



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS DE
EXPRESIÓN DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
NAC DE *SACCHARUM OFFICINARUM* EN
CONDICIONES DE SALINIDAD Y SEQUÍA**

Tesis que presenta

EVELYN ARLETTE CARRILLO BERMEJO

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

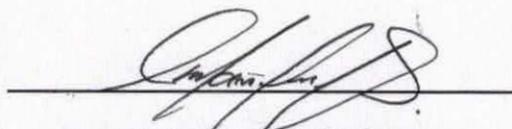
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de la **Ing. Evelyn Arlette Carrillo Bermejo** titulado "**Caracterización molecular y análisis de expresión de un factor de transcripción NAC de *Saccharum officinarum* L. en condiciones de salinidad y sequía**", fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Transformación Genética de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



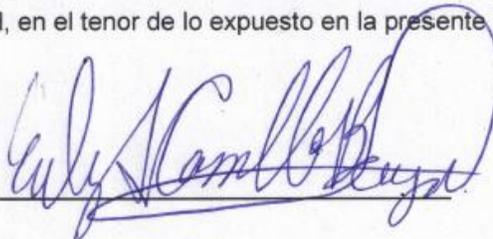
Dra. Clelia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de marzo 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: _____



Nombre: Evelyn Arlette Carrillo Bermejo

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi maestría, por brindarme las fortalezas necesarias en mis momentos de debilidad y llenarme de gozo el corazón en cada momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (462859) y por el financiamiento del proyecto en conjunto con la Secretaría de Educación Pública (SEP) “Base biotecnológica para la innovación y desarrollo de variedades de caña de azúcar tolerantes a sequía para la zona de temporal en México - primera etapa” (número: 215098).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY), por las instalaciones otorgadas para la realización de mi tesis.

A mi asesor, Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, y coasesor, Dr. Luis Joel Figueroa Yáñez, por confiar en mí, por darme su apoyo y dirección, y sobre todo por el crecimiento profesional que aportaron en mí.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, Dr. Enrique Castaño de la Serna y Dr. Manuel Martínez Estévez, por sus excelentes observaciones y aportaciones a mi trabajo de maestría.

Al programa de Becas de Movilidad 2018 de CONACYT, por el apoyo para realizar una estancia de investigación en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), campus Zapopan.

A los técnicos M. C. Miguel Angel Herrera Alamillo y M. C. Miguel Angel Keb Llanes, por haberme apoyado con todos los protocolos y metodologías que necesité para realizar mi tesis de maestría.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Transformación Genética, por ser parte clave para mi desarrollo profesional de esta etapa (M.C Samuel Gamboa, Dr. Alejandro Pereira, Ing. Antonio Reyes, M. C. Sandi Reyes, M. C Alejandro Zamora).

A mi familia, por haberme apoyado y brindando amor, fortaleza, comprensión y motivación para finalizar este posgrado, ya que sin ellos no podría haber llegado hasta donde estoy.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Base biotecnológica para la innovación y desarrollo de variedades de caña de azúcar tolerantes a sequía para la zona de temporal en México - primera etapa” (número: 215098), en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

	Página
1.1. Introducción	1
1.2. Antecedentes	3-40
1.2.1 Cambio climático	3-4
1.2.2 Sequía.....	4-7
1.2.3 Salinidad.....	8-13
1.2.4 Ácido abscísico (ABA)	12-18
1.2.5. Sistemas de regulación de la expresión génica ante estrés abiótico.....	18-21
1.2.6. Factores de transcripción.....	22-23
1.2.7. Factor de transcripción NAC.....	24-26
1.2.8. Modelo de estudio: <i>Saccharum officinarum</i>	26-40
1.2.8.1. Descripción botánica.....	26
1.2.8.2. Importancia	27

económica.....		
1.2.8.3. Problemática del cultivo tradicional.....		28
1.2.8.4. Respuestas morfológicas y fisiológicas de la caña de azúcar ante un estrés hídrico.....		29-32
1.2.8.5. Análisis relativo de expresión genética de la caña de azúcar bajo estrés hídrico.....		33
1.2.8.6. Variación y mejoramiento de la caña de azúcar.....		34
1.2.8.7. Ingeniería genética de caña de azúcar para la tolerancia al estrés de hídrico.....		35-37
1.2.8.8. Edición de genoma en caña de azúcar.....		38-40
1.3. Justificación.....		41
1.4. Objetivos.....		42
1.4.1. General.....	Objetivo	42
1.4.2. Específicos.....	Objetivos	42
1.5. Hipótesis.....		43
1.6. Estrategia experimental.....		44
 CAPITULO II. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE FT NAC CON LOS GENES NAC DE <i>S. officinarum</i> L. Var MEX69290		
2.1. Introducción.....		45
2.2. Materiales y Métodos.....		46

2.2.1. Visualización de la expresión de los genes NAC de <i>Saccharum officinarum</i> mediante un mapa de calor.....	46
2.2.2. Recuperación de las secuencias proteicas de los genes NAC de las especies seleccionadas, alineamiento y rasurado de las secuencias proteicas de los genes NAC.....	46
2.2.3. Obtención del mejor modelo y construcción del árbol filogenético.	46
2.2.4. Análisis de estructura y localización subcelular del gen NAC25 de <i>Saccharum officinarum</i> VAR. MEX69290.	46
2.3. Resultados.....	47
2.3.1. Visualización de la expresión de los genes NAC de <i>Saccharum officinarum</i> mediante un mapa de calor.....	47
2.3.2. Recuperación de las secuencias proteicas de los genes NAC de las especies seleccionadas, alineamiento y rasurado de las secuencias proteicas de los genes NAC.....	48- 50
2.3.3. Obtención del mejor modelo y construcción del árbol filogenético.....	50- 53
2.3.4. Análisis de estructura y localización subcelular del gen NAC25 de <i>Saccharum officinarum</i> VAR. MEX69290.	54- 55
2.4. Discusión.....	55
2.5. Conclusiones.....	55

CAPITULO III. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN NAC 25 EN *Saccharum officinarum* EN RESPUESTA EN SALINIDAD, SEQUÍA Y ÁCIDO ABSCÍSIKO.

3.1. Introducción	56-57
3.2. Materiales y métodos	57
3.2.1. Material biológico.....	57
3.2.2. Tratamientos de salinidad, sequía y ácido abscísico.	58
3.2.3. Determinación de parámetros fisiológicos.....	58
3.2.4. Determinación de parámetros bioquímicos.....	58
3.2.5. Extracción de RNA total y síntesis de ADNc.....	59
3.2.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	59
3.2.7. Análisis estadístico.	59
3.3. Resultados	60
3.3.1. Parámetros fisiológicos y bioquímicos de las plantas de <i>Saccharum officinarum</i> bajo condiciones de salinidad, sequía y ácido abscísico.....	60-68
3.3.1.1. Salinidad.....	61
3.3.1.2. Sequía.....	63
3.3.1.3. Ácido abscísico.....	65
3.3.2. Expresión diferencial del gen NAC25 de <i>Saccharum officinarum</i> bajo condiciones de salinidad y sequía.	69-70
3.4. Discusión	71
3.5. Conclusiones	71

CAPITULO IV. CLONACIÓN E INSERCIÓN DEL GEN EN LOS VECTORES DE TRANSFORMACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN NAC 25 DE *SACCHARUM OFFICINARUM*

4.1.		72
	Introducción	
4.2.	Materiales	72
	y métodos	
4.2.1.	Secuenciación y alineación del gen NAC que se seleccionó del transcriptoma de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	72
4.2.2.	Diseño y clonación en los Vectores de sobreexpresión	73
	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa EHA105.....	75
4.2.4.	Transformación en callos de tabaco mediante <i>Agrobacterium tumefaciens (Rhizobium radiobacter)</i>	75
4.3.	Resultados	75
4.3.1.	Secuenciación y alineaciones del gen NAC 25 que se seleccionó del transcriptoma de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	76
4.3.2.	Clonación del gen NAC25 en los vectores de sobreexpresión.....	76-77
4.3.3.	Transformación en <i>Agrobacterium tumefaciens (Rhizobium radiobacter)</i>	78
4.4.		79
	Discusión	
4.5.	Conclusiones	80

Bibliografía.....

83-102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes de sobreexpresantes del gen NAC.....	25
Tabla 2. Especies que se seleccionaron para obtener las secuencias proteicas NAC.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismo de tolerancia al estrés de sequía	7
Figura 1.2. Modelo de la ruta del mecanismo SOS para respuestas de estrés de salinidad.....	12
Figura 1.3. Representación esquemática de la biosíntesis de ABA en plantas.....	16
Figura 1.4. La representación esquemática de la vía principal de señalización de ABA en plantas con y sin presencia de ABA.....	19
Figura 1.5. Redes de señalización de estrés abiótico mediadas por AREB, DREB1 y de transcripción de tipo DREB2 en Arabidopsis.	21
Figura 1.6. Red transcripcional de respuestas de estrés abiótico.	23
Figura 1.7. Esquema de la estructura de un factor de transcripción NAC ...	25
Figura 1.8 Gráfica modificada de la producción en millones de toneladas (MT) de los principales productores de caña de azúcar a nivel mundial.....	28
Figura 1.9 <i>Cultivos de Saccharum officinarum</i>	29
Figura 1.10. Esquema de los mecanismos de respuesta a la sequía de la caña de azúcar	33
Figura 2.1. Heatmap de los genes NAC de caña de azúcar en condiciones en sequía con PEG 8000 al 40%.....	47
Figura 2.2. Árbol filogenético de especies y familia del reino plantae.....	49
Figura 2.3. Análisis filogenético de las proteínas NAC	50
Figura 2.4. Clado resaltado en azul.....	52
Figura 2.5. Estructura proteica	51
Figura 2.6. Localización subcelular de NAC25.....	53
Figura 3.1. Sistema de micropropagación en medio líquido.....	57
Figura 3.2. Tratamiento de salinidad	60
Figura 3.3. Valores de fotosíntesis neta (A) de las plántulas de caña de azúcar tratadas en salinidad (150mM de NaCl),	60
Figura 3.4 Valores de prolina de las plántulas de caña de azúcar tratadas en salinidad (150mM de NaCl	61
Figura 3.5 Tratamiento de sequía (PEG 8000 al 40%).	62
Figura 3.6 Valores de fotosíntesis neta (A) de las plántulas de caña de azúcar tratadas con polietilenglicol PEG 8000 al 40%.....	62

Figura 3.7. Valores de prolina de las plántulas de caña de azúcar tratadas en PEG 8000 al 40%.....	63
Figura 3.8. Tratamiento de ácido abscísico (100µM).....	64
Figura 3.9. Valores de fotosíntesis neta (A) de las plántulas de caña de azúcar tratadas con ácido abscísico.....	64
Figura 3.10. Análisis del ARN total de las plantas de caña de azúcar sometidas a 150 mM de NaCl	66
Figura 3.11. Perfil de expresión diferencial del gen NAC 25 en plantas de caña de azúcar sometidas a 150mM NaCl	66
Figura 3.12. Análisis del ARN total de las plantas de caña de azúcar sometidas a PEG 8000 al 40%	67
Figura 3.13. Perfil de expresión diferencial del gen NAC 25 en plantas de caña de azúcar sometidas a PEG 8000 al 40%.....	67
Figura 3.14. Análisis del ARN total de las plantas de caña de azúcar sometidas en ácido abscísico 100µM	67
Figura 3.15 Perfil de expresión diferencial del gen NAC 25 en plantas de caña de azúcar sometidas a ácido abscísico 100µM	68
Figura 4.1 Vector pBISN1.....	73
Figura 4.2 Vector pK7FWG2.0.....	74
Figura 4.3 Alineamiento entre la secuencia de nucleótidos predicha.....	75
Figura 4.4 Amplicones que se obtuvieron de pGEM-T easy.....	75
Figura 4.5 Callos de tabaco sembrados en medio de cultivo con a) kanamicina y b) sin kanamicina.....	

LISTA DE ABREVIATURA

A	Asimilación neta de CO ₂
ABA	Acido Abscisico
ADNA	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico
AP2	Apétala 2
NAC	NAM, ATAF1, CUC2
AREB	Proteína de unión al elemento responsivo a ABA
ARN	Acido ribonucleico
BAP	6-N-Bencil Aminopurina
bZIP	Cremalleras de leucinas básico
CAM	Calmodulina
CAT	Catalasas
CDPK	Proteínas cinasas que interaccionan con CBL
DREB	Proteínas de unión a elemento responsivo a deshidratación
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
ERF	Factor de respuesta a Etileno
FAH1	Hidroxilasa de ácidos grasos
HKT	Transportadores de potasio de alta afinidad
KAT	Canal de potasio hacia el interior

HR	Respuesta hipersensible
LCT1	Transportadores catiónicos de baja afinidad
LEA	Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía
MDA	Malondialdehído
MYB	Mieoblastosis
MYC	Miecilotomatosis
NCED3	9-Cis-epoxi-carotenoide dioxigenasa 3
NHX	Antiportador NA^+/H^+
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SnRK3	Serina/treonina cinasa 3
SOS	Altamente sensible a la sal (salt overlay sensitive)
AOX	Vía oxidasa alternativa

RESUMEN

El cambio climático altera las condiciones ambientales, causando inundaciones y sequías estacionales, temperaturas extremas y salinidad durante todo el año. Los cambios climáticos causan diferentes tipos de estrés en la planta, un mecanismo por el cual las plantas responden a estos tipos de estrés es a través de la expresión de los factores de transcripción (TF), que activan la expresión de otros genes que producirán proteínas para que la planta pueda tolerar estas condiciones de estrés. Las proteínas NAC constituyen uno de los grupos de plantas TF más grandes. NAC FT desempeña varias funciones esenciales en el desarrollo de la planta, como senescencia, señalización de auxinas, tiempo de floración, morfogénesis floral, desarrollo lateral de la raíz, movilización de nutrientes, desarrollo del margen foliar, maduración de la fruta, control de la longevidad, desarrollo de embriones, formación de brotes meristemáticos embrionarios, movimiento de hojas, formación de elementos vasculares y tolerancia a múltiples estreses bióticos y abióticos, entre otros. *Saccharum officinarum* L., comúnmente conocida como caña de azúcar, es una hierba perenne tropical con tallos gruesos y fibrosos que pueden crecer entre 3 y 5 metros de altura. Estos contienen una gran cantidad de sacarosa que se procesa para obtener azúcar. La caña de azúcar es uno de los cultivos agroindustriales más importantes en las regiones tropicales. El análisis del transcriptoma de la caña de azúcar en condiciones de sequía mostró que NAC25 aumenta su expresión gradualmente con respecto al tiempo de exposición al estrés por sequía. Los análisis filogenéticos realizados sugieren que NAC 25 es un ortólogo de AtNAP y OsNAP. Los ensayos de localización transitoria en células epidérmicas de cebolla confirmaron que NAC 25 es una proteína nuclear. El análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real indicó que la NAC25 se indujo mediante tratamientos de salinidad, sequía y ácido abscísico. La sobreexpresión de NAC25 en tabaco mediante transformación por *Agrobacterium tumefaciens* muestra síntomas de senescencia. En general, nuestros resultados indicaron que el gen NAC25 es posiblemente un ortólogo de AtNAP y OsNAP, que se induce en condiciones de salinidad y sequía y la sobreexpresión de NAC25 en el tabaco provoca la muerte celular.

ABSTRACT

Climate change alters environmental conditions, causing floods and seasonal droughts, extreme temperatures or salinity throughout the year. Climate changes cause different types of stress in the plant, a mechanism by which plants respond to these types of stress is through the expression of such transcription factors, which activate the expression of other genes that will produce proteins for the plant can tolerate these stress conditions. NAC proteins constitute one of the largest TF groups of plants. NAC FT plays several essential roles in plant development such as senescence, auxin signaling, flowering time, floral morphogenesis, lateral root development, nutrient mobilization, leaf margin development, fruit ripening, longevity control, development of embryos, formation of post-embryonic meristematic buds, movement of leaves, the formation of vascular elements and tolerance to multiple biotic and abiotic stresses, among others. *Saccharum officinarum* L commonly known as sugar cane is a tropical perennial grass with thick and fibrous stems that can grow between 3 and 5 meters in height. These contain a large amount of sucrose that is processed to obtain sugar. Sugarcane is one of the most important agroindustrial crops in tropical regions. The objective of this work is to molecularly characterize, functionally, the NAC 25 gene of *Saccharum officinarum* L, as well as to analyze the differential expresión of NAC 25 of *Saccharum officinarum* in conditions of salinity and abscisic acid.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático, el cual se define como un cambio en los patrones climáticos globales o regionales, en particular un cambio aparente de estos, desde mediados hasta fines del siglo XX en adelante y atribuido a los mayores niveles de dióxido de carbono en la atmósfera derivados del uso de combustibles fósiles (Lineman *et al.*, 2015), altera las condiciones ambientales y, por lo tanto, tiene efectos sobre la producción agrícola. Los efectos biológicos, físicos y directos del cambio climático ocasionan diferentes tipos de estrés a la planta (Gerald *et al.*, 2013).

A través de la historia de la evolución, las plantas han desarrollado una amplia variedad de mecanismos altamente sofisticados y eficientes para detectar, responder y adaptarse a una amplia gama de cambios ambientales. Cuando se encuentran en condiciones de crecimiento adversas o limitantes, las plantas responden activando mecanismos de tolerancia a múltiples niveles de organización (molecular, tisular, anatómico y morfológico), ajustando el sistema de membranas, la arquitectura de la pared celular, alterando el ciclo celular, la tasa de división celular, y por medio de ajustes metabólicos (Atkinson, 2012). A nivel molecular, muchos genes son inducidos o reprimidos por el estrés abiótico, que implican una regulación extensa de redes de genes de estrés (Shinozaki, 2007). Los productos de esos genes pueden funcionar en respuesta al estrés y tolerancia a nivel celular. Las proteínas resultantes en respuesta al estrés se encuentran implicadas en la biosíntesis de compuestos osmoprotectores, de enzimas de desintoxicación, proteasas, transportadores y chaperonas. (Wang, 2009). Los primeros mecanismos de respuesta de las plantas previenen o alivian el daño celular causado por el estrés y restablecen las condiciones homeostáticas y permiten la continuación del crecimiento (Peleg, 2011). La recuperación del equilibrio energético, osmótico y redox producidos por el estrés son los primeros objetivos de las respuestas inmediatas de la planta. Mecanismos generales de respuesta están involucrados en el mantenimiento de la energía e incluyen cascadas de señalización de calcio (Peleg, 2011), especies reactivas de oxígeno (Ahmad, 2010) y privación de energía (Baena-Gonzalez, 2008).

La inducción de genes bajo estrés se regula a través de complejas redes transcripcionales (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Los genes clave que funcionan en estas redes transcripcionales han sido revelados por estudios moleculares y son importantes

candidatos para el desarrollo de plantas transgénicas tolerantes al estrés abiótico. Estudios realizados en *Arabidopsis* han identificado dos vías importantes de las redes transcripcionales en condiciones de estrés abiótico: Una vía de señalización dependiente del ácido abscísico (ABA) y una red reguladora independiente de ABA (Zhu, 2002; Bartels y Sunkar, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2007).

Dado que la mayoría de estas respuestas implican el control de la expresión génica, los FT juegan un papel crítico en la respuesta al estrés abiótico (Chaves y Oliveira, 2004). Los FTs son proteínas con un dominio que se une al ADN en los elementos de acción cis presentes en el promotor de un gen diana. Estos inducen (activadores) o reprimen (represores) la actividad de la ARN polimerasa, regulando así la expresión génica.

Las proteínas NAC son factores de transcripción, constituyen uno de los grupos más grandes de FT de plantas. Se expresan de forma ubicua a través de los organismos vegetales y se sabe que participan en diversos procesos de desarrollo y respuestas al estrés. El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización molecular y funcional del gen NAC 25 de *Saccharum officinarum* en condiciones de salinidad y sequía.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 Cambio Climático

El cambio climático altera las condiciones ambientales y, por lo tanto, tiene efectos sobre la producción agrícola. Los efectos directos del cambio climático sobre la agricultura inducen cambios en la producción y precios, que se manifiestan en el sistema económico a medida que los agricultores y otros participantes del mercado realizan ajustes de forma autónoma, modificando sus combinaciones de cultivos, uso de insumos, nivel de producción, demanda de alimentos, consumo de alimentos y comercio. (Gerald *et al.*, 2013)

El cambio climático ocasiona el aumento de las temperaturas y el cambio en los regímenes pluviales los cuáles, tienen efectos directos sobre el rendimiento de los cultivos, así como efectos indirectos a través de los cambios en la disponibilidad de agua de riego. (Gerald *et al.*, 2013)

El 30% de las tierras agrícolas del mundo se ven afectadas por los drásticos efectos del cambio climático. El cambio climático podría costar al mundo por lo menos una pérdida del 5% del PIB cada año; Si se producen predicciones más dramáticas, el costo podría elevarse a más del 20% del PIB. (Gerald *et al.*, 2013)

Una gran escala de producción de plantas cultivadas bajo diferentes sistemas de producción agrícola se pierde bajo los efectos del cambio climático, lo que puede resultar en una reducción del 70% de los rendimientos potenciales de las plantas de cultivo (Agarwal *et al.*, 2006). Durante el crecimiento y los períodos de desarrollo, los cultivos sufren inundaciones y sequías estacionales, temperaturas extremas o salinidad durante todo el año. Los datos de FAO (2004) mostraron que aproximadamente el 22% de las tierras agrícolas mundiales son salinas y que el mayor daño causado por la sequía limita el crecimiento y desarrollo de las plantas, seguido de una pérdida de productividad, especialmente en especies de cultivos (Shao *et al.*, 2008; Burke *et al.*, 2006). Por lo tanto, sequía y salinidad son los tipos más graves de estrés abiótico que implica una amenaza para la productividad de los cultivos en todo el mundo.

La resiliencia al cambio climático se hace cada vez más presente en la agenda de los investigadores, políticos y encargados de programas que el cambio climático es real y amenaza con socavar la sostenibilidad social y ecológica. En agricultura, los esfuerzos de adaptación se centran en la implementación de programas de mejoramiento genético en busca de mejoras de productividad y variedades resistentes a los efectos ambientales que ayuden a fomentar medios de vida rurales y urbanos que sean más resilientes ante la variabilidad climática y los desastres (Gerald *et al.* 2009).

1.2 Sequía

La sequía es un estrés multidimensional que afecta a las plantas en varios niveles de su organización, es decir, desde niveles fenológicos y morfológicos hasta niveles moleculares (Anjum *et al.*, 2011). Bajo un severo déficit de agua, el alargamiento celular se inhibe por la interrupción del flujo de agua a las células que se alargan. El contenido relativo de agua (CRA), el potencial hídrico de la hoja, la conductancia estomática, la tasa de transpiración, la temperatura de la hoja y la temperatura del suelo son características importantes que influyen en las relaciones hídricas de la planta. Se observa comúnmente una disminución en el CRA en respuesta al estrés por sequía en una variedad de especies de plantas (Lings *et al.*, 2013). Aunque el crecimiento de la planta generalmente se reduce cuando el suministro de agua del suelo es limitado, el crecimiento de brotes normalmente es más inhibido que el crecimiento de raíces y, en algunos casos, la relación de biomasa raíz/brote de las plantas en el suelo de sequía puede aumentar con respecto a los controles bien regados (Anithakumari *et al.*, 2012). El estrés por sequía induce una reducción en el área foliar según lo atribuye la supresión de la expansión foliar y la reducción de la fotosíntesis (Avramova *et al.*, 2015); También causa alteraciones en la mitosis, elongación y expansión de las células que producen un crecimiento reducido (Potopová *et al.*, 2016). La deficiencia de agua conduce a una disminución severa en los rasgos de rendimiento de las plantas de cultivo probablemente interrumpiendo el intercambio de gases foliares debido al cierre de estomas (Farooq *et al.*, 2009; Akram, 2011). La sequía reduce no solo el crecimiento de las plantas, sino también el desarrollo, lo que lleva a un déficit de producción de flores y granos; por lo tanto, menos granos y más pequeños dan como resultado severas pérdidas de rendimiento. En la mayoría de las

especies de plantas, la sequía está vinculada a cambios en la anatomía y estructura de las hojas (Rollins *et al.*, 2013). En general, los cambios incluyen reducción del tamaño de las hojas, disminución del número de estomas, sumersión de estomas en plantas suculentas y xerófitas, engrosamiento de las paredes celulares de las hojas, cutinización de la superficie foliar, subdesarrollo del sistema conductivo pero un aumento en el número de vasos grandes de xilema y la inducción de la senescencia temprana (Anjum *et al.*, 2011). La sequía también afecta las estructuras no solo a nivel de tejido y celular sino también a nivel subcelular. A nivel subcelular, modificaciones importantes se refieren a la forma de los cloroplastos y las vacuolas, lo que conduce a la hinchazón de las lamelas estromales, que cambian la organización estructural de los tilacoides y forman fotosistemas (PS) II dañados que reducen las actividades fotosintéticas y respiratorias (Siddiqui *et al.* 2015). El déficit hídrico conduce a la supresión progresiva de la fotosíntesis al alterar todos los componentes principales, incluido el transporte de electrones tilacoides, el ciclo de reducción de carbono y el control estomático del suministro de CO₂, junto con una mayor acumulación de azúcares (, Carmo-Silva *et al.* 2012; Farooq *et al.*, 2009).

La producción de ROS, conocida como estallido oxidativo, es un evento temprano de respuesta de defensa de la planta al estrés hídrico y actúa como un mensajero secundario para desencadenar una reacción de defensa posterior en las plantas (Miller *et al.*, 2010). Bajo estrés por sequía, la producción de ROS se mejora a través de múltiples formas (Fig. 1). Durante la fotosíntesis, hay una mayor fuga de electrones (O₂) por la reacción de Mehler (Driever y Baker, 2011).

Para hacer frente a la producción continua de ROS bajo estrés, las plantas han desarrollado una batería de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que funcionan como un sistema cooperativo extremadamente eficiente (Harba *et al.*, 2015). La literatura masiva mostró una mayor actividad de las enzimas antioxidantes bajo estrés por sequía (Marok *et al.*, 2013; Chakraborty y Pradhan, 2012; Chugh *et al.*, 2011,). Evitar la producción de ROS durante el estrés por sequía también es una estrategia importante que permite a las plantas hacer frente a la escasez de agua sin un daño extenso. Las mitocondrias desempeñan un papel importante en evitar la producción de ROS mediante mecanismos eficientes de disipación de energía (Xu *et al.*, 2011). La vía oxidasa alternativa (AOX) es una alternativa a la vía del citocromo en la mitocondria que desvía

los electrones que fluyen a través de la cadena de transporte de electrones para producir agua mediante la reducción de O₂ (Fischer *et al.*, 2013).

El ajuste osmótico ha sido considerado como uno de los procesos vitales en la adaptación de la planta a la sequía, ya que ayuda a mantener la actividad metabólica del tejido. Los compuestos osmóticos sintetizados bajo sequía incluyen solutos compatibles tales como aminoácidos (prolina, ácido aspártico y ácido glutámico), glicina betaína, azúcares (fructanos y sacarosa) y ciclitos (manitol y pinitol). De estos, la prolina es uno de los más importantes. Su acumulación en hojas con bajo potencial hídrico es causada por una combinación de una mayor biosíntesis y una oxidación lenta en las mitocondrias (Hu *et al.*, 2015). Se han asignado muchas funciones fisiológicas a la prolina, incluida la estabilización de macromoléculas, que incluyen enzimas y proteínas, mantienen la integridad de la membrana y eliminan las especies de oxígeno reactivo (Verbruggen y Hermans, 2008, Verslues y Sharma, 2010, Kaur y Asthir, 2015). Prolina también actúa como fuente de energía, carbono y nitrógeno durante la recuperación posterior a la sequía (Szabados y Saviouré, 2009).

Los estímulos de sequía externos son percibidos y capturados por sensores en la membrana que posteriormente las señales se transmiten a través de múltiples vías de transducción de señales, lo que resulta en la expresión de genes sensibles a la sequía y la adaptación a la sequía. Una variedad de mensajeros secundarios como Ca²⁺, ROS, ABA, fosfoglicerol, diacilglicerol y reguladores de la transcripción juegan papeles significativos en varias vías de transmisión de señal, en la figura 1.1 podemos observar un diagrama de estas vías de señalización. Los productos de expresión de los genes sensibles a la sequía son principalmente las proteínas implicadas en las cascadas de señalización y la regulación transcripcional (como la proteína quinasa, la proteína fosfatasa y los factores de transcripción), proteínas funcionales que protegen las membranas celulares y otras proteínas como las de embriogénesis tardía, antioxidantes, osmolitos, proteínas asociadas con la captación y el transporte de agua e iones como las acuaporinas y los transportadores de azúcar (Nakashima *et al.*, 2014). La sequía desencadena la producción de ABA en las raíces que se transporta a los brotes causando el cierre de los estomas y, finalmente, restringir el crecimiento (Mittler y Blumwald 2015). ABA también se sintetiza en células de hoja y se transloca alrededor de la planta. Evidencias recientes indican que el pH xilema/apoplasto influye en la compartimentación

de ABA y, en consecuencia, la cantidad de ABA que llega a los estomas (Andrésa *et al.*, 2014). Los genes sensibles a la sequía se pueden dividir en dos grupos, dependientes de ABA e independientes de ABA, según su dependencia de este fitoregulador para la inducción. (Kim 2014). Los análisis de los patrones de expresión de los genes inducidos por la deshidratación han revelado una amplia variación en el momento de su inducción y las diferencias en su capacidad de respuesta a ABA.

