



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Firmas moleculares asociadas al transporte de
mRNAs a larga distancia en plantas**

Tesis que presenta

Héctor Baroni Cantaro Segura

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Héctor Baroni Cantaro Segura, titulado “Firmas moleculares asociadas al transporte de mRNAs a larga distancia en plantas” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dra. Clelia de la Peña Seaman

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 24 de Mayo de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Héctor Baroni Cantaro Segura

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Firmas moleculares asociadas al transporte de mRNAs a larga distancia en plantas” bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres porque desde pequeño me inculcaron el deseo de superación y las ganas de alcanzar las metas a base de esfuerzo; y por siempre darme buenos consejos que me permiten recorrer el camino más corto hacia el éxito. Son mis principales ejemplos de fuerza y orgullo para enfrentarme a la vida, seguir adelante, luchar y nunca rendirme hasta el final.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me dio la capacidad, la sabiduría y la fortaleza de culminar esta etapa de mi vida.

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar el posgrado con número 831161.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por prestarme las instalaciones y los equipos para realizar esta tesis.

A mi asesor de tesis, el Dr. Enrique Castaño de la Serna, por el apoyo brindado a mis iniciativas durante la maestría y el acceso a equipos y materiales necesarios para el trabajo.

Al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata por su asesoría y consejos durante la maestría.

A mi comité tutorial, Dr. Luis Figueroa Yáñez por darse la tarea de revisar mi trabajo y ayudarme a mejorarlo.

A la Dra. Luisa López Ochoa y a la Dra. Ana Ly Arroyo por sus valiosos comentarios.

A la Ing. Wilma González Kantún por su apoyo técnico y logístico en los experimentos.

A mis compañeros del laboratorio 23: Angélica, Andrea, Stefano, Francisco, Jeanin, Ulises, Javier, gracias por su apoyo, consejos y ayuda.

A mis compañeros y maestros del CICY por todo el apoyo brindado.

A todas las maravillosas personas que conocí estos dos años. Gracias totales.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
CAPITULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes.....	2
1.2.1. Estrés abiótico.....	2
1.2.2. El floema.....	6
1.3. Justificación.....	11
1.4. Hipótesis.....	12
1.5. Objetivos.....	13
1.5.1. Objetivo General	13
1.5.2. Objetivos Específicos	13
1.6. Estrategia Experimental.....	14
1.7. Referencias.....	15
CAPITULO II. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE mRNA TRANSLOCABLES EN EL FLOEMA	24
2.1. Introducción.....	24
2.2. Materiales y Métodos	25
2.2.1. Análisis de las regiones no traducidas de mRNAs del factor de transcripción BEL en papa.....	25
2.2.2. Caracterización de mRNAs translocables a larga distancia.....	25
2.2.3. Búsqueda de firmas y RBPs en la base de datos PLaMoM.....	26
2.3. Resultados	26
2.3.1. Análisis de las regiones no traducidas de mRNAs del factor de transcripción BEL en papa.....	26
2.3.2. Caracterización de mRNAs translocables a larga distancia.....	28
2.3.3. Búsqueda de firmas y RBPs en la base de datos PLaMoM.....	31
2.4. Discusión.....	35
2.5. Referencias	37
CAPÍTULO III. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL mRNA Y DE LA PROTEÍNA CpRAP2.4a.....	43
3.1. Introducción.....	43
3.2. Materiales y Métodos.....	43
3.3. Resultados	44
3.4. Discusiones	47

3.5. Conclusiones	47
3.6. Referencias	48
CAPITULO IV. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES	50
4.1. Discusión general	50
4.2. Conclusiones generales.....	52
4.3. Perspectivas	52
4.4. Referencias	53
ANEXOS.....	54
Anexo 1. Firmas de RNA encontradas en siete especies vegetales.....	54
Anexo 2. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de <i>Apium graveolens</i>	59
Anexo 3. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
Anexo 4. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de <i>Citrullus lanatus</i>	61
Anexo 5. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de <i>Cucumis melo</i>	62
Anexo 6. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de <i>Cucumis sativus</i>	63
Anexo 7. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de <i>Ricinus communis</i>	64

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1. Análisis de los UTRs de los mRNAs: StBEL5, StBEL30, StBEL13 y StBEL14.....	27
Figura 2.2. Sitios de unión a RNA en mRNAs translocables.....	29
Figura 2.3. Firmas de RNAs encontradas en siete especies vegetales con MEME.....	32
Figura 3.1. Estructura secundaria MFE del mRNA de CpRAP2.4a.....	44
Figura 3.2. Predicción de la estructura secundaria de la proteína CpRAP2.4a.....	45
Figura 3.3. Caracterización funcional de mRNA y de la proteína CpRAP2.4a.	46
Figura 3.4. Dominios CU y UGUA presentes en los UTRs del mRNA de CpRAP2.4a.....	46

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1. Selección de mRNAs que se transportan en el floema.....29

Cuadro 2.2. Proteínas de unión a RNA (RBPs) asociados a las firmas de transporte a larga distancia en especies vegetales.....34

ABREVIATURAS

AP2/ERF: dominio Apetala2/Ethylene responsive factor

BEL: familia de factores de transcripción BEL

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CO₂: dióxido de carbono

CU: dominios ricos en citosina y uracilo

DELLA-GRAS: familia de factores de transcripción DELLA-GRAS

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

eIF4B: factor eucariótico de iniciación 4B

EST: marcadores de secuencias expresadas

FAA: formaldehído

GAI: gen insensible a ácido giberélico

GFP: proteína verde fluorescente

GR: proteínas ricas en glicina

KH: proteínas que contienen el dominio K Homology

KNOTTED 1: proteína homeobox 1

LDTM: firma de transporte a larga distancia

LEA: proteína abundante de embriogénesis tardía

LeT6: gen L knox en tomate

LMPC: microdissección láser

miRNA: microRNA

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

PAB: proteínas de unión a secuencias poli (A)

PAB: proteínas que se unen a secuencias poli (A)

PbWOXT1: gen WOX transport 1 en *Pyrus betifolia*

Pn: fotosíntesis neta

PSII: fotosistema II

PTB: proteínas que se unen a trectos de polipirimidina

PTB3 proteína 3 de unión a trectos de pirimidina

PUF: proteínas *Pumilio* y FBF

Pum: Pumilio

RAP2.4a: factor de transcripción de la familia relacionada a APETALA.

RNA: ácido ribonucleico

RNP: complejo ribonucleoproteico

SFRS: factores del splicing ricos en serina y arginina

Znf: proteínas que contienen dominios de dedos de zinc

RESUMEN

El transporte a larga distancia en las plantas es muy importante para su crecimiento, desarrollo y adaptación a diversas condiciones medioambientales. El movimiento selectivo de RNAs a través del floema es aparentemente liderado por firmas dentro de las regiones no traducidas en el RNA mensajero que se unen a diversas proteínas de unión a RNA y forman un complejo ribonucleoproteico, lo que le permite ser estable y evitar ser degradado en su transporte hacia su sitio de acción. En este estudio se identificó computacionalmente nuevas firmas moleculares de transporte de mRNAs a larga distancia (LDTMs), que son posibles sitios de unión a diversas proteínas de enlace a RNA, algunos ya ampliamente descritos por ser clave en el transporte a larga distancia como los dominios CUCU que se unen a las proteínas PTB3, y otros dominios UGUA que se unen a proteínas PUF que contienen dominios *Pum* y dominios ricos en bases GA, con un rol que se desconoce en el transporte selectivo de mRNAs a larga distancia; todos mayormente localizados en el extremo 3' de los RNA mensajeros que son regiones más largas y con mayor cantidad de sitios que se unen a proteínas de unión a RNA involucradas en la estabilidad de los mRNAs translocables y aumentando su vida media asegurando su movilidad a diferentes órganos en las plantas participando en diferentes procesos fisiológicos y de defensa en las plantas.

ABSTRACT

Long-distance transport in plants is crucial in their growth, development and its adaptation to diverse environmental conditions. The selective movement of RNAs through the phloem is apparently led by motifs within the untranslated regions in the messenger RNA that bind to various RNA binding proteins and form a ribonucleoprotein complex, which allows it to be stable and avoid being degraded in its transportation to their site of action. In this study, new plant long-distance transport motifs (LDTMs) were identified computationally, which are possible binding sites for various RNA binding proteins, some of which already widely described as being key in long-distance transport such as CUCU domains that bind to PTB3 proteins , and other UGUA domains that bind to PUF proteins that contain *Pum* domains and GA-rich domains, with an unknown role yet in the selective transport of long-distance mRNAs; all mostly located at the 3 'end of the messenger RNAs which are longer regions and with a greater number of sites that bind to RNA binding proteins involved in the mobile mRNAs stability and increasing their half-life, assuring their mobility at different organs in plants participating in different physiological and defense processes in plants.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1. Introducción

Las plantas como organismos sésiles poseen adaptaciones que les permiten sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables, a través de respuestas de aclimatación en las que ocurren cambios fisiológicos, celulares y moleculares, como la inducción de genes de respuesta a estrés. En general, los productos de los genes inducibles por estrés pueden agruparse en dos categorías: los que directamente protegen contra el estrés y los que regulan la transducción de señales o la expresión de otros genes estructurales (Hasegawa et al., 2000). En el primer grupo se incluyen genes implicados en la biosíntesis de azúcares solubles y otros solutos compatibles, así como los genes que codifican para proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (Yue et al., 2012), mientras que, en el segundo, se consideran los que codifican para proteínas de señalización como las quinasas y factores de transcripción (FT) (Yuasa et al., 2001; Xiong y Yang, 2003). Debido a la amplitud de genes que pueden regular, en la actualidad los FT se consideran blancos moleculares promisorios para mejorar la tolerancia a estrés abiótico en plantas. Este conocimiento es una herramienta poderosa para plantear y desarrollar cultivos resistentes a estrés mediante ingeniería genética (Ali et al., 2018).

Las plantas en respuesta a ciertas condiciones desfavorables a su crecimiento y desarrollo responden de diferentes maneras y envían señales a la planta entera para poder tolerar o resistir esas condiciones. Un paso clave en la señalización de los principales procesos de crecimiento y desarrollo lo determinan moléculas claves como hormonas, RNA, mRNA, miRNA, siRNAs que se transportan en el floema para movilizarse a larga distancia y cumplir su función en el proceso en los tejidos diana. Cientos de mRNAs fueron encontrados en la savia del floema (Doering-Saad et al., 2006; Omid et al., 2007); éstos incluyen mRNAs que codifican factores de transcripción que potencialmente activan procesos fisiológicos cruciales en la planta. Un rol como señales sistémicas son apoyados por varias observaciones: (1) la presencia en la savia floemática de muchos mRNAs que codifican factores de transcripción de la familia DELLA-like GRAS, KNOTTED-1-like y la familia BEL-1-like BEL5 TALE; (2) su transporte a larga distancia a través de uniones de injertos; (3) un efecto a larga distancia sobre la morfogénesis de las hojas y la formación de tubérculos

(Kim et al., 2001; Haywood et al., 2005; Banerjee et al., 2006). Las firmas de RNA requeridos para su larga distancia fueron recientemente identificados en los mRNAs de GAI (Huang y Yu, 2009), BEL5 (Banerjee et al., 2006) y PbWOXT1 (Duan et al., 2016).

1.2. Antecedentes

1.2.1. Estrés abiótico

Las plantas están constantemente expuestas a varios tipos de estreses bióticos y abióticos (Fujita et al., 2006; Suzuki et al., 2014). Los factores de estrés abiótico incluyen deficiencia de agua (sequía), temperaturas extremas (calor, frio), cambios repentinos en la temperatura, falta de oxígeno en el suelo debido al anegamiento, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), exposición a alta luminosidad, ozono y elevadas concentraciones salinas (Aysin et al., 2015; Li et al., 2011).

1.2.1.1. Sequía

La sequía representa el estrés abiótico más importante en los cultivos y una de las limitaciones más importantes para el crecimiento de las plantas y la productividad de los ecosistemas terrestres en muchas regiones de todo el mundo (Chaves et al., 2003). Los factores involucrados incluyen la falta de lluvias, niveles excesivos de sales en la solución-suelo o la incesante desviación de recursos hídricos para usos domésticos y/o industriales (Neumann, 2008).

Los modelos climáticos predicen que el calentamiento global aumentará aún más la sequía como resultado de una evapotranspiración creciente (Cook et al., 2007) aunque habrá diferencias según las regiones (Metz et al., 2007) con frecuencias e intensidades crecientes de 1 a 30% en áreas extremas de sequía en el 2100 (Fischlin et al., 2007). Estas consecuencias negativas del cambio climático en la agricultura afectarán drásticamente a los grupos pobres y marginalizados que dependen de la agricultura para sus vidas.

La sequía limita la productividad de los cultivos afectando los procesos fotosintéticos a nivel de la canopia, hojas o cloroplastos, sea directamente, o por inhibición por retroalimentación si el transporte de fotosintatos de los órganos fuente son limitados (Jones y Corlett, 1992).

El patrón de respuesta de las plantas a la sequía es regulado por la intensidad, duración y tasa de progresión de la sequía impuesta (Pinheiro y Chaves, 2011). Bajo condiciones suaves a moderadas, las características estomatales son afectadas que resultan en una pérdida de biomasa; bajo condiciones severas, los factores no estomatales se convierten en dominantes (Liu et al., 2010) limitando la eficiencia fotoquímica y la actividad de la enzima Rubisco y luego afectando el metabolismo bioquímico y fisiológico (Xu et al., 2010). Las vías metabólicas de transducción de señal lumínica de las células guarda siguen el mecanismo primario regulando la apertura estomatal (Lee, 2010), mientras que el mecanismo del comportamiento estomatal es influenciado por el ácido abscísico en la señalización raíz-tallo bajo estrés (Jia y Zhang, 2008). Las plantas que crecen bajo condiciones de sequía tienden a tener baja conductancia estomatal ayudando así a conservar agua y mantener un estatus hídrico en las hojas al mismo tiempo que se reducen las concentraciones internas de CO₂ en las hojas y la fotosíntesis (Chaves et al., 2002). Se ha mostrado también que la exposición a largo plazo de la hoja o la canopia a bajos déficits de presión de vapor generan un tipo de “memoria” en las células guardianas que resultan en una pérdida del estímulo de cierre de las respuestas estomatales (Fanourakis et al., 2011).

A nivel bioquímico y molecular, las plantas perciben y responden a la sequía cambiando dinámicamente las respuestas durante la expresión de proteínas y la transcripción, afectando entonces muchas vías bioquímicas y consecuentemente los procesos fisiológicos y de desarrollo (Mane et al., 2008). La reducción en la fotosíntesis como un resultado de la sequía es mediada a través de efectos estomatales y no estomatales, donde el último involucra un flujo de electrones decreciente como resultado de daño foto-inhibitorio y un control regulatorio de disipación de energía en los cloroplastos (Baker, 2008). El cierre estomatal disminuye la disponibilidad de CO₂ en el mesófilo y cambios en el transporte de electrones y vías bioquímicas.

Una gran cantidad de genes se inducen durante el proceso de respuesta en las plantas. Estos genes se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a su modo de funcionamiento. El primer grupo comprende genes que codifican proteínas estructurales, los cuales sirven como efectores dentro de la señalización en respuesta al estrés, como es el caso de los genes de regulación osmótica, proteínas antioxidantes, acuaporinas y proteínas LEA (Late

Embryogenesis Abundant; Wang et al., 2006). El segundo grupo consiste en genes que codifican proteínas reguladoras, activadores transcripcionales de respuesta temprana, como las proteínas de señalización y los factores de transcripción, siendo éstos últimos considerados herramientas promisorias para el mejoramiento genético debido a la amplitud de genes que pueden regular (Gonzalez, 2016).

1.2.1.2. Estrés por temperaturas

La temperatura juega un papel vital en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La exposición de las plantas a temperaturas extremas daña el tejido vivo, causando alteraciones en la estabilidad de la membrana celular, la interrupción de la división celular y el alargamiento, limitando la productividad de la planta (Howarth, 2005; Jenabiyan et al., 2014). La susceptibilidad al estrés por temperatura se determina genéticamente, pero la tolerancia al estrés de temperatura subsiguiente puede mejorarse sometiendo las plantas a un tratamiento de pre-acondicionamiento a través de su desarrollo, también conocido como cebado o aclimatación (Wang et al., 2014, Xiangnan et al., 2014). Además, la eficiencia de la fase de recuperación que sigue a un período de estrés en las plantas es un elemento crucial para determinar y caracterizar el nivel de daño causado por ese estrés.

