



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Análisis y clasificación de los factores de
respuesta a Auxinas (ARF) en maíz (*Zea mays L.*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Química Farmacéutica Bióloga**

PRESENTA

Paola Isabel Aguirre de la Cruz

Directora de tesis:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Ciudad Universitaria Cd. Mx., 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PLASENCIA DE LA PARRA FRANCISCO JAVIER

VOCAL: Profesor: AVILA CHAVEZ EUCLIDES

SECRETARIO: Profesora: DIMITROVA DINKOVA TZVETANKA

1er. SUPLENTE: Profesora: CEAPA CORINA DIANA

2° SUPLENTE: Profesora: GARCIA VELAZQUEZ LIZBETH ESMERALDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 103, Conjunto E Facultad de Química, Depto. de Bioquímica UNAM.

Asesora del tema: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SUSTENTANTE: PAOLA ISABEL AGUIRRE DE LA CRUZ

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
1-NAA	Ácido 1-naftalenacético
AD	Dominio de activación
ARF	Factor de respuesta a auxinas
AuxRE	Elemento de respuesta a auxinas
ABA	Ácido abscísico
AJ	Ácido jasmónico
AUX/IAA	Auxina/ Ácido indol acético
CaMV 35s	Promotor mínimo 35s del virus del mosaico de la coliflor
circRNA	RNA circular
C15	Callos obtenidos a partir de IE15 un mes después de la inducción a ES
C23	Callos obtenidos a partir de IE23 un mes después de la inducción a ES
CM	Callos obtenidos a partir de ME un mes después de la inducción a ES
DBD	Dominio de unión a DNA
ES	Embriogénesis somática
GUS	β -glucuronidasa
GFP	Proteína verde fluorescente
ID	Desorden intrínseco
IAA	Ácido indol acético
IPyA	Ácido indol-3-pirúvico
IE15	Embrión inmaduro 15 días después de la polinización
IE23	Embrión inmaduro 23 días después de la polinización
ME	Embrión maduro
MR	Dominio medio de regulación
NOS	Nopalina sintasa
PB1	Phox and Bem1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RD	Dominio de represión
TF	Factor de transcripción
TIR1/AFB	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALLING F-BOX PROTEIN
TMV	Virus del mosaico del tabaco
UFR	Unidades relativas de fluorescencia

Índice

Índice	3
Índice de figuras y tablas.	5
Agradecimientos y dedicatoria.	6
Resumen.	7
Introducción.	8
Embriogénesis somática.	8
Auxinas, biosíntesis y señalización.	10
Regulación de la expresión génica en plantas.	13
Factores de transcripción en plantas.	16
Factores de respuesta a auxinas (ARF).	17
Alineamiento múltiple de secuencias	24
Genes reporteros para monitorear la expresión génica en respuesta a estímulos.	26
Ejemplos de genes reporteros.	27
Antecedentes.	29
Planteamiento del problema.	35
Hipótesis.	36
Objetivo.	36
Objetivos particulares.	36
Metodología.	37
Análisis <i>in silico</i> .	37
Metodología experimental.	38
Desinfección y siembra de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	38
Aplicación de estímulo con auxinas.	38
Ensayo histoquímico de actividad de GUS.	38
Ensayo fluorométrico cuantitativo de actividad de GUS.	39
Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la construcción DR5::GUS.	40
Extracción de DNA genómico de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	41
Amplificación de DR5::GUS y clonación en el vector pGEM T-Easy.	41
Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α	42
Purificación de plásmidos en columna.	42
Digestión del plásmido con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>NcoI</i> para confirmar la clonación.	43
Ensayo de transfección de protoplastos de <i>A. thaliana</i> con el vector pGEM_DR5::GUS.	43
Resultados.	46
Dominios conservados en los ARF de maíz.	46

Alineamiento múltiple de secuencias.	47
Árbol filogenético de los factores de respuesta a auxinas.	51
Acumulación diferencial de transcritos de ARF de maíz durante la inducción a callo embriogénico de maíz.	53
Obtención de un vector reportero GUS bajo un promotor que responde a auxinas.	54
Ensayo de transfección de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> con pGEM_DR5::GUS y cotransfección con pENTR_ZmARF34.	61
Discusión	63
Homología de los ARF.	63
Clasificación de los factores ARF.	63
Acumulación diferencial de transcritos de ARF de maíz durante la inducción a callo embriogénico de maíz.	67
Promotor sintético DR5 para observar la señalización de auxinas.	69
Conclusiones	73
Perspectivas	74
Referencias.	75

Índice de figuras y tablas.

