



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis funcional del gen SoNAP en tejidos meristemáticos radiculares de *Saccharum officinarum* Var MEX69290.

Tesis que presenta

OSMAR WILEBALDO SOLIS MORALES

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **BIOTECNOLOGÍA**)

Mérida, Yucatán, México

2021

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 Osmar Wilebaldo Solis Morales titulado **“Análisis funcional del gen SoNAP en tejidos meristemáticos radiculares de *Saccharum officinarum* Var MEX 69290”** 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. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 17 de noviembre de 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación 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.



Osmar Wilebaldo Solís Morales

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número de apoyo 748027.

Al centro de investigación Científica de Yucatán, A.C., por las instalaciones prestadas para realización del proyecto. Al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata en colaboración con el Dr. Luis Joel Figueroa por dar los seguimientos, las asesorías, las pláticas durante todo mi trayecto, preparación y realización de tesis. Al técnico Miguel Angel Kep Llanes por haberme proporcionado apoyo con los protocolos, metodologías durante la parte experimental del proyecto. También al comité tutorial por las excelentes observaciones y aportaciones al proyecto.

A mis amigos, conocidos y colegas que durante mi estancia en el posgrado tuve el agrado de haberlos conocido; al Dr. Samuel por las asesorías, las pláticas, los seguimientos que me proporcionaste al inicio del semestre y la gran charla del ¿Por qué?, del ¿Por qué? del ¿Por qué?; al MC. Antonio por la motivación, por hacerme ver lo mucho que madure en este tiempo, el apoyo y colaboración en los análisis estadísticos para este proyecto; a la M.C Evelyn por el material y contribución en la parte de ediciones genéticas; a la M.C Maria José por las células competentes proporcionadas, guiño-guiño; al Ing. Alberto por ser un gran amigo durante mi estancia, por el apoyo moral y las aventuras recorridas; al MC. Rufino por la gran amistad que me brindaste, las extensas y profundas pláticas de la vida.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a:

Jehová, por la guía, sabiduría, salud recibida para culminar con éxito el posgrado.

Con mucho cariño a mis padres, que siempre han estado apoyándome, alentándome, en mis proyectos de vida, gracias por todo, los Amo.

A mis profesores, compañeros y colaboradores por atender mis dudas, la disposición brindada, y proporcionarme su vasto conocimiento y apoyo durante el transcurso de mi estancia, así como también a la institución "CICY" por ser una casa de estudio que me permitió el desarrollo profesional como Maestro en Ciencias y por tener una educación de calidad.

A mis amigos, por brindarme su apoyo incondicional y por extender su mano en momentos difíciles.

Y finalmente a mí, por todo el esfuerzo, la dedicación, constancia, perseverancia para realizar este proyecto de vida que desarrolle a lo largo de dos años, por creer en mí mismo y jamás darme por vencido.

ÍNDICE

Capítulo I. ANTECEDENTES.....	2
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.1.1 Senescencia y/o muerte celular	2
1.1.2 Los Factores de Transcripción.....	4
1.1.3 Factores de Transcripción de la familia NAC	4
1.1.4 SONAP	7
1.1.3 Modelo biológico: <i>Saccharum officinarum</i>	8
1.1.5 Desarrollos biotecnológicos en caña de azúcar	13
1.1.6 Mejoramientos genéticos en caña de azúcar.....	14
1.1.7 Tecnologías actuales de edición genética.....	14
1.1.8 Sistema CRISPR	17
1.1.9 Ediciones genéticas empleando el sistema CRISPR/Cas9	19
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	22
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	23
1.3.1 Objetivos específicos	23
1.4 Estrategia experimental general.....	24
Capítulo II. SOBRE EXPRESANTE SoNAP EN MERISTEMOS RADICULARES	25
2.1 INTRODUCCIÓN.....	25
2.2 METODOLOGÍA	27
2.2.1 Transformación genética en <i>Agrobacterium</i>	27
2.2.2 Transformación genética de meristemos de caña de azúcar.....	28
2.2.3 Análisis del cambio de color en meristemos transformados	28
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
2.3.1 Transformación de <i>Agrobacterium</i>	29
2.3.2 Sobre expresión del SoNAP en meristemos de caña de azúcar.....	29

2.4	CONCLUSIONES	36
Capítulo III. SISTEMA DE EDICIÓN PARA EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SoNAP		37
3.1	INTRODUCCIÓN	37
3.2	METODOLOGÍA	40
3.2.1	Análisis bioinformáticos.....	40
3.2.2	Sitio objetivo de edición.....	41
3.2.3	Plásmidos	41
3.2.4	Estrategia de ensamble de guías “sgRNA”.....	42
3.2.5	Corroboración de cassette 1 y 2 ensamblados en plásmido pDK-SA.....	44
3.3	RESULTADOS	45
3.3.1	Análisis bioinformáticos.....	45
3.3.2	Sitio blanco de edición y guías de RNA seleccionadas	46
3.3.3	Corroboración de insertos en plásmidos	47
3.4	DISCUSIÓN.....	51
3.5	CONCLUSIONES	53
Bibliografía		54
Anexo A.....		61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Modelo para las vías reguladoras en la senescencia de la hoja, adaptada de Lim et al., (2007).....	3
Figura 1. 2 Proceso de transcripción. Recuperado de https://es.khanacademy.org/	4
Figura 1. 3 Esquema general de un factor de transcripción NAC. La región de unión al DNA está contenida en los subdominios D y E. La región TAR se encuentra en el extremo C-Terminal (Ooka, 2003).....	5
Figura 1. 4 Expresión relativa del gen SoNAP en hojas y raíces de caña de azúcar bajo diferente estrés abiótico (Carrillo-Bermejo, 2020).	7
Figura 1. 5 Callos de tabaco transformados con la sobre expresante del SONAP. A) En un medio de cultivo con kanamicina y B) en un medio sin kanamicina, adaptada de (Carrillo-Bermejo, 2020)	8
Figura 1. 6 Principales productores de caña de azúcar a nivel mundial (FAOSTAT, 2019)	10
Figura 1. 7 principales productos agrícolas generados en México (FAOSTAT, 2019)	11
Figura 1. 8 Cromosomas homólogos de <i>Saccharum officinarum</i> , adaptado de (Thirugnanasambandam et al., 2018)	12
Figura 1. 9 Dos nucleasas dedos de Zin (ZNF) unidas a un sitio específico (Voytas, 2013)	15
Figura 1. 10 TALEN unidas a su sitio objetivo (Voytas, 2013).	16
Figura 1. 11 Representación esquemática de Cas9 (Ma, 2016).	18
Figura 1. 12 Representación esquemática de la estructura secundaria del sgRNA (Liang G. Z., 2016)	19
Figura 2. 1 Mapa del vector pK7FWG2,0. Sm/SpR: gen de resistencia a estreptomicina y espectinomicina para selección de bacterias transformadas; Kan: gen de resistencia a kanamicina para la selección de plantas transformadas; T35S: terminador 35S; Egfp: proteína verde fluorescente; ccdB: gen que codifica para la toxina ccdB; p35S: promotor 35S.....	27
Figura 2. 2 Productos de PCR en colonias analizadas en gel de agarosa al 1%. Carril 1: cargado con 1ul de marcador molecular de DNA 1kb Ladder (PROMEGA, G571A), carril 2: control negativo (sin templado), carriles 3 y 4, colonia transformada con el gen SoNAP, carriles 5 y 6: control positivo (con templado 35S:SoNAP).....	29
Figura 2. 3 Respuesta fenotípica de la sobreexpresión del SoNAP en tejidos meristemáticos de caña. A) Estructura del vector 35S:SoNAP-GFP. B) Respuesta de la sobreexpresante. En la	

primera columna se muestra el fenotipo de los meristemos control cultivados en un medio MS al día 1 y día 10; en la segunda columna se muestra el fenotipo de los meristemos transformados con *Agrobacterium* cultivados en medio sin kanamicina al día 1 y día 10; en la tercera columna se muestra el fenotipo de los meristemos transformados y cultivados en medio con kanamicina (50mg/ml) al día 1 y día 10. **C)** Graficas de tendencia. Las gráficas muestran la tendencia del cambio fenotípico en los meristemos radiculares de *Saccharum officinarum* a los 10 días posteriores a la transformación con *Agrobacterium*; MSK (medio sin kanamicina) y MCK (medio con kanamicina).....30

Figura 2. 4 Análisis de componentes principales en la sobreexpresión del gen SoNAP en meristemos radiculares de *Saccharum officinarum*31

Figura 2. 5. Cambio de color de los meristemos durante la sobreexpresión del gen SoNAP. A) Imágenes tomadas bajo el microscopio del día 1 y día 10 para el grupo control meristemático; el grupo transformado y cultivado en un medio sin antibiótico (MTSK); y el grupo meristemático transformado y cultivado en un medio con antibiótico (MTCK), respectivamente. B) Imagen representativa de las coordenadas de CIELab en un sistema tridimensional. C) Promedio del espacio de color para la coordenada a*; para cada grupo meristemático; donde la línea roja representa al grupo control, la línea verde al grupo meristemático transformado y cultivado en un medio sin antibiótico (MTSK); la línea azul representa al grupo meristemático transformado y cultivado en un medio con antibiótico (MTCK). D) Promedio del espacio de color para la coordenada b*. E) Grafico que representa la diferencia de color (ΔE) para cada uno de los grupos meristemáticos.....32

Figura 3. 1 Representación esquemática de la mutación puntual en el gen OsALS (Xie et al, 2017)37

Figura 3. 2 Diseño del knockout del gen Wx1 (Chilcoat et al., 2017,).....38

Figura 3. 3 Esquema del locus PYL gen. La región CDs se muestra en amarillo, el transcrito ARNm se representa con la línea negra. El sgRNA de PYL8 fue seleccionado en la región 5'UTR (Zhang et al., 2016).....38

Figura 3. 4 Esquema de la estructura del gen OsERF922 y el sitio objetivo (Wang et al., 2016).39

Figura 3. 5 Plásmidos binarios de expresión. (A) Estructura del vector binario basado en el esqueleto pCAMBIA 1300. El gen de Higromicina (HPT II) de selección para planta. Contiene el promotor OsU3 y Scaffold necesarios para la transcripción de la guía de RNA. El gen Cas9 es

impulsado por el promotor de Ubiquitina. Plásmido binario pRGE32 requerido como molde para amplificar el promotor OsU3, Scaffold y generar un fragmento de 500 pb (Xie et al., 2013). (B) Estructura del vector binario basado en el esqueleto pCAMBIA1300. El NTP II codifica para la neomicina fosfotransferasa II (nptII). El gen de Cas9p impulsado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Dos sitios de restricción, Spe I/ Asc I, fueron proporcionados para entrar múltiples cassettes sgRNAs (Ma et al., 2015).....41

Figura 3. 6 Estrategia de ensamble. (A) esquema general de rondas de PCR para amplificar y obtener los cassettes 1 y 2 (fragmentos de 500 pb). (B) esquema general de ensamble de cassettes 1 y 2 en el plásmido pDK-SA.42

Figura 3. 7 Relación filogenética de la base de datos NACs analizada en este estudio. El análisis se basó en alineaciones de las secuencias NAC de longitud completa. A) árbol filogenético. B) amplificación del clado donde se agrupan las tres secuencias con alta identidad al SoNAP (identificado con una estrella), referencia anexo A.....46

Figura 3. 8 Estructura del gen SoNAP.....47

Figura 3. 9 Estrategia para la mutagénesis del gen SoNAP y su corroboración guía 1. A) Representación esquemática del gen SoNAP de Caña de azúcar *Saccharum officinarum* y el sitio objetivo sgRNA1, el sgRNA1 se dirige a los nucleótidos 608 – 628, el sitio PAM se indica con fuente roja. B) Mapa del plásmido de edición para la caña de azúcar. El sgRNA1 se expresa bajo el promotor OsU3 de arroz, pCas9 está bajo el control transcripcional del promotor CaMV 35S y el terminador T35S y el nptII está bajo el control transcripcional del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). C) Amplificación de los fragmentos de 500 pb (Promotor OsU3: guía1:Scaffold) en los carriles 3 y 7, 400 pb (OsU3:Guía) en los carriles 4 y 8, 100 pb (Guía:Scaffold) en los carriles 5 y 9, fragmentos que constituyen el cassette-1, gen NPTII de 794 pb en carril 10, marcador molecular de 1kb en carril 1, amplificaciones realizadas mediante una reacción de PCR donde se utilizó el plásmido pDK-SA ligado con el cassette 1 como plantilla molde.....48

Figura 3. 10 Estrategia para la mutagénesis del gen SoNAP y su corroboración guía 2. A) Representación esquemática del gen SoNAP de Caña de azúcar *Saccharum officinarum* y el sitio objetivo sgRNA2, el sgRNA2 se dirige a los nucleótidos 952 – 972, el sitio PAM se indica con fuente roja. B) Mapa del plásmido de edición para la caña de azúcar. El sgRNA1 se expresa bajo el promotor OsU3 de arroz, pCas9 esta bajo el control transcripcional del promotor CaMV 35S y el terminador T35S y el nptII está bajo el control transcripcional del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). C) Amplificación de los fragmentos de 500 pb (Promotor OsU3:guía1:Scaffold) en los carriles 3 y 7, 400 pb (OsU3:Guía) en los carriles 4 y 8, 100 pb

(Guía:Scaffold) en los carriles 5 y 9, fragmentos que constituyen el cassette-1, gen NPTII de 794 pb en carril 10, marcador molecular de 1kb en carril 1, amplificaciones realizadas mediante una reacción de PCR donde se utilizó el plásmido pDK-SA ligado con el cassette 1 como plantilla molde.....49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1 Factores de transcripción de la familia NAC asociados a la senescencia (Podzimska-Sroka et al., 2015).....	5
Tabla 1. 2 Clasificación taxonómica de la caña de azúcar (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011)..	9
Tabla 1. 3 Cromosomas presentes en especies de <i>Saccharum</i> (Cordeiro et al., 2007)	9
Tabla 1. 4 Comparación de las tecnologías de edición, adaptada de (Liu. &, 2017)	17
Tabla 1. 5 Resumen de los tipos de sistema de CRISPR/Cas, elaboración propia.	18
Tabla 1. 6 Lista de plantas editadas mediante el sistema CRISPR/Cas9. Recopilación de diversos artículos, elaboración propia	20
Tabla 3. 1 Primers empleados para las amplificaciones de fragmentos 500 pb, 400 pb y 100pb.	43
Tabla 3. 2 Primers empleados para amplificar los fragmentos de 400 pb y 100 pb.....	43
Tabla 3. 3 Primers empleados para la amplificación y corroboración de los cassettes insertados en el plásmido pDK-SA.....	44
Tabla 3. 4 Base de datos proteicas NAC, referencia anexo A.....	45
Tabla 3. 5 Secuencias proteicas con identidad a la secuencia proteica SoNAP, referencia anexo A.	45
Tabla 3. 6 Secuencias redundantes, ver anexo A.....	46
Tabla 3. 7 Guías seleccionas.....	47
Tabla 3. 8 Match completo encontrados en la base datos NAC generados por cada guía.....	47

LISTADO DE ABREVIATURAS

SoNAP,	Factor de transcripción de <i>Saccharum officinarum</i>
FT	Factores de transcripción.
sgRNA	Guía única de ARN
CRISPR	Repeticiones palíndromicas cortas Interespaciadas regularmente agrupadas
Cas9	Proteína Cas 9
WT	Tipo salvaje
MTSK	Grupo meristemático transformado en un medio sin kanamicina
MTCK	Grupo meristemático transformado en un medio enriquecido con kanamicina
NAC	Familia de tres grandes grupos de proteínas de acuerdo a su dominio
PAM	Motivo adyacente protoespaciador “NGG, bases nucleotídicas”

RESUMEN

En los últimos años, los factores de transcripción de la familia NAC han sido objeto de diversos estudios donde han demostrado su rol esencial en diversos procesos de desarrollo de la planta. Recientemente se caracterizó un gen NAC perteneciente a caña de azúcar, que codifica para el factor de transcripción denominado SoNAP cuya función se demostró que está relacionada en la respuesta a estrés abiótico y posiblemente en senescencia. Por tanto, este estudio se centró en entender la funcionalidad senescente del gen SoNAP al ser sobreexpresado en tejido meristemático radicular de *Saccharum officinarum*, como resultado se obtuvo un fenotipo amarillado-café a los 10 días, síntomas visibles de senescencia, y sin desarrollo. Además, como parte de continuar dilucidando la funcionalidad del gen, se realizó un primer acercamiento de edición genómica en la región C-terminal del transcrito SoNAP con la finalidad de generar mutaciones; suprimir su función, y con esto determinar su comportamiento en el tejido meristemático.

ABSTRACT

In recent years, transcription factors of the NAC family have been the subject of several studies that have demonstrated their essential role in various processes of plant development. Recently, a NAC gene belonging to sugarcane was characterized, which encodes for the transcription factor called SoNAP whose function was shown to be related to the response to abiotic stress and possibly in senescence. Therefore, this study focused on understanding the senescent functionality of the SoNAP gene when overexpressed in root meristematic tissue of *Saccharum officinarum*, resulting in a yellowish-brown phenotype at 10 days, visible symptoms of senescence, and no development. In addition, as part of further elucidating the functionality of the gene, a first genomic editing approach was performed in the C-terminal region of the SoNAP transcript in order to generate mutations, suppress its function, and thus determine its behavior in the meristematic tissue.

INTRODUCCIÓN

La senescencia se caracteriza por ser una operación masiva de muerte celular programada que se acompaña de un reciclaje activo de los nutrientes liberados de las células moribundas a los tejidos activos en crecimiento u órganos de almacenamiento. Aunque la senescencia de la hoja es un proceso genéticamente controlado, puede ser desencadenado y regulado por diversas señales ambientales (como estrés por sequía, deficiencia de nutrientes, oscuridad, temperatura extrema e infección por patógenos) y hormonas vegetales (como ácido abscísico “ABA”, etileno), ácido jasmónico, ácido salicílico, citoquininas y auxina) (Zhang et al., 2012), sin la percepción de estrés exógeno, la senescencia de las hojas depende principalmente de dos parámetros endógenos: la edad de las hojas y la etapa de desarrollo a nivel de toda la planta (Miao et al., 2004). Durante la senescencia, las células de las hojas experimentan cambios dramáticos de manera coordinada en la estructura, el metabolismo y la expresión génica (Lim et al., 2007). En la expresión génica, diversos genes se activan o desactivan de manera diferencial. Por tanto, los factores de transcripción (TF) a menudo actúan como un interruptor para causar la expresión diferencial de genes al unirse a elementos cis específicos de sus promotores de genes diana, lo que resulta en la activación y / o supresión de los genes diana (Guo et al., 2004). Varios factores de transcripción (TFs) de la familia NAC han sido encontrados y asociados con la senescencia de la hoja, y que pueden además estar involucrados a la par en otros procesos como en las diferentes vías de señalización que controlan las respuestas al estrés (Christiansen et al., 2014; Gregerson et al., 2007; Buchanan-Wollastor., 2005; Guo et al., 2004;).

Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* (modelo favorito para el estudio genético molecular de la senescencia de la hoja) se ha demostrado que diversos genes (AtNAP; ANAC029, ORE1, ORS1, JUB1, VNI2, ANAC016, ATAF1; ANAC002) de la familia NAC tienen un rol funcional significativo en la senescencia de la hoja. De modo que, la sobreexpresión de AtNAP, ORE1, ORS1, ANAC016 y ATAF1 resultó en una senescencia precoz, mientras que bloquear su función resulta en un retraso en el proceso de senescencia (Podzimska-Sroka, 2015). Recientemente se caracterizó el gen SoNAP en *Saccharum officinarum*, este gen codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia de NAC cuya función predicha está posiblemente asociada a la senescencia, de acuerdo al análisis in silico, y cuando es sobreexpresado en una planta modelo heteróloga. Por lo que en este estudio se centró en continuar analizando la función del gen SoNAP cuando se sobreexpresa en tejidos meristemático radicales de *Saccharum officinarum*. Además, se realizó un análisis para la mutación en la región C-terminal del factor de transcripción SoNAP.

