



**VNIVERSIDAD
SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

VICERRECTORADO DE POLITICA ACADEMICA
PROGRAMA PROPIO DE CALIDAD EN LA ENSEÑANZA
PLANES DE FORMACION, INNOVACIÓN Y MEJORA DOCENTE

**CONVOCATORIA DE AYUDAS
A PROYECTOS DE INNOVACION Y
MEJORA DOCENTE
Curso 2012-2013**

MEMORIA DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO ID2012/144

**EMPLEO DE MUTANTES DE *Arabidopsis thaliana*
PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS Y MECANISMO
DE ACCIÓN DE LOS BRASINOESTEROIDES**

Coordinador: José Ignacio Martín Sánchez

Título:

Empleo de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para el estudio de los efectos y mecanismo de acción de los brasinoesteroides.

Código del proyecto:

ID2012/144

Asignatura a la que se dirige:

Señalización y Diferenciación
(Master en Biología Celular y Molecular, Facultad de Biología)

Integrantes del equipo:

José Ignacio Martín Sánchez (Coordinador) e-mail: a56562@usal.es

Jesús Sánchez Yagüe

Carmen Sánchez Bernal

José Ignacio San Román García

INTRODUCCIÓN

Disponer de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en las rutas de síntesis y señalización de las distintas hormonas vegetales ha permitido avanzar, no solo en el estudio de las proteínas implicadas en los distintos pasos de estas rutas, si no también en el estudio de los procesos fisiológicos y los genes regulados por las mismas.

En este sentido, una primera aproximación para la identificación de las proteínas pertenecientes a estas rutas biosintéticas y de transducción de la señal es la caracterización fenotípica de los mutantes en relación con la adición exógena de la hormona correspondiente. Así, la reversión del fenotipo en presencia de hormona, podría indicar una mutación en el gen que codifica alguna de las enzimas de la ruta biosintética de la hormona, mientras que la ausencia de reversión indicaría una alteración de su ruta de transducción.

En nuestro laboratorio disponemos de diversos mutantes afectados tanto en la ruta de síntesis como de señalización de los brasinoesteroides, hormonas vegetales implicadas en procesos como la inducción del crecimiento de tallos, diferenciación vascular o germinación de las semillas. Dos de ellos, el mutante *det2* (deficiente en brasinoesteroides y mutado en el gen correspondiente a una 5- α -reductasa de la ruta de síntesis de estas hormonas) y *bin2*, (insensible a brasinoesteroides y mutado en el gen correspondiente a una serina/treonina kinasa de la ruta de señalización) presentan fenotipos claramente diferenciables, lo que los convierte en unos buenos candidatos para su uso como herramienta docente en el estudio de los procesos de señalización hormonal.

OBJETIVOS

Como objetivo del presente proyecto, nos planteamos acercar a los estudiantes a la utilización de los mutantes de *A. thaliana* como herramientas moleculares para el estudio del efecto y mecanismo de acción de las hormonas, así como al manejo de las técnicas más habituales a la hora de trabajar con esta especie vegetal.

Así, cada alumno tratará de identificar, mediante el análisis fenotípico de los mutantes creciendo en presencia/ausencia de brasinoesteroides, el tipo de mutación que presenta cada una de las plantas, prestando especial atención a aquellas características morfológicas relacionadas con esta fitohormona, lo que permitirá además, comprobar los efectos de su aplicación exógena en el desarrollo vegetal.

Por otra parte, para resaltar la importancia del uso de estos mutantes en el estudio de la señalización y regulación génica, durante estas prácticas se tratará de mostrar a los alumnos la utilidad de los mismos para el análisis de la actividad de promotores. Así, se

generarán plantas transgénicas de *A. thaliana* con construcciones en las que el promotor de distintos genes cuya expresión sea susceptible de ser regulada por brasinoesteroides esté fusionada a una proteína *reporter*, utilizando como fondo genético el mutante *det2*, deficiente en esta hormona. Esto nos permitirá disponer de líneas transgénicas sobre las que estudiar la activación de los distintos promotores dependiendo de la presencia o no de la citada hormona, que podrán analizarse en los próximos cursos académicos, constituyendo un valioso material docente para esta asignatura.