Figura 1. Aspectos morfológicos y fisiológicos de la embriogénesis somática directa de zanahoria.	9
Figura 2. Embriogénesis somática directa e indirecta en dicotiledóneas.	9
Figura 3. Modelo celular de biosíntesis, transporte y señalización de auxinas.	12
Figura 4. Biosíntesis de auxina dependiente de triptófano.	12
Figura 5. Niveles de control de la expresión génica.	15
Figura 6. La familia ARF en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	18
Figura 7. Señalización de auxinas a través de la vía SCF TIR1/AFB.	19
Figura 8. Filogenia y estructura de genes ARF en plantas terrestres.	21
Figura 9. Diversidad estructural de proteínas ARF en plantas terrestres.	22
Figura 10. Desorden intrínseco en la región media de ARF.	23
Figura 11. Diagrama de flujo del algoritmo MUSCLE.	25
Figura 12. Ejemplo de un sistema informador.	26
Figura 13. Niveles relativos de transcritos de ARF que aumentan durante embriogénesis somática.	30
Figura 14. Niveles relativos de transcritos de ARF que disminuyen durante embriogénesis somática.	30
Figura 15. Localización espacio-temporal de ARFs de <i>Arabidopsis thaliana</i> durante la ES directa.	31
Figura 16. Callo inducido a partir de osarf11 ^{TRIM} y semillas de tipo silvestre con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).	32
Figura 17. Expresión diferencial de ARF de maíz (<i>Zea mays</i>) durante la inducción de embriogénesis somática entre los diferentes tipos de explante.	34
Figura 18. Diagrama del vector binario que contiene el promotor DR5(7x)::GUS.	40
Figura 19. Diagrama de la construcción DR5::GUS de interés a amplificar y cebadores diseñados para la amplificación.	40
Figura 20. Visualización de parte del alineamiento de secuencias de ARF de diferentes especies en el dominio de unión a DNA.	48
Figura 21. Visualización de parte del alineamiento de secuencias de ARF de diferentes especies en el dominio medio de regulación.	49
Figura 22. Visualización de parte del alineamiento de secuencias de ARF de diferentes especies en el dominio C-terminal AUX/IAA.	50
Figura 23. Árbol filogenético de los factores de respuesta a auxinas de <i>Zea mays</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> y <i>Marchantia polymorpha</i> .	52
Figura 24. Confirmación de la actividad de GUS dirigida por DR5.	54
Figura 25. Cuantificación de actividad de GUS.	55
Figura 26. Amplificación de la construcción reportera DR5::GUS de DNA genómico de semillas de <i>A. thaliana</i> .	56
Figura 27. Representación gráfica del plásmido pGEM T-Easy vacío (A) y con la construcción DR5::GUS insertada (B).	57
Figura 28. Digestión del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con <i>NcoI</i> y <i>EcoRI</i> para confirmar la clonación.	57
Figura 29. Representación gráfica del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con los cebadores empleados para su secuenciación.	58
Figura 30. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con el oligonucleótido T7.	59
Figura 31. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con el oligonucleótido M13 reverso.	60
Figura 32. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con el oligonucleótido GUS Fw.	60
Figura 33. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy con el oligonucleótido GUS Rv.	61
Figura 34. Cuantificación de actividad de GUS en protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	62
Figura 35. Relación filogenética entre las proteínas ZmARF.	64
Figura 36. Análisis filogenético de los factores de respuesta a auxinas en maíz.	65
Figura 37. Acumulación de transcritos de ARF de maíz en inducción a embriogénesis somática.	68
Figura 38. Las auxinas afectan diversos procesos del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	70
Tabla 1. Cebadores diseñados para la amplificación del cassette de expresión DR5::GUS	41
Tabla 2. Soluciones de trabajo para la extracción y transfección de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	43
Tabla 3. Reacciones de transfección de protoplastos y tratamientos con auxinas	45

Agradecimientos y dedicatoria.

