



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA**

**Modulación de la movilidad de azúcares por sobreexpresión
de simportadores y proteínas señales en *Arabidopsis
thaliana***

TESIS

Que presenta

LILIAN ROCIO DUPLAT BERMÚDEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENERÍA

Directora de la Tesis:

Dra. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES

Ciudad de México.

Junio, 2016

Dedicatoria

Este trabajo esta dedicado a mi hija Juliana por ser fuente de motivación para ser cada día mejor, a mi esposo Andrés por apoyarme incondicionalmente en este proyecto de vida y alentarme siempre para poder culminarlo con éxito, a mis padres por estar siempre presentes apoyándome cuando fue necesario.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios doctorales en el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV . Asi como tambien por el otorgamiento de la beca para movilidad en el extranjero que hizo posible una estancia en el NCBI para complementar mi trabajo de tesis.

A la Doctora Beatriz Xoconostle Cázares por dirigir mi trabajo de investigación, transmitirme parte de su conocimiento y darme su apoyo incondicional para la finalización con éxito de la tesis doctoral.

A mi comité tutorial integrado por: Dr Roberto Ruíz Medrano, Dra Maria Montes Horcasitas y Dra Maria Eugenia Hidalgo Lara, por ser guía y otorgarme sabios consejos durante cada una de las etapas de este trabajo.

A mi asesor externo Dr Leonardo Mariño Ramírez , por permitirme realizar una estancia en el NCBI y adquirir el conocimiento necesario para culminar con éxito los análisis bioinformaticos parte de mi investigación.

A todos mis amigos y compañeros de los laboratorios 24 y 12 por su permanente colaboración, disposición y consejos fundamentales para la realización de este proyecto.

A los demás integrantes del laboratorio Estelita, Lulu, Jose Luis, Bety y Nidia por el apoyo que siempre me brindaron .

Índice

Resumen

1. Introducción

2. Antecedentes

2.1 Sistema Vascular en plantas

2.2 Síntesis y Transporte de azúcares

2.3 Transportadores de hexosas en *Arabidopsis*

2.4 Citocromo b5 reductasa

2.5 Flowering Locus T (FT)

2.6 Tecnologías de nueva generación

3. Justificación

4. Objetivos

5. Materiales y métodos

6. Resultados

7. Discusión

8. Conclusiones

9. Perspectivas

10. Bibliografía

Índice de figuras

Figura 1. Movilización del carbono en plantas. Modelo simplificado del flujo de carbono y generación de señales de azúcares por fotosíntesis, transporte y hidrólisis en células fotosintéticas durante el día (a) y la noche (b).

Figura 2. Toma apoplástica de azúcares. La sacarosa puede ser hidrolizada por invertasas de la pared celular las cuales son activadas por señales y ser convertida a glucosa y fructosa (Hexosas) las cuales van a ser descargadas en el tejido consumidos mediante simportadores de monosacáridos los cuales también median el transporte de otros monosacáridos como galactosa, xilosa y manosa. Tomada de Sarah M. Sherson y cols. (2003) *Journal of Experimental Botany*, 54 (382).

Figura 3. Árbol filogenético de la superfamilia de los transportadores de monosacáridos (MST) en *Arabidopsis*. Las secuencias de proteínas fueron alineadas usando el algoritmo Clustal X y el árbol filogenético fue construido usando el software "Treeview 1.6". La familia de los AtSTP se presenta en color rojo. Tomada de Büttner (2007).

Figura 4. Modelo de como actúa FT en el cambio de identidad de meristemo vegetativo a floral.

Figura 5. Representación esquemática de las construcciones. (A) Construcción para la expresión del gen que codifica para Cytb5R, (B) Construcción para la expresión del gen que codifica para AtSTP13, (C) Construcción para la expresión del gen que codifica para FT

Figura 6. Proceso de selección con glufosinato de amonio de semillas transformadas con cada uno de los tres genes de interés.

Figura 7. Proceso para la recolección de semillas de líneas independientes transformadas.

Figura 8. Procedimiento para amplificación del transgen por el método “Touch and go”.

Figura 9 . RNA obtenido a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* en gel desnaturizante formaldehído-agarosa al 1.4%. Carril 1-4: 5 µl de RNA extraído.

Figura 10 . cDNA de doble cadena obtenido a los 26 ciclos con el procedimiento SMART LD-PCR visualizado en gel de agarosa al 1%. Carril 1-3: 5µl de cDNA

Figura 11 . Producto amplificado por PCR correspondiente al ORF de los genes de interés en gel de agarosas al 0.8% **(A)** Gen que codifica para la Cyb5R , **(B)** Gen que codifica para la proteína AtSTP13 , **(C)** Producto amplificado por PCR correspondiente al ORF del gen que codifica para FT.

Figura 12. Producto de la miniprep del plásmido p-Drive® con el inserto clonado del gen que codifica para la proteína AtSTP13 en gel de agarosa al 0.8%.

Figura 13. Producto de la digestión con EcoRI del plásmido p-Drive® con la construcción para la expresión del gen de interés. **(A)** STP13 y Cyb5R. **(B)** (FT).

Figura 14. Prueba histoquímica GUS para evidenciar el nivel de expresión del promotor 59880 (1000) + 5UTR en diferentes tejidos vasculares de

Arabidopsis thaliana. (A) Hoja caulinar, (B) Hoja de roseta, (C) Flor, (D) Raíz, (E) Silicua, (F) Tallo.

Figura 15. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al promotor 59880 (1000 pb) + 5'UTR en gel de agarosa al 0.8%.

Figura 16. Producto amplificado por PCR correspondiente al promotor KNAT1.

Figura 17. Producto de la digestión del plásmido con EcoRI del plásmido con el inserto KNAT1.

Figura 18. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al terminador NOS en gel de agarosa al 0.8%.

Figura 19. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al promotor 59880 (1000) + 5'UTR y al gen que codifica para Cytb5r.

Figura 20. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al terminador NOS.

Figura 21. Producto amplificado por PCR correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR), el gen que codifica para Cytb5R y el terminador NOS.

Figura 22. Producto amplificado por PCR correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR), el gen codifica para Cytb5R, y terminador NOS.

Figura 23. Vector PCR8/GW/TOPO.

Figura 24. Plásmido PCR8/GW/TOPO con ensamblaje promotor, Cytb5r y terminador NOS purificado por miniprep.

Figura 25. Digestión con EcoRI del plásmido PCR8/GW/TOPO con el ensamblaje del promotor, Cytb5r y terminador NOS.

Figura 26. Plásmido pBGWFS7,0 (Gateway)

Figura 27. Producto amplificado por PCR correspondiente al promotor 59880 (1000) + 5'UTR.

Figura 28. Producto amplificado por PCR correspondiente al terminador NOS y al gen que codifica para AtSTP13.

Figura 29. Producto PCR amplificado correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR), el gen que codifica para AtSTP13 y el promotor NOS.

Figura 30. Producto amplificado por PCR correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR), el gen que codifica para AtSTP13, y terminador NOS.

Figura 31. Visualización en gel de agarosa al 0.8% de productos amplificados por PCR para el ensamblaje y clonación de la construcción para la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína flowering locus T (FT) en *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Fragmento amplificado del promotor KNAT1 (2356pb). **(B)** Fragmento amplificado de FT (528pb) y Fragmento amplificado del T-NOS (294pb).

Figura 32. (A) Amplificación del fragmento ensamblado del ORF (FT) y terminador NOS (822pb). (B) Amplificación de la construcción ensamblada promotor KNAT1,ORF (FT) y terminador NOS, el tamaño del fragmento fue de 3178pb.

Figura 33. Proceso de selección de líneas independientes transformadas con los genes de interés. (A) Semillas de plantas transformadas germinadas una semana después de ponerlas en el sustrato suplementado con glufosinato de amonio; (B) Plantas de *Arabidopsis thaliana* a los 20 días de germinadas (C) Plantas de *Arabidopsis thaliana* seleccionadas 1 mes después de germinados.

Figura 34. Amplificación por PCR punto final del transgen FT con un tamaño esperado de 152pb.

Figura 36. Comparación fenotípica de líneas de plantas AtFTOE vs plantas WT (A) Plantas de tres líneas independientes AtFTOE vs WT que no muestran diferencias significativas ni en conteo de hojas de roseta ni en diámetro de roseta a los 21 días post-germinación. (B) Plantas AtFTOE 2.1 vs plantas WT a los 35 días post germinación (C) Plantas WT a los 40 días post germinación empezando a florecer. (D) Comparación de tamaño de hojas de roseta a los 40 días post- germinación y diámetro de roseta en plantas WT vs AtFTOE.

Figura 37. RNA total extraído de hoja de plantas de las líneas AtFTOE y WT para RNA –seq.

Figura 38. Gráfica que representa la sobreexpresión de FT en líneas AtFTOE comparadas con WT.

Figura 39. Expresión diferencial de FT medida en fragmentos por kilobase de transcritos por millón de lecturas mapeadas (FPKM) Determinados por Cufflinks en línea AtFTOE 2.1 y WT.

Figura 40. Distribución de genes expresados diferencialmente en líneas AtFTOE comparadas con WT de Arabidopsis en categorías de ontología de genes (GO). (A) Componente celular, donde N=2913 genes reprimidos y 579 genes sobreexpresados (B) Procesos biológicos, N=2678 genes reprimidos y 572 genes sobreexpresados y (C) función molecular, N= 2782 genes reprimidos y 583 genes sobreexpresados; usando anotaciones GO de la base de datos TAIR.

Figura 41. Clusters obtenidos por K-means de los genes expresados diferencialmente.

Figura 42. Cluster de genes expresados diferencialmente relacionados con floración obtenido por DAVID versión 6.7. En este gráfico 2D podemos observar los genes relacionados con floración (eje X) y sus anotaciones de genes asociados (eje Y). El color verde corresponde a asociaciones de genes ya reportadas y el color negro corresponde a asociaciones de genes no reportados aún.

Figura 43. Análisis por PCR en tiempo real de sobreexpresión de genes en plantas AtFTOE vs WT.

Figura 44. Cluster de genes expresados diferencialmente relacionados con transporte obtenido por DAVID versión 6.7. En este gráfico 2D podemos observar los genes relacionados con floración (eje X) y sus anotaciones de genes asociados (eje Y). El color verde corresponde a asociaciones de genes ya reportadas y el color negro corresponde a asociaciones de genes no reportados aún.

Figure 45. Genes expresados diferencialmente (sobreexpresados y reprimidos con FC=1.5 con $p < 0.05$) en hojas maduras de roseta a los 35

días de edad son visualizados por Mapman en un gráfico relacionado con funciones celulares. Los genes sobreexpresados son indicados en rojo y los reprimidos en azul acorde al \log_2 . (A) funciones celulares (B) metabolismo.

Índice de tablas

Tabla 1. Patrón de expresión en *Arabidopsis* de diferentes AtSTP estudiados. (Büttner, 2010). *M (Hojas maduras), ** J (Hojas jóvenes).

Tabla 2. Regulación transcripcional de AtSTP por diversos factores internos y externos. (R) Reprimido, y (I) Inducido.

Tabla 3. Oligos específicos diseñados para amplificar ORF de interés a partir de cDNA.

Tabla 4. Oligos diseñados para ensamblar cada una de las construcciones para expresar los genes de interés.

Tabla 5. Primers diseñados para detectar el transgen en plantas transformadas seleccionadas y el terminador NOS.

Tabla 6. Oligos diseñados para la amplificación del transgen por PCR en tiempo real y ddPCR.

Tabla 7. Líneas independientes transformadas con cada gen de interés.

Tabla 8. Líneas transformadas con los genes de interés y verificación del transgen por PCR.

Tabla 9. Determinación de la cantidad y calidad de RNA extraído de líneas AtFTOE y WT por Nanodrop y Bioanalyzer.

Tabla 10. Descripción de la función de los genes sobreexpresados en líneas AtFTOE relacionados con floración.

Tabla 11. Lista de genes que codifican para proteínas que reprimen floración, los cuales son reprimidos en líneas AtFTOE.

Tabla 12. Genes sobreexpresados en líneas AtFTOE relacionados con transporte de azúcares.

Tabla 13. Genes relacionados con transporte de sacarosa que fueron reprimidos en líneas AtFTOE.

Resumen

El objetivo principal de este trabajo fue la obtención y el análisis de plantas genéticamente modificadas sobreexpresoras de genes codificantes para proteínas asociadas con transporte y consumo de fotoasimilados. Dos genes relacionados con transporte, el transportador de hexosas (STP13) y la enzima citocromo b5 reductasa (Cytb5R) y uno relacionado con consumo, la proteína Flowering locus T (FT) fueron seleccionados. Se obtuvieron 3 construcciones para la sobreexpresión de los tres genes de interés, las cuales fueron incorporadas en vectores de expresión en plantas. Posteriormente se realizó la transformación genética de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante el método de inmersión floral y fueron seleccionados los transformantes comprobándose la presencia del transgen por PCR, el número de copias por Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) y el nivel de expresión por PCR en tiempo real. Aunque se logró la transformación de plantas con los tres genes de interés de manera independiente, los análisis fenotípicos mostraron características diferenciales tempranas en plantas sobreexpresoras del gen *FT* (AtFTOE) al ser comparadas con plantas Wild Type (WT), enfocado el trabajo a partir de esta etapa al análisis transcriptómico de plantas AtFTOE con el fin de entender las bases moleculares que soportaban estos cambios. Los análisis transcriptómicos se realizaron con los datos obtenidos por secuenciación por RNA-seq Illumina, a partir de 3 muestras biológicas de hojas de roseta de la línea AtFTOE 2.1 y de 2 muestras biológicas de hojas de roseta de plantas WT. Los resultados mostraron la expresión diferencial de 3652 genes de los cuales 626 genes fueron sobreexpresados y 3026 fueron reprimidos.

1. Introducción

En plantas superiores, el floema es un órgano especializado que se encarga del transporte de fotoasimilados desde los tejidos productores a los consumidores; este sistema opera como una red de comunicación entre tejidos distantes. En la savia del floema se han detectado azúcares, sales minerales y ácidos grasos, además de macromoléculas tales como proteínas y RNAs (Lough y Lucas, 2006). Los tejidos fotosintéticamente activos producen azúcares que son transportados por vía apoplástica y simplástica a tejidos consumidores. En el proceso de fotosíntesis, la planta fija CO₂ en presencia de energía y agua para producir azúcares que son la fuente de carbono y energía que sustenta su crecimiento. Los tejidos fotosintéticos son productores de estos azúcares, mientras que los tejidos heterotróficos tales como meristemas, hojas jóvenes, flores, frutos, raíces y órganos de almacenamiento se consideran consumidores, al depender del aporte del carbono orgánico que usan como fuente de energía (Taiz y Zeiger, 2010).

De este hecho deriva la hipótesis de que el crecimiento del tejido heterotrófico depende de la fotosíntesis y movilización de los productos de fijación del CO₂. En este sentido, la productividad definida operacionalmente como el crecimiento de las plantas y sus frutos, está limitada por una red de procesos de síntesis, transporte y consumo de moléculas entre tejidos hetero- y autotróficos.

De acuerdo a lo anterior el objetivo principal de este trabajo fue analizar el efecto de la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas involucradas en transporte y consumo de fotoasimilados en *Arabidopsis thaliana*, con el fin de obtener líneas independientes transformadas con los

genes de interés y analizarlas fenotípicamente e identificar los genes directamente afectados por esos cambios realizando análisis transcriptómicos mediante RNA-seq.

Para cumplir el objetivo del trabajo se realizó la obtención de construcciones para sobreexpresar tres genes, dos que codifican para proteínas relacionadas con transporte y un gen que codifica para una proteína relacionada con consumo. Los genes que fueron seleccionados para sobreexpresarlos en tejido vascular fue el transportador apoplástico AtSTP13, el cual es un simportador de monosacáridos que presenta alta afinidad con hexosas y la proteína - enzima citocromo b5 reductasa (Cytb5R) la cual es la encargada de mantener el balance redox en el floema. Es procesada en la célula acompañante y translocada vía floema donde se elimina su dominio amino membranal, haciendo que esta proteína sea soluble; su actividad enzimática permite mantener un poder reductor en el floema, que facilitaría la actividad del simportador. Por otro lado, el transporte de azúcares podría ser más eficiente si éstos son oligomerizados y/o consumidos en tejidos heterotróficos, aumentando la demanda del tejido consumidor. Para evaluar esta posibilidad, se escogió expresar en tejido meristemático el gen que codifica para la proteína flowering locus T (FT) implicada en modificar la identidad del meristemo vegetativo a floral manejado por el promotor KNAT1 de *Arabidopsis* homólogo al promotor en maíz. Es de suponer que la generación de flores, sus frutos y el llenado de grano son procesos altamente demandantes de energía y de modificarse aumentarían la demanda del tejido consumidor, haciendo entonces que la reacción de transporte se incremente. A pesar del potencial uso de estos genes en variedades comerciales, en el presente trabajo se utilizó la planta *Arabidopsis* como modelo para validar la hipótesis.

Como resultado se logró la transformación de *Arabidopsis* con los tres genes de interés (*STP13*, *Cytb5R* y *FT*). Sin embargo la investigación fue enfocada

a analizar las líneas transformadas sobreexpresoras de *FT* puesto que los análisis fenotípicos mostraron resultados notorios representados por una floración temprana al día 21 post-germinación de las planta transformadas en comparación con plantas WT, que florecían al día 40. Para determinar la influencia de la sobreexpresión de *FT* sobre otros genes se realizó un análisis transcriptómico mediante RNA-seq. La secuenciación de RNA se realizó por illumina obteniéndose secuencias de RNAseq para dos muestras controles de plantas de *Arabidopsis thaliana* sin transformar o wild type (WT) y tres plantas transformadas con el gen que codifica para la proteína FT obteniéndose un promedio de 20.000.000 de lecturas para cada una de las muestras. Posteriormente se realizaron análisis bioinformáticos tales como Tophat, Cufflinks, Cuffmerge y Cuffdiff utilizando las capacidades computacionales de Biowulf Linux cluster en el Instituto Nacional de Salud (NIH), departamento de bioinformática (NCBI) Bethesda, MD. (<http://biowulf.nih.gov>).

Basados en los resultados obtenidos por Cufflinks y utilizando el paquete bioinformático CummeRbund del programa R, se logró determinar la abundancia del transcrito FT en plantas sin transformar y transformadas, obteniéndose un FPKM (fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas mapeadas) 20 veces mayor en las plantas transformadas con el gen que codifica para la proteína FT, lo cual indica la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína FT en plantas transformadas. Además se pudo determinar la expresión diferencial de 3699 genes al comparar plantas sobreexpresoras del gen *FT* vs plantas silvestres WT. Para los análisis posteriores se tuvieron en cuenta 3652 genes por ser expresados diferencialmente 1.5 veces o más de los cuales se pudo determinar 626 genes sobreexpresados y 3026 reprimidos en plantas sobreexpresoras de *FT* vs plantas Wild type (WT).

Para la anotación funcional de los genes expresados diferencialmente se utilizaron las siguientes herramientas bioinformáticas: TAIR GO Annotation (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/>) y DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Para visualizar la expresión diferencial de los genes en vías metabólicas se utilizó la herramienta bioinformática Mapman (<http://mapman.gabipd.org>).

Los genes sobreexpresados relacionados con floración muestran la sobreexpresión de factores de transcripción tales como MADS-box que se conocen son marcadores de floración en meristemo y cuya sobreexpresión se ha relacionado con el mantenimiento de la identidad del meristemos y transición del estado vegetativo al estado floral. Los genes sobre expresados relacionados con transportes de azúcares muestran que hay una mayor demanda de monosacáridos productos de la hidrólisis de sacarosa como glucosa y posiblemente fructosa la cual también puede ser influenciada por el estado reproductivo de la planta *AtFTOE*. Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de *FT* este influenciando una respuesta transcriptional en hojas lo cual estaría reprogramando la planta para que cambien de estado vegetativo a estado reproductivo.

2. Antecedentes

2.1 Sistema vascular en plantas

En plantas el sistema vascular está conformado por xilema y floema los cuales son tejidos conductores. Ambos tejidos se diferencian a partir de células meristemáticas denominadas cambium, el cual es un conjunto de células polarizadas que se producen en regiones apicales y opuestas a xilema y floema.

El xilema está compuesto principalmente de células conductoras muertas de pared gruesa ya sean vasos (células grandes sin paredes transversas que forman estructuras) o traqueidas (células menores de diámetro con paredes terminales) y fibras que sirven como soporte estructural. En este tejido vascular se transportan agua y sales inorgánicas en una sola dirección de manera ascendente (Bidwell, 2002).

En plantas vasculares angiospermas, el floema está compuesto principalmente de células de diámetro grande y pared delgada con placas terminales características a manera de cribas llamadas elementos cribosos (ECs), alineados extremo con extremo para formar tubos cribosos, los cuales tienen paredes laterales y finales con agujeros (Bidwell, 2002). Las células que conforman el tubo criboso son altamente modificadas ya que durante la maduración pierden el núcleo y las mitocondrias. Los ECs siempre se encuentran unidos a las células acompañantes (CAs) las cuales se caracterizan por tener un citoplasma denso, núcleo y numerosas mitocondrias y se encuentran conectadas a los ECs por un conjunto de plasmodesmos. La comunicación entre célula acompañante y tubo criboso

hace que el núcleo de la célula acompañante controle la fisiología de ambos elementos (Padilla y Martínez, 2007; Xoconostle, et al.2000).

En el floema se lleva a cabo la translocación o transporte de los productos obtenidos en la fotosíntesis en órganos productores (hojas maduras) a tejidos demandantes (raíces, flores, semillas, hojas jóvenes, meristemas etc.), transporte que se realiza tanto de manera ascendente y descendente (Padilla y Martínez, 2007; Tony J. Lough y William J. Lucas 2006, Taiz y Zeiger, 2010). Este transporte de macromoléculas en plantas superiores opera con una red de comunicación a larga distancia con el sistema vascular, dada por señales detectadas por órganos maduros o productores a regiones meristemáticas de la planta o tejidos consumidores. La corriente de translocación del floema de angiospermas contiene, además de los productos de la fotosíntesis y otras pequeñas moléculas, una variedad de macromoléculas incluyendo mRNA, pequeños RNA y proteínas. Estudios recientes se han focalizado al papel que juegan estas proteínas y RNA en coordinación con programas de desarrollo y respuestas de plantas a factores abióticos o ambientales. (Tony J. Lough y William J. Lucas 2006).

2.2 Síntesis y Transporte de azúcares en plantas

La regulación de producción y transporte de azúcares en plantas es compleja ya que como organismos multicelulares fotosintéticos autotróficos, las plantas están compuestas de tejidos productores u órganos de exportación y de tejidos consumidores o de importación. Para que ocurra el transporte entre estos dos tejidos, las plantas necesitan mecanismos de señalización a larga distancia que se dan como respuesta a cambios fisiológicos de la planta o a factores ambientales a las que estas están expuestas tales como cambios diurnos y estreses bióticos y abióticos. En general, las actividades de fotosíntesis, movilización de nutrientes y exportación son reguladas bajo

condiciones bajas de azúcar, mientras que las actividades como crecimiento y almacenaje son reguladas cuando los recursos de carbono son abundantemente disponibles (Rolland, *et al* 2006).

La sacarosa es el mayor producto fotosintético y el azúcar que más se transporta en plantas. Sin embargo, muchos efectos de señalización de azúcar relacionados con el crecimiento y metabolismo son atribuidos a la acción de sus productos hidrolíticos tales como las hexosas glucosa y fructosa (Rolland, *et al.* 2006).

La síntesis de azúcares, comienza en las células fotosintéticas o cloroplastos en las cuales son generados los fotosintatos por fijación de CO₂. Mediante el ciclo de Calvin se da origen a los azúcares triosa-fosfato, las cuales son exportadas del cloroplasto al citosol, donde son usadas en la glicolisis y posteriormente en respiración; o convertidas a sacarosa para uso local o exportación a tejidos consumidores. La sacarosa puede ser hidrolizada por invertasas de pared celular inducidas por señales generadas por estrés biótico o abiótico, dando origen a las hexosas glucosa y fructosa, que pueden ser consumidas en las hojas productoras. Por otro lado, el exceso de fotosintatos es transitoriamente almacenado en almidón en el cloroplasto durante el día. La ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa) es un enzima clave en la síntesis de almidón y es altamente regulada por azúcares. Una de las principales fuente de señales de glucosa es la ruptura transitoria del almidón de los cloroplastos en células de hoja maduras durante la noche, principalmente vía exportación maltosa y glucosa. (Rolland, *et al* 2006; Taiz y Zeiger, 2010) (figura 1).

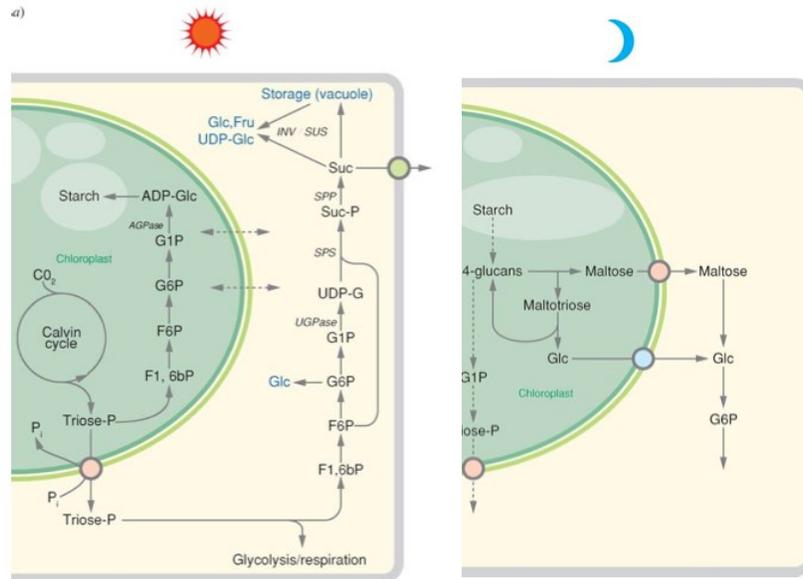


Figura 1. Movilización del carbono en plantas. Modelo simplificado del flujo de carbono y generación de señales de azúcares por fotosíntesis, transporte y hidrólisis en células fotosintéticas durante el día (a) y la noche (b).

Una vez que la sacarosa es sintetizada en los órganos productores, obedeciendo a señales de tejidos consumidores se concentra en el floema mediante una carga que se da del mesófilo de la hoja productora a la célula acompañante. Dependiendo de la especie de la planta la carga del floema se puede dar por dos vías: La primera vía es la simplástica en la cual se da un transporte pasivo mediado por plasmodesmos que comunican la célula fotosintética con el complejo célula acompañante- tubo criboso, y otra vía es la apoplástica en la cual se da un transporte activo mediado por proteínas simportadores (transportan el azúcar en compañía de un protón) en contra del gradiente de concentración (Büttner M. 2010; Rolland, *et al.*, 2006; Padilla & Martínez., 2007; Slewinski & Braun., 2010).

La sacarosa es transportada en el floema y llega el tejido que lo demanda y puede ser incorporada a este mediante una descarga que también puede ser vía simplástica o apoplástica. En *Arabidopsis thaliana* la descarga se da por vía apoplástica y es mediada por simportadores de disacáridos (SUT). En el apoplasto la sacarosa extracelular también puede ser hidrolizada por

invertasas de la pared celular activadas por señales (figura 2) y ser convertida a hexosas (glucosa y fructosa) generando altos niveles de las mismas y favoreciendo la descarga de estos azúcares en tejidos demandantes. Las hexosas son tomadas por proteínas transportadoras de hexosas (STP) e incorporadas a los tejidos demandantes en contra del gradiente de concentración. Estos transportadores de hexosas son coexpresados y coordinadamente regulados con las invertasas de la pared celular. (Rolland *et al* 2006; Padilla y Martínez, 2007).

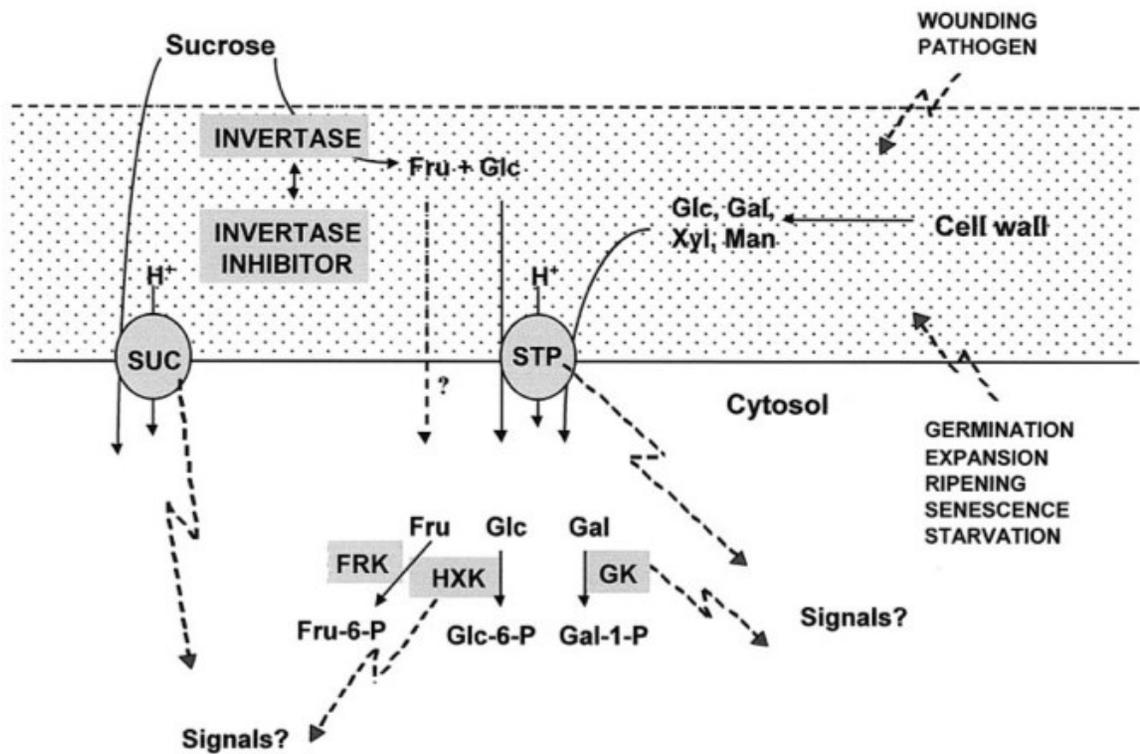


Figura 2. Toma apoplástica de azúcares. La sacarosa puede ser hidrolizada por invertasas de la pared celular las cuales son activadas por señales y ser convertida a glucosa y fructosa (Hexosas) las cuales van a ser descargadas en el tejido consumidos mediante simportadores de monosacáridos los cuales también median el transporte de otros monosacáridos como galactosa, xilosa y manosa. Tomada de Sarah M. Sherson y cols. (2003) *Journal of Experimental Botany*, 54 (382).