METODOLOGÍA

Durante las prácticas, a los alumnos se le suministrarán dos lotes de semillas “problema” (lote A y lote B), cada uno de ellos correspondiente a uno de los mutantes anteriormente citados. Los alumnos tratarán de determinar el fenotipo de las plántulas crecidas a partir de cada uno de estos lotes en presencia y ausencia de brasinoesteroides (siempre en comparación con plántulas de tipo silvestre) con objeto de identificar cada uno de ellos con el mutante al que pertenecen, indicando si se trata de un mutante afectado en la síntesis o en la ruta de señalización. Para ello, una vez esterilizadas y estratificadas las semillas de *arabidopsis* se sembrarán en placa con medio MS/Sacarosa, o medio MS/Sacarosa con 24-Epibrasinólido (brasinoesteroide comercial) 0,1 μM . y se crecerán durante 5 días, tanto en luz como en oscuridad realizando un seguimiento fenotípico de las distintas plantas creciendo en las diferentes condiciones.

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos identificado y clonado los promotores de diversos genes que codifican β -galactosidasas de *A. thaliana* (en concreto de los genes *BGAL1*, -2, -3, -4, -5 y 12) que, en base a estudios bioinformáticos, son susceptibles de responder a brasinoesteroides. Dado que disponemos de estos promotores clonados en vectores binarios que permiten la expresión *in planta* de la proteína *reporter GUS* (β -glucuronidasa) bajo la actividad de los mismos e introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58c1 m), en esta práctica se pretende que los alumnos generen plantas transgénicas de *A. thaliana* con estas construcciones, utilizando como fondo genético el mutante *det2* (deficiente en brasinoesteroides). Cada grupo (pareja) de alumnos realizará la infiltración correspondiente a una de las construcciones utilizando para ello el método de infiltración *in planta*, en el que la agrobacteria se pone en contacto con los capullos florales de *arabidopsis*, infectando el tejido y produciendo en último término gametos transformados.

Por otra parte, para completar estas prácticas y proporcionar a los alumnos una visión técnica más completa de los pasos a seguir en el análisis de los promotores, se suministrará a los alumnos distintos lotes de semillas transgénicas con los promotores de estos genes BGAL fusionados al gen GUS, esta vez realizadas sobre un fondo genético de tipo silvestre y obtenidas previamente en nuestro laboratorio. Así, podrán realizar la determinación de actividad de estos promotores mediante el ensayo de la β -glucuronidasa sobre plantas de 5 días crecidas en condiciones normales.

RESULTADOS

Una vez sembradas las semillas de cada uno de los lotes problemas, tanto en presencia como en ausencia de brasinólido, se procedió a la caracterización fenotípica de las plantas en cada uno de los casos.

Mediante la comparación de las plantas de tipo silvestre y de los dos mutantes creciendo únicamente en medio MS se han podido comprobar alguno de los efectos de los brasinoesteroides en el desarrollo. Así, las plantas mutadas, independientemente del tipo de mutación, muestran un fenotipo que refleja los procesos en los que estos reguladores del crecimiento están implicados. En el caso de las plantas creciendo en condiciones de oscuridad, tanto los mutantes pertenecientes al lote A (correspondientes al mutante *bin2*), como los del lote B (mutante *det2*), presentan hipocotilos más cortos y anchos y los cotiledones ligeramente más expandidos que las plantas de tipo silvestre, siendo estas características más típicas de plantas no etioladas. Por el contrario, los mutantes creciendo con fotoperiodo normal (16 horas de luz/8 de oscuridad), son más pequeños y más verdes que los de tipo silvestre. A modo de ejemplo, se muestra una imagen de plantas mutantes y de tipo silvestre de 5 días creciendo en condiciones etioladas (figura 1).

Así, los alumnos han podido constatar el efecto de estas fitohormonas en el desarrollo, pudiendo comprobar su implicación en los procesos de elongación de tallos e hipocotilos y su relación con los procesos de fotomorfogénesis.

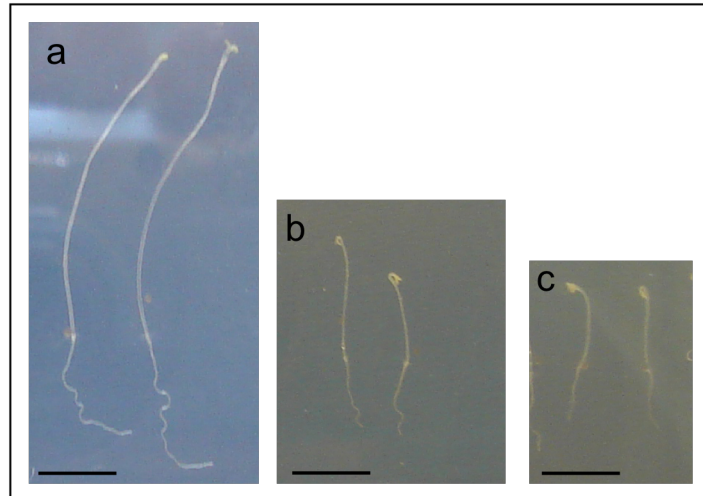


Figura 1. Plantas de arabisopsis de tipo silvestre (a), del mutante *bin2* (b) y del mutante *det2* (c) crecidas durante 5 días en oscuridad en medio MS.