La tasa óptima de temperaturas de crecimiento para la mayoría de los cultivos se encuentra entre 10 y 30 °C, y puede disminuir significativamente fuera de este umbral (Morales et al., 2003). El establecimiento de umbrales de temperatura superior e inferior resulta imprescindible para la producción de cultivos para evitar lesiones por frío o calor al cultivo.

a) Estrés por bajas temperaturas

El estrés por frío es una importante limitante de la diversificación agrícola, ya que puede afectar significativamente el rendimiento de los cultivos si los cultivares muestran baja resistencia al invierno. El estrés frío se puede clasificar como estrés de enfriamiento (0 a 12° C) o por estrés por congelación (por debajo de 0 °C, sin que la nieve cubra el cultivo) (Inci & Toker, 2011)

El estrés por frío puede tener efectos adversos en las plantas, causando una reducción o un deterioro del crecimiento de las plantas, la germinación y el establecimiento de los cultivos, la fotosíntesis y el rendimiento de los granos (Ercoli, et al., 2004). Por lo tanto, es

imperativo que los cultivos sembrados en otoño y principios de primavera sean capaces de soportar las impredecibles fluctuaciones de las temperaturas post-emergentes durante el invierno y principios de la primavera para minimizar el impacto del estrés frío en los rendimientos anuales (Arbaoui et al., 2008). La tolerancia al frío se ha definido como el factor principal que impulsa el desarrollo y rendimiento de los cultivos de invierno (Arbaoui et al., 2008). El aumento de la tolerancia al frío y la resistencia al enfriamiento pueden estimarse no sólo por la capacidad de la planta para mantener altas tasas de crecimiento durante el período de estrés, sino también por su capacidad para recuperarse después de la interrupción de la exposición a bajas temperaturas (Ercoli et al., 2004).

La foto-inhibición es uno de los principales problemas que las plantas pueden enfrentar durante períodos de alta tasa de luz y bajas temperaturas (Rapacz et al., 2004); Y ocurre si la tasa de recolección de luz en PSII excede la capacidad de transporte de electrones, reducida a temperaturas bajas (Rapacz et al., 2004).

b) Estrés por altas temperaturas

El estrés térmico causado por elevadas temperaturas ambientales suele estar asociado con el estrés por sequía y representa un problema sustancial en muchas áreas agrícolas de todo el mundo debido a su impacto negativo en el crecimiento de las plantas y el rendimiento económico (Branca et al., 2013; Kurukulasuriya & Rosenthal, 2013).

El estrés térmico se define a menudo como el aumento de la temperatura más allá de un nivel umbral durante un período suficiente para causar daño irreversible al crecimiento y desarrollo de las plantas (Lipiec et al., 2013). Un aumento en las temperaturas alrededor de 10-15 ° C por encima de la temperatura ambiente puede clasificarse como un choque térmico o un estrés por calor (Wahid et al., 2007).

El estrés por calor puede causar alteraciones en los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas, tales como la germinación de las semillas, la fotosíntesis, la respiración, la estabilidad de la membrana y las relaciones entre las plantas y el agua (Howarth, 2005, Siddiqui et al., 2015). Algunas de estas alteraciones fisiológicas son la abscisión y la senescencia de las hojas, la inhibición del crecimiento en brotes y raíces, la infertilidad del polen, el número reducido de flores o el aborto potencial de las flores y el daño a las frutas

o vainas (Inci & Toker, 2011; Wahid et al., 2007). Además, el estrés por calor desencadena la sobreproducción de compuestos tóxicos y especies de oxígeno reactivo (ROS), cuya acumulación provoca lesiones celulares graves e incluso muerte celular (Mittler, 2006). Por lo tanto, el estrés térmico es perjudicial para el crecimiento y desarrollo de la planta, y puede afectar sustancialmente el rendimiento económico y la producción de alimentos (Ainsworth y Ort, 2010).

La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos más sensibles al calor en las plantas, con componentes termolábiles en reacciones oscuras y dependientes de la luz (Sharma et al., 2012). Por lo tanto, las plantas bajo estrés por calor experimentan una disminución sustancial de su tasa fotosintética. Esta reducción de la fotosíntesis se puede atribuir a la inhibición del fotosistema II (PSII), identificado como el componente más termolábil de la cadena de transporte de electrones (Janka et al, 2007), y la disminución de la actividad de Rubisco bajo estrés por altas temperaturas debido a la sensibilidad térmica de Rubisco activase (Mathur et al., 2011). La inhibición de la PSII puede causar alteraciones en la fluorescencia de la clorofila, permitiendo el uso de mediciones in vivo de la fluorescencia de la clorofila como un método sensible y confiable para detectar alteraciones inducidas por la temperatura en el aparato fotosintético (Baker & Rosenqvist, 2004; Wang et al., 2011).

Por otra parte, el estrés por altas temperaturas usualmente ocurre en combinación con el déficit hídrico, y estos pueden conducir a reducciones significativas del rendimiento (Vadez et al., 2012). La resistencia a la sequía se define como la tolerancia inherente de una planta que determina su predisposición a sobrevivir a la deficiencia de agua (Lipiec et al., 2013). Por otro lado, la evasión de la deshidratación se refiere a la predisposición de la planta a mantener un alto potencial de agua en sus tejidos bajo condiciones de sequía (Lipiec et al., 2013). Además, el estrés térmico junto con el déficit hídrico disminuye la fotosíntesis neta (P_n) y, posteriormente, puede causar una reducción en la tasa de crecimiento de la planta (Vadez et al., 2012).

1.2.2. El floema

1.2.2.1. Estructura

En las plantas, el floema y el xilema son los principales tejidos que facilitan el transporte de nutrientes, así como de diferentes moléculas de señalización a lo largo de la estructura

vegetal. El xilema está compuesto por células del parénquima xilemático, fibras y vasos del xilema. Tanto los vasos como las fibras del xilema, están formados por células muertas, que mantienen solamente una pared celular dando lugar a espacios vacíos. En general, el xilema tiene la función de transporte de savia bruta en sentido acropétalo, la cual está compuesta básicamente de sales inorgánicas, nutrientes orgánicos (aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos), así como de hormonas y macromoléculas (Kehr et al., 2004). Aunque los elementos de xilema son células muertas, la savia bruta del xilema contiene proteínas a bajas concentraciones, pero que parecen tener funciones muy específicas, por ejemplo, en el mantenimiento, la reorganización o el refuerzo de las paredes celulares o la defensa contra patógenos (Sakuta et al., 2000; Rep et al., 2003).

Por su parte, el floema está compuesto por canales formados de células vivas que transportan savia elaborada y actúa como vía de transporte simplástico responsable de la translocación de fotoasimilados desde los tejidos donde son producidos (ej. hojas) hasta los tejidos donde son consumidos (ej. frutos). Este tejido se compone de elementos cribosos, las células de parénquima y células acompañantes. Los elementos cribosos pierden la mayor parte de sus núcleos y orgánulos y las funciones metabólicas en este sistema de transporte son llevadas a cabo principalmente por las células acompañantes (Lin et al., 2009). Asimismo, los RNAs pequeños, los mRNA y proteínas transportadas a través de estos conductos, lo hacen a través de los plasmodesmos (Oparka et al., 1999). En el floema, también se transportan gran número de metabolitos y macromoléculas como RNAs y proteínas. Por ejemplo, en *A. thaliana* se estima que al menos el 20% de sus genes, codifican para proteínas que viajan o residen en el floema (Buhtz et al., 2008; Kehr et al., 2009). De esta manera, el transporte de macromoléculas vía vascular no es un evento aislado sino todo lo contrario.

1.2.2.2. Movilización a larga distancia de moléculas

La visión de la función del floema ha evolucionado de un simple transporte de asimilados a un sistema de tráfico para respuesta a patógenos, estreses y reguladores del desarrollo (Wu et al., 2003; Haywood et al., 2005). El floema es esencial para el transporte de nutrientes minerales, virus, señales de silenciamiento inducido por virus, defensa y resistencia contra la infección por patógenos y las señales de respuesta a ciertas condiciones ambientales (Kehr, 2006; Lough y Lucas, 2006). Éstas contienen una multitud

de compuestos: pequeñas moléculas (Corbesier et al., 2003), péptidos y proteínas (Lin et al., 2009) y ácidos nucleicos (Haywood et al., 2005). Además, las interacciones entre muchas proteínas o RNA y proteínas que facilitan o regulan el transporte de floema parece más probables de ser encontradas (Ham et al., 2009).

Una de las primeras indicaciones de que el floema podría contener moléculas de mRNA fue proporcionada por Sasaki et al. (1998), quienes detectaron mediante ensayos específicos de RT-PCR, tres especies de mRNA en la savia de floema de arroz (*Oryza sativa* L.) que codificaban para la tiorredoxina H, oryzacistatina y actina (Sasaki et al., 1998). La presencia de mRNAs en el floema provocó muchas preguntas con respecto a la contaminación potencial de los exudados del floema, así como su función específica. La savia del floema carece de actividad inespecífica RNasa (Doering-Saad et al., 2002) y tRNA enriquecido con metionina en el floema inhiben eficazmente la actividad de traducción (Zhang et al., 2009).

Por lo tanto, es poco probable que los mRNA del floema sean una fuente de nucleótidos metabolizados o que los mRNAs móviles se traducen en proteínas en los elementos cribosos. Las primeras percepciones acerca de la complejidad de la población de mRNAs translocables se obtuvieron principalmente en dos familias de plantas: *Cucurbitaceae* (calabaza, sandía y pepino) y *Brassicaceae* (colza y *Arabidopsis*). La identidad y las características de estos mRNAs móviles se reveló principalmente por dos enfoques: (i) el análisis de exudados del floema (Yoo et al., 2004; Buhtz et al., 2008) y (ii) el injerto de especies genéticamente distintas (Thieme et al., 2015; Zhang et al., 2016). Posteriormente, muchos estudios señalaron la presencia de transcritos endógenos en la vasculatura y el floema de diferentes especies (Spiegelman et al., 2013; Notaguchi, 2014).

Se utilizaron enfoques alternativos para identificar los transcritos presentes en el tejido del floema. Se utilizó la secuenciación de marcadores de secuencias expresadas (EST) para identificar mRNAs extraídos del exudado floemático de apio (*Apium graveolens*) [Vilaine et al., 2003], llantén mayor (*Plantago major*) [Pommerrenig et al., 2006], ricino (*R. communis*) [Doering-Saad et al., 2002] y melón (*Cucumis melo*) [Omid et al., 2007]. Muestras de floema de *Arabidopsis* fueron recogidos de dos maneras diferentes: (i) microdissección láser (LMPC) y (ii) exudación facilitada por EDTA analizada por microarreglos. Estos dos enfoques revelaron la presencia de 1291 transcritos específicamente enriquecidos en la vasculatura y 2417 presentes en la savia del floema. Se realizó secuenciación del

transcriptoma en muestras de RNA de diferentes tejidos de sandía y pepino, incluyendo tallos, ápices, haces vasculares y savia de floema de pecíolos y tallos (Guo et al., 2013). El análisis de la identidad y distribución de transcritos reveló la especificidad de la movilidad de mRNAs en el floema y distintos procesos de entrega de mRNA en estas dos especies.

Curiosamente, una fracción más pequeña, el 25% (n=234) se movía de la raíz a los tejidos de los brotes, planteando la cuestión de qué vía de transporte intercelular utilizan estos transcritos. Los experimentos alternativos de injertos entre especies de vid y entre sandía y pepino revelaron números similares de mRNAs translocables que van desde 3333 a 3546, respectivamente (Yang et al., 2015; Zhang et al., 2016). Una comparación entre estas varias poblaciones identificadas de transcritos translocables reveló que una parte altamente significativa (n=258) se conserva entre las diversas familias de plantas representadas por la sandía, la vid y *Arabidopsis* (Walther y Kragler, 2016). Otro enfoque no comúnmente utilizado fue el injerto de especies de plantas distantes como *A. thaliana* (injerto) con *N. benthamiana* (patrón o portainjerto) y llevó a la detección de 138 transcritos translocables (Notaguchi et al., 2015). La falta de identificación de un buen número de mRNAs en estas muestras sugiere que estos 138 transcritos de *Arabidopsis* no representan todo el espectro de mRNAs translocables. Sin embargo, el elevado número total de mRNAs translocables identificados en varias especies que representa aproximadamente un cuarto de su transcriptoma apoya dos hipótesis opuestas. Una es que el RNA se transfiere inespecíficamente a través del floema y no desempeña un papel en la señalización. El otro es que los mRNAs translocables juegan un papel fundamental en tejidos distantes. La función de señalización es apoyada por los hallazgos de que al menos algunos mRNAs translocables albergan firmas que facilitan su transporte y que pueden afectar el crecimiento y el desarrollo de tejidos distantes.

Curiosamente, parece que la población y la distribución espacial de mRNAs translocables dependen de los tejidos diana y las condiciones de crecimiento. En las plantas de pepino-sandía y *Arabidopsis* injertadas, se suministran mRNAs específicos a distintas regiones apicales. Por ejemplo, 26 mRNAs de *Arabidopsis* producidos por patrones fueron encontrados exclusivamente en flores (Thieme et al., 2015). También en la sandía se encontró un número elevado de transcritos producidos por patrones de pepino, tanto en los ápices de los brotes como en las hojas jóvenes. Tanto en los injertos de *Arabidopsis* y

pepino-sandía, condiciones de deficiencia de fosfato hizo que la población de mRNAs translocables varíe significativamente y se refleje en cambios en el transcriptoma (Walther y Kragler, 2016).

Aunque los ensayos de injerto confirmaron que los mRNAs se mueven sobre las uniones de injerto, la simple presencia de mRNAs en el exudado del floema no permite concluir que se están moviendo activamente a través del floema. Como se ha comentado por Oparka y Cruz (2000), mRNAs identificados en los exudados del floema podrían ser remanentes presentes en elementos cribosos diferenciados, o una consecuencia de la fuga celular por cambios repentinos en el turgor. No obstante, los ensayos de microinyección sugirieron el transporte activo de célula a célula de mRNAs específicos a través del plasmodesmo (Lucas et al., 1995) y se mostró que el factor de transcripción KNOTTED1 y su mRNA se movió entre las células de mesófilo de tabaco. El transporte en el floema del mRNAs de CmNACP que codifica para un dominio NAC de la proteína se demostró mediante experimentos de injertos inter-específicos de calabaza injertado sobre pepino (Ruiz-Medrano et al., 1999). Otros ejemplos de mRNAs móviles con función de señalización específica se encuentran con factores de transcripción homeobox que codifican los transcritos de LeT6 (Kim et al., 2001)] y StBEL5 (Banerjee et al., 2006), y el regulador de respuesta a brasinosteroides que codifica el transcrito de CmGAIP (Haywood et al., 2005).

1.3. Justificación

Los factores ambientales más adversos que pueden afectar el crecimiento de las plantas y la producción de cultivos son la sequía, el frío y la salinidad. Bajo estas condiciones de estrés se induce una variedad de genes que permiten a las plantas responder a estreses abióticos mediante varias redes de regulación de la transcripción implicados en el estrés inducido por los cambios en la expresión génica. Los genes inducidos por el estrés pueden regular positivamente la expresión de muchos genes que proporcionan tolerancia al estrés abiótico a temperaturas extremas, sequía y alta salinidad. Figueroa-Yáñez et al. (2016) detectaron que la proteína CpRAP2.4a y su mRNA, involucrado en la respuesta a sequía y estrés por altas y bajas temperaturas en plantas como papaya, *Arabidopsis* y tabaco se puede transportar de una planta transgénica a las hojas del ápice de la planta de tabaco no transformadas, lo cual le permite tolerar el estrés causado por altas temperaturas, y CpRAP2.4a:GFP puede ser visualizado en el tejido de tabaco no transformado. Sin embargo, hasta ahora no se conoce bien el/los responsables del transporte a larga distancia de mRNAs a través del floema. Además, la ruta de internalización de estas proteínas en las células permanece desconocida, su elucidación es clave para entender como estas proteínas pueden ser translocadas en la célula, asimismo es de suma importancia y de un rol clave su entendimiento para el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de plantas que expresen ciertas características de un injerto modificado internalizado, además de poder trasladarse a otras proteínas con potencial biotecnológico.

El análisis *in silico* de la secuencia proteica de la proteína CpRap2.4a no presenta firmas previamente reportadas por otros grupos de investigación en la literatura (Lin et al., 2009; Ham et al., 2009; Mahajan et al., 2012; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2005; Jiang et al., 2013; Li et al., 2010; Schmid et al., 2010) que se hayan descrito como responsables del transporte a larga distancia. En este trabajo se plantea la identificación de firmas responsables del transporte a larga distancia en diferentes mRNAs cuyo transporte ha sido demostrado por diversos autores y también del mRNA de CpRAP2.4a; además de evaluar las proteínas de unión a RNA que interactúan con estos mRNAs y su influencia en conferirles una mayor capacidad de movilización a larga distancia.

1.4. Hipótesis

La base del transporte a larga distancia de mRNAs translocables y su capacidad de movilizarse en el floema puede ocurrir por diversos mecanismos, aún desconocidos. Sin embargo, se requiere de la presencia de firmas moleculares específicas localizadas en las unidades no traducidas del mRNA y de proteínas de unión que en su conjunto forman complejos ribonucleoproteícos que les permite movilizarse a larga distancia y actuar como agentes sistémicos de señalización. Por ello, se plantea como hipótesis que existen secuencias particulares conservadas en las regiones no traducidas (UTRs) de los RNA mensajeros que definen su transporte a larga distancia en el floema.