Agradecimientos.

Este proyecto de Tesis fue realizado gracias al apoyo financiero de la UNAM, Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 218921 y al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9118.

Agradezco también al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química UNAM por el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto.

Gracias a Eduardo Luján Soto por enseñarme las técnicas y herramientas empleadas para realizar este proyecto, pero aún más importante, gracias por ser mi mejor amigo, por escucharme y ayudarme. A Vasti Thamara Juárez González por ser una gran motivación para ser científica e impulsarme a trabajar en este proyecto. Gracias a la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por aceptarme en el laboratorio, por sus enseñanzas y apoyarme tanto en el ámbito académico como personal. A todos mis amigos del laboratorio 103 que me hacen pasar ratos muy agradables.

A todas las personas que a lo largo de los últimos años me compartieron de su tiempo, cariño y apoyo.

Al jurado revisor de esta tesis por su tiempo, comentarios y sugerencias que ayudaron a pulir este trabajo.

Dedicatoria.

Me habría gustado que vieras esto, que sepas que lo logré. Todavía tenía mucho que darte. Estás y estarás en cada paso que doy. Esto es para ti. Te amo mamá.

*Ojalá que donde andes puedas llorarle a gusto a la vida
Y que al fin hayas entendido de que trata la soledad.
Ojalá no te olvides que te sigo queriendo
Y regreses conmigo cuando me toque irme de aquí.
Y que allá donde estás no nos preocupe la vida
Y andemos felices, nomás preocupadas por nuestro amor.*

Resumen.

Las auxinas son hormonas vegetales presentes en diferentes procesos de desarrollo de las plantas, cuya percepción y señalización desencadenan respuestas transcripcionales diversas. Los genes que responden a las auxinas se encuentran regulados por los factores de respuesta a auxinas (ARF) que se encargan de reprimir o activar la transcripción. Estas proteínas contienen dominios altamente conservados entre las diferentes especies de plantas terrestres. Las auxinas participan en muchos procesos de desarrollo en las plantas, desde la embriogénesis cigótica hasta la etapa reproductiva de la planta. Un proceso alternativo a la reproducción sexual por embriogénesis cigótica es la embriogénesis somática. En este proceso ocurre una reprogramación genética compleja, desencadenada fundamentalmente por elevadas concentraciones de auxinas exógenas y otras condiciones de estrés. Estudios sobre la participación de los ARFs en la embriogénesis somática se han realizado principalmente en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, sin embargo, poco se conoce de su función en maíz. En este trabajo se realizó la construcción de un árbol filogenético para comparar ARFs de *A. thaliana*, *O. sativa*, *Z. mays* y la planta ancestral *Marchantia polymorpha*, para inferir la posible relación estructura/función entre proteínas homólogas. Se recopilaron y analizaron por algoritmos bioinformáticos 90 secuencias para realizar la reconstrucción filogenética. Esto permitió ubicar a los 37 miembros de la familia ARF de maíz en 9 grupos. Para cada grupo se observó una presencia similar de dominios conservados, mientras que en la comparación entre grupos se notó la ausencia de algunos dominios, cambios en su extensión o disposición. Esto sugiere que los diferentes ARFs, activadores o represores de la transcripción, pueden presentar cierta redundancia o diferencias funcionales en cuanto a los sitios diana en promotores, interacción con otras proteínas reguladoras y formación de dímeros. Para estudiar la función de ARFs y la señalización de auxinas en maíz, se clonó la construcción reportera DR5::GUS que contiene el elemento de respuesta a auxinas (AuxRE) en el vector pGEM T-Easy y se observó su funcionalidad para maíz mediante transfección transitoria en protoplastos. Esta construcción será utilizada en estudios futuros para evaluar la respuesta a auxinas y la función de diferentes ARFs en la embriogénesis somática de maíz.