Capítulo I. ANTECEDENTES

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Senescencia

La senescencia es definida como la última etapa de un programa de desarrollo, que es un proceso degenerativo, pero ocurre de una manera coordinada temporalmente (Lim et al., 2007; Gan y Amasino, 1997). Como la senescencia es considerada un proceso largo y coordinado, puede dividirse en tres fases: inicio, reorganización y terminación (Figura 1.1) (Breson, et al., 2018). En la fase de inicio ocurre la integración constante entre las señales intrínsecas y ambientales a nivel celular, tisular y orgánico (Tomas, 2013). Además, la fase de inicio es impulsada por señales múltiples y coordinadas por hormonas, azúcares, especies reactivas de oxígeno (ROS) y calcio (Lim et al., 2007). Mientras que, a nivel molecular, diversos factores de transcripción (FT) son activados sucesivamente, lo que los lleva a formar determinados eventos que tienen lugar en el curso de la senescencia. En la fase de reorganización; las células se someten a una reestructuración intensiva, que se caracteriza por la descomposición de macromoléculas, por ejemplo, la clorofila. Sin embargo, la degradación extensa de las macromoléculas puede conducir a la acumulación de productos intermedios y subproductos tóxicos, que deben ser tratados por las células senescentes. Por consiguiente, las catalasas y peroxidasas, juegan un papel importante como enzimas antioxidantes en esta fase, rol crucial en la desintoxicación de compuestos altamente reactivos generados durante los procesos de degradación (Buchanan-Wollaston et al., 2006). La desintoxicación es primordial, tanto el núcleo como las mitocondrias deben permanecer funcionales para mantener el control transcripcional y proporcionar suficiente energía durante todo el proceso. Finalmente, en la fase de terminación las vacuolas colapsan y se rompen, lo que permite la liberación de nucleasas y proteasas en el citoplasma, de este modo es contraído y acidificado. Esto conduce la degradación gradual del citoplasma, orgánulos, la fragmentación del ADN nuclear y el deterioro de las membranas (Kuriyama and Fukuda, 2002). Así la muerte celular se inicia, lo que conduce progresivamente a una pérdida irreversible de la integridad celular (Woo et al., 2018; Breson et al., 2018).

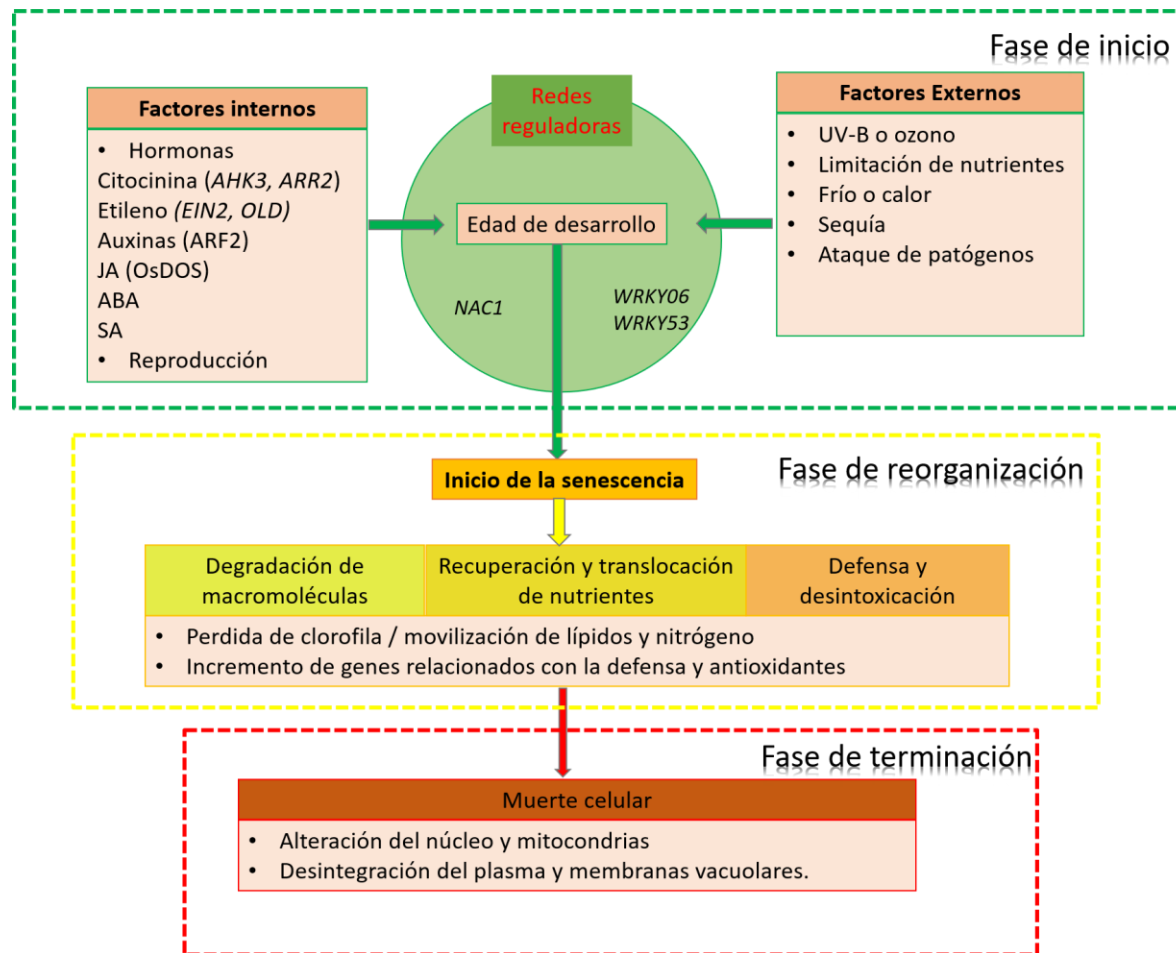


Figura 1. 1 Modelo para las vías reguladoras en la senescencia de la hoja, adaptada de Lim et al., (2007).

Por otro lado, múltiples rutas que responden a varios factores están posiblemente interconectadas (Figura 1.1, fase de inicio) para formar las redes regulatorias de senescencia (Lim et al., 2007). Uno de los mayores avances en el entendimiento de las rutas y mecanismos regulatorios de la senescencia de la hoja, es la identificación de los diversos factores de transcripción que juegan un rol crítico en este proceso. Kim et al. (2018) remarcan que la activación y/o desactivación dinámica de los factores de transcripción son una clave para los mecanismos que controlan los cambios transcripcionales en todo el genoma mediante la integración continua de señales ambientales y de desarrollo (Woo et al. 2018). Por ende, existe un interés particular en la identificación de genes reguladores que codifican factores de transcripción y componentes de señalización que podrían ser responsables de desencadenar la senescencia.

1.1.2 Los Factores de Transcripción.

Los factores de transcripción son proteínas capaces de unirse específicamente a secuencias cortas de ADN localizadas en las regiones promotoras de genes, y de interactuar con el complejo de pre-iniciación de la transcripción para inducir o inhibir la actividad de la enzima ARN polimerasa II (Figura 1.2). La estructura proteica de un factor de transcripción típico consiste en dos dominios: el dominio unión al ADN, el cual es el responsable de unirse a elementos específicos que actúan en *cis* en las regiones del promotor, y el dominio regulatorio responsable de la regulación transcripcional de los genes blanco, el cual se une a la maquinaria de transcripción (García-Morales *et al.*, 2013). De esta manera, los factores de transcripción modulan (activan/reprimen) la tasa de transcripción de sus genes blanco a través de un sistema denominado regulón y con esto regulan la expresión génica.

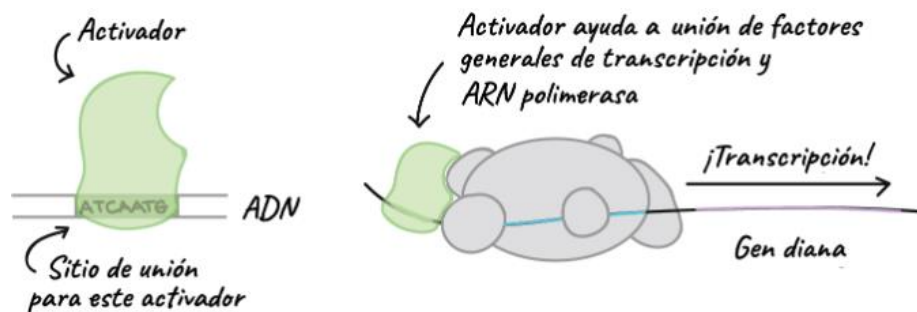


Figura 1. 2 Proceso de transcripción. Recuperado de <https://es.khanacademy.org/>

1.1.3 Factores de Transcripción de la familia NAC

La familia *NAC* contempla tres grupos de proteínas (las cuales se toma la primera letra de cada una para formar la sigla *NAC*): NAM (*No apical Meristem*), ATAF 1-2 (*Arabidopsis transcription activation factor*) y CUC2 (*Cup-shaped cotyledon*); se han caracterizado por mantener dominios conservados en la región N-Terminal (aproximadamente de 150 aminoácidos) para la adhesión al ADN y esta región se ha dividido en 5 subdominios (A-E) Figura 1.3 (Ooka, 2003), mientras que su variabilidad de aminoácidos en la región C-Terminal (región no conservada en las plantas) sirve para generar las diversas redes de interacción proteína – proteína y de este modo generar nuevas propiedades emergentes de las células (Olsen, 2005).

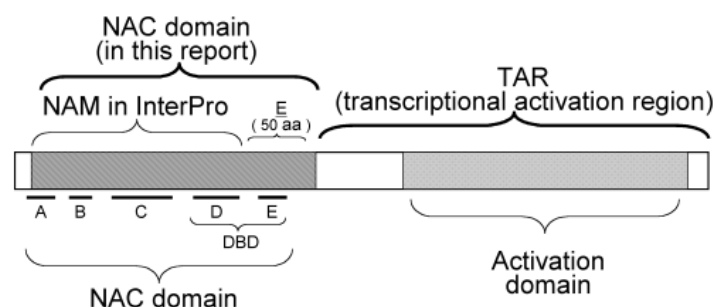


Figura 1. 3 Esquema general de un factor de transcripción NAC. La región de unión al DNA está contenida en los subdominios D y E. La región TAR se encuentra en el extremo C-Terminal (Ooka, 2003).

Se ha encontrado que los FT NAC participan en varios procesos que incluyen el desarrollo de flores, formación de paredes secundarias y división celular, formación de meristemos apicales de brotes, senescencia de hojas, en respuesta al estrés biótico y abiótico (Banerjee y Roychoudhury, 2015; Nuruzzaman et al., 2013; Nakashima et al., 2012; Tran et al., 2010; Olsen et al., 2005). Hasta la fecha, se han identificado una gran cantidad de FT NAC putativos en diversas especies, 117 en *Arabidopsis* y 151 en arroz (Nuruzzaman et al., 2010), 152 en soja (Le et al., 2011), 204 en col china (Liu TK et al., 2014), 152 en maíz (Shiriga et al., 2014), tomate (Su et al., 2015), 30 en caña de azúcar (Pereira et al., 2017).

Por consiguiente, los estudios transcriptómicos realizados han revelado un gran número de genes de la familia NAC relacionados con el proceso de senescencia (Pereira-Santana et al., 2017; Gregersen et al., 2007; Buchanan-Wollaston et al., 2005; Guo et al., 2004). Hasta ahora se ha demostrado un papel funcional significativo en la senescencia de la hoja de varios factores de transcripción de la familia NAC (tabla 1.1).

Tabla 1. 1 Factores de transcripción de la familia NAC asociados a la senescencia (Podzimská-Sroka et al., 2015).

GEN	DESCRIPCIÓN
ATNAP; ANAC029	La expresión de este gen está estrechamente asociada con el proceso de senescencia de las hojas en roseta de <i>Arabidopsis</i> .
ORE1; ANAC092; ATNAC2	Regula positivamente la muerte celular inducida por el envejecimiento en las hojas de <i>Arabidopsis</i> .

ORS1; ANAC059	La sobreexpresión de ORS1 acelera la senescencia en plantas transgénicas, mientras que su inhibición lo retrasa.
VNI2; ANAC083	Los patrones de expresión espacial y temporal del gen VNI2 están correlacionados con el envejecimiento y la senescencia de las hojas. En consecuencia, el envejecimiento de las hojas se retrasó en las plantas transgénicas que sobre expresaban el gen VNI2, pero se aceleró significativamente en un mutante deficiente en VNI2.
JUB1; ANAC042	Regula negativamente la senescencia. La sobreexpresión de JUB1 prolonga notablemente la longevidad de las hojas y promueve la tolerancia a diversos estreses abióticos.
ANAC016	TF asociado a senescencia previamente no caracterizado en <i>Arabidopsis thaliana</i> , promueve la senescencia. Las hojas de los mutantes nac016 permanecieron verdes en condiciones inductoras de la senescencia, y las hojas de las plantas que sobreexpresan NAC016 (NAC016 -OX) envejecieron temprano.
ATAF1; ANAC002	Identificaron ATAF1 como un nuevo regulador positivo de la senescencia en <i>Arabidopsis</i> . Demostramos que ATAF1 regula la senescencia activando la expresión del regulador positivo de senescencia ORE1 y reprimiendo la expresión del mantenimiento del cloroplasto TF GLK1.

Así, por ejemplo, la sobreexpresión de ORE1, ORS1, ANAC016 y ATAF1 dieron como resultado una senescencia precoz, mientras que el bloqueo de la función de estos genes retrasó la senescencia, lo que sugiere que funcionan como reguladores positivos no redundantes de la senescencia en *Arabidopsis*.

De este modo, Guo *et al.*, 2006 reportaron el análisis funcional de AtNAP, gen que codifica para la familia de factores de transcripción NAC y relacionado con la senescencia. Como resultados mostraron que el AtNAP se localizaba en el núcleo celular y que al ser sobreexpresado causaba senescencia precoz y, por el contrario, al mutarlo, la senescencia foliar se retrasaba significativamente caracterizada por una pérdida retrasada en el contenido de clorofila, esto sugirió que el AtNAP es un regulador positivo a la senescencia. Además, realizaron una alineación de la secuencia de aminoácidos del AtNAP contra secuencias NACs de diferentes especies de plantas, de las cuales identificaron que el gen PvNAP (de la habichuela dicotiledónea) y al OsNAP (del arroz) presentaban una identidad significativa del 66% y 70%, respectivamente, hipotetizan que estos dos genes son ortólogos funcionales del AtNAP, ya que comparten patrones de expresión específicos de hojas senescentes. Estos datos los llevaron a inferir que el AtNAP y sus homólogos juegan un rol importante en la senescencia de la hoja en *Arabidopsis* y posiblemente en otras especies de plantas.

1.1.4 SoNAP

En estudios previos, Pereira-Santana et al., (2017) obtuvieron el perfil transcriptómico de hojas y raíces de caña de azúcar bajo estrés osmótico progresivo para entender los mecanismos moleculares y su expresión génica. Del perfil, identificaron 30 FT NAC como altamente expresados bajo la condición anteriormente mencionada; y de acuerdo al Heatmap, el transcrito con la denotación DN49045 mostro una notable regulación positiva en los tejidos de hoja y raíces en todos los puntos temporales de las condiciones de estrés, de manera que este gen se muestra como candidato a estudios posteriores. Así, Carrillo-Bermejo et al., (2020) realizó el primer reporte de la caracterización del transcrito DN49050, denominado como gen SoNAP de *Saccharum officinarum* var MEX-69290. Como resultados, la expresión del gen SoNAP se encontró involucrada en respuesta por tratamientos osmótico y salino (Figura 1.4). La localización subcelular de la proteína fue encontrada en el núcleo celular.

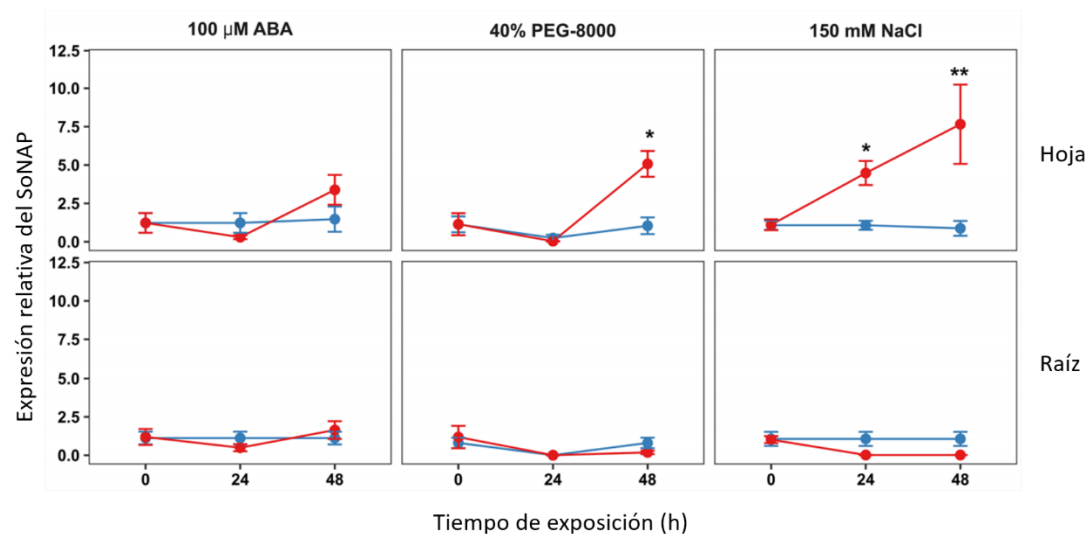


Figura 1. 4 Expresión relativa del gen SoNAP en hojas y raíces de caña de azúcar bajo diferente estrés abiótico (Carrillo-Bermejo, 2020).

Por otro lado, los análisis in silico de ortología y filogenia del gen SoNAP, mostraron que su secuencia estaba agrupada en el clado V (clado caracterizado en previos estudios basados en los patrones de agrupamiento con diversos FT NAC involucrados con diferentes funciones relacionadas con el estrés) junto a las secuencias de AtNAP y OsNAP (genes relacionados con la senescencia, perteneciente a *Arabidopsis* y arroz, respectivamente). Además, se comparó la secuencias de aminoácidos del gen SoNAP contra secuencias de aminoácidos NAC agrupadas en el clado V, y se encontró que la región C-terminal del gen SoNAP no mostro homología de

secuencia con las proteínas NAC del clado V. Subsecuentemente realizaron una expresión ectópica del gen SoNAP en callos de tabaco mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* para observar su funcionalidad del gen en un tejido diferenciado, como resultado obtuvieron un fenotipo amarillento acelerado a los 7 días de transformación, lo cual les llevo a inferir que este factor de transcripción NAC podría estar involucrado en el proceso de senescencia, sin embargo aún quedan estudios por demostrar dicha función (figura 1.5).

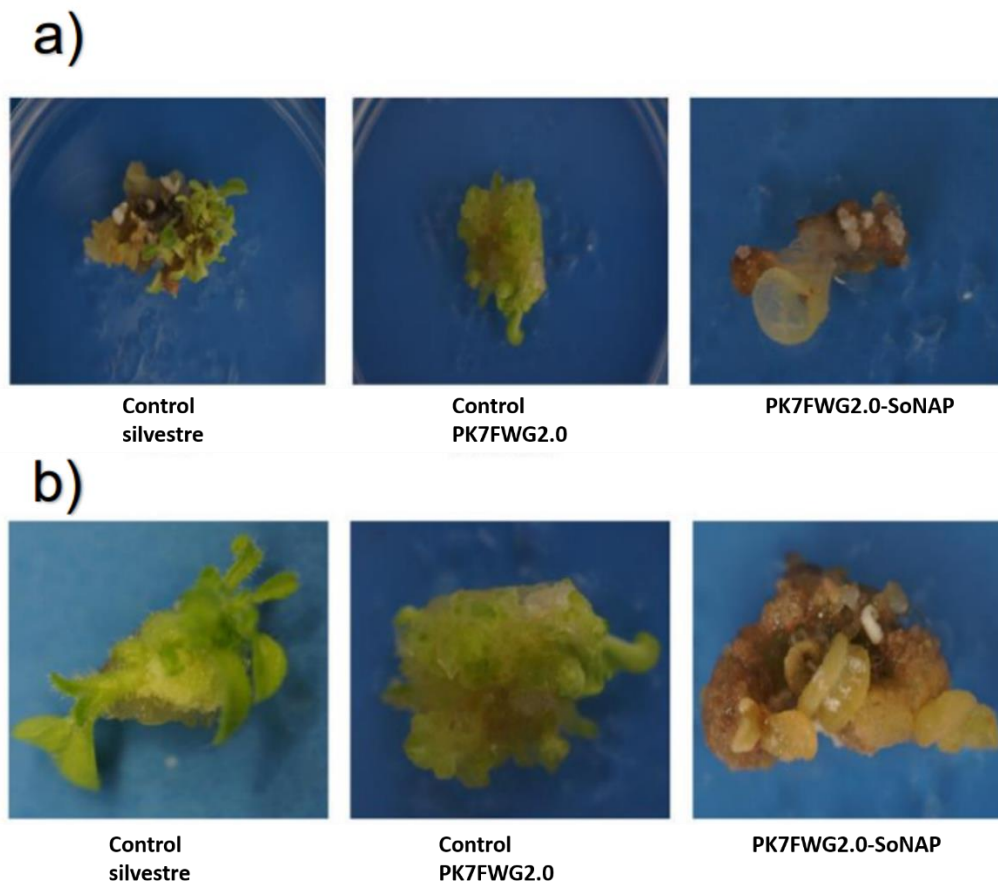


Figura 1. 5 Callos de tabaco transformados con la sobre expresante del SONAP. A) En un medio de cultivo con kanamicina y B) en un medio sin kanamicina, adaptada de (Carrillo-Bermejo, 2020)

1.1.3 Modelo biológico: *Saccharum officinarum*

La caña de azúcar es el término usado para referirse a un grupo de especies de hierbas y/o pastos perennes que crecen de 2 a 6 metros de altura, se cultivan en lugares tropicales y subtropicales, domesticadas especialmente para la producción de azúcar. La caña de azúcar es

un miembro de la familia de las gramíneas, Poaceae, así como de la tribu del maíz y sorgo. Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1. 2 Clasificación taxonómica de la caña de azúcar (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011)

Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Panicoideae
Tribu	Andropogoneae
Subtribu	Saccharinae
Genero	<i>Saccharum</i>
Especies	<i>officinarum, spontaneum, sinense, barberi, robustum, edule</i>

Las especies del género *Saccharum* poseen un número variable de cromosomas, de 40 a 140 (Tabla 1.3), lo que les confiere niveles altos de poliploidía.