2.3 Transportadores de hexosas en *Arabidopsis*

La toma de hexosas del espacio apoplástico a través de la membrana plasmática es mediada por transportadores de monosacáridos, los cuales en *Arabidopsis* están codificados por 14 genes que conforman la familia de los AtSTP (sugar transport protein) (figura 3), los cuales representan el grupo de transportadores de monosacáridos mejor caracterizados. Hasta el momento 8 genes AtSTP (1,2,3,4,6,9,11 y 13) han sido estudiados en detalle por mediar el transporte de hexosas a través de la membrana plasmática dentro de las células, lo cual ha sido demostrado en sistemas heterólogos de expresión como levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*). Usando este sistema, los transportadores AtSTP1, AtSTP2, AtSTP4, AtSTP6, AtSTP11 y AtSTP13 se han caracterizado por tener alta afinidad a la translocación de hexosas tales como glucosa, galactosa y manosa. En el caso de la fructosa se ha demostrado que solo los transportadores AtSTP6 y AtSTP13 pueden transportarla (Scholz-Starke et al. 2003; Norholm et al. 2006), por otro lado AtSTP5 y AtSTP7 no presenta actividad de transporte con las hexosas antes mencionadas lo cual puede indicar que son pseudogenes (Büttner M., 2010).

En cuanto al patrón de expresión los AtSTP (transportadores de monosacáridos) son específicos de algunos tejidos y no presentan un patrón de expresión ubicuo en toda la planta. En la tabla 1 se resumen el patrón de expresión específico para cada uno de ellos.

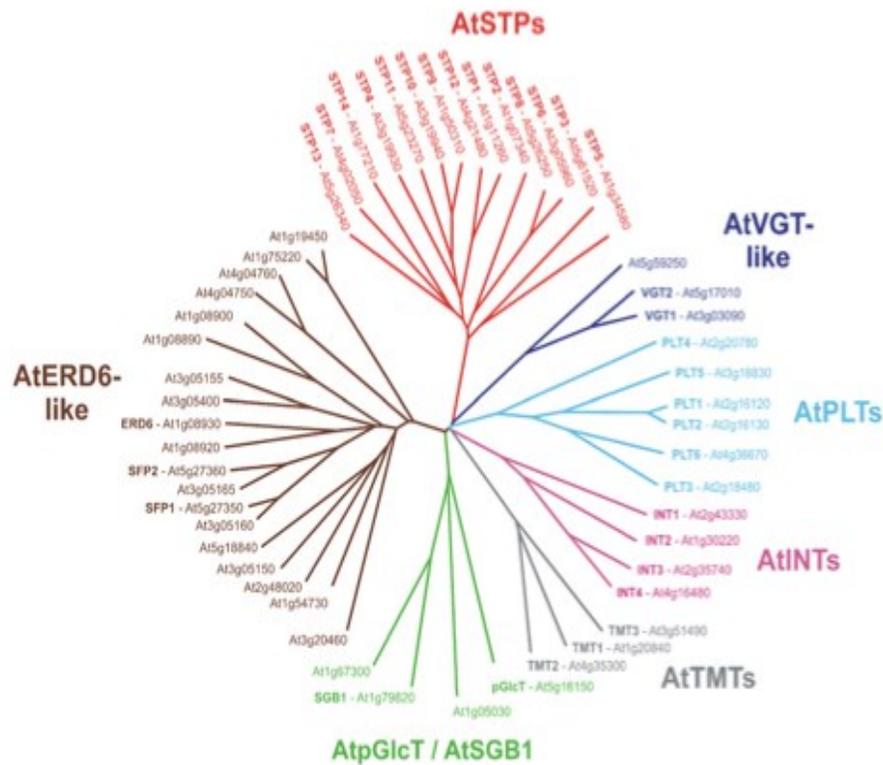


Figura 3. Árbol filogenético de la superfamilia de los transportadores de monosacáridos (MST) en *Arabidopsis*. Las secuencias de proteínas fueron alineadas usando el algoritmo Clustal X y el árbol filogenético fue construido usando el software “Treeview 1.6”. La familia de los AtSTP se presenta en color rojo. Tomada de Büttner (2007).

Tabla 1. Patrón de expresión en *Arabidopsis* de diferentes AtSTP estudiados. (Büttner, 2010). *M (Hojas maduras), ** J (Hojas jóvenes).

	Polen temprano	Polen maduro	Raíz	Semilla	Células estomáticas	Hojas*M **J	Pétalos	Tallo
AtSTP1			X	X	X	X(J)		X
AtSTP2	X							
AtSTP3								
AtSTP4	X	X			X	X(J)		
AtSTP6		X						
AtSTP9		X						
AtSTP11		X						
AtSTP13			X		X	X(M)	X	
AtSTP14				X		X(M)		

Como podemos observar en la tabla 1, seis de los catorce AtSTP se expresan durante la formación y maduración del polen el cual es un tejido heterotrófico, y muchos estudios demuestran la importancia de los transportadores de hexosas en este proceso. (Büttner, 2010).

En cuanto al desarrollo de la semilla se ha encontrado alta expresión de AtSTP 1,5,7,12 y 14 días durante las etapas tempranas de crecimiento y esta expresión decrece durante las etapas tardías, por el contrario los transportadores de sacarosa (SUC) presentan un patrón de expresión opuesto donde la expresión tardía de transportadores de sacarosa es correlacionada con un cambio a maduración y acumulación de productos de almacenamiento en semilla. Por otro lado la funcionalidad de AtSTP5 y AtSTP7 es cuestionable ya que como se mencionó anteriormente, no presenta afinidad por las hexosas más conocidas pero puede jugar un papel importante en recuperar xilosa y arabinosa importantes para la formación de la cubierta de la semilla (Büttner, 2010).

Otro órgano consumidor donde se encuentra expresión de AtSTP es la raíz. En *Arabidopsis* la raíz no almacena cantidades suficientes de almidón y depende de un suministro constante de fotoasimilados del floema. Adicionalmente, las raíces pueden tomar hexosas externamente mediadas por estos transportadores. Comparando los niveles de expresión de los transportadores de sacarosa (SUC) estos son bajos en raíces mientras las invertasas de pared celular son expresadas en altos niveles, indicando que la sacarosa debe jugar un papel menor en proveer con carbohidratos a las células de la raíz vía apoplástica (Büttner., 2010; Tsai, et al., 2009).

El AtSTP13 y AtSTP14 son expresados en hojas maduras (tejido productor), donde posiblemente jueguen un papel importante en la recuperación de hexosas apoplásticas (Büttner, 2010). El AtSTP1, AtSTP4 y AtSTP13 son

expresados en células estomáticas las cuales no tienen suficiente capacidad para reducir carbono, por lo que representan un órgano consumidor de carbohidratos que depende del suministro de carbono por parte de órganos productores. (Outlaw .,2003).

Por otro lado, la regulación a nivel transcripcional de estos genes ha sido ampliamente demostrada y está dada por factores externos tales como ataque a patógenos, daño mecánico, luz, oscuridad y el ciclo circadiano de la planta. Los principales factores que afectan la expresión de los AtSTP se muestran en la tabla 2

Tabla 2. Regulación transcripcional de AtSTP por diversos factores internos y externos. (R) Reprimido, y (I) Inducido.

	Ataque de Patógenos	Daño mecánico	Luz	Ciclo Circadiano	Oscuridad	Senescencia
AtSTP1	X(I)		X(R)	X	X(I)	
AtSTP2						
AtSTP3	X(I)	X(I)				
AtSTP4	X(I)	X(I)		X	X(I)	
AtSTP6						
AtSTP9						
AtSTP11						
AtSTP13	X(I)		X(R)		X (I)	X (I)
AtSTP14			X(R)		X (I)	

A diferencia de la regulación transcripcional, las modificaciones post-transduccionales de los AtSTP han sido poco estudiadas, pero se ha demostrado que se pueden dar por procesos de fosforilación en los simportadores AtSTP1, AtSTP13 y AtSTP14. (Nuhse at al. 2004; Büttner, M. 2010).

De acuerdo a lo documentado anteriormente, el AtSTP13 es un transportador de nuestro interés para ser sobreexpresado en *Arabidopsis* con el fin de mejorar el transporte de hexosas especialmente por su capacidad para transportar glucosa y fructosa dos hexosas derivadas de la hidrólisis de la sacarosa. Por otro lado su patrón de expresión en tejido vascular de raíces, hojas, células estomáticas y pétalos emergentes nos hace pensar que este STP puede tener un papel clave en la recuperación de hexosas apoplásticas. Estas son descargadas en los órganos consumidores los cuales a su vez podrán tener un mejor aprovechamiento de las mismas. Por otro lado ya ha sido demostrado que la sobreexpresión constitutiva de *STP13* en *Arabidopsis thaliana* mejora el uso de nitrógeno y el crecimiento de las plantas (Schofield et al. 2009).

2.4 Proteína con actividad citocromo b5 reductasa (Cytb5R)

La membrana del retículo endoplásmico contiene dos sistemas de transferencia de electrones; uno es el sistema dependiente de NADH que contiene la NADH-Cytb5 reductasa y el otro es el sistema dependiente de NADPH que contiene la NADPH- Cyt p450 reductasa. La NADH- Cytb5 reductasa es una flavoproteína unida a membrana que contiene FAD como grupo prostético y en plantas superiores la NADH-Cyt b5 reductasa es el mayor componente involucrado en la transferencia de electrones (Fukuchi-Mizutani, 1999).

En el 2000 fue descrita por Xoconostle y colaboradores, una proteína perteneciente a la familia de la citocromo b5 reductasa (Cytb5R), la cual fue previamente identificada en calabaza y que tiene un gen homólogo que codifica para la misma en *Arabidopsis*. Esta proteína fue llamada CmPP36, la cual presenta un dominio de membrana N-terminal y un dominio de unión NADH+. Esta proteína presenta dos isoformas una de 36kDa y otra de 31kDa en la cual su dominio de membrana N-terminal de 5kDa es procesado

para producir una proteína soluble de 31kDa, presente en la savia del floema. Mediante estudios de q-PCR también se pudo establecer que mRNA de *cmpp36* están presentes en todos los órganos de las plantas y son muy abundantes en tejido vascular, se encuentran en niveles bajos en flores y hojas, en niveles intermedios en tallos y altos niveles en raíces.

El modelo propuesto para explicar cómo la forma procesada de *Cmpp36* entra al tubo criboso de la planta es el siguiente: La transcripción y traducción de *CmPP36* se realiza en células acompañantes maduras, resultando una proteína anclada a la membrana plasmática vecina al complejo de células acompañantes y tubo criboso. Posteriormente, una proteinasa específica tipo tripsina procesa a *Cmpp36*, la cual es capaz de ser reconocida por la maquinaria de translocación en plasmodesmos. Esta proteína es activamente movilizada al tubo criboso. La secuenciación del extremo amino terminal de la *CmPP36* muestra que la proteinasa que actuó fue del tipo tripsina, al digerir después de la presencia de un residuo de triptófano (Xoconostle et al., 2000).

Así como todos los miembros de la familia *Cytb5R*, la *Cmpp36* puede funcionar como un donador de electrones en una variedad de procesos fisiológicos, posiblemente la forma procesada de *Cmpp36* presente en la savia del floema puede servir para mantener hierro con el tubo criboso en estado reducido (estado soluble) y asegurar su eficiente transporte a los tejidos. Esto fue evidenciado experimentalmente, por ensayos *in vitro* en el que la proteína del floema purificada de 31 kDa media la reducción de Fe^{+3} quelato, Fe^{+3} -citrato y Fe^{+3} EDTA en presencia de $NADH^{+}$ (Xoconostle et al.2000).

En *Arabidopsis thaliana* se encuentra un gen homólogo AT5G17770 que codifica para esta proteína de la familia *Cytb5R*, la cual es de nuestro interés para ser sobreexpresada en esta planta modelo, debido a que la ruta de movimiento apoplástico implica el transporte activo de azúcares mediados

por simportadores los cuales transportan el azúcar en compañía de un protón a través de la membrana en contra del gradiente de concentración, generando posiblemente un desbalance redox a nivel celular o supracelular. Evidencias fisiológicas de medición de pH intracelular y en el floema han mostrado un cambio significativo en la concentración de H⁺ cuando ocurre movilización de fotoasimilados. El poder reductor y la acumulación de citocromo b5 reducido en plantas aumentarían significativamente el transporte de azúcares. Por ello se propone a la enzima citocromo b5 reductasa, que fue clonada por nuestro grupo como candidato a su sobreexpresión bajo la regulación de un promotor vascular.

2.5 Flowering Locus T (FT)

En plantas superiores la transición del estado vegetativo al estado floral representa un cambio fundamental en el desarrollo de la planta que requiere la interacción coordinada de cambios moleculares y bioquímicos los cuales son percibidos en las hojas maduras y son transmitidos hacia el meristemo apical caulinar. Esta transición es controlada por múltiples vías genéticas controladas por estímulos ambientales como temperatura, fotoperiodo y disponibilidad de nutrientes (Lee and Amasino, 1995; Andrés and Coupland, 2012; Romera-Branchat et al., 2014). Sin embargo, se desconoce la manera como estas cascadas se integran *in vivo*. (Corbesier et al, 2005).

Avances en genética molecular han revelado seis diferentes vías involucradas en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis* las cuales son: edad, vernalización, giberelina (GA), temperatura, fotoperiodo y la vía autónoma. Estas vías convergen un pequeño número de integradores florales tales como: Flowering locus T (FT) y supresor de la sobreexpresión de Constans 1 (SOC1) (Lough, *et al*, 2006; Fornara, *et al.*,2010).

En la vía de inducción de floración por fotoperiodo, la proteína FT es una señal de floración que se transloca a larga distancia a través del floema (Corbesier et al., 2007; Tamaky et al., 2007; Lin et al., 2007). Las plantas perciben diferencias en la longitud del día en hojas maduras, y cuando se alcanza una cantidad de la señal móvil FT se desencadena la transición floral en la yema apical (SAM), para iniciar la morfogénesis floral a través de la interacción con proteínas 14-3-3 (Turck et al., 2008; Taoka et al., 2011; Yoo et al., 2013) (figura 4).

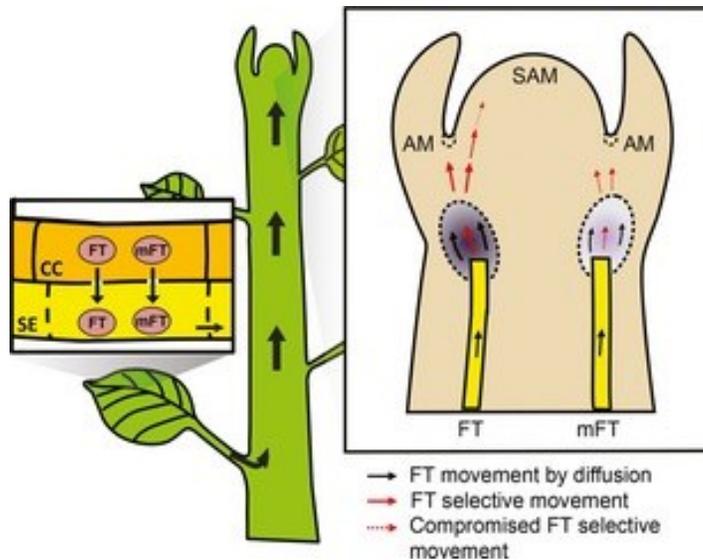


Figura 4. Modelo de como actúa FT en el cambio de identidad de meristemo vegetativo a floral.

Arabidopsis es una planta facultativa cuya floración está influenciada por la longitud del día, florece más tempranamente en días largos (LDS) de 16 horas de luz /8h oscuridad que en días cortos (SD) con 8 horas de luz/16 oscuridad. En días largos los genes *FT* y su homólogo TWIN SISTER OF FT (*TSF*) se activan por el regulador transcripcional CONSTANS. En la hoja *FT* es previamente activada por CONSTAN (CO) que no es capaz de moverse más allá de las células en que es transcrito (An H, Roussot, et al 2004). *FT* es expresado en las células acompañantes y de manera selectiva entra a la corriente de translocación de la hoja y es transportado hacia el ápice por movimiento de célula a célula. *FT* es descargado al plasmodesma hasta

llegar al SAM donde esta el blanco de la transición floral formando un complejo con FD un factor de transcripción bZIP (Yoo et al., 2013). *FT* activa al *SUPRESOR DE LA SOBREENPRESIÓN DE CO (SOC1)*, *FRUITFULL (FUL)* y después *APETALA1 (AP1)*, todos factores de transcripción del tipo MADS (Turck et al., 2008; Torti et al., 2012; Yoo et al., 2013). A sido propuesto que la acumulación de altos niveles de FT en el floema provee una reserva de FT para soportar el tráfico selectivo célula a célula dentro del meristemo axilar (AM) (Yoo, et al., 2013). El meristemo apical (SAM) se encuentra más allá de los límites establecidos para el tráfico de FT y se requiere una buena cantidad para unirse al factor de transcripción FD para inducir floración en el SAM (Yoo et al. , 2013). La transición floral implica una reprogramación transcripcional del meristemo, sin embargo muchos de los cambios globales originados por la expresión de genes que ocurre específicamente en el SAM aún no se entienden completamente (Torti et al. , 2012). La expresión constitutiva de *FT* bajo el promotor CaMV 35S causa floración temprana, obteniéndose flores terminales inmediatamente después de la germinación (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999).

2.6 Tecnologías de nueva generación

La información genética cifrada en el ADN y contenida en los genes se expresa a través de los mecanismos de transcripción y traducción dando origen a moléculas de ARNm y proteínas respectivamente. Eventos celulares tales como la replicación, la diferenciación, la división celular y otros caracteres macroscópicos tales como características fenotípicas, morfológicas, funcionales y de respuesta ante estímulos son producto de la expresión diferencial de genes. La transcripción es un proceso nuclear cuya activación depende de estímulos intra o extracelulares que activan cascadas de señalización para determinar cuáles genes deben expresarse o reprimirse de acuerdo con el tipo de estímulo inicial. La cantidad de moléculas producidas de determinado ARNm depende de la función que este tenga en

un proceso celular específico. Por ejemplo en respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producirán. De manera similar, bajo ciertas circunstancias particulares hay genes que permanecen apagados, pero un estímulo hace que se expresen iniciándose la transcripción. Es por este motivo que la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcrito bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen. Por otro lado los niveles de ARNm pueden dar no solo una visión clara de patrones de expresión, sino también cuantificaciones altamente correlacionadas entre cambios en la abundancia de ARNm con cambios en la abundancia de proteínas. En conjunto, todos los transcritos derivados de genes que se producen en una célula en un momento y bajo una condición fisiológica determinada se denomina transcriptoma. (Sedano.C et al.,2012)

Actualmente gracias a los avances en las técnicas de secuenciación masiva de cADN o RNA (RNA-seq), a través de las tecnologías de nueva generación NGS (del inglés Next generation sequencing) se han revolucionado los campos de la genómica y la transcriptómica . Estas tecnologías han permitido no solo generar información con altos rendimientos y a bajo costo, si no también abrir nuevos horizontes para el entendimiento detallado y global de procesos de expresión génica (Mochida y Shinozaki, 2011; Ozsolak F y Milos P.M, 2011; Ward et al., 2012; Sedano.C et al.,2012). La tecnología de RNA-seq , cambio de manera definitiva la forma de analizar los transcriptomas ya sea de una célula o un tejido permitiendo llegar al entendimiento y comprensión de los mismos aún sin ninguna información genómica previa (Wang *et al.*, 2009). RNA-seq genera información completa de los transcritos abarcando no solo la secuencia de los mismos si no también información de la estructura de exones, sitios de inicio de la transcripción, detección de fusión de genes, caracterización de microRNA y detección de eventos de splicing alternativo, (Ozsolak F y Milos P.M, 2011). La información de esta manera puede ser integrada e interpretada, y se

constituye de gran utilidad para vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de coexpresión (Sedano, S., *et al.* 2012). Además la tecnología presenta ventajas representadas en datos con alta precisión y altamente reproducibles. (Wang *et al.*,2009)

En plantas los análisis de transcriptomas están siendo últimamente bastante utilizados y han permitido por ejemplo en *Arabidopsis* identificar papeles clave de la melatonina en el sistema de defensa de plantas (Weeda, S., *et al.*, 2014), identificar genes marcadores de embriogénesis somática, (Wickramasuriya, A. M., y Dunwell, J. M. 2015), estudiar la regulación de genes de pared celular en la formación de tallo (Minic, Z., *et al.* 2009), siendo solo algunos ejemplos de las muchas aplicaciones que presenta la tecnología.

La tecnología RNA-seq actualmente está disponible comercialmente en las compañías, SOLiD/Life Technologies y Helicos/ BioSciences, Roche/454 y Solexa/ Illumina siendo estas dos últimas las más utilizadas de las tecnologías (Strickler *et al.*, 2012). Sin embargo estas compañías y otras no cesan en la búsqueda de mayores rendimientos de secuenciación, obtención de lecturas más largas que se lleven a cabo en tiempo real y cada vez a costos más bajos (Mardis, 2011)

3. Justificación

La productividad en plantas entendida como el crecimiento y producción de frutos está limitada por la síntesis, transporte y consumo de fotoasimilados de tejidos productores a tejidos consumidores. En plantas superiores, este transporte llamado translocación ocurre a través de un conducto especializado llamado floema. Aunque se han identificado proteínas que median el proceso este aún no ha sido entendido en su totalidad. La sobreexpresión de genes que codifican para estas proteínas en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, y los posteriores análisis transcriptómicos por RNA-Seq, nos pueden llevar al entendimiento de las bases moleculares que median el transporte de azúcares y consumo de los mismos, lo que permitiría manipular estos procesos con el fin de obtener características deseables en plantas. Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo de este trabajo fue obtener líneas transformadas de *Arabidopsis thaliana* con genes relacionados con el transporte y consumo de azúcares. Entre los genes relacionados con transporte esta el gen que codifica para la proteína transportadora de hexosas vía apoplástica AtSTP13 y el gen que codifica para la proteína CyB5R la cual es soluble en floema mostrando tener un poder reductor, y un gen relacionado con consumo de fotoasimilados que codifica para la proteína que actúa como una señal inductora de floración Flowering Locus T (FT) con el fin de aumentar la demanda de azúcares por parte del tejido consumidor. Posteriormente analizar la respuesta fenotípica y transcriptómica en las líneas sobreexpresoras nos permitirá contribuir al conocimiento de las bases moleculares que intervienen en el proceso.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Analizar los efectos en *Arabidopsis thaliana* de la sobreexpresión de genes de interés que codifican para proteínas relacionadas con transporte y/o consumo de azúcares.

4.2 Objetivos específicos

- Construir vectores para la expresión de los genes de interés *STP13*, y *Cytb5R* regulados por un promotor vascular (59880) y *FT* regulado por un promotor específico de meristemo *KNAT1*.
- Obtener plantas transformadas de *A. thaliana* y comprobar la presencia del transgen, número de copias y nivel de expresión.
- Analizar fenotípicamente al menos tres líneas independientes de plantas transformadas con al menos un gen de interés.
- Realizar análisis transcriptómicos de expresión RNA- seq utilizando herramientas bioinformáticas de las plantas sobreexpresoras de al menos un gen de interés vs plantas sin transformar Wild Type.

5. Materiales y métodos

5.1 Construcción de vectores de expresión con los genes de interés *STP13*, *Cytb5R* y *FT* regulados por promotores vasculares y de meristemo respectivamente.

Para la sobreexpresión de los genes *STP13* y *Cytb5R* se ensamblaron construcciones utilizando un promotor vascular 59880. Para la expresión del gen *FT* fue usado un promotor específico de meristemo KNAT1 de un gene de *Arabidopsis thaliana* homologo al gene KNOTTED1 en maíz (Lincoln, 1994; Long, 1996; Heyer, 2004). El aislamiento de los marcos de lectura abierta o ORF y el ensamblaje de las construcciones se llevo a cabo siguiendo los pasos que se describen a continuación.

5.1.1 Extracción de RNA total y amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés

Para amplificar los ORF de los genes de interés *AtSTP13*, *Cyb5R* y *FT* se procedió a realizar la extracción de RNA, para posteriormente realizar la síntesis de cDNA.

Para la extracción de RNA, se partió de 100 mg hojas de *Arabidopsis thaliana* de aproximadamente dos meses de edad. Las hojas fueron maceradas con nitrógeno líquido, posteriormente el DNA fue extraído con el kit RNEASY para RNA de QIAGEN®. El RNA obtenido se cuantificó con el equipo espectrofotométrico Nanodrop de Thermo scientific® (ND-1000). La integridad del RNA obtenido se analizó mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa (1.4%) con formaldehído.

5.1.2 Síntesis del DNA complementario (cDNA).

Para sintetizar la primera cadena de cDNA, se emplearon 500 ng de RNA total extraído de hojas de *Arabidopsis thaliana* como molde para la síntesis de la primera cadena de cDNA la cual fue sintetizada con el kit Superscript II – RT® (Life Technologies) y el protocolo de SMART® síntesis de cDNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Para los síntesis de la segunda cadena de cDNA fue amplificado por PCR a larga distancia (LD-PCR) con 20, 22, 24, 26 ciclos independientemente, con el fin de identificar el número de ciclos óptimo para obtener una adecuada cantidad de producto PCR. Para la amplificación se utilizó un termociclador de marca Biometra® (T-professional basic gradient) y se utilizó el siguiente programa: Una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos y 26 ciclos de: 94°C 35 segundos, 68°C 6 minutos, 72°C 6 minutos. El cDNA obtenido fue analizado en un gel de agarosa al 1.0% .

5.1.3 Amplificación de los ORF de interés

A partir del cDNA obtenido se amplificaron los ORF de los genes de interés mediante PCR, para cada uno de los genes fueron diseñados oligos específicos (tabla 3) teniendo en cuenta la base de datos de “Arabidopsis Information Resource (TAIR)” .

Tabla 3. Oligos específicos diseñados para amplificar ORF de interés a partir de cDNA.

ORF	Oligos	Tamaño del amplicon
(AT5G17770)- Cytb5R	ATCb5RedF (ATGGATACCGAGTTTCTCCGAAC) ATCb5RedR (TCAGAACTGGAATTGCATCTCCG)	846 pb
(AT5G26340) –STP13	AtSTP13F (5'TGACCGGAGGGAGGATTTGCGACT3') AtSTP13R (5'TTAAAGCCGTGTTGAAGGATCAA 3')	1581pb
(AT1G65480)	AtFT1F (5'ATGTCTATAAATATAAGAGACCC3') AtSTP13R (5'TTAAAGCCGTGTTGAAGGATCAA 3')	528pb

Para la amplificación de los ORF de interés. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó se describe a continuación: Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos seguido de 26 ciclos de: 94 °C por 35 segundos, 68 °C (para *Cytb5R*), 61°C (*STP13*) y 66°C (*FT*) por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto, seguido de una elongación a 72 °C por 7 minutos.

5.1.4 Clonación de los ORF en pDRIVE

Los productos PCR correspondientes a los ORF amplificados de los tres genes de interés fueron clonados independientemente en el plásmido p-Drive® (QIAGEN). Posteriormente se transformaron en células competentes de *E-coli* DH5α las cuales fueron crecidas en medio LB (Luria Bertani) suplementado con kanamicina (100 µg/ml) como antibiótico de selección, IPTG (isopropyl beta-D- tiogalactopiranosido) (0.1mM) y X-Gal (5 bromo-4 cloro-3-indolyl-β-galactosido) (40 µg/ml). La selección de las colonias se realizó por color. Las colonias azules contenían el plásmido recircularizado, y las colonias blancas contenían el plásmido con el inserto.

De cada uno de los productos PCR de los ORF (*AtSTP13*, *Cyb5R* y *FT*) clonados se seleccionaron 5 colonias blancas, y se les realizó la purificación del plásmido por medio de miniprep por el método de Birnboim y Dolly (1979). El producto de las miniprep fue visualizado después de la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% .

Posteriormente una vez corroborada la presencia del plásmido con movilidad indicativa de la incorporación del inserto al ser comparada con el plásmido control, se procedió a hacer una digestión del plásmido con la enzima de digestión EcoRI para la liberación del inserto.

Una vez que se obtuvo el patrón de digestión esperado de los tres genes de interés (*AtSTP13*, *Cyb5R* y *FT*), se enviaron a secuenciar en el laboratorio de servicios genómicos de Langebio -Cinvestav Irapuato.

5.2.5 Promotor Vascular

Para la selección del promotor vascular empleado para sobreexpresar los genes *AtSTP13* y *Cyb5R* relacionados con transporte de azúcares, se partió de semillas de 14 líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con promotores previamente identificados y reportados por Ruiz-Medrano et al, 2011. Las semillas se pusieron a germinar y se evaluó su expresión en tejido vascular por medio de la prueba histoquímica GUS. Para la evaluación se emplearon plantas de dos meses de edad y se tomaron los siguientes tejidos: Hoja caulinar, hoja de roseta, raíz, tallo, silicuas y flor y se colocaron con el buffer GUS toda la noche a 37 °C, siguiendo el protocolo de Weigel, D. y Glazebrook, J. (2002), los tejidos fueron examinados en un estereoscopio. La reacción GUS fue considerada negativa si no se evidenció color azul luego de 24 horas de incubación.

