicadors de la seua regulació a escala posttranscripcional o posttraduccional.

La manera més senzilla de sobreexpressar un gen és fusionar el cDNA del gen d'interès a un promotor constitutiu, el més conegut dels quals és el promotor 35S del virus del mosaic de la coliflor (anomenat CaMV 35S, o simplement 35S). Si les plantes transgèniques resultants presenten un fenotip diferenciat, se solen referir com a *mutants de guany de funció*, ja que el seu fenotip és la conseqüència de l'increment en els nivells d'expressió del gen d'interès, i molt probablement per l'augment en la funció exercida per la proteïna transgènica

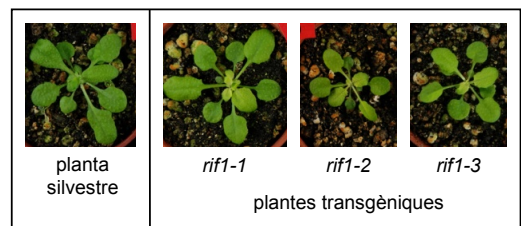


FIGURA 1. Fenotip de plantes adultes mutants *rif1*. El mutant *rif1-1* es va identificar en el cribratge genètic directe. Després de la identificació del gen *RIF1*, els allels mutants *rif1-2* i *rif1-3* es van identificar en la col·lecció de mutants SALK i la del Cold Spring Harbor Laboratory Ds-GeneTrap, respectivament.

codificada. La sobreexpressió d'un gen sota el control del promotor 35S té, no obstant això, algunes limitacions. Per un costat, el promotor 35S no és vertaderament constitutiu en el sentit que la seua expressió, sent ubíqua, no és igual en tots els teixits o estadis de desenvolupament. A més, l'expressió constitutiva d'un gen pot ser perjudicial per a la planta, i per tant pot ser difícil (si no impossible) obtenir línies transformades estables. A la figura 2 es mostra l'efecte en el desenvolupament d'*Arabidopsis* de la sobreexpressió d'un gen, anomenat *ATHB2*, que codifica un factor de transcripció que s'ha implicat en la re-

gulació de la síndrome de fugida de l'ombra (Steindler *et al.*, 1999; Roig-Villanova *et al.*, 2006). Les plantes transgèniques adultes presenten un nanisme accentuat en comparació de les plantes silvestres (no transgèniques). L'efecte de la sobreexpressió del gen *ATHB2* també redueix la fertilitat (vegeu la figura 2b), fet que dificulta el manteniment d'aquesta línia. La sobreexpressió constitutiva d'altres gens que codifiquen factors de transcripció estructuralment relacionats amb *ATHB2*, com *HAT2* i *ATHB4*, també provoca efectes dràstics en el desenvolupament de la planta i fertilitat baixa o nul·la (Sawa *et al.*, 2002; Sorin *et al.*, 2009). En aquests casos, l'ús de promotors específic de teixits o de sistemes per a l'expressió induïble del gen d'interès són alternatives viables.

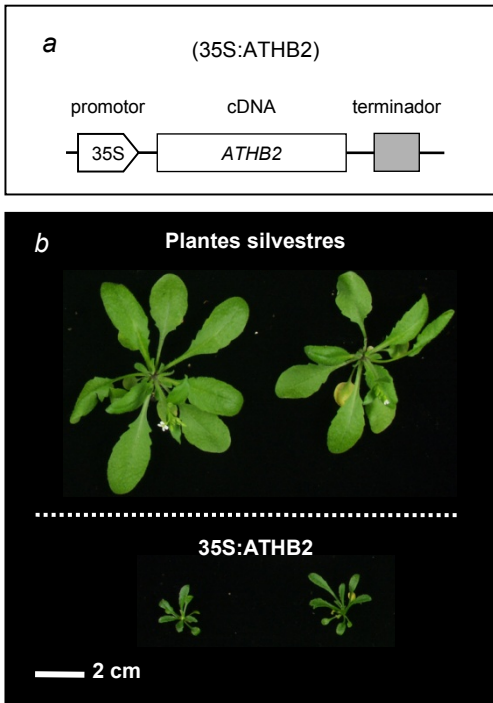


FIGURA 2. Plantes transgèniques d'*Arabidopsis* que sobreexpressen el gen *ATHB2* sota el control del promotor 35S. a) Esquema de la construcció introduïda en *Arabidopsis*, indicada com a 35S:ATHB2. b) Aspecte de plantes no transgèniques (plantes silvestres) i el de plantes que sobreexpressen *ATHB2* (35S:ATHB2) crescudes durant tres setmanes a l'hivernacle.