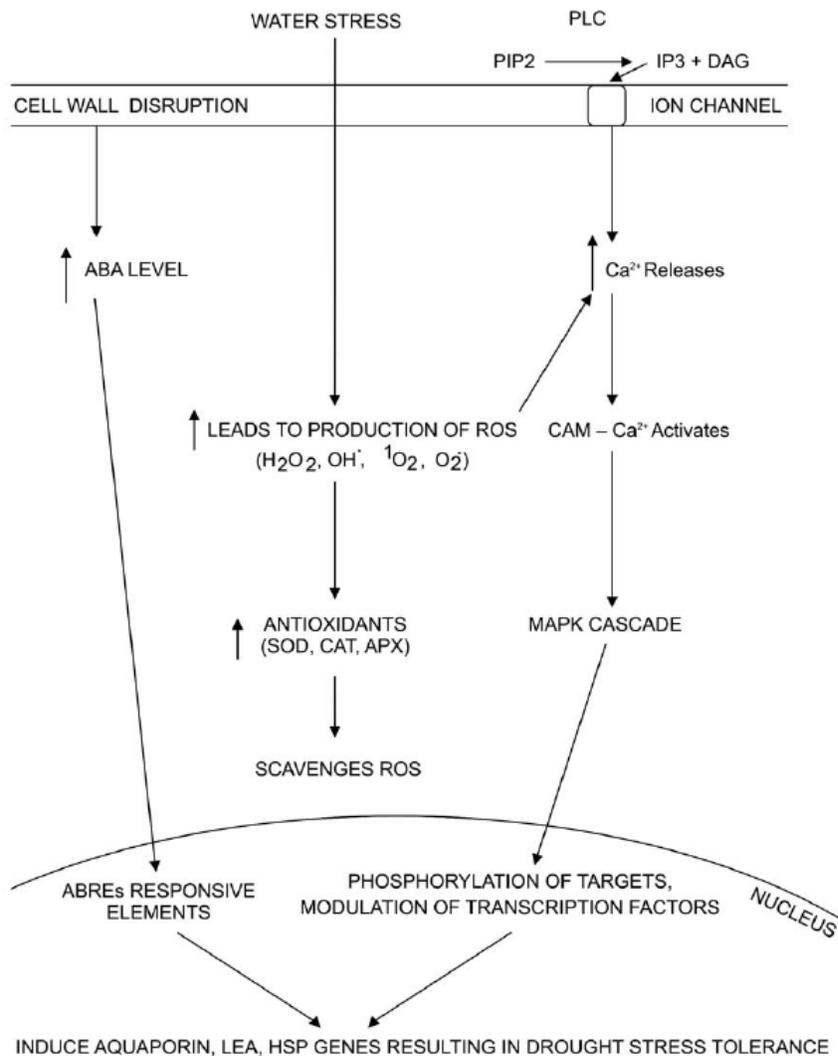


Figura 1.1 Mecanismo de tolerancia al estrés de sequía. ABA - ácido abscísico, ABRE - elemento sensible a ABA, APX - ascorbato peroxidasa, CAM - calmodulina, CAT - catalasa, DAG - diacilglicerol, HSP - proteína de choque térmico, IP3 - inositol 1,4,5-trifosfato, LEA - proteínas abundantes de embriogénesis tardía, MAPK - proteína cinasa activada por mitógenos, PIP2 -

fosfoinositol 4,5 bisfosfato, PLC - fosfolipasa C, especies reactivas de oxígeno ROS, SOD - superóxido dismutasa. Adaptado de Farooq *et al.*, (2009).

1.3 Salinidad

La salinidad es un estrés importante que limita el aumento de la demanda de cultivos alimentarios. Más del 20% de la tierra cultivada en todo el mundo (alrededor de 45 hectáreas) se ve afectada por el estrés salino y la cantidad aumenta día a día. Por lo tanto, la salinidad es uno de los factores ambientales más importantes que obstaculizan la productividad de los cultivos en todo el mundo debidos a las sales principalmente por la abundancia de cloruro de sodio proveniente de la acumulación natural o el riego (Flowers y Flowers, 2005). El estrés por salinidad implica cambios en varios procesos fisiológicos y metabólicos, dependiendo de la concentración de sales y la duración del estrés, y en última instancia, inhibe la producción de cultivos (James *et al.*, 2011; Rahnama *et al.*, 2010; Munns, 2005; Rozema y Flowers, 2008). Inicialmente, se sabe que los suelos salinos reprimen el crecimiento de las plantas de dos maneras fundamentales, como estrés osmótico y como toxicidad iónica, existe un tipo de estrés secundario provocado por la salinidad que es el oxidativo (James *et al.*, 2011; Rahnama *et al.*, 2010,). Durante las fases iniciales de estrés salino, la capacidad de absorción de agua de los sistemas radiculares disminuye y la pérdida de agua de las hojas se acelera debido al estrés osmótico de la alta acumulación de sal en el suelo y las plantas, y por lo tanto el estrés por salinidad también se considera estrés hiperosmótico (Munns, 2005). El estrés osmótico en la etapa inicial de estrés por salinidad causa varios cambios fisiológicos, como interrupción de las membranas, desequilibrio de nutrientes, afectación de la capacidad de desintoxicar especies reactivas de oxígeno (ROS), diferencias en las enzimas antioxidantes y disminución de la actividad fotosintética y disminución de la apertura estomática (Rahnama *et al.*, 2010; Munns y Tester, 2008). El estrés por salinidad también se considera estrés hiperiónico. Uno de los efectos más perjudiciales del estrés por salinidad es la acumulación de Na^+ y iones Cl^- en tejidos de plantas expuestas a suelos con altas concentraciones de NaCl . La entrada de Na^+ y Cl^- en las células provoca un desequilibrio grave de los iones y un exceso de captación puede causar un trastorno fisiológico significativo. La alta concentración de Na^+ inhibe la absorción de iones K^+ , que

es un elemento esencial para el crecimiento y el desarrollo que resulta en una menor productividad e incluso puede conducir a la muerte (James *et al.*, 2011). En respuesta al estrés por salinidad, la producción de ROS, como el oxígeno solo, el superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, se incrementa (Ahmad y Prasad, 2012; Ahmad y Umar, 2011; Ahmad, 2010-, Mahajan y Tuteja, 2005; Apel e Hirt, 2004). La formación de ROS inducida por la salinidad puede provocar daños oxidativos en diversos componentes celulares, como proteínas, lípidos y ADN, interrumpiendo las funciones celulares vitales de las plantas.

Las plantas desarrollan varios mecanismos fisiológicos y bioquímicos para sobrevivir en suelos con alta concentración de sal. Los mecanismos principales incluyen, entre otros, homeostasis iónica y compartimentación, transporte y captación de iones, biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles, activación de la enzima antioxidante y síntesis de compuestos antioxidantes, síntesis de poliaminas, generación de óxido nítrico (NO) y modulación hormonal. Los avances de la investigación que dilucidan estos mecanismos se discuten a continuación.

1. **Homeostasis iónica y tolerancia a la salinidad.** El mantenimiento de la homeostasis iónica mediante la absorción iónica y la compartimentación no sólo es crucial para el crecimiento normal de las plantas, también es un proceso esencial para el crecimiento durante el estrés salino (Hasegawa, 2003; Serrano *et al.*, 1999; Xiaomu *et al.*, 1995). Independientemente de su naturaleza, tanto las glicofitas como las halófitas no pueden tolerar altas concentraciones de sal en su citoplasma. Por lo tanto, el exceso de sal se transporta a la vacuola o se secuestra en tejidos más viejos que finalmente se sacrifican, protegiendo así la planta del estrés por salinidad (Zhu, 2003; Reddy *et al.*, 1992). La principal forma de salinidad presente en el suelo es debido al NaCl, por lo que el foco principal de investigación es el estudio sobre el mecanismo de transporte del ion Na^+ y su compartimentación. El ion Na^+ que ingresa al citoplasma es luego transportado a la vacuola a través del antiportador Na^+/H^+ . Hay dos tipos de bombas H^+ presentes en la membrana vacuolar: vacuolar tipo H^+ -ATPasa (V-ATPase) y la pirofosfatasa vacuolar (V-PPase) (Dietz *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). De estos, la V-ATPasa es la bomba de H^+ más dominante presente dentro de la célula de la planta. Durante las condiciones sin estrés desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de soluto, energizando el transporte secundario y

facilitando la fusión de vesículas. En condiciones de estrés, la supervivencia de la planta depende de la actividad de V-ATPasa (Dietz *et al.*, 2001). Cada vez más pruebas demuestran los roles de una vía de señalización de estrés excesivamente sensible (SOS) en la homeostasis iónica y la tolerancia a la sal (Hasegawa *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2000). La vía de señalización SOS (Figura 1.2) consta de tres proteínas principales, SOS1, SOS2 y SOS3. SOS1, que codifica una proteína de membrana plasmática Na^+ / H^+ antiporter, es esencial para regular el flujo de salida de Na^+ a nivel celular. También facilita el transporte de Na^+ a larga distancia desde la raíz hasta el brote. La sobreexpresión de esta proteína confiere tolerancia a la sal en las plantas (Shi *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2002). La proteína SOS2, una serina/treonina quinasa, cuando la SOS1 se une a ella y enciende su actividad cinasa y este complejo SOS. Esta proteína consiste en un dominio catalítico N-terminal bien desarrollado y un dominio regulador C-terminal (Liu *et al.*, 2000). El tercer tipo de proteína implicada en la vía de señalización de estrés SOS es la proteína SOS3, que es una proteína de unión a Ca^{2+} miristoilada y contiene un sitio de miristoilación en su extremo N-terminal. Este sitio juega un papel esencial en conferir tolerancia a la sal (Ishitani *et al.*, 2000). El dominio regulador C-terminal de la proteína SOS2 contiene un motivo FISL (también conocido como dominio NAF), que tiene una secuencia de aproximadamente 21 aminoácidos y sirve como un sitio de interacción para la proteína SOS3 de unión a Ca^{2+} (Figura 1.2). Esta interacción entre SOS2 y la proteína SOS3 da como resultado la activación de la quinasa. La quinasa activada luego fosforila la proteína SOS1, lo que aumenta su actividad de transporte que se identificó inicialmente en la levadura (Guo *et al.*, 2004). La proteína SOS1 se caracteriza por una cola C-terminal larga citosólica, de aproximadamente 700 aminoácidos de longitud, que comprende un motivo de unión a nucleótido putativo y un dominio autoinhibidor. Este dominio autoinhibitorio es el sitio objetivo para la fosforilación de SOS2 (Figura 1.2). Además de conferir tolerancia a la sal, también regula la homeostasis del pH, el tráfico de vesículas de membrana y las funciones de la vacuola (Quintero *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2010). Por lo tanto, con el aumento en la concentración de Na^+ , hay un fuerte aumento en el nivel de Ca^{2+} intracelular que a su vez facilita su unión con la proteína SOS3. Ca^{2+} modula la homeostasis intracelular de Na^+ junto con las proteínas SOS. La proteína SOS3 luego interactúa y activa la proteína SOS2 al liberar su autoinhibición. El complejo SOS3-SOS2 se carga en la membrana plasmática donde fosforila SOS1 (Figura 1.2).

Muchas plantas han desarrollado un método eficiente para mantener la concentración de iones en el citoplasma en un nivel bajo. Las membranas junto con sus componentes asociados desempeñan un papel integral en el mantenimiento de la concentración de iones dentro del citosol durante el período de estrés mediante la regulación de la absorción iónica y el transporte (Sairam y Tyagi, 2004). El fenómeno de transporte se lleva a cabo por diferentes proteínas transportadoras, proteínas de canal, antiportadores y simportadores. El mantenimiento de la homeostasis celular de Na^+/K^+ es fundamental para la supervivencia de las plantas en ambientes salinos. Las plantas mantienen un alto nivel de K^+ dentro del citosol de aproximadamente 100 mM ideal para actividades de enzimas citoplásmicas. Dentro de la vacuola, la concentración de K^+ varía entre 10 mM y 200 mM. La vacuola contiene el conjunto más grande de K^+ dentro de la célula de la planta. K^+ juega un papel importante en el mantenimiento de la turgencia dentro de la célula. Se transporta a la célula de la planta contra el gradiente de concentración a través del transportador K^+ y los canales de membrana. Los mecanismos de captación de K^+ de alta afinidad están mediados por transportadores de K^+ , el mecanismo de captación se determina principalmente por la concentración de K^+ disponible en el suelo. Por otro lado, se mantiene una concentración de ion Na^+ (aproximadamente 1 mM o menos) en el citosol. Durante el estrés de salinidad, debido al aumento de la concentración de Na^+ en el suelo, el ion Na^+ compite con K^+ por el transportador, ya que ambos comparten el mismo mecanismo de transporte, disminuyendo así la absorción de K^+ (Sairam y Tyagi, 2004). Se ha identificado y clonado una gran cantidad de genes y proteínas, como HKT y NHX, que codifican transportadores y canales de K^+ en diversas especies de plantas. Durante el estrés salino, se mejora la expresión de algunas transcripciones de baja abundancia que se encuentran implicadas en la absorción de K^+ . Los transportadores ubicados en la membrana plasmática, pertenecientes a la familia HKT (transportador de histidina quinasa), también desempeñan un papel esencial en la tolerancia a la sal regulando el transporte de Na^+ y K^+ .

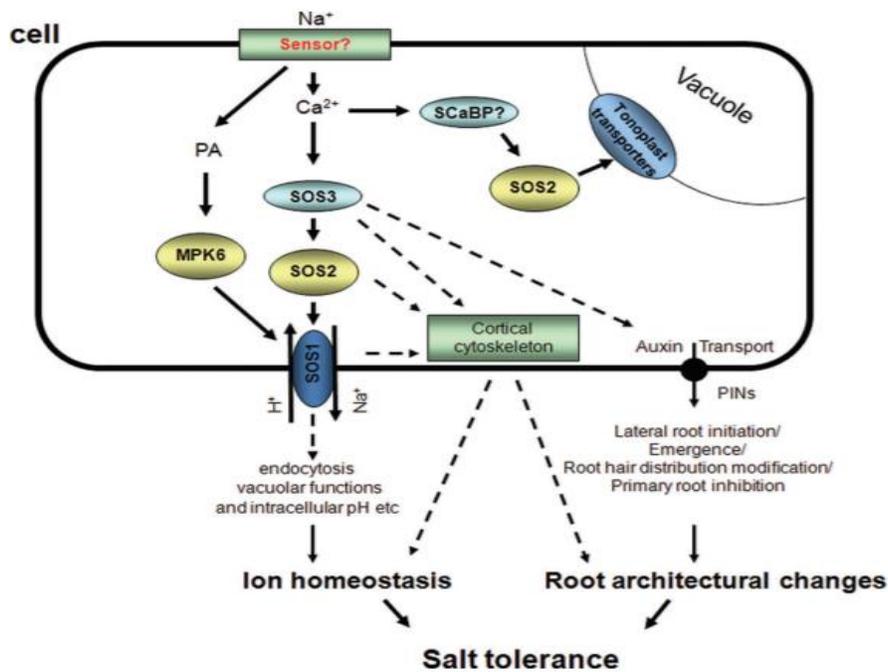


Figura 1.2 Modelo de la ruta del mecanismo SOS para respuestas de estrés de salinidad. (Ji *et al.*, 2013).

2. Compatibilidad con la acumulación de soluto y la protección osmótica.

Los solutos compatibles, también conocidos como osmolitos compatibles, son un grupo de compuestos orgánicos químicamente diversos que son de naturaleza descargada, polar y soluble, y no interfieren con el metabolismo celular incluso a altas concentraciones. Principalmente incluyen prolina (Hoque *et al.*, 2007), glicina betaína (Khan *et al.*, 2000; Wang and Nii, 2000) azúcar (Kerepesi y Galiba, 2000; Bohnert *et al.*, 1995) y polioles (Saxena *et al.*, 2013; Ashraf y Foolad, 2007; Dopp *et al.*, 1985; Ford, 1984;). Los osmolitos orgánicos se sintetizan y se acumulan en cantidades variables entre las diferentes especies de plantas. Por ejemplo, la acumulación de beta-alanina-betaína en el compuesto de amonio cuaternario está restringida entre algunos miembros de Plumbaginaceae, mientras que la acumulación de aminoácido prolina se produce en conjuntos de plantas taxonómicamente diversas (Saxena *et al.*, 2013). La concentración de solutos compatibles dentro de la célula se mantiene ya sea por síntesis irreversible de los compuestos o por una combinación de síntesis y degradación. Las vías bioquímicas y los genes implicados en estos procesos se han estudiado a fondo. Su acumulación es proporcional a la osmolaridad externa, las

principales funciones de estos osmolitos son proteger la estructura y mantener el equilibrio osmótico dentro de la célula a través del influjo continuo de agua (Hasegawa *et al.*, 2000). Los aminoácidos como la cisteína, la arginina y la metionina, que constituyen aproximadamente el 55% del total de aminoácidos libres, disminuyen cuando se exponen al estrés por salinidad, mientras que la concentración de prolina aumenta en respuesta al estrés por salinidad (Shintinawy y El-Shourbagy, 2001). La acumulación de prolina es una medida conocida adoptada para aliviar el estrés por salinidad (Matysik *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2010). La prolina intracelular que se acumula durante el estrés de salinidad no solo proporciona tolerancia al estrés, sino que también sirve como reserva de nitrógeno orgánico durante la recuperación del estrés.

1.4 Ácido abscísico (ABA)

Las fitohormonas son los reguladores clave del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como los mediadores de las respuestas al estrés ambiental (Sreenivasulu *et al.*, 2012). Entre varias fitohormonas, el ácido abscísico (ABA), que es el regulador central de la resistencia al estrés abiótico en las plantas y coordina una serie de funciones (Wani y Kumar, 2015; Finkelstein, 2013), lo que permite a las plantas hacer frente a diferentes tensiones. En la planta, cuando las condiciones ambientales son duras, el nivel de ABA aumenta a través de la biosíntesis de ABA. El aumento de ABA se une a su receptor para iniciar la transducción de señal que conduce a respuestas a tensiones celulares (Ng *et al.*, 2014); por lo tanto, también se llama ABA hormona del estrés (Mehrotra *et al.*, 2014). ABA es un ácido débil que fue aislado por primera vez de las frutas jóvenes de algodón como una sustancia aceleradora de la abscisión por Frederick Addicott y sus asociados (Ohkuma *et al.*, 1963). Inicialmente, se pensó que ABA tenía un papel importante en el proceso de abscisión de la fruta (Ohkuma *et al.*, 1963; Cracker y Abeles, 1969). Sin embargo, estudios intensivos posteriores muestran que ABA no participó directamente en el proceso de abscisión. El papel preciso de ABA en los órganos de absceso es promover la senescencia y las respuestas al estrés, que son los procesos anteriores a la abscisión (Finkelstein, 2013). Las tensiones ambientales como la sequía, la sal y la baja temperatura que reducen la disponibilidad de agua (Cutler *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010),

también llamado estrés osmótico, promueven la síntesis de ABA. ABA aumenta significativamente en condiciones de estrés por sequía o salinidad, estimula el cierre estomático, cambios en la expresión génica y respuestas fisiológicas adaptativas (Cutler *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Seki *et al.*, 2002). ABA también desempeña un papel importante en muchos procesos celulares, incluidos el desarrollo de semillas, latencia, germinación, crecimiento vegetativo (Finkelstein *et al.*, 2008; Xiong y Zhu, 2003) y la modulación de la arquitectura de raíz (Harris, 2015). Desde el descubrimiento de ABA, se han dedicado varios esfuerzos para comprender cómo se sintetiza ABA bajo condiciones de estrés.

Se cree que el ácido abscísico es la hormona clave que media las respuestas de la planta a estímulos ambientales adversos ya que el nivel de ABA en las plantas generalmente aumenta durante condiciones de estrés abiótico, y el ABA elevado puede mejorar la adaptación de la planta a diversos estreses abióticos (Tuteja, 2007; Swamy y Smith, 1999). Desde la primera observación de la acumulación de ABA en trigo tratado con sequía (Wright, 1969), se han reportado niveles elevados de ABA endógeno en condiciones de estrés por sequía en muchas especies de plantas que incluyen maíz (Wang *et al.*, 2008; Beardsell y Cohen, 1975), sorgo (Kannangara *et al.*, 1983), arroz (Henson, 1984), cebada (Thameur *et al.*, 2011; Stewart y Voetberg, 1985), soja (Bensen *et al.*, 1988) y trigo (Guoth *et al.*, 2009). También se ha observado un aumento del nivel de ABA endógeno en células de tabaco estresadas con sal y plántulas de alfalfa (Luo *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1987). La aplicación exógena de ABA a las plantas puede aumentar sus respuestas adaptativas al estrés abiótico. Se ha revelado que la aplicación externa de ABA aumenta la tolerancia a la sequía en algunas especies de plantas (Wei *et al.*, 2015; Yadegari *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2013; Waterland *et al.*, 2010). Los tratamientos con ABA podrían aumentar la resistencia al frío en pepino (Flores *et al.*, 1988) y alfalfa (Mohapatra *et al.*, 1988). También se muestra que ABA puede aliviar el estrés salino en frijol y papa (Khadri *et al.*, 2006; Etehadnia *et al.*, 2008). Además de su papel en la regulación de la apertura estomática, que se requiere para limitar la pérdida de agua de las hojas en condiciones de sequía, ABA induce la expresión de muchos genes cuyos productos son importantes para las respuestas al estrés y la tolerancia como enzimas para la síntesis osmoprotectora (Fujita *et al.*, 2011). Los estudios de transcriptoma han demostrado que

más del 50% de los genes regulados por ABA también se rigen por la sequía o la salinidad, mientras que el transcriptoma regulado por frío muestra una menor superposición con los inducidos por otros factores estresantes. Seki y sus asociados identificaron 245 genes inducibles por ABA en *Arabidopsis*. Entre los genes inducibles por ABA, 63% (155 genes) fueron inducidos por la sequía, 54% (133 genes) por alta salinidad, 10% (25 genes) por tratamiento en frío (Seki et al., 2002). Rabbani *et al.* (2003) identificaron 73 genes inducibles por estrés en el arroz, entre ellos, 43 genes fueron inducidos por ABA. Estos resultados indican relación significativa entre la respuesta ABA y las vías de señalización de estrés abiótico, especialmente para la sequía y la alta salinidad. El conocimiento de que ABA es un regulador clave de respuestas de estrés abiótico se ha utilizado para desarrollar cultivos con mayor tolerancia en condiciones de estrés. Se ha demostrado que los cultivos transgénicos que sobreexpresan el gen clave de síntesis de ABA NCED (9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa) muestran una tolerancia a la sequía mejorada. De forma similar, se ha informado que los cultivos que sobreexpresan el gen del receptor ABA-PYR (resistencia a la pirabactina) confieren tolerancia a la sequía. Sin embargo, en muchos estudios, los efectos de los transgénicos manipulados con ABA no se probaron para su rendimiento, aunque mostraron tolerancia al estrés abiótico. Algunos estudios informaron una mejor biomasa y calidad nutricional a nivel de rendimiento (Sivamani *et al.*, 2000; Aswath et al., 2005; Bao *et al.*, 2016).

La biosíntesis de ácido abscísico ocurre en dos lugares; comienza desde plástidos y termina en el citosol. ABA en plantas superiores sintetizadas a través de la vía independiente del ácido mevalónico también llamada ruta indirecta. En esta vía, ABA se sintetiza a través de la escisión de un precursor de carotenoide C40, seguido de una conversión en dos etapas de la xantoxina intermedia a ABA a través de aldehído ABA, que se oxidará en ABA. El mecanismo principal de la ruta de biosíntesis de ABA se muestra en la Figura 1.3. El primer paso de la ruta de biosíntesis de ABA es la conversión de zeaxantina y antraxantina en todas las trans-violaxantinas, que serán catalizadas por zeaxantina epoxidasa (ZEP) en el plástido. El ZEP fue identificado por Marin *et al.* (1996). En esta reacción, la antraxantina es el intermediario formado. Después de eso, toda la trans-violaxantina se convirtió en 9-cis-violaxantina o 90-cisneoxantina. La enzima involucrada en esta reacción es desconocida (Seiler *et al.*, 2011). Después de eso, la escisión oxidativa de 9-cisviolaxantina y 9-cis-neoxantina, catalizada por la enzima

llamada 9-cis-epoxi carotenoide dioxigenasa (NCED), que produce un producto intermedio llamado xantoxina (Schwartz *et al.*, 1997). El gen ZmNCED se aisló por primera vez usando el mutante viviparous14 de maíz, y NCED es la enzima clave en la biosíntesis de ABA (Tan *et al.*, 1997). Luego, el producto xanthoxin se exporta al citosol (Nambara y Marion-Poll, 2005) donde la xantoxina se convierte en ABA. En este paso, la xantoxina se convierte en un ABA aldehído mediante una enzima llamada alcohol deshidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR) codificada por el gen AtABA2 en *Arabidopsis thaliana* (Rook *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Gonzalez- Guzman *et al.*, 2002). El siguiente y último paso de la biosíntesis de ABA es la oxidación del aldehído abscísico a ABA, catalizada por la enzima aldehído oxidasa abscísica (AAO).

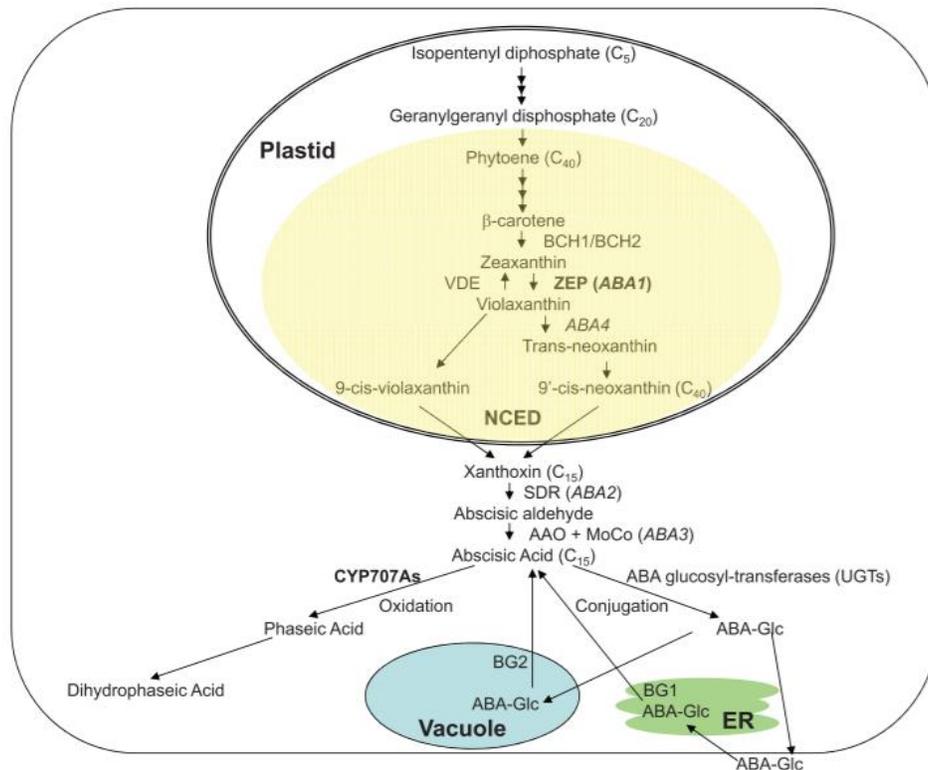


Figura 1.3. Representación esquemática de la biosíntesis de ABA en plantas. ABA se deriva de β -caroteno (C40) a través de una reacción de escisión oxidativa en plastidios. El primer paso de la vía de biosíntesis de ABA es la conversión de zeaxantina y antheraxantina en todas las trans-violaxantinas, que serán catalizadas por zeaxantina epoxidasa (ZEP). Antheraxanthin es el producto intermedio. All-trans-violaxantina se convierte en 9-cis-violaxantina o 90-cis-neoxantina por la 9-cis-epoxi carotenoide dioxigenasa (NCED), que produce un producto intermedio C15 llamado

xantroxina. Luego, el producto xanthoxin se exporta al citosol (Nambara y Marion-Poll, 2005) donde la xantroxina se convierte en ABA. La xantroxina se convierte luego en ABA mediante dos reacciones enzimáticas. Finalmente, la xantroxina se convierte en un aldehído ABA por la enzima, alcohol deshidrogenasa / reductasa de cadena corta (SDR), y luego la oxidación del aldehído abscísico a ABA es catalizada por la enzima aldehído oxidasa abscisa (Modificado de Finkelstein *et al.*, 2013).

