

Análisis proteómico del desarrollo sexual mediado por anteridiógeno en el gametofito del helecho *Blechnum spicant*

Virginia Menéndez, Luis Valledor, Angeles Revilla, Helena Fernández

Area de Fisiología Vegetal, Departamento B.O.S. Facultad de Biología. Universidad de Oviedo

Los helechos actuales son un legado genético de gran valor. Se trata de plantas vasculares con una organización primitiva cuyo ciclo vital consta de una fase gametofítica (haploide) y otra esporofítica (diploide), que se hallan separadas en el espacio y en el tiempo. La formación del esporofito se produce en el seno de un gametofito, que es una estructura morfológicamente muy sencilla y también muy vulnerable a factores ambientales. La reproducción sexual en este conjunto de especies implica la formación de órganos sexuales femeninos (arquegonios) y masculinos (anteridios) en distintas secuencias cronológicas. Una de estas secuencias implica la formación inicial de órganos femeninos seguida de la formación de los órganos masculinos que es controlada por la presencia de un sistema anteridiógeno. Este sistema inductor se ha relacionado tradicionalmente con las giberelinas [1], aunque en *Blechnum spicant* aún no se conoce su naturaleza química exacta [2-4]. En ausencia de estas sustancias el gametofito es hermafrodita (*Ceratopteris*) o femenino (*Blechnum*), y éste, una vez alcanzada la madurez, producirá y secretará activamente anteridiógeno que actuará sobre los gametofitos en desarrollo, induciendo en ellos la masculinidad. Este mecanismo está destinado a evitar la autofecundación.

El gametofito del helecho, que apenas consta de una única capa de células y no presenta interacciones con el tejido esporofítico, se presenta como un sistema experimental ideal para profundizar en el estudio de procesos del desarrollo sexual en plantas.

En este trabajo, se han empleado por primera vez técnicas proteómicas para estudiar la expresión diferencial de proteínas entre gametofitos que se han desarrollado en presencia y en ausencia de sustancias con acción anteridiógena.

En primer lugar se extrajeron anteridiógenos de cultivos de gametofitos adultos siguiendo el método de Yamauchi [5], y posteriormente se añadieron a medio de cultivo MS para generar un sistema de in-

ducción de masculinidad. A este medio se añadieron gametofitos de 30 días de edad y, tras un periodo de cultivo de 20 días, se caracterizaron (estado de desarrollo, órganos sexuales) y se compararon con gametofitos del mismo origen cultivados en medio de cultivo sin anteridiógeno (Control).

Ambos tipos de gametofitos se trituraron en nitrógeno líquido (50 mg de peso seco por muestra) y la proteína se purificó mediante extracción fenólica seguida de precipitación en acetato de amonio en metanol descrito por Carpentier [6]. La concentración de proteínas se midió por medio de Bradford y las muestras se almacenaron a -80°C hasta que se realizó el isoelectroenfoque. Para ello se utilizaron 10 tiras de 24 cm con un rango de pH 3-10 no lineal, que fueron rehidratadas todas a la vez de forma pasiva con 550 μg de proteína en 450 μL de tampón de solubilización. El isoelectroenfoque se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare). Una vez terminado el enfoque las tiras fueron equilibradas posteriormente almacenadas a -80°C .

La segunda dimensión SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 13%. Posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G-250 durante 20 horas (3 veces) siguiendo el protocolo de Mathesius et al. [7]. Las imágenes de los geles se adquirieron con un densitómetro y se analizaron con software PDQuest 8 (Biorad). Tras una revisión manual, se contabilizaron 581 spots bien resueltos. Solo se consideraron spots que aparecieran en al menos 3 de los 5 geles. Se asignaron valores perdidos empleando el algoritmo KNN aplicado de forma secuencial (R environment). Posteriormente se normalizó la intensidad de los spots y, para reducir la dependencia de la media y la varianza, se realizó una transformación logarítmica. Tras aplicar una prueba t con $\alpha = 0.05$, se definieron 117 spots como diferencialmente expresados.

Se aplicó un análisis de componentes principales a todos los spots, permitiendo el PC2 la separación de las muestras en dos grupos. Teniendo en cuenta los análisis uni y multivariados se seleccionaron para su identificación aquellos los 50 spots que mostraron un p-valor más bajo en el caso de la prueba T, y aquellos con coeficientes de correlación mayores de 0.85 para los componentes principales 1-3.

La identificación de los spots diferenciales permitió describir por primera vez en helechos las rutas metabólicas cuya expresión varía en relación con el desarrollo sexual dependiente de la acción del anteridiógeno.

Referencias

- [1] Yamane H. Fern antheridiogens. *Int Rev Cytol* 1998; 184:1-32.
- [2] Fernández H, Bertrand AM, Sierra MI, Sánchez-Tamés R. An apolar GA-like compound responsible for antheridiogen in *Blechnum spicant*. *Plant Growth Regul* 1999; 28:143-4.
- [3] Menéndez V, Revilla MA, Fernández H. Growth and gender in the gametophyte of *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Tiss Org* 2006; 86:47-53.
- [4] Menéndez V, Revilla MA, Bernard P, Gotor V, and Fernández H (2006) Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Rep* 25:1104-1110.
- [5] Yamauchi T, Oyama N, Yamane H, Murofushi N, Schraudolf H, Pour M, Furber M, Mander L. Identification of Antheridiogens in *Lygodium circinatum* and *Lygodium flexuosum*. *Plant Physiol* 1996; 111:741-5.
- [6] Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R and Panis B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 2005; 5:2497-507.
- [7] Mathesius U, Keijzers G, Natera SHA, Weinman JJ, et al. Establishment of root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2001; 1:1424-40.

Proteome regulation and epigenetic code during *Pinus radiata* needle maturation

Luis Valledor¹, Maria Jesus Cañal¹, Christof Lenz³, Roberto Rodríguez¹, Jesús Jorrín³

¹Plant Physiology. I.U.B.A. University of Oviedo.C/ Cat. Rodrigo Uria s/n, E-33071 Oviedo, Spain. ²Applied Biosystems Deutschland, Frankfurter Strasse 129-B, Darmstadt, Germany. ³Biochemistry and Molecular Biology. University of Córdoba. Campus de Rabanales. E-14071 Córdoba, Spain

Needle differentiation is a very complex process which leads to the formation of a mature photosynthetic organ. This fact implies important changes in protein accumulation and gene expression which must be regulated, amongst others, by epigenetic mechanisms. We have compared some epigenetic modifications (DNA methylation, Histone H3K4^{3m}, Histone H3K9^{3m} and acetylated Histone H4) present in immature (1 month old) and mature (12 month old) *Pinus radiata* needles (Figure 1a), determining a tissue specific DNA methylation (Figure 1b) and

the differential expression levels of histone epigenetic marks, being the levels of acetylated Histone H4 and Histone H3K4^{3m}, associated to gene expression, higher in immature needles whereas the Histone H3K9^{3m} was only found in mature needles (Figure 1c). This could be explained by the fact that chromatin needs to be altered and restructured during the differentiation to regulate gene expression [1].

To determinate which genes and proteins showed as differential during needle development