1.5. Objetivos

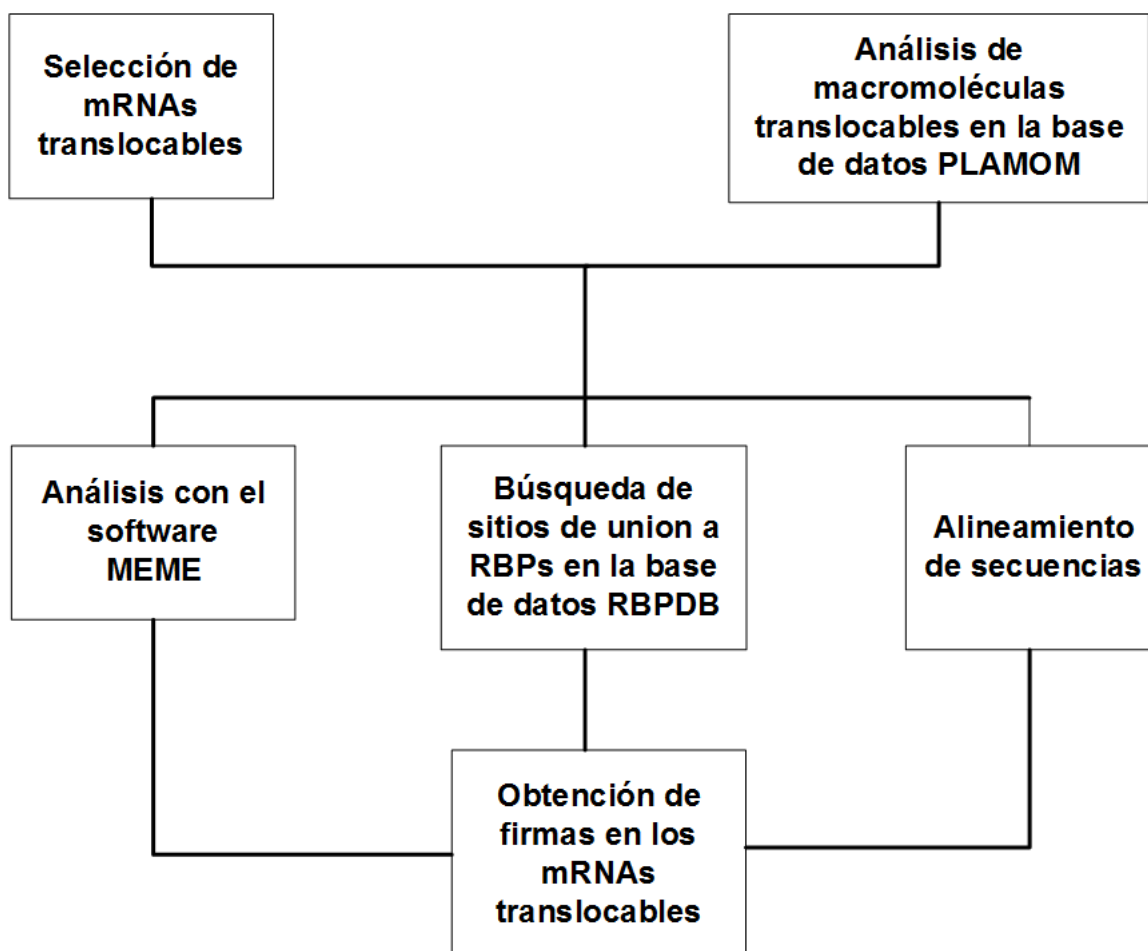
1.5.1. Objetivo general

Determinar las firmas *in silico* de mRNA que participan en el transporte a larga distancia en el floema de las plantas.

1.5.2. Objetivos Específicos

1. Analizar *in silico* los mRNAs translocables en las plantas y encontrar dominios o firmas moleculares conservadas que les permitan transportarse a larga distancia.
2. Buscar *in silico* posibles sitios de unión a RNA y encontrar proteínas de unión a RNA (RBPs) asociadas al transporte a larga distancia.
3. Determinar las características del mRNA y la proteína de RAP2.4a que le permite transportarse a través del floema.

1.6. Estrategia Experimental



1.7. Referencias

- Ainsworth, E. A., & Ort, D. R. (2010). How do we improve crop production in a warming world? *Plant Physiology*, 154, 526-530.
- Ali, M.A.; Azeem, F.; Nawaz, M.A.; Acet, T., et al. (2018). Transcription factor WRKY11 and WRKY17 are involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology* 226: 12-21
- Arbaoui, M., Balko, C., & Link, W. (2008). Study of faba bean (*Vicia faba* L.) winter-hardiness and development of screening methods. *Field Crop Research*, 106, 60-67.
- Aysin, F.; Erson-Bensan, A.E.; Eyidoğan, F., Öktem, H.A. (2015). Generating salt-tolerant *Nicotiana tabacum* and identification of stress-responsive miRNAs in transgenics. *Turk J Bot* 39; 757-768.
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89–113.
- Baker, N., & Rosenqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.*, 55, 1607-1621.
- Banerjee A.K., Chatterjee M., Yu Y., Suh S.-G., Miller W.A., Hannapel D.J., (2006) Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway, *Plant Cell* 18 (12) 3443–3457.
- Branca, G., Lipper, L., McCarthy, N., & Jolejole, M. C. (2013). Food security, climate change and sustainable management: A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 33, 635-650.
- Buhtz A., Springer F., Chappell L., Baulcombe D.C., Kehr J. (2008). Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*, *Plant J.* 53 (5) 739–749.
- Doering-Saad C., H.J. Newbury, J.S. Bale, J. Pritchard (2002). Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements, *J. Exp. Bot.* 53: 631–637.

Chaves, M.M., Maroco, J.P., y Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239–264.

Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., et al. (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* 89, 907–916.

Cook, E.R., Seager, R., Cane, M.A., and Stahle, D.W. (2007). North American drought: reconstructions, causes, and consequences. *Earth Sci. Rev.* 81, 93–134.

Corbesier L, Prinsen E, Jacqumard A, Lejeune P, Van Onckelen H, Perilleux C, Bernier G. 2003. Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany* 54, 2511–2517.

Duan X, Zhang W, Huang J, Hao L, Wang S, Wang A, Meng D, Zhang Q, Chen Q, Li T. PbWoxT1 mRNA from pear (*Pyrus betulaefolia*) undergoes long-distance transport assisted by a polypyrimidine tract binding protein. *New Phytol.* 2016; 210:511–24.

Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A., & Arduini, I. (2004). Growth responses of sorghum plants to chilling temperature and duration of exposure. *European Journal of Agronomy*, 21, 93–103.

Fanourakis, D., Carvalho, S.M.P., Almeida, D.P.F., and Heuvelink, E. (2011). Avoiding high relative air humidity during critical stages of leaf ontogeny is decisive for stomatal functioning. *Physiol. Plant.* 142,274–286.

Fischlin, A., Midgley, G.F., Price, J., Leemans, R., Gopal, B., Turley, C., et al. (2007). “Ecosystems, their properties, goods, and services” in *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, eds M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden, and C.E. Hanson (Cambridge: Cambridge University Press), 211–272.

Figuerola-Yáñez, L., Pereira-Santana, A., Arroyo-Herrera, A., Rodríguez-Corona, U., Sanchez-Teyer, F., Espadas-Alcocer, J., et al. (2016). RAP2.4a is transported through the phloem to regulate cold and heat tolerance in papaya tree (*Carica papaya* cv. Maradol):

implications for protection against abiotic stress. *PLoS ONE* 11: e0165030. doi: 10.1371/journal.pone.0165030

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Shinozaki, K.Y., Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9: 436–442.

Gonzales, H. (2016). Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects. Academic Press. 434 pp

Guo S., Zhang J., Sun H., Salse J., Lucas W.J., Zhang H., Zheng Y., Mao L., Ren Y., et al. (2013). The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions, *Nat. Genet.* 45 (1): 51–58.

Ham BK, Brandom JL, Xoconostle-Cázares B, Ringgold V, Lough TJ, Lucas WJ. 2009. Polypyrimidine tract binding protein, CmRBP50, forms the basis of a pumpkin phloem ribonucleoprotein complex. *The Plant Cell* 21, 197–215.

Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K. & Bohnert H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 463–499.

Haywood V, Yu TS, Huang NC, Lucas WJ. 2005. Phloem long-distance trafficking of gibberellic acid-insensitive RNA regulates leaf development. *The Plant Journal* 42, 49–68.

Howarth, C. J. (2005). Genetic improvements of tolerance to high temperature. In M. Ashraf & P. J. C. Harris (Eds.), *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches* (pp. 277-300). New York: Howarth Press Inc.

Huang N.C., Yu T.S. (2009). The sequences of *Arabidopsis* GA-INSENSITIVE RNA constitute the motifs that are necessary and sufficient for RNA long-distance trafficking, *Plant J.* 59: 921–929

Inci, N. E., & Toker, C. (2011). Screening and selection of faba beans (*Vicia faba* L.) for cold tolerance and comparison to wild relatives. *Genet Resour Crop Evol*, 58, 1169-1175.

Janka, E., Körner, O., Rosenqvist, E., & Ottosen, C. O. (2013). High temperature stress monitoring and detection using chlorophyll a fluorescence and infrared thermography in chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 67, 87-94.

Jenabiyan, M., Pirdashti, H., & Yaghoubian, Y. (2014). The combined effect of cold and light intensity stress on some morphological and physiological parameters in two soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *International Journal of Biosciences*, 5(3), 189-197.

Jia, W., and Zhang, J. (2008). Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 3, 772–777.

Jones, H.G., and Corlett, J.E. (1992). Current topics in drought physiology. *J. Agric. Sci.* 119, 291–296.

Kehr J. 2006. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany* 57, 767–774.

Kim M., Canio W., Kessler S., Sinha N. (2001). Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato, *Science* 293: 287–289.

Kurukulasuriya, P., & Rosenthal, S. (2013). Climate change and agriculture: A review of impacts and adaptations. Retrieved from Washington, D.C.: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/16616>.

Lee, J.S. (2010). Stomatal opening mechanism of CAM plants. *J. Plant Biol.* 53, 19–23.

Li M, Li Y, Li H, Wu G (2011). Overexpression of AtNHX5 improves tolerance to both salt and drought stress in *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. *Tree Physiol* 31: 349–357.

Lin M-K, Lee Y-J, Lough TJ, Phinney B, Lucas WJ. 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides functional insights into angiosperm sieve tube function. *Molecular and Cellular Proteomics* 8, 343–356.

Lin RC, Park HJ, Wang HY. 2008. Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating light and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. *Mol Plant*, 1:42-57.

Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ: Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol* 2008, 147:732-746.

Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A., & Kondracka, K. (2013). Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review. [yes]. *International Agrophysics*, 27, 463-477.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/ AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10:1391-1406.

Liu, C.C., Liu, Y.G., Guo, K., Zheng, Y.R., Li, G.Q., Yu, L.F., et al. (2010). Influence of drought intensity on the response of six woody karst species subjected to successive cycles of drought and rewating. *Physiol. Plant.* 139, 39–54.

Lough TJ, Lucas WJ. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annual Review of Plant Physiology* 57, 203–232.

Lucas W.J., Bouché-Pillon S., Jackson D.P., Nguyen L., Baker L., Ding B., Hake S. (1995). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata, *Science* 270 (5244): 1980–1983.

Mane, S.P., Robinet, C.V., Ulanov, A., Schafleitner, R., Tincopa, L., Gaudin, A., et al. (2008). Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Funct. Plant Biol.* 35, 669–688.

Mathur, S., Jaigo, A., Mehta, P., & Bharti, S. (2011). Analysis of elevated temperature-induced inhibition of photosystem II using chlorophyll a fluorescence induction kinetics in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Plant Biology*, 13, 1-6.

Metz, B., Davidson, O., Bosch, P., Dave, R., and Meyer, L. (2007). Mitigation of Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends. Plant Sci.*, 11(15-19).

Morales, D., Rodríguez, P., Dellamico, J., Nicolás, J., Torrecillas, E., Sánchez, A., & Blanco, M. J. (2003). High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. *Biologia Plantarum*, 47(2), 203-208.

Neumann, P.M. (2008). Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Ann. Bot.* 101,901–907.

Notaguchi M., Higashiyama T., Suzuki T., (2015). Identification of mRNAs that move over long distances using an RNA-seq analysis of *Arabidopsis/Nicotiana benthamiana* heterografts. *Plant Cell Physiol.* 56 (2): 311–321.

Notaguchi, M. (2014). Identification of phloem-mobile mRNA, *J. Plant Res.* 128 (1): 27–35.

Omid A., Keilin T., Glass A., Leshkowitz D., Wolf S. (2007). Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants, *J. Exp. Bot.* 58 (13): 3645–3656.

Oparka K.J., Cruz S.S. (2000). The Great Escape: phloem transport and unloading of macromolecules, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 323–347.

Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR: MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J* 2008, 53:731-738.

Pinheiro, C., and Chaves, M.M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J. Exp. Bot.* 62,869–882.

Pommerrenig B., Barth I., Niedermeier M., Kopp S., Schmid J., Dwyer R.A., McNair R.J., Klebl F., Sauer N. (2006). Common Plantain. A collection of expressed sequence tags from vascular tissue and a simple and efficient transformation method, *Plant Physiol.* 142 (4): 1427–1441.

Rapacz, M., Gasior, D., Zwierzykowski, Z., Lesniewska-Bocianowska, A., Humphreys, M. W., Gay, A. P. R., Gay, A. (2004). Changes in cold tolerance and the mechanisms of acclimation of photosystem II to cold hardening generated by anther culture of *Festuca pratensis* x *Lolium multiflorum* cultivars. *New Phytologist*, 162, 105-114.

Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants, *Development* 126 (20): 4405–4419.

Sharma, D. K., Andersen, S. B., Ottosen, C.-O., & Rosenqvist, E. (2012). Phenotyping of wheat cultivars for heat tolerance using chlorophyll a fluorescence. *Functional Plant Biology*, 39, 936-947.

Siddiqui, M. H., Al-Khaishany, M. Y., Al-Qutami, M. A., Al-Whaibi, M. H., Grover, A., Ali, H. M., Bukhari, N. A. (2015). Response of different genotypes of faba bean plant to drought stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 10214-10227.

Spiegelman Z., Golan G., Wolf S. (2013). Don't kill the messenger: long-distance trafficking of mRNA molecules, *Plant Sci.* 213: 1–8.

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 203: 32–43

Sasaki T., Chino M., Hayashi H., Fujiwara T. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.* 39 (8) (1998) 895–897.

Thieme C.J., Rojas-Triana M., Stecyk E., Schudoma C., Zhang W., Yang L., Miñambres M., Walther D., Schulze W.X., Paz-Ares J., Scheible W.-R., Kragler F., (2015). Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat. Plants* 1: 15025.

Vadez, V., Berger, J. D., Warkentin, T., Asseng, S., Ratnakumar, P., Chandra Rao, P., Abdou Zaman, M. (2012). Adaptation of grain legumes to climate change: A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 32, 31-44.

Vilaine F., Palauqui J.C., Amselem J., Kusiak C., Lemoine R., Dinant S. (2003). Towards deciphering phloem: a transcriptome analysis of the phloem of *Apium graveolens*, *Plant J.* 36 (1): 67–81.

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 199- 223.

Walther D., Kragler, F. (2016). Limited phosphate: mobile RNAs convey the message, *Nat. Plants* 2 (4): 16040.

Wang, X., Cai, J., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., & Cao, W. (2011). Pre-anthesis hightemperature acclimation alleviates damage to the flag leaf causes by postanthesis heat stress in wheat. *Journal of Plant Physiology*, 168, 585-593.

Wang, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W., Wollenweber, B., & Jiang, D. (2014). Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving sub cellular antioxidant activities in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 185-192.

Wu X, Dinneny JR, Crawford KM, Rhee Y, Citovsky V, Zambryski PC, Weigel D. 2003. Modes of intercellular transcription factor movement in the *Arabidopsis* apex. *Development* 130, 3735–3745

Xiangnan, L., Jian, C., Fulai, L., Tingbo, D., Weixing, C., & Dong, J. (2014). Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 34-43.

Xiong L. and Y. Yang (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15:745-759.

Xu, F., Guo, W., Xu, W., Wei, Y., and Wang, R. (2009). Leaf morphology correlates with water and light availability: what consequences for simple and compound leaves? *Proc. Nat. Sci.* 19, 1789–1798.

Yang Y., Mao L., Jittayasothorn Y., Kang Y., Jiao C., Fei Z., Zhong G.-Y. (2015). Messenger RNA exchange between scions and rootstocks in grafted grapevines, *BMC Plant Biol.* 15 (1): 251.

Yoo B., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Lee Y.M., Lough T.J., Lucas W.J. (2004). A systemic small RNA signaling system in plants, *Plant Cell* 16 (8): 1979–2000.

Yuasa T., K. Ichimura, T. Mizoguchi and K. Shinozaki (2001) Oxidative stress activates ATMPK6, and Arabidopsis homologue of MAP kinase. *Plant and Cell Physiology* 42:1012-1016.

Yue Y, Zhang M, Zhang J, Tian X, Duan L, et al. (2012) Overexpression of the AtLOS5 gene increased abscisic acid level and drought tolerance in transgenic cotton. *J Exp Bot* 63: 3741–3748

Zhang Z., Zheng Y., Ham B.-K., Chen J., Yoshida A., Kochian L.V., Fei Z., Lucas W.J. (2016). Vascular-mediated signaling involved in early phosphate stress response in plants, *Nat. Plants* 2 (4): 16033.