Una vez seleccionado el promotor vascular 59880 (1000pb) + 5 'UTR, se amplificó a partir del plásmido donde fue clonado previamente. Para la amplificación se utilizó el plásmido purificado por miniprep como molde y primers específicos pAT5G59880 F TCAATTATAATCATCAAACCGCAGAGA y pAT5G59880 R GGTTGAATCAAAGCTAGTCTCAGAGAA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient). El programa que se utilizó: Una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos seguido de 26 ciclos de: 94 °C por 35 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 7 minutos.

5.2.6 Promotor meristemático KNAT1

Para la amplificación del promotor meristemático KNAT1 (Long et al 1996; Lucas, et al 1995), el cual fue utilizado para la expresión del gen que codifica para la proteína señal inductora de floración (Flowering Locus T), se partió de DNA genómico extraído de hojas *Arabidopsis thaliana* mediante el kit DNA extracción de QIAGEN® y se utilizaron oligonucleótidos específicos pATG08150 F (5'-TTCTTAACATTTGACCATTGATTGAAA 3') y pAT4G08150 R(5'ACCCAGATGAGTAAAGATTTGAGAGAG 3'). La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient). El programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos seguido de 30 ciclos de: 94 °C por 35 segundos, 56°C por 45 segundos, 72 °C por 2 minutos 20 segundos, seguido de una elongación a 72°C por 7 minutos. El producto amplificado fue evidenciado en un gel de agarosa al 0.8%

Una vez que se obtuvo el fragmento amplificado del tamaño correspondiente fue clonado en el plásmido p-Drive® (QIAGEN). Posteriormente se transformaron en células competentes de E-coli DH5α las cuales fueron crecidas en medio LB (Luria Bernati) suplementado con kanamicina (100µg/ml) como antibiótico de selección, IPTG (isopropyl beta-D-tiogalactopiranosido) (0.1mM) y X-Gal (5 bromo-4 cloro-3-indolyl-β-galactosido) (40µg/ml). La selección de las colonias se realizó por color seleccionando 5 colonias blancas, y se les realizó la purificación del plásmido por medio de miniprep por el método de Sambrook et al; 1989. El producto de las minipreps fue visualizado después de la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente se procedió a hacer una digestión del plásmido con la enzima de digestión EcoRI para la liberación del inserto.

Una vez se obtuvo el patrón de digestión esperado para el promotor meristemático KNAT1, se envió a secuenciar en el laboratorio de servicios genómicos de Langebio -Cinvestav Irapuato.

5.2.7 Terminador NOS

Las tres construcciones obtenidas para expresar los genes de interés utilizaron el terminador NOS. Para la amplificación terminador NOS, se utilizó como molde la miniprep del plásmido pB7W320 y oligos específicos (T-Nos (F) (5'-TGACCCCTAGAGTCAAGCAGATCGTTCAAACAT-3') and T-nos (R) (5'-ATCAGCTTGCATGCCGGTTCGATCTAGTA-3')). La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos seguido de 30 ciclos de: 94 °C por 35 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos 20 segundos, seguido de una elongación a 72 °C por 7 minutos.

5.2.8 Ensamblaje de productos amplificados para la obtención de las construcciones

Una vez clonados y secuenciados los productos de amplificación por PCR correspondientes al promotor, ORF y terminador, se procedió a realizar la amplificación nuevamente de cada uno con la enzima Pfu para obtener fragmentos romos. Los productos de PCR amplificados fueron purificados mediante el kit "QIAQUICK PCR purification de QIAGEN®. Posteriormente se cuantificaron para poder ensamblarlos y obtener las tres construcciones para la sobreexpresión de los genes de interés Las cuales se muestran gráficamente en la figura 5.

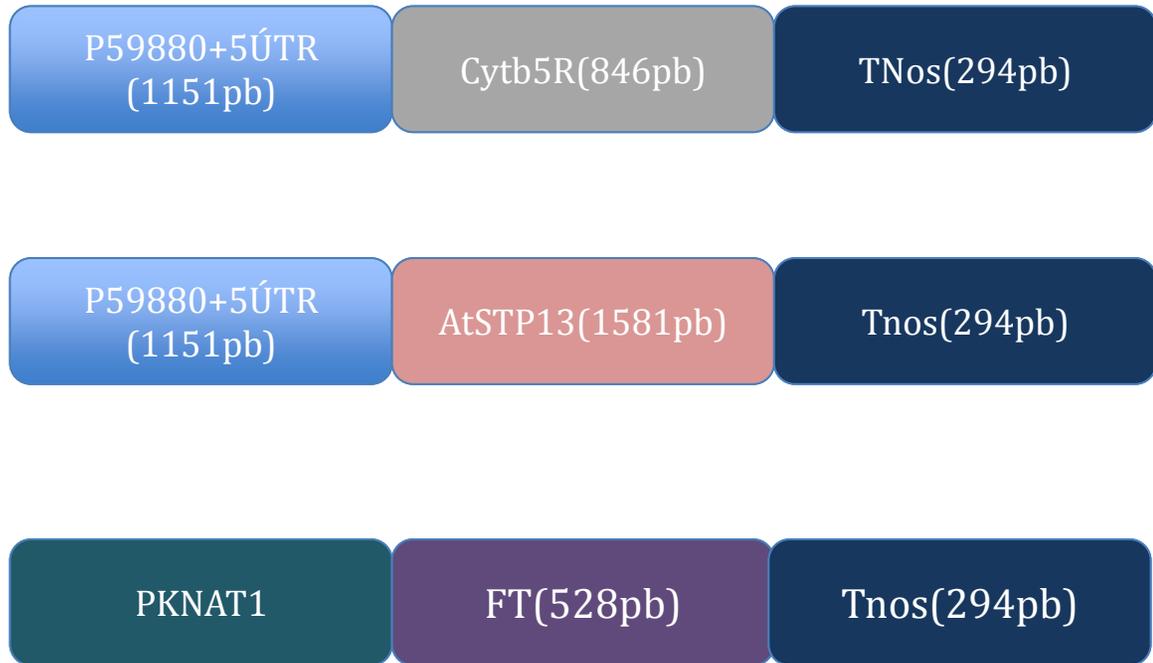


Figura 5. Representación esquemática de las construcciones. (A) Construcción para la expresión del gen que codifica para Cytb5R, (B) Construcción para la expresión del gen que codifica para AtSTP13, (C) Construcción para la expresión del gen que codifica para FT

Para el ensamblaje se utilizó el protocolo GeneIOS™ con algunas modificaciones. Se diseñaron primers conectores para cada una de las construcciones los cuales se describen en la tabla 4 y se utilizaron 100ng de los productos PCR purificados correspondientes al promotor, ORF y terminador de cada una de las construcciones.

El primer paso fue ensamblar el promotor 59880+5'UTR con el ORF amplificado de Cytb5R y/o ATSTP13 y el promotor KNAT1 con el ORF amplificado de *FT*. Se empleó el oligo específico directo del promotor (F) y el oligo conector reverso (R) diseñado para cada una de las construcciones (tabla 4). La mezcla fue preparada con 2 µl de buffer de enzima TAKARA® (DNA polimerasa) y se completó con agua hasta un volumen de 20µl. Esta mezcla se colocó en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), y se programó una rampa de temperatura 94°C a 50°C

bajando 1°C por minuto. Posteriormente se mezclaron DNTPs (100mM) (2.5µl), Takara (0.2µl), H₂O (2.3 µl) y se colocó a 72 °C a 10 minutos.

Posteriormente este fragmento amplificado correspondiente al promotor con el ORF fue ensamblado con el fragmento amplificado correspondiente al terminador NOS utilizado para cada una de las construcciones, utilizando oligos específicos y las mismas condiciones de mezcla y reacción.

Tabla 4. Oligos diseñados para ensamblar cada una de las construcciones para expresar los genes de interés.

Segmento a ensamblar	Oligos	Tamaño esperado producto PCR
(P59880+5'ÚTR)+ AT5G17770 que codifica para Cytb5R	pAT5G59880 (F) (5'TCAATTATAATCATCAAACCGCAGAGA 3') G59880Cb5 (R) (5'AAACTCGGTATCCATGGTTGAAT 3')	1997pb
(P59880+5'ÚTR)+ (AT5G17770) Cytb5R +TNos	G59880CB5r(F) (5'AAACTCGGTATCCATGGTTGAAT 3') Cytb5r-TNOS (R) (5'TGACTCTAGGGGTCATCAGAACT3')	2291pb
(P59880+5'ÚTR)+(AT5G26340) STP13	pAT5G59880 (F) (5'TCAATTATAATCATCAAACCGCAGAGA 3') G59880ATCTP13(R) (5'TCCTCCTCCGGTCATGGTTGAATCAAAGTC3')	2732pb
P59880+5'ÚTR)+(AT5G26340) STP13 + TNos	G59880ATCTP13 (F) (5'AGCTTTGATTCAACCATGACCGG 3'), ATSTP13-NOS (R) (5'TGACTCTAGGGGTCATTAAGCCGTGTTGA)	3026pb
PKNAT1+ AT1G65480 (FT)	pATG08150 F (5'TTCTTAACATTTGACCATTGATTGAAA 3') KNOTFT(R) (5'TATATTTATAGACATACCCAGATGTGAAA3')	
PKNAT1+ AT1G65480 (FT) +TNOS	KNOTFT(F) 5'TTTACTCATCTGGGTATGTCTATAAATATA3' FT-TNOS (R) (5'TGACTCTAGGGGTCACTAAAGTCTTCTTCC3')	

5.3 Transformación genética de *Arabidopsis thaliana* vía *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones

5.3.1 *Material vegetal*

Para la obtención de plantas de *Arabidopsis thaliana* wild type, se germinaron semillas procedentes de la estación experimental de Cold Spring Harbor (NY), en invernadero a una temperatura de 24°C y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad hasta que emergieron los botones florales.

5.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *Arabidopsis thaliana* se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 previamente electroporada con cada una de las construcciones para la expresión de los genes de interés.

5.3.3 Transformación de plantas de *Arabidopsis* y obtención de semillas T0

Para la transformación se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* WT de aproximadamente 2 meses de edad con botones florales. Como unidad experimental se tomó una muestra con 6-8 plantas las cuales fueron transformadas por el método de inmersión floral con algunas modificaciones (Steven J, *et al.*, 1998; Xiuren Zhang, *et al.*, 2006, Logemann, E., *et al.* 2006). Para el ensayo se tomaron 3 unidades experimentales por gen de interés empleando el siguiente método de transformación:

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* en estado óptimo (con varios botones florales) para la transformación, fueron sumergidas en un inoculo preparado con 300 ml de buffer (5% sacarosa 0.02% silwet 77, 10µg BAP) y el raspado del césped de 3 cajas de *Agrobacterium tumefaciens* con el gen de interés. El tiempo de inmersión fue de 35 seg, posteriormente las plantas transformadas se colocaron acostadas en cámara húmeda por un periodo de 24 horas, al termino de este periodo se levantaron y se colocaron en condiciones controladas de 24 °C de temperatura y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad por un periodo de 3 a 4 semanas hasta la obtención de silicuas, posteriormente se suspende el riego y se dejan secar completamente las semillas para ser recolectadas y guardadas en bolsas de papel a temperatura ambiente.

5.4 Selección con glufosinato de amonio en suelo de plantas transformadas con los genes de interés.

Para seleccionar plántulas transformadas a partir de la semilla obtenida de plantas (T0) se siguió el siguiente procedimiento:

1. Sincronización de semillas previamente recolectadas de las plantas transformadas T0 para romper dormancia, colocándolas en refrigeración a 4°C por 2-4 días.
2. Germinación de semillas en sustrato (40% tierra, 40% kechala y 20% agrolita).
3. Selección con herbicida Finale® (glufosinato de amonio 1:3000) empezando con la primera aplicación 15 días después de germinadas las semillas seguido de 2 aplicaciones más cada 4 días
4. A los 15 días de terminado el proceso de aplicación del herbicida a las plantas los cotiledones empiezan a ponerse amarillos. Las plantas no transformadas empiezan a morirse y las transformadas se dejan crecer hasta la obtención de semillas.

El proceso puede observarse de manera gráfica en la figura 6 y 7. Como unidades experimentales se tomaron 4 macetas con aproximadamente 300 semillas (F0) recolectadas de plantas transformadas (T0) con el gen de interés, para asperjar con el herbicida Finale ® 1:3000 y seleccionar las plantas transformadas que resistan el herbicida las cuales van a ser resistentes por tener el gen BAR. Una maceta con semilla (F0) recolectadas de plantas transformadas, (T0) como control sin aspersión con el herbicida glufosinato de amonio (Control para determinar el buen estado de la semilla) y una maceta con semillas de *Arabidopsis thaliana* WT en la cual si se le aplicara el herbicida como control con aspersión (Como control para determinar efectividad en la acción del herbicida en plantas no transformadas).



Figura 6. Proceso de selección con glufosinato de amonio de semillas transformadas con cada uno de los tres genes de interés.

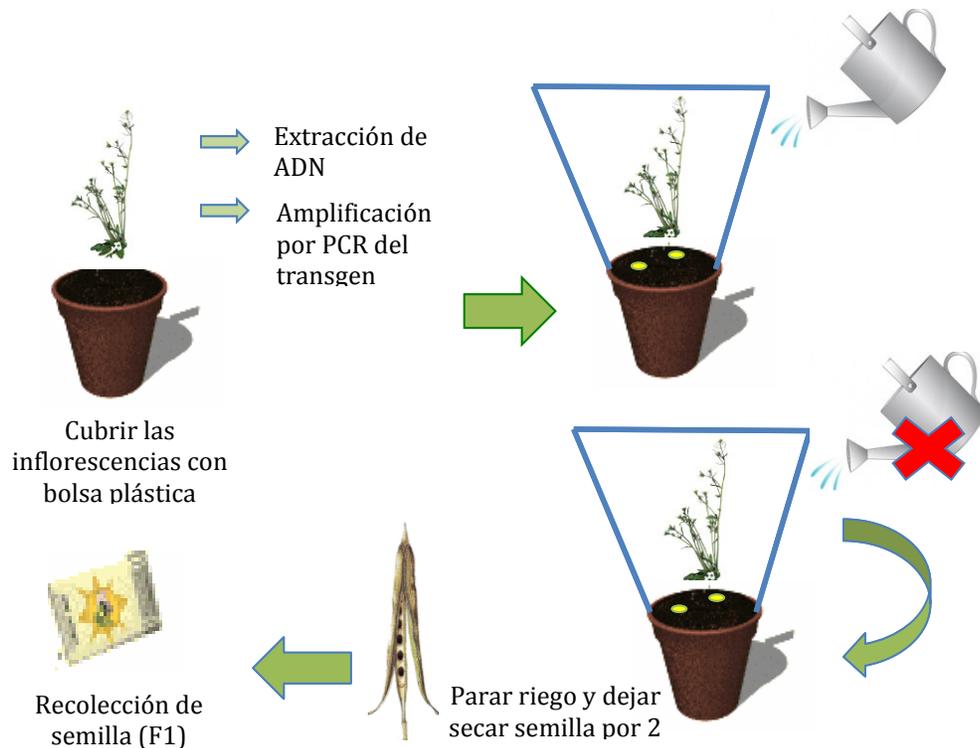


Figura 7. Proceso para la recolección de semillas de líneas independientes transformadas.

5.5 Comprobación de la presencia del transgen por PCR en plantas transformadas seleccionadas utilizando el método “Touch and go” (Berendzen, K.,et al, 2005)

Para la amplificación del transgen y/o el terminador NOS en cada una de las líneas transformadas seleccionados con glufosinato de amonio, se procedió a hacer una extracción rápida del ADN utilizando el protocolo de “Touch and go” reportado por Berendzen, K.,y colaboradores en el 2005. Este protocolo tiene la ventaja de utilizar una mínima cantidad de tejido lo que facilita que la plántula se puede evaluar en una etapa muy temprana del crecimiento, además de tener la ventaja de poder tener una disponibilidad inmediata del ADN y RNA para PCR y RT-PCR. El procedimiento se muestra en la figura 8.

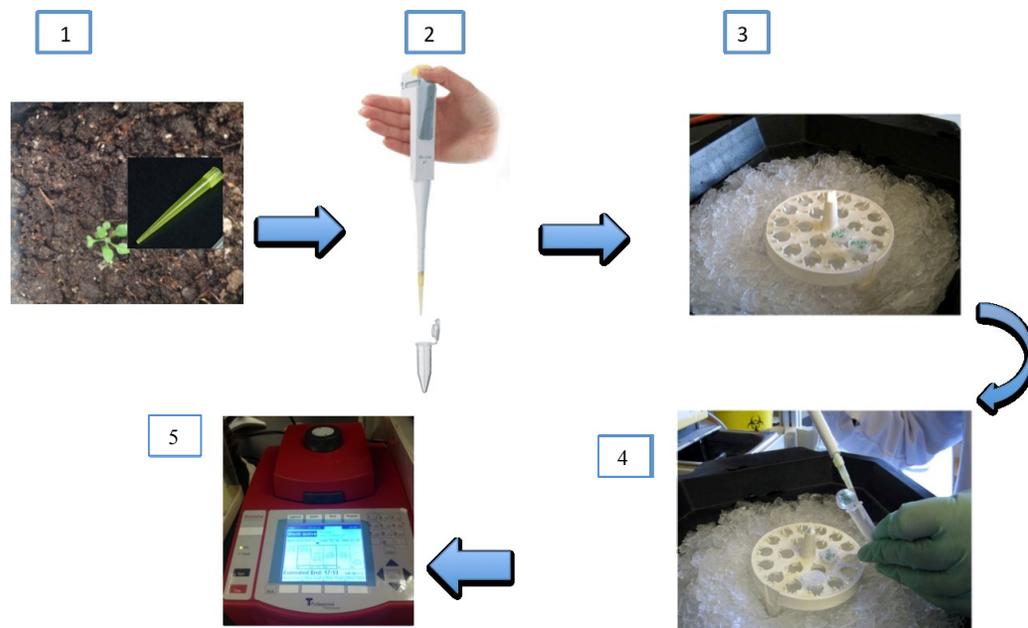


Figura 8. Procedimiento para amplificación del transgen por el método “Touch and go” . (1) Punzar una hoja con una punta de micropipeta de 20µl libre de Rnasas y Dnasa (autoclavada) (2) inmediatamente poner la punta en 10µl de agua destilada autoclavada, esta muestra es suficiente para tener el DNA necesario para realizar la PCR (3) Colocar en Hielo (4) Agregar 40µl del mix de PCR a los 10µl de agua con la muestra como molde (5) Correr la PCR con el siguiente programa: 94°C por 3min seguido de 40 ciclos de 94°C por 30seg , 58°C por 45 seg , 72°C por 30seg , finalizando con un ciclo de 72°C por 10 minutos.4. El producto amplificado puede ser visualizado en gel de agarosa al 0.8%.

Los primers utilizados para amplificar el transgen y el terminador NOS en cada uno de los constructos se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Primers diseñados para detectar el transgen en plantas transformadas seleccionadas y el terminador NOS

Amplicon	Primers
Cytb5R (534pb)	Trangen59880(F) (ATGTTTACTTATTCGGACTAGAGAGCTTCC) OGMCytb5R(R) (AAATGATGAGACATCCGTCCTTGCGGATAC)
STP13 (514pb)	Trangen59880(F) (ATGTTTACTTATTCGGACTAGAGAGCTTCC) OGMSTP13(R) (GAAGAAAACGCCGGCTATGAGCATAGTTAG)
FT (559pb)	Trangenknotted (F) (CCTTGACGAATTCTATATACCTAGTTTCGTT) OGMFT (R)(ACCAAAGTATAGAAGTTCCTGAGGTCTTCT)
T-NOS (294pb)	T-Nos (F) (TGACCCCTAGAGTCAAGCAGATCGTTCAAACAT) T-nos (R) (ATCAGCTTGCATGCCGGTTCGATCTAGTA)

5.6 Determinación del número de copias por PCR digital (dPCR)

La determinación del número de copias en las líneas transformadas seleccionadas con el gen que codifica para la proteína FT se realizó por medio de la técnica de PCR digital o droplet digital PCR (ddPCR). En primera instancia fue necesaria la optimización de condiciones de amplificación por PCR punto final del transgen (*FT*) y del gen endógeno *HMG* (utilizado como control) con sondas y primers diseñados para ser utilizados mediante esta técnica. Posteriormente se validaron las sondas y los primers con la técnica ddPCR realizando un gradiente de temperatura, para determinar la temperatura ideal de amplificación tanto del transgen como del gen endógeno (*HMG*) utilizado. Para la determinación del número de copias fueron utilizados oligos específicos FT-dPCR (FOR) 5'TCCGTTTAATAGATCAATCAC 3' y FT-dPCR (REV) 5' CCCATAACCAAAGTATAG 3' y la Sonda dPCR FT [FAM]TCCTGAGGTCTTCTCCACCA[BHQ-1]. Es de resaltar que estos oligos fueron diseñados en la unión exón –exón con el fin de asegurar que la amplificación del transgen se realizará en el RNA. Para la amplificación del gen *HMG* se utilizaron los siguientes oligos HMGB1At-FOR: 5'CAGAAAGGTGGGAAAGAGGA3'HMGB1AtREV:5'TTTGGTTTGTGGGT CCTT3' Sonda:[HEX]AGGCTTCTCAGCCGGTGCCT[BH1].

Para la ddPCR se utilizaron 90 ng de DNA por planta seleccionada. El DNA fue digerido con la enzima de restricción (HindIII) seleccionada por que no corta el fragmento de interés. Se utilizó 2.5 ng por reacción de DNA. El equipo utilizado fue el Sistema de PCR QX200™ Droplet Digital™ (BIORAD) y las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.7 Determinación del tiempo de floración, conteo de hojas y diámetro de roseta mediante análisis fenotípicos

Se utilizaron semillas de tres líneas seleccionadas por tener una única copia del transgen las cuales fueron 2.1, 3.1 y 4.3. Las semillas se recolectaron y posteriormente se germinaron hidropónicamente según el protocolo publicado por Conn. S. J. 2013. Las plantas germinadas se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 22°C, con un fotoperiodo de día corto (8h luz/16 oscuridad) hasta el día 21 y posteriormente fueron sometidas a un fotoperiodo de día largo (16h luz/8 oscuridad) hasta el final del ciclo. Las plantas fueron monitoreadas diariamente, se determinó el tiempo de floración, se conto el número de hojas, y se midió el diámetro de la roseta mediante el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>).

5.8 Secuenciación de RNA (RNA-SEQ)

Para la extracción de RNA, se utilizaron 50mg de hojas de roseta de dos plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres WT y 3 plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el gen que codifica para la proteína FT (línea 2.1) las hojas fueron tomadas a los 35 días pos germinación.

La extracción del RNA se realizó con el “ RNeasy plant kit” de Qiagen® y se obtuvieron 5 mg de RNA de cada muestra para un total de 5 muestras: 2 de plantas WT y 3 de plantas transformadas con el gen que codifica para la proteína FT. Posteriormente se envió el RNA a secuenciar a OTOGENETICS.

5.9 Obtención de datos de RNA –SEQ

Una vez se determinó que el RNA obtenido tuvo la calidad y cantidad suficiente se procedió a realizar la secuenciación de las 5 muestras. El RNA-

SEQ se obtuvo mediante la preparación de librerías cDNA “Paired- end”. A partir del RNA se obtuvo el cDNA y se realizaron librerías de fragmentos del mismo a los cuales se les añadieron adaptadores específicos los cuales fueron importantes para secuenciar los fragmentos de tamaño conocido por ambos extremos. Utilizando esta información en el mapeo de las secuencias obtenidas, las secuencias fueron obtenidas por medio de un secuenciador Illumina HiSeq2000/2500 PE100.

5.10 Utilización de paquetes bioinformáticos para el análisis de secuencias de RNA –SEQ para determinar la expresión diferencial de genes y expresión de transcritos

Los análisis bioinformáticos se realizaron utilizando las capacidades computacionales de Biowulf Linux cluster en el Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (<http://biowulf.nih.gov>).

Con las lecturas obtenidas de RNA-SEQ de las 5 muestras (WT1,WT2,FT1,FT2 y FT3) se trabajó para determinar la expresión diferencial de genes en plantas WT vs plantas transformadas con el gen *FT* de la misma edad cronológica. Utilizando los programas:

- TopHat/2.04/bowtie2: para alinear lecturas de RNA-Seq usando el programa bowtie2 a un genoma conocido en nuestro caso al de *Arabidopsis thaliana* teniendo como base de datos genómicos de Illumina Tair 10 de *Arabidopsis thaliana* genomes.
- Cufflinks 2.0.2 package: Compuesto de varios programas como Cuffcompare, Cuffmerge y Cuffdiff y es utilizado para ensamblar transcritos, estimar su abundancia y determinar la expresión diferencial de genes en cada muestra de RNA-SEQ

- CummeRbund: Es un programa de R el cual es un paquete, utilizado para visualizar y simplificar el procesamiento de los datos obtenidos.
- Base de datos tair 10 i genomes : utilizada para mapear las lecturas.

5.11 Anotación de genes expresados diferencialmente.

Para la anotación funcional de los genes expresados diferencialmente se utilizaron las siguientes herramientas bioinformáticas:

- TAIR GO Annotation (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/>)
- DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). (Huang DW, *et al.*2009)
- Para visualizar la expresión diferencial de los genes expresados diferencialmente en vías metabólicas se utilizó la herramienta bioinformática Mapman (<http://mapman.gabipd.org>).

5.12 Real time para corroborar la sobreexpresión de genes.

Para validar la expresión diferencial de genes se utilizó PCR en tiempo real, utilizando como molde RNA extraído con RNeasy plant kit” de Qiagen® y el kit KAPA SYBR FAST One-Step q TR-PCR kit. Se utilizó RNA de *Arabidopsis* WT 18s como gen endógeno de control. En la tabla 6 se describen los primers utilizados para la amplificación de algunos genes sobre expresados tales como *FT*, *MAF5*, *SUPPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*, *SPL4*, *STP13* and *STP3*.

Tabla 6. Oligos diseñados para la amplificación del transgen por PCR en tiempo real y ddPCR

Gen	Locus ID	Oligos
FT		FT-dPCR (FOR) 5' TCCGTTTAATAGATCAATCAC 3' FT-dPCR (REV) 5' CCCATAACCAAAGTATAG 3'
MAF5	AT5g65080	MAF5- RTSYBG (F) 5' GGAAGAAGAAGAGTAGAGAT 3' MAF5-RTSYBG (R) 5' ACAGAGAATTGAGAGTTGA 3'
SOC1	AT2g45660	SOC1- RTSYBG (F) 5' GAAGAGAATAGAGAATGC 3' SOC1-RTSYBG (R) 5'AGAGAAGATGATAAGAGAA3'
Squamosa promoter-binding-like protein 4 SPL4	AT5g65080	SPL4-RTSYBG (F) 5'GTCGGAGAGGAATCAATG 3' SPL4-RTSYBG (R) 5'GGCATAGGAAGTGTCAATC3
ATSTP13, MSS1, STP13, SUGAR TRANSPORT PROTEIN 13 STP13	At5g26340	AtSTP13-qPCR(F) "ACTCCGTTGACAAAGTCGGT" AtSTP13-qPCR(R) "TGGCGATTACGACTTGAGAG"
Sugar transport protein 3 STP3	At5g61520	STP3-RTSYBG (F) "CCAAGAAGAAGATAGAAGAAGAAG" STP3-RTSYBG (R) "CGTATAGAGAAGATGTGAAGGA"
18S		18S-F 5'-GTGATGGGGATAGATCATTGCAATTGTTGG-3' 18S-R 5'-TGGACTTCTCGCGACGTCGCGGGCGGCG-3'

6. Resultados

6.1 Síntesis del DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis de cDNA se realizaron extracciones de RNA total de *Arabidopsis thaliana*. Se obtuvieron concentraciones de RNA total entre 632 a 1042ng/μl, la relación 260/280 fue de 2,1 indicando la pureza del RNA obtenido y posteriormente se corrió en un gel de agarosa del 0.8% (figura 9). La cantidad y calidad del RNA obtenido permitió utilizarlo para la síntesis de cDNA de doble cadena el cual fue amplificado a los 26 ciclos, y se visualizó en un gel de agarosa al 1% (figura 10). Este cDNA fue utilizado para la fase posterior de amplificación de los ORF de los genes de interés.

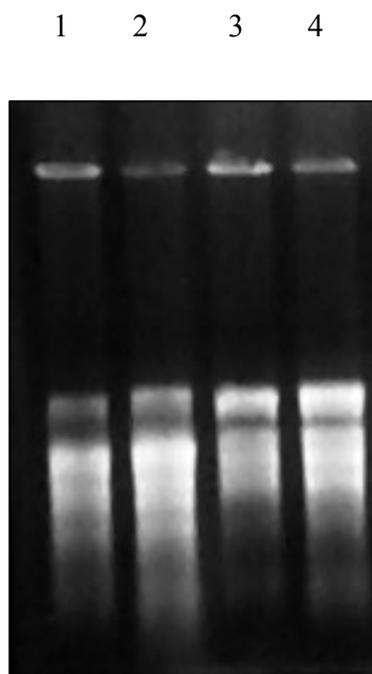


Figura 9 . RNA obtenido a partir de hojas de *Arabidopsis thaliana* en gel desnaturalizante formaldehído-agarosa al 1.4%. Carril 1-4: 5 μl de RNA extraído.

