



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

Coordinación de estudios de Posgrado

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Caracterización de la expresión específica en tejidos y órganos
del gen *AtSpn2* y de los genes que codifican enzimas sacarosa-
fosfato sintasas (SPS), en *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS EN
MANEJO Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS NATURALES**

Presenta:

M.C. MARÍA GLORIA SOLÍS GUZMÁN

Director de Tesis

D.C. Miguel Martínez Trujillo

D.C. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Morelia Michoacán, Mayo 2017



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de
Doctorado en Ciencias Biológicas

DR. CARLOS CORTÉS PENAGOS
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Caracterización de la expresión específica en tejidos y órganos del gen *AtSpen2* y de los genes que codifican enzimas sacarosa-fosfato sintasas (SPS), en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh" presentado por la **MC. MARÍA GLORIA SOLÍS GUZMÁN**, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctora en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, 06 de abril de 2017

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Miguel Martínez Trujillo
Director de Tesis



Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Co director



Dr. José López Bucio
Vocal




Dr. Joel Edmundo López Meza
Vocal



Dr. Lenin Sánchez Calderón
Vocal

c.c.p. Archivo de la OCyMRN



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO Y CO-ASESORÍA DEL D.C. GERARDO RAFAEL ARGÜELLO ASTORGA. PARA SU REALIZACIÓN SE CONTÓ CON EL APOYO DEL CONACYT, PROYECTO CB-2011-169769

A mi princesa Gloria Noemí

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al D.C. Miguel Martínez Trujillo, por todo el apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo, mil gracias.

Al D.C. Gerardo R. Argüello Astorga, por todos sus acertados comentarios para el mejoramiento de este trabajo.

Al comité sinodal integrado por: D.C. Joel E. López Meza, D.C. José López Bucio y D.C. Lenin Sánchez Calderón, por sus aportes y comentarios realizados a lo largo de estos años de trabajo.

A la D.C. Patricia Ríos Chávez y M.C. Luis María Suárez Rodríguez por su asesoría técnica durante la realización de éste trabajo

A todos los integrantes del laboratorio de Genética y Microbiología, muchas gracias.

A la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por la beca otorgada.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I. ANTECEDENTES GENERALES	3
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo experimental	3
1.2. El genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.3. Recursos y bases de datos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.4. Caracterización de genes en <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
1.5. El gen At4g12640 de <i>Arabidopsis thaliana</i> de función desconocida.....	9
1.6. La familia de proteínas de tipo Split ends (Spen)	11
1.7. Las proteínas Spen de plantas y los genes que las codifican.	13
1.8. El gen At4g12640 interacciona <i>in vivo</i> con la región 5' del ARN del gen sacarosa fosfato sintasa (<i>sps1</i>) de arroz.....	15
1.9. Las enzimas sacarosa-fosfato sintasas (SPS)	16
1.10. Los genes <i>sps</i> son regulados transcripcional y postraduccionalmente	21
II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	26
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
VI. RESULTADOS	28
6.1. Expression analysis of the <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>AtSpen2</i> gene, and its relationship with other plant genes encoding Spen proteins	29
ABSTRACT	29
INTRODUCTION.....	30

MATERIALS AND METHODS.....	33
RESULTS	37
DISCUSSION	49
CONCLUSION.....	54
REFERENCES.....	54
6.2. The <i>Arabidopsis thaliana</i> sucrose-phosphate synthase (<i>sps</i>) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress.....	59
ABSTRACT	59
INTRODUCTION.....	60
MATERIALS AND METHODS.....	64
RESULTS	68
DISCUSSION	79
REFERENCES.....	82
VII. DISCUSIÓN GENERAL	88
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	93
IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	94
X. ANEXO. Documentos de divulgación generados.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I.1. Comparación del porcentaje de genes identificados por distintos métodos en los genomas de diferentes especies de plantas.....	9
Figura I.2. El gen At4g12640 de <i>Arabidopsis thaliana</i> codifica para una proteína de tipo Spen de función desconocida	11
Figura I.3. Secuencia básica conservada en las proteínas Spen.....	14
Figura I.4. Región 5' líder del gen <i>sps1</i> de arroz.....	16
Figura I.5. Síntesis de sacarosa.....	18
Figura I.6. Análisis evolutivo de las enzimas SPS.....	21
Figura IV.1. Estrategia experimental utilizada en los estudios del gen <i>AtSpen2</i> y los genes <i>AtSPS1F</i> , <i>AtSPS2F</i> , <i>AtSPS3F</i> y <i>AtSPS4F</i> , de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
Figure 6.1.1. The <i>AtSpen2</i> gene encodes a Spen putative protein.....	39
Figure 6.1.2 Dendrogram inferred using Neighbor-Joining of plant Spen proteins derived from the SPOC domain comparisons.....	41
Figure 6.1.3. Analysis of growth and development in <i>A. thaliana</i> lines	43
Figure 6.1.4. <i>AtSpen2</i> expression levels in <i>A. thaliana</i> lines.....	45
Figure 6.1.5. Putative <i>cis-regulatory</i> elements in the <i>AtSpen2</i> promoter.....	46
Figure. 6.1.6. Expression conferred in by the <i>AtSpen2</i> promoter region in different organs and tissues.....	48
Figure 6.2.1. Steps in the construction of vectors with the promoter regions of the <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>sps</i> genes fused to the <i>gfp::uidA</i> reporter genes.	69
Figure 6.2.2. Steps in the <i>Arabidopsis thaliana</i> transformation with the constructed <i>sps</i> vectors.....	70
Figure 6.2.3. Expression conferred by the promoters of the <i>sps</i> genes in <i>A. thaliana</i> vegetative structures.....	71
Figure 6.2.4. Expression conferred by the promoters of the <i>sps</i> genes from <i>A. thaliana</i> in stele and columella roots.....	72
Figure 6.2.5. Expression conferred by the promoters of the <i>sps</i> genes in <i>Arabidopsis thaliana</i> flowers.....	73
Figure 6.2.6. Transcripts levels of the <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>sps</i> genes.....	75
Figure 6.2.7. Effect of osmotic stress on the root growth and proline levels in <i>Arabidopsis thaliana</i>	76

Figure 6.2.8. Effect of osmotic stress on the transcript levels of the <i>sps</i> genes in <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
Figure 6.2.9. Effect of osmotic stress on the expression of the <i>abi4::uidA</i> genetic marker in <i>Arabidopsis thaliana</i> plants.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I.1. Resumen de las características genómicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
Tabla I.2. Bases de datos bioinformáticos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Tabla I.3. Descripción del gen At4g12640.	10
Tabla I.4. Genes reportados en plantas y algunas cianobacterias que codifican enzimas sacarosa-fosfato sintasas (SPS).	20
Table. 6.1.1. Comparison of organ and tissue-specific expression patterns of the <i>uidA</i> reporter gene directed by the <i>AtSpen2</i> and <i>fpa</i> gene promoters in <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	51
Table 6.2.1. Comparison of organ and tissue-specific expression patterns of the <i>sps</i> genes in <i>A. thaliana</i> , between the reported by Volkert et al. (2014) and this work.	74

RESUMEN

Las proteínas de tipo Spen tienen, al menos, un dominio que permite la unión a ARN (RRM) y otro dominio llamado SPOC, que participa en interacciones con otras proteínas, por lo que las proteínas Spen de plantas están involucradas en la regulación de diferentes procesos biológicos. El gen At4g12640 de *Arabidopsis thaliana*, codifica para una proteína putativa de tipo Spen de función desconocida. Mediante experimentos de interacción *in vivo* con el sistema de tres híbridos en levadura, se determinó que la proteína codificada por el gen At4g12640 interactúa de manera específica con la región 5' líder (no traducida) del ARNm del gen *sps1* de arroz, el cual codifica una enzima que sintetiza sacarosa. Para entender el significado biológico de esta interacción, se analizó bioinformáticamente el gen At4g12640 (denominado *AtSpen2* en este trabajo) y su proteína putativa, además se caracterizó la actividad específica en tejidos y órganos del promotor de éste gen, así como las regiones reguladoras de los cuatro genes de *A. thaliana* que codifican enzimas sacarosa-fosfato sintasas (SPS).

El análisis bioinformático reveló que el dominio SPOC de *AtSpen2* presenta baja identidad en secuencia con el dominio equivalente de la segunda proteína Spen de *A. thaliana*, FPA, identidad que es incluso menor a la que exhibe respecto a proteínas Spen de otras especies, como OsRRM de arroz. Se analizó el crecimiento, desarrollo y tiempo de floración de líneas knock-out o de pérdida de función (KO), y transgénicas (OE) que sobre-expresan el gen *AtSpen2*, pero en ambos casos no se encontraron diferencias significativas con respecto a la línea silvestre Col-0. Se obtuvieron plantas de *A. thaliana* transformadas con construcciones genéticas que llevan fusionada la región promotora del gen *AtSpen2* a los genes reporteros *uidA::gfp*. Los resultados demostraron que la expresión está asociada al tejido vascular en diferentes órganos: raíz, hojas cotiledonares y verdaderas, tallo floral y gineceo; además, se observó expresión en los óvulos y embriones en desarrollo en la fase globular. La expresión determinada experimentalmente sugiere que la función del gen *AtSpen2* está asociada al tejido vascular, probablemente involucrada en procesos de transporte y/o en la formación del tejido mencionado.

La enzima sacarosa-fosfato sintasa (SPS), cataliza la reacción entre UDP-glucosa y la fructosa 6-fosfato que genera sacarosa-6-fosfato, la cual es desfosforilada por la sacarosa-6-fosfato fosfatasa (SPP), para sintetizar sacarosa. En el genoma de *A. thaliana* se encuentran presentes 4 genes que codifican para proteínas SPS. En este trabajo se generaron plantas transgénicas que contienen la región promotora de cada gen *sps* de *A. thaliana* fusionada a los genes reporteros *uidA::gfp*, para determinar sus niveles de expresión en órganos y tejidos. Se observó un patrón de expresión en las hojas cotiledonares y verdaderas, así como en el tejido vascular, en los casos de los promotores *AtSPS1F*, *AtSPS2F* y *AtSPS3F*. En la raíz, la expresión se observó en el cilindro central, el periciclo y en las células de la columnela, por lo que se sugiere la existencia de ciclos de síntesis y degradación de sacarosa en los órganos sumidero. El patrón de actividad del promotor *AtSPS4F* sugiere que éste gen está involucrado en el desarrollo de los embriones. Se analizó además, el efecto del estrés osmótico en los niveles de transcripción de los 4 genes *sps*: La expresión transcripcional de *AtSPS2F* aumentó más de 4 veces, la de *AtSPS4F* se duplicó, y la expresión de *AtSPS1F* y *AtSPS3F* no se modificó.

Los resultados indican que la función de *AtSpen2* ha divergido del gen *FPA* en *A. thaliana* en parte por la divergencia del dominio regulador SPOC aunado al diferente patrón de expresión transcripcional de ambos genes. Por otro lado, la regulación transcripcional de los genes *sps* de *A. thaliana* muestra diferencias y traslapes a nivel de tejidos y órganos, lo que posiblemente les permite contribuir conjuntamente en la síntesis de sacarosa en algunos sitios y desempeñar su actividad de manera individual en otros sitios, modulando así la síntesis de sacarosa de una manera más fina; además, la diferencia en la expresión transcripcional de los genes *sps* en respuesta al estrés osmótico, pudiera ajustar adecuadamente la síntesis de sacarosa y, junto con otras respuestas, lograr la adaptación al estrés hídrico.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, *Spen*, *AtSpen2*, genes *sps*, sacarosa.

ABSTRACT

Spen proteins have at least one RNA binding (RRM) domain and a SPOC domain which is involved in protein-protein interactions; Spen proteins play a role in different biological processes. The *Arabidopsis thaliana* gene At4g12640 of unknown function, codes for a putative Spen-like protein. Using the yeast three-hybrid system, it was determined that protein encoded by At4g12640 gene specifically interacts with 5' RNA leader region of *sps1* gene in rice, encoding an enzyme that allows the synthesis of sucrose. To understand the biological significance of this interaction, we analyzed At4g12640 gene (called *AtSpen2* in this work) bioinformatically and its putative protein. In addition, we have characterized the tissue and organ specific activity of the *AtSpen2* gene promoter. Furthermore, the activities of the upstream sequences of the four genes of *A. thaliana* encoding sucrose-phosphate synthase (SPS) enzymes were assessed in transgenic plants by using fusions to reporter genes. Bioinformatic analyses revealed that the SPOC domain of *AtSpen2* protein exhibits low sequence identity to its equivalent domain in FPA (i.e., *AtSpen1* protein) of *A. thaliana*; the low sequence identity between the two Spen proteins of *Arabidopsis* is even lower than that exhibited with Spen proteins from other plant species, such as rice OsRRM. Development and flowering time of *AtSpen2* knock-out line (KO) as well in transgenic lines overexpressing *AtSpen2* (OE) were analyzed, and surprisingly no significant phenotypic differences were observed respect to wild-type Col-0 line. We obtained *A. thaliana* plants transformed with a genetic construct that carries the promoter region of *AtSpen2* fused to reporter genes *uidA::gfp*. Expression of the latter genes were observed at the vascular tissue of various organs: root, cotyledonary leaves, true leaves, floral stem and gynoecium. *AtSpen2* expression was also detected in developing embryos at globular phase. This expression pattern suggests that *AtSpen2* has a function at the vascular tissue level, either involved in transport processes and/or on its formation.

The sucrose-phosphate synthase (SPS) catalyzes the reaction between UDP-glucose and fructose-6-phosphate to form 6-phosphate sucrose, which is finally dephosphorylated by sucrose-6-phosphate phosphatase (SPP) to synthesize

sucrose. *A. thaliana* genome encodes four SPS enzymes. In this work *A. thaliana* transformant plants containing the promoter region of each *sps* gene fused to the *uidA::gfp* reporter genes were generated, to determine their expression levels at organs and tissues. We observed an expression pattern in cotyledonary leaves, true leaves and vascular tissue for *AtSPS1F*, *AtSPS2F* and *AtSPS3F* constructs. In the root, expression was found in the stele and pericycle, as well as columella cells. This suggests the existence of synthesis and degradation cycles of sucrose in sinks organs. *AtSPS4F* gene was associated to embryo development. The effect of osmotic stress on the transcription levels of all four *sps* genes was also analyzed. *AtSPS2F* expression was increased more than 4-fold, *AtSPS4F* expression was duplicated, while the *AtSPS1F* and *AtSPS3F* expression did not show changes at all.

The results suggest that *AtSpen2* function of *A. thaliana* has diverged from *FPA* gene by the divergence of the SPOC regulatory domain coupled with the different transcriptional expression pattern of both genes. On the other hand, the transcriptional regulation of *A. thaliana* *sps* genes shows either differences and overlaps at tissues and organs level, possibly allowing them to contribute together in sucrose synthesis in some sites and to perform their activity individually in other zones, modulating thus the sucrose synthesis in a more finely way. Transcriptional expression differences of *sps* genes in response to osmotic stress, could adequately adjust the sucrose synthesis and, together with other responses, achieve an adaptation to water stress.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Spen*, *AtSpen2*, *sps* genes, sucrose.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las proteínas de tipo “Extremos abiertos” (“Split ends” o Spen) tienen uno o más dominios para la unión a ARN (RRM) y otro dominio (SPOC) que permite establecer una interacción con otras proteínas. Se ha establecido que las proteínas Spen participan en procesos de regulación genética. En el genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han identificado dos genes que codifican proteínas Spen. Uno de ellos codifica a la proteína FPA, que participa en el proceso de floración (Schomburg et al. 2001). El segundo gen, At4g12640, codifica para una proteína Spen de función desconocida (TAIR: The Arabidopsis Information Resource).

Una manera de introducirse al estudio de la función de un gen consiste en analizar la expresión conferida por la región promotora, lo cual es posible mediante la fusión de estas regiones a genes reporteros para la posterior transformación de plantas, lo que permite estudiar su expresión *in vivo* en los diferentes órganos y tejido (Ruijter et al. 2003)

Mediante experimentos de interacción *in vivo* utilizando el sistema de tres híbridos en levadura, Toledo-Jacobo et al. (2009) determinaron que la proteína codificada por el gen At4g12640 interacciona de manera específica con la región 5' líder del ARN del gen de arroz *sps1* que codifica para una enzima que permite la síntesis de sacarosa a partir de UDP-Glucosa y Fructosa 6-Fosfato.

El gen *sps1* de arroz codifica para la enzima sacarosa-fosfato sintasa (SPS), que hace posible la síntesis de sacarosa (Valdez-Alarcón et al. 1996). Éste disacárido ocupa una posición central en el metabolismo de todas las plantas, es el principal producto de la fotosíntesis en la mayoría de ellas y es exportado de las hojas a todos los tejidos heterotróficos (Ruan 2014). Al igual que en otras especies vegetales, en *A. thaliana* existen varios genes que codifican enzimas SPS, cuatro en esta especie. Considerando que la sacarosa es un compuesto clave en el metabolismo vegetal, existen diferentes niveles en los cuales se regula su síntesis, transporte y degradación; al nivel de las enzimas SPS, se ha reportado que éstas pueden ser reguladas alostéricamente y por fosforilación. Se ha considerado que

las diferentes SPS en las plantas pueden tener diferencias en su actividad catalítica y además diferir en sus niveles de expresión en las diversas etapas de desarrollo y órganos de las plantas (Lutfylla et al. 2007). No obstante, se conoce poco de la regulación a nivel transcripcional de los genes *sps*. Por otro lado, la complejidad de los procesos reguladores que conducen a la síntesis de sacarosa hace necesario profundizar en ciertos aspectos de estos procesos

En este trabajo se caracterizó la expresión conferida por la región promotora de los 4 genes *sps* en *A. thaliana* en los diferentes órganos y tejidos de la planta, y se compararon con los reportados previamente; también se determinaron los niveles de transcritos de SPS bajo efectos del estrés osmótico, siendo éste un regulador de la fosforilación de las enzimas SPS. Por otra parte, en este estudio se aporta información relevante para conocer la función del gen At4g12640, el cual codifica una proteína putativa de tipo Spen en *A. thaliana*.

I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental

En las últimas décadas *Arabidopsis thaliana* (L.), Heynh ha sido un organismo ampliamente utilizado en los laboratorios de muchos fisiólogos, bioquímicos, biólogos del desarrollo y genetistas de plantas, lo que la ha convertido en un organismo modelo de las angiospermas. Actualmente es difícil no utilizar esta especie en los laboratorios de genética de plantas de todo el mundo y es imposible obviar los descubrimientos, metodologías y el conocimiento generado en ésta.

A. thaliana es una planta pequeña, herbácea, que pertenece a la familia *Brassicaceae*, en la que se incluyen especies cultivadas como la mostaza (género *Sinapis*), la coliflor (*Brassica oleracea*) y el rábano (*Raphanus sativus*), entre otras. *A. thaliana* no tiene relevancia agronómica, pero es una especie silvestre que tiene numerosas ventajas: está adaptada a un rango geográfico muy amplio, es anual y crece entre los 10 a 30 cm, presenta un ciclo de vida corto (6-8 semanas de germinación a la producción de semilla madura), es fácil de cultivar en espacios reducidos, produce abundante semillas, alrededor de 10,000 (Meyerowitz y Somerville, 1994); además es sencillo realizar entrecruzamientos (Meinke et al. 1998) y presenta una organización celular relativamente simple (Malamy, 2005); existen métodos de transformación eficientes mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent 1998; Martínez-Trujillo et al. 2004), además, se cuenta con una extensa colección de semillas en varios centros internacionales, como el Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC), Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC), RIKEN Bioresource Center (BRC)/ SENDAI Arabidopsis Seed Stock Center (SASSC), INRA-Versailles Genomic Resource Center y Lehle Seeds.

1.2. El genoma de *Arabidopsis thaliana*

En el año 2000 se publicó la secuencia completa del genoma de *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), siendo el primer genoma de plantas secuenciado; este hecho la situó por delante de otros modelos de importancia en la agricultura como el maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*), petunia (*Petunia hybrida*),

tomate (*Solanum lycopersicum*), chícharo (*Pisum sativum*) y boca de dragón (*Antirrhinum majus*) (Koorneef y Meinke 2010). La forma canónica de la secuencia de su genoma y su anotación es actualmente representada por el TIGR (The Institute of Genome Research, versión 5.0) (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>) (Haas et al. 2005). El genoma es de aproximadamente 146 Mb, de los cuales se tienen secuenciados 119 Mb, incluyendo regiones centroméricas. Se encuentran anotados 26,207 genes que codifican proteínas, los cuales producen 27,885 distintas proteínas; este número ligeramente mayor se debe al corte y empalme (“splicing”) alternativo (Bevan y Walsh 2005). Aproximadamente el 36% de su proteoma predicho es codificado por duplicaciones genómicas en segmentos y en hilera. Alrededor de 1,400 pseudogenes se han identificado, la mayoría de ellos tiene secuencias de aminoácidos (aa) degeneradas y codones de paro prematuros comparados con los miembros de las familias a las cuales se parecen. Además, *Arabidopsis* contiene 2,355 loci para transposones (Bevan y Walsh 2005) (Tabla I.1).

El impacto de los estudios y de los recursos experimentales desarrollados no se restringe a *Arabidopsis*: por ejemplo, el 85% de los genes tienen homólogos cercanos en el genoma de arroz (*Oryza sativa*) (Goff et al., 2002); por lo tanto esto ayuda al análisis de otras plantas teniendo como base a este organismo modelo. El análisis del genoma de arroz ha sido publicado (The international Rice Genome Sequence Project 2005) (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/>) y se han descrito relaciones entre *Arabidopsis* y plantas cultivadas como arroz, maíz y sorgo (*Sorghum bicolor*) (Paterson et al. 2005), donde la comparación de los proteomas de *Arabidopsis* y arroz mostraron que el 71% de las proteínas que se predicen en esta última planta son razonablemente similares a las de *Arabidopsis*. Esta prometedora y en cierto modo inesperada similitud sugiere que las funciones bioquímicas y celulares de muchos genes de arroz se pueden interpretar de acuerdo a experimentos conducidos en *Arabidopsis*.

Tabla I.1. Resumen de las características genómicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	
Tamaño del genoma	146 Mb (estimado)
Genoma secuenciado y anotado	119 Mb
Genes predichos codificantes de proteínas	26,207
Genes con splicing alternativo	2330
Genes codificantes de proteínas con transcrito	19,117
Genes en familias de proteínas	18,641
Transposones y pseudogenes	3786
Proteínas distintivas	27,855
ORFs no redundantes clonados	14,668
Genes con espacio de inserción en exón + intrón	24,589

(Tomada de Bevan y Walsh 2005).

1.3. Recursos y bases de datos en *Arabidopsis thaliana*

El volumen creciente de la información concerniente a *Arabidopsis* como resultado de la secuenciación de su genoma (Arabidopsis Genome Initiative 2000) y de proyectos genómicos a gran escala, como la iniciativa internacional de genómica funcional (<http://arabidopsis.org/info/workshop2010.jsp>), que buscan descifrar la función de cada uno de sus genes, ha hecho una necesidad imperativa el guardar, ordenar y hacer pública la información generada. Para realizar esta tarea se han creado bases de datos y recursos en la red, que compilan toda la información generada para que esté disponible para la comunidad científica (Tabla I.2).

Tabla I.2. Bases de datos bioinformáticos de *Arabidopsis thaliana*

Base de Datos, herramienta, literatura y publicaciones	URL	Protocolo/Descripción
Base de datos NCBI PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed	Acceso a artículos relevantes
Publicaciones en TAIR	www.arabidopsis.org	Publicaciones exclusivas de <i>Arabidopsis</i>
Información acerca de genes		
TAIR: gene search	www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=gene&action=new_search	Búsqueda de información de genes de <i>Arabidopsis</i>
TAIR GO Annotation Bulk	www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp	Información funcional sobre genes
TIGR: Gene Search	www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml	Búsqueda de genes por locus, descripción.
MatDB: Gene	www.hsll.pitt.edu/obrc/index.php?page=URL1096992371	Genes, locus, clones de BAC's, YAC's, códigos MIPS
NCBI: Gene Search	www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=3702	Genes por nombre, locus, descripción.
Gene Ontology Consortium	geneontology.org/	Genes con funciones similares en <i>Arabidopsis</i> y otros organismos
Información acerca de microarreglos en <i>Arabidopsis</i>		
TAIR: Microarray Expression Search	www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=expression	Patrones de expresión en diferentes experimentos de microarreglos
NASCArrays: Spot History	pcp.oxfordjournals.org/content/50/1/173/T1.expansion.html	Historial de expresión de genes a lo largo de un experimento de microarreglos
NCBI Gene Expression Omnibus	www.ncbi.nlm.nih.gov/geo	Experimentos con microarreglos, SAGE, patrones de expresión, análisis en cluster.
Stanford Microarray Database	www.origene.com/qPCR/Tissue-qPCR-Arrays.aspx?gclid=COTqqeKWws8CFZWGaQodTqwOjA	Datos acerca de microarreglos
Genevestigator	genevestigator.com/gv	Patrones de expresión de genes de <i>Arabidopsis</i> en microarreglos de Affymetrix en diferentes contextos como estadio

		de crecimiento, órgano de la planta o respuesta a estrés
MapMan	mapman.gabipd.org/web/guest;jsessionid=C8766108ACD3D4DA69A01F12F84ECDFE.ajp13_mapman_gabipd_org	Presenta patrones de expresión de genes en microarreglos de Affimetrix en diagramas de rutas metabólicas y otros procesos
Búsqueda de EST's (expressed sequence tags)		
NCBI UniGene Search	www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene	Búsqueda de EST's para genes secuenciados
TIGR Gene Index Database	occams.dfci.harvard.edu/pub/bio/tgi/data/Arabidopsis_thaliana	Usa EST's para buscar genes diferencialmente expresados
AtGDB	www.plantgdb.org/AtGDB/prj/ZSB03PP/	Mapas de EST's y clúster.
Rutas metabólicas de <i>Arabidopsis</i>		
AraCyc	www.arabidopsis.org/biocyc	Rutas metabólicas, enzimas, reacciones y compuestos.
AraCyc Expression Viewer	www.arabidopsis.org/biocyc/	Detecta cambios de expresión en genes responsables del metabolismo.
Kegg	www.genome.jp/kegg/pathway.html	Busca rutas metabólicas, rutas regulatorias, y complejos moleculares.
Búsqueda de secuencias de proteínas relacionadas		
TAIR: WU-BLAST	www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp	Encuentra secuencias similares de proteínas
MIPS: BLAST	www.upr-info.org/database/?gclid=CJnL95Caws8CFQmtaQod7L0Mkw	Encuentra secuencias similares
NCBI: BLAST y NCBI: Blink	www.ncbi.nlm.nih.gov	Búsqueda de proteínas similares, y similitud entre proteínas de <i>Arabidopsis</i> y todo el GanBank.
De genotipo a fenotipo: Búsqueda de mutantes para el análisis de la función de genes		
SIGnAL T-DNA Express	signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress	Búsqueda de mutaciones "Knockout" de algún gen.
TAIR: Germplasm Search	www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=germplasm	Búsqueda de mutaciones y tipos de mutantes con fenotipo similar.

NASC: Catalogue Search	www.raiarubiabooks.com/related-pdf-product-catalogue-nasc-sa.html	Búsqueda de mutantes para un gen de interés.
TAIR: WU-BLAST NASC: Insert BLAST AtIDB	www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp www.arabidopsis.org/portals/mutants/stockcenters.jsp atidb.cshl.org/	Usa el BLAST para la búsqueda de mutantes por T-DNA/transposones de un gen específico o genes de interés
De fenotipo a genotipo: Bases de datos y herramientas para la clonación basada en mapas (map-based cloning)		
TAIR: Genetic Marker Search	www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=marker&action=new_search	Búsqueda y descarga de conjuntos de marcadores genéticos para generar mapas
TAIR: Polymorphism/Allele Search	www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=polyallele	Búsqueda de polimorfismos entre dos ecotipos para generar nuevos marcadores.
TAIR: Monsanto Polymorphism Collection	www.arabidopsis.org/browse/Cereon	SNPs y In Dels entre secuencias de Col y Ler
MASC SNP database	www.genomforschung.uni-bielefeld.de/GF-dataresources/masc/search_masc_snps.php	Información de SNP de 12 ecotipos.

(Modificada de García-Hernández y Reiser 2004).

1.4. Caracterización de genes en *Arabidopsis thaliana*

Con la secuenciación de los genomas de numerosos organismos se han establecido bases de datos que pueden ser analizadas mediante el uso de diversas herramientas bioinformáticas y hacer predicciones de la función de los genes y las proteínas que codifican; además, la secuenciación de los genomas completos de más de 100 especies de plantas ha permitido establecer aspectos interesantes y novedosos de su arquitectura y evolución y han facilitado la identificación de marcadores genéticos que permiten la selección de rasgos importantes en varios cultivos.

El genoma de *A. thaliana* es uno de los más estudiados, sin embargo sólo se ha logrado determinar la función de un 39% de sus genes por evidencia experimental, el 55% por predicción computacional y el 6% restante permanece

desconocido (Rhee y Mutwil 2014). Basados en datos experimentales se conoce la función molecular, participación en procesos biológicos y componentes celulares de aproximadamente 25% de sus genes (Figura I.1).

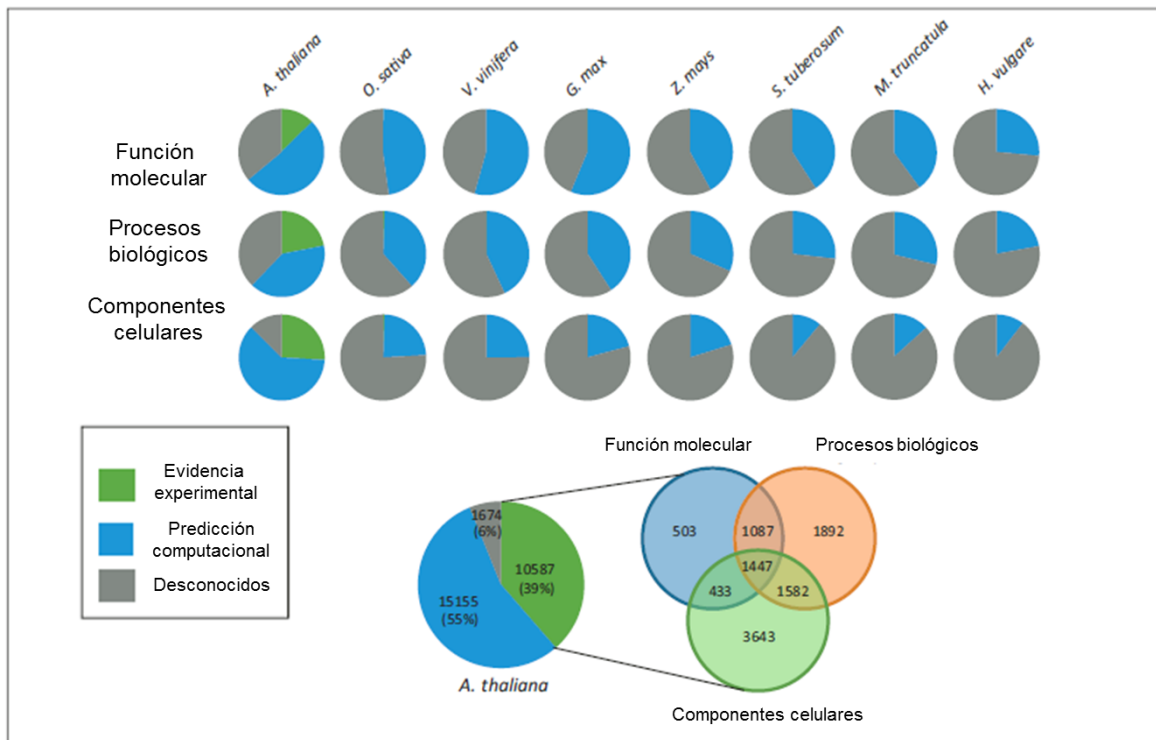


Figura I.1. Comparación del porcentaje de genes identificados por distintos métodos en los genomas de diferentes especies de plantas. *A. thaliana*, *O. sativa*, *V. vinifera*, *G. max*, *Z. mays*, *S. tuberosum*, *M. truncatula*, *H. vulgare* (Rhee y Mutwil 2014).

1.5. El gen At4g12640 de *Arabidopsis thaliana* de función desconocida

El gen At4g12640 de *Arabidopsis thaliana* de función desconocida codifica para la proteína NP193001.2 perteneciente a la familia Split ends (Spen), con un tamaño predicho de 823 aa (TAIR: The Arabidopsis Information Resource) (Figura I.2). El gen se encuentra localizado en el cromosoma 4 del genoma de *A. thaliana*, presenta 4 exones y 3 intrones, y el tamaño de la secuencia completa es de 5264 pares de bases (pb) (Tabla I.3).

Tabla I.3. Descripción del gen At4g12640. El gen se encuentra localizado en el cromosoma 4, está constituido por una secuencia de 5264 pb, presenta 4 exones y 3 intrones

Categoría	Coordenadas (pb)
Cromosoma 4	7462532..7467870
ORF	99-5032
5' utr	1-98
Región codificante	99-101
Región codificante	190-471
Región codificante	2639-3846
Región codificante	4054-5032
Exón 1	1-101
Intrón 1	102-189
Exón 2	190-471
Intrón 2	472-2638
Exón 3	2639-3846
Intrón 3	3847-4053
Exón 4	4054-5264
3' utr	5033-5264

(TAIR: The Arabidopsis Information Resource).

Locus: AT4G12640

Update History
 AT4G12640 replaces AT4G12630 on 2004-06-28
 AT4G12640 replaces AT4G12630 on 2004-06-28

Date last modified
 2003-05-02

TAIR Accession
 Locus:2135605

Representative Gene Model
 AT4G12640.1

Gene Model Type
 protein_coding

Other names:

Description
 RNA recognition motif (RRM)-containing protein; FUNCTIONS IN: RNA binding, nucleotide binding, nucleic acid binding; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; EXPRESSED IN: 23 plant structures; EXPRESSED DURING: 13 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Spen paralogue and orthologue SPOC, C-terminal (InterPro:IPR012921), RNA recognition motif, RNP-1 (InterPro:IPR000504), Nucleotide-binding, alpha-beta plait (InterPro:IPR012677); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: RNA binding (TAIR:AT2G43410.4); Has 8554 Blast hits to 7148 proteins in 405 species: Archae - 8; Bacteria - 199; Metazoa - 4614; Fungi - 1472; Plants - 1436; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 825 (source: NCBI BLink).

Map Detail Image
 Protein Coding Gene Models
 AT4G12640.1 (T1_5_Star)

Figura I.2. El gen *At4g12640* de *Arabidopsis thaliana* codifica para una proteína de tipo Spen de función desconocida (TAIR: The Arabidopsis Information Resource)

1.6. La familia de proteínas de tipo Split ends (Spen)

Las proteínas de tipo Split ends (Spen) son codificadas por animales y plantas, varían ampliamente en tamaño (90-600 kD), y se caracterizan por un dominio RRM N-terminal (del inglés RNA recognition motif, RBD, RNA binding domain, RNP Ribonucleoprotein domain), y un dominio C-terminal llamado SPOC (del inglés Spen paralogue and ortholog C-terminal). La secuencia RRM tiene una extensión de 80-100 aa. Este motivo se caracteriza por una secuencia consenso bipartita RNP que forma la superficie de unión a ARN del dominio, así como muchos aa predominantemente hidrofóbicos dispersos a través del RRM, los cuales son esenciales para la estructura general del dominio. Las proteínas con un motivo RRM intervienen en una variedad de reacciones de procesamiento post-transcripcional del ARN, incluyendo el splicing alternativo de ARNm, su estabilidad y transporte (Rebay et al. 1999).

El dominio SPOC es altamente conservado y consta de ~165 aa, lo que permite establecer una interacción con otras proteínas y se cree que es responsable de la interacción con varios factores de transcripción (Ariyoshi et al. 2003), por lo que en general, estas proteínas participan en procesos de regulación de la expresión genética. Las proteínas Spen se encuentran desde *Caenorhabditis elegans* hasta humanos y cada especie codifica una proteína grande (3000-5000 aa) y una o dos pequeñas (500-1000 aa) (Uranishi et al. 2009).

Las proteínas Spen participan en diferentes procesos biológicos, como la diferenciación y sobrevivencia de la célula neuronal, la orientación del axón (Chen y Rebay 2000; Kuang et al. 2000), regulación del ciclo celular (Lane et al. 2000), represión en la identidad de la cabeza del tronco embrionario de *Drosophila* (Wiellette et al., 1999), así como en la señalización de la proteína Wingless (Wg) en los discos imaginales del ojo, alas y patas de *Drosophila* (Lin et al. 2003). La proteína Spen humana SHARP (del inglés SMRT7HDAC1-associated represor proteína) ha sido identificada como componente de un complejo de represión transcripcional tanto en el receptor nuclear como en las vías de señalización Notch/RBP- jkappa; por consiguiente, las proteínas de la familia Spen parecen regular la transcripción mediante algunas vías de señalización (Sánchez-Pulido et al. 2004).