Zhang, L. Sun, F. Kragler (2009). The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation, *Plant Physiol.* 150 (1): 378–387.

CAPITULO II. ANÁLISIS IN SILICO DE mRNA TRANSLOCABLES EN EL FLOEMA

2.1. Introducción

El transporte a larga distancia es un fenómeno ampliamente estudiado ya que es crucial durante el crecimiento y desarrollo de la planta regulando diversos procesos como desarrollo de hoja, formación de tubérculos, floración, formación de raíces laterales y en las vías de señalización del nitrógeno y el fósforo (Kehr y Buhtz, 2007; Carella et al., 2016).

Aunque el mecanismo de movilización de los mRNAs en el floema todavía se desconoce, muchos estudios han revelado la presencia de proteínas de unión a RNA (RNA-binding proteins, RBPs, *por sus siglas en inglés*). Ham et al. (2009) encontraron la presencia de firmas dentro de las secuencias de los mRNAs que son reconocidos por RBP50, un homólogo de la proteína ampliamente conservada en todos los seres vivos, PTB3 (*polypirimidine tract binding 3*); así se postuló la formación de complejos ribonucleoproteicos como forma de transportarse de los RNAs a larga distancia; éstos se forman por el reconocimiento de firmas o *RNA zip codes* dentro de las regiones no traducidas (UTRs), secuencias específicas a las que se le unen los RBPs y les otorgan mayor estabilidad al complejo evitando ser degradados en el floema. Los UTRs son importantes ya que experimentos anteriores demuestran acumulación de transcritos y su movilización específica controlada por el UTR en el extremo terminal 3' del mRNA (Fedoroff, 2002; Banerjee et al., 2009; Cho et al., 2012).

En este capítulo se evaluaron las diferencias entre los UTRs de mRNAs que se transportan y los que no se transportan a larga distancia en papa, donde Chen et al. (2003) caracterizó diversos mRNAs como translocables o no translocables, además se hizo la identificación de firmas moleculares putativas en mRNAs que son capaces de transportarse a larga distancia y que regulan un proceso fisiológico en la planta, así como también secuencias masivas que se transportan en el floema recolectados de la base de datos PlaMoM.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Análisis de las regiones no traducidas de mRNAs del factor de transcripción BEL en papa

Para este análisis diferencial se usó 4 mRNAs de papa obtenidos de Chen et al. (2003): StBEL5 (AF406697), StBEL30 30 (AF406703), StBEL13 (AF406699) y StBEL14 14 (AF406700), el primero se transporta en el floema, el segundo es parcialmente móvil y los dos últimos no se transportan a larga distancia en el floema. Con estas secuencias se calcularon proporciones del contenido de bases nitrogenadas y se realizó una prueba estadística F para probar la significancia entre los datos. Luego se hizo un alineamiento en Clustal Omega (Sievers et al., 2011) y se analizó las regiones conservadas dentro de las secuencias y predicción de los RBPs asociados con la base de datos RBPDB (Cook et al., 2011), disponible en <http://rbpdb.cabr.utoronto.ca/index.php> y luego se hizo un BLAST contra UNIPROT KB Target Plants para buscar ortólogos de esas proteínas de unión a RNA en plantas y hacer una correlación con su influencia en el movimiento de estos mRNAs en el floema.

2.2.2. Caracterización de mRNAs translocables a larga distancia

Con el fin de identificar mRNAs capaces de moverse en el floema se realizó una exhaustiva búsqueda de artículos científicos donde se hayan realizado experimentos in silico y funcionales en el que se haya comprobado la movilidad de estos en diversas especies vegetales y demostrado su función en el metabolismo de plantas, y luego se recuperaron las secuencias en la base de datos NCBI (El Centro Nacional de Información Biotecnológica, *The National Center for Biotechnology Information por sus siglas en inglés*) que se describe en el cuadro 2.1.

Se recuperaron 10 RNAs translocables de GENBANK: FT (AB027504.1), BEL5 (NM_001287992.1), CmGAIP (AY326306.1), CmNACP (FJ151402.1), CmPP16-1 (AF079170.1), DELLA-GAI (AY326307.1), MpIAA14 (AB469200.1), PbWOXT1 (KT998806.1), POTH1 (NM_001288425.1), CpRAP2.4a (NW_019014656.1) y se realizó un alineamiento buscando sitios de unión a RBPs dentro de las regiones no traducidas usando la base de datos RBPDB (Cook et al., 2011).

2.2.3. Búsqueda de firmas y RBPs en la base de datos PLaMoM

Se descargaron las secuencias nucleotídicas y proteicas identificadas como capaces de transportarse en el floema de la base de datos del Max Planck Institute of Plant Physiology, PLAMOM (Plant Mobile Macromolecules), en la que se incluyen 13 especies vegetales, de las cuales después de la curación y depuración manual de estos datos se utilizaron solo 8 especies vegetales (7 especies con secuencias nucleotídicas **N** y 1 especie con secuencias proteicas **P**): *Apium graveolens* **N**, *Arabidopsis thaliana* **N**, *Citrullus lanatus* **N**, *Cucumis melo* **N**, *Cucumis sativus* **N** y *Cucurbita maxima* **P**, *Ricinus communis* **N**, *Vitis spp.* **N**, para su posterior análisis con la herramienta MEME (Bailey et al., 2009) del paquete bioinformático MEME-SUITE (disponible en la página web: <http://meme-suite.org/tools/meme>). Los parámetros que se establecieron fue de encontrar 100 motivos con default mínimo y máximo de 6 a 50 nucleótidos, buscando en la hebra dada (solo para secuencias de RNA). Además, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) de cada especie por separado con el software MAFFT v.7.419 (Kato et al., 2002), adecuado para analizar y alinear miles de secuencias. Se empleó la estrategia FFT-NS-2, un método progresivo rápido con el argumento adicional --memsave porque en ciertas especies hay secuencias con más de 10000 nucleótidos.

Una vez encontradas las firmas moleculares en los RNAs que se transportan a larga distancia (LDTMs, *long-distance transport motifs*), se identificó la firma más común, para ello fue usado como *query* en la base de datos RBPDB v.1.3.1 (Cook et al., 2011). Posteriormente, las proteínas de unión a RNA encontradas se sometieron a un BLAST en UNIPROT para buscar homólogos en plantas. En el caso de *Cucurbita maxima*, la firma proteica se usó como *query* en la base de datos Pfam v.32 (Sonnhammer et al., 1997). Estos sitios de unión a RNA y las proteínas de unión a RNA se muestran en el cuadro 2.2.

2.3. Resultados

2.3.1. Análisis de las regiones no traducidas de mRNAs del factor de transcripción BEL en papa

La fluctuación de la frecuencia individual de nucleótidos varía entre genes eucarióticos y es el resultado de presión diferencial en las mutaciones y asociado a la presencia de firmas

específicas y sitios de unión a RNA a factores de transcripción y splicing alternativo (Louie et al., 2013).

No se encontraron diferencias significativas entre los contenidos de GC, AU, AG y UC entre las secuencias, pero si StBEL5 y StBEL30 tienen mayor contenido de AG y menos de UC en el 5' UTR, los contenidos de AU y AG son altos en ambos UTRs y el contenido de GC es más alto en los 5' UTR que en los 3' UTR (Figure 2.1 A). Ambos UTRs tienen múltiples sitios de unión a RNA (KH, PAB, etc.) más en los 3' UTR que en los 5' UTR y una nueva proteína de unión a RNA (RBP) fue encontrada (Figura 2.1 B), una proteína Pumilio (*Pum*). Las proteínas Pumilio, tienen como sitio de reconocimiento a las firmas UGUA, se encontraron 4 sitios *Pum* en el 3' UTR de StBEL5 y 2 sitios *Pum* en el 3' UTR de StBEL30; y en el extremo 5' UTR de StBEL5 se encontró un sitio *Pum*; mientras que en StBEL13 y StBEL14 no se encontraron sitios *Pum* (Figura 2.1 C)

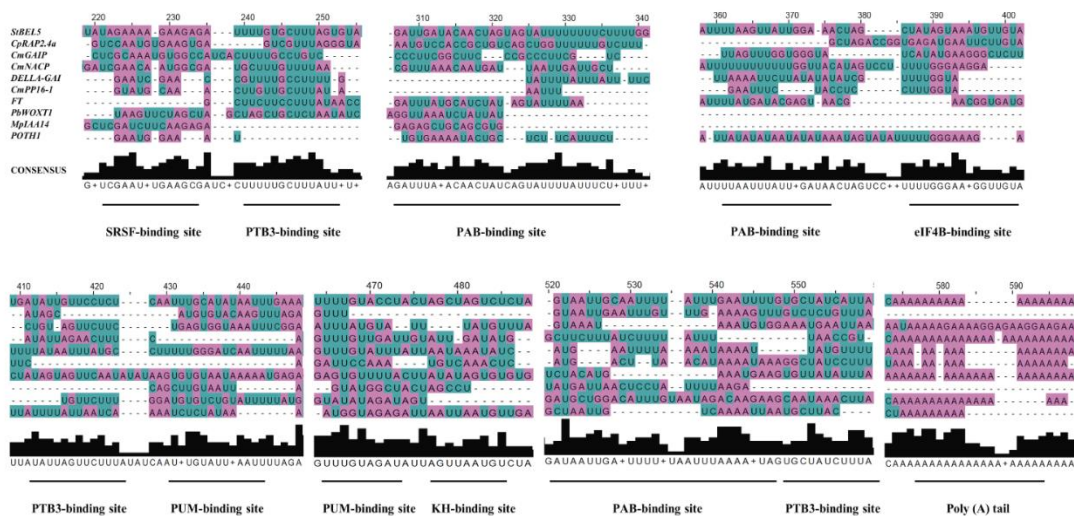
2.3.2. Caracterización de mRNAs translocables a larga distancia

Se identificaron 10 mRNAs para los que previamente se había demostrado experimentalmente que son capaces de moverse en el floema, cuyas características, función, referencia y longitudes de las regiones de los mRNAs se describen en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Selección de mRNAs que se transportan en el floema

RNA	Número accesión GENBANK	Anotación	Función	Referencia	mRNA (bp)	5´ UTR (bp)	3´ UTR (bp)	Proteína (aa)
FT	AB027504.1	Arabidopsis Flowering locus T	Floracion	Li et al. (2011)	864	70	269	175
BEL-1	NM_00128799 2.1	Potato Bel-1 like family	Crecimiento de tubérculos	Banerjee et al. (2006)	2735	148	521	688
CmGAI	AY326306.1	GA Insensitive	Morfología de la hoja	Haywood et al. (2005)	2202	137	325	579
CmNAC	FJ151402.1	NAM, ATAF1/2 and CUC2	Desarrollo de meristemas	Ruiz-Medrano et al. (1999)	1314	116	271	308
CmPP16-1	AF079170.1	Proteína 16 del floema	Desarrollo de meristemas	Ruiz-Medrano et al. (1999)	673	59	161	150
DELLA-GAI	AY326307.1	Della-GA Insensitive	Morfología de la hoja	Haywood et al. (2005)	2212	142	306	587
MplAA14	AB469200.1	Factor de respuesta a auxinas	Factor transcripcional	Kanehira et al. (2010)	1069	165	172	243
PbWOXT1	KT998806.1	Wuschel related Homeobox	Desarrollo de meristemas	Duan et al. (2016)	1286	105	194	328
POTH1	NM_00128842 5.1	Potato Knotted1- type	Crecimiento vegetativo	Mahajan et al. (2012)	1383	134	211	345
RAP2.4a	NW_01901465 6.1	Relacionado a AP2	Factor transcripcional	Figueroa et al. (2014)	2043	638	289	284

B



The diagram illustrates the protein domains located in the 5' and 3' UTRs of the *Drosophila* 28S rRNA gene. The 5' UTR contains the KH, PTB3, PAB, PUM, and GR domains. The 3' UTR contains the Znf, SFRS, PTB3, GR, PUM, KH, eIF4B, and PAB domains. Each domain is represented by a colored shape: KH (yellow pentagon), PTB3 (blue rectangle), PAB (pink trapezoid), PUM (yellow triangle), GR (green rectangle), Znf (blue diamond), SFRS (teal trapezoid), eIF4B (red arrow), and PAB (pink trapezoid).

30

En el 5' UTR de los mRNAs translocables a larga distancia se encontró sitios de unión a KH (K Homolog), y sitios de unión a PTB3 (Polypirimidine tract binding 3), el último es el socio principal de estos mRNAs en la formación de complejos ribonucleoproteicos (Figura 2.2 A). En el 3' UTR (Figura 2.2 B) se encontraron más sitios de unión a proteínas de unión a RNA (RBPs): Znf (zinc finger containing proteins), SFRS (serine/arginine rich splicing factors), GR (Glycine-rich proteins), KH (K Homology domain proteins), eIF4B (eukaryotic initiation factor 4B), PAB (Polyadenilate binding proteins), PTB3 y Pum (Pumilio homolog proteins). Estas últimas cuatro proteínas de unión a RNA están involucradas en la estabilidad de los mRNAs, factor crucial para su transporte a larga distancia en el floema (Figura 2.2 C).

2.3.3. Búsqueda de firmas y RBPs en la base de datos PLaMoM

De la base de datos PlaMoM se recuperaron 950 mRNAs en *Apium graveolens*, 3246 mRNAs en *Arabidopsis thaliana*, 1517 mRNAs en *Citrullus lanatus*, 1774 mRNAs en *Cucumis melo*, 1110 mRNAs en *Cucumis sativus*, 158 mRNAs en *Ricinus communis*, 3268 mRNAs en *Vitis vinífera* y 392 proteínas en *Cucurbita maxima*.

En el cuadro 2.2 se muestran los dominios de unión a ARN asociados a la firma más frecuente en cada especie. Se encontraron 5 LDTMs en *Apium graveolens* (Cuadro S1), AgLDTM1 (Figura 2.3) tiene una firma CCAG donde en plantas se une a proteínas de unión a RNA ricas en glicina (glycine rich RNA-binding proteins) y en humanos se une a las proteínas RBMX. Ambas proteínas se unen a secuencias de ADN y ARN con preferencia a ácidos nucleicos de una sola hebra mostrando una fuerte afinidad por secuencias poli-uracilo (U) y poli-guanina (G), estas proteínas están involucradas en el splicing alternativo de mRNAs modulando la selección del sitio donde se produce el splicing (Streitner et al., 2012). AgLDTM2 y AgLDTM3 son ricos en pirimidinas y se unen a PTB y proteínas que contienen motivos Znf. En *Arabidopsis*, hay 5 LDTMs, siendo AtLDTM1 rico en bases GA uniéndose a Serine/Arginine rich splicing factors, AtLDTM2 rico en firmas UCUU uniéndose a PTB, en cambio AtLDTM3 lleno de bases U uniéndose a proteínas PAB2 (polyadenilate binding protein 2) en plantas (Cuadro S1).

Species	Name	Logo		Best match	RNA binding domains
<i>Apium graveolens</i>	AgLDTM1		E-value: 8.5 e-148 Sites: 625 (65.4 %) Width: 9	GGCACCAGG	RRMx1
<i>Apium graveolens</i>	AgLDTM2		E-value: 4.9 e-14 Sites: 427 (44.7 %) Width: 20	UGCUGCUGCU GCUGCUGCUG	Znf_CCCHx4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtLDTM1		E-value: 3.3 e-17 Sites: 3245 (99.9 %) Width: 19	GAAGAAGAAG GUGGAGGAG	RRMx1, RRMx2, Znf_RanBP2x1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtLDTM2		E-value: 2.7 e-33 Sites: 3224 (99.3 %) Width: 20	UUUUCUUCU UCUUCUUUUU	PTB, RRMx3, KHx4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtLDTM3		E-value: 6.4 e-7 Sites: 3147 (96.9 %) Width: 20	UUUUUUUUUU UUUUUUUUUU	RRMx3
<i>Citrullus lanatus</i>	ClaLDTM1		E-value: 4.4 e-10 Sites: 1338 (88.2 %) Width: 20	GCGGGGGUG GUGGCGGCGG	RRMx1, Znf_RanBP2x1, SAMx1, CSDx1
<i>Citrullus lanatus</i>	ClaLDTM2		E-value: 2.4 e-7 Sites: 1301 (85.7 %) Width: 49	UCUUCUUCU UUUCUUCUUC	PTB, RRMx3, KHx4
<i>Cucumis melo</i>	CmLDTM1		E-value: 6.3 e-9 Sites: 1749 (98.6 %) Width: 10	UCUUCUUCU	PTB, YTHx1
<i>Cucumis melo</i>	CmLDTM2		E-value: 7.6 e-34 Sites: 1493 (84.2 %) Width: 10	GAAGGAAGAA	RRMx1, RRMx2
<i>Cucumis sativus</i>	CsLDTM1		E-value: 1.5 e-9 Sites: 1103 (99.4 %) Width: 20	UGGAGGUGGA GGAGGGGGAG	RRMx1, RRMx2, Znf_RanBP2x1
<i>Cucumis sativus</i>	CsLDTM2		E-value: 2.4 e-35 Sites: 984 (88.6 %) Width: 20	CUUCUUCUUC UUCUUCUUCU	PTB, RRMx3, KHx4
<i>Ricinus communis</i>	RcLDTM1		E-value: 5.1 e-68 Sites: 157 (99.4 %) Width: 20	CUUCUGCUU CUUCUUCUUU	RRMx3, KHx1, Znf_CCCHx4, CSDx1
<i>Ricinus communis</i>	RcLDTM2		E-value: 4.8 e-31 Sites: 107 (67.7 %) Width: 20	GCCUGCCCU GCUGCUGCUG	RRMx1, CSDx1, Znf_CCCHx4, YTHx1
<i>Vitis vinifera</i>	VvLDTM1		E-value: 1.2 e-3 Sites: 3224 (98.7 %) Width: 15	GAAAAAA AAGAAAA	RRMx4, Znf_CCCHx2
<i>Vitis vinifera</i>	VvLDTM2		E-value: 3.7 e-4 Sites: 2888 (88.4 %) Width: 15	UUUUUUU UCUUUUU	PTB, RRMx3

Figura 2.3. Firmas de RNAs encontradas en siete especies vegetales con MEME. Solo se ponen los logos de firmas que se encuentran en más del 20% de secuencias. RRMxN indica el RRM número “N” de los ocho que existen en las proteínas de unión a RNA encontrados en RBPDB. E-value es la significancia estadística de la firma.