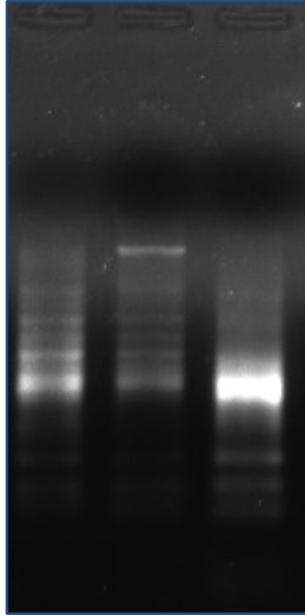


Figura 10 . cDNA de doble cadena obtenido a los 26 ciclos con el procedimiento SMART LD-PCR visualizado en gel de agarosa al 1%. Carril 1-3: 5µl de cDNA.

6.2 Amplificación y clonación de los ORF de interés

Como resultado se obtuvo la amplificación de los ORF correspondientes a los tres genes de interés *Cyb5R*, *STP13* y *FT*, obteniéndose fragmentos amplificados de 846pb (figura 11A), 1581 pb (figura11B) y 528 pb (figura 11C) correspondientes a los tamaños esperados respectivamente. Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8%.

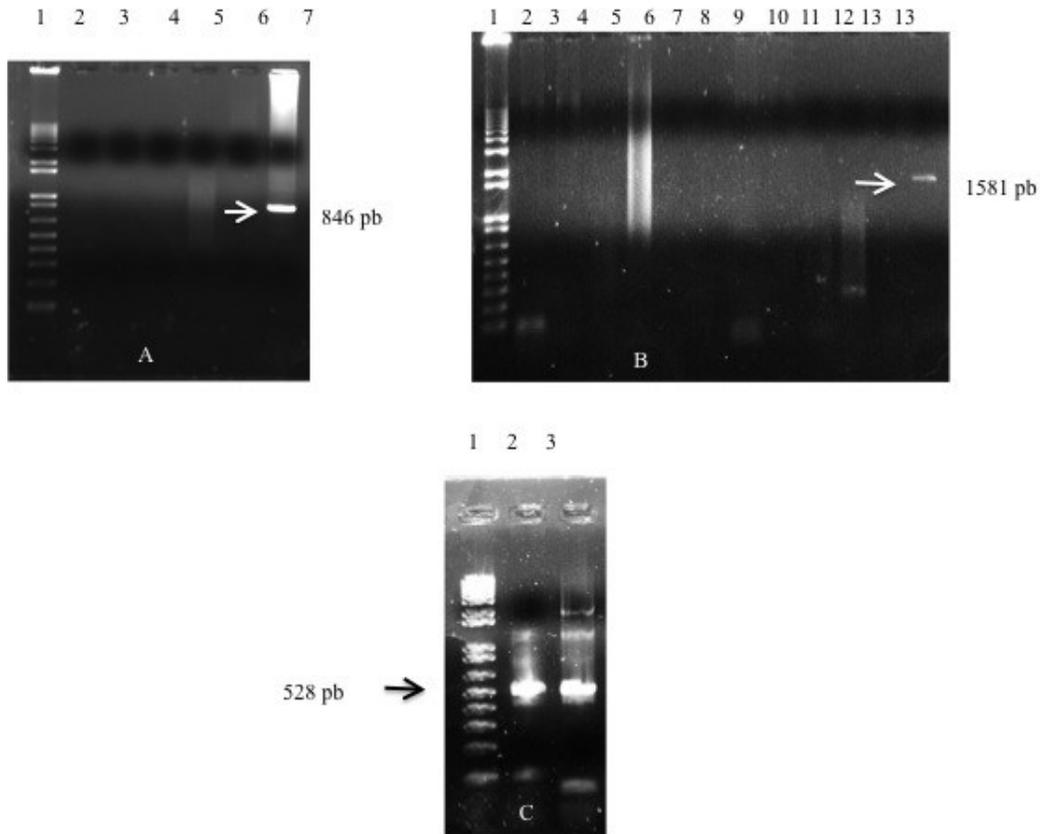


Figura 11 . Producto amplificado por PCR correspondiente al ORF de los genes de interés en gel de agarosas al 0.8% **(A)** Gen que codifica para la *Cyb5R*. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®) Carril 6: 5µl del Producto PCR de 846 pb correspondiente al tamaño esperado. **(B)** Gen que codifica para la proteína *AtSTP13*. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 kB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 13: 5 µl del producto PCR de 1581 pb correspondiente al tamaño esperado. **(C)** Producto amplificado por PCR correspondiente al ORF del gen que codifica para *FT*. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 13: 5µl del producto PCR de 528 pb correspondiente al tamaño esperado

Una vez amplificados los ORF correspondientes a los tres genes de interés (*Cytb5R*, *STP13* y *FT*) estos fueron clonados en el vector plásmidico p-Drive® y transformados en células competentes de *E.coli* DH5α para su almacenamiento. Posteriormente se realizó una miniprep y se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% el producto de las minipreps observándose el plásmido p-Drive® con movilidad indicativa de la incorporación del inserto al ser comparado con el plásmido control (figura 12).

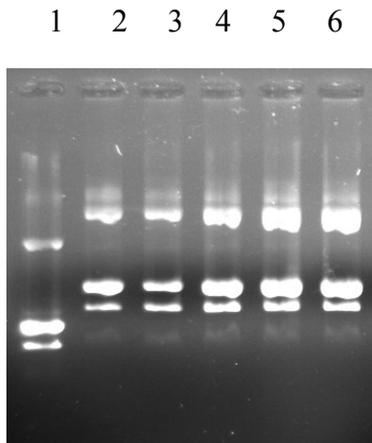


Figura 12. Producto de la miniprep del plásmido p-Drive® con el inserto clonado del gen que codifica para la proteína AtSTP13 en gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: 5 µl de plásmido control. Carril 2-6: 5 µl del producto de la miniprep de cada una de las colonias seleccionadas.

Los plásmidos digeridos con la enzima EcoRI con el inserto correspondiente al gen que codifica para AtSTP13 mostraron un perfil de digestión con dos bandas (una de 1000pb y otra de 581pb) correspondiente al perfil de digestión esperado ya que la enzima EcoRI tiene un sitio de corte en el fragmento amplificado (Figura 13 A, carril 3-10).

Los plásmidos con el inserto correspondiente al gen que codifica para Cyb5R mostraron un perfil de digestión con una banda de aproximadamente 528pb correspondiente al tamaño esperado (Figura 13A , carril 14-17).

Los plásmidos con el inserto correspondiente al gen que codifica para *FT* mostraron un perfil de digestión con dos bandas (Una de 400pb y otra de 181pb) (figura 13B, carril 4) correspondiente al perfil de digestión esperado ya que la enzima Eco RI tiene un sitio de corte en el fragmento amplificado.

Los perfiles electroforéticos esperados fueron previamente visualizados in silico con el programa Nebcutter <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.

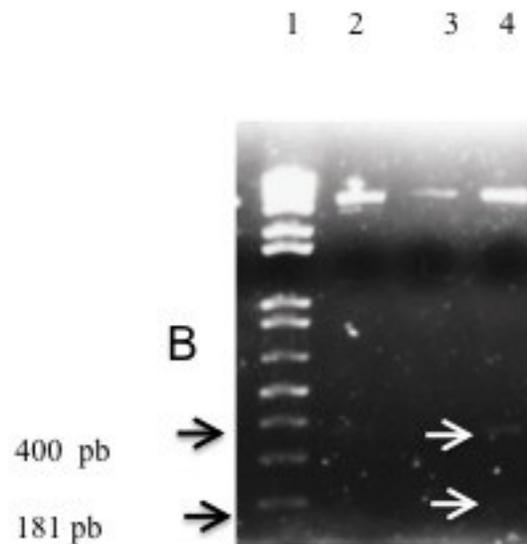
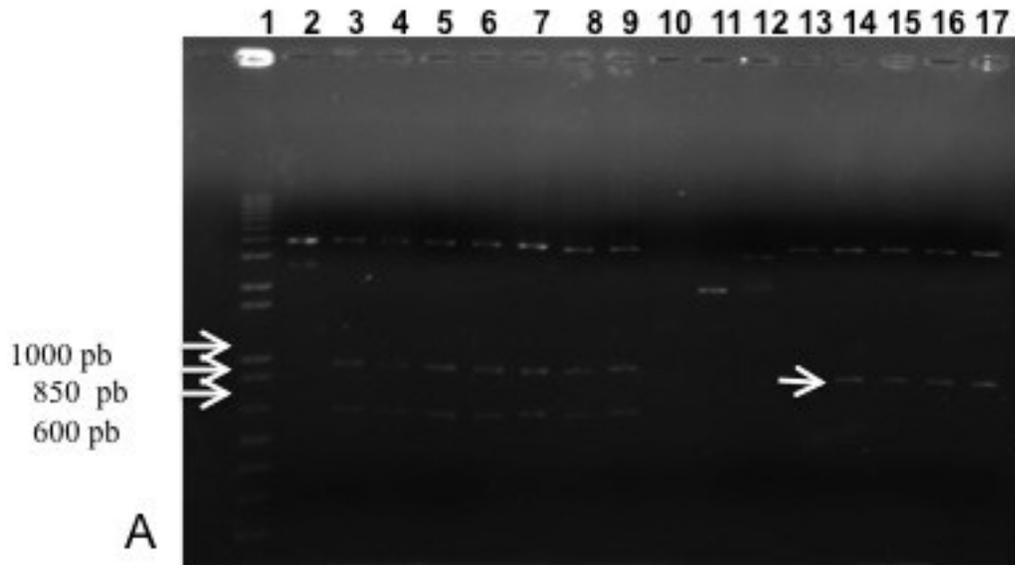


Figura 13 . Producto de la digestión con EcoRI del plásmido p-Drive® con la construcción para la expresión del gen de interés. **(A)** STP13 y Cyb5R. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2: Plásmido sin digerir, carril 3-9: 5µl del producto de la digestión del plásmido con el inserto AtSTP13, carril 10-17: 5µl: del producto de la digestión del plásmido con el inserto Cyb5R. **(B)** (FT). Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de Invitrogen ®), Carril 2: Plásmido sin digerir, carril 3: 5µl del producto de la digestión del plásmido con el inserto FT, carril 4: 5µl del producto de la digestión del plásmido con el inserto FT.

Obtenidas las secuencias de los tres genes fueron comparadas con las bases de datos mediante BLAST (Basic Alignment Search Tool), presentándose una identidad del 100% de las secuencias de los 3 genes de interés con las bases de datos reportadas.

6.3 Promotor Vascular

El promotor vascular seleccionado por su nivel de expresión en tejidos vasculares de *Arabidopsis thaliana* fue el 59880 (1000pb) + 5'UTR, pudiéndose visualizar mediante la prueba GUS (figura 14)

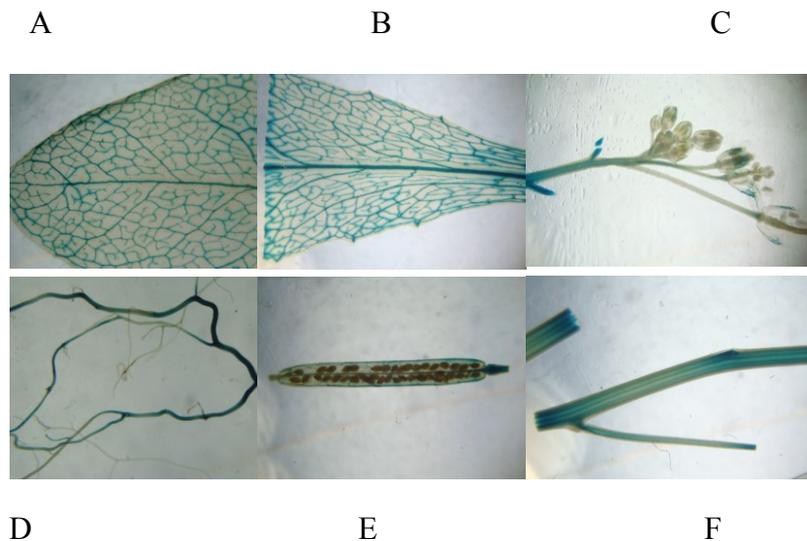


Figura 14. Prueba histoquímica GUS para evidenciar el nivel de expresión del promotor 59880 (1000) + 5UTR en diferentes tejidos vasculares de *Arabidopsis thaliana*. (A) Hoja caulinar, (B) Hoja de roseta, (C) Flor, (D) Raíz, (E) Silicua, (F) Tallo.

Posteriormente el promotor 59880 fue amplificado por PCR obteniéndose un producto de 1151pb, el cual fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 15)

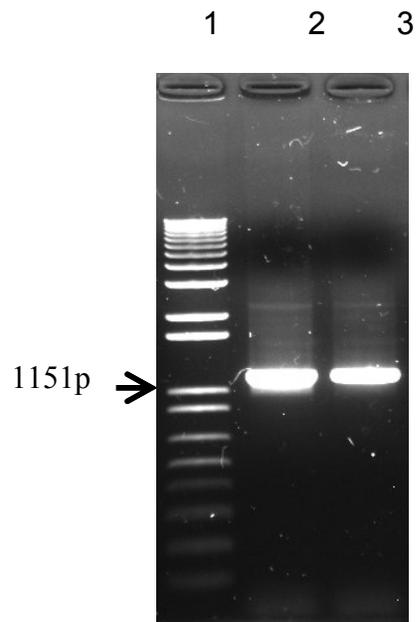


Figura 15. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al promotor 59880 (1000 pb) + 5'UTR en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2-3: 5µl Producto PCR de 1151pb correspondiente al tamaño esperado

6.4 Promotor meristemático KNAT1

El promotor específico meristemático KNAT1 fue amplificado por PCR y el producto amplificado fue evidenciado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 16), obteniéndose un fragmento de 2356 pb correspondiente al tamaño esperado.

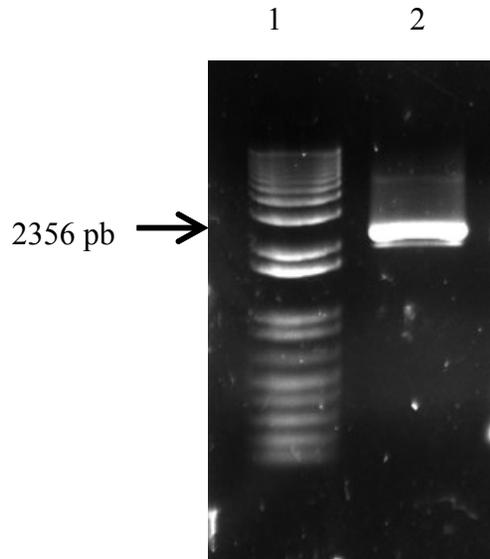


Figura 16. Producto amplificado por PCR correspondiente al promotor KNAT1. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2: 5µl Producto PCR de 2356 pb correspondiente al tamaño esperado.

El análisis electroforético de los insertos liberados con EcoRI, mostró el perfil de digestión esperado para el promotor (figura 17).

Los plásmidos con el inserto correspondiente al gen promotor KNAT1 mostraron un perfil de digestión con cuatro bandas (1053, 702, 348 y 253pb) (Figura 17) correspondiente al perfil de digestión esperado ya que la enzima Eco RI tiene tres sitios de corte en el fragmento amplificado, esto fue verificado in silico con el programa Ncb cutter.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos mediante BLAST (Basic Alignment Search Tool) mostrándose una identidad del 100%.

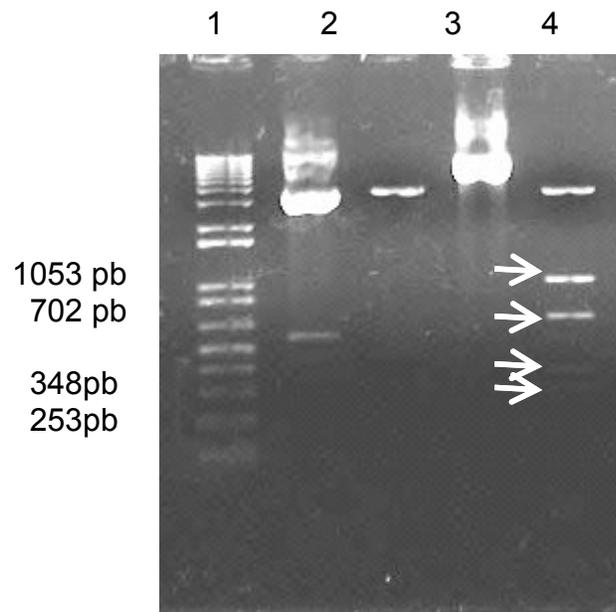


Figura 17 . Producto de la digestión del plásmido con EcoRI del plásmido con el inserto KNAT1. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de Invitrogen®), Carril 4: 5µl del producto de la digestión del plásmido con el inserto KNAT1.

6.5 Terminador NOS

El terminador NOS fue amplificado por PCR y como resultado se obtuvo la amplificación de un fragmento de 294 pb, correspondiente al tamaño esperado (figura 18).

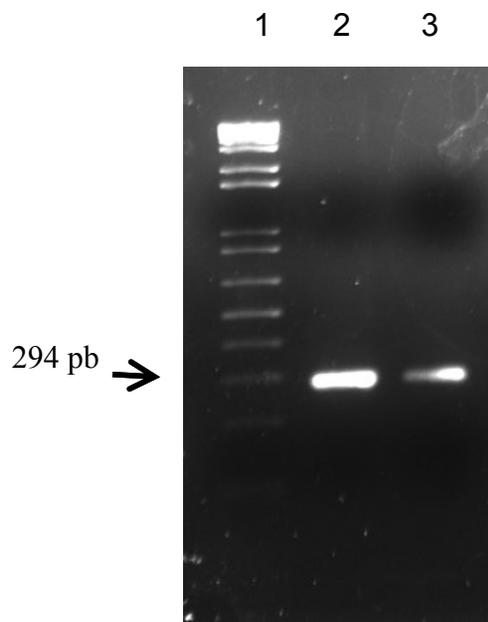


Figura 18. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al terminador NOS en gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2-3: 5µl Producto PCR de 294 pb correspondiente al tamaño esperado.

6.6 Ensamblaje de la construcciones para la sobreexpresión de los genes de interés

Utilizando el protocolo GeneIOS™ con algunas modificaciones se logró el ensamblaje de tres construcciones para sobreexpresar los genes que codifican para *Cytb5R*, *STP13* y *FT* de manera independiente.

6.6.1 Ensamblaje y clonación de la construcción para la sobreexpresión del gen que codifica para *Cytb5R*

Para el ensamble del promotor (59880 + 5' UTR) y el gen AT5G17770 que codifica para *Cytb5R*, se diseñaron oligos específicos de conexión con el fin de conectar el fragmento amplificado del promotor con el gen de interés. El promotor 59880 (1000) + 5'UTR fue amplificado utilizando el plásmido purificado por miniprep como molde, el oligo específico directo del promotor (F), el oligo conector reverso G59880Cb5 (R)

(5'AAACTCGGTATCCATGGTTGAAT 3'), y la enzima PFU®, con el fin de obtener extremos romos. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), y el producto se amplificó con la enzima PFU, el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 minutos seguido de 25 ciclos de: 94 °C por 45 segundos, 60°C por 45 seg, 72 °C por 3 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos.

El fragmento amplificado por PCR fue de 1151 pb, correspondiente al tamaño esperado para el promotor 59880 + 5ÚTR y evidenciado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 19).

El gen At5G17770 que codifica para la Cytb5R fue amplificado a partir del plásmido p-drive® (QIAGEN) donde había sido previamente clonado, el plásmido purificado por miniprep se utilizó como molde, el oligo conector G59880CB5r (F) directo (5'AAACTCGGTATCCATGGTTGAAT 3'), el oligo conector reverso Cytb5r-TNOS (R) (5' TGA CTCTAGGGGTCATCAGAACT), y la enzima PFU. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 minutos seguido de 25 ciclos de: 94 °C por 45 segundos, 62°C por 45 seg, 72 °C por 2 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos.

El fragmento amplificado por PCR fue de 846 pb, correspondiente al tamaño esperado para el gen que codifica para la Cytb5R y evidenciado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 19).

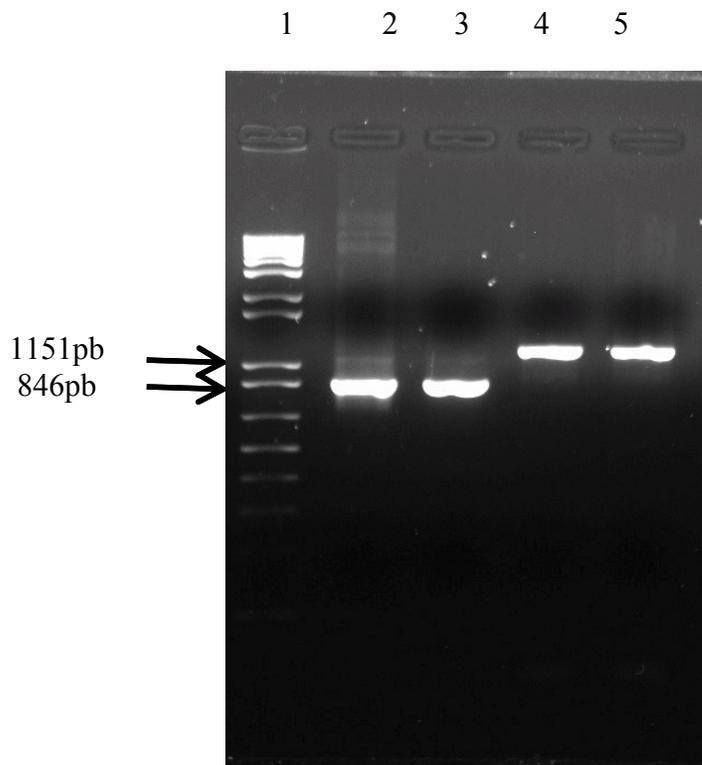


Figura 19. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al promotor 59880 (1000) + 5'UTR y al gen que codifica para Cytb5. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2-3: 5µl Producto PCR de 846 pb correspondiente al tamaño esperado para el gen que codifica la Cytb5R, Carril 4-5: 5µl Producto PCR de 1151 pb correspondiente al tamaño esperado para el promotor.

Para la amplificación terminador NOS, se utilizó como molde la miniprep del plásmido pB7W320, el oligo directo Cytb5r-TNOS(F) (5'CAATTCCAGTTCTGATGACCCCT3'), el primer reverso específico para T-NOS y la enzima PFU®. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 segundos seguido de 30 ciclos de: 94°C por 45 segundos, 68°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto 30 segundos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos. Como resultado se obtuvo la amplificación de un fragmento de 294 pb, correspondiente al tamaño esperado (figura 20).

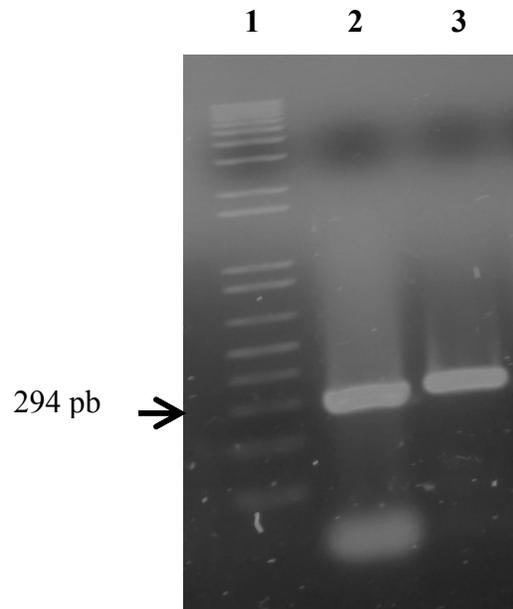


Figura 20. Visualización del producto amplificado por PCR correspondiente al terminador NOS. Carril 1: Marcador de peso molecular 1 Kb plus; Carril 2: 5µl Producto PCR de 294 pb correspondiente al tamaño esperado para el terminador Nos, Carril 3: 5µl Producto PCR de 294 pb correspondiente al tamaño esperado para el terminador.

Los productos de PCR amplificados fueron purificados mediante el kit “QIAQUICK PCR purification de QIAGEN®. Posteriormente se cuantificaron para poder ensamblarlos. Se utilizaron 100ng de los productos PCR purificados del promotor (59880+5’UTR), del producto PCR amplificado del gen Cytb5R y del producto amplificado por PCR del terminador NOS, se colocaron 2 µl de buffer de enzima TAKARA® (DNA polimerasa) y se completó con agua hasta un volumen de 20 µl. Esta mezcla se colocó en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), y se programó una rampa de temperatura 94°C a 50°C bajando 1°C por minuto. Posteriormente se mezclaron DNTPs (100mM) (2.5µl), Takara (0.2µl), H₂O (2.3 µl) y se colocó a 72 °C a 10 minutos. Una vez ensamblados los 3 productos amplificados por PCR correspondientes al promotor vascular, el gen que codifica para Cytb5R y el terminador NOS, se procedió a amplificar el fragmento ensamblado con la enzima TAKARA® (DNA polimerasa). La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional

basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos seguido de 26 ciclos de: 94 °C por 35 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 2 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 7 minutos. El producto de la reacción fue un fragmento amplificado de 2291 pb correspondiente al tamaño esperado del promotor ensamblado con el gen y con el terminador NOS, otras dos bandas de menor tamaño fueron evidenciadas en un el de agarosa al 0.8% (figura 21).

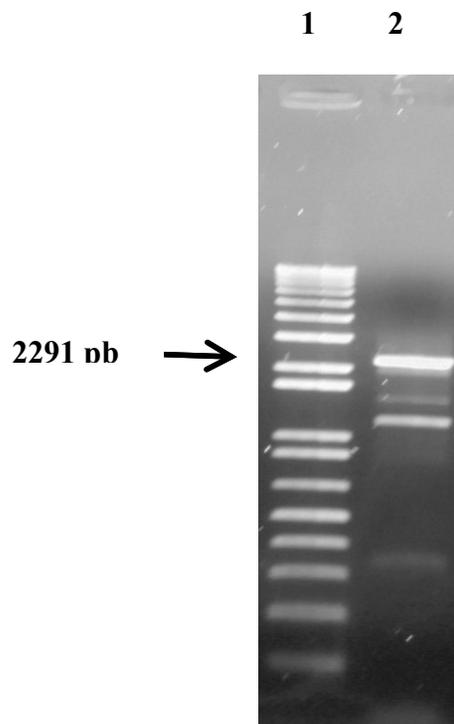


Figura 21. Producto amplificado por PCR correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR), el gen que codifica para Cytb5R y el terminador NOS. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2: 5µl Producto PCR de 2297 pb correspondiente al tamaño esperado para el ensamblaje del promotor con el gen que codifica la Cytb5R y el terminador NOS.

Para clonar la banda del tamaño esperado de 2291pb, se procedió a cortar y a purificar la banda del gel de agarosa mediante el kit QIAquick Spin™ de Quiagen obteniéndose una sola banda purificada del tamaño esperado (Figura 22)

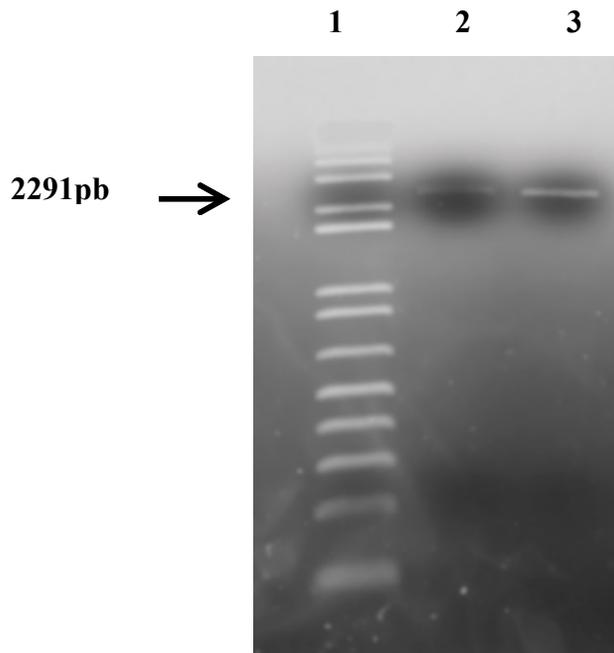


Figura 22. Producto amplificado por PCR correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR) , el gen codifica para Cytb5R, y terminador NOS. Carril1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2-3: 5µl de la banda purificada correspondiente al tamaño esperado del ensamblaje del promotor, el gen que codifica para la Cytb5r y el terminador NOS.

Una vez purificada la banda se ligo en el vector pCR®8/GW/TOPO® TA de Invitrogen (figura 23). Este plásmido es compatible con los vectores Gateway que son los que finalmente serán usados para la transformación de Arabidopsis. Realizada la ligación del producto del ensamblaje con el plásmido se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5α las cuales fueron plaqueadas en medio LB (Luria Bertani) suplementado con espectinomicina (100µg/ml) como antibiótico de selección y se dejaron incubando a 37°C toda la noche.

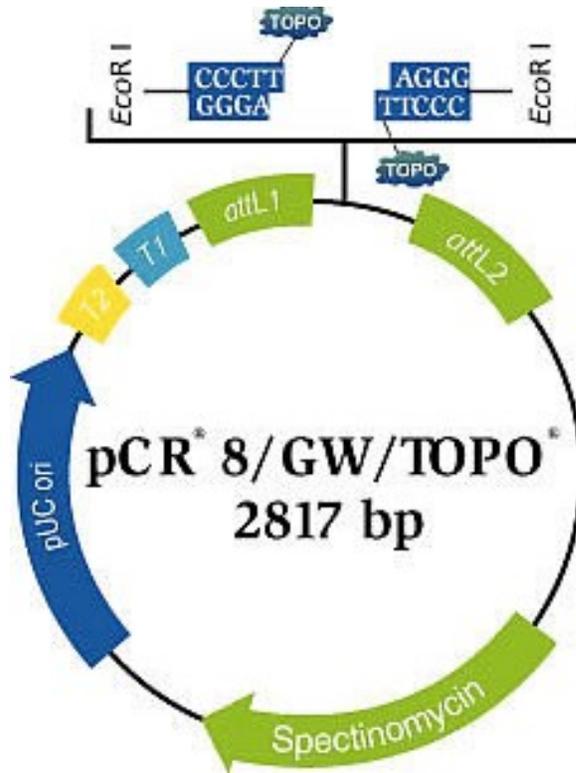


Figura 23. Vector PCR8/GW/TOPO.