LA REDUCCIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA AMB PLANTES TRANSGÈNIQUES: QUAN LES COLLECCIONS DE MUTANTS DE T-DNA NO SÓN SUFICIENTS

Tal com s'ha esmentat, les col·leccions de mutants per inserció de T-DNA d'*Arabidopsis* disponibles no cobreixen tots els possibles gens predits en *Arabidopsis*. A més, depenent del lloc d'inserció del T-DNA en l'estructura d'un gen —regió promotora o terminadora, regió codificant (ORF), introns, exons o regions transcrites però no traduïdes, també conegudes com a UTR, de l'anglès *untranslated regions*—, aquesta no provoca necessàriament una pèrdua o reducció en la funció del gen etiquetat (vegeu la figura 3). Aquest fet provoca que la quantitat de línies KO siga molt inferior als més de 30.000 gens etiquetats, i rebaixa el nombre de línies útils en les col·leccions de mutants catalogades dis-

ponibles. Com a conseqüència, si no es disposa de mutants de pèrdua o reducció de funció del gen d'estudi, s'ha de procedir a obtenir línies de reducció de funció en un gen concret mitjançant la generació de plantes transgèniques que sobreexpressen RNA antisentit, RNA interferent (RNAi) o un microRNA artificial (amiRNA) contra el gen que es vol suprimir.

L'expressió d'un RNA antisentit d'un gen d'interès permet que, en hibridar amb l'RNA sentit producte del gen endogen, es

genere un RNA dúplex, el qual és degradat per mecanismes de seguretat cel·lulars. Com a conseqüència, l'expressió d'un RNA antisentit pot reduir amb certa eficàcia els nivells del gen endogen corresponent. El procediment clàssic és clonar un fragment o tot el cDNA del gen d'estudi en orientació contrària davant d'un promotor fort, transformar plantes transgèniques amb aquesta construcció i, mitjançant anàlisis moleculars, analitzar el fenotip d'aquelles línies que mostren una reducció en els ni-