ClaLDTM1 tiene dos firmas conocidas dentro de su firma, primero una firma GCGGGGG, reconocida por la proteína *mts1* (*VTi 1-2 Suppressor*) en hongos y proteínas del dominio SAM en plantas, ambas involucradas en la estabilidad del mRNA y el transporte de proteínas (Aviv et al., 2003; Denay et al., 2017). La segunda firma es un GGUG reconocido por las proteínas *Fus* en humanos y las proteínas que contienen dominios de tipo RanBP2 en plantas, estos últimos son proteínas de unión a DNA/RNA que desempeñan un papel en varios procesos celulares, como la regulación de la transcripción, acoplamiento de RNA (splicing), transporte de RNA, estabilidad, reparación del DNA y la respuesta al daño (Nguyen et al., 2011). Hay 10 firmas encontradas en los mRNAs translocables de *Cucumis melo* (Cuadro S1), CmLDTM1 tiene un motivo UCUU y CmLDTM2 es rico en bases GA que se unen a proteínas ricas en serina/arginina y contienen firmas GGAA y AGAA que se unen a eIF4B. 7 firmas en *Cucumis sativus* muestran un patrón similar obtenido con *C. melo* pero en orden inverso en el caso de CsLDTM1 y CsLDTM2 porque el primero es rico en bases GA que se unen a muchas RBPs descritas en el cuadro 2.2 y el segundo es rico en firmas UUCU que se unen a proteínas PTB.

En *Ricinus communis* encontramos dos firmas, uno más universal con presencia en 157 de 158 secuencias ricas en firmas UUCU y CUUU que también se unen a otras RBP como PAB (polyadenilate binding proteins) y, en menor medida, a proteínas de dedos de zinc (Znf-containing proteins); en *Vitis vinifera*, encontramos 6 firmas con el mismo patrón en firmas de transporte de larga distancia, unos ricos en dominios UUCU que se unen a PTB y otros ricos en bases GA que se unen a muchas proteínas de unión a ARN (Cuadro S1), que concuerda con lo reportado por Duan et al. (2016). Finalmente, dentro de las proteínas móviles, *Cucurbita maxima* muestra una firma poco frecuente en sus secuencias, pero se liga como RBP a enzimas conjugadoras de ubiquitina (ubiquitinated conjugating enzymes), que participan en la degradación de proteínas.

Cuadro 2.2. Proteínas de unión a RNA (RBPs) asociadas a las firmas de transporte a larga distancia en especies vegetales.

ESPECIE	NOMBRE	FIRMA	MEJOR MATCH	TASA DE FRECUENCIA (%)	FIRMAS CONTENIDAS	PROTEÍNAS DE UNIÓN A RNA ASOCIADOS	
						HUMANOS	PLANTAS
<i>Apium graveolens</i>	AgLDTM1	GGCACSAGV	GGCACCAGG	65.4	CCAG	RBMX	Glycine-rich RNA-binding proteins
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtLDTM1	GAAGAAGAARRWRRARRAR	GAAGAAGAAGGUGGAGGAG	99.9	GGUG	FUS	SAM domain proteins
					UGGA	SFSR1	Serine/arginine-rich-splicing factor SR34
					AGGAG	SFSR9	Serine/arginine-rich-splicing factor SR30
<i>Citrullus lanatus</i>	CilLDTM1	GGHGGDGNYGGRMRGHGG	GGCGGGGUGGUGGCGGCGG	88.2	GCGGGGG	Vts1	SAM domain proteins
					GGUG	FUS	Zinc finger RanBP2-type domain-containing protein
<i>Cucumis melo</i>	CmLDTM1	UBUUCUYYW	UCUUCUCCU	98.6	UUCU	PTB	PTB
<i>Cucumis sativus</i>	CsLDTM1	KGRWGRWGRARRWGRDGRWG	UGGAGUGGAGGAGGGGAG	99.4	AGGAG	SFSR9, LIN 28	Cold shock proteins
					UGGA	SFSR1	Serine/arginine-rich-splicing factor SR34
					GGUG	FUS	SAM domain proteins
<i>Ricinus communis</i>	RcLDTM1	BUUUYUKYUUYUUBUKYUKK	CUUUCUGCUUCUUCUUCUU	99.4	UUCU	PTB	PTB
					UGCU	MBNL1	Zinc finger CCCH domain-containing protein
					CUUU	ELAVL1	Polyadenilate binding proteins
					UCUGCU	YBX1	Zinc finger CCHC domain-containing protein
<i>Vitis vinifera</i>	VvLDTM1	VAAAAAARAAAAA	GAAAAAAAGAAAA	98.7	AAAGAAA	SFSR13A	SCL33 (Serine/arginine-rich SC35-like splicing factor)

2.4. Discusión

Una de las claves en el transporte de mRNAs a larga distancia en el floema es la especificidad, porque muchos mRNAs se transportan en el floema, pero solo pocos a larga distancia y que tengan un efecto en la fisiología o en el fenotipo de la planta (mRNAs funcionales). La especificidad puede estar dada por la presencia de regiones conservadas, firmas o *zip codes* dentro de las regiones no traducidas, regiones blanco de unión de proteínas (Banerjee et al., 2009). En esta sección analizamos los mRNAs del factor de transcripción BEL en papa (Chen et al., 2003), se encontraron más sitios de unión a proteínas claves en los mRNAs translocables que aquellos que no se translocan, 16 sitios CU y 4 sitios Pum en StBEL5 y 3 sitios CU y ningún sitio Pum en StBEL14, que no se moviliza a larga distancia en el floema (Figura 2.1). Este fenómeno no solo se debe a las proteínas PTB o RBP50, que son las que participan en la formación del complejo ribonucleoproteico sino que se debe a la presencia de más proteínas de unión a ARN que le confieren más propiedades a estos mRNAs y les permiten translocarse (Hannapel y Banerjee, 2017).

En los mRNAs de varias especies que se translocan en el floema (Cuadro 2.1) se encontraron diferencias en las firmas estructurales, particularmente en los sitios de unión a RNA (*RNA binding site*, *RBS*), la región 3' UTR tiene más RBS que los 5' UTR, por lo que se une a mayor cantidad de proteínas de unión a RNA (Figuras 2.1 y 2.2), que le otorgan ventajas a nivel post-transcripcional como estabilidad, transporte, localización y splicing. La región 3' UTR contiene sitios de unión a proteínas importantes, como PAB, eIF4B, Pum y PTB (Figura 2.2) que interactúan entre sí para incrementar la estabilidad de los mRNAs a los cuales se le unen, factor crucial en la movilidad de estos a larga distancia en el floema.

También se encuentran sitios de unión a otras proteínas en los UTRs, como las proteínas de unión a RNA ricas en glicina que tienen un rol importante en la transcripción de RNA y su procesamiento en condiciones de estrés, se unen a secuencias de RNA y DNA con preferencia a ácidos nucleicos ricos en sitios 5'-CC[A/C]-3' y que están involucrados en el splicing alternativos de muchos mRNAs, exhiben actividad chaperona (Kwak et al., 2011) y están implicados en la exportación de mRNAs desde el núcleo hacia el citoplasma bajo estrés por frío (Kim et al., 2007).

Las firmas GGA [A/G] se unen a muchas RBP en plantas: proteínas ricas en serina/arginina, proteínas de choque frío y eIF4B, una proteína de unión a ARN de 59 kDa, el factor de iniciación menos conservado entre los eucariotas (Browning, 2004) que mejora la actividad helicasa del RNA de eIF4A (Bi et al., 2000), 18S rRNA (Bailey-Serres, 1999) y también se une a PAPB (Le et al., 1997, Cheng y Gallie, 2006), una interacción que aumenta la afinidad de PABP por secuencias poli (A) (Le et al., 2000). Además, de su interacción con PABP, eIF4B interactúa con eIFiso4G (una isoforma de eIF4F en plantas) incrementando las actividades de ATPasa y RNA helicasa asociadas con eIFiso4F (Bi y Goss, 2000), interacción conservada en animales y plantas (Cheng y Galle, 2010). eIF4B también ayuda a organizar el ensamblaje de la maquinaria de inicio de la traducción, estimula la traducción de los mRNAs largos con 5' UTR estructuradas (Sen et al., 2016) y participa en la traducción diferencial de los mRNAs que, a su vez, pueden afectar la cantidad de proteína traducida (Mayberry et al., 2009). Las proteínas de choque frío en las plantas son chaperonas que se unen al ARN y al ADN de doble cadena y desenrollan las hebras de los ácidos nucleicos (Park et al., 2009; Juntawong et al., 2013), están involucrados en la adaptación al frío y la tolerancia (Kim et al., 2007). En las plantas, las proteínas SR30 y SR34 en *Arabidopsis* también participan en la exportación y traducción nuclear de los mRNAs (Michlewski et al., 2008) y pueden tener una función esencial durante el desarrollo temprano de la planta (Lopato et al., 1999).

La UGCU presente en RcLDTM1, se une a la proteína de humanos MBNL1, esta proteína media la regulación del splicing alternativo de pre-mRNAs actuando como activador o represor (Ho et al., 2004); en las plantas es el blanco de unión de proteínas que contienen dominios Znf-CCCH, proteínas de unión al ARN con la capacidad de unirse directamente al ARN, mientras que la mayoría de las otras familias de dedos del zinc se confirman como proteínas de unión a ADN o proteínas de unión (Bai y Tolias, 1996). También posee actividad de unión a ARN (Peng et al., 2012), controla la traducción de sus mRNAs dianas, regula la adenilación y exportación del mRNA (Hurt et al., 2009). [G/C]UUU, la segunda firma presente en RcLDTM1, se une a la proteína de humanos ELAV1, una proteína de unión a ARN que se une a la región 3'-UTR de los mRNAs y aumenta su estabilidad (Tran et al., 2003); en plantas se une a proteínas de unión a poli-A, PAB (Cuadro 3.2). AAAGAAA, la firma presente en VvLDTM1 (Figura 2.3) se une a proteínas ricas en serina/arginina involucradas como represoras del splicing de los pre-mRNAs (Cowper et al., 2001) y

promueven la omisión de exones durante el splicing alternativo (Xiao et al., 2016); de manera similar, en las plantas, SCL33, participa en el reconocimiento de intrones, el ensamblaje de los espliceosomas y puede ser necesario para un splicing preciso de la región 3' de los intrones (Thomas et al., 2012)

La firma UGUA es el blanco de unión a proteínas con dominio *Pumilio* (PUF). Las proteínas PUF son una gran familia de proteínas de unión a RNA que se encuentran en todos los eucariotas. Regula tanto la estabilidad como la traducción mediante la unión específica de secuencia al 3' UTR de los transcritos de mRNAs dianas (Hasan et al., 2014). En *Drosophila*, la presencia de sitios de unión de Pum en 3' UTR retrasa la degradación de los mRNA diana en la fase tardía (cigótica) (Marsolais, 2015). En *Arabidopsis*, APUM5 puede ser un nuevo regulador post-transcripcional de la respuesta al estrés abiótico mediante la unión directa al extremo 3' UTR de los genes diana (Huh et al., 2014).

CmaLDTM1 se une a las enzimas conjugadoras de ubiquitina, implicadas en la degradación de proteínas (Xu et al., 2008), pero también funciona como un represor que evita la acumulación excesiva de proteínas controlando su cantidad mediante la interacción con los miRNAs (Huang et al., 2013).

2.5. Referencias

Aviv T, Lin Z, Lau S, Rendl LM, Sicheri F, Smibert CA: The RNA binding SAM domain of Smaug defines a new family of posttranscriptional regulators. *Nat Struct Biol* 2003, 10: 614-621

Bai C, Tolias PP: Cleavage of RNA hairpins mediated by a developmentally regulated CCCH zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 1996, 16:6661-6667

Bailey-Serres, J. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. *Trends in Plant Science* 1999; 4(4), 142–148.

Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS: MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 2009, 37: W202-208.

Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ: Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell* 2006, 18(12):3443–3457.

Banerjee AK, Lin T, Hannapel DJ: Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiol* 2009, 151 (4):1831–1843.

Bi X, Goss DJ. Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* 2000, 275: 17740-17746.

Browning, K. S. Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochemical Society Transactions*. 2004; 32(4), 589–591.

Carella P, Merl-Pham J, Wilson DC, Dey S, Hauck SM, Vlot C, Cameron RK. Comparative Proteomics Analysis of Arabidopsis Phloem Exudates Collected During the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol*. 2016; 171(2): pp.00269.2016.

Chen H, Rosin FM, Prat S, Hannapel DJ. 2003. Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation. *Plant Physiol*. 132:1391–1404.

Cheng, S., and Gallie, D. R. Wheat eukaryotic initiation factor 4B organizes assembly of RNA and eIFiso4G, eIF4A, and poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem*. 2006; 281, 24351–24364.

Cheng, S., & Galle, D.R. Competitive and Noncompetitive binding of eIF4B, eIF4A and the Poly (A) Binding Protein to Wheat Translation Initiation Factor eIFiso4G. *Biochemistry* 2010, 49 (38), 8251-8265.

Cho, S. K., Kang, I. H., Carr, T., & Hannapel, D. J. (2012). Using the yeast three-hybrid system to identify proteins that interact with a phloem-mobile mRNA. *Frontiers in Plant Science*, 3, 189

Cook K.B., Kazan H., Zuberi K., Morris Q., Hughes T.R. RBPDB: a database of RNA-binding specificities, *Nucleic Acids Research* 2011. 39, D301–D308.

Cowper AE, Caceres JF, Mayeda A, Screaton GR. Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 48908-48914

Denay G, Vachon G, Dumas R, Zubieta C and Parcy F. Plant SAM-domain proteins start to reveal their roles. *Trends Plant Sci* 2017; 22: 718-725.

Duan X, Zhang W, Huang J, Hao L, Wang S, Wang A, Meng D, Zhang Q, Chen Q, Li T. PbWoxT1 mRNA from pear (*Pyrus betulaefolia*) undergoes long-distance transport assisted by a polypyrimidine tract binding protein. *New Phytol.* 2016; 210:511–24.

Fedoroff NV. (2002). RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Cur Opinion Plant Biol*; 5: 452–459.

Figueroa-Yáñez, L., Pereira-Santana, A., Arroyo-Herrera, A., Rodríguez-Corona, U., Sanchez-Teyer, F., Espadas-Alcocer, J., et al. RAP2.4a is transported through the phloem to regulate cold and heat tolerance in papaya tree (*Carica papaya* cv. Maradol): implications for protection against abiotic stress. *PLoS ONE* 2016. 11 (10): e0165030.

Ham BK, Brandom J, Xoconostle-Cazares B, Ringgold V, Lough TJ, Lucas WJ. Polypyrimidine tract binding protein, CmRBP50, forms the basis of a pumpkin phloem ribonucleoprotein complex. *Plant Cell.* 2009; 21:197–215.

Hasan A, Cotobal C, Duncan CD, Mata J. Systematic Analysis of the role of RNA-binding proteins in the regulation of RNA stability. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004684

Haywood V, Yu TS, Huang NC, Lucas WJ: Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J* 2005, 42(1):49-68

Ho, T.H., Charlet, B., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S. and Cooper, T.A. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* 2004. 23, 3103– 3112.

Huang T-K, Han C-L, Lin S-I, Chen Y-J, Tsai Y-C, Chen Y-R, Chen J-W, Lin W-Y, Chen P-M, Liu T-Y, Chen Y-S, Sun C-M, Chiou T-J. Identification of Downstream Components of

Ubiquitin-Conjugating Enzyme PHOSPHATE2 by Quantitative Membrane Proteomics in *Arabidopsis* Roots. *The Plant Cell*. 2013; 25 (10):4044–4060.

Huh S, Paek K-H. APUM5, encoding a Pumilio RNA binding protein, negatively regulates abiotic stress responsive gene expression. *BMC Plant Biology*. 2014; 14(1):75.

Hurt JA, Obar RA, Zhai B, Farny NG, Gygi SP, Silver PA: A conserved CCCH-type zinc finger protein regulates mRNA nuclear adenylation and export. *J Cell Biol* 2009, 185(2):265–277.