Tabla 1. 3 Cromosomas presentes en especies de *Saccharum* (Cordeiro et al., 2007)

Especie	Número de Cromosomas (2n)
<i>S. barberi</i>	111 - 120
<i>S. edule</i>	60 - 80
<i>S. officinarum</i>	80
<i>S. Robustum</i>	60 - 80
<i>S. sinense</i>	80 – 140
<i>S. spontaneum</i>	40 - 128

A *S. officinarum* L. se le conoce generalmente como la caña noble porque es robusta y produce abundante jugo dulce. Los tallos son gruesos (normalmente de más de 3-5 cm de diámetro) y blandos, debido al bajo contenido de fibra. *S. officinarum* es cultivada por su habilidad de acumular sacarosa en los tallos. Es, muy exigente en condiciones climáticas específicas, requiere de una alta fertilidad del suelo y suministro de agua. Las accesiones de *S. officinarum* son generalmente susceptibles a enfermedades como el mosaico, la gummosis, el chamuscado de las hojas, la pudrición de la raíz y la enfermedad de Fiji (Salgado et al., 2003).

1.1.1.1 Importancia Económica

La caña de azúcar es un producto comercial y se produce en casi 100 países en un área de 23.8 millones de hectáreas (FAOSTAT 2019), que es aproximadamente el 1.5% del área total de tierras de cultivo mundiales. El tallo de la caña de azúcar es considerado un “fruto agrícola”, debido a que en la planta se produce y almacena el azúcar. Su uso principal es para solventar la producción de azúcar requerida a nivel mundial, aunque también se puede convertir en materia prima para la fabricación de papel, cemento, abonos y alimento animal. Los jugos que se obtienen en el proceso de producción se emplean además en la producción de alcohol. Históricamente la producción de azúcar era en India, en donde se practicaba el triturado y hervido del jugo de caña de azúcar (Gopal, 1964), sin embargo, Brasil con 746 millones de toneladas métricas, es el productor más grande de caña de azúcar, seguido por India (376 MT), China (108 MT), Tailandia (104 MT), Pakistán (67 MT) y México (56 MT). Hasta la fecha, la producción de caña de azúcar en peso excede la de cualquiera de los cultivos alimentarios como el trigo, el arroz o el maíz (FAOSTAT, 2019). Por ende, México tiene el puesto número 6 en la región de América Latina, con una producción promedio de 56, 841,523 toneladas año (FAOSTAT 2019; figura 1.6). Se cultiva en 16 entidades de la república donde Veracruz se destaca como el número 1 de producción con un estimado de 20, 786, 411 toneladas/año, según datos recabados por SIAP en el cierre del ciclo 2018 donde se cosecharon 840 mil hectáreas.

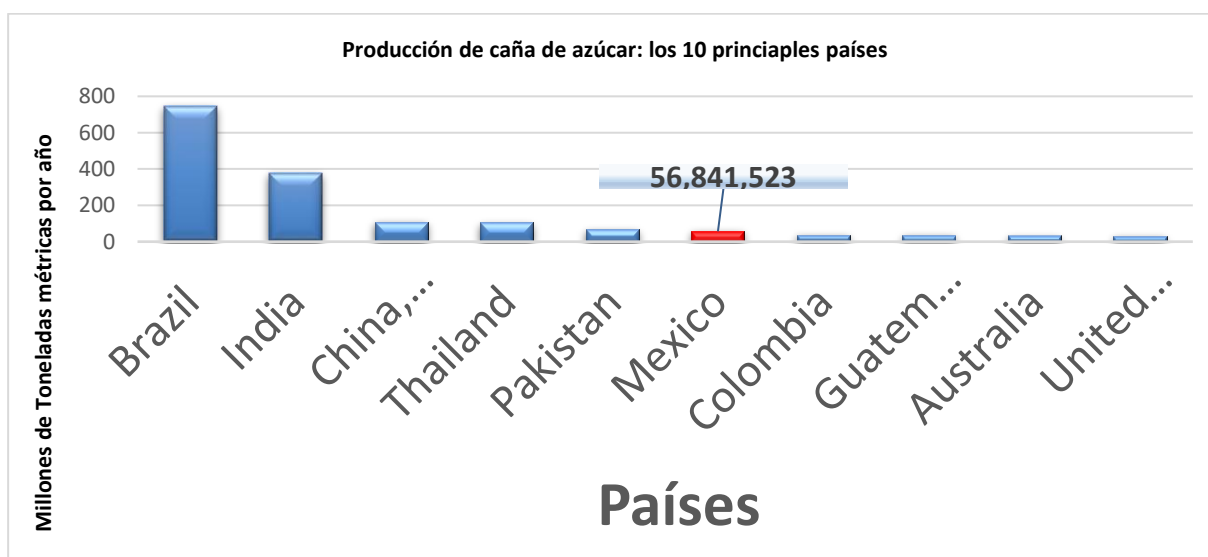


Figura 1. 6 Principales productores de caña de azúcar a nivel mundial (FAOSTAT, 2019)

Además, la caña se posiciona en el primer lugar entre los principales productos agrícolas generados en México (figura 1.7)

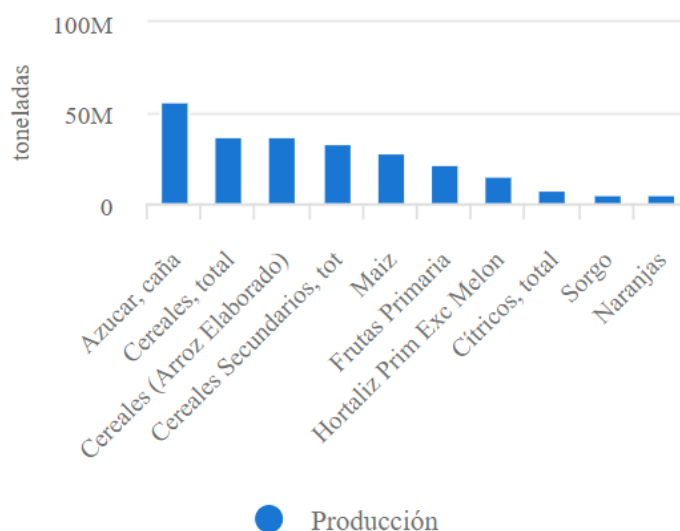


Figura 1. 7 principales productos agrícolas generados en México (FAOSTAT, 2019)

1.1.1.2 La complejidad en un genoma poliploide.

A pesar de que la caña de azúcar es el mayor acumulador de sacarosa, el cultivo no ha sido estudiado a detalle, principalmente por poseer un genoma con una naturaleza poliploide y heterocigota (Thirugnanasambandam, 2018). En consecuencia, el genoma de la caña de azúcar es un punto focal que contiene las respuestas a muchos aspectos intrigantes de esta especie. La genética de la caña de azúcar es una de las más complejas que existe en el reino de las plantas. En recientes años, la genómica de la caña de azúcar se ha mejorado, aunque aún no en la medida en que han sido logrado otros cultivos, como los cereales. El entendimiento de aspectos evolutivos y de la estructura de su genoma ha mejorado gracias al uso de recursos tecnológicos significantes, como son los mapas genéticos, colecciones de gran escala de EST (etiquetas de secuencia expresada), transcriptomas, librería de cromosomas bacterianos artificiales (BAC) y secuenciación por shotgun (Souza *et al*, 2011). El sorgo ha sido ampliamente aceptado como una referencia diploide cercana (Grivet and Arruda, 2002), debido a que ambos divergieron de un ancestro común hace aproximadamente de 5 a 8 millones de años, con un 85% de similitud entre los ortólogos (Wang *et al*, 2010), sin embargo, aún no se han podido descifrar por completo los genomas –nuclear, de cloroplasto y mitocondrial, de la caña de azúcar (Thirugnanasambandam *et al.*, 2018).

El genoma nuclear moderno de la caña de azúcar (*Saccharum spp. hybrids*) está compuesto de sub-genomas originalmente de dos genomas, de *S. officinarum* una hembra de tallo delgado y con un alto contenido de azúcar, y *S. spontaneum* –un macho de tallo delgado, con bajo contenido de azúcar. *S. officinarum* es una especie octaploide, la cual tiene un número básico de cromosomas (x) de 10, un genoma monoploide básico de ~1 Gb, y un número total de cromosomas ($2n$) de 80 (D'Hont *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2012). Esto da como resultado un tamaño total del genoma de aproximadamente ~ 7.88 Gb para esta especie (Zhang *et al.*, 2012). El genoma es autoploiploide, lo cual significa que hay más de 8 copias homologas de cada gen en el genoma de *S. officinarum* (Figura 1.8) (Thirugnanasambandam *et al.*, 2018).

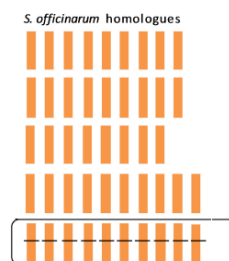


Figura 1. 8 Cromosomas homólogos de *Saccharum officinarum*, adaptado de (Thirugnanasambandam *et al.*, 2018)

Por otro lado, *S. spontaneum*, tiene un número básico de cromosomas de 8, un genoma básico monoploide de tamaño de 750-843 Mb, sus niveles de ploidía varían (autoploiploide) con un total de cromosomas en el rango de 40 a 128 y un genoma reportado de 3.36 a 12.64 Gb.

Finalmente, estas cualidades de (-información genómica-) que posee la caña de azúcar permiten introducir grandes retos en la biología computacional. De este modo, los diversos consorcios de secuenciación hacen suponer que el genoma de caña de azúcar, se perfila como uno de los más grandes ensamblajes de Novo a obtener, debido a: I) porcentaje de poliploidía, donde el 80% es heredado de *S. officinarum* y un 10% de *S. spp.*, II) presenta nivel altos de recombinación, constituye el 10% restante del genoma el cual es derivado de ambas especie progenitoras, III) heterocigocidad; es decir, conduce a diversos grados de incertidumbre durante el ensamblaje del genoma (Mohan, 2016).

A pesar de la complejidad del genoma de esta especie, Garsmeur *et al.*, (2018) realizaron una primera secuenciación y ensamblaje del genoma la caña de azúcar para el cultivar R570 basado en BAC. Predijeron un total 25,316 modelos de genes que codifican proteínas, el 17% de los

cuales no muestran colinealidad con sus ortólogos de sorgo. Por otro lado, Zhang et al (2018), secuenciaron una variedad de caña de azúcar *Saccharum spontaneum* haploide, AP85-441, facilitaron el ensamblaje de 32 pseudocromosomas que comprenden 8 grupos homólogos de 4 miembros cada uno, que llevan 35,525 genes con alelos definidos.

1.1.5 Desarrollos biotecnológicos en caña de azúcar

Como se ha mencionado anteriormente, el genoma de la caña de azúcar esta entre los más complejos de las plantas y de los cultivos comerciales. Esta complejidad dificulta la comprensión genética de la caña de azúcar y la capacidad para mejorar el cultivo utilizando herramientas biotecnológicas. Una serie de estudios describen parte de su complejidad y establecen el nivel de poliploidía de las especies, mientras revela la coexistencia de distintas organizaciones de genomas en las variedades modernas de la caña de azúcar (D'Hont *et al.*, 1998; Ha S *et al.*, 1999, Mohan *et al.*, 2016, Thirugnanasambandam *et al.*, 2018).

Los métodos de transformación genética en caña de azúcar fueron reportados desde hace décadas. Los primeros experimentos genéticos en caña de azúcar fueron realizados en los 80s (Chen *et al.*, 1987) cuando introdujeron un gen de resistencia a kanamicina dentro de protoplastos a través de transformación por electroporación y polietilenglicol. Posteriormente en los años 90s (Bower y Birch, 1992) transformaron plantas a través del bombardeo con partículas (biobalística) en callos embriogénicos. Sun *et al.*, (1993) obtuvieron plantas resistentes al herbicida glufosinato de amonio a través de la biobalística empleando el gen *bar*, el cual codifica una fosfinotricina acetiltransferasa. Gambley *et al.*, (1994) bombardearon tejidos del meristemo con microproyectiles y regeneraron plantas que expresaban el gen luciferasa. Later y Arencibia (1995) reportaron un procedimiento para la transformación estable de tejido meristemáticos usando electroporación. Gallo-Meagher e Irvine (1996) describieron el desarrollo de plantas transformadas mediante biobalística, cultivo comercial NC0 310 conteniendo el gen *bar* (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011).

Actualmente, diversos estudios han demostrado que la transformación mediante *Agrobacterium* y el bombardeo de partículas en caña de azúcar han proporcionado la suficiente eficiencia para producir variedades comerciales. Además, varios genes de interés comercial han sido introducidos dentro de la caña de azúcar mediante transformación genética, confiriéndole tolerancia a herbicidas, resistencia a enfermedades y plagas, tolerancia a sequía, incremento de sacarosa, y mejoras en la calidad y color de la azúcar (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011).

1.1.6 Mejoramientos genéticos en caña de azúcar.

Zhang *et al.*, (2006) reportaron la sobreexpresión del gen TSase (Grifola frondosa trehalosa sintasa) bajo el promotor 2 x CaM35S el cual es transferido a la caña de azúcar mediante la transformación de *A. tumefaciens* EHA105, para mejorar la tolerancia a sequía (*S. officinarum* L). El gen TSase codifica una enzima involucrada en la producción de trehalosa, un disacárido no reductor de glucosa que funciona como un protector en la estabilización de las estructuras biológicas y mejora la tolerancia a estrés en organismos. Las plantas transformadas acumulaban niveles altos de trehalosa, lo cual incrementaba la tolerancia a sequía.

Se ha reportado que el factor de transcripción DREB2A interactúa con una secuencia DRE de acción *cis* para activar la expresión de genes ubicados posteriormente que están involucrados en la respuesta por sequía, sal y calor en *A. thaliana*. Reis *et al.*, (2014) evaluaron los efectos de la sobreexpresión inducible de AtDREB2A por estrés en caña de azúcar. Los resultados les indicaron que la expresión de dicho gen en caña de azúcar mejoró su tolerancia a sequía, ya que las plantas transgénicas mantuvieron los niveles relativos de agua, el contenido de sacarosa, el contenido relativo de agua y mejoraron la brotación de yemas.

Jung y Altpeter *et al.*, (2016) apuntaron con TALEN a una región altamente conservada de múltiples genes del ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT), gen relacionado a la biosíntesis de lignina. El nivel de reducción en el contenido de lignina entre las líneas de caña de azúcar regeneradas se correlacionó positivamente con la frecuencia de eliminación del gen COMT en cada planta. De hecho, las plantas que mostraron los niveles más altos de eliminación genética (99%), presentaron una disminución en los niveles de lignina entre un 29% a 32% menos que las plantas progenitoras.

1.1.7 Tecnologías actuales de edición genética.

Las tecnologías de edición de genomas comprenden tres sistemas primarios SSN, las nucleasas dedos de zinc (ZFNs), las nucleasas efectoras como activadoras de la transcripción (TALENs) y las repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas CRISPR asociadas a una proteína Cas9. Las ZFNs fueron las primeras en emplearse para editar genomas de plantas, sin embargo, era difícil diseñarlas y construirlas para las aplicaciones en varios organismos. También sufrían de imprecisas secuencias de reconocimiento del DNA y tenían un elevado costo. Posteriormente surgió una herramienta prometedora; TALENs derivada de las bacterias *Xantomas*, fueron desarrolladas y usadas para la edición de genoma. La complicada

característica de repetición en tándem en los dominios de unión al ADN de la proteína TALEN hace que la construcción sea tediosa y complicada. Finalmente, el sistema CRISPR/Cas9 es la nueva herramienta de edición del genoma que ha emergido poco después de que el sistema TALEN fuera desarrollado (Ma D *et al.*, 2015).

1.1.7.1 ZFNs

Las ZNFs fueron las primeras nucleasas específicas de secuencia diseñadas para reconocer y escindir sitios cromosómicos. La unión del ADN por ZFN se logra a través de matrices de dedos de zinc (ZF), cada uno de los cuales reconoce típicamente tres nucleótidos. Los ZFN, que comprenden tres o cuatro ZF, funcionan en pares, por lo que se reconoce un total de 18-24 pb en un sitio objetivo dado, una secuencia de longitud suficiente para ser única en la mayoría de los genes eucariotas superiores. Las matrices de ZF se fusionan con el dominio catalítico de una enzima de restricción de tipo II, FokI, que funciona como un dímero, por lo que la unión de los dos ZFN al objetivo acerca los monómeros de FokI para que pueda interactuar e introducir al objetivo la ruptura de la doble hebra (Double Strand Break o DSB) (figura 1.9) (Voytas, 2013).



Figura 1. 9 Dos nucleasas dedos de Zin (ZNF) unidas a un sitio específico (Voytas, 2013)

1.1.7.2 TALENs

El dominio de unión al ADN de TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) se deriva de proteínas producidas por patógenos bacterianos de plantas del género *Xanthomonas*. Durante la infección, las *Xanthomonas* administran efectores similares a los activadores de la transcripción (TAL) a la célula vegetal que se unen a promotores específicos de genes de plantas y activan la expresión. Esto a su vez, conduce a un aumento de la virulencia del patógeno. La unión al ADN por los efectores TAL se lleva a cabo por el dominio central de la proteína, que comprenden una base única, y hay una correspondencia uno a uno entre las repeticiones en la proteína y las bases en el ADN al que se unen. La secuencia de aminoácidos de cada repetición

está altamente conservada, con la excepción de los denominados di-residuos variables repetidos (RVD) en las posiciones de aminoácidos 12 y 13. Cada repetición de 34 aminoácidos se pliega en una estructura de horquilla en que los RVD se colocan en la punta. El duodécimo aminoácido alcanza la espalda para estabilizar la horquilla, mientras que el decimotercer aminoácido establece un contacto de base específica en el surco principal del ADN (figura 1.10) (Voytas, 2013).

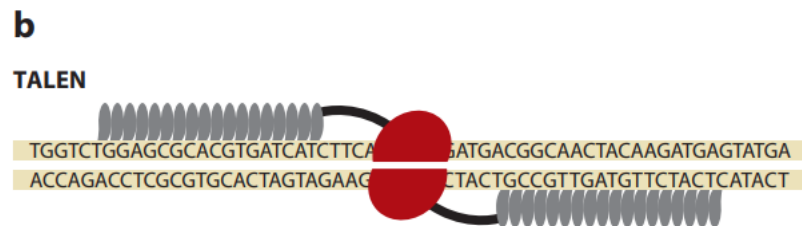


Figura 1. 10 TALEN unidas a su sitio objetivo (Voytas, 2013).