Catabolismo ABA. Cuando las señales de estrés disminuyen, el ABA se metaboliza en productos inactivos (Ng *et al.*, 2014). Esto se logra mediante dos vías llamadas hidroxilación y conjugación (Nambara y Marion-Poll, 2005). En la hidroxilación, el ABA se hidroxila a través de la oxidación de tres grupos metilo (C-70, C-80 y C-90) de la estructura del anillo. Entre estos C-80 se conoce como la vía catalítica dominante (Okamoto *et al.*, 2009; Cutler y Krochko, 1999; Zeevaart y Creelman, 1988). En la vía de 80 -hidroxilación, el ácido fásico (PA) y el ácido dihidro-fásico (DPA) son los catabolitos ABA más amplios (Gillard y Walton, 1976; Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004; Nambara y Marion-Poll, 2005). La enzima del tipo del citocromo P450 (CYP707A) es una enzima crucial para el metabolismo de ABA (Kushiro *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2004). El metabolismo está controlado por la expresión del gen CYP707A en los estomas y los tejidos vasculares de las hojas en condiciones rehidratadas (Okamoto *et al.*, 2009, 2011; Nambara y Marion-Poll, 2005). De acuerdo con Lee *et al.* (2006), la activación de glucosidasa a través de la polimerización inducida por estrés también aumenta rápidamente los grupos activos de ABA. Del mismo modo, Okamoto *et al.* (2009) informaron que CYP707A3 funciona en los tejidos vasculares para reducir los niveles sistémicos de ABA. Por otro lado, CYP707A1 cataboliza grupos de ABA locales en células de protección en respuesta a la alta humedad. La segunda vía para inactivar ABA es la conjugación. La conjugación de ABA desempeña un papel significativo en la regulación de las cantidades tanto en condiciones normales como de deshidratación (Lee *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012). ABA y sus catabolitos hidroxilados pueden conjugarse con glucosa. El éster de glucosilo ABA (ABA-GE) se sintetiza por la glicosiltransferasa. ABA-GE se sintetiza en el citosol y se almacena en vacuolas (Lim *et al.*, 2005, Boursiac *et al.*, 2013). En condiciones de estrés abiótico, el éster de glucosilo ABA podría convertirse en ABA por hidrólisis catalizada por enzimas. La enzima glucosidasa que cataliza la hidrólisis de

ABA-GE para liberar ABA se demostró por primera vez en la cebada (Dietz *et al.*, 2000). Posteriormente, dos enzimas hidrolizantes ABA-GE, BG1 (beta-glicosidasa homólogo 1) y BG2, se aislaron en *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012). BG1 se encuentra en el retículo endoplásmico mientras que BG2 está presente en la vacuola (Lee *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012).

1.5 Sistemas de regulación de la expresión génica ante estrés abiótico

El estrés abiótico, como la sequía y la alta salinidad inducen la expresión de un gran número de genes. La inducción de estos genes bajo estrés se regula a través de complejas redes transcripcionales (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Los genes clave que funcionan en estas redes transcripcionales han sido revelados por estudios moleculares y son importantes candidatos para el desarrollo de plantas transgénicas tolerantes al estrés abiótico. Estudios realizados en *Arabidopsis* han identificado dos vías importantes de las redes transcripcionales en condiciones de estrés abiótico: Una vía de señalización dependiente del ácido abscísico (ABA) y una red reguladora independiente de ABA (Deinlein *et al.* 2014; Gollack *et al.*, 2014; Yoshida *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2011; Thomashow, 2010; Hua, 2009; Chinnusamy *et al.*, 2007; Bartels y Sunkar, 2005; Zhu, 2002, ;).

Ruta de señalización ABA-Dependiente. En respuesta al estrés ABA es sintetizado mediante una enzima clave la 9-cisepoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) (Iuchi *et al.*, 2001). Estudios en *Arabidopsis* han identificados cinco genes que codifican la enzima NCED y se ha descubierto que la expresión de NCED3 aumenta en condiciones deficientes de agua (Iuchi *et al.*, 2001). Kuromori *et al.* (2014) han demostrado que las células específicas en el tejido vascular sintetizan ABA y transportan la molécula a las células diana. Bauer *et al.* (2013) han propuesto que la ABA se sintetiza de forma autónoma en células guardianas. El ABA sintetizado o transportado es percibido por un complejo receptor que consiste en PYR (RESISTENCIA A PYRABACTIN) / PYL (PYR1-LIKE) / RCAR (COMPONENTE REGULADOR DE LA RESPUESTA ABA), PP2C (proteína fosfatasa 2C) y SnRK2 (La proteína quinasa 2 relacionada con la sacarosa no fermentada) (Cutler *et al.*, 2010, Raghavendra *et al.*, 2010, Umezawa *et al.*, 2010, Weiner *et al.*, 2010). Una serie de estudios han aclarado los cambios estructurales moleculares

que se producen durante la percepción de ABA y en la cascada de señalización de ABA (Cutler *et al.*, 2010; Raghavendra *et al.*, 2010; Umezawa *et al.*, 2010; Weiner *et al.*, 2010; Miyakawa *et al.*, 2013). En ausencia de ABA, los PP2Cs reprimen la vía de señalización ABA por desfosforilación que propicia la inactivación de SnRK2s. En presencia de ABA, los PYL / PYR / RCARs enlazados a ABA reconocen y se unen a PP2Cs, liberando así SnRK2s de la regulación negativa dependiente de PP2C. Los SnRKs activados fosforilan las proteínas aguas abajo incluyendo factores de transcripción AREB/ABF (factor de unión de cis-elemento sensible a ABA/factor de unión a elementos cis sensible a ABA). Los factores de transcripción AREB/ABF tienen un dominio bZIP y cuatro dominios conservados que contienen sitios de fosforilación de SnRK2. Los AREB/ABF fosforilados se activan y se unen al elemento cis sensible a ABA (ABRE, PyACGTGG/TC), que se enriquece en regiones promotoras de genes inducibles por sequía. AREB/ABFs funcionan como activadores transcripcionales que regulan la expresión génica dependiente de ABRE en señales ABA bajo condiciones de estrés por sequía (Figura 1.4).

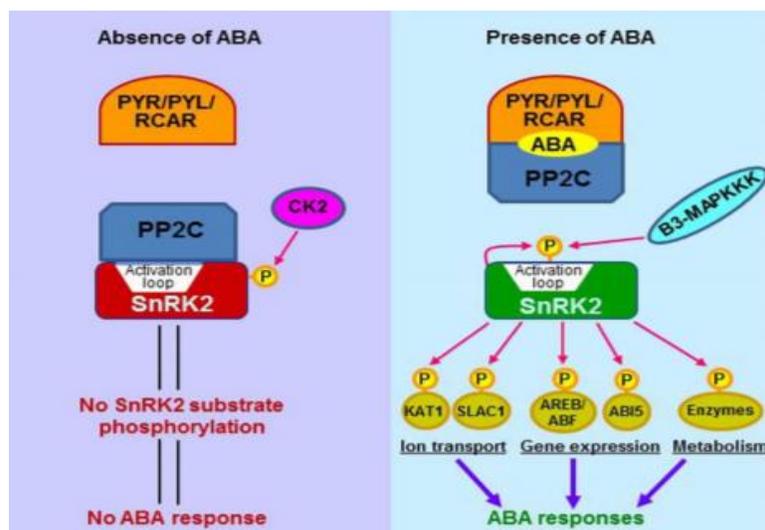


Figura 1.4. La representación esquemática de la vía principal de señalización de ABA en plantas con y sin presencia de ABA. Los componentes principales en la señalización ABA incluyen los receptores ABA (PYR/PYL/RCAR), las fosfatasas PP2C (reguladores negativos) y las quinasas SnRK2 (reguladores positivos). En ausencia de ABA, las PP2Cs se asocian con SnRK2 y evitan la activación de SnRK2. Los SnRK2 inactivos son incapaces de fosforilar sustratos aguas abajo, y por lo tanto la transducción de señales no está ocurriendo. En presencia de ABA, los receptores PYR/PYL/RCAR se unen a ABA e interactúan con PP2Cs, que liberan SnRK2. Los

SnRK2s se activan luego por autofosforilación del ciclo de activación. Los SnRK2s activos pueden fosforilar las proteínas del sustrato aguas abajo, incluyendo factores de transcripción, canales iónicos y enzimas tales como NADPH oxidasas, induciendo de este modo respuestas de ABA. SnRK2s están sujetos a regulación por otras proteínas quinasas. Se ha demostrado que una quinasa similar a Raf (B3-MAPKKK) activa SnRK2 mediante la fosforilación del bucle de activación, mientras que la caseína quinasa 2 (CK2) puede fosforilar los residuos de serina carboxilo terminales de SnRK2, mejorando la interacción SnRK2-PP2C e inactivando SnRK2. El SnRK2 catalíticamente activo se muestra en verde y el SnRK2 inactivo está en rojo. Factor de unión al elemento ABF, ABA-responsive; ABI5, insensible a ABA 5; AREB, proteína de unión al elemento que responde a ABA; B3-MAPKKK, quinasa quinasa MAP de tipo Raf de tipo B3; KAT1, canal de potasio en *Arabidopsis thaliana* 1; PP2C, proteína fosfatasa 2C; PYR, resistencia a la pirabactina; PYL, relacionado con PYR; RCAR, componente regulador del receptor ABA; SLAC1, anión lento canal 1; SnRK2, proteína quinasa 2 relacionada con la no-1 relacionada con la sacarosa.

Ruta de señalización ABA-INDEPENDIENTE mediada por DREB2 Y DREB1 / CBF. Las vías de señalización independientes de ABA también son importantes en la respuesta al estrés abiótico. Las proteínas DREB2 son factores de transcripción miembros de la familia AP2 / ERF y son específicos de plantas. De los ocho genes de DREB2 que se han estudiado en *Arabidopsis*, DREB2A y DREB2B son altamente inducidos por sequía, salinidad y estrés por calor y funcionan como activadores transcripcionales en la vía ABA independiente. Se ha identificado un dominio regulador negativo en la secuencia de aminoácidos DREB2A y se ha descrito que está implicado en la estabilidad de la proteína DREB2A (Sakuma *et al.*, 2006a, Mizoi *et al.*, 2012). En condiciones no estresadas, la degradación de las proteínas DREB2A se produce a través de la ubiquitinación de DREB2A por las proteínas que contienen dominio RING de C₃HC₄ DRIP1 (proteína interactiva DREB2A y DRIP2 (Qim *et al.*, 2008; Morimoto *et al.*, 2013). Kim *et al.* (2012a) han propuesto que la expresión de DREB2A es reprimida por GRF7, un factor regulador del crecimiento, para prevenir la inhibición del crecimiento en condiciones no estresadas. El DREB2A también desempeña un papel en la respuesta al estrés a altas temperaturas y una mayor tolerancia al estrés térmico (Sakuma *et al.*, 2006b). El uso de mutantes múltiples HsfA1 ha revelado que la expresión de DREB2A bajo condiciones de estrés por

calor está regulada por las proteínas HsfA1 (factor de choque térmico A1) (Yoshida *et al.*, 2011). Los factores de transcripción DREB1/CBF son otra subfamilia que regula la expresión de muchos genes abióticos sensibles al estrés. DREB1/CBFs son reguladores claves en la expresión de genes que responden al estrés a baja temperatura (Figura 1.5). En plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan genes DREB1 / CBF han presentado una mayor tolerancia al estrés a bajas temperaturas, así como la tolerancia al estrés por sequía y salinidad (Kasuga *et al.*, 1999; Yamaguchi Shinozaki y Shinozaki, 2006).

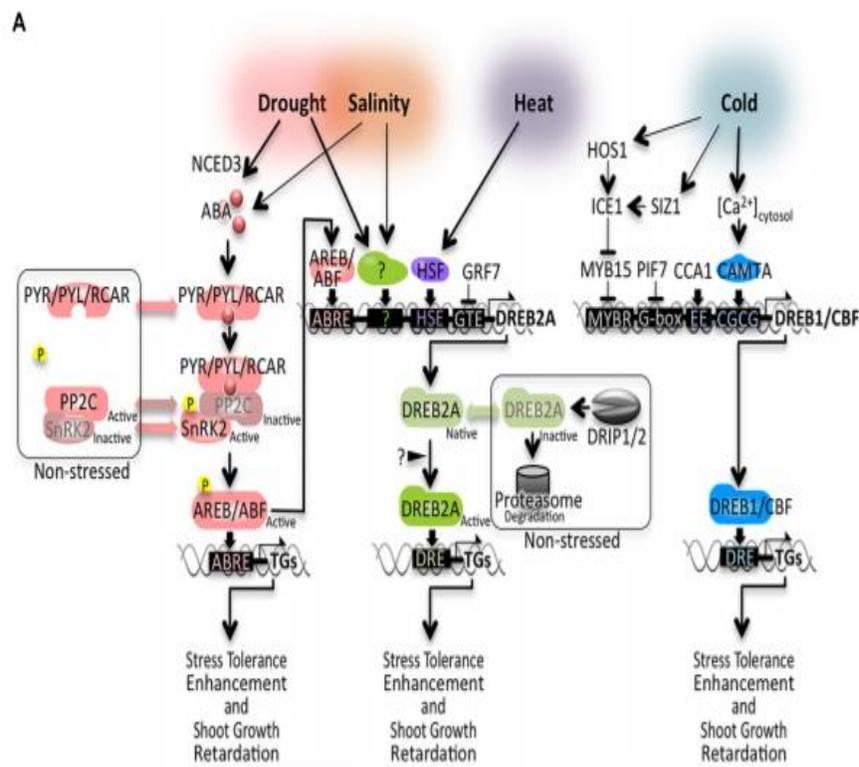


Figura 1.5. Redes de señalización de estrés abiótico mediadas por AREB, DREB1 y de transcripción de tipo DREB2 en *Arabidopsis* (Daisuke *et al.*, 2015).

1.6 Factores de transcripción involucrados en estrés abiótico

Las respuestas al estrés abiótico requieren la producción de proteínas metabólicas importantes tales como aquellas implicadas en la síntesis de osmoprotectores y de proteínas reguladoras que operan en las vías de transducción de señales, tales como quinasas o Factores de Transcripción (FTs). Dado que la mayoría de estas respuestas implican el control de la expresión génica, las FT juegan un papel crítico en la respuesta al estrés abiótico (Chaves y Oliveira, 2004). FTs son proteínas con un dominio que se une al ADN en los elementos de acción cis presentes en el promotor de un gen diana. Estos inducen (activadores) o reprimen (represores) la actividad de la ARN polimerasa, regulando así la expresión génica. Los TF pueden agruparse en familias de acuerdo con su dominio de unión al ADN (Riechmann *et al.*, 2000). El TF que controla un cierto grupo de genes se conoce como regulón. En la respuesta de la planta a las tensiones abióticas, se pueden identificar por lo menos cuatro regulones diferentes (Figura 1.6): (1) el regulón CBF / DREB; (2) el regulón NAC (NAM, ATAF y CUC) y ZF-HD (homeodominio de dedo de zinc); (3) el regulón AREB / ABF (factor de unión a elementos ABA-proteína / factor de unión a ABA); Y (4) el regulador MYC (mielocitosis oncogénico) / MYB (mieloblastosis oncogénica). Los dos primeros regulones son ABA independientes, y los dos últimos son ABA dependientes (Figura 1.6) (Saibo *et al.*, 2008).

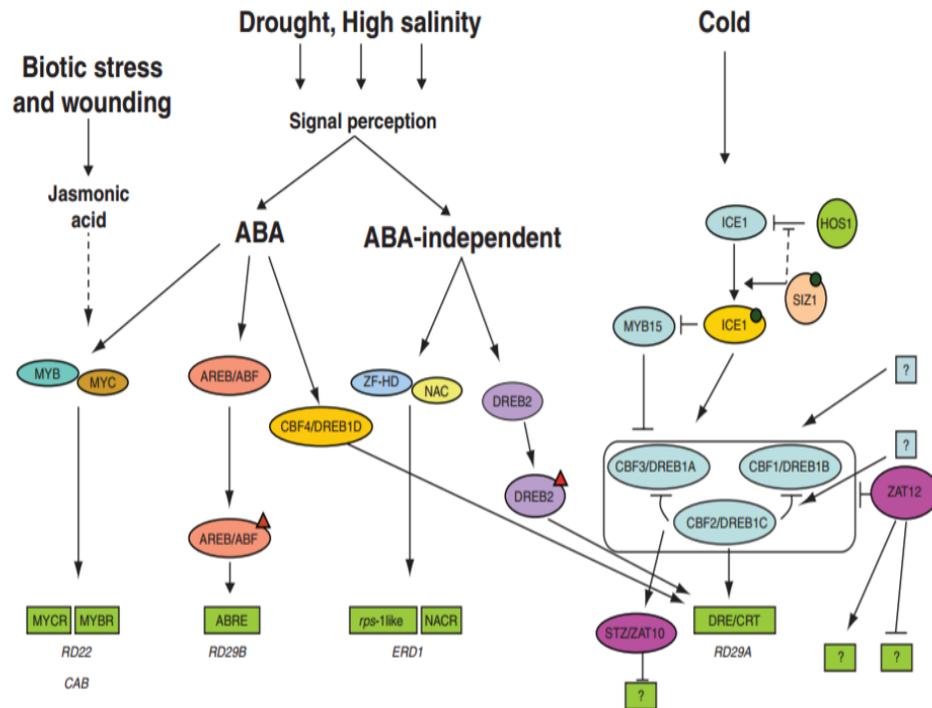


Figura 1.6. Red transcripcional de respuestas de estrés abiótico. Los factores de transcripción se muestran en óvalos. Las enzimas modificadoras del factor de transcripción se muestran en círculos. Los triángulos pequeños corresponden a modificaciones post-traduccionales. Cuadrados azules con signos de interrogación representan putativos MYC ICE1-como los factores de transcripción que pueden activar CBF1/DREB1B y CBF2/DREB1C. Las cajas verdes representan los elementos cis presentes en los genes que responden al estrés. Las cajas verdes con signos de interrogación representan elementos cis putativos en el promotor de los genes que responden al estrés. El punto negro corresponde a la modificación de sumoilacion por SIZ1 del factor de transcripción ICE1. La línea negra punteada de SIZ1 a HOS1 representa la competencia para lugares vinculantes en el factor de transcripción ICE1. SIZ1 bloquea el acceso de HOS1 a los sitios de ubiquitinación en el ICE1. CBF4 / DREB1D es un factor de unión de cis-elemento DRE que es dependiente de ABA (Saibo *et al.*, 2008).

1.7 Factor de transcripción NAC

Las proteínas NAC constituyen uno de los grupos más grandes de FT de plantas. Se expresan de forma ubicua a través de los organismos vegetales y se sabe que participan

en diversos procesos de desarrollo y respuestas al estrés. El acrónimo NAC se deriva de tres genes que inicialmente se descubrieron que contenían un dominio particular (el dominio NAC): NAM (Sin meristemo apical), ATAF1/2 (factor de activación de la transcripción de *Arabidopsis* 1/2) y CUC2 (cotiledon en forma de copa, (Souer *et al.*, 1996; Aida *et al.*, 1997). Típicamente, la familia NAC contiene un dominio de unión al ADN que es altamente conservado localizado en la región N-terminal y consta de aproximadamente 150-160 aminoácidos divididos en cinco sub-dominios (A-E) que codifican una lámina β retorcida rodeada por unos pocos elementos helicoidales (Olsen *et al.*, 2005). El dominio C-terminal contiene la región de activación transcripcional (TAR), que no se conserva entre las plantas, lo que le permite regular una amplia gama de funciones celulares actuando como un activador transcripcional o represor (Tran *et al.*, 2004; Ooka *et al.*, 2003) (Figura 1.7).

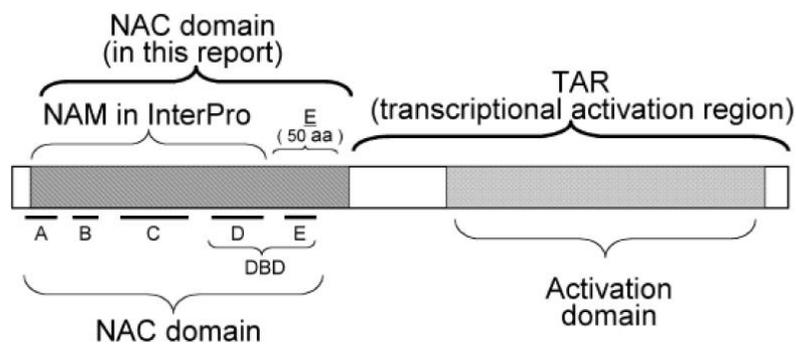


Figura 1.7. Esquema de la estructura de un factor de transcripción NAC. La región dominio de unión al ADN está contenida en los subdominios D y E. La región TAR (Región de activación transcripcional) se encuentra en el C-terminal de las proteínas de la familia NAC.

En muchos casos, los FT de NAC se almacenan inactivamente en el citoplasma y se translocan al núcleo después de la estimulación. El NAC TAR contiene motivos transmembranales (TMM) que ayudan a anclar la proteína a la membrana plasmática y proporcionar un método eficaz para la regulación de genes, que es una estrategia adaptativa que permite respuestas rápidas a los cambios ambientales (Kim *et al.*, 2006; Hoppe *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2000). NAC FT desempeña varios papeles esenciales en el desarrollo de la planta como (Kato *et al.*, 2010), senescencia (Balazadeh *et al.*, 2010), auxina señalización (He *et al.*, 2005), tiempo de floración (Kim *et al.*, 2010), morfogénesis floral (Sablowski *et al.*, 1998, Shih *et al.*, 2014), raíz lateral de desarrollo (He *et al.*, 2005), movilización de nutrientes (Waters *et al.*, 2009), desarrollo de margen foliar (Nikovics *et al.*, 2006), maduración de los frutos (Shan *et al.*, 2012), control de la longevidad (Wu *et al.*, 2012), desarrollo de embriones (Duval *et al.*, 2002), formación de brotes meristemáticos postembrionarios (Hibara *et al.*, 2006), movimiento de las hojas (Rauf *et al.*, 2013) la formación de elementos vasculares (Yamaguchi *et al.*, 2008), y la tolerancia a múltiples estreses bióticos (Jensen *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009) y abióticos (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1994; He *et al.*, 2005, Lu *et al.*, 2007; Balazadeh *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010), entre otros (Tabla 1).

Tabla 1. Antecedentes de sobreexpresantes del gen NAC.

Planta transgénica	Gen/Procedencia	Fenotipo de la planta transgénica	Referencia
	SNAC1/Arroz	Tolerancia a salinidad	Hu <i>et al.</i> , 2006
	OsNAC2/Arroz	Tolerancia salinidad y sequía	Shen <i>et al.</i> , 2016
<i>Oryza sativa</i>	ORS1/Arroz	Control de la senescencia	Balazadeh <i>et al.</i> , 2011
	OsNAC10/Arroz	Tolerancia a sequía	Jeong <i>et al.</i> , 2010
	SNAC2/Arroz IRA 109	Tolerancia a salinidad y frío	Hu <i>et al.</i> , 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NTL8 (NAC) / Arabidopsis	Señalización en salinidad mediada por GA	Kim <i>et al.</i> , 2008
	GmNAC20 / <i>Glycine max</i>	Tolerancia a salinidad	Hao <i>et al.</i> , 2011
<i>Solanum tuberosum</i>	SINAC1/ Tomate SINAM1/ Tomate	Respuesta a salinidad	Yang <i>et al.</i> , 2011

<i>Solanum lycopersicum</i>	SINAC3/ Tomate	Tolerancia a salinidad y sequía	Han <i>et al.</i> , 2011
	TaNAC2a/ Tabaco	Tolerancia a sequía	Tang <i>et al.</i> , 2012
<i>Nicotiana tabacum</i>	DgNAC1/ Chrysanthemum	Tolerancia a salinidad	Liu <i>et al.</i> , 2011

Antecedentes de Filogenias de los Factores de Transcripción NAC. Han realizado varios árboles filogenéticos de los Factores de transcripción NAC en diversas especies de plantas tales como arabis (Zhu T. *et al.*, 2011; Ramaswamy M *et al.*, 2017; Ooka H. *et al.*, 2003.), arroz (Ramaswamy M *et al.*, 2017; Ooka H. *et al.*, 2003). Trigo (Borrill P. *et al.*, 2017), entre otras.

Actualmente, el árbol filogenético de los factores de transcripción NAC más completo es el de Pereira *et al.* (2015), en el cual se realizó un análisis comparativo del genoma en 24 especies de plantas terrestres. Un total de 3,187 factores de transcripción NAC se agruparon en seis grupos principales en el análisis filogenético.

1.8. Modelo de estudio: *Saccharum officinarum*

S. officinarum comúnmente conocida como caña de azúcar es una gramínea tropical perenne con tallos gruesos y fibrosos que pueden crecer entre 3 y 5 metros de altura. Éstos contienen una gran cantidad de sacarosa que se procesa para la obtención de azúcar. La caña de azúcar es uno de los cultivos agroindustriales más importantes en las regiones tropicales (Ramírez, 2008).

Se adapta a casi cualquier tipo de suelo, pero se desarrolla mejor en suelos francos, profundos y bien drenados. Se prefieren suelos con un pH de 7.4, pero se puede cultivar en un rango de 5.5 a 7.8. El cultivo demanda altos requerimientos nutricionales en consideración a la alta cantidad de materia verde y seca que produce, situación que agota los suelos y hace necesario un adecuado programa de fertilización. Sin embargo, es muy eficiente en el aprovechamiento de la luz solar. La caña de azúcar requiere grandes cantidades de agua, aunque también es relativamente eficiente en su uso. La

precipitación mínima es de 1500 mm por temporada. Si la precipitación no es suficiente para cubrir esa cantidad, se puede utilizar irrigación; Se cultiva en los climas tropicales y subtropicales, desarrollándose mejor en climas calientes y con mucha exposición solar. (Ramírez, 2008).

Generalmente se cultiva a una altura entre los 0 y 1000 msnm. Requiere de un clima húmedo caliente, alternando con períodos secos y temperaturas entre los 16 y 30 grados centígrados. La propagación de la caña de azúcar se realiza por estaca. La cosecha conocida también como zafra se puede hacer de forma mecanizada como manual. Por cada plantación generalmente se extraen 4 ó 5 cortes (cosechas) y luego se realiza la renovación del cultivo. (Ramírez, 2008).

1.8.1. Descripción botánica

La raíz es de tipo fibroso, se extiende hasta 80 cm de profundidad cuando los suelos son profundos, el 80% de la misma se encuentra regularmente en los primeros 35 cm del suelo. (Díaz L., 2002)

El tallo que es la parte esencial para la producción de azúcar se encuentra dividido en nudos y entrenudos. El largo de los entrenudos puede variar según las variedades y desarrollo de la planta, está compuesto por una parte sólida llamada fibra y una parte líquida, el jugo, que contiene agua y sacarosa (Díaz, 2002).

La hoja es en forma de vaina, su función principal es proteger a la yema, nace en los entrenudos del tallo. A medida que la caña se desarrolla, las hojas bajas se vuelven senescentes, se caen y son reemplazadas por las que aparecen en los nudos superiores. También nacen en los nudos las yemas que bajo ciertas condiciones especiales pueden dar lugar al nacimiento de una nueva planta (Díaz, 2002)

La inflorescencia es una panícula de forma y tamaño variables, características de cada cultivar o variedad usado, las flores son hermafroditas completas. La manipulación sexual o por semillas se utiliza solamente en programas de mejoramiento, para la obtención de híbridos más productivos, resistentes a ciertas plagas y enfermedades o adaptables a una región específica (Océano, 2000).

1.8.2. Importancia económica

A nivel mundial, de acuerdo al FAOSTAT (2014) caña de azúcar es cultivada en 26.1 millones de hectáreas produciendo 1.83 billones de cañas a nivel mundial, siendo México el sexto país productor más importante de caña de azúcar produciendo al año más de 50 millones de toneladas (figura 1.8), por lo cual la industria azucarera es históricamente una de las más importantes en México, debido a su relevancia económica y social en el campo. (FAOSTAT, 2014). La industria azucarera genera más de dos millones de empleos, tanto de forma directa como indirecta; se desarrolla en 15 entidades federativas y 227 municipios, los ingenios azucareros generan un valor de producción primaria de alrededor de 30 mil millones de pesos al año (SAGARPA, 2014).

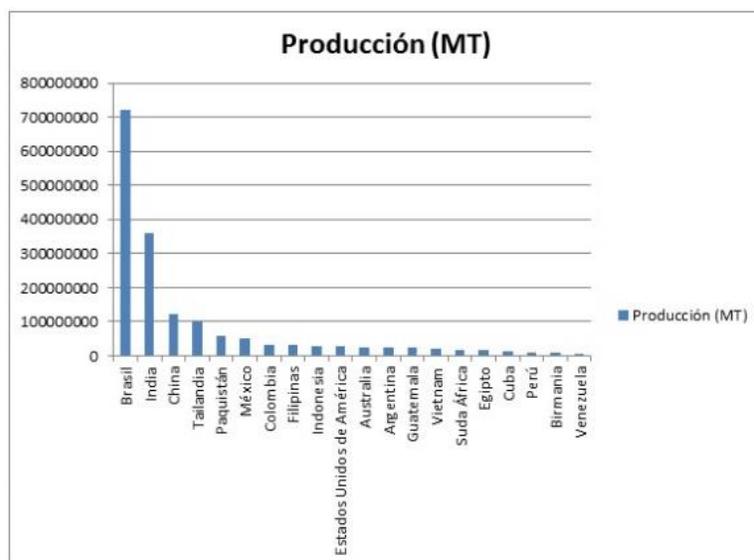


Figura 1.8. Gráfica modificada de la producción en millones de toneladas (MT) de los principales productores de caña de azúcar a nivel mundial (FAOSTAT, 2014).