Juntawong P, Sorenson R, Bailey-Serres J. Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2013; 74(6):1016–1028.

Kanehira A, Yamada K, Iwaya T, Tsuwamoto R, Kasai A, Nakazono M, et al. Apple phloem cells contain some mRNAs transported over long distances. *Tree Genet Genomes*. 2010;6(5):635–42

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 2002, 30: 3059–66.

Kehr J, Buhtz A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany* 2007. 59 (1): 85-92

Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Kim JY, Song J, et al. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 506 - 516

Kwak KJ, Park SJ, Han JH, Kim MK, Oh SH, Han YS, Kang H. Structural determinants crucial to the RNA chaperone activity of glycine-rich RNA-binding proteins 4 and 7 in *Arabidopsis thaliana* during the cold adaptation process. *Journal of Experimental Botany*. 2011; 62(11):4003–4011.

Le, H., Browning, K. S., and Gallie, D. R. The phosphorylation state of poly(A)-binding protein specifies its binding to poly(A) RNA and its interaction with eukaryotic initiation factor (eIF) 4F, eIFiso4F, and eIF4B. *J. Biol. Chem*. 2000; 275, 17452–17462.

Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C.-C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J., and Gallie, D. R. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem* 1997. 272, 16247–16255.

Li CY, Zhang K, Zeng XW, Jackson S, Zhou Y, Hong YG. A cis element within Flowering Locus T mRNA determines its mobility and facilitates trafficking of heterologous viral RNA. *Journal of Virology* 2009. 83: 3540–3548

Lopato S, Kalyna M, Dorner S, Kobayashi R, Krainer AR, Barta A. atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes & Dev* 1999; 13: 987–1001

Louie, E., Ott, J., & Majewski, J. (2003). Nucleotide frequency variation across human genes. *Genome Research*, 13(12), 2594–2601.

Mahajan A, Bhogale S, Kang IH, Hannapel DJ, Banerjee AK. The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile. *Plant Mol Biol*. 2012;79 (6):595–608.

Marsolais, JA. Regulation of mRNA stability by the RNA-Binding Protein Pumilio during Early *Drosophila* Embryogenesis [Ph.D. Thesis]. [University of Toronto]; 2015. p. 1–136.

Mayberry LK, Allen ML, Dennis MD, Browning KS. Evidence for Variation in the Optimal Translation Initiation Complex: Plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F Differentially Promote Translation of mRNAs. *Plant Physiology* 2009; 150(4):1844–1854.

Michlewski G, Sanford JR, Cáceres JF. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Molecular Cell*. 2008; 30 (2): 179–89.

Nguyen CD, Mansfield RE, Leung W, Vaz PM, Loughlin FE, Grant RP, Mackay JP. Characterization of a Family of RanBP2-Type Zinc Fingers that Can Recognize Single-Stranded RNA. *Journal of Molecular Biology*. 2011; 407(2):273–83.

Park SJ, Kwak KJ, Oh TR, Kim YO, Kang H. Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol* 2009; 50:869–878

Peng X, Zhao Y, Cao J, Zhang W, Jiang H, Li X, Ma Q, Zhu S, Cheng B. CCCH-Type Zinc Finger Family in Maize: Genome-Wide Identification, Classification and Expression Profiling under Absciscic Acid and Drought Treatments. *PLoS ONE*. 2012; 7(7): e40120.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 1999; 126: 4405-19.

Sen ND, Zhou F, Harris MS, Ingolia NT, Hinnebusch AG. eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5' UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016; 113(38):10464–10472.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol* 2011. 7, 539.

Sonnhammer ELL, Eddy SR, Durbin R: Pfam: A comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* 1997, 28: 405-420.

Thomas J, Palusa SG, Prasad KV, Ali GS, Surabhi GK, Ben-Hur A, Abdel-Ghany SE, Reddy AS: Identification of an intronic splicing regulatory element involved in auto-regulation of alternative splicing of SCL33 pre-mRNA. *Plant J*. 2012, 72: 935–946

Tran H, Maurer F, Nagamine Y: Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7177-7188.

Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.S., Hao, Y.J., Sun, B.F., Sun, H.Y., Li, A., Ping, X.L., Lai, W.Y., et al. Nuclear m⁶ A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol. Cell* 2016. 61, 507–519.

Xu, L., Menard, R., Berr, A., Fuchs, J., Cognat, V., Meyer, D., Shen, W.-H. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2008; 57: 279-288.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS IN SILICO DEL mRNA Y DE LA PROTEÍNA CpRAP2.4a

3.1. Introducción

Entre los factores de transcripción involucrados en respuesta a estrés bien conocidos están las proteínas que se unen a los elementos de respuesta a la deshidratación (DRE), los DREBs (Liu et al., 1998; Thomashow, 1999). La familia de proteínas DREB pueden ser divididas en seis pequeños grupos (A-1 a A-6) basado en su similaridad en el dominio que se une a ADN, APETALA 2 (AP2) [Sakuma et al., 2002].

Un miembro de esta superfamilia es el factor de transcripción AtRAP2.4 (Lin et al., 2008). RAP 2.4 es un miembro del grupo A-6 (Dong y Liu, 2010), funciona como un transactivador de genes mediados por DRE y ERE (elementos de respuesta al etileno) que surgen como respuesta a luz, etileno y sequía (Sun et al., 2008), sugiriendo que RAP 2.4 actúa en la interrelación entre las vías metabólicas de la luz y el etileno para coordinadamente regular múltiples procesos de desarrollo y respuesta al estrés (Lin et al., 2008)

Recientemente, Figueroa-Yáñez et al., (2016) caracterizaron dos genes de papaya, CpRAP2.4a y CpRAP2.4b, los cuales se inducen ante diferentes tipos de estrés. Su análisis funcional reveló que su sobre-expresión es capaz de inducir termo-tolerancia. Quizá más interesante, resulta el hecho de que al trans-injertar plantas sobre-expresoras de CpRAP2.4a y CpRAP2.4b, se observa la movilización tanto del mRNA como de la proteína a través de la planta, vía tejido vascular y exclusivamente en sentido acropétalo (Figueroa-Yáñez et al., 2016). Este fenómeno no se ha reportado para ningún FT del grupo RAP2.4, pero sí se ha descrito para otros FT como FLORICAULA, LEAFY, GLOBOSA y DEFICIENS (Mezitt y Lucas, 1996; Sessions et al., 2000).

3.2. Materiales y Métodos

El gen CpRAP2.4a cuyo número de acceso en GENBANK es KU065114.1 y cuyo gen ortólogo en el transcriptoma en la papaya cv. Sunup es NW_019014656.1 se sometió a un análisis de los componentes del mRNA y de la proteína traducida. La secuencia de mRNA se analizó en RegRNA2.0 (Chang et al., 2013) para la búsqueda de sitios funcionales y en la base de datos RBPDB (Cook et al., 2011) para la búsqueda de firmas y proteínas de unión a RNA asociadas. La proteína se analizó con Pfam para la búsqueda de dominios

funcionales (El-Gebali et al., 2018) y KinasePhos2.0 para predecir los sitios de fosforilación de la proteína (Wong et al., 2007). El diagrama de los sitios funcionales del mRNA se hizo con el software Illustrator for Biological Sciences (Liu et al., 2015).

3.3. Resultados

El mRNA de CpRAP2.4a posee 2043 bp, con una extensión de 638 nucleótidos en el 5' UTR, 1116 nucleótidos en la región codificante y 289 nucleótidos en el 3' UTR para el cultivar SunUp que no difiere en las UTR del cultivar Maradol, pero si en la región codificante, que presenta únicamente 855 nucleótidos. La estructura secundaria del mRNA de CpRAP2.4a se sometió a un análisis con el software RNAfold webserver del Instituto de Química de la Universidad de Viena (Gruber et al., 2008) y el resultado se muestra en la figura 3.1.

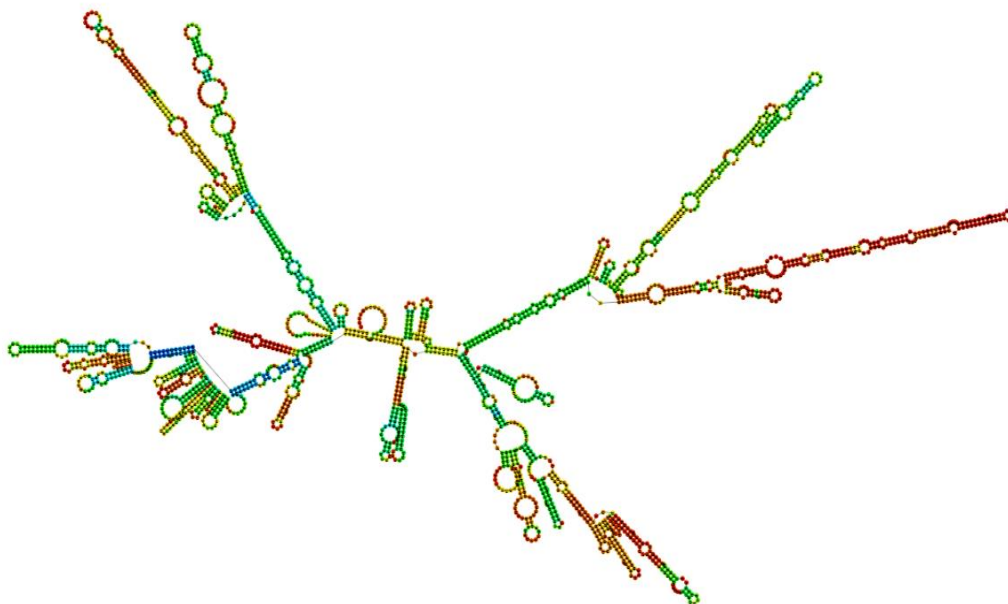


Figura 3.1. Estructura secundaria MFE del mRNA de CpRAP2.4a

La proteína de CpRAP2.4a en el cultivar Maradol tiene 284 aa (Figuerola-Yañez et al., 2016), con un peso molecular de 31.9 KDa y un punto isoeléctrico de 9.1. La estructura de la proteína fue realizado con el servidor I-Tasser (Zhang, 2008) y el resultado se muestra en la figura 3.2.



Figura 3.2. Estructura de la proteína CpRAP2.4a

RAP2.4a es un factor de transcripción muy importante en diversas plantas y cuya función ha sido descrita en *Arabidopsis*, tiene un dominio AP2/ERF muy característico de 57 aa (84-141, de color verde en la figura 3.2) y su mRNA muestra sitios funcionales muy importantes (Figura 3.3): aumentadores de splicing exónico (*exon splicing enhancer*, *ESE*), silenciadores de splicing exónico (*exon splicing silencer*, *ESS*), aumentadores de splicing intronico (*intron splicing enhancer*, *ISE*), sitios de poliadenilación (*PAS*), elementos de unión a Musashi (*Musashi binding element*, *MBE*).

En el 5' UTR se encuentran 19 dominios CU y 5 firmas UGUA; en el 3' UTR se encuentran 4 dominios CU y 7 firmas UGUA (Figura 3.4)

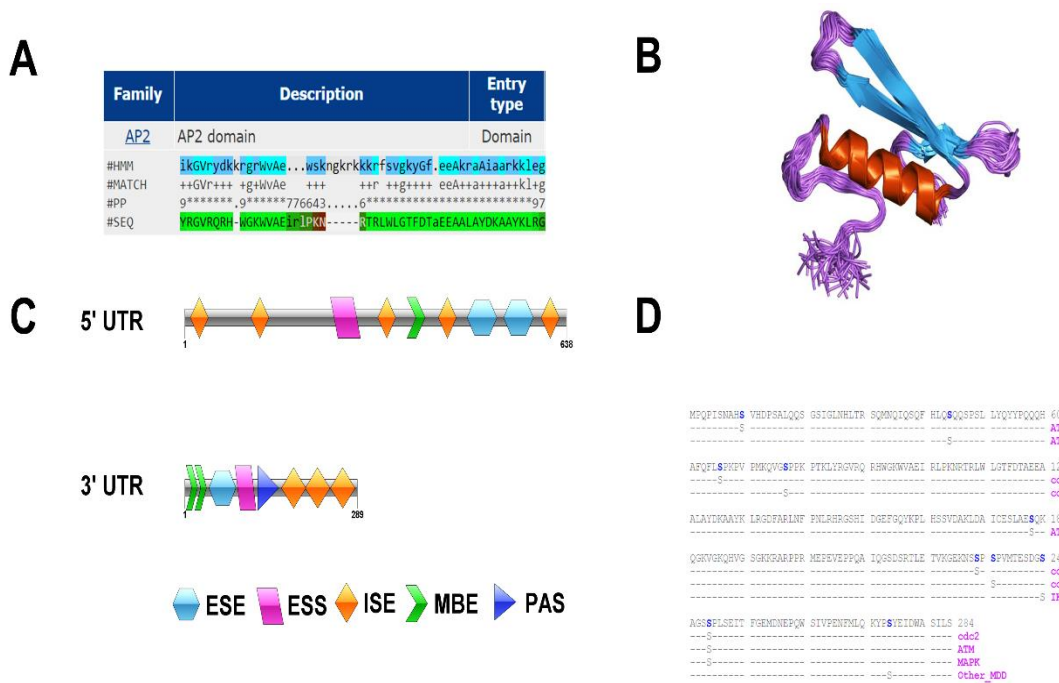


Figura 3.3. Caracterización funcional de mRNA y de la proteína CpRAP2.4a. A) Dominio AP2 en Pfam, B) Estructura 3D, C) Sitios funcionales de RNA en los UTRs, D) Sitios de fosforilación y quinasas respectivas en la secuencia.

5' UTR

GUUGAGGGUCAUUCACACCAGAAAAAGAGAGAAAACCAGAGAGAAAAA
AAUUAGAGUGGUGAGAUCAAUUGAGUGAAUAGGACGUUCAGGUGUUUUCUUCU
ACUUCUCCUCCCCCCCCUUCUCUGUAACAUCGCCGCUUCUCUGAAUCCCUUUCUG
UUAUUAUCUGUCUUUCAAAGAGAAUUCUUGAUUUUAGGUUUGUGUUCUCAACGCA
AAAAUAUGGAUAGAAAGCAAACUUAAGAAGGGUUUUCUUAAGAAAGCCAGGUGUUU
UCAGAAUCGAGAUCCAGGUUCUUGUUUUAUUAUUUUUUAAGGCUUUUUUUUUUU
UUUUCUGUGUCCUUGUUAUCUGAUUUUUCUUUUUUAUUUUUUUUUUUGUAUUUU
UCGUGUAAGAGAAAUACAGCUUGGAGGGUGAUUUUUGGUUCCCUCAUAGUUGGUUU
UGUAAGUUCUUGAUUUUAAGGGGUUGCUUUAUUUGAAACCUCUUGAUCUUUUUC
UGUUGUAAGAAAGAGCAGCUCUUUUUAUUAAAAAAUUAUUUGGUGCCUGUCUC
UUUUUAAUCUUGACAAGAAGCAGGUUAAUUUCAUAAUUUUCUCUGUCGUCUCAAG
UCAAAAAUUUCUUCAGUCUCUAAGAU

3' UTR

AUAUUUGUAGUUCUGUGGUUUUAGUUUAUGAUGUAUGUCAUUGUAGUGGGA
GAUUAGGAGUGGGUAACGGUCCGUGCAUUGAAGUUUUUGGCAUUGCAGGGUCC
AAUGUGAAGUGAGUCGUUUAGGGUAAUAAAGCAGUACUGUAAUUAUUUUUGUAU
AAUGUCCACCGCUGUCAGCUGGUUUUUUGUCUAGACCGGUGAGAUAAU
CUUGUAUAGCAUGUGUAAGAUUUAGAGUUUGUAUUGAAUUUGUUUGAAAGUU
UGUCUCUGUUUA

Figura 3.4. Dominios CU y UGUA presentes en los UTRs del mRNA de CpRAP2.4a

3.4. Discusiones

RAP2.4a es un factor de transcripción muy importante en plantas superiores, que pertenece a la superfamilia AP2/ERF, que se caracteriza por poseer un dominio de aproximadamente 60 aminoácidos. En este capítulo se estudiaron *in silico* las propiedades de su mRNA y de la proteína traducida CpRAP2.4a. Figueroa-Yañez et al. (2016) demostraron la movilidad del mRNA del patrón transgénico hacia hojas de plantas silvestres (no transformadas o wild type), a través de injertos intra-específicos de tabaco y la proteína quimérica fusionada con GFP fue detectada en hojas no transformadas de tabaco lo que involucra un transporte a larga distancia. Como se observa en la figura 3.3, el mRNA de CpRAP2.4a muestra sitios funcionales muy importantes como aumentadores y silenciadores intrónicos y exónicos (ESE, ESS, ISE), muy importantes en la identificación correcta de los sitios de empalme por la maquinaria celular, así como también de sitios de unión a elementos Musashi, involucrados en regulación temporal de la traducción en otros organismos como *Drosophila* (Bertolin et al., 2016). Asimismo, tiene dominios CU y UGUA importantes en el transporte a larga distancia en plantas, el primero porque permite la formación de complejos ribonucleoproteicos al ser el blanco de unión a proteínas PTB y el segundo de proteínas PUF con dominio Pumilio que al interactuar con otras proteínas de unión a RNA presentes en ambos UTR incrementa la estabilidad de los mRNAs translocables. La proteína contiene el dominio AP2 y también presenta sitios de fosforilación por diversas quinasas, así como su transporte es dado por su pequeño peso molecular que no supera los 70 kDa, peso molecular máximo para el transporte simplástico por los plasmodesmos (Paultre et al., 2016)

3.5. Conclusiones

CpRAP2.4a es un factor de transcripción en papaya Maradol involucrado en muchos estreses ambientales como estrés por temperaturas, sequía y luz, presenta transporte a larga distancia en el floema ejerciendo un efecto fisiológico otorgándole mayor resistencia a estrés y es parte de una respuesta rápida para prevenir daños causados por el estrés. Este transporte a larga distancia es mediado por dominios CU y otros presentes en sus UTRs que le permiten unirse a diferentes proteínas de unión a RNA (RBPs) y transportarse en forma de complejo ribonucleoproteico, asimismo la proteína se transporta gracias a su

pequeño peso molecular y la capacidad de moverse por los poros plasmodésmicos a través del simplasto.