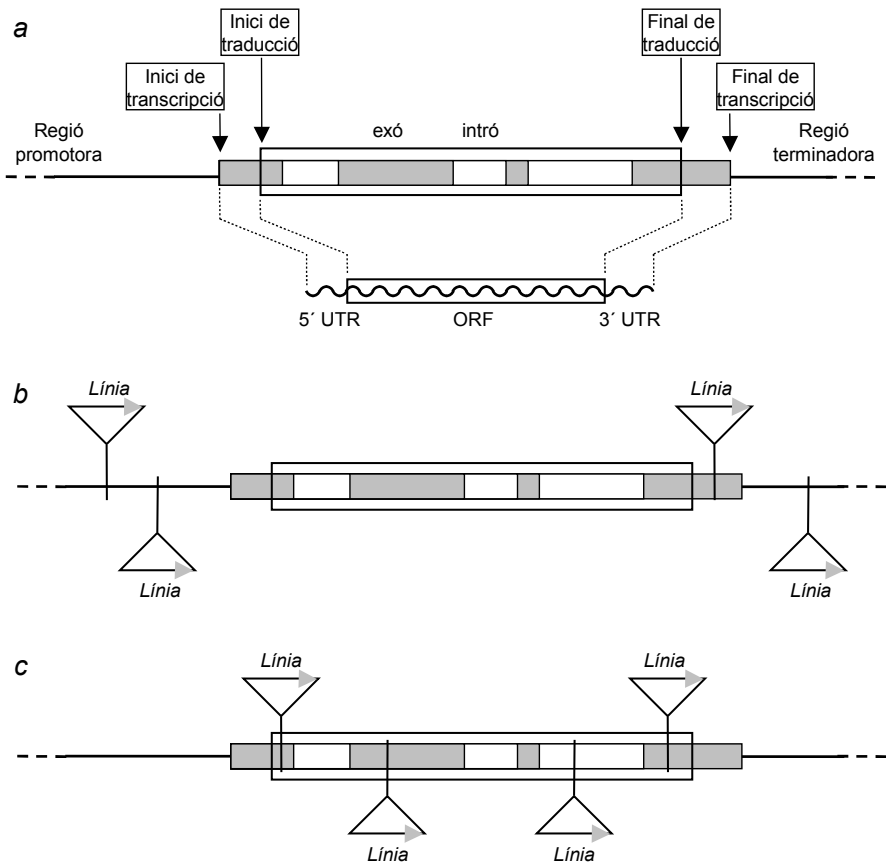


FIGURA 3. El lloc d'inserció del T-DNA pot afectar l'expressió del gen alterat. *a*) Estructura general d'un gen. *b*) Quan el T-DNA s'insereix fora de la regió codificant (ORF, de l'anglès *open reading frame*) és difícil predir si l'expressió del gen està afectada. *c*) Quan el T-DNA s'insereix dins de l'ORF, l'expressió del gen pot estar més o menys alterada, però el producte gènic pot ser afuncional. Les insercions dins de l'ORF és probable que resulten en mutants KO.

vells de l'RNA endogen. Idealment, almenys unes poques línies transgèniques independents obtingudes haurien de mostrar un fenotip nou. Si el gen d'interès forma part d'una família de gens estructuralment relacionats, l'elecció d'una part d'una seqüència del cDNA única o compartida entre els membres de la família pot silenciar un o diversos membres de la família, respectivament, tot i que és difícil predir el comportament de l'RNA antisentit en aquest aspecte.

De vegades, la sobreexpressió d'un gen d'interès, és a dir, de l'RNA sentit del gen *A*, pot provocar l'efecte contrari al desitjat, i pot silenciar l'expressió del gen endogen i provocar fenotips de pèrdua o reducció de funció. S'ha postulat que aquest procés de silenciament d'un gen, conegut com a *co-supressió*, es pot aconseguir pel bloqueig de la transcripció del gen endogen o per la inducció de la degradació dels transcrits produïts pel gen endogen. Aquest últim procés, conegut com a *silenciament gènic posttranscripcional* (PTGS, de l'anglès *post-transcriptional gene silencing*) es creu que té lloc per la presència de RNA de doble cadena que resultaria de la presència de transcrits antisentit generats per promotors críptics, bé en les seqüències del T-DNA o en les regions genòmiques adjacents (Waterhouse *et al.*, 1998). Quan el PTGS es descobrí en animals es va anomenar *RNA interferent* (RNAi, de l'anglès *double stranded RNA interference*). Actualment en plantes aquest terme també s'utilitza per referir-se al PTGS (Chuang i Meyerowitz, 2000).

A més de les dues formes indicades, l'RNA de doble cadena també es pot produir transformant plantes amb una construcció per expressar un sol transcrit que conté seqüències autocomplementàries. La formació de l'RNA de doble cadena s'afavoreix si les seqüències autocomplementàries estan separades per una petita regió

no complementària d'almenys quatre bases. Com que pareix important que els nivells de l'RNA sentit i antisentit siguin similars, la sobreexpressió d'un RNA de doble cadena és la millor opció per silenciar un gen o grup de gens utilitzant plantes transgèniques. Aquest RNA de doble cadena formaria una estructura semblant a una forquilla i resulta més eficient que la sobreexpressió d'un RNA antisentit en la reducció de l'expressió del gen endogen d'interès (Wesley *et al.*, 2001).

Més recentment, s'ha desenvolupat la sobreexpressió de microRNA artificials (*artificial microRNA*, amiRNA) com una estratègia per suprimir l'expressió gènica de manera més específica i controlada (Ossowski *et al.*, 2008). Els microRNA (miRNA) constitueixen un grup nombrós de RNA de cadena simple endògens i de mida petita (19-24 nucleòtids) que tenen una funció reguladora negativa en l'expressió gènica. Els miRNA de plantes reprimeixen la funció dels seus gens diana (normalment transcrits que codifiquen proteïnes) i n'indueixen la degradació. Per tant, la sobreexpressió de miRNA produeix una reducció dels nivells de l'mRNA dels gens diana. Els amiRNA són RNA de vint-i-un nucleòtids que es poden manipular genèticament per silenciar específicament un gen o una família gènica d'interès. Hi ha pàgines web que ajuden al disseny dels oligonucleòtids més adients per al silenciament d'un gen o gens d'interès mitjançant aquesta estratègia (<http://wmd3.weigelworld.org>). Un avantatge d'aquesta tecnologia és l'aplicació en espècies d'estudi o interès aplicat transformables genèticament però per a les quals no es disposa de col·leccions de mutants per inserció de T-DNA ben desenvolupades. A més, el disseny dels amiRNA permet controlar els gens diana, de manera que aquest sistema permet silenciar un gen sol o un grup de gens es-

tracturalment relacionats utilitzant plantes transgèniques. Això pot ser especialment important quan es treballa amb gens relacionats adjacents (probablement redundants) o molt a prop en el mateix cromosoma (repeticions en tàndem).