1.1.7.3 CRISPR/Cas

Este sistema existe en procariontes para mediar la respuesta de defensa “inmune adaptativo” bacteriana contra los virus o ácidos nucleicos invasores. Brouns *et al.*, 2008 encontró que el RNA CRISPR maduro (crRNA) trabaja con proteínas Cas provenientes de las mismas procariontes confiriendo defensa antiviral para interferir la proliferación de los virus. En el 2012, Jinek *et al* mostraron que la estructura dual-RNA formada por crRNA y transactivación crRNA (tracrRNA) es suficiente para dirigir a la proteína del tipo II Cas (spCas) de *Streptococcus pyogenes*, para escindir una secuencia objetivo del DNA *in vitro*. La escisión del DNA *in vitro* por spCas9 y el dual-RNAs revela el potencial de este sistema para la edición de genomas. Debido a esto, la herramienta de edición guiada por RNA para los genomas de mamíferos fue establecido usando un diseño de sistema CRISPR bacteriano del tipo II en el 2013. En el sistema CRISPR/Cas, el crRNA-tracrRNA, también denominado como la guía de RNA (gRNA), reconoce los sitios objetivo en el genoma, y entonces recluta a la proteína Cas9 para precisar la escisión en un locus genómico endógeno específico. Para la construcción de la guía que se enviará al sistema biológico, la síntesis del gRNA compuesta de un crRNA específico de 20 bp y un tracrRNA universal, pueden transcribirse por un promotor de U6 polimerasa III *in vivo* o por una ARN polimerasa, tal como T7 RNA polimerasa, *in vitro*. La región más importante para la selección del sitio objetivo para un sistema CRISPR/Cas es la secuencia motivo adyacente protoespaciadora (PAM), NGG, la cual media la estimulación de la actividad de nucleasa Cas9 (Ma D *et al.*, 2015).

La siguiente tabla 1.4 resume la comparación de las diversas tecnologías de edición de genomas.

Tabla 1. 4 Comparación de las tecnologías de edición, adaptada de (Liu. &, 2017)

TECNOLOGÍA	DETERMINANTE DE UNIÓN AL ADN	ENDONUCLEASA	TASA DE MUTACIÓN	LONGITUD DEL SITIO DE UNIÓN (PB)	ESPECIFICIDAD DE ENLACE	OFF TARGETING	APLICACIONES
ZFN	Proteína "Zinc finger"	FokI	10	18-36	3 nucleótidos	Alta	Células de humano, cerdo, ratón, tabaco, nematodos y pez cebra
TALEN	Efactor similar a un activador de la transcripción	FokI	20	30-40	1 nucleótido	Baja	Células de humano, pulga de agua, vacas y ratón
CRISPR/CAS9	crRNA/sgRNA	Cas9	20	22	1:1 Emparejamiento de nucleótidos	Variable	Células de humano, trigo, tabaco, banana, arroz, Arabidopsis, etc.

1.1.8 Sistema CRISPR

CRISPR es un acrónimo que significa "*cluster regulary interspace short palindromic reapep*", significando "repeticiones palíndromicas cortas interespaciadas regularmente agrupadas", este término fue conferido por Mojica *et al.*, 2012 con la finalidad de evitar nomenclatura confusa. En sí, es un sistema que recopila y almacena fragmentos de material genético invasor, lo que le confiere memoria molecular transmisible, estos fragmentos se transcriben en forma de crRNAs, y son estos los que actuarán como guía de una enzima conocida como endonucleasa Cas de la célula hospedera, la cual posteriormente funcionará en la neutralización de procesos infectivos, degradando el ARN o ADN foráneo (Mojica, 2000).

La tecnología de edición CRISPR/Cas9, como sistema contempla los siguientes elementos:

- Proteína Cas
- Un fragmento crRNA (protoespaciador) y Un fragmento TracrRNA (scaffold) (sgRNA)
- Sitio de reconocimiento PAM (Motivo adyacente espaciador)

El sistema CRISPR se encuentra clasificado en 2 clases, 5 tipos y 16 subtipos, según el criterio basado en la arquitectura de sus componentes y sus mecanismos de acción. El sistema CRISPR del tipo I y III, involucra todos aquellos sistemas que requieren de un gran complejo de proteínas efectoras guiado por ARN para llevar a cabo la escisión del DNA o RNA foráneo. El sistema CRISPR del tipo II, comúnmente la más empleada, precisa de una única proteína "endonucleasa

efectora”, que guiada por un ARN lleva a cabo la neutralización del genoma invasivo, como es el caso de Cas9 y Cpf1 (Makarova, 2011; Kirchner, 2015) tabla 1.5.

Tabla 1. 5 Resumen de los tipos de sistema de CRISPR/Cas, elaboración propia.

Sistema CRISPR/Cas9	Descripción	Ejemplo
TIPO I Y III	Emplean un complejo de proteínas-Cas para el reconocimiento y escisión.	Sistema CRISPR/Cas1 de <i>S. epidermis</i>
TIPO II	Solo emplea una proteína Cas para el reconocimiento y escisión.	Sistema CRISPR/Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>

1.1.8.1 Proteína Cas9

Todas las proteínas Cas9 tienen una estructura con dos dominios conservados (lóbulos): un dominio de nucleasa HNH y un dominio de nucleasa RuvC. Los dos lóbulos están conectados por un puente de hélice y son responsables de la escisión del DNA objetivo. El dominio nucleasa HNH de Cas9 escinde la hebra complementaria, mientras que el dominio nucleasa RuvC de Cas9 escinde la hebra no complementaria, como consecuencia, entre ambos dominios se da lugar a un DBS. La escisión que se lleva a cabo por estos dos dominios lo realizan tres nucleótidos rio arriba del sitio PAM, (Figura 1.11) (Shan, 2014)

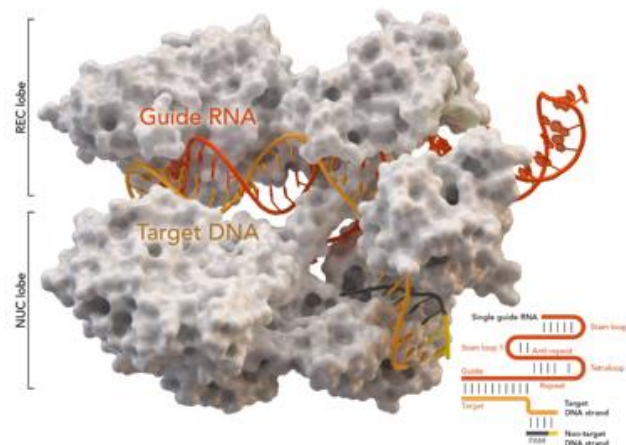


Figura 1. 11 Representación esquemática de Cas9 (Ma, 2016).

1.1.8.2 *sgRNA*

Una de las funciones del sgRNA es interactuar con la estructura secundaria de la proteína Cas9 en vivo. El sgRNA está compuesto de un derivado de crRNA y un tracrRNA de secuencias conectadas por un tetraloop artificial. La secuencia crRNA consiste de una guía de (20 nt, también llamado espaciador), y una región repetida de 12 nt, mientras que la secuencia de tracrRNA consiste de una región anti-repetidas de 14nt y tres tracrRNA bucles de tallo (stem loop) (Figura 1.12). Las regiones repetidas y anti-repetidas denominadas también como RAR bucle de tallo (stem loop RAR) desencadenan el precursor CRISPR RNA (pre-RNA) procesado por la RNA polimerasa III y subsecuentemente activa la guía crRNA escindiendo el ADN por Cas9. El análisis de la estructura de Cas9-sgRNA-ADN revela que el “stem loop 1” es crucial para la formación del complejo funcional Cas9-sgRNA-ADN, mientras que el “stem loop 2 y 3” promueven la formación estable del complejo a través de la interacción con el lóbulo NUC y por lo tanto mejoran la actividad en vivo (Liang G. Z., 2016; Kirchner, 2015)

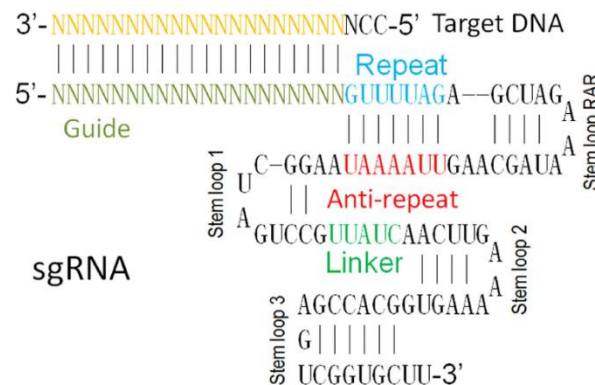


Figura 1. 12 Representación esquemática de la estructura secundaria del sgRNA (Liang G. Z., 2016)

1.1.9 Ediciones genéticas empleando el sistema CRISPR/Cas9

Se han realizado ediciones genéticas con el uso del sistema CRISPR/Cas9 en diversas plantas, desde plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis* –planta modelo, hasta plantas de interés comercial como lo es el *sorgo bicolor* y *Zea mays* ,–plantas monocotiledóneas (Tabla 1.6). La tecnología del sistema CRISPR/Cas9 ha surgido para revolucionar los sistemas de edición genética en las plantas, de tal forma que ha llegado a ser empleado de manera sencilla, fácil y eficaz.

Tabla 1. 6 Lista de plantas editadas mediante el sistema CRISPR/Cas9. Recopilación de diversos artículos, elaboración propia

<i>Especie</i>	<i>Eudicotiledónea / Monocotiledónea</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Eudicotiledónea
<i>Brassica oleracea</i>	Eudicotiledónea
<i>Citrus sinensis</i>	Eudicotiledónea
<i>Glycine max</i>	Eudicotiledónea
<i>Hordeum vulgare</i>	Monocotiledónea
<i>Nicotina benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i>	Eudicotiledónea
<i>Oryza sativa</i>	Monocotiledónea
<i>Petunia hybrid</i>	Eudicotiledónea
<i>Populus tormentosa</i>	Eudicotiledónea
<i>Solanum lycopersicum</i>	Eudicotiledónea
<i>Solanum tuberosum</i>	Eudicotiledónea
<i>Triticum aestivium</i>	Monocotiledónea
<i>Vitis vinifera</i>	Eudicotiledónea
<i>Zea mays</i>	Monocotiledónea
<i>Sorghum bicolor</i>	Monocotiledónea

Las ediciones genéticas que se han llevado a cabo en las diversas especies (10 eudicotiledóneas y 5 monocotiledóneas), se caracterizan por guiar el sistema CRISPR/Cas9 mediante un RNA guía, a un locus de un gen definido, el cual es reparado en la mayoría de los casos por la vía de unión no homologa directa (NHEJ) y como resultados han obtenido diversos porcentajes de transformación y de mutación. Por ejemplo, Feng *et al.*, 2013, emplean el sistema de CRISPR/Cas9 para realizar la edición en genes de *Arabidopsis* (BRI1 y GAI), como resultados se obtuvieron plantas que exhibieron un crecimiento retardado y hojas enrolladas; en la edición del gen BRI1 y plantas con fenotipo enano al mutar el gen GAI. Posteriormente, Gao *et al.*, 2015, mutaron los genes PDS y PDR6 por el sistema CRISPR/Cas9, para ello diseñaron gRNA dirigidos al exón del PDS y al segundo exón del PDR6. Como resultado, los mutantes con pérdida de la función exhibieron hojas albinas para el gen PDS, mientras que para las plántulas con el gen PDR6 interrumpido, se observó un incremento en el número de ramas. Estos fenotipos fueron observados en etapas tempranas de desarrollo. Ma X *et al.*, 2015 diseñaron un sistema de CRISPR/Cas9 para editar plantas monocotiledóneas como eudicotiledóneas. Dirigieron el sistema CRISPR/Cas9 a 3 grupos de genes en arroz, (i) grupos de genes que tienen función positiva en efectos de florecimiento FTL (11 genes), cuyos mutantes mostraron un fenotipo de hoja con senescencia prematura, (ii) genes OsGSTU, OsMRP15 y OsANP, los cuales sintetizan antocianinas color púrpura en las hojas de arroz, cuyos mutante presentaron hojas verdes, confirmando el rol de estos genes para la síntesis de antocianinas en arroz, (iii) finalmente genes

OsWaxy, sintetizan amilosa, cuyos mutantes mostraron una disminución en el contenido de amilosa del 14.6% a 2.6%. Recientemente, Eid *et al.*, (2021), informaron la edición múltialelica de la subunidad I quelatasa de Magnesio (MgCh) en caña de azúcar. La quelatasa es una enzima clave para la biosíntesis de clorofila. La confirmación de la mutagénesis de 49 alelos dirigida por el sistema CRISPR/Cas9 fue corroborada por secuenciación por Sanger de amplicones de PCR clonados. La mutación, resultó en una disminución en el contenido de clorofila. Por otro lado, Oz *et al.*, (2021) realizaron mutaciones puntuales al gen acetolactasa sintasa (ALS) perteneciente a la caña de azúcar, mediante el direccionamiento genético. Como resultado, la coedición de hasta tres copias / alelos del ALS le confirió tolerancia contra el herbicida.

Los estudios de edición genómica en los que han empleado el sistema CRISPR/Cas9 se han centrado en editar genes representativos que están involucrados con algún rasgo fisiológico y/o estructura de la planta que pueden ser fácilmente medibles, como lo es el albinismo, enanismo, aumento de tricomas, pigmentación, fluorescencia, floración tardía, mayor número de ramas, síntesis defectuosa de clorofila b, fenotipos pronunciados de propagación de la macolla, tamaño de semilla, fenotipos sensibles a ciertos herbicidas, pérdida de la función de enzimas de suma importancia como la carboxiviniltransferasa, involucrada en la ruta del corismato, el cual es un precursor de los aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, triptófano y tirosina, en donde la célula no sobrevivirá con dichas mutaciones, etc.

1.1.4 JUSTIFICACIÓN

Sabemos que el gen SoNAP se encuentra regulando positivamente en la expresión diferencial en diversas condiciones de estrés osmótico y salino, por lo que se infiere que este factor de transcripción perteneciente a la familia NAC se encuentre involucrado en respuesta al estrés abiótico; además los análisis in silico de ortología y filogenia predijeron una segunda función, relacionada con la senescencia. Por consecuencia, como primer intento de corroboración de dicha función, el FT SoNAP se sobreexpreso en callos de hojas de tabaco en los que se observaron fenotipos amarillos acelerados y otros con necrosis posterior a los 7 días de transformación, esto llevo a inferir la posibilidad de que FT SoNAP se relacione en el proceso de senescencia, sin embargo, no fue esclarecido por completo para poder dilucidar dicha función en tejidos no diferenciados. Motivo por el cual este estudio se centra en continuar analizando la funcionalidad del gen SoNAP en tejido meristemático de *Saccharum officinarum*.

1.2 Hipótesis

La sobreexpresión del gen SoNAP en meristemas radiculares de *Saccharum officinarum* da lugar un fenotipo senescente.

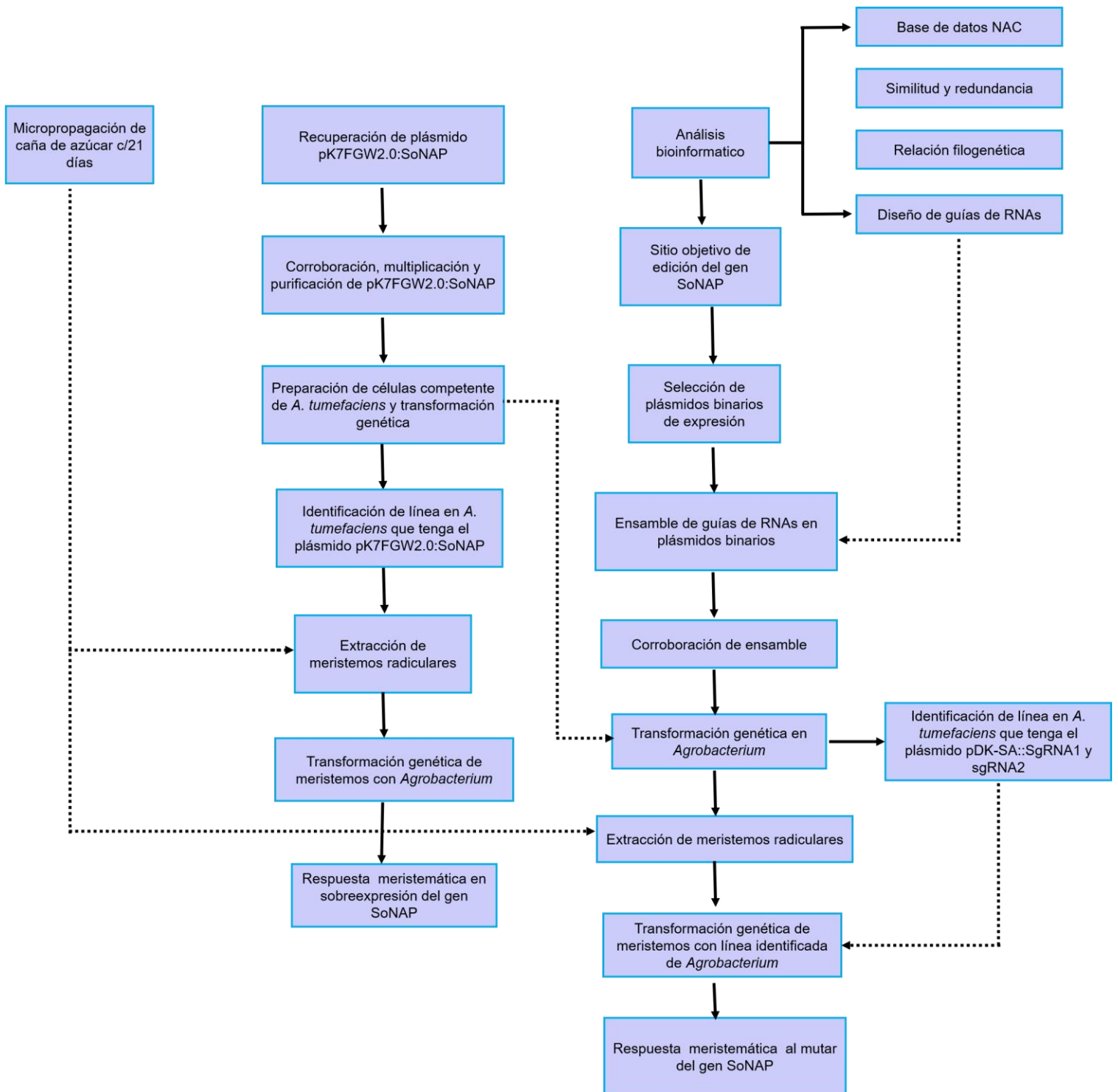
1.3 OBJETIVO GENERAL

Determinar la funcionalidad del gen SoNAP en tejidos meristemáticos radiculares de *Saccharum officinarum* Var MEX69290.

1.3.1 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la construcción 35S::SoNAP en tejidos meristemáticos de *Saccharum officinarum*.
2. Analizar in silico la edición del gen SoNAP
3. Determinar el efecto del silenciamiento del gen SoNAP en tejidos meristemáticos utilizando el sistema CRISPR/Cas9.

1.4 Estrategia experimental general



Capítulo II. SOBRE EXPRESANTE SoNAP EN MERISTEMOS RADICULARES

2.1 INTRODUCCIÓN

La familia NAC contempla tres grupos de proteínas (las cuales se toma la primera letra de cada una para formar la sigla NAC): NAM (*No apical Meristem*), ATAF 1-2 (*Arabidopsis transcription activation factor*) y CUC2 (*Cup-shaped cotyledon*); caracterizándose por mantener dominios conservados en la región N-Terminal (aproximadamente de 150 aminoácidos) para la adhesión al ADN y están divididos en 5 subdominios (A-E) (Ooka, 2003), mientras que su variabilidad de aminoácidos en la región C-Terminal (región no conservada en las plantas) sirve para generar las diversas redes de interacción proteína – proteína y de este modo generar nuevas propiedades emergentes de las células (Olsen, 2005).

Guo *et al.*, 2006 reportaron el análisis funcional de AtNAP, un gen que codifica para la familia de factores de transcripción NAC. La expresión de este gen esta cercanamente relacionada con el proceso de senescencia de las hojas de roseta de Arabidopsis. El AtNAP fue detectado solo cuando las hojas comenzaron con la senescencia, en hojas viejas, pero no en hojas jóvenes. El AtNAP es una proteína nuclear. Al mutar el AtNAP observaron que la senescencia de la hoja se retrasa significativamente. Consideran que la expresión constitutiva de este gen podría ser letal, al inducir la sobreexpresión del AtNAP, que causa una senescencia precoz. Finalmente llevan a cabo un BLAST y un árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos del AtNAP con secuencias con alta similitud de diferentes especies de plantas e identifican al PvNAP (de la habichuela dicotiledónea) con una identidad del 66% y al OsNAP (del arroz) con una identidad del 70% e hipotetizan que estos homólogos son ortólogos funcionales del AtNAP, y comprueban que estos dos factores de transcripción comparten el mismo patrón de expresión específico de hojas senescentes. Estos datos sugieren que el AtNAP y sus homólogos juegan rol importante en la senescencia de la hoja en Arabidopsis y posiblemente en otras especies de plantas.