Introducción.

Embriogénesis somática.

Diversos cambios en el ambiente influyen en el metabolismo de las plantas. Factores de estrés como sequías, salinidad, radiación, altas o bajas temperaturas, compactación del suelo, etc., son contrarrestados por mecanismos de supervivencia de las plantas para curar lesiones y/o regenerar partes u órganos completos. Muchos de estos mecanismos de regeneración son utilizados para la propagación de plantas *in vitro*. Una de estas vías de desarrollo es la embriogénesis somática (ES), la cual permite generar un organismo completo a partir de un explante. Las células somáticas se reprograman para generar células con capacidad embriogénica, lo cual está basado en un modelo complejo de totipotencialidad, acompañado a nivel molecular de reorganización de la cromatina, activación o inactivación de genes y complejas redes transcripcionales (Gulzar et al., 2020, Méndez-Hernández et al., 2019).

La embriogénesis somática puede llevarse a cabo de forma directa o indirecta. En la ES directa, los embriones se forman en los bordes del explante, mientras que en la ES indirecta se lleva a cabo la proliferación de un tejido desorganizado con cierto grado de dediferenciación, denominado “callo” (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Tanto la ES directa como la indirecta se pueden dividir en cuatro fases (0-3), caracterizadas por cambios morfológicos particulares que podemos separar por estadios (Figura 1). Durante la fase 0, se requieren células individuales competentes (estadio 0) que puedan formar grupos de células embriogénicas (estadio 1) en respuesta a estímulos apropiados, por lo general la presencia de auxina exógena. La fase 1 de la ES directa se inicia transfiriendo los grupos de células del estado 1 a un medio sin auxina. Durante esta fase, los grupos de células proliferan de forma relativamente lenta y sin ninguna diferenciación aparente. Después de la fase 1, se produce una división celular rápida en ciertas partes de los grupos de células, lo que conduce a la formación de embriones globulares. Esta fase se designa como fase 2. En la fase final 3, las plántulas se desarrollan a partir de embriones globulares a través de embriones en forma de corazón y torpedo (plantas dicotiledóneas). (Fujimura, 2014).

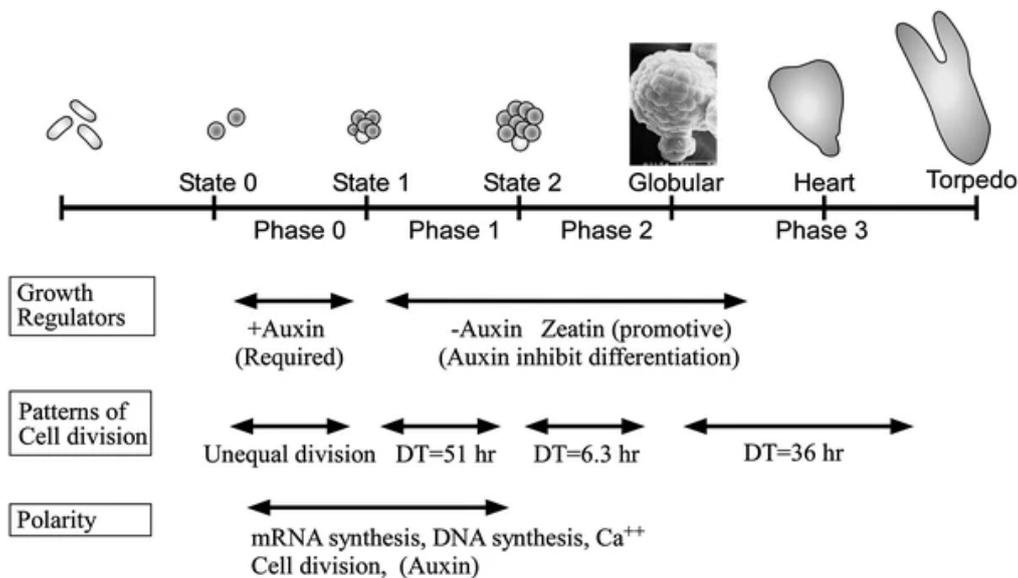


Figura 1. Aspectos morfológicos y fisiológicos de la embriogénesis somática directa de zanahoria. (Tomado de Fujimura, 2014).