Como resultado se seleccionaron 5 colonias, y se les realizó la purificación del plásmido por medio de miniprep por el método de Birnboim y Dolly (1976). El producto de las miniprep fue visualizado después de la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (Figura 24)

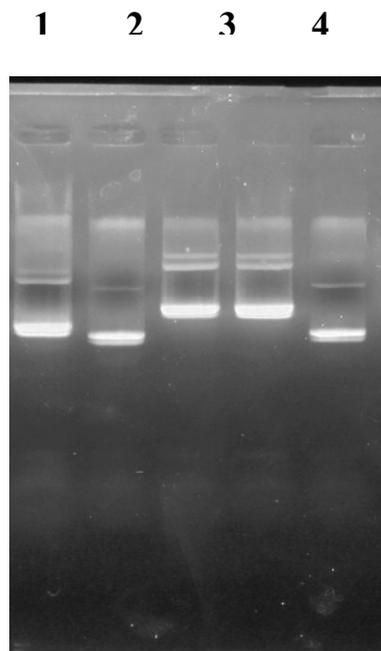


Figura 24. Plásmido PCR8/GW/TOPO con ensamblaje promotor, Cytb5r y terminador NOS purificado por miniprep. Carril 1-5: 4 μ l del producto de la miniprep.

Una vez corroborada la integridad y la presencia del plásmido con movilidad indicativa de la incorporación del inserto (carril 3 y 4 figura 24) al ser comparada con el plásmido control, se procedió a hacer una digestión del plásmido con la enzima de digestión EcoRI para la liberación del inserto.

El análisis electroforético de los plásmidos purificados y de los insertos liberados con EcoRI, mostró el perfil esperado (figura 25). Los plásmidos con el inserto correspondiente al ensamblaje del promotor (59880+5'UTR), con el gen Cytb5R y el terminador NOS mostraron un perfil de digestión con tres bandas (una de 1596pb, otra de 497pb, y otra de 198pb) correspondiente al perfil de digestión esperado ya que la enzima EcoRI tiene dos sitios de corte, esto fue verificado in silico con el programa Nebcutter.

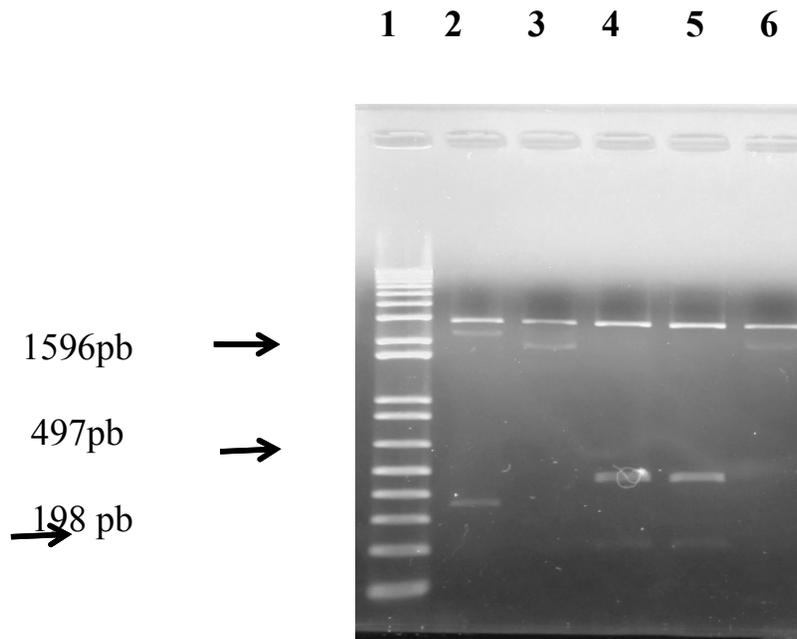


Figura 25. Digestión con EcoRI del plásmido PCR8/GW/TOPO con el ensamblaje del promotor, Cytb5r y terminador NOS. Carril 1: Marcador de peso 1Kbplus, Carril 2-6: Producto de la digestión del plásmido PCR8/GW/TOPO.

Una vez se obtuvo el patrón de digestión esperado, se envió a secuenciar en el laboratorio de servicios genómicos de Langebio -Cinvestav Irapuato, para determinar su identidad.

Como resultado se obtuvieron dos colonias con el plásmido PCR8/GW/TOPO y del promotor (59880+5'UTR), con el gen Cytb5R y el terminador NOS. El producto ensamblado fue transferido por medio del sistema Gateway utilizando clonasa al plásmido pBGWFS7 (Figura 26), para ser utilizado en la transformación de *Arabidopsis thaliana*.

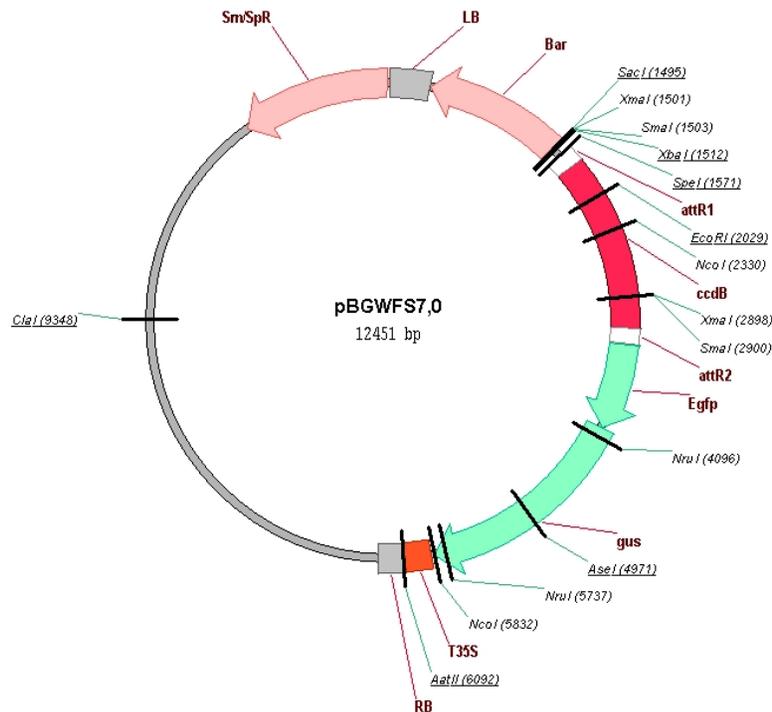


Figura 26. Plásmido pBGWFS7,0 (Gateway)

6.6.2 Ensamblaje y clonación de la construcción para la sobreexpresión del gen que codifica para el transportador de hexosas STP13 en *Arabidopsis thaliana*

Para el ensamble del promotor (59880 + 5' UTR), el gen AT5G26340 que codifica para el transportador de hexosas STP13, y el terminador NOS se diseñaron oligos específicos de conexión (connect) con el fin de ensamblar promotor, el gen que codifica para el transportador de hexosas y el terminador NOS.

El promotor 59880 (1000) + 5'UTR fue amplificado utilizando el plásmido purificado por miniprep como molde, el oligo específico directo del promotor (F), el oligo conector reverso G59880ATCTP13(R) (5'TCCTCCTCCGGTCATGGTTGAATCAAAGTC3'), y la enzima PFU®, con el fin de obtener extremos romos. La PCR se llevó a cabo en un

termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), y el producto se amplificó con la enzima PFU, el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 minutos seguido de 25 ciclos de: 94 °C por 45 segundos, 60°C por 45 seg, 72 °C por 3 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos.

El fragmento amplificado por PCR fue de 1151 pb, correspondiente al tamaño esperado para el promotor 59880 + 5UTR y evidenciado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 27).

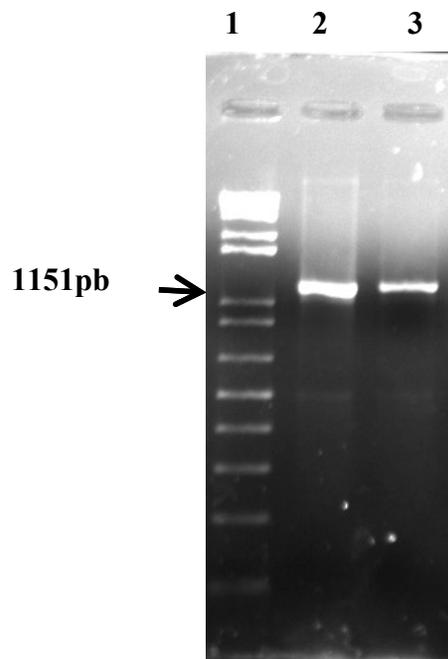


Figura 27. Producto amplificado por PCR correspondiente al promotor 59880 (1000) + 5'UTR. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2-3: 5µl Producto PCR de 1151 pb correspondiente al tamaño esperado para el gen promotor.

El gen AT5G26340 que codifica para AtSTP13 fue amplificado a partir del plásmido p-drive® (QIAGEN) donde había sido previamente clonado, el plásmido purificado por miniprep se utilizó como molde, el oligo conector directo G59880ATCTP13 (F) (5'AGCTTTGATTCAACCATGACCGG 3'), el oligo conector reverso ATSTP13-NOS (R) (5'TGACTCTAGGGGTCATTAAAGCCGTGTTGA), y la enzima PFU. La PCR

se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 minutos seguido de 25 ciclos de: 94 °C por 45 segundos, 62°C por 45 seg, 72 °C por 2 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos. El fragmento amplificado por PCR fue de 1581 pb, correspondiente al tamaño esperado para el gen que codifica para la AtSTP13 y evidenciado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 28)

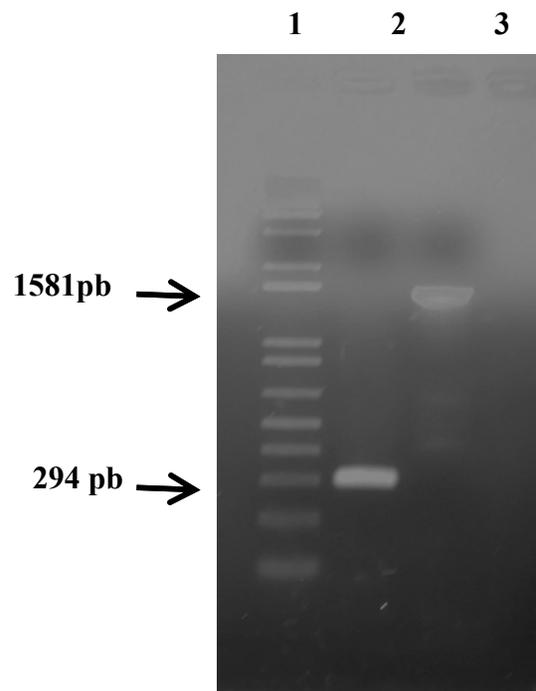


Figura 28. Producto amplificado por PCR correspondiente al terminador NOS y al gen que codifica para AtSTP13. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2: 5µl Producto PCR de 294 pb correspondiente al tamaño esperado para el terminador NOS, Carril 3: 5µl Producto PCR de 1581 pb correspondiente al tamaño esperado para el gen que codifica para AtSTP13.

Para la amplificación terminador NOS, se utilizó como molde la miniprep del plásmido pB7W320, el oligo directo ATSTP13-TNOS(F) (5'TCAACACGGCTTAATGACCCCT3'), el primer reverso específico para T-NOS y la enzima PFU®. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 segundos

seguido de 30 ciclos de: 94°C por 45 segundos, 68°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto 30 segundos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos. Como resultado se obtuvo la amplificación de un fragmento de 294 pb, correspondiente al tamaño esperado (figura 28).

Los productos de PCR amplificados fueron purificados mediante el kit “QIAQUICK PCR purification” de QIAGEN®. Y posteriormente se cuantificaron para poder ensamblarlos. Se utilizaron 100ng de los productos PCR purificados del promotor (59880+5'UTR), del producto PCR amplificado del gen *STP13* y del producto amplificado por PCR del terminador NOS, se colocaron 2 µl de buffer de enzima TAKARA® (DNA polimerasa) y se completó con agua hasta un volumen de 20 µl. Esta mezcla se colocó en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), y se programó una rampa de temperatura 94°C a 50°C bajando 1°C por minuto. Posteriormente se mezclaron DNTPs (100mM) (2.5µl), Takara (0.2µl), H₂O (2.3 µl) y se colocó a 72 °C a 10 minutos.

Una vez ensamblados los 3 productos amplificados por PCR correspondientes al promotor vascular (59880), el gen que codifica para *STP13* y el terminador NOS se procedió a amplificar el fragmento ensamblado con la enzima TAKARA® (DNA polimerasa). La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos seguido de 26 ciclos de: 94 °C por 35 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 2 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 7 minutos. El producto de la reacción fue un fragmento amplificado de 3026 pb correspondiente al tamaño esperado del promotor ensamblado con el gen y con el terminador NOS, otra banda de menor tamaño fue evidenciada en un el de agarosa al 0.8% (figura 29).

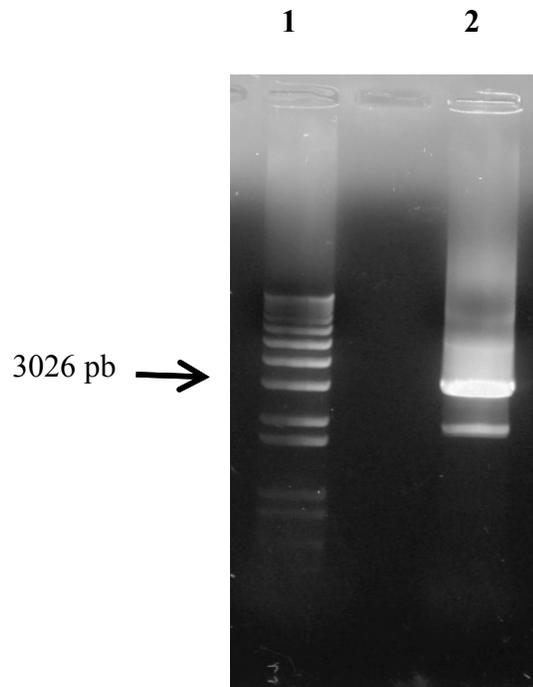


Figura 29. Producto PCR amplificado correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR), el gen que codifica para AtSTP13 y el promotor NOS. Carril 1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2: 5µl Producto PCR de 3026 pb correspondiente al tamaño esperado para el ensamblaje del promotor con el gen que codifica la AtSTP13 y el terminador NOS.

Para clonar la banda del tamaño esperado de 3026 pb, se procedió a cortar y a purificar la banda del gel de agarosa mediante el kit QIAquick Spin™ de Qiagen, obteniéndose una sola banda purificada del tamaño esperado (Figura 30).

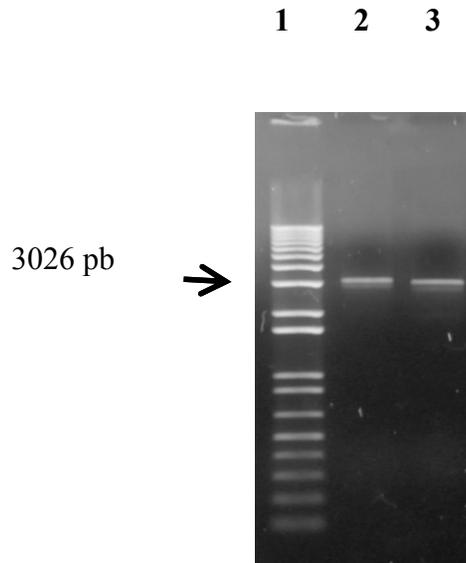


Figura 30. Producto amplificado por PCR correspondiente al ensamblaje del promotor (59880 (1000) + 5'UTR) , el gen codifica para AtSTP13, y terminador NOS. Carril1: Marcador de peso molecular (1KB Plus DNA Ladder de INVITROGEN®), Carril 2-3: 5µl de la banda purificada correspondiente al tamaño esperado (3026 pb) del ensamblaje del promotor, el gen que codifica para la proteína AtSTP13 y el terminador NOS.

6.6.3 Ensamblaje y clonación de la construcción para la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína flowering locus T (FT) en *Arabidopsis thaliana*

Para el ensamble del promotor KNAT1, el gen AT AT1G6580 que codifica para la proteína flowering locus T, y el terminador NOS se diseñaron oligos específicos de conexión (connect) con el fin de ensamblar promotor, el gen que codifica para el transportador de hexosas y el terminador NOS.

El promotor KNAT1 fue amplificado utilizando el plásmido purificado por miniprep como molde, el oligo específico directo del promotor (F) pATG08150 F (5'TTCTTAACATTTGACCATTGATTGAAA 3') el oligo conector reverso KNOTFT(R) (5'TATATTTATAGACATACCCAGATGTGAAAA3') y la enzima PFU®, con el fin de obtener extremos romos. La PCR se llevó a cabo

en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), y el producto se amplificó con la enzima PFU, el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 minutos seguido de 25 ciclos de: 94 °C por 35 segundos, 56°C por 35 seg, 72 °C por 2 minutos 30 segundos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos.

El fragmento amplificado por PCR fue de 2356 pb, correspondiente al tamaño esperado para el promotor KNAT1 y evidenciado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 31A).

El gen AT1G6580 que codifica para *FT* fue amplificado a partir del plásmido p-drive® (QIAGEN) donde había sido previamente clonado. El plásmido purificado por miniprep se utilizó como molde, el oligo conector directo kNOTFT(F) TTTACTCATCTGGGTATGTCTATAAATATA y el oligo conector reverso FT-TNOS (R) TGA CTCTAGGGGTC ACTAAAGTCTTCTTCC, y la enzima PFU. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 minutos seguido de 25 ciclos de: 94 °C por 45 segundos, 62°C por 45 seg, 72 °C por 2 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos. El fragmento amplificado por PCR fue de 528pb, correspondiente al tamaño esperado para el ORF del gen AT1G6580 y evidenciado en un gel de agarosa al 0.8% (figura 31B).

Para la amplificación terminador NOS, se utilizó como molde la miniprep del plásmido pB7W320, el oligo directo FT-TNOS (F) ATSTP13-TNOS(F) (5'GGAAGAAGACTTTAGTGACCCCTAGAGTCA3'), el primer reverso específico para T-NOS 5'TCAGCTTGCATGCCGGTTCGATCTAGTA3' y la enzima PFU®. La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 45 segundos seguido de 30 ciclos de: 94°C por 45 segundos, 68°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto 30

segundos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos. Como resultado se obtuvo la amplificación de un fragmento de 294 pb, correspondiente al tamaño esperado (figura 31B).

Los productos de PCR amplificados fueron purificados mediante el kit “QIAQUICK PCR purification” de QIAGEN®. Y posteriormente se cuantificaron para poder ensamblarlos. Se utilizaron 100ng de los productos PCR purificados del promotor KNAT1, del producto PCR amplificado del ORF FT y del producto amplificado por PCR del terminador NOS.

En primera instancia se ensamblo el ORF *FT* con el terminador NOS colocando en la reacción 100ng de cada producto amplificado posteriormente se colocaron 2 µl de buffer de enzima TAKARA® (DNA polimerasa) y se completó con agua hasta un volumen de 20 µl. Esta mezcla se colocó en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), y se programó una rampa de temperatura 94°C a 50°C bajando 1°C por minuto. Posteriormente se mezclaron DNTPs (100mM) (2.5µl), Takara (0.2µl), H₂O (2.3 µl) y se colocó a 72 °C a 10 minutos. Una vez ensamblados los 2 productos amplificados por PCR correspondientes al ORF del gen que codifica para *FT* y terminador NOS se procedió a amplificar el fragmento ensamblado con la enzima TAKARA® (DNA polimerasa). La PCR se llevó a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient), el programa que se utilizó fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos seguido de 26 ciclos de: 94 °C por 40 segundos, 56 °C por 40 segundos, 72 °C por 1 minutos, seguido de una elongación a 72 °C por 10 minutos. El producto de la reacción fue un fragmento amplificado de 822 pb correspondiente al tamaño esperado del ORF del gen con el terminador NOS, otra banda de menor tamaño fue evidenciada en un el de agarosa al 0.8% (figura 32A).

Posteriormente se realizó el ensamblaje del fragmento amplificado de (2356pb) del promotor KNAT1 con el fragmento ORF(*FT*) y terminador NOS ensamblado (822pb). Una vez amplificados los dos fragmentos se purificaron y se ensamblaron por medio de una rampa de temperatura. Posteriormente se realizó una amplificación por PCR y se logró la amplificación de un fragmento de 3178pb correspondiente al promotor KNAT1, ORF (*FT*) y terminador NOS ensamblados (Figura32B).

Para clonar la banda del tamaño esperado de 3178 pb, se procedió a cortar y a purificar la banda del gel de agarosa mediante el kit QIAquick Spin[®] de Qiagen, obteniéndose una sola banda purificada del tamaño esperado. Posteriormente la construcción ensamblada obtenida para la expresión de la proteína FT, se clonó en el vector plasmídico topo PCR 8[®].

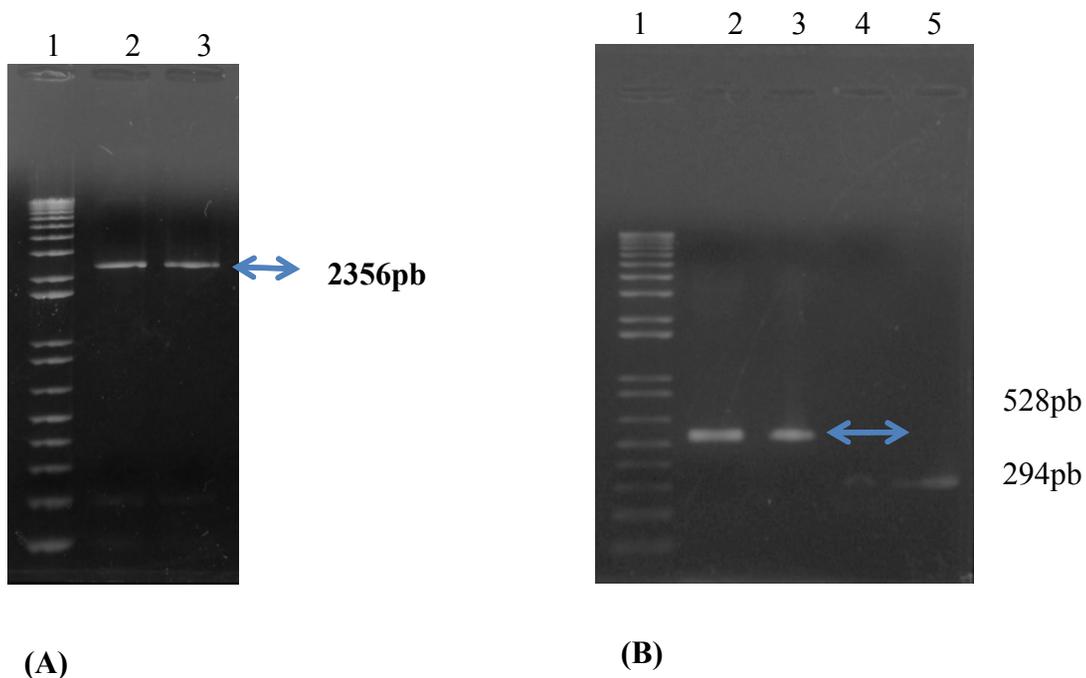


Figura 31. Visualización en gel de agarosa al 0.8% de productos amplificados por PCR para el ensamblaje y clonación de la construcción para la sobreexpresión del gen que codifica para la proteína flowering locus T (FT) en *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 y 3: Fragmento amplificado del promotor KNAT1 (2356pb). **(B)** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 y 3: Fragmento amplificado de FT (528pb); Carril 4 y 5: Fragmento amplificado del T-NOS (294pb).

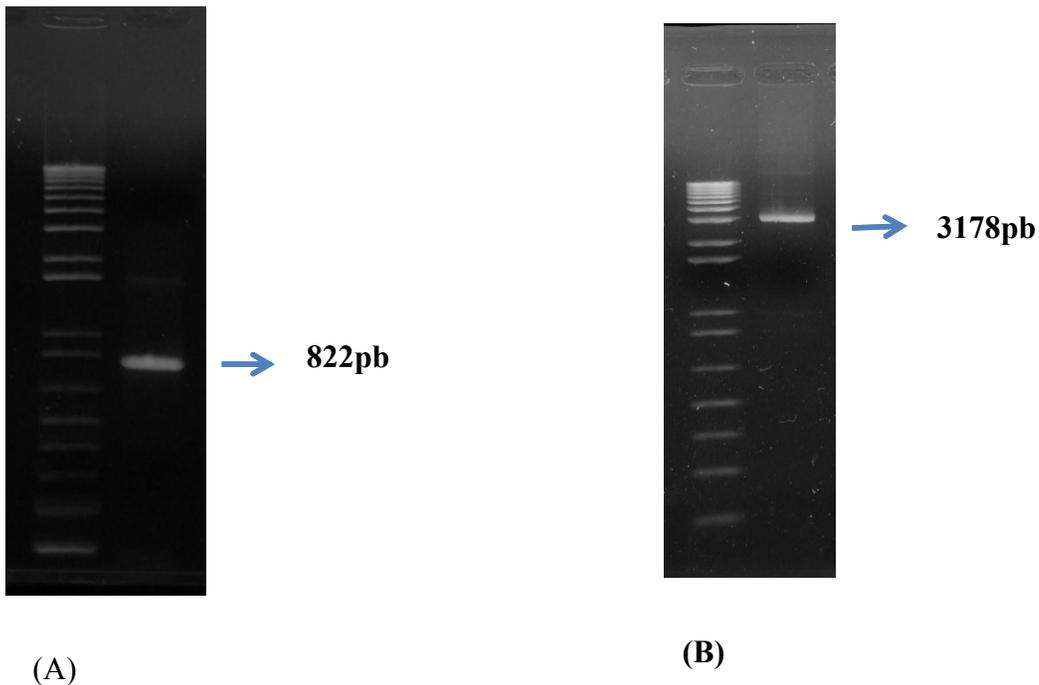


Figura 32. (A) Amplificación del fragmento ensamblado del ORF (FT) y terminador NOS, Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Fragmento amplificado correspondiente al ensamblaje del ORF y terminador NOS (822pb). (B) Amplificación de la construcción ensamblada promotor KNAT1, ORF (FT) y terminador NOS, el tamaño del fragmento fue de 3178pb.

6.6.4 Selección de líneas de plantas transformadas con los genes de interés y verificación del transgen por PCR.

Seleccionando con glufosinato de amonio tal como se describe en la sección de materiales y métodos y como se representa en la figura 33 se obtuvieron líneas independientes de plantas transformadas de con los genes de interés *FT*, *cytb5R* y *STP13*, a las cuales de manera temprana se les pudo confirmar la presencia del transgen por PCR utilizando el método touch and go. (Berendzen, K., et al, 2005). En la tabla 7 se encuentran documentadas las líneas transformadas obtenidas con cada construcción.

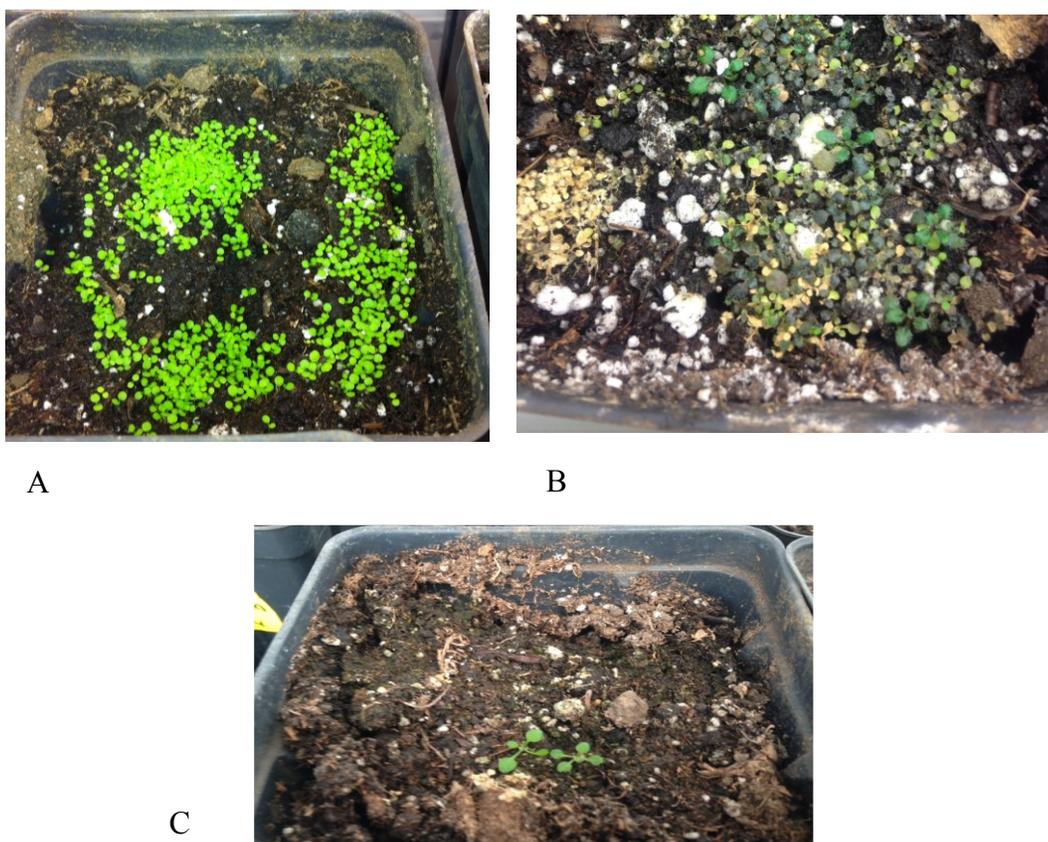


Figura 33. Proceso de selección de líneas independientes transformadas con los genes de interés. **(A)** Semillas de plantas transformadas germinadas una semana después de ponerlas en el sustrato suplementado con glufosinato de amonio; **(B)** Plantas de *Arabidopsis thaliana* a los 20 días de germinadas **(C)** Plantas de *Arabidopsis thaliana* seleccionadas 1 mes después de germinados.