Carrillo *et al.*, 2020 realizaron un análisis del transcriptoma de *S. officinarum* en condiciones de sequía, y mostraron que el FT SoNAP incrementa su expresión gradualmente con respecto al tiempo de exposición en condición de sequía, además de acuerdo al análisis filogenético llevado a cabo sugirió que el SoNAP es ortólogo del AtNAP y OsNAP. De acuerdo al ensayo transitorio de localización sobre células epidérmicas de cebolla confirmaron que el SoNAP es una proteína nuclear. El análisis cuantitativo de la reacción de la polimerasa en cadena indica que SoNAP fue inducido por tratamientos de alta salinidad, sequia, y ácido abscísico. Finalmente, la sobreexpresión ectópica del SoNAP en callos de tabaco transformado mediante *Agrobacterium*

exhibieron un fenotipo café acelerado después de 7 días de transformación y algunos mostraron necrosis (Carrillo-Bermejo, 2020).

En este capítulo se pretende llevar a cabo la sobre expresión del gen SoNAP en meristemas de caña de azúcar, como parte del ADN-T de un vector binario llevado por *Agrobacterium tumefaciens*, con la finalidad de continuar dilucidando la funcionalidad de dicho factor de transcripción.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Transformación genética en *Agrobacterium*

Se recuperó el vector binario pK7FWG2.0 (Figura 2.1) con el inserto del gen SoNAP (Carrillo-Bermejo, 2020), esta construcción fue empleada para inducir la sobreexpresión en callos de tabaco. Se descongelaron alícuotas de células competentes de *A. tumefaciens* y el vector 35S:SoNAP en hielo. Se adicionó 10 µl del vector y se mezcló suavemente, posteriormente se incubó por 5 min en nitrógeno líquido. Las células de *A. tumefaciens* se transformaron por choque térmico a 37°C durante 10 min. Se cultivaron con 500ul de medio YEP con agitación constante a 28°C por 4 h. Posteriormente se centrifugaron las alícuotas a 4000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet formado, finalmente se cultivó en placas con medio YEP suplementado con los antibióticos de selección correspondientes al vector 35S:SoNAP (Estreptomicina / Espectinomicina).

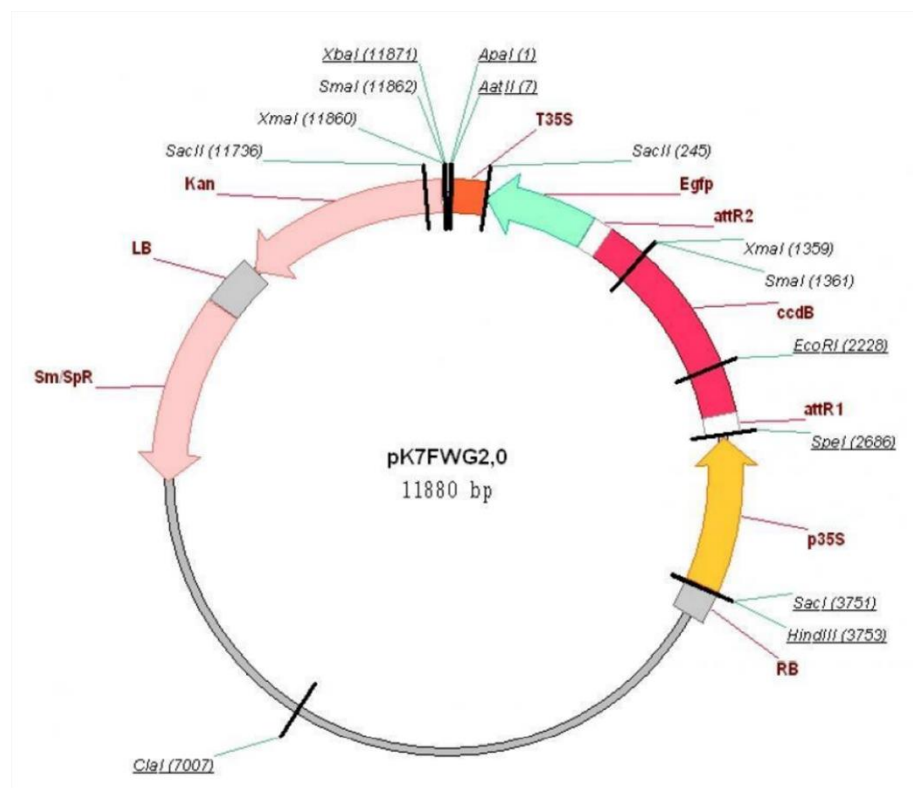


Figura 2. 1 Mapa del vector pK7FWG2,0. Sm/SpR: gen de resistencia a estreptomicina y espectinomicina para selección de bacterias transformadas; Kan: gen de resistencia a kanamicina para la selección de plantas transformadas; T35S: terminador 35S; Eglp: proteína verde fluorescente; ccdB: gen que codifica para la toxina ccdB; p35S: promotor 35S.

2.2.2 Transformación genética de meristemos de caña de azúcar

Se realizó la transformación genética mediante agroinfiltración en meristemos de caña de azúcar de 1-5 mm de longitud, se seleccionó 6 meristemos como controles y cultivados en medio MS sin antibióticos, 8 meristemos transformados y cultivados en medio MS sin kanamicina (grupo meristemático, MTSK) y 8 meristemos transformados y cultivados en medio MS con kanamicina (grupo meristemático, MTCK) (50mg/ml). La transformación se realizó con el método de agroinfiltración con base en el protocolo de Clemente (2006) modificado. La fenotipificación de los meristemos se realizó a los 10 días posteriores de la agroinfiltración.

2.2.3 Análisis del cambio de color en meristemos transformados

Se evaluó el cambio de color posterior a los 10 días a un grupo que contempla 3 meristemos transformados y cultivados en medio sin kanamicina (MSK), a 3 meristemos transformados y cultivados en medio con kanamicina (MCK) y a los 3 meristemos control, se utilizó el procedimiento descrito por Cárdenas-Pérez et al., (2017) que consiste en tres pasos principales captura, proceso y análisis. Se utilizó el software ImageJ para el análisis del color mediante la medición en CIELab, donde sus valores de L* (luminosidad), a* (verde a rojo), y b* (amarillo a azul) fueron estimados usando la herramienta de histograma de frecuencia. Se tomó 5 valores en L, a y b en el área superior, media e inferior para cada uno de los meristemos, además se calculó la diferencia de color (ΔE) de acuerdo a Arzate-Vázquez *et al.*, (2011). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) como un primer acercamiento al comportamiento de los datos, posterior a esto se realizó un diagrama de cajas y bigotes entre los grupos (día 1 vs día 10) para observar las diferencias cuya significancia se analizó mediante la comparación de sus medias (prueba de T-student, $p < 0.05$).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Transformación de *Agrobacterium*

Se realizó la transformación genética de *A. tumefaciens* LBA 4404 con el vector.35S:SoNAP. Se realizó la PCR en colonia, en esta se identificaron las colonias transformadas, se observó el inserto con el tamaño cercano a lo esperado, 1119 pb inserto del gen SoNAP y 750 pb para kanamicina (Figura 2.1)

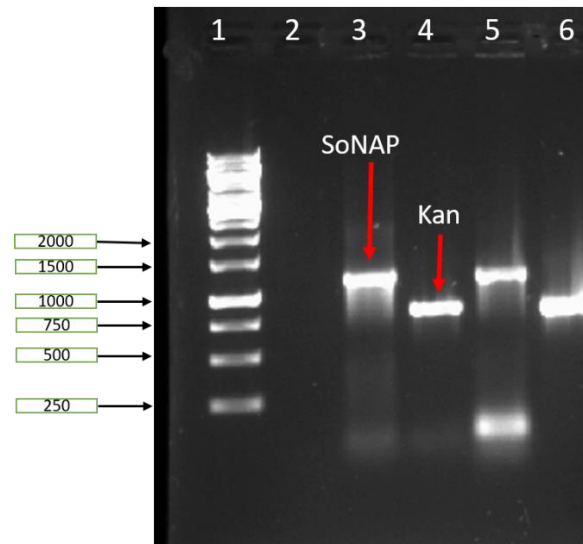


Figura 2. 2 Productos de PCR en colonias analizadas en gel de agarosa al 1%. Carril 1: cargado con 1ul de marcador molecular de DNA 1kb Ladder (PROMEGA, G571A), carril 2: control negativo (sin templado), carriles 3 y 4, colonia transformada con el gen SoNAP, carriles 5 y 6: control positivo (con templado 35S:SoNAP).

2.3.2 Sobre expresión del SoNAP en meristemos de caña de azúcar

Para estudiar la función del gen SoNAP, se transformaron meristemos radiculares mediante la agroinfiltración, se usaron colonia transformas con el vector 35S:SoNAP (Figura 2.3 A). Se monitoreó el desarrollo de los meristemos y la fenotipificación a los 10 días posteriores a su transformación genética. Los meristemos del grupo control presentaron alargamiento y desarrollo de hoja; los meristemos transformados y cultivados en un medio sin kanamicina (MTSK) presentaron signos de oxidación con una tasa del 75%; mientras que, los meristemos transformados y cultivados en un medio enriquecido con kanamicina (MTCK) presentaron de igual modo signos de oxidación con una tasa superior del 100% (Figura 2.3 B), finalmente la tendencia

de la oxidación fue percibida mayormente en los meristemos transformados al transcurrir el tiempo y posterior a los 14 días no se presentó recuperación. (Figura 2.3 C)

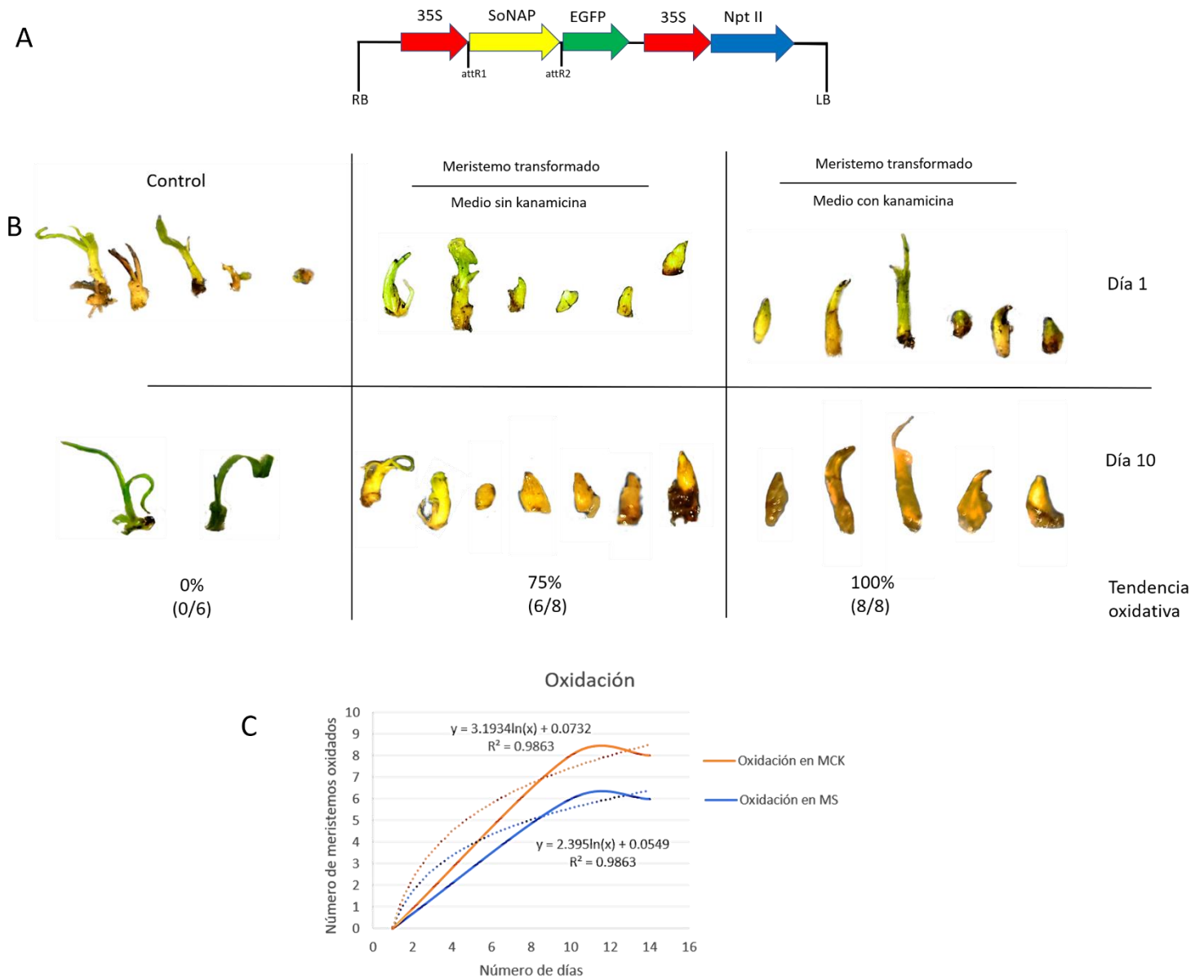


Figura 2. 3 Respuesta fenotípica de la sobreexpresión del SoNAP en tejidos meristemáticos de caña. **A)** Estructura del vector 35S:SoNAP-GFP. **B)** Respuesta de la sobreexpresante. En la primera columna se muestra el fenotipo de los meristemos control cultivados en un medio MS al día 1 y día 10; en la segunda columna se muestra el fenotipo de los meristemos transformados con *Agrobacterium* cultivados en medio sin kanamicina al día 1 y día 10; en la tercera columna se muestra el fenotipo de los meristemos transformados y cultivados en medio con kanamicina (50mg/ml) al día 1 y día 10. **C)** Gráficas de tendencia. Las gráficas muestran la tendencia del cambio fenotípico en los meristemos radiculares de *Saccharum officinarum* a los 10 días posteriores a la transformación con *Agrobacterium*; MSK (medio sin kanamicina) y MCK (medio con kanamicina).

Como un primer acercamiento al comportamiento de los datos, el análisis de PCA nos indicó que los tres grupos meristemáticos (control, MTCK y MTSK) del día 1 se encuentran agrupados en una misma área del cuadrante, lo cual esta representado por caracterizarse por tener colores similares en la misma etapa de desarrollo, además el grupo meristemático control a los 10 días no estuvo tan alejado de tener las tonalidades semejantes a los grupos del día 1; sin embargo, para los grupos meristemático MTSK y MTCK del día 10 se agruparon muy juntos entre ellos y en un cuadrante distinto y alejados de los grupos meristemático del día 1, esto postula la idea del cambio de color significativo debido a la expresión del gen SoNAP en este grupo de tejidos (Figura 2.4).

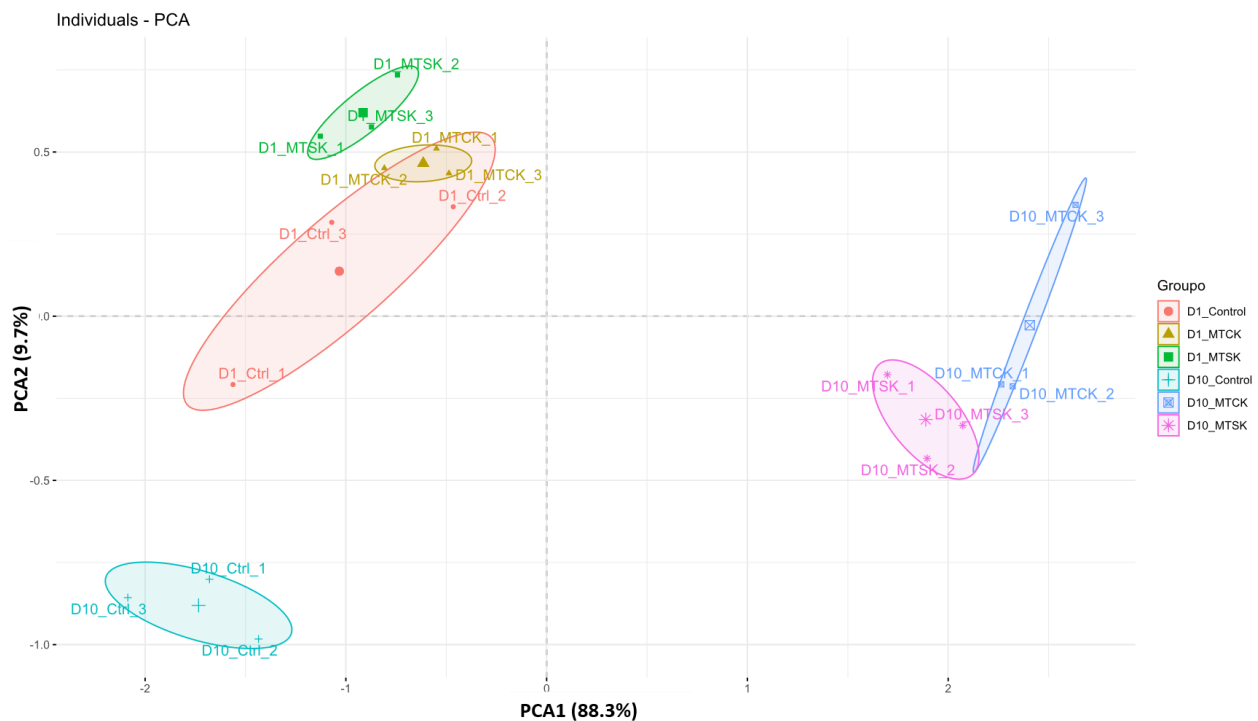


Figura 2. 4 Análisis de componentes principales en la sobreexpresión del gen SoNAP en meristemas radicales de *Saccharum officinarum*

Por otro lado, para observar detenidamente la sobreexpresión del gen SoNAP en los tejidos meristemático, se tomaron imágenes bajo el microscopio a los tres grupos meristemáticos al día 1 y al día 10, las imágenes tomadas mostraron que el grupo control no presento cambios en el color, mientras que tanto para el grupo MTSK y MTCK se pudo observar un cambio de color de un verde-amarillo a un amarillo-café, posterior a los 10 días, lo que se infiere como signos de oxidación (Figura 2.5 A).

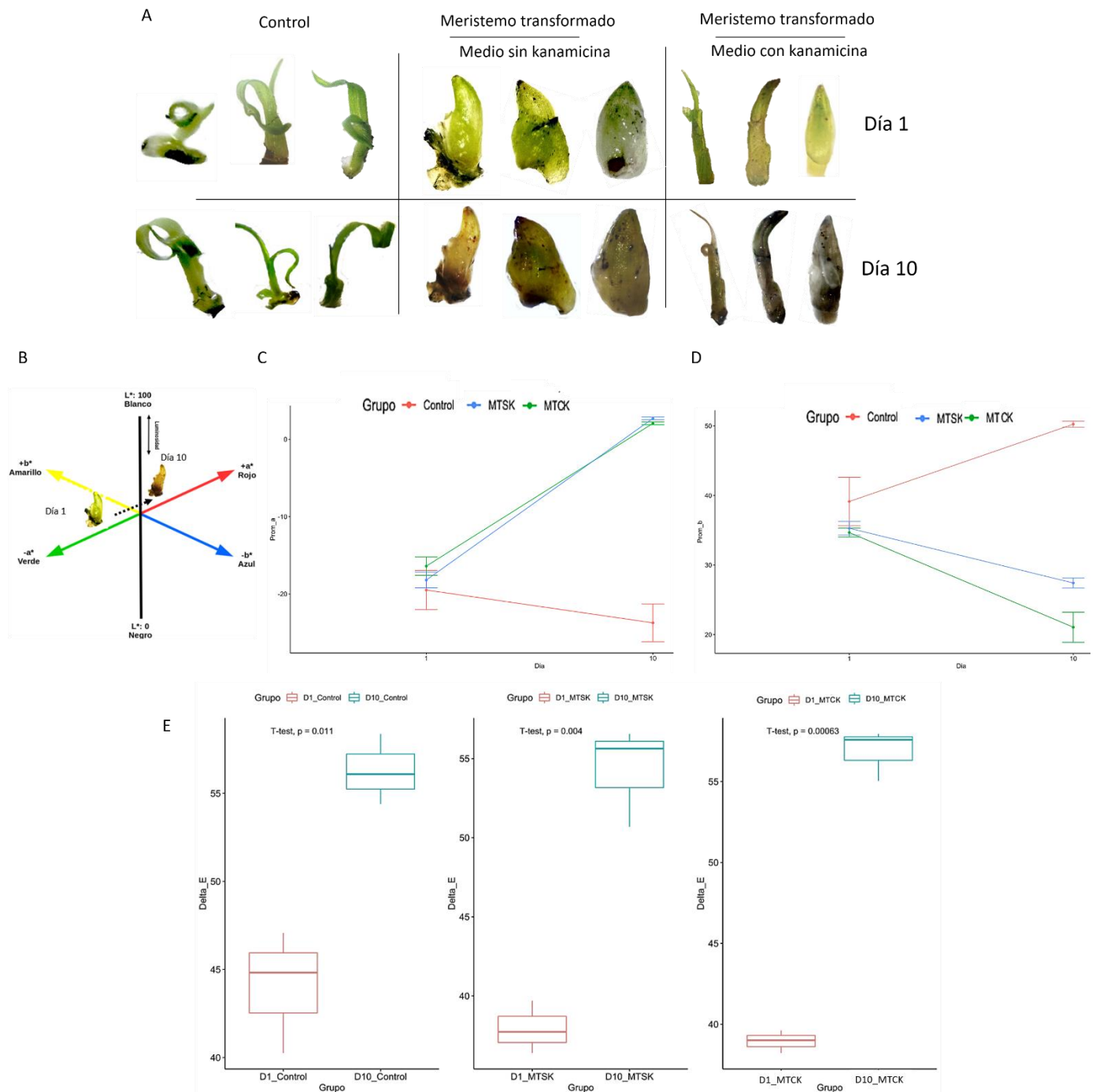


Figura 2. 5. Cambio de color de los meristemos durante la sobreexpresión del gen SoNAP. A) Imágenes tomadas bajo el microscopio del día 1 y día 10 para el grupo control meristemático; el grupo transformado y cultivado en un medio sin antibiótico (MTSK); y el grupo meristemático transformado y cultivado en un medio

con antibiótico (MTCK), respectivamente. B) Imagen representativa de las coordenadas de CIELab en un sistema tridimensional. C) Promedio del espacio de color para la coordenada a^* ; para cada grupo meristemático; donde la línea roja representa al grupo control, la línea verde al grupo meristemático transformado y cultivado en un medio sin antibiótico (MTSK); la línea azul representa al grupo meristemático transformado y cultivado en un medio con antibiótico (MTCK). D) Promedio del espacio de color para la coordenada b^* . E) Grafico que representa la diferencia de color (ΔE) para cada uno de los grupos meristemáticos.