La inducción a la embriogénesis somática depende de diversos factores como el tipo de explante, condiciones de cultivo y reguladores de crecimiento. Las condiciones de inducción dan como resultado, en el caso de la ES indirecta, la dediferenciación de las células vegetales somáticas seguido de la readquisición de la totipotencia del desarrollo. Muchos mecanismos moleculares que subyacen en estos procesos aún son desconocidos, y se han estudiado algunos genes y proteínas que pueden ser relevantes durante la inducción y mantenimiento del tejido embrionario como las señaladas en la Figura 2.

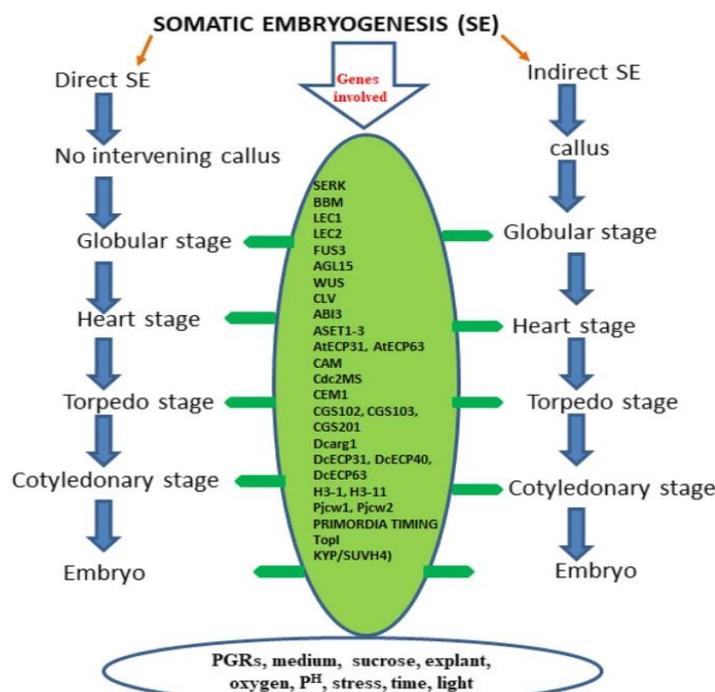


Figura 2. Embriogénesis somática directa e indirecta en dicotiledóneas. Genes involucrados en las diferentes etapas de desarrollo del embrión y factores ambientales que influyen en su expresión (Tomado de Gulzar et al., 2020).

Auxinas, biosíntesis y señalización.

Las hormonas vegetales juegan un papel muy importante durante las diferentes etapas de ES y la variabilidad de la capacidad de inducción de diferentes tejidos se debe, en parte, a la concentración y señalización de reguladores del crecimiento vegetal. En la mayoría de las especies, la auxina, la citoquinina, el ácido abscísico (ABA) y el ácido jasmónico (AJ) son factores clave que desencadenan la respuesta embriogénica, ya que tienen un efecto regulador sobre el ciclo celular, la división y la diferenciación (Gulzar et al., 2020).

Las auxinas regulan procesos importantes de crecimiento y desarrollo de plantas, desde la embriogénesis hasta la vida adulta y reproductiva. Se ha establecido que las auxinas forman parte importante en el inicio de formación de embriones, los explantes con niveles más altos de auxina endógena son generalmente más sensibles a la inducción. El tratamiento de tejido cultivado *in vitro* con auxinas da como resultado una extensa reprogramación del transcriptoma de células somáticas, lo que implica la modulación de numerosos factores de transcripción asociados con ES. Una vez inducida la ES, los niveles de auxinas se ven disminuidos, para permitir el establecimiento de la polaridad celular y/o tisular y el desarrollo del embrión (Wojcik et al., 2020; Fehér, 2019). La distribución espacial de auxinas controla de manera importante el crecimiento y desarrollo de las plantas, concentraciones máximas locales de auxina se observan en la iniciación del primordio de hojas y flores, así como en la formación de raíces laterales. La auxina promueve el crecimiento y la división celular, lo que lleva al desarrollo de órganos. La distribución de auxinas dentro de los tejidos vegetales está regulada por vías de biosíntesis, transporte y señalización que desencadenan respuestas transcripcionales amplias y específicas (Figura 3).