Ariyoshi y colaboradores (2003), determinaron la estructura del dominio SPOC de la proteína humana SHARP por cristalización y difracción de rayos X. El dominio SPOC está plegado en un único dominio compacto de ~40 x 40 x 45 Å. La arquitectura del dominio consiste de un barril β con siete láminas (β 1- β 7) enmarcadas por seis α -hélices (α A- α F). Un lado del barril β está deformado como resultado de una discontinuidad en la lámina β 3 y una ruptura del patrón característico de los puentes de hidrógeno entre la región N-terminal de β 3 y β 3' y la lámina adyacente β 5. Esta deformación en el barril β resulta claramente en un surco entre las láminas β 3' y β 5. La superficie interior de este surco es no polar y está rodeada por dos bucles ricos en prolina, L4 y L9. Es posible que esta región pudiera jugar un papel en interacciones proteína-proteína.

Hay una segunda hendidura notable formada entre las hélices αA , αF y el final N de αD . La superficie interior de esta hendidura está constituida por cadenas laterales hidrofóbicas y el esqueleto de grupos carbonilo, confiriéndole un carácter ligeramente ácido (Figura I.3). Esta característica estructural también sugiere que es una superficie de interacción proteína-proteína. Mediante estudios con la combinación de experimentos estructurales y funcionales con el dominio SPOC se demuestra claramente que la función conservada de SPOC es mediar la interacción con co-represores y, por lo tanto, que las proteínas Spen juegan un papel esencial en la regulación de la represión transcripcional.

1.7. Las proteínas Spen de plantas y los genes que las codifican.

Chen et al. (2007) analizaron un gen que codifica una proteína Spen en arroz (*Oryza sativa* var. japonica), mediante la técnica promoter-trap. La proteína, OsRRM se expresa exclusivamente en el endospermo y su sobreexpresión en toda la planta resulta en varias anormalidades, tales como baja estatura, floración tardía, espigas pequeñas y baja proporción de fructificación. Determinaron que su posición subcelular es nuclear. Identificaron cinco exones y cuatro intrones en el gen *OsRRM* y su ADNc contiene un marco de lectura de 3,018 bp, que codifica una proteína de 1,005 aa. Contiene dos dominios RRM N-terminales: RRM1 se localiza en los 51-116 aa y RRM2 en los 183-238 aa. La identidad entre estos dos dominios es de 29% y la similitud de 39%, y se asemejan mucho a sus contrapartes en otras proteínas RRM como Tial, SHARP y Spen. Se identificó una estructura de cremallera de leucina en el extremo C-terminal, lo que sugiere una actividad de interacción proteína-proteína y formación de dímeros de proteína. También se identificó un dominio SPOC estructuralmente conservado (498-594 aa). El alineamiento de la secuencia SPOC de OsRRM con proteínas Spen de otras especies demostró que comparte un buen nivel de identidad con otros miembros de la familia Spen como SHARP, OTT1, AtFPA y At4g12640. La disminución en la expresión del gen no resultó en alteraciones fenotípicas observables, lo que sugiere una actividad redundante que puede ser compensada por otros genes homólogos.

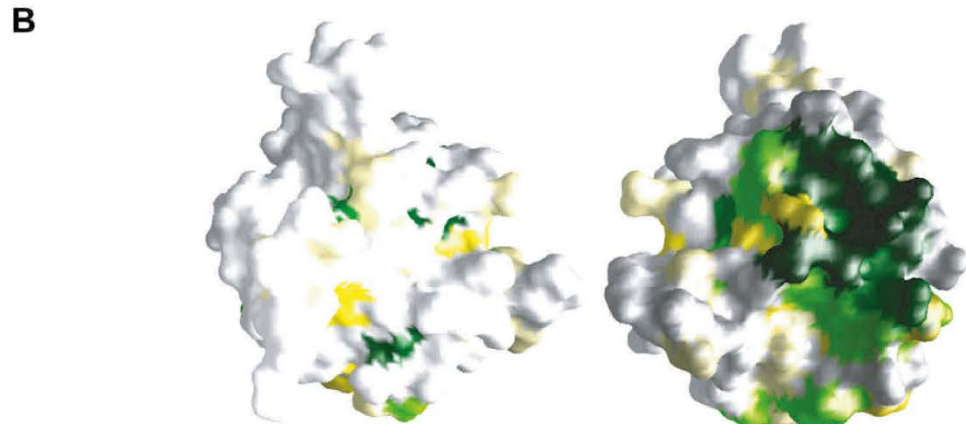
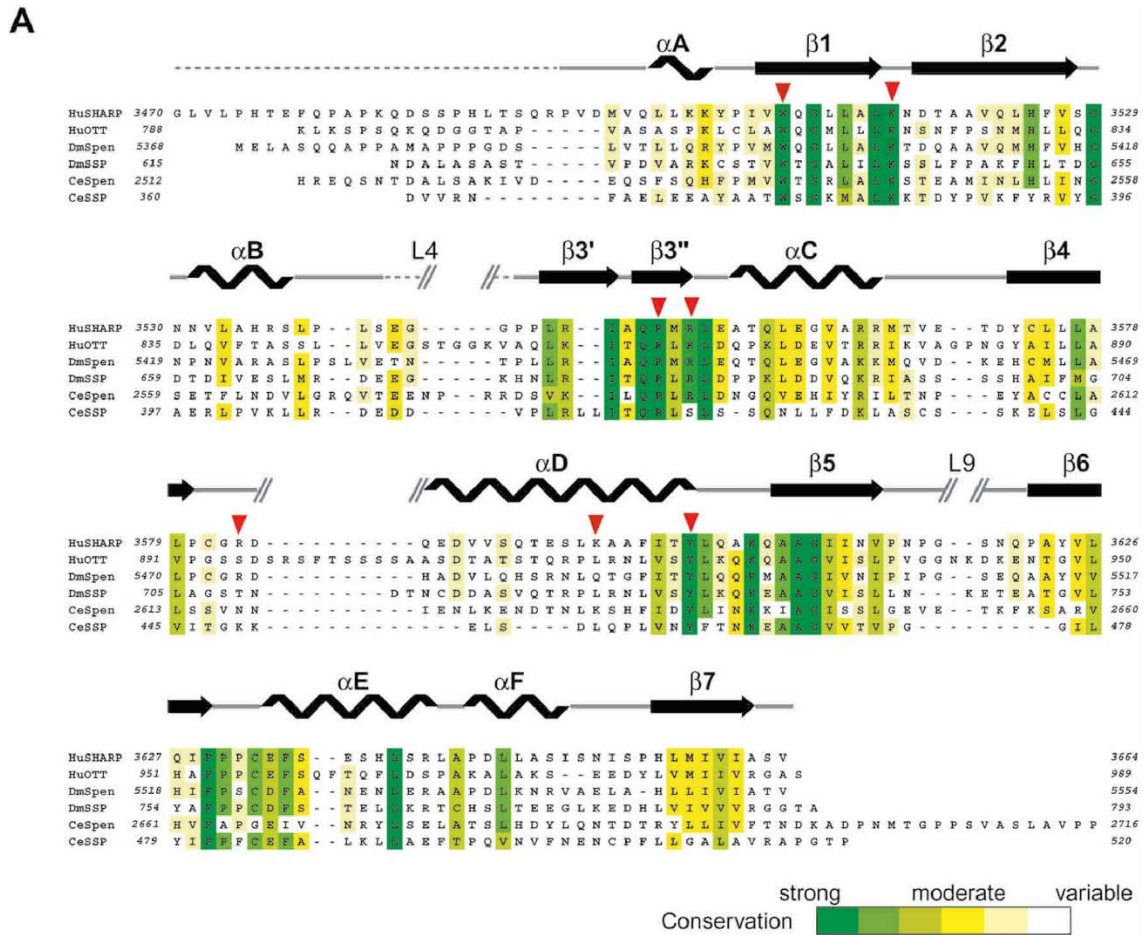


Figura I.3. Secuencia básica conservada en las proteínas Spen. A. La secuencia del dominio SPOC de la proteína SHARP, SPOC-195, fue alineado con los dominios SPOC de otras proteínas Spen de humanos, *Drosophila* y *C. elegans* usando CLUSTALW. Los residuos idénticos y los similares son resaltados en el esquema de color que corresponde al nivel de conservación mostrado en la barra en el fondo. Los elementos de estructura secundaria de SPOC-195 se muestran encima de la secuencia. La cadena $\beta 3$ está dividida en 2 partes: $\beta 3'$ y $\beta 3''$. Las líneas quebradas indican las regiones desordenadas. **B.** Distribución de los residuos conservados trazados en la superficie del dominio SPOC. Los residuos están coloreados de acuerdo a su conservación como en A (Tomada de Ariyoshi, 2003).

El segundo gen que codifica para una proteína Spen en arroz es *OsRRMh* (Liu y Cai 2013), presenta dos dominios RRM (47-116 y 230-297 aa) y un dominio SPOC (440-536 aa) y codifica para una proteína de 900 aa. Este gen se expresa en la raíz, tallo, hoja, espiguilla y semilla inmadura y presenta splicing alternativo en los diferentes tejidos, por lo que podría presentar diversas funciones biológicas

En *Arabidopsis thaliana* se ha caracterizado la función de una proteína de tipo Spen, FPA, la cual participa en la regulación de la vía autónoma de floración (Schomburg et al. 2001). FPA junto con otra proteína, FCA, actúan de manera complementaria en la regulación del gen represor de la floración, FLC, mediante la formación de un ARN antisentido del locus *FLC*, induciendo de esta manera el silenciamiento de este gen (Hornyik et al. 2010). La proteína FPA de 901 aa, presenta tres dominios RRM (19-87, 96-163 y 207-278 aa) y un dominio SPOC (441-537 aa).

1.8. El gen *At4g12640* interactúa *in vivo* con la región 5' del ARN del gen *sacarosa fosfato sintasa (sps1)* de arroz

Como se mencionó previamente, el gen *At4g12640* de *A. thaliana* codifica para una proteína de tipo Spen de función desconocida. Mediante experimentos de interacción *in vivo* utilizando el sistema de tres híbridos en levadura se determinó que la proteína codificada por *At4g12640* interactúa de manera específica con una región 5' líder del ARN del gen *sps1* de arroz (Toledo-Jacobo et al. 2009) (Figura I.4).

El gen *sps1* codifica para la enzima sacarosa-fosfato sintasa, una enzima que permite la síntesis de sacarosa a partir de UDP-glucosa y fructosa 6-fosfato.

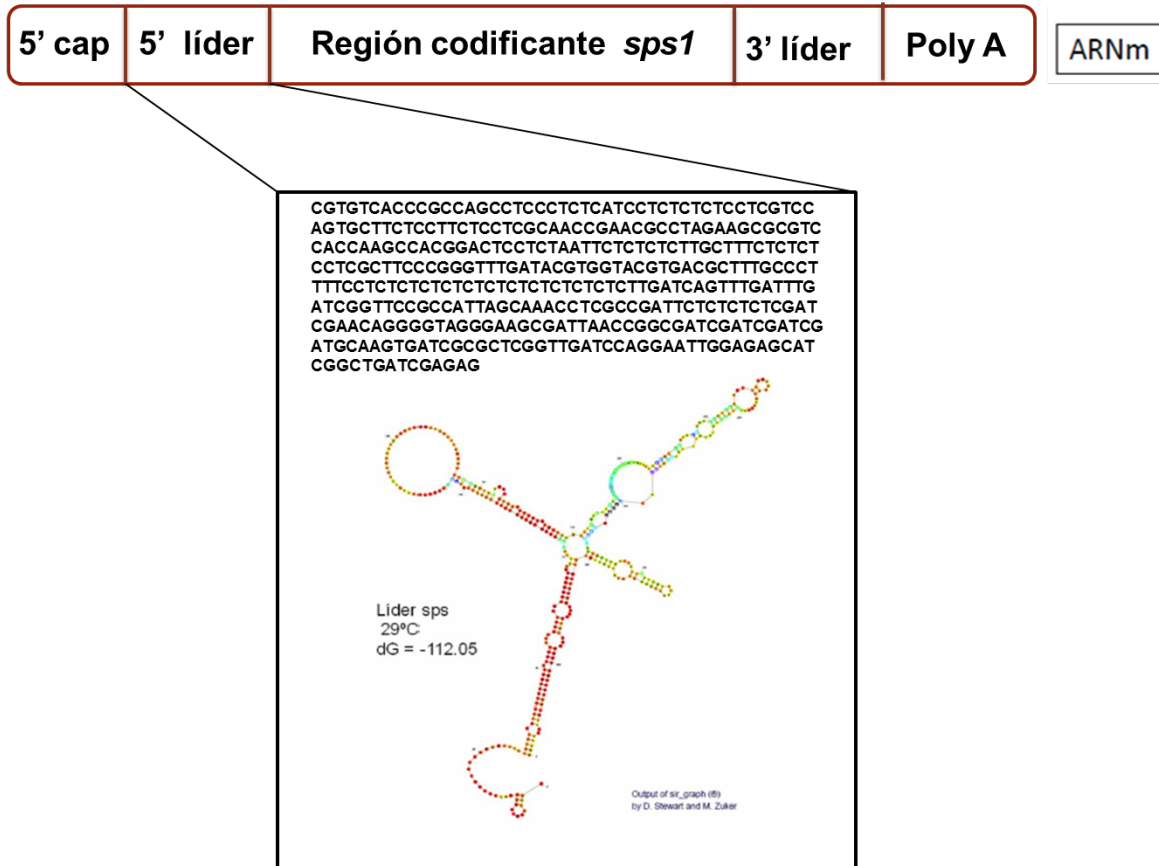


Figura I.4. Región 5' líder del gen *sps1* de arroz. La proteína codificada por el gen At4g12640 interacciona de manera específica con una región 5' líder del ARN del gen *sps1* de arroz. (Toledo-Jacobo et al. 2009)

1.9. Las enzimas sacarosa-fosfato sintasas (SPS)

La sacarosa ocupa una posición central en el metabolismo de todas las plantas, es el principal producto de la fotosíntesis en la mayoría de las angiospermas y es exportado de las hojas a todos los tejidos no fotosintéticos de la planta. La síntesis de sacarosa está confinada al citosol, debido a la estricta separación en compartimentos de las enzimas implicadas en su síntesis. La síntesis de sacarosa en el citosol se inicia a partir de triosas fosfato provenientes del cloroplasto, las cuales al combinarse forman hexosas, en una ruta altamente regulada, principalmente por inhibición alostérica de las enzimas por los productos de la reacción (Ruan 2014) (Figura I.5).

La sacarosa-fosfato sintasa (SPS, EC 2.4.1.14) cataliza la penúltima reacción en la ruta biosintética de la sacarosa, a partir de UDP-glucosa (UDPGlc) y de

fructosa 6 fosfato (Fru6P) obteniendo sacarosa-6-fosfato (Suc6P) (Lunn et al. 1990). Otra enzima que sintetiza sacarosa es la sacarosa sintasa (SuSy; EC 2.4.1.13), que cataliza la reacción: $\text{UDP-glucosa} + \text{fructosa} \leftrightarrow \text{sacarosa} + \text{UDP} + \text{H}^+$. Esta reacción se orienta principalmente hacia la degradación de sacarosa (Winter y Huber 2000), mientras que en la reacción catalizada por la SPS, la remoción rápida del fosfato de la sacarosa 6-fosfato por la sacarosa fosfatasa (SPP; EC 3.1.3.24), hace que la reacción por SPP sea prácticamente irreversible (Huber y Huber 1996). Existe evidencia que la SPS y SPP se asocian formando un complejo multienzimático, formando un canal metabólico que hace más eficiente la síntesis de sacarosa (Echeverría et al. 1997).

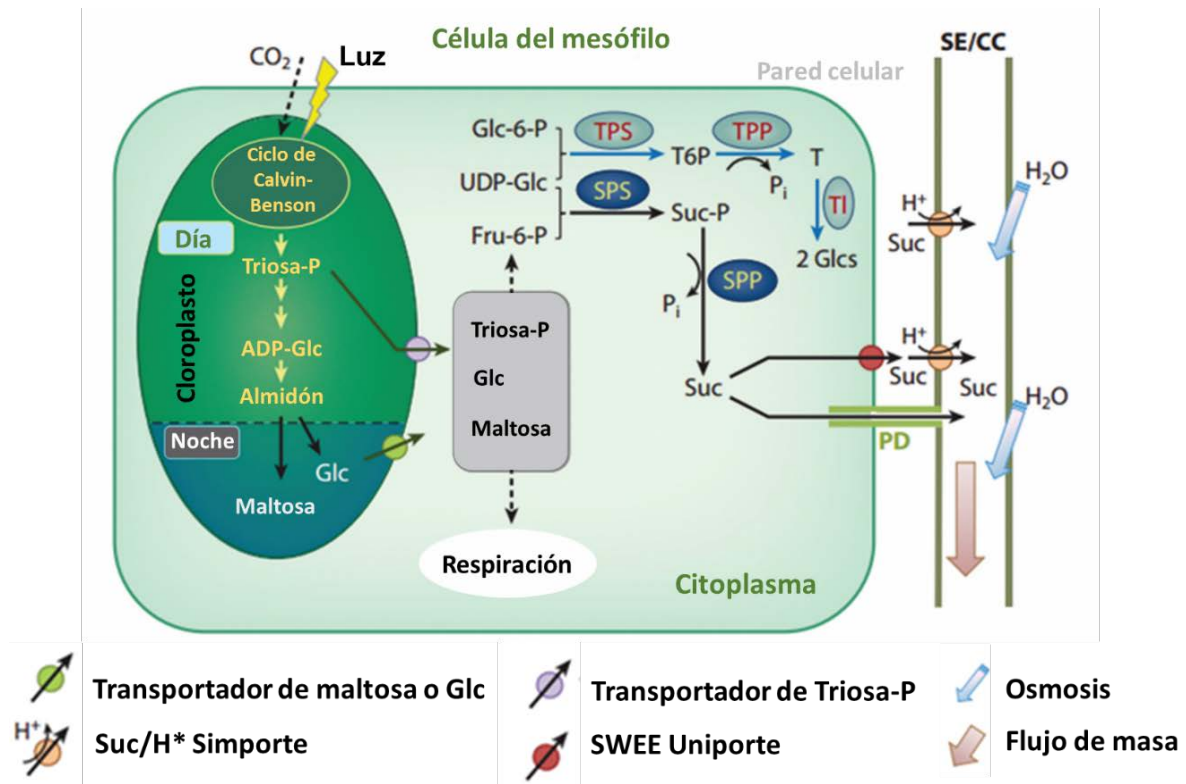


Figura I.5. Síntesis de sacarosa. La síntesis de sacarosa y la carga del floema en las hojas origen. Las hojas fotosintéticas (fuente) utilizan la energía solar para fijar CO_2 para producir triosas fosfatos (triosas-P) en el cloroplasto. Las triosa-P se exportan al citoplasma como bloques a otro metabolismo. También se puede convertir para la síntesis de ADP-glucosa (ADP-Glc) para la síntesis de almidón en el cloroplasto. El almidón es degradado por la noche en glucosa (Glc) o maltosa para su exportación al citoplasma. La glucosa puede ser fosforilada por la hexoquinasa, para formar fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) por la glucosa-6-fosfato isomerasa. La sacarosa-fosfato sintasa (SPS) utiliza fructosa-6-fosfato y UDP-Glc como sustrato para producir sacarosa-fosfato (Suc-P), posteriormente se convierte en sacarosa por la fosfatasa sacarosa-fosfato (SPP). La sacarosa se carga en el floema ya sea apoplásticamente o simplásticamente. La acumulación de sacarosa atrae el agua por osmosis, creando presión de turgencia alta, lo que impulsa el flujo de masa de asimilados hacia los sumideros. En paralelo con la síntesis de sacarosa, una pequeña cantidad de trehalosa (T) también se puede sintetizar. Mediante el uso de ADP-Glc y Glc-6-P como sustratos, la trehalosa-6-fosfato (T6P) sintasa (TPS) sintetiza T6P, un metabolito de señal recientemente descubierto, luego se convierte en trehalosa por T6P fosfatasa (TPP). La trehalosa puede ser finalmente hidrolizada por la trehalasa (TI) en dos moléculas de glucosa. También se muestran varios transportadores implicados. Abreviatura adicional: Pi ortofosfato (Tomada de Ruan, 2014).

Antes de la secuenciación de genomas de plantas, se pensaba que existía sólo un gen que codificaba para la enzima SPS en cada especie; al respecto se hicieron diferentes reportes de ADNc de SPS en diferentes especies: para el maíz (*Zea mays*) (Worrell et al. 1991), espinaca (*Spinacia oleracea*) (Klein et al. 1993, Sonnwald et al. 1993), plátano (*Musa paradisiaca*) (do Nascimento et al. 1997),

remolacha de azúcar (*Beta vulgaris*) (Hesse et al. 1995), mandarina (*Citrus unshiu*) (Komatsu et al. 1996), haba (*Vicia faba*) (Heim et al. 1996), planta de la resurrección (*Craterostigma plantagineum* Hochst) (Ingram et al. 1997), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Sugiharto et al. 1997), y la fruta de kiwi (*Actinidia deliciosa*) (Langenkämper et al. 1998). Además, se reportó una secuencia genómica de un gen *sps* de arroz (*OsSPS1*) (*Oryza sativa*) (Valdez-Alarcón et al. 1996). Actualmente, se conocen familias de genes que codifican enzimas SPS en diferentes especies de plantas (Lutfylla et al. 2007; Jiang et al. 2015) (Tabla I.4).

Una forma de contribuir al entendimiento de las propiedades de las SPS y sus funciones, es mediante estudios evolutivos, entre los que se encuentran los análisis bioinformáticos de las proteínas SPS. Langenkämper et al. (2002) separan a las SPS de las plantas en 3 grupos, denominados A, B y C; posteriormente, considerando más secuencias, Castleden et al. (2004) las separa en 4 grupos (A, B, C y D). Lutfiyya et al. (2007) considera 6 grupos de enzimas SPS, basados en la similitud de la secuencia de aa del dominio glucosil transferasa: 1a, 1b, 2d, 2 M, 3 y 4, entre las que 1a y 1b corresponden a las SPS bacterianas; *Arabidopsis* tiene 4 enzimas SPS: AtSPS1F (AtSPS1A) y AtSPS2F (AtSPS2A) han sido agrupadas con otras enzimas de plantas dicotiledóneas en el grupo 2D, mientras que AtSPS3F (AtSPSB) y AtSPS4F (AtSPSC) están incluidas en los grupos 3 y 4, respectivamente, que contienen enzimas de dicotiledóneas y monocotiledóneas (Figura I.6). De lo anterior se infiere que la duplicación de los genes *sps* que dieron origen a los 3 grupos de enzimas SPS, ocurrió antes de la separación de dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Tabla I.4. Genes reportados en plantas y algunas cianobacterias que codifican enzimas sacarosa-fosfato sintasas (SPS).

Especie	Número de Genes	Referencia
PLANTAS VASCULARES		
<i>Actinidia chinensis</i> (kiwi)	4	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Actinidia deliciosa</i> (kiwi)	4	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Ananas cosmosus</i> (anona)	2	Zhang <i>et al.</i> (2012)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4	(www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/)
<i>Beta vulgaris</i> (remolacha azucarera)	2	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Brassica rapa</i> (col)	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Citrus unshiu</i>	4	Komatsu <i>et al.</i> (1996)
<i>Craterostigma plantagineum</i>	2	Ingram <i>et al.</i> (1997)
<i>Hordeum vulgare</i> (cebada)	3	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Ipomea batatas</i> (papa dulce)	2	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Lycopersicum esculentum</i> (tomate)	2	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Mangifera indica</i> (mango)	2	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Medicago sativa</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Musa acuminata</i> (banana)	3	Choudhuy <i>et al.</i> (2008)
<i>Nicotiana tabacum</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Oncidium cv "Goldiana"</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	5	Valdez-Alarcón <i>et al.</i> (2002)
<i>Pinus pinaster</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Saccharum officinarum</i>	5	Hesse <i>et al.</i> (1995)
<i>Solanum tuberosum</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Spinacia oleracea</i> (espinaca)	2	Klein <i>et al.</i> (1993)
<i>Triticum aestivum</i>	5	Castleden <i>et al.</i> (2004)
<i>Vicia faba</i>	1	Heim <i>et al.</i> (1996)
<i>Viscum álbum</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Zea mays</i>	7	Worrell <i>et al.</i> (1991)
CIANOBIOTAS		
<i>Anabaena sp</i>	2	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Gloeobacter violaceus</i>	2	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Nostoc punctiforme</i>	3	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Pirellula sp</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Prochlorococcus marinus</i>	2	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Synechococcus marinus</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)
<i>Thermosynechococcus elongates</i>	1	Lutfiyya <i>et al.</i> (2007)

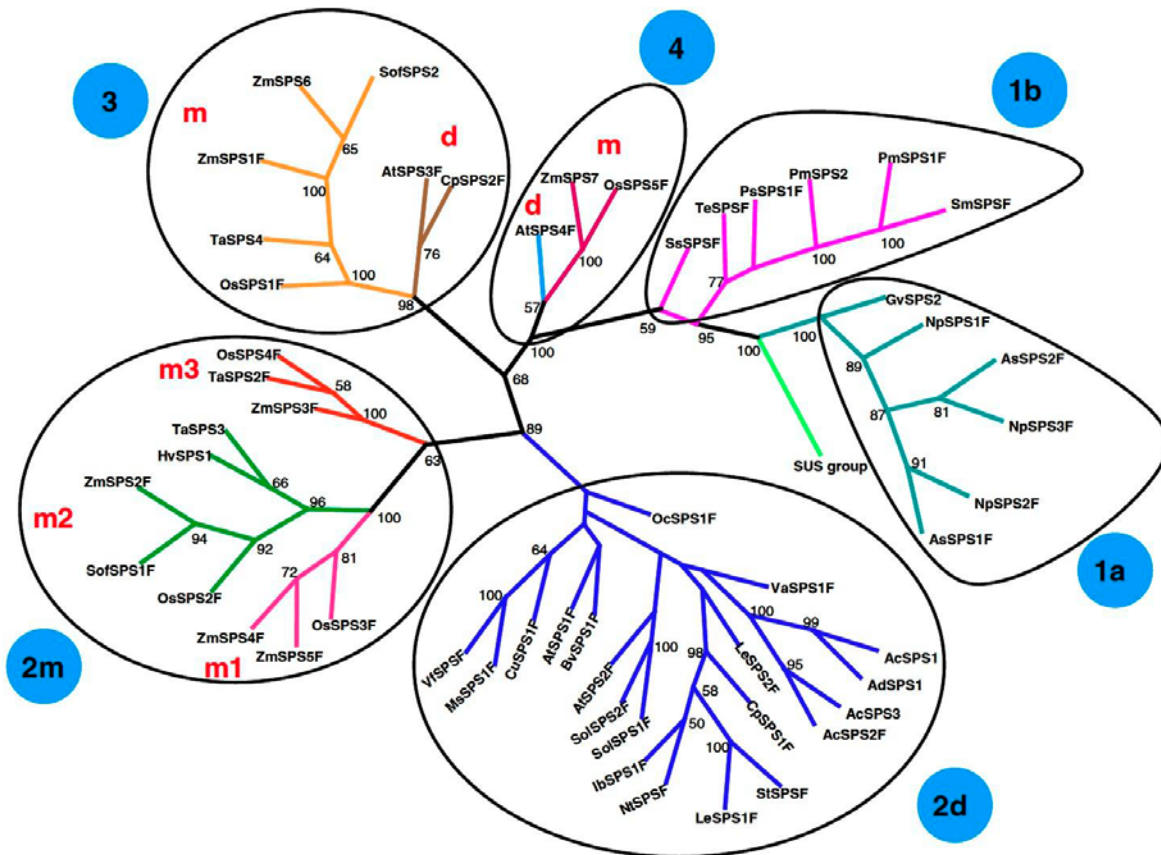


Figura I.6. Análisis evolutivo de las enzimas SPS. El árbol fue generado a partir de una alineación (donde se eliminaron todos los huecos o “gaps”) de la región del dominio glicosil transferasa de SPS de las proteínas codificadas por los genes. Los grupos principales están rodeados y etiquetados. Las designaciones 'm' y 'd' indican grupos de monocotiledóneas y dicotiledóneas subgrupos; m1, m2 y m3 son 3 subgrupos de monocotiledóneas dentro del Grupo 2. El grupo 1 corresponde a cianobacterias, donde 'a' y 'b' indican diferentes subgrupos. Como grupo externo se encuentra la sacarosa sintasa (SUS). Tomada de Lutfiyya et al. (2007).

1.10. Los genes *sps* son regulados transcripcional y postraduccionalmente

Durante las condiciones de sequía y alta salinidad, la disponibilidad de agua para las plantas es muy limitada debido a que el estado de la energía libre del agua (potencial de agua) disminuye debido al efecto osmótico derivado de moléculas que interactúan con ella, lo que hace más difícil la captura de agua (Xiong y Zhu 2002). Las respuestas de las plantas al estrés osmótico son diversas y comprenden un cambio en el crecimiento, ajustes en el transporte de iones y cambios en el metabolismo del carbono; estos cambios pueden ocurrir en respuesta al efecto osmótico de señales primarias o señales secundarias tales como el ácido abscísico y etileno (Fujita et al. 2011). La regulación covalente de enzimas SPS puede

producirse por estrés osmótico: en la espinaca se ha delimitado la secuencia RMRRGVSC, con una serina en la posición 424; este sitio es fosforilado cuando la planta se somete a estrés osmótico, y en consecuencia se activa la enzima, permitiendo así la síntesis de sacarosa (Winter y Huber 2000). En otras especies de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, secuencias similares de aa pueden ser sitios potenciales de fosforilación de la serina: en *A. thaliana*, esta secuencia reguladora está presente en las enzimas AtSPS1F, AtSPS2F y AtSPS4F, mientras que en AtSPS3F se encuentra ausente (Lutfylla et al. 2007).

La regulación transcripcional de los genes *sps* es compleja y se vuelve más importante teniendo en cuenta que hay varios genes que codifican enzimas SPS en cada especie vegetal. Las regiones promotoras de diferentes genes *sps* confieren expresión que difiere total o parcialmente entre los tejidos y órganos de las plantas; estos aspectos se han abordado en algunas especies mediante la cuantificación de las transcripciones de cada gen *sps* por qPCR: de los 7 genes *sps* del maíz *ZmSPS1F* y *ZmSPS2F* muestran su máxima expresión en las hojas (34% y 29%, respectivamente), por otro lado *ZmSPS6F*, muestra expresión sólo en la inflorescencia, mientras que los otros 5 genes muestran expresión distribuida entre los diferentes órganos (Lutfylla et al. 2007). En el arroz, de los 5 genes *sps*, *OsSPS1* muestra una mayor expresión, especialmente en las hojas, mientras que *OsSPS11* muestra marcada expresión en las raíces (Okamura et al. 2011). En *A. thaliana*, un patrón muy general de expresión conferido por las regiones promotoras de los genes *sps* en plantas transgénicas reportan que *AtSPS2F* se expresa sólo en las raíces, mientras que los otros 3 genes (*AtSPS1F*, *AtSPS3F* y *AtSPS3F*) se expresan en las hojas y tallos (Volkert et al. 2014).

En algunos genes *sps*, la luz tiene un efecto sobre la regulación de su transcripción: en las hojas del arroz, hay un aumento en la transcripción de *OsSPS1* en presencia de la luz (Chávez-Bárcenas et al. 2000) y en el proceso de ritmo circadiano, hay un patrón diferente en la expresión transcripcional de los 5 genes *sps* de arroz. (Yonekura et al. 2013).

El estrés osmótico también puede regular transcripcionalmente la expresión de los genes *sps*: en maíz, mediante la cuantificación de los transcritos, se determinó que *ZmSPS3F* es inducido por estrés hídrico, *ZmSPS1F* y *ZmSPS4F* son reprimidos, mientras que los otros 4 genes no tienen un cambio significativo en la expresión (Lutfylla et al. 2007). En *Craterostigma plantagineum* Hochst, una planta con tolerancia a la desecación, hay un aumento en los transcritos de *sps* durante la deshidratación de las plantas (Ingram et al. 1997).

II. JUSTIFICACIÓN

Con la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Initiative 2000) ha sido posible identificar numerosos genes putativos cuya función sigue siendo un enigma en ausencia de datos experimentales y análisis bioinformáticos sistemáticos. Lo anterior se debe en parte a que el interés se ha enfocado en los genes cuya inactivación genera cambios fenotípicos notables (morfológicos y/o fisiológicos). En el genoma de *A. thaliana* sólo existen dos genes que codifican proteínas Spen, con dominios de unión a ARN (RRM) y con dominios SPOC de interacción con otras proteínas. Puesto que uno de estos genes (*fpa*) ha sido ya bien caracterizado, y su participación en la vía de floración independiente del fotoperíodo ha sido determinada por vía experimental, decidimos llevar a cabo el análisis bioinformático y experimental del segundo gen que codifica a una proteína Spen: At4g12640 (denominado *AtSpen2* en este trabajo), cuya función no se ha logrado establecer al presente. La interacción de la proteína codificada por *AtSpen2* con la región líder del ARN mensajero de uno de los genes que codifica una enzima sacarosa fosfato sintasa en arroz (*sps1*), nos indujo a estudiar también la familia de los cuatro genes *sps* de *A. thaliana*, cuya expresión temporal y específica de tejido/órgano se ha estudiado muy poco al presente. Por esa razón, decidimos hacer una caracterización detallada de los promotores de los genes *sps* de *A. thaliana* para definir su patrón de expresión tisular y determinar el efecto del estrés osmótico en su transcripción.

III. HIPÓTESIS

Los estudios bioinformáticos y de expresión conferida por promotores en tejidos y órganos, permitirán establecer que:

- El gen *AtSpen2* de *A. thaliana* ha divergido en su función de su parálogo *FPA*, por lo que no participa en la floración.
- La expresión transcripcional de los genes *sps* de *A. thaliana* presentan traslapes y divergencias en tejidos y órganos.
- Los genes *sps* responden de manera diferencial en la expresión transcripcional ante el estrés osmótico.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión específica en tejidos y órganos del gen *AtSpen2* y de los genes que codifican enzimas sacarosa-fosfato sintasas (SPS), en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar bioinformáticamente el gen *AtSpen2* y su proteína putativa, en *Arabidopsis thaliana*.
2. Caracterizar experimentalmente la expresión conferida por el promotor del gen *AtSpen2* en tejidos y órganos, en *Arabidopsis thaliana*
3. Analizar los promotores de los genes *sps* de *Arabidopsis thaliana* y definir su patrón de expresión conferida por éstos a nivel tisular.
4. Determinar el efecto del estrés osmótico en los niveles de transcripción de los genes *sps* de *A. thaliana*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental establecida consistió principalmente de 5 aspectos:

- Un análisis bioinformático de genes y las proteínas codificadas
- Fusión a genes reporteros *uidA* y *gfp* de las regiones reguladoras 5' de los genes bajo estudio
- Análisis de la expresión conferida por las regiones promotoras a los genes reporteros en plantas transgénicas de *A. thaliana*
- Cuantificación de transcritos mediante qPCR
- Sobre-expresión e inactivación de los genes de interés (Figura IV.1).