A su vez, se evaluó los cambios de color en los grupos meristemáticos durante la sobreexpresión del gen SoNAP mediante la escala CIELab; L^* (luminosidad), a^* (verde a rojo); y b^* (amarillo a azul) (Figura 2.5 B, C y D). Con respecto a los valores de a^* ; al día 1 los tres grupos se situaron entre valores de -20 a -5, posterior a los 10 días de sobreexpresión del gen SoNAP, el grupo control mantuvo un valor negativo lo cual está asociado a mantener un color verde, mientras que los grupos meristemáticos MTSK y MTCK obtuvieron valores positivos, lo que indica una disminución en el color verde. Por otro lado; los valores b^* para los tres grupos se obtuvieron entre 30 a 40 al día 1; posterior a los 10 días, los grupos meristemáticos MTSK y MTCK exhibieron un decremento en sus valores, lo que indica una disminución del color amarillo. Por tanto, el incremento y decremento en los valores de a^* y b^* respectivamente, en el día 1 con respecto al día 10 para los grupos meristemáticos MTSK y MTCK podrían estar asociados con el cambio de matiz de un verde-amarillo a un amarillo-café con manchas marrones, lo que se infiere como signos de oxidación; degradación de la clorofila, cambio que se manifiesta por modificaciones progresivas del color de las hojas verde oscuro a verde pálido, amarillo y marrón como paso final, probablemente el cambio de color este surgiendo como consecuencia de la sobreexpresión del gen SoNAP (Figura 2.5 A y B). Finalmente, la diferencia de color en CIELab para el grupo meristemático control al día 1 respecto al día 10 no presentó significancia ($p > 0.05$), mientras que para los grupos MTSK y MTCK al día 1 y día 10 respectivamente, sí hubo diferencias significativas (Figura 2.5 E y A). Por consiguiente, este capítulo nos proporcionó los datos relevantes que continúan sustentando la funcionalidad del gen SoNAP; previamente descrito por Carrillo-Bermejo *et al.*, (2020), como un gen que está relacionado con la muerte celular causada por la senescencia de la hoja.

2.4 DISCUSIÓN

Bresson *et al.*, (2018) analizaron el proceso de senescencia en hojas de roseta verdes, amarillas y marrones de 3, 4, 5 y 7 semanas de *A. thaliana* a niveles fisiológicos, bioquímicos y moleculares.

Además, cuantificaron de manera novedosa la senescencia foliar mediante ensayos colorimétricos macroscópicos basados en la escala HSV, lo que permitió definir los umbrales para cada color. Los valores de distribución H, S, V en hojas de 6 semanas reflejaron un color verde-amarillo, color percibido en la degradación de la clorofila; cambio temprano, significativo y visible. Al mismo tiempo, los parámetros obtenidos de la relación F_v/F_m (rendimiento de la fluorescencia de la clorofila) decrecieron en la semana 6. De este modo, corroboraron que ambos parámetros se encuentran estrechamente relacionados. Por otro lado, en este estudio se realizó la cuantificación del espacio color CIELab en meristemas transformados que sobreexpresan el gen SoNAP al día 1 y día 10, como resultado se obtuvo un aumento en los parámetros a^* y una disminución en los parámetros b^* , lo que indicó un cambio de matiz de un amarillo-verde a un amarillo-café con manchas marrones, signos inferidos posiblemente a la oxidación y/o degradación de la clorofila, similares a los percibidos en las hojas de roseta de *A. thaliana*, en el trabajo de Bresson et al. (2018).

Por otra parte, Balazadeh et al., (2010) concluyeron que el gen ANAC092 en *Arabidopsis t.* ejerce su función durante la senescencia y germinación a través de conjunto de genes diana parcialmente superpuestos. Además, en el (2011), reportaron que el gen ORS1 (miembro de la familia de factores de transcripción NAC) desencadena la expresión de genes asociados a la senescencia a través de una red reguladora que pueden implicar interferencias con vías de señalización dependientes de NaCl y H₂O₂. Garapati et al., (2015) concluyen que el factor de transcripción ATAF1 de *Arabidopsis* sirve como un activador transcripcional central de la senescencia al acoplar la señalización relacionada con el estrés con cascadas transcripcionales relacionadas con la fotosíntesis y la senescencia. Carrillo-Bermejo et al., (2020) caracterizó un gen que codifica para el factor de transcripción SoNAP de *Saccharum officinarum*, predijo la función de FT mediante ortologías y filogenias como un gen posiblemente relacionado con la senescencia, y como primer intento corroboró su función al sobreexpresar el gen SoNAP en callos de tabaco (tejido diferenciado) en donde observó un fenotipo amarillo acelerado a los 7 días y algunos presentaron necrosis, síntomas exhibidos posiblemente debido a la senescencia. Como parte del sustento de la funcionalidad del factor de transcripción SoNAP, en este estudio se realizó la sobreexpresión del gen SoNAP en tejidos meristemáticos de *Saccharum officinarum*, los datos mostraron un fenotipo amarillo-café en el tejido meristemático a los 10 días, el cambio de color fue analizado en el espacio de color en CIELab, el resultado infirió un fenotipo meristemático que presentó síntomas de senescencia; además, este FT está involucrado en la respuesta a estrés osmótico y salino (Carrillo-Bermejo). De este modo, los FTs pueden jugar roles de regulones. Finalmente podemos

hacer mención que, cuando las plantas se enfrentan a tensiones drásticas, la senescencia también puede ser una estrategia de salida para garantizar la supervivencia para su descendencia.

2.5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En primera instancia se concluye una oxidación del 100% en los grupos meristemáticos transformados y cultivados en un medio MS suplementado con kanamicina (MTCK). Además, los datos obtenidos del espacio color CIELab para cada grupo meristemático mostraron cambios significativos en el color de un verde-amarillo a un amarillo-café, valores representativos que pueden asumir que está ocurriendo la descomposición de macromoléculas, como la clorofila. Por lo que, el gen SoNAP sobreexpresado en meristemas radiculares de caña de azúcar se perfila a dirigirse como un gen relacionado con la respuesta a senescencia, que además se involucra en respuesta a estrés osmótico y salino.

A partir de los estudios y discusiones presentados en este trabajo, como perspectiva de trabajos futuros que estén orientados a continuar en la dilucidación de la funcionalidad del gen SoNAP, deben de realizarse diversas pruebas como la cuantificación de la relación F_v/F_m , el contenido de peróxido de hidrogeno intracelular, las actividades de las enzimas CAT y APX en meristemas transformados con el gen SoNAP sobreexpresado, a fin de usarse como marcadores fisiológicos tempranos de senescencia (Bresson et al., 2018).

Capítulo III. EDICIÓN DEL GEN SoNAP

3.1 INTRODUCCIÓN

El sistema CRISPR/Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes* es una herramienta poderosa para la edición del genoma que puede agilizar los estudios funcionales de genes en una variedad de organismos, incluidas las plantas (Doudna y Charpentier 2014). El sistema CRISPR/Cas se compone de un ARN guía monocatenario (sgRNA) para el reconocimiento del ADN objetivo a través de la complementariedad de bases, y una proteína asociada a CRISPR (Cas9) para la escisión del ADN ~ 3 pb corriente arriba del motivo adyacente protoespaciador (PAM = 'NGG') (Jinek *et al.* 2012). En ausencia de plantillas de ADN homólogas, las roturas bicatenarias activadas por CRISPR/Cas9 se repararán principalmente a través de la vía de unión no homóloga propensa a errores (NHEJ), lo que dará como resultado la generación de mutaciones de cambio de marco de lectura en los genes objetivo (Zhang *et al.*, 2016).

CRISPR/Cas9 se ha desarrollado recientemente como una tecnología prometedora para realizar ediciones genéticas en diversas variedades de especies, incluyendo las plantas, guiando el sistema a diversos genes, editándolos de manera que suprimen su función o la mejoran. En los diversos estudios el sistema CRISPR/Cas9 se ha dirigido a regiones específicas en el gen, por ejemplo, Xie *et al.*, (2017) realizaron edición genética en el gen ALS del arroz (OsALS), un gen de acetolactato sintasa, el cual cataliza los pasos iniciales de la biosíntesis de la cadena de aminoácidos ramificada como leucina, isoleucina y valina (Chipman *et al.*, 1998). Para dirigir al sistema CRISPR/Cas9 realizaron mutaciones puntuales, es decir realizaron un cambio en el aminoácido 548 (W548L) TRIPTOFANO (W, TGG) por una LEUCINA (L, TTG), y un cambio en el aminoácido 627 (S627I) una SERINA (S, AGT) por una ISOLEUCINA (I, ATT), emplearon una plantilla molde, por lo que la reparación del ADN vino dada por vía homóloga directa (HDR), ver figura 3.1. Sin embargo, una sola mutación puntual (W548L) es suficiente para conferirle resistencia al arroz (Butt *et al.*, 2017).

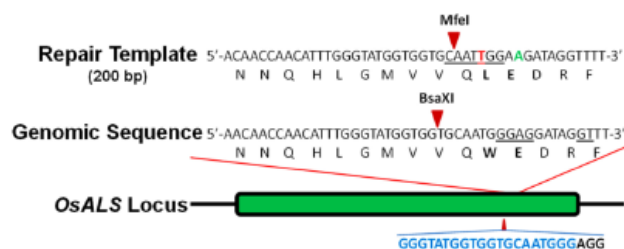


Figura 3. 1 Representación esquemática de la mutación puntual en el gen OsALS (Xie et al, 2017)

Chilcoat *et al.*, 2017, reportaron ediciones genéticas en el gen *WX1* del maíz, el cual codifica para una sintasa de almidón involucrada en la composición de la semilla, diseñaron dos guías, un gRNA-Cas9 apuntó a una secuencia aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y otro gRNA-Cas9 se dirigió hacia abajo del codón de terminación de parada (figura 3.2). La región entre los dos objetivos se extirpó y los extremos cromosómicos distales restantes se unieron a través de la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ) para la reparación del daño del ADN, lo que resultó en un alelo nulo *Wx1* con el fenotipo *Waxy*

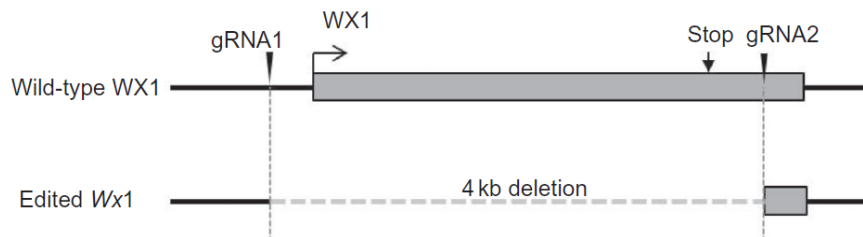


Figura 3. 2 Diseño del knockout del gen *Wx1* (Chilcoat *et al.*, 2017,).

Zhang *et al.*, (2016) reportaron mutaciones a 6 miembros de la familia de genes *PYR/PYL*, genes que codifican una rama de receptores de ABA en *Arabidopsis*. Los mutantes que son ausentes de estos receptores de ABA, presentan un fenotipo insensible a ABA. Para la mayoría de los genes *PYL*, los sitios objetivo de sgRNA se eligieron de la región CDs, mientras que para *PYL8*, el sitio objetivo de sgRNA se localizó dentro de la región 5' no traducida (UTR) (figura 3.3) sin embargo, la eficiencia de edición en la región UTR es baja, del 26%.

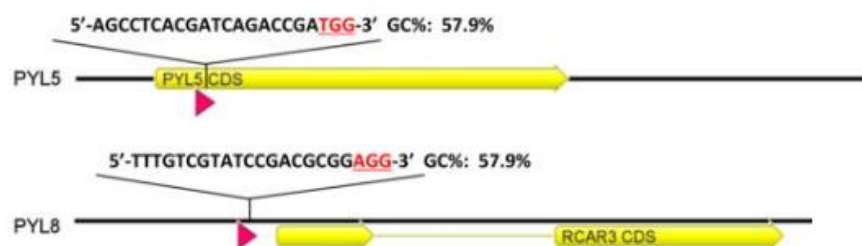


Figura 3. 3 Esquema del locus *PYL* gen. La región CDs se muestra en amarillo, el transcrito ARNm se representa con la línea negra. El sgRNA de *PYL8* fue seleccionado en la región 5'UTR (Zhang *et al.*, 2016)

Wang *et al.*, (2016) diseñaron un vector CRISPR/Cas9 el cual iba dirigido al gen *OsERF922* en arroz, este gen proviene de la familia de los factores de transcripción de respuesta al etileno (ERF), la sobreexpresión de este factor de transcripción permite la susceptibilidad de la planta a la infección por *M. oryzae*, regulando así de manera negativa. Eligieron una secuencia de 20

nucleótidos que contiene el codón de iniciación del marco de lectura abierto de *OsERF922* como el sitio objetivo. El sitio de escisión de Cas9 predicho en la región de codificación del gen fue de siete pares de bases aguas abajo del codón de iniciación de ATG, figura 3.4.

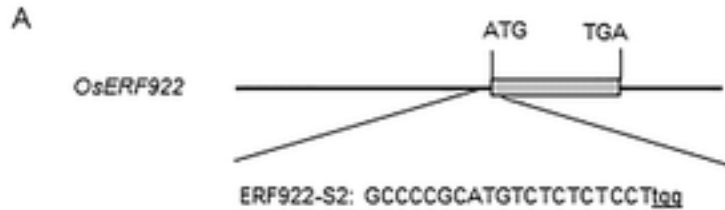


Figura 3. 4 Esquema de la estructura del gen *OsERF922* y el sitio objetivo (Wang et al., 2016).

La elección de la región a editar dependerá del gen con el que se encuentran trabajando. Sin embargo, en este capítulo se contemplará el análisis bioinformático para encontrar las regiones blanco posibles a editar, las guías que permitan dirigir el sistema CRISPR/Cas9 y la construcción de un plásmido binario que exprese ambos componentes.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Análisis bioinformáticos

3.2.1.1 Base de datos de proteínas NACs

Se creó una base de datos de proteínas a partir de *Saccharum spontaneum* AP85-411 y *Saccharum spontaneum* Sspon. Cultivar R570. Se empleó el software HMMER v3.3.2 con el parámetro phmmer – parámetro de consultada de la proteína SoNAP en la base de datos generada previamente. Se concatenó las secuencias obtenidas con las 30 secuencias generadas por Pereira et al., (2019).

3.2.1.2 Búsqueda de similitud

Se realizó un BLASTP en la página de NCBI, de la base de datos proteica previamente obtenida contra la secuencia proteica del SoNAP.

3.2.1.3 Proteínas redundantes

Se empleó el software EMBOS con el parámetro Skipredundant para determinar las secuencias proteicas redundantes y no redundantes.

3.2.1.4 Relación filogenética

Se realizó un alineamiento de la base de datos proteica de NACs con la herramienta MAFFT en la plataforma web Galaxy (Versión 7.221.3); se utilizaron los datos por default, además se le solicito mostrar el árbol de alineación. Finalmente, el árbol de alineación fue visualizado en el programa iTOL.

3.2.1.5 Selección de guías de RNAs

El análisis del diseño y evaluación de las secuencias guías fue realizado en el programa CRISPOR (Concordet, 2018), herramienta web para los experimentos de edición de genomas con el sistema CRISPR/Cas9. Como dato de entrada en el paso 1, se colocó la secuencia nucleotídica codificante para el factor de transcripción SoNAP de 1,119 pb, como paso 2 se seleccionó el genoma de *Saccharum spontaneum* – wild sugarcane – NCBI GCA_003544955.1 (Sspon.HiC_chr_asm) y finalmente como paso 3 se seleccionó el motivo PAM 20pb-NGG. Se escogieron 2 guías direccionadas a la región C-terminal del gen SoNAP. Se empleó el programa Benchling (Pellegrini, 2016) para visualizar la dirección de las guías en el gen SoNAP.

3.2.1.6 Alineación de guías de RNAs

Se realizó un alineamiento BLASTn en el NCBI de las guías con la base de datos NACs generada a partir de las tres variedades de caña.

3.2.2 Sitio objetivo de edición

Se seleccionó el extremo C-terminal del gen SoNAP como región objetivo a editar.

3.2.3 Plásmidos

Los plásmidos pRGEB32 y pDK-SA (Figura 3.5) fueron empleados para el diseño y construcción.

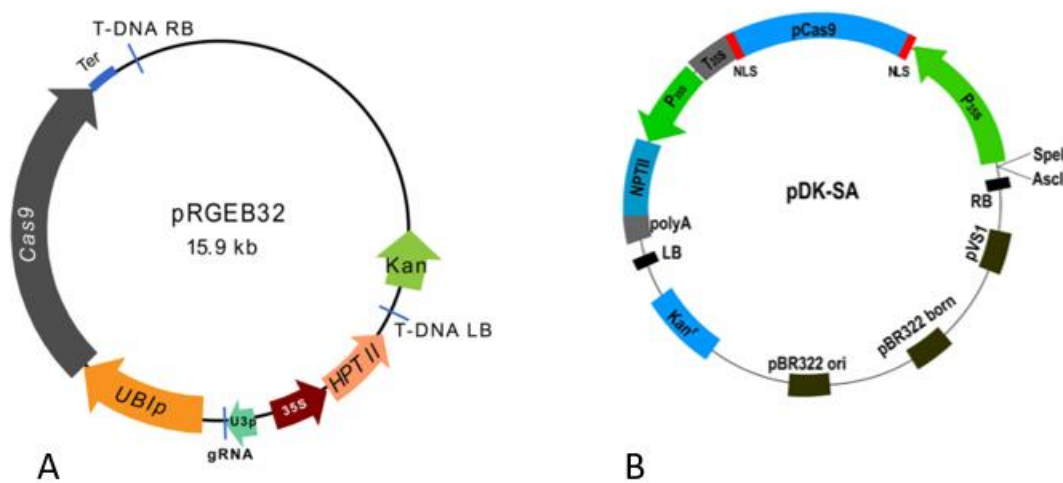


Figura 3. 5 Plásmidos binarios de expresión. (A) Estructura del vector binario basado en el esqueleto pCAMBIA 1300. El gen de Higromicina (HPT II) de selección para planta. Contiene el promotor OsU3 y Scaffold necesarios para la transcripción de la guía de RNA. El gen Cas9 es impulsado por el promotor de Ubiquitina. Plásmido binario pRGEB32 requerido como molde para amplificar el promotor OsU3, Scaffold y generar un fragmento de 500 pb (Xie et al., 2013). (B) Estructura del vector binario basado en el esqueleto pCAMBIA1300. El NPT II codifica para la neomicina fosfotransferasa II (nptII). El gen de Cas9p impulsado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Dos sitios de restricción, *Spe I* / *Asc I*, fueron proporcionados para entrar múltiples cassettes sgRNAs (Ma et al., 2015).

El plásmido pRGEB32 sirvió como molde para la amplificación del promotor OsU3 y la secuencia Scaffold. El plásmido pDK-SA se utilizó como plásmidos binarios de expresión del sistema CRISPR/Cas9 y los sgRNA.