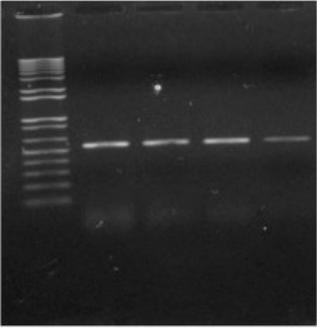
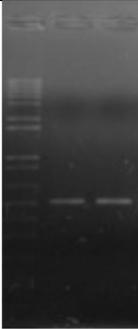
Tabla 7. Líneas independientes transformadas con cada gen de interés.

Construcción empleada para transformar plantas	Plantas regeneradas después de la selección con Finale®
ATC58C1 cons Pknotted-FT-TNOS	4
ATC58C1 cons P59880-STP13-TNOS	1
ATC58C1 cons Pknotted-FT-TNOS	1

Para verificar la presencia del transgen se extrajo ADN de hoja de las plantas de líneas independientes y se comprobó la amplificación de un producto PCR del tamaño correspondiente del transgen en cada una de las

líneas transformadas seleccionadas. Los resultados de las líneas en las que se pudo evidenciar por PCR la amplificación de un producto del tamaño del transgen se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Líneas transformadas con los genes de interés y verificación del transgen por PCR.

Construcción empleada para transformar plantas	ID de la línea transformada	Tamaño del Fragmento Amplificado por PCR (transgen)	Gel de electroforesis
ATC58C1 cons PKNAT1-FT- TNOS	AtFTOE2.1 AtFTOE3.1 AtFTOE4.3 AtFTOE6.1	559pb	
ATC58C1 cons P59880- STP13-TNOS	AtSTP13 1.1 AtSTP13 2.1	514pb	
ATC58C1 cons- P59880- Cytb5R-TNOS	AtCytb5R1.1	534pb	

6.7 Determinación del número de copias por ddPCR

En primera instancia se validaron los primers diseñados para la amplificación del transgen *FT* el cual tenía el ORF sin intrones por ddPCR. Para esto se estandarizaron condiciones para la amplificación del transgen por PCR punto final. Se utilizó como molde DNA extraído de líneas transformadas ATFTOE positivas para la presencia del transgen y WT, la enzima TAKARA® y los oligos específicos FT-dPCR (FOR) 5'TCCGTTTAATAGATCAATCAC 3' y FT-dPCR (REV) 5' CCCATAACCAAAGTATAG 3'. La PCR se llevo a cabo en un termociclador marca Biometra® (T-professional basic gradient) utilizando el siguiente: Una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos seguido de 27 ciclos de: 94°C por 35 segundos, 54°C por 45 seg, 72°C por 16 segundos, seguido de una elongación a 72°C por 7 minutos. El producto amplificado por PCR fue de 152pb correspondiente al tamaño esperado del transgen *FT* (figura 34).

MP WT WT C+ AtFT2.1 AtFT3.1



Figura 34. Amplificación por PCR punto final del transgen *FT* con un tamaño esperado de 152pb. Carril 1: marcador de peso, Carril2: WT, Carril3: WT, Carril 4: control positivo, Carril 5: AtFTOE2.1, Carril 6:AtFTOE3.1

La determinación del número de copias se realizó a las 4 líneas independientes de plantas transformadas AtFTOE2.1, AtFTOE3.1, AtFTOE4.3 y AtFTOE 6.1 por Droplet Digital™ PCR (ddPCR™). Los resultados mostraron 3 líneas (AtFTOE2.1, AtFTOE3.1, AtFTOE4.3) (figura 35A) con una sola copia del transgen y 1 línea (AtFTOE1.1) (figura 35 B) con cinco copias del transgen, esta última línea presentó un fenotipo con floración y crecimiento muy prematuro (figura 35 C) lo que nos llevó a excluirla del estudio.

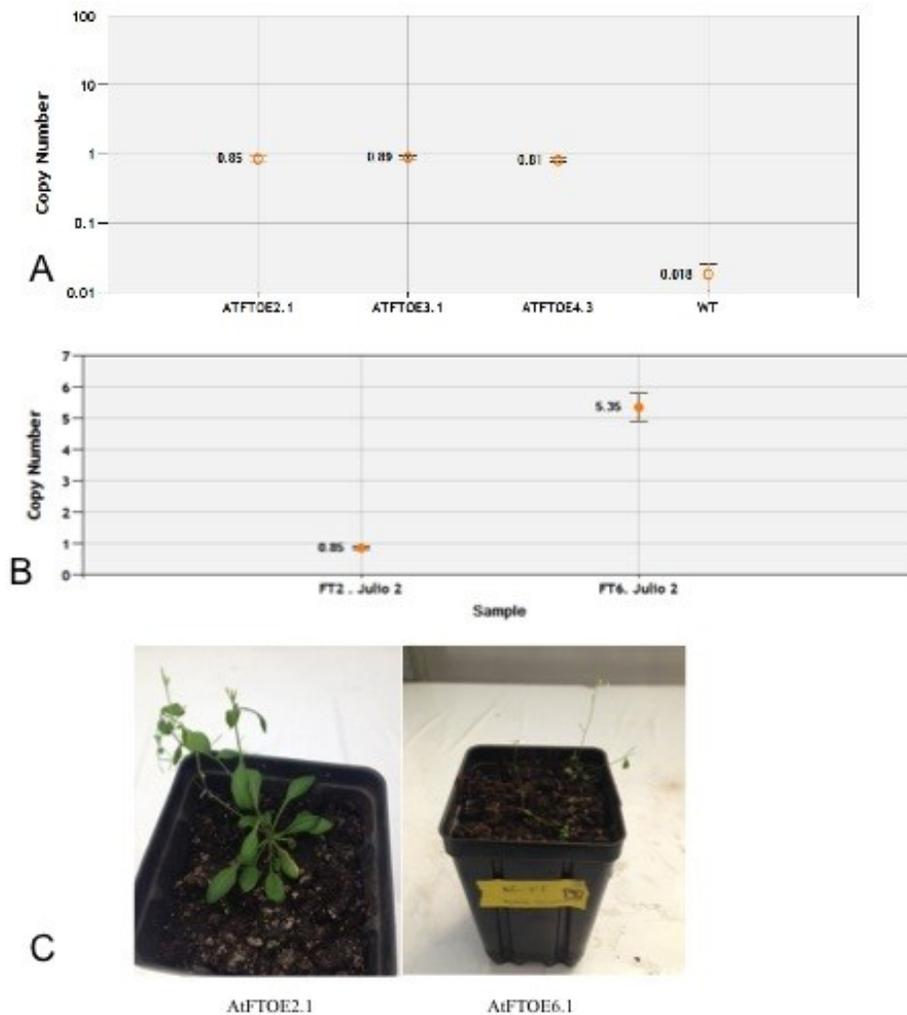


Figura 35. Gráfica de determinación de número de copias de las líneas AtFTOE por ddPCR. (A) Líneas AtFTOE 2.1, 3.1.4.3 y WT (B) Líneas 2.1 y 1.1 (C) planta AtFTOE 2.1 y planta AtFTOE 1.1

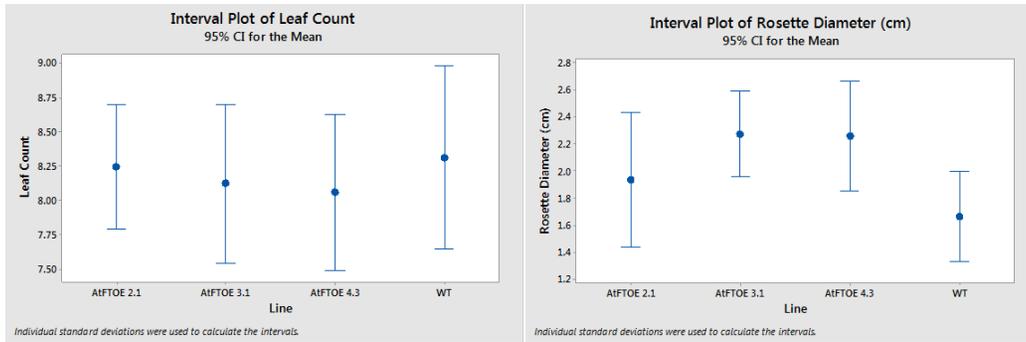
6.8 Sobreexpresión de *FT* induce floración temprana en condiciones independientes del fotoperiodo.

Para la determinación de las características fenotípicas se utilizaron semillas de plantas WT y de tres líneas transformadas AtFTOE 2.1 3.1y 4.3, las semillas se germinaron hidropónicamente según el protocolo publicado por Conn, Simon J. 2013. Las plantas germinadas se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 22°C, con un fotoperiodo de día corto (8h luz/16 oscuridad) hasta el día 21 y posteriormente fueron sometidas a un fotoperiodo de día largo (16h luz/8 oscuridad) hasta el final del ciclo. Las plantas fueron monitoreadas diariamente, se cuantificó el tiempo en el que empezó la floración se contó el número de hojas y se midió el diámetro de la roseta.

Como resultado del tiempo de floración se evidenció una floración temprana en las plantas transformadas sobreexpresoras del gen *FT* (AtFTOE) cuando fueron comparadas con plantas WT. Mostrándose el comienzo de la floración a los 21 días post-germinación (Estado 5 según Boyes, *et al.* 2001) en $\geq 80\%$ de las plantas de las tres líneas AtFTOE (2.1,3.1,4.3) al contrario de las plantas WT en las cuales no se observó floración en el mismo periodo y bajo las mismas condiciones (figura 36 A). Hasta el día 40 se observó floración en el 73-80% de las plantas WT (Figura 36 B) mientras el 100% de las líneas AtFTOE (2.1,3.1,4.3) ya estaban florecidas en las mismas condiciones y en el mismo tiempo.

Con el fin de determinar si un crecimiento rápido en plantas sobreexpresoras de *FT* pudiera influenciar en la floración temprana se contó el número de hojas y se midió el diámetro de roseta hasta la aparición del botón floral. El diámetro de la roseta y número de hojas no mostraron diferencias significativas cuando fueron analizados estadísticamente con ANOVA y la prueba de T-Student test ($\alpha = 0.05$) comparando líneas AtFTOE Vs plantas WT hasta el

día 21 (Figura 36 A). Las plantas AtFTOE presentaron el inicio del botón floral con un número de hojas de roseta 8-9 >1mm, mientras que las plantas WT presentaron el mismo número de hojas (estado 1.09 según Boyes 2001, *et al* .2001) pero sin la presencia de botón floral en el mismo tiempo (figura 36A). En los días posteriores se observó que las plantas sobreexpresoras de *FT* empezaron a desarrollar el estado floral, mientras las plantas WT siguieron produciendo más hojas de roseta hasta completar 12-14 hojas >1mm al día 35 (figura 36B). La floración en plantas WT comenzó al día 40 en las condiciones ya mencionadas (figura 36C). Las hojas de roseta dejaron de crecer en las líneas AtFTOE cuando empezaron a florecer mientras que siguieron creciendo en las plantas WT. Después de 40 días el tamaño de las hojas de roseta en Wild type fue significativamente más grande que en las líneas AtFTOE (figura36D)



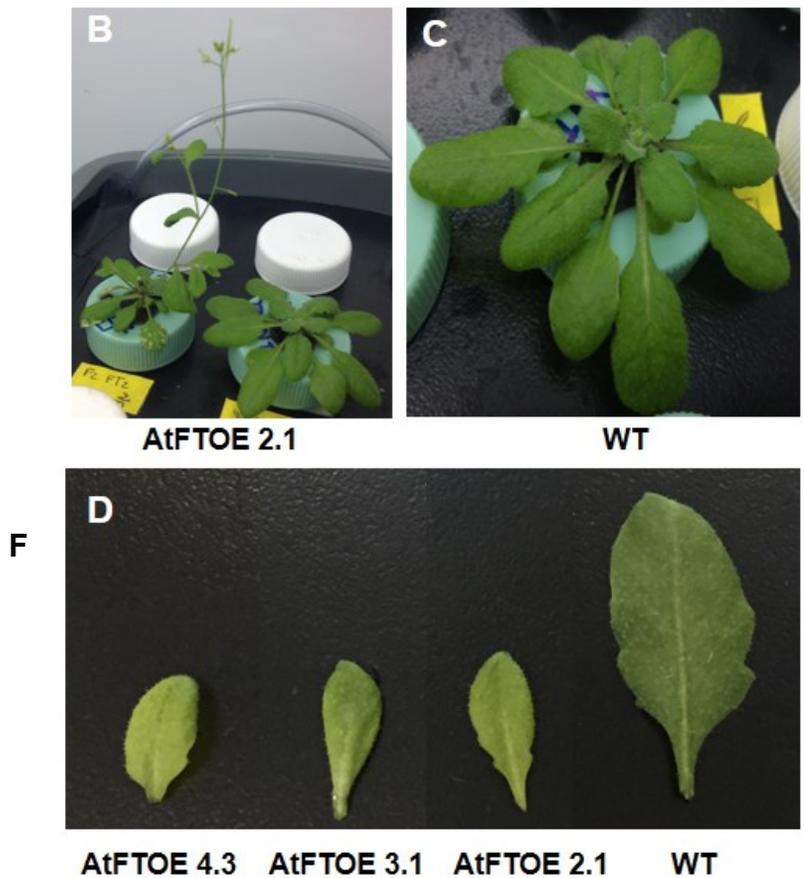


Figura 36. Comparación fenotípica de líneas de plantas AtFTOE vs plantas WT (A) Plantas de tres líneas independientes AtFTOE vs WT que no muestran diferencias significativas ni en conteo de hojas de roseta ni en diámetro de roseta a los 21 días post-germinación. (B) Plantas AtFTOE 2.1 vs plantas WT a los 35 días post germinación (C) Plantas WT a los 40 días post germinación empezando a florecer. (D) Comparación de tamaño de hojas de roseta a los 40 días post- germinación y diámetro de roseta en plantas WT vs AtFTOE.

6.9 Análisis RNA-SEQ de plantas AtFTOE

6.9.1 Extracción de RNA

Se obtuvo RNA de 3 replicas biológicas de hoja de la línea ATFTOE 2.1 y de dos replicas biológicas a los 35 días pos germinación en hidroponía. El RNA extraído fue calidad y cantidad óptima para ser secuenciado. Los resultados del RNA extraído de las tres muestras de AtFTOE y dos de WT mostraron integridad del RNA en todas las muestras (figura 37) al ser corrido electroforéticamente y una cantidad y calidad suficiente (tabla 9).

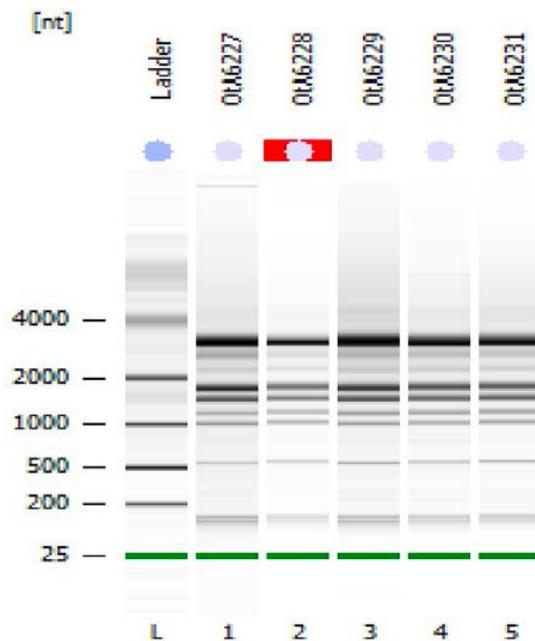


Figura 37. RNA total extraído de hoja de plantas de las líneas AtFTOE y WT para RNA –seq.

Tabla 9. Determinación de la cantidad y calidad de RNA extraído de líneas AtFTOE y WT por Nanodrop y Bioanalyzer.

Lane #	Storage Number	Sample Name	Nanodrop Conc. (ng/ μ l)	OD260/280	Bioanalyzer Loading Dilution	Bioanalyzer Corrected Conc. (ng/ μ l)	RIN / RINe	rRNA ratio (28S/18S)	QC Result
1	OtA6227	WT1	397.2	2.11	1:32	262.4	7	1.5	Pass
2	OtA6228	WT2	460	2.03	1:44	316.8	7.7	1.7	Pass
3	OtA6229	FT1	122	1.99	1:12	83.9	7.2	1.8	Pass
4	OtA6230	FT2	169.2	2.08	1:16	94.4	7.4	1.7	Pass
5	OtA6231	FT3	174	2.03	1:16	123.2	7.5	1.8	Pass

6.9.2 Determinación de la sobreexpresión del gen *FT* por PCR en tiempo real en líneas ATFTOE.

Para confirmar la sobreexpresión del gen *FT* se realizó la técnica de PCR en tiempo real utilizando como molde RNA extraído de tres líneas AtFTOE 2.1 y 3.1, 4.3 y WT. Todas las líneas AtFTOE mostraron una mayor acumulación de transcritos *FT* en comparación con las plantas WT en un promedio de 20 a 30 veces más. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 38.

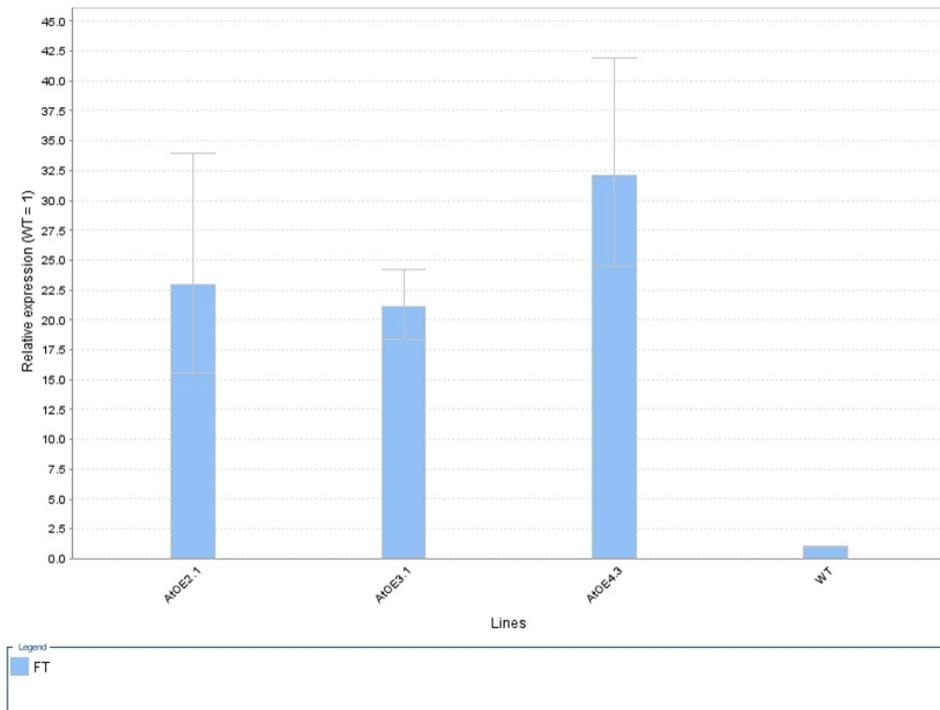


Figura 38. Gráfica que representa la sobreexpresión de *FT* en líneas AtFTOE comparadas con WT.

6.9.3 Análisis bioinformático de datos RNA-SEQ

6.9.3.1 Determinación de FPKM para medir la acumulación de transcritos en plantas sobrepresoras de *FT*.

Para determinar la sobreexpresión del gen *FT* se utilizó el programa Cuflinks los fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas mapeadas

(FPKM), como podemos observar en la figura 39 la abundancia del transcrito FT en plantas transformadas supera aproximadamente en 20 veces el transcrito acumulado FT en plantas WT.

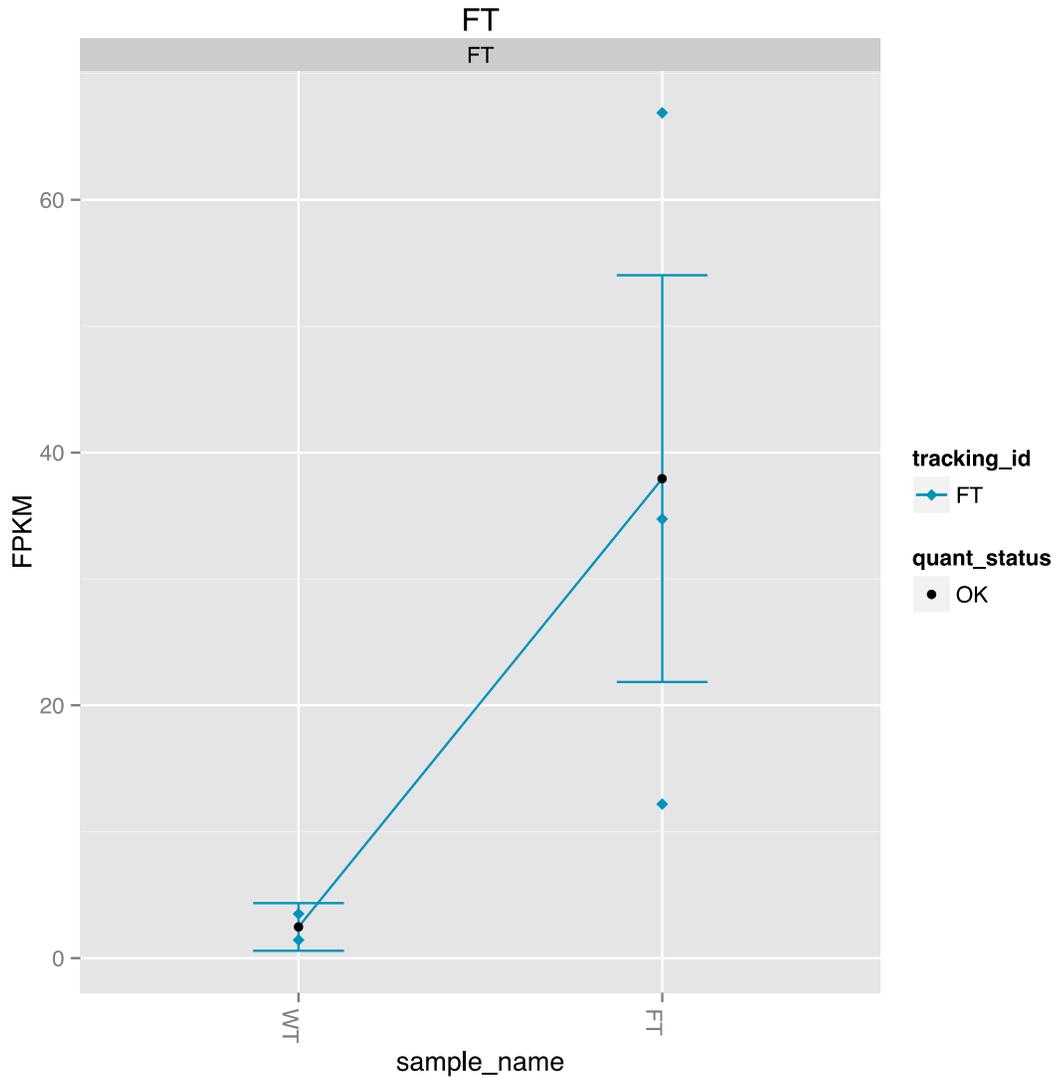


Figura 39. Expresión diferencial de *FT* medida en fragmentos por kilobase de transcritos por millón de lecturas mapeadas (FPKM) Determinados por Cufflinks en la línea AtFTOE 2.1 y WT.

6.9.3.2 Expresión diferencial de genes en AtFTOE 2.1 vs WT

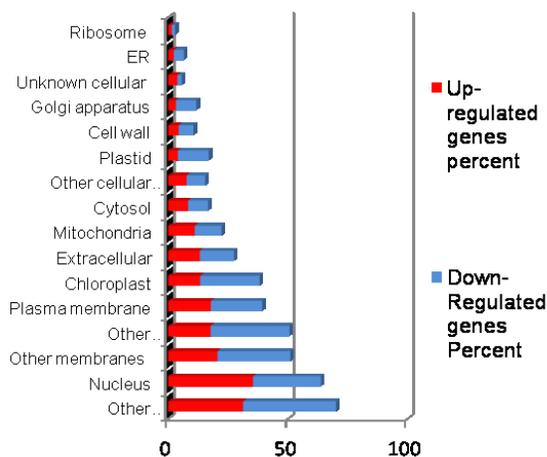
Por medio del paquete `CummeRbund` de R (Trapnell, C, *et al.* 2012) se pudo determinar la expresión diferencial de 3699 genes al comparar plantas sobreexpresoras del gen *FT* vs plantas silvestres WT. Para comparar el efecto de sobreexpresión de *FT* en hojas de roseta de AtFTOE vs plantas WT, se analizaron grupos de genes en los cuales el fold change (FC) fue \geq de 1.5 para genes sobreexpresados y reprimidos. Análisis de RNA-seq presentaron que la sobreexpresión de *FT* tuvo efectos ($p < 0.05$) en 3652 genes expresados diferencialmente en hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana*, de los cuales 626 genes fueron sobreexpresados y 3026 fueron reprimidos comparando plantas sobreexpresoras de *FT* vs plantas silvestres (WT) el cluster generado se muestra en el anexo 2.

6.9.3.3 Anotación funcional de los genes expresados diferencialmente

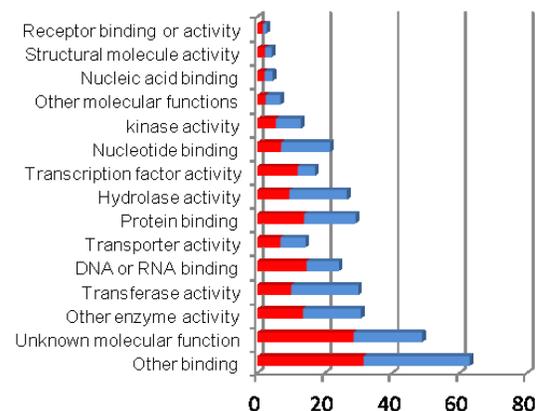
La anotación funcional de los 3652 genes expresados diferencialmente se realizó por medio de la herramienta bioinformática para la anotación “Tair GO Annotations” (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/>). 3026 genes fueron reprimidos y de estos 2913 fueron asignados componentes celulares, 2782 fueron asignados a procesos biológicos y 2678 genes fueron asignados a función molecular. 626 genes fueron sobre-regulados de los cuales 579 fueron asignados a componentes celulares, 572 fueron asignados a funciones moleculares y 583 fueron asignados a procesos biológicos. La clasificación funcional de los genes diferencialmente expresados son presentadas en las figuras 40 A,B,C en términos de porcentaje. Fue mayor el número de genes reprimidos que sobreexpresados en plantas AtFTOE con relación a las WT en las tres categorías. Un total de 579 genes sobreexpresados y 2913 genes reprimidos fueron agrupados en el cluster de “Componente celular”. Como se menciona arriba hubo mas transcritos reprimidos que sobre-expresados en la mayoría de categorías excepto en

“núcleo” y “Componentes celulares desconocidos” sugiriendo cambios en regulares transcripcionales (figura 40 A). En el cluster de “Función molecular” 572 genes fueron sobre-expresados y 2678 genes reprimidos siendo la mayoría de ellos agrupados en “otras uniones”, hubo mas genes sobre-expresados que reprimidos en las categorías de “función molecular desconocida”, “Uniones DNA, RNA”, “Actividad de factor de transcripción”, “Actividad estructural de la molécula” y “Actividad de receptores de unión” (figura 40 B). En el cluster GO de “Procesos biológicos” la mayoría de genes reprimidos y sobreexpresados anotados fueron en las categorías de “Otros procesos celulares” y “otros procesos metabólicos”, y una pequeña proporción de estos fueron agrupados en “Respuesta a stress”, “respuesta estímulos bióticos y abióticos”, “Otros procesos biológicos”, “Transporte”, “Señales de traducción”, “Transcripción dependiente de DNA” y “Procesos biológicos desconocidos”.

(A) GO Cellular component



(B)GO Molecular Function



(C) GO Biological Process

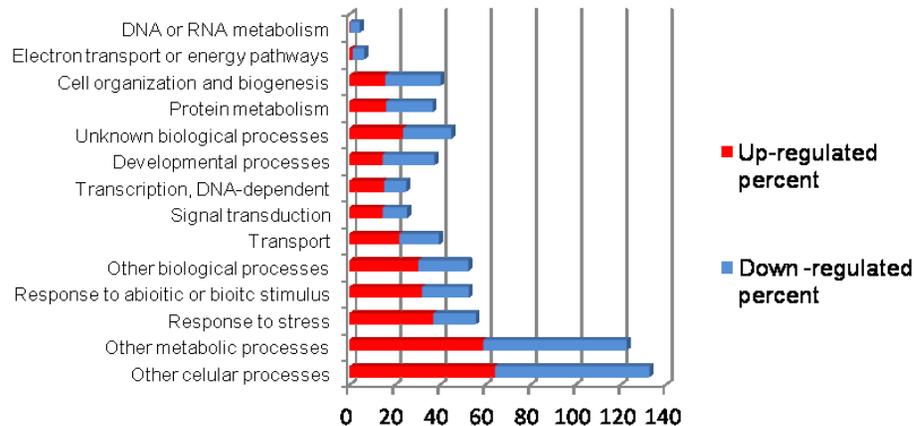


Figura 40. Distribución de genes expresados diferencialmente en líneas AtFTOE comparadas con WT de *Arabidopsis* en categorías de ontología de genes (GO). (A) Componente celular, donde N=2913 genes reprimidos y 579 genes sobreexpresados (B) Procesos biológicos, N=2678 genes reprimidos y 572 genes sobreexpresados y (C) función molecular, N= 2782 genes reprimidos y 583 genes sobreexpresados; usando anotaciones GO de la base de datos TAIR.