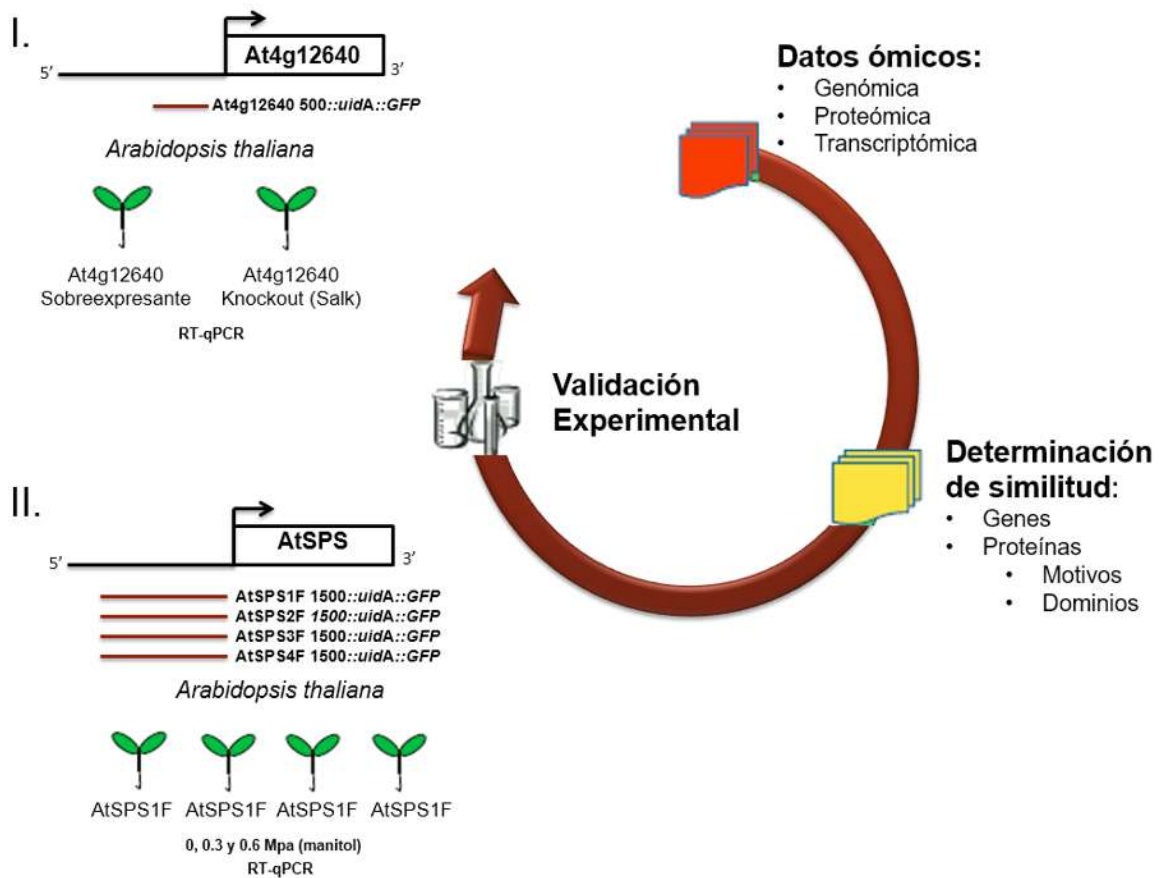


Figura IV.1. Estrategia experimental utilizada en los estudios del gen *AtSpen2* y los genes *AtSPS1F*, *AtSPS2F*, *AtSPS3F* y *AtSPS4F*, de *Arabidopsis thaliana*.

VI. RESULTADOS

6.1. Expression analysis of the *Arabidopsis thaliana* *AtSpen2* gene, and its relationship with other plant genes encoding Spen proteins.

6.2. The *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (*sps*) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress

6.1. Expression analysis of the *Arabidopsis thaliana* *AtSpen2* gene, and its relationship with other plant genes encoding Spen proteins

Solís-Guzmán María Gloria¹, Argüello-Astorga Gerardo², López-Bucio José¹, Ruiz-Herrera León Francisco¹, López-Meza Joel¹, Sánchez-Calderón Lenin³, Carreón-Abud Yazmín¹, Martínez-Trujillo Miguel¹

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México. CP 58000.

²Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa de San José 2055, San Luis, S.L.P., México. C.P. 78216. ³Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, Zac., México. C.P. 98000.

ABSTRACT

Proteins of the Split ends (Spen) family are characterized by an N-terminal domain, with one or more RNA recognition motifs and a SPOC domain. In *Arabidopsis thaliana*, the Spen protein FPA is involved in the control of flowering time as a component of an autonomous pathway independent of photoperiod. The *A. thaliana* genome encodes another gene for a putative Spen protein at the locus At4g12640, herein named *AtSpen2*. Bioinformatic analysis of the AtSPEN2 SPOC domain revealed low sequence similarity with the FPA SPOC domain, which was markedly lower than that found in other Spen proteins from unrelated plant species. To provide experimental information about the function of *AtSpen2*, *A. thaliana* plants were transformed with gene constructs of its promoter region with *uidA::gfp* reporter genes; the expression was observed in vascular tissues of leaves and roots, as well as in ovules and developing embryos. There was absence of a notable phenotype in knock-out and over-expressing lines, suggesting that its function in plants might be specific to certain endogenous or environmental conditions that await further clarification. Our results suggest that the function of *Atspen2* has significantly diverged from that of *fpa* gene due in part to their different transcription expression pattern and divergence of the regulatory SPOC domain.

Keywords: Spen; *Arabidopsis*; vascular bundle; expression.

INTRODUCTION

Several experimental approaches have been used to determine the function of genes in plants: inactivation by disruption (knock-out), over-expression using strong or constitutive promoters, single gene or whole transcriptome analysis, and the use of reporter constructs to study expression patterns conferred by regulatory regions. Notwithstanding the variety of existing methods, only approximately 25% of the genes of *Arabidopsis thaliana*, the most-studied plant species, have been functionally characterized (Rhee and Mutwil, 2014). Using different databases, it is possible to determine the presence of potential *cis* elements in the promoters of genes under study, and predict if transcription is developmentally regulated or by specific internal or external factors (Hernández-García and Finer, 2014).

With the growing number of sequenced plant genomes, numerous databases have been established that can be explored by using various bioinformatic tools to predict the functions of genes and their products. From a structural and evolutionary point of view, it has been possible to classify proteins into families, mainly by comparing related sequences and domains and the presence of tertiary structures associated with specific functions that have been preserved during molecular evolution (Martínez, 2011). The current definition of more than 10,000 protein families could be considered, by analogy, as a periodic table for biology, allowing the prediction of protein function at the molecular level (Sammut *et al.*, 2008). By means of diverse algorithms, protein domains can be predicted from the amino acid (aa) sequence to obtain the first clues about molecular function (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

Proteins of the Split ends (Spen) family are characterized by having an N-terminal RRM domain (RNA recognition motif) and a C-terminal conserved SPOC domain (Spen paralogue and orthologue C-terminal) (Kuang *et al.*, 2000). The RRM domain is also known as an RBD (RNA binding domain) or an RNP (Ribonucleoprotein domain); it consists of 90 aa and has a structure composed of four beta sheets and two alpha helices that interact with ssDNA and ssRNA; this domain is found in a variety of hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins)

involved in alternative splicing and in proteins that are components of snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) (Ariyoshi and Schwabe, 2003). The SPOC domain contains approximately 165 aa residues and consists of a beta-barrel with seven sheets (β 1- β 7) framed by six alpha helices (α A- α F) and is involved in protein-protein interactions; this domain has been described among animals, plants, and fungi (Sánchez-Pulido *et al.*, 2004).

The Spen proteins of animals are involved in different biological processes. In *Drosophila*, they participate in neuronal cell differentiation, the growth and guidance of axons in the embryo (Chen and Rebay, 2000; Kuang *et al.*, 2000), cell-cycle regulation (Lane *et al.*, 2000), and repression of head identity of the embryonic trunk (Wiellette *et al.*, 1999). Artavanis-Tsakonas (1999) stated that the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway is involved in several cellular processes during the embryony development, such as proliferation, differentiation, apoptosis, maintaining of undifferentiated cells, and cell-fate specification. In humans, the Spen SHARP protein (SMRT7/HDAC1-associated repressor protein) participates as a component of this signalling pathway, repressing the transcription of the *Notch* genes by the RBP-Jk-SHARP complex, which recruits a histone deacetylase complex (Oswald *et al.*, 2002). Furthermore, the participation of SHARP in the silencing of the X chromosome in humans has been recently demonstrated: the long non-coding RNA *Xist* associates with SHARP and two other proteins (SAF-A and LBR), forming a complex that activates a histone deacetylase (DHAC3) which is necessary not only for silencing the chromosome but also for the exclusion of the RNA polymerase II (McHugh *et al.*, 2015).

Flowering is a process that entails the change from the vegetative to the reproductive phase in the angiosperms; it depends on the quantitative integration of environmental stimuli with an endogenous development program (Simpson and Dean 2002). In *A. thaliana* several flowering pathways have been characterized, including the photoperiod-dependent pathway, the gibberellin (GA) pathway, and the autonomous pathway, which is not triggered by light signals but by exposure to low temperatures in combination with some endogenous cues (Simpson, 2004). In the

autonomous pathway, the components act regulating the level of the mRNA that encodes the Flowering Locus C (FLC), a transcription factor that repress flowering by antagonizing the activity of some components of the photoperiod-dependent pathway (Hepworth *et al.*, 2002). The *A. thaliana* Spen protein FPA (Flowering Pathway Autonomous) is a key component of the autonomous pathway (Schomburg *et al.*, 2001); it acts in concert with other proteins (FCA and FY) promoting the 3' end processing and polyadenylation of an antisense *flc* RNA (Hornyik *et al.*, 2010), leading to the transcriptional down-regulation of the sense *flc* RNA, by a mechanism involving the FLD demethylase (Liu *et al.*, 2010). Thus, the flowering time in *A. thaliana* is increased or reduced when the *fpa* gene is either inactivated or overexpressed, respectively (Schomburg *et al.* 2001).

The crystal structure of the FPA SPOC domain has been determined at high resolution (2.7 Å) and comparisons with homologous domains showed the highest similarity with the SPOC domain of SHARP, hence demonstrating the high conservation of the SPOC structure among far related organisms (Zhang *et al.*, 2016).

In rice (*Oryza sativa*), two genes encoding Spen proteins, *OsRRM* and *OsRRMh*, have been identified. *OsRRM* is expressed in the seed endosperm and the synthesized protein is localized in the nucleus; however, when this gene was silenced by dsRNAi, no differences with the control plants were found in the seeds and whole plant phenotypes, and no change in the flowering time was observed (Chen *et al.*, 2007). The *OsRRMh* gene is expressed in the roots, stem, leaves, and immature seeds, and it is alternatively spliced in different tissues, suggesting its involvement in several biological functions; when this gene was knocked-down by dsRNAi, the flowering was retarded and the panicle phenotype was larger, which was in agreement with the down-regulation of two flowering-related genes of rice: *RFT1* and *Hd3a* (Liu and Cai, 2013).

With the sequencing of the *A. thaliana* genome (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), it has been possible to identify numerous putative genes, but the functions of many remain enigmatic. In this work, experimental and bioinformatic information was

generated and analyzed to unravel the function of the At4g12640 gene (herein named *AtSpen2*) encoding a putative Spen protein (AtSPEN2). Gene constructs of the *AtSpen2* promoter fused to *uidA::gfp* reporter genes revealed its expression in the vascular tissues of leaves, roots, and embryos, while no apparent changes in growth, development and flowering time were observed under standard growth conditions in *AtSpen2* knock-out (KO) mutants or over-expressing (OE) lines compared to WT plants. We discarded that *AtSpen2* has a function related with the flowering time, and suggest that it may have an accessory function in a development process or its participation is conditional and depends on certain endogenous or environmental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Databases and bioinformatic tools

The databases and bioinformatic tools using in this research are available at the following electronic addresses:

Genetic analysis and molecular biology in *Arabidopsis thaliana*:

- <https://www.arabidopsis.org/>

Analysis of promoter regions and transcription factors of *Arabidopsis thaliana*:

- <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>

Analysis of nucleotide and protein sequences:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.sanger.ac.uk/>
- <http://www.genomesonline.org>

Analysis of proteins and domains:

- <http://pfam.sanger.ac.uk/>
- <http://pfam.janelia.org/>
- <http://pfam.sbc.su.se/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=cdd>
- <http://www.uniprot.org>
- <http://www.expasy.org/prosite/>

Similarity analysis of the AtSPEN2 SPOC domain

Sequences were obtained from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> and <http://www.uniprot.org>. Multiple sequence alignment was performed with ClustalW. The tree was generated with Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), using the Neighbor-Joining method with the proportion of paired differences.

Construction of a vector to over-express *AtSpen2*

A region of the *AtSpen2* cDNA was amplified from a plasmid isolated from an *A. thaliana* cDNA Matchmaker[®] library. The oligonucleotides FOE 5'-AAAAGCAGGCTGCATGTCATCTAGAGGAAGGGAGAGGATGA-3' and ROE 5'-AGAAAGCTGGGTGTTAACTCGGTTTAGCTTGTGAATCTGCTG-3' were used to generate the *attB1* and *attB2* recombination sites. The amplified DNA fragment was cloned into the pDONR221[®] (Invitrogen) vector, harbouring the sites *attP1* and *attP2*. The recombination reaction was performed using the BP Clonase Enzyme Mix Kit[®] (Invitrogen), forming the *attL1* and *attL2* recombination sites. The pDONR221[®] vector with the *AtSpen2* coding region was recombined with the pK2GW7.0 (Ghent University, Belgium) binary vector (harbouring the *attR1* and *attR2* recombination sites), using the LR Clonase Enzyme Mix Kit[®] (Invitrogen). In the final recombinant vector, the strong 35S promoter of the Cauliflower Mosaic Virus (Odell *et al.*, 1985) was joined to the *AtSpen2* coding region.

Genotyping of the *AtSpen2* knock-out mutant (KO)

Seeds of the *A. thaliana* insertional mutant At4g12640-T-DNA (KO) were provided by the Salk Institute for Genomic Analysis. Two lines were used: KO-024223 and KO-030932. Lines were genotyped by PCR as previously described (Alonso *et al.*, 2003).

***Arabidopsis thaliana* genomic DNA extraction and amplification of the promoter region**

DNA of the wild-type *A. thaliana* ecotype Col-0 was isolated using the DNAeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), following the manufacturer's instructions. The resulting DNA was used to amplify 500 bp of the *AtSpen2* promoter region, using the oligonucleotides: F500 5'-ACATGACGAGCAGATCTACGGAGA-3' and R500 5'-TCTGCATTTCGTCAGATCTATCGCA-3'. The Supermix High Fidelity[®] PCR kit (Invitrogen) was used following the manufacturer's instructions. The amplification conditions were: 95°C for 5 min, 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, 68°C for 90 sec, followed by a final extension at 68°C for 10 min.

Construction of a vector to analyze the expression conferred by the *AtSpen2* promoter region

The 500 bp PCR fragment, corresponding to the *AtSpen2* promoter, was cloned into the pCR8[®]/GW/TOPO (Invitrogen) vector, between the *attL1* and *attL2* recombination sites. The sequence and orientation of the cloned fragment was verified by the method of Sanger *et al*, (1977). The resultant vector was recombined with the pKGWFS7 binary vector (Ghent University, Belgium) containing the *attR1* and *attR2* recombination sites; this vector harbours a translational fusion of the *gfp* and *uidA* reporter genes, allowing both to be used for analyzing the expression conferred by the *AtSpen2* promoter region. Recombination was performed using the LR Clonase II enzyme Mix[®] Kit (Invitrogen).

***Agrobacterium tumefaciens* and *Arabidopsis thaliana* genetic transformation**

The recombined binary vectors were used to transform the *Agrobacterium tumefaciens* strain pGV2260 (McBride and Summerfelt, 1990) by electroporation at 1800 V, using the Eppendorf electroporator 2510. Transformed colonies were selected in LB medium (Luria) with carbenicillin (100 µl/ml), rifampicin (50 µl/ml), spectinomycin (100 µl/ml) and streptomycin (300 µl/ml).

The *A. tumefaciens* strain pGV2260 containing the recombinant binary vector was grown to an optical density of 0.6 (600 nm), centrifuged for 5 min at 6000 rpm; the pellet was resuspended in infiltration medium: 0.5X MS (Murashige and Skoog, 1962), 5% sucrose (Bioxon) and 0.05% Silwett L-77. The bacterial suspension was applied to 2-10 mm *A. thaliana* Col-0 inflorescences following the floral DIP method (Clough and Bent, 1998; Martínez-Trujillo *et al.*, 2004). Plants were placed in the dark for 12 h and then transferred to light conditions. To collect the seeds, plants were allowed to produce mature siliques. Plant selection was made in 0.2X MS medium, pH 5.7 supplemented with 0.6% sucrose as carbon source and 1% plant agar (Phytotechnology Laboratories A111), with kanamycin (60 µg/ml) for plant selection.

Expression analysis by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA from Col-0, KO and OE *A. thaliana* lines was isolated from the roots, leaves, and flowers, using Trizol[®] (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using reverse transcriptase H (Thermo Fisher Scientific) and oligo dT. The following oligonucleotides were designed to amplify a 201 bp *AtSpn2* gene fragment: FAt4g 5'-TCCAAAGGGACTCCAGAATG-3' and RAt4g 5'-CATAACTGCGACCAGGGGAAT-3'. A 226 bp fragment of actin was used as the internal reference, using the oligonucleotides FACTINA 5'-TGCCAATCTACGAGGGTTTC-3', RACTINA 5'-TTCCGATGGAAGAGCTGGT-3'.

Growth conditions of different *A. thaliana* lines

Seeds of the different *A. thaliana* lines were surface disinfected by washing with 96% ethanol (v/v in water) for 7 min and then with 20% sodium hypochlorite (v/v in water) for another 7 min. Subsequently, seeds were rinsed five times with sterile deionized water, resuspended in 1 ml, and placed at 4°C in the dark for 48 h to promote and synchronize germination.

Disinfected seeds were placed in Petri dishes containing 0.2X MS medium, pH 7.0, for plant growth, supplemented with 0.6% sucrose and 1% plant agar. For the

selection of genetically transformed plants, kanamycin (60 µg/ml) was added to the medium. Ten days after germination, plants were transferred to pots with a substrate composed of peat moss, perlite, and vermiculite in 3:1:1 ratios at field capacity water. Both Petri dishes and pots were incubated in growth chambers (Percival Scientific AR-95L), under the following conditions: 24 °C, 100 µmol m²s⁻¹ light intensity, 80% relative humidity, and a 16:8 h light-dark photoperiod.

Expression analysis of the *uidA* and *gfp* reporter genes

The transgenic plants with the *uidA* reporter gene (Jefferson *et al.*, 1987) were stained with 0.1% 5-bromo-4-cloro-3-indolil D-glucuronide (x-gluc) in phosphate buffer (NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄, 0.1 M, pH 7), with 4 mM potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide for 12 h at 37 °C. A blue compound was generated by conversion of the x-gluc substrate via the activity of the beta-glucuronidase enzyme encoded by *uidA*. Plants were clarified and fixed according to Malamy and Benfey (1997).

The expression of the *gfp* reporter gene was determined by detecting the green fluorescence emitted by the GFP protein (Haseloff and Amos, 1995). To analyze the expression pattern, seedlings were supplied with propidium iodide (1 µg/ml), which emits red fluorescence. Detection of GFP and propidium iodide fluorescence was performed using an Olympus Fluo-View FV1000-PME microscope. To generate the fluorescence of the GFP protein and propidium iodide, excitation wavelengths of 488 nm and 493 nm were used, respectively; photographs were taken at 509 nm and 535 nm wavelengths, respectively.

RESULTS

Bioinformatic analysis of the *AtSpn2* gene and the putative AtSPEN2 protein

To provide information about the function of the *AtSpn2* gene, the similarity of the encoded protein with other Spn proteins of plants and particularly of the SPOC domain, was performed by a bioinformatic analysis.

The *AtSpn2* gene is located on *A. thaliana* chromosome 4 and encodes a putative protein of 823 aa residues. A bioinformatic analysis of this protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/42566726>) predicted two RRM motifs between aa 25-90 and 153-223, respectively, and a SPOC domain from aa residues 471-567 (Figure 6.1.1 A); hence, it can be concluded that this protein belongs to the Spn family (Sammut *et al.*, 2008). The alignment of the SPOC domain of AtSPEN2 with the homologous domains of other Spn proteins showed the conservation of 18 aa residues, and the sequences that participate in the β sheets and α helix structures (Figure 6.1.1 B). A topological comparison of the RRM and SPOC domains of AtSPEN2 with other described Spn proteins showed that the number of actual or putative RRM domains is either two (AtSPEN2, OsRRM and OsRRMh), three (AtFPA) or four (SHARP), but there is only one SPOC domain in the carboxyl side of the protein (Figure 6.1.1 C).

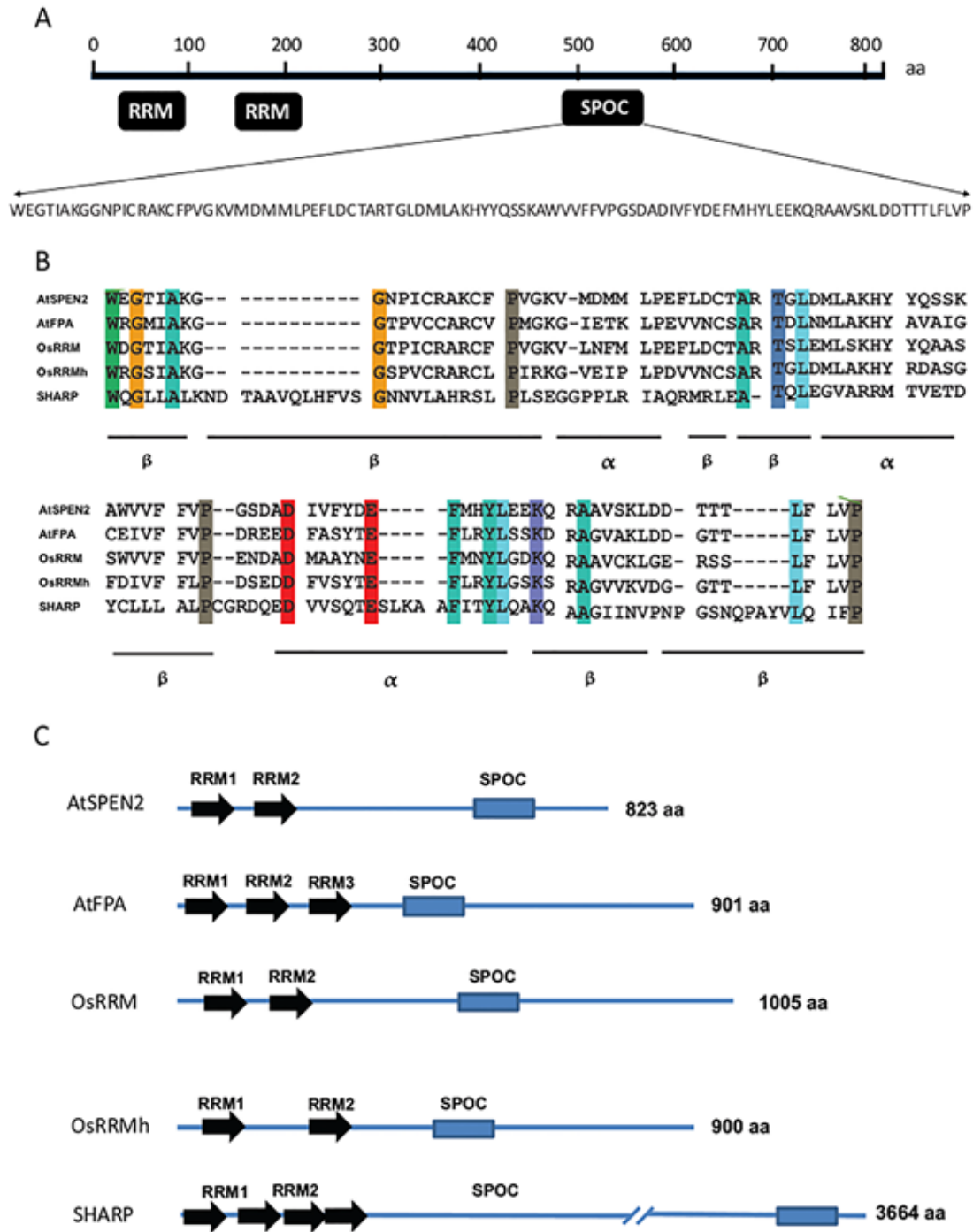


Figure 6.1.1. The *AtSpEN2* gene encodes a Spen putative protein. A. The *AtSpEN2* gene is located on chromosome 4 from nucleotides 7,462,599 to 7,467,862 in the *A. thaliana* genome (TAIR, The Arabidopsis Information Resource) and encodes an 823 aa putative protein, with two RRM domains (aa 25-89) and (aa 153-223), and a SPOC domain (aa 471-567) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/826877>). **B.** Alignment of the SPOC sequences in Spen plant and human proteins: AtSPEN2 (*A. thaliana*), AtFPA (*A. thaliana*), OsRRM (*O. sativa*), OsRRMh (*O. sativa*) and SHARP (*Homo sapiens*) is shown. **C.** Location of RRM and SPOC domains of Spen proteins: AtSPEN2 (*A. thaliana*), AtFPA (*A. thaliana*), OsRRM (*O. sativa*), OsRRMh (*O. sativa*) and SHARP (*Homo sapiens*).

The average size of the plant Spen proteins is approximately 900 aa, while the human protein SHARP is almost four times larger, with 3,664 aa. Unlike the RRM domain, which is very diverse (Maris *et al.*, 2005), the SPOC domain is more conserved, allowing evolutionary relationships to be established between proteins. The bioinformatic analysis of SPOC domains in predicted proteins of vascular plants with a sequenced genome, revealed that in each plant species there are two genes encoding Spen proteins; moreover, the SPOC domains of those distinct proteins encoded in the genome of each plant species are grouped in two clearly divergent clades (Figure 6.1.2), hence suggesting that the genes encoding Spen proteins of a same clade are orthologous; this also indicates that the *Spen* genes of vascular plants were derived from an antique event of duplication of a single ancestral gene; this supposition is reinforced by the existence of only one Spen gene in the non-vascular plant *Physcomitrella patens*, a moss with a sequenced genome. The moss Spen protein contains a SPOC domain which displays low sequence identity with both of major SPOC clades of vascular plants (Figure 6.1.2). The comparative analysis of SPOC domains of *A. thaliana* and *Oryza sativa* proteins, showed that the domains of AtSPEN2 and OsRRM belong to a same clade, whereas the domains of FPA and OsRRMh, both reportedly involved in flowering time determination in the corresponding plant species, belong to the second major clade (Figure 6.1.2).

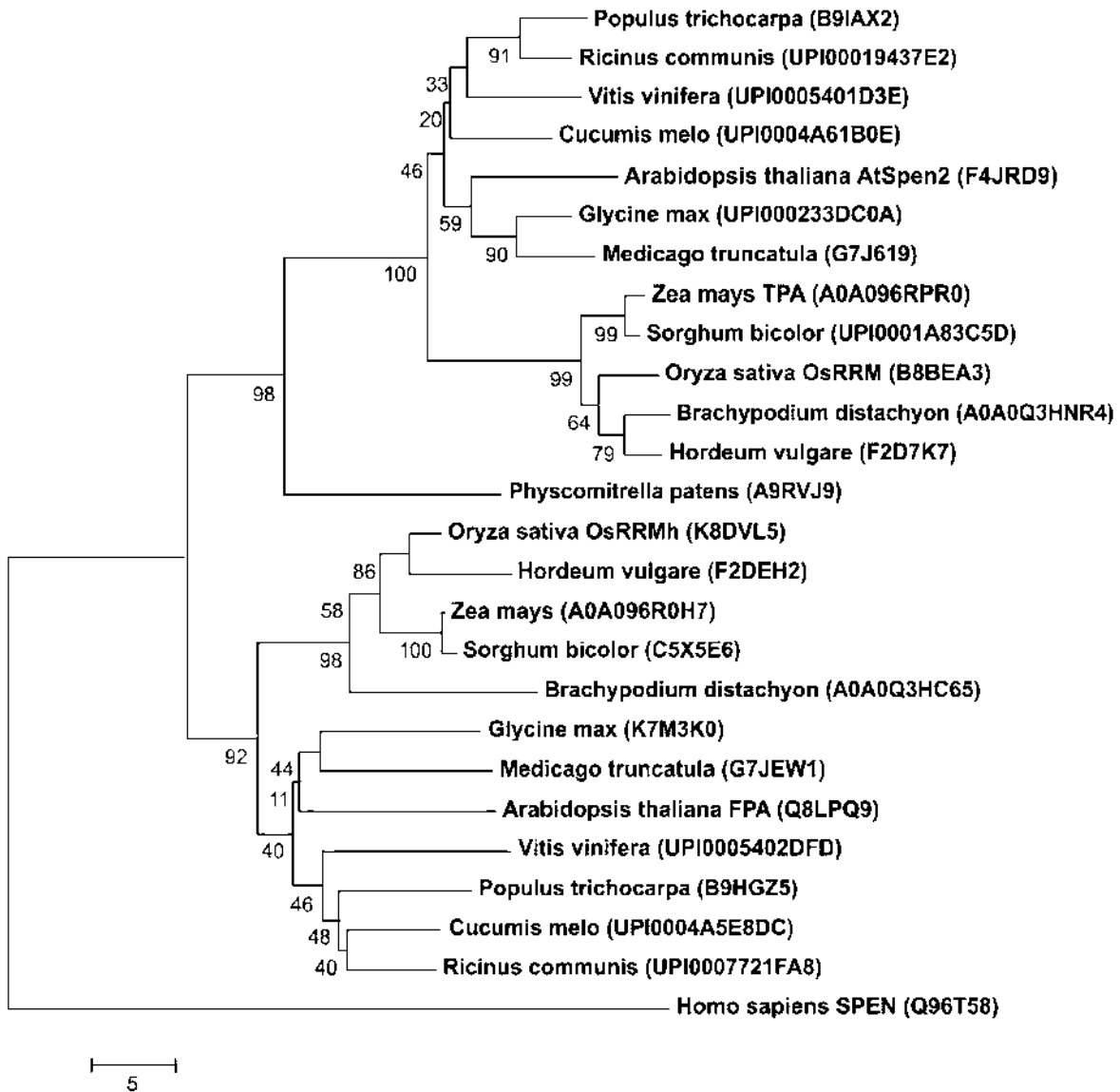


Figure 6.1.2 Dendrogram inferred using Neighbor-Joining of plant Spen proteins derived from the SPOC domain comparisons. The SPOC sequences of the following species were used: *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Brachypodium distachyon*, *Physcomitrella patens*, *Cucumis melo*, *Medicago truncatula*, *Shorgum bicolor*, *Ricinus communis*, *Glicine max*, *Zea mays*, and *Homo sapiens* as the external group. Bootstrap values are shown below the branches. The scale are in the units of the number of amino acid differences per sequence and accession number or locus ID is indicated in parenthesis.

Analysis of the *AtSpn2* over-expressing (OE) and knock-out (KO) transgenic lines

The binary vector with the *AtSpn2* cDNA fused to the strong 35S promoter of Cauliflower mosaic virus (CaMV) was used to transform *A. thaliana* plants using *A. tumefaciens*. Plants were selected on the basis of kanamycin resistance and homozygous plants were selected; this strategy obtained 13 lines (T3 generation). The *AtSpn2* KO lines were analyzed by PCR and it was found that in KO-024223 the T-DNA was inserted in the exón 3 (nucleotide +2153), whereas in the KO-030932 line the T-DNA was inserted in the promoter (nucleotide – 413). These KO lines were named as KO-E and KO-P in the following sections.

The *in vitro* growth of plants from three OE lines (OE-1, OE-2, OE-3), KO-E and KO-P lines, was compared to the WT line for 10 days, and then the plants were transferred to pots for the production of flowers and siliques. The following phenotypic variables were analyzed: primary root growth, lateral root number, lateral root density, root biomass, shoot biomass, and flowering time. There were no apparent differences among WT, KO and OE plants in any of the developmental traits analysed in: figure 6.1.3 results of KO-E, OE-1, and WT, are shown as representatives, the other OE lines (OE-2 and OE-3) and the KO-P line, had the same statistical values in the phenotypic variables analysed. These results discard the participation of the *AtSpn2* gene in the flowering time in the experimental used conditions, as a difference with its paralogue gene *fpa*.

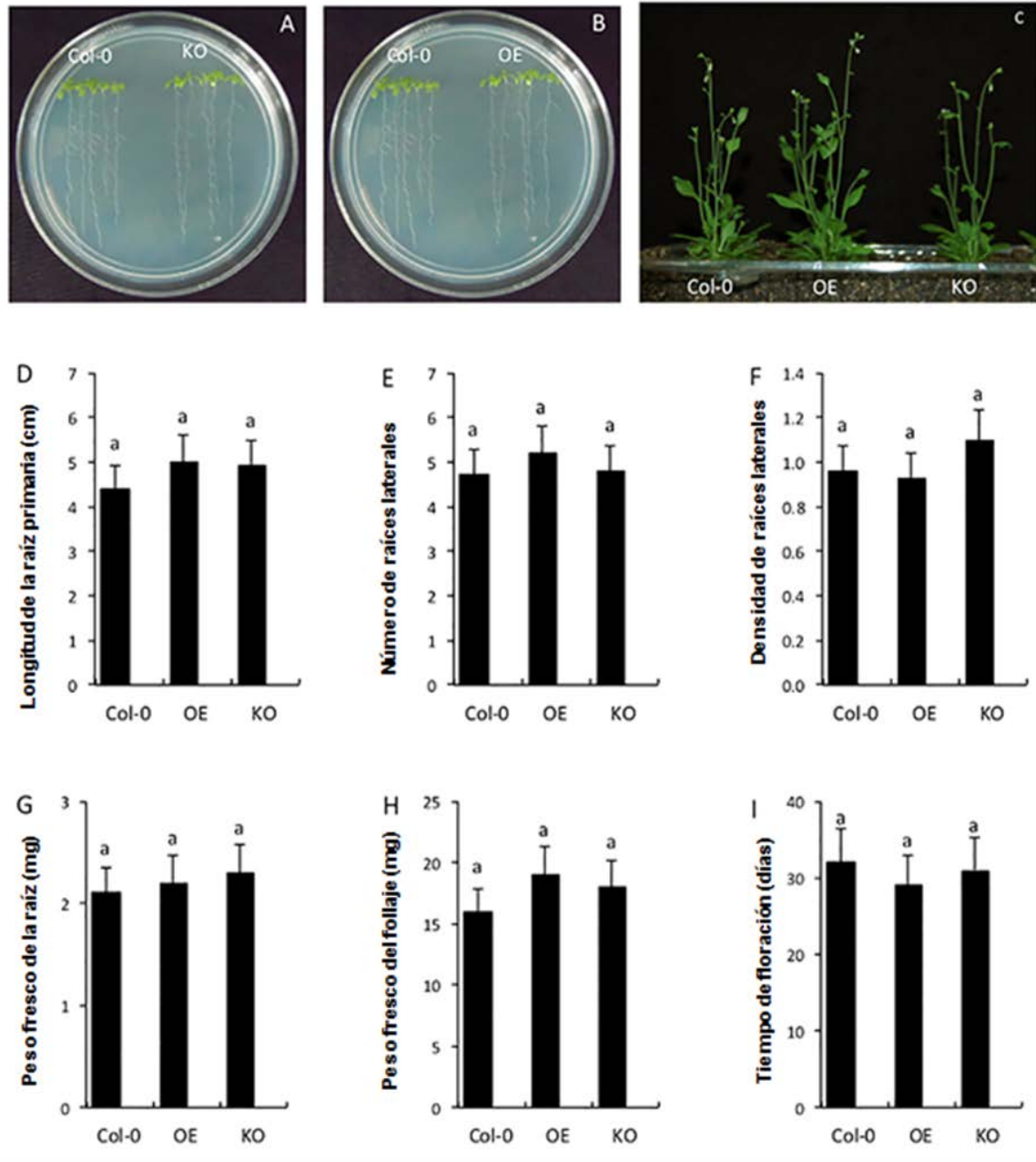


Figure 6.1.3. Analysis of growth and development in *A. thaliana* lines **A.** *In vitro* growth of Col-0 and KO-E lines at 10 days after germination. **B.** *In vitro* growth of Col-0 and OE-1 lines at 10 days after germination. **C.** Growth in pot of Col-0, OE-1 and KO-E lines, at 35 days after germination. **D.** Primary root growth. **E.** Number of lateral roots. **F.** Lateral root density. **G.** Fresh root weight. **H.** Fresh foliage weight. **I.** Flowering time. For D-H, plants were grown *in vitro* and measurements were made ten days after germination. In I, plants were first grown *in vitro* for six days and then transferred to pots. Bars indicate the confidence interval for $\alpha = 0.05$. Different letters indicate significance with the Tukey test ($p \leq 0.05$, $n = 15$).

The levels of *AtSpn2* transcripts in the OE-1 and KO-E lines used to analyze the phenotypic traits, were determined by RT-qPCR. *A. thaliana* Col-0 plants were used as the control, and the expression of the endogenous actin gene was used as the internal reference. In the different organs analyzed, leaf, root, and flower, there was greater expression of the *AtSpn2* gene in the OE-1 line (145.5, 29.5 and 41.2 fold, respectively), and lower in the KO-E line (0.011, 0.21 and 0.0023 fold, respectively), relative to WT seedlings (1, 1 and 1, respectively) (Figure 6.1.4). The changes observed in the *AtSpn2* transcript levels in the OE-1 line with respect to the wt plants, were more than two magnitude orders in leaves and one magnitude order in root and flowers. In the KO-E line, changes in transcript levels were more variable, with decrements of two magnitude orders in leaves and flowers, but only five fold in roots. Therefore, we consider that the observed changes in the *AtSpn2* transcript levels in OE-1 and KO-E lines with respect to wt plants, are enough significant to be considered as typical overexpressing and knock-out lines. Furthermore, it is improbable that the KO-E line can produce a normal mRNA, because the exon 3 is interrupted by the T-DNA, as we demonstrated. Although only one endogenous gene was used as control, the experiment was repeated three times with similar results.