ALTRES USOS DE LES PLANTES TRANSGÈNIQUES: FUSIONS A GENS MARCADORS PER INDICAR O CONTROLAR LA LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR D'UNA PROTEÏNA D'INTERÈS

Fusions a GUS i GFP

Una part fonamental per entendre la funció gènica és establir la localització subcel·lular de la proteïna que codifica. La seqüència primària de la proteïna pot indicar o suggerir una localització subcel·lular, bé perquè mostra homologia amb proteïnes de funció i localització subcel·lular coneguda, bé perquè les seues anàlisis bioinformàtiques suggereixen l'existència de dominis responsables d'una certa localització subcel·lular, com per exemple pèptids de localització plastídica o mitocondrial en

35S:PAR1-GUS-GFP

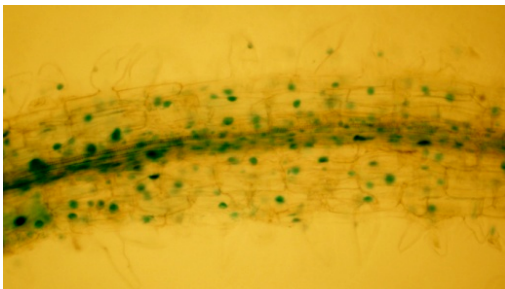


FIGURA 4. Localització subcel·lular de la proteïna PAR1 fusionada a les proteïnes reporteres GUS i GFP visualitzada mitjançant una tinció histoquímica de l'activitat GUS en arrels de plantes transgèniques.

l'extrem aminoterminal de la proteïna, seqüències de localització nuclear (NLS, de l'anglès *nuclear localization signal*) o dominis de localització transmembrana o en la paret cel·lular. No obstant aquestes anàlisis, només mitjançant la demostració experimental es pot concloure aquest aspecte de la funció gènica. La manera més directa d'esbrinar aquest aspecte és la utilització de mètodes bioquímics de fraccionament subcel·lular combinats amb la detecció immunoespecífica de la proteïna d'estudi. Quan no es disposa d'anticossos específics contra el producte del gen analitzat, una alternativa complementària és l'expressió en plantes de la fusió del cDNA del gen d'interès a gens reporters, com el que codifica la β -glucuronidasa (activitat GUS) o la proteïna fluorescent verda (GFP). Aquests dos gens reporters produeixen activitats fàcilment detectables amb equipaments disponibles en la majoria dels centres de recerca del nostre entorn. Tal com es mostra a la figura 4, plantes transgèniques que sobreexpressen constitutivament el gen *PAR1* fusionat al doble gen reporter *GUS-GFP* mostren activitat GUS immunohistoquímica en el nucli cel·lular. Com que la proteïna GUS-GFP sola es localitza en el citoplasma, la distribució observada s'explica com que la proteïna PAR1 conté seqüències de tipus NLS que en determinen la localització nuclear. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts de l'anàlisi de l'activitat GFP (Roig-Villanova *et al.*, 2007). S'han fet experiments semblants amb proteïnes plastídiques (Flores-Perez *et al.*, 2008), de membrana (Speth *et al.*, 2009) o de paret (Rodríguez-Concepcion *et al.*, 2001).

Fusions al receptor de glucocorticoides (GR)

Quan es treballa amb factors reguladors de la transcripció s'assumeix que aquestes proteïnes actuen al nucli de les cèl·lules vegetals. En aquest camp està relativament estesa la sobreexpressió en plantes de fusions del factor de transcripció estudiat (FT) amb el receptor de glucocorticoides (GR) de mamífers (FT-GR). Aquesta estratègia es basa en el fet que, igual que en animals i llevats, els productes gènics dels gens *HSP90* (del grup de les *heat shock proteins*) endògens de plantes s'uneixen al domini GR de la proteïna de fusió FT-GR en absència de les hormones glucocorticoides, i aquesta unió reté la proteïna transgènica al citoplasma celular. El tractament amb glucocorticoides provoca que la proteïna de fusió FT-GR se separe de les proteïnes productes dels gens *HSP90* i entre al nucli de la cèl·lula. Com que els tractaments amb glucocorticoides normalment tenen poc o cap efecte secundari en plantes, aquest sistema s'utilitza amb èxit per controlar la translocació nuclear de proteïnes nuclears, especialment factors reguladors de la transcripció (Sablowski i Meyerowitz, 1998; Wagner *et al.*, 1999; Sawa *et al.*, 2002; Roig-Villanova *et al.*, 2007; Sorin *et al.*, 2009).