1) Biosíntesis de auxinas

El ácido indol 3-acético (IAA) es la auxina natural más abundante en plantas. El IAA se biosintetiza predominantemente a través de la vía del ácido indol 3-pirúvico (IPA), donde el triptófano se convierte en IAA a través de dos pasos enzimáticos secuenciales. En el paso inicial, tres aminotransferasas codificadas por la familia de genes *RELACIONADOS CON LA TRIPTÓFANO AMINOTRANSFERASA DE ARABIDOPSIS1/TRIPTÓFANO AMINOTRANSFERASA* (TAA1/TAR) producen IPA a partir de triptófano en *Arabidopsis*. Posteriormente, el IPA sufre una descarboxilación oxidativa catalizada por la familia *YUCCA* (YUC) de monooxigenasas de flavina para producir IAA (Figura 4). Esta ruta de biosíntesis de auxina de dos pasos está altamente conservada en todo el reino vegetal y es esencial para casi todos los principales procesos de desarrollo (Fukui y Hayashi , 2018; Zhao., 2014).

2) Transporte de auxinas

Luego de ser sintetizada, la auxina IAA se transporta a su sitio de respuesta. El transporte polar de auxinas modula la distribución local de auxinas para formar un gradiente asimétrico de concentración de auxinas que regula el crecimiento trópico, el desarrollo embrionario, la formación de raíces laterales y el desarrollo vascular y de raíces. Para el transporte de eflujo de auxina, los transportadores de eflujo PIN y los transportadores de la subfamilia ATP-BINDING BINDING CASSETTE CLASS B/*MULTIDRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN (ABCB/MDR/PGP)* (ABCB/MDR/PGP) regulan de manera coordinada la dirección y la velocidad del flujo de auxina intercelular, estas proteínas transportadoras localizadas en el RE facilitan el movimiento de auxina intracelular entre el citosol y el RE para regular la homeostasis de la auxina.

3) Señalización de auxinas

La vía de señalización de la auxina nuclear consta de un pequeño número de componentes centrales y cada componente está representado por una gran familia de genes. Por lo tanto, la construcción modular de la vía puede producir diversos resultados transcripcionales según el contexto celular y ambiental. Los componentes centrales de la maquinaria de señalización de auxinas pertenecen a tres familias de proteínas: los correceptores de auxinas F-box *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALLING F-BOX PROTEIN* (TIR1/AFB), los correceptores de auxinas *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* (Aux/IAA) que son represores transcripcionales, y los factores de transcripción *FACTOR DE RESPUESTA A AUXINA (AUXIN RESPONSE FACTORS, ARF)* (Fukui y Hayashi, 2018; Lavy y Estelle, 2016). A bajos niveles de auxinas, los represores AUX/IAA forman heterodímeros con los ARF inhibiendo su actividad, sin embargo, al percibir un aumento de auxina, las proteínas TIR1/AFB se unen a AUX/IAA y median su ubiquitinación para dirigirlos al proteosoma y promover su degradación. De esta manera, las proteínas ARF se liberan de su inhibidor para actuar como factores de transcripción sobre los promotores de genes de respuesta a auxina.