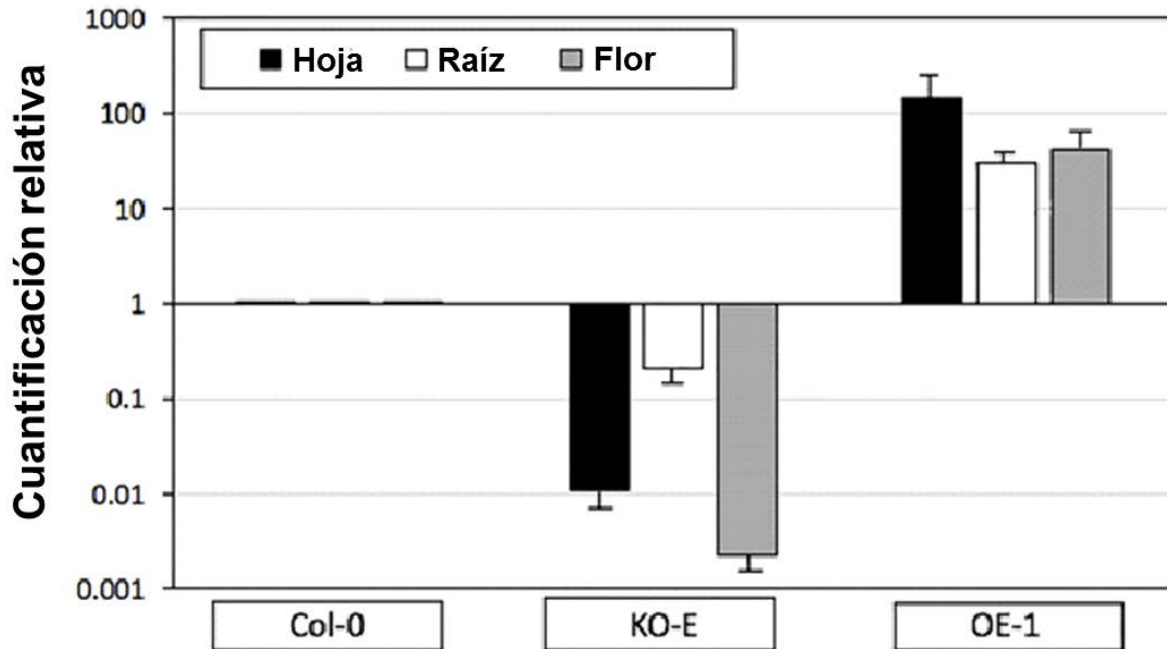


Figure 6.1.4. *AtSpn2* expression levels in *A. thaliana* lines. *AtSpn2* gene expression was determined by quantitative PCR, according to the Materials and Methods. Actin was used as the endogenous control. Expression in KO-E and OE-1 lines are reported as fold-change relative to the WT Col-0 line.

***Cis* elements and expression conferred by the *AtSpn2* promoter to the *uidA* and *gfp* reporter genes**

The promoter region of the *AtSpn2* gene apparently consists of 346 bp, which is the distance that separates it from the nearest gene, *At4g12620*. This promoter lacks a canonical TATA box, which is present in one-third of *A. thaliana* genes at ~30 bases upstream of the transcription start site; it also lacks the initiator element (Inr), YYANa/tYY. Some potential *cis* regulatory elements identified by bioinformatic tools (see Material and Methods) were the following: T-Box (position 7462561-7462566), GATA-Box (position 7462503-7462508), and I-Box (position 7462504-7462509) (AGRIS: Davuluri *et al.*, 2003 and Athena: O'Connor *et al.*, 2005). The GATTTGATA sequence at position 746499-746507 was found, by visual analysis, as a variant of the GAaTTGATA and GAgATGATA motifs, both reported *cis*-acting elements conferring expression in the phloem (Srivastava *et al.*, 2014; Truernit and Sauer, 1995). This finding is congruent with the tissue-specific expression conferred by the *AtSpn2* promoter, as described in a subsequent section (Figure 6.1.5).

The promoter region of *Atspen2* is shared with the *At4g12620* gene, which is located at position 7459646-7462253 (TAIR, The Arabidopsis Information Resource). This gene encodes a protein of the replication origin recognition complex (ORC1B) and its promoter region contains several predicted *cis* elements: T-Box, ATB2/AtbZIP53/GBF5 BS in ProDH, BoxII, SORLIP2 and E2F (AGRIS: Davuluri *et al.*, 2003 and Athena: O'Connor *et al.*, 2005) (Figure 6.1.5)

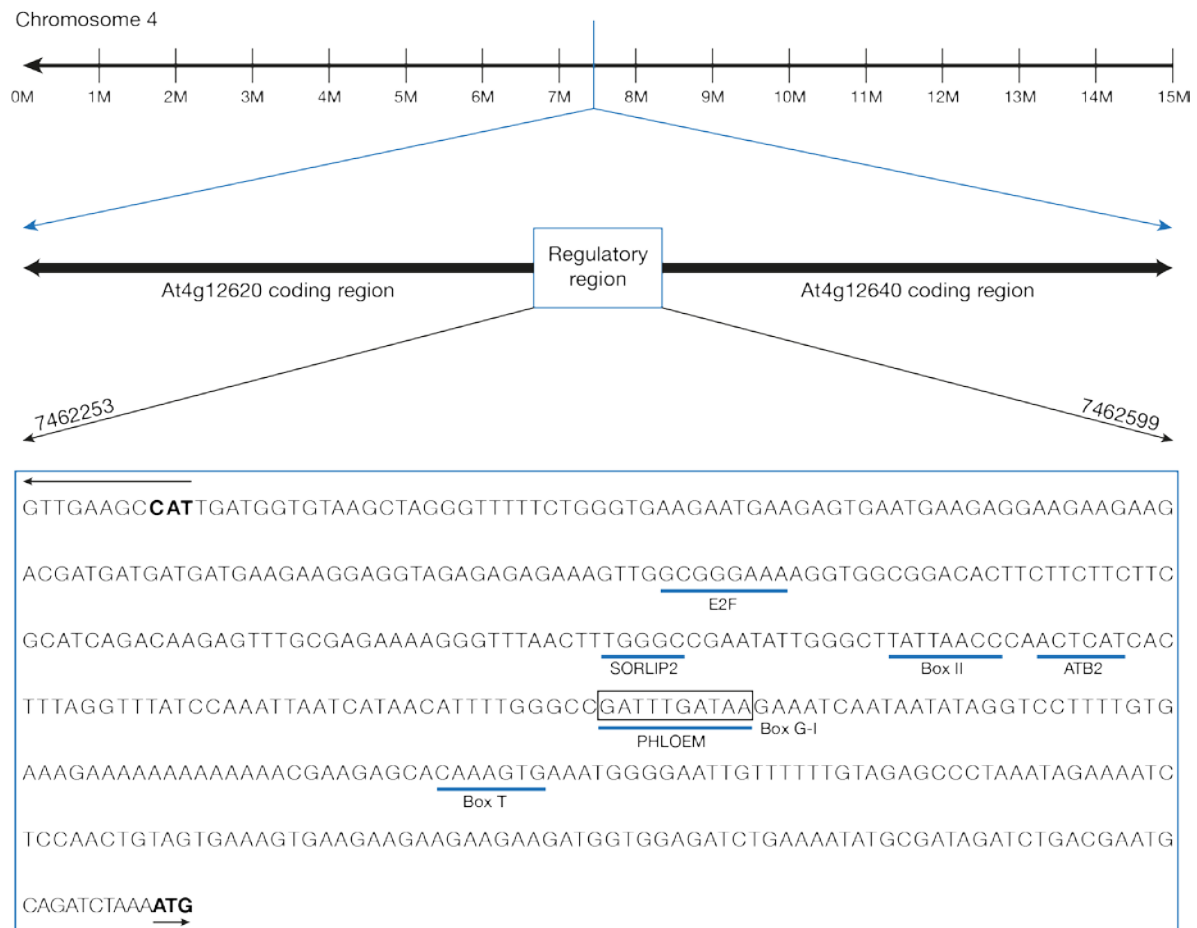


Figure 6.1.5. Putative *cis-regulatory* elements in the *AtSpen2* promoter. The nucleotide sequence of 346 bp located 5' upstream of the *AtSpen2* coding sequence was used for the bioinformatic analysis; this sequence is partially shared with the promoter of the *At4g12620* gene. The sequences underlined correspond to I-Box, GATA-Box and T-Box as part of the *AtSpen2* promoter. The box corresponds to the putative element conferring expression in phloem. Other underlined sequences correspond to *At4g12620* *cis* elements: T-Box, ATB2/AtbZIP53/GBF5 BS in ProDH, BoxII, SORLIP2 and E2F.

A. tumefaciens transformed with a binary vector harbouring the *AtSpen2* promoter region fused to the *uidA::gfp* reporter genes was used to transform *A. thaliana* Col-0 plants. The transformed plants were differentiated from untransformed ones by their greenish colour and fast growth in media with kanamycin (60 µg/ml). The percentage of plant transformation obtained was 1-1.2%. Plants were selected for homozygosity in the T3 generation. Twelve independent transgenic lines were obtained, 10 of them with detectable expression of the two reporter genes, although with variations in the intensity of expression, possibly due to positional effects of the T-DNA insertion into the genome. The expression analysis of the reporter genes showed that both *uidA* and *gfp* displayed the same expression patterns in the different plant tissues; accordingly, the results illustrated in the subsequent figures are shown with either one or the other reporter gene, depending on the quality of the images obtained.

The expression of the *uidA::gfp* reporter genes was observed in different organs of the plants. In roots, the expression was found in the stele of the differentiated zone, both in the vascular tissue and pericycle. Lateral root primordia originating from pericycle showed expression in all cells, but in the tips of the primary and lateral roots, the expression was detected in the central part of the elongation and meristematic zones, and it was interrupted before reaching the quiescent centre. (Figure 6.1.6 A-D). In the cotyledonary and true leaves, the expression was restricted to the vascular tissue bundles and continued through the petiole (Figure 6.1.6 E-H).

In the flowers, the expression was observed in the filaments of the stamens, but not in the anthers and pollen grains; following the stages reported by Smyth *et al.* (1990), in flower stage 12 (flower unopened unfertilized), expression was concentrated in the septum margins (Figure 6.1.6 I), whereas in the stages 14-15 (fertilized flowers), the expression appeared with greater intensity in the developing embryos (Figure 6.1.6 J).

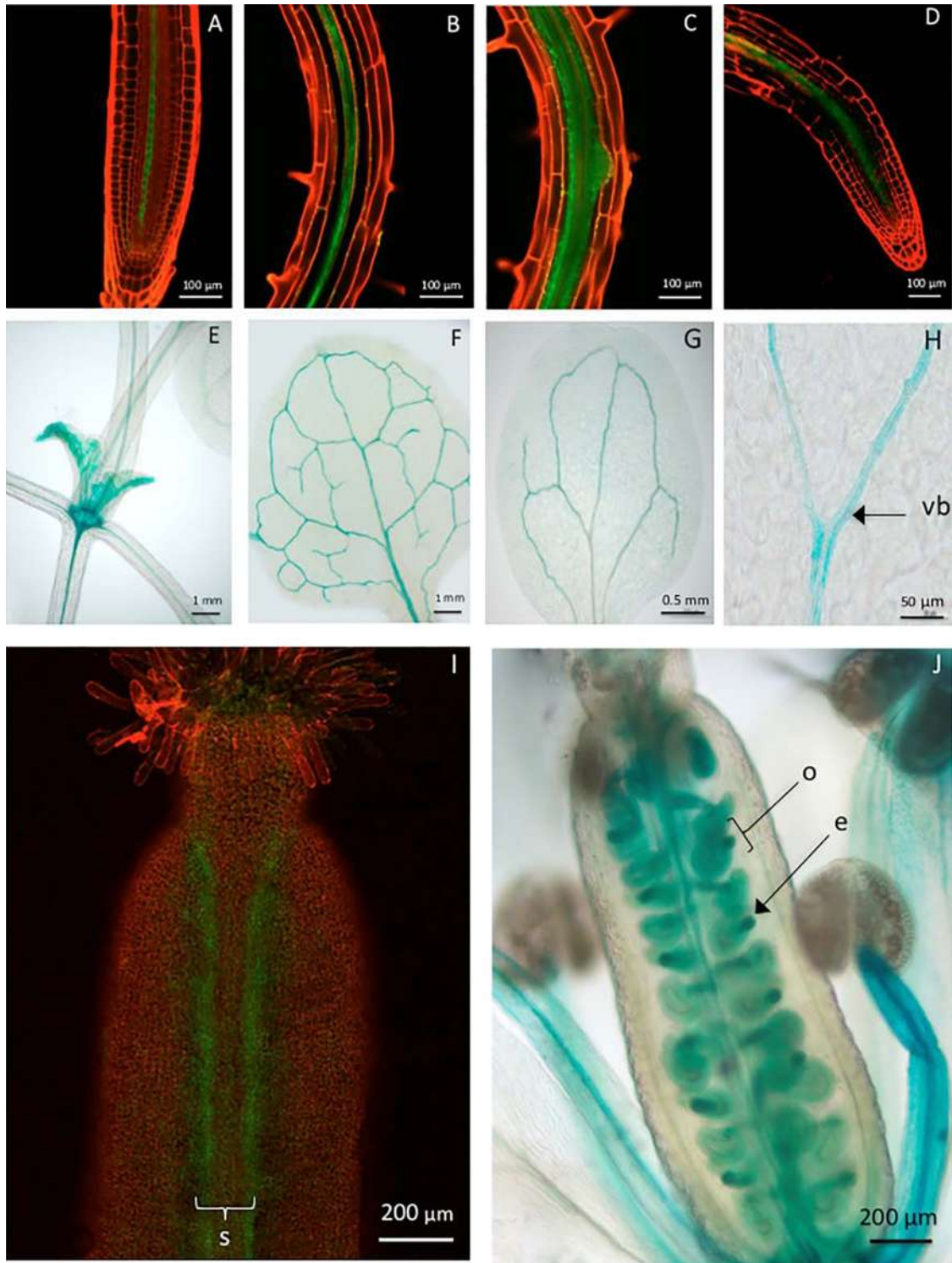


Figure. 6.1.6. Expression conferred in by the *AtSpen2* promoter region in different organs and tissues. **A.** Primary root tip. **B.** Lateral root tip. **C.** Lateral root primordium. **D.** Lateral root. **E.** Stem with forming leaves. **F.** True leaf. **G.** Cotyledonary leaf. **H.** Vascular bundle. **I.** Gynoecium in the flower stage 13 (without fertilization). **J.** Gynoecium in the flower stage 15 (fertilized with developing embryos). In A-D and I, the expression was detected by GFP fluorescence (green). In E-H and J, the expression was detected by the *uidA* reporter gene (blue). Images are representative of 10 replicates. vb (vascular bundle), s (septum), o (ovule), e (embryo).

DISCUSSION

In this work, the *AtSpen2* gene of *A. thaliana* and the predicted encoded protein were analyzed by using bioinformatic and experimental methods. The comparative sequence analysis showed that the putative AtSPEN2 protein is different from FPA, the first Spen protein functionally characterized in *A. thaliana*, in both size and overall aa sequence: AtSPEN2 exhibits two RRM domains in its N-terminal domain whereas FPA displays three RRM domains. Systematic comparisons of the AtSPEN2 SPOC domain revealed that it exhibits higher sequence identity to the equivalent domain of Spen proteins encoded by other plant species, including the OsRRM protein of rice (72%), whereas with *A. thaliana* FPA was only 56%; correspondingly, the SPOC domain of FPA exhibits higher sequence identity to the OsRRMh protein of rice than to AtSPEN2 (Figure 6.1.2). These observations indicate that the *AtSpen2* gene is a paralogue of the *fpa* gene of *A. thaliana*, and probably an orthologue of the rice *OsRRM* gene. Thus, it is plausible that the AtSPEN2 protein function has diverged from that of FPA, which is involved in controlling flowering time by the autonomous pathway (Schomburg *et al.*, 2001).

This hypothesis is supported by the results of the phenotypic analysis of *A. thaliana AtSpen2* KO mutants and transgenic OE lines, as flowering time was not modified compared to WT plants. In contrast, inactivation of *fpa* in *A. thaliana* (Schomburg *et al.*, 2001) and its orthologous gene *OsRRMh* in rice (Liu and Cai, 2013) produced a delay in flowering, hence demonstrating the function of both proteins in flowering control has been preserved through the evolution of angiosperms. It can be hypothesized that the ancestral gene encoding a Spen protein in plants was duplicated before separation of dicots and monocots and that a process of functional divergence took place throughout the subsequent evolution of those plant lineages. The plausible original function of the ancestral protein was the control of flowering, as indicated by the preservation of that function in both FPA and OsRRMh, while the other proteins (AtSPEN2 and OsRRMh) might have one or more functions unrelated to this process.

We functionally analyzed the promoter of *AtSpen2* to establish its pattern of activity in different organs and tissues during plant development, and compared it with the expression conferred by the *fpa* gene promoter (Table 6.1.1). This could shed light on potential functional differences between the Spen protein-coding genes examined because promoters have an important role in determining the place (tissue or organ), time, and intensity of transcription, which together with the characteristics of the encoded proteins, largely define the molecular, cellular, and physiological function of these proteins (Hernández-García and Finer, 2014). The absence of a canonical TATA box and an initiator element in the *AtSpen2* promoter indicates that these elements are not the only *cis* elements that are critical for determining transcription initiation of RNA pol II-dependent genes (Narlikar, 2014). Although it has been proposed that yeast and human genes with promoters lacking a TATA box are involved in constitutive processes (Yang *et al.*, 2007), there are numerous exceptions to this rule in those same species and notably, in plants (Kumari and Ware, 2013). Indeed, the pattern of tissue-specific expression conferred by the *AtSpen2* promoter and its dependence on the development of flower structures suggest that this promoter does not display constitutive transcriptional activity.

Table. 6.1.1. Comparison of organ and tissue-specific expression patterns of the *uidA* reporter gene directed by the *AtSpen2* and *fpa* gene promoters in *Arabidopsis thaliana* (Data of the *fpa* promoter are those reported by Schomburg *et al.*,2001).

ORGANS/ TISSUES	<i>fpa</i> EXPRESSION	<i>AtSpen2</i> EXPRESSION
COTYLEDONARY LEAVES	Yes Pattern: the whole leaf	Yes Pattern: vascular tissue
ROOTS	No	Yes Pattern: all the stele of primary and lateral roots (vascular tissue and pericycle); lateral root primordia Time: all time
MATURE LEAVES	Yes Pattern: patches Time: only in the two first true leaves	Yes Pattern: vascular tissue Time: all time
AXILARY MERISTEM INFLORESCENCE	Yes Pattern: homogeneous	No
INFLORESCENCE STEM	Yes Pattern: homogeneous	Yes Pattern: vascular tissue
FLOWER	Yes Pattern: not reported Time: all time	Yes Pattern: septum in stage 12 (non-fertilized flower); developing embryos in stages 14-15. Time: onset at stage 12

The most characteristic expression directed by the *AtSpen2* promoter occurs throughout the vascular tissue (phloem and xylem) and although some *cis* elements have been associated to the specific expression in phloem, the reported sequences are diverse, consisting of 8-13 nucleotides that do not show a significant degree of conservation among distinct promoters. These phloem-specific sequences have been classified into four groups, two of which have been reported in *A. thaliana* (Srivastava *et al.*, 2014). The sequence GATTTGATA found in the *AtSpen2* promoter, is very similar to the sequences GAaTTGATA and GAgATGATA, both reported to confer expression in *Pisum sativum* (Srivastava *et al.* 2014) and *A. thaliana* (Truernit and Sauer, 1995); thus it is possible that this sequence is involved in the phloem expression conferred by the *AtSpen2* promoter. Another possibility is the existence of a different *cis* element (or combination of them) in the *AtSpen2*

promoter conferring expression in phloem, but delimiting it needs another approach, such as directed mutagenesis.

Although the reporter gene expression directed by the *AtSpn2* promoter was observed throughout the vascular tissue, it is not clear what function it could have in this tissue, unlike other *A. thaliana* genes that are expressed in the phloem, such as *AHA3* and *SUC2*. The former gene encodes a H⁺-ATPase, which provides energy for *SUC2*, a sucrose-H⁺ symporter, both contributing to the transport of sucrose in this tissue (Truernit and Sauer, 1995). Another relevant example is the *Cucurbita moschata* *PP2* gene encoding one of the major proteins involved in the formation of slime plugs in damaged phloem (Guo *et al.*, 2004). Whereas the reported Spn proteins participate in regulating the expression of other genes in animals (Sánchez-Pulido *et al.*, 2004; McHugh *et al.*, 2015) and plants, such as *FPA* which regulates the expression of the flowering repressor *FLC* (Hornyk *et al.*, 2010), it is possible that *AtSPEN2* contributes to the regulation of a gene whose protein could have a clear function in the phloem.

The root is an organ that allows the plant to be anchored to the substrate and to absorb water and nutrients from the soil and transport them to the aerial parts via the vascular tissue, which is a central stele in *A. thaliana*, both in the primary and lateral roots (Scheres *et al.*, 2002). The proposal that *AtSpn2* function is partly associated with the vascular tissue is reinforced by the expression conferred by the promoter in this tissue, through the root system and the aerial parts, indicating that this gene is being expressed throughout all of the plant vascular system. In the root, the expression of *AtSpn2* extends to the pericycle cell layer, the site where lateral roots originate through robust hormonal and environmental control (Dubrovsky *et al.*, 2008). In transformed *fpa::uidA* plants, expression in the root is not reported (Schomburg *et al.*, 2001) (Table 6.1.1), adding another important difference between *fpa* and *AtSpn2* and reinforces the notion of a functional difference between these two genes and their encoded proteins. Besides, in our experimental analysis, the expression conferred by the *AtSpn2* promoter in leaves is restricted to the vascular tissue; in contrast, the *fpa* promoter region confers expression mainly in young

leaves and in continuous foliar areas that are not associated with the vascular tissue (Schomburg *et al.*, 2001) (Table 6.1.1), which is an important difference that supports the divergence of the function of both genes in *A. thaliana*.

The expression conferred by the *AtSpen2* promoter in the ovules and developing embryos suggests that this gene plays a role in this stage, but additional studies are required to reveal it because it has been reported that embryogenesis is complex and involves the acquisition of cellular identities and developmental patterns (Capron *et al.*, 2009). Although the *fpa* gene is also expressed in flowers, its pattern is different from that conferred by the *AtSpen2* promoter, because this expression is widespread throughout the inflorescence and begins in the initial stages of flower development (Schomburg *et al.*, 2001), which is consistent with the function of this gene in the control of flowering time. A comparison of the time expression of the *A. thaliana* and *O. sativa* genes encoding Spen proteins in the developing of the reproductive structures, reinforce the hypothesis of divergence of *fpa* and *AtSpen2* functions: in the rice genes *OsRRMh* and *OsRRM*, orthologous of *fpa* and *AtSpen2*, respectively, the expression in the former (determined by RT-qPCR) occurs in the leaves and inflorescences (Liu and Cai, 2013), while the *OsRRM* expression (determined by a reporter gene) is associated only with the seed endosperm (Chen *et al.*, 2007). Summarizing this comparison, the expression in the flower of the orthologous genes *fpa* and *OsRRMh* is found at an early flowering stage, in congruence with their reported function in controlling the flowering time, while the orthologous genes *AtSpen2* and *OsRRM* are expressed only in later flower stages.

Although the *AtSpen2* promoter directed reporter gene expression in the transition from the unfertilized flower stage to the flower with developing embryos, we did not observe any changes in the floral development of plant when the *AtSpen2* gene was inactivated or overexpressed. Some authors have reported that in consequence of gene inactivation there may not necessarily be a morphological change, even if there is a severe physiological alteration; consequently, integral strategies to reveal the function of these genes should be used (Niehaus *et al.*,

2015). The redundancy in the function of genes may account for the absence of a phenotype when a gene is mutated (Bouché and Bouchez, 2001), but in the particular case of *AtSpn2*, this is unlikely because of the following reasons: a) its unique paralogue in *A. thaliana*, the gene *fpa*, has a function in the control of flowering time (Ietswaart *et al.*, 2012), which was not found for *AtSpn2* in this work; b) the SPOC domains of FPA and AtSPEN2 have low sequence identity; and c) the expression conferred by the promoter regions of *AtSpn2* and *fpa* in the organs and tissues of *A. thaliana*, respectively, is completely different. Therefore, it is proposed that the lack of a remarkable phenotype in our KO and OE lines is due to any of the following situations: a) *AtSpn2* is not a master gene in a development process, but it may have an accessory function, and b) its participation is conditional and depends on certain endogenous or environmental conditions.

CONCLUSION

Taken together, our results demonstrate that the *AtSpn2* gene: a) has a functional promoter that confers expression in the whole vascular tissue, and in the gynoecium and developing embryos, b) Its function in the regulation of the flowering time was discarded, and it is debt possibly by the divergence of the transcription expression pattern and low similarity of the SPOC domain with its paralogue *fpa* gene

Acknowledgements. To the Coordinación General de Estudios de Posgrado of the Universidad Michoacana by a grant to María Gloria Solís-Guzmán. To CONACYT by the support of project CB-2011-169769.

REFERENCES

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL,

- Berry CC and Ecker JR (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815.
- Ariyoshi M and Schwabe JW (2003) A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes Dev* 17:1909-1920.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- Bellini C, Pacurar DI and Perrone I (2014) Adventitious Roots and Lateral Roots: similarities and Differences. *Annu Rev Plant Biol* 65:639-666.
- Bouché N and Bouchez D (2001) *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Plant Biol* 4:111-117.
- Capron A, Chatfield S, Provart N and Berletha T (2009) Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book* 7:e0126. doi:10.1199/tab.0126.
- Chen F and Rebay I (2000) Split ends, a new component of the *Drosophila* EGF receptor pathway, regulates development of midline glial cells. *Curr Biol* 10:943-946
- Chen SY, Wang ZY and Cai XL (2007) OsRRM, a Spen-like rice gene expressed specifically in the endosperm. *Cell Research* 17:713-721.
- Clough SJ and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-43.
- Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M and Grotewold E (2003) AGRIS: *Arabidopsis* Gene Regulatory Information Server, an information resource of *Arabidopsis* cis-regulatory elements and transcription factors. *BMC Bioinf* 4:25. doi:10.1186/1471-2105-4-25.
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucially-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J and Benkova E (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8790-8794.
- Gateway® Technology (2010) A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. 2010. Catalog nos. 12535-019 and 12535-027.
- Guo H, Cheny X, Zhang H, Fang R, Yuan Z, Zhang Z and Tian Y (2004) Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin PP2 gene promoter. *Transgenic Res* 13:559-566.
- Haseloff J and Amos B (1995) GFP in plants. *Trends Genet* 11:328-329.
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A and Coupland G (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J* 21:4327-4337.

- Hernandez-Garcia CM and Finer JJ (2014) Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Sci* 217:109-119.
- Hornyik C, Terzi LI and Simpson GG (2010) The Spen Family Protein FPA Controls Alternative Cleavage and Polyadenylation of RNA. *Dev Cell* 18:203-213.
- Ietswaart R, Wu Z, Dean C (2012) Flowering time control: another window to the connection between antisense RNA and chromatin. *Trends Genet* 28:445-453.
- Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907.
- Kuang B, Wu SCY, Shin YA, Luo L and Kolodziej P (2000). Split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development* 127:1517-1529.
- Kumari S and Ware D (2013) Genome-wide computational prediction and analysis of core promoter elements across plant monocots and dicots. *PLoS One* 8:e79011. doi: 10.1371/journal.pone.0079011.
- Lane ME, Elend M, Heidmann D, Herr A, Marzodko S, Herzig A and Lehner CF (2000) A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* 155:233-244.
- Liu F, Marquardt S, Ister C, Swiezewski S and Dean C (2010) Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers Arabidopsis FLC chromatin silencing. *Science* 327:94-97.
- Liu D and Cai X (2013) OsRRMh, a Spen-like Gene, Plays an Important Role during the Vegetative to Reproductive Transition in Rice. *J Integr Plant Biol* 55:876-887.
- McHugh CA, Chen CK, Chow A, Surka CF, Tran C, McDonel P, Pandya-Jones A, Blanco M, Burghard C, Moradian A, Sweredoski MJ, Shishkin AA, Su J, Lander E, Hess S, Plath K and Guttman M (2015) The *Xist* lncRNA interacts directly with SHARP silence transcription through HDAC3. *Nature* 521(7551):232-236.
- Malamy JE and Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C and Bryant SH (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43:Database issue doi:10.1093/nar/gku1221.
- Maris C, Dominguez C and Allain FH (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* 272:2118-2131.
- Martínez M (2011) Plant protein-coding gene families: emerging bioinformatics approaches. *Trends Plant Sci* 16:558-567.

- Martínez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Mol Biol Rep* 22:63-70.
- McBride KE and Summerfelt KR (1990) Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 14:269-276.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 15:473-497.
- Narlikar L (2014) Multiple novel promoter-architectures revealed by decoding the hidden heterogeneity within the genome. *Nucleic Acids Res* 42:12388-12403.
- Niehaus TD, Thamm AMK, Crécy-Lagard V and Hanson AD (2015) Proteins of Unknown Biochemical Function: A Persistent Problem and a Roadmap to Help Overcome It. *Plant Physiol* 169:1436-1442.
- O'Connor TR, Dyreson C and Wyrick JJ (2005) Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of Arabidopsis promoter sequences. *Bioinformatics* 21:4411-4413.
- Odell JT, Nagy F and Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
- Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knöchel W, Liptay S and Schmid M (2002) SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jk in the signaling pathway. *EMBO J* 21:5417-5426.
- Rhee SY and Mutwil M (2014). Towards revealing the functions of all genes in plants. *Trends Plant Sci* 19:212-221.
- Sammut SJ, Finn RD and Bateman A (2008). Pfam10 years on: 10 000 families and still growing. *Brief Bioinf* 9:210-219.
- Sánchez-Pulido L, Rojas AM, van Wely KH, Martínez-A C and Valencia A (2004). SPOC: A widely distributed domain associated with cancer, apoptosis and transcription. *BMC Bioinf* 5:91. doi:10.1186/1471-2105-5-91.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- Scheres B, Benfey P and Dolan L (2002) Root Development. *Arabidopsis Book* 1:e0101. doi:10.1199/tab.0101.
- Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW and Amasino RM (2001) FPA, a Gene Involved in Floral Induction in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Recognition Motifs. *Plant Cell* 13:1427-1436.
- Simpson DD and Dean C (2002) Arabidopsis, the rosetta stone of flowering time?. *Science* 296:285-289.

- Simpson DD (2004) The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Curr Opin Plant Biol* 7:570-574.
- Smyth DR, Bownan JL and Meyerowitz EM (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2:755-767.
- Srivastava VK, Raikwar S and Tuteja N (2014) Cloning and functional characterization of the promoter of *PsSEOF1* gene from *Pisum sativum* under different stress conditions using *Agrobacterium*-mediated transient assay. *Plant Signal Behav* 9(9):e29626, doi:10.4161/psb.29626.
- TAIR The *Arabidopsis* Information Resource, <http://arabidopsis.org>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol Evol* 30:2725-2729.
- Todd PM and VanBuren R (2015) Progress, challenges and the future of crop genomes. *Current Opinion in Plant Biol* 24:71-81.
- Truernit E and Sauer N (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196:564-570.
- Wiellette EL, Harding KW, Mace KA, Ronshaugen MR, Wang FY and McGinnis W (1999) Spen encodes an RNP motif protein that interacts with Hox to repress the development of head-like sclerites in the *Drosophila* trunk. *Development* 126:5373-5385.
- Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM and Martinez E (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* 389:52-65.
- Zhang Y, Rataj K, Simpson GG and Tong L (2016) Crystal structure of the SPOC domain of the *Arabidopsis* flowering regulator FPA. *Plos One*. Doi:10.1371/journal.pone.0160694.

6.2. The *Arabidopsis thaliana* sucrose-phosphate synthase (*sps*) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress

Solís-Guzmán María Gloria¹, Argüello-Astorga Gerardo ², López-Bucio José¹, Ruiz-Herrera León Francisco¹, López- Meza Joel¹, Sánchez-Calderón L³, Carreón-Abud Yazmín¹, Martínez-Trujillo Miguel¹

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. CP 58000.

²Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Camino a la Presa de San José 2055, San Luis, S.L.P., México. C.P. 78216. ³Universidad Autónoma de Zacatecas. Zacatecas, Zac., México. C.P. 98000.

ABSTRACT

Sucrose is synthesized from UDP-Glc and Fru-6-phosphate via the activity of sucrose-phosphate synthase (SPS) enzymes, which produce Suc-6-phosphate. Suc-6-phosphate is rapidly dephosphorylated by a phosphatase to produce Suc and inorganic phosphate. *Arabidopsis* has 4 *sps* genes encoding SPS enzymes, of which AtSPS1F and AtSPS2F have been grouped with other dicotyledonous SPS enzymes, while AtSPS3F and AtSPS4F are included in groups with both dicotyledonous and monocotyledonous SPS enzymes. In this work, we generated *Arabidopsis thaliana* transformants containing the promoter region of each *sps* gene fused to the *uidA::gfp* reporter genes. A detailed characterization of the expression conferred by the *sps* promoters in organs and tissues was performed: novelties results showed the expression of *AtSPS1F*, *AtSPS2F* and *AtSPS3F* in the columella roots, which supports the sucrose synthesis in these cells, and suggests a role of sucrose in this tissue; besides, the expression of *AtSPS4F* was found in embryos suggesting its participation in this developmental stage. Additionally, a quantitative transcriptional analysis of *A. thaliana* plants grown in media with different osmotic potential, determined that the *AtSPS2F* and *AtSPS4F* genes respond to the osmotic stress.

Key words: sucrose, genes, transcription, osmotic stress

INTRODUCTION

Plants are photosynthetic organisms that use light energy, carbon dioxide from the atmosphere, and water for carbohydrate synthesis in the chloroplast; subsequently, they transport cytoplasmic triose phosphates, allowing the synthesis of sucrose in several reactions. In the last reaction pathway, sucrose is synthesized from UDP-Glc and Fru-6-phosphate via the activity of sucrose-phosphate synthase enzyme (SPS; EC 2.4.1.14), which produces Suc-6-phosphate. Suc-6-phosphate is rapidly dephosphorylated by a phosphatase (SPP; EC 3.1.3.24) to produce Suc and inorganic phosphate (Pi), making the reaction practically irreversible (Huber and Huber, 1996)

In most plants, sucrose is the main sugar transported from the sites of synthesis to other organs and tissues of the plant to be utilized. The tissue the sucrose is transported via is the phloem, in which the sucrose is discharged by specific membrane transport proteins; once in this tissue, mass flow mobilizes sucrose and other organic compounds. In tissues in which sucrose is used, it is cleaved by the enzyme sucrose synthase (Sus; EC 2.4.1.13) to produce UDP-Glc and Fru, or it is hydrolysed by invertase (INV; EC 3.2.1.26) to yield Glc and Fru, allowing monosaccharides to be used for energy production and the synthesis of cellulose, starch, fructans, protein and antioxidant compounds. (Ruan, 2014; Jiang et al., 2015). Prior to the sequencing of plant genomes, only one gene was thought to encode an SPS enzyme in each species; thus, SPS cDNA was reported for maize (Worrell *et al.*, 1991), spinach (Klein et al., 1993; Sonnewald et al., 1993), banana (do Nascimento et al., 1997), sugar beet (Hesse et al., 1995), *Citrus unshiu* (Komatsu et al., 1996), bean faba (Heim et al., 1996), *Craterostigma plantagineum* (Ingram et al., 1997), sugarcane (Sugiharto et al., 1997), and kiwi fruit (Langenkämper et al., 1998); additionally, a genomic sequence in rice (*OsSPS1*) was reported (Valdez-Alarcón et al., 1996). Currently, it has been reported that there is a family of *sps* genes encoding SPS enzymes in different plant species (Jiang et al., 2015). Langenkämper et al. (2002) classified the SPS enzymes into three groups, called A, B and C. Using more sequences, Castleden et al. (2004)

considered four groups (A, B, C and D), and Lutfylla et al. (2007) formed six groups (1a, 1b, 2d, 2m, 3 and 4), based on the similarity of the amino acid sequence of the glucosyl transferase enzyme domains, among which 1a and 1b correspond to bacterial SPS. Arabidopsis has 4 *sps* genes encoding SPS enzymes, among which AtSPS1F (AtSPS1A) and AtSPS2F (AtSPS2A) have been grouped with other dicotyledonous SPS enzymes in the 2d group, while AtSPS3F (AtSPSB) and AtSPS4F (AtSPSC) are included in the 3 and 4 groups, respectively, containing both dicotyledonous and monocotyledonous SPS enzymes (Lutfylla et al., 2007).