Con el objetivo de identificar los genes agrupados en cada categoría, se realizaron análisis adicionales con la herramienta bioinformática de DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) utilizada para analizar los cluster obtenidos por K-means (figura 41), enfocándonos primero en los clusters con transcritos sobreexpresados de los grupos 7,8 y 9. El último grupo presento los valores más altos con 70 transcritos sobreexpresados con un FC ≥ 4

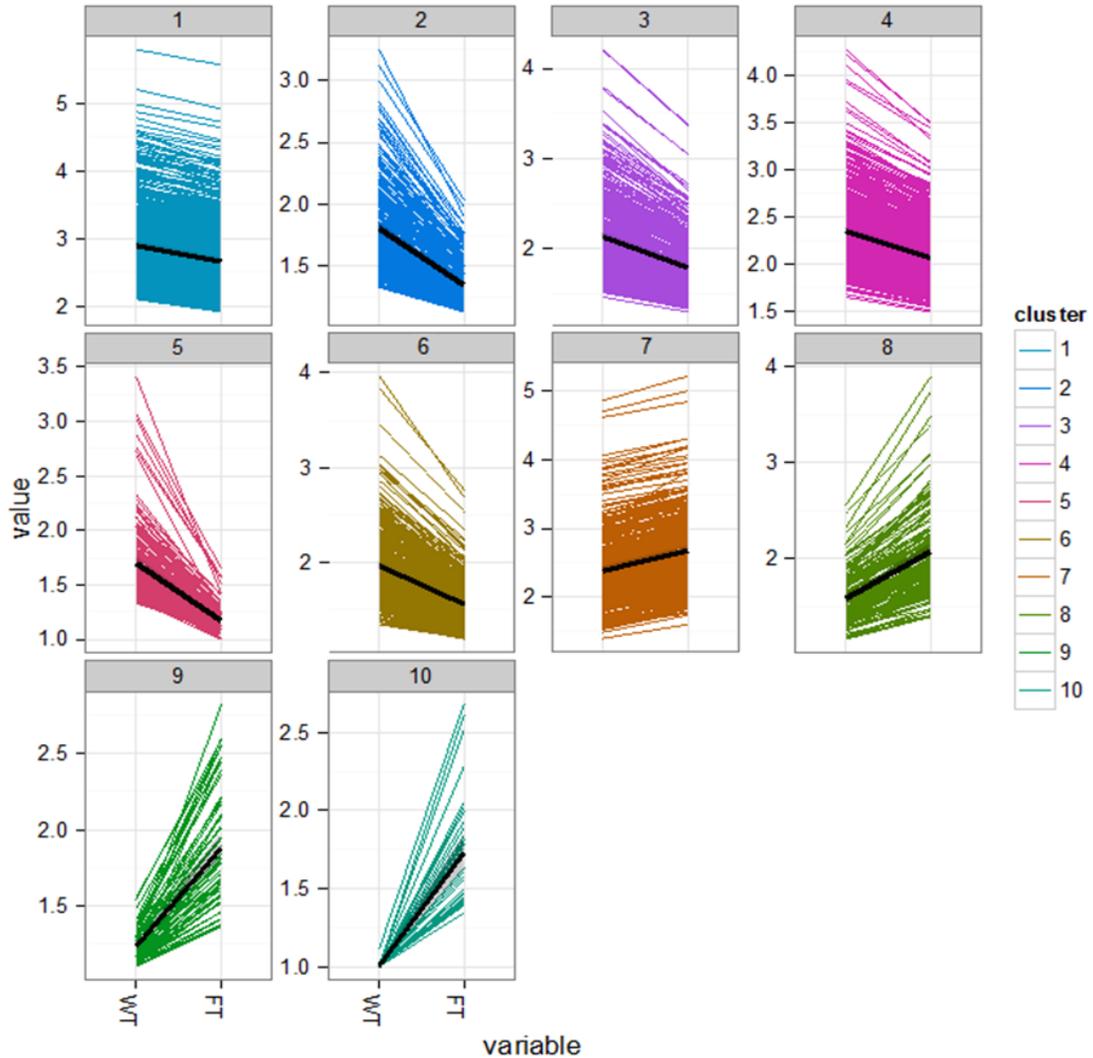


Figura 41. Clusters de genes expresados diferencialmente obtenidos por K-means .

El análisis de los grupos 7, 8 y 9 por David generaron 83 clusters con un total de 626 genes sobreexpresados con un $FC \geq 1.5$. El cluster relacionado con genes en la categoría correspondiente al proceso de floración es representado en la figura 42 y la identificación de estos genes y su función son presentados en la tabla 10.

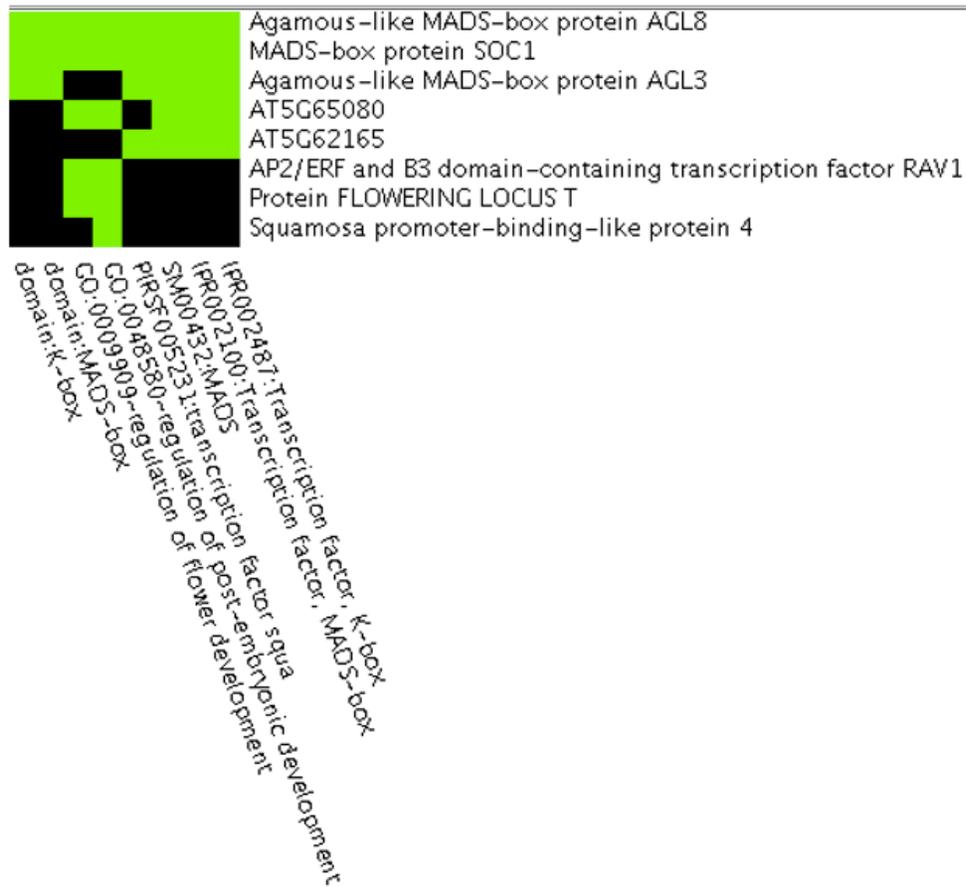


Figura 42. Cluster de genes expresados diferencialmente relacionados con floración obtenido por DAVID versión 6.7. En este gráfico 2D podemos observar los genes relacionados con floración (eje X) y sus anotaciones de genes asociados (eje Y). El color verde corresponde a asociaciones de genes ya reportadas y el color negro corresponde a asociaciones de genes no reportados aún.

Tabla 10. Descripción de la función de los genes sobreexpresados en líneas AtFTOE relacionados con floración

Gene	Locus ID	Localización	Descripción	FC
FRUITFULL(FUL)/AGL8	At5g60910	Núcleo	Proteína MADS-box	2.52
MADS – BOX PROTEIN SOC1	At2g45660	Núcleo, citoplasma	Proteína MADS-box. Controla floración y es requerido por CO para promover floración.	1.89
Agamous –like MADS-box protein AGL3, SEP4, AGAMOUS- LIKE 3	At2g03710	Núcleo	Proteína MADS-box involucrada en el desarrollo de sépalos , pétalos , estamentos, y carpelo .Juega un papel importante en la determinación de meristemo floral y identidad del órgano.	2.31
AGAMOUS-LIKE 68,/MAF5	At5g65080	Núcleo	Es sobrerregulada durante la vernalización y regula tiempo de floración . Codifica para una proteína dominio MADS..	14.82
AGL42 (FOREVER YOUNG FLOWER) (FYF)	At5g62165	Núcleo	Proteína MADS-box	3.04
AP2/ERF and B3 domain containig transcription factor RAV1	At1g13260	Núcleo	Codifica para un factor de transcripción AP2/B3	2.01
FLOWERING LOCUS T	At1g65480	Núcleo, Citoplasma	Promueve floración y actúa como una señal a larga distancia.	15.36

Squamosa promoter-binding-like protein 4 SPL4	At1g53160	Núcleo, Citoplasma	Codifica para una proteína SPL (squamosa-promoter binding protein-like) Proteínas de unión DNA y factores de transcripción putativos. Involucrados en regulación de floración y fase del cambio vegetativo .	6.8
AP2/B3-like	At3g53310	Núcleo	Proteína AP2/B3-like	3.09
CYTOCHROME P450	At3g20100		Proceso de oxido-reducción	3.56
CELLULOSE SYNTHASE LIKE E1	AT1g55850	Membrana plasmática	Codifica una proteína similar a celulosa sintetasa	3.24
DUF581	At1g22160	Mitocondria	Proteína de función desconocida	
	At3g28500	Proteína 60S acido ribosomal	Traducción – elongación	17.09
ATNPF2.13, NITRATE TRANSPORTER 1.7, NPF2.13, NRT1.7, NRT1/PTR FAMILY 2.13	At1g69870		Codifica para un transportador de nitrato NRT1.7. expresado en floema responsable de remobilización de nitrato de tejido productor a tejido consumidor.	1.89
	At4g23680		Transportados de lípidos	6.47

En este cluster se pueden observar los transcritos de 5 proteínas de la caja –MADS las cuales son: FUL/AGL8, SOC1, SEP4 (AGL3), AGL42 y MAF5, además de proteínas tales como: Proteína AP2/B3 , SPL (squamosa-

promoter binding protein-like gene family), SPL4, MAF5 y AP2/ERF y dominio B3 contiene factor de transcripción RAV1. Por PCR en tiempo real se realizó una validación de tres genes expresados diferencialmente (*MAF5*, *SPL4* y *SOC1*) cuyos resultados son representados en la figura 43.

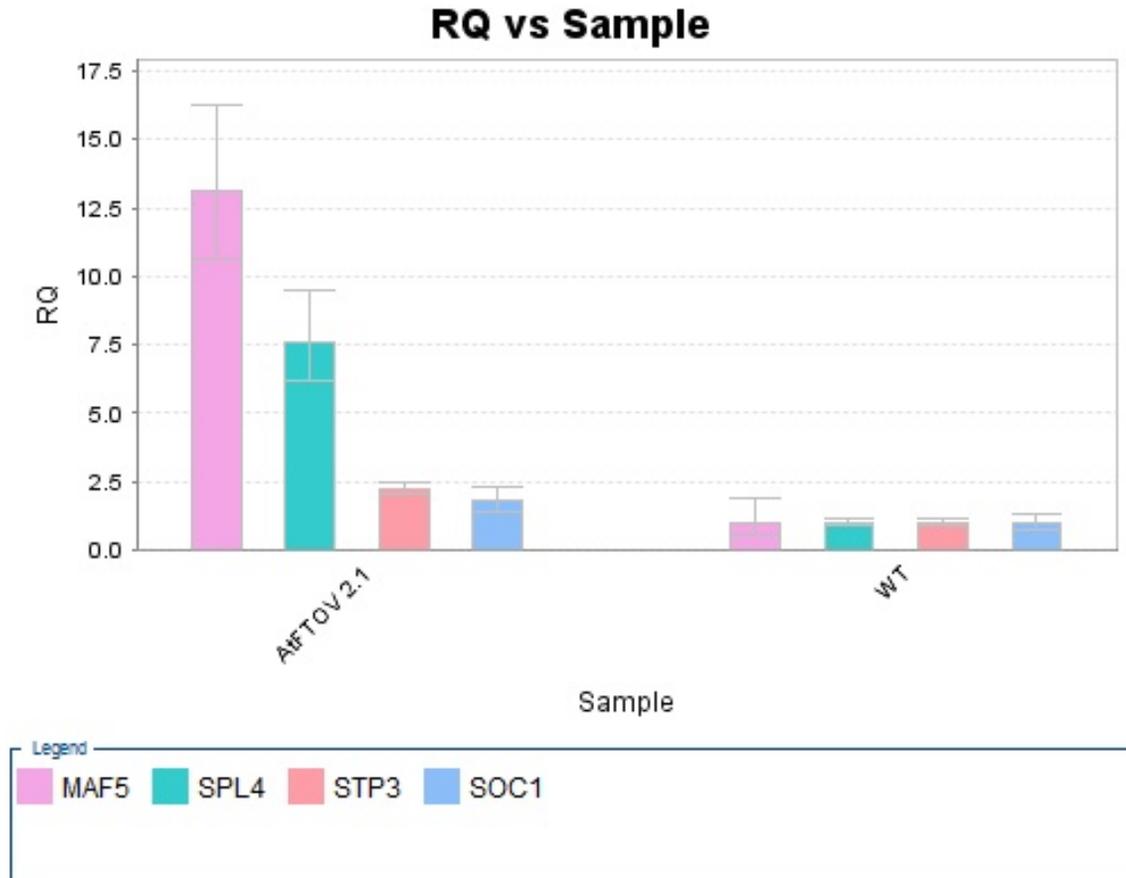


Figura 43. Análisis por PCR en tiempo real de sobreexpresión de genes en plantas AtFTOE vs WT.

Los datos transcriptómicos de la línea AtFTOE2.1 también fueron comparados con los datos reportados por *Schmid et al.*, (2003), quien investigo la inducción de genes relacionados con floración como respuesta al fotoperiodo. 12 genes fueron sobreexpresados en común comparando los dos estudios, de los cuales 5 fueron las MADS-box anteriormente nombradas las cuales están involucradas en la transición y identidad del meristemo (*Dorca-Fornell et al.*, 2011, *Ditta., G et al.*, 2004). De otros genes

sobreexpresados tales como At3g53310, Atg20100, At1g22160, At3g28500, At4g23680, At1g69870 y At1g55850 se describe la función en la tabla 10. Nosotros encontramos que muchos genes conocidos fueron sobreexpresados en hojas de roseta de la línea AtFTOE tales como (*FRUITFULL (FUL)/AGL8*), proteína MADS box *SOC1* y *SPL4* (Borner *et al.*, 2000; Hempel *et al.*, 1997). *FRUITFULL (FULL)/AGL8* y la proteína MADS-box juega un papel esencial en este proceso y en la inducción de floración corriente abajo de la señalización por FT (Torti *et al.*, 2012).

También es sabido que en la inducción de floración ocurre la represión de genes involucrados en el mantenimiento del estado vegetativo y creemos que los represores de floración tales como At327200 y At5g43270 (*SPL2*) pueden ser reprimidos en las líneas sobreexpresoras AtFTOE (Teaster, *et al.*, 2012; Schmit, *et al.*, 2003). De hecho la comparación de datos RNA –seq realizada entre este estudio con los datos obtenidos por Schmit *et al.*, 2003, dio como resultado 28 genes reprimidos en común (tabla 11). Estudios posteriores son necesarios para el entendimiento de las bases moleculares de este fenómeno por ejemplo entender el por que los genes reprimidos en la inducción de floración son sobreexpresados en el estado vegetativo.

Tabla 11. Lista de genes reprimidos en líneas AtFTOE que codifican para proteínas que actúan como posibles represores florales.

Genes	Locus ID	Localización	Descripción	FC
	At3g27200	Membrana Plasmática	Plastocyanin-like domain-containing proteína. Cupredoxin superfamily proteína;	0.11
SPL2, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 2	At5g43270	Núcleo	Miembro de la familia de genes SPL (squamosa-promoter binding protein-like), una nueva familia de genes que codifican para proteínas de unión de ADN y	0.57

			factores de transcripción putativos..	
AP2, APETALA 2, ATAP2, FL1, FLO2, FLORAL MUTANT 2, FLOWER	At4G36920	Núcleo	Codifica para un gene floral homeótico, un miembro de AP2/EREBP (Respuesta a ethyleno proteína de unión) Factor de transcripción involucrado en la identidad del órgano floral, establece la identidad del meristemo floral.	0.46
	At3g45160		Putativa lipoproteína de membrana	0.47
ATMYB29	At5g07690	Núcleo	Codifica para un putativo factor de transcripción.	0.56
CA1	At3g01500	Apoplasto, cloroplasto estroma, membrana tilacoide,	Codifica para una anhidrasa beta CA1.	0.44
	At3g05730	Región extracelular	Codifica para una defensina (DEFL)	0.27
	At5g05960	Región extracelular	Proteína bifuncional inhibe /transfiere lípidos	0.23
BETA CA2,	At5g14740	Apoplasto, cloroplasto, estroma, membrana citoplasmática,	Codifica para una anhidrasa beta carbonica y es localizada en el citoplasma	0.41
	At3g26960	Región extracelular	Proteína de la familia extensina	0.37
BETA GLUCOSIDASE 33, BGLU33	At2g32860	Cloroplasto	Beta glucosidasa	0.27
XCP2, XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE 2	At1g20850	Cloroplasto	Cysteina con actividad peptidasa	0.15
	At4g30650	Pared celular, Cloroplasto, espacio extracelular, lysosoma	Xilema cisteína peptidasa 2 (XCP2)	0.50
	At1g29660		GDSL-motivo esterasa/acyltransferasa/lipasa. Enzima substrato especifica que puede catalizar reacciones	0.24

			aciltransferasa o hidrolasa con substratos lipídicos y no lipídicos	
TON1 RECRUITING MOTIF 14, TRM14	At3g61380	Núcleo, membrana plasmática	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P-related	0.39
ATIMD3, IMD3, IPMDH1	At1g31180	Cloroplasto estroma, mitocondria, tilacoide	El AtIMD3 es uno de los tres genes que codifican para la enzima 3-isopropilmalato deshidrogenasa involucrada en biosíntesis de leucina en Arabidopsis.	0.61
OEP6, OUTER ENVELOPE PROTEIN 6	At3g63160	Cloroplasto,	Función molecular desconocida	0.48
	At1g35190	Citoplasma	Proteína 2-oxoglutarato (2OG) y Fe(II)-dependiente	0.55
AGAMOUS-LIKE 19, AGL19, GL19	At4g22950	Núcleo	MADS-box proteína AGL19	0.23
	At3g27200		Proteína Cupredoxina, transportador de electrones ;	0.11
	At2g39850	Región extracelular	Proteína endopeptidasa , involucrada en procesos metabólicos y proteólisis	0.56
	At3g53100	Región extracelular	GDSL-motivo actividad esterasa/aciltransferasa/lipasa,hydrolasa	0.33
	At5g44400	Pared celular, citoplasma , plasmodesma	Proteína de unión FAD	0.11
MORPHOGENESIS OF ROOT HAIR 1, MRH1	At4g18640	Cloroplasto	Proteína con actividad kinasa	0.11
ATPAP3, PAP3, PURPLE ACID PHOSPHATASE 3	At1g14700	Región extracelular , vacuola	Actividad ácido fosfatasa.	0.25
	At3g29030	Pared celular	Codifica para una expansina .	0.17
	At1g04040	Pared celular,	HAD superfamilia, subfamilia IIIB ácido fosfatasa	0.27

TPPH, TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE H	At4g39770	Citoplasma, citosol, núcleo	Proceso biosíntesis de trealosa	0.61
	At5g63180	Pectina liasa / factor de virulencia	Proteína pectina liasa	0.35

Los genes involucrados en el transporte y consumo de fotoasimilados principalmente azúcares tienen un importante papel en floración, ya que la demanda de azúcares está relacionada con el estado fisiológico de la planta. Como resultado del análisis de los datos obtenidos en la línea AtFTOE 2.1 algunos transcritos relacionados con transporte de monosacáridos específicamente hexosas como glucosa y fructosa son inducidos como es el caso de STP13, STP3 y sugar transport protein ERD6-like11, el gen At3g06500 que codifica para una invertasa también fue sobreexpresado (Figura 44 y tabla 12).

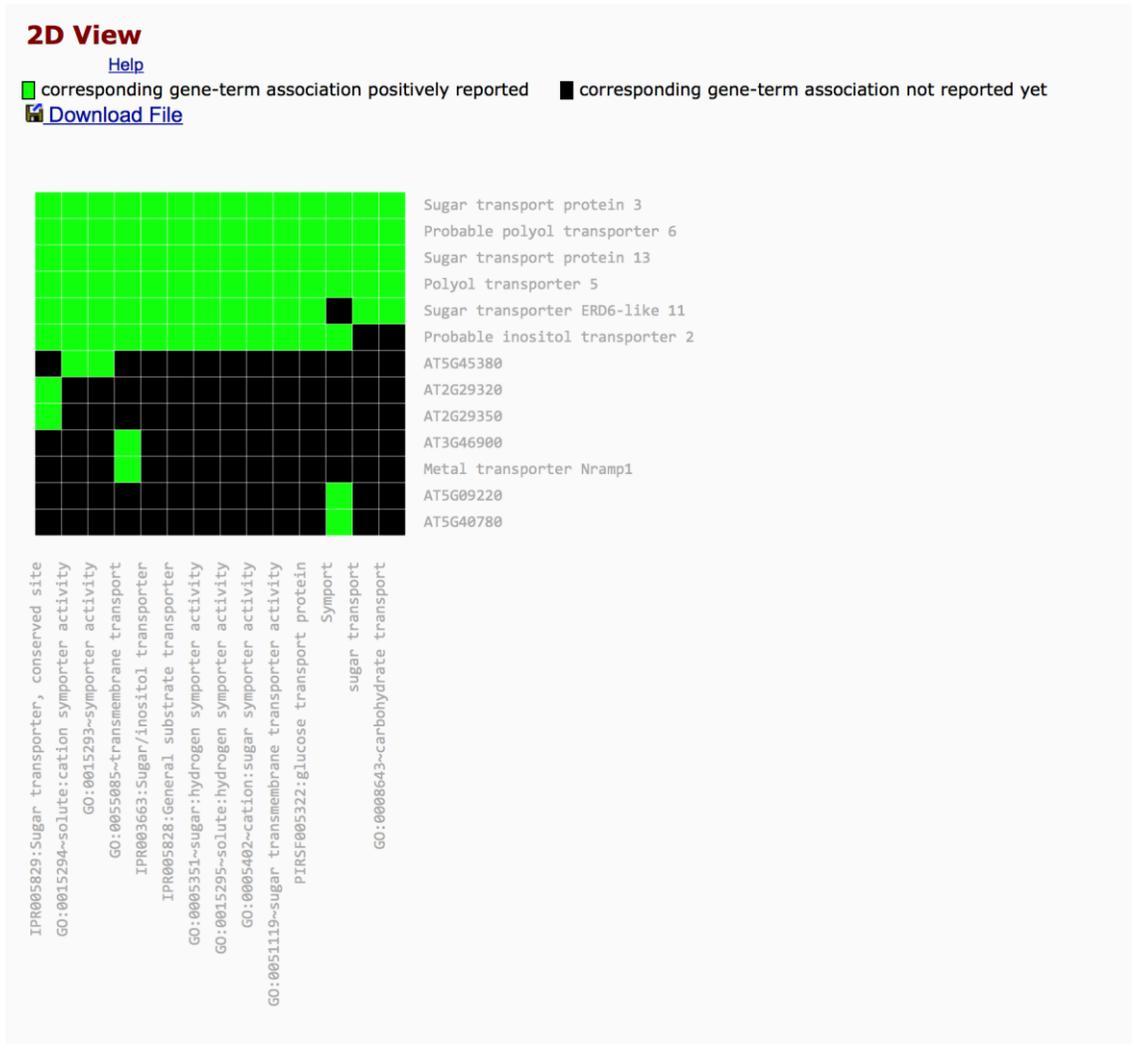


Figura 44. Cluster de genes expresados diferencialmente relacionados con transporte obtenido por DAVID versión 6.7. En este gráfico 2D podemos observar los genes relacionados con floración (eje X) y sus anotaciones de genes asociados (eje Y). El color verde corresponde a asociaciones de genes ya reportadas y el color negro corresponde a asociaciones de genes no reportados aún.

Tabla 12. Genes sobreexpresados en líneas AtFTOE relacionados con transporte de azúcares.

Genes	Locus ID	Localización	Descripción	FC
Sugar transporter ERD6-like 11	At3g05165	Membrana plasmática	Simportador , actividad transportadora sustrato específica.	1.68
ATSTP13, MSS1, STP13, SUGAR TRANSPORT PROTEIN 13	At5g26340	Citoplasma, componente integral de la membrana plasmática	Codifica para una proteína con alta afinidad de específica de hexosas. Actividad /H+ simportadora.	4.59
Sugar transport protein 3	At5g61520	Membrana	Actividad transportadora de carbohidratos, actividad simportadora.	2.42
A/N-INVC, ALKALINE/NEUTRAL INVERTASE C	At3g06500	Región extracelular, mitocondria	Codifica para una invertasa neutral alcalina la cual se localiza en la mitocondria.	1.83
POLYOL TRANSPORTER 5	At3g18830	Membrana plasmática	Importadora de glucosa	1.63
POLYOL TRANSPORTER 6	At4g36670	Membrana plasmática	Transporte de hexosa Glucosa	2.07

La validación de la sobreexpresión de STP3 fue realizada por PCR en tiempo real (Figura 43). Adicionalmente tres genes relacionados con transporte de sacarosa SUC2, SUC3 y SUC4 fueron reprimidos (tabla 13).

Tabla 13. Genes relacionados con transporte de sacarosa que fueron reprimidos en líneas AtFTOE.

Gene	Locus ID	localización	Descripción	FC
SUC 2	At1g22710	Membrana plasmática	Codifica para un transportador esencial a larga distancia de alta afinidad en el floema.	0.60
SUC 3	At2g02860	Membrana plasmática	Codifica para un transportador de sacarosa en los tubos cribosos y tejidos consumidores.	0.57
SUC 4	At1g09960	Membrana plasmática , vacuola	Transportador de sacarosas en los tubos cribosos en el floema.	0.38

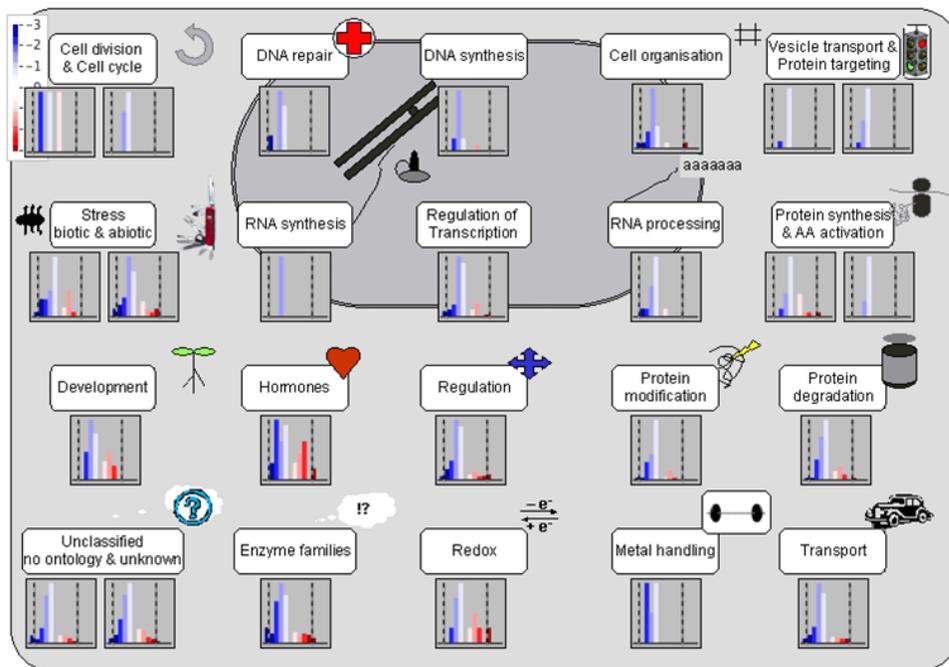
Con el fin de visualizar los 3652 genes expresados diferencialmente, en relación con metabolismo y funciones celulares se realizaron análisis con la

herramienta

bioinformática

Mapman

(<http://mapman.gabipd.org/web/guest/mapman>) donde 2032 genes fueron mapeados utilizando la base de datos Ath_AGI_LOCUS_TAIR10_Aug2012-3.m02 y en el gráfico 1806 puntos de datos fueron visualizados (Figura 45A). La expresión diferencial de genes se pudo visualizar en funciones celulares como división celular y ciclo celular, síntesis de DNA, stress biótico y abiótico, regulación de transcripción, procesamiento de RNA, síntesis de proteínas y activación de AA, desarrollo, regulación hormonal, modificación de proteínas, degradación de proteínas, enzimas, redox y transporte. En la figura 45 B podemos observar expresión diferencial en vías metabólicas relacionadas con metabolismo de carbohidratos, lípidos, metabolitos secundarios, síntesis de aminoácidos y síntesis de sacarosa.