1.8.3. Problemática del cultivo tradicional

Saccharum officinarum, presenta grandes problemas en la producción de caña de azúcar tales como variedades de caña en estado degenerativo, con alto desbalance en campo, insuficiencia de fertilización, así como, virus y plagas (SAGARPA, 2014).

La baja disponibilidad de agua en los cultivares de caña de azúcar puede reducir drásticamente la producción y recuperación total de la azúcar (Teramoto, 2003). A pesar de los avances en la cría de caña de azúcar, la falta de conocimiento sobre las respuestas genéticas y moleculares involucradas en la tolerancia a un estrés abiótico, representan el principal desafío para el desarrollo de cultivares tolerantes. Por otro lado, la identificación y comprensión de los genes y redes de señalización en la caña de azúcar bajo un estrés abiótico son fundamentales para el desarrollo de nuevos cultivares con mayor tolerancia en condiciones de privación de agua (Chaves, 1991).



Figura 1.9. Cultivos de *Saccharum officinarum*.

1.8.4. Respuestas morfológicas y fisiológicas de la caña de azúcar antes un estrés hídrico

El desarrollo de la caña de azúcar se divide en tres etapas: germinación, establecimiento de la planta y fase temprana de macollaje, concesión de la fase de crecimiento vegetativo y maduración y floración. Desde una perspectiva de gestión del estrés hídrico, la germinación, el macollamiento y la etapa de crecimiento vegetativo de la concesión fueron el objetivo de muchos estudios debido a que son fases de crecimiento importantes desde

la perspectiva de la producción de cultivos. La susceptibilidad de la caña de azúcar a la sequía es mayor en las fases de macollamiento y elongación del tallo (Machado *et al.*, 2009; Inman-Bamber y Smith, 2005). Sin embargo, el estrés de sequía moderado en la fase de maduración tiene efectos positivos sobre el rendimiento de sacarosa, ya que la fotosíntesis es menos sensible al estrés de sequía que el crecimiento del tallo, canalizando CO₂ asimilado a la producción de sacarosa y acumulación en el tallo (Inman-Bamber, 2004). La sequía, afecta a toda la planta (Figura 1.10). Las respuestas morfológicas y fisiológicas de las plantas de caña varían según el genotipo, la duración (rápida o gradual) y la intensidad (severa o leve) del estrés y también el tipo de tejido afectado (Smit y Singels, 2006; Bartels y Sunkar, 2005). (Inman-Bamber *et al.*, 2012; Da Graça *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, el estrés de sequía también afecta sustancialmente la producción de caña y azúcar. Sin embargo, se ha informado una gran variación genética potencialmente explotable para el rendimiento de caña y azúcar bajo estrés de sequía (Basnayake *et al.*, 2012; Hemaprabha *et al.*, 2006, 2004). Las respuestas de estrés de sequía más comunes en la caña de azúcar son el balanceo de las hojas, el cierre de estomas, la inhibición del crecimiento de tallos y hojas, la senescencia foliar y la reducción del área foliar (Inman-Bamber *et al.*, 2012; Inman-Bamber y Smith, 2005). Además, bajo estrés hídrico, tanto la división celular como el alargamiento celular se interrumpen (Machado *et al.*, 2009) y el alargamiento del tallo y la hoja son los procesos de crecimiento más afectados (Inman-Bamber *et al.*, 2008; Inman-Bamber, 2004). El desarrollo de la raíz también está influenciado por el déficit hídrico (Smit y Singels, 2006; Inman-Bamber y Smith, 2005), pero relativamente menor que la biomasa aérea. La caña de azúcar es un cultivo tropical con metabolismo fotosintético C4. Bajo estrés de sequía moderado, una disminución en la conductancia estomática (gs), la tasa de transpiración (E), la concentración interna de CO₂ (Ci) y la tasa fotosintética ocurren, principalmente debido a las limitaciones estomáticas (Basnayake *et al.*, 2015; Medeiros *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2012; Da Graça *et al.*, 2010; Endres *et al.*, 2010; Silva *et al.* 2007; Inman-Bamber y Smith, 2005; Du *et al.*, 1996). Esto, junto con la inhibición del crecimiento del tallo y la hoja, es la adaptación inicial más común cuando las plantas de caña de azúcar son sometidas a una deshidratación leve a moderada (Inman-Bamber y Smith, 2005). Sin embargo, las limitaciones no estomáticas inducidas por el estrés de sequía también se han informado como causa de la inhibición de la fotosíntesis en la caña de azúcar (Ribeiro *et al.*, 2013). Esto ocurre a menudo cuando el estrés es severo o bajo

condiciones prolongadas de déficit de agua moderado (Basnayake *et al.*, 2015). La disminución inducida por el estrés de sequía en la tasa fotosintética es causada principalmente por una disminución en la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcase) y ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco) (Lakshmanan y Robinson, 2014; Inman-Bamber y Smith, 2005). Vale la pena señalar que la tasa de fotosíntesis también se ve afectada por la acumulación de azúcar en las hojas (McCormick *et al.*, 2008). Bajo condiciones no estresadas, el bajo contenido de azúcar en la hoja es propicio a la fotosíntesis, mientras que el alto contenido de azúcar modera la fijación de carbono (Goldschmidt y Huber, 1992). Curiosamente, el aumento de los niveles de algunos azúcares, como la trehalosa, puede ayudar a las plantas a hacer frente al déficit hídrico, reduciendo el daño a la membrana celular (Delorge *et al.*, 2014). La capacidad de acumular trehalosa se demostró en raíces de caña de azúcar bajo sequía. Sales *et al.* (2012) informaron un aumento en la hidrólisis del almidón, lo que condujo a mayores niveles de azúcares solubles que ayudaron a mantener el suministro de carbono incluso en una condición de fijación de CO₂ reducida, lo que facilita la recuperación del crecimiento después del estrés.

Comprender la naturaleza del problema agrícola desde una perspectiva genética y de producción de cultivos es fundamental para desarrollar soluciones efectivas y comercialmente aplicables (Blum, 2005). El estrés se define como cualquier restricción de las funciones y el desarrollo normales que las plantas deben enfrentar durante sus ciclos de vida.

Una visión general de las alteraciones morfológicas y fisiológicas que han sido consideradas como características útiles para diferenciar genotipos de caña de azúcar susceptible y tolerante por parte de investigadores y mejoradores. Silva *et al.* (2008) concluyeron que una mayor productividad bajo estrés se asocia con un mayor número de tallos, altura del tallo y peso del tallo. Por otro lado, el diámetro del tallo es variable entre variedades, siendo más dependiente del genotipo que del ambiente (Silva *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2004; Da Silva y Da Costa, 2004). El contenido de clorofila foliar (SPADindex), temperatura de hojas y copa, tasa de fotosíntesis, conductancia estomática (gs), conductancia del dosel (gc) y tasa de transpiración (E) también se utilizan como criterios de selección indirectos para genotipos de caña de azúcar tolerantes al estrés hídrico (Basnayake *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2012; Endres *et al.*, 2010; Silva *et al.*,

2007;). La retención del área foliar verde, también denominada fenotipo "permanezca verde", también se considera una característica importante para mantener el potencial de rendimiento (Thomas y Howarth, 2000; Blum, 2005). En general, los genotipos con mayor conductancia estomática y del dosel, hojas inferiores y condiciones de estrés hídrico de leve a moderado se consideran tolerantes con potencial para desplegarse como variedades comerciales o para la reproducción. La fluorescencia de la hoja se ha utilizado como una medida indirecta de la capacidad fotoquímica de la hoja. La energía de la luz, cuando es absorbida por el fotosistema II (PSII), se puede convertir en energía fotoquímica (en forma de ATP y NAPH) o se disipará como calor o fluorescencia. Por lo tanto, todas las reacciones fotoquímicas afectan la emisión de fluorescencia. La reducción del rendimiento cuántico del fotosistema II (rendimiento del PSII o F_v / F_m) también se ha informado como una respuesta de estrés de sequía en la caña de azúcar (Cha-Um y Kirdmanee, 2008; Ribeiro *et al.*, 2013). Las características de la raíz también son útiles para predecir la capacidad de las plantas para adaptarse al estrés por sequía (Wang *et al.*, 2009; Songsri *et al.*, 2008). En la caña de azúcar, el desarrollo de raíces profundas y grandes en los sistemas puede usarse como criterio de selección para la tolerancia al estrés hídrico (Smith *et al.*, 2005). Una mayor densidad de longitud de la raíz da como resultado una mejor captación de agua, un rasgo deseable para extraer la humedad profunda del suelo cuando el agua es limitante (Tardieu, 2012; Blum, 2005; Tardieu *et al.*, 1992). Endres *et al.* (2010) encontraron un genotipo tolerante al estrés hídrico con una mayor densidad de longitud de raíz y un mejor rendimiento en el campo bajo estrés hídrico (figura 1.10). Está bien establecido que la percepción y transducción de la señal de estrés y la expresión génica resultante sustentan todas las respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las plantas frente al estrés abiótico. Por lo tanto, una mejor comprensión de estas cascadas de respuestas moleculares, celulares, tisulares, orgánicas y de plantas enteras y su interacción ayudarán a desarrollar estrategias moleculares para mejorar el rendimiento de las plantas y los cultivos en condiciones de déficit hídrico.

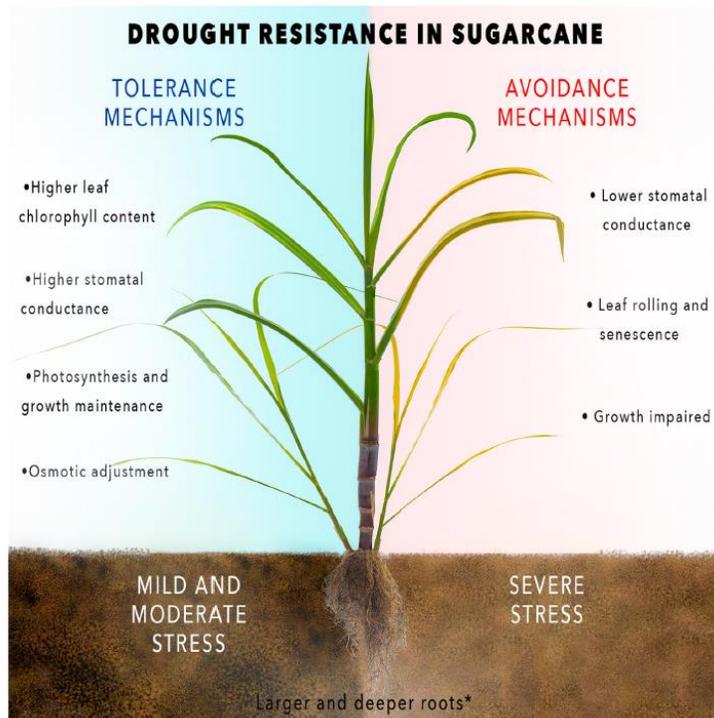


Figura 1.10. Esquema de los mecanismos de respuesta a la sequía de la caña de azúcar.

1.8.5. Análisis relativo de expresión genética de la caña de azúcar bajo estrés hídrico

El mayor uso de abordajes transcriptómicos se ha asociado estrechamente con la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) como herramienta para la validación de datos (Gutierrez *et al.*, 2008; Czechowski *et al.*, 2005). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en diferentes experimentos de transcriptoma y microtranscriptoma de caña de azúcar (Vargas *et al.*, 2014; Gentile *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2012), estudios de plantas transgénicas (Ramiro *et al.*, 2016; Augustine *et al.*, 2015b), y los análisis del perfil de expresión bajo estrés (Thiebaut *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2013). La presencia de controles internos adecuados es crítica para la confiabilidad en tiempo real (Bustin, 2000). A pesar de su uso extensivo, los parámetros para la normalización de datos qRT-PCR continúan siendo una fuente de debate (Gutierrez *et al.*, 2008; Bustin,

2000). Entre los genes de referencia clásicos (ARN ribosómico 25S, GAPDH, b-actina y b-tubulina), Iskandar *et al.* (2004) concluyeron que GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) es el mejor gen de caña de azúcar que codifica proteínas para la normalización. Estos autores evaluaron 2 cultivares de caña de azúcar y 3 otras especies de *Saccharum* bajo déficit hídrico y estrés salino. Recientemente, algunos trabajos han combinado el ensayo qRT-PCR y las herramientas estadísticas para determinar el gen más adecuado para usar como referencia en la caña de azúcar (Guo *et al.*, 2014; Ling *et al.*, 2014; Silva R. L. D. O. *et al.*, 2014). Silva R. L. D. O. y col. (2014) analizaron cañas de azúcar en exposición a estrés hídrico. Observaron que los genes que codifican GAPDH, a-tubulina e histona H1 eran los genes más confiables para la normalización de los análisis de expresión génica en raíces de caña de azúcar bajo estrés por déficit hídrico. En un análisis más amplio, Ling *et al.* (2014) analizaron la estabilidad de 13 genes de referencia candidatos en una amplia gama de muestras de caña de azúcar, que comprende cinco tejidos diferentes de plantas expuestas al estrés abiótico y al tratamiento hormonal. Los autores encontraron que los genes que codifican GAPDH, eEF-1a y el factor de iniciación eucariótico 4a (EIF-4a) fueron los genes más estables para la normalización de qRT-PCR. Lo más interesante es que también encontraron que una combinación de algunos genes tenía un mejor rendimiento en diferentes conjuntos de muestras: CUL (Cullin) y eEF-1a fueron más adecuados para la normalización de los experimentos de tratamiento hormonal, CAC y CUL para el estrés abiótico y CAC (complejo adaptador de clatrina), CUL, APRT (Adenina fosforribosil transferasa) y TIPS-41 (Proteína intrínseca tonoplástica 41) para muestras de tejido. Guo *et al.* (2014) encontraron resultados similares en plantas de caña de azúcar expuestas a déficit hídrico y estrés salino, considerándose GAPDH y eEF-1a como buenos genes de referencia para la normalización. Además, encontraron que a pesar de la baja expresión del gen diana dado, cuando se normaliza con dos o más genes de referencia, los datos de expresión se vuelven menos variables a través de las muestras. Por lo tanto, los genes más confiables para la normalización de la caña de azúcar bajo estrés son CAC + APRT, GAPDH + eEF1 y CAC + CUL. Finalmente, la asociación de qRT-PCR y análisis estadístico es la mejor herramienta para la selección de genes de referencia. Además, la validación del gen de referencia para cada conjunto de experimento y su uso en combinación son factores clave para garantizar un mejor rendimiento del análisis de expresión relativa en condiciones de déficit hídrico.

1.8.6. Variación y mejoramiento de la caña de azúcar

La caña de azúcar es posiblemente la planta que ha sido sometida a un mejoramiento más intenso, solo comparable al del maíz. Los clones de *S. officinarum* seleccionados por el hombre neolítico por sus suavidad y riqueza en azúcar, fueron la base de la primera explotación industrial. Esos clones, sin embargo, son altamente susceptibles a las enfermedades virosas, los llamados mosaicos, que se extendieron por todas las áreas azucareras y amenazaron seriamente la producción comercial hace algunas décadas. Los híbridos obtenidos con *S. spontaneum* en que se había incorporado la resistencia de esa última especie, reemplazaron a las cañas nobles, cuyo cultivo es actualmente muy reducido.

Una fuente de variación en caña son las mutaciones vegetativas. Estas se manifiestan en cambios de caracteres, como el color de los entrenudos. De una caña rojo púrpura uniforme, por ejemplo, puede salir una yema que da cañas listadas. Se ha observado también, aunque rara vez, la mutación en sentido contrario. La hibridación es la forma más importante de producir nuevos cultivares. Muchos de los clones conocidos, como “criollos”, son altamente estériles, debido a que no forman polen fértil. Desde hace siglos, sin embargo, se observó que en ciertas localidades las cañas formaban semillas perfectas que germinaban normalmente. El descubrimiento en Java a fines del siglo anterior de la caña “Glagah” de gran resistencia a virus, que se sospechaba de origen híbrido, así como el desarrollo de técnicas de polinización, fueron los pasos primeros para los grandes programas de mejoramiento.

En la caña, como en ningún otro cultivo, el estudio citológico ha sido esencial para dar base a las fases avanzadas del mejoramiento. Caña pertenece a la tribu de las Andropogóneas, cuyo número básico de cromosomas es 10 (5+5). En la caña noble *S. officinarum*, el número de cromosomas es $2n=80$, o sea que es un octoploide, como la mayoría de los tipos de *S. robustum*. Pero al hibridizar la caña noble con otras especies, como *S. spontaneum*, puede ocurrir que la primera contribuya, como es normal, con la mitad (40 cromosomas) o a veces con la totalidad de ellos (80). También se sabe en algunos casos en que la especie *S. officinarum* actúa como pariente femenino, se elimina cierto número de cromosomas, y que el número que aporta no es 40 ni 80. Estos distintos comportamientos llevan a la formación de variedades muy diferentes, aun cuando se

utilicen los mismos tipos parentales. En esos cruces *S. spontaneum* ha jugado un papel predominante.

1.8.7. Ingeniería genética de caña de azúcar para la tolerancia al estrés de hídrico

El aumento de la tolerancia al estrés hídrico en la caña de azúcar hasta ahora se logró a través de la sobreexpresión de los genes diana. Este enfoque también permite identificar y validar la función de genes, incluso aquellos que son funcionalmente redundantes (Abdeeva *et al.*, 2012; Kondou *et al.*, 2010; Nakazawa *et al.*, 2001; Ito y Meyerowitz, 2000). A pesar de la gran importancia económica, solo hay unos pocos informes de investigación transgénica que hicieron algunos avances notables en la mejora de la tolerancia al estrés hídrico en la caña de azúcar. En todos ellos, el gen elegido está asociado con respuestas de estrés hídrico o se sabe que confieren tolerancia al estrés hídrico en otras especies (Ramiro *et al.*, 2016; Augustine *et al.*, 2015c; Reis *et al.*, 2014; Zhang SZ *et al.*, 2006). En este contexto, es importante señalar que una línea de caña de azúcar transgénica que transporta colina deshidrogenasa, que se atribuye tolerancia al estrés hídrico, probablemente se convertirá en la primera caña de azúcar transgénica cultivada comercialmente en el mundo (B. Sugiharto, comunicación personal). Esta enzima está involucrada en la síntesis de glicina betaína, que ayuda a mantener el potencial hídrico de las células mediante el ajuste osmótico. Los genes reguladores inducidos por estrés hídrico son candidatos potenciales para desarrollar plantas tolerantes al déficit hídrico (Reis *et al.*, 2014). Los genes DREB constituyen la primera familia de factores de transcripción que se asociaron con la regulación génica bajo estrés abiótico (Moran *et al.*, 1994). La sobreexpresión de AtDREB2A CA (Constitutivamente activa) mejoró la tolerancia a la sequía en la caña de azúcar, como lo demuestra el mayor contenido relativo de agua (RWC), tasa fotosintética, contenido de sacarosa y brotación de yemas, sin ningún efecto negativo sobre la acumulación de biomasa (Reis *et al.*, 2014). Además, la sobreexpresión del gen DREB2 de *Erianthus arundinaceus* aumentó la tolerancia a la sequía y la salinidad en la caña de azúcar (Augustine *et al.*, 2015c). El gen PEH PDH45 codifica una helicasa 45 de ADN, una proteína motora de la clase helicasa. Este grupo de proteínas juega un papel importante en el desenrollamiento dúplex de ácidos nucleicos. En otro estudio relacionado, Augustine *et al.* (2015b) demostraron una

mayor tolerancia a la sequía y la salinidad con la sobreexpresión de PDH45 en las plantas de caña de azúcar. Sin embargo, cuando el gen AtDREB2A se coexpresó con el gen Pea PDH45, las plantas transgénicas mostraron una mayor tolerancia a la salinidad, pero se volvieron menos tolerantes al déficit hídrico en comparación con aquellas que expresan solo el gen DREB2. Las HSP70 son chaperonas moleculares implicadas en la estabilización de proteínas y membranas y restablecen la conformación proteica normal bajo condiciones de estrés. Las plantas transgénicas de caña de azúcar que sobreexpresan *E. arundinaceus* HSP70 mostraron tolerancia al estrés hídrico y estrés hídrico mejorada, exhibiendo termoestabilidad de alta membrana, RWC, parámetros de intercambio de gases, contenido de clorofila y eficiencia fotosintética bajo déficit hídrico y mejor capacidad de germinación de brotes bajo estrés salino (Augustine *et al.* 2015a).

La manipulación de los genes que regulan la presión osmótica en el déficit hídrico es un enfoque potencialmente útil para los mecanismos de tolerancia a la sequía (Raza *et al.*, 2016; Nelson, 1994). El gen de *Arabidopsis* H⁺-PPasa (AVP1) codifica una proteína de membrana vacuolar capaz de aumentar el contenido de soluto vacuolar mediante la absorción de H⁺ del citoplasma a las vacuolas. La sobreexpresión de AVP1 en la caña de azúcar transgénica mejoró la tolerancia a la sequía y la sal (Raza *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2014) con mayor RWC y agua de hojas, potencial osmótico y de turgencia y tamaño, profundidad y biomasa de raíces. Con respecto al metabolismo del azúcar, las plantas de caña de azúcar transgénicas que sobreexpresaron un gen de la trehalosa sintasa (TS) de *Grifola frondosa* mejoraron la tolerancia al estrés hídrico a través de la acumulación de trehalosa (Zhang S. Z. *et al.*, 2006). Las líneas de TS que sobreexpresantes mostraron un mayor contenido de clorofila y actividad de enzimas antioxidantes, menor permeabilidad de la membrana plasmática y menor contenido de malondialdehído. La subfamilia BAX se destaca entre las proteínas que regulan la inducción de la señalización de ROS (Watanabe y Lam, 2008). La sobreexpresión de un inhibidor de BAX de *A. thaliana* (BI-1) mejoró la tolerancia al déficit hídrico en las plantas de caña de azúcar mediante la supresión de la muerte celular inducida por el estrés del retículo endoplásmico (Ramiro *et al.*, 2016). El uso de promotores constitutivos es el enfoque más común en la transformación de la caña de azúcar. El promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) es ampliamente utilizado para la transformación de plantas (Porto *et al.*, 2014), produciendo altos niveles de expresión transgénica (Dutt *et al.*, 2014). Sus efectos

pueden aumentarse al incluir secuencias adicionales, como elementos duplicados del promotor 35S (Dhadi *et al.*, 2009). Aunque altos niveles de expresión transgénica impulsada por el promotor 35S son particularmente comunes en plantas dicotiledóneas (Battraw y Hall, 1990; Benfey *et al.*, 1990) que no es el caso en plantas monocotiledóneas (Park *et al.*, 2010; Lakshmanan *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2001; Weeks *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 1992). Estudios recientes apuntan a los promotores de ubiquitina como una opción emergente para la expresión constitutiva de transgenes en la caña de azúcar (Lakshmanan *et al.*, 2005), principalmente debido a que sus niveles de expresión transgénica son significativamente mayores en comparación con otros promotores, como el promotor CaMV 35S, la actina de arroz Act1 promotor (McElroy *et al.*, 1991) y el promotor sintético Emu (Last *et al.*, 1991). Aunque los promotores condicionales no utilizados comúnmente pueden ser más ventajosos (Dutt *et al.*, 2014; Kizis y Lumbreras, 2001), ya que estos promotores teóricamente permiten el control de la expresión génica en etapas y tejidos específicos del desarrollo en respuesta a estímulos ambientales. Esto podría reducir las pérdidas de rendimiento en cultivos tolerantes al estrés, ya que elimina los efectos negativos del desarrollo causados por la expresión constitutiva del transgén en condiciones no estresadas (Peleg y Blumwald, 2011). Reis *et al.* (2014) utilizaron el promotor del gen ab17 ABA sensible al estrés inducible para dirigir la expresión del gen AtDREB2A CA en plantas de caña de azúcar, evitando los problemas de crecimiento de las plantas asociados con la expresión constitutiva del transgén (Kasuga *et al.*, 1999). Sin embargo, la disponibilidad de promotores condicionales útiles para la caña de azúcar es limitada (Chakravarthi *et al.*, 2016). Dos estrategias principales son ampliamente utilizadas para producir plantas transgénicas en caña de azúcar: transformación directa a través de microproyectiles (biolística) (Bower y Birch, 1992) y transformación indirecta mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Arencibia *et al.*, 1998). La biología es un método común utilizado para la transformación de la caña de azúcar (Altpeter y Sand1hu, 2010) debido a su simplicidad y aplicabilidad a una amplia gama de tejidos y genotipos (Lakshmanan *et al.*, 2005). Sin embargo, presenta algunas desventajas como la baja reproducibilidad, la integración de un gran número de copias transgénicas (Zhangsun *et al.*, 2007). Por otro lado, la transformación mediada por *Agrobacterium* tiene el potencial de producir inserciones transgénicas completas y de una sola copia, expresión estable, heredabilidad y menor costo (Singh *et al.*, 2013; Zhangsun *et al.*, 2007; Lakshmanan *et al.*, 2005; Somers y Makarevitch, 2004). Sin embargo, sus desventajas incluyen la

dependencia del genotipo (Shrawat y Lörz, 2006; Lakshmanan *et al.*, 2005) y baja eficiencia (Shrawat y Lörz, 2006). Dado que ambos métodos tienen ventajas y desventajas, la mejor opción para la transformación de la caña depende del protocolo establecido en el laboratorio, la experiencia del grupo y el genotipo de la caña de azúcar. Aunque los avances en la transgénesis en la caña de azúcar son impresionantes, todavía hay muchos desafíos que superar para producir caña de azúcar transgénica tolerante al estrés hídrico, comercialmente útil, adecuada para condiciones de producción de cultivos geográficamente diversos. La rápida expansión de las herramientas y la base de conocimientos de biología molecular, especialmente los resultados de la secuenciación del genoma de la caña de azúcar, y los avances en fenotipos de alto rendimiento en el campo acelerarán el desarrollo de soluciones biotecnológicas útiles para mejorar la productividad de cultivos de caña de azúcar.

1.8.8. Edición de genoma en caña de azúcar

La biotecnología ha entrado en una nueva era donde la mutagénesis aleatoria será reemplazada por enfoques específicos y precisos de edición del genoma (Griggs *et al.*, 2013). La edición del genoma es la técnica más reciente y se basa en la actividad de nucleasas diseñadas específicamente para la secuencia y aprovecha el sistema de reparación del ADN que existe dentro de cada célula (Kumar y Jain, 2015). Estas nucleasas diseñadas se dirigen a secuencias de ADN específicas y provocan roturas bicatenarias (DSB) que se reparan mediante unión final no homóloga (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR), lo que produce diversos resultados, tales como mutagénesis dirigida, reemplazo de genes, inserciones o deleciones de nucleótidos. Las nucleasas del dedo de zinc (ZNF), las nucleasas efectoras similares a las del activador de la transcripción (TALEN) y las repeticiones palindrómicas cortas interpareadas de forma regular, las nucleasas Cas9 asociadas (CRISPR / Cas9) son las herramientas más utilizadas para este fin (Kumar y Jain, 2015). Entre ellos, TALEN se ha demostrado en la caña de azúcar (Jung y Altpeter, 2016) y CRISPR/Cas9 también se ha desarrollado recientemente para la edición dirigida del genoma en la caña de azúcar (Altpeter, comunicación personal). La aplicación de CRISPR / Cas9 en plantas es muy reciente (Li J. F. *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013). Esta técnica se ha utilizado

con éxito para la edición del genoma de varias especies de plantas, como el arroz (Chen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2017), maíz (Shi *et al.*, 2017; Zong *et al.*, 2017; Svitashv *et al.*, 2016) e incluso en el trigo hexaploide (Gil-Humanes *et al.*, 2017). La edición del genoma múltiple también se ha demostrado con éxito a partir de dos genes pertenecientes a la misma familia en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2013) a la orientación simultánea 14 loci del genoma distintos sin eventos detectables fuera del objetivo (Peterson *et al.*, 2016). Hasta ahora, solo un estudio informó el uso de la técnica CRISPR/Cas9 para atacar un gen relacionado con el estrés por sequía, el gen de maíz AGOS8, un regulador negativo de la respuesta al etileno (Shi *et al.*, 2017). En una estrategia elegante, el promotor AGOS8 nativo fue reemplazado por el promotor GOS2, también del maíz, que confiere una expresión constitutiva en varios tejidos. Las plantas mutantes tenían niveles más altos de transcritos de AGOS8 e incrementaban el rendimiento de grano bajo el déficit de agua y no penalizaban el rendimiento en condiciones de buen riego. El uso de CRISPR/Cas9 en plantas de cultivo es particularmente interesante debido a los problemas regulatorios que implican la liberación de productos comerciales de organismos genéticamente modificados (OGM). Recientemente, el USDA-PHIS confirmó que un hongo con una versión editada de un gen que codifica una enzima polifenol oxidasa (para evitar el oscurecimiento) no se regulará como un OMG (Waltz, 2016). Esto dará como resultado una tremenda reducción de los costos regulatorios para el desarrollo de cultivares. Las autoridades reguladoras en otros países, incluido Brasil, aún están discutiendo los marcos regulatorios para las plantas editadas por el genoma. Mientras tanto, se han desarrollado métodos de entrega que introducen mutaciones dirigidas sin ninguna huella transgénica de la herramienta de edición del genoma (Liang *et al.*, 2017). En resumen, los datos hasta ahora sobre CRISPR/Cas9 en plantas sugieren que la edición del genoma en una poliploidía compleja como la caña de azúcar puede ser factible. Esta tecnología transformadora permitirá un cambio de paradigma en la mejora de los cultivos y simplificará la aprobación reglamentaria de la caña de azúcar modificada genéticamente.

