

# PRÀCTICA 1: ANÀLISI GENOTÍPIC I FENOTÍPIC DE MUTANTS DE PERCEPCIÓ D'OMBRA EN ARABIDOPSIS

## INTRODUCCIÓ

Aquesta pràctica consisteix en la identificació genotípica i fenotípica de tres mutants d'*Arabidopsis* per gens relacionats amb la senyalització lumínica, concretament amb la percepció d'ombra. Utilitzarem plantes *wild-type* de tipus columbia<sup>1</sup>, abreuja col, com a control intern per estudiar els tres mutants, *pif7*, *hfr1* i *phyB* quan les condicions lumíniques són d'ombra induïda respecte les condicions normals.

De les tres línies de mutants utilitzades, *pif7*<sup>2</sup> és un mutant deficient en la traducció d'aquest factor de transcripció per la inserció de tDNA. En el mutant de *hfr1*<sup>3</sup> no se sintetitza el regulador transcripcional de factor de transcripció *hfr1* també a causa de la inserció d'un tDNA. Mentre que, el en mutant *phyb*<sup>4</sup> la proteïna fitocrom b, ha estat mutada mitjançant mutagènesi amb metanosulfonat d'etili (EMS<sup>5</sup>).

## RESULTATS I DISCUSSIÓ:

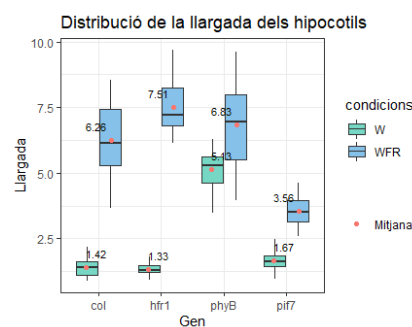
Per tal d'estudiar els resultats obtinguts en les plantes mutants, es van mesurar els hipocòtils de cadascuna de les 3 rèpliques per a cadascun dels gens i de les condicions lumíniques, obtenint un total de 288 plantes (*Taula 1*). A continuació, emprant les dades mesurades i un script de R propi<sup>6</sup> es va estudiar la variància entre cadascun dels mutants i la variant Col sotmesa a la mateixa condició lumínica.

Inicialment, es va elaborar un gràfic de caixes (*Fig1*) que permet observar per una banda, que no hi ha cap valor fora de la normal i que per tal sigui precís descartar de l'estudi. Per altra, permet veure de forma gràfica quina distribució presenten les dades i on es troba la mitjana de cada subgrup, això ja dona una idea de quins mutants presenten una clara diferència en la llargada mitja dels hipocòtils.

A continuació, mitjançant els corresponents Shapiro test es va poder comprovar que cadascun dels subgrups complia la condició de presentar una distribució normal, condició *sine qua non* per tal de poder aplicar el estadístic T a les dades (*Taula 2*). Així mateix, per tal de dur a terme el t-test a R cal indicar si la variància entre els dos grups és la mateixa. Per a comprovar-ho, es va dur a terme un test de variància entre cada subgrup i el control segons el resultat obtingut es va indicar com a condició per el t-test. Finalment, es va dur a terme la prova t-test gràcies a la qual es va poder observar que en condicions lumíniques normals, el mutant de *phyB* presenta una longitud major en els hipocòtils que el control. En canvi, en condicions lumíniques que simulen l'ombra, els mutants *pif7* presenten una longitud menor que el control mentre que el mutant *hfr1* presenta una longitud major que el control. Això suggereix que el gens estudiats regulen l'allargament dels hipocòtils (*Fig. 2*). Cal afegir que aquesta figura només mostra les interaccions estudiades i no tota la xarxa, per tant no es pot assumir que siguin regulacions directes.

**Taula 1:** Quantitat d'hipocòtils mesurats segons el gen afectat i les condicions lumíniques. Les condicions lumíniques normals s'indiquen com a W. Les condicions lumíniques que simulen ombra mitjançant llum roja llunyana es simbolitzen com a WFR.

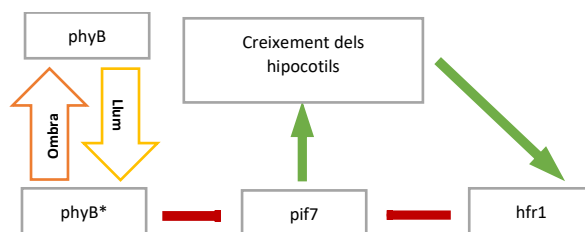
	Col	pfr1	pif7	phyB	Totals
W	32	35	30	39	136
FR	40	40	36	36	152
Totals	72	75	66	75	288



**Figura 1:** Diagrama de caixes que recull la distribució de les dades i la mitjana de cada grup.

**Taula 2:** Resultats dels p-valors dels tests estadístics aplicats. S'ha considerat una  $\alpha=0,05$ . Els valors menors que  $\alpha$  indiquen que són significativament diferents.

CONDICIONS	GENS	SHAPIRO	VARIÀNCIA	T TEST	DIFERÈNCIA
W	hfr1	0,6720	0,0028	0,2193	NO
	pif7	0,1605	0,0003	9,91E-37	SI
	phyB	0,4846	0,6253	0,1178	NO
WFR	hfr1	0,0504	0,1913	2,40E-06	SI
	pif7	0,5614	0,1831	0,0699	NO
	phyB	0,9111	4,77E-07	3,17E-18	SI



**Figura 2.** Model d'interacció dels gens estudiats en la regulació de la percepció d'ombra de les plantes i l'afectació en la llargada dels hipocòtils.