3.6. Referencias

Bertolin AP, Katz MJ, Yano M, Pozzi B, Acevedo JM, Blanco-Obregon D, et al. (2016). Musashi mediates translational repression of the *Drosophila* hypoxia inducible factor. *Nucleic Acids Res*; 44:7555

Chang TH, Huang HY, Hsu JB, Weng SL, Horng JT, Huang HD. (2013) An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. *Bmc Bioinformatics*, 14 Suppl 2: S4

Dong, C.-J., & Liu, J.-Y. (2010). The Arabidopsis EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BMC Plant Biology* 10:47.

El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, et al. (2018). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47 (1): D427–D432

Figuroa-Yáñez, L., Pereira-Santana, A., Arroyo-Herrera, A., Rodríguez-Corona, U., Sanchez-Teyer, F., Espadas-Alcocer, J., et al. (2016). RAP2.4a is transported through the phloem to regulate cold and heat tolerance in papaya tree (*Carica papaya* cv. Maradol): implications for protection against abiotic stress. *PLoS ONE* 11: e0165030. doi: 10.1371/journal.pone.0165030

Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server):70-74

Lin RC, Park HJ, Wang HY. (2008). Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating light and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. *Mol Plant*, 1:42-57.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with EREBP/ AP2 DNA binding domain

separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10:1391-1406.

Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., et al. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*. 31, 3359–3361.

Mezitt, L. A and Lucas, W. J. (1996). Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol. Biol.* 32, 251-273.

Paultre DSG, Gustin M-P, Molnar A, Oparka KJ. (2016). Lost in transit: long-distance trafficking and phloem unloading of protein signals in *Arabidopsis* homografts. *Plant Cell*, 28: 2016-2025.

Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 290:998-1009.

Sessions, A., Yanofsky, M.F., and Weigel, D. (2000). Cell–cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* 289, 779–781

Sun S, Yu JP, Chen F, Zhao TJ, Fang XH, Li YQ, Sui SF. (2008). TINY, a DREB-like transcription factor connecting the DRE- and ERE-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 283: 6261-6271.

Thomashow MF. (1999). Plant Cold Acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:571-599.

Wong YH, Lee TY, Liang HK, Huang CM, Wang TY, Yang YH, Chu CH, Huang HD, Ko MT and Hwang JK. (2007). KinasePhos 2.0: a web server for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites based on sequences and coupling patterns. *Nucleic Acids Res*, 35 Web Server: W588–594.

Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9 (1):40

CAPITULO IV. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES GENERALES

4.1. Discusión general

La movilidad de muchas macromoléculas específicas de información como mRNAs y proteínas ha sido demostrada mediante experimentos de injertos intra- e inter-específicos (Ruiz-Medrano et al., 1999). Es bien conocido que aparte de nutrientes y fitohormonas, moléculas de RNA pueden ser transportados en el floema como complejos ribonucleoproteicos para evitar la degradación y permanecer estables y funcionales durante su transporte a larga distancia en el floema (Kehr y Buhtz, 2007; Pallas y Gómez, 2013). Pero una pregunta que siempre ha existido en este fenómeno es cómo ciertos mRNA se pueden transportar a larga distancia y otros no son capaces de hacerlo; muchos autores discuten esta pregunta bajo dos hipótesis en la última década: un enfoque "selectivo" (Li et al., 2009; Banerjee et al., 2009; Thieme et al., 2015) y otro enfoque "no selectivo" (Calderwood et al., 2016; Zhang et al., 2016).

El enfoque selectivo establece que no todos los mRNAs producidos en una planta se transportan a larga distancias y ejercen un efecto en un proceso fisiológico, lo que implica una fuerte selección. Para demostrar que son mRNAs funcionales a larga distancia, debe haber un cambio en la concentración del mRNA con el tiempo, luego una translocación de un órgano a otro y finalmente un resultado medible en la fisiología de la planta o en su fenotipo (Morris, 2018). Los mecanismos intrínsecos de selectividad residen en dos componentes: a) las características del RNA translocable (su secuencia, carga, longitud, contenido del par de bases) y la presencia de chaperonas esenciales o socios de unión que permiten su movimiento y b) la degradación selectiva de los mRNAs durante su transporte en el floema (Turnbull y López-Cobollo, 2013).

Dentro del primer componente, hay otro término relacionado con la capacidad de unirse a proteínas de unión a RNA, la "especificidad", se refiere a la presencia de firmas o "*zip codes*" dentro de las secuencias de los mRNAs, en las regiones no traducidas (Banerjee et al., 2009) y en la secuencia codificante que permiten su transporte selectivo en el floema (Li et al., 2009). Por lo tanto, en este estudio analizamos dentro de los UTRs, la longitud, la secuencia, el contenido de pares de bases, AU, GC, UC, AG y no encontramos diferencias estadísticas entre los mRNAs translocables y no translocables en los mRNAs del factor de

transcripción BEL (Figura 3.1). Pero encontramos diferencias en firmas estructurales, particularmente en los sitios de unión a RBPs, el extremo 3' UTR es más grande que el extremo 5' UTR y contiene más sitios de unión a muchas RBPs, por lo que hay mayor cantidad de éstas (Figura 3.1 y 3.2). Pero todos los RNAs contienen elementos reguladores, como factores que actúan en cis y en trans ubicados en ambas regiones no traducidas, por lo que estas regiones tienen un papel fundamental en el control de la expresión génica a nivel post-transcripcional, que es importante durante el crecimiento y desarrollo de la planta; por lo tanto, no se trata de tener muchas o pocas proteínas de unión a RNAs en las UTR, sino de tener RBPs que desempeñan un papel predominante en la estabilidad de los mRNAs (Figura 3.2), como es el caso de RNAs translocables que tienen proteínas PAB, eIF4B, PUF y PTB que interactúan entre sí para aumentar la estabilidad de los mRNAs, factor clave en el movimiento a larga distancia.

El enfoque no selectivo sugiere que el transporte a larga distancia de los RNAs puede explicarse por la abundancia de transcritos presentes en las células acompañantes circundantes a los elementos cribosos y su vida media bajo un equilibrio entre estos dos componentes llevado a cabo por las regiones no traducidas que contienen elementos que aumentan la vida media de los transcritos. Zhang et al. (2016) apoyan los hallazgos de Calderwood et al. (2016), al demostrar que algunos mRNAs que no se ajustan al modelo de abundancia se pueden movilizar a través de estructuras similares a tRNA presentes en estos mRNA. Sin embargo, estos autores aceptan que una población relativamente pequeña de mRNAs puede moverse a través de un mecanismo diferente, la movilización selectiva.

Sobre la base de nuestros resultados obtenidos, se observa que ambos enfoques no son mutuamente excluyentes, el transporte de los RNAs funcionales se realiza de forma selectiva y la gran cantidad de transcritos que se transportan en largas distancias muestra que el segundo enfoque lo explica muy bien, apoyado en la estabilidad de los mRNAs, factor diferencial y clave, debido a que los mRNAs más estables se pueden transportar a larga distancia y esta estabilidad viene dada por las múltiples proteínas de unión al ARN que forman complejos ribonucleoproteicos con ellos.

4.2. Conclusiones generales

El análisis computacional de las secuencias de RNAs translocables en este estudio ha descubierto nuevos actores involucrados en el transporte a larga distancia de los RNAs y cómo pueden movilizarse evitando la degradación. Las firmas de transporte a larga distancia de las plantas son regiones que contienen múltiples dominios reclutando diversas proteínas de unión a ARN involucradas en los procesos pre y post-transcripcionales de los RNAs translocables que ayudan a estabilizarlos y aumentar su vida media, por lo tanto moverse dentro del floema en conjunto con proteínas socias de tipo PTB que tienen múltiples dominios RRM y previenen la degradación durante su transporte en el floema como complejos ribonucleoproteicos. Además, encontramos firmas de transporte de larga distancia ricas en bases GA, diferentes de lo que se ha encontrado hasta ahora, ampliando la posibilidad de que estas firmas se puedan vincular a otras proteínas clave en la formación de complejos RNP o sean anclajes de proteínas que sirvan para estabilizar los RNAs translocables.

4.3. Perspectivas

En el presente estudio se llevó a cabo el estudio de miles de secuencias de RNAs translocables en el floema y se han descubiertos nuevas proteínas de unión a RNA que le otorgan estabilidad en su transporte a larga distancia; sin embargo, aún falta conocer la función de estos, por ejemplo, las proteínas PUF, y su interacción con otras proteínas como PAB, eIF4B y PTB. Para demostrar la funcionalidad de dichas proteínas se pueden estudiar mutaciones puntuales tanto en sitios de reconocimiento de las proteínas como en las firmas que las reconocen en los RNAs.

También se plantea la generación de secuencias similares de DNA/RNA o pequeños mRNAs que contengan las firmas de transporte a larga distancia (LDTMs) y sitios de reconocimientos a proteínas descubiertas en el presente experimento. Añadirles un fluoróforo en el extremo 5' o 3' y rastrear su transporte con técnicas de microscopía electrónica y confocal.

4.4. Referencias

Banerjee AK, Lin T, Hannapel DJ: Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiol* 2009, 151 (4):1831–1843.

Calderwood A, Kopriva S, Morris RJ. Transcript abundance explains mRNA mobility data in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2016; 28: 610–5.

Kehr J, Buhtz A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany* 2007. 59 (1): 85-92

Li CY, Zhang K, Zeng XW, Jackson S, Zhou Y, Hong YG. A cis element within Flowering Locus T mRNA determines its mobility and facilitates trafficking of heterologous viral RNA. *Journal of Virology* 2009. 83: 3540–3548

Morris RJ. On the selectivity, specificity and signalling potential of the long-distance movement of messenger RNA. *Current Opinion in Plant Biology*. 2018; 431–7.

Pallas V, Gomez G. Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system. *Frontiers Plant Sci* 2013, 4:130.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 1999; 126: 4405-19.

Thieme, C.J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., Miñambres, M., Walther, D., Schulze, W.X., Paz-Ares, J., Scheible, W.-R., and Kragler, F. Endogenous *Arabidopsis* messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat. Plants* 2015. 1: 15025

Turnbull CG, Lopez-Cobollo RM. Heavy traffic in the fast lane: long-distance signalling by macromolecules. *New Phytologist* 2013. 198, 33–51.

Zhang, W., Thieme, C., Kollwig, G., Apelt, F., Yang, L., Winter, W., Andresen, N., Walther, D., and Kragler, F. tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants. *Plant Cell* 2016. 28: 1237–1249.

ANEXOS.

Anexo 1. Firmas de RNA encontradas en siete especies vegetales

Nombre	Firma	Mejor match	e-value	Sitios	Longitud	RNA-binding domains
<i>Apium graveolens</i> (n=956)						
AgLDTM1	GGCACSAGV	GGCACCAGG	9E-148	625	9	RRMx1
AgLDTM2	UGHWGMUGCUGMUSHUD YUG	UGCUGCUGCUGCUGCUG CUG	4.90E-14	427	20	Znf_CCCHx4
AgLDTM3	CHUCUYCHUCYHYYUCUY YY	CCUCUCCCUCUCUCUCU CCC	2.30E-06	208	20	PTB, RRMx1
AgLDTM4	MWARRRRGAWGGAAAAR AAG	AAAGGGGGAAGGAAAAG AAG	1.30E-02	103	20	RRMx1, RRMx2
AgLDTM5	AKCUYCSUUCUKGUUURC UG	AGCUCCCUUCUGGUUUG CUG	3.40E-03	8	20	Znf_CCCHx4, RRMx3
<i>Arabidopsis thaliana</i> (n=3246)						
AtLDTM1	GAAGAAGAARRWRRARRA R	GAAGAAGAAGGUGGAGG AG	3.30E-17	3245	19	RRMx1, RRMx2, Znf_RanBP2x1

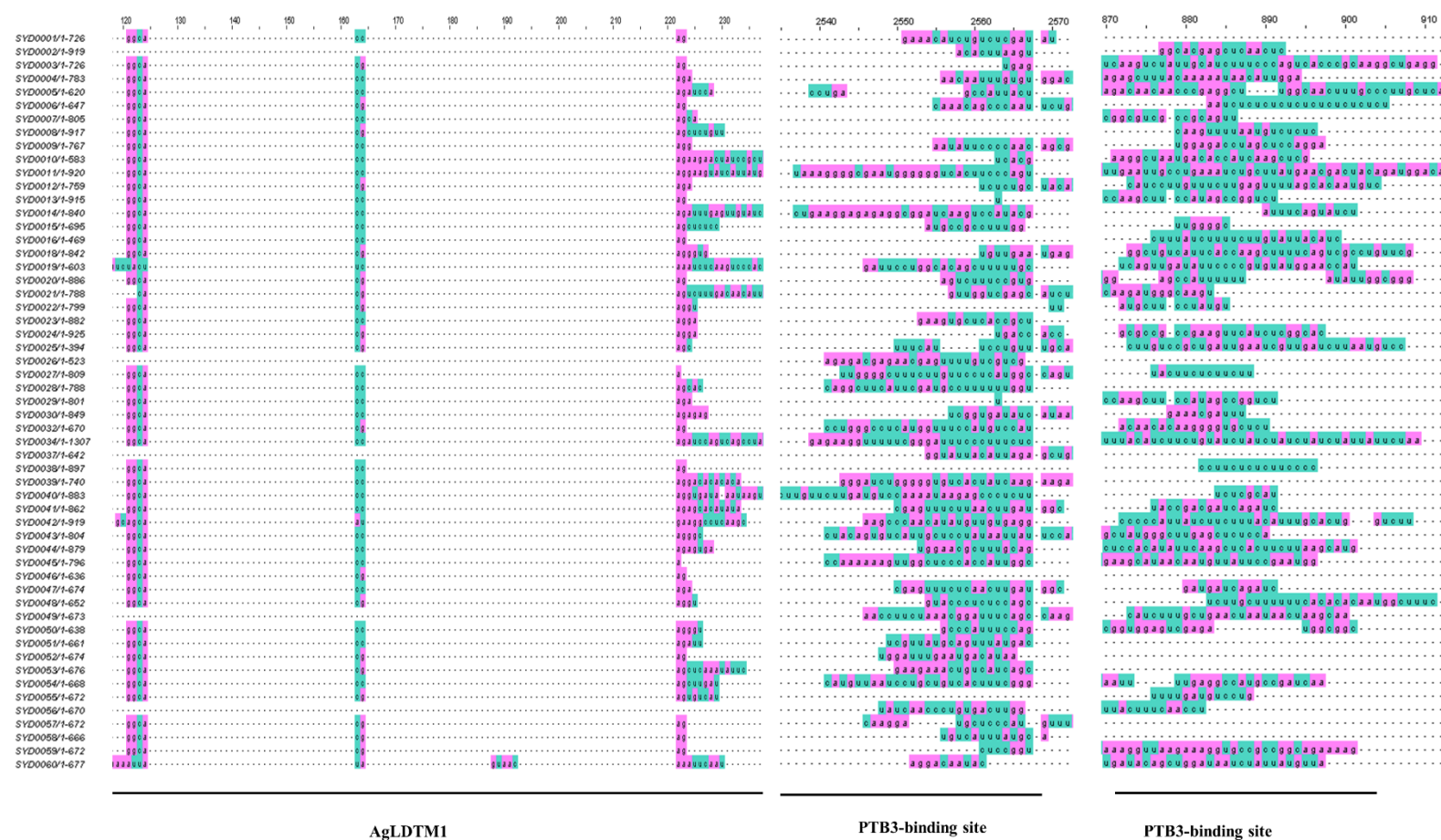
AtLDTM2	YYYUYYUUCUUYUUCUYYU Y	UUUUUCUUCUUCUUCUU UUU	2.70E-33	3224	20	PTB, RRMx3, KHx4
AtLDTM3	UUUUUKUYUUUBKBUUUNU BU	UUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUU	6.40E-07	3147	20	RRMx3
AtLDTM4	GRWGHUGWDGWWGMWG ADDH	GGUGUUGUUGGUGCUGA UUU	2.60E-10	3023	20	RRMx1, RRMx3, Znf_RanBP2x1, Znf_CCCHx4
AtLDTM5	ARRARAARNWDSAAAAGN WD	AGGAGAAGUUUGAAAAG UUU	1.30E-05	2948	20	RRMx1, RRMx2, RRMx3
<i>Citrullus lanatus (n=1517)</i>						
ClaLDTM1	GGHGDDGNYGGHGRMRG HGG	GGCGGGGGUGGUGGCG GCGG	4.40E-10	1338	20	RRMx1; Znf_RanBP2x1, SAMx1, CSDx1
ClaLDTM2	UYUUYUUYUUUUUYUUYU UY	UCUUCUUCUUUUUCUUC UUC	2.40E-07	1301	20	PTB, RRMx3, KHx4
ClaLDTM3	AARAARAAAAARAARA A	AAAAAGAAAAAGAAGAAG AA	2.60E-18	620	20	RRMx1, RRMx4
<i>Cucumis melo (n=1774)</i>						
CmLDTM1	UBUUCUUYW	UCUUCUCCU	6.30E-09	1749	10	PTB, YTHx1