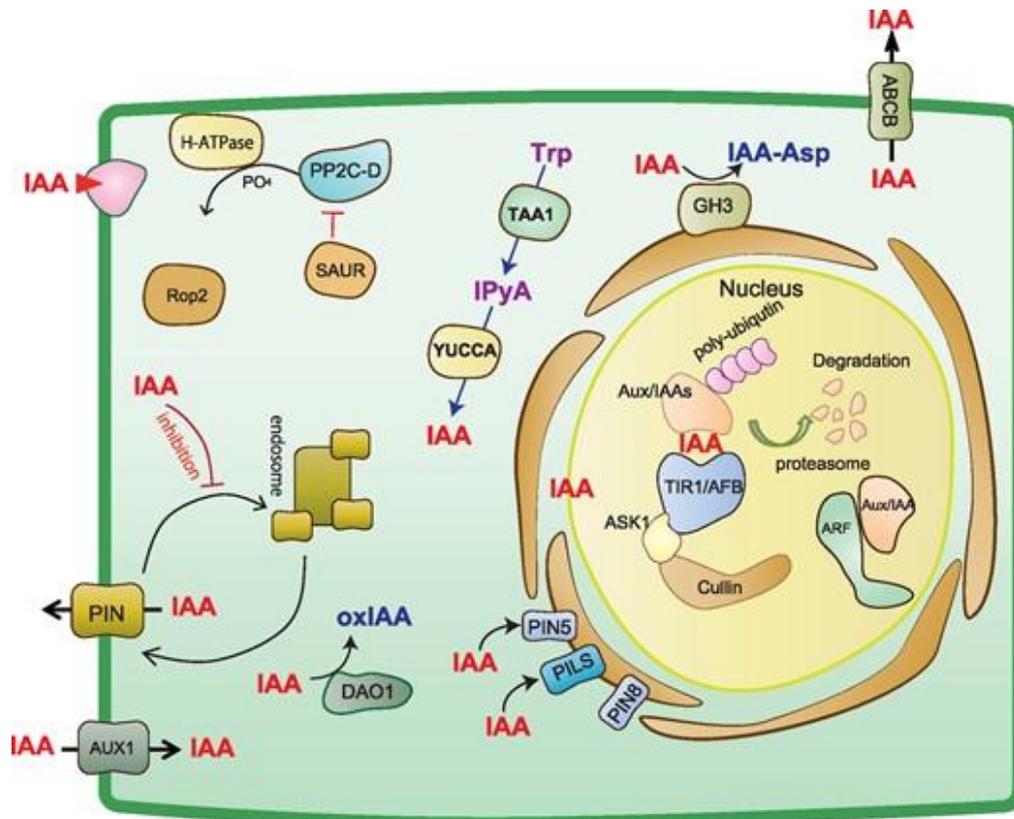


Figura 3. Biosíntesis, transporte y señalización de auxinas. El IAA se biosintetiza a partir de triptófano (Trp) a través del ácido indol 3-pirúvico (IPyA) por TAA1 y YUCCA en la vía IPyA. IAA es incorporado por los simportadores AUX1/LAX1 y exportado por las proteínas PIN y ABCB. Las proteínas transportadoras PIN y PILS localizadas en ER regulan la homeostasis del IAA celular. La auxina bloquea la endocitosis de PIN mediada por clatrina de la membrana plasmática. El complejo SCF TIR1/AFB, ubiquitina ligasa E3 está compuesto por SKP (ASK1), cullina y proteína F-box (TIR1/AFB). La auxina induce la ubiquitinación de proteínas Aux/IAA a través de SCF TIR1/AFB. La degradación del represor Aux/IAA recupera la actividad ARF para activar la transcripción de genes sensibles a auxina. Las proteínas SAUR inducidas por auxina inhiben las fosfatasa PP2C-D, lo que da como resultado la activación de H⁺-ATPasa para inducir una respuesta rápida de auxina, como el crecimiento inducido por turgencia. El IAA se convierte en IAA-aspartato (IAA-Asp) por la enzima GH3 inducida por auxina IAA-aminoácido conjugado sintasa. El IAA se oxida a 2-oxo-IAA (oxIAA) por la dioxigenasa DAO1. (Tomado de Fukui y Hayashi, 2018).

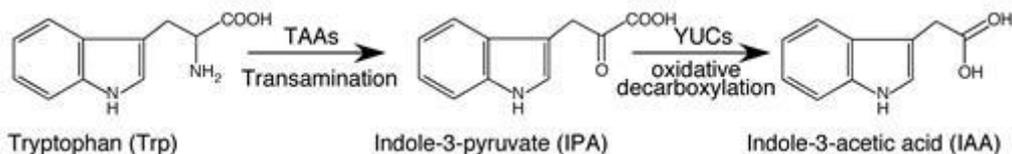


Figura 4. Biosíntesis de la auxina IAA dependiente de triptófano. (Tomado de Zhao, 2014).