## PRÀCTICA 2: ESTUDI DE LA REGULACIÓ PER AUXINA DE LA PROTEÏNA AXR3 MITJANÇANT ACTIVITAT $\beta$ -GLUCORONIDASA (GUS) EN PLÀNTULES D'ARABIDOPSIS

### INTRODUCCIÓ

Aquesta pràctica consisteix en l'estudi de la regulació mediada per auxines de la proteïna AXR3 utilitzant plàntules transgèniques d'*Arabidopsis* que contenen la construcció HS::AXR3-GUS. La proteïna AXR3<sup>7</sup> és un factor de transcripció que actua com a repressor de gens de resposta a auxines. En els mutants, s'utilitza una construcció en la que AXR3 està fusionat amb la proteïna  $\beta$ -glucoronidasa<sup>8</sup> (GUS) amb capacitat hidrolasa com a gen *reporter* ja que, en actuar es genera un precipitat blau. El promotor utilitzat per aquesta construcció és HS (*heat-shock*) induïble per temperatura (37°). D'aquesta manera, quan s'arriba a una temperatura concreta, s'activa la transcripció del gen quimèric AXR3-GUS que en absència d'auxines la capacitat hidrolasa de GUS està activa i per tant es produirà un precipitat blau.

### RESULTATS I DISCUSSIÓ:

Per tal de fer aquest estudi es van considerar 3 mostres. Per una banda, el control negatiu no va estar sotmès a *head-shock* sinó que es va mantenir a temperatura ambient durant tot el procés, així doncs esperaríem que no aparegués precipitat ja que la construcció no s'hauria de transcriure (Fig. 1). Per altra banda, les altres dues mostres si van ser sotmeses a tractament per *head-shock* durant dues hores. Posteriorment, a una de les mostres (AUX) es va afegir solució d'auxina sintètica mentre que a l'altra (NO AUX) es va afegir la mateixa quantitat d'etanol que en l'altre control.

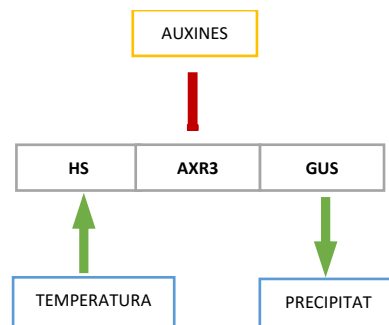


Fig 1. Esquema del funcionament de la construcció HS::AXR3-GUS utilitzada en els mutants.

Els resultats obtinguts podem observar que són concordants amb el que es mostra en l'esquema (Fig. 1). En el control (Fig. 2.A) com que no es transcriu la construcció al no estar sotmès a temperatura, no es pot observar cap coloració. En canvi, en la mostra sense presència de auxines (Fig. 2.C) que actuaria també com a control, es pot detectar clarament la presència de precipitat blau. Aquesta, en no estar sotmesa a les auxines cal que el repressor dels gens, AXR3 estigui actiu i, per tant, la nostra construcció també ho està.

En la mostra amb auxines (Fig. 2.C) no es pot observar precipitat blau ja que la presència d'auxines provoca la degradació dels repressor AXR3, i conseqüentment també la nostra construcció. Tot i això, en algunes ocasions (Fig. 2.D) és possible observar certa coloració degut a que no s'hagi donat prou temps per a la degradació completa de la construcció i el seu precipitat.

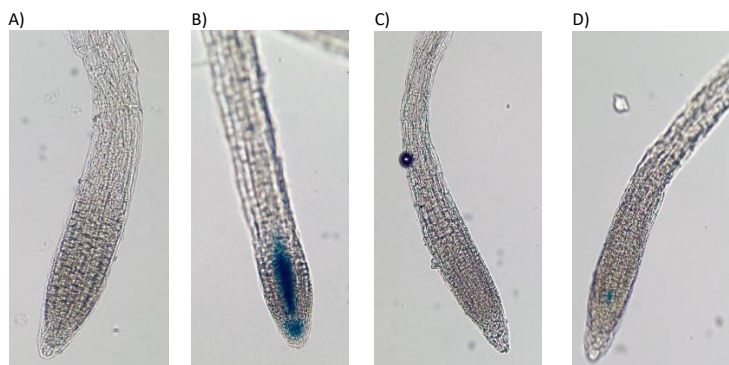


Fig. 2: Resultats de la tinció histoquímica de GUS del grup 10. A) Tractament control no sotmès a *heat-shock*. B) Tractament control sotmès a *heat-shock* però no a auxines. C) Tractament amb *heat-shock* i auxines sintètiques. D) Tractament amb *heat-shock* i auxines sintètiques.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Col: [https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=species\\_variant&id=91](https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=species_variant&id=91)
2. PIF7: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q570R7>
3. HFR1: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9FE22>
4. Phyb: <https://www.uniprot.org/uniprot/P14713>
5. EMS : Kim Y., Schumaker K.S., Zhu JK. (2006) EMS Mutagenesis of *Arabidopsis*. In: Salinas J., Sanchez-Serrano J.J. (eds) *Arabidopsis Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 323. Humana Press
6. Script R dissenyat: [https://github.com/ruthdominguez/Pr-ctiques-BMBTP/blob/master/Hipocotils\\_Dom%C3%ADnguez\\_Hajjioui.R](https://github.com/ruthdominguez/Pr-ctiques-BMBTP/blob/master/Hipocotils_Dom%C3%ADnguez_Hajjioui.R)
7. AXR3 : <https://www.uniprot.org/uniprot/P93830>
8. GUS: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q93VY4>