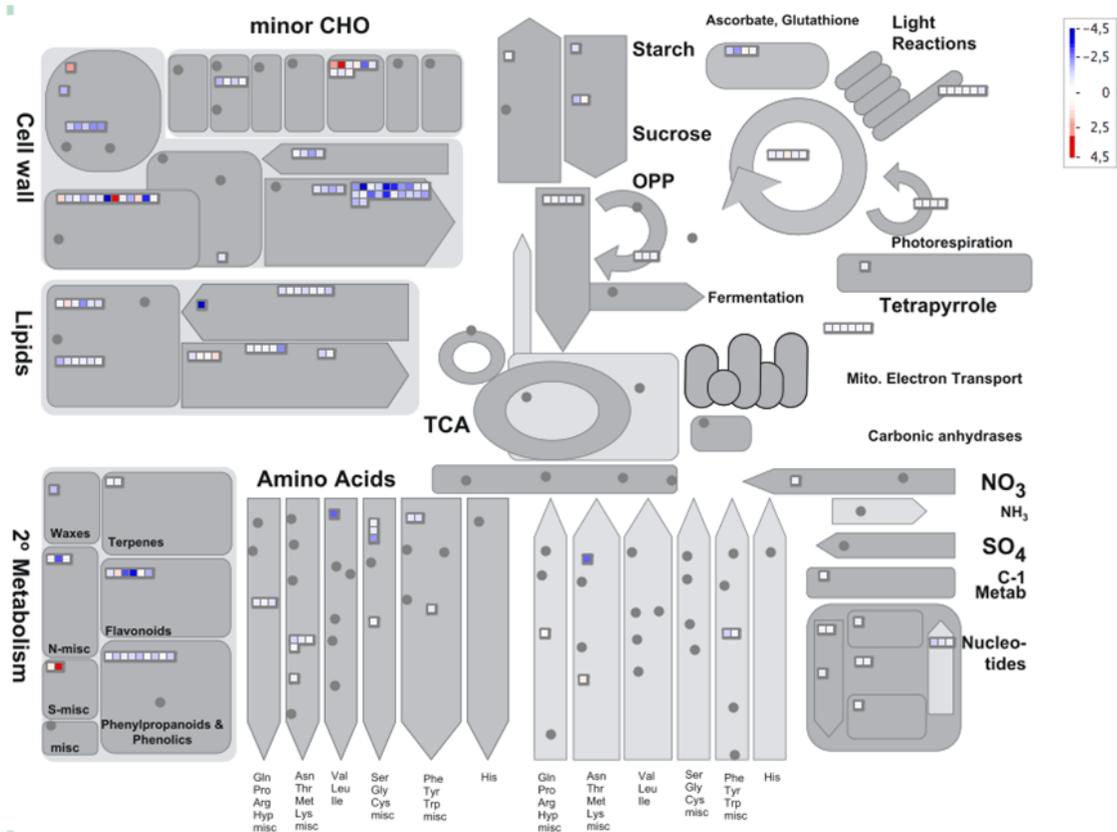


Figure 45. Genes expresados diferencialmente (sobreexpresados y reprimidos con FC=1.5 con $p < 0.05$) en hojas maduras de roseta a los 35 días de edad son visualizados por Mapman en un gráfico relacionado con funciones celulares. Los genes sobreexpresados son indicados en rojo y los reprimidos en azul acorde al log₂. **(A)** funciones celulares **(B)** metabolismo

7 Discusión

Los resultados aquí mostrados están enfocados al análisis fenotípico y transcriptómico (RNA-Seq) de tres líneas AtFTOE (2.1,3,1 y 4,3) sobreexpresoras del gen que codifica para la proteína FT por mostrar un efecto diferencial representado en un fenotipo con floración temprana independiente del fotoperiodo AtFTOE al ser comparado con plantas WT. Análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en líneas AtFTOE vs WT ni en el número de hojas ni en el diámetro de roseta hasta el día 21 post-germinación tiempo en el cual se presentó la floración en $\geq 80\%$ de las líneas AtFTOE en contraste con las plantas WT las cuales no mostraron floración en el mismo periodo ni bajo las mismas condiciones. Posteriormente diferencias fenotípicas fueron observadas al analizar las hojas de roseta de plantas AtFTOE observándose que una vez florecieron al día 21 se detuvo el crecimiento y la producción de hojas, mientras que las plantas WT siguieron en estado vegetativo con crecimiento de las hojas y producción de las mismas hasta el día 40 tiempo en el cual se presentó la floración en el 73-80% de las plantas WT. Es interesante el hecho de que las hojas de roseta de plantas AtFTOE detenga su producción y crecimiento al día 21 post-germinación cuando se produce la floración en contraste con las plantas WT que siguen en su estado vegetativo hasta el día 40 cuando florecen, observándose un mayor número de hojas y un mayor tamaño de las mismas, sin embargo consideramos que esto podría tener una explicación lógica si partimos del hecho de que al entrar la planta AtFTOE al estado de floración cambia el estado del meristemo vegetativo al de meristemo floral el cual es un tejido consumidor fuerte y detener el crecimiento de la hoja puede constituir una estrategia para balancear la demanda de energía requerida por meristemos florales.

Para conocer las bases moleculares involucradas en estos cambios se realizó un análisis transcriptómico de hojas de roseta de plantas AtFTOE vs

WT de 35 días post-germinación. Datos obtenidos por RNA-seq Illumina fueron procesados por herramientas bioinformáticas dando como resultado la expresión diferencial de 3652 genes con $FC \geq 1.5$. Nuestro análisis se enfocó a determinar los efectos de la expresión diferencial de genes relacionados con floración y transporte de azúcares en hoja de roseta, así como visualizar por medio de la herramienta bioinformática de Mapman la expresión diferencial de los genes en vías metabólicas y funciones celulares.

Como es conocido en la inducción de la floración interviene un gran número de genes y es esperado que ocurran cambios en la expresión de estos en el meristemo más que en cualquier otro tejido, sin embargo es claro que hay efectos que se producen en otros tejidos cuando se induce floración. De hecho la sobreexpresión del gen *FT* manejado con un promotor constitutivo da como resultado una floración temprana, la cual es el resultado de la activación de genes en tejidos vegetativos (Kardailsky, *et al* 1999; Kobayashi *et al.*,1999). En este sentido cabe mencionar que ciertos genes que son requeridos para el proceso de transición floral son expresados en hoja y en otros tejidos; por ejemplo en papa *FT* ha sido mantenido durante la evolución y funciona como blanco en la formación de tubérculo (Navarro C, *et al.*,2011).

Para entender las bases moleculares de la respuesta en hojas maduras asociada con la sobreexpresión de *FT* manejada por un promotor específico de meristemo KNAT1 (Lincoln, *et al.*, 1994; Long, *et al.*, 1996; Heyer, *et al.*,2004), se utilizó la herramienta bioinformática DAVID (del inglés the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (). El análisis de genes sobreexpresados en hojas de rosetas originó un clúster relacionado con floración, los datos concordaron con los obtenidos por Schmid, *et al* en 2003. La mayoría de los productos de los genes sobreexpresados relacionados con floración estuvieron localizados en núcleo suponiendo que la mayoría de proteínas están asociadas a transcripción. Como resultado cinco factores de transcripción del tipo box-MADS fueron

sobreexpresados y son conocidos como importantes reguladores de procesos celulares relacionados con tiempo de floración, determinación de la identidad del meristemo floral, organogénesis floral, formación del fruto y desarrollo endotelial (Parenicová *et al.*, 2003). Sin embargo el mecanismo por el cual las proteínas MADS activan o reprimen la expresión de sus genes blanco y sus cofactores aun son desconocidos (Parenicová, *et al.*., 2003; Smaczniak, *et al.*, 2012). Es interesante que el supresor de la expresión de CO1 (SOC1) el cual codifica para un factor de transcripción box MADS e integra múltiples señales florales derivadas del fotoperiodo, temperatura, señales hormonales y relacionadas con la edad, es sobreexpresado en plantas AtFTOE. Es conocido que SOC1 es activado principalmente por FT en el estado de floración y es necesario para establecer y mantener la identidad del meristemo floral (Lee and Lee., 2010; Schmid *et al.* 2003). Plantas WT contienen altos niveles de transcritos SOC1 en hojas cuando son cultivadas en días largos en comparación a cuando son cultivadas en condiciones de días cortos y las mutantes SOC1 presentan una perdida de floración (Samach *et al.* 2000; Schmid *et al.*., 2003). Esto sugiere que la acumulación de mRNAs SOC1 en hojas de roseta en líneas ATFTOE es también importante para mantener la identidad del meristemo floral. Otro gen sobreexpresado en hojas de roseta es *FRUITFULL (FUL/AGL8)* el cual es un factor de transcripción MADS-box estrechamente relacionado con *SOC1* (Schimid *et al.*, 2003). *SOC1* y *FUL* funcionan corriente debajo de *FT* (Torti, *et al.*,2012) formando un heterodimero que puede mediar la transición del meristemo vegetativo al floral. (Balanzá, *et al.*, 2014). El incremento de la expresión de *FUL* en hojas de roseta sugiere que este gen puede estar involucrado en el cambio del estado del primordio de la hoja durante la transición a floración. También ha sido reportado la reducción del tamaño de la hoja dependiente de *FUL* ocasionada por FT y FD (Teper-Bammolker and Samach, 2005). Por otro lado la sobreexpresión de *AP2/ERF* y el factor de transcripción *RAV1* genera menos raíces laterales y menos hojas de roseta (Hu *et al.*, 2004). La acumulación de estos transcritos en las líneas AtFTOE

podrían en parte también explicar el tamaño pequeño de hojas de roseta en comparación con plantas WT.

Los transcritos diferencialmente acumulados de factores de transcripción MADS-box como el *AGL42* (estrechamente relacionado filogenéticamente a *SOC1* y directamente regulado por este gen) son también involucrados en transición floral (Dorcall-Fornell, et al., 2011). De acuerdo a los datos de microarreglos disponibles, *AGL42* es expresado en raíces, hojas de roseta, hojas caulinares y inflorescencias (Schmid *et al.*, 2005). Otro factor de transcripción sobreexpresado MADS-box fue *AGL3/SEP2*, el cual juega un papel importante en la identidad del meristemo floral (Ditta, et al., 2004) y *MAF5*, el cual actúa como un activador floral (Ratcliffe, et al., 2003). La sobreexpresión de *SPL4* también fue observada, esta proteína también tiene un papel en la transición floral y es negativamente regulada por microRNA 156 y 157 (Schwab, *et al.*, 2005). Esto podría sugerir que esta respuesta esta influenciada por el modulo 153-SPL4 el cual al mismo tiempo puede regular la sobreexpresión de marcadores florales en hojas que mantienen la planta en estado productivo.

La inducción de marcadores florales de transición tal como proteínas de unión como las MADS-box y Squamosa Promoter (*SPL*) en hojas, las cuales son normalmente expresadas en meristemo apical es curiosa. Sin embargo dos hechos pueden explicar estas observaciones: 1) El promotor *KNAT1* es también activo en cambium (así mismo en tejidos de hoja); 2) La proteína *FT* tiene la habilidad para moverse célula a célula a larga distancia; lo cual posiblemente en el caso de las líneas *AtFTOE* donde la proteína *FT* puede ser transportada fuera del cambium a otros tipos de células con lo cual puede ser la causa de la sobreexpresión de los genes mencionados. Algunos de los genes reprimidos en plantas de las líneas *AtFTOE*, han sido anteriormente sugeridos como represores de floración tales como *Atg27200* (Teaster *et al.*, 2012) y *Atg43270* (*SPL2*) (Teaster *et al.*, 2012 y Schmidt *et al.*, 2003). En

análisis comparativos de los resultados obtenidos en este estudio con los resultados de Schmidt et al., de 2003, se pudo determinar 28 genes reprimidos en común, por lo cual en un futuro sería interesante determinar el mecanismo a través de lo cual estos genes actúan como represores florales. Es de anotar que los productos de estos genes reprimidos cuando las plantas se encuentran en estado de floración son localizados principalmente en cloroplastos y en componentes extra celulares.

Los análisis bioinformáticos no presentaron expresión diferencial de genes tales como *CONSTANS* (*CO*), que codifica para una proteína que actúa promoviendo floración en días largos y promueve la expresión de *FT* y *SOC1*, regulando a ambas a nivel de mRNA y proteínas (Kardailsky et al., 1999; Kobayasky et al., 1999; Samach et al., 2000; Suarez- Lopez., 2001; Hepworth., 2002; Valverde et al., 2004). Tampoco hay evidencia de expresión diferencial de genes que codifican para fotoreceptores tales como fitocromo A (*PHYA*) y criptocromos (*CRY1* y *CRY2*), los cuales son necesarios para la estabilización de la proteína *CO* (Valverde et al., 2004; Kim et al., 2008). Estos resultados demuestran que la expresión de *FT* es independiente de genes asociados con fotoperiodo.

Nosotros también consideramos necesario realizar análisis relacionados con costo de energía considerando la generación temprana de tejidos heterotróficos fuertemente demandantes de nutrientes y azúcares como son los meristemos florales. Los azúcares afectan la transición floral inhibiendo o activando genes cuando actúan como señal o cuando son transportados a órganos demandantes (Corbesier et al., 1998; Roldan et al., 1999; Ohto et al., 2001; Seo, P.J., 2011; Yang et al., 2013). *Arabidopsis* es una planta con un gran movimiento apoplástico de fotoasimilados mediado por una gran familia de simportadores de mono y di sacáridos identificados en su genoma, acorde a esto identificamos los genes sobreexpresados y reprimidos en líneas de plantas *AtFTOE* involucrados en transporte de azúcares tales como

simportadores de mono y di sacáridos y transportadores de polyoles. Como resultado fueron encontrados genes sobreexpresados relacionados con transporte de hexosas tales como *STP13* y *STP3* (tabla 12), los cuales pertenecen a la familia de los “Arabidopsis sugar transporter (AtSTP)” que median la toma de hexosas del espacio apoplástico a través de la membrana plasmática en la célula (Büttner.,2010; Büttner., M., 2007). *STP3* y *STP13* transportan glucosa, y específicamente *STP13* también transporta fructosa (Norholm M.H., *et al.*, 2006), las dos hexosas que resultan de la hidrólisis de sacarosa por invertasas de pared celular. La sobreexpresión de estos genes y el gen *At3g06500* (tabla 12) que codifica para una invertasa indica una demanda de glucosa y fructosa posiblemente generada por la presencia temprana de meristemos florales, los cuales son tejidos heterotróficos altamente demandantes en plantas *AtFTOE*. Otros dos genes sobreexpresados fueron *At3g18830* y *At4g36670* transportadores de polyol 5 y 6 respectivamente (tabla 12), los cuales también tienen la función de transportar hexosas principalmente glucosa y pentosas principalmente ribosa a tejidos demandantes en las plantas (Reinders, *et al.*, 2004; Klepek , 2005). Lo anterior indica que las plantas *AtFTOE* están en un estado demandante de hexosas posiblemente generado por la floración temprana y el crecimiento acelerado de la planta. Considerando que la glucosa actúa además de metabolito como molécula de señalización y que manipulando la tasa de síntesis, transporte o degradación se puede afectar el crecimiento de la planta y desarrollo fisiológico (Wind and Smeekens., 2010) es interesante el hecho que tres transportadores de sacarosa (*SUC1,2,3* y *4*) (tabla 13) fueron reprimidos en plantas *AtFTOE* cuando fueron comparadas con plantas *WT*. Esto podría indicar que la demanda de azúcares esta relacionada con el estado fisiológico de la planta, indicando que las plantas *WT* requieren de sacarosa para el crecimiento de las hojas puesto que se encuentran en estado de desarrollo (Proveniers, 2013) y que las plantas *AtFTOE* presentan una alta demanda de hexosas por encontrarse en un estado de floración.

Para visualizar la expresión diferencial de genes en relación a función celular se realizaron análisis por medio de la herramienta bioinformática Mapman, 2032 genes fueron mapeados y en el gráfico 1806 puntos de datos fueron visualizados (Fig. 45A) indicando una expresión diferencial de genes asociados con división celular y ciclo celular y esto es de considerarse ya que fue analizado el mRNA de hojas maduras y en las plantas AtFTOE era de esperarse que no hubiera división celular ya que se detuvo el crecimiento y la producción de hojas de roseta en contraste con las plantas WT, la expresión diferencial también se pudo visualizar en la síntesis de ADN reforzando esta interpretación. La expresión diferencial de genes asociados a biosíntesis de hormonas en hojas puede estar indicando una regulación supracelular en tejidos distantes basada en reguladores de plantas. También se observa una expresión diferencial en síntesis, modificación, degradación y transporte de proteínas, lo cual puede indicar que la rotación normal se altera para proporcionar mayor vida media de las proteínas recién sintetizadas. El balance redox comprometido en la expresión diferencial indica el papel que ejerce el metabolismo redox en todas las vías metabólicas. También pudimos obtener un gráfico para visualizar la expresión diferencial de genes en vías metabólicas 2032 genes fueron mapeados y en el gráfico 189 puntos de datos fueron visualizados (Figura 45B), observándose expresión diferencial en metabolismos primario de carbohidratos, síntesis de lípidos y metabolismo secundario, así como el la hidrólisis de sacarosa.

8. Conclusiones

1. La sobreexpresión del gen *FT* (AtFTOE) con un promotor específico de meristemo KNAT-1 en *Arabidopsis thaliana* dio como resultado un fenotipo con una floración temprana independiente al fotoperíodo al ser comparado con plantas WT.
2. Se observaron diferencias con plantas WT en líneas sobreexpresoras AtFTOE las cuales dejaron de producir hojas y se detuvo el crecimiento de las mismas cuando empezaron a florecer al día 21 posiblemente por la generación de meristemos florales los cuales son fuertes tejidos consumidores, considerando esta una estrategia para balancear la mayor demanda de energía ocasionada por el aumento temprano de meristemos florales.
3. El análisis transcriptómico de hojas de roseta mediante RNA-seq de líneas AtFTOE comparado con plantas WT dio como resultado la expresión diferencial de 3652 genes con un \geq FC 1.5. La mayoría de los productos de los genes sobreexpresados en plantas AtFTOE relacionados estuvieron localizados en núcleo lo cual supone que las proteínas están asociadas a cambios transcripcionales que afectan miles de genes ocasionando que la planta entre a un estado de floración en un tiempo menor al ser comparadas con plantas WT.
4. La sobreexpresión de *FT* manejada por un promotor meristemático KNAT1 ocasiona que se sobreexpresen en hoja de roseta marcadores florales los cuales han sido reportados necesarios para mantener la identidad del meristemo floral en plantas de *Arabidopsis*.
5. Los análisis transcriptómicos mostraron que la demanda de azúcares es diferente para plantas AtFTOE vs plantas WT a los 35 días post-germinación debido al estado reproductivo en que se encuentra las plantas AtFTOE en donde son más demandadas hexosas al contrario

del estado vegetativo de las plantas WT donde es mas fuerte la demanda de sacarosa.

9. Perspectivas

Los resultados de este trabajo demuestran que la sobreexpresión en *Arabidopsis* de genes relacionada con consumo de azúcares como es el caso del gen *FT*, causan cambios importantes relacionados con el fenotipo. Las plantas AtFTOE las cuales fueron comparadas con plantas WT presentaron una floración temprana demostrándose una reducción del ciclo juvenil. Estos cambios fueron sustentados por una expresión diferencial de genes que afectan la demanda de azúcares y funciones a nivel celular que hacen que las plantas AtFTOE entren a estado productivo en menor tiempo que las plantas WT.

Con base en los resultados ya mencionados y como perspectiva de este trabajo se propone transformar plantas de interés agronómico como es el caso de cítricos los cuales tienen un ciclo juvenil bastante largo aproximadamente de 3 a 5 años. De llegarse a obtener estos mismos resultados podríamos obtener variedades de plantas que entren a estados productivos en menor tiempo y por a una obtención de frutos a más corto plazo, constituyendo una ventaja económica y productiva para el agricultor.

10. Bibliografía

- An, H., Roussot, C., Suarez-Lopez, P., Corbesier, L., Vincent, C., Pineiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., and Coupland, G. (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development* 131, 3615–3626.
- Andres, F., & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet*, 13(9), 627–639. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3291>
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., and Ferrándiz, C. (2014). Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. *J. Exp. Bot*, 65(4), 1193–1203. <http://doi.org/10.1093/jxb/ert482>
- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Ulker, B. (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between Arabidopsis thaliana ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plants Methods*, 1(1), 4. doi:10.1186/1746-4811-1-4
- Bidwell r.g.s. (2002). Fisiología vegetal, tercera reimpression. A.G.T Editor S.A. México, D.F .

- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513–1523
- Büttner M. (2007). The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581. pág.2318-2324.
- Büttner M. (2010). The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biology*. vol 12. pág. 35-41.
- Conn, S. J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., ... Gilliham, M. (2013). Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods*, 9(1), 4. doi:10.1186/1746-4811-9-4
- Corbesier, L.; Coupland, G. (2005). Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: Integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant, Cell Environ* 28:54-66.
- Gary Ditta, Anusak Pinyopich, Pedro Robles, Pelaz, S.,, and Yanofsky, M. F . (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr.Biol.* 14, 1935-1940. doi 10.1016/j.cub.2004.10.028
- Dorca-Fornell, C., Gregis, V., Grandi, V., Coupland, G., Colombo, L., & Kater, M. M. (2011). The *Arabidopsis* SOC1-like genes AGL42, AGL71 and AGL72 promote flowering in the shoot apical and axillary meristems. *Plant Journal*, 67(6), 1006–1017. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04653.x>
- Fornara, F., de Montaigu, A., and Coupland, G. (2010). SnapShot: Control of flowering in *arabidopsis*. *Cell*, 141(3), 3–5.

- Fukuchi-Mizutani, M., Mizutani, M., Tanaka Y. (1999). Microsomal electron transfer in higher plants: Cloning and heterologous expression of NADH-cytochrome b5 reductase from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 119,353-361.
- Heyer, A. G., Raap, M., Schroeer, B., Marty, B., & Willmitzer, L. (2004). Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 39(2), 161–169.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., and Weigel, D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286, 1962–1965. doi: 10.1126/science.286.5446.1962
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., and Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286, 1960–1962. doi:10.1126/science.286.5446.1960
- Mochida, K., & Shinozaki, K. (2011). Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2017–2038. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcr153>
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., and Nakamura, K. (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 252–261. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.127.1.252>
- Parenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Colombo, L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *The Plant Cell*, 15(7), 1538–1551. <http://doi.org/10.1105/tpc.011544>

- Proveniers M. 2013. Sugars speed up the circle of life. *elife* 2, e00625. doi:10.7554/eLife.00625
- Reinders, A., Panshyshyn, J. A., & Ward, J. M. (2005). Analysis of transport activity of Arabidopsis sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1594–602. <http://doi.org/10.1074/jbc.M410831200>
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev. Cell* 8: 517–527. doi: 10.1016/j.devcel.2005.01.018
- Sedano, S., Carolina, J., Carrascal, L., & Ernesto, C. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 16, 101–113.
- Seo, P. J., Ryu, J., Kang, S. K. and Park, C.-M. (2011), Modulation of sugar metabolism by an INDETERMINATE DOMAIN transcription factor contributes to photoperiodic flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 65: 418–429. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04432.x
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* 288, 1613–1616. doi:10.1126/science.288.5471.1613
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Muino, J. M., Blanvillain, R., Busscher, M., Busscher-Lange, J., Kaufmann, K. (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1560–1565. doi:10.1073/pnas.1112871109

- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, 410(6832), 1116–1120. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35074138>
- Roldan, M., Gomez-Mena, C., Ruiz- Garcia, L., Salinas, J., and Martinez-Zapater, J. M. (1999). Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of Arabidopsis in the dark. *Plant J.* 20, 581–590. <http://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00632.x>
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 675–709. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Ham, B. K., Li, G., & Lucas, W. J. (2011). Vascular expression in Arabidopsis is predicted by the frequency of CT/GA-rich repeats in gene promoters. *Plant Journal*, 67(1), 130–144. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04581.x
- Taiz Lincoln & Zeiger Eduardo. (2010). *Plant physiology*. Fifth Edition.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., ... Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–78.
- Teaster, N. D., Keereetawee, J., Kilaru, A., Wang, Y.-S., Tang, Y., Tran, C. N.-Q., Blancaflor, E. B. (2012). Overexpression of Fatty Acid Amide Hydrolase Induces Early Flowering in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 3(February), 32. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00032>
- Teper-Bamnlker, P., & Samach, A. (2005). The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in Arabidopsis

leaves. *The Plant Cell*, 17(10), 2661–2675.
<http://doi.org/10.1105/tpc.105.035766>

Torti, S., Fornara, F., Vincent, C., Andrés, F., Nordström, K., Göbel, U., ... Coupland, G. (2012). Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *The Plant Cell*, 24(2), 444–62. <http://doi.org/10.1105/tpc.111.09279>

Tony J. Lough & William J. Lucas. (2006) Integrative Plant Biology: Role of Phloem Long-Distance Macromolecular Trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* V57. pág. 203-232.

Hu, Y. X., Wang, Y. X., Liu, X. F., & Li, J. Y. (2004). *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research*, 14(1), 8–15.
<http://doi.org/10.1038/sj.cr.7290197>

Lee I, Amasino RM (1995) Effect of vernalization, photoperiod, and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the FRIGIDA gene. *Plant Physiol* 108: 157–162.
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.1.157>

Lee, J., & Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2247–2254.
<http://doi.org/10.1093/jxb/erq098>

Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., & Hake, S. (1994). A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *The Plant Cell*, 6(12), 1859–1876.
[doi:10.1105/tpc.6.12.1859](http://doi.org/10.1105/tpc.6.12.1859)

- Long, J., Moan, E., Medford, J., & Barton, K. (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Letters to nature*, 379, 66-69.
- Lucas, W. J., Bouche-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B. & Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 270, pág. 1980–1983.
- Mardis, E. R. (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470(7333), 198–203. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature09796>
- Minic, Z., Jamet, E., San-Clemente, H., Pelletier, S., Renou, J.-P., Rihouey, C., Jouanin, L. (2009). Transcriptomic analysis of Arabidopsis developing stems: a close-up on cell wall genes. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1–17. <http://doi.org/10.1186/1471-2229-9-6>
- Navarro, C., Abelenda, J. A., Cruz-Oro, E., Cuellar, C. A., Tamaki, S., Silva, J., Prat, S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, 478(7367), 119–122. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature10431>
- Norholm M.H., Nouur-Eldin H.H., Brodersen P., Mundy J., Halkier B.A. (2006). Expression of Arabidopsis high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell death. *FEBS Letters*, 580 (9), pág.2381-2387.
- Nuhse T.S., Stensballe A., Jensen O.N., Peck S.C. (2004). Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. *The plant cell*. 16 (9), 2394-2405.
- Outlaw W.H (2003). Integration of cellular and physiological functions of guard cells. *Critical reviews in plants sciences*, 22(6), 503-529.

- Ozsolak, F., & Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*, 12(2), 87–98. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2934>
- Padilla Chacón, D., & Martínez Barajas. (2007). Factores involucrados en la distribución de azúcares en las plantas vasculares: Comunicación entre los tejidos fuente y tejidos demanda. *Revista de educación Bioquímica (REB)*. Universidad Nacional Autónoma de México. Pag 99-105.
- Romera-Branchat M, Andrés F, Coupland G (2014) Flowering responses to seasonal cues: what's new? *Curr Opin Plant Biol* 21: 120–127. doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.006.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarah M. Sherson, Heather L. Alford, Susan M. Forbes, Graham Wallace and Steven M. Smith. (2003). Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 54 (382).
- Sedano, S., Carolina, J., Carrascal, L., & Ernesto, C. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 16, 101–113.
- Schenkman, J B; Jansson. J. (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology and Therapeutics*. 97:139-152.
- Schofield. R.A, Kant Y-M. Bl and Rothstein. (2009) Over-expression of STP13, a hexose transporter, improves plant growth and nitrogen use in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant cell and Environment*. 32,271-285.

- Scholz-Starke J., Büttner M., Sauer N., (2003) AtSTP6, a new pollen-specific H⁺monosaccharide symporter from Arabidopsis. *Plant physiology*, 131 (1): 70-77.
- Strickler, S. R., Bombarely, A., & Mueller, L. A. (2012). Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species. *American Journal of Botany*, 99 (2), 257–266. <http://doi.org/10.3732/ajb.1100292>
- Tsai, H.-L., Lue, W.-L., Lu, K.-J., Hsieh, M.-H., Wang, S.-M., & Chen, J. (2009). Starch synthesis in Arabidopsis is achieved by spatial cotranscription of core starch metabolism genes. *Plant Physiology*, 151(3), 1582–1595. doi:10.1104/pp.109.144196
- Valverde, F. Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, 303: 1003–1006. <http://doi.org/10.1126/science.1091761>
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2010). Nihms229948, 10(1), 57–63. <http://doi.org/10.1038/nrg2484.RNA-Seq>
- Ward, J. A., Ponnala, L., & Weber, C. A. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany*, 99(2), 267–276. <http://doi.org/10.3732/ajb.1100334>
- Weeda, S., Zhang, N., Zhao, X., Ndip, G., Guo, Y., Buck, G. A., ... Ren, S. (2014). Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS ONE*, 9(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0093462>
- Weigel, D. & Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M. (2015). Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis in vitro. *BMC Genomics*, 16(1), 1–23. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1504-6>
- Wind, J and Smeekens, S. (2010). Sucrose : Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*,7 (1610-1614). doi:10.1016/j.phytochem.2010.07.007
- Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., & Lucas, W. J. (2000). Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b5 reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant Journal*, 24(6), 735–747. doi:10.1046/j.1365-313X.2000.00916.x
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., & Poethig, R. S. (2013). Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife*, 2. doi: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00260>