The route of sucrose synthesis is highly regulated: from the transcription of the genes encoding the SPS enzymes, by covalent modifications that inactivate or activate enzymes, and by the allosteric effect of some substrates of the metabolic pathway of this sugar (Huber and Huber, 1996). Allosteric regulation occurs in some SPS enzymes such as spinach and maize, where the Glc-6-P, a precursor in the synthesis pathway, positively regulates the activity, whereas inorganic phosphate (Pi), one of the final products, negatively regulates the activity (Amir and Preiss, 1982; Doehlert and Huber, 1983; Kalt-Torres et al., 1987). However, allosteric regulation is not a general feature of SPS enzymes because it has been reported that leaf soybean and wheat germ SPS are only inhibited slightly by Pi and are not affected by Glc-6-P (Nielsen and Huber, 1989; Salerno and Pontis, 1978). Additionally, it has been reported that, in *A. thaliana*, only AtSPS3F is allosterically regulated (Volkert et al., 2014)

Light regulates various processes in plants, such as germination, flowering and photomorphogenesis (Bou-Torrent et al., 2008). This factor is important in the regulation of certain SPS enzymes, as phosphorylation or dephosphorylation determines protein activity (Stitt et al., 1988); in spinach (*Spinacia oleracea*), the RMRRISSVE sequence has been defined, in which serine 158 (bold) can be phosphorylated in the dark, inactivating the enzyme, and dephosphorylated in the presence of light, activating the enzyme (McMichael et al., 1993). For maize, an amino acid sequence of an SPS has been described, similar to the sequence of spinach, with a serine at position 162 that can be phosphorylated in the dark,

inactivating the enzyme (McMichael et al., 1995); for other SPS enzymes, they have been described as potential sites of regulation by light-dark, as in rice (Huber and Huber, 1996) and in several dicotyledonous plants, including *A. thaliana* (Lutfylla et al., 2007).

During drought conditions and high salinity, water availability for plants is severely limited because the status of the free energy of water (water potential) decreases due to the osmotic effect derived from molecules that interact with it, making it more difficult to capture the water (Xiong and Zhu, 2002). The responses of plants to osmotic stress are diverse and comprise a change in growth, adjustments in ion transport and changes in carbon metabolism; these changes can occur in response to the osmotic effect of primary signals or secondary signals such as abscisic acid and ethylene hormones (Fujita et al., 2011). Covalent regulation of SPS enzymes can also occur by osmotic stress; in spinach, it has been delimited by the RMRRGVSC sequence, with a serine at position 424; this site is phosphorylated when the plant is subjected to osmotic stress, and the enzyme is activated, perhaps antagonizing the inhibitory effect of the phosphorylation of serine 158 and allowing the synthesis of sucrose (Winter and Huber, 2000). In other species of dicotyledonous plants and monocots, similar amino acid sequences that may be potential serine phosphorylation sites and regulation by water stress have been reported; in *A. thaliana*, AtSPS1F, AtSPS2F and AtSPS4F, this regulatory sequence is present; however, in AtSPS3F, it is absent (Lutfylla et al., 2007).

The transcriptional regulation of *sps* genes is complex and becomes more important considering that there are several genes encoding SPS enzymes in each plant species; the promoter regions of different *sps* genes confer expression that differ totally or partially among the tissues and organs of plants; these aspects have been addressed in some species by the quantification of the transcripts of each *sps* gene by qPCR: among the seven *sps* maize genes, *ZmSPS1F* and *ZmSPS2F* show their highest expression in the leaves (34 and 29%, respectively), another (*ZmSPS6*) shows expression only in the inflorescence, while the other five genes show expression distributed among different organs (Lutfylla et al., 2007). In rice, among

the five *sps* genes, *OsSPS1* shows greater expression, especially in the leaves, while *OsSPS11* demonstrates marked expression in the roots (Okamura et al., 2011). In *A. thaliana*, a very general pattern of expression conferred by the promoter regions of the *sps* genes has been reported in transgenic plants: *AtSPS2F* is expressed only in the roots, whereas the other three genes (*AtSPS1F*, *AtSPS3F* and *AtSPS3F*) are expressed in leaves, stems and flowers (Volkert et al., 2014).

Genes encoding SPS enzymes can be regulated at the transcriptional level during the development of plants: for example, an increase occurs in the *sps* transcripts during the maturation of spinach leaves (Klein et al., 1993), and during maturation of fruits in mandarin (Komatsu et al., 1996), banana (Oliveira et al., 1997) and Kiwi (Langenkämper et al., 1998); additionally, there is increased transcription in *OsSPS1* in the maturation of rice leaves and in the seed scutellum during germination (Chávez-Bárceñas et al., 2000; Martínez-Trujillo et al., 2004).

Osmotic stress may also transcriptionally regulate the expression of the *sps* genes: in maize, by quantifying transcripts, it was determined that *ZmSPS3F* is induced by water stress, *ZmSPS1F* and *ZmSPS4F* are repressed, while the other four genes do not have a significant change in expression (Lutfylla et al., 2007). In *Craterostigma plantagineum* Hochst, a plant with tolerance to severe desiccation, there is an increase in *sps* transcripts during the dehydration of plants (Ingram et al., 1997). Besides, in some *sps* genes, light has an effect on transcriptional regulation: in rice leaves, there is an increase in the transcription of *OsSPS1* in the presence of light (Chávez-Bárceñas et al., 2000); by quantifying the transcripts, Yonekura et al. (2013) determined that, in the process of circadian rhythm, there is a different pattern in the transcriptional expression of the five *sps* genes of rice.

The complexity in the regulatory processes that lead to the synthesis of sucrose make it necessary to delve deeper into certain aspects of these processes; thus, this work contributes to the following: a) the generation of transformants containing the promoter region of each *sps* gene fused to the *uidA::gfp* reporter genes, b) a detailed characterization of the expression conferred by *sps* promoters in organs and tissues, complementing the results previously reported, c) the determination of the *sps*

transcription expression levels, and d) the analysis of the effect of osmotic stress on the transcriptional expression levels of the four *sps* genes.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic lines

Abi4::uidA (Söderman et al. 2000).

AtSPS1F::uidA-gfp (this work).

AtSPS2F::uidA-gfp (this work).

AtSPS3F::uidA-gfp (this work).

AtSPS4F::uidA-gfp (this work).

Arabidopsis thaliana genomic DNA extraction and amplification of the promoter regions

The sequences of *AtSPS1F* (At5g20280), *AtSPS2F* (At5g11110), *AtSPS3F* (At1g04920), and *AtSPS4F* (At4g10120) 5' regulatory regions were obtained from the TAIR database (<http://www.arabidopsis.org/>). The oligonucleotides were designed with the Oligo Analyzer 3.0. Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) program.

The DNA of the wild-type *A. thaliana* ecotype Col-0 was isolated using the DNAeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), following the manufacturer's instructions. The resulting DNA was used to amplify 1,500 bp of the *AtSPS1F*, *AtSPS2F*, *AtSPS3F* and *AtSPS4F* promoter regions, using the oligonucleotides: SPS1F 5'GAGTTCTACATGAAGAAGATCCAGAAGAAGAAG3', SPS1R 5'CTGGTGGGACGATCAAAGATCGA3'); SPS2F 5'AGCAGATGCATTTGTGGTAATCACATT3', SPS2R 5'TGGTGTTCGCTCTCCCGAACT3'), SPS3F 5'ACCTATTTGCATCCGTGCTAGTTAGAG3' SPS3R 5'TCTGAGTTTGTCTCTGTTTCTCGAG3'), and SPS4F 5'GAATCGTAGAAAGAGTCGAATGGTCAC3', SPS4R 5'CTCTCTGATTGTTGCACTGAAACTCC3'). The Supermix High Fidelity® PCR kit

(Invitrogen) was used following the manufacturer's instructions. The amplification conditions were as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 30 sec, 68°C for 90 sec, followed by a final extension at 68°C for 10 min.

Construction of vectors to analyse the expression conferred by the *AtSPS1F*, *AtSPS2F*, *AtSPS3F*, and *AtSPS4F* promoter regions

The 1,500-bp PCR fragment, corresponding to the *AtSPS1F*, *AtSPS2F*, *AtSPS3F*, and *AtSPS4F* promoter, were cloned into the pDONR221® (Invitrogen) vector; the recombination reaction was performed using the BP Clonase Enzyme Mix Kit® (Invitrogen), forming the *attL1* and *attL2* recombination sites. The sequences and orientation of the cloned fragments were verified by the method of Sanger et al. (1977). The resultant vectors were recombined with the pKGWFS7 binary vector (Ghent University, Belgium) containing the *attR1* and *attR2* recombination sites; this vector harbours a translational fusion of the *gfp* and *uidA* reporter genes, allowing both to be used to analyse the expression conferred by the *AtSPS1F*, *AtSPS2F*, *AtSPS3F* and *AtSPS4F* promoter regions. Recombinations were performed using the LR Clonase II enzyme Mix® Kit (Invitrogen).

***Agrobacterium tumefaciens* and *Arabidopsis thaliana* genetic transformations**

The recombined binary vectors were used to transform the *Agrobacterium tumefaciens* strain pGV2260 (McBride and Summerfelt 1990) by electroporation at 1,800 V, using the Eppendorf electroporator 2510. Transformed colonies were selected in LB medium (Luria) with carbenicillin (100 µg ml⁻¹), rifampicin (50 µg ml⁻¹), spectinomycin (100 µg ml⁻¹) and streptomycin (300 µl ml⁻¹).

The *A. tumefaciens* strain pGV2260 containing the recombinant binary vector was grown to an optical density of 0.6 (600 nm) and centrifuged for 5 min at 6,000 rpm; the pellet was resuspended in infiltration medium: 0.5× MS (Murashige and Skoog, 1962), 5% sucrose (Bioxon) and 0.05% Silwett L-77. The bacterial suspension was applied to 2- to 10-mm *A. thaliana* Col-0 inflorescences; the plants were placed in the dark for 12 h and then transferred to light conditions. To collect

the seeds, the plants were allowed to produce mature siliques. Plant selection was made in 0.2× MS medium, pH 5.7, supplemented with 0.6% sucrose as a carbon source and 1% plant agar (Phytotechnology Laboratories A111), with kanamycin (60 µg ml⁻¹).

Quantitation of the proline concentration in *A. thaliana* under osmotic stress

Proline was measured as described by Bates et al. (1973): 0.3 g of the frozen plant material was homogenized in 3% aqueous sulphosalicylic acid (0.02 g ml⁻¹), and the residue was removed by centrifugation at 12,000 g for 10 min. One ml of the homogenized tissue reacted with 1 ml of acid-ninhydrin and 1 ml of glacial acetic acid in a test tube for 1 h at 100°C, and the reaction was terminated in an ice bath. The reaction mixture was extracted with 1 ml of toluene. The chromophore-containing toluene was warmed to room temperature, and its optical density was measured at 520 nm in a Thermo Spectromic model Genesis 10 UV. The amount of proline was determined from a standard curve using D-Proline in the range of 5- 60 µg ml⁻¹.

Expression analysis by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in transformed *A. thaliana* lines under osmotic stress

Total RNA from Col-0 and transformed *A. thaliana* lines were isolated using Trizol® (Invitrogen). cDNA synthesis was performed using reverse transcriptase H (Thermo Fisher Scientific) and oligo dT. The following oligonucleotides were designed to amplify a 161 bp *AtSPS1F* (At5g2BF, 5'AGCAAGTTGGTGTGGGAAG3', At5g2BR 5'TTGTCTCAAAGCTGCTCCA3'); 245 bp *AtSPS2F* (At5g1AF, 5'TGTTTCAACCTTGGCACAAA3', At5g1AR 5'GTGGTTTCAACCCTCCTGAA3'); 215 bp *AtSPS3F* (At1gBF, 5'TGGATCCACACGATCAAGAA3', At1gBR 5'ATCGTCTTGAGCAGCCACTT3'); and 181 bp *AtSPS4F* (At4gAF, 5'GGAGCGTTAAATGTGCCAAT3'; At4gAR, 5'GTGTGCTTGTCACCACCATC3'). A 226-bp fragment of actin was used as the internal reference, using the oligonucleotides FACTINA,

5'TGCCAATCTACGAGGGTTTC3', and RACTINA
5'TTCCGATGGAAGAGCTGGT3'.

Growth conditions of different *A. thaliana* lines

The seeds of the different *A. thaliana* lines were surface disinfected by washing with 96% ethanol (v/v in water) for 7 min and then with 20% sodium hypochlorite (v/v in water) for another 7 min. Subsequently, the seeds were rinsed five times with sterile deionized water, resuspended in 1 ml and were placed at 4°C in the dark for 48 h to promote and synchronize germination. Disinfected seeds were placed in Petri dishes containing 0.2X MS medium, pH 7.0, for plant growth, supplemented with 0.6% sucrose and 1% plant agar. For the selection of genetically transformed plants, kanamycin (60 µg ml⁻¹) was added to the medium. Ten days after germination, the plants were transferred to pots with a substrate composed of peat moss, perlite, and vermiculite at a 3:1:1 ratio at field capacity water. Both Petri dishes and pots were incubated in growth chambers (Percival Scientific AR-95L), under the following conditions: 24°C, 100 µmol m²s⁻¹ light intensity, 80% relative humidity, and a 16-8 h light-dark photoperiod.

For the analysis by osmotic stress, the disinfected seeds were placed in Petri dishes containing 0.2X MS medium, pH 7, for plant growth, supplemented with 0.6% sucrose and 1% plant agar, and then mannitol (0, -0.3, and -0.6 Mpa) was added to the medium. The Petri dishes were incubated for ten days in growth chambers (Percival Scientific AR-95L), under the following conditions: 24°C, 100 µmol m²s⁻¹ light intensity, 80% relative humidity, and a 16-8 h light-dark photoperiod.

Expression analysis of the *uidA* and *gfp* reporter genes

The transgenic plants with the *uidA* reporter gene (Jefferson et al. 1987) were stained with 0.1% 5-bromo-4-cloro-3-indolil D-glucuronide (x-gluc) in phosphate buffer (NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄, 0.1 M, pH 7), with 4 mM potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide for 12 h at 37°C. A blue compound was generated for conversion of the x-gluc substrate by the activity of the beta-glucuronidase enzyme

encoded by *uidA*. The plants were clarified and fixed according to Malamy and Benfey (1997).

The expression of the *gfp* reporter gene was determined by detecting the green fluorescence emitted by the GFP protein (Haseloff and Amos 1995). To analyse the expression pattern, the seedlings were supplied with propidium iodide ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), which emits red fluorescence. The detection of GFP and propidium iodide fluorescence was performed using an Olympus Fluo-View FV1000-PME microscope. To generate the fluorescence of the GFP protein and propidium iodide, excitation wavelengths of 488 nm and 493 nm were used, respectively. Photographs were captured at 509 nm and 535 nm wavelengths, respectively.

RESULTS

Although the general pattern of expression of the four *A. thaliana sps* genes has been reported, in this work, a detailed characterization of the transcriptional expression of the *sps* genes was performed using the generated transgenic lines *AtSPS1F::uidA-gfp*, *AtSPS2F::uidA-gfp*, *AtSPS3F::uidA-gfp* and *AtSPS4F::uidA-gfp*. Some steps of the genetic constructs are shown in Fig. 6.2.1, and the selection of transformed plants is shown in Fig. 6.2.2

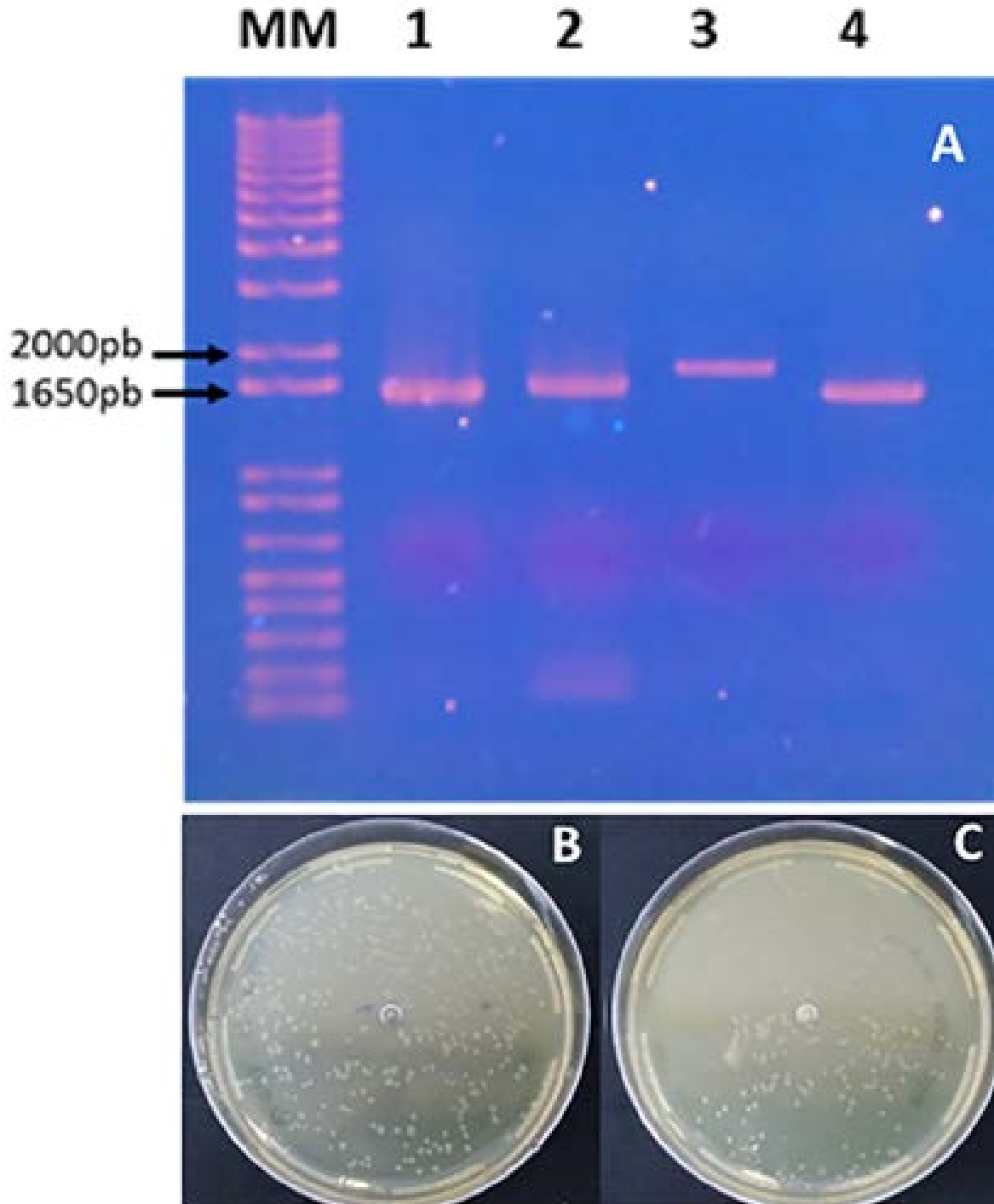


Figure 6.2.1. Steps in the construction of vectors with the promoter regions of the *A. thaliana sps* genes fused to the *uidA::gfp* reporter genes. A. Amplification of DNA fragments with the 5' regulatory regions of *A. thaliana sps* genes; lanes: 1 = AtSPS1F, 2 = AtSPS2F, 3 = AtSPS3F, 4 = AtSPS4F. **B.** *Escherichia coli* DH5a colonies transformed with the pDON221[®] plasmid with the 5' *AtSPS1F* regulatory region, selected in kanamycin; transformation results with vectors carrying the other *sps* genes were similar. **C.** Colonies of *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 colonies transformed with pKGWF7 carrying the 5' *AtSPS1F* regulatory region, selected in rifampin, streptomycin spectinomycin and carbenicillin. It was proceeded as described in the Materials and Methods section for each step.

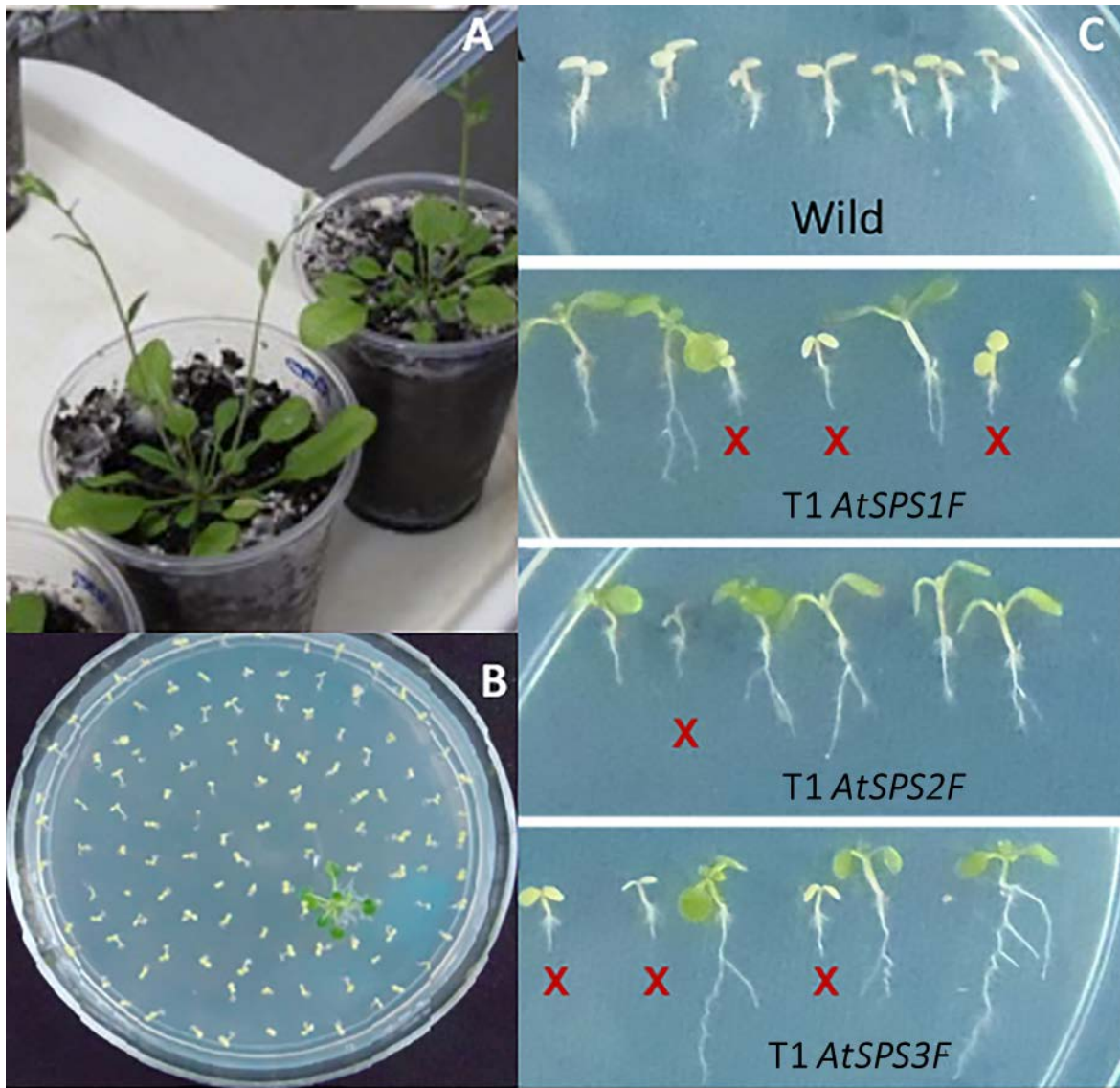


Figure 6.2.2. Steps in the *A. thaliana* transformation with the constructed *sps* vectors. A. Application of *Agrobacterium tumefaciens* suspension to closed flowers. **B.** Selection in kanamycin of T0 transformed plants. **C.** Selection in kanamycin of transformed T1 transformed plants. It was proceeded as described in the Materials and Methods section for each step

For each *sps* gene, the expression conferred in tissues and organs was evaluated in 10 transformed lines. The expression found in vegetative organs by analysing the histochemical changes produced by the enzyme encoded by the reporter *uidA* gene is shown in: Fig. 6.2.3 overlaps in the expression in some organs were observed but also important differences, mainly that *AtSPS3F* was expressed in the roots, *AtSPS4F* was expressed in the apical stem, while *AtSPS1F* and

AtSPS2F were expressed in the leaves and roots. By analysing the fluorescence emitted by the GFP protein, the detected expression in the roots was delimited to the stele and columella (Fig. 6.2.4). In plants grown for 3-4 weeks, the *uidA* expression was analysed in flowers: the four *sps* genes were expressed in this organ, and *AtSPS4F* was also expressed in developing embryos (Fig. 6.2.5). (Table 6.2.1).

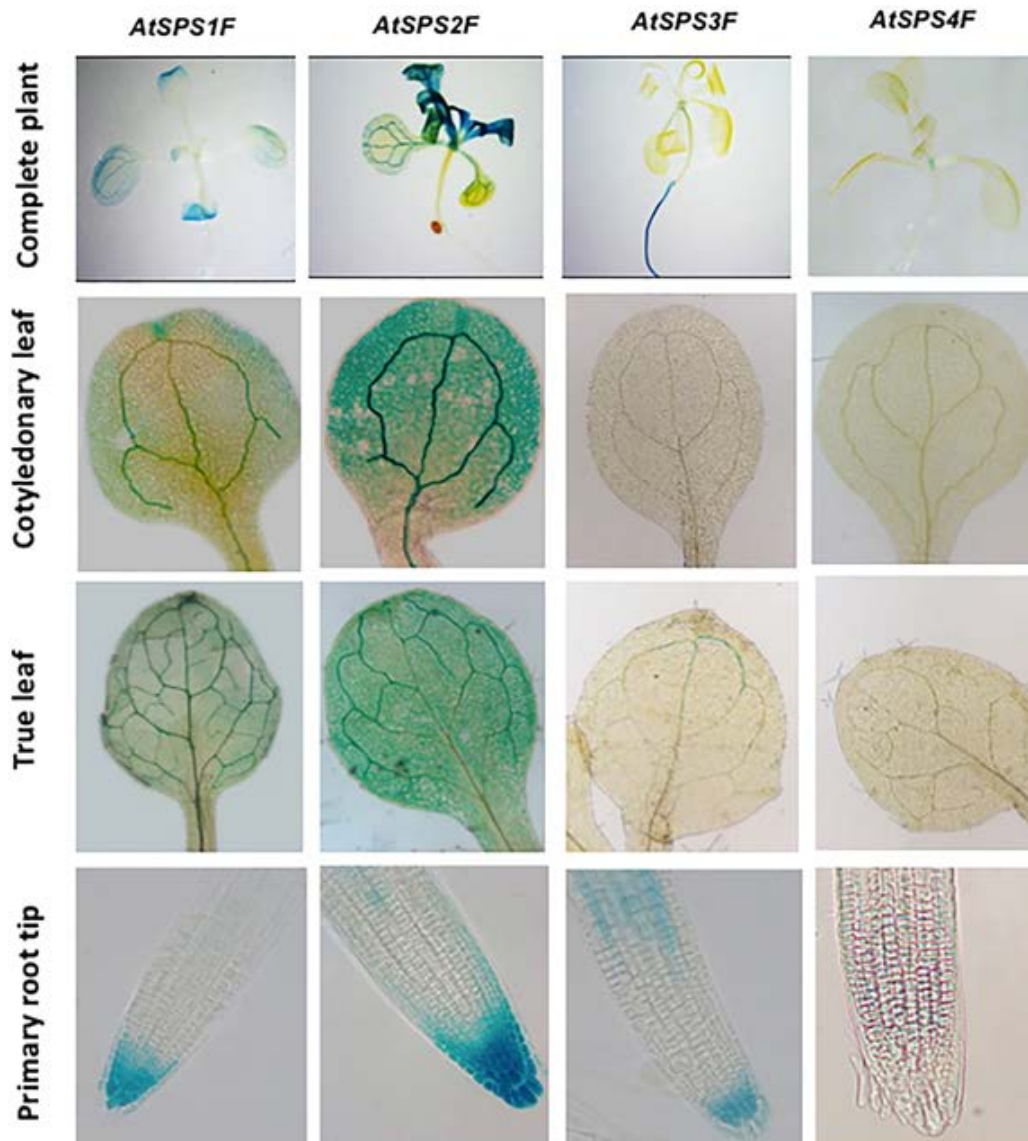


Figure 6.2.3. Expression conferred by the promoters of the *sps* genes in *A. thaliana* vegetative structures. Homozygous seed lines transformed with each of the genetic constructs were germinated and grown for 10 days. The plants were processed as described in the Materials and Methods section to determine the colour derived from the *uidA* reporter gene expression. Photographs are representative of 15 plants analysed.

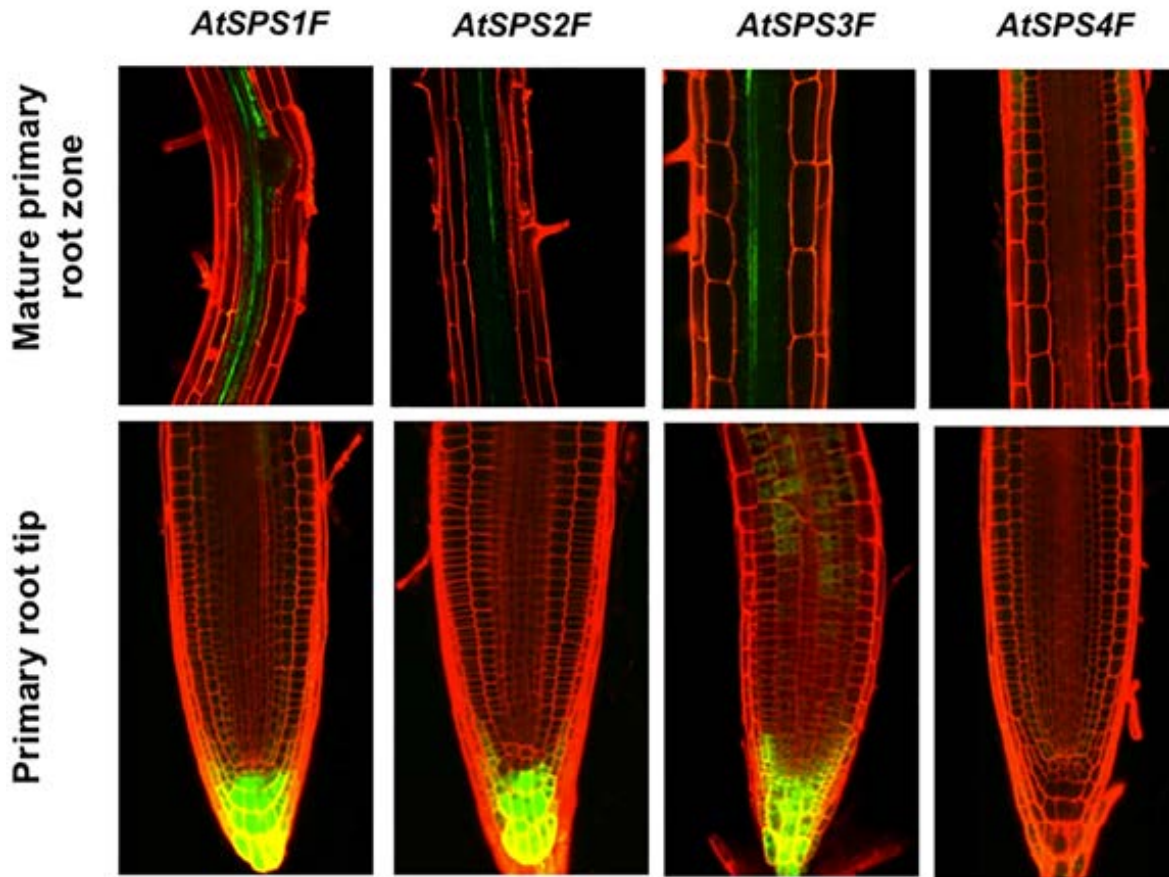


Figure 6.2.4. Expression conferred by the promoters of the *sps* genes from *A. thaliana* in stele and columella roots. Homozygous seed lines transformed with each of the genetic constructs were germinated and grown for 10 days. The plants were processed as described in the Materials and Methods section to determine the fluorescence emitted by GFP. Photographs are representative of 15 plants analysed.

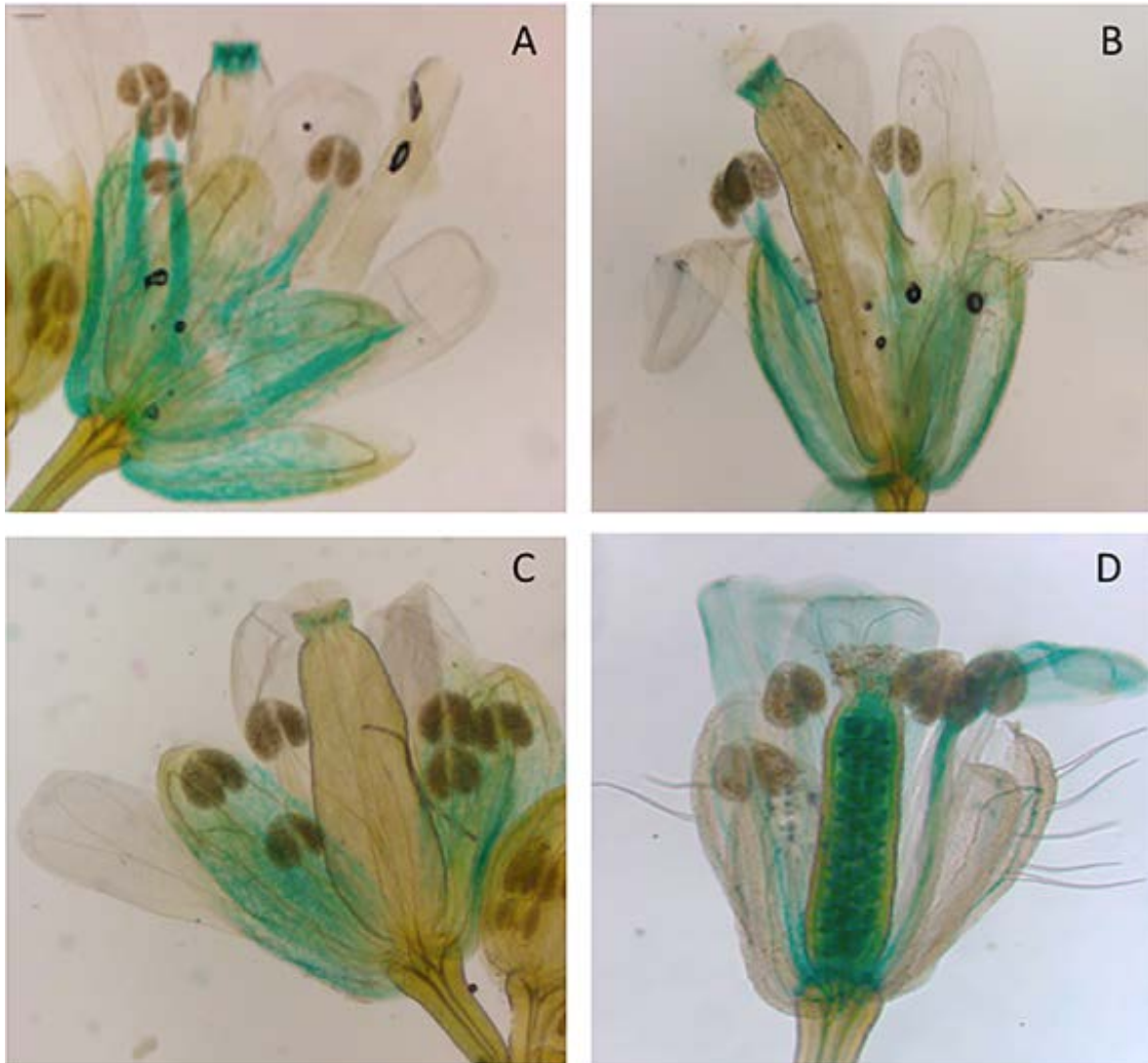


Figure 6.2.5. Expression conferred by the promoters of the *sps* genes in *A. thaliana* flowers. Homozygous seed lines transformed with each of the genetic constructs were germinated and grown in soil for 3-4 weeks. The collected flowers were processed as described in the Materials and Methods section to determine the colour derived from the *uidA* reporter gene expression. Photographs are representative of 15 plants analysed.

Table 6.2.1. Comparison of organ and tissue-specific expression patterns of the *sps* genes in *A. thaliana*, between the reported by Volkert et al. (2014) and this work.