3.2.4 Estrategia de ensamble de guías “sgRNA”

La estrategia general utilizada para el ensamble e inserción de fragmentos en plásmidos binarios de expresión del sistema CRISPR/Cas9 constituyó de rondas de amplificación con primers específicos a partir del plásmido pRGEB32 y la ligación de estos fragmentos en el plásmido de expresión pDK-SA, una estrategia basada por Liang *et al.*, (2016).

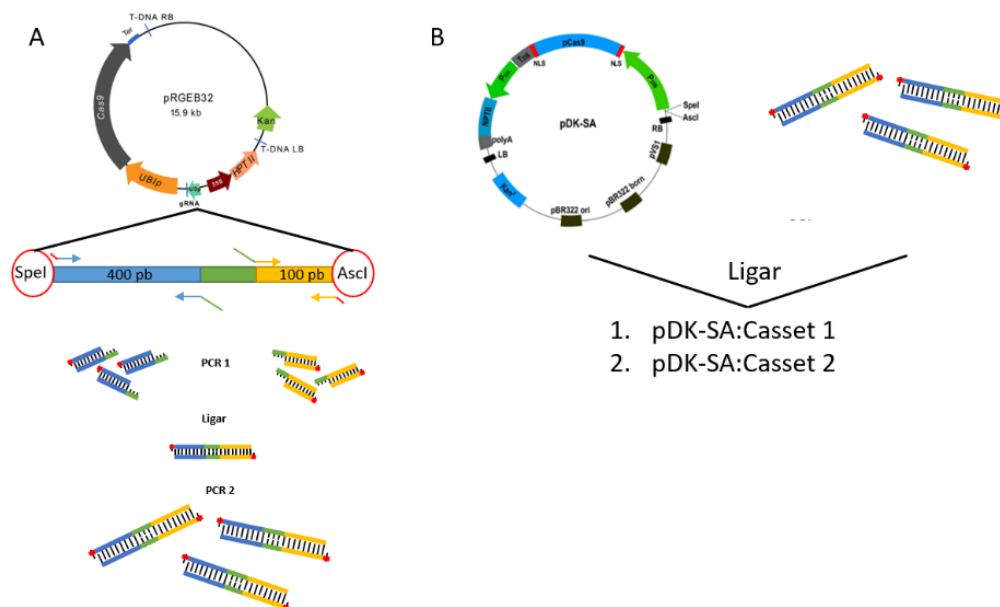


Figura 3. 6 Estrategia de ensamble. (A) esquema general de rondas de PCR para amplificar y obtener los cassettes 1 y 2 (fragmentos de 500 pb). (B) esquema general de ensamble de cassettes 1 y 2 en el plásmido pDK-SA.

Diseño de cebadores

El diseño de los primers (tabla 2.1) se siguió a lo descrito por Liang *et al.*, (2016).

Tabla 3. 1 Primers empleados para las amplificaciones de fragmentos 500 pb, 400 pb y 100pb.

Primer ID	Secuencia del primer	Nomenclatura posterior
Pro-F-SpeI-U3	AAACTAGTAAGGAATCTTTAAACATA	F-SPEI
sgRNA-R-AscI-U3	AAGGCGCGCCGCACCGACTCGGTGCCACT	R-ASCI
U6NgRNA-1-Rv-U3	GUÍA1-RV-TGCCACGGATCATCTGCAC	1R
gRNA-1-Fw-U3	GUÍA 1-FW-GTTTTAGAGCTAGAAATA	1F
U6NgRNA-2-Rv-U3	GUÍA 2-RV-TGCCACGGATCATCTGCAC	2R
gRNA-2-Fw-U3	GUÍA-2-FW-GTTTTAGAGCTAGAAATA	2F

Ensamble de fragmentos

Se realizó la primera ronda de PCR-1 bajo el siguiente protocolo, 20.5 µl de mezcla maestra, 1.5 µl de primer forward / primer reverse (Tabla 3. 2), 1 µl DNA y 0.5 µl Taq Polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador bajo los siguientes parámetros, 95°C por 2 min, 95°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 30 s, 30 repeticiones y 72°C por 5 min.

Tabla 3. 2 Primers empleados para amplificar los fragmentos de 400 pb y 100 pb

Componentes	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Producto 4
P-F	F-SpeI	1F	F-SpeI	2F
P-R	1R	R-AscI	2R	R-AscI
	400 PB	100 PB	400 PB	100 PB

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron purificados, posteriormente se realizó una reacción de ligación entre los productos (1 y 2) y (3 y 4), la reacción fue realizada mediante el siguiente protocolo: 4 µl Buffer ligasa 5x, 7.5 µl fragmento X, 7.5 µl fragmento Y, 1 µl T4 DNA ligasa. Se dejó la reacción a 25°C por 30 min, se inactivó la enzima a 65°C por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se amplificó el fragmento de 500 pb en una segunda ronda de amplificación por PCR-2 con primers F-SpeI y R-AscI, se siguió el protocolo como se mencionó anteriormente. Se corroboró las amplificaciones de los fragmentos ligados en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Finalmente, los productos de la segunda ronda de PCR fueron purificados y denominados como producto A y B.

Digestión y ligación

El plásmido pDK-SA fue digerido con SpeI y Ascl, se utilizó el siguiente protocolo: 1 µg ADN, 5 µl Buffer rCutSmart 10x, 1 µl (10U) SpeI, 1 µl (10U) Ascl, agua hasta 50 µl, se incubaron a 37°C por 5-15 min, se inactivaron las enzimas a 80°C por 20 min. El plásmido digerido fue purificado por columna. Se llevó a cabo la reacción de ligación entre el plásmido pDK-SA digerido y los productos A y B, bajo el siguiente protocolo: 4 µl Buffer ligasa 5x, 1 µl Vector digerido, 4 µl fragmento "X", 1 µl ligasa T4 y 10 µl agua. La reacción se dejó a 25°C por 30 min y se inactivó la enzima a 65°C por 10 min. Se tomó 5 µl para transformar en células competentes de *E. coli* mediante choque térmico a 42°C. Las células transformadas fueron cultivadas en medio LB suplementado con kanamicina. Se realizó la PCR de colonia para identificar las colonias con el inserto de 500 pb. Finalmente, corroboradas las colonias se procedió a la extracción y purificación del plásmido.

3.2.5 Corroboración de cassette 1 y 2 ensamblados en plásmido pDK-SA.

Posterior a la extracción y purificación del plásmido, se corroboró el inserto amplificando la secuencia de 500 pb, 400 pb y 100 pb, respectivamente para el cassette-1 y cassette-2 insertados en el plásmido pDK-SA. Se realizó una PCR bajo el siguiente protocolo, 20.5 µl de mezcla maestra, 1.5 µl de primer forward / primer reverse (Tabla 3.3), 1 µl DNA y 0.5 µl Taq Polimerasa. La reacción se llevó a cabo en un termociclador bajo los siguientes parámetros, 95°C por 2 min, 95°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 30 s, 30 repeticiones y 72°C por 5 min.

Tabla 3. 3 Primers empleados para la amplificación y corroboración de los cassettes insertados en el plásmido pDK-SA

COMPONENTES	<i>pDK-SA:Cassette-1</i>			<i>pDK-SA:Cassette-2</i>		
	FRAGMENTO 1	FRAGMENTO 2	FRAGMENTO 3	FRAGMENTO 1	FRAGMENTO 2	FRAGMENTO 3
<i>P-F</i>	F-SPEI	F-SPEI	1F	F-SPEI	F-SPEI	2F
<i>P-R</i>	R-ASCI	1R	R-ASCI	R-ASCI	2R	R-ASCI
	500 PB	400 PB	100 PB	500 PB	400 PB	100 PB

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análisis bioinformáticos

Se elaboró una base de datos con un total de 109,143 proteínas proveniente de dos variedades de caña de azúcar. Como primer paso, se usó el software HAMMER con el parámetro phmmer, comparó la secuencia proteica del gen SoNAP contra la base proteica generada, como resultado se obtuvo 418 posibles secuencias NAC; estas secuencias y las provenientes del transcriptoma de *Saccharum officinarum* sumaron un total de 448 secuencias (Tabla 3.4), con esto se generó una base de datos de consulta proteica NAC. Para corroborar que las 448 secuencias presentaban su dominio NAC, se analizaron en HAMMER con el parámetro phmmscan, comparó cada una de las secuencias proteicas contra una colección de perfiles de diferentes dominios, con esto se corroboró la presencia del dominio NAC en cada uno de las secuencias aminoácidos que conforman la base de datos proteica.

Tabla 3. 4 Base de datos proteicas NAC, referencia anexo A.

Base de datos	Variedad	Consulta SoNAP
25,316 proteínas	Cultivar R570	91 posibles secuencias NAC
83,827 proteínas	<i>Saccharum spontaneum</i> AP85-441	327 posibles secuencias NAC
	<i>Saccharum officinarum</i> VAR MEX69290	30 secuencias NAC

Además, se realizó un alineamiento de la base de datos de consulta proteica NAC previamente generada contra la secuencia de aminoácidos del gen SoNAP, el resultado mostro tres secuencias con un porcentaje alto de identidad que van del 99.19%, 98.58% y 96%, para Sspon.03G0018230-3D, Sspon.03G0018230-1A y Sspon.03G0018230-2C, respectivamente (Tabla 3.5).

Tabla 3. 5 Secuencias proteicas con identidad a la secuencia proteica SoNAP, referencia anexo A.

Identificador	% identidad
Sspon.03G0018230-3D	99.194
Sspon.03G0018230-1A	98.577
Sspon.03G0018230-2C	96.194

Por otro lado, se determinó un total de 285 secuencias redundantes de la base de datos de consulta proteica NAC; dentro de las secuencias redundantes, se encontró las secuencias

proteicas SoNAP, Sspon.03G0018230-3D, Sspon.03G0018230-1A y Sspon.03G0018230-2C (Tabla 3.6).

Tabla 3. 6 Secuencias redundantes, ver anexo A.

No. secuencias	Redundancia
285 secuencias	REDUNDANTES
163 secuencias	NO REDUNDANTES

Por consiguiente, el árbol filogenético obtenido a partir de la base de datos de consulta proteica NAC mostró que las secuencias proteicas de SoNAP; Sspon.03G0018230-3D, Sspon.03G0018230-1A y Sspon.03G0018230-2C se agruparon en el mismo clado, lo cual corrobora la posible ortología de estas secuencias.

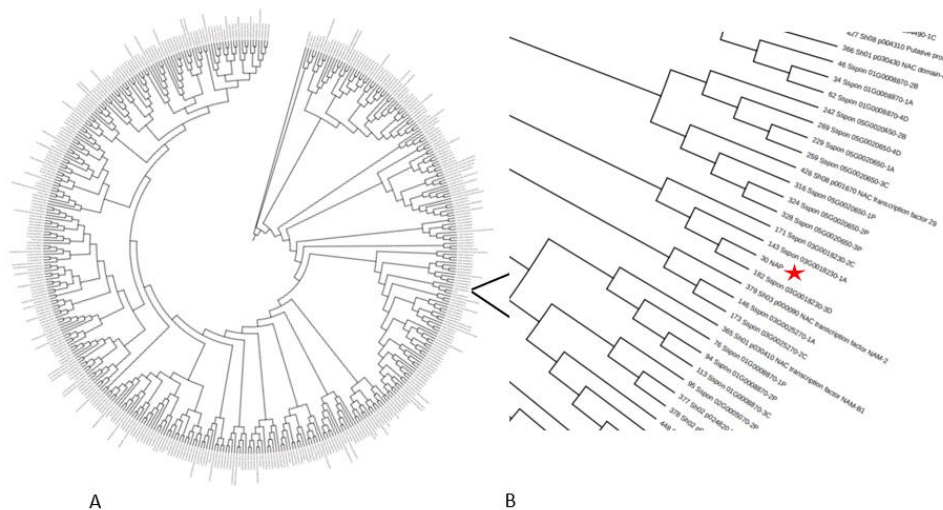


Figura 3. 7 Relación filogenética de la base de datos NACs analizada en este estudio. El análisis se basó en alineaciones de las secuencias NAC de longitud completa. A) árbol filogenético. B) ampliación del clado donde se agrupan las tres secuencias con alta identidad al SoNAP (identificado con una estrella), referencia anexo A.

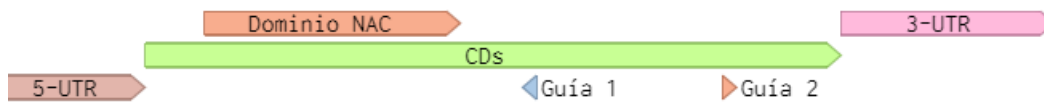
3.3.2 Sitio blanco de edición y guías de RNA seleccionadas

Con respecto a las guías de RNA, se seleccionó dos guías dirigidas a la región C-terminal del gen SoNAP (Tabla 3.7)

Tabla 3. 7 Guías seleccionas

# Guía	Posición	Secuencia guía + PAM
1	608/Rv	CATGTACGCCAGCTGCGGTG TGG
2	952/Fw	AGCAGAGCCCACTCAAGAGG CGG

En cuanto a la estructura del gen SoNAP; contempla una región 5`UTR, una región codificante con un dominio NAC en el extremo N-terminal y una región 3`UTR. Dado que la secuencia nucleotídica de la región C-terminal es variable entre las secuencias NAC, las guías seleccionas apuntaron a dicha región blanco (Figura 3.8).

**Figura 3. 8** Estructura del gen SoNAP

Finalmente, el alineamiento de las guías contra la base de datos nucleotídica NAC identifico los 20 nucleótidos respectivos para la guía 1 y 2 de RNA solo en las secuencias Sspon.03G0018230-3D, Sspon.03G0018230-1A y Sspon.03G0018230-2C (Tabla 3.8)

Tabla 3. 8 Match completo encontrados en la base datos NAC generados por cada guía

Secuencia	RNA-1	RNA-2
SoNAP -Ctrl	1	1
Sspon.03G0018230-3D	1	1
Sspon.03G0018230-1A	1	1
Sspon.03G0018230-2C	1	1

3.3.3 Corroboración de insertos en plásmidos

La guía RNA-1 (sgRNA1) dirigirá al sistema CRISPR/cas9 a la región C-terminal del gen SoNAP entre los nucleótidos 608-628 (Figura 3.9 A). Por ende, el sgRNA1 fue insertado en el plásmido pDK-SA (Figura 3.9 B). Finalmente, la corroboración del inserto fue realizada mediante PCR y se

visualizó en un gel de agarosa al 1% donde se observó el tamaño esperado de los fragmentos que albergan al cassette-1 – 500pb; el cual se conforma por el Promotor OsU3 – 400 pb y la guía::Scaffold – 100 pb (Figura 3.9 C).

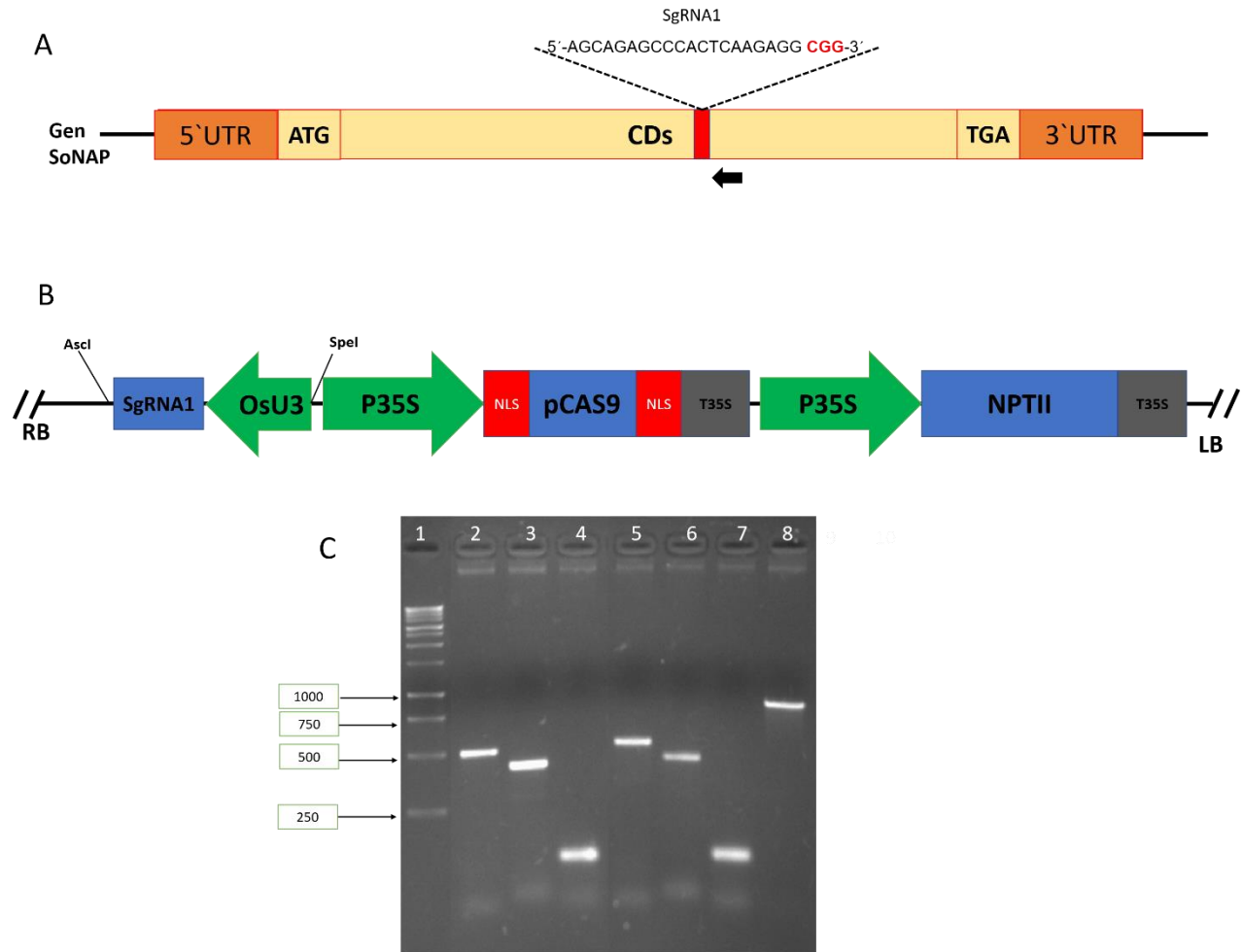


Figura 3. 9 Estrategia para la mutagénesis del gen SoNAP y su corroboración guía 1. A) Representación esquemática del gen SoNAP de Caña de azúcar *Saccharum officinarum* y el sitio objetivo sgRNA1, el sgRNA1 se dirige a los nucleótidos 608 – 628, el sitio PAM se indica con fuente roja. B) Mapa del plásmido de edición para la caña de azúcar. El sgRNA1 se expresa bajo el promotor OsU3 de arroz, pCas9 está bajo el control transcripcional del promotor CaMV 35S y el terminador T35S y el nptII está bajo el control transcripcional del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). C) Amplificación de los fragmentos de 500 pb (Promotor OsU3: guía1:Scaffold) en los carriles 3 y 7, 400 pb (OsU3:Guía) en los carriles 4 y 8, 100 pb (Guía:Scaffold) en los carriles 5 y 9, fragmentos que constituyen el cassette-1, gen NPTII de 794 pb en carril 10, marcador molecular de 1kb en carril 1, amplificaciones realizadas mediante una reacción de PCR donde se utilizó el plásmido pDK-SA ligado con el cassette 1 como plantilla molde.

De este modo, la guía RNA-2 (sgRNA2) dirigirá al sistema CRISPR/cas9 a la región C-terminal del gen SoNAP entre los nucleótidos 952-972 (Figura 3.10 A). El sgRNA2 fue insertado en el plásmido

pDK-SA (Figura 3.10 B). Finalmente, la corroboración del inserto fue realizada mediante PCR y se visualizó en un gel de agarosa al 1% donde se observó el tamaño esperado de los fragmentos que albergan al cassette-2 – 500pb; el cual se conforma por el Promotor OsU3 – 400 pb y la guía::Scaffold – 100 pb (Figura 3.10 C).

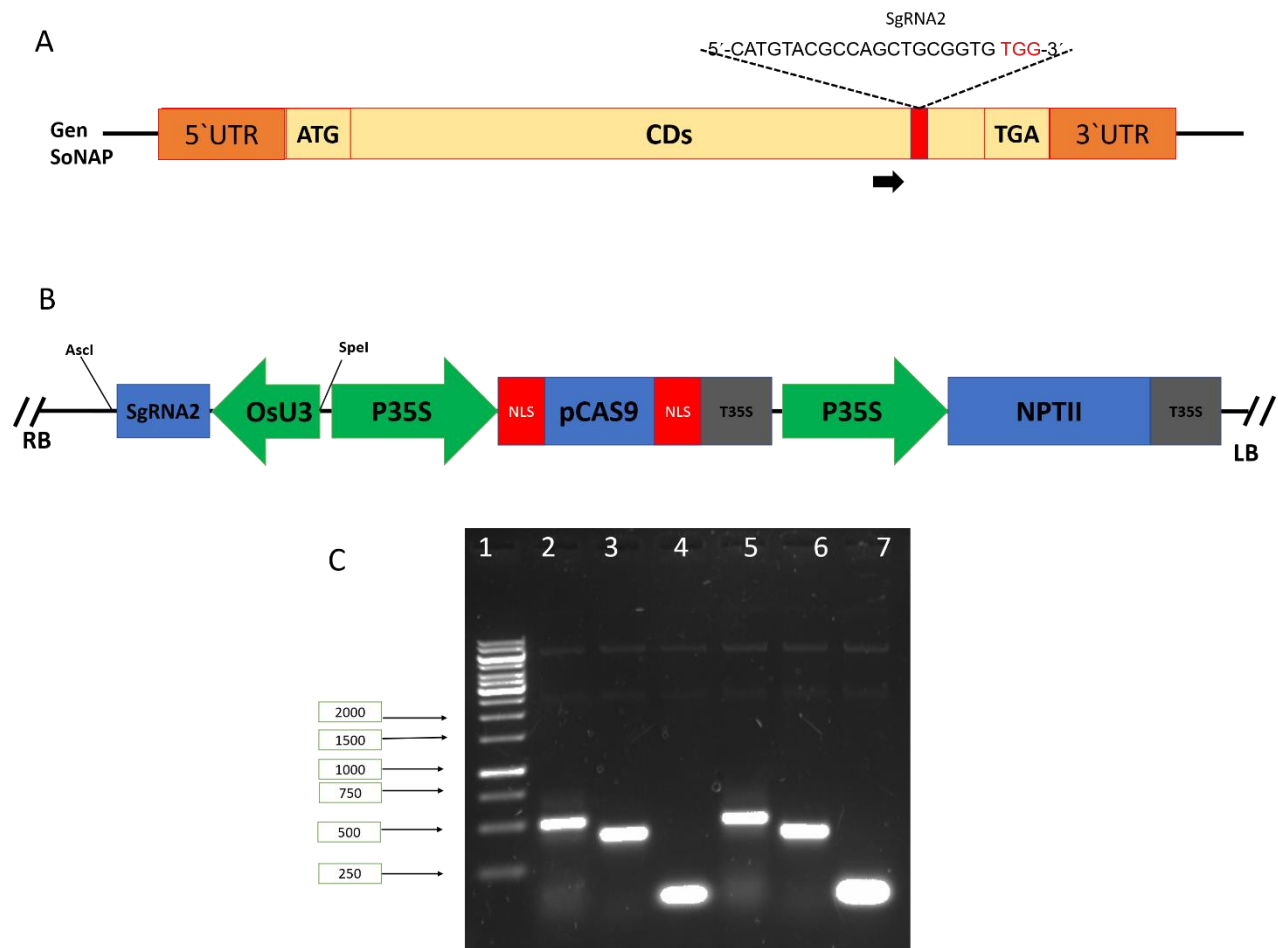


Figura 3. 10 Estrategia para la mutagénesis del gen SoNAP y su corroboración guía 2. A) Representación esquemática del gen SoNAP de Caña de azúcar *Saccharum officinarum* y el sitio objetivo sgRNA2, el sgRNA2 se dirige a los nucleótidos 952 – 972, el sitio PAM se indica con fuente roja. B) Mapa del plásmido de edición para la caña de azúcar. El sgRNA1 se expresa bajo el promotor OsU3 de arroz, pCas9 esta bajo el control transcripcional del promotor CaMV 35S y el terminador T35S y el nptII está bajo el control transcripcional del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). C) Amplificación de los fragmentos de 500 pb (Promotor OsU3:guía1:Scaffold) en los carriles 3 y 7, 400 pb (OsU3:Guía) en los carriles 4 y 8, 100 pb (Guía:Scaffold) en los carriles 5 y 9, fragmentos que constituyen el cassette-

1, gen NPTII de 794 pb en carril 10, marcador molecular de 1kb en carril 1, amplificaciones realizadas mediante una reacción de PCR donde se utilizó el plásmido pDK-SA ligado con el cassette 1 como plantilla molde..

3.4 DISCUSIÓN

La limitación de datos transcriptómicos y genómicos en la caña de azúcar, particularmente debido a su largo y complejo genoma, han obstaculizado estudios moleculares en profundidad. Sin embargo, existen estudios recientes sobre análisis transcriptómicos en caña de azúcar que han revelado genes claves involucrados en diferentes etapas; como en el desarrollo del vástago y hoja (Yan, 2021), bajo estrés osmótico en hojas y raíces (Pereira-Santana, 2017), en la elongación de la hoja en respuesta a estrés (Li C. N., 2016), relacionados con la abscisión de la hoja durante el periodo de maduración (Li, 2016), y recientemente se ha obtenido los primeros ensamblajes genómicos de dos cultivares R570 (Garsmeur, 2018) y AP85-411 (Zhang, 2018). Los resultados de estos estudios pueden ayudar a generar bases de datos para los factores de transcripción pertenecientes a la familia NAC e identificar posibles genes diana útiles.

Se generó una base de datos proteicas NAC (448 secuencias) proveniente de las tres variedades, como resultado se descubrió tres secuencias proteicas con alta identidad al SoNAP; la Sspon.03G0018230-3D, Sspon.03G0018230-1A y Sspon.03G0018230-2C provenientes de la variedad *Saccharum spontaneum* cultivar AP85-441, presentaron un porcentaje de identidad del 99.19%, 98.58% y 96%, respectivamente, además se observó que estos genes se agruparon en el mismo clado en el árbol filogenético, lo que resulta en la ortología entre estas secuencias. Así, podemos considerar la posibilidad de mutar no solo el gen SoNAP, sino que también contemplar las 3 secuencias encontradas. Esta información sirvió como base para la selección de guías de RNA.

Por otro lado, los factores de transcripción pertenecientes a la familia NAC se caracterizan por tener un dominio NAC altamente conservado en la región N-terminal, mientras que en la región C-terminal es considerada como la región de activación de la transcripción (TAR) y es una región altamente divergente entre las plantas (Ooka *et al.*, 2013). Carrillo-Bermejo *et al.*, 2020, reportó que la región C-terminal del gen SoNAP no mostró homología de secuencia con las proteínas NAC que pertenecen al clado V. En conjunto con los datos obtenidos, se seleccionó dos posibles guías que dirigirán el sistema CRISPR/Cas9 para generar indels, la primera provocaría mutaciones entre los aminoácidos 204-208 y la segunda guía entre los aminoácidos 319-323 (región C-terminal), cuyas mutaciones deberían ser reparadas por los sistemas de reparación de la doble hebra, en donde se ha visto que el sistema de reparación por unión no homóloga directa es propenso a generar errores, esto se ve reflejado en la adición o eliminación de bases nucleotídicas lo cual provoca un cambio en el marco de lectura, esto a su vez interrumpiría la funcionalidad del gen.

3.5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Podemos dilucidar que existe la posibilidad de que haya 3 copias del gen SoNAP en *Saccharum officinarum*, de acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados.

Por otro lado, como perspectiva de trabajos futuros en la edición de los meristemas, ¿Qué se espera obtener con la mutación del SoNAP en los meristemas? En primera instancia, no se sabría su fenotipo, recordemos que los Factores de transcripción son regulones y pueden estar participando en diversos procesos de desarrollo de la planta, sin embargo, se debería caracterizar el desarrollo de los meristemas transformados con los plásmidos de edición, para determinar su fenotipo. Aunado a esto, se debería realizar la corroboración de la edición del gen SoNAP en los tejidos meristemáticos y posteriormente a una determinada edad de la plántula. Entonces, solo si se alcanzara a generar la mutación con éxito y el desarrollo normal de la caña, podríamos obtener material meristemático mutado para continuar con la corroboración de la funcionalidad del gen SoNAP cuando se encuentra apagado con diversos experimentos como lo es el propio estrés osmótico, recordémonos que la sobreexpresión del SoNAP en tejidos meristemáticos nos dio pauta a pensar que es un gen letal, que al ser inducido desencadena determinados eventos que tienen lugar en el curso de la senescencia, como lo fue percibido en los fenotipos meristemáticos del día 1 contra los del fenotipo meristemático del día 10.

Bibliografía

Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875-877.

Balazadeh, S., Kwasniewski, M., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanor, M. I., Xue, G. P., & Mueller-Roeber, B. (2011). ORS1, an H₂O₂-responsive NAC transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 4(2), 346-360.

Banerjee, A., and Roychoudhury, A. (2015). WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *Sci. World J.* 2015:807560.

Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.

Bower, R., & Birch, R. G. (1992). Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, 2(3), 409-416.

Bresson, J., Bieker, S., Riester, L., Doll, J., & Zentgraf, U. (2018). A guideline for leaf senescence analyses: from quantification to physiological and molecular investigations. *Journal of Experimental Botany*, 69(4), 769-786.

Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim PO, Nam HG, Lin JF, Wu SH, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver CJ *Plant J.* 2005 May; 42(4):567-85

Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., ... & Leaver, C. J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 42(4), 567-585.

Butt, H., Eid, A., Ali, Z., Atia, M. A., Mokhtar, M. M., Hassan, N., ... & Mahfouz, M. M. (2017). Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Frontiers in plant science*, 8, 1441.

Carrillo-Bermejo, E. A., Gamboa-Tuz, S. D., Pereira-Santana, A., Keb-Llanes, M. A., Castaño, E., Figueroa-Yañez, L. J., & Rodríguez-Zapata, L. C. (2020). The SoNAP gene from sugarcane (*Saccharum officinarum*) encodes a senescence-associated NAC transcription factor involved in response to osmotic and salt stress. *Journal of plant research*, 133(6), 897-909.

Cheavegatti-Gianotto, A., de Abreu, H. M. C., Arruda, P., Bessalho Filho, J. C., Burnquist, W. L., Creste, S., ... & de Fátima Grossi-de-Sá, M. (2011). Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Tropical plant biology*, 4(1), 62-89.

Chilcoat, D., Liu, Z. B., & Sander, J. (2017). Use of CRISPR/Cas9 for crop improvement in maize and soybean. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 149, pp. 27-46). Academic Press.

- Chipman, D., Barak, Z., and Schloss, J. V. (1998). Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochim. Biophys. Acta* 1385, 401–419.
- Christiansen, M. W., & Gregersen, P. L. (2014). Members of the barley NAC transcription factor gene family show differential co-regulation with senescence-associated genes during senescence of flag leaves. *Journal of experimental Botany*, 65(14), 4009-4022.
- Clemente, T. (2006). *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). In *Agrobacterium protocols* (pp. 143-154). Humana Press.
- D'Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann JC (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41:221–225.
- D'Hont, A., Grivet, L., Feldmann, P., Rao, S., Berding, N., and Glaszmann, J. C. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 250.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Eid, A., Mohan, C., Sanchez, S., Wang, D., & Altpeter, F. (2021). Multiallelic, Targeted Mutagenesis of Magnesium Chelatase With CRISPR/Cas9 Provides a Rapidly Scorable Phenotype in Highly Polyploid Sugarcane. *Frontiers in Genome Editing*, 3, 10.
- Fang, Y., You, J., Xie, K., Xie, W., and Xiong, L. (2008). Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice.
- FAOSTAT. (s.f.). FAOSTAT-PRODUCCIÓN DE CAÑA. Recuperado 5 Septiembre del 2019.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., ... & Zhu, J. K. (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229-1232
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., ... & Xia, Q. (2015). CRISPR-Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant molecular biology*, 87(1-2), 99-110
- Garapati, P., Xue, G. P., Munné-Bosch, S., & Balazadeh, S. (2015). Transcription factor ATAF1 in *Arabidopsis* promotes senescence by direct regulation of key chloroplast maintenance and senescence transcriptional cascades. *Plant Physiology*, 168(3), 1122-1139.
- García-Morales, S., Gómez-Merino, F. C., Trejo-Téllez, L. I., & Herrera-Cabrera, É. B. (2013). Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 105-115.
- Garsmeur, O., Aitken, K. S., Potier, B., Grimwood, J., Charron, C., Droc, G., et al. (2017). “A reference sequence of the monoploid genome of sugarcane [W889],” in *Proceedings of the Plant and Animal Genome Conference*, San Diego, CA.

Garsmeur, O., Droc, G., Antonise, R., Grimwood, J., Potier, B., Aitken, K., ... & D'hont, A. (2018). A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. *Nature communications*, 9(1), 1-10.

Gregersen, P. L., & Holm, P. B. (2007). Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 5(1), 192-206.

Grivet, L., and Arruda, P. (2002). Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 122–127.

Guo Y, Cai Z, Gan S-S (2004) Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell Environ* 27: 5

Guo, Y., & Gan, S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46(4), 601-612.

Guo, Y., Cai, Z., & Gan, S. (2004). Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant, cell & environment*, 27(5), 521-549.

Ha S, Moore P, Heinz D, Kato S, Ohmido N, Fukui K (1999) Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multifluorescence in situ hybridization and imagine methods.

Huang, H., Wang, Y., Wang, S., Wu, X., Yang, K., Niu, Y., et al. (2012). Transcriptome-wide survey and expression analysis of stress-responsive NAC genes in *Chrysanthemum lavandulifolium*.

Jiang, Y., and Deyholos, M. K. (2006). Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biol.*

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821.

Kim, J. H., Woo, H. R., Kim, J., Lim, P. O., Lee, I. C., Choi, S. H., ... & Nam, H. G. (2009). Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in Arabidopsis. *Science*, 323(5917), 1053-1057.

Kim, Y. S., Sakuraba, Y., Han, S. H., Yoo, S. C., & Paek, N. C. (2013). Mutation of the Arabidopsis NAC016 transcription factor delays leaf senescence. *Plant and Cell Physiology*, 54(10), 1660-1672.

Kirchner, M. &. (2015). CRISPR-Cas: From the Bacterial Adaptive Immune System to a Versatile Tool for Genome Engineering. *Angewandte Chemie International Edition*. Angewandte Chemie International Edition, 13508-13514.

Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., et al. (2011). Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res.* 18, 263–276.

Liang, G., Zhang, H., Lou, D., & Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific reports*, 6(1), 1-8.

- Lim PO, Woo HR, Nam HG. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 8:272–78
- Lim, P. O., Kim, H. J., & Gil Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 115-136.
- Lim, P. O., Woo, H. R., & Nam, H. G. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 8(6), 272-278.
- Liu, T. K., Song, X. M., Duan, W. K., Huang, Z. N., Liu, G. F., Li, Y., et al. (2014). Genome-wide analysis and expression patterns of NAC transcription factor family under different developmental stages and abiotic stresses in Chinese Cabbage. *Plant Mol. Biol. Report.* 32, 1041–1056.
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta pharmaceutica sinica B*, 7(3), 292-302.
- Ma, D., & Liu, F. (2015). Genome editing and its applications in model organisms. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(6), 336-344.
- Ma, X. Z.-G. (2016). CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular Plant*, 961–974.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., ... & Xie, Y. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular plant*, 8(8), 1274-1284.
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., & Liu, Y. G. (2016). CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Molecular plant*, 9(7), 961-974.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- Makarova, K. S. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 467.
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P., & Zentgraf, U. (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, 55(6), 853-867.
- Mohan, C. (2016). Genome editing in sugarcane: challenges ahead. *Frontiers in plant science*, 7, 1542.
- Mojica, F. J.-V. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 244-246.
- Moreno, F., & Patricia, L. (2009). Plant responses to water deficit stress. A review. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 97–103.
- Nooden LD. (1988). The phenomena of senescence and aging. In *Senescence and Aging in Plants*, ed. LD Nooden, AC Leopold, pp. 1–50. San Diego: Academic

Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A. M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., et al. (2010). Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465, 30–44.

Nuruzzaman, M., Sharoni, A. M., and Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants.

Olsen, A. N. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in plant science*. *Trends in plant science*, 79-87.

Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. L., and Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.* 10, 79–87.

Ooka, H. y. (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA research* 10.6, 239-247.

Oz, M. T., Altpeter, A., Karan, R., Merotto, A., & Altpeter, F. (2021). CRISPR/Cas9-Mediated Multi-Allelic Gene Targeting in Sugarcane Confers Herbicide Tolerance. *Frontiers in Genome Editing*, 15.

Pereira-Santana, A., Alvarado-Robledo, E. J., Zamora-Briseno, J. A., Ayala-Sumuano, J. T., Gonzalez-Mendoza, V. M., Espadas-Gil, F., ... & Rodriguez-Zapata, L. C. (2017). Transcriptional profiling of sugarcane leaves and roots under progressive osmotic stress reveals a regulated coordination of gene expression in a spatiotemporal manner. *PloS one*, 12(12), e0189271.

Podzimska-Sroka, D., O'Shea, C., Gregersen, P. L., & Skriver, K. (2015). NAC transcription factors in senescence: from molecular structure to function in crops. *Plants*, 4(3), 412-448.

Reis, R. R., da Cunha, B. A. D. B., Martins, P. K., Martins, M. T. B., Alekcevetch, J. C., Chalfun-Júnior, A., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. *Plant science*, 221, 59-68.

Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel y C.X. Zhao. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biol.* 331, 215-225.

Shiriga, K., Sharma, R., Kumar, K., Yadav, S. K., Hossain, F., and Thirunavukkarasu, N. (2014). Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the NAC family in maize. *Meta Gene* 2, 407–417.

Silva, M. D. A., Silva, J. A. G. D., Enciso, J., Sharma, V., & Jifon, J. (2008). Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Scientia Agricola*, 65(6), 620-627.

Souza, G. M., Berges, H., Bocs, S., Casu, R., D'hont, A., Ferreira, J. E., et al. (2011). The sugarcane genome challenge: strategies for sequencing a highly complex genome. *Trop. Plant Biol.* 4, 145–156.

Sun, J., Hu, W., Zhou, R., Wang, L., Wang, X., Wang, Q., et al. (2015). The *Brachypodium distachyon* BdWRKY36 gene confers tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.* 34, 23–35.

Thirugnanasambandam, P. P., Hoang, N. V., & Henry, R. J. (2018). The challenge of analyzing the sugarcane genome. *Frontiers in plant science*, 9, 616. Five phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *J. Agron. Crop Sci.* 185:83-89.

Tran, L. S., Nishiyama, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2010). Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops* 1, 32–39.

Voytas, D. F. (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual review of plant biology*, 64, 327-350.

Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y., ... & Zhao, K. (2016). Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PloS one*, 11(4).

Wang, H., Wang, H., Shao, H., & Tang, X. (2016). Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Frontiers in plant science*, 7, 67.

Wang, J., Roe, B., Macmil, S., Yu, Q., Murray, J. E., Tang, H., et al. (2010). Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. *BMC Genomics* 11:261.

Woo, H. R., Kim, H. J., Nam, H. G., & Lim, P. O. (2013). Plant leaf senescence and death—regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of cell science*, 126(21), 4823-4833.

Wu, A., Allu, A. D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanol, M. I., ... & Fernie, A. R. (2012). JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(2), 482-506.

Xie, K. &. (2013). Molecular plant. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR/Cas system, 1975-1983.

Xie, K., Minkenberg, B., & Yang, Y. (2014). Targeted gene mutation in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Bio Protoc*, 4, e1225.

Yang, S. D., Seo, P. J., Yoon, H. K., & Park, C. M. (2011). The *Arabidopsis* NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. *The Plant Cell*, 23(6), 2155-2168.

Zhang, J. S., Nagai, C., Yu, Q. Y., Pan, Y. B., Ayala-Silva, T., Schnell, R. J., et al. (2012). Genome size variation in three *Saccharum* species. *Euphytica* 185, 511–519.

Zhang, J., Zhang, X., Tang, H., Zhang, Q., Hua, X., Ma, X., ... & Ming, R. (2018). Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nature genetics*, 50(11), 1565-1573.

Zhang, K., & Gan, S. S. (2012). An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 158(2), 961-969.

Zhang, S. Z., Yang, B. P., Feng, C. L., Chen, R. K., Luo, J. P., Cai, W. W., & Liu, F. H. (2006). Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(4), 453-459.

Zhang, Z., Mao, Y., Ha, S., Liu, W., Botella, J. R., & Zhu, J. K. (2016). A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, 35(7), 1519-1533.

Anexo A

El siguiente link proporciona la visualización de los documentos obtenidos y/o generados para el análisis bioinformático.

https://drive.google.com/drive/folders/1S1w_L9ZiYHChzy0OhwxF16UXRri3NZXx?usp=sharing