JUSTIFICACIÓN

1. La familia de factores de transcripción NAC participan en varios procesos de desarrollo de la planta, así como en la respuesta a múltiples factores bióticos y abióticos, por lo que son proteínas clave de estudio.
2. El gen NAC25 de *S. officinarum* elevó su expresión en el transcriptoma de caña bajo condiciones de estrés osmótico, motivo por el cual, lo hace un blanco en la ingeniería genética.

3. Al día de hoy no existen estudios del gen NAC 25 de *S. officinarum* VAR MEX69290 y debido a que forma parte de la familia de proteínas NAC, las cuales son importantes en el desarrollo de las plantas y que la expresión del gen NAC 25 de *S. officinarum* se elevó ascendentemente bajo condiciones de estrés osmótico, es de suma importancia el estudio del gen NAC 25 de *S. officinarum* ya que podría darnos una estrategia para delucidar los mecanismos de tolerancia a estrés abiótico en *S. officinarum* VAR. MEX69290

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecularmente y analizar la expresión del factor de transcripción (FT) NAC25 de *Saccharum officinarum* Var MEX69290 en condiciones de salinidad y ácido abscísico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

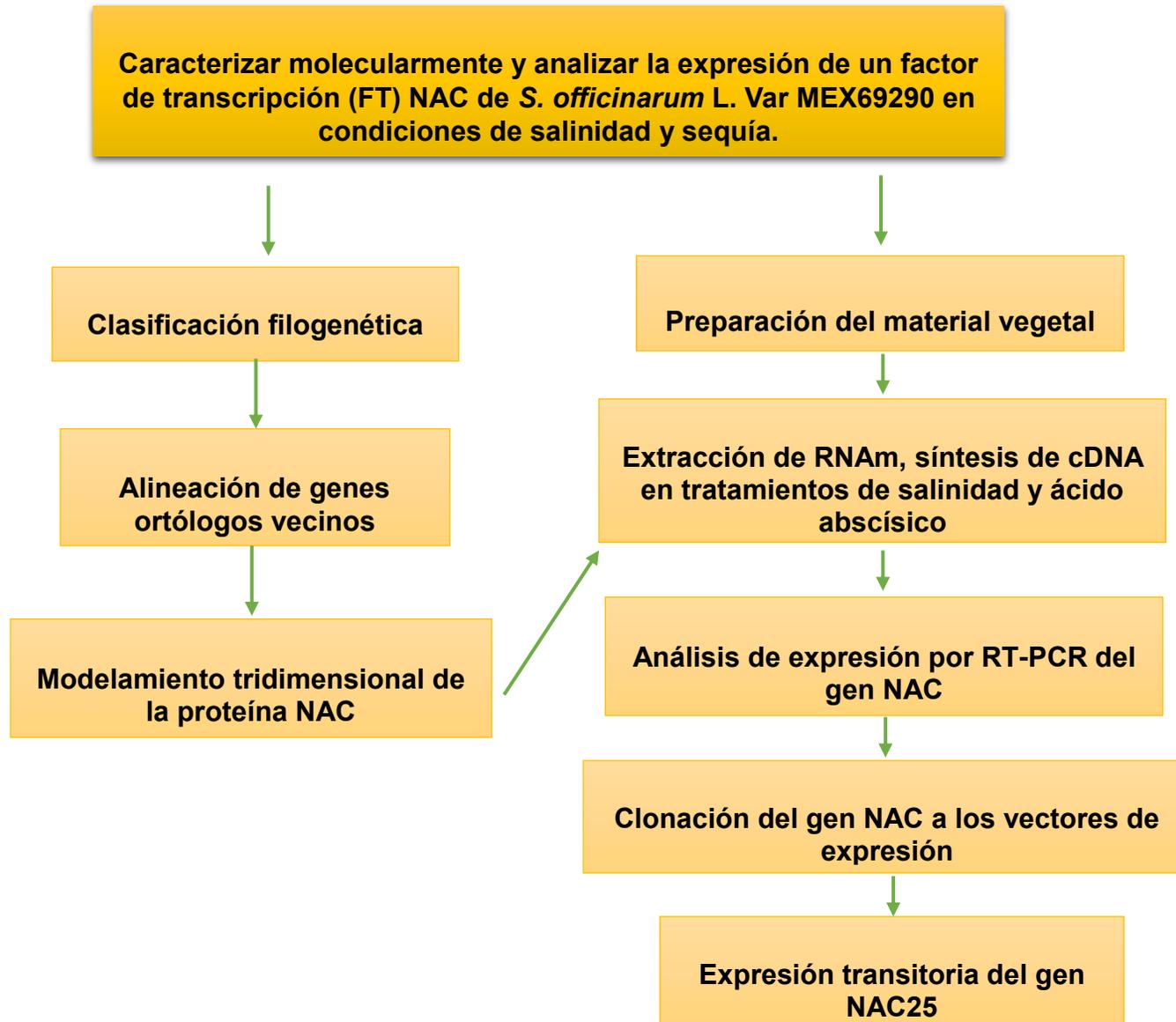
1. Reconstruir el árbol filogenético de los FT NAC con los genes NAC de *S. officinarum* L. Var MEX69290.

2. Determinar los perfiles de expresión de un FT NAC de *S. officinarum* L. bajo condiciones de salinidad, sequía y ácido abscísico.
3. Evaluar la transformación de *Nicotiana tabacum* con el gen NAC25 de *Saccharum officinarum* Var MEX69290 a través de PCR y medios de selección.

HIPÓTESIS

Existen evidencias de la expresión de los factores de transcripción de la familia NAC en respuesta al estrés abiótico, por lo tanto, el gen NAC 25 eleva su expresión génica en caña de azúcar en condiciones de salinidad y ácido abscísico.

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPITULO II

RECONSTRUCCIÓN DE EL ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LOS FT NAC CON LOS GENES NAC DE *S. officinarum* L. Var MEX69290

2.1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas NAC constituyen uno de los grupos más grandes de TF de plantas. Se expresan de forma ubicua en todos los organismos vegetales y se sabe que participan en diversos procesos de desarrollo y respuestas al estrés. El acrónimo NAC se deriva de tres genes que inicialmente se descubrió que contienen un dominio particular (el dominio NAC): NAM (sin meristemo apical), ATAF1/2 (factor de activación de la transcripción de Arabidopsis 1/2) y CUC2 (cotiledón en forma de copa, (Aida *et al.*, 1997; Souer *et al.*, 1996). Típicamente, la familia NAC contiene un dominio de unión a DNA NAC altamente conservado localizado en la región N-terminal y consta de aproximadamente 150-160 aminoácidos divididos en cinco subdominios (AE) que codifican una hélice β trenzada rodeada por unos pocos elementos helicoidales (Olsen *et al.*, 2005). El dominio C-terminal contiene la región de activación transcripcional (TAR), que no está conservada entre las plantas y puede actuar como un activador transcripcional o represor (Tran *et al.*, 2004; Ooka *et al.*, 2003). En muchos casos, los TF de NAC se almacenan de forma inactiva en el citoplasma y se translocan al núcleo después de la estimulación. El TAR de NAC contiene motivos transmembrana (TMM) que ayudan a anclar la proteína a la membrana plasmática y proporcionan un método eficiente para la regulación génica, que es una estrategia adaptativa que permite respuestas rápidas a los cambios ambientales (Kim *et al.*, 2006; Hoppe *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2000). NAC TFs se han caracterizado y descrito en varias especies de plantas, como Arabidopsis (Ooka *et al.*, 2003), Populus, cítricos, arroz (Ooka *et al.*, 2003) y la cebada que van desde 16-289 NAC secuencias, Pereira *et al.*, en 2017 realizó una clasificación sistemática y el análisis genómico de esta familia de genes. El objetivo de este trabajo es clasificar los genes NAC de *S. officinarum* y en particular el gen NAC 25 que se obtuvieron del transcriptoma de caña de azúcar VAR MEX69290 en PEG 8000 al 40% a través de la reconstrucción del árbol filogenético realizado por Pereira y colaboradores en el 2017.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Visualización de la expresión de los genes NAC de *S. officinarum* mediante un heatmap

Con el fin de identificar los genes NAC de *S. officinarum* que elevaron su expresión ascendentemente y prolongadamente en condiciones de estrés hídrico, se realizó el mapa de calor utilizando el programa Complex Heatmaps (Gu *et al.*, 2016).

2.2.2. Recuperación de las secuencias proteicas de los genes NAC de las especies seleccionadas, alineamiento y rasurado de las secuencias proteicas de los genes NAC

Con el fin de obtener e identificar las proteínas NAC, se utilizó el modelo oculto de markov NAC (NAM) de pfam (Finn *et al.*, 2016) y se descargaron las proteínas NAC de la base de datos Phytozome (University of California, 2018) de las especies siguientes: *Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens*, *Amborella trichopoda*, *Zea mays PH207*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*. Las secuencias proteicas de *Saccharum officinarum* L. se obtuvieron de la base de datos de GRASSIUS y del artículo de Pereira *et al.*, 2017, por último, se obtuvieron de la base de datos de Sol genomics network (Fernandez-Pozo *et al.*, 2014) las secuencias proteicas de *Nicotiana tabacum*-N90.

Los alineamientos múltiples, visualización y rasurado de las secuencias se realizaron con el programa clustal w (Higgins *et al.*, 1994) utilizando el programa UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012).

2.2.3. Obtención del mejor modelo y construcción del árbol filogenético

Para encontrar el mejor modelo que se ajuste a cada alineamiento de las proteínas, se utilizó la herramienta PROTTEST 3.4.2 (Darriba *et al.*, 2011), posteriormente las relaciones filogenéticas fueron inferidas con el programa RaxML v. 8.0.26 (Stamatakis, 2014).

2.2.4. Análisis de estructura y localización subcelular del gen NAC25 de *S. officinarum* VAR. MEX69290

El análisis de la estructura proteica del gen NAC25 de *S.officinarum* se realizó en el programa Protein Homology/analogy recognition engine V 2.0 (Kelley *et al.*, 2015). Por otra parte se realizó el análisis de sublocalización celular, para el cual, se transformaron células de cebolla mediante el método de Nebenführ A. (2014) y utilizando como vector de expresión el pK7FWG2.0.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Visualización de la expresión de los genes NAC de *S. officinarum* mediante un mapa de calor

Los datos de las secuencias del ensamble del transcriptoma de *S. officinarum* se obtuvieron para evaluar los perfiles de expresión entre diferentes proteínas NACs de *S. officinarum* en condiciones de sequía. La abundancia de transcritos de 30 genes NAC se evaluó de acuerdo con los valores de PPM. Se mostró un mapa de calor en base a los valores de PPM. Los genes NAC025 (NAC25), NAC021 (NAC21) mostraron niveles de expresión ascendentes y continuos en todos los tiempos de exposición al estrés. El gen NAC025 se expresó mayormente en hoja que en raíz, mientras que el gen NAC21 se expresó mayormente en raíz. El gen NAC25 se eligió como estudio en este trabajo debido a su tiempo de expresión y zona de expresión, la cual fue en hoja (Figura 2.1).

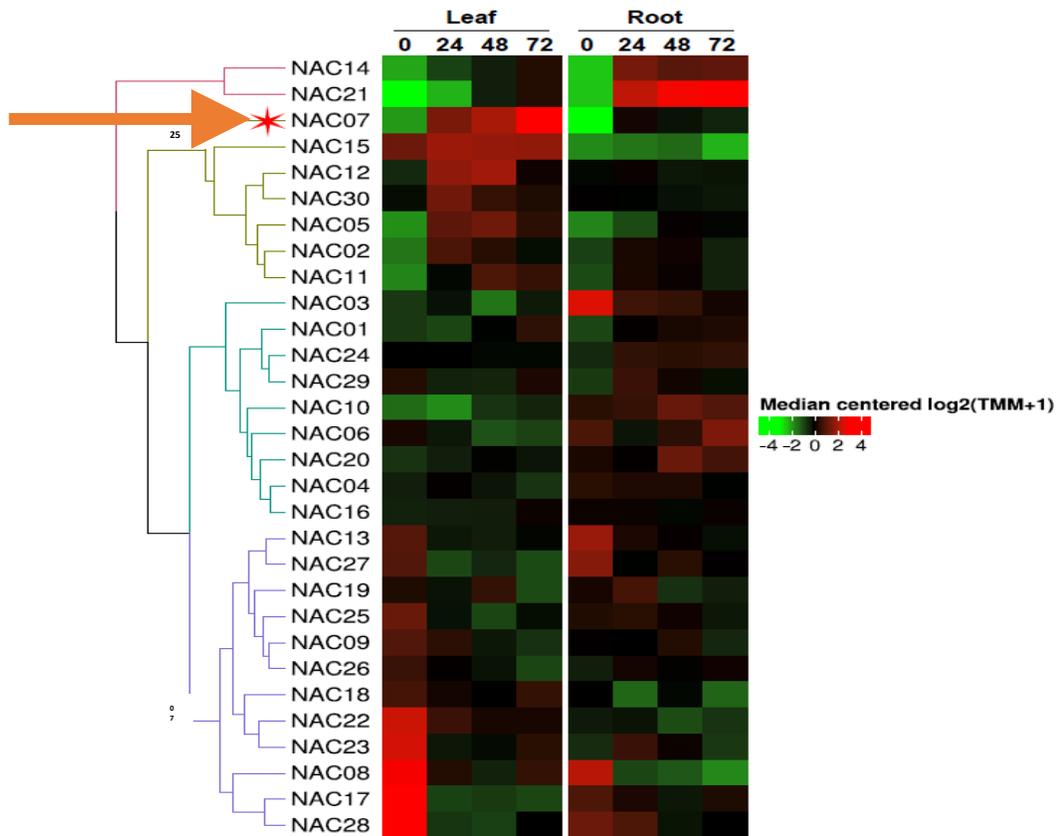


Figura 2.1. Heatmap de los genes NAC de caña de azúcar en condiciones en sequía con PEG 8000 al 40%.

2.3.2. Recuperación de las secuencias proteicas de los genes NAC de las especies seleccionadas, alineamiento y rasurado de las secuencias proteicas de los genes NAC

Se descargaron las secuencias proteicas NAC de la base de datos Phytozome y solgenomics, el alineamiento de las secuencias y rasurado se realizó con el programa HMMER versión 3.2.1.

Tabla 2. Especies que se seleccionaron para obtener las secuencias proteicas NAC.

Especie	Fuente	Versión	Subclase:	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phytozome*	TAIR10	Dicotiledónea	Lamesch et al., 2012
<i>Physcomitrella patens</i>	Phytozome*	v3.3	Bryopsia	Lang et al., 2018
<i>Amborella trichopoda</i>	Phytozome*	v1.0		Science, 2013
<i>Zea mays PH207</i>	Phytozome*	v1.1	Monocotiledónea	Hirsch et al., 2016
<i>Oryza sativa</i>	Phytozome*	v7_JGI	Monocotiledónea	Ouyang et al., 2007
<i>Saccarum officinarum</i>	Transcriptome Pereira, 2017*	-	Monocotiledónea	Pereira et al., 2017
<i>Saccarum officinarum</i>	GRASSIUS*	-	Monocotiledónea	-
<i>Sorghum bicolor</i>	Phytozome*	v3.1.1	Monocotiledónea	McCormick et al., 2017
<i>Nicotiana tabacum-N90</i>	Solgenomics*	AYMY-SS	Dicotiledónea	Sierro et al., 2014

*Base de datos donde se descargaron las secuencias

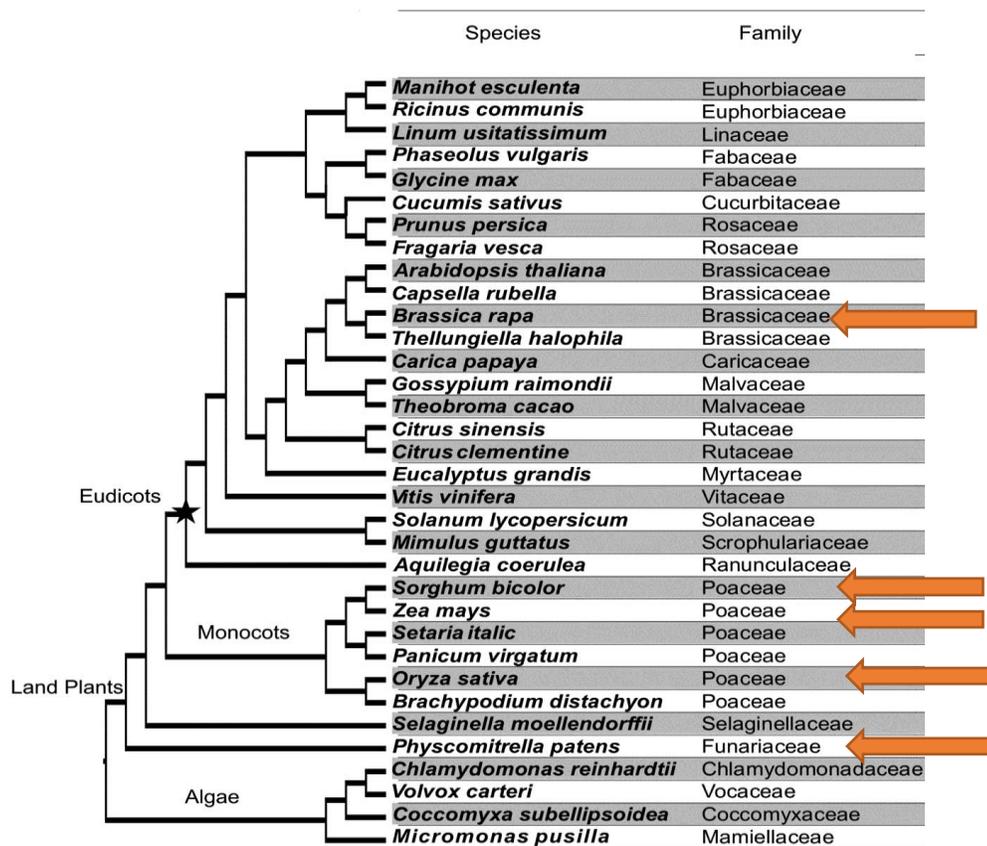


Figura 2.2. Árbol filogenético de especies y familia del reino plantae, en el cual se señala la especie y la familia seleccionada para el análisis filogenético de las proteínas NAC.

2.3.3. Árbol filogenético

Se generó el árbol filogenético a partir del dominio de las proteínas NAC de *P. patens*, *O. sativa*, *S. bicolor*, *Z. mays*, *A. thaliana*, *N. tabacum*, *A. trichopoda* y *S. officinarum*.

La raíz se colocó en la rama correspondiente a la proteína más alejada, que es una proteína NAC de *P. patens*. Se observó algunos residuos conservados en el dominio NAC, lo que sugiere un papel vital en su estructura debido a su prevalencia a través de distintos linajes, como en el caso de los residuos GxxFxF en el motivo A, el residuo en el motivo C y la firma WxMHEY en el Dmotif. La importancia de estos residuos debe

considerarse en estudios futuros para desentrañar el origen y la evolución del dominio NAC en el linaje de plantas.

Se utilizó la representación esquemática de la clasificación de la familia NAC de Pereira *et al.*, 2017 (Pereira *et al.*, 2017) en el cual las secuencias de *Arabidopsis* se usaron como referencias para el análisis filogenómico de la familia NAC debido al apoyo experimental de esta especie modelo. Las secuencias se agruparon en 6 grupos.

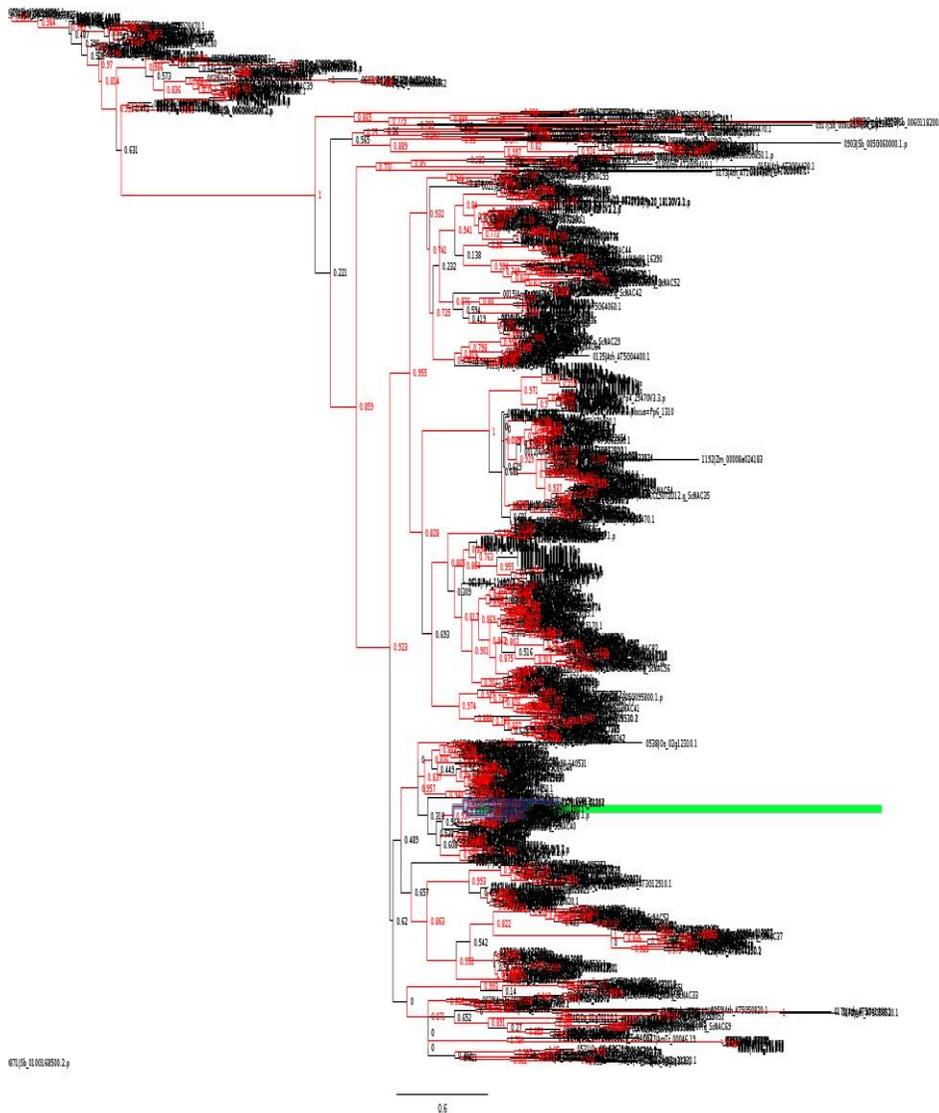


Figura 2.3. Análisis filogenético de las proteínas NAC, el clado resaltado en azul corresponde al clado donde se encuentra la proteína NAC 25 *S. officinarum* VAR. MEX69290.

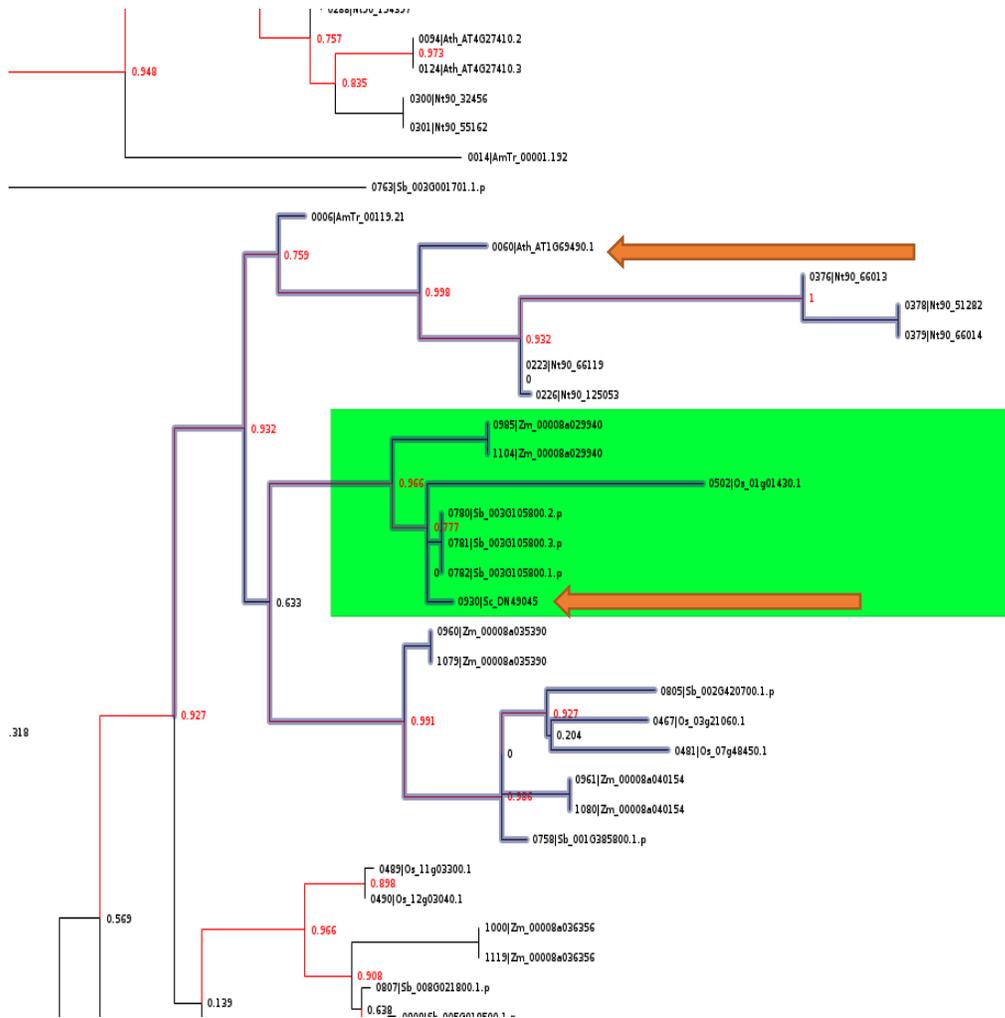


Figura 2.4. Clado resaltado en azul, el cual corresponde al clado donde se encuentra la proteína NAC 25 *Saccharum officinarum* VAR. MEX69290.

Mediante la clasificación filogenética pudimos observar que el gen NAC25 es un ortólogo del gen Ath_AT1G6949.01, también conocido como AtNAP, codifica a un miembro de la familia de genes de factor de transcripción NAC, se expresa en primordios florales y es regulado por AP3 y PI, su expresión está asociada con la senescencia foliar y el ARNm es móvil de célula a célula.

2.3.4. Análisis de estructura y localización subcelular del gen NAC25 de *S. officinarum* VAR. MEX69290

La estructura proteica de NAC 25 obtenida del phyre 2 muestra estructuras características del dominio NAC. La estructura general del monómero de dominio NAC consiste en una lámina β plegada antiparalela muy retorcida, que se agrupa contra una α -hélice al extremo N-terminal en un lado y una α -hélice más corta en el otro lado (figura 2.5). La parte restante de la estructura comprende bucles entre los elementos principales de la estructura secundaria con solo tramos esporádicos y muy cortos de estructura secundaria, gran parte de la cola N-terminal está mal definida (Ernst *et al*, 2003).

Por otro lado, la estructura proteica demuestra una alta similitud a la estructura de las proteínas AtNAP (arabidopsis) y OsNAP (arroz), las cuales en el árbol filogenético previamente hecho se muestran como ortologas cercanas al gen NAC 25 de *S. officinarum* VAR. MEX69290.

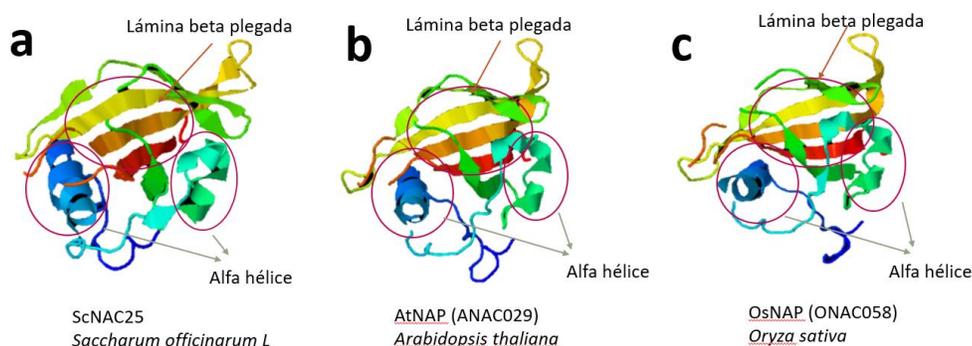


Figura 2.5. Estructura proteica de a) ScNAC25; b) ANAC029 y c) ANAC058, en las cuales se muestran claramente las estructuras características del dominio NAC, lámina β plegada antiparalela muy retorcida que se agrupa contra una α -hélice al extremo N-terminal en un lado y una α -hélice más corta en el otro lado.

Las proteínas NAC tienen subdominos de unión al ADN, los cuales les permiten realizar su función de factor de transcripción en el núcleo.

En teoría, el producto de codificación del gen NAC25 actúa como un factor de transcripción, si los factores de transcripción logran la unión precisa a los genes diana, este factor de transcripción específico debe ubicarse en el núcleo. Para aclarar si la proteína NAC25 de caña de azúcar está localizada en el núcleo se realizó el ensayo de localización subcelular (Figura 2). La expresión transitoria en las células epidérmicas de cebolla, mostró que la proteína de fusión NAC25 estaba localizada predominantemente en el núcleo, mientras que la GFP sola estaba localizada en el citoplasma de las células (Figura 2 (b)).

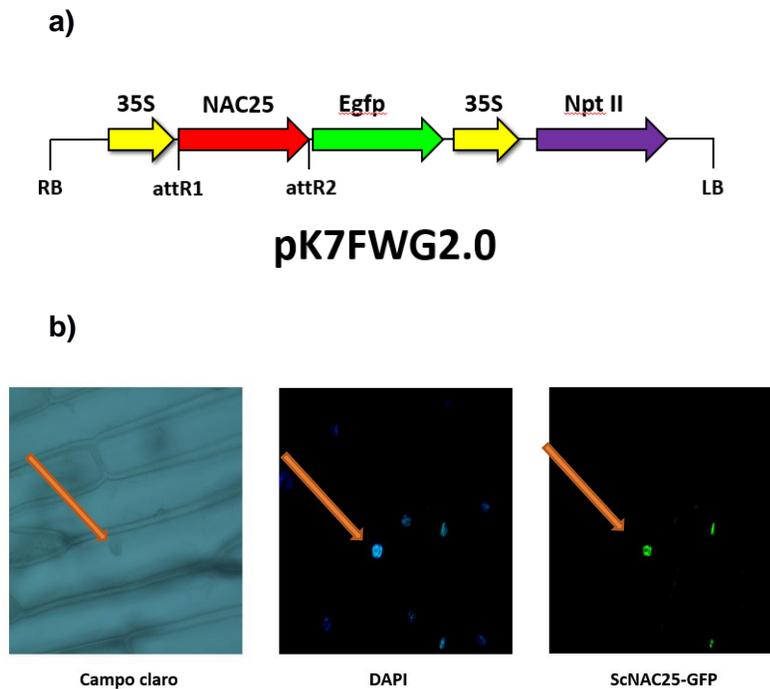


Figura 2.6. Localización subcelular de NAC25. a) La estructura del vector 35S: NAC25-GFP; b) Localización subcelular de la proteína de fusión NAC25-GFP. Las flechas indican la ubicación del núcleo.

2.4. DISCUSIÓN

NAC FT desempeña varios papeles esenciales en el desarrollo de la planta como (Kato *et al.*, 2010), senescencia (Balazadeh *et al.*, 2010), auxina señalización (He *et al.*, 2005),

tiempo de floración, la tolerancia a múltiples estreses bióticos (Wang *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2008) y abióticos (Balazadeh *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2007; He *et al.*, 2005; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1994), entre otros.

Los genes NAC025 (NAC25), NAC021 (NAC21) mostraron niveles de expresión elevados y continuos en todos los tiempos de exposición al estrés. El gen NAC025 se expresó mayormente en hoja que en raíz, mientras que el gen NAC21 se expresó mayormente en raíz. El gen el NAC25, se eligió como estudio en este trabajo, debido a su tiempo de expresión y zona de expresión, la cual, es hoja. Sorprendentemente, NAC 25 en la clasificación filogenética realizada su ortólogo funcionalmente estudiado es AtNAP y OsNAP los cuales están involucrados en la regulación positiva a senescencia y a la tolerancia al estrés abiótico (Podzimska-Sroka *et al.*, 2015). Los niveles de expresión génica están altamente asociados con la función de genes, lo que indica que NAC25 desempeñan un papel importante en el proceso de senescencia y en la tolerancia al estrés abiótico.

Típicamente, la familia NAC contiene un dominio de unión NAC altamente conservado localizado en la región N-terminal y consta de aproximadamente 150-160 aminoácidos divididos en cinco subdominios (AE) que codifican una hélice β trenzada rodeada por unos pocos elementos helicoidales (Olsen *et al.*, 2005). El dominio C-terminal contiene la región de activación transcripcional (TAR), que no está conservada entre las plantas y puede actuar como un activador transcripcional o represor (Tran *et al.*, 2004; Ooka *et al.*, 2003). En la localización subcelular se observó que la proteína NAC 25 se expresa en el núcleo, esto también se ha observado en otras proteínas NAC tal como GmNAC5 de *Glycine max.* (Jin *et al.*, 2013)

2.5. CONCLUSIONES

Se ha documentado que los factores de transcripción NAC específicos de la planta (para NAM, ATAF1, 2 y CUC2) juegan un papel importante en el desarrollo de la planta y en las respuestas al estrés (Podzimska-Sroka *et al.*, 2015). NAC25 pertenece al subgrupo NAM y está estrechamente relacionado con CUC1, CUC2 y NAM, que están involucrados en eventos de tolerancia al estrés abiótico, así como, en la regulación de senescencia (Podzimska-Sroka *et al.*, 2015). En este estudio, observamos algunos indicios nuevos

involucrados en las funciones de NAC25. El análisis de expresión de tejido indicó que NAC25 estaba altamente expresado en hojas ante condiciones de sequía en exposición de 72h, lo que sugiere la implicación de NAC25 en la tolerancia al estrés abiótico y senescencia.

CAPITULO III

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN NAC 25 EN *S. officinarum* EN RESPUESTA EN SALINIDAD, SEQUÍA Y ÁCIDO ABSCÍSICO

3.1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, un dato de FAO en 2004 mostró que aproximadamente el 22% de las tierras agrícolas son salinas y se ha informado que el daño cada vez mayor causado por la sequía limita el crecimiento y desarrollo de las plantas como consecuencia de la pérdida de productividad, especialmente de cultivos (Agarwal *et al.*, 2006; Burke *et al.*, 2006). Por lo tanto, la salinidad y la sequía son dos de los factores estresantes más abióticos que amenazan la productividad de los cultivos en todo el mundo. La caña de azúcar (híbridos de *Saccharum spp.*) Es un cultivo comercial en todo el mundo para el azúcar, los biocombustibles y otras industrias alimentarias, como el ron, en regiones tropicales y subtropicales. Sirve como la cosecha más grande del mundo y se cultivó en alrededor de 26,1 millones de hectáreas en 2012 en 101 países, según estimaciones de la FAO. Como una hierba C4 altamente productiva y una fuente de biocombustible, recientemente se ha puesto más interés por la caña de azúcar (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011). Aunque la caña de azúcar puede superar un corto período de déficit hídrico durante el crecimiento final del desarrollo cuando se acumula la sacarosa, un largo período de sequía puede causar un rendimiento significativo de la caña y la pérdida de contenido de azúcar (Begcy *et al.*, 2012). Recientemente, la hibridación sustractiva, microarrays de ADNc, el perfil de expresión de transcripción, el proteoma, el transcriptoma y el microARN-seq, conocidas como técnicas de visualización diferencial y estrategias de expresión génica, se han utilizado para identificar genes y marcadores moleculares implicados en las respuestas al estrés, el estudio de regulación de genes relacionados con el estrés es un paso clave para explicar estos mecanismos moleculares relacionados con el estrés. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), que es una técnica de alto rendimiento con una amplia aplicación en organismos vivos, es poderosa para identificar y cuantificar la expresión génica (Guo *et al.*, 2014).

Las proteínas NAC constituyen uno de los grupos más grandes de FT de plantas. Se expresan de forma ubicua a través de los organismos vegetales y se sabe que participan

en diversos procesos de desarrollo y respuestas al estrés. Se ha visto que la expresión de los genes NAC aumentan en condiciones de sequía y salinidad (Hu *et al.*, 2015).

El objetivo de este capítulo es el perfil de expresión del gen NAC 25 en condiciones de sequía, salinidad y Ácido abscísico (ABA).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material biológico

Plantas de caña de azúcar VAR. MEX69290 se obtuvieron del banco de germoplasma del Colegio de Postgraduados (Colpos) en Campeche, México. Las plántulas se establecieron *in vitro*, se micropropagaron en medio líquido continuo (Figura 3.1), utilizando el siguiente protocolo de micropropagación establecido previamente en el Laboratorio en el CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán). La composición del medio contiene: medio Murashige Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962), complementado con 1 mL/L de solución de vitaminas (número de catálogo: MVL01-100ML, CAISSON LABS), 2% de sacarosa, 2 g/L de carbón activado y 4.4 mM/L de 6-bencilaminopurina (BAP). El pH del medio se ajustó a 5,8 en autoclave a 121 °C durante 20 min. Las condiciones del cuarto de almacenamiento se mantuvieron a temperatura ambiente bajo una iluminación de fotoperíodo de 16 h de 40 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Comenzamos los experimentos después del tercer mes de adaptación de la planta; La curva de crecimiento de la etapa de multiplicación de la caña de azúcar se estableció a 28 días.



Figura 3.1. Sistema de micropropagación en medio líquido.

3.2.2. Tratamientos de salinidad y sequía

En la literatura se han empleado diferentes concentraciones NaCl, PEG 8000 y ABA para estudios de estrés abiótico en caña de azúcar (Patade *et al.*, 2017), arroz (Shen *et al.*, 2016) entre otros. En el presente trabajo, el medio MS se usó como medio de cultivo basal, Murashige Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962), complementado con 1 ml/L de solución de vitaminas (número de catálogo: MVL01-100ML, CAISSON LABS), 2% de sacarosa, 2 g/L de carbón activado y 4.4 mM/L de 6-bencilaminopurina (BAP), para el tratamiento de Ácido abscísico se agregó 100 mM de ácido abscísico, en el tratamiento de sequía se utilizó PEG (polietilenglicol) 8000 al 40% y en el tratamiento de salinidad se utilizó NaCl (Cloruro de sodio) a 150 mM. El pH de todos los medios se ajustó a 5.8 en autoclave a 121 °C durante 20 min. Las condiciones del cuarto de almacenamiento fueron de temperatura de 25 °C ± 1 °C, en un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y una intensidad de luz de 40 μmol × -2s. Por cada tratamiento se transfirieron 60 plántulas y se usaron 6 frascos para el experimento (diez plántulas por frasco), se tomó muestra de cada tratamiento a las 0, 24 y 48 h. Se escogieron al azar tres plantas por tratamiento y por tiempo; El experimento se realizó por triplicado.

3.2.3. Determinación de parámetros fisiológicos

La fotosíntesis neta (A) se midió con un analizador infrarrojo de gases (IRGA) LI-6400 de LI-COR. Se midió la concentración de osmolaridad mediante el osmómetro VAPRO 5600.

3.2.4. Determinación de parámetros bioquímicos

Para la determinación del contenido de prolina se maceraron 250 mg de tejido foliar de las plántulas de caña de azúcar con N₂ líquido y 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3%. El macerado obtenido se filtró a través de un papel filtro y 1 mL del filtrado se puso a reaccionar con 1 mL de ninhidrina y 1 mL de ácido acético glacial. La muestra se incubó en baño María durante 1 hora a 95 °C y se enfrió bruscamente en agua fría. La muestra

se mezcló con 2 mL de tolueno agitándose vigorosamente en vórtex y se dejó reposar para que se separen las fases. Se tomó la fase superior y se midió la absorbancia a 520nm. El contenido de prolina se determinó mediante una curva de calibración y se expresó en nmol/g.p.f. (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 1998).

3.2.5. Extracción de RNA total y síntesis de DNAc

Para la extracción del ARN total se maceraron 200 mg de tejido de hoja y raíz con N₂ líquido, se homogenizaron con 1 mL de Trizol[®] y se dejaron reposar por 5 mi a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12,000 × g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se mezcló manualmente con 0.24 mL de cloroformo/alcohol isoamílico (50:1) y se centrifugó a 12,000 × g por 15 min a 4 °C. Para la precipitación del ARN se tomó el sobrenadante y se mezcló con 1 volumen de isopropanol y 1 µL de glicógeno a -20 °C. La muestra se centrifugó a 12 000 x g por 10 min a 4 °C y la pastilla se lavó dos veces con etanol-DEPC al 70%. La pastilla se resuspendió en H₂O₂ DEPC estéril y se cuantificó su concentración en una nanodrop. El RNA purificado se visualizo mediante un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio (1 µg/mL). Esta metodología está basada en las instrucciones del fabricante de Trizol[®].

A partir de la extracción del ARN total se realizó la síntesis de DNAc; se utilizó oligo dT para obtener el ADNc.

3.2.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la síntesis de ADNc, se usó 1 µg de ARN total y 200 unidades de la enzima de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV RT) para la síntesis de la primera cadena de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de sistema de Promega). Para la reacción qRT-PCR se usaron 0.25 µL de cada cebador a 10 µM, junto con 6 µL de Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) y 1 µL de plantilla de ADNc en un volumen final de 12 µL. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 40 s, unatemperatura de fusión, elegida en base a la secuencia de los cebadores, durante 40s y una extensión final en 72 °C.

3.2.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las mediciones de fotosíntesis neta (A), ajuste osmótico y prolina fueron analizados mediante un ANOVA de una vía o un ANOVA sin rangos, seguidos por una prueba de Dunnet comparando los tratamientos con las condiciones iniciales (controles) del experimento. Todos los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron mediante el programa Sigmaplot v 11.0 (Systat Software, Inc.).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Parámetros fisiológicos y bioquímicos de las plantas de *Saccharum officinarum* bajo condiciones de salinidad y sequía

3.3.1.1. Salinidad

En el tratamiento de salinidad se utilizó NaCl a 150 mM. Esta concentración se ha utilizado en trabajos previos (ver sección 3.2.2); a las 24 h se notó el efecto del tratamiento en las hojas, éstas presentaban síntomas de palidez y pérdida de vigor, a las 48 h las hojas presentaban senescencia y la raíz se elongó (Figura 3.2).

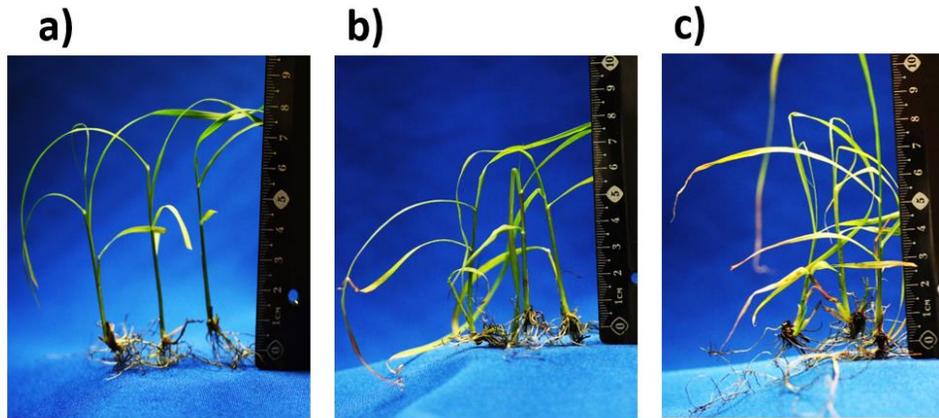


Figura 3.2. Tratamiento de salinidad (150 mM de NaCl). a) tratamiento control a 0 h; b) estrés a las 24 h; c) estrés a las 48 h.

En las plantas de grupo control la fotosíntesis neta (A) fue de $-1.8 \mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, sin embargo, las plantas sometidas a estrés presentaron un cambio significativo hasta las 48 h descendiendo hasta $-2.7 \mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$ (Figura 3.3).

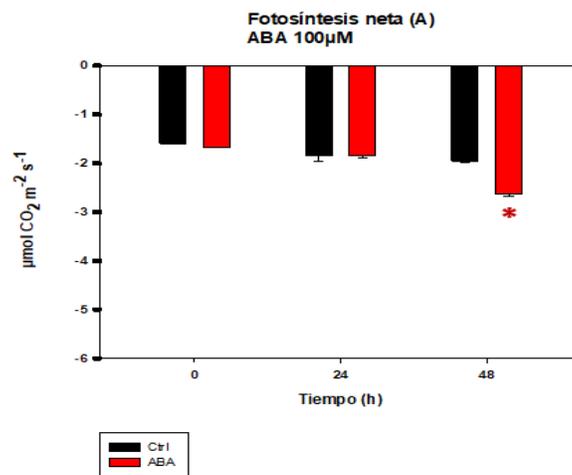


Figura 3.3. Valores de fotosíntesis neta (A) de las plántulas de caña de azúcar tratadas en salinidad (150mM de NaCl), durante 0, 24 y 48 h. En la grafica se presentan las medias \pm SD (n = 9). Los asteriscos (*) representan los tratamientos con diferencia significativa.

El contenido de prolina en plantas del grupo control en hojas y raíz se mantuvo entre 0.8 y 1.2 micromoles/g.p.f. a lo largo de todo el experimento. En las plantas tratadas con 150 mM de NaCl el contenido de prolina en raíz se mantuvo a las 24 h, en contraste con hoja en el cual, el contenido de prolina aumento a 2.3 micromoles/g.p.f.; A las 48 h el contenido de prolina en hojas aumento significativamente hasta 4.5 micromoles/g.p.f., por otra parte, en raíz el contenido de prolina se mantuvo entre 0.8 y 1.2 micromoles/g.p.f.

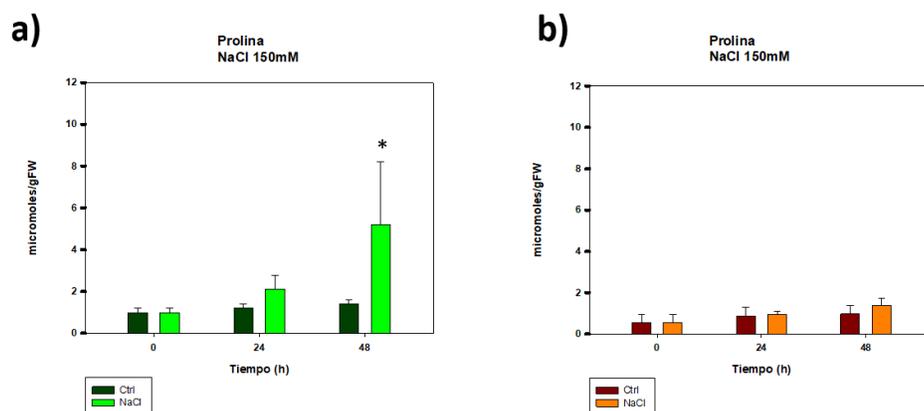


Figura 3.4. Valores de prolina de las plántulas de caña de azúcar tratadas en salinidad (150mM de NaCl), durante 0, 24 y 48 h. a) hoja y b) raíz. En la grafica se presentan las medias \pm SD (n = 9). Los asteriscos (*) representan los tratamientos con diferencia significativa.

3.3.1.2. Sequía

En tratamiento de sequía se utilizó PEG 8000 (polietilenglicol) al 40%. A las 24 h ya se notaba el efecto del tratamiento, las hojas comenzaban a enrollarse, lo cual es un síntoma muy marcado de caña en un estrés abiótico, a las 48 h ya presentaban más síntomas característicos a un estrés, la raíz elongaba, las hojas pálidas y presentaban senescencia en algunas partes (Figura 1.21).

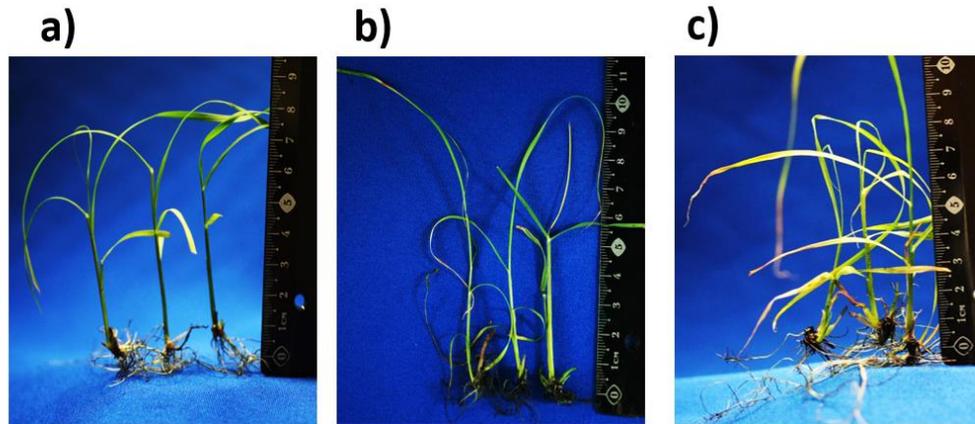


Figura 3.5. Tratamiento de sequía (PEG 8000 al 40%). a) tratamiento control a 0 h; b) estrés a las 24 h; c) estrés a las 48 h.

En las plantas de grupo control la fotosíntesis neta (A) fue de $-1.8 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, sin embargo, las plantas sometidas a estrés presentaron un cambio significativo hasta las 48 h descendiendo hasta $-4.4 \mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Figura 3.6).

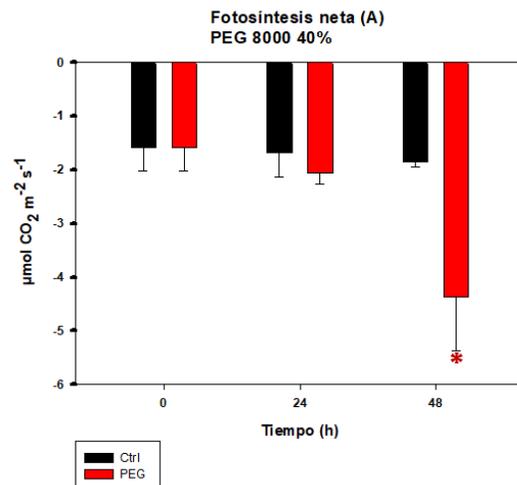


Figura 3.6. Valores de fotosíntesis neta (A)

de las plántulas de caña de azúcar tratadas con polietilenglicol PEG 8000 al 40%, durante 0, 24 y 48 h. En la gráfica se presentan las medias \pm SD (n = 9). Los asteriscos (*) representan los tratamientos con diferencia significativa.

El contenido de prolina en plantas del grupo control en hojas y raíz se mantuvo entre 0.8 y 1.2 micromoles/g.p.f. a lo largo de todo el experimento. En las plantas tratadas con polietilenglicol 8000 al 40% el contenido de prolina en raíz se mantuvo a las 24 h, en contraste con hoja en el cual, el contenido de prolina aumento a 5.8 micromoles/g.p.f.; A las 48 h el contenido de prolina en hojas aumento significativamente hasta 9.8 micromoles/g.p.f., por otra parte, en raíz el contenido de prolina se mantuvo entre 0.8 y 1.8 micromoles/g.p.f.

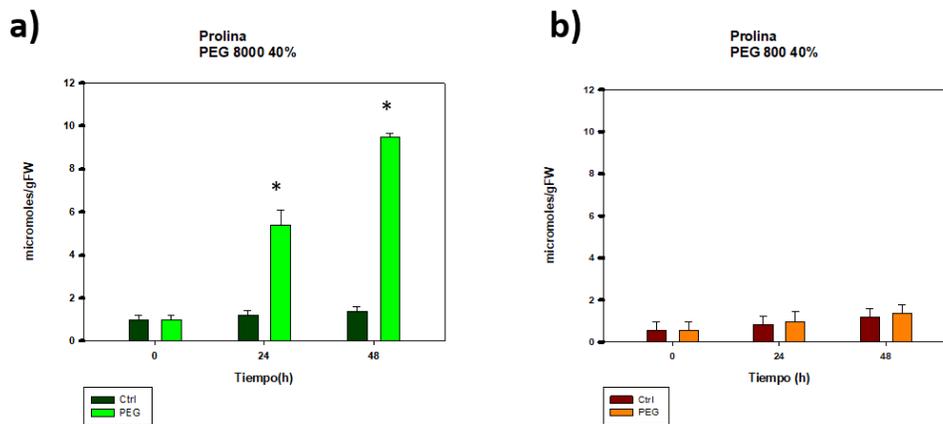


Figura 3.7. Valores de prolina de las plántulas de caña de azúcar tratadas en PEG 8000 al 40%, durante 0, 24 y 48 h. a) hoja y b) raíz. En la gráfica se presentan las medias \pm SD (n = 9). Los asteriscos (*) representan los tratamientos con diferencia significativa.

3.3.1.3 Ácido abscísico

En tratamiento de ácido abscísico se utilizó ABA al $100\mu M$. A las 24 h no se observaba el efecto del tratamiento, las hojas se mantenían vigorosas, lo cual posiblemente sea indicación de que la concentración de ácido abscísico (ABA) no fue la ideal, sin embargo, a las 48 h ya presentaban síntomas característicos a un estrés, la raíz elongada, las hojas enrolladas y la plántula presentaba algunas hojas pálidas (Figura 3.8).

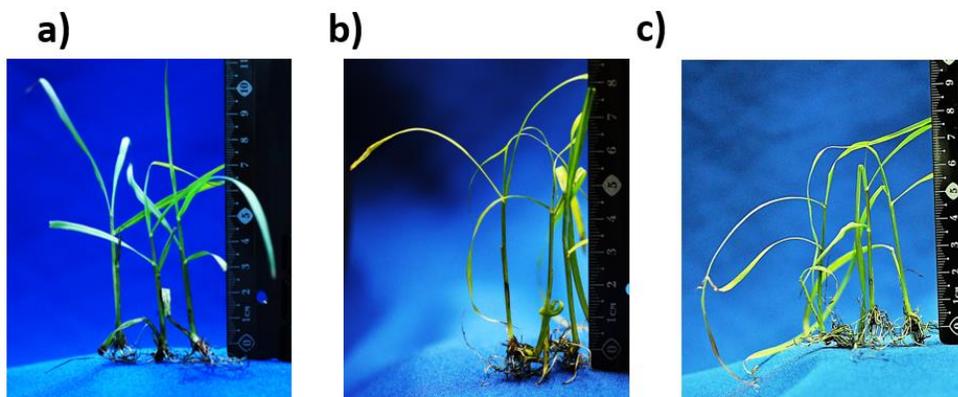


Figura 3.8. Tratamiento de ácido abscísico ($100\mu M$). a) tratamiento control a 0h; b) estrés a las 24h; c) estrés a las 48 h.

En las plantas de grupo control la fotosíntesis neta (A) fue de $-1.8 \mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$, sin embargo, las plantas sometidas a estrés presentaron un cambio significativo hasta las 48 h descendiendo hasta $-2.8 \mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$ (Figura 3.9).

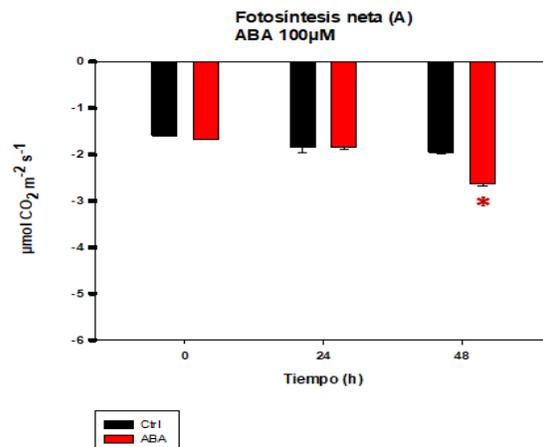


Figura 3.9. Valores de fotosíntesis neta (A) de las plántulas de caña de azúcar tratadas con ácido abscísico, durante 0, 24 y 48 h. En la grafica se presentan las medias \pm SD (n = 9). Los asteriscos (*) representan los tratamientos con diferencia significativa.

El contenido de prolina en plantas del grupo control en hojas y raíz se mantuvo entre 0.8 y 1.5 micromoles/g.p.f. a lo largo de todo el experimento. En las plantas tratadas con ácido abscísico (100 μ M) el contenido de prolina en raíz y hoja se mantuvo a las 24 h, sin embargo, el contenido de prolina aumento a 2.8 micromoles/g.p.f. en hoja en contraste a raíz donde el contenido de prolina se mantuvo entre 0.8 y 1.8 micromoles/g.p.f. hasta las 48 h.