Regulación de la expresión génica en plantas.

Una estrategia clave de las plantas para hacer frente a los diferentes cambios en el ambiente es la regulación en los niveles de expresión en respuesta a factores de estrés. La regulación de expresión génica en plantas se da a través de diferentes procesos moleculares que intervienen en diferentes etapas de la vida del mRNA, como lo es la transcripción, procesamiento, empalme alternativo, transporte, traducción, almacenamiento y descomposición (Petrillo et al., 2014). En la Figura 5 se ilustran los distintos niveles de regulación de la expresión génica.

Muchos elementos reguladores presentes en el genoma de las plantas modulan la expresión génica a través de interacciones con proteínas reguladoras. Los elementos reguladores que actúan como secuencias de DNA se clasifican como *cis* mientras que las proteínas reguladoras específicas que interactúan con las secuencias *cis* y otras proteínas asociadas pertenecen a la clase *trans*. Las secuencias reguladoras de las plantas se ubican en la cadena de DNA codificante antes del sitio de inicio de la transcripción: promotores, potenciadores, silenciadores y aislantes, o en la región transcrita en el caso de regulación postranscripcional: 5'cap, cola de poli-A, secuencias señal. Diferentes análisis indican que la variación en elementos reguladores *cis* tuvo importancia en la domesticación de plantas y pueden ser objetivos interesantes para la edición del genoma para crear nuevos alelos para el mejoramiento de plantas (Bilas et al., 2016; Swinnen et al., 2016).

Dentro de los elementos *trans* encontramos aquellas proteínas denominadas factores transcripcionales, que interactúan con promotores, silenciadores y activadores alterando la transcripción. Aquellos que incrementan la actividad transcripcional se denominan activadores, mientras que los que la disminuyen son represores. Aunque los mecanismos de transcripción en eucariotas son similares en general, los componentes pueden variar entre los diferentes reinos. En este sentido, los factores de transcripción (TF) juegan un papel muy importante en la transducción de señales e interactúan con las secuencias reguladoras *cis*, modulando así la expresión de una serie de genes involucrados en diversos procesos en plantas. Otros elementos que actúan en *trans* son subunidades de la RNA polimerasa II y proteínas que se unen a esta para estabilizar el complejo de iniciación de la transcripción. Recientemente se han reportado moléculas de RNA cerradas covalentemente denominados RNAs circulares (circRNA) que pueden unirse a los genes en su locus de síntesis y causar una pausa o terminación transcripcional a través de la formación de híbridos de RNA-DNA, pueden también actuar como esponjas de microRNAs, regulando al alza los mRNA diana y también se ha reportado su interacción con ribosomas que le permiten regular la traducción (Figura 5) (Zhou et al., 2020).

Del mismo modo, la regulación a nivel epigenético es muy relevante en plantas, todos los principales mecanismos epigenéticos que se sabe que ocurren en los eucariotas son utilizados por las plantas, con las vías responsables elaboradas en un grado que no es superado en otros taxones. Estos mecanismos de regulación engloban modificaciones postraduccionales de histonas, metilación de DNA y compactación de la cromatina. El nivel de compactación de la cromatina es dinámicamente regulado, y constituye un punto de control para el acceso y reclutamiento de factores para la replicación, reparación y transcripción del DNA. La cromatina presenta dos conformaciones principales que determinan la accesibilidad a la transcripción: heterocromatina y eucromatina. La heterocromatina es muy condensada y compacta, donde la expresión de genes es muy pobre o nula debido al superenrollamiento que ocurre a causa de modificaciones represivas de histonas (trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 – H3K27me3 – o desacetilación de lisinas en las colas de histonas) y el reclutamiento de complejos silenciadores, mientras que la eucromatina es más laxa, se caracteriza por acetilación de lisina en histonas y permite el reclutamiento de la RNA polimerasa y proteínas que conforman los complejos transcripcionales (Pikaