



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

“Análisis de los genes homólogos de *CmNACP1* en *Arabidopsis thaliana*”

T E S I S

Que presenta

BRENDA YAZMÍN VARGAS HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dr. Roberto Ruíz Medrano**

Ciudad de México

Octubre, 2016

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por haberme otorgado la beca número 339617, la cual me permitió llevar a cabo mis estudios de Maestría.

A mi director de tesis, Dr. Roberto Ruíz Medrano por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por haberme permitido desarrollar este proyecto tan interesante. Agradezco infinitamente el interés que usted tuvo el día a día en este proyecto y sobre todo, el admirable entusiasmo que siempre mantuvo. A mi asesora de proyecto, Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por haber depositado su confianza en mí, por todas las observaciones profesionales que aportó a este tema de investigación. Agradezco a ambos, el haberme otorgado los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Rodolfo Marsch Moreno por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial y principalmente por todas sus valiosas aportaciones que realizó durante el desarrollo de esta investigación.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio: Yorch, Angie, Vale, Alejita, Robert, Bere, Moni, Leandro, Josué, porque siempre me dieron su apoyo personal y profesionalmente. Gracias por todos los valiosos conocimientos transmitidos y por todos los momentos lindos que pasamos juntos durante esta etapa de mi vida.

A las personas más importantes en mi vida, mi mamá Olivia, mi papá Lalo y mis hermanos Bere y Eduardo. A todos ustedes les agradezco infinitamente el haberme demostrado siempre su apoyo y confianza en todas las decisiones que he tomado en mi vida. Gracias por los valiosos e inigualables consejos que me dieron durante este desarrollo profesional.

A Yael, por tu apoyo incondicional que me brindaste durante esta etapa, gracias por escucharme, amarme y sobre todo por ser el mejor compañero de mi vida.

A todos mis compañeros de maestría: Citlalli, Mariana, Jessy, Cyn, Yos, James, Isra, Martín y Lalo, gracias por todas las experiencias y conocimientos compartidos. Bruno, gracias especialmente por haberte convertido en mi mejor amigo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Plantas Vasculares	1
1.2 El sistema vascular de plantas	3
1.2.1 Estructura y función primaria del floema.....	4
1.3 Transporte de macromoléculas en plantas vasculares.....	5
1.4 Señalización a larga distancia a través del floema	6
1.5 Transporte de RNAs a través del floema	7
1.5.1 Transcritos presentes en el floema de cucurbitáceas	7
1.6 La familia de los genes NAC	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Patrón de distribución del transcrito y la proteína de <i>CmNACPI</i>	9
2.2 ANAC046 y ANAC087 como genes homólogos de <i>CmNACPI</i>	9
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVO GENERAL	12
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
7.1 Desarrollo de las construcciones de promotores, ORFs y silenciamiento de ANAC046/087	14
7.1.1 Crecimiento de plantas de <i>A. thaliana</i>	14
7.1.2 Extracción de DNA genómico y RNA total de plantas.....	15
7.1.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)	16
7.1.4 Amplificación del ORF de ANAC046.....	16
7.1.5 Clonación de fragmentos de interés.....	17
7.2 Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> (Floral dip)	23
7.2.1 Selección de líneas transgénicas	24
7.2.2 PCR punto final para detección de Bar y fusiones a GFP.....	25
7.3 Transformación transitoria de plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	26
7.4 Análisis en plantas transformadas y silvestres	26
7.4.1 Cuantificación del mRNA de ANAC046/087 por medio de qRT-PCR en tiempo real	27

7.4.2	Análisis de fluorescencia por microscopía confocal	28
7.4.3	Detección histoquímica de la actividad β -glucuronidasa	29
8.	RESULTADOS.....	30
8.1	Construcciones de sobreexpresión de los genes <i>ANAC046/087</i>	30
8.1.1	Extracción de RNA de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
8.1.2	Clonación del ORF de cDNA de <i>ANAC046</i> en el vector de entrada.....	31
8.1.3	Obtención de plásmidos recombinantes en vector de sobreexpresión y transformación en <i>A. tumefaciens</i>	32
8.1.4	Estructura de los ORFs de <i>ANAC046/087</i> fusionados al gen reportero GFP en el vector pB7FWG2.....	34
8.2	Construcciones de silenciamiento génico post-transcripcional de los genes <i>ANAC046/087</i>	35
8.3	Construcciones para el análisis de promotores de los genes <i>ANAC046/087</i>	37
8.4	Análisis de líneas transgénicas	40
8.4.1	Análisis de líneas sobreexpresoras de los genes <i>ANAC046/087</i>	40
8.4.2	Análisis de líneas con silenciamiento génico de los genes <i>ANAC046/087</i>	42
8.5	Fenotipos inducidos durante el análisis de los genes <i>ANAC046/087</i>	43
8.5.1	Fenotipo de la sobreexpresión del gen <i>ANAC046</i>	43
8.5.2	Fenotipo del silenciamiento de <i>ANAC046/087</i>	44
8.5.3	Fenotipo de las líneas transgénicas para el análisis de regiones promotoras de <i>ANAC046/087</i>	45
8.6	Caracterización de la expresión de los genes <i>ANAC046/087</i>	47
8.6.1	Identificación del patrón de expresión de <i>ANAC087</i> y <i>ANAC046</i> PROM:: <i>GFP-GUS</i> por microscopía confocal en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	48
8.6.2	Identificación del patrón de expresión de la región promotora de <i>ANAC046/087</i> a nivel tisular	50
8.6.3	Identificación del patrón de expresión de <i>ANAC087</i> PROM:: <i>GFP-GUS</i> por microscopía confocal en plantas transgénicas estables.....	53
8.6.4	Cuantificación de los niveles endógenos de expresión de <i>ANAC046/087</i> en plantas silvestres de <i>A. thaliana</i>	58
8.7	Análisis por microscopía confocal de <i>ANAC046/087</i> en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i> transformadas transitoriamente	59
8.7.1	Localización celular de los sitios de acumulación de las proteínas de fusión <i>ANAC046::GFP</i> y <i>ANAC087::GFP</i> en <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	59
8.7.2	Localización celular de los sitios de acumulación de las proteínas y las regiones promotoras de <i>ANAC046</i> y <i>ANAC087</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i>	61
9.	DISCUSIÓN	64

10. CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS	71
ANEXO 1	78
ANEXO 2	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación filogenética de las plantas terrestres	2
Figura 2. Patrón longitudinal y radial del sistema vascular en <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Figura 3. Patrón de distribución del mRNA y la proteína de <i>CmNACPI</i>	9
Figura 4. Análisis filogenético de la familia de genes NAC en <i>A. thaliana</i>	11
Figura 5. Representación de las regiones a analizar de los genes <i>ANAC046/087</i>	13
Figura 6. Estrategia experimental para el análisis de <i>ANAC046/087</i>	14
Figura 7. Mapa del vector de entrada PCR8GWTOPO.	18
Figura 8. Vectores binarios utilizados para expresión en planta.....	22
Figura 9. Esquema representativo de la obtención de plantas transformadas.	25
Figura 10. Extracción de RNA y amplificación de ORF de cDNA de ANAC046.	31
Figura 11. Clonación del ORF cDNA de ANAC046 en el vector de entrada.....	32
Figura 12. Subclonación de ANAC046 ORF cDNA, ORFg y ANAC087 ORF cDNA en el vector binario de sobreexpresión.	33
Figura 13. Estructura de las construcciones de sobreexpresión en el vector pB7FWG2.....	34
Figura 14. Estructura de las construcciones de silenciamiento génico post-transcripcional.....	35
Figura 15. Desarrollo del silenciamiento del gen <i>ANAC087</i>	36
Figura 16. Desarrollo del silenciamiento del gen <i>ANAC046</i>	37
Figura 17. Estructura de las construcciones de promotores en el vector pBGWFS7.....	38
Figura 18. Desarrollo de la construcción para el análisis del promotor del gen <i>ANAC087</i>	39
Figura 19. Desarrollo de la construcción para el análisis del promotor del gen <i>ANAC046</i>	40
Figura 20. Líneas transgénicas sobreexpresoras del gen <i>ANAC046</i>	41
Figura 21. Líneas transgénicas sobreexpresoras del gen <i>ANAC087</i>	42
Figura 22. Líneas transgénicas de silenciamiento génico para <i>ANAC046/087</i>	43
Figura 23. Fenotipo inducido por la sobreexpresión del ORF de <i>ANAC046</i>	44
Figura 24. Fenotipo inducido por el silenciamiento del gen <i>ANAC046</i>	44
Figura 25. Fenotipo inducido por el silenciamiento de <i>ANAC046/087</i>	45
Figura 26. Fenotipo inducido por la expresión de GFP::GUS dirigida por el promotor de <i>ANAC046/087</i>	46
Figura 27. Fenotipo inducido por la expresión de GFP::GUS dirigida por el promotor de <i>ANAC087</i>	47
Figura 28. Patrón de expresión ANAC046 PROM::GFP en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	48
Figura 29. Patrón de expresión ANAC087 PROM::GFP en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	49

Figura 30. Patrón de expresión de la región promotora de <i>ANAC087</i> en hojas de roseta y hoja caulinar	50
Figura 31. Patrón de expresión del gen <i>ANAC087</i> en varios tejidos de <i>A. thaliana</i>	51
Figura 32. Patrón de expresión del gen <i>ANAC087</i> en otras líneas transgénicas	52
Figura 33. Patrón de expresión del gen <i>ANAC046</i>	53
Figura 34. Localización de GFP en hoja de roseta y peciolo de la línea L31 de <i>ANAC087</i>	54
Figura 35. Localización de GFP en cortes longitudinales de silicua y semillas de la línea L31 de <i>ANAC087</i>	55
Figura 36. Localización de GFP en cortes longitudinales de anteras de la línea L31 de <i>ANAC087</i>	56
Figura 37. Localización de GFP en cortes transversales de tallos de la línea L31 de <i>ANAC087</i>	57
Figura 38. Niveles de expresión del mRNA de <i>ANAC087</i>	58
Figura 39. Niveles de expresión del mRNA de <i>ANAC046</i>	59
Figura 40. Localización celular de la acumulación de la proteína ANAC046 en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	60
Figura 41. Localización celular de la acumulación de la proteína ANAC087 en plantas de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	61
Figura 42. Localización celular de los sitios de acumulación de la fusión de ANAC046 ORFg y ANAC046 PROM en plantas de <i>N. benthamiana</i>	62
Figura 43. Localización celular de los sitios de acumulación de la fusión de ANAC087 ORF cDNA y ANAC087 PROM en plantas de <i>N. benthamiana</i>	62
Figura 44. Localización celular de los sitios de acumulación de la fusión total de (ANAC046 ORFg/ANAC046 PROM/ANAC087 ORF cDNA/ANAC087 PROM) en plantas de <i>N. benthamiana</i>	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de restricción para las construcciones en estudio.....	20
Tabla 2. Mezcla de reacción para evaluar un tejido y condiciones para qRT-PCR	28
Tabla 3. Avance de construcciones genéticas con el que se inició este proyecto	30

RESUMEN

En plantas vasculares, la principal función del floema es el transporte de nutrientes desde los tejidos fotosintéticos a los tejidos heterotróficos, a través de este conducto se lleva a cabo el transporte de algunas macromoléculas como proteínas y diferentes tipos de RNAs que actúan como moléculas señal en respuesta a distintos factores bióticos y abióticos. Se ha demostrado que el mRNA de *CmNACPI* es capaz de transportarse a través del floema de calabaza y que se acumula en tejidos meristemáticos en heteroinjertos. *CmNACPI* pertenece a la familia de genes NAC presente exclusivamente en plantas y que codifica para factores de transcripción involucrados en procesos de respuesta a varios factores ambientales. Además, en el grupo de trabajo, mediante un análisis filogenético se observó que *CmNACPI* se agrupa directamente con dos proteínas en *Arabidopsis thaliana* (ANAC046/87).

En este estudio, recurrimos a *A. thaliana* para llevar a cabo el análisis de los genes homólogos de *CmNACPI* y así dilucidar cuál es la posible función del transporte de este transcrito y a la vez conocer cuáles son los posibles papeles que desempeñan estos factores de transcripción en plantas. Para cumplir con estos objetivos, obtuvimos tres construcciones genéticas, las cuales dirigen la sobreexpresión de los genes *ANAC046/087* así como su silenciamiento génico y un análisis de regiones promotoras.

La sobreexpresión y el silenciamiento génico de *ANAC046* indican que posiblemente este gen esté involucrado en el crecimiento y dominancia apical de *A. thaliana*. Mientras que por otro lado, el silenciamiento del gen *ANAC087* induce una senescencia temprana en las hojas, lo cual sugiere que este gen es un regulador negativo de la senescencia. Asimismo, es posible que el desarrollo de las rosetas aéreas en plantas de *A. thaliana* sea regulado por las regiones promotoras y/o las regiones 5'UTR de los genes *ANAC046/087*. Las proteínas de estos genes, se localizan en varios compartimentos celulares, por ejemplo en los espacios intercelulares y en la periferia del núcleo, dichas localizaciones sugieren que ambas proteínas se pueden transportar intercelularmente. Aunado a esto, se demostró la posibilidad de que *ANAC046/087* sean genes homólogos de *CmNACPI* ya que sus promotores se encontraron activos en tejido vascular. Resultará interesante confirmar todos estos resultados a través de heteroinjertos así como evaluar los fenotipos inducidos por el silenciamiento y la sobreexpresión de *ANAC046/087* de manera cuantitativa.

ABSTRACT

In vascular plants, the main function of phloem is the transport of nutrients from photosynthetic to heterotrophic tissues. Some proteins and RNAs can also be transported through the phloem, acting as signals in response to different biotic and abiotic factors. In addition, it has been shown that the *CmNACPI* mRNA can be transported through the phloem of pumpkin and accumulates in meristematic tissues in heterografts. *CmNACPI* belongs to the NAC gene family present exclusively in plants, encoding transcription factors involved in response to different environmental factors. In the collaboration group, a phylogenetic analysis showed that *CmNACPI* groups directly with two proteins (*ANAC046/87*) from *Arabidopsis thaliana*.

In this study we resorted to *A. thaliana* in order to analyze both *ANAC* genes for functions homologous to *CmNACPI*, and to elucidate their involvement as transcription factor in plant development. For these purposes, we designed three genetic constructs to assess the overexpression and gene silencing of *ANAC046/087* and another to analyze their promoter regions.

The overexpression and gene silencing of *ANAC046* evidenced that this gene is involved in growth and apical dominance in *A. thaliana*. On the other hand, gene silencing of *ANAC087* induces an early senescence, so it suggests that *ANAC087* is a negative regulator of senescence in plants. Also, is possible that *ANAC046/087* promoter and 5'UTR regions regulate aerial rosettes development in *A. thaliana* plants. Proteins encoded by *ANAC046/087* are localized in several cellular compartments, such as intercellular spaces and nuclear periphery. These localizations suggest that both proteins can be transported cell to cell. In addition, it is possible that *ANAC046/087* are homologous genes to *CmNACPI* due to the promoter regions are active in vascular tissue. However, it could be interesting to support all these results through heterografts development and also is important analyze quantitatively the phenotypes induced under the *ANAC046/087* overexpression and gene silencing.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plantas Vasculares

El surgimiento de las plantas terrestres (Embryophyta) comenzó en el periodo Ordovícico hace 470 millones de años (Ma) aproximadamente, durante la era Paleozoica (Ishizaki, 2016). La colonización de las plantas ocasionó el incremento en la complejidad de los ecosistemas (Kenrick & Crane, 1997), por ejemplo en la formación de suelos, afectando en el ciclo del carbono y por lo tanto influenciando la atmósfera y el clima (Gensel, 2008). Diferentes estudios filogenéticos indican que las plantas terrestres surgieron a partir de algas verdes multicelulares (Charophyta) (Ishizaki, 2016). En diferentes estudios se ha propuesto que las plantas terrestres se adaptaron gradualmente a diferentes hábitats como sequía temporal o drásticamente a la humedad terrestre. Por lo tanto, se piensa que estos cambios causaron la formación de nuevas especies de plantas. A partir de Embryophyta y Charophyta, se formó un grupo, denominado como Streptophyta el cual se refiere a otras formas de algas verdes. Por otro lado, en la relación filogenética de las plantas terrestres, se derivan principalmente dos superdivisiones: Bryophyta y Tracheophytas. Las briofitas representan el grupo más antiguo divergente de la flora terrestre y se consideran como descendientes de las primeras plantas no vasculares. Cabe mencionar que dentro de las briofitas se incluyen a hepáticas y musgos (Ishizaki, 2016). Las traqueofitas o plantas vasculares llegaron a ser la vegetación dominante en los ambientes terrestres y su clasificación consta de dos grupos (Lycophyta y Euphylophyta), el primer grupo se caracteriza por ser plantas sin semilla, dividiéndose en tres órdenes (Lycopodiales, Isoetales y Selaginellales). El grupo Euphylophyta se divide en dos clados (Monilophyta y Lignophyta), el primero se compone por plantas sin raíces verdaderas y entre ellas están los helechos. Mientras que el grupo Lignophyta incluye plantas con raíces verdaderas y con semillas, comprende a las angiospermas y gimnospermas. Las últimas, son árboles sin frutos y sus semillas no se encuentran cubiertas, de esta forma, para llevar a cabo su reproducción, el polen de las células masculinas viaja por efecto del viento hacia las células femeninas. Las angiospermas representan el grupo de plantas vasculares más numeroso y se caracterizan por poseer flores como órganos reproductores y frutos en los cuales se encuentran las semillas, la fecundación se da mediante el contacto directo del polen de las flores por medio de la polinización. Las

angiospermas, se dividen en dos grupos diferenciados por el número de cotiledones que las plantas presentan (monocotiledóneas y dicotiledóneas), como su nombre lo indica, refiriéndose a uno y dos cotiledones presentes, respectivamente (Kenrick & Crane, 1997). Aunado a esto, se ha reportado que en un principio el sistema vascular primitivo se presentaba en un arreglo muy simple. Sin embargo, debido a la evolución de nuevas estructuras como hojas y a la colonización de diferentes plantas en varios hábitats, el sistema vascular se diversificó a una variedad de arreglos y disposición de sus haces vasculares (Scarpella, 2004).

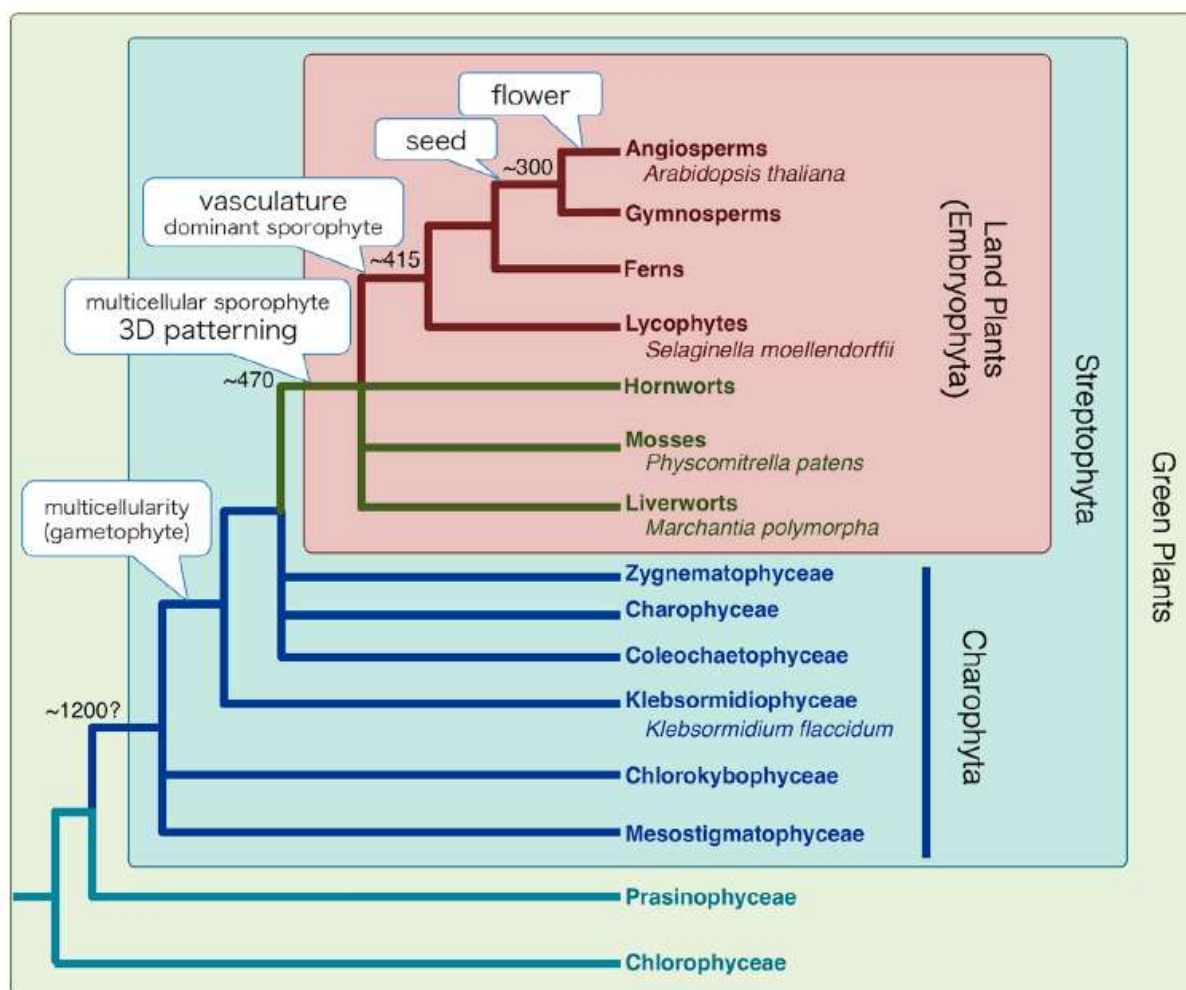


Figura 1. Relación filogenética de las plantas terrestres. Tomado de Ishizaki, 2016.

1.2 El sistema vascular de plantas

Para que todos los organismos multicelulares coordinen su crecimiento y desarrollo, requieren que sus diferentes tipos celulares lleven a cabo un intercambio de información y de moléculas de una manera eficiente. En el caso de las plantas vasculares, los tejidos fotosintéticos producen los nutrientes que requieren los tejidos heterotróficos. Dichos nutrientes y moléculas son transportados a través de conductos especializados que conforman el tejido vascular, conformado a su vez por el xilema y el floema. A través del xilema, se lleva a cabo el transporte de agua, nutrientes minerales y hormonas en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Mientras que a través del floema se transportan azúcares, aminoácidos, proteínas y diferentes tipos de RNAs endógenos y virales (Kehr & Buhtz, 2008). El xilema consta de traqueidas, fibras y células parenquimáticas; este conducto se forma gracias a que las células sufren un proceso similar a la muerte celular programada, ya que sus organelos son digeridos y las paredes celulares quedan reforzadas. Por otro lado, el floema consta de dos tipos celulares principalmente: las células acompañantes y los elementos cribosos.

El tejido vascular conecta todos los órganos de la planta y tiene un patrón de organización espacial tejido-específico, a dicho arreglo se le conoce como patrón longitudinal y patrón radial (Figura 2). El primero, se refiere al arreglo de los haces vasculares en un determinado tejido de la planta y el patrón radial incluye la distribución espacial del xilema y el floema dentro de cada haz vascular (Scarpella, 2004). Los haces vasculares se conforman por el xilema, el floema y el tejido meristemático, el cual está formado a su vez por células madre: el procambium y el cambium vascular, a partir de los cuales se diferencian continuamente para generar el sistema vascular e interconectar todos los tejidos de la planta, haciendo posible el crecimiento continuo. El procambium, es el meristemo primario que da lugar tanto al tejido vascular primario como al cambium vascular y está localizado en los meristemos apicales de raíz y tallo. El cambium vascular es el meristemo lateral que da lugar al xilema y al floema secundario en el tallo y la raíz (Fukuda, 2004) .

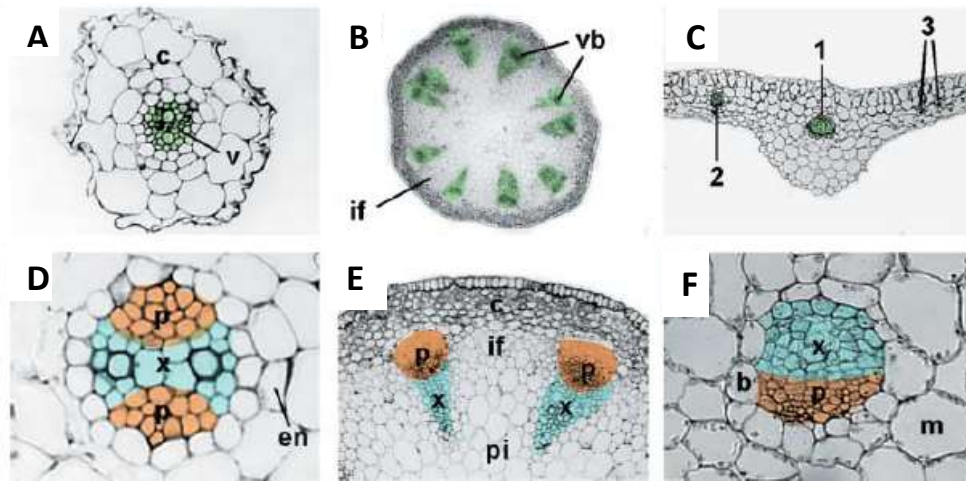


Figura 2. Patrón longitudinal y radial del sistema vascular en *Arabidopsis thaliana*. Patrón logitudinal: (A) raíz, (B) tallo, (C) hoja. Patrón radial: (D) raíz, (E) tallo, (F) hoja. (x) xilema, (p) floema, (en) endodermis, (c) cambium vascular, (m) mesófilo. Tomado de Scarpella, 2004.

1.2.1 Estructura y función primaria del floema.

Como se mencionó anteriormente, el floema está conformado de dos tipos celulares principalmente, los primeros estudios que se reportaron acerca de estas células datan del siglo XIX. Hartig en 1837 acuñó el término de “elementos cribosos” y en 1880 Wilhelm el de “células acompañantes”. El término “floema” fue acuñado por Nägeli en 1858, definido como el tejido que incluye los tubos cribosos, las células acompañantes, el parénquima y las fibras (Esau, 1939).

En su madurez, los canales que interconectan a las células vegetales se convierten en elementos cribosos vecinos, dando como resultado a una estructura de baja resistencia o placas cribosas. El conjunto de elementos cribosos a su vez forma una red de vasos a través de los cuales, los productos fotosintéticos son transportados desde las hojas maduras, hacia el reto de la planta. Los elementos cribosos se caracterizan por carecer de núcleo y ribosomas, aunque conservan algunos organelos como las mitocondrias y además su membrana plasmática permanece funcional (Turgeon & Wolf, 2009). En algunos estudios recientes, se ha reportado que los elementos cribosos se diferencian mediante un proceso denominado enucleación, durante el cual el contenido nuclear es liberado y degradado en el citoplasma, dicho mecanismo es

molecularmente coordinado por dos factores de transcripción que contienen el dominio NAC y que son genéticamente redundantes (NAC45 y NAC86) (Furuta et al., 2014). Por el contrario, las células acompañantes se caracterizan por ser células que mantienen su actividad metabólica. Los elementos cribosos se encuentran interconectados con las células acompañantes mediante plasmodesmos especializados con un considerable límite de exclusión. Se ha reportado que la proteína verde fluorescente (GFP) de aproximadamente 24 kDa, puede transportarse a través de plasmodesmos entre estos dos tipos celulares (Turgeon & Wolf, 2009). Sin embargo, en determinadas condiciones los plasmodesmos pueden dilatarse para permitir el paso de moléculas mayores ya sea mediante difusión o por reconocimiento con proteínas específicas (Lucas & Lee, 2004; Chen et al., 2013).

Actualmente, se conoce que el floema es el conducto a través del cual se transportan los nutrientes esenciales para las plantas y además, se transportan macromoléculas involucradas en una serie de procesos de respuesta a estrés, estímulos ambientales y a los propios procesos de desarrollo. Asimismo, se ha confirmado que los virus son capaces de transportarse a través de los plasmodesmos y también, se han reportado otro tipo de patógenos que tienen la capacidad de transportarse mediante estos conductos (Ruiz-Medrano et al., 2001).

1.3 Transporte de macromoléculas en plantas vasculares

A lo largo de la evolución, las plantas vasculares han desarrollado una compleja red de comunicación que se clasifica en dos tipos: la primera se lleva a cabo a corta distancia entre células adyacentes y la segunda se da a larga distancia a través del sistema vascular (Atabekov & Taliansky, 1990). La identificación de virus de RNA que se transportan a larga distancia a través del sistema vascular, es uno de los primeros estudios que confirmó el transporte de macromoléculas en plantas. Por ejemplo, se ha reportado que el virus del mosaico del tabaco (TMV) se transporta de célula a célula por medio de una proteína de 30 kDa (Meshi et al., 1987). Este descubrimiento, dio pie a la investigación para identificar factores del virus que infectan a las plantas que son necesarios para su transporte dentro de estas, a dichos factores se les asignó el nombre de “proteínas de movimiento” o “PMs” (Hull, 1989).

Aunado a esto, se demostró que existen proteínas endógenas que promueven su propio transporte célula a célula, tal como la proteína KNOTTED1 en maíz, la cual lleva a cabo el transporte de sí misma y a la vez de su propio transcrito (Lucas et al., 1995; Kim et al., 2002).

A este tipo de macromoléculas, se les ha denominado como proteínas que poseen una función no celular autónoma (NCA), debido a que se mueven desde la célula en la cual fueron sintetizadas hasta otra en la cual desempeñan sus funciones (Lucas & Lee, 2004).

El mecanismo de transporte de moléculas que actúan como señales químicas, aún no ha sido bien definido. Pero se han identificado algunas proteínas, virus, viroides y varios tipos de RNAs que forman complejos ribonucleoproteicos para hacer posible su transporte (Xoconostle-Cázares et al., 1999). Continuando con el ejemplo de KNOTTED1, ya ha sido reportado que el transporte de esta proteína se lleva a cabo mediante un complejo de chaperoninas citosólicas que despliegan esta proteína durante su transporte y cuando ésta llega a su célula destino, se vuelve a plegar (Xu et al., 2011).

La importancia de la evolución del transporte intercelular en plantas se ilustra con el hecho que las algas poseen poros alineados en su membrana plasmática que forman canales citoplasmáticos, a través de los cuales se difunden moléculas muy pequeñas; tales reportes sugieren que dichos poros posiblemente fueron los antecesores de lo que ahora conocemos como plasmodesmos en las plantas vasculares (Lucas & Lee, 2004). Asimismo, se ha encontrado que los factores de transcripción Dof cuentan con dominios que determinan su transporte célula a célula e interesantemente, son los mismos dominios que se encuentran en plantas vasculares y en algas (Chen et al., 2013).

1.4 Señalización a larga distancia a través del floema

Los factores que regulan el transporte de moléculas señal a larga distancia a través del floema, aún no han sido completamente elucidados (Ruiz-Medrano et al., 2001). Existen algunos virus que están restringidos específicamente en el floema (luteovirus y geminivirus) (Atabekov & Taliansky, 1990). Sin embargo, sus proteínas estructurales y de replicación del genoma del virus tienen la capacidad de transportarlos a larga distancia (Carrington et al., 1996).

En el floema de Cucurbitáceas se han identificado diferentes proteínas que pueden movilizarse a larga distancia como CmPP16, la cual es capaz de transportar mRNA (Xoconostle-Cázares et al., 1999); CmPSRB1 que une RNAs de bajo peso molecular (Yoo et al., 2004). Actina, involucrada en la formación del citoesqueleto y peroxidasas en respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lough & Lucas, 2006). El papel que desempeñan todas estas moléculas es muy

diverso; algunas están involucradas en inducción floral, silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), resistencia sistémica adquirida ante patógenos, respuesta a sequía, formación del tubérculo y asignación de nutrientes (Ruiz-Medrano et al., 2001).

1.5 Transporte de RNAs a través del floema

Además de las proteínas, diferentes tipos de RNAs también son moléculas que se transportan a través del floema (miRNAs, siRNAs y mRNAs). La principal función de los siRNAs y miRNAs es la regulación de la expresión génica (Palauqui et al., 1997). El primer reporte que se tuvo sobre un mRNA móvil a través del floema, fue el mRNA del transportador de sacarosa-1 (*SUT1*) (Kühn et al., 1997). Una variedad de estudios revela que posiblemente el transporte de transcritos a larga distancia está relacionado con cambios fenotípicos o adquisición de funciones en heteroinjertos (Kim et al., 2001; Lu et al., 2012; Banerjee et al., 2006; Haywood et al., 2005; Notaguchi et al., 2012).

En un reporte reciente, se han identificado 2006 genes que producen RNAs móviles en *Arabidopsis thaliana*. Dicho estudio se llevó a cabo mediante heteroinjertos entre ecotipos diferentes de *A. thaliana*, en donde se encontraron RNAs móviles entre distintos órganos como roseta, raíz, flor y tallo, tanto bajo condiciones normales como en limitación de nutrientes (fósforo y nitrógeno) (Thieme et al., 2015).

Por otra parte, se ha propuesto que las moléculas de mRNA y de virus son capaces de transportarse a través del floema gracias a secuencias conservadas dentro de las regiones 5' UTR y 3' UTR (Ruiz-medrano et al., 2011). Sin embargo, aunque no se han encontrado motivos conservados, en las regiones promotoras de algunos transcritos, se han identificado regiones ricas en repetidos de CT/GA y GT/CA (Ruiz-Medrano et al., 2011).

1.5.1 Transcritos presentes en el floema de cucurbitáceas

Algunos autores sugieren que en el floema de calabaza existen un poco más de 1500 transcritos (Loguh & Lucas, 2006). Sin embargo, no existe una correlación directa entre la cantidad de transcritos identificados en el floema y la capacidad de éstos para transportarse a través de

heteroinjertos. Es por esto que se reporta que existe una cierta selectividad en el transporte de transcritos específicos (Ruiz-Medrano et al., 2001).

Se han identificado que los transcritos de *CmPPI6*, *CmGAIP* y *CmNACPI* se transportan a través de la corriente del floema de calabaza y estos se dirigen hacia zonas meristemáticas, por lo cual, es posible que dichos transcritos estén relacionados con funciones de señalización en la planta (Ruiz-Medrano et al., 1999). En otras investigaciones, se ha analizado que el transcrito de *CmGAIP* está involucrado con el desarrollo de hojas (Haywood et al., 2005) y se ha descubierto que la secuencia de la región 3' UTR está fuertemente asociada al transporte de este transcrito (Huang & Yu, 2009).

1.6 La familia de los genes NAC

La familia de los genes NAC fue definida con base en el dominio altamente conservado que se encuentra en el extremo N-terminal de las proteínas de los genes *NAM* de petunia, *ATAF 1*, *ATAF2* y *CUC2* en *A. thaliana* (Aida et al., 1997). *NAM* y *CUC2* son genes involucrados principalmente en el desarrollo de la planta a nivel de tejido meristemático, en la separación de órganos florales adyacentes y de cotiledones (Souer et al., 1996; Aida et al., 1997). Esta familia de genes es exclusiva de plantas ya que no se ha reportado su presencia en otros organismos eucariotes. En *A. thaliana* se han reportado un poco más de 100 genes NAC. (Olsen et al., 2005). Los genes NAC codifican para diversos factores de transcripción, los cuales están involucrados en diferentes procesos como daño mecánico, respuesta a sequía, daño al DNA, transición de la división a la expansión celular, formación de raíces laterales, inducción floral, formación de vasos del xilema, respuesta a estrés biótico y abiótico, y senescencia, entre mucho otros (Ren et al., 2000; Collinge & Boller, 2001; Xie et al., 1999; Hegedus et al., 2003; Sablowski & Meyerowitz, 1998; Xie et al., 2000; Yamaguchi et al., 2010).

Existen algunos genes NAC que son funcionalmente redundantes, por ejemplo, *CUC3* actúa de manera cooperativa con *CUC1* y *CUC2* en la formación del cotiledón y el meristemo apical (Vroemen et al., 2003). Por otro lado, los genes *VND* que representan un sub-grupo de genes NAC, están involucrados en la formación de los vasos del xilema y también presentan redundancia funcional, puesto que el patrón de expresión de estos genes (*VND1-VND7*), en el tejido vascular, es similiar (Kubo et al., 2005). Aunado a esto, algunos genes *VND*,

específicamente VND7 pueden formar heterodímeros con otras proteínas VND (Yamaguchi et al., 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 Patrón de distribución del transcrito y la proteína de *CmNACPI*

Ya ha sido reportado que el transcrito de *CmNACPI* se localiza en los elementos cribosos (ECs) del floema, mientras que la proteína únicamente se encuentra en las células acompañantes (CAs). Esto quiere decir que en este caso, la molécula señal que se transporta es el transcrito, mas no la proteína (Figura 3). Por otro lado, mediante heteroinjertos entre calabaza y pepino se demostró que efectivamente, el transcrito de *CmNACPI* tiene la capacidad de moverse a larga distancia a través del floema. Asimismo, se observó que el destino final de este transcrito fue en meristemo apical, axilar y zonas de órganos florales en desarrollo y que la proteína tiene una distribución diferente al mRNA, encontrándose únicamente en el meristemo apical (Ruiz-Medrano et al., 1999).

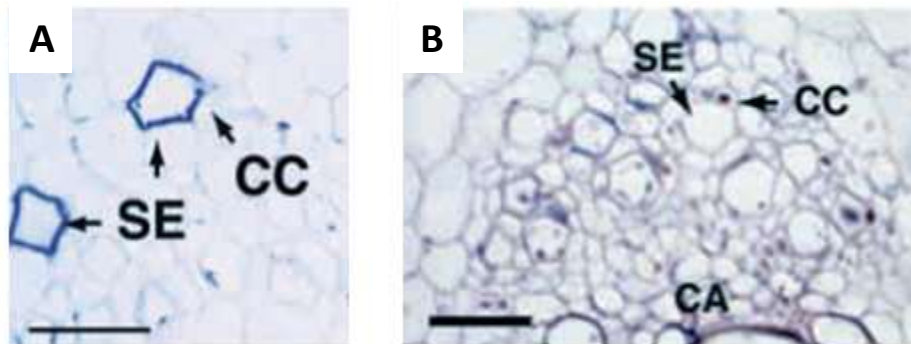


Figura 3. Patrón de distribución del mRNA y la proteína de *CmNACPI*

(A) Hibridación in situ que demuestra que el transcrito se encuentra en los ECs. (B) Immunolocalización que detectó a la proteína en CAs. Tomado de (Ruiz-Medrano et al., 1999).

2.2 *ANAC046* y *ANAC087* como genes homólogos de *CmNACPI*

Fuentes-Ramírez (2013), llevó a cabo un análisis bioinformático con las secuencias de proteínas NAC en *A. thaliana*. Para ello, se usó el dominio conservado en el extremo N-terminal de la familia NAC. Se observó que *CmNACPI* se agrupa directamente con dos proteínas con número

de acceso At3g04060 y At5g18270, denominadas ANAC046 y ANAC087, respectivamente. Es por esto que en el presente trabajo, analizamos a *ANAC046/087* como genes homólogos de *CmNACPI* (Figura 4).

Por otro lado, se han reportado algunas posibles funciones de los genes *ANAC046/087*. Se ha identificado que varios factores de transcripción, como *ANAC046*, *ANAC087* y *ANAC100* son capaces de unirse a los promotores de genes involucrados en la ruta de degradación de la clorofila. Líneas transgénicas sobreexpresoras de *ANAC046* mostraron una senescencia temprana y un bajo contenido de clorofila. Asimismo, mediante microarreglos se demostró que tanto los genes involucrados en la degradación de clorofila y los genes asociados a senescencia son regulados positivamente por *ANAC046* (Oda-Yamamizo et al., 2016).

En otro estudio, ha sido reportado que *ANAC046* se une a RCD1 (Radical Induced Cell Death 1), el cual funciona como un reclutador celular que es capaz de interactuar con una variedad de factores de transcripción implicados en el desarrollo (O'Shea et al., 2015).

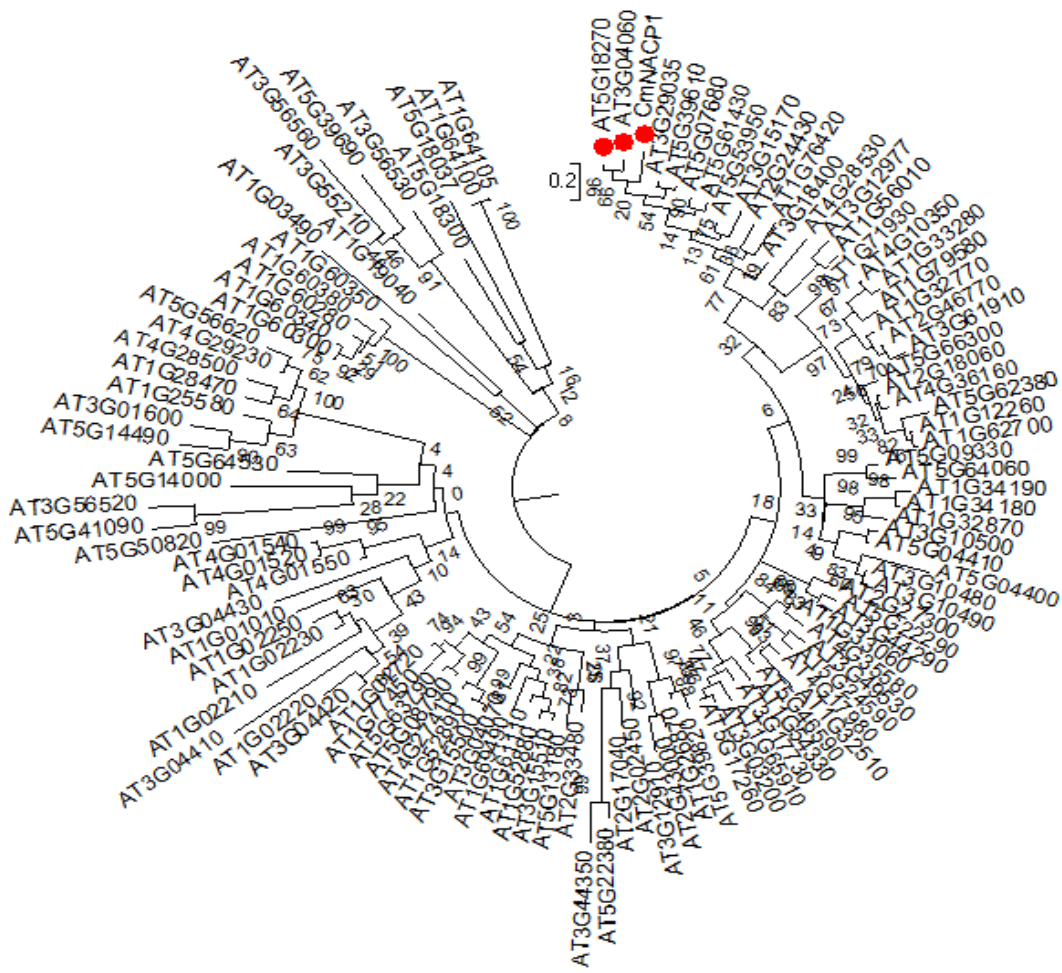


Figura 4. Análisis filogenético de la familia de genes NAC en *A. thaliana*.

Los círculos rojos representan las proteínas que se agrupan con *CmNACPI*. El árbol filogenético se llevó a cabo mediante el método de máxima verosimilitud con un bootstrap de 1000 y con el modelo de sustitución de aminoácidos de Jones-Taylor-Thornton (JTT).

Tomado de Fuentes-Ramírez et al., 2013.

3. JUSTIFICACIÓN

En este trabajo, se ha recurrido a *Arabidopsis thaliana* como una planta modelo que posee los recursos genéticos suficientes para llevar a cabo el análisis de los genes *ANAC046/087*. Esto nos permitirá dilucidar la posible función del transporte de *CmNACPI* a larga distancia, y a la vez conocer cuál es que papel que desempeñan estos factores de transcripción en el desarrollo de *A. thaliana*.

4. HIPÓTESIS

Los genes homólogos de *CmNACPI* (*ANAC046/087*) desarrollan un papel en la función o desarrollo del tejido vascular de *Arabidopsis thaliana*.

5. OBJETIVO GENERAL

- Conocer la función de los genes *ANAC046/087* en *Arabidopsis thaliana*.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudio del patrón de expresión de los genes *ANAC046/087* en *A. thaliana*
- Conocer el fenotipo asociado a la sobreexpresión y el silenciamiento de los genes *ANAC046/087*
- Identificar la localización celular de las proteínas de los genes *ANAC046/087* en *A. thaliana* y *Nicotiana benthamiana*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el análisis de los genes homólogos de *CmNACPI* (*ANAC046/087*), se desarrollaron tres construcciones genéticas para cada uno de los genes (Figura 5) con regiones diferentes que de ahora en adelante se denotan de la siguiente manera:

- La región codificante o marco de lectura abierto (**ORF**) por sus siglas en inglés
- La región 5' UTR junto con la región 3000 pb corriente arriba del ORF (**PROM**)
- La región para silenciamiento génico post-transcripcional (**PTGS**)

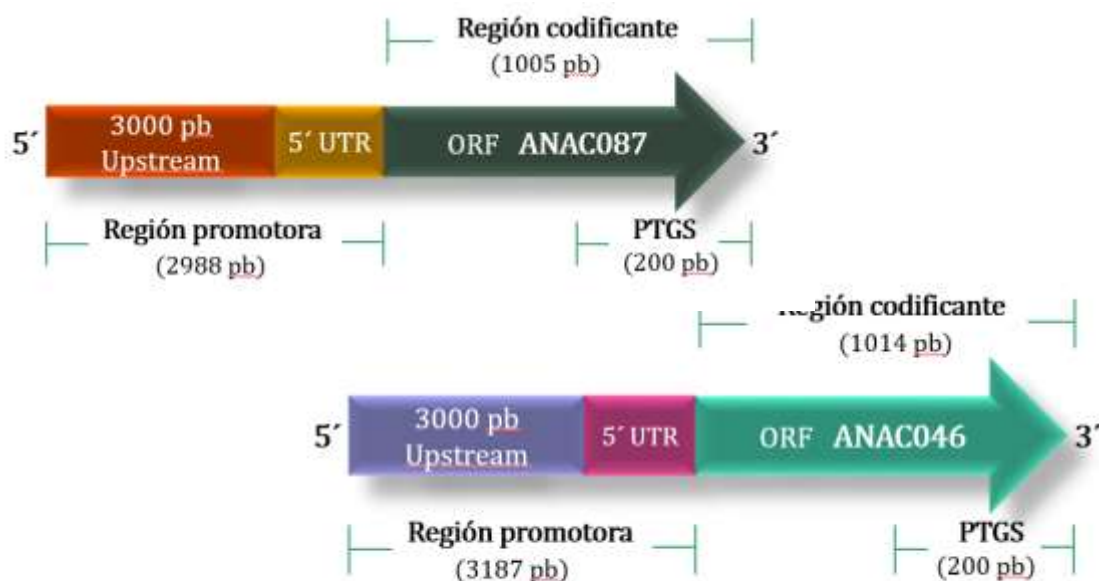


Figura 5. Representación de las regiones por analizar de los genes ANAC046/087

Asimismo, en el siguiente esquema se muestra un panorama general de las actividades que se llevaron a cabo para analizar los genes *ANAC046/087*.

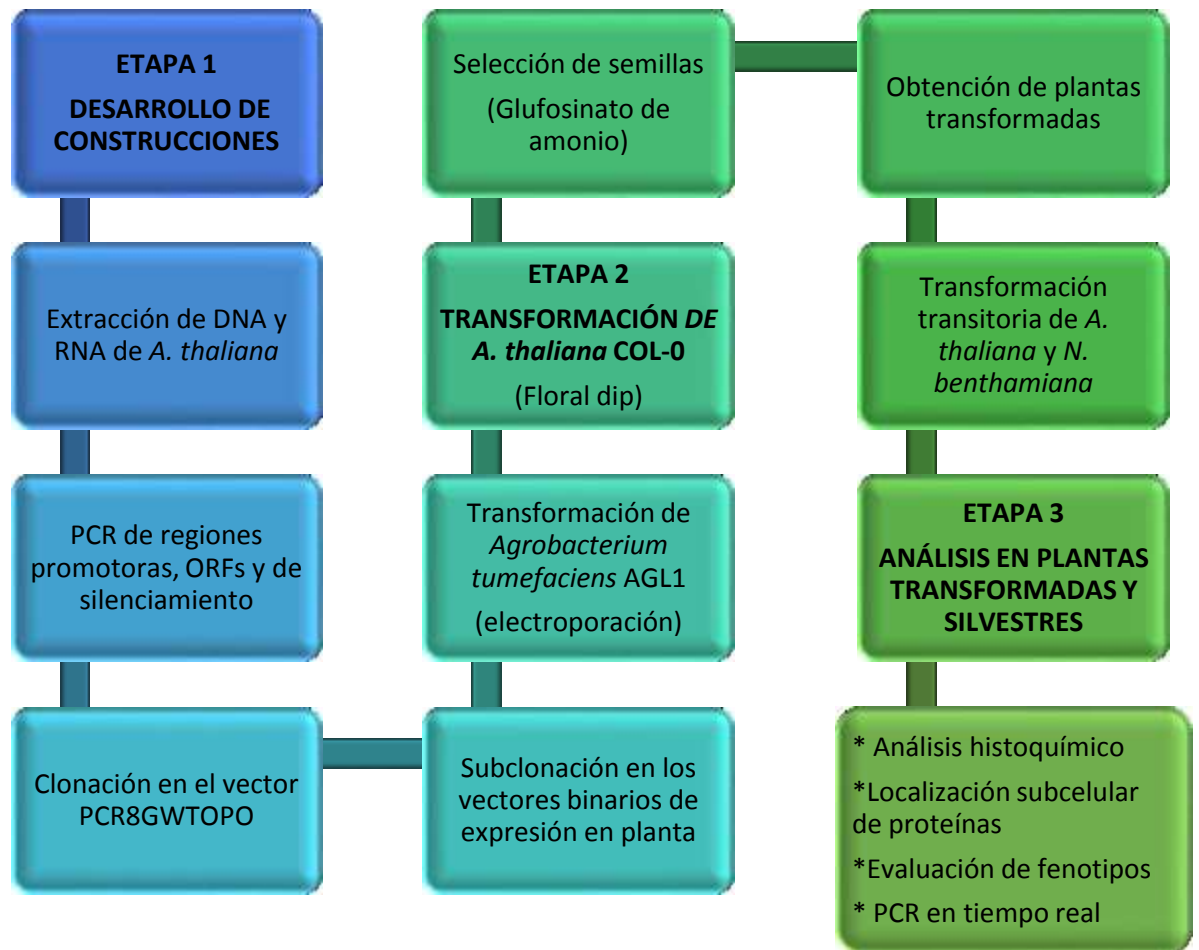


Figura 6. Estrategia experimental para el análisis de ANAC046/087

7.1 Desarrollo de las construcciones de promotores, ORFs y silenciamiento de ANAC046/087

7.1.1 Crecimiento de plantas de *A. thaliana*

Las plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 fueron crecidas en un sistema hidropónico que fue desarrollado de acuerdo a lo reportado por (Conn et al., 2013). Primero, se hicieron orificios con una aguja de disección a las tapas de tubos Eppendorf ámbar y se colocaron unas gotas de medio de germinación (GM) con agar, una vez gelificado; las tapas se colocaron sobre una base de unicel con orificios exactos para el diámetro de las tapas. Posteriormente, la base fue colocada en un recipiente con GM líquido y se procedió a sembrar de 3 a 4 semillas de *A. thaliana* en

cada uno de los orificios, se selló el recipiente con película de plástico y se dejó en oscuridad a 4°C durante tres días para sincronizar las semillas. Después de este período, se colocó el recipiente en una cámara de crecimiento a 22°C con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad durante diez días para iniciar la germinación. Se hizo un cambio gradual durante tres días del medio GM por medio basal (BNS); una vez hecho el cambio total, se esperó siete días para realizar algunas punciones sobre el film plástico y se dejó el recipiente tres días más para equilibrar las plantas. Finalmente, se removió el plástico y después de tres a cinco días cuando las plantas presentaron raíces largas se realizó un cambio a tubos Falcon que contenían orificios para las tapas con las plantas y cuyo recipiente contenía medio BNS fresco y aeración continua.

7.1.2 Extracción de DNA genómico y RNA total de plantas

Las extracciones de DNA genómico (DNAg) y RNA se realizaron a partir de plantas de *A. thaliana* silvestres de aproximadamente ocho semanas crecidas en hidroponía. Para ello se recolectó tejido de rosetas maduras para la extracción de DNAg y de raíz para el caso de RNA en condiciones de esterilidad en tubos eppendorf de 2 ml. Los tejidos fueron congelados con nitrógeno líquido y se colocó un balón estéril en cada muestra para iniciar la pulverización en el equipo TissueLyser LT de QIAGEN durante 1 min a 50 Hz; la trituración se repitió dos veces más intercalando la congelación del tejido nuevamente. La extracción de DNAg se llevó a cabo mediante el método de CTAB (Weigel & Glazebrook, 2002), mientras que la de RNA se realizó con el kit comercial Direct-zol™ RNA Miniprep de Zymo Research, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Se midieron las respectivas concentraciones por espectrofotometría (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific). La integridad del DNA se comprobó por medio de electroforesis en agarosa al 1% y para el RNA se realizó en agarosa al 1.4% en condiciones desnaturizantes con formaldehído 2.2 M y solución amortiguadora 1X (10X=MOPS 0.2 M, acetato de sodio 0.05 M, EDTA 0.5 M pH 8) a temperatura ambiente y en oscuridad (Sambrook et al., 2001). Por último, los ácidos nucleicos se visualizaron en un fotodocumentador (BioDocAnalyze, Biometra) con luz ultravioleta (312 nm).

7.1.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de cDNA únicamente se llevó a cabo para el gen ANAC046 a partir del RNA extraído de raíz, debido a que es uno de los tejidos en los que hay mayor expresión de dicho gen de acuerdo con la base de datos de AtGenExpress (TAIR) y de cuyo gen no se contaba con su construcción de sobreexpresión en el anterior proyecto. La síntesis se realizó con el sistema comercial ThermoScript™ RT-PCR (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor. En la mezcla de reacción se utilizaron 500 ng de RNA y los oligonucleótidos dTGAGA y SMAGGG (10 µM) como adaptadores y una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) a una concentración de 10 mM y por último agua destilada estéril hasta un volumen final de 13 µL. La mezcla de reacción se incubó a 72°C durante 10 min y se mantuvo en hielo 5 min; posteriormente se comenzó la síntesis de la primera cadena del cDNA para lo cual se adicionaron 4 µl de solución amortiguadora 5X, 1 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de inhibidor de RNasas (RNasa out) y 1 µl de enzima SuperScript™ III RT (200 U/µl). La mezcla se homogenizó suavemente, se incubó a 50°C durante 1 h y finalmente se inactivó la reacción mediante una incubación a 75°C por 15 min.

7.1.4 Amplificación del ORF de ANAC046

A partir del cDNA sintetizado, se hizo una PCR para amplificar el ORF de ANAC046 al cual de ahora en adelante se le denominará ANAC046 ORF cDNA (1014 pb); asimismo también se llevó a cabo la amplificación del ORF a partir de DNAg, denominado como ANAC046 ORFg (1325 pb). Cada mezcla de reacción se llevó a cabo con 1.25 µl de solución amortiguadora (10X) ExTaq de Takara Bio Inc., 2 µl de una mezcla de dNTPs (2.5 mM), 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos específicos directo y reverso para amplificar el ORF, 1 µl de cada molde (cDNA sintetizado y DNAg), 0.05 µl de enzima TakaRa Ex Taq DNA Polimerasa (5 U/µL) y 6.2 µl de agua MILLI-Q estéril para completar un volumen final de 12.5 µl. Las reacciones se incubaron en un termociclador Biometra (el programa de amplificación se muestra en anexos) y se evaluó un gradiente de temperatura para estandarizar las condiciones de PCR. Por último, los productos fueron cargados en geles de agarosa al 1% conteniendo 1 µl de bromuro de etidio por cada 100 ml de agarosa; la electroforesis se llevó a cabo en una cámara con solución amortiguadora TBE (Tris 45 mM; ácido bórico 4 mM; EDTA 1 mM, pH 8) a 100 V (Sambrook

et al., 2001). Los geles fueron visualizados bajo luz UV en el fotodocumentador antes mencionado.

7.1.5 Clonación de fragmentos de interés

7.1.5.1 Purificación de los productos de PCR de *ANAC046*

Se cortaron las bandas de agarosa correspondientes a cada uno de los fragmentos de interés y se purificaron con el sistema Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research). Las bandas de agarosa se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml y se adicionaron tres volúmenes de buffer para solubilizar (ADB) por un volumen de agarosa, se incubó a 55°C durante 10 min y se mantuvo en agitación hasta que la agarosa quedara totalmente disuelta. La solución (aproximadamente 750 µl) se colocó sobre una columna Zymo Clean y un tubo colector, se centrifugó durante 30 seg a 13,000 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante; este paso se repitió hasta terminar el volumen total de agarosa disuelta. Se adicionaron 200 µl de un buffer con etanol (DNA Wash Buffer) a cada columna y se centrifugó nuevamente por 30 seg, el sobrenadante fue descartado y este paso de lavado se repitió una vez más. Las columnas fueron colocadas en nuevos tubos colectores y se centrifugó durante 1 min para eliminar el exceso de etanol. Finalmente, en tubos Eppendorf de 1.5 ml se colocaron las columnas para eluir el producto con 25 µl de agua Milli-Q estéril y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min para que el agua impregnara toda la membrana. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 min y se almacenó el DNA eluido a -20°C hasta ser utilizado.

7.1.5.2 Clonación de fragmentos de interés en el vector pCR8/GW/TOPO

Los productos de PCR purificados (*ANAC046* ORF cDNA y *ANAC046* ORFg) se ligaron a un vector de entrada con el kit pCR8GWTOPO® TA Cloning (Invitrogen). La mezcla de reacción contenía 2 µl del producto de PCR, 1 µl de solución salina, 0.5 µl de vector pCR8GWTOPO y 2.5 µl de agua Milli-Q estéril para alcanzar un volumen final de 6 µl. Se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó a 22°C toda la noche.

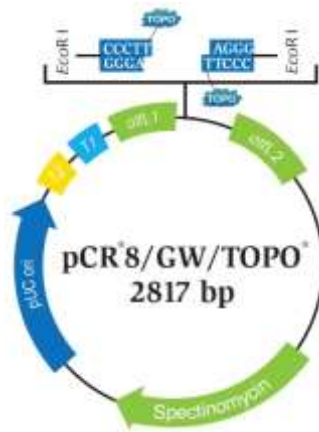


Figura 7. Mapa del vector de entrada PCR8GWTOPO

Los sitios attL1 y attL2 serán intercambiados en la recombinación homóloga por los sitios attR1 y attR2 de los vectores binarios.

7.1.5.3 Transformación de células competentes por choque térmico

Se utilizaron dos viales con células de *E. coli* comerciales quimiocompetentes (One Shot® Mach1™, Invitrogen), en cada uno se colocaron 6 µl de la ligación en pCR8GWTOPO y se incubaron en hielo durante 20 min, después de este tiempo se llevó a cabo un choque térmico a 42°C por 52 seg. Los tubos se incubaron inmediatamente en hielo durante 5 min. Posteriormente, a cada tubo se agregaron 250 µl de medio S.O.C (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y fueron incubados a 37°C a 150 rpm de agitación durante 2 h. La suspensión de células fue espatulada uniformemente (30 a 50 µl) sobre placas de LB solido con espectinomicina (100 mg/ml), las cajas fueron selladas e incubadas a 37 °C durante 1 día para su posterior selección de aquellas clonas con plásmidos recombinantes (Sambrook et al., 2001).

7.5.1.4 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Se seleccionaron algunas colonias posiblemente positivas y se crecieron en medio LB (3 ml) con espectinomicina durante 16 h a 37°C y a 150 rpm. Las células fueron compactadas por centrifugación a 13,000 rpm durante 2 min a 4°C. Una vez obtenidas las respectivas pastillas se adicionaron 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) para resuspender hasta homogenizar. Se agregaron 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N y SDS

1% preparada en el instante de utilizar) para llevar a cabo una lisis alcalina, se agitó suavemente por inversión y se incubaron en hielo durante 15 min. Posteriormente, se colocaron 150 μ l de solución III, se agitó nuevamente y se incubó en hielo por 5 min. Las mezclas se llevaron a centrifugación a 13,000 rpm a 4°C durante 15 min a 4°C, el sobrenadante fue recuperado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml evitando pasar restos celulares. Se realizó una fenolización agregando 450 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) en la campana de extracción, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa fue recuperada en un nuevo tubo y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA, se mezcló y se dejó incubando a -20°C durante 60 min. Para recuperar el DNA precipitado, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante fue decantado y las pastillas fueron lavadas dos veces con etanol al 70% agregando 400 μ l en cada lavado y agitando suavemente, se centrifugó a las mismas condiciones por 15 min. Se quitó el exceso de etanol cuidadosamente y las pastillas se secaron en un termoblock a 50°C. El DNA fue resuspendido en 30 μ l de agua Milli-Q estéril con RNasa A (10 mg/ml; 1 μ l por cada plásmido) y se incubó a 37°C durante 20 min (Sambrook et al., 2001). Se midieron las concentraciones de cada uno de los plásmidos mediante espectrofotometría en un NanoDrop™ 2000. También, se realizó electroforesis de todos los DNA plasmídicos en agarosa 1% para observar su integridad.

7.5.1.5 Análisis de restricción de clonas candidatas

Una vez extraídos los DNA plasmídicos, se procedió a realizar tres análisis de restricción mediante enzimas de digestión para los siguientes fines: 1) para comprobar que los insertos de interés (ANAC046 ORFg y ANAC046 ORFcDNA) efectivamente se encontraban en los plásmidos recombinantes extraídos, 2) esta digestión se llevó a cabo para conocer cuáles de las clonas candidatas contenían el inserto en la orientación correcta (5' \rightarrow 3') para poder realizar una recombinación en el vector binario y 3) una vez elegidas las clonas con orientación positiva, se llevó a cabo una digestión para linealizar el plásmido y así recombinar en el vector binario de expresión en plantas. Cabe mencionar, que la digestión número 2 y 3 también se llevó a cabo para las construcciones (ANAC087 PROM, ANAC087 siRNA, ANAC046 PROM y ANAC046 siRNA) las cuales en el trabajo anterior ya se encontraban clonadas en el vector pCR8GWTOPO. La construcción de ANAC087 ORFg se continuó hasta la etapa de transformación en *A. tumefaciens* puesto que el fragmento ya se encontraba clonado hasta el

vector binario. Además, los análisis de restricción también se llevaron a cabo *in silico* con ayuda del software SnapGene para comparar con los patrones de restricción obtenidos. En la Tabla 1 se muestran las mezclas de reacción que se llevaron a cabo para las respectivas digestiones.

Tabla 1. Análisis de restricción para las construcciones en estudio. Digestiones realizadas para determinar el inserto, orientación positiva y linealización de los genes *ANAC046/087*

Construcción	Digestión	Buffer NEB (μl)	H₂O (μl)	BSA 100X (μl)	DNAP (μl)	Enzima (μl)
ANAC046 ORFg	Inserto	EcoRI 2	17	---	1	EcoRI 0.1
	Orientación	Buffer 3 1	6.8	0.1	2	EcoRV 0.1
	Linealización	Cut Smart 6	27.4	0.6	25	XbaI 1
ANAC046 ORFcDNA	Inserto	EcoRI 2	17	---	1	EcoRI 0.1
	Orientación	Buffer 3 1	6.8	0.1	2	EcoRV 0.1
	Linealización	Cut Smart 6	27.4	0.6	25	XbaI 1
ANAC046 PROM	Orientación	Buffer 3 1	6.8	0.1	2	EcoRV 0.1
	Linealización	Cut Smart 6	27.4	0.6	25	XbaI 1
ANAC046 siRNA	Linealización	Cut Smart 6	27.4	0.6	25	XbaI 1
ANAC087 ORFcDNA	NO APLICA					
ANAC087 PROM	Orientación	Buffer 3.1 1	6.6	0.1	2	HincII 0.3

	Linealización	Cut Smart 6	27.4	0.6	25	XbaI 1
ANAC087 siRNA	Linealización	Cut Smart 6	27.4	0.6	25	XbaI 1

7.5.1.6 Subclonación en los vectores binarios para transformar en planta

Una vez linealizados los insertos en el vector pCR8GWTOPO, estos productos fueron purificados mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research) y se procedió a realizar la subclonación de los insertos de interés en los respectivos vectores de expresión en planta, por medio del sistema GATEWAY. Los binarios que se utilizaron en este trabajo fueron tres, el primero para generar las construcciones de sobreexpresión (pB7FWG2), el segundo para el análisis de las regiones promotoras (pBGWFS7) y el tercero para el silenciamiento de los genes pB7GW1WG2(II), los cuales se muestran en la Figura 8. Las mezclas para llevar a cabo la recombinación constaron de 2 µl de plásmido lineal, 1 µl del respectivo vector binario, 2.5 µl de agua Milli-Q estéril y 0.5 µl de LR-Clonasa (Invitrogen), se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó toda la noche a 22°C. Posteriormente, con el producto obtenido se llevaron a cabo transformaciones de células de *E. coli* One Shot® Mach1™ comerciales mediante choque térmico. Se sembraron en un medio selectivo con espectinomicina y se seleccionaron algunas clonas para posteriormente extraer DNA plasmídico. La comprobación de la subclonación se realizó por medio de digestiones con EcoRI que tiene sitios de corte en los extremos donde se llevó a cabo la recombinación y por lo tanto permite liberar el inserto clonado.

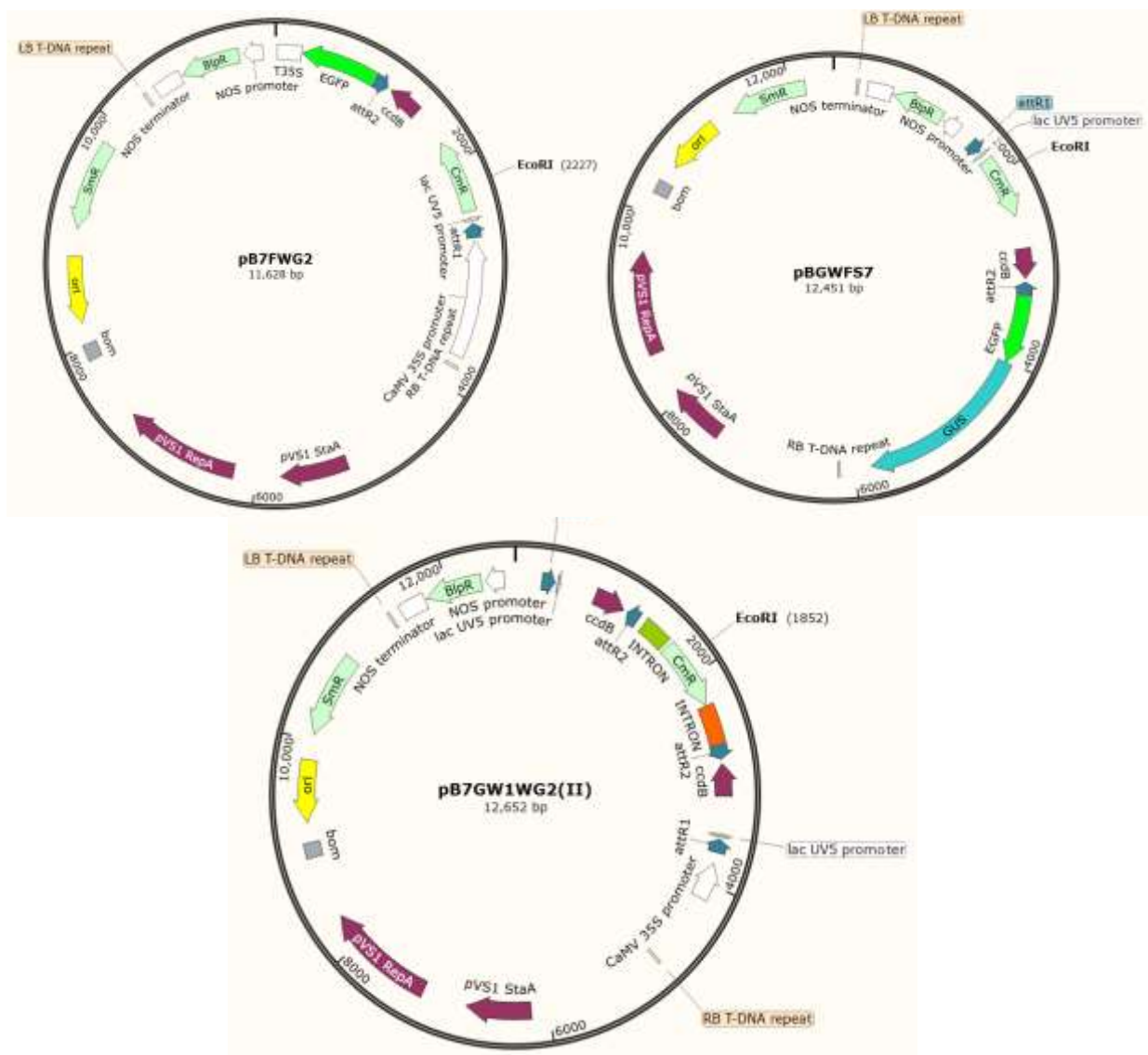


Figura 8. Vectores binarios utilizados para expresión en planta.

Sobreexpresión (pB7FWG2), regiones promotoras (pBGWFS7) y silenciamiento pB7GW1WG2 (II).

7.5.1.7 Transformación por electroporación

A partir de las reacciones de LR-clonasa que contenían los plásmidos recombinantes, se llevó a cabo la transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa AGL1. En el vial de células de *A. tumefaciens* (conservadas a -80°C) se colocaron inmediatamente 6 µl de la reacción LR-clonasa, el volumen completo del vial se adicionó en

una celda de electroporación de 1mm (la cual se colocó en hielo 15 min previos a su uso). La celda se colocó adecuadamente en un electroporador y se aplicó un choque eléctrico de 1800 V, inmediatamente se adicionaron 300 μ l de medio S.O.C (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM), el volumen total se colocó en un tubo Eppendorf estéril y se puso en incubación para la recuperación de las células a 28°C, 150 rpm de agitación durante 3 h. Al cabo de este tiempo, se esparcieron diferentes volúmenes de las células (15, 25 y 50 μ l) sobre cajas Petri con medio LB (composición en gramos por litro de medio: tripotona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; cloruro de sodio, 5g) suplementado con espectinomicina (50 mg/ml), kanamicina (25 mg/ml) y carbenicilina (50 mg/ml); la adición de los últimos dos antibióticos se debe a las resistencias de la cepa AGL1. Las placas se sellaron y se incubaron a 28°C, durante aproximadamente 4-5 días. Una vez obtenidas distintas clonas candidatas, estas se crecieron en medio LB con los antibióticos antes mencionados para extraer DNA plasmídico y finalmente evaluar su transformación mediante PCR punto final con oligonucleótidos específicos para cada construcción bajo las condiciones correspondientes.

7.2 Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana* (Floral dip)

La transformación de plantas se llevó a cabo según el protocolo establecido por (Bernhardt et al., 2012) denominado como floral dip o “inmersión floral”. Este método es posible gracias a la capacidad de *A. tumefaciens* para infectar óvulos en donde se lleva a cabo una transferencia de T-DNA que contiene nuestras construcciones genéticas que se desean analizar. Se crecieron pre-inóculos de cada una de las construcciones en *A. tumefaciens* en medio YEB con los tres antibióticos antes mencionados a las mismas concentraciones durante dos días. Dichos pre-inóculos se colocaron en 250 ml de medio YEB bajo las mismas condiciones y se incubaron a 28°C a 150 rpm durante 2 a 3 días hasta alcanzar una OD₆₀₀=1 a 2 como máximo. Una vez alcanzada esta densidad óptica, el medio fue colocado en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente; este paso se repitió hasta centrifugar el volumen total de medio. El sobrenadante fue decantado y las pastillas fueron resuspendidas suavemente en 30 ml de Buffer de inmersión floral o FD (Sacarosa 5%, Silwet L77 0.02% y 6-N-bencilaminopurina (BAP) 10 mg/l) por sus siglas en inglés. Se centrifugó a las mismas condiciones y se decantó el sobrenadante, posteriormente; las células fueron resuspendidas

nuevamente en 30 ml de FD y finalmente, se colocaron 270 ml más del mismo buffer; el volumen total fue colocado en un vaso de precipitados de 500 ml previamente desinfectado con cloro 10%. Previamente, ya se contaba con plantas de *A. thaliana* crecidas en hidroponia y con un gran número de primordios florales (es importante que los primordios aún no estén abiertos para una eficiente transformación). Las plantas fueron sumergidas en la mezcla de *A. tumefaciens* con el buffer FD durante 40 seg, se transformaron de 4 a 6 plantas por construcción. Posteriormente, las plantas se colocaron en su base de hidroponia y se cubrieron cuidadosamente con bolsas de plástico para mantener la humedad, se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante dos días y con una bomba para pecera para mantener la oxigenación. Transcurrido este tiempo, se quitaron las bolsas de plástico y se sustituyeron por bolsas de celofán cubriendo los alrededores de la planta; a dicha bolsas se les hicieron pequeñas punciones para evitar que el vapor del agua se almacenara en estas. Asimismo, en la base de hidroponia se colocó nuevo medio BNS (este medio se cambia cada cinco días) y finalmente las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento a las mismas condiciones a las cuales fueron crecidas, esperando así la producción de semillas para su posterior cosecha, es decir la obtención de la primera generación (F1) como se muestra en la Figura 9.

7.2.1 Selección de líneas transgénicas

Una vez recolectadas las semillas (F1) de plantas que fueron transformadas por floral dip, se procedió a crecer gran cantidad de estas semillas de cada una de las construcciones sobre pellets de turba y se incubaron en una cámara de crecimiento (22°C, fotoperiodo 16:8, humedad 35-50%). Después de que germinaron las semillas (estado de cotiledón), se realizó una aspersión uniforme del herbicida glufosinato de amonio (1:3000); esta aspersión se repitió por dos veces más una cada ocho días; los pellets fueron cubiertos con un domo de plástico. Cuando las aspersiones fueron concluidas, se observaron y se seleccionaron aquellas plantas que habían resistido al glufosinato de amonio, dicha resistencia está dada por el gen *bar* que se encuentra en todos los vectores binarios utilizados.

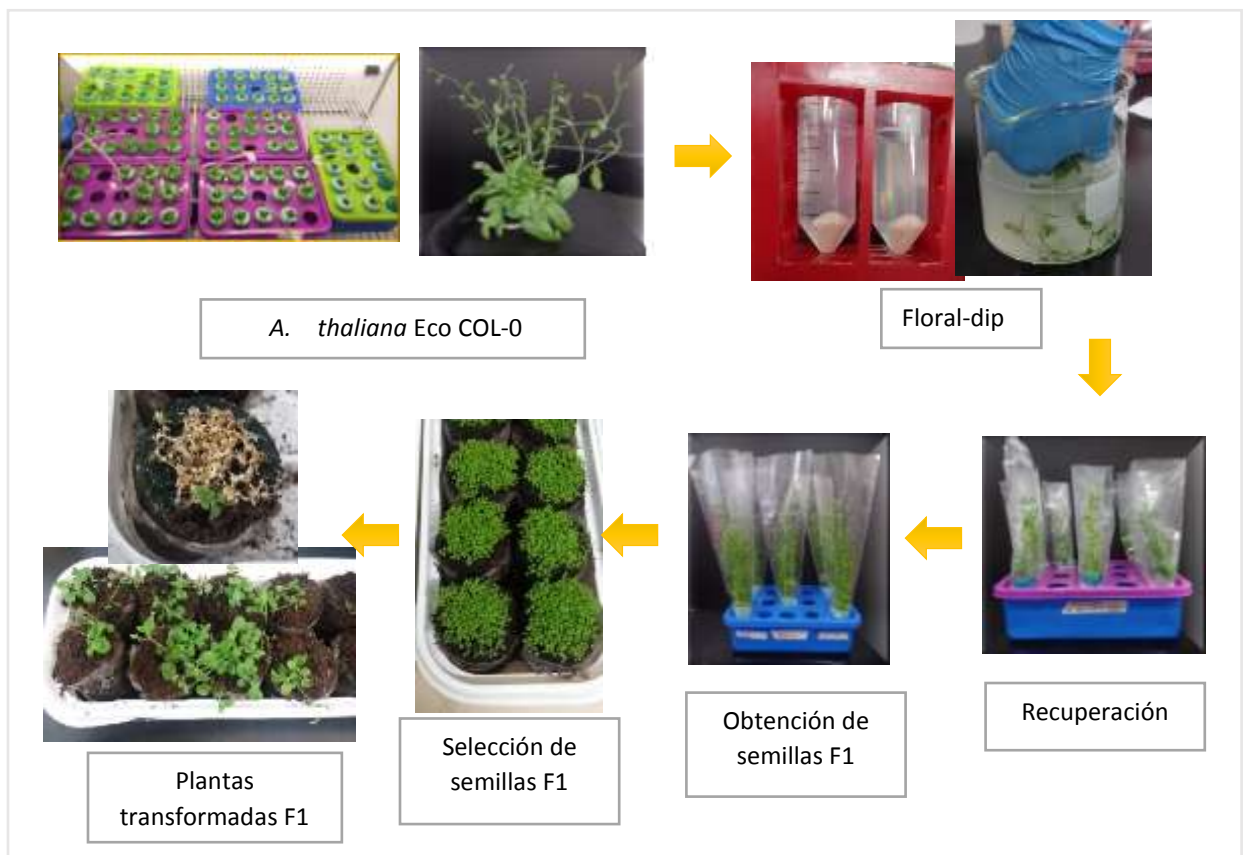


Figura 9. Esquema representativo de la obtención de plantas transformadas.

Muestra la metodología utilizada desde el crecimiento de *A. thaliana* en hidroponía, hasta la selección y obtención de plantas F1.

7.2.2 PCR punto final para detección de Bar y fusiones a GFP

Una vez que las plantas resistentes a herbicida presentaron hojas verdaderas, se llevó a cabo una toma de muestra en condiciones de esterilidad para extraer DNA genómico por el método de CTAB (Weigel & Glazebrook, 2002). Este DNA fue utilizado para amplificar diferentes regiones que comprueban la transformación de las plantas. Para el caso de sobreexpresión de ambos genes se amplificó el gen reportero de GFP (740 pb aproximadamente) así como los marcos de lectura abiertos fusionados a GFP (ORF::GFP); cuyos pesos varían de acuerdo al gen y si proviene de DNA genómico o de cDNA), para las regiones promotoras se amplificó el gen GUS (1800 pb aproximadamente) y por último para el silenciamiento se amplificó el gen Bar (120 pb). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en agarosa 1%.

7.3 Transformación transitoria de plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*

La transformación transitoria fue desarrollada de acuerdo con el protocolo de Ken (2007). Las cepas de *A. tumefaciens* que contenían las construcciones sobreexpresoras y de promotores de ANAC046/087 fueron inoculadas en 50 ml de medio LB con espectinomicina (50 mg/ml), kanamicina (25 mg/ml) y carbenicilina (50 mg/ml) y se incubaron a 28°C, 150 rpm durante dos días. Una vez transcurrido este tiempo, el pre-inóculo se colocó en 500 ml de medio LB bajo las mismas condiciones de antibióticos y de incubación durante un día aproximadamente hasta que la densidad óptica (OD₆₀₀) se establezca entre 0.5 a 0.9. El inóculo fue centrifugado en tubos Falcon a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 15 min, hasta terminar el volumen total del inóculo. Las pastillas formadas se resuspendieron en 50 ml de Buffer de Agro Infiltración (MES 2 g, MgCl₂ 6H₂O 0.41 g, acetosiringona 300 µl (100 mM), agua destilada 200 ml, pH 5.6), posteriormente; se adicionaron 450 ml más del mismo buffer y se mantuvo en incubación durante 3 h a temperatura ambiente. Previamente, ya se contaba con plantas de *A. thaliana* de aproximadamente un mes y plantas de *N. benthamiana* de 5-6 semanas de crecimiento. La transformación se llevó a cabo mediante vacío en un desecador, el cual en su interior contenía un recipiente con la mezcla del Buffer y el inóculo; las plantas se colocaron hacia abajo a manera de que estuvieran en contacto con el medio y se fijaron a una placa de unicel para evitar su caída. Finalmente, se colocó la tapa del desecador y se aplicó vacío durante 4-6 min hasta que todas las hojas fueran agro infiltradas. Las plantas se colocaron en una charola y se mantuvieron en la misma cámara de crecimiento durante 5-7 días, después de este tiempo; las plantas se observaron bajo una lámpara de luz ultravioleta (UVL-23RW Compact UV, 355 nm) y se seleccionaron aquellas hojas en las que se observaba una fluorescencia que indicaba la presencia de las proteínas y los promotores fusionados a GFP.

7.4 Análisis en plantas transformadas y silvestres

Una vez que se contaba con plantas transformadas de manera transitoria y estable, se procedió a realizar diferentes análisis. Una vez obtenidas y seleccionadas las plantas transformadas de manera estable se realizaron observaciones en la etapa madura para determinar si debido a la sobreexpresión o silenciamiento de alguno de los genes de interés (*ANAC046/087*) se presentaba algún fenotipo que describiera parte de la función de dichos genes.

7.4.1 Cuantificación del mRNA de ANAC046/087 por medio de qRT-PCR en tiempo real

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de cuantificar los niveles de expresión endógena de los genes *ANAC046/087* en plantas silvestres de *A. thaliana*. Las plantas fueron crecidas en hidroponia como se describió anteriormente en el apartado 7.1.1. El diseño experimental para realizar la qRT-PCR constó en realizar una mezcla de tres réplicas biológicas de cada uno de los tejidos que componen las plantas (raíz, hoja de roseta, hoja caulinar, tallo, silicua, flor y ápice). Una vez realizado esto, se procedió a extraer RNA con el kit Direct-Zol™ RNA Miniprep (Zymo Research) y se visualizó su integridad en un gel desnaturalizante para RNA. Después, todos los RNAs fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

7.4.1.1 qRT-PCR en tiempo real

La cuantificación por tiempo real se llevó a cabo en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todos los RNAs extraídos fueron diluidos hasta una concentración final de 25 ng/μl para posteriormente realizar las mezclas de reacción con el kit KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR, siguiendo las especificaciones del proveedor. A partir de la mezcla de las tres réplicas biológicas, se realizaron cuatro réplicas técnicas para cada uno de los tejidos analizados. En la siguiente Tabla se muestran las mezclas de reacción y el programa utilizado en la corrida de tiempo real. Finalmente, los datos fueron procesados mediante el método $\Delta\Delta CT$ para normalizar los datos de CT obtenidos para los genes *ANAC046/087* en cada tejido con respecto a los CTs para el gen de referencia o endógeno (Ubiquitina 10 de *Arabidopsis*).

Tabla 2. Mezcla de reacción para evaluar un tejido y condiciones para qRT-PCR

Reactivo	ANAC046/087 y UBQ10 (11X, μ l)
Agua libre de nucleasas	35.2
Kapa Sybr Fast qPCR Master Mix (2X)	55
Oligonucleótido 5' (10 μ M)	2.2
Oligonucleótido 3' (10 μ M)	2.2
Rox High	2.2
Kapa RT Mix (50X)	2.2
RNA (25 ng/ μ l)	(1x11)
Volumen final	110

Paso		Temperatura ($^{\circ}$ C)	Duración
Síntesis de cDNA		42	5 min
Inactivación de RT		95	5 min
Condiciones por ciclo	Desnaturalización	95	5 seg
	Alineamiento/Extensión	60	20 seg
(40 ciclos)			

7.4.2 Análisis de fluorescencia por microscopía confocal

Para los análisis de microscopía confocal se tomaron muestras de las plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana*, transformadas de manera transitoria. Se cortaron hojas, peciolo, tallo y ápice (en el caso de *Arabidopsis*), los tejidos fueron mantenidos en agua destilada para posteriormente realizar cortes transversales en un micrótopo (Microm HM 315, Fisher Scientific, Walldorf, Alemania) de 40-50 μ m. Se utilizaron navajas especiales para microscopía de acero inoxidable (Electron Microscopy SciencesTM). Una vez realizados los respectivos cortes, estos se colocaron cuidadosamente en un portaobjetos (76x26 mm) con glicerol 50%, posteriormente; se colocó un cubreobjetos y se selló la periferia con esmalte. La toma de imágenes se llevó a cabo en el Microscopio Confocal Multifotónico TCS-SP5/MO-TANDEM Marca Leica, utilizando objetivos 20X, 40X y 63X. Este microscopio contiene un Laser Tisaph 200M 2X (resolución: 1024 x 1024 pixeles). La longitud de onda de excitación que se utilizó fue de 515 nm/580 nm y de detección de 500-545 nm/600-680 nm para GFP y la auto-fluorescencia de la clorofila

respectivamente. Por último, el procesamiento de las imágenes se realizó mediante el software Leica LAS AF.

7.4.3 Detección histoquímica de la actividad de β -glucuronidasa

Para este análisis se tomaron muestras de diferentes tejidos (hojas de roseta, hojas caulinares, silicua y ápice) de aquellas plantas transgénicas que estaban expresando la construcción de las regiones promotoras de los genes *ANAC046/087*. Para el desarrollo de la detección histoquímica se siguió el protocolo descrito por Weigel & Hazelbrook (2002), cuyo fundamento se basa en el hecho de que el gen reportero *uidA* o *gusA* codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS) la cual se encarga de hidrolizar el sustrato X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico), produciendo un color azul en los tejidos de la planta donde se expresa nuestro promotor de interés. Primero, los tejidos antes mencionados se colocaron en cajas de plástico y se colocó solución GUS (Weigel & Hazelbrook, 2002) hasta cubrirlos totalmente, las cajas se cubrieron con papel aluminio (todo lo anterior se llevó a cabo en oscuridad). Posteriormente, los tejidos se pusieron a infiltrar al vacío durante 1 h, se incubó a 37°C por 2-3 días. Una vez terminada la incubación, se retiró la solución GUS y se agregó una solución de etanol-ácido acético (3:1) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 6-8 h. Posteriormente, la solución fue sustituida por una nueva de metanol-acetona (3:1); cuando se observó decoloración, se realizó un cambio más con la misma solución para eliminar completamente la clorofila. Finalmente, los tejidos se mantuvieron en glicerol 50%, se visualizaron en un estereoscopio Nikon SMZ 745T y se capturaron imágenes con una cámara Nikon Digital Sight DS-U3 utilizando el software NIS-Elements D.

8. RESULTADOS

En los siguientes apartados se presentan los resultados del desarrollo de las construcciones de sobreexpresión, silenciamiento y de promotores para ambos genes, cabe mencionar que el seguimiento no fue el mismo para ambos genes, ya que en el trabajo anterior ya se contaba con el inicio de algunas construcciones, tal como se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 3. Avance de construcciones genéticas con el que se inició este proyecto

Construcción	Tamaño (pb)	pCR8GWTOPO	Vector Binario
ANAC046 ORF cDNA	1014		
ANAC046 ORFg	1325	✓	✓
ANAC046 PROM	3187	✓	
ANAC046 siRNA	200	✓	
ANAC087 ORF cDNA	1005	✓	✓
ANAC087 PROM	2988	✓	
ANAC087 siRNA	200	✓	

Como se mencionó anteriormente, la nomenclatura de las construcciones para facilidad de notación es la siguiente: ORF cDNA (ORF amplificado a partir de DNA complementario), ORFg (ORF amplificado a partir de DNA genómico) PROM (PROMOTOR), siRNA (silenciamiento inducido por RNA).

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos en planta y sus respectivos análisis.

8.1 Construcciones de sobreexpresión de los genes *ANAC046/087*

De acuerdo con la tabla anterior, el desarrollo de la construcción de sobreexpresión para ANAC046 ORF cDNA fue comenzada desde la extracción de RNA, mientras que para ANAC046 ORFg y ANAC087 ORF cDNA se continuó a partir de la verificación de subclonación en el vector binario.

8.1.1 Extracción de RNA de *Arabidopsis thaliana*

Se llevó a cabo la extracción de RNA de raíz para realizar la construcción de ANAC046 ya que es uno de los tejidos en donde se observan niveles de expresión más altos de este gen. A partir del RNA extraído se realizó una retro-transcripción (RT-PCR) a partir del cDNA sintetizado para amplificar el ORF de cDNA (1014 pb).

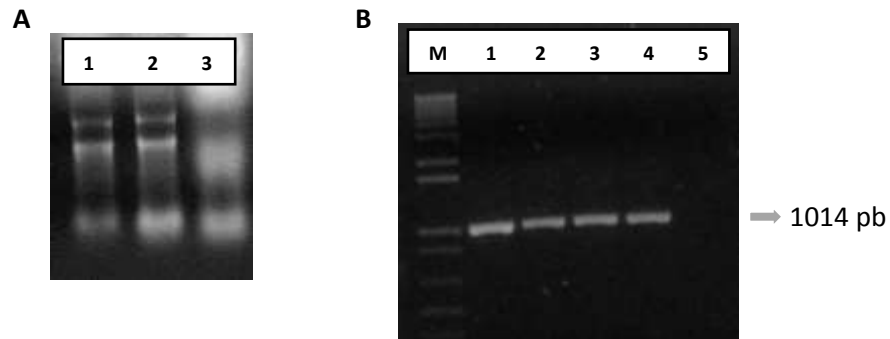


Figura 10. Extracción de RNA y amplificación de ORF de cDNA de ANAC046.

A) RNA extraído de raíz (1 y 2), control positivo de RNA. B) Obtención del amplicón de ANAC046 ORF cDNA (1014 pb) a 60°C en varias reacciones (1 a 4); control negativo de reacción (5).

8.1.2 Clonación del ORF de cDNA de ANAC046 en el vector de entrada

Los amplicones que se obtuvieron anteriormente, fueron purificados y clonados en el vector de entrada pCR8GWTOPO; se obtuvieron varias clonas candidatas y se comprobó la clonación mediante una restricción con la enzima EcoRI, con la cual fue posible liberar el inserto de interés. Posteriormente, se comprobó la orientación correcta del inserto (5'→3') en el vector con la enzima EcoRV que de acuerdo con el análisis *in silico* realizado con la herramienta NEBcutter V2.0, se obtiene un patrón de bandeo característico y que se muestra en la siguiente figura.

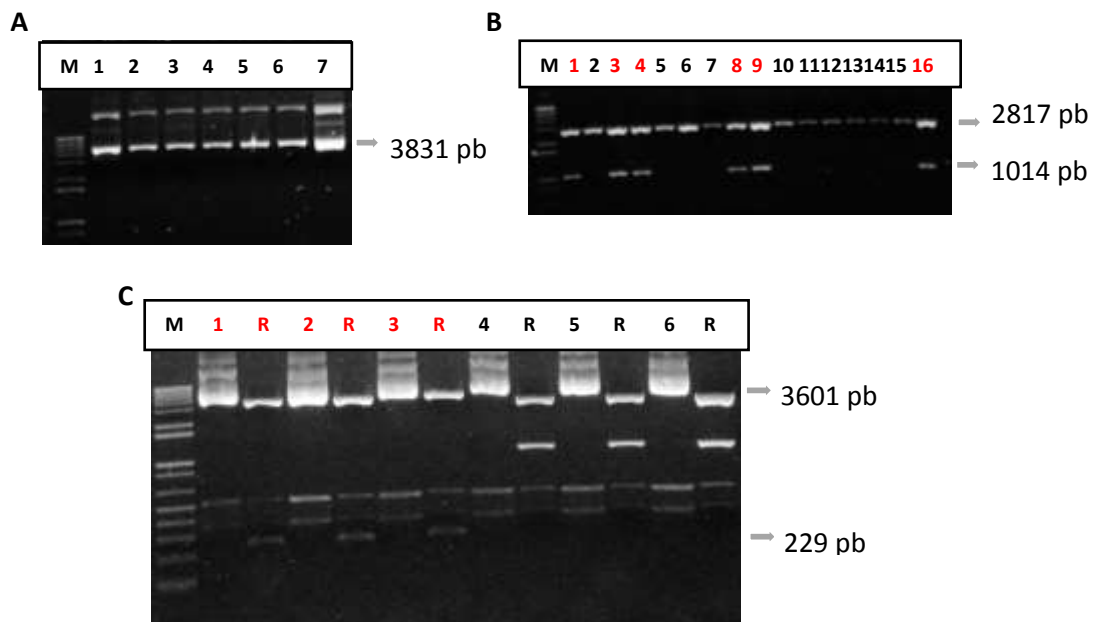


Figura 11. Clonación del ORF cDNA de ANAC046 en el vector de entrada.

A) DNA plasmídico de algunas clonas posiblemente recombinantes (3831 pb= 2817 pb del vector pCR8GWTOPO + 1014 pb del ORF de ANAC046). B) Digestión del DNAp con la enzima EcoRI para conocer las clonas recombinantes con el fragmento de interés (números rojos). C) Digestión del DNAp para conocer las clonas con orientación positiva con un patrón de bandeado de (3601 y 229 pb). (R: restricción).

8.1.3 Obtención de plásmidos recombinantes en vector de sobreexpresión y transformación en *A. tumefaciens*

Se seleccionó una de las clonas candidatas que contaba con la orientación positiva y se llevó a cabo una subclonación en el vector binario de sobreexpresión (pB7FWG2). Se llevó a cabo una reacción de LR-clonasa y se transformaron células de *E. coli* Mach1. Se extrajo DNA plasmídico de algunas clonas candidatas y finalmente se comprobó la transformación mediante una digestión con la enzima EcoRI que libera el inserto de ANAC046 ORF cDNA. Cabe mencionar que este último paso de comprobación de inserto, también se llevó a cabo para la construcción de ANAC087 ORF cDNA y ANAC046 ORFg cuyos inserto ya se encontraban subclonados en el vector binario de expresión en planta. Finalmente, también se llevó a cabo la transformación de células de *A. tumefaciens* cepa AGL1 con los plásmidos recombinantes.

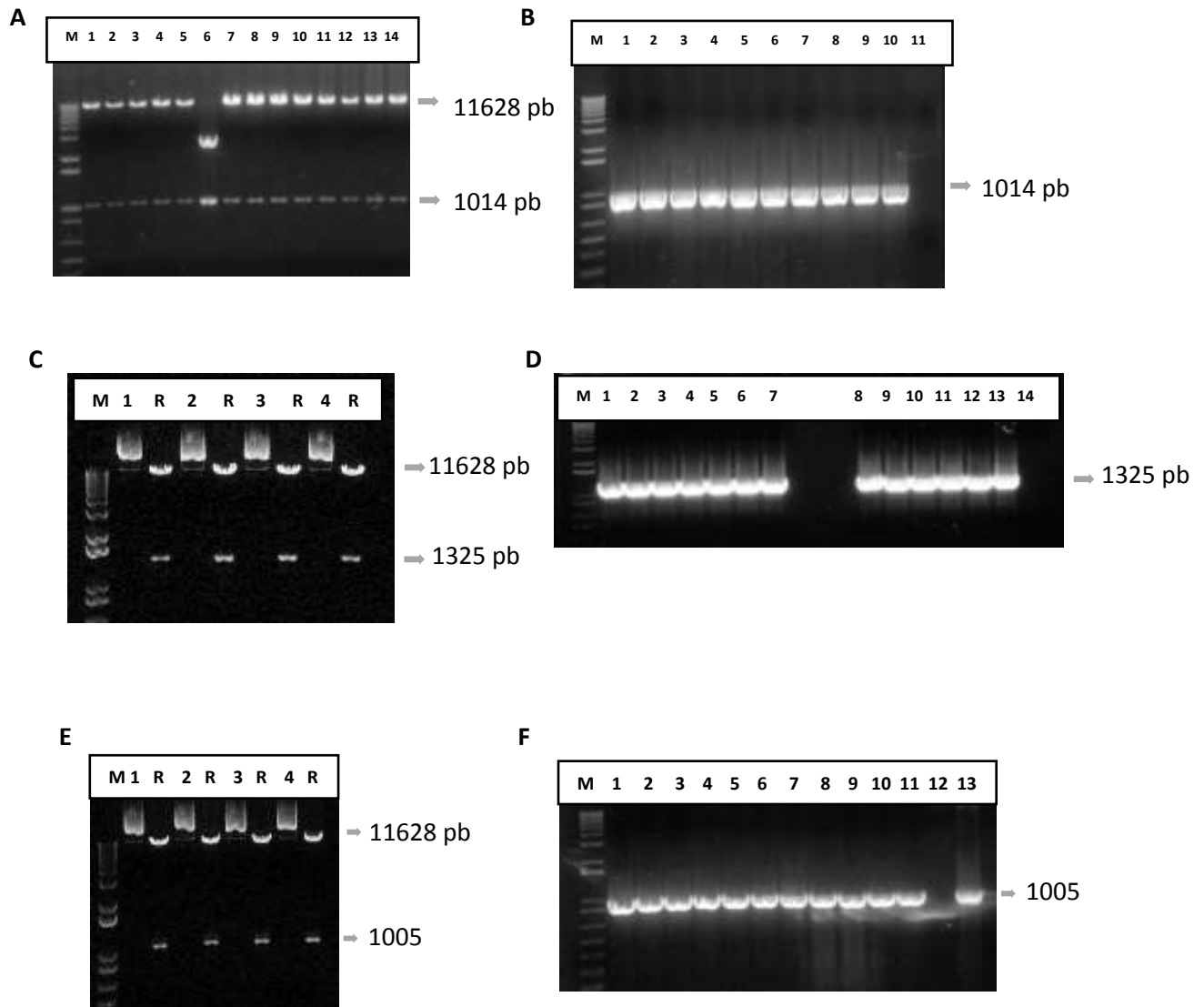


Figura 12. Subclonación de ANACO46 ORF cDNA, ORFg y ANAC087 ORF cDNA en el vector binario de sobreexpresión.

Comprobación de subclonación en el vector pB7FWG2 con la enzima EcoRI que libera los insertos esperados de 1014 pb para ANAC46 ORF cDNA (A), 1325 pb para ANAC046 ORFg (C) y 1005 pb para ANAC047 ORF cDNA (E). Comprobación por PCR de la transformación en *A. tumefaciens* AGL1 con los respectivos fragmentos (B, D y F).

A partir de estos resultados, se seleccionaron algunas clonas de *A. tumefaciens* con plásmidos recombinantes de cada construcción para crioconservarlas en crioviales con glicerol 30% a -80 °C.

8.1.4 Estructura de los ORFs de *ANAC046/087* fusionados al gen reportero GFP en el vector pB7FWG2

Por otro lado, es importante señalar que esta subclonación se llevó a cabo con el fin de realizar una fusión traduccional de cada uno de los fragmentos de interés con la proteína EGFP (una versión de GFP con fluorescencia incrementada), la expresión de esta fusión está dirigida bajo el promotor constitutivo 35S, lo cual indica que la expresión de nuestras proteínas de interés se encontrará en toda la planta. En las siguientes Figuras, se muestran las representaciones de los fragmentos de interés clonados en el vector de sobreexpresión.



Figura 13. Estructura de las construcciones de sobreexpresión en el vector pB7FWG2.

A) Esquema representativo de la sobreexpresión de ANAC046 ORF cDNA y ANAC087 ORF cDNA (B). En este vector se destaca el promotor 35S fuerte del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el cual dirige la expresión de las proteínas ANAC046/087 fusionadas a la proteína GFP. El promotor NOS dirigiendo la expresión de la enzima para la resistencia a herbicida y los sitios de recombinación (attB1 y attB2) que delimitan los extremos de los fragmentos de interés.

8.2 Construcciones de silenciamiento génico post-transcripcional de los genes *ANAC046/087*

Para llevar a cabo el silenciamiento de ambos genes, se amplificó una región de 200 pb localizada en el C-terminal, debido a que este extremo es altamente variable entre la familia de los genes NAC. Para llevar a cabo dicho silenciamiento, se utilizó el vector binario pB7GW1WG2 (II) de la serie GATEWAY y el cual se caracteriza principalmente por contener dos sitios de recombinación en donde los fragmentos de silenciamiento serán ligados y se generarán repetidos invertidos; entre estos sitios se encuentra clonado un intrón que producirá un RNA de cadena doble, formando una horquilla de RNA a partir de las secuencias de interés, desencadenando así un silenciamiento génico de manera eficiente.

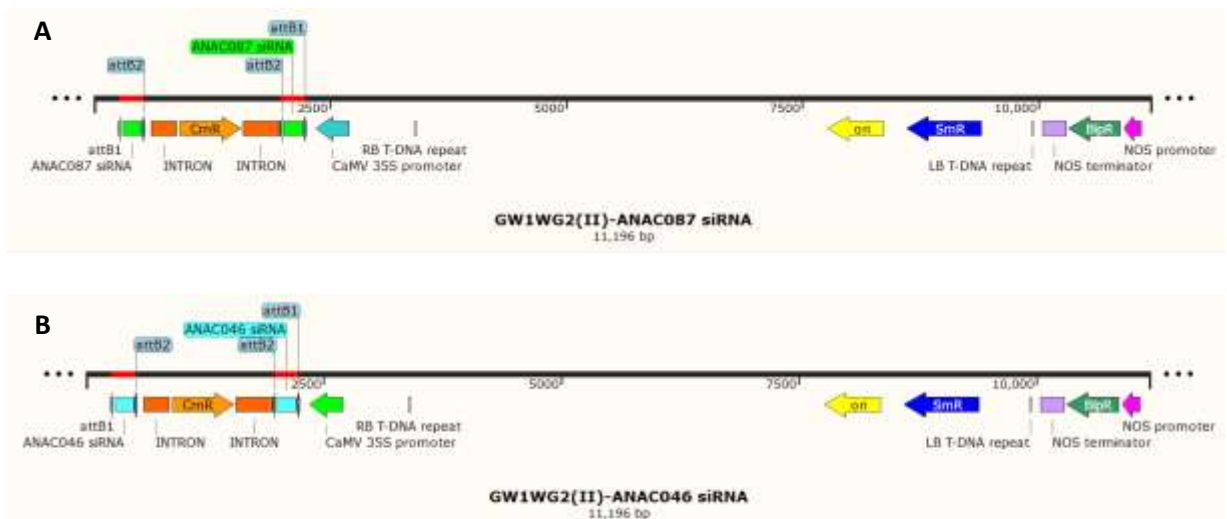


Figura 14. Estructura de las construcciones de silenciamiento génico post-transcripcional.

Esquema representativo de los fragmentos de ANAC087 (A) y ANAC046 (B) clonados en el vector binario pB7GW1WG2 (II).

De acuerdo con la Tabla 3, las construcciones de silenciamiento tuvieron seguimiento a partir de la clonación en el vector pCR8GWTOPO, lo cual fue corroborado en este trabajo. A continuación, se muestra la subclonación que se llevó a cabo en el vector de silenciamiento y sus respectivas comprobaciones mediante restricción y PCR. Finalmente, se transformaron células de *A. tumefaciens* AGL1 y se corroboró la transformación mediante PCR, asimismo, se seleccionaron algunas clonas para crioconservar a -80°C .

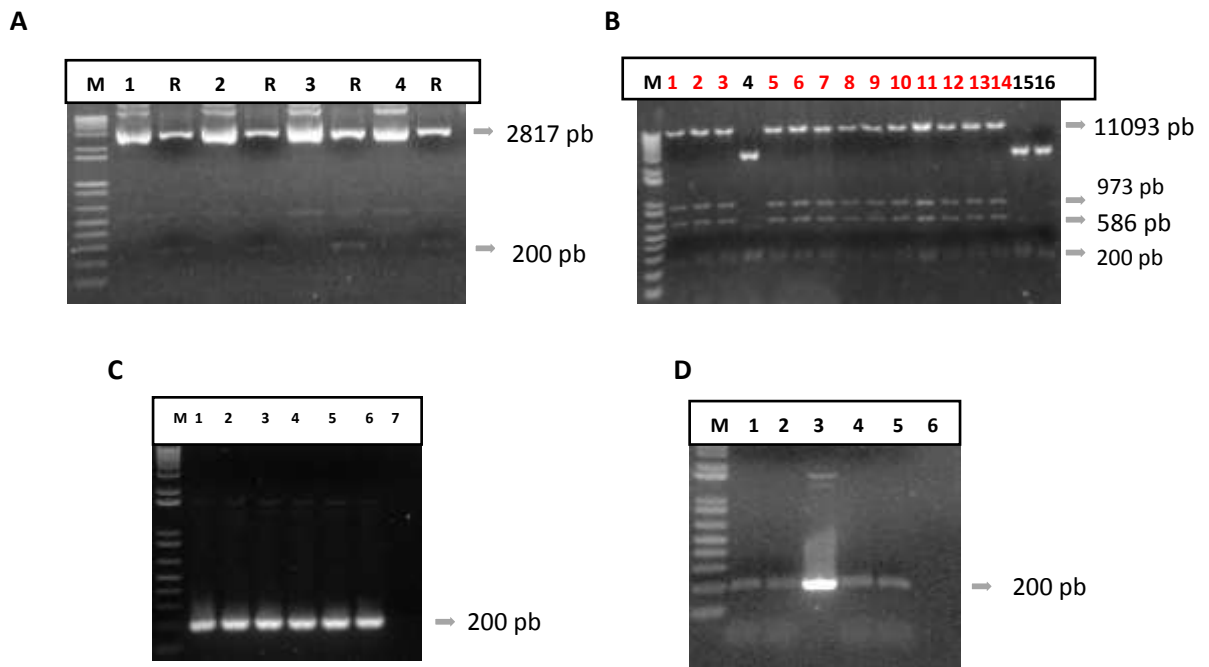


Figura 15. Desarrollo del silenciamiento del gen ANAC087

A) Comprobación de la clonación del fragmento de 200 pb en el vector PCR8GWTOPO por medio de restricción (R) con la enzima EcoRI. B) Comprobación de la subclonación en el vector binario de silenciamiento pB7GW1WG2(II) mediante restricción con EcoRI. Los números rojos muestran las clonas positivas recombinantes, los fragmentos de 973 y 586 pb pertenecen al intrón que se encuentra en el vector de silenciamiento, ya que tiene un sitio de corte interno para EcoRI. C) Comprobación de la subclonación mediante PCR, (1-6) clonas positivas, control negativo (7). D) PCR de la transformación en *A. tumefaciens* AGL1, (1-5) clonas positivas, (6) control negativo.

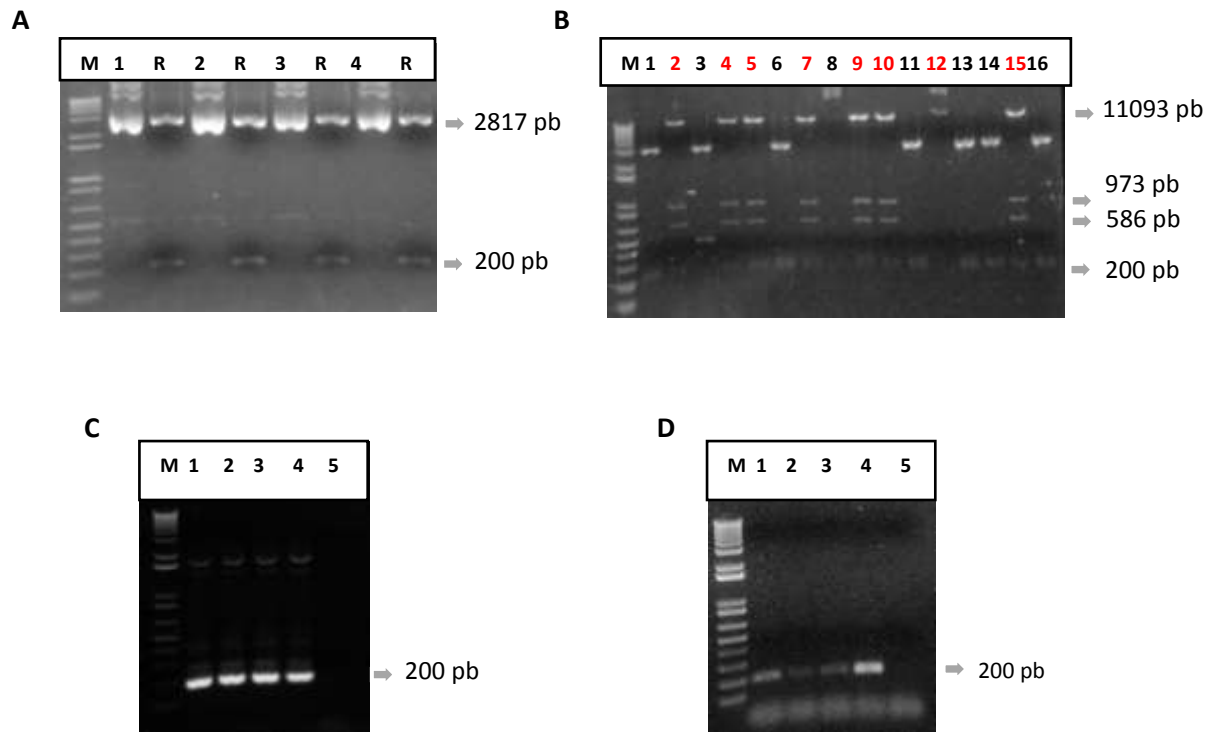


Figura 16. Desarrollo del silenciamiento del gen ANAC046.

A) Comprobación de la clonación del fragmento de 200 pb en el vector PCR8GWTOPO por medio de restricción (R) con la enzima EcoRI. B) Comprobación de la subclonación en el vector binario de silenciamiento pB7GW1WG2(II) mediante restricción con EcoRI. Los números rojos muestran las clonas positivas recombinantes, los fragmentos de 973 y 586 pb pertenecen al intrón que se encuentra en el vector pB7GW1WG2 (II), ya que tiene un sitio de corte interno para EcoRI. C) Comprobación de la subclonación mediante PCR, (1-4) clonas positivas, control negativo (5). D) PCR de la transformación en *A. tumefaciens* AGL1, (1-4) clonas positivas, (5) control negativo.

8.3 Construcciones para el análisis de promotores de los genes ANAC046/087

Para llevar a cabo el análisis de las regiones promotoras de los genes ANAC046/087, se amplificaron las regiones 3000 pb corriente arriba del marco de lectura abierto (ORF) de cada gen. Es importante mencionar que dentro de estos fragmentos, se encuentran las regiones 5'UTR. Para realizar este análisis, se utilizó el vector binario pBGWFS7 de la serie GATEWAY, cuya característica principal es contener una fusión de GFP a una β -glucuronidasa

(GUS) y su expresión está dirigida bajo el promotor de ANAC046 (3187 pb) y ANAC087 (2988 pb).

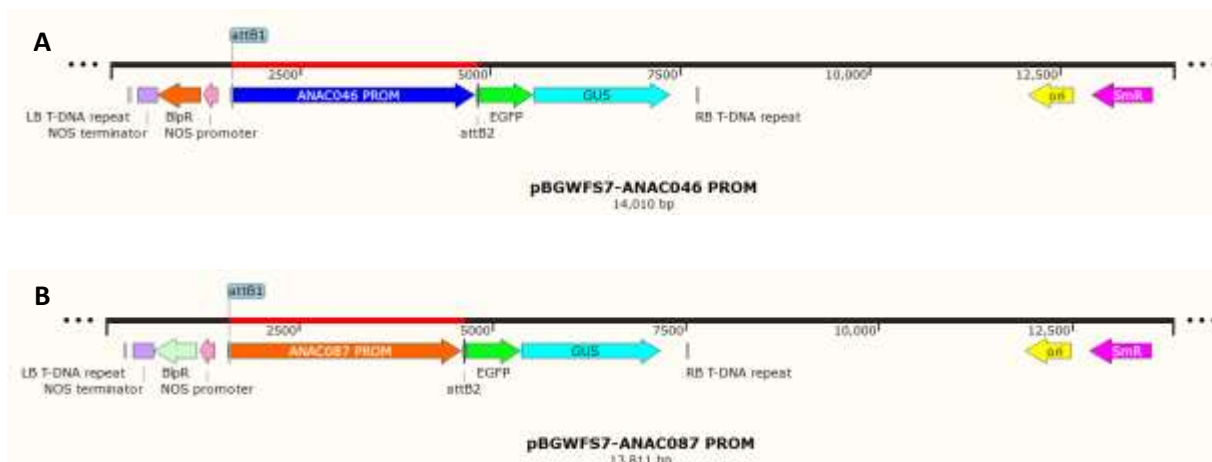


Figura 17. Estructura de las construcciones de promotores en el vector pBGWFS7.

Representación esquemática de las regiones promotoras de ANAC046 (A) y ANAC087 (B) clonadas en el vector binario para análisis de promotores.

De acuerdo con la Tabla 3, las regiones promotoras de ambos genes ya se encontraban clonadas en el vector pCR8GWTOPO. Por lo tanto, en este trabajo se dio continuación a partir de corroborar la orientación correcta y posteriormente, la subclonación en el vector binario. Una vez que se obtuvieron clonas candidatas, se extrajo DNAp y se realizó una restricción para liberar las regiones promotoras y comprobar así la clonación. Finalmente se transformaron células de *A. tumefaciens* mediante electroporación y se realizó una PCR para comprobar la transformación. Las clonas positivas, fueron crioconservadas en glicerol.

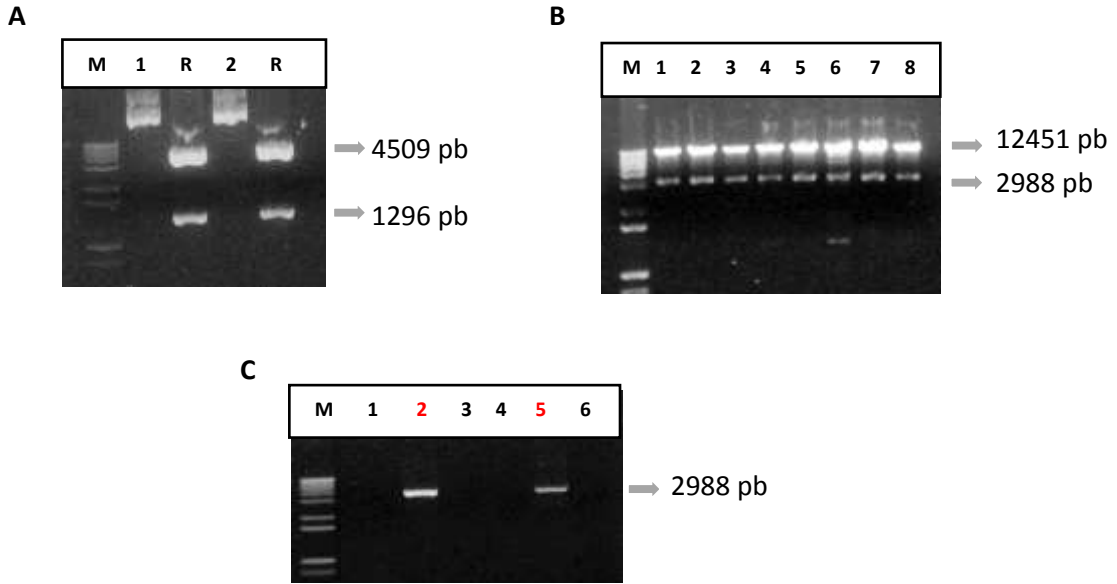


Figura 18. Desarrollo de la construcción para el análisis del promotor del gen ANAC087

A) Patrón de bandeo que corrobora la orientación positiva de la región promotora clonada en el vector PCR8GWTOPO, (1 y 2) DNA plasmídico, (R) restricción con la enzima HincII. B) Comprobación de la subclonación de la región promotora de ANAC087 (2988 pb) en el vector binario pBGWFS7 mediante restricción con la enzima EcoRI en diferentes clonas (1-8). C) Comprobación de la transformación en células de *A. tumefaciens* AGL1 mediante PCR, (2 y 5) clonas recombinantes, (6) control negativo.

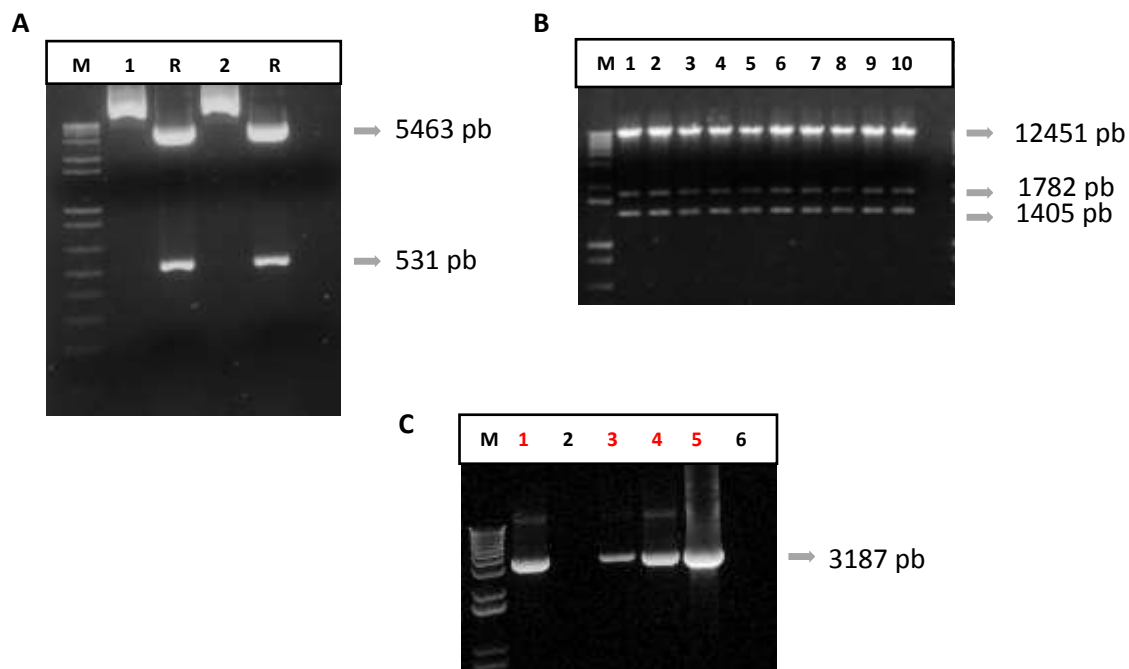


Figura 19. Desarrollo de la construcción para el análisis del promotor del gen ANAC046

A) Patrón de bandeo que corrobora la orientación positiva de la región promotora clonada en el vector PCR8GWTOPO, (1 y 2) DNA plasmídico, (R) restricción con la enzima EcoRV. B) Comprobación de la subclonación de la región promotora de ANAC046 en el vector binario pBGWFS7 mediante restricción con la enzima EcoRI en diferentes clonas (1-10), se observa un patrón de bandeo de (1782 y 1404 pb= 2988 pb) debido a que la región promotora de este gen, tiene un sitio interno para EcoRI. C) Comprobación de la transformación en células de *A. tumefaciens* AGL1 mediante PCR, (1, 3,4 y 5) clonas recombinantes, (6) control negativo.

8.4 Análisis de líneas transgénicas

Una vez que se contaba con células de *A. tumefaciens* transformadas con los fragmentos de interés para ambos genes, se llevó a cabo la transformación en plantas de *A. thaliana* mediante floral dip y crecidas en hidroponia, tal y como se detalla en el apartado 7.2. Posteriormente, se llevó a cabo la selección de líneas transgénicas con el herbicida glufosinato de amonio. Aquellas plantas que resistieron la aplicación del herbicida, se colocaron en nuevos pellets de turba, para analizar individualmente a las posibles candidatas.

8.4.1 Análisis de líneas sobreexpresoras de los genes ANAC046/087

Llevado a cabo todo lo anterior, a partir de las plantas candidatas, se tomó una muestra de hoja de roseta de cada planta y se realizó una extracción de DNA genómico. Posteriormente, se

comprobó la transformación por medio de la amplificación del gen reportero GFP para el caso de las construcciones de sobreexpresión.

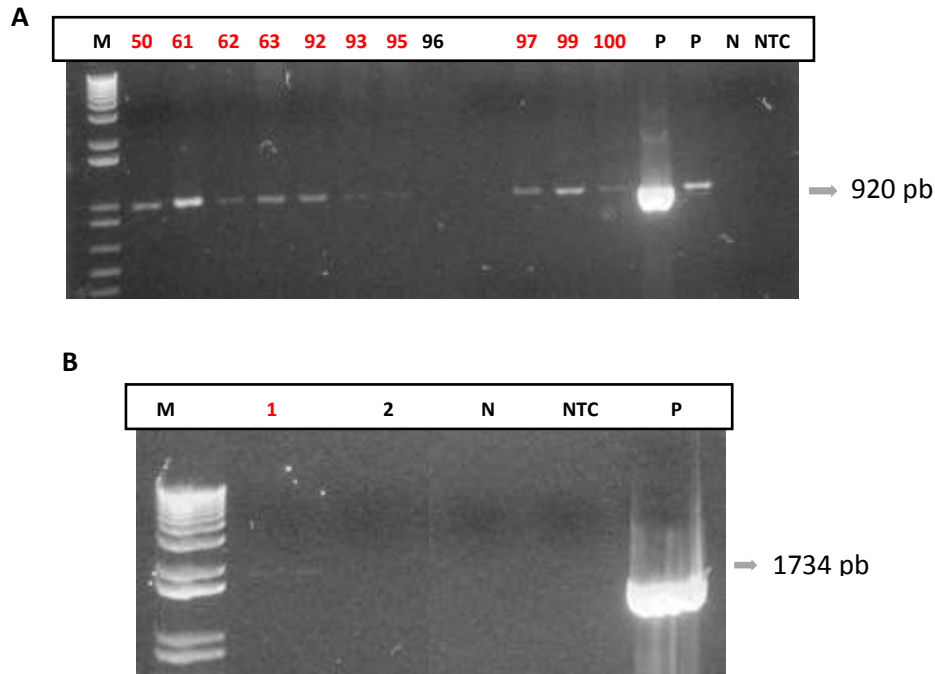


Figura 20. Líneas transgénicas sobreexpresoras del gen ANAC046

A) Detección mediante PCR de un fragmento del ORFg de ANAC046 (200) fusionado a GFP (720 pb). B) Detección de la fusión del ORF cDNA de ANAC046 (1014 pb) con GFP. P, controles positivos (DNA plasmídico de la construcción en *A. tumefaciens*); N, control negativo (DNA genómico de *A. thaliana* silvestre); NTC, control negativo de reacción o No Template Control. Los números rojos representan las líneas transgénicas.

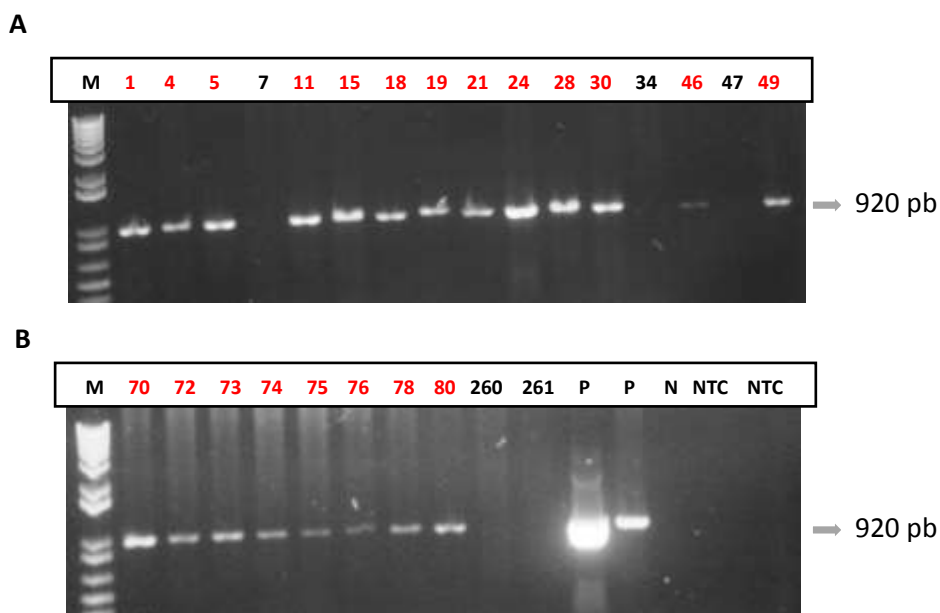


Figura 21. Líneas transgénicas sobreexpresoras del gen *ANAC087*

A y B) Detección de la fusión de un fragmento del ORF de *ANAC087* ORF cDNA (200 pb) con GFP. P, controles positivos (DNA plasmídico de la construcción en *A. tumefaciens*); N, control negativo (DNA genómico de *A. thaliana* silvestre); NTC, control negativo de reacción o No Template Control. Los números rojos representan las líneas transgénicas.

8.4.2 Análisis de líneas con silenciamiento génico de los genes *ANAC046/087*

Se llevó a cabo el mismo procedimiento anteriormente descrito, con la diferencia, de que en este caso, se realizó la amplificación del gen *Bar*.

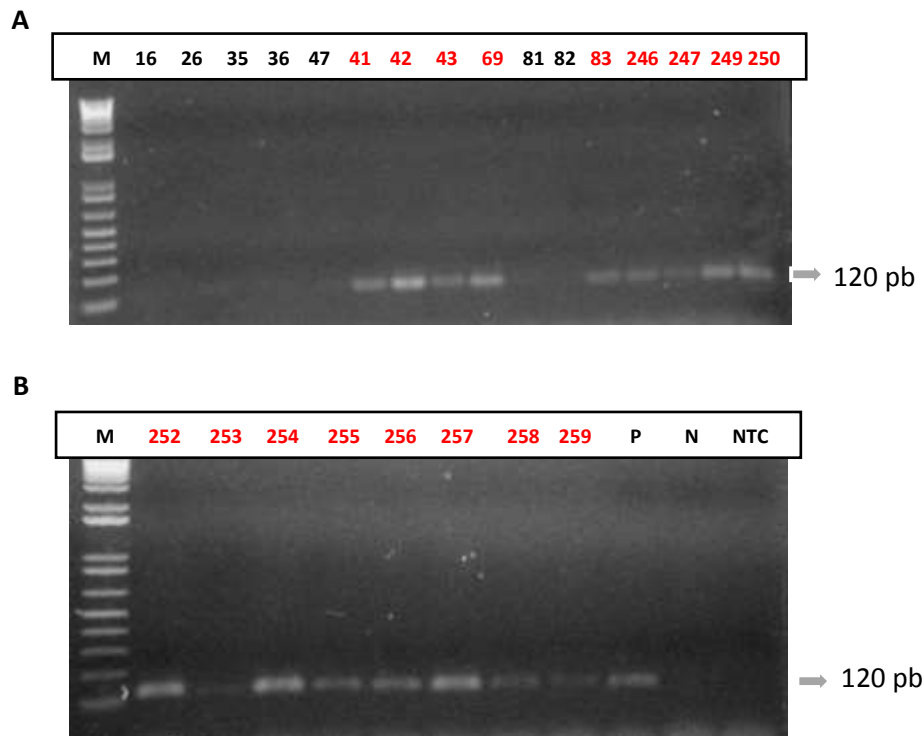


Figura 22. Líneas transgénicas de silenciamiento génico para *ANAC046/087*

A y B) Detección de un fragmento del gen Bar (120 pb). Los números rojos, representan las líneas transgénicas silenciadas. Líneas 41, 42, 43, 69, 258 y 259, corresponden a *ANAC046* y las líneas 246, 247, 249, 250, 252, 253, 254, 255, 256, 257 pertenecen al gen *ANAC087*.

8.5 Fenotipos inducidos durante el análisis de los genes *ANAC046/087*

8.5.1 Fenotipo de la sobreexpresión del gen *ANAC046*

Una vez que se obtuvieron líneas transgénicas, se mantuvieron en una cámara de crecimiento hasta obtener plantas adultas maduras y posteriormente, se llevó a cabo la recolección de semillas de la segunda generación. Durante este periodo, se observó que las plantas sobreexpresoras presentaron un fenotipo interesante: las hojas de roseta eran más grandes, comparado con plantas silvestres. Asimismo, se observó que el número de ramificaciones era mayor en las plantas sobreexpresoras, tal y como se muestra en la siguiente Figura.



Figura 23. Fenotipo inducido por la sobreexpresión del ORF de ANAC046.

Comparación entre una planta silvestre y plantas de la primera generación de la sobreexpresión del ORFg de ANAC046. Las líneas 96 y 100, fueron corroboradas como líneas transgénicas. Las flechas amarillas indican las diferencias con la planta silvestre.

8.5.2 Fenotipo del silenciamiento de *ANAC046/087*

De la misma manera que se describió anteriormente, una vez que se obtuvieron líneas transgénicas, se observó que las líneas con el silenciamiento del gen *ANAC087* presentaron un retraso en el crecimiento y desarrollo.



Figura 24. Fenotipo inducido por el silenciamiento del gen ANAC046

En estas imágenes se muestra que el tamaño de las rosetas no fue normal así como el desarrollo de la planta en etapa madura. Estas plantas son la primera generación del silenciamiento de dicho gen.

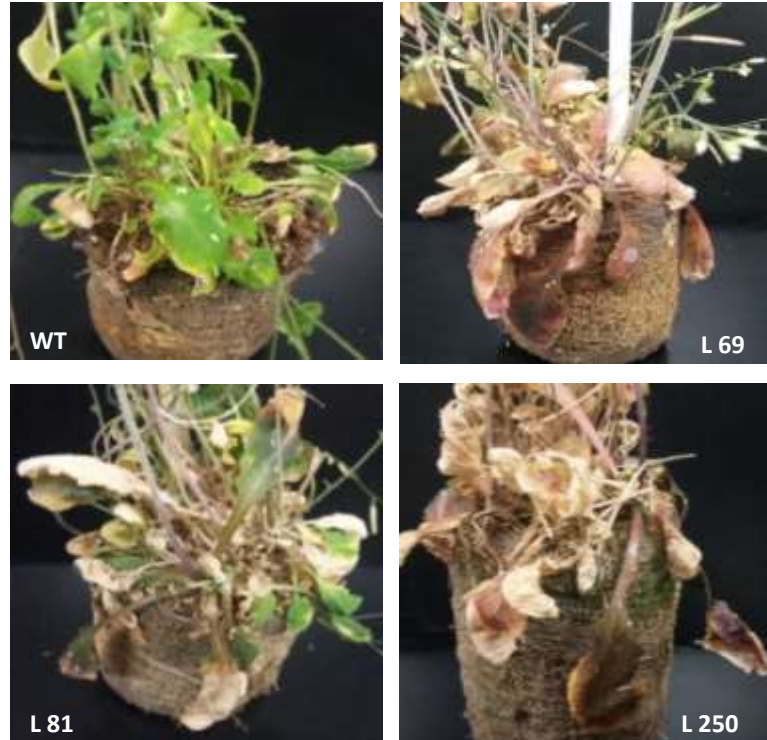


Figura 25. Fenotipo inducido por el silenciamiento de *ANAC046/087*

La línea transgénica L69 muestra el fenotipo del silenciamiento del gen *ANAC046* y las líneas L81 y L250 pertenecen al silenciamiento del gen *ANAC087*. En ambos casos se observó una temprana senescencia y además se observaron algunas hojas de color morado en comparación con plantas silvestres o wild type (WT) que presentan la misma edad cronológica que las plantas silenciadas. Cabe mencionar que estas plantas son de la segunda generación del silenciamiento.

8.5.3 Fenotipo de las líneas transgénicas para el análisis de regiones promotoras de *ANAC046/087*

En las líneas transgénicas que expresaban la fusión de GFP::GUS dirigida por el promotor de *ANAC046/087*, se observó un fenotipo muy interesante; puesto que se observaron rosetas aéreas en las plantas de la segunda y tercera generación. Cabe mencionar, que el número de rosetas aéreas que presentaban las plantas no era uniforme. Asimismo, se observó que algunas líneas presentaban rosetas aéreas completamente desarrolladas, mientras que otras plantas desarrollaban rosetas aéreas más pequeñas. También, estas líneas se observaron con un verdor más intenso en toda la planta, comparado con una planta silvestre. Sin embargo, se observó que

las plantas en edad adulta presentaban un color morado intenso en el tallo secundario y también en partes de tallos en donde comenzaba el desarrollo de las rosetas aéreas.

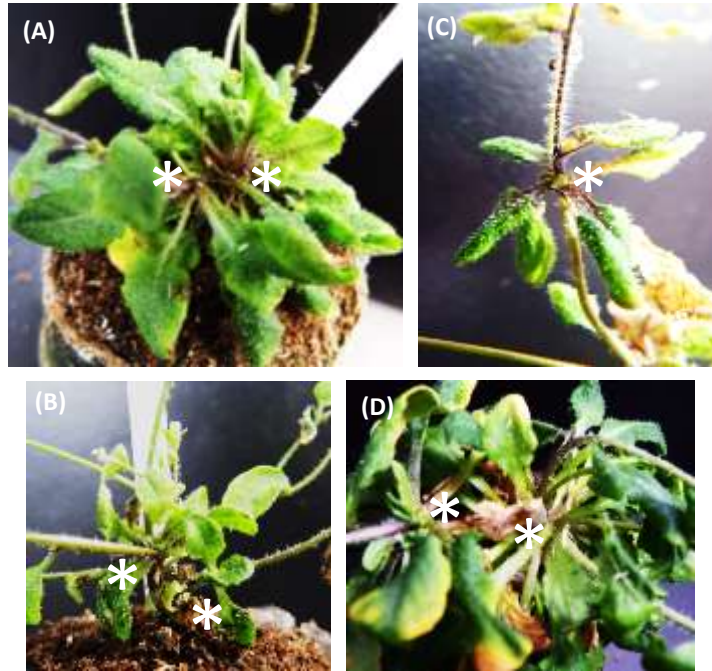


Figura 26. Fenotipo inducido por la expresión de GFP::*GUS* dirigida por el promotor de *ANAC046/087*

Fotografías que muestran un fenotipo de rosetas aéreas en diferentes líneas transgénicas de la primera generación (F1). (A, B) corresponden a las líneas L115 y L119 cuya expresión de GFP::*GUS* es dirigida bajo el promotor del gen *ANAC046*. Mientras que (C, D) representan a las líneas 163 y 190, respectivamente cuya expresión de la fusión GFP::*GUS* es dirigida por el promotor del gen *ANAC087*. Los asteriscos indican las rosetas aéreas.

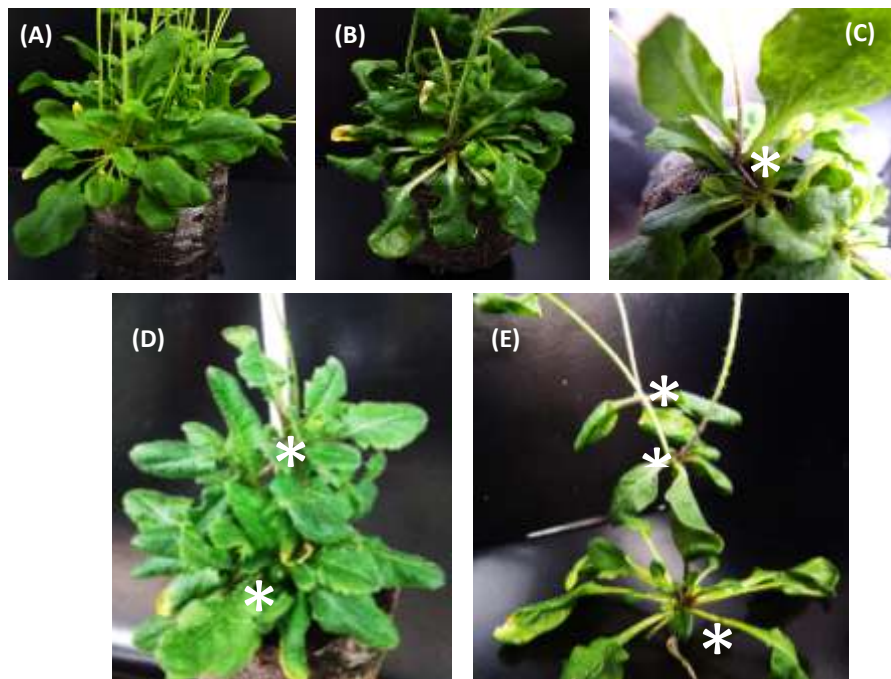


Figura 27. Fenotipo inducido por la expresión de *GFP::GUS* dirigida por el promotor de *ANAC087*

Estas fotografías corresponden a plantas de la línea transgénica L31 que también presentó un fenotipo relacionado al desarrollo de rosetas aéreas y además fue la línea en donde se desarrollaron rosetas aéreas completamente. (A) Es una planta silvestre con la misma edad cronológica que en (B) línea L31 (F3) en donde se observa un verdor más intenso en las hojas y además presentan un crecimiento epinástico. (C) Línea L31 (F3) en donde se destaca el color morado que presentaban los tallos. (D) Línea 31 (F1) en donde los asteriscos indican dos rosetas totalmente desarrolladas. (E) Línea L31 (F3) se indica con asteriscos el número de rosetas desarrolladas en una planta adulta.

8.6 Caracterización de la expresión de los genes *ANAC046/087*

Para definir la expresión de ambos genes, se realizaron diferentes análisis, como por ejemplo; la identificación del patrón de expresión en diferentes tejidos y por otro lado, la cuantificación de los niveles de mRNA en diversos tejidos de plantas silvestres.

8.6.1 Identificación del patrón de expresión de ANAC087 y ANACO46 PROM::*GFP-GUS* por microscopía confocal en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*

Para cuando se comenzaron los análisis de microscopía confocal, aún no se contaba con plantas transgénicas estables y seleccionadas; es por esto que se procedió a realizar un ensayo previo para conocer el patrón de expresión de ANAC046 y ANAC087 en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* transformadas transitoriamente, tal y como se detalla en el apartado (7.3).

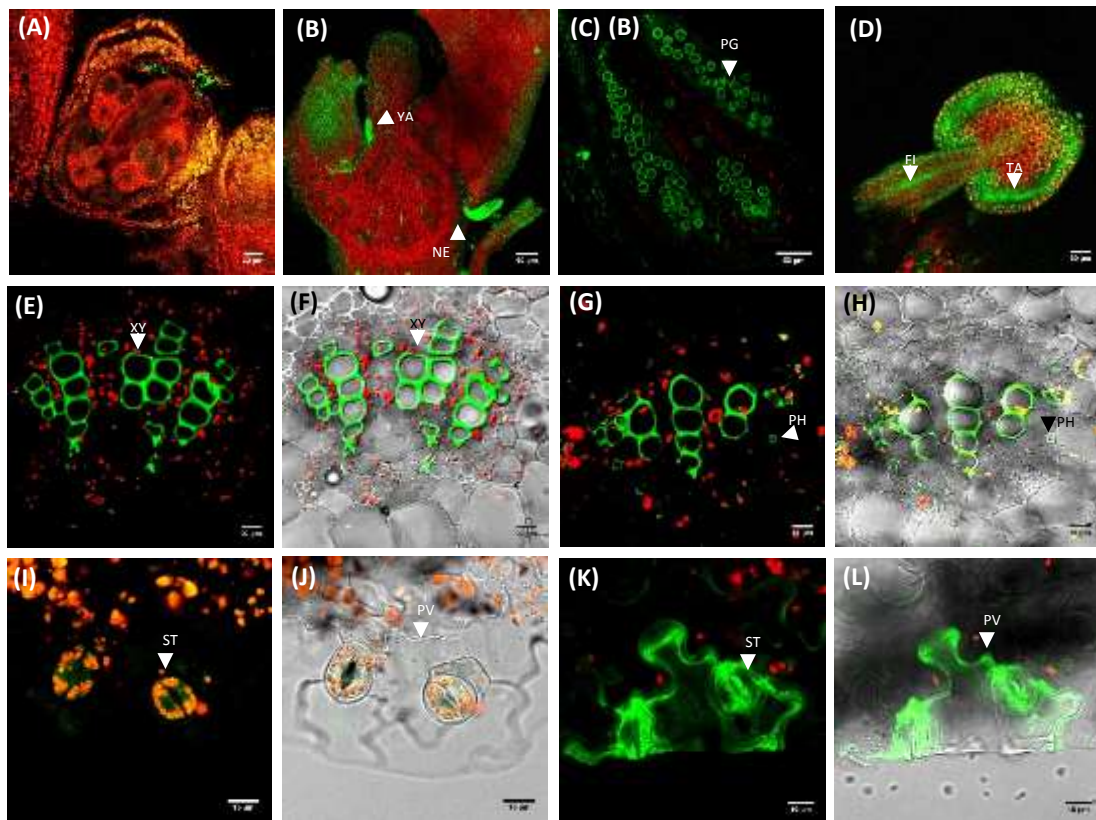


Figura 28. Patrón de expresión ANAC046 PROM::*GFP* en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*

Localización de GFP en cortes transversales de diferentes tejidos en plantas de *A. thaliana* (A-D) y *N. benthamiana* (E-L). (A, C) Controles silvestres que muestran la autofluorescencia en ápice y en los granos de polen (PG) de las anteras, respectivamente. (B, D) Localización de GFP en las yemas axilares (YA) del meristemo, en nectarios (NE) y en el filamento (FI) y tapetum (TA) de las anteras de la planta transformada. (E, F) Autofluorescencia presente en el xilema del peciolo. (G, H) Localización de GFP en el floema (PH) del haz vascular de peciolo. (I, J) Autofluorescencia detectada en los estomas (ST) y en las células pavimento (PV) de un corte transversal de hoja. (K, L) Localización de GFP en (ST) y (PV).

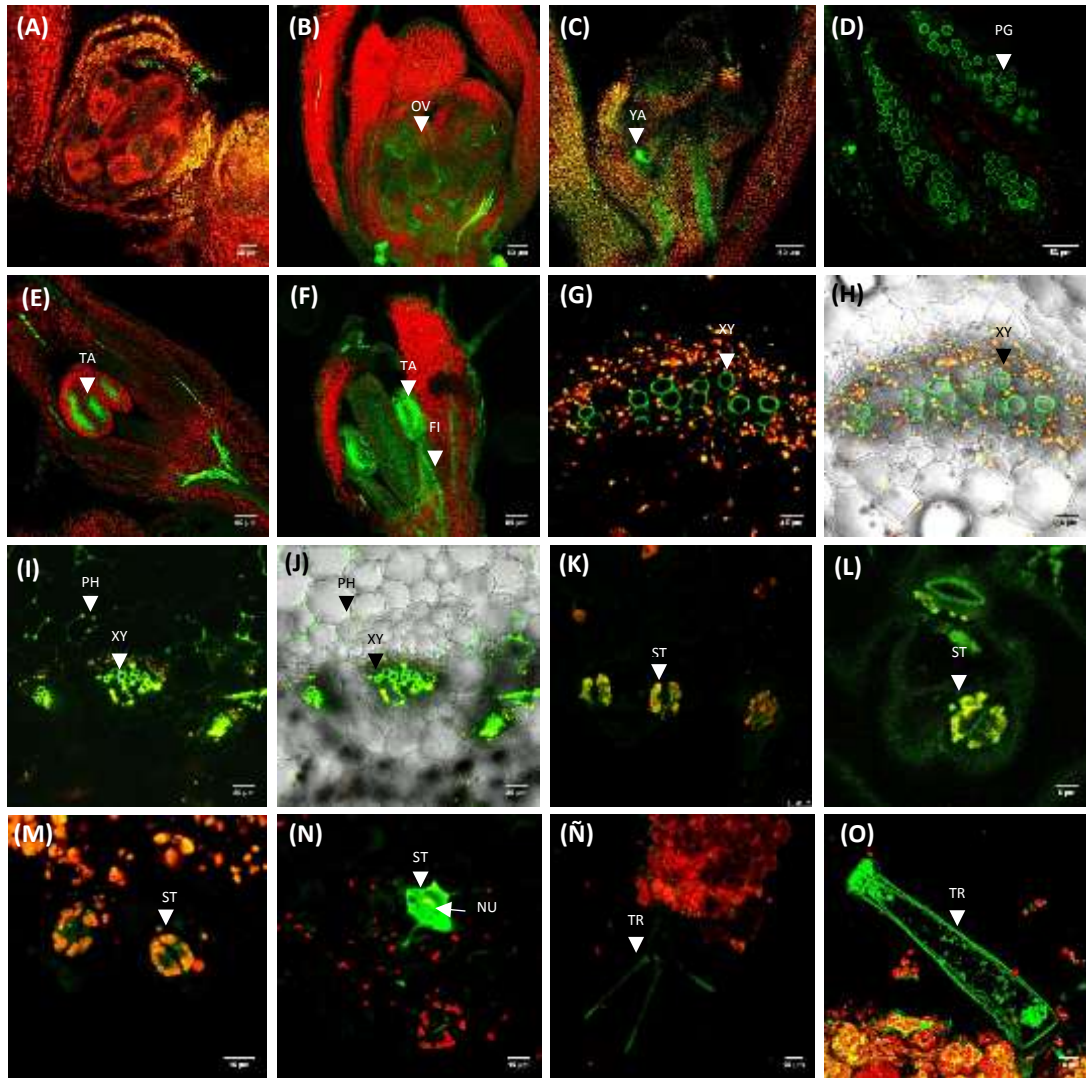


Figura 29. Patrón de expresión *ANAC087 PROM::GFP* en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*.

Localización de GFP en cortes transversales y longitudinales de diferentes tejidos en plantas de *A. thaliana* (A-L) y *N. benthamiana* (M-O). (A) Corte longitudinal que muestran la autofluorescencia de un ápice. (B, C) Localización de GFP en óvulos (OV) y en yemas axilares (YA). (D) Corte longitudinal de antera que presenta fluorescencia en granos de polen (PG). (E-F) Localización de GFP en el tapetum (TA) y filamento (FI) de anteras de una planta transgénica. (G, H) Corte transversal de peciolo que muestra la autofluorescencia del xilema (XI). (I-J) Localización de GFP en el floema (PH) del haz vascular de peciolo. (K, M) Corte transversal de hoja de *A. thaliana* y *N. benthamiana* respectivamente, que muestra la autofluorescencia de los estomas (ST). (L, N) Cortes que muestran la localización de GFP en (ST) y en núcleo (NU). (Ñ) Autofluorescencia presente en un tricoma (TR). (O) Localización de GFP en (TR) de una planta de *N. benthamiana* transformada.

8.6.2 Identificación del patrón de expresión de la región promotora de *ANAC046/087* a nivel tisular

Una vez que se obtuvieron plantas transgénicas seleccionadas, se determinó el patrón de expresión en diversos tejidos de planta de la segunda y tercera generación (F2 y F3) mediante la detección de la actividad β -glucuronidasa hidrolizando al sustrato X-gluc, tal y como se describe en el apartado 7.4.3. El patrón de expresión del promotor de *ANAC087* se determinó en varias líneas transgénicas de la segunda generación. Sin embargo, el patrón completo es decir en todos los tejidos, fue analizado en la línea 31 de tercera generación. Para el caso del patrón de expresión de *ANAC046*, este se determinó parcialmente (en ciertos tejidos) en líneas F2.

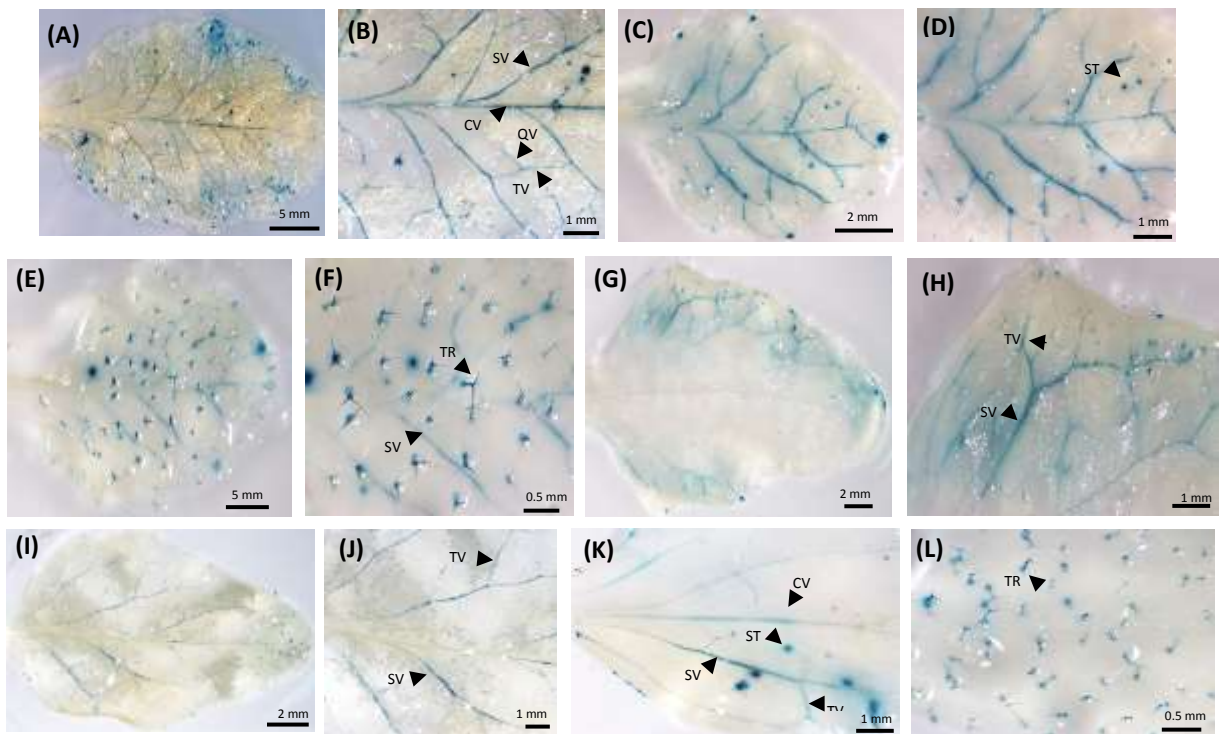


Figura 30. Patrón de expresión de la región promotora de *ANAC087* en hojas de roseta y hoja caulinar

Análisis histoquímico de hojas de diferentes rosetas expresando una región de 3000 pb corriente arriba del marco de lectura de *ANAC087* y dirigiendo la expresión de GFP-GUS. La actividad de GUS fue detectada en hojas de la roseta principal (A-D), B y D son ampliaciones de A y C, respectivamente. También se detectó actividad en diferentes rosetas aéreas: segunda roseta (E y F), tercera roseta (G y H) y en la cuarta roseta (I y J). Asimismo, se observó actividad en hojas caulinares (K y L). Vena central (CV), vena secundaria (SV), vena terciaria (TV), vena cuaternaria (QV), estomas (ST) y tricomas (TR).

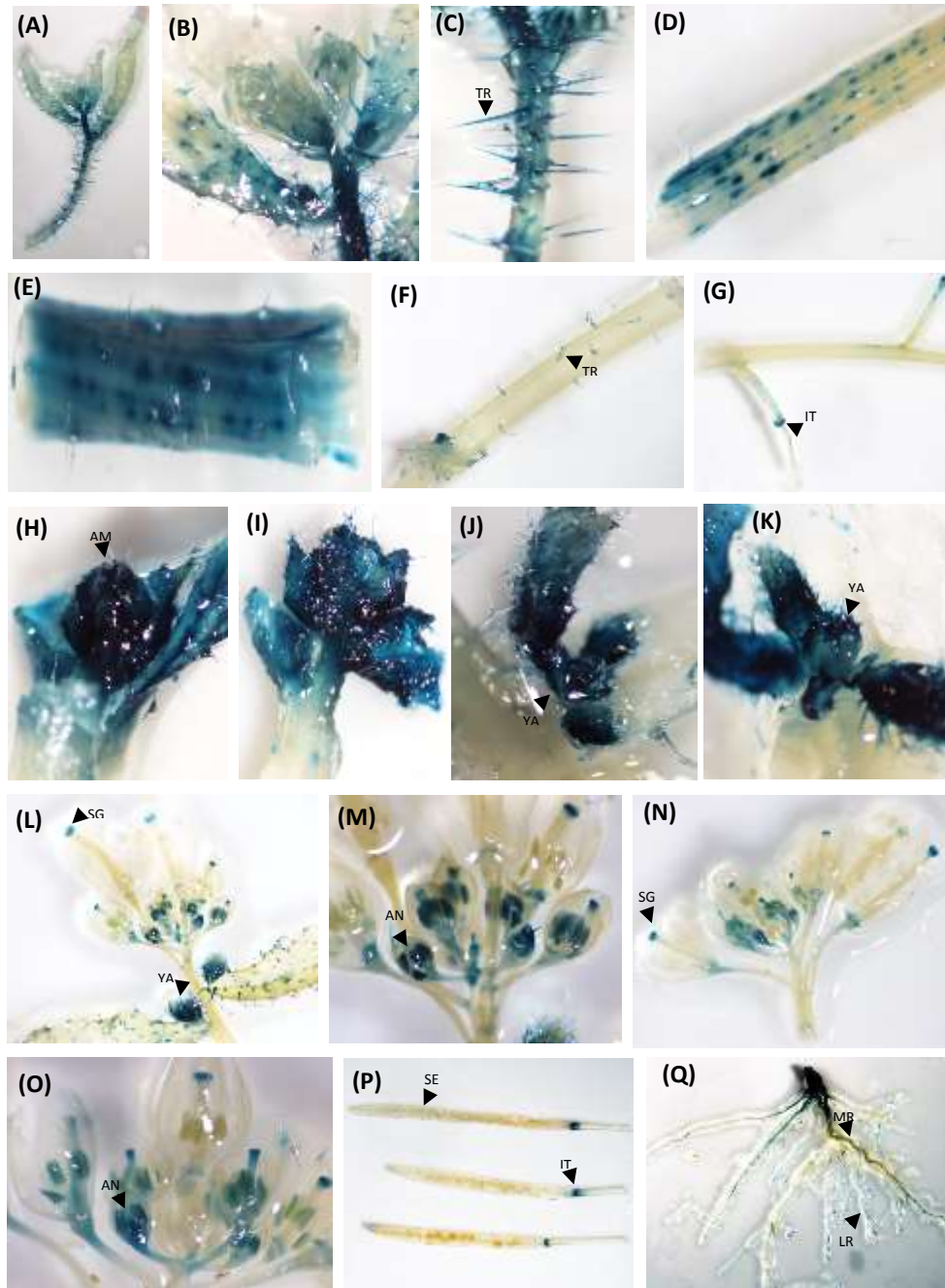


Figura 31. Patrón de expresión del gen ANAC087 en varios tejidos de *A. thaliana*.

Se detectó actividad de la región promotora de interés en la inflorescencia (A, B) y en el tallo de inflorescencia (C), principalmente en tricomas (TR). D) Tallo intermedio que pertenece a la roseta principal, E) tallo secundario que pertenece a la roseta principal. F) Tallo intermedio que pertenece a la roseta aérea número 3; G) tallo principal de la roseta número 3, en donde únicamente se observó actividad en el internodo (IT) que dará lugar a una silicua. (H, I) Apices que muestran actividad en los meristemos apicales (AM). (J, K) tallos con yemas axilares (YA). (L, M) flores que pertenecen a la roseta principal y (N, O) flores de la roseta número 3; en ambos casos presentan expresión en el estigma (SG) y en las anteras (AN). (P) silicuas que muestran

actividad en el IT y en semillas (SE). (Q) sistema radical de la planta, expresando GUS en la raíz principal (MR) y en raíces laterales (LR).

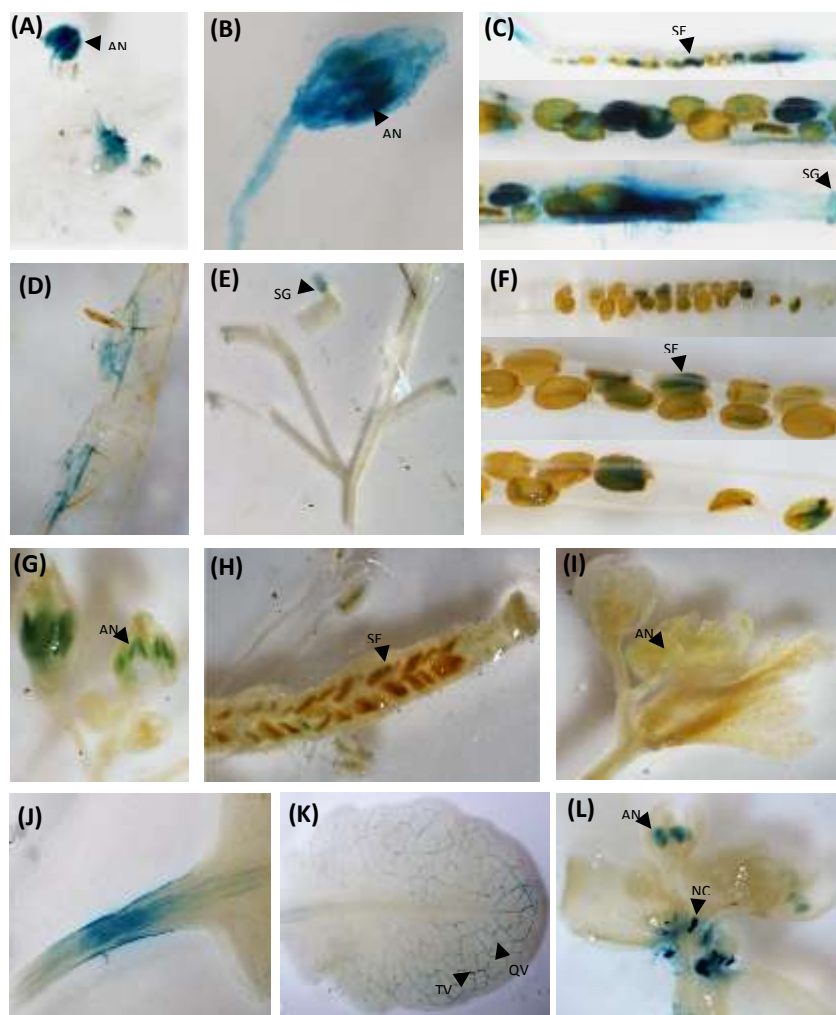


Figura 32. Patrón de expresión del gen ANAC087 en otras líneas transgénicas

- A) Línea transgénica 165, presentando actividad en anteras (AN). (B, C) Tejidos de la línea 167, se observó actividad en AN, estigma (SG) y en semillas (SE). D) Parte de una hoja de roseta de la línea 184, la actividad se presenta de manera inespecífica. E) Silicuas jóvenes de la línea 168 y se observó expresión en SG. F) Semillas, con actividad GUS de la línea 179. (G, H) Tejidos de la línea 188, con actividad en SE y AN. (I) Anteras de la línea 170. (J, K, L) Pecíolo, hoja de roseta y ápices, respectivamente; de la línea 31. Presentando actividad en venas terciarias (TV) y cuaternarias (QV), así como en AN y en nectarios (NC).

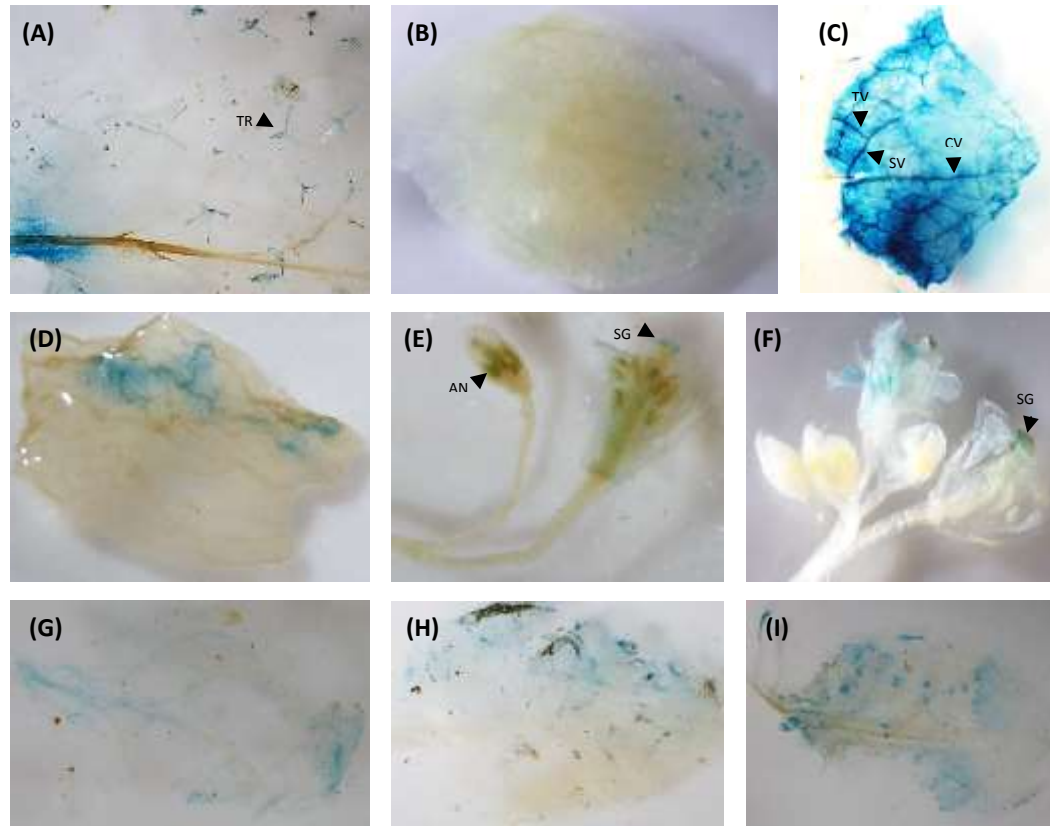


Figura 33. Patrón de expresión del gen *ANAC046*

Análisis histoquímico de tejidos de diferentes líneas de *A. thaliana* expresando una región de 3000 pb corriente arriba del marco de lectura de *ANAC046* y dirigiendo la expresión de GFP-GUS. A) Hoja de roseta de la línea 110, presentando actividad en tricomas (TR). (B, C) Hojas de roseta de las líneas 119 y 124, respectivamente; observando actividad únicamente en la parte senescente. D) Hoja de roseta de la línea 140, con actividad inespecífica. (E, F) Inflorescencias de las líneas 142 y 143, respectivamente, en las cuales se observa actividad GUS en anteras (AN) y estigma (SG). (G, H, I) Hojas de roseta de las líneas 155, 157 y 113 respectivamente; la actividad GUS no se observó específicamente.

8.6.3 Identificación del patrón de expresión de *ANAC087* PROM::*GFP-GUS* por microscopía confocal en plantas transgénicas estables

Esta construcción contiene el promotor del gen *ANAC087* dirigiendo la expresión de la fusión de la proteína GFP con GUS. Por lo tanto, es posible identificar el patrón de expresión mediante microscopía confocal. A continuación, se muestra la localización de GFP en varios tejidos de la línea L31 (F3) de *ANAC087*.

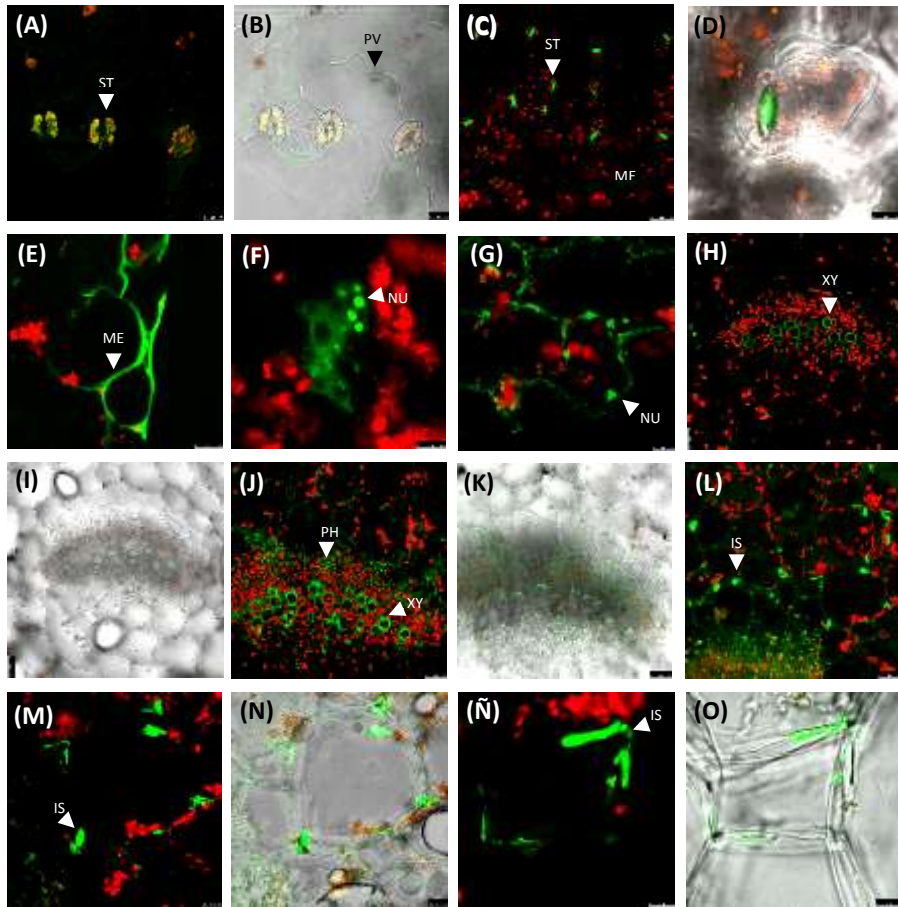


Figura 34. Localización de GFP en hoja de roseta y peciolo de la línea L31 de ANAC087

(A, B) Corte transversal de una hoja silvestre, en donde se señalan los estomas (ST) y las células pavimento (PV). (C, D, E, F, G) Representan cortes de hoja de roseta de la línea transgénica y se señala la presencia de GFP en las células de mesófilo (ME), en (ST) y en núcleo (NU). (H, I) Corte transversal de peciolo de una planta silvestre, se observa la autofluorescencia del xilema (XY). (J-O) Indican cortes transversales de peciolo, en los cuales se detectó a GFP en el floema (PH) y en los espacios intercelulares (IS). (M-O) Representan acercamientos de (L).

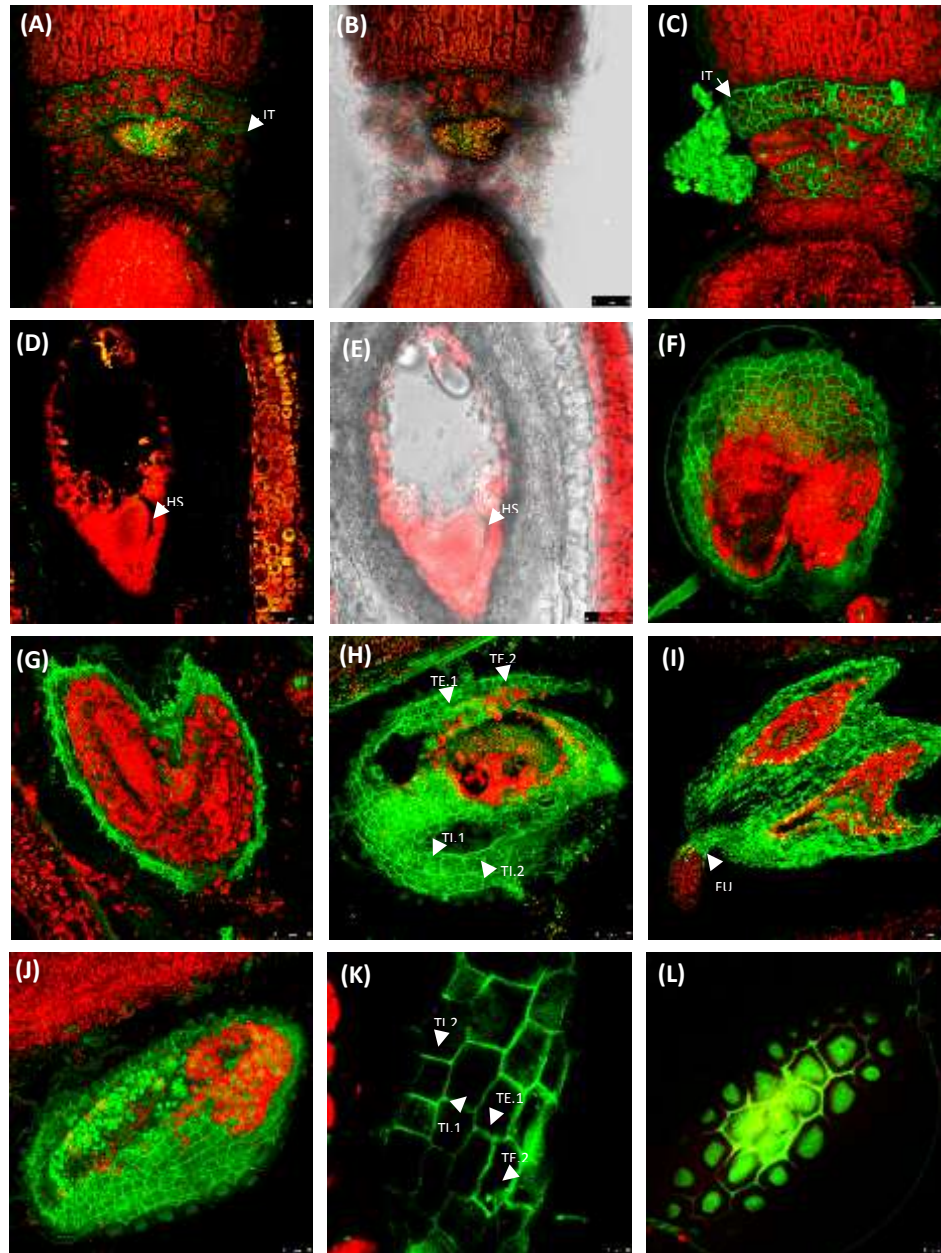


Figura 35. Localización de GFP en cortes longitudinales de silicua y semillas de la línea L31 de ANAC087

(A, B) Microscopía confocal que muestra la autofluorescencia presente en el internodo (IT) de una silicua de planta silvestre. (C) Detección de GFP en el (IT) de la línea transgénica L31 (F3) de ANAC087. (D, E) Autofluorescencia presente en una semilla en estado embrionario de corazón (HS). (F) Semilla en estado embrionario globular en cuya sección se localizó a GFP en la capa abaxial del tegumento externo (TE.2) y en la capa adaxial del tegumento externo (TE.1). (G) Semilla en estado embrionario torpedo en donde se detectó a GFP en el tegumento. (H) Semilla en estado embrionario torpedo en la cual se localizó a GFP en TE.2, TE.1, en la capa abaxial del tegumento interno (TI.2) y en la capa adaxial del tegumento interno (TI.1). (I) Semilla en estado maduro en donde se detectó señal de GFP en el funículo

(FN). (J, K, L) Localización de GFP en las diferentes capas de los tegumentos TE.2, TE.1, TI.2, TI.1 de una semilla.

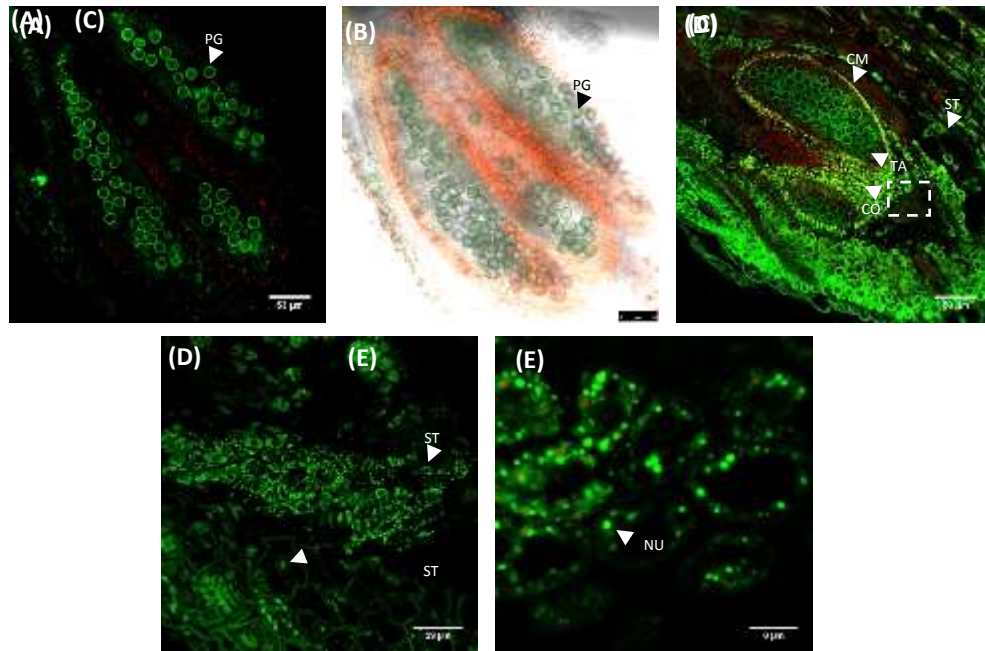


Figura 36. Localización de GFP en cortes longitudinales de anteras de la línea L31 de ANAC087

La expresión de GFP en estos tejidos está dirigida por la región promotora del gen *ANAC087*. (A, B) Corte longitudinal de una antera silvestre, en donde se observa la autofluorescencia de los granos de polen (PG). (C) Corte longitudinal de una antera de la línea L31 (F3), en la cual se detectó a GFP en la capa media (CM), en el tapetum (TA) y en el conectivo (CO). En cuya parte inferior, se observó una región con mayor fluorescencia (D) la cual se detectó en estomas (ST) y con una magnificación (E) se logró distinguir un patrón característico de núcleos (NU).

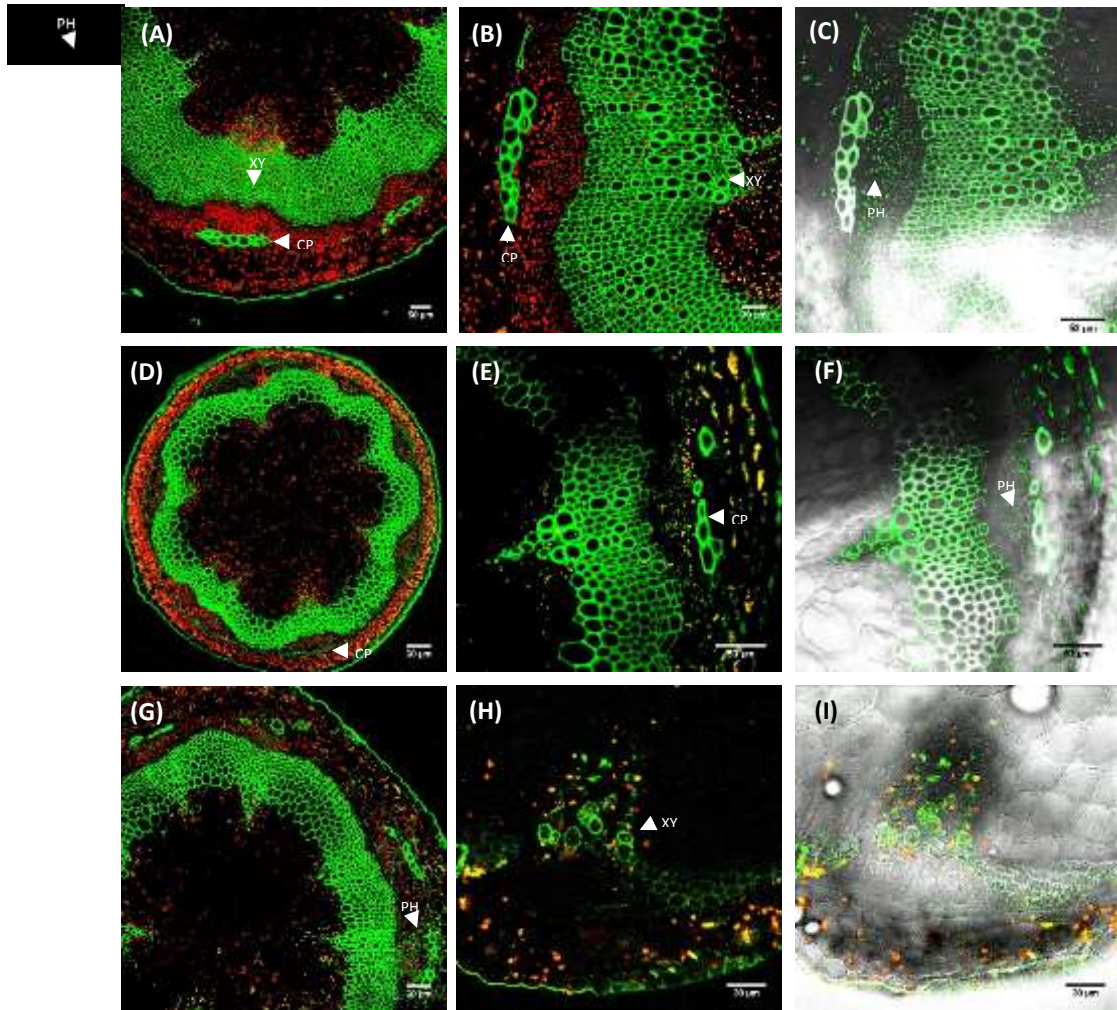


Figura 37. Localización de GFP en cortes transversales de tallos de la línea L31 de ANAC087

(A, B, C) Cortes transversales de tallo secundario en los cuales se detectó señal de GFP en la capa del floema (CP) y en el floema (PH). (D, E, F, G) Cortes transversales de tallo primario, en los cuales la señal de GFP es más continua en los haces vasculares. GFP se detectó igualmente en CP y PH. (H, I) Cortes transversales de tallo primario de una planta silvestre, en donde es posible detectar la autofluorescencia del xilema (XY).

8.6.4 Cuantificación de los niveles endógenos de expresión de *ANAC046/087* en plantas silvestres de *A. thaliana*

Los mayores niveles de expresión del gen *ANAC087* se cuantificaron en tejidos como ápice, tallo, seguido de raíz. En contraste con el gen *ANAC046* que presenta mayores niveles de expresión en tallos y flores.

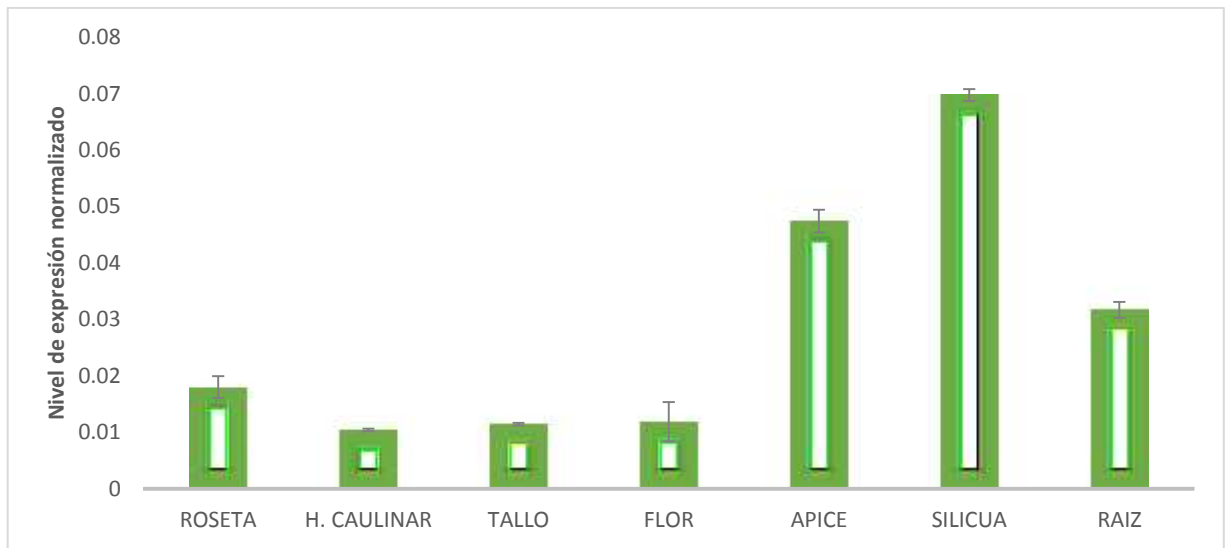


Figura 38. Niveles de expresión del mRNA de *ANAC087*

Cuantificación de los niveles de expresión mediante QRT-PCR, en diferentes tejidos de plantas silvestres de *A. thaliana*. Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen endógeno Ubiquitina 10 de *A. thaliana*.

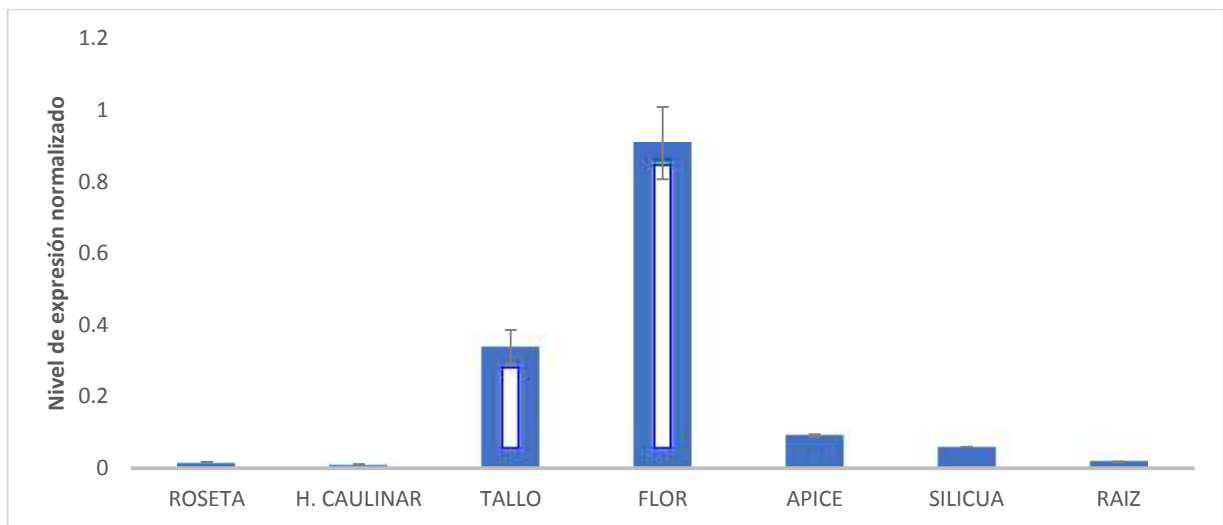


Figura 39. Niveles de expresión del mRNA de ANAC046

Cuantificación de los niveles de expresión mediante QRT-PCR, en diferentes tejidos de plantas silvestres de *A. thaliana*. Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen endógeno Ubiquitina 10 de *A. thaliana*.

8.7 Análisis por microscopia confocal de ANAC046/087 en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* transformadas transitoriamente

La identificación celular de los sitios de acumulación de las proteínas ANAC046/087; se llevó a cabo únicamente en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* transformadas transitoriamente. La metodología que se siguió para este análisis se detalla en el apartado (7.4.2).

8.7.1 Localización celular de los sitios de acumulación de las proteínas de fusión ANAC046::GFP y ANAC087::GFP en *A. thaliana* y *N. benthamiana*

Las plantas transgénicas que contienen el ORF genómico y el ORF de cDNA de *ANAC046* y *ANAC087* están fusionados a GFP. Por lo tanto, mediante microscopía confocal es posible detectar GFP, cuya señal indica el patrón de acumulación de la sobreexpresión de las proteínas mencionadas; ya que en estas construcciones se está utilizando el promotor constitutivo 35S.

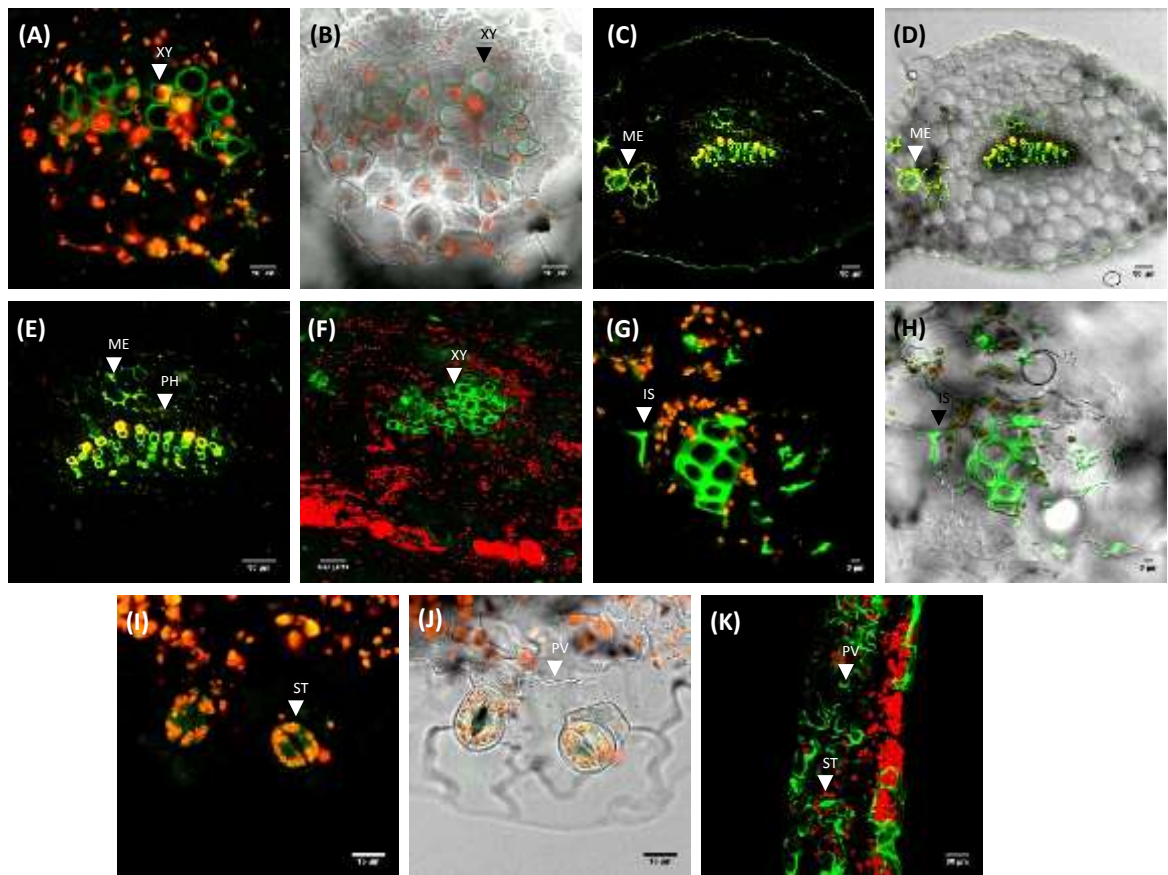


Figura 40. Localización celular de la acumulación de la proteína ANAC046 en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*

(A, B) Corte transversal de hojas de roseta de *A. thaliana* infiltradas únicamente con *A. tumefaciens*, se observa la autofluorescencia del xilema (XY). (C, D, E) Hoja de roseta de una planta transformada transitoriamente con la construcción de sobreexpresión que muestra la detección de GFP en la periferia de las células de mesófilo (ME) y en el floema (PH). (F) Control de hoja de *N. benthamiana* infiltrada únicamente con *A. tumefaciens*. (G, H) Corte transversal de una hoja de *N. benthamiana* transformada transitoriamente, detectando GFP en los espacios intercelulares. (I, J) Detección de la autofluorescencia presente en los estomas (ST) y células pavimento (PV) de *N. benthamiana* infiltrada con *A. tumefaciens*. (K) Detección de GFP asociada a la proteína de interés en ST y PV de una hoja transformada.

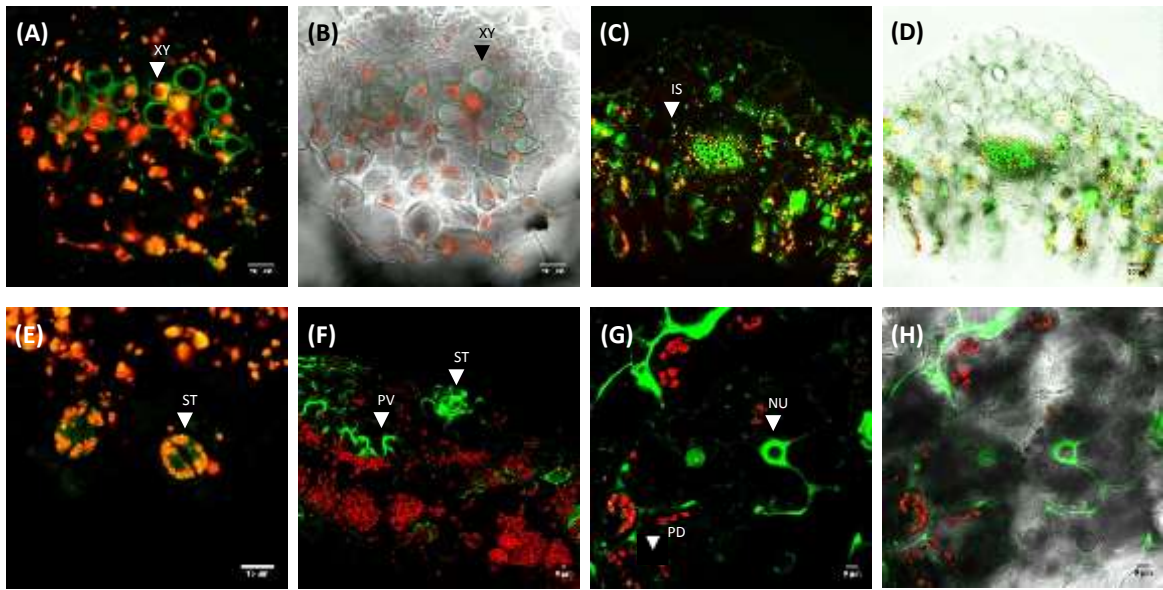


Figura 41. Localización celular de la acumulación de la proteína ANAC087 en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*

(A, B) Control que muestra la autofluorescencia del xilema (XY) en una hoja de *A. thaliana* infiltrada con *A. tumefaciens*. (C, D) Detección de GFP en los espacios intercelulares (IS) de hojas transformadas. (E) Control de hoja de *N. benthamiana* infiltrada con *A. tumefaciens* que muestra la autofluorescencia de los estomas (ST). (F, G, H) Detección de GFP en (ST), células pavimento (PV), núcleo (NU) y plasmodesmos (PD) en hojas transformada.

8.7.2 Localización celular de los sitios de acumulación de las proteínas y las regiones promotoras de *ANAC046* y *ANAC087* en plantas de *N. benthamiana*

Finalmente, se llevó a cabo la transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* con la fusión de las construcciones de sobreexpresión y de las regiones promotoras de cada uno de los genes, es decir; (*ANAC046* ORFg y *ANAC046* PROM), (*ANAC087* ORF cDNA y *ANAC087* PROM) y una fusión total de ambos genes (*ANAC046* ORFg/*ANAC046* PROM/*ANAC087* ORF cDNA/*ANAC087* PROM). Todo esto se llevó a cabo para conocer el patrón de acumulación de esta fusión y si se podría presentar algún cambio en la localización celular de GFP.

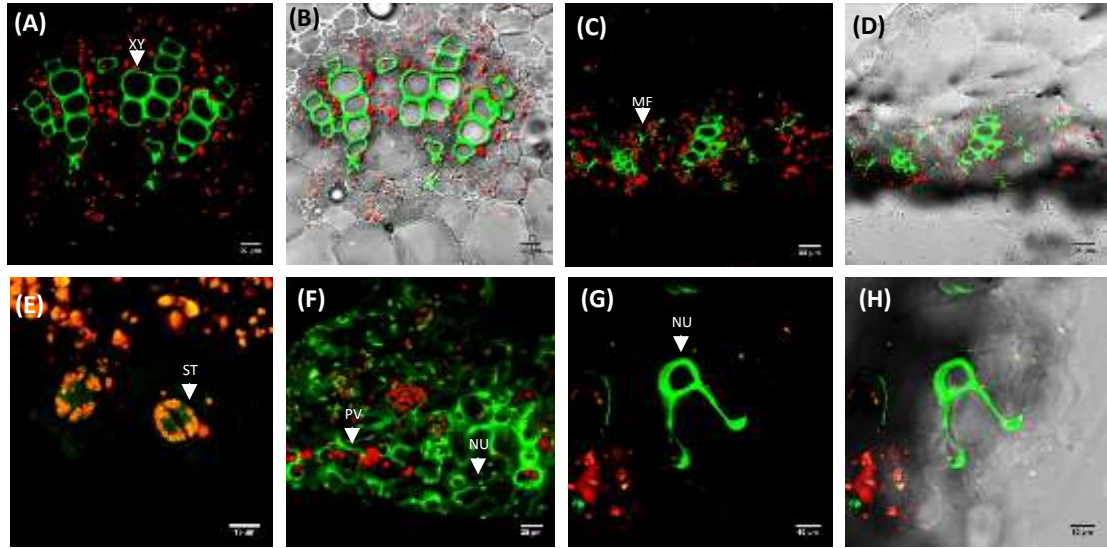


Figura 42. Localización celular de los sitios de acumulación de la fusión de ANAC046 ORFg y ANAC046 PROM en plantas de *N. benthamiana*

(A, B) Corte transversal de peciolo de hojas infiltradas únicamente con *A. tumefaciens*. (C, D) Detección de GFP en células de mesófilo (ME) en un corte de peciolo de planta transformada con ambas construcciones. (E) Control que muestra la autofluorescencia en estomas (ST) de hojas de *N. benthamiana* infiltrada con *A. tumefaciens*. (F, G, H) Detección de GFP en células pavimento (PV) y en núcleo (NU) en hojas transformadas.

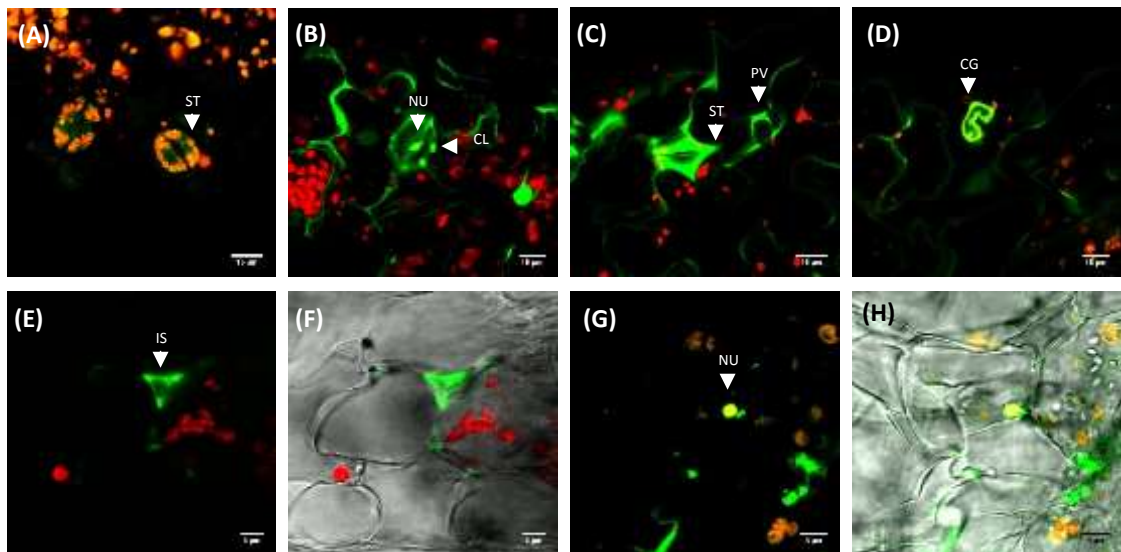


Figura 43. Localización celular de los sitios de acumulación de la fusión de ANAC087 ORF cDNA y ANAC087 PROM en plantas de *N. benthamiana*

(A) Control que muestra la autofluorescencia en estomas (ST) de hojas de *N. benthamiana* infiltrada con *A. tumefaciens*. (B-H) Cortes transversales de hojas transformadas

transitoriamente que muestran la detección de GFP en núcleo (NU), cloroplastos (CL), estomas (ST), células pavimento (PV), células guarda (CG) y en los espacios intercelulares (IS).

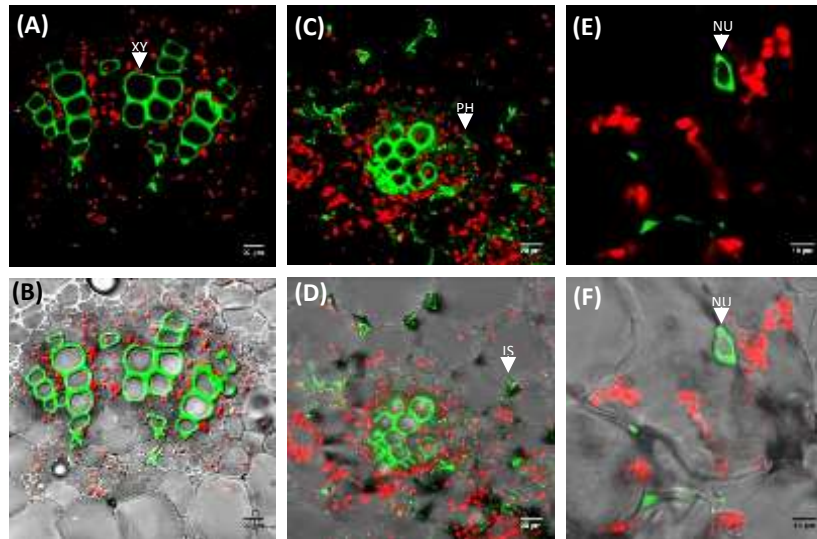


Figura 44. Localización celular de los sitios de acumulación de la fusión total de (ANAC046 ORFg/ANAC046 PROM/ANAC087 ORF cDNA/ANAC087 PROM) en plantas de *N. benthamiana*

(A, B) Corte transversal de peciolo de una hoja infiltrada con *A. tumefaciens*. (C-F) Corte de peciolo de una hoja transformada con todas las construcciones mencionadas, en el cual se detectó a GFP en el floema (PH), en los espacios intercelulares (IS) que conforma el mesófilo y en la periferia del núcleo (NU).

9. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, se cuenta con muy pocos reportes acerca de las funciones que desempeñan los genes homólogos de *CmNACPI* (*ANAC046/087*). Con los resultados que se han obtenido en este trabajo, hemos podido dilucidar algunas otras posibles funciones que desempeñan estos factores de transcripción en *A. thaliana*. Primero, a partir de las líneas transgénicas de sobreexpresión y silenciamiento logramos observar algunos fenotipos, en el caso de las plantas sobreexpresoras del gen *ANAC046*, se detectó que el tamaño de las hojas de roseta era mayor en comparación con una planta silvestre; asimismo, se presentó un mayor número de ramificaciones en estas líneas transgénicas (Figura 23). Por el contrario, en las plantas con silenciamiento génico de *ANAC046* se observó el retraso en el crecimiento y desarrollo de las plantas incluso de algunas líneas no fue posible obtener semillas (Figura 24). De acuerdo con estos resultados, es posible que el gen *ANAC046* desempeñe un papel en la dominancia apical, afectando a la ruta de señalización de auxinas y por lo tanto, induciendo el desarrollo de un mayor número de ramificaciones en las plantas. Sin embargo, estos resultados son diferentes a los obtenidos recientemente por Oda-Yamamizo et al., (2016), quienes reportan que el gen *ANAC046* tiene un papel regulador en la ruta de degradación de la clorofila, puesto que la sobreexpresión de este gen indujo un fenotipo de senescencia temprana, mientras que las mutantes con pérdida de función presentaron un retraso de senescencia y además, un mayor contenido de clorofila. La diferencia en estos resultados en comparación con los nuestros, podría ser atribuida a que en ambos trabajos se utilizaron vectores y tecnologías diferentes. Por ejemplo, en el análisis de Oda-Yamamizo et al., en el caso de silenciamiento génico, se recurrió a la tecnología SRDX, el cual es un represor que resulta en la pérdida de función de *ANAC046* pero también de sus posibles blancos y de otros factores de transcripción funcionalmente redundantes. Mientras, en este proyecto únicamente se indujo el silenciamiento del gen mediante RNA con el vector pBGW1WG2 (II). Sin embargo, analizando todos estos resultados de manera objetiva, quizás *ANAC046* desarrolle múltiples funciones, como por ejemplo, regulación de la senescencia, pero también es posible que active a otros genes blanco que intervengan en diversos procesos involucrados en el desarrollo de las plantas. Un ejemplo claro de esto y que ya ha sido reportado, es que *ANAC046* puede unirse a RCD1 (Radical Induced Cell Death 1), un reclutador celular que es capaz de interactuar con una variedad de factores de transcripción implicados en el desarrollo (O'Shea et al., 2015).

Por otra parte, el silenciamiento del gen *ANAC087* indujo una senescencia temprana en las plantas transgénicas y también se observó un color púrpura en las hojas (Figura 25), lo cual podría hacer referencia a la acumulación de antocianinas, dicho fenotipo será justificado más adelante. Sin embargo, se podría deducir que el gen *ANAC087* posiblemente regule de manera negativa el proceso de senescencia.

Inesperadamente, en las líneas transgénicas que expresan la fusión de GFP::GUS inducida por las regiones promotoras de *ANAC046/087*, observamos algunos fenotipos muy interesantes. Primero, se detectó el desarrollo de rosetas aéreas a lo largo de estas plantas como podemos observar en la Figura 26. Sin embargo, el fenotipo fue más representativo en líneas de la región promotora de *ANAC087*. Como claro ejemplo, se muestran imágenes de la línea L31, en la cual durante la primera generación se observó el desarrollo total de rosetas aéreas (Figura 27). Este resultado fue totalmente inesperado, puesto que únicamente se estaban analizando las regiones promotoras de los genes de interés. Además, la posibilidad de que este fenotipo haya sido causado por la posición en la cual se insertó el T-DNA en el genoma quedó descartada cuando observamos que el fenotipo era reproducible en varias líneas transgénicas y además en diferentes generaciones desde la primera hasta la tercera generación. Es por esto que proponemos la posibilidad de que el promotor y/o la región 5'UTR podrían actuar como secuencias que activan de forma *trans* a los genes endógenos de *ANAC046/087*, o a otros genes, como ART1, involucrado en el control de la formación de dichas estructuras (Wang et al., 2007), desencadenando así sus funciones en distintos mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo de rosetas aéreas en *A. thaliana*. Sin embargo, aún queda por realizar una variedad de análisis que comprueben esta hipótesis. Aunado a esto, en las líneas transgénicas para el análisis de las regiones promotoras, observamos otros fenotipos: las hojas de las rosetas presentaban un crecimiento epinástico en comparación con las hojas de una planta silvestre. Asimismo, en los tallos secundarios, en los intermedios que daban lugar a las rosetas aéreas y en las propias hojas de estas; se observó la aparición de un color púrpura, el cual sugiere una posible acumulación de antocianinas. Se ha reportado que las antocianinas llevan a cabo principalmente un papel de protección de la radiación ultravioleta, protegen a las hojas en respuesta a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico; además de que su acumulación puede retrasar la senescencia (Deikman & Hammer, 1995; Feild et al., 2001). Este último papel no suena desatinado, puesto que como se mencionó anteriormente, posiblemente *ANAC087* es un regulador negativo de la senescencia, quizás esta función se desarrolla gracias la regulación

positiva en la ruta de biosíntesis de las antocianinas, causando así, una acumulación de estas para prevenir la senescencia temprana. Dicha hipótesis resulta ser muy interesante, ya que si se comprobara que *ANAC087* es un regulador negativo de la senescencia, entonces su sobreexpresión podría resultar en un ciclo reproductivo más duradero de las plantas, lo cual es un aspecto muy interesante desde el punto de vista biotecnológico.

Posteriormente, con el fin de identificar en qué tejidos se encontraban activos los promotores de *ANAC046/087*, decidimos llevar a cabo diferentes análisis histoquímicos. Ya que si ambos son genes homólogos de *CmNACPI*, entonces esperaríamos encontrar su expresión en el tejido vascular; y efectivamente así fue. En las Figuras 30 y 31, se muestra que detectamos actividad de la región promotora de *ANAC087* en tejido vascular, tanto en la roseta principal como en las rosetas aéreas, específicamente en la vena central y también en venas secundarias, terciarias y cuaternarias, así como en tricomas y estomas. En un análisis histoquímico más detallado detectamos actividad de GUS en inflorescencias, tallos secundarios e intermedios, tejidos involucrados con el desarrollo del ápice, principalmente en meristemos apicales y yemas axilares; asimismo, en tejidos reproductivos como las anteras, específicamente en el estigma y en el tapetum. El patrón de expresión también se detectó en la raíz principal y en raíces laterales. Dichos resultados, quieren decir que el promotor de *ANAC087* se encuentra activo no únicamente en tejido vascular, sino también en otros tejidos relacionados con el crecimiento apical y el desarrollo reproductivo en los cuales este gen está participando.

En la Figura 35 se muestra el patrón de expresión de la región promotora de *ANAC087* en otras cinco líneas transgénicas con esta misma construcción, dicha actividad se detecta en los mismos tejidos que se mencionaron anteriormente así como en nectarios y semillas.

En cuanto a la región promotora de *ANAC046* encontramos que esta se encuentra activa principalmente en tejidos senescentes como se muestra en la Figura 33. Aunque la actividad también se observó en tejidos como anteras, en el estigma de estas y también en el tejido vascular (vena central, secundaria y terciaria).

Aunado a esto, para obtener resultados con una mayor resolución también se llevó a cabo la transformación de plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* de manera transitoria, realizamos cortes transversales y longitudinales y visualizamos bajo microscopía confocal. En este caso, detectamos la actividad de los promotores mediante la señal de GFP. Los resultados fueron congruentes con lo obtenido mediante ensayos histoquímicos. Detectamos señal de GFP y por

lo tanto actividad de los promotores en el ápice, en las yemas axilares, óvulos, en anteras (filamento y tapetum), en el floema, estomas, núcleos y en tricomas (Figuras 28 y 29). A la vez, se realizó microscopía confocal de una línea de ANAC087 PROM (L31) puesto que ya se contaba con la tercera generación (Figuras 35-37). Se comprobó que el promotor de este gen está activo en el tejido vascular, se detectó señal de GFP en el floema y en la última capa de este en cortes transversales de tallo secundario y primario. Esto confirma que *ANAC087* es un gen homólogo de *CmNACPI*. Asimismo, en esta línea estable también observamos señal en estomas, células de mesófilo, en núcleo, espacios intercelulares, en el floema y también en embriones en estado de torpedo, específicamente en los tegumentos internos y externos; indicando que el gen *ANAC087* posiblemente esté involucrado en el desarrollo embrionario.

Para finalizar el estudio de la expresión de los genes *ANAC046/087*, llevamos a cabo la cuantificación de los niveles de expresión del mRNA de ambos genes en plantas silvestres de *A. thaliana* mediante PCR en tiempo real. Obtuvimos que *ANAC046* se expresa principalmente en tejidos involucrados con el crecimiento y la reproducción de *A. thaliana*, tales como tallos y flores. En contraste con *ANAC087*, detectamos los niveles más altos de expresión en ápice, silicua y raíz, tejidos involucrados principalmente en el desarrollo y crecimiento de la planta (Figuras 38 y 39). Sin embargo, aún falta por cuantificar los niveles de expresión de ambos genes en diferentes etapa fisiológicas y cronológicas de *A. thaliana*, puesto que lo más probable es que los niveles de expresión varíen de acuerdo con las diferentes etapas.

Por último, llevamos a cabo la identificación de la localización celular de las proteínas de fusión (ANAC046/087 ORF::GFP). Para esto, también utilizamos plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* transformadas de manera transitoria. Identificamos que la proteína ANAC046 se acumula principalmente en células de mesófilo, espacios intercelulares, floema, estomas y células pavimento (Figura 40). El mismo patrón de acumulación se observó cuando transformamos plantas con las construcciones de sobreexpresión (ANAC046 ORF) y de la región promotora (ANAC046 PROM) (Figura 42), obteniendo también señal en la periferia nuclear. Estos resultados indican que es posible que la proteína de ANAC046 pueda transportarse intercelularmente.

En cuanto a la proteína ANAC087, detectamos su acumulación en estomas, células pavimento, espacios intercelulares, periferia nuclear y al parecer también en plasmodesmos (Figura 41). En la transformación de plantas con (ANAC087 ORF) y (ANAC087 PROM) también detectamos

acumulación en estomas, células pavimento, células guarda, espacios intercelulares y núcleo (Figura 43). De la misma manera, esto indica que la proteína de ANAC087 se está movilizándose entre diferentes compartimentos celulares. Lo cual no está fuera de lugar, ya que es lógico encontrar ambas proteínas en el núcleo puesto que son factores de transcripción, pero recordando todos los tejidos y compartimentos celulares en los cuales fueron localizadas, podría sugerirse que tal vez estas proteínas desempeñan una función no celular autónoma.

Para reforzar estos resultados, nos pareció interesante realizar una transformación transitoria con ambas proteínas y también con ambas regiones promotoras (Figura 44), y efectivamente, el patrón de acumulación de GFP fue similar a lo descrito anteriormente, detectando señal en el floema, la periferia nuclear y en espacios intercelulares.

Finalmente, resumiendo todos estos resultados, podemos decir que es muy probable que los genes *ANAC046/087* desempeñen una diversidad de papeles en *A. thaliana*. Puesto que por el simple hecho de ser factores de transcripción, estos pueden activar distintos reguladores moleculares en respuesta a diferentes condiciones ambientales, pero también en respuesta a diferentes etapas de desarrollo. Sin embargo, aunque en este proyecto no quedan totalmente dilucidados los papeles de dichos factores de transcripción, los resultados presentados dan paso a nuevas investigaciones que sin duda alguna nos conducirán a descubrir plenamente las implicaciones de estos genes en *A. thaliana*.

Resultaría muy interesante llevar a cabo heteroinjertos para concluir definitivamente que *ANAC046/087* son efectivamente homólogos funcionales de *CmNACPI* y que por lo tanto, también se transportan a larga distancia a través del floema. De esta manera se contribuiría así, a postular un modelo que describa el transporte de transcritos en plantas vasculares.

10. CONCLUSIONES

- El gen *ANAC046* podría desempeñar un papel importante en el desarrollo y la dominancia apical de *A. thaliana*.
- El gen *ANAC087* es un posible regulador negativo de la senescencia.
- El gen *ANAC087* es un posible regulador positivo de la ruta de biogénesis de las antocianinas, regulando a su vez el retraso de la senescencia.
- El promotor y/o la región 5'UTR podrían actuar como secuencias que activan de forma *trans* a los genes endógenos (*ANAC046/087*) de *A. thaliana*, desencadenando así; sus interacciones en una serie de mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo del fenotipo de rosetas aéreas.
- Las regiones promotoras de *ANAC046/087* se encuentran activas en tejido vascular, por lo tanto, ambos genes son homólogos de *CmNACPI*.
- La localización celular de las proteínas ANAC046/087 en distintos tejidos y compartimentos celulares podría indicar una función no celular autónoma.
- Las proteínas ANAC046/087 presentan una localización múltiple lo que sugiere que puede transportarse intercelularmente.

PERSPECTIVAS

- Sería muy importante evaluar de manera cuantitativa el desarrollo de los fenotipos del silenciamiento y sobreexpresión de *ANAC046*, por ejemplo, una vez obteniendo líneas transgénicas de la tercera generación, se recomienda medir el área foliar de las hojas de roseta, asimismo, cuantificar el número de ramificaciones que las plantas sobreexpresoras presentan. Y para complementar, se podría hacer una cuantificación de los niveles de auxinas en estas líneas. Finalmente, presentar datos estadísticos que validen la diferencia de estos fenotipos con respecto a plantas silvestres.
- En las plantas silenciadas del gen *ANAC087*, resultaría muy interesante conocer los niveles de clorofila así como también llevar a cabo PCR en tiempo real para cuantificar los niveles de expresión de dicho gen en diferentes etapas de desarrollo de varias líneas transgénicas.
- Para comprobar nuestra hipótesis de que el promotor y/o la región 5'UTR está activando a los genes endógenos *ANAC046/087* en *A. thaliana*; se propone llevar a cabo PCR en tiempo real para determinar si en estas líneas transgénicas los niveles de expresión de ambos genes aumentan considerablemente con respecto a plantas silvestres.
- Aunado a esto, se considera importante realizar una secuenciación masiva de las plantas transgénicas de regiones promotoras con el fin de obtener un perfil de miRNAs que posiblemente podrían unirse a las regiones promotoras.
- Para complementar las dos últimas propuestas, de igual forma es importante cuantificar los niveles de acumulación de antocianinas en estas líneas transgénicas. De esta forma podremos concluir totalmente, si *ANAC087* regula negativamente la senescencia, mediante la activación de ruta de biogénesis de las antocianinas.
- Para dilucidar completamente si *ANAC046/087* son genes homólogos funcionales de *CmNACPI*, se propone llevar a cabo heteroinjertos entre *A.thaliana* y *N. benthamiana* y así identificar si estos son capaces de transportarse a larga distancia a través del floema.
- Finalmente, mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación podría determinar que proteínas están interactuando con *ANAC046/087* y así identificar si realmente *ANAC046* se une a proteínas relacionadas con la degradación de la clorofila y en el caso de *ANAC087*, conocer si puede interactuar con proteínas involucradas en la ruta de biogénesis de antocianinas.

REFERENCIAS

- Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., & Tasaka, M. (1997). Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis : An Analysis of the cup-shaped cotyledon Mutant. *The Plant cell*, 9(6), 841–857.
- Atabekov, J.G. & Taliany, M.E. (1990). Expression of plant virus-coded transport function by differential viral genomes. *Advances in virus research*, 38, 201-248.
- Banerjee, A. K., Chatterjee, M., Yu, Y., Suh, S.-G., Miller, W. A., & Hannapel, D. J. (2006). Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *The Plant cell*, 18(12), 3443–3457. doi:10.1105/tpc.106.042473
- Bernhardt, K., Vigelius, K. S., Wiese, J., Linka, N., Weber, P.M. (2012). Agrobacterium-mediated Arabidopsis thaliana transformation: an overview of T-DNA binary vectors, floral dip and screening for homozygous lines. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*. 22: 19-28.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., & Schaad, M. C. (1996). Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *The Plant cell*, 8(10), 1669–1681.
- Chen, H., Ahmad, M., Rim, Y., Lucas, W. J., Kim, J., & Kim, J. (2013). Evolutionary and molecular analysis of Dof transcription factors identified a conserved motif for intercellular protein trafficking. *The New phytologist*, 198(4), 1250–1260.
- Collinge, M., & Boller, T. (2001). Differential induction of two potato genes, Strpx2 and StNAC, in response to infection by Phytophthora infestans and to wounding. *Plant molecular biology*, 16(6), 521–529.
- Conn, S. J., Hocking, B., Dayod, M., Xu, B., Athman, A., Henderson, S., Gilliam, M. (2013). Protocol : optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of Arabidopsis thaliana and other plants, *Plant Methods*, 9(4), 1–11.
- Deikman, J., Hammer, E. F. (1995). Induction of Anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 08, 47-57.

- Esau, K. (1939). Development and structure of the phloem tissue. *The botanical review*. 07, 373-428.
- Feild, Taylor S, David W Lee, & N Michele Holbrook. (2001). Why Leaves Turn Red in Autumn. The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-Osier Dogwood. *Plant Physiology*. 127 (10), 566–574. doi:10.1104/pp.010063.566.
- Fuentes-Ramírez, E. et al., (2013). *Análisis de la función de CmNACP1 en calabaza y búsqueda de sus homólogos funcionales en Arabidopsis thaliana*. Tesis de maestría no publicada. CINVESTAV, Unidad Zacateco.
- Fukuda, H. (2004). Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(5), 379–91. doi:10.1038/nrm1364
- Furuta, M, K. (2014). Arabidopsis NAC46/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation. *Science*. 435(10), 933-937. doi:10.1126/science.1253736
- Gensel, P. G. (2008). The Earliest Land Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 459–477. doi:10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173526
- Haywood, V., Yu, T.-S., Huang, N.-C., & Lucas, W. J. (2005). Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 42(1), 49–68. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02351.x
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Lydiate, D. (2003). Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant molecular biology*, 53(3), 383–397.
- Huang, N.-C., & Yu, T.-S. (2009). The sequences of Arabidopsis GA-INSENSITIVE RNA constitute the motifs that are necessary and sufficient for RNA long-distance trafficking. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 59(6), 921–9. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03918.x

- Hull, R. (1989). The movement of viruses in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 213-240.
- Ishizaki, K. (2016). Evolution of land plants: insights from molecular studies on basal lineages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 8451(9), 1–8. doi:10.1080/09168451.2016.1224641
- Kehr, J., & Buhtz, A. (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of experimental botany*, 59(1), 85–92. doi:10.1093/jxb/erm176
- Ken. (2007). Protein production and purification from *N. benthamiana*. Adaptado de *Plant Journal*. 33, 949-956.
- Kenrick, P., & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389, 33–39.
- Kim, J. Y., Yuan, Z., Cilia, M., Khalfan-jagani, Z., & Jackson, D. (2002). Intercellular trafficking of a KNOTTED1 green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 4103-4108.
- Kim, M., Canio, W., Kessler, S., & Sinha, N. (2001). Developmental Changes Due to Long-Distance Movement of a Homeobox Fusion Transcript in Tomato. *Science*, 293(7), 12–15.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & development*, 19, 1855–1860. doi:10.1101/gad.1331305.
- Kühn, C., Franceschi, V. R., Schulz, A., & Frommer, W. B. (1997). Macromolecular Trafficking Indicated by Localization and Turnover of Sucrose Transporters in Eucleate Sieve Elements, *Science*. 275, 1298-1300.

- Lough, T. J., Lee, R. H., Emerson, S. J., Forster, R. L. S., & Lucas, W. J. (2006). Functional analysis of the 5' untranslated region of potexvirus RNA reveals a role in viral replication and cell-to-cell movement. *Virology*, 351(2), 455–465. doi:10.1016/j.virol.2006.03.043
- Lu, K.-J., Huang, N.-C., Liu, Y.-S., Lu, C.-A., & Yu, T.-S. (2012). Long-distance movement of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T RNA participates in systemic floral regulation. *RNA biology*, 9(5), 653–62. doi:10.4161/rna.19965
- Lucas, W. J., Bouche-pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., & Hake, S. (1995). Homeodomain Protein and Its mRNA Through Plasmodesmata. *Science*, 270(12), 1980-1983.
- Lucas, W. J., & Lee, J.-Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(9), 712–726. doi:10.1038/nrm1470
- Meshi, T., Watanabe, Y., & Saito, T. (1987). Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *The EMBO journal*, 6(9), 2557–2563.
- Notaguchi, M., Wolf, S. & Lucas, William J, 2012. Phloem-mobile Aux/IAA transcripts target to the root tip and modify root architecture. *Journal of integrative plant biology*, 54(10), 760–772.
- Oda-yamamizo, C., Mitsuda, N., Sakamoto, S., & Ogawa, D. (2016). The NAC transcription factor ANAC046 is a positive regulator of chlorophyll degradation and senescence in Arabidopsis leaves. *Nature Publishing Group*, (1), 1–12. doi:10.1038/srep23609
- Olsen, A. N., Ernst, H. a, Leggio, L. Lo, & Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in plant science*, 10(2), 79–87. doi:10.1016/j.tplants.2004.12.010
- O'Shea, C., Kriger, M., Stender, G.P., Kregelund, B. B., Willemoes, M., Striker, K. (2015). Protein intrinsic disorder in Arabidopsis NAC transcription factors: transcriptional activation by ANAC013 and ANAC046 and their interactions with RCD1. *Biochemical Journal*. 465, 281-294. doi: 10.1042/BJ20141045.

- Palauqui, J., Elmayan, T., & Pollien, J. (1997). Systemic acquired silencing : transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO journal*, 16(15), 4738–4745.
- Ren, T., Qu, F., & Morris, T. J. (2000). HRT Gene Function Requires Interaction between a NAC Protein and Viral Capsid Protein to Confer Resistance to Turnip Crinkle Virus. *The Plant cell*, 12(10), 1917–1925.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., Byung-Kook, H., Gang, L., & William, J. L. (2011). Vascular expression in Arabidopsis is predicted by the frequency of CT / GA-rich repeats in gene promoters. *The Plant Journal*, 67(5), 130–144. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04581.x
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., & Lucas, W. J. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA : implications for supracellular regulation in plants. *Development (Cambridge, England)*, 126, 4405–4419.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., & Lucas, W. J. (2001). The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 202–209.
- Sablowski, R. W. M., & Meyerowitz, E. M. (1998). A Homolog of NO APICAL MERISTEM Is an Immediate Target of the Floral Homeotic Genes APETALA3 / PISTILLATA. *Cell*, 92(1), 93–103.
- Sambrook J., Russell D.W., (2001). Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Scarpella, E. (2004). Pattern formation in the vascular system of monocot and dicot plant species. *New Phytologist*. 164, 209 –242. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01191.x
- Souer, E., Houwelingen, A.V., Kloos, D., Mol, J. & Koes, R. (1996). The *No Apical Meristem* Gene of Petunia Is Required for Pattern Formation in Embryos and Flowers and is Expressed at Meristem and Primordia Boundaries. *Cell*, 85(4), 159-170.

- Thieme, C. J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., Kragler, F. (2015). Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants*, 15025(3), 1-7. doi:10.1038/nplants.2015.25
- Turgeon, R., & Wolf, S. (2009). Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annual review of plant biology*, 60, 207–21. doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092045
- Vroemen, C. W., Mordhorst, A. P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M. A. C. J., & Vries, S. C. De. (2003). The CUP-SHAPED COTYLEDON3 Gene Is Required for Boundary and Shoot Meristem Formation in Arabidopsis. *The Plant cell*, 15(7), 1563–1577. doi:10.1105/tpc.012203.1994
- Wang, Q., Sajja, U., Rosloski, S., Humphrey, T., Chul-Kim, M., Bomblies, K., Weigel, D., & Grbic, V. (2007). *HUA2* Caused Natural Variation in Shoot Morphology of *A. thaliana*. *Current Biology*, 17(9), 1513-1519.
- Weigel, D., Glazebrook, J. (2002). Arabidopsis A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., & Chua, N. (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & development*, 3024–3036. doi:10.1101/gad.852200.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Guo, H., García, J.A., & Gutierrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interactions with geminivirus protein. *Plant Molecular Biology*, 39(4), 647-656.
- Xoconostle-Cázares, B., (1999). Plant Paralog to Viral Movement Protein That Potentiates Transport of mRNA into the Phloem. *Science*, 283(5398), 94-98.
- Xu, X. M., Wang, J., Xuan, Z., Goldshmidt, A., Borrill, P. G. M., Hariharan, N., Jackson, D. (2011). Chaperonins Facilitate KNOTTED1 Cell-to-Cell Trafficking and Stem Cell Function. *Science*, 333(6046), 1141-1144.

- Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., & Demura, T. (2011). Vascular-related NAC-domain 7 directly regulates a broad range of genes for xylem vessel differentiation. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 66(4), 579-590. doi:10.1186/1753-6561-5-S7-O37
- Yamaguchi, M., Ohtan, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H, & Demura, T. (2010). VND-INTERACTING2, a NAC Domain Transcription Factor, Negatively Regulates Xylem Vessel Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22(4), 1249-1263.
- Yoo, B., Kragler, F., Varkonyi-gasic, E., Haywood, V., Archer-evans, S., Lee, Y. M., Lucas, W. J. (2004). A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *The Plant cell*, 16(8), 1979–2000. doi:10.1105/tpc.104.023614.

ANEXO 1

Tabla A. 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en las construcciones genéticas

Gen	Región a amplificar	Tamaño del amplicón (pb)	Secuencia de oligonucleótidos
<i>At3g04060</i> (<i>ANAC046</i>)	ORF	1325	DIRECTO ATGGTGAAGAAGGCGGCGTAGTTGTGA
			REVERSO GCTAGTATATAAATCTTCCCAGAAGATC
	SiRNA	200	DIRECTO ACAAAGGTATGATCAAGTTGGAGCATTCTCTTG
			REVERSO GGCCTGGGCTGGGTCCACATACCCCAATAAG
Promotor	3187	CTATATATATGTATGCTTGATCAAGAACAAG	
<i>At5g18270</i> (<i>ANAC087</i>)	ORF	1005	DIRECTO ATGGCGGTTGTGGTTGAAGAAGGTGTGGTG
			REVERSO GAAGTCCCACAAGTCCCCCTCAAGTCACA
	siRNA	200	DIRECTO TGATCAAGATGGAGCAATCACTTGTTAGTGT
			REVERSO CGACAAATCACCAATTTTCAACGGCGTG
PROM	2988	CACTTTATATGTTTTTCAAGTAATAAAGATTC	
<i>Bar</i>	Parte del ORF	120	DIRECTO GTGCTTGTCTCGATGTAG
			REVERSO GAGGGGATCTACCATGAG
			DIRECTO TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
<i>GFP</i>	ORF	720	REVERSO TCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT

La nomenclatura de las construcciones para facilidad de notación es la siguiente, ORF: marco de lectura abierto de cada gene y no contiene codón de paro. siRNA: silenciamiento inducido por RNA. PROM: región promotora de cada gen incluyendo la región 5'UTR. La amplificación del gen *Bar* y *GFP* fueron utilizados para corroborar las líneas transgénicas.

ANEXO 2

Tabla 2.1 Condiciones de amplificación para los insertos de *ANAC046/087*

Gen	Amplicón	Tamaño de amplicón (pb)	Tm (°C)	Tiempo de extensión (m:s)	Número de ciclos
<i>At3g04060</i> (<i>ANAC046</i>)	ORFg	1325	60	01:20	30
	ORFcDNA	1014	60	01:00	30
	siRNA	200	56	00:15	25
	Promotor	3187	62	03:20	30
<i>At5g18270</i> (<i>ANAC087</i>)	ORFcDNA	1005	62	1:10	25
	siRNA	200	66	00:15	25
	Promotor	2988	62	3:00	30

Tabla 2.2 Condiciones de amplificación para la comprobación de líneas transgénicas

Gen	Amplicón	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Tiempo de extensión (m:s)	Número de ciclos
<i>Bar</i>	Parte del ORF	120	60	00:10	28
<i>GFP</i>	ANAC046 ORFg::GFP	920	65	1:00	35
	ANAC046 ORF cDNA:: GFP	920	65	1:00	35
	ANAC087 ORF CDNA:: GFP	920	62	1:00	35