En cuanto a la determinación del tipo de mutación que presentan cada uno de los lotes de semillas problema, como cabía esperar los correspondientes al lote A (mutante *bin2*, mutado en el gen correspondiente a una serina/treonina kinasa de la ruta de señalización) no presentaban una reversión del fenotipo cuando crecen en presencia de la hormona (figura 2b). Por el contrario, en los mutantes (*det2* deficientes en una 5- α -reductasa de la ruta de síntesis) si se observa, aunque de forma parcial, una reversión del fenotipo, tal y como puede apreciarse en la figura 2c, lo que ha permitido a los alumnos diferenciar entre los mutantes insensibles a brasinoesteroides y los deficientes en esta hormona.

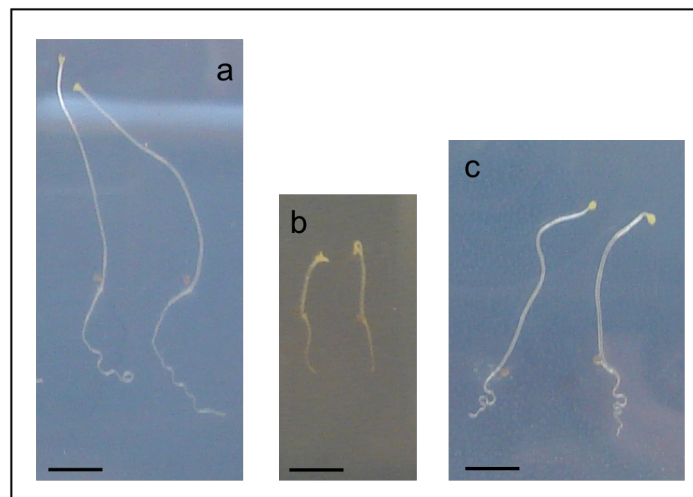


Figura 2. Plantas de arabisopsis de tipo silvestre (a), del mutante *bin2* (b) y del mutante *det2* (c) crecidas durante 5 días en oscuridad en medio MS (a) o en Medio MS suplementado con 24-Epibrasinólido 0,1 μ M (b y c).

La reversión parcial nos podría indicar una deficiencia en la concentración de hormona presente en el medio, siendo necesario ajustar de forma más precisa la concentración óptima de brasinólido en estas condiciones concretas, hecho que ha sido convenientemente explicado a los alumnos.

Por otra parte, se ha procedido a la transformación de plantas de *arabidopsis* del mutante *det2* utilizando para ello las construcciones correspondientes a los distintos promotores de los genes *BGAL* de las que disponemos en nuestro laboratorio. La transformación se ha realizado por el método de infiltración *in planta*, uno de los métodos más comúnmente utilizados al trabajar con esta especie vegetal. Durante la realización de esta práctica se ha presentado un problema metodológico derivado de las propias características anatómicas de los mutantes utilizados para la transformación. Estos mutantes presentan una marcada disminución en la masa radicular, lo que genera que las plantas no se fijen al sustrato de forma correcta. No obstante, se pudo resolver este problema y en principio se realizó la infiltración de forma correcta, siempre a la espera de la comprobación de la inserción del transgén una vez obtenidos los semilleros correspondientes, lo que se realizará con la mayor brevedad posible de cara al próximo curso.

Para finalizar estas prácticas, los alumnos han realizado un análisis de la actividad de los promotores de los distintos genes *BGAL* sobre un fondo genético de tipo silvestre mediante el ensayo de la β -glucuronidasa. De esta manera, han podido comprobar la especificidad de los mismos en los distintos órganos de las plantas utilizadas. A modo de ejemplo se muestran los resultados correspondientes al promotor de los genes (*BGAL12*) en plántulas etioladas de 5 días, donde se puede ver una activación específica de este promotor en la base del hipocotilo (figura 3a) y en los cotiledones (figuras 3a y 3b).

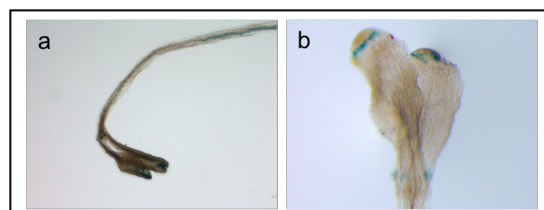


Figura 3. Actividad del promotor del gen *BGAL12* en plantas etioladas de 5 días de *arabidopsis*.

Estos datos servirán como referencia a la hora de analizar los resultados obtenidos con las líneas transgénicas generadas sobre el fondo genético *det2* de cara a cursos posteriores, en los que se utilizarán las líneas obtenidas en estas prácticas.

CONCRECIÓN DE LOS OBJETIVOS PROPUESTOS

Mediante estas prácticas se ha iniciado a los alumnos a las técnicas básicas de trabajo más comúnmente utilizadas con la planta modelo *A. thaliana*. Así, han adquirido conocimientos técnicos sobre siembra, crecimiento, caracterización fenotípica, transformación genética y análisis de proteínas *reporter*.

Además, les ha permitido el estudio *in vivo* de los efectos de los brasinoesteroides en el desarrollo vegetal, pudiendo comprobar directamente su acción sobre determinados procesos, como la elongación o la fotomorfogénesis y se han familiarizado con el empleo de mutantes en estudios de los mecanismos de síntesis y transducción de las fitohormonas. De esta forma los alumnos han completado los conocimientos adquiridos mediante la docencia teórica y han tenido acceso a la metodología básica para el análisis de la actividad de los promotores y los mecanismos de acción hormonal. Asimismo, los alumnos han adquirido experiencia en la resolución de problemas asociados al seguimiento de protocolos experimentales y en la discusión e interpretación de los resultados obtenidos.

Por otra parte, una vez comprobada su correcta transformación, las líneas transgénicas realizadas sobre el fondo genético del mutante *det2* obtenidas durante el presente curso podrán ser analizadas en cursos posteriores, incorporándose tanto a estas prácticas como a las correspondientes a otras asignaturas de grado o postgrado.



RESUMEN DE GASTOS*

Financiación concedida: 300,00 €

	Subtotal	Total
24-Epibrasinólido. Sigma Aldrich. (Brasinoesteroide comercial)	240,55 €	
Medio MS. Duchefa. (Medio de cultivo de arabidopsis)	38,24 €	
Guantes látex. Naturflex. (Manipulación de medios y plantas)	19,83 €	
		298,62 €

*Las facturas originales han sido remitidas al Vicerrectorado de Política Académica

FACTURA

Sigma-Aldrich Chemie GmbH · 82018 Taufkirchen
 DV 05 0,45 **Deutsche Post** 
 Port Payé 

Para cualquier aclaración indique nro.factura

FACTURA NÚMERO: 8240772032
 Fecha de Factura: 21.05.2013
 Número de Cuenta: 11566100 / 11566100
 CIF: ESQ3718001E
 Condiciones de pago: 90 Días, fecha factura
 Fecha de Pago: Hasta el 19.08.2013 sin deducción

UNIV.SALAMANCA/FAC.BIOLOGIA
 DPTO.FISIOLOGIA VEGETAL
 AT.IGNACIO MARTIN
 CAMPUS MIGUEL DE UNAMUNO
 37007 SALAMANCA
 SPANIEN

Página: 1 / 1

***** ORIGINAL *****

DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO Y TAMAÑO	CANTI DAD	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL	IVA
Su Pedido Nro. 21/05/2013 del 21.05.2013 Our reference 8014756395; Albarán Nro. 431516965 Expedidoel 21.05.2013; IGNACIO MARTÍN				
000010 E1641-2MG Epibrassinolide, > = 85%	2	EUR 99,40	EUR 198,80	21,0 %

Resumen de cargos

Total cargos 0,00

Total IVA

=====

IVA 21,0 % Importe Total 198,80 al 21,0 % 41,75

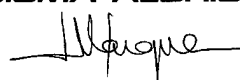
Ship-to number: 11566100

UNIV.SALAMANCA/FAC.BIOLOGIA
 DPTO.FISIOLOGIA VEGETAL
 AT.IGNACIO MARTIN
 EDIF. FARMACIA (CAMPUS UNAMUNO)
 CAMPUS MIGUEL DE UNAMUNO

37007 SALAMANCA
 SPANIEN

EXW .

SIGMA-ALDRICH®



82407720321156610000100102ES

MERCANCIAS	198,80	EUR
CARGOS	0,00	EUR
IVA	41,75	EUR
TOTAL	240,55	EUR

Enabling Science to Improve the Quality of Life

BANCO DE SANTANDER
 Pza. del Pueblo, 10
 28100 Alcobendas (Madrid)
 C C C 0049-5176-19-2110128227

POR FAVOR efectue el pago a
 SIGMA-ALDRICH QUÍMICA S L
 indicando el nº de factura

C/ Marqués de Teverga, 3
Apartado 399
33401 Aviles (Asturias)
N.I.F A-33.219.486
TLF. (98) 556 12 14
FAX. (98) 556 13 84
EMAIL. RAPADOF@mrbit.ES

fernández rapado
productos químicos, s.a.
material de laboratorio, instrumentación,
productos quimicos

Nº FACTURA 1717/13 F

Fecha Fra. 16/04/2013

Fecha Vto. 15/07/2013

dirección fiscal:

U. DE SALAMANCA FARMACIA DPTO. FISILOGIA
VEGETAL
AVDA DEL CAMPO CHARRO S/N
37007 SALAMANCA
SALAMANCA

dirección de envío de factura:

U. SALAMANCA FARMACIA DPT. FISILOGIA VEGETAL-
J.IGNACIO MARTIN SANCHEZ
AVDA DEL CAMPO CHARRO, S/N
37007 SALAMANCA
SALAMANCA

C.I.F. Q3718001E

4300001103

Pos. Clave Producto	Descripcion	Envase	U.Serv.	Imp.Unit.	Dto.	Total
PEDIDO: TELEF16/04/13						
Albarán: 2264/13 fecha 16/04/2013						
1 DUCHEFM0255.94	MURASHIGE & SKOOG MEDIUM MMV MES (M0255.0050)	50L	1	31,60 €	0,00	31,60 €

FORMA DE PAGO:	Nº PROV.	BASE IMPONIBLE	31,60 €
TRANSFERENCIA		DTO.	0
BANCO HERRERO		I.V.A.	21
Nº CUENTA: 0081 5714 50 0001463151		R.E.	0
		IMPORTE TOTAL	38,24 €

Las Partes se someten de forma expresa a los Tribunales de Avilés para cualquier pleito derivado de esta factura.

Registro Mercantil de Asturias. Tomo 929, Libro 613 Sección 3.ª, Folio 67, Hoja 4495, Inscripción 1.ª, Fecha 7-7-89

A los efectos previstos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal, se le informa que los datos personales proporcionados se incorporarán (o actualizarán) a los ficheros de FERNANDEZ RAPADO PRODUCTOS QUIMICOS, S.A., con dirección C/ MARQUES DE TEVERGA, 3, 33400-AVILES-ASTURIAS.

La finalidad del tratamiento de los datos será la de gestionar la facturación de la entidad.

Los datos personales solicitados en este documento son de carácter obligatorio, por lo que su no cumplimentación supone la imposibilidad de su inclusión en los ficheros antes descritos y de cumplir con la finalidad definida en el párrafo anterior. Ud. tiene derecho al acceso, rectificación, cancelación y oposición en los términos previstos en la Ley, que podrá ejercitar mediante escrito dirigido al responsable de los mismos en la dirección anteriormente indicada.



PROSISA, S.L.

DIVISIÓN LABORATORIO

Pol. Ind. Castellanos de Moriscos, Nave 510.
37439-CASTELLANOS DE MORISCOS.
SALAMANCA
Tel.923 36 15 27 Fax.923 36 14 38
prosisa@prosisa.es
B-37029881



FACULTAD BIO.SALAMANCA -DR. JOSE IGNACIO MARTÍN

UNI. SALAMANCA -DPTO.FISIO.VEGETAL

CAMPUS M.UNAMUNO -AVDA.CAMPO CHARRO, S/N

37007 SALAMANCA

Q-3718001-E

FACTURA

FACTURA:	694	FECHA:	10/06/13	CLIENTE:	43012021	AGENTE:	001	Nº HOJA:	1
----------	-----	--------	----------	----------	----------	---------	-----	----------	---

Alb.	Código	Descripción	Cant.	Precio	Dto	IVA	Importe	
979	0060-118342	PEDIDO 10/6/13 GUANTE LATEX NATURFLEX T/M C/100	3	6.01		10	18.03	
Bruto	%Dto.	Imp. Dto.	Base Imponible	%IVA	Imp. IVA	%Recgo.	Imp. Recgo.	TOTAL FACT.
18.03			18.03	10.00	1.80			19.83 eur
								3,300 pta

€ Columna Informativa aplicando 1EURO=166 386 PTS

FORMA DE PAGO: Transferencia	
BANCO: 00817830 98 0001075416 SABADELL ATLANTICO	
OBSERVACIONES:	