Genes	Expression reported	
	Volkert et al. (2014)	This work
<i>AtSPS1F (AtSPSA1)</i>	Cotyledonary leaves Mature leaves Stem Petals Anthers*	Cotyledonary leaves Mature leaves Stem Root stele** Columella** Sepals Petals
<i>AtSPS2F (AtSPSA2)</i>	Roots	Cotyledonary leaves** Mature leaves** Root stele Columella** Sepals** Petals**
<i>AtSPS3F (AtSPSB)</i>	Cotyledonary leaves* Stem* Anthers*	Root stele** Columella** Sepals** Petals**
<i>AtSPS4F (AtSPSC)</i>	Cotyledonary leaves* Mature leaves* Stem Petals Anthers*	Apical stem Sepals Petals Developing embryos**
Expression reported by Volkert et al. (2014) not reported in this work (*). Expression reported in this work, not reported by Volkert et al. (2014) (**).		

The transcript levels produced by each of the *sps* genes were determined in *A. thaliana* Col-0 plants grown under *in vitro* conditions. As a result, although *AtSPS2F* had a higher expression level than the other 3 *sps* genes, the increment was approximately 25% (Figure 6.2.6).

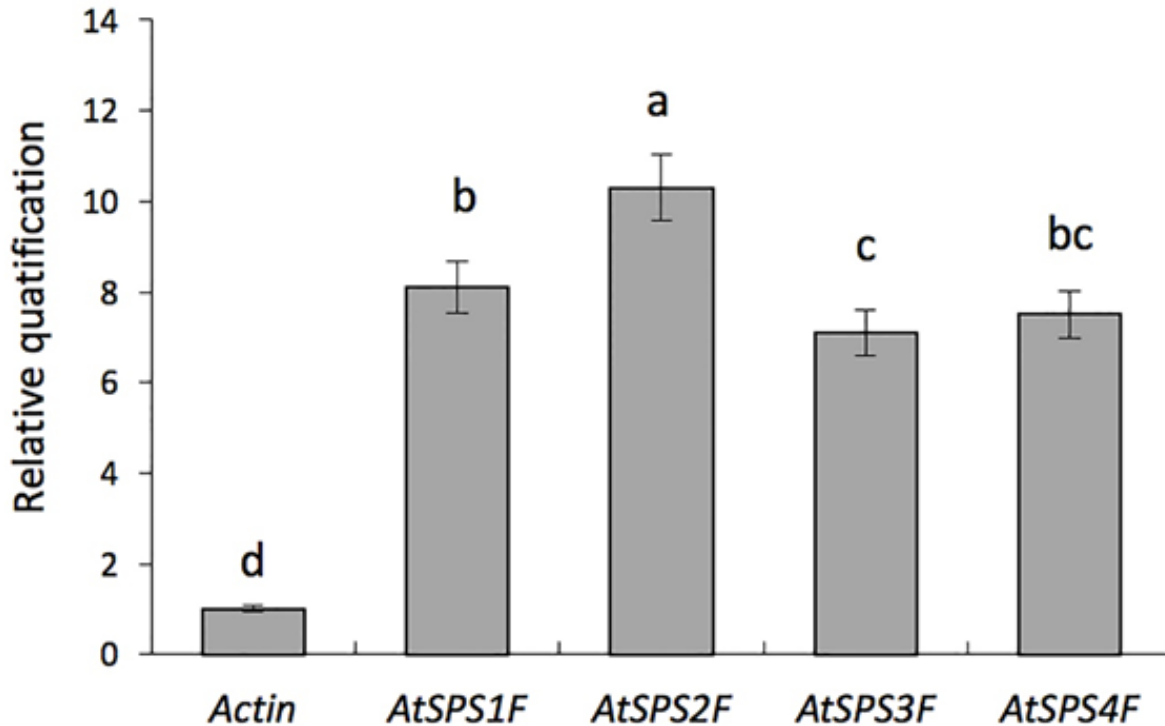


Figure 6.2.6. Transcripts levels of the *A. thaliana* *sps* genes. *A. thaliana* Col-0 seeds were germinated, and plants were grown in MS medium for 10 days. Total RNA was extracted, and the transcript levels were determined by qPCR as described in the Materials and Methods section. The levels of *sps* transcripts were standardized with the level of actin transcripts. The confidence interval for $\alpha = 0.05$ is indicated. Different letters indicate significant differences with the Tukey test ($P < 0.05$, $n = 3$).

To determine the effect of the osmotic stress on the accumulation of the osmoprotector proline and on the root growth, Col-0 and the four transgenic SPS lines were grown in the media with mannitol, finding that proline was duplicated and triplicated in plants grown in media with osmotic potential -0.3 and -0.6 MPa, respectively; conversely, the primary root growth was inhibited (Fig. 6.2.7). Analysing the transcript levels by qPCR in the Col-0 line, it was shown that osmotic stress acts differentially on the induction of *sps* expression genes, showing that *AtSPS2F* expression is increased more than four times its expression (Fig. 6.2.8); the analysis in the four SPS transgenic lines was similar.

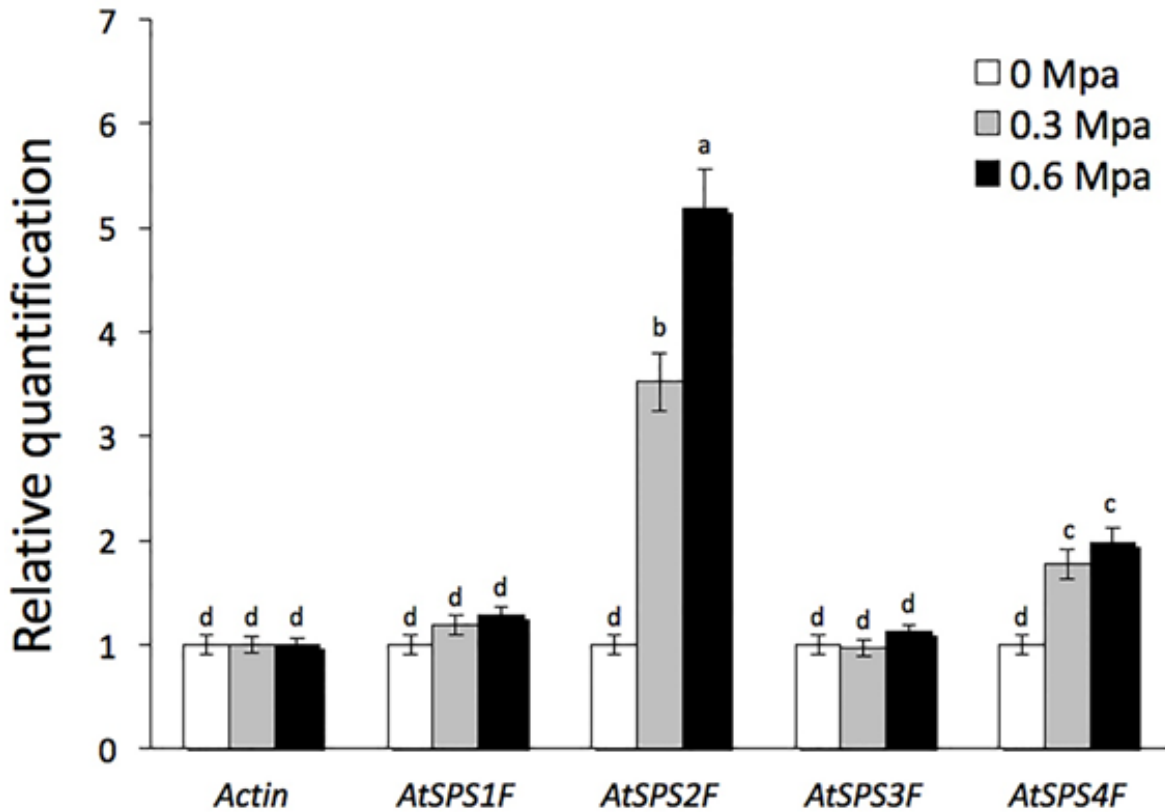


Figure 6.2.7. Effect of osmotic stress on the root growth and proline levels in *A. thaliana*. *A. thaliana* Col-0 seeds were germinated and grown for 15 days in the different MS media without (0 MPa) and with mannitol (-0.3 Mpa, -0.6 Mpa). The primary root growth was measured, and the amount of proline was quantified as described in the Materials and Methods section. The confidence interval for $\alpha = 0.05$ is indicated. Different letters indicate significant differences with the Tukey test ($P < 0.05$, $n = 3$).

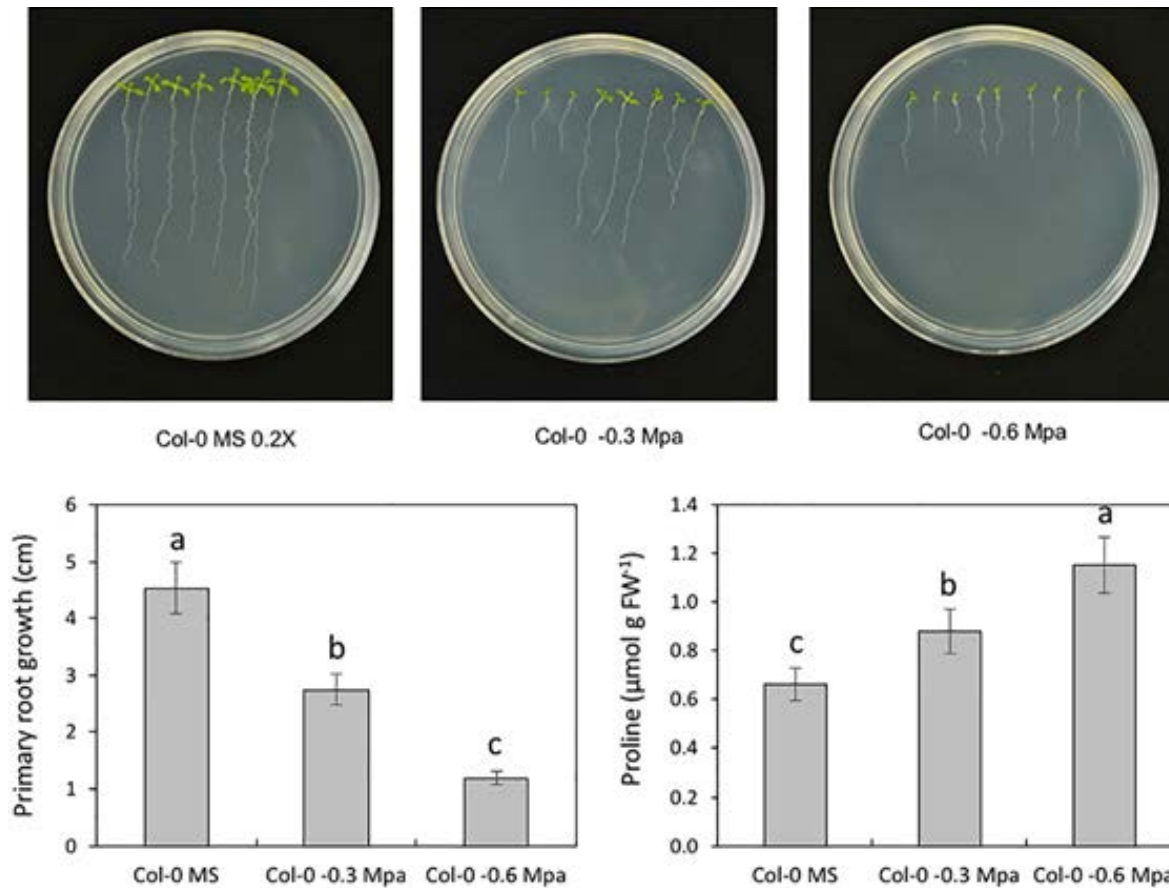


Figure 6.2.8. Effect of osmotic stress on the transcript levels of the *sps* genes in *A. thaliana*. *A. thaliana* Col-0 seeds were germinated, and plants were grown for 15 days in different MS media without mannitol (0 MPa) and mannitol (-0.3 Mpa, -0.6 Mpa). Total RNA was extracted, and the transcript levels were determined by qPCR as described in the Materials and Methods section. The transcript levels of each *sps* gene of plants grown in mannitol were standardized with the respective *sps* transcript levels of plants grown in media without mannitol; additionally, all of the transcripts were standardized to the level of actin gene transcripts. The confidence interval for $\alpha = 0.05$ is indicated. Different letters indicate significant differences with the Tukey test ($P < 0.05$, $n = 3$).

To determine whether the system established for osmotic stress in this work could induce the expression in the abscisic acid response marker *abi4::uidA*, *A. thaliana* plants harbouring this marker were grown in these media for further analysis of its histochemical expression, finding no remarkable differences (Fig. 6.2.9).

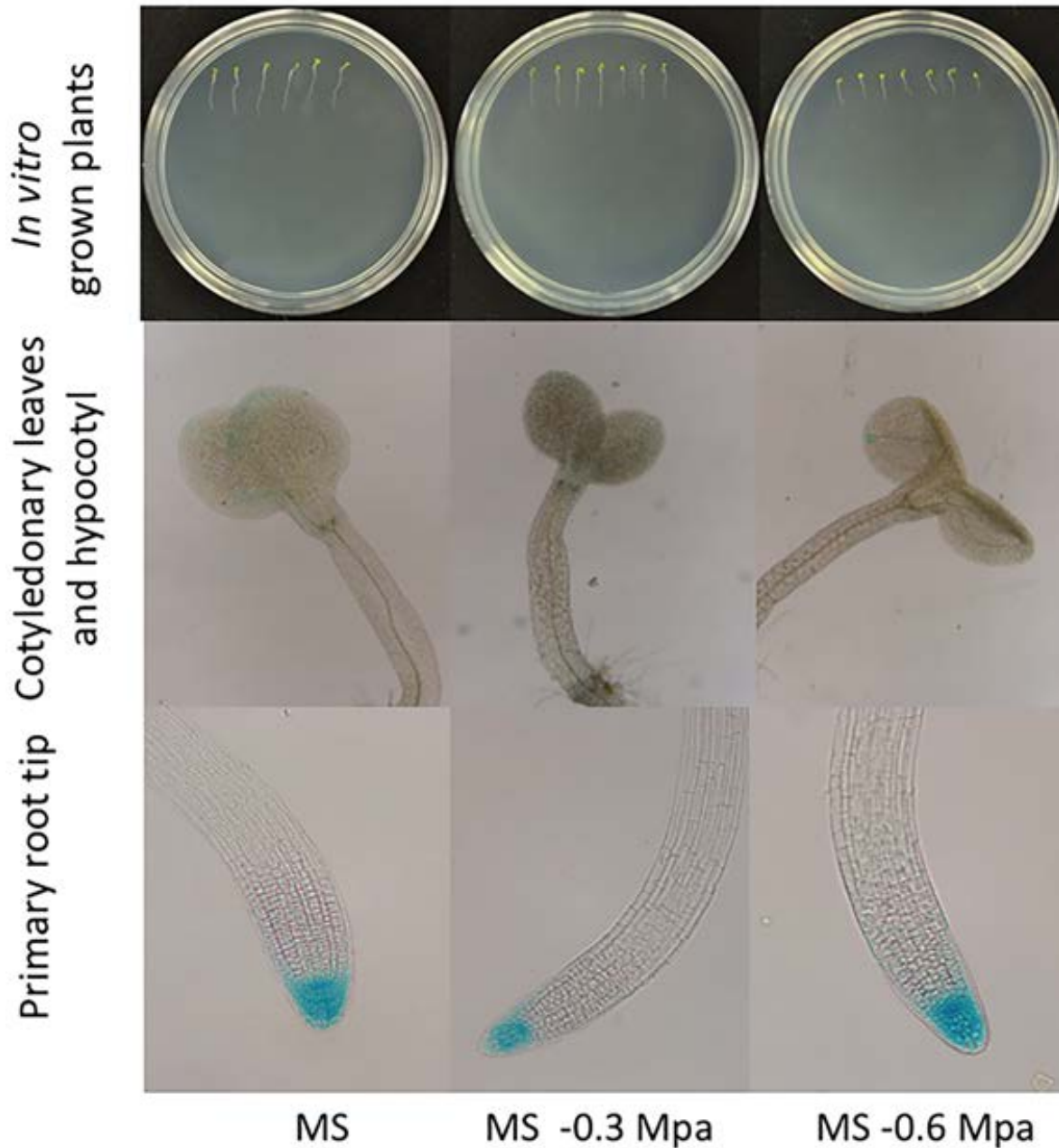


Figure 6.2.9. Effect of osmotic stress on the expression of the *abi4::uidA* genetic marker in *A. thaliana* plants. Seeds of the *A. thaliana abi4::uidA* line were germinated and grown for 72 hours in MS media without mannitol (0 MPa) and mannitol (-0.3 Mpa, -0.6 Mpa). Plants were processed as described in the Materials and Methods section to determine the colour derived from the expression of the *uidA* reporter gene.

DISCUSSION

The regulation of sucrose synthesis involves different steps from transcription to allosteric regulation (Huber and Huber, 1996); thus, it is necessary to understand this process in greater detail. In this paper, the expression conferred by the promoters of the four *A. thaliana* *sps* genes in different tissues and organs was analysed: the use of two genetic markers (*uidA* and *gfp*) allowed us to detail the expressions, complementing those results reported previously. Moreover, it was determined that these genes respond differently to osmotic stress via transcriptional expression.

In the evolutionary process, one of the major sources that generates diversity is gene duplication, which, via molecular mutations, can change the sequence of the coding and regulatory regions forming families of genes that differ both in intensity, time and place of transcription as in the activity or function of the encoded protein (Panchy et al., 2016). The transcriptional expression conferred by the promoters of the *A. thaliana* *sps* genes in vegetative structures found in this work shows some differences with that reported by Volkert et al. (2014)(Table 1); instead of indicating contradictions, our results complement those previously reported. Some factors may explain the variation in the results: i) the use of the *gfp* marker in the roots allowed delimiting accurately the expression in the stele and columella, ii) in the plant transformation, the insertion of T-DNA in the genome is random, which influences the gene expression in the obtained lines (Feng and Mundy, 2006) and as a consequence the intensity of expression conferred by a promoter can be altered (Schneeberger et al., 2005), making expression weak in some cases and preventing the visualization of the activity of the protein encoded by reporter genes in some tissues, iii) some variation in the techniques used in each laboratory.

The found overlapping in the transcriptional expression in the organs and tissues of the four *A. thaliana* *sps* genes, is according with studies of inactivation of these genes: when only one *sps* gene is inactivated it does not affect notably the growth and reproduction of *Arabidopsis* plants; only when there are double mutants (*AtSPS1F* and *AtSPS4F* genes), the rosettes, flowers and siliques are smaller than

those of the wild-type plants, and the inactivation of one more gene (*AtSPS3F*) is required for plants to be sterile (Volkert et al., 2014; Bahaji et al., 2015). Consistently, the *AtSPS2F* gene that showed the higher level of transcriptional expression in this work, does not affect notably the growth and reproduction when it is inactivated (Volkert et al., 2014). Therefore, although the tissue transcription of the *sps* genes has diverged to theoretically fine tune their function, the transcription overlapping may contribute for the plants to grow and reproduce without notable deficiencies when one *sps* gene is inactivated.

The expression in the leaves of *A. thaliana* *sps* genes, *AtSPS1F* and *AtSPS2F*, is a common pattern in other species: in maize, only one of its seven *sps* genes has no expression in this organ (Lutfylla et al., 2007); in rice, the major *sps* gene (*OsSPS1*) is expressed in the leaves (Chávez-Bárcenas et al., 2000); the above is coincident with the availability of precursors for sucrose synthesis, mainly trioses derived of photosynthesis in the leaf cells (Ruan, 2004; Jiang et al., 2015). On the other hand, the expression observed in the roots of three *A. thaliana* *sps* genes and five maize *sps* genes (Lutfylla et al., 2007) suggests that sucrose synthesis is required in this organ, and although this sugar is transported to the root through the phloem, it has been suggested that in sink organs a cycle of breaking the disaccharide into glucose and fructose and re-synthesis should form sucrose to establish an appropriate balance in the distribution of carbohydrates entering cells and to be transported to other cells (Stitt and Sonnewald, 1995). One of these cycles of the breaking and resynthesis of sucrose has been demonstrated in developing maize kernels (Cheng and Chourey, 1999); therefore, we propose that, in *A. thaliana*, the synthesis of sucrose occurs in the stele region (where the *sps* expression was found), allowing the partitioning of carbohydrates to the local cells and transport of sucrose to the cortex cells.

The expression of the *AtSPS1F*, *AtSPS2F* and *AtSPS3F* *A. thaliana* *sps* genes in the columella is interesting, because it is the site of gravity perception by the roots: in these cells, it has been shown that amyloplasts function as statoliths when they sediment and activate potential receptors in the endoplasmic reticulum or plasmatic

membrane, leading to a response of asymmetric growth in the root, involving the auxin hormone (Mendocilla et al., 2015). Starch accumulation in amyloplasts contributes to its greater density and ability to sediment; thus, the synthesis of this polysaccharide is essential for these organelles to function as statoliths, a phenomenon demonstrated using mutants that synthesize less starch or lack this polysaccharide in the amyloplasts, leading to a weaker response to gravity (MacCleery and Kiss, 1999). The expression of *A. thaliana sps* genes in columella suggests the sucrose synthesis in these tissue, and considering that this sugar induces the transcriptional expression of genes encoding ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) the first committed enzyme in the starch synthesis in *A. thaliana* (Sokolov et al., 1998), and also induces the *in vivo* starch synthesis (Tiessen et al., 2002), we hypothesize that the sucrose synthesis in the columella stimulate the starch synthesis in this tissue.

Transcriptional expression in sepals and petals was shown in the four *A. thaliana sps* genes; besides, in *AtSPS4F* the expression additionally occurred in the developing embryos; similarly, differences in the expression of the *sps* genes in reproductive structures have been found in other species, highlighting that *ZmSPS7* and *TaSPS2F* are expressed in embryos in maize and wheat, respectively (Lutfylla et al., 2007; Sharma et al., 2010). This suggests that in each species, one of the *sps* genes has been selected for its majority expression in embryos.

The osmotic stress established in our *in vitro* system allowed us to determine that the *A. thaliana sps* genes respond differentially to this factor: the transcriptional expression of *AtSPS2F* was increased more than four times, the expression of *AtSPS4F* was duplicated, and the *AtSPS1F* and *AtSPS3F* expression was not modified; similarly, of the seven *sps* maize genes, the transcriptional expression of *ZmSPS3F* was significantly induced in hydric stress conditions (Lutfylla et al., 2007). At the enzymatic level, considering a conserved amino acid sequence of spinach and maize, it has been predicted that in *A. thaliana*, the *AtSPS1F*, *AtSPS2F* and *AtSPS4F* enzymes are regulated by hydric stress, but not *AtSPS3F* (Lutfylla et al., 2007); thus, there is coincidence in the regulation by osmotic or hydric stress of the

AtSPS2F and *AtSPS4F* genes and their corresponding encoded enzymes, but not for the *AtSPS1F* gene and its encoded enzyme. Similarly, in maize there is no complete correlation of gene transcriptional regulation by hydric stress, and the presence of potential regulatory sequences in the SPS enzymes (Lutfylla et al., 2007). The Arabidopsis and maize data suggests that in the *sps* genes, the evolution of the promoter and coding regions are not necessarily co-related to determine that the regulation by osmotic or hydric stress be equal at the transcriptional and enzymatic levels.

The increased synthesis of sucrose under different abiotic stress conditions that lead to osmotic stress suggests that this sugar and others participate as osmoprotectants in angiosperms (Drennan et al., 1993; Ingram et al., 1997; Strand et al., 1999) and in reducing reactive oxygen species (Keunen et al., 2013). In the *A. thaliana* line *abi4::uidA*, with a sensible genetic marker for the response to abscisic acid, the reporter gene expression was not induced; therefore, it is suggested that the transcriptional induction of the *sps* Arabidopsis genes is not necessarily dependent on this hormone, and instead it is a primary response to osmotic stress.

Taken together, our results showed a detailed expression of the *A. thaliana* *sps* genes in organs and tissues and complemented the previous reported results by other research group, and demonstrated a differential transcriptional expression of these genes in response to osmotic stress.

REFERENCES

- Amir J, Preiss J (1982) Kinetic characterization of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Plant Physiol* 69:1027-1030
- Bahaji A, Baroja-Fernández E, Ricarte-Bermejo A, Sánchez-López AM, Muñoz FJ, Romero JM, Ruiz MT, Baslam M, Almagro G, Sesma MT, Pozueta-Romero J (2015) Characterization of multiple SPS knockout mutants reveal redundant functions of the four Arabidopsis sucrose phosphate synthase isoforms in plant viability, and strongly indicates that enhanced respiration and accelerated starch turnover can alleviate the blockage of sucrose biosynthesis. *Plant Sci* 238:135–147

- Bates L, Waldren RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207
- Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martínez-García JF (2008) Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci* 13:108–114
- Castleden CK, Auki N, Gillespie VJ, McRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn J (2004) Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol* 135:1753-1764
- Chávez-Bárceñas A, Valdez-Alarcón J, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cázarez B, Lucas WJ, Herrera-Estrella L (2000) Tissue-specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* Gene. *Plant Physiol* 124:641-653
- Cheng WH, Chourey PS (1999) Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theor Appl Genet* 98:485-495
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999) Spatio temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *Plant J* 20:503-508
- Do Nascimento JR, Cordenunsi BR, Lajolo FM, Alcocer MJ (1997) Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. *Planta* 203:283-288
- Doehlert DC, Huber SC (1983) Regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase by glucose-6-phosphate, inorganic phosphate, and pH. *Plant Physiol* 73:989-994
- Drennan PM, Smith MT, Goldsworthy D, Vanstaden J (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* welw J. *Plant Physiol* 142:493–496
- Feng CP, Mundy J (2006) Gene discovery and functional analyses in the model plant *Arabidopsis*. *J Integ Plant Biol* 48:5–14
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* 124:509–525
- Haseloff J, Amos B (1995) GFP in plants. *Trends Genet* 11:328-329
- Heim U, Weber H, Wobus U (1996) Cloning and characterization of full-length cDNA encoding sucrose phosphate synthase from faba bean. *Gene* 178:201–203
- Hesse H, Sonnewald U, Willmitzer L (1995) Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Mol Gen Genetics* 247:515–520
- Huber SC, Bachmann M, McMichael RW, Huber JL (1995) Regulation of sucrose-phosphate synthase by reversible protein phosphorylation: manipulation of activation and inactivation *in vivo*. *Int Symp Sucrose Met* (Points HG, Salerno GL, Echeverria EJ eds) American Society of Plant Physiologist, Maryland, USA

- Huber SC, Huber JL (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:431-444
- Ingram J, Chandler JW, Gallgher L, Salamini F, Bartels D (1997). Analysis of cDNA clones encoding sucrose phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Physiol* 115:113-121
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan M (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3910-3907
- Jiang SY, Chi YH, Wang JZ, Zhou JX, Cheng YS, Zhang BL, Ma A, Vanitha J, Ramachandran S (2015) Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Sci Rep* 5:17583 doi:10.1038/srep17583
- Kalt-Torres W, Kerr PS, Huber SC (1987) Isolation and characterization of multiple forms of maize leaf sucrose-phosphate synthase. *Physiol Plantarum* 70:653-658.
- Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, Van Den Ende W, Cuyper A (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell and Envi* 36:1242–1255
- Klein RR, Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME (1993) Cloning and developmental expression of the sucrose-phosphate-synthase gene from spinach. *Planta* 190:498–510
- Komatsu A, Takanokura Y, Omura M, Akihama T (1996). Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthases isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc). *Mol Gen Genet* 252:346-351
- Langenkämper G, McHale R, Gardner RC, MacRae E (1998) Sucrose-phosphate synthase steady-state mRNA increases in ripening kiwifruit. *Plant Mol Biol* 36:857-869
- Langenkämper G, Fung RW, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC, MacRae EA (2002) Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *J Mol Evol* 54:322–332
- Lutfiyya LL, Xu N, D'Ordine RL, Morrell JA, Miller PW, Duff SM (2007) Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *J Plant Physiol* 164:923-933
- MacCleery SA, Kiss JZ (1999) Plastid sedimentation kinetics in roots of wild-type and starch-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 120:183–192
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Develop* 124:33-44.
- Martínez-Trujillo M, Chávez-Bárcenas T, Limones-Briones V, Simpson J, Herrera-Estrella L (2004) Functional analysis of the promoter of the rice sucrose phosphate synthase gene (*sps1*). *Plant Sci* 166:131–140
- McBride KE, Summerfelt KR (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 14:269-276

- McMichael Jr RW, Klein RR, Salvucci ME, Huber SC (1993) Identification of the major regulatory phosphorylation site in sucrose-phosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* 307:248–252
- Mendocilla E, Hijazi H, Bennet MJ, Vissenverg K, Swarum R (2014). New insights into root gravitropic signaling. *J Exp Bot*: 2-11
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nielsen TH, Huber SC (1989) Unusual regulatory properties of sucrose-phosphate synthase purified from soybean (*Glycine max*) leaves. *Physiol Plantarum* 76:309-314
- Okamura M, Aoki N, Hirose T, Yonekura M, Ohto C, Ohsugi R (2011). Tissue specificity and diurnal change in gene expression of the sucrose phosphate synthase gene family in rice. *Plant Sci* 181:159-166
- Oliveira JR, Cordenunsi BR, Lajolo FM, Caruso MJ (1997). Banana sucrose phosphate synthase gene expression during fruit ripening. *Planta* 203:283-288
- Panchy N, Lehti-Shiu M, Shiu SH (2016) Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiol* 171:2294–2316
- Ruan YL (2014) Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol* 65:33-67
- Salerno GL, Pontis HG (1978) Sucrose phosphate synthetase. Separation from sucrose synthetase and a study of its properties. *Planta* 142:41–48
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotech* 1992:104–108.
- Schneeberger RG, Zhang K, Tatarinova T, Troukhan M, Kwok SF, Drais J, Klinger K, Orejudos F, Macy K, Bhakta A, Burns J, Subramanian G, Donson J, Flavell R, Feldmann KA (2005) Agrobacterium T-DNA integration in *Arabidopsis* is correlated with DNA sequence compositions that occur frequently in gene promoter regions. *Funct Integr Genomics* 5:240–253
- Sharma S, Sreenivasulu N, Harshavardhan VT, Seiler C, Sharma S, Khalil ZN, Akhunov E, Sehgal SK, Röder MS (2010) Delineating the structural, functional and evolutionary relationships of sucrose phosphate synthase gene family II in wheat and related grasses. *BMC Plant Biol* 10:134-147
- Söderman E, Brocard I, Lynch T, Finkelstein R (2000) Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 (ABI4) gene in seed and ABA response signaling networks. *Plant Physiol* 124:1752–1765
- Sokolov LN, Déjardin A, Kleczkowski LA (1998) Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADPglucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochem. J* 336:681-687

- Sonnewald U, Quick WP, MacRae E, Krause K-P, Stitt M (1993) Purification, cloning and expression of spinach leaf sucrose-phosphate synthase in *Escherichia coli*. *Planta* 189:174–181
- Stitt M, Wilke I, Feil R, Heldt W (1988) Coarse control of sucrose phosphate synthase in leaves: Alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. *Planta* 174: 217-230
- Stitt M, Sonnewald U (1995) Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 341-368
- Strand Å, Hurry V, Henkes S, Huner N, Gustafsson P, Gardestrom P, Stitt M (1999) Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol* 119:1387–1397
- Sugiharto B, Sakakibara H, Sumadi, Sugiyama T (1997) Differential Expression of Two Genes for Sucrose-Phosphate Synthase in Sugarcane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiol* 38:961-965
- Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farré EM, Geigenberger P (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism. *Plant Cell* 14:2191–2213
- Valdez-Alarcón JJ, Ferrando M, Salerno G, Jimenez-Moraila B, Luis Herrera-Estrella (1996) Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase-encoding gene. *Gene* 170:217–222
- Volkert K, Debast S, Voll LM, Voll H, Schießl I, Hofmann J, Schneider S, Börnke F (2014) Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *J Exp Botany* 65:5217–5229
- Winter H, Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Plant Sci* 19:31-67
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3:1121-1130
- Xiong J, Zhu K (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell Env* 25:131–139
- Yonekura M, Aoki N, Hirose T, Onai K, Ishiura M, Okamura M, Ohsugi R, Ohto C (2013). The promoter activities of sucrose phosphate synthase genes in rice, OsSPS1 and OsSPS11, are controlled by light and circadian clock, but not by sucrose. *Front Plant Sci* 4:1-8

RESUMEN DE RESULTADOS

- a) El gen *AtSpen2* tiene un promotor funcional que confiere expresión específica en los órganos de la planta a nivel de tejido vascular.
- b) El gen *Atspen2* presenta diferencias importantes a la expresión conferida por su gen parálogo *FPA* de *A. thaliana*.
- c) Los genes *sps* de *A. thaliana*, *AtSPS1F*, *AtSPS2F*, *AtSPS3F* y *AtSPS4F*, presentan diferente expresión en órganos y tejidos
- d) Existe expresión en las hojas cotiledonares y verdaderas en *AtSPS1F* y *AtSPS2F* así como en el tejido vascular. En la raíz, la expresión se encontró en el cilindro central y el periciclo, así como en las células de la columnela para *AtSPS1F*, *AtSPS2F* y *AtSPS3F*. La expresión del gen *AtSPS4F* es a nivel de embriones en desarrollo
- e) La expresión transcripcional en *AtSPS2F* aumentó más de 4 veces bajo estrés osmótico, la de *AtSPS4F* se duplica, mientras que la expresión de *AtSPS1F* y *AtSPS3F* no se modificada de manera significativa.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

A partir de la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Initiative 2000) ha sido posible identificar numerosos genes putativos cuya función sigue siendo un enigma en ausencia de datos experimentales y análisis bioinformáticos sistemáticos. *A. thaliana* es la planta mejor conocida, sin embargo, Rhee y Mutwil (2014) reportan que se desconoce la función del 6% de sus genes. Entre los genes de función desconocida se encuentra At4g12640, el cual codifica para una proteína Split end (Spen); este tipo de proteínas presentan al menos un dominio que permite la unión a ARN (RRM) y otro dominio que permite establecer una interacción con otras proteínas (SPOC), por lo que en general, estas proteínas participan en procesos de regulación genética.

Mediante experimentos de interacción *in vivo* utilizando el sistema de tres híbridos en levadura, Toledo-Jacobo et al. (2009), determinaron que la proteína codificada por el gen At4g12640 interactúa de manera específica con una región 5' líder del ARN del gen *sps1* de arroz que codifica para una enzima sacarosa fosfato sintasa, que permite la síntesis de sacarosa. Para entender el significado biológico de esta interacción, se decidió partir con un análisis bioinformático y una posterior caracterización de la expresión específica en tejidos y órganos del gen At4g12640 (nombrado *AtSpen2* en éste trabajo) y de los genes que codifican enzimas sacarosa fosfato sintasas (SPS), en *A. thaliana*.

Con los resultados obtenidos se demostró que la región promotora de *AtSpen2* es funcional y confiere expresión específica en órganos y tejidos; la comparación de la similitud del dominio SPOC de esta proteína con el dominio homólogo de otras proteínas Spen de plantas permitió inferir su filogenia. El hecho de que en la filogenia derivada de la comparación del dominio SPOC, AtSPEN2 se agrupe más estrechamente con proteína OsRRM de arroz que con la proteína FPA de *Arabidopsis*, y que ésta última sea más similar a la proteína OsRRMh de la misma monocotiledónea, indica que los genes *AtSpen2* y *FPA*, que codifican estas proteínas en *A. thaliana* son parálogos, y probablemente la función de *AtSpen2* es diferente a la de *FPA*, ya que este último está involucrada en el control del tiempo

de floración por la vía autónoma (Schomburg et al. 2001). Los resultados mostraron que la expresión conferida por el promotor de *AtSpen2* fusionado a los genes reporteros *uidA::gfp* estuvo asociada al tejido vascular en diferentes órganos: raíz, hoja cotiledonar y hoja verdadera, tallo floral y gineceo; además, se encontró expresión en los óvulos y embriones en desarrollo en la fase globular. El patrón de expresión observado sugiere que la función del gen *AtSpen2* está asociada al tejido vascular, ya sea en procesos de transporte y/o en la formación de éste, a partir de células que dan origen al xilema y/o floema. El hecho de que la expresión de *AtSpen2* apareciera en los óvulos y embriones en desarrollo, sugiere que este gen tiene una función en esta etapa, que para desvelarla requiere estudios adicionales, ya que se ha reportado que la embriogénesis es compleja e implica la adquisición de identidades celulares y patrones de desarrollo (Capron et al. 2009). En el análisis del crecimiento, desarrollo y tiempo de floración de líneas knock-out (KO), y sobreexpresoras (OE) del gen *AtSpen2* no se encontraron diferencias fenotípicas significativas con respecto a la línea silvestre Col-0, y aunque se ha reportado que la redundancia en la función de los genes puede ser la causa de la ausencia de un fenotipo al mutar un gen (Bouche y Bouchez 2001), en el caso particular de *AtSpen2* esto es poco probable por lo siguiente: a) su único gen parálogo *FPA* tiene una función clara al participar en el control del tiempo de floración (Ietswaart et al. 2012), descartada para *AtSpen2*, b) *FPA* tiene un dominio SPOC con poca similitud al mismo dominio de la proteína *AtSpen2* y c) la expresión conferida por las regiones promotoras de *AtSpen2* y *FPA* en los órganos de la planta presentan varias diferencias. Por lo anterior, se propone que la ausencia de diferencias fenotípicas notables en nuestras líneas KO y OE se debe a alguna de las siguientes situaciones: a) que *AtSpen2* no es un gen maestro en algún proceso del desarrollo, sino que en caso de participar lo hace de manera accesoria y b) su participación sea condicional y depende de ciertas condiciones endógenas o ambientales.

Por otro lado, la regulación de la síntesis de sacarosa se presenta en diferentes niveles, desde la transcripción hasta la regulación alostérica (Huber y Huber 1996), por lo que es necesario entender este proceso en mayor detalle. En este trabajo se analizó la expresión conferida por los promotores de los 4 genes *sps* de *A. thaliana*

en diferentes órganos y tejidos: se encontraron diferencias significativas con respecto a lo reportado previamente; además, se determinó que estos genes responden diferentemente al estrés osmótico a nivel de la expresión transcripcional.

La expresión transcripcional conferida por los promotores de los genes *sps* de *A. thaliana* en estructuras vegetativas encontrada en este trabajo mostró diferencias con la reportada por Volkert et al. (2014) para *AtSPS1F*, *AtSPS4F* y *AtSPS3F*, ellos reportan expresión sólo en las hojas y para *AtSPS2F* sólo en las raíces; en cambio, en este trabajo se encontró que la expresión conferida por los promotores de *AtSPS1F*, *AtSPS2F* se presentó en las hojas, así como en la estela y la columnela de la raíz, *AtSPS3F* confirió expresión en la estela de la raíz y la columnela, y *AtSPS4F* se expresó en el ápice del tallo. Las diferencias entre nuestro trabajo y el reportado previamente pueden deberse en parte a que en la transformación genética de plantas, la inserción del ADN de transferencia en el genoma es aleatoria (Feng y Mundy 2006) y la intensidad de la expresión conferida por un promotor se puede alterar (Schneeberger et al. 2005), debilitando la expresión en algunos casos y evitando la visualización de la actividad de la proteína codificada por el gen reportero en algunos tejidos. La expresión transcripcional en las estructuras reproductivas se presentó en los 4 genes *sps* de *A. thaliana*, sin embargo, en 3 genes se presentó en los pétalos y estigma del gineceo, mientras que en *AtSPS4F*, la expresión ocurrió también en los embriones en desarrollo, lo que sugiere una función de este gen durante alguna etapa del desarrollo embrionario, posiblemente mediante el aporte de sacarosa. En nuestro trabajo, el gen *AtSPS2F* mostró un nivel más alto de expresión transcripcional que los otros 3 genes *sps*; sin embargo, en la inactivación de los genes *sps*, *AtSPS2F* es el gen cuya inactivación afecta menos al crecimiento y a la reproducción (Volkert et al. 2014); con lo anterior, y aunado a que la inactivación del gen *AtSPS2F* no cambia significativamente la actividad enzimática de SPS en general, mientras que la inactivación de cada uno de los otros tres genes *sps* disminuye alrededor de un tercio la actividad de las enzimas SPS (Bahaji et al. 2025), sugiere que finalmente es la actividad de las enzimas SPS lo más importante; esta paradoja puede estar

relacionada a que AtSPS2F es la única enzima que está regulada alostéricamente por G-6P y Pi (Volkert et al. 2014).

El reporte de que hay un aumento en la síntesis de sacarosa bajo diferentes condiciones de estrés abiótico que causan estrés osmótico, sugiere que este azúcar y otros participan como osmoprotectores en las angiospermas (Drennan et al. 1993; Ingram et al. 1997; Strand et al. 1999), lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro sistema de estrés osmótico *in vitro*, que permitió determinar que los genes *sps* de *A. thaliana* responden diferencialmente a este factor: la expresión de *AtSPS2F* aumenta más de 4 veces, la expresión de *AtSPS4F* se duplica, mientras que la expresión de *AtSPS1F* y *AtSPS3F* no se altera; este comportamiento, del efecto del estrés osmótico en la expresión transcripcional, no está necesariamente correlacionado con la presencia de sitios de regulación por estrés hídrico en las enzimas SPS (Lutfylla 2007) porque la secuencia de aa se reporta para *AtSPS1F*, pero el gen que codifica para la enzima no se indujo transcripcionalmente en nuestro sistema de estrés osmótico; de manera similar, en el maíz, no existe una correlación completa entre la regulación génica a nivel transcripcional por estrés hídrico y la presencia de secuencias reguladoras potenciales para este factor en las enzimas SPS (Lutfylla et al. 2007). Lo anterior sugiere que en los genes *sps*, la evolución del promotor y de las regiones codificadoras no están necesariamente correlacionadas para determinar que la regulación por factores ambientales sea igual en los niveles transcripcional y post-transcripcional, y se sugiere que *AtSPS2F* es el gen que más contribuye a nivel de la transcripción en la vía de la síntesis de la sacarosa en respuesta al estrés osmótico. En la línea *abi4:: uidA* de *A. thaliana*, que contiene un marcador genético para la respuesta al ácido abscísico, no hubo inducción de la expresión del gen reportero por efecto del estrés osmótico, por lo que se sugiere que la inducción transcripcional de los genes *AtSPS1F* y *AtSPS4F* no depende necesariamente de esta hormona, sino que es una respuesta primaria al estrés osmótico.

La interacción reportada entre el ARNm de la región líder de un gen *sps* de arroz y la proteína AtSPEN2, motivó el presente estudio, en el cual se realizaron las

caracterizaciones anteriormente reportadas; de esta manera quedan sentadas las bases para un estudio posterior que analice primeramente las interacciones de las regiones líderes (no traducidas) de los ARNm codificados por cada uno de los genes *sps* de *A. thaliana* con la proteína AtSPEN2 y dependiendo de los resultados, orientar el trabajo hacia análisis más específicos. Al momento sólo se podría resaltar el hecho de que *AtSpen2* tiene expresión en floema, que es el sitio donde es transportada la sacarosa, producto de la actividad de las diferentes enzimas SPS de *A. thaliana*, aunado a que además de la expresión de los genes *sps* en tejido fotosintético, también tienen expresión en el floema de la hoja e incluso de la raíz.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

- a) La función de *Atspen2* ha divergido significativamente de la de *FPA*, debido posiblemente a la divergencia del dominio regulador SPOC, aunado al diferente patrón de expresión transcripcional de ambos genes en *A. thaliana*.

- b) La expresión conferida por los promotores de los genes *sps* de *A. thaliana* presentan traslapes y divergencias a nivel de tejidos y órganos, lo que posiblemente permite que estos genes contribuyan conjuntamente en la síntesis de enzimas SPS en algunos sitios y desempeñar su actividad de manera individual en otros sitios, modulando más finamente la síntesis de sacarosa.

- c) Existen diferencias en la expresión transcripcional de los genes *sps* de *A. thaliana* por efecto del estrés osmótico lo que posiblemente contribuya en la adaptación al agobio hídrico.

IX. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Ariyoshi M, Schwabe JW (2003) A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes Dev* 17:1909-1920
- Álvarez-Buylla ER, Benítez M, Corvera-Poiré A, Chaos A, de Folter S, Gamboa A, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Pérez-Ruiz RV, Piñeyro-Nelson A and Sánchez-Corrales YE (2010) Flower Development. *The Arabidopsis Book* 8: e0127. doi:10.1199/tab.0127.
- Bevan M, Walsh S (2005) The Arabidopsis genome: A foundation for plant research. *Genome Research* 15:1632–1642
- Castleden CK, Auki N, Gillespie VJ, McRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn J (2004) Evolution and function of the Sucrose-Phosphate Synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol* 135:1753-1764
- Chávez-Bárcenas AT, Valdez-Alarcón JJ, Martínez-Trujillo M, Chen L, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ, Herrera-Estrella L (2000) Tissue specific and developmental pattern of expression of the rice *sps1* gene. *Plant Physiol* 124:641-653
- Chen F, Rebay I (2000) Split ends, a new component of the Drosophila EGF receptor pathway, regulates development of midline glial cells. *Curr Biol* 10:943-946.
- Chen S, Wang Z, Cai X (2007) *OsRRM*, a *Spen*-like rice gene expressed specifically in the endosperm. *Cell Res* 17:713-721
- Clough SJ and Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-43.
- Do Nascimento JR, Cordenunsi BR, Lajolo FM, Alcocer MJ (1997) Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. *Planta* 203:283-288
- Echeverría E, Salvacci ME, González P, Paria G, Salerno G (1997). Physical and kinetic evidence for an association between Sucrose-Phosphate Synthase and Sucrose-Phosphate Phosphatase. *Plant Physiology* 115:223-227
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* 124:509–525
- Garcia-Hernandez M, Reiser L (2006) Using Information From Public Arabidopsis Databases to Aid Research, *Methods In: Molecular Biology*, vol. 323: Arabidopsis Protocols, 2a Eds, editado por Salinas J y Sanchez-Serrano JJ© Humana Press Inc., Totowa, NJ. p 187-211
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y,

- Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296:92-100.
- Haas BJ, Wortman JR, Ronning CM, Hannick LI, Smith Jr, RK, Maiti R, Chan AP, Yu C, Farzad M, Wu D (2005) Complete reannotation of the Arabidopsis genome: Methods, tools, protocols and the final release. *BMC Biol.* 3:7-15
- Heim U, Weber H, Wobus U (1996) Cloning and characterization of full-length cDNA encoding sucrose phosphate synthase from faba bean. *Gene* 178:201–203
- Hesse H, Sonnewald U, Willmitzer L (1995) Cloning and expression analysis of sucrose-phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Mol Gen Genet* 247:515–520
- Hornyik C., L. I. Terzi, y G. G. Simpson. 2009. The Spen Family Protein FPA Controls Alternative Cleavage and Polyadenylation of RNA. *Developmental Cell* 18:203–213
- Huber SC, Huber JL (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 47:431-444
- Ingram J, Chandler JW, Gallgher L, Salamini F, Bartels D (1997) Analysis of cDNA clones encoding sucrose phosphate synthase in relation to sugar interconversions Associated with Dehydration in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Physiol* 115:113-121
- Jaeger S, Eriani G, Martin F (2004) Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Letters* 556:7-12.
- Jiang SY, Chi YH, Wang JZ, Zhou JX, Cheng YS, Zhang BL, Ma A, Vanitha J, Ramachandran S (2015) Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Sci Rep* doi: 10.1038/srep17583
- Komatsu A, Takanokura Y, Omura M, Akihama T (1996) Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthases isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc). *Mol Gen Genet* 252:346-351
- Koomneef M, Meinke D (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J.* 61:909-921
- Kuang B, Wu SC, Shin Y, Luo L, Kolodziej P. (2000). Split ends encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development* 127:1517-1529.
- Lane ME, Elend M, Heidmann D, Herr A, Marzodko S, Herzig A, Lehner CF. (2000) A screen for modifiers of cyclin E function in *Drosophila melanogaster* identifies Cdk2 mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in Cdk2. *Genetics* 155:233-244.

- Langekämper G, Fung RW, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC, MacRae EA (2002) Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *Journal of Molecular Evolution* 54:322-332.
- Lin HV, Doroquez DB, Cho S, Chen F, Rebay I, Cadigan KM (2003) Splits ends is a tissue/promoter specific regulator of Wingless signaling. *Development*, 130:3125-3135
- Lunn JE, Rees T (1990) Apparent equilibrium constant and mass-action ratio for sucrose-phosphate synthase from seeds of *Pisum sativum*. *The Biochemical Journal* 267:739-743
- Lutfiyya LL, Xu N, D'Ordine RL, Morrell JA, Miller PW, Duff SM (2007). Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *J Plant Physiol.* 164(7):923-933
- Liu D, Cai X (2013) OsRRMh, a Spn-like Gene, Plays an Important Role during the Vegetative to Reproductive Transition in Rice. *J Integr Plant Biol* 55:876-887
- Malamy JE y Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 662:679-682
- Martínez-Trujillo M, Herrera Estrella L (2003) Incremento en la eficiencia de transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión floral. *Ciencia Nicolaita* 36:87-96
- Meyerowitz EM y Somerville CR (1994) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p1300.
- Okamura M, Aoki N, Hirose T, Yonekura M, Ohto C, Ohsugi R (2011) Tissue specificity and diurnal change in gene expression of the sucrose phosphate synthase gene family in rice. *Plant Sci* 181:159-166
- Paterson AH, Freeling M, Sasaki T (2005) Grains of knowledge: Genomics of modern cereals. *Genome Research* 15:1643-1650
- Rebay I, Chen F, Hsiao F, Kolodziej PA, Kuang BH, Laverty T, Suh C, Voas M, Williams A, Rubin GM (2000) *Genetics* 154:695-712
- Rhee SY, Mutwil M (2014) Towards revealing the functions of all genes in plants. *Trends Plant Sci* 19:212-221
- Ruan YL (2014) Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol* 65:26.1-26.35
- Ruijter NCA, Verhees J, van Leeuwen W, van der Krol AR (2003) Evaluation and comparison of the GUS, LUC, and GFP reporter system for gene expression studies in plants. *Plant Biol* 5:103-115

- Sánchez-Pulido L, Rojas AM, Wely KH, Martínez-A C, Valencia A (2004) BMC Bioinformatics 5:91
- Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW, Amasino RM (2001) FPA, a Gene Involved in Floral Induction in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Recognition Motifs. The Plant Cell 13: 1427–1436
- Sonnewald U, Quick WP, MacRae E, Krause K-P, Stitt M (1993) Purification, cloning and expression of spinach leaf sucrose-phosphate synthase in *Escherichia coli*. Planta 189:174–181
- Sugiharto B, Sakakibara H, Sumadi, Sugiyama T (1997) Differential Expression of Two Genes for Sucrose-Phosphate Synthase in Sugarcane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. Plant Cell Physiol 38:961-965
- Toledo-Jacobo L, Gómez-González MR, Solís-Guzmán G, Vázquez-Chimalhua E, Martínez-Trujillo M (2009) Identificación y análisis de proteínas de *Arabidopsis thaliana* resultantes de la interacción con el ARN de la región líder del gen sacarosa fosfato sintasa de arroz. Biológicas 11:93–103
- Uranishi H, Zolotukhin AS, Lindtner S, Warming S, Zhang G, Bear J, Copeland NG, Jenkins NA, Pavlakis GN, Felber BK (2009) The RNA-binding Motif Protein 15B (RBM15B/OTT3) Acts as Cofactor of the Nuclear Export Receptor NXF1. J Biol Chem 284:26106-16
- Valdez-Alarcón JJ, Ferrando M, Salerno G, Jimenez-Moraila B, Herrera-Estrella L (1996) Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase-encoding gene. Gene 170:217–222
- Volkert K, Debast S, Voll LM, Voll H, Schießl I, Hofmann J, Schneider S, Börnke F (2014) Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in Arabidopsis thaliana limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. J Exp Botany 65:5217–5229
- Wiellette EL, Harding KW, Mace KA, Ronshaugen MR, Wang FY, McGinnis W. (1999) Spen encodes an RNP motif protein that interacts with Hox pathways to repress the development of head-like sclerites in the Drosophila trunk. Development 126:5373-5385.
- Winter H, Huber SC (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. Plant Sciences 19:31-67
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. Plant Cell 3:1121-1130
- Xiong J, Zhu K (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell Env 25:131–139

X. ANEXO. Documentos de divulgación generados

1. María Gloria Solís Guzmán (2017) La sacarosa: el dulce de las plantas. Saber más 31:19-23
2. María Gloria Solís-Guzmán, Luis María Suárez-Rodríguez, Miguel Martínez-Trujillo (2016) Expresión conferida por tres versiones de la región reguladora 5' del gen *AtSpen2* en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* (L). Biológicas. 18(2):10-15
3. María Gloria Solís Guzmán (2013) ¿El gen de la infidelidad? En Cienciarío, Cambio de Michoacán (Suplemento de cambio de Michoacán para la divulgación de temas científicos y tecnológicos), Raúl López Téllez (editor), 1-2 p.

La sacarosa : el dulce de las plantas

María Gloria Solís Guzmán

La sacarosa, azúcar común o azúcar de mesa, es uno de los edulcorantes naturales más utilizados en nuestros alimentos, en nuestro paladar lo reconocemos como "dulce". Pertenecen, junto a la glucosa, la fructosa, la lactosa, la maltosa y la galactosa, a los carbohidratos o sacáridos denominados "nutritivos", porque son la principal fuente de energía para nuestro organismo. La glucosa, la fructosa y la galactosa, son monosacáridos o azúcares simples; la lactosa, maltosa y sacarosa son disacáridos, formados por la condensación (unión) de dos azúcares monosacáridos iguales o distintos. La sacarosa está constituida por glucosa y fructosa.

La M. en C. María Gloria Solís Guzmán es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas. Laboratorio de Genética y Microbiología de

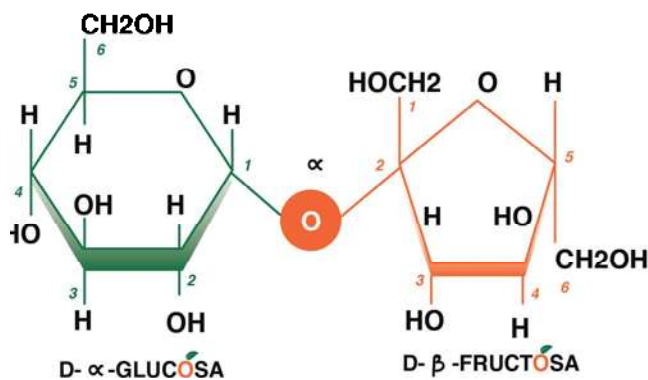
¿La sacarosa, se obtiene solo de las plantas?

¡Sí!

La sacarosa la podemos encontrar en hojas, tallos, raíces y frutos de muchas plantas, pero solamente se obtiene para su uso, mayormente de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*). Pero también del arce azucarero (*Acer saccharum*), un árbol muy abundante en Canadá, de algunas palmeras (*Arenga pinnata* y *Caryota urens*) y del sorgo azucarero (*Sorghum bicolor*). De manera natural también podemos encontrarla en la miel de abeja en mezcla con la glucosa y la fructosa.

La sacarosa ocupa una posición central en el metabolismo de todas las plantas, es producida o sintetizada como principal producto de la

la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Sacarosa y su fórmula química

fotosíntesis en la mayoría de éstas. La fotosíntesis es el proceso mediante el cual se captura la energía de la luz y se utiliza para impulsar la síntesis de los azúcares a partir de dióxido de carbono (CO₂) y agua, produciéndose, además, el oxígeno que respiramos.

Entonces, para la síntesis de los azúcares en las plantas se requiere de los cloroplastos, orgánulos presentes mayormente en las células de las hojas y algunos tallos, en los que se encuentra la clorofila y lugar donde se realiza la fotosíntesis. Aunque es un proceso muy complejo, puede resumirse en que, por medio de este, el CO₂ (materia inorgánica) se transforma en azúcar (materia orgánica) en la denominada Fase Oscura por no ser dependiente de la luz, empleando la energía bioquímica de la molécula energética celular, el ATP (trifosfato de adenosina). Esta molécula es obtenida por medio de la energía solar a través de los pigmentos fotosintéticos (entre ellos, la clorofila) y la cadena transportadora de electrones de los tilacoides, denominada Fase Luminosa por depender de la luz. Los tilacoides son sacos membranosos de los cloroplastos que al apilarse forman los grana, que contienen sustancias como los pigmentos fotosintéticos (clorofila, carotenoides y xantofilas, ente otros).

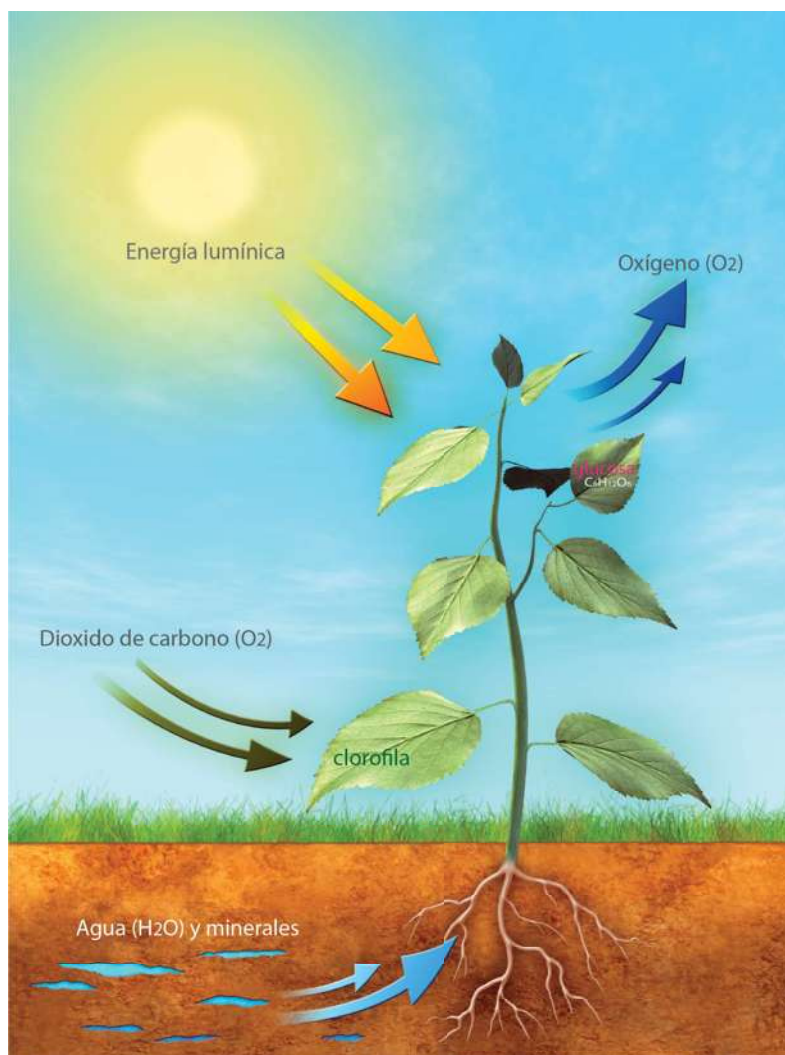
Del Ciclo de Calvin (denominado en honor de su descubridor Melvin Cal-

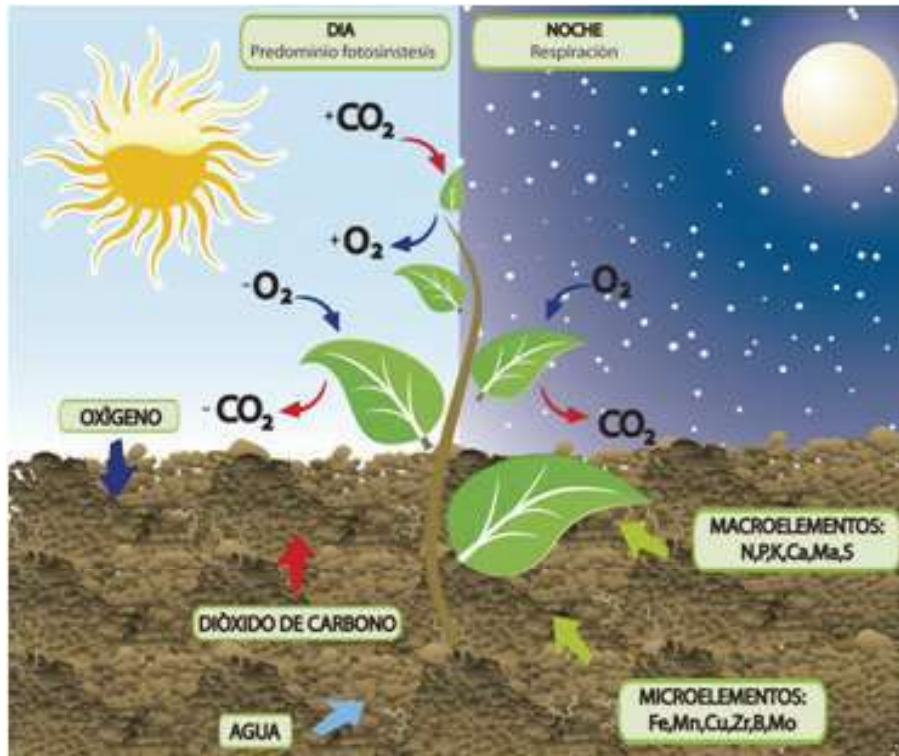
vin, galardonado con el Premio Nobel de Química en 1961), a partir de seis moléculas de CO₂ se producen dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (GAP), las que son transportadas al citosol para la síntesis de la sacarosa. A partir de estas moléculas también se sintetizan el almidón, la celulosa y otros compuestos orgánicos.

“El proceso completo desde la captura de la energía luminosa hasta la producción de azúcar, termina en el citosol de las células fotosintéticas”

¿Cómo es la síntesis de la sacarosa?

Estas moléculas GAP, son triosas (significan un azúcar de tres carbonos) con grupos fosfato (triosas-P) y son las precursoras de formar, primeramente, glucosa y a partir de esta la fructosa, los monosacáridos que conforman a la sacarosa, mediante el metabolismo básico de las células como la glucólisis o la vía de las pentosas.





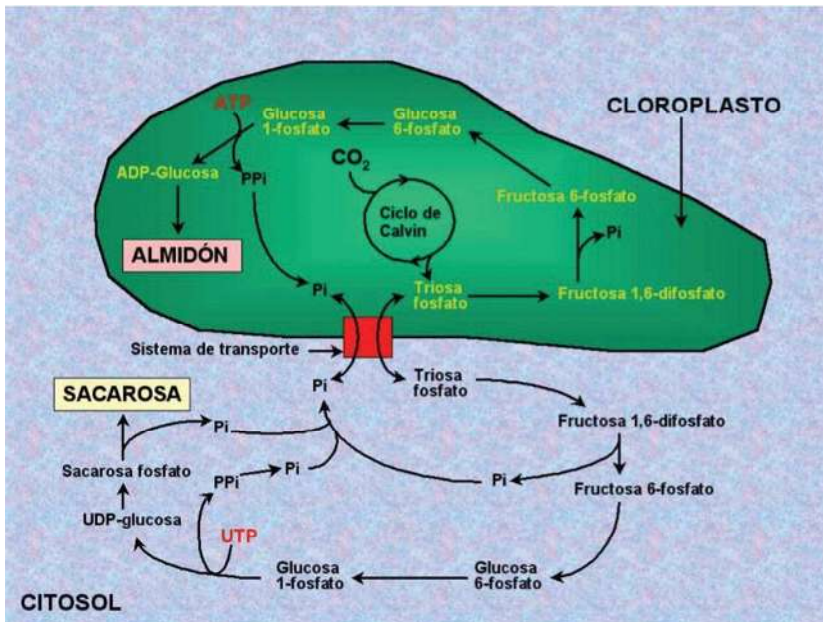
Fase luminosa y fase oscura de la fotosíntesis

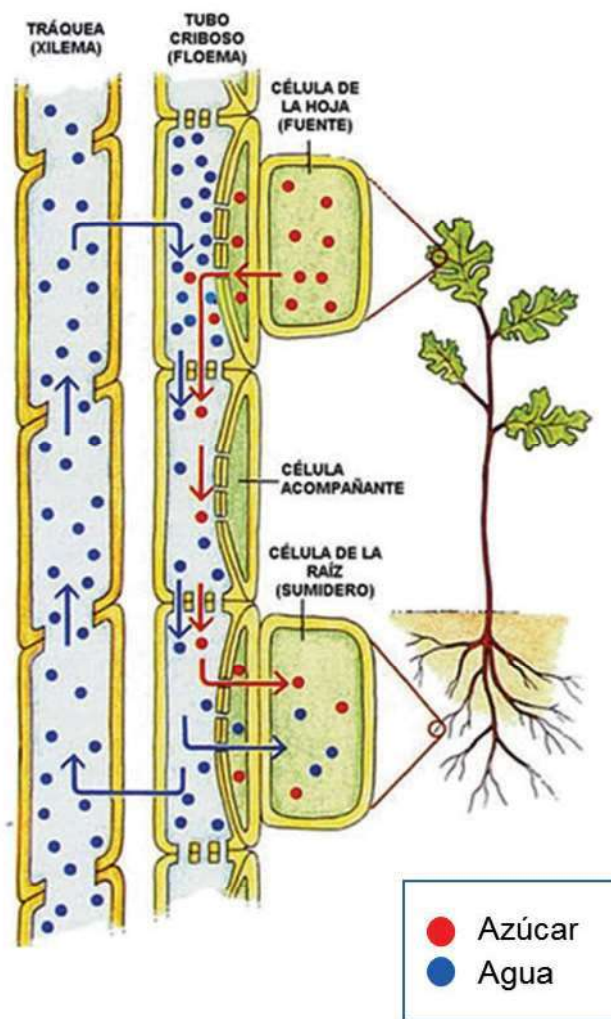
Es esta parte del metabolismo de los azúcares en plantas, que lo hace único en la naturaleza, ya que solo estos organismos son capaces de sintetizar la sacarosa por la acción de enzimas (importantes proteínas cuya función es acelerar la velocidad de las reacciones químicas que se producen en los organismos) como la Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS), la Fosfatasa Sacarosa

Fosfato (SPP) y la Sacarosa Sintetasa (SSS), dependiendo de las moléculas sustrato, que generalmente son glucosa y fructosa fosforiladas (Fructosa-6-Fosfato, UDP-Glucosa y Sacarosa-Fosfato).

Transporte y almacén de sacarosa

Una vez formada la sacarosa, esta es transportada de los tejidos fotosintéticos por el tejido conductor de las plantas (el floema) hacia las diferentes partes de la planta, ya sea moviéndose entre las paredes celulares (transporte apoplástico) o alrededor del citoplasma de las células (transporte simplástico). El floema se compone de células vivas que transportan una solución acuosa de azúcares, que comúnmente llamamos savia. Este movimiento está modelado por la teoría de presión-flujo, una parte de la cual dice que el fluido que contiene el azúcar, se mueve a través de tubos cribosos por la presión de fluido. Por este





Transporte de azúcar de las células fuente a las células sumidero (Modificado de Curtis y Barnes, 1997).

medio, los nutrientes se pueden mover desde el lugar de la fotosíntesis (la fuente), al lugar donde se utiliza el azúcar (el sumidero), ya sea hacia arriba o hacia abajo del tallo de la planta.

Los órganos o tejidos no fotosintéticos de las plantas como algunas partes de los tallos o ramas, las raíces y las flores, necesitan a la sacarosa como fuente de energía, ya que no pueden fabricarla. Además, los azúcares se pueden almacenar en las raíces o en los tallos, tal es el caso de la remolacha y la caña de azúcar, respectivamente.

La sacarosa y demás azúcares producidos en el Ciclo de Calvin por los organismos fotosintéticos, también llamados autótrofos, son los bloques moleculares que representan la energía total en nuestro planeta, se produce a partir de la fijación del carbono del CO₂ debido a la ener-

gía luminosa. Mediante el metabolismo celular (glucólisis y respiración celular), esta energía es empleada para su propio desarrollo, crecimiento y reproducción.

Importancia del consumo y uso de la sacarosa

Una gran cantidad de materia vegetal termina siendo consumida por los heterótrofos, los organismos como nosotros que no podemos sintetizar los bloques energéticos como la sacarosa y que dependemos de los autótrofos para obtener materias primas y fuente de energía para llevar a cabo el metabolismo primordial que nos da la vida. De ahí la importancia de consumir alimentos ricos en carbohidratos, sobre todo los "nutritivos" como la sacarosa.

Una de las propiedades específicas de la sacarosa como nutriente para el organismo humano es que presenta fácil digestibilidad y no genera productos tóxicos durante su metabolismo.

Se ha demostrado que el consumo de sacarosa, como fuente de glucosa, se ha asociado con una mejora de la agilidad mental, la memoria, el tiempo de reacción, la atención y la capacidad para resolver problemas matemáticos, así como con una reducción de la sensación de cansancio, tanto en individuos sanos como en enfermos de Alzheimer. La adecuada nutrición del cerebro mantiene la integridad estructural y funcional de las neuronas. Se ha demostrado que en las enfermedades mentales mayores, como la esquizofrenia, depresión y demencia de Alzheimer, hay deficiencias nutricionales a nivel celular. Aunque los estudios deben de profundizarse en el conocimiento de los procesos implicados en el deterioro de las funciones cognitivas y en los mecanismos, la sacarosa potencialmente puede modularlos a través de los componentes nutritivos de la dieta.

La sacarosa es el edulcorante más utilizado en el mundo industrializado, aunque ha sido en parte reemplazada en la preparación industrial

de alimentos por otros endulzantes tales como jarabes de glucosa, fructosa o por combinaciones de ingredientes funcionales y endulzantes de alta intensidad como los esteviósidos.

La extensa utilización de la sacarosa se debe a su poder endulzante y sus propiedades funcionales como consistencia. Por tal motivo es importante para la estructura de algunos alimentos incluyendo panecillos y galletas, nieve y sorbetes, además es auxiliar en la conservación de alimentos, siendo un aditivo comúnmente utilizado en la preparación de la denominada comida "chatarra".

Lo dulce de las plantas, la sacarosa, y su sabor tan agradable, raramente se da en la naturaleza. Es por eso, que tendemos a consumirla de forma exagerada y debe ser limitada en la dieta por razones de salud, ya que un consumo descontroladamente alto produce una carga glucémica elevada y está relacionado con enfermedades, como la caries dental, obesidad y puede contribuir a desarrollar el síndrome metabólico.

Sin embargo, no hay ninguna duda de que la sacarosa es una de las moléculas energéticas por excelencia en la naturaleza.



Echevarría et al. 2005. *Conceptos generales del metabolismo del carbono y del transporte de sacarosa. Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal*, pp. 11-22.
<file:///C:/Users/rsalg/Desktop/1.Conceptos%20generales%20del%20metabolismo%20del%20carbono.pdf>

Zamora-Navarro y Pérez-Llamas. 2013. *Importancia de la sacarosa en las funciones cognitivas: conocimiento y comportamiento*. *Nutr. Hosp.* [online], 28(4):106-111. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=So212-16112013001000013

Tofiño et al. 2006. *Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación*. *Acta Agronómica*, 55(1):1-13.
http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/190/453

Curtis y Barnes. 1997. *Invitación a la Biología*. Quinta edición. Ed. Panamericana.
<http://www.euita.upv.es/VARIOS/BIOLOGIA/imagenes/Libros/curtis.gif>

Expresión conferida por tres versiones de la región reguladora 5' del gen *AtSpen2* en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* (L)

Solís-Guzmán María Gloria^{1✉}, Suárez-Rodríguez Luis María², Martínez-Trujillo Miguel¹

¹ Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. CP 58000.

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. CP 58000.

Resumen

El gen At4g12640 de *Arabidopsis thaliana* codifica para una proteína de tipo Spen (Split ends), de función desconocida. Las proteínas de tipo Spen tienen al menos un dominio RRM, (RNA recognition motif) N-terminal, que permite la unión a ARN y otro dominio llamado SPOC (Spen paralog and ortholog C-terminal), que permite establecer una interacción con otras proteínas, por lo que en general, estas proteínas participan en procesos de regulación genética. El gen At4g12640 es nombrado *AtSpen2* en éste trabajo. La región reguladora 5' del gen *AtSpen2* fue analizada con herramientas bioinformáticas. Además, se generaron tres construcciones genéticas con 500, 1000 y 1500 bases de la región reguladora 5' fusionadas por separado al gen reportero *uidA::GFP*, usando la tecnología Gateway[®]. Se transformaron plantas de *A. thaliana*, obteniendo una eficiencia de entre el 1 y 1.2%. En las plantas transformadas de la generación T3, se observó una expresión similar en las tres versiones de la región promotora 5' del gen *AtSpen2* asociada al tejido vascular. Los resultados sugieren que no existen elementos *cis* a 1000 y 1500 pb río arriba del sitio de transcripción de *AtSpen2* que intervengan de manera importante en la regulación de la expresión del gen ya que la versión de 500 pb permite la regulación del gen *AtSpen2* asociada al tejido vascular y en células que dan lugar a este tejido.

Palabras Clave: gen *AtSpen2*, *Arabidopsis thaliana*, tejido vascular, elementos *cis*.

Expression conferred by three versions of the 5' regulatory region of the *AtSpen2* gene in transformed plants of *Arabidopsis thaliana* (L)

Abstract

The At4g12640 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes for a Spen-like protein (Split ends), of unknown function. Spen-type proteins have at least one N-terminal RRM domain (RNA recognition motif), which allows binding to RNA and another domain called SPOC (Spen paralog and C-terminal ortholog), which allows an interaction with other proteins, so that in general, these proteins participate in different genetic regulation processes. The At4g12640 gene, herein is named *AtSpen2*. The 5' region of the *AtSpen2* gene was analyzed using bioinformatic tools. In addition, three genetic constructs were generated with 1500, 1000 and 500 bases of *AtSpen2* regulatory region, fused separately into the *uidA::GFP* reporter, using Gateway[®] technology. *A. thaliana* plants were transformed, obtaining a transformation efficiency between 1 and 1.2%. In the T3 generation transformed plants, a similar expression associated with vascular tissue was observed in all three versions of the 5' promoter region. The results suggest that there are no *cis* elements at 1000 and 1500 bp upstream of the transcription site of *AtSpen2* that could play an important role in the regulation of the expression gene, since the 500 bp version allows the regulation of *AtSpen2* gene associated with vascular tissue and cells that shape this tissue.

Key words: *AtSpen2* gene, *Arabidopsis thaliana*, vascular tissue, *cis* elements.

Introducción

Las regiones reguladoras o promotoras de los genes que codifican proteínas se encuentran corriente arriba de la región codificante, y contienen múltiples secuencias conservadas, conocidas como elementos reguladores en *cis*, que pueden ser generales y compartidos por numerosos promotores o bien ser específicos de unos pocos genes; estos elementos permiten la unión de factores de transcripción y finalmente el ensamblaje de la ARN polimerasa II y el inicio de la transcripción (Kumari y Ware 2013). Utilizando diferentes bases de datos, es posible determinar la presencia de elementos *cis* potenciales en los promotores de los genes en estudio y predecir de manera general si la transcripción es regulada por factores internos o externos específicos (Hernández-García y Finer 2014). Los promotores se definen de manera general como secuencias en el ADN que tienen la capacidad de conferir la transcripción en un sistema *in vivo* o *in vitro*. La organización de los promotores reconocidos por la ARN polimerasa II consisten de un promotor núcleo.

Antes del promotor núcleo, a pocas decenas de bases, se encuentran secuencias que varían de acuerdo al promotor, y a las cuales se unen proteínas activadoras para incrementar la eficiencia de transcripción (White 2001). Además de los factores generales de transcripción, la eficiencia de iniciación de transcripción es grandemente influenciada por factores de transcripción específicos para ciertos promotores, los cuales se unen a elementos de secuencia cortos o elementos en *cis*, que activan o reprimen los genes en una manera que es específica del tejido, del estadio de desarrollo o las condiciones ambientales (Mitsuda y Takagi 2009).

En *Arabidopsis thaliana* se ha caracterizado la función de una proteína de tipo Spen, FPA, la cual participa en la regulación de la vía autónoma de floración (Schomburg *et al.* 2001). FPA junto con otra proteína, FCA, actúan de manera complementaria en la regulación del gen represor de la floración, FLC, mediante la formación de un RNA antisentido del locus *FLC*, induciendo de esta manera el silenciamiento de este gen (Hornyik *et al.* 2010).

Con la secuenciación del genoma de *A. thaliana* (The Arabidopsis Initiative 2000) ha sido posible identificar numerosos genes putativos cuya función sigue siendo un enigma en ausencia de datos experimentales y análisis

✉ Gloria Solís Guzmán, gloriasolisg@gmail.com

Facultad de Biología, Edificio "R", Ciudad Universitaria, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Múgica S/N, Colonia Felicitas del Río, C.P. 58030, Morelia, Michoacán. Tel. 443 199 4363.

bioinformáticos sistemáticos. En el presente trabajo se aporta información para conocer la función del gen At4g12640, denominado *AtSpen2* que codifica una proteína putativa de tipo Spen en *A. thaliana*.

El gen At4g12640 (*AtSpen2*) de *Arabidopsis thaliana* de función desconocida codifica para la proteína NP193001.2 perteneciente a la familia Spen (Split ends) caracterizada por un dominio RRM (RNA recognition motif) N-terminal, éste dominio RRM es conocido como RBD (ARN binding domain) o RNP (Ribonucleoprotein domain), y un dominio conservado C-terminal llamado SPOC (Spen paralog and ortholog C-terminal) que permite establecer una interacción con otras proteínas, por lo que en general, estas proteínas participan en procesos de regulación genética. Para entender la función de un gen es necesario conocer primeramente los órganos y tejidos de expresión, por lo que en este trabajo se realizó la caracterización de la expresión conferida por tres versiones de la región promotor 5' del gen *AtSpen2* en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* (L).

Materiales y métodos

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron en la página de IDT (Integrated DNA Technologies) <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>, además se agregó en el extremo 5' la secuencia para corte con la enzima *HindIII* (Invitrogen).

Extracción de ADN de *A. thaliana* y amplificación de las tres versiones del promotor del gen *AtSpen2*

El ADN de planta se aisló usando el kit DNeasy Plant Mini (cat. 69104) siguiendo el protocolo del fabricante. Este ADN se utilizó como templado para realizar PCRs con los oligonucleótidos diseñados empleando el kit para PCR de la empresa Fermentas, utilizando la fórmula de reacción del fabricante. Los oligos diseñados son: SpocF1500: 5'-AAGCTTCAAACCTCCTCGCTTACTCTTCA-3', SpocF1000: 5'-AAGCTTACCTCACAGAATTGACAGATCCA-3', SpocF500 5'-AAGCTTACATGACGAGCAGATCTACGGAGA-3', y SpocR: 5'-AAGCTTTCTGCATTCTGTCAGATCTATCGCA-3'. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de 95 °C por 5 min, 30 ciclos con 95 °C un min, 55 °C un min, 68 °C dos min, un ciclo de 68 °C por 10 min, finalización a 4 °C.

Clonación de las diferentes versiones del promotor del gen *AtSpen2* en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO

Los fragmentos de ADN del promotor del gen *AtSpen2* amplificados por PCR se clonaron en el vector de entrada Gateway pCR8®/GW/TOPO®, usando la mezcla de reacción sugerida por el fabricante (Invitrogen).

Recombinación dirigida en el vector destino pKGWFS7

Los fragmentos de ADN con los tres tamaños del promotor de *AtSpen2* clonados en el vector de entrada PCR8®/GW/TOPO®, se amplificaron por PCR con los oligos M13, llevando dentro de los ADN amplificados los sitios de attL1 y attL2,

que se recombinan con los sitios attR1 y attR2 del vector destino binario pKGWFS7. La recombinación se hizo con el Kit de Invitrogen LR clonase II enzyme Mix del sistema Gateway.

Método de transformación de *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 y *Arabidopsis thaliana*

La cepa de *A. tumefaciens* pGV2260 (McBride y Summerfelt 1990) fue transformada de acuerdo a Sambrook y Russel (2001) con el vector binario con las regiones de 500, 1000 y 1500 pb de la región reguladora 5' del gen *AtSpen2*. La selección de colonias transformadas se hizo en medio LB con carbenicilina (100 µl/ml), rifampicina (50 µl/ml), espectinomicina (100 µl/ml) y estreptomycin (300 µl/ml). La transformación de *A. thaliana* Col-0 se realizó por el método de floral dip modificado (Martínez-Trujillo *et al.* 2004).

Análisis histoquímico de la actividad de GUS

Las plantas transgénicas con el gen reportero *uidA* (Jefferson *et al.* 1987) se tiñeron con 0.1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil D-glucurónido en buffer de fosfatos (NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄, 0.1M, pH 7), con 2 mM de ferrocianuro de potasio y ferricianuro de potasio, por 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y fijaron de acuerdo a Malamy y Benfey (1997).

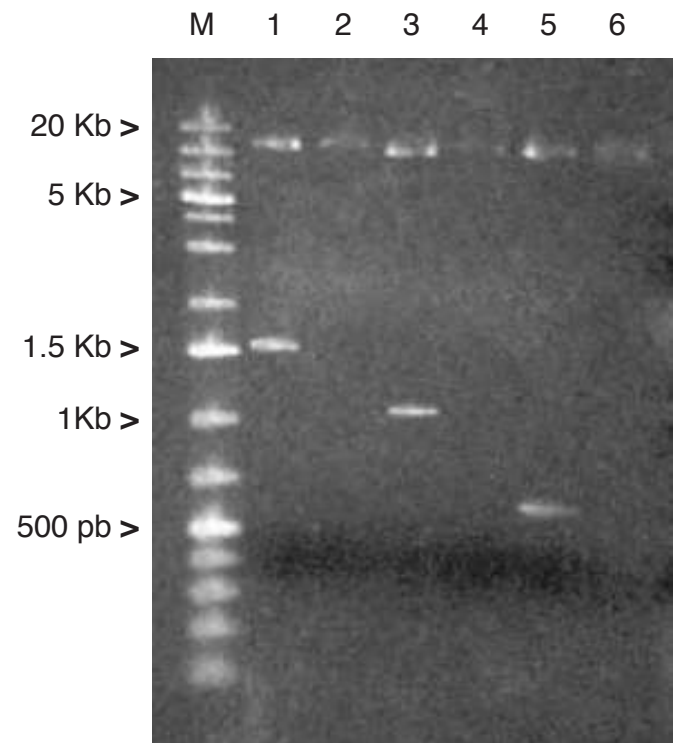


Figura 1. Versiones del promotor de *AtSpen2* de 500, 1000 y 1500 pb clonadas en el vector de expresión pKGWFS7. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a los plásmidos sin digerir y los carriles 1, 3 y 5 presentan la digestión de los vectores con *HindIII*, que liberan fragmentos de ADN con las diferentes versiones del promotor.

Análisis de elementos *cis* a 500, 1000 y 1500 pb de la región 5' de la región promotora del gen *AtSpn2*

Los elementos *cis* en el ADN de los promotores se analizaron utilizando la base de datos Plant Care, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html> y AGRIS <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu>

Resultados y discusión

En este trabajo se generaron construcciones genéticas de 500, 1000 y 1500 pb de la región reguladora 5' del gen *AtSpn2* fusionadas al gen reportero *uidA::GFP* y se transformaron plantas de *A. thaliana* para analizar la expresión conferida por estas regiones. Se analizaron los elementos *cis* de las tres versiones de la región promotora del gen *AtSpn2*.

Amplificación de la región reguladora 5' del gen *AtSpn2*

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar las regiones de 500, 1000 y 1500 pb de la región reguladora 5' del gen *AtSpn2* fueron diseñados adicionando un sitio de reconocimiento para la enzima *HindIII* (AAGCTT), lo cual permitió seleccionar los candidatos positivos. Las amplificaciones obtenidas se presentan en la **Figura 1**.

Transformación genética de *A. thaliana*

Los plásmidos recombinados conteniendo las regiones reguladoras 5' del gen *AtSpn2*, se utilizaron para transformar *A. tumefaciens*. Posteriormente, se realizó la inoculación de plantas de *A. thaliana* Col-0 con la suspensión

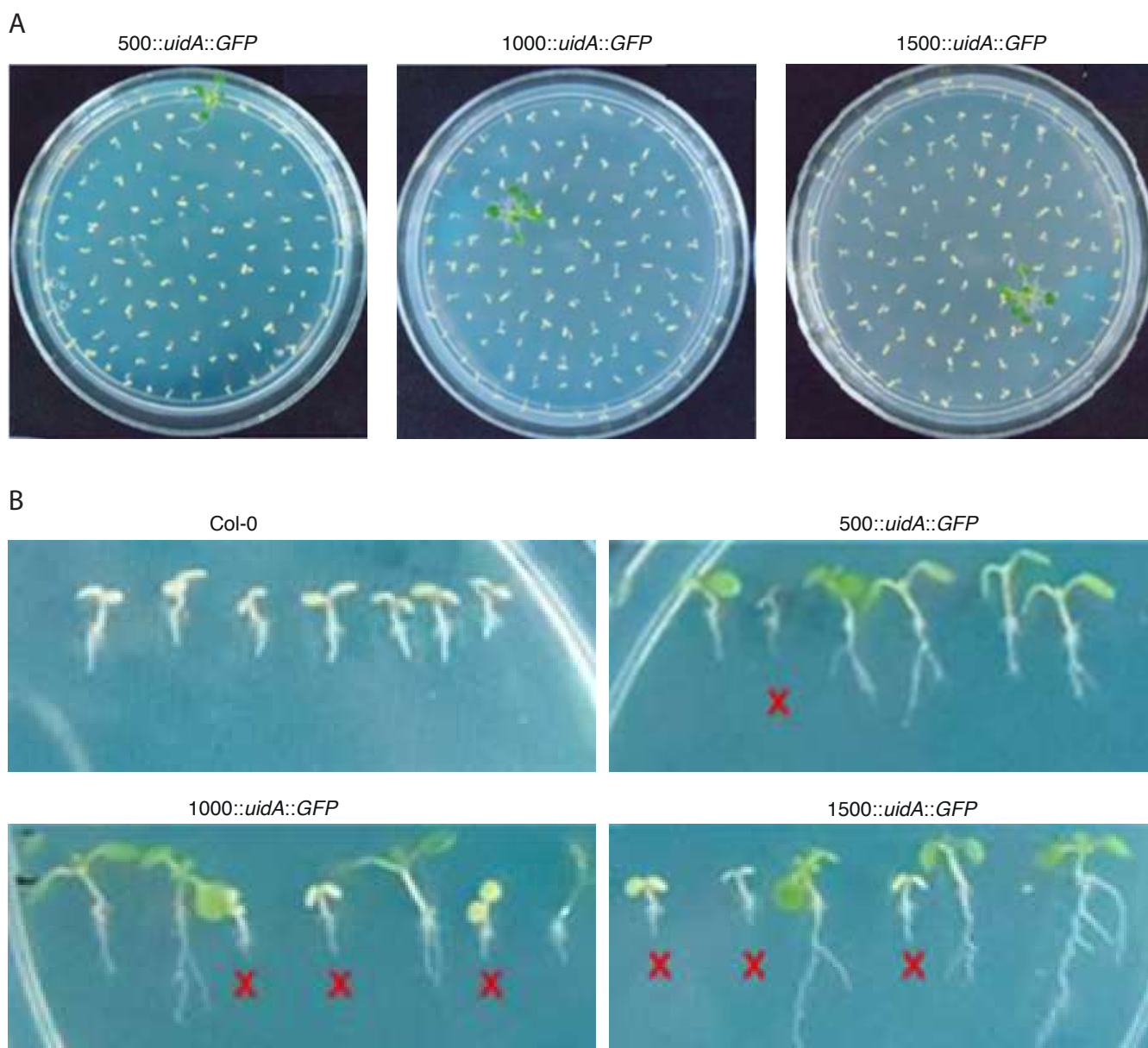


Figura 2. Plantas de *A. thaliana* transformadas. A) Las semillas generadas por plantas de la generación To de la línea 500::uidA::GFP, 10000::uidA::GFP y 1500::uidA::GFP fueron sembradas en medios MS con kanamicina 65 µg/ml. B) Selección de las plantas transformadas de la generación T1, por resistencia a la kanamicina 65 µg/ml, Col-0 (no transformada), 500::uidA::GFP, 10000::uidA::GFP y 1500::uidA::GFP.

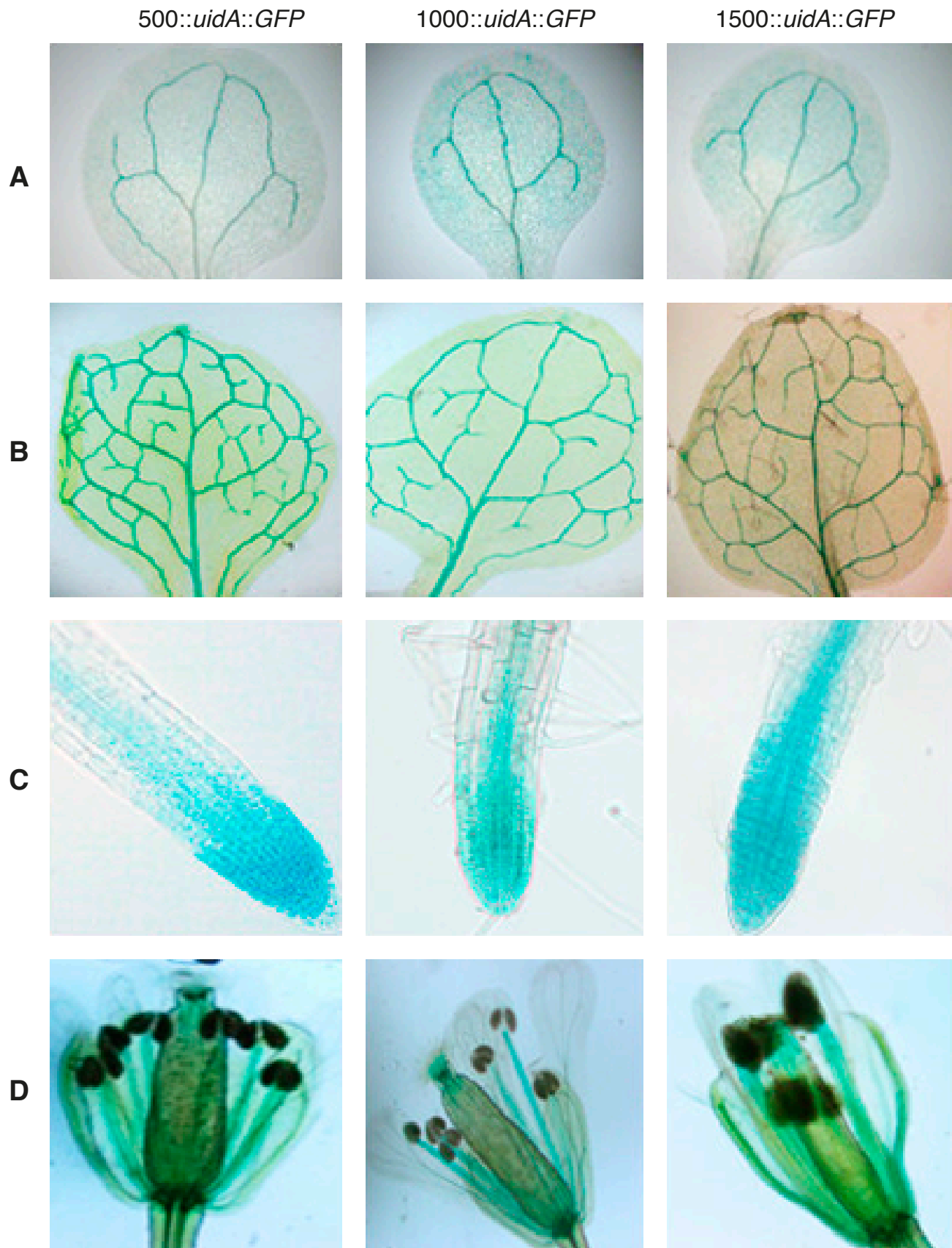


Figura 3. Expresión en hojas, raíz y flor de la versión 500 pb, 1000 pb y 1500 pb de la región promotora del gen *AtSpen2* fusionada al gen reportero *uidA* en plantas transformadas. A) Expresión en hoja cotiledonar, B) Expresión en hoja verdadera, C) Expresión en raíz, D) Expresión en flor.

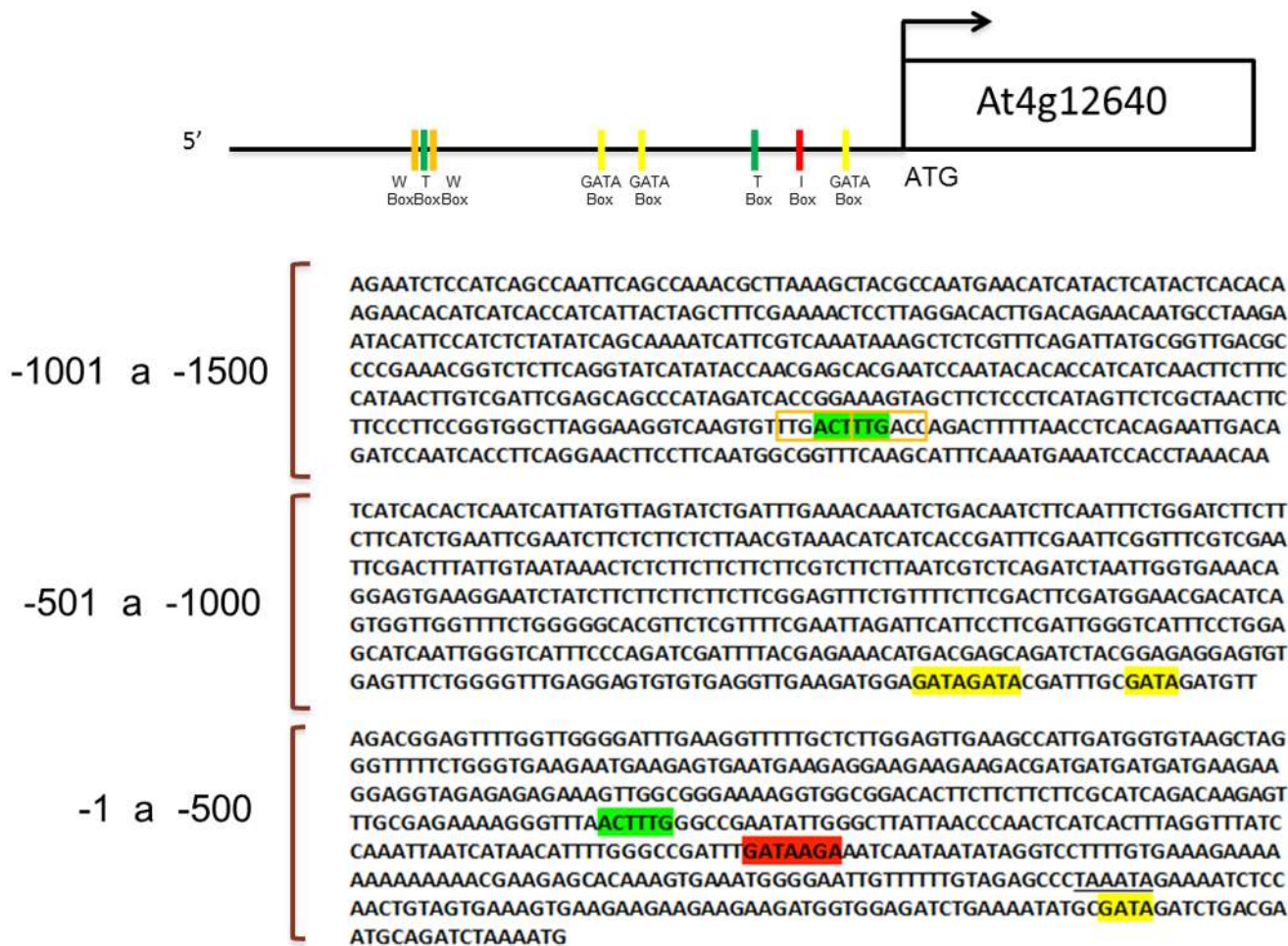


Figura 4. Los elementos cis-reguladores potenciales identificados. En la región -500 son: T-Box, GATA-Box y I-Box, en la región -1000 se encuentran repetidos de la GATA-Box, en la región -1500 se encuentra repetido de T-Box y dos secuencias de W-Box.

de *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones genéticas. Las semillas obtenidas se germinaron en medios MS con kanamicina 65 µg/ml, obteniéndose en todos los casos plantas potencialmente transformadas, con coloración verdosa y mayor crecimiento. La frecuencia de transformación obtenida fue entre 1 y 1.2% (**Figura 2A**). Las plantas seleccionadas a 65 µg/ml, fueron transferidas a un sustrato preparado con tierra y agrolita crecidas hasta la producción de semilla. La semilla recuperada fue utilizada para ser germinada y crecida nuevamente en medio MS con kanamicina a 65 µg/ml, para obtener la generación T1. Los resultados obtenidos demuestran que en las semillas producidas ocurrió una segregación del transgén de kanamicina en una relación de 3:1 (**Figura 2B**).

Expresión conferida por las regiones reguladoras 5' del gen *AtSpn2*

Para detectar la expresión conferida por las regiones reguladoras 5' del gen *AtSpn2*, se realizaron tinciones con x-gluc de plantas de la generación T1. En todas las líneas T1 resistentes a kanamicina 65 µg/ml, se encontró expresión del gen reportero *uidA*. En las líneas 500, 1000 y

1500, se encontró expresión en plantas de 10 días después de la germinación, en el tejido vascular en las siguientes estructuras: hoja cotiledonar, hoja verdadera y raíz. No se apreciaron diferencias en la intensidad de la coloración entre las diferentes líneas transgénicas conteniendo los diferentes tamaños de las regiones reguladoras 5'. En la **Figura 3** se presentan imágenes representativas de las tres líneas transgénica con la región reguladora 5'. La expresión en la flor se presentó en los filamentos de los estambres, en las diferentes líneas transformadas, pero no se encontró expresión en las anteras. En el gineceo sólo se encontró expresión en etapas del desarrollo de los estadios 12 y 13, sin embargo, ésta fue muy variable en intensidad, incluso en diferentes flores del mismo individuo. No obstante que la expresión de *AtSpn2* se observó en el tejido vascular, la función que podría tener en este tejido no es muy clara, a diferencia de otros genes como *AHA3* de *A. thaliana* que se expresa en el floema, y codifica una H⁺-ATPase que proporciona energía para SUC2, un simporter Sucrese-H⁺, contribuyendo en el transporte de sacarosa en este tejido (Truernit y Sauer 1995).

Elementos *cis* presentes en las tres versiones de la región promotora

La región promotora del gen *AtSpen2* carece de una caja TATA canónica, que está presente en una tercera parte de los genes de *A. thaliana*, y que tiene la secuencia consenso TATAa/tAa/t, localizada ~30 bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción; también carece del elemento iniciador (Inr), YYANa/tYY. Los elementos *cis*-reguladores potenciales identificados son: T-Box, GATA-Box y I-Box, relacionados con respuesta a luz y W-Box en respuesta a azúcar, (**Figura 4**). Se ha reportado que las regiones reguladoras de los genes tienen una función importante al determinar el lugar (tejido u órgano), tiempo e intensidad de la transcripción, lo que aunado a las características de la proteínas para las cuales codifican los genes, definen en gran parte la función molecular, celular y fisiológica de éstas (Hernández-García y Finer 2014). La ausencia de una caja TATA y de un elemento iniciador en *AtSpen2*, confirma que estos elementos no son los únicos que determinan la iniciación de transcripción, sino que hay otros elementos *cis* que no están sobre-representados en los promotores de todos los genes, o que no se detectan con los métodos tradicionales, que generalmente buscan secuencias consenso (Narlikar 2014).

De manera global, los resultados obtenidos permitieron demostrar una transformación eficiente de *A. thaliana* de las regiones reguladoras 5' de 500, 1000 y 1500 pb del gen *AtSpen2*. Las tres construcciones genéticas, permitieron establecer que la expresión conferida por el promotor del gen *AtSpen2* está ubicada en el tejido vascular y en zonas donde se forman células que posteriormente darán origen a este tejido. Los elementos *cis* ubicados en los primeros 500 pb son suficientes para proporcionar expresión al gen.

Referencias

- Hernández-García CM, Finer JJ** (2014) Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217: 109–119.
- Horniyk C, Terzi LI, Simpson GG** (2010) The Spen Family Protein FPA Controls Alternative Cleavage and Polyadenylation of RNA. *Developmental Cell* 18:203–213
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907
- Kumari S, Ware D** (2013) Genome-wide computational prediction and analysis of core promoter elements across plant monocots and dicots. *PLoS One* 8:e79011. doi: [10.1371/journal.pone.0079011](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079011)
- Malamy JE, Benfey, PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33–44.
- Martínez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L** (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant. Molecular Biology Reporter* 22: 63–70.
- McBride KE, Summerfelt KR** (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* 14: 269–276.
- Mitsuda N, Ohme-Takagi M** (2009) Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 50: 1232–1241.
- Narlikar L** (2014) Multiple novel promoter-architectures revealed by decoding the hidden heterogeneity within the genome. *Nucleic Acids Research* 42: 12388–12403.
- Sambrook J, Russell D** (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York*.
- Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW, Amasino RM** (2001) FPA, a Gene Involved in Floral Induction in *Arabidopsis*, Encodes a Protein Containing RNA-Recognition Motifs. *The Plant Cell* 13: 1427–1436.
- Truernit E, Sauer N** (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: 564–570.
- White RJ** (2001) Gene transcription. *Blackwell Science, Glasgow UK*. 273 pp.



¿El gen de la infidelidad?

María Gloria Solís
Guzmán



ESPECIAL

De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (Inegi), durante el 2011 se efectuaron, en el estado de Michoacán 26 mil 858 matrimonios y en el mismo año se presentaron tres mil 343 divorcios, es decir se registraron 12.4 divorcios por cada 100 matrimonios.

La infidelidad, según los datos de Inegi, es una de las razones principales por las que una pareja rompe su relación, pero ¿por qué la infidelidad?, quizá el culpable sea el gen RS334 llamado también, el *gen de la infidelidad*. El gen RS334 contiene la información para la producción de vasopresina, una hormona básica que está presente en el cerebro de la mayoría de los mamíferos. Se sabe que esta hormona participa en la función renal y la retención de líquidos, además interviene en las relaciones sociales, algo que puede resultar muy difícil de comprender.

Hasse Walum y colaboradores del Departamento de Epidemiología Médica y Bioestadística del Instituto Karolinska en Estocolmo, Suecia, descubrieron

que el gen RS334 tiene una influencia en el comportamiento social de los hombres dependiendo de la variación del mismo. Walum trabajó con 552 pares de gemelos (por ser quienes presentan mayor similitud genética), y sus esposas o parejas y con adolescentes, la mayoría de ellos de clase media y con al menos cinco años de relación en pareja. En total fueron dos mil 186 individuos adultos heterosexuales de los cuales mil 899 proporcionaron muestras de la boca para el análisis de ADN, con la finalidad de buscar las variantes de determinados segmentos del genoma relacionados con los receptores del gen que regula la vasopresina.

Los estudios genéticos demostraron que los hombres podían tener una, dos o ninguna copia del gen RS334. Los hombres que no presentaban esta variación genética eran los más monógamos, información que fue corroborada al entrevistar a sus parejas, quienes mencionaban una relación estable. Por el contrario, los hombres con una o dos copias del gen, no estaban casados y si lo estaban,

tenían un número más alto de crisis maritales y amenazas de divorcio, datos corroborados al entrevistar a sus parejas que mencionaban una relación insatisfecha. A estos hombres, sugiere el estudio, les resulta más difícil mantenerse monógamos. Estos estudios con el gen RS334 pretenden entender la parte del cerebro que controla las relaciones sociales en personas con enfermedades como el autismo, ya que quienes sufren de este malles es muy difícil interactuar con otros. Lo que ahora se sabe es que los individuos autistas presentan múltiples copias del gen RS334, por lo que se puede concluir que los receptores de la vasopresina juegan un papel importante en las relaciones sociales.

Por otro lado, un estudio previo con ratones demostró que el 90 por ciento de los ratones de pradera (*Microtus ochrogaster*) son habitualmente monógamos a diferencia de los ratones de pantano (*Microtus pennsylvanicus*) que se relacionan con varias hembras y prestan poco cuidado a sus des-

PÁGINA 2



NUESTROS
ÁRBOLES
PELIGRAN

PÁGINA 2



SÍ, EL RUIDO
DAÑA LA SALUD

PÁGINA 3



TESTIGOS
INSOBORNABLES

PÁGINA 4

¿El gen de la infidelidad?

PÁGINA 1

cendientes, la explicación a este comportamiento se encuentra en las cantidades de vasopresina en el cerebro de los ratones, aquellos de comportamiento monógamo la vasopresina se encuentra en concentraciones elevadas.

La genética nos podría ayudar a entender por qué menos del cinco por ciento de los mamíferos son habitualmente monógamos. Se sabe que la variante «silvestre» de los receptores de la vasopresina en humanos conduce a una condición polígama, mientras que la variante monógama o «estable» es mutante, es decir, la naturaleza es polígama.

El gen predispone, sí, pero no condena a la infidelidad. La biología no lo es todo. También cuentan los valores morales, las influencias culturales y las creencias religiosas.

O bien, existen alternativas como aquella propuesta por el cantautor Luis Eduardo Aute con la melodía que dice: *una de dos, o me llevo a esa mujer o entre los tres nos organizamos, sí puede ser...*

Usted, ¿qué prefiere?

Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

«El gen predispone, sí, pero no condena a la infidelidad. La biología no lo es todo. También cuentan los valores morales, las influencias culturales y las creencias religiosas».



«...Si ustedes son observadores habrán notado que muchos ejemplares lucen como «adornados» con algo que parecen cabellos.... Cabellos gruesos, amarillos tirándole a anaranjado o a veces hasta rojo. Algunos habrán dicho que esa coloración luce bien sobre el verde de sus hojas... pero...»

La ciudad de Morelia, y los cientos de colonias que están en la periferia, no es realmente rica en áreas verdes. No conocemos la densidad de población actualizada pero si observamos las calles cuando manejamos, sólo son algunas avenidas con árboles, algunos jardines públicos y ocasionalmente en algunas casas vemos sobresalir árboles.

En el peor de los casos en una casa (o en su entrada) podía haber habido un árbol que fue derrumbado para construir una entrada, o un estacionamiento o una nueva habitación; en otros casos, algún nefasto vecino pudo haber dañado los árboles o las plantas de ornato sólo por el gusto de demostrar poder. Así que los árboles que no gritan y no se quejan parece que no les duela y están a la buena de «bios».

Pero ahora una nueva amenaza se cierne sobre muchas de las plantas que quedan.

Si ustedes son observadores habrán notado que muchos ejemplares lucen como «adornados» con algo que parecen cabellos.... Cabellos gruesos, amarillos tirándole a anaranjado o a veces hasta rojo. Algunos habrán dicho que esa coloración luce bien sobre el verde de sus hojas... pero ojo: Esos «como cabellos güeros» realmente es una planta parásita que vive sobre estas plantas y les está chupando todos sus nutrientes.

Se le conoce con el nombre de cúscuta, debido a que los biólogos reconocen a su grupo (género) con ese nombre. Pertenece a la familia de las convolvuláceas y en Internet encontramos que hay 170 especies parásitas. Desgraciadamente se distribuye en todo el mundo y no tiene preferencia por hospederos, o sea, que puede parasitar a cualquiera.

Nos sorprendió verla en la ciudad porque nunca había sido tan evidente, de modo que si estaba, debió haber sido poca su presencia. En el campo es más común y los campesinos seguramente saben controlarla en sus campos, pero en la ciudad no sólo ha seguido apareciendo en diferentes puntos y pareciera que a nadie le importan y eso pue-

Nuestros árboles peligran

María C. González | Cuauhtémoc Sarabia



ESPECIAL

de deberse a que pocos la conocen.

Es muy característico su crecimiento, pues tiene tallos delgaditos prácticamente sin hojas (si las tiene, pueden ser de un milímetro de tamaño o ya estar sólo modificada a escamas) lo que hace que no sean capaces de fotosintetizar su propio alimento a partir de los rayos solares y se vuelven completamente dependientes de las plantas que parasitan, de donde toman sus nutrientes.

Son plantas con flor y en serio que sus flores son bonitas. Esta es la época del año en que empiezan a hacerlo, y parte de su éxito se debe a que da numerosas semillas y muy chiquitas, por lo que se pueden dispersar fácilmente, además que éstas pueden estar sin germinar hasta diez años antes de encontrar las condiciones correctas. Si logran germinar, y no hay un huésped a parasitar cerca, permanecen

como plantita verde unos cuantos días y después de ello muere... pero si encuentra huésped...

Se enrosca sobre el tallo de su hospedero como lo hacen las enredaderas; en cuanto encuentra huésped desarrolla unas estructuras llamadas haustorios (que es un tipo de raíz modificada) que penetran a la indefensa planta hasta que llegan al sistema vascular (donde circulan sus nutrientes) y comienzan a vivir de él. Su velocidad de crecimiento es realmente alta pues se registran hasta siete centímetros por día.

Es muy importante para su control que se elimine esta parásita antes de que florezca y un primer paso es una poda estricta del ejemplar parasitado, removiendo hasta unos cinco centímetros por debajo de donde se ha insertado la rubia parásita. Después de ello tendrá que verificar que en el suelo no haya semillas ni plántulas recién germinadas.

Hay que hacer notar que la propagación puede hacerse de varias maneras: De árbol a árbol, ya que al llegar la parásita por vía aérea a otro árbol, ahí se comienzan a desarrollar sus haustorios.

También puede propagarse si los instrumentos usados para la poda no se limpian a fondo para evitar la presencia de cualquier semilla y por último, si no se quemar las ramas podadas.

Sería conveniente que hablemos a la oficina de Parques y Jardines de nuestra ciudad para que nos apoyen en la remoción de ejemplares que ya estén parasitados y si aún no se dan cuenta del problema, debemos insistirles que nos permitan hablar con los biólogos o los encargados de las oficinas. Toda la información que circula en Internet sobre esta planta nos alerta de lo difícil que es exterminar, así que deberemos hacer un frente común contra ella y acabarla. Nuestros árboles merecen vivir sanos y fuertes.