CmLDTM2	RRARGAAGAR	GAAGGAAGAA	7.60E-34	1493	10	RRMx1, RRMx2
CmLDTM3	UGCUAARKUUGVWGKSRA UG	UGCUGAAUUUGCUGUGG AUG	2.90E-59	489	20	Znf_CCCHx4, RRMx2, RRMx3, KHx1
CmLDTM4	UUGRWUWAAAAUUMABAA UG	UUGGAUUAAAAUUCACAA UG	1.90E-45	199	20	RRMx1, RRMx2, KHx1
CmLDTM5	ACAAWGMMUMUGARGAU AAH	ACAAAGCCUCUGAAGAU AC	9.60E-48	174	20	RRMx4, KHx1
CmLDTM6	GAWKGCWYYKGAYGUKUK MG	GAAGGCUUCGGACGUGU GAG	7.30E-29	173	20	RRMx1, RRMx2, Znf_CCHCx1
CmLDTM7	CYAAAGAUGGVAAGAAAAU G	CCAAAGAUGGGAAGAAAA UG	3.50E-66	170	20	RRMx1, RRMx2
CmLDTM8	KCCAAUKGUAUUGGYAAG CC	UCCAAUGGUAAUGGUAA GCC	5.20E-38	165	20	KHx1, Znf_RanBP2x2
CmLDTM9	AAGGRKKGGWKCAARAKY CA	AAGGGGUGGUUCAAGAU CCA	4.40E-41	156	20	RRMx1; Znf_RanBP2x1, CSDx1
CmLDTM1 0	UGABUYUGGYCKUUGGAG UU	UGACUCUGGCCGUUGGA GUU	1.00E-33	150	20	RRMx1, RRMx2, RRMx3, SAMx1
<i>Cucumis sativus</i> (n= 1110)						

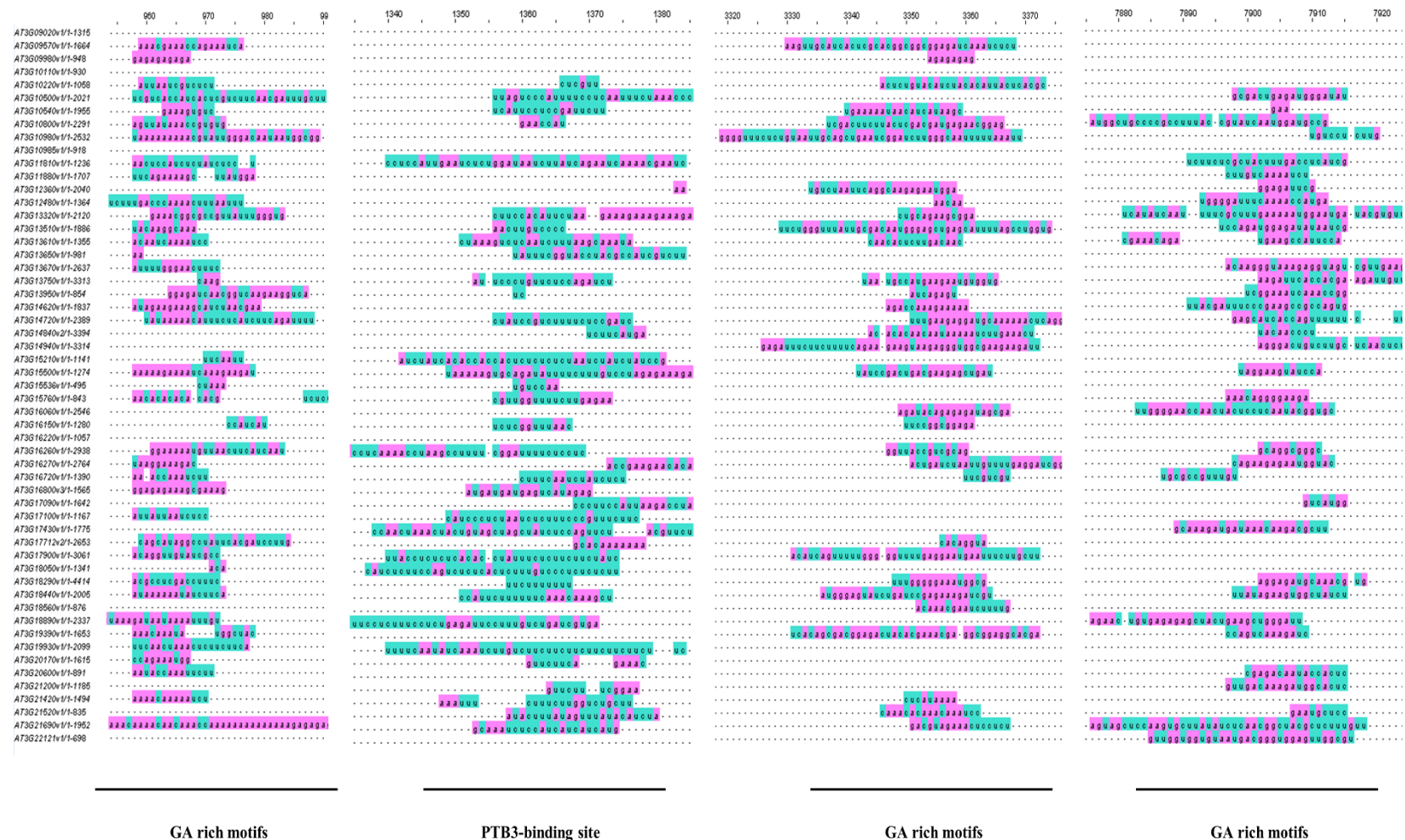
CsLDTM1	KGRWGRWGRARRWGRDG RWG	UGGAGGUGGAGGAGGG GGAG	1.50E-09	1103	20	RRMx1, RRMx2, Znf_RanBP2x1
CsLDTM2	YUUYUYUUYUYUYUYUY U	CUUCUUCUUCUUCUUCU UCU	2.40E-35	984	20	PTB, RRMx3, KHx4
CsLDTM3	BCWYYYYCHYUYUCUYU YY	CCUCCUCCCCUUCUCC UCC	2.40E-12	885	20	PTB, RRMx1, RRMx3, KHx4
CsLDTM4	AAAAAAGAAAAA	AAAAGAAAAAAGAAAA	1.50E-09	872	15	RRMx1, RRMx4
CsLDTM5	YYYYCUUCWUCHUC	CCCCCUUCUCCUC	1.80E-13	828	14	PTB, YTHx1, KHx4
CsLDTM6	UUUUUUUKUUUUUKDDWU KK	UUUUUUUGUUUUUGGGA UUG	2.80E-02	391	20	RRMx3
CsLDTM7	KCRGCRSCGVCGGCVVYR G	GCGGCGGCGGCGGCGG CGG	1.20E-02	83	19	RRMx2; Znf_CCHCx1, CSDx1
<i>Ricinus communis (n= 158)</i>						
RcLDTM1	BUUUYUKYUUYUUBUKYUK K	CUUUCUGCUUCUUCUUC UUU	5.10E-68	157	20	RRMx3, Znf_CCCHx4, KHx1, CSDx1
RcLDTM2	KSNUGMHVHDGYUGMWG MUG	GCCUGCCCCUGCUGCUG CUG	4.80E-31	107	20	RRMx1, CSDx1, YTHx1, Znf_CCCHx4

<i>Vitis vinifera</i> (n= 3268)						
VvLDTM1	VAAAAAARAAAAA	GAAAAAAAAGAAAA	1.20E-03	3224	15	RRMx4, Znf_CCCHx2
VvLDTM2	UUUUUUUUUYUUUUU	UUUUUUUUUCUUUUU	4.30E-03	2888	15	RRMx3
VvLDTM3	YYCYUCUYMUCUCUY UC	CCUCUCUCUCCUCUCU CUC	1.50E-02	2712	20	RRMx1
VvLDTM4	AAWAAAAAAAAARWAAAA AA	AAAAAAAAAAAAAGAAAA AAA	3.70E-04	2692	21	RRMx1, RRMx4, Znf_CCCHx2
VvLDTM5	GKDGDRRGRRRRRGKKR RR	GGGGGGGGGGGGGGGGG GGGG	2.20E-06	2650	20	RRMx1, SAMx1, Znf_RanBP2x1
VvLDTM6	HUCWUCUUCUUCWB	CUCUUCUUCUUCUC	1.10E-02	1935	14	KHx4

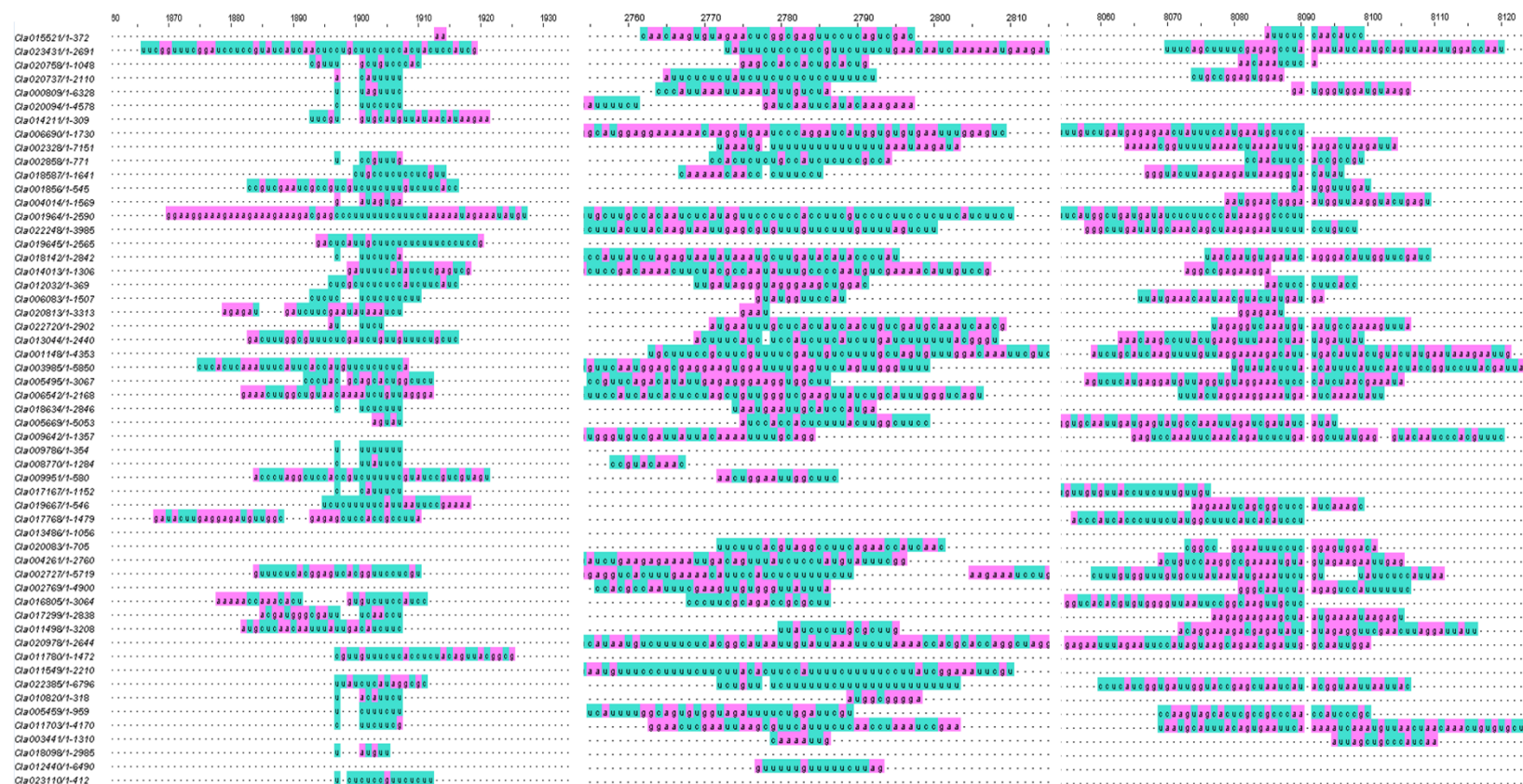
Anexo 2. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de *Apium graveolens*.



Anexo 3. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de *Arabidopsis thaliana*.



Anexo 4. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de *Citrullus lanatus*.

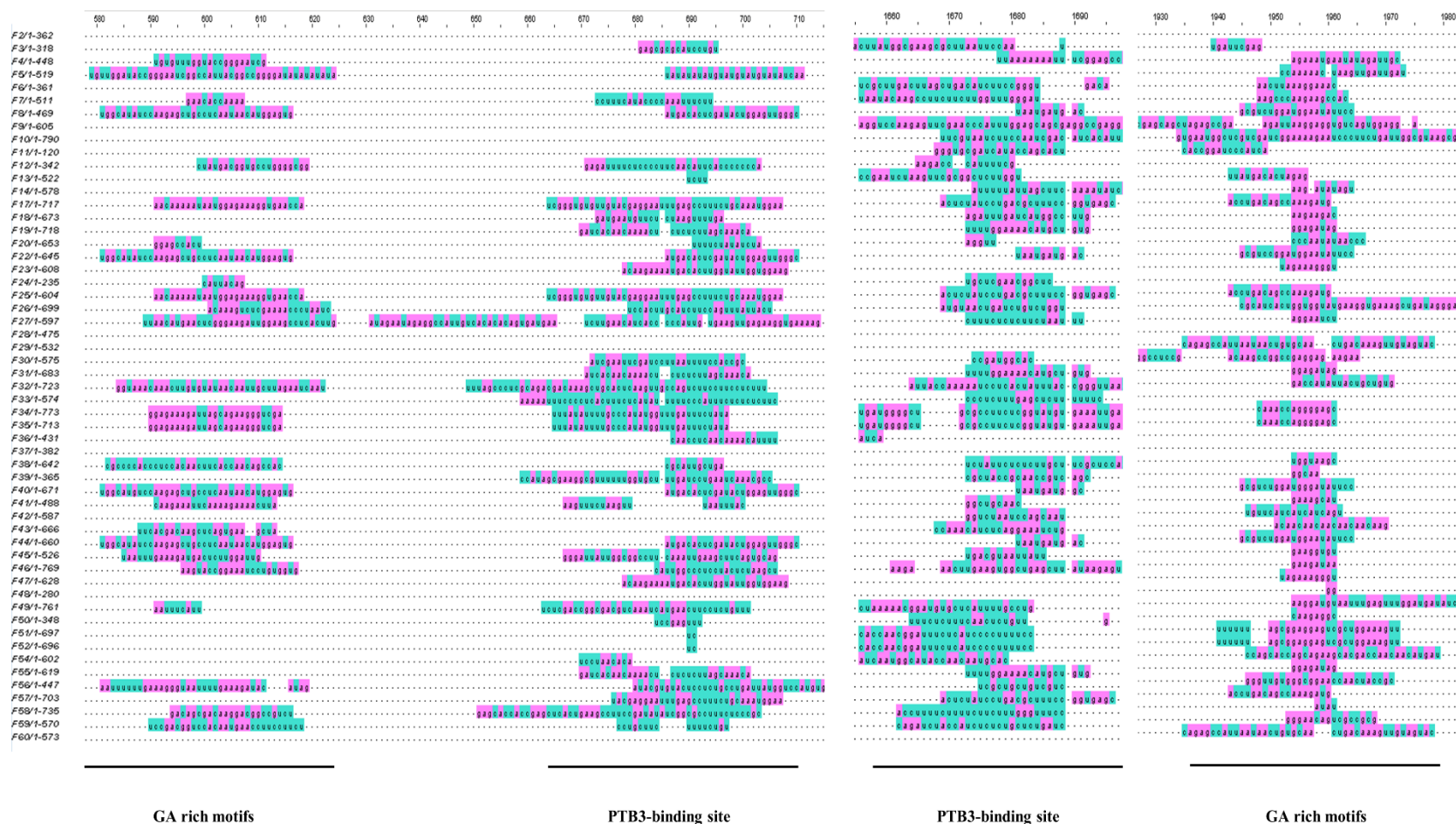


PTB3-binding site

PTB3-binding site

GA rich motifs

Anexo 5. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de *Cucumis melo*.



Anexo 6. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de *Cucumis sativus*.



Anexo 7. Alineamiento de las secuencias de mRNAs translocables de *Ricinus communis*.