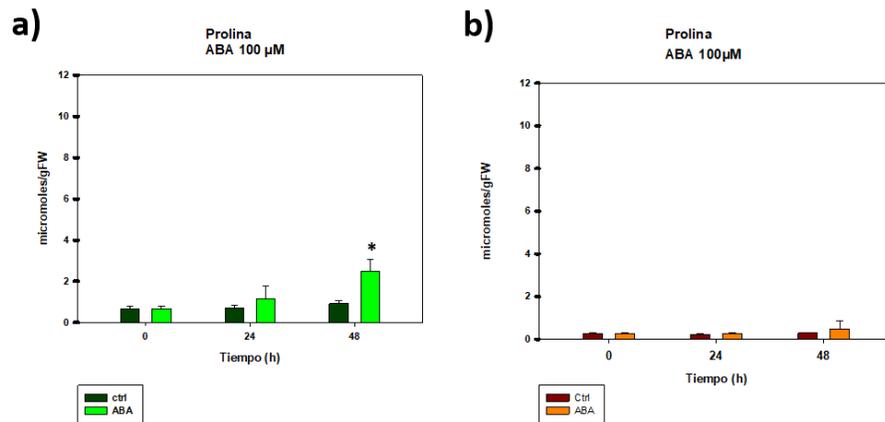


Figura 27. Valores de prolina de las plántulas de caña de azúcar tratadas en ácido abscísico ($100 \mu M$), durante 0, 24 y 48 h. a) hoja y b) raíz. En la gráfica se presentan las medias \pm SD ($n = 9$). Los asteriscos (*) representan los tratamientos con diferencia significativa.

3.3.2. Expresión diferencial del gen NAC25 de *S. officinarum* bajo condiciones de salinidad, sequía y ácido abscísico

3.3.2.1 Salinidad

Se extrajo el ARN total de hojas y raíces de las plantas de *S. officinarum* VAR MEX69290 tratadas con $150mM$ de NaCl durante 0,24 y 48h. A partir del ARN extraído se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario.

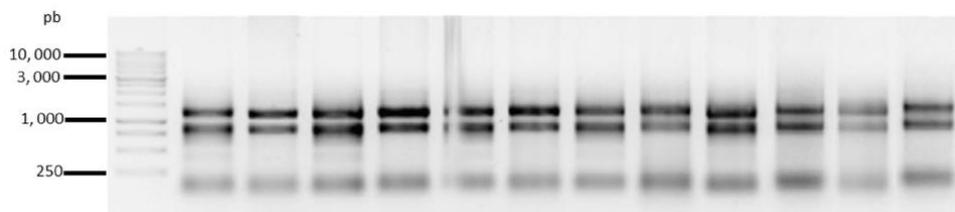


Figura 3.10. Análisis del ARN total de las plantas de caña de azúcar sometidas a $150 mM$ de NaCl durante 0,24 y 48h. En la figura se pueden observar las bandas correspondientes a 28s, 18s y 5s.

Una vez obtenido el ADNc del tratamiento de salinidad se realizó el análisis del perfil de expresión del gen NAC25 mediante PCR tiempo real. El perfil del gen NAC25 en hoja mostro un perfil ascendente, la expresión del gen aumento conforme al tiempo de exposición de estrés, a las 24 h se elevó dos veces más que el control y a las 48 h seis veces más que el control. En raíz se observo un leve cambio de expresión del gen a las 24 y 48h, donde el nivel de expresión descendió.

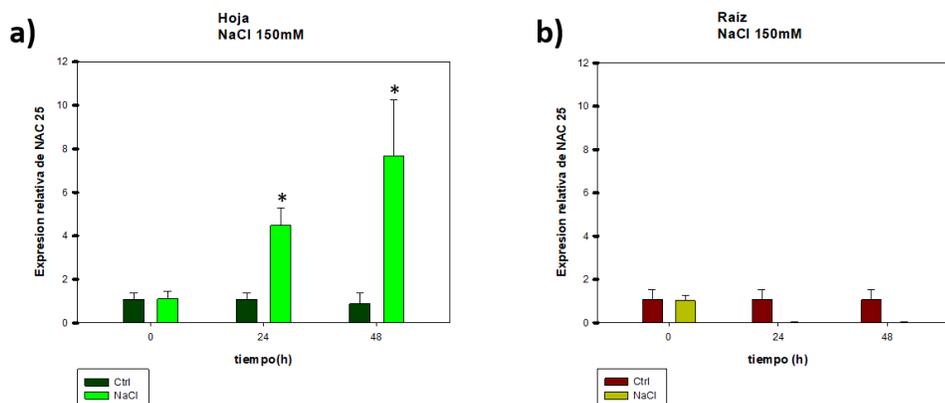


Figura 3.11. Perfil de expresión diferencial del gen NAC 25 en plantas de caña de azúcar sometidas a 150mM NaCl durante 0, 24 y 48 h. a) hojas; b) raíz.

3.3.2.2 Sequía

Se extrajo el ARN total de hojas y raíces de las plantas de *S. officinarum* VAR MEX69290 tratadas con PEG 8000 al 40% durante 0, 24 y 48h. A partir del ARN extraído se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario.

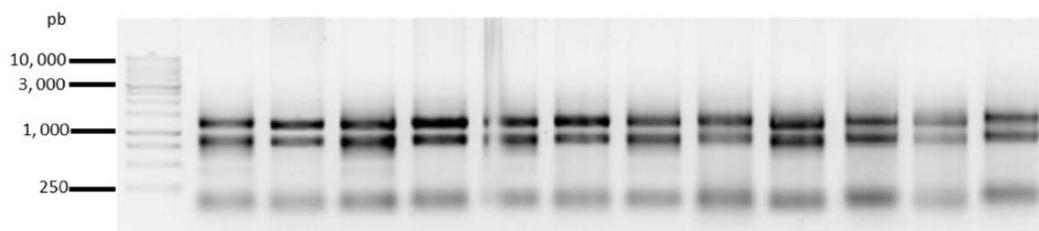


Figura 3.12. Análisis del ARN total de las plantas de caña de azúcar sometidas a PEG 8000 al 40% durante 0, 24 y 48 h. En la figura se pueden observar las bandas correspondientes a 28s, 18s y 5s.

Una vez obtenido el ADNc del tratamiento de sequía se realizó el análisis del perfil de expresión del gen NAC25 mediante PCR tiempo real. La expresión del gen NAC25 en hoja a las 24 h descendió su expresión sin embargo, a las 48 h elevó significativamente su expresión, cinco veces más que el control. En raíz se observó un leve cambio de expresión del gen a las 24 y 48h, donde el nivel de expresión descendió.

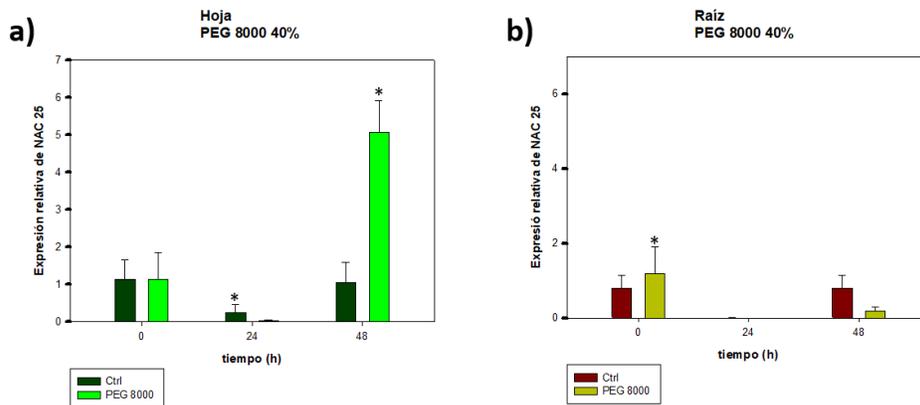


Figura 3.13. Perfil de expresión diferencial del gen NAC 25 en plantas de caña de azúcar sometidas a PEG 8000 al 40% durante 0, 24 y 48 h. a) hojas; b) raíz.

3.3.2.3 Ácido abscísico

Se extrajo el ARN total de hojas y raíces de las plantas de *S. officinarum* VAR MEX69290 tratadas ácido abscísico 100 μ M durante 0, 24 y 48 h. A partir del ARN extraído se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario.

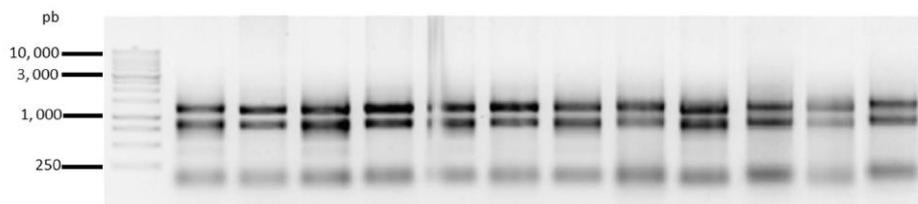


Figura 3.14. Análisis del ARN total de las plantas de caña de azúcar sometidas en ácido abscísico 100 μ M a durante 0, 24 y 48h. En la figura se pueden observar las bandas correspondientes a 28s, 18s y 5s.

Una vez obtenido el ADNc del tratamiento de ácido abscísico se realizó el análisis del perfil de expresión del gen NAC25 mediante PCR tiempo real. La expresión del gen NAC25 en hoja a las 24 h descendió su expresión sin embargo, a las 48 h elevó significativamente su expresión dos punto cinco veces más que el control. En raíz no se observó un cambio de expresión significativo del gen a las 24 y 48h, la expresión fue continua.

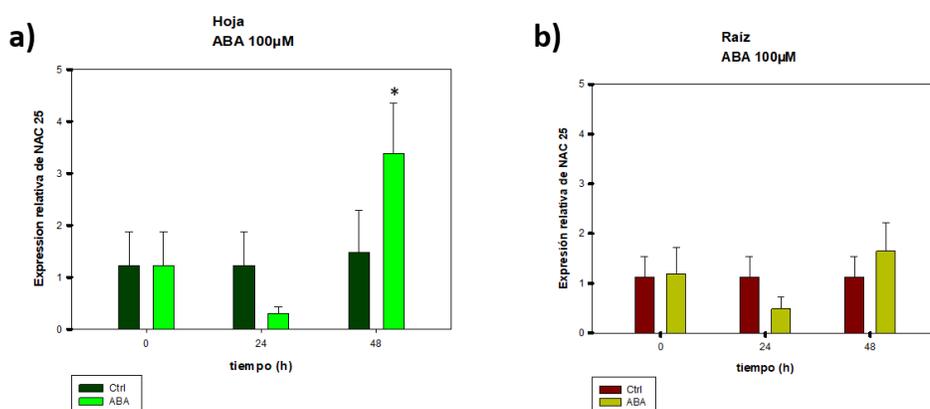


Figura 3.15. Perfil de expresión diferencial del gen NAC 25 en plantas de caña de azúcar sometidas a ácido abscísico 100 μ M durante 0, 24 y 48 h. a) hojas; b) raíz.

3.4. DISCUSIÓN

3.4.1. Parámetros fisiológicos y bioquímicos de las plantas de *S. officinarum* bajo condiciones de salinidad y sequía

Las plantas se ven afectadas por el estrés hídrico, salino y en condiciones de ácido abscísico. Algunos de los efectos de estos tipos de estrés sobre la planta se ven reflejados en la reducción de la fotosíntesis, producciones de osmolitos tales como prolina entre otros. En el presente trabajo se midió la asimilación neta de carbono y la

acumulación de prolina en las hojas y raíces de las plantas sometidas a estrés hídrico, salino y ácido abscísico.

Bajo condiciones de estrés hídrico, la primera reacción de las plantas es el cierre de estomas, evitando la pérdida excesiva de agua, pero a la vez reduciendo cantidad de carbono (CO₂) asimilado (Luke *et al.*, 2015). Previamente Luke *et al.*, 2015 y Li *et al.*, 2016 en sus trabajos han demostrado que el estrés de sequía, salinidad y ácido absicio afecta severamente la fotosíntesis en *S. officinarum* y *Hevea brasiliensi*, en el presente trabajo se pudo observar un resultado similar en los diferentes tipos de estrés, la fotosíntesis fue afectada y decreció conforme las horas de exposición a un estrés avanzaban.

3.4.2. Prolina

Prolina es un osmoprotector o soluto compatible, de bajo peso molecular que actúa como osmolito, que se ha utilizado como marcador de estrés en varios estudios (Daldoul *et al.*, 2010; Bruno *et al.*, 2007). Prolina ayuda a las células equilibrar su potencial osmótico y a estabilizar proteínas y membranas durante el estrés. Se ha demostrado que varias especies vegetales acumulan mayores concentraciones de prolina bajo estrés de sequía, salinida y estrés hídrico, Errabi y colaboradores demostraron que callos de caña de azúcar en condiciones de estrés salinico e hidrico aumentaban su concencentración de prolina (Errabi *et al.*, 2007). En caña de azúcar se observó que en hojas estresadas, hay un aumento de contenido de prolina en todos los tratamientos: salinidad, sequía y ABA sin embargo, prolina en raíz no aumento, podría sugerirse que tal vez tengan otro sistema de regulación al estrés tales como azúcares y otros osmolitos como glicina betaína.

3.4.3. Expresión diferencial del gen NAC25 de *S. officinarum* bajo condiciones de salinidad, sequía y ácido abscísico

Los genes de la familia NAC son factores de transcripción que constituyen uno de los grupos más grandes de FT de plantas. Se expresan de forma ubicua a través de los organismos vegetales y se sabe que participan en diversos procesos de desarrollo y respuestas al estrés. Se ha visto que elevan su expresión en las plantas bajo condiciones de sequía (Shen *et al.*, 2016; Jeong *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012), salinidad (Hu *et al.*,

2006; Shen *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2011), ácido abscísico (Chen *et al.*, 2013). En el presente estudio se observó que el gen NAC 25 de *S. officinarum* presenta un comportamiento similar al de arroz “OsNAP” (Chen *et al.*, 2013) y OsNAC2 (Shen *et al.*, 2016) en hojas, posiblemente este aumento se deba a un mecanismo de adaptación o defensa por las plantas ante el estrés y su ausencia de expresión en la raíz posiblemente sea a que el gen NAC25 tiene una regulación diferente que en hojas.

3.5. CONCLUSIONES

La expresión del gen NAC 25 aumenta su expresión en hojas de caña de azúcar en condiciones de salinidad, sequía y ABA sin embargo, su expresión en raíces de caña de azúcar fue mínima y continúa en todos los tiempos en condiciones de estrés.

CAPITULO IV

CLONACIÓN DEL GEN NAC 25 DE *S. officinarum* EN LOS VECTORES DE EXPRESIÓN PARA LA TRANSFORMACIÓN EN PLANTAS

4.1. INTRODUCCIÓN

Con la secuenciación del genoma de la mayoría de las especies de plantas en la última década, existe una creciente necesidad de caracterizar funcionalmente el gran número de proteínas predichas y definir sus redes de interacción física. En consecuencia, se ha vuelto cada vez más importante el requisito de vectores que facilitan la clonación de genes de alto rendimiento y la expresión de proteínas nativas o derivados fusionados con marcadores epitópicos y/o proteínas fluorescentes. En plantas, la expresión de la proteína se puede lograr ya sea mediante un enfoque de expresión transitoria o mediante el desarrollo de líneas transformadas establemente. La expresión transitoria ha surgido como una opción atractiva en comparación con los enfoques transgénicos estables debido a sus ventajas significativas en términos de plazos de producción cortos y bajo costo. Los sistemas de expresión basados en virus en plantas son particularmente atractivos frente a sistemas de expresión transitorios alternativos debido al alto nivel de multiplicación de genes y niveles concomitantes elevados de expresión alcanzables en un corto período de tiempo, al tiempo que minimizan el deterioro de las actividades del huésped (Turpen., 1999; Scholthof., 1996). El virus del mosaico del tabaco (TMV) es uno de los virus vegetales más ampliamente estudiados y se ha convertido así en una opción natural para el desarrollo de vectores. Los vectores basados en TMV han conducido a un rendimiento de proteína recombinante tan alto como 80% de la proteína soluble total (Marillonnet., 2004, Yusibov., 1999). La agroinfección es barata y reproducible, lo que lo convierte en un método preferido para suministrar vectores de expresión víricos en tejidos vegetales como parte del ADN-T de un vector binario llevado por *Agrobacterium tumefaciens* (Leiser., 1992; Grimsley., 1986).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Secuenciación y alineación del gen NAC que se seleccionó del transcriptoma de *S. officinarum*

Se clonó el gen NAC 25 en el vector pGEM®-T Easy Vector Systems posteriormente se transformó en *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante el método de choque térmico, se extrajo el plásmido con el protocolo: the QIAprep spin miniprep kit y se mandó a secuenciar.

Los datos obtenidos de la secuenciación fueron analizados en el programa MEGA 6, para garantizar que no hubiera mutaciones que afectarán la funcionalidad del gen NAC 25.

4.2.2. Diseño y clonación en los Vectores de sobreexpresión.

Se eligieron los vectores pBISN1 y PK7FWG2.0.

4.2.2.1. Vector pBISN1

El vector pBISN1 (Figura 4.1) consta de un promotor uidA que es quimérico, consistente en secuencias activadoras aguas arriba del promotor octopina sintasa (ocs) y una sola copia del promotor mannopina sintasa (mas) y activador aguas arriba. El vector pBISN1 se diseñó y construyó mediante enzimas de restricción y la enzima T4 ligasa;

1. Se diseñaron los primers con adaptadores que contienen el sitio de corte de las enzimas spe 1 y sac 1.

Cebadores para la construcción del vector pBISN1.

Cebador 1: Fw 5' TGA ACT AGT **ATG CTT ACA ATT GAC CTT GG** 3'

Cebador 2: Rw 5' **ACT TGA** **GAG CTC** TTA ATG GTG GTG GTG ATG ATG **TAT TCT**
GTC CTG CAG CGT AG 3'

Enzimas de restricción: spe1 y sac 1

2. Se realizó reacción de digestión con la secuencia purificada y el vector pBISN1 con las enzimas de restricción spe 1 y sac 1. Se dejó ligando el vector pBISN1 con la secuencia purificada, los dos previamente digeridos, toda la noche. Al día siguiente, se transformaron las células de *E. coli* con la ligación del vector pBISN1 y la secuencia purificada. Se seleccionaron por medios con antibiótico (kanamicina, 50 mg/L) las células transformadas y se cultivaron en un medio LB con kanamicina durante 12-16 h. Se realizó PCR de colonia (cebadores de NAC 25 con los adaptadores) con los cultivos de las células previamente seleccionadas para verificar que estén transformadas. Se hizo la extracción del plásmido de las colonias que resultaron positivas de la PCR. Se realizó una PCR (primers de NAC 25 con los adaptadores) con el plásmido recuperado de la extracción, posteriormente se hizo un análisis de restricción con las enzimas spe 1 y sac 1, con el fin de corroborar que el plásmido esté correctamente construido.

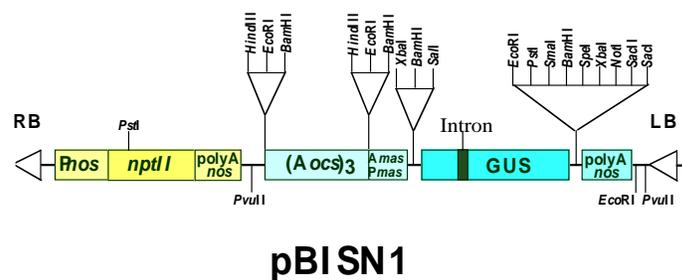


Figura 4.1. Vector pBISN1.

4.2.2.2. Vector pK7FWG2.0

Para la elaboración y construcción de vector pK7FWG2.0 (Figura 4.2), se usó el sistema de clonación por PCR “Gateway[®] Technology” (Cat. 12535-019, Invitrogen). Dicha tecnología altamente eficiente y rápida facilita construcción y expresión de un gen de interés mediante la recombinación en sitios específicos de un clon, permitiendo la clonación de múltiples fragmentos de material genético en un orden y una orientación definida; presenta una manera eficiente de mover una secuencia de ADN dentro de un sistema de múltiples vectores con el cual poder llevar a cabo diversos tipos de análisis

funcionales y de expresión de proteínas. Se siguieron las indicaciones y metodologías sugeridas por el proveedor.

Cebadores para la construcción del vector pK7FGW2.0.

Cebador 1: Fw 5' **GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC** ATG CTT ACA ATT GAC CTT GG 3'

Cebador2: Rw 5' **GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT** TAT TCT GTC CTG CAG CGT AG

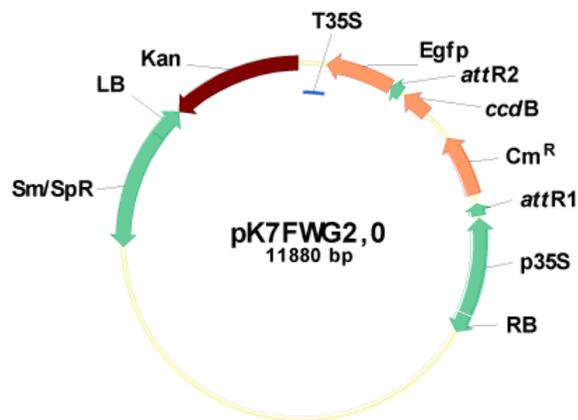


Figura 4.2. Vector pK7FGW2.0

Transformación de células de Escherichia coli. Se utilizó células de *E. coli*, cepa DH5 α para la replicación del plásmido y su posterior extracción.

4.2.3. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105

Una vez diseñados, construidos y verificados los vectores de sobreexpresión se insertaron en *A. tumefaciens*. Se descongelaron las alícuotas de células competentes de *A. tumefaciens* y los plásmidos pBISN1 y Pk7FGW2.0 en hielo. Se agregaron 10 μ L de cada uno de los vectores, se mezclaron manualmente e incubaron 5 min en Nitrógeno. Se

aplicó choque térmico a 37 °C durante 10 min. Se cultivaron e incubaron en medio YEP a 28 °C/200 rpm durante 4 h. Posteriormente se centrifugaron las alícuotas a 4000 rpm por 5 min, se retiró el 1 mL del medio YEP que se añadió anteriormente. Por último, se resuspendieron las células con el medio restante (100µL) y se sembraron las células en placas en el medio YEP con los antibióticos de selección de los plásmidos pBISN1 y Pk7FGW2.0

4.2.4. Transformación de callos de tabaco por medio de *A. tumefaciens*

Para llevar a cabo la transformación genética de tabaco se usó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. Para dicha transformación se empleó el protocolo de Clemente (2006) modificado mediante infiltración al vacío. Para este experimento se siguieron los lineamientos básicos descritos en dicho protocolo. Se realizó posteriormente la fenotipificación de los callos.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Secuenciación y alineaciones del gen NAC 25 que se seleccionó del transcriptoma de *S. officinarum*

Una vez obtenidas la amplificación de la banda del gen NAC 25 se clonaron en el vector pGEM-T Easy de Promega y se mandaron a secuenciar. Las secuencias fueron idénticas a la secuencia del gen NAC 25 que se tomó del transcriptoma.

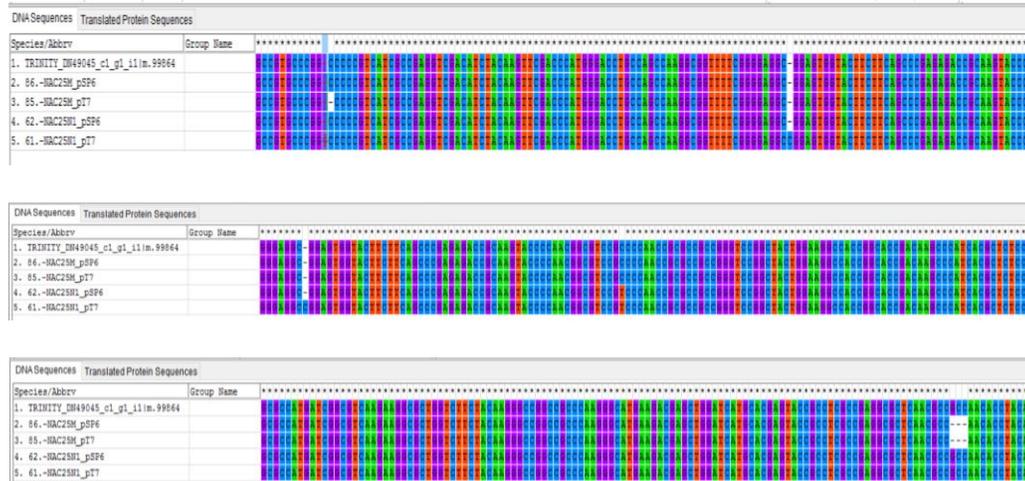


Figura 4.3. Alineamiento entre la secuencia de nucleótidos predicha (TRINITY_DN49045) y las secuenciadas (NAC25M_pSP6, NAC25M_pT7, NAC25N1_pSP6, NAC25N1_pT7)

4.3.2. Clonación del gen NAC25 en los vectores de sobreexpresión.

4.3.2.1. pBISN1

NAC25 (119pb) + Adaptador de Histidina (18pb) = 1137pb

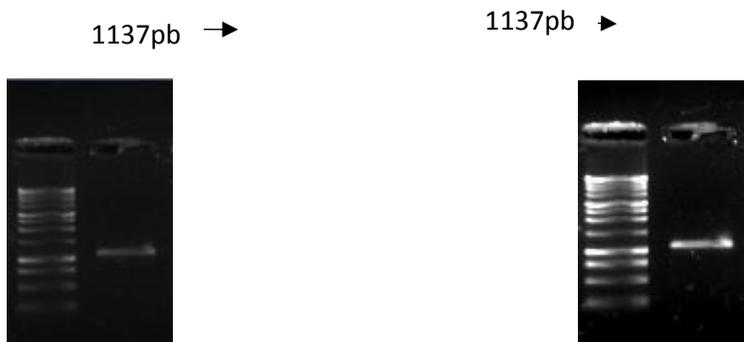
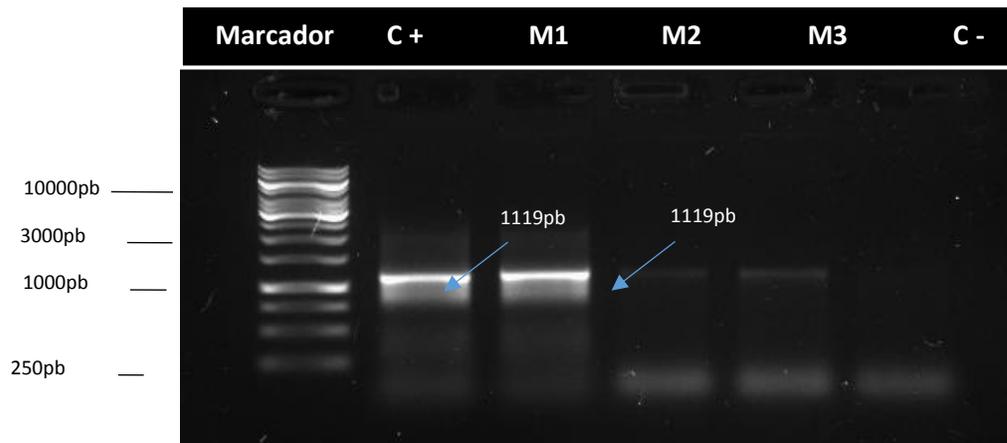
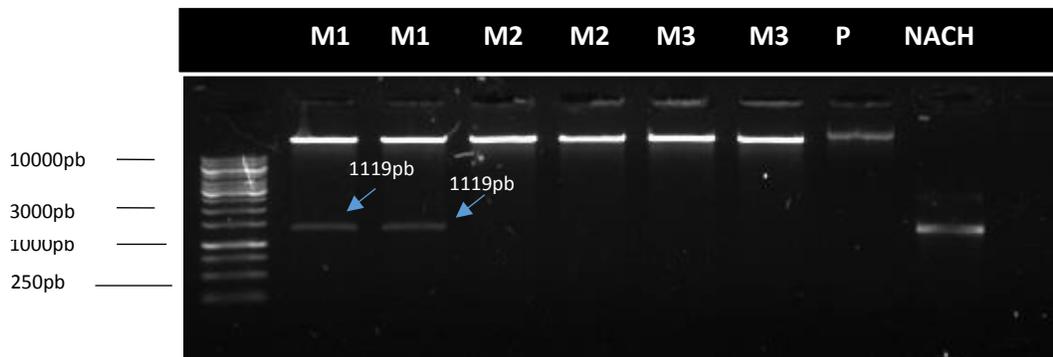


Figura 4.4. Amplicones que se obtuvieron de pGEM-T easy.

2.-PCR de colonia para la confirmación de la transformación del vector de pBISN1 en *E. coli*

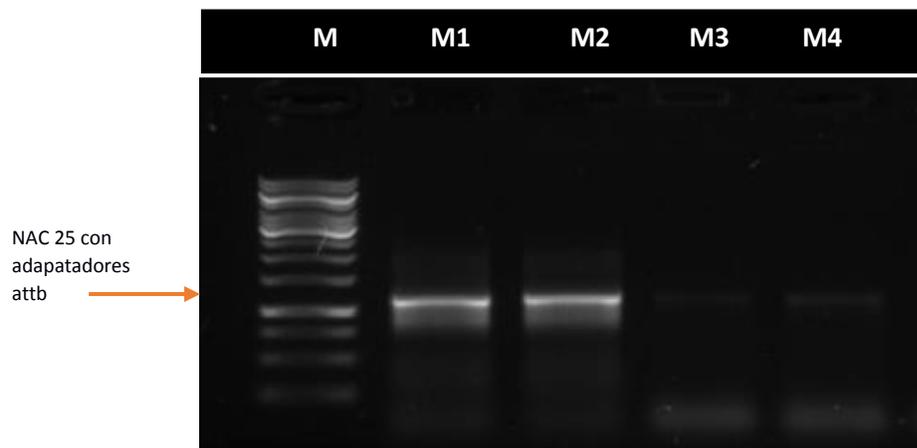


3.- Análisis de restricción del vector pBISN1 con las enzimas de restricción spe1 y sac1.



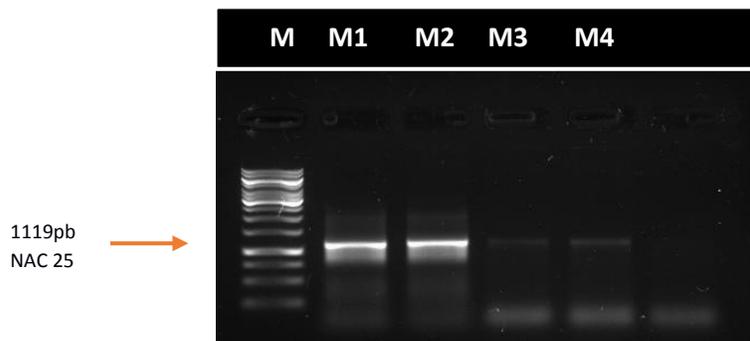
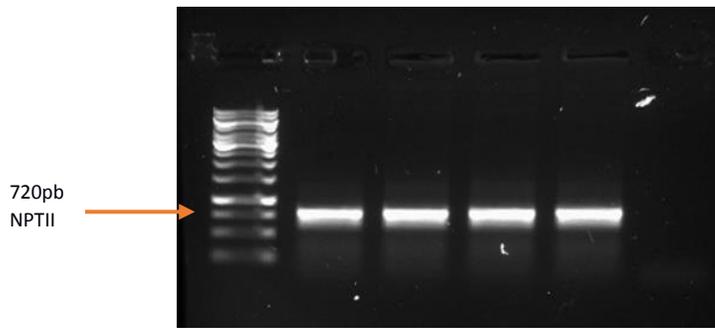
4.3.2.2. PK7FWG2.O

1.-Amplicones que se obtuvieron de pGEM- T easy con los adaptadores attb.



2.-PCR de colonia del vector PK7FGW2.O con los primers de NPT II y NAC 25

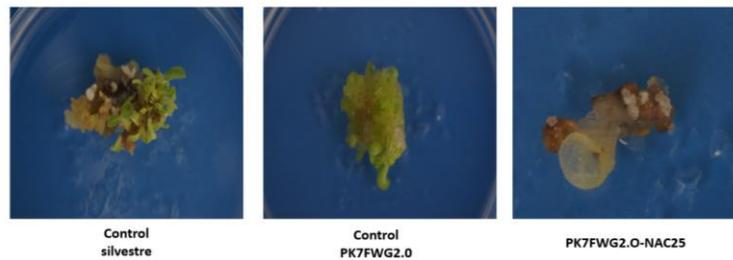




4.3.3. Transformación de callos de tabaco por medio de *A. tumefaciens*

Como resultados de la transformación se obtuvieron diversas líneas de callos de tabaco transformados con el gen marcador NPT II que confiere resistencia al antibiotico kanamicina, los cuales fueron regenerados en medios selectivos con kanamicina para evitar el crecimiento de tejido no transformado.

a)



b)

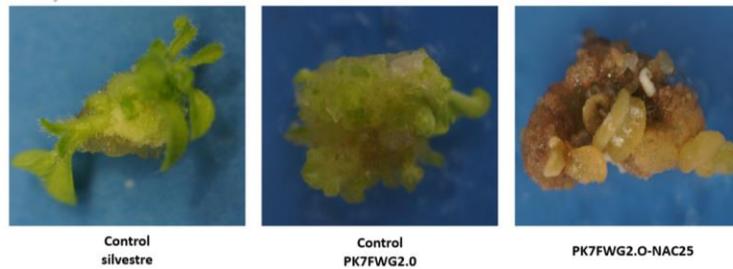


Figura 4.5. Callos de tabaco sembrados en medio de cultivo con a) kanamicina y b) sin kanaminica.

4.4. DISCUSIÓN

4.4.1. Secuenciación y alineaciones del gen NAC que se seleccionó del transcriptoma de *S. officinarum*

En las alienaciones realizadas con los datos de secuenciación se pudieron observar que no hubo cambio o mutación que pudiera afectar la transcripción, traducción y por lo tanto funcionalidad del gen NAC25.

4.4.2. Diseño y construcción de los vectores de sobreexpresión

Los resultados obtenidos en los análisis del vector pBISN1 y PK7FWG2.0 nos confirman una correcta construcción, por consiguiente, podemos transformar en *A. Tumefaciens* y posteriormente a *Nicotiana tabacum*.

4.4.3. Transformación de callos de tabaco por medio de *A. tumefaciens*

Los resultados obtenidos hasta ahora de las líneas de callos de tabaco necesitan más experimentos de corroboración y evaluación, ya que por tiempo solo se realizó una fenotipificación por un mes y medio. Hasta ahora con los resultados de fenotipificación se puede sugerir que el gen NAC 25 de caña de azúcar posiblemente este participando en la regulación positiva a senescencia y por lo tanto ser un ortólogo funcional de AtNAP de arabidopsis y OsNAP de arroz.

BIBLIOGRAFÍA

- Rahnama A., James R. A., Poustini K. y Munns R. (2010). Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. *Functional Plant Biology*, 37: 255-263.
- Abe H, Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) functionas transcriptional activator abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63–78.
- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D. and Shinizaki K. (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 9: 1859–1868.
- Afzal Z., Howton T.C., Sun Y., Mukhtar M.S. (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology*,9: 1-22.
- Agarwal P., Reddy M. y Sopory S. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25: 1263–1274.
- Agrawal G., Tamogami S., Iwahashi H., Agrawal V. y Rakwal R. (2003). Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice MAP kinase gene (OsBWMK1) by diverse biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology Biochemistry*, 41: 355–361.

- Ahmad P., Jaleel CA., Salem MA., Nabi G., Sharma S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 3: 161-75.
- Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H., Tasaka M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 9: 841–857.
- Akram, M. (2011). Growth and yield components of wheat under water stress of different growth stages. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*. 36: 455-468.
- Akram N.A., Waseem M., Ameen R., Ashraf M. (2016). Trehalose pretreatment induces drought tolerance in radish (*Raphanus sativus* L.) plants: some key physio-biochemical traits. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 1-10.
- Stamatakis A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models, *Bioinformatics*, 22: 2688–2690,
- Ambrosone A., Costa A., Leone A. y Grillo S. (2012). Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. *Plant Science*, 182: 12–18.
- An Z., Jing W., Liu Y. y Zhang W. (2008). Hydrogen peroxide generated by copperamine oxidase is involved in abscisic acid induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, 59: 815–825.
- Anderson J., Badruzsaufari E., Schenk P., Manners J., Desmond O. , Ehlert C. *et al.* (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 3460–3479.
- Andrésa Z., Pérez-Hormaechea J., Leidia E.O., Schlücking K., Leonie S., McLachlan D., Schumacher K., Hetherington A., Kudlab J., Cuberoa B., Pardo J. (2014). Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 111: 1806-1814.

- Anithakumari A., Nataraja K., Visser R., Linden V. (2012). Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Molecular Breeding*, 30: 1413-1429.
- Anjum S.A., Xie X., Wang L. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal agriculture*, 6: 2026-2032.
- Antoni R., Gonzalez-Guzman M., Rodriguez L., Peirats-Llobet M., Pizzio G., Fernandez M. *et al.* (2013). PYRABACTINRESISTANCE 1-LIKE8 plays an important role in the regulation of abscisic acid signaling in root. *Plant Physiology*, 161: 931–941.
- Antoni R., Gonzalez-Guzman M., Rodriguez L., Rodrigues A., Pizzio G. y Rodriguez P. (2012). Selective inhibition of clade phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. *Plant Physiology*, 158: 970–980.
- Aroca R., Vernieri P., Ruiz-Lozano J. (2008). Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of experimental botany*, 59: 2029-41.
- Ashraf M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* 27: 84–93.
- Ashraf M., Harris P. (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51: 163-190.
- Aswath C., Kim S., Mo S.y Kim D. (2005). Transgenic plants of creeping bentgrass harboring the stress-inducible gene, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase are highly tolerant to drought and NaCl stress. *Plant Growth Regulator*, 47: 129-139.
- Atkinson N., Urwin P. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 35: 23-43.
- Avramova V., Elgawad H. Zhang Z., Fotschki B., Casadevall R., Vergauwen L., Knapen D., Taleisnik E., Guisez Y., Asard H., Beemster G. (2015). Drought induces distinct growth response, protection, and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. *Plant Physiology*, 169: 1382-1396.

- Wang B., Luttge U. y Ratajczak R. (2001). Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda*. *Journal of Experimental Botany*, 365:2355–2365.
- Baena-Gonzalez E., Sheen J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Science*, 22: 474-82.
- Bailey-Serres J., Lee S., yBrinton E. (2012). Water proofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiology*, 160: 1698–1709.
- Balazadeh S., Wu A., Mueller-Roeber B. (2010). Salt-triggered expresión of the ANAC092 dependent senescence regulon in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling Behaviour*, 20: 404-534.
- Bao G., Zhuo C., Qian C., Xiao T., Guo Z. y Lu S. (2016). Co-expression of NCED and ALO improves vitamin C level and tolerance to drought and chilling in transgenic tobacco and stylo plants. *Plant Biotechnology Journal*, 14: 206–214.
- Barbieri G., Vallone S., Orsini F., Paradiso R. *et al.* (2012). Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 169: 1737–1746.
- Bartel D. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215–233.
- Bartels, D. y Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24: 23–58.
- Brown M., Ye J., Rawson R., Goldstein J. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Plant Cell*, 100: 391–398.
- Burke E., Brown S. y Christidis N. (2006). Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley Centre climate model. *Journal Hydrometeor*, 7: 1113–1125.

- Christiansen M., Holm P., Gregersen P. (2011). Characterization of barley (*Hordeum vulgare* L.) NAC transcription factors suggests conserved functions compared to both monocots and dicots. *BMC Research Notes*, 4: 302-314
- Darriba D., Taboada G., Doallo R., Posada D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 27: 1164-1165.
- De Oliveira T., Cidade L., Gesteira A., Coelho-Filho M., Soares-Filho W., Costa M. *et al.* (2011). Analysis of the NAC transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses. *Tree Genetics & Genomes*.7: 1123–1134.
- Ernst H., Nina A., Skriver K., Larsen S., Lo Leggio L. (2004). Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Reports*, 5: 297-303.
- Grimsley N., Hohn B., Hohn T. y Walden R. (1986). 'Agroinfection, an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 3282–3286.
- Gu Z., Eils R., Schlesner M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*
- Hoppe T., Rape M., Jentsch S. (2001). Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:344–348.
- Hu R., Qi G., Kong Y., Kong D., Gao Q., Zhou G. (2010). Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology*, 10: 145-155.
- Hua J. (2009). From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 568–573.

- Ings J., Mur L., Robson R., Bosch M. (2013). Physiological and growth responses to water deficit in the bioenergy crop *Miscanthus giganteus*. *Frontier PlantsScience*. 4: 468-480
- lordachescu, M., Imai, R.: (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. - *Journal of Integrative Plant Biology*. 50: 1223-1229,
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T. *et al.* (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 27: 325–333.
- Schroeder J., Delhaize E., Frommer W. *et al.* (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*, 497:60–66.
- Zhang J. y Shi H. (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance, *Photosynthesis Research*.115: 1–22,
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C. y Zhu J. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2: 3730– 3734.
- Rozema J. y Flowers T. (2008). Ecology: crops for a salinized world. *Science*, 322: 1478–1480.
- Zhu J. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 192: 441–445.
- Martínez-Atienza J., Jiang X., Garcíadeblas B. *et al.* (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology*, 143:1001–1012.
- Jaleel C., Gopi R., Sankar B., Gomathinayagam y M., Panneerselvam R. (2008). Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 42-47.
- Jensen M., Hagedorn P., Torres-Zabala M., Grant M., Rung J., Collinge D. *et al.* (2008). Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor

- attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. hordei in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 56: 867– 880.
- Jin J., Zhang H., Kong L., Gao G., Luo J. (2014). PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 42: 1182–1187.
- Joliot P., Johnson G.N. (2011). Regulation of cyclic and linear electron flow in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 13317-13322.
- Apel K. y Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399.
- Dietz K., Tavakoli N., Kluge C. *et al.* (2001). Significance of the V type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level, *Journal of Experimental Botany*, 52: 1969–1980.
- Kaewsuksaeng, S. (2011). Chlorophyll degradation in horticultural crops. - *Walailak Jorunal Science Technology*, 8: 9-19.
- Kannan N., Kulandaivelu G. (2011). Drought induced changes in physiological, biochemical and phytochemical properties of *Withania somnifera* Dun. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 3929-3935.
- Kar R. (2011). Plant responses to water stress: role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 1741-1745.
- Karami A., Shahbazi M., Niknam V., Shobbar Z.S., Tafreshi R.S., Abedini R. (2013). Expression analysis of dehydrin multigene family across tolerant and susceptible barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes in response to terminal drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 2289-2297.
- Karimi M., Inzé D., Depicker A. (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plants Science* 7: 193–195.

- Kasuga K., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17: 287–291.
- Kato H., Motomura T., Komeda Y., Saito T., Kato A. (2010). Overexpression of the NAC transcription factor family gene ANAC036 results in a dwarf phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 167: 571–577.
- Kaur G., Asthir B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Plant Biology*, 59: 609-619.
- Kelley A., Lawrence A., Mezulis S., Yates C., Wass M., Sternberg M. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*; 2015/05/07/online 10845B. Nature Publishing Group, a division of Macmillan.
- Kerepesi and Galiba G., (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings, *Crop Science*, 482–487.
- Khan M., Ahmad D., Khan M. (2015). Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18: 257-266.
- Kim S., Kim S., Park C. (2007). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Plantas*, 226: 647–654.
- Kim S., Kim S., Kim Y., Seo P., Bae M., Yoon H. *et al.* (2006). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Research*, 35: 203-213.
- Kim, J.-S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K. *et al.* (2012a). *Arabidopsis* growth-regulating factor7 functions as a transcriptional repressor of abscisic acid- and osmotic stress-responsive genes, including DREB2A. *Plant Cell* 24, 3393–3405.

- Kim T. (2014). Mechanism of ABA signal transduction: agricultural highlights for improving drought tolerance. *Journal of Plant Biology* 57: 1-8.
- Kingsbury R., Epstein E. (1984). Selection for salt-resistant spring wheat. *Crop Science*, 24: 310–315.
- Knapp A., Briggs J., Koelliker J. (2001). Frequency and extent of water limitation to primary production in a mesic temperate grassland. *Ecosystems*, 26:185-192.
- Kondrák M., Marincs F., Antal F., Juhász Z., Bánfalvi Z. (2012). Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. *BMC Plant Biology*, 12: 74-79.
- Krasensky J., Jonak C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal Experimental Botany*, 63: 1593-608.
- Kulik A., Wawer I., Krzywińska E., Bucholc M., Dobrowolska G. (2011). SnRK2 protein kinases-key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS* 15: 859-872.
- Kuromori T., Sugimoto E. y Shinozaki K. (2014). Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiology*, 164: 1587–1592.
- Ma L., Zhang H., Sun L. *et al.* (2012). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 63: 305–317.
- Lahaye P., Epstein E. (1971). Calcium and salt toleration by bean plants. *Physiologia Plantarum* 25: 213–218.
- Lata C., Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62: 4731-4748.
- Le Gall H., Philippe F., Domon J.M., Françoise G., Jérôme P., Rayon C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4: 112-166.

- Leiser R. *et al.* (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 9136–9140.
- Li H., Zang B., Deng X., Wang X. (2011). Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Plants*, 234: 1007- 1018.
- Licausi F., Ohme-Takagi M., Perata P. (2013). *APETALA2*/ethylene mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytology*, 199: 639-649.
- Lim J., Kim S. (2013). Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *The Plant Pathology Journal*, 29: 201-208.
- Liu S., Lv Y., Wan X., Li L., Hu B. (2014). Cloning and expression analysis of cDNAs encoding ABA 8'-hydroxylase in peanut plants in response to osmotic stress. *PLoS ONE* 9: 97025-97032.
- López-Lázaro M., Willmore E. y Austin C. (2007). Cells lacking DNA topoisomerase II β are resistant to genistein. *Journal of Natural Products*, 70: 758-764.
- Lu P., Chen N., An R., Su Z., Qi B., Ren F. *et al.* (2007). A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 63:289–305.
- Hoque M., Banu M., Okuma E. *et al.* (2007). Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology*, 164: 1457–1468.
- Hossain M., Munemasa S., Uraji M., Nakamura Y., Mori I. y Murata Y. (2011). Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156: 430–438.

- Khan M., Ungar I., and Showalter A. (2000). Effects of sodium chloride treatments on growth and ion accumulation of the halophyte *haloxylon recurvum*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 57: 2763–2774.
- Tahir M., Aziz T., Farooq M., and Sarwar G., (2012). Silicon induced changes in growth, ionic composition, water relations, chlorophyll contents and membrane permeability in two salt stressed wheat genotypes. *Archives of Agronomy and Soil Science*: 58: 247–256.
- Ashraf M. y Foolad M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 206–216.
- Oliveira M., Menezes A., Farias M., Orellano E., Silva M. y Fernandes D. (2001). Salt modulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. *Journal of Plant Physiology*, 72: 545–551.
- Dopp M., Larher F. y Weigel P. (1985). Osmotic adaption in *Australian mangroves*. *Vegetatio*, 56:247–253.
- Ishitani M., Liu J., Halfter U., Kim C., Shi W. y Zhu J. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires Nmyristoylation and calcium binding. *Plant Cell*, 12: 1667–1677.
- Reddy M., Sanish S., and Iyengar E. (1992). Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata Roxb* under saline conditions. *Photosynthetica*, 18: 173–179.
- Maggio A., Raimondi G., Martino A., De Pascale S. 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 276–282.
- Manivannan P., Jaleel C., Sankar B., Kishorekumar A., Somasundaram R., Alagu L., Panneerselvam R. (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus L.* as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 59: 141-149.

- Marillonnet S. *et al.* (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 6852–6857.
- Marok M., Tarrago L., Ksas B., Henri P., Abrous-Belbachir O., Havaux M., Rey P. (2013). A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds during water deficit compared to a tolerant variety. *Journal Plant Physiology*, 170: 633-645.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environment*, 33: 453-467.
- Mittler R., Blumwald E. (2005). The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell*, 27: 64-70.
- Miyakawa T., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K. y Tanokura M. (2013). Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends Plant Science*, 18: 259–266.
- Mizoi J., Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819: 86–96.
- Morimoto K., Mizoi J., Qin F., Kim J., Sato H., Osakabe Y. *et al.* (2013). Stabilization of *Arabidopsis* DREB2A is required but not sufficient for the induction of target genes under conditions of stress. *PLoS ONE* 8:80457-80465.
- Munns R., Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 143–160.
- Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–681.
- Munns R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, vol. 167: 645–663.

- Nebenführ A., Žárský V., Cvrčková F. (2014). Identifying Subcellular Protein Localization with Fluorescent Protein Fusions After Transient Expression in Onion Epidermal Cells. *Plant Cell Morphogenesis*, 1080: 168-185
- Fernandez-Pozo Noe, Naama M., Jeremy D., Surya E., Isaak Y. Teclé R. *et al.* (2015). The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding, *Nucleic Acids Research*, D: 1036–1041
- Olsen A., Ernst H., Leggio L., Skriver K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Science*, 10: 79–87.
- Ooka H., Satoh K., Doi K., Nagata T., Otomo Y., Murakami K. *et al.* (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research.*; 10: 239–247.
- Podzimská-Sroka D., O'Shea C., Gregersen P. (2015). NAC Transcription Factors in Senescence: From Molecular Structure to Function in Crops. *Plants*, 4: 412-448.
- Finn R., Coggill P., Eberhardt R., Eddy S., Mistry J., Mitchell A., Potter S. *et al.* (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future; *Nucleic Acids Research*, 44: 279-285.
- Scholthof H., Scholthof K. y Jackson A. (1996). Plant virus gene vectors for transient expresión of foreign proteins in plants. *Annual Review Phytopathology*, 34: 299–323.
- Shao H., Chu L., Jaleel, C. y Zhao C. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 215–225.
- Sharma P., Jha A., Dubey R. y Pessarakli M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal Botany*, 25: 2012, 2026.
- Shi J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M. *et al.* (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology. Journal*. 15, 207–216.

- Shih C., Hsu W., Peng Y., Yang C. (2014). The NAC-like gene anther indehiscence factor acts as a repressor that controls anther dehiscence by regulating genes in the jasmonate biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Journal Experimental Botany*, 65: 621–639.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal Experimental Botany*, 58: 221-7.
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (1997). Gene expresión and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115: 327-335.
- Shinozaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal Experimental Botany*, 58: 221–227.
- Shrawat A., and Lörz H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnology Journal*, 4: 575–603.
- Shulaev V. y Oliver D. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology*, 141: 367–372.
- Silva M., Goncalves da Silva J., Enciso J., Sharma V. y Jifon J. (2008). Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Science Agriculture*, 65: 620–627.
- Silva M., Jifon J., Da Silva J., Dos Santos C. y Sharma V. (2014). Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. *Journal of Agriculture Science*. 152: 104-118.
- Silva M., Jifon J., Dos Santos, C., Jadoski C. y Da Silva J. (2013). Photosynthetic capacity and water use efficiency in sugarcane genotypes subject to water deficit during early growth phase. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56:735–748.
- Silva M., Jifon J., Da Silva J. y Sharma V. (2007). Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 193–201.
- Silva R., Silva M., Ferreira Neto J., Nardi C., Chabregas S., Burnquist W. *et al.* (2014). Validation of novel reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR in drought-stressed sugarcane, 52: 189-197.

- Singh R., Kumar P., Tiwari N., Rastogi J. y Singh S. (2013). Current status of sugarcane transgenic: an overview. *Advance. Genetic Engeeniery*, 2: 112-120.
- Skiryycz A., Vandenbroucke K., Clauw P., Maleux K., De Meyer B., Dhondt S. *et al.* (2011). Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology*, 29: 212–214.
- Skorzynska-Polit E. (2007). Lipid peroxidation in plant cells, its physiological role and changes under heavy metal stress. *Polish Botanical Society*, 76: 49–54.
- Smit M. y Singels A. (2006). The response of sugarcane canopy development to water stress. *Field Crops Research*, 98: 91–97.
- Smith D., Inman-Bamber N. y Thorburn P. (2005). Growth and function of the sugarcane root system. *Field Crops Research*, 92: 169–183.
- Soares R., Oliveira P., Cardoso H., Vasconcelos A., Landell M. y Rosenfeld U. (2004). Efeito da irrigação sobre o desenvolvimento e a produtividade de duas variedades de cana-de-açúcar colhidas em início de safra. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*, 22: 38–41.
- Somers D. y Makarevitch I. (2004). Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes?. *Current Opinion Biotechnology*, 15: 126–131.
- Songsri P., Jogloy S., Vorasoot N., Akkasaeng C., Patanothai A. y Holbrook C. (2008). Root distribution of drought-resistant peanut genotypes in response to drought. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 92–103.
- Souer E., Houwelingen A., Kloos D., Mol J., Koes R. (1996). The No Apical Meristem gene is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. *Cell*, 85: 159–170.
- Spiteller G. (2003). The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. *Physiology Plant*, 119: 5–18.
- Su Y., Guo J., Ling H., Chen S., Wang S., Xu L. *et al.* (2014). Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses. *PLoS ONE*, 9:84426-84436.

- Sugiharto B., Sakakibara H., and Sugiyama T. (1997). Differential expresión of two genes for sucrose-phosphate synthase in sugarcane: molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expresión. *Plant Cell Physiology*, 38: 961–965.
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J. y Mark C. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*, 7: 13274-13285.
- Flowers T. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 396: 307–319.
- Tanaka Y., Sano T., Tamaoki M., Nakajima N., Kondo N. y Hasezawa S. (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138: 2337–2343.
- Tardieu F. (2012). Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *Journal Experimental Botany*, 63, 25–31.
- Tardieu F., Bruckler L. y Lafolie F. (1992). Root clumping may affect the root water potential and the resistance to soil-root water transport. *Plant and Soil*, 140: 291–301.
- Teramoto E. (2003). Avaliação e Aplicação de Modelos de Estimativa de Produção de Caña-de-azúcar (*Saccharum spp*) Baseados em Parametros do solo e do clima. Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.123.
- Thiebaut F., Grativol C., Tanurdzic M., Carnavale-Bottino M., Vieira T., Motta M. *et al.* (2014). Differential sRNA regulation in leaves and roots of sugarcane under water depletion. *PLoS ONE*, 9: 93822-93836.
- This D., Comstock J., Courtois B. *et al.* 2010. Genetic analysis of water use efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) at the leaf level. *Rice* 3: 72–86.
- Thomas H. y Howarth C. (2000). Five ways to stay green. *Journal Experymental Botany*. 51: 329–337.

- Thomashow M. (2010). Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiology*, 154: 571–577.
- Tran L., Nakashima K., Sakuma Y., Simpson S., Fujita Y., Maruyama K. *et al.* (2004). Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors that bind to a drought- responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *Plant Cell*, 16: 2481–2498.
- Turpen T. (1999). Tobacco mosaic virus and the virescence of biotechnology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 354: 665–673.
- Venkataramana S., Rao P. y Naidu K. (1986). The effects of wáter stress during the formative phase on stomatal resistance and leaf water potential and its relationship with yield in ten sugarcane varieties. *Field Crops Research*, 13: 345–353.
- Verbruggen N. y Hermans C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753–759.
- Vettore A. L., Da Silva F., Kemper E., Souza G., Da Silva A., Ferro M. *et al.* (2003). Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research*, 13: 2725–2735.
- Wagih M., Ala A. y Musa Y. (2003). Biomass analysis and selection of sugarcane genotypes for drought tolerance. *Sugar Tech*, 5: 257–263.
- Wahid A. y Close T. (2007). Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biology Plant*, 51: 104–109.
- Walter A., Galdos M., Scarpore F., Seabra J., Leal M., Cunha M. *et al.* (2013). Brazilian sugarcane ethanol: developments so far and challenges for the future. *WENE*, 3: 70–92.
- Waltz E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 532: 293–293.
- Wang X., Basnayake B., Zhang H., Li G., Li W., Virk N. *et al.* (2009). The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses

- against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 22: 1227–1238.
- Wang X., Yang P., Liu Z., Liu W., Hu Y., Chen H. *et al.* (2009). Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy. *Plant Physiology*, 63: 1739-50.
- Wilkinson S. y Davies W. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell and Environment*, 33: 510–525.
- Wu A., Allu DA, Garapati P., Siddiqui H., Dortay H., Zanol M., *et al.* (2012). JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species–responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24: 482–506.
- Wu Y., Zhou H., Que Y., Chen R. y Zhang M. (2008). Cloning and identification of promoter Prd29A and its application in sugarcane drought resistance. *Sugar Tech*, 10: 36–41.
- Xiong L., Schumaker K. S. y Zhu J. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14:165–183.
- Guo Y., Qiu Q., Quintero F. *et al.* (2004). Transgenic Evaluation of Activated Mutant Alleles of SOS2 Reveals a Critical Requirement for Its Kinase Activity and C-Terminal Regulatory Domain for Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 53: 435–449.
- Wang Y. y Nii N. (2000). Changes in chlorophyll, ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 12: 623–627.
- Yamaguchi M., Kubo M., Fukuda H., Demura T. (2008). Vascular-related NACDOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in *Arabidopsis* roots and shoots. *Plant Journal*, 55: 652– 664.

- Yamaguchi T. y Blumwald E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Science*, 10: 615–620.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6: 251–264.
- Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review Plant Biology*, 57: 781–803.
- Yancey P. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal Experimental Biology*, 208: 2819-2830.
- Yang Y., Fu Z., Su Y., Zhang X., Li G., Guo J. *et al.* (2014). A cytosolic glucose- 6-phosphate dehydrogenase gene, ScG6PDH, plays a positive role in response to various abiotic stresses in sugarcane. *Scientific Reports*, 4: 7090-7098.
- Yoshida T., Mogami J. y Yamaguchi-Shinozaki K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21: 133–139.
- Yoshida T., Ohama N., Nakajima J., Kidokoro S., Mizoi J., Nakashima K. *et al.* (2011). *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expresión. *Molecular Genetics and Genomics*, 286: 321–332.
- You J., and Chan Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1092-1098.
- Yusibov V., Shivprasad S., Turpen T., Dawson W. y Koprowski H. (1999). Plant viral vectors based on tobamoviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 240: 81–94.

Zeevaart J. y Creelman R. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 39: 439–473.