COLLECCIONS ESPECIALS PER ENTENDRE LA FUNCIO GÈNICA: ACTIVATION TAGGING, ENHANCER-TRAPS I GENE-TRAPS

La relativa rapidesa i simplicitat assolides pels protocols de transformació d'*Arabidopsis* ha estimulat la imaginació de molts investigadors, que han posat en marxa versions especialitzades de T-DNA per a la generació de poblacions mutagenitzades amb característiques noves d'interès.

És el cas de les col·leccions de mutants *enhancer-trap*, *gene-trap* i *activation tagging*.

Col·leccions *enhancer-* i *gene-trap*

En les anàlisis de la funció gènica, un altre aspecte molt important és el coneixement del patró d'expressió del gen d'interès. Les anàlisis transcriptòmiques mitjançant microxips han ajudat a disposar d'informació global i pública sobre els patrons d'expressió en diferents teixits o tipus cel·lulars (per exemple, The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics, accessible a <http://bbc.botany.utoronto.ca>; Genevestigator, accessible a <https://www.genevestigator.com>). Aquests resultats també es poden complementar amb tècniques d'hibridació *in situ* específiques per al gen d'estudi. No obstant això, si la resolució o sensibilitat d'aquestes tècniques no és suficient i no proveeixen suficient informació, el cribratge de línies de *gene-trap* i *enhancer-trap* és una opció que cal considerar.

El principi general en aquestes aproximacions és generar una col·lecció de mutants per inserció de T-DNA utilitzant un vector perquè s'integre en els diferents llocs del genoma de la planta un gen reporter al qual li manca un promotor (*gene-trap*) o només du un promotor mínim (*enhancer-trap*). Com a reporters s'utilitzen normalment el gen *GUS* i el de la *GFP*, ja que produeixen activitats fàcilment visibles. En aquestes línies, com en la resta de mutants per inserció, el T-DNA s'insereix en el genoma a l'atzar. Quan la inserció té lloc dins o a prop d'un gen o d'una regió reguladora de tipus estimulador (en anglès, *enhancer*), el gen reporter s'expressa sota el control del promotor natiu (*gene-trap*) o dels elements estimuladors (*enhancer-trap*) dels gens que han «atrapat». Per tant, l'expressió del gen reporter represen-

ta i reflecteix l'expressió d'un gen endogen. Òbviament, en molts casos les insercions poden no tenir cap efecte en l'expressió dels gens reporters, ja que la detecció d'activitat és fortament dependent del lloc d'inserció (vegeu la figura 3). En conseqüència, aquestes estratègies en general produeixen una baixa freqüència de línies útils. Com les constriccions d'inserció pel sistema d'*enhancer-trap* són menors, aquestes insercions produeixen una freqüència més alta de patrons d'expressió que les derivades de les línies del *gene-trap*. En les col·leccions d'*enhancer-* i *gene-trap* generades s'han observat diferents patrons d'expressió dels gens reporters (Sundaresan *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999; Springer, 2000). Si bé s'han detectat línies en les quals el patró d'expressió del reporter és ubic, és a dir, l'expressió es mostrava en la majoria de les cèl·lules i teixits vegetals, i era més comú detectar l'expressió limitada a uns pocs teixits o tipus cel·lulars.

S'ha descrit una col·lecció *enhancer-trap* d'unes trenta línies seleccionades perquè mostren patrons d'expressió del gen reporter *GUS* que són útils en l'ensenyament d'anatomia vegetal. Aquestes línies poden ajudar als estudiants a identificar tipus cel·lulars, teixits, sistemes de teixits i l'evolució dels patrons d'expressió durant el desenvolupament. Tot i que aquestes línies no estan caracteritzades molecularment, ja que es desconeixen els gens afectats per l'inserit, són útils com a marcadors i ja s'han convertit en una nova eina en l'ensenyament (Geisler *et al.*, 2002).

Col·leccions d'*activation tagging*

En els cribratges genètics, la utilització exclusiva de col·leccions de mutants produïts per pèrdua de funció pot limitar la identificació de gens si el procés estudiat

està controlat per un grup de gens que actuen redundamment. El «problema» de la redundància gènica és molt més habitual del que inicialment s'havia considerat i, amb la seqüenciació del genoma d'*Arabidopsis* (i d'altres espècies vegetals), s'ha posat de manifest la duplicació de moltes regions del genoma i també l'existència de famílies de gens estructuralment pareguts i amb patrons d'expressió superposats. De fet, la popularització de les estratègies de genètica inversa i la disponibilitat de col·leccions de mutants per inserció de T-DNA ha provat que, almenys, és tan habitual com excepcional que la pèrdua de funció de només un dels membres d'una família gènica no provoqui canvis fenotípics. Un segon problema quan s'analitzen mutants de pèrdua de funció és l'anàlisi de mutants requerits per a la viabilitat de la planta, com ara els que resulten en embrions o gametòfits (pollen o òvuls) letals. En el cas de gens de funció redundants en una determinada ruta genètica també es poden identificar si un excés en l'expressió d'aquests gens és suficient per alterar la ruta analitzada. En el cas de gens essencials per a la supervivència de la planta, la identificació serà possible sempre que l'expressió ectòpica o incrementada del gen sigui compatible amb la supervivència de l'individu.

Un exemple del primer cas són alguns mutants en components implicats en la regulació de la síndrome de fugida de l'ombra en *Arabidopsis*. Mentre que la sobreexpressió d'*ATHB4* resulta en una forta alteració en la resposta de la planta a la proximitat vegetal, la pèrdua de funció no té cap efecte ni en la morfologia de la planta ni en les seues respostes a la proximitat vegetal. Tampoc no té cap efecte la pèrdua de funció en *HAT3*, el gen més paregut a *ATHB4* de tot el genoma d'*Arabidopsis*. La combinació de mutacions de pèrdua de funció en *ATHB4* i en el seu homòleg

HAT3 provoca, al contrari, una alteració clara tant en la morfologia de la planta com en la seua resposta a la proximitat vegetal, i confirma la participació d'aquests gens estructuralment relacionats en la regulació de la síndrome de fugida de l'ombra (Sorin *et al.*, 2009). A més, confirma que *ATHB4* i *HAT3* són redundants en la regulació del procés analitzat.

Els fenotips de guany de funció es poden causar per mutacions en la regió codificant d'un gen que resulten en una proteïna amb una activitat augmentada, o per mutacions que incrementen els nivells d'expressió del gen. La manera més directa d'induir aquestes mutacions en poblacions mutagenitzades per la inserció d'un T-DNA va ser desenvolupada ja fa alguns anys en *Arabidopsis* per mitjà de la construcció d'un vector de T-DNA que contenia quatre còpies d'un element estimulador del promotor constituïtiu 35S. Aquests estimuladors poden provocar l'activació transcripcional de gens localitzats en la proximitat del lloc d'inserció del T-DNA. Per tant, com que els gens activats estan etiquetats (de l'anglès *tagged*) per la inserció del T-DNA, aquesta aproximació s'anomena *activation tagging*. Utilitzant aquesta estratègia, diferents grups han generat milers de plantes transgèniques que configuren diverses col·leccions d'*activation tagging*, algunes de les quals estan dipositades en les bases de llavors i poden ser utilitzades pels grups de recerca per dur a terme el seu cribratge genètic favorit.

Les anàlisis d'aquestes línies per part de diferents laboratoris han mostrat dos fets importants que cal considerar: *a)* com que la inserció del T-DNA és a l'atzar, moltes de les línies de les col·leccions d'*activation tagging* no són mutants de guany de funció, sinó de pèrdua de funció (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004; Sauret-Gueto *et al.*, 2006; Flores-Perez *et al.*, 2008), i *b)* quan la

inserció cau fora de regions transcrites, la majoria dels gens adjacents al lloc d'inserció del T-DNA estan sobreexpressats, fet que facilita la identificació dels gens responsables de la mutació pel guany de funció (Weigel *et al.*, 2000).

Una vegada identificat un mutant de guany de funció (i per tant, genèticament dominant) en el procés d'interès, si la caracterització molecular mostra que en la línia que presenta el fenotip mutant hi ha un gen sobreexpressat, s'ha de demostrar inequívocament que aquest és el gen responsable (i per tant la causa) del fenotip identificat en el cribratge genètic. Com a complement de les anàlisis genètiques que permeten correlacionar el fenotip mutant amb la presència del T-DNA, l'estratègia més neta i elegant és l'aïllament d'una regió genòmica del mutant que continga el gen afectat sota el control dels estimuladors del 35S i la transformació posterior de plantes silvestres amb aquesta regió genòmica. Alternativament, si es disposa del cDNA del gen afectat, es pot inserir en un vector per sobreexpressar-lo sota el control del promotor constituïtiu 35S. Les plantes transgèniques resultants haurien de recapitular el fenotip presentat pel mutant original. Aquests estudis, quan siga possible, s'haurien de complementar amb les anàlisis de mutants de pèrdua de funció en els gens afectats, tot i que, com ja s'ha comentat, la redundància gènica pot impedir la visualització fàcil de fenotips relacionats.

AGRAÏMENTS

Als membres del laboratori, al doctor Manuel Rodríguez-Concepción per les imatges dels mutants *rif*; i al Ministeri de Ciència i Innovació (BIO2008-00169, CSD2007-00036, programes FPU i FPI), al CSIC (programes JAEdoc i JAEpre) i a la

Generalitat de Catalunya (Xarxa de Referència en Biotecnologia, 2009 SGR697) pel finançament.

BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, J. M.; STEPANOVA, A. N.; LEISSE, T. J.; KIM, C. J.; CHEN, H.; SHINN, P.; STEVENSON, D. K.; ZIMMERMAN, J.; BARAJAS, P.; CHEUK, R.; GADRINAB, C.; HELLER, C.; JESKE, A.; KOESEMA, E.; MEYERS, C. C.; PARKER, H.; PREDNIS, L.; ANSARI, Y.; CHOY, N.; DEEN, H.; GERALT, M.; HAZARI, N.; HOM, E.; KARNES, M.; MULHOLLAND, C.; NDUBAKU, R.; SCHMIDT, I.; GUZMAN, P.; AGUILAR-HENONIN, L.; SCHMID, M.; WEIGEL, D.; CARTER, D. E.; MARCHAND, T.; RISSEEUW, E.; BROGDEN, D.; ZEKO, A.; CROSBY, W. L.; BERRY, C. C.; ECKER, J. R. (2003). «Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*». *Science*, 301: 653-657.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000). «Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*». *Nature*, 408: 796-815.
- BENEDITO, V. A.; TORRES-JEREZ, I.; MURRAY, J. D.; ANDRIANKAJA, A.; ALLEN, S.; KAKAR, K.; WANDREY, M.; VERDIER, J.; ZUBER, H.; OTT, T.; MOREAU, S.; NIEBEL, A.; FRICKEY, T.; WEILLER, G.; HE, J.; DAI, X.; ZHAO, P. X.; TANG, Y.; UDVARDI, M. K. (2008). «A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*». *Plant J.*, 55: 504-513.
- CAMPISI, L.; YANG, Y.; YI, Y.; HEILIG, E.; HERMAN, B.; CASSISTA, A. J.; ALLEN, D. W.; XIANG, H.; JACK, T. (1999). «Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis*; characterization of expression patterns in the inflorescence». *Plant J.*, 17: 699-707.
- CHUANG, C. F.; MEYEROWITZ, E. M. (2000). «Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4985-4990.
- FANKHAUSER, C.; CASAL, J. J. (2004). «Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant». *Plant J.*, 39: 747-760.
- FLORES-PEREZ, U.; SAURET-GUETO, S.; GAS, E.; JARVIS, P.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. (2008). «A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids». *Plant Cell*, 20: 1303-1315.
- GEISLER, M.; JABLONSKA, B.; SPRINGER, P. S. (2002). «Enhancer trap expression patterns provide a novel teaching resource». *Plant Physiol.*, 130: 1747-1753.
- KRISHNAN, A.; GUIDERDONI, E.; AN, G.; HSING, Y. I.; HAN, C. D.; LEE, M. C.; YU, S. M.; UPADHYAYA, N.; RAMACHANDRAN, S.; ZHANG, Q.; SUNDARESAN, V.; HIROCHIKA, H.; LEUNG, H.; PEREIRA, A. (2009). «Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses». *Plant Physiol.*, 149: 165-170.
- OSSOWSKI, S.; SCHWAB, R.; WEIGEL, D. (2008). «Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs». *Plant J.*, 53: 674-690.
- PARINOV, S.; SEVUGAN, M.; YE, D.; YANG, W. C.; KUMARAN, M.; SUNDARESAN, V. (1999). «Analysis of flanking sequences from dissociation insertion lines: a database for reverse genetics in *Arabidopsis*». *Plant Cell*, 11: 2263-2270.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; FORES, O.; MARTINEZ-GARCIA, J. F.; GONZALEZ, V.; PHILLIPS, M. A.; FERRER, A.; BORONAT, A. (2004). «Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development». *Plant Cell*, 16: 144-156.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; PEREZ-GARCIA, A.; BELTRAN, J. P. (2001). «Up-regulation of genes encoding novel extracellular proteins during fruit set in pea». *Plant Mol. Biol.*, 46: 373-382.
- ROIG-VILLANOVA, I.; BOU-TORRENT, J.; GALSTYAN, A.; CARRETERO-PAULET, L.; PORTOLES, S.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; MARTINEZ-GARCIA, J. F. (2007). «Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins». *Embo J.*, 26: 4756-4767.
- ROIG-VILLANOVA, I.; BOU, J.; SORIN, C.; DEVLIN, P. F.; MARTINEZ-GARCIA, J. F. (2006). «Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in *Arabidopsis*». *Plant Physiol.*, 141: 85-96.
- SABLOWSKI, R. W.; MEYEROWITZ, E. M. (1998). «A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*». *Cell*, 92: 93-103.
- SAURET-GUETO, S.; BOTELLA-PAVIA, P.; FLORES-PEREZ, U.; MARTINEZ-GARCIA, J. F.; SAN ROMAN, C.; LEON, P.; BORONAT, A.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. (2006). «Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in *Arabidopsis*». *Plant Physiol.*, 141: 75-84.
- SAWA, S.; OHGISHI, M.; GODA, H.; HIGUCHI, K.; SHIMADA, Y.; YOSHIDA, S.; KOSHIBA, T. (2002). «The *HAT2* gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*». *Plant J.*, 32: 1011-1022.

- SIMPSON, G. G.; DEAN, C. (2002). «Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time?» *Science*, 296: 285-289.
- SORIN, C.; SALLA-MARTRET, M.; BOU-TORRENT, J.; ROIG-VILLANOVA, I.; MARTINEZ-GARCIA, J. F. (2009). «ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in Arabidopsis seedlings». *Plant J.*, 59: 266-277.
- SPETH, E. B.; IMBODEN, L.; HAUCK, P.; HE, S. Y. (2009). «Subcellular localization; functional analysis of the Arabidopsis GTPase RabE». *Plant Physiol.*, 149: 1824-1837.
- SPRINGER, P. S. (2000). «Gene traps: tools for plant development and genomics». *Plant Cell*, 12: 1007-1020.
- STEINDLER, C.; MATTEUCCI, A.; SESSA, G.; WEIMAR, T.; OHGISHI, M.; AOYAMA, T.; MORELLI, G.; RUBERTI, I. (1999). «Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression». *Development*, 126: 4235-4245.
- SUNDARESAN, V.; SPRINGER, P.; VOLPE, T.; HAWARD, S.; JONES, J. D.; DEAN, C.; MA, H.; MARTIENSSEN, R. (1995). «Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements». *Genes Dev.*, 9: 1797-1810.
- WAGNER, D.; SABLÓWSKI, R. W.; MEYEROWITZ, E. M. (1999). «Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY». *Science*, 285: 582-584.
- WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M. B. (1998). «Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 13959-13964.
- WEIGEL, D.; AHN, J. H.; BLAZQUEZ, M. A.; BOREVITZ, J. O.; CHRISTENSEN, S. K.; FANKHAUSER, C.; FERRANDIZ, C.; KARDAILSKY, I.; MALANCHARUVIL, E. J.; NEFF, M. M.; NGUYEN, J. T.; SATO, S.; WANG, Z. Y.; XIA, Y.; DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J.; YANOFSKY, M. F.; CHORY, J. (2000). «Activation tagging in Arabidopsis». *Plant Physiol.*, 122: 1003-1013.
- WESLEY, S. V.; HELLIWELL, C. A.; SMITH, N. A.; WANG, M. B.; ROUSE, D. T.; LIU, Q.; GOODING, P. S.; SINGH, S. P.; ABBOTT, D.; STOUTJESDIJK, P. A.; ROBINSON, S. P.; GLEAVE, A. P.; GREEN, A. G.; WATERHOUSE, P. M. (2001). «Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants». *Plant J.*, 27: 581-590.
- YAMAGUCHI, S. (2008). «Gibberellin metabolism and its regulation». *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 225-251.
- YOUNG, N. D.; UDVARDI, M. (2009). «Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes». *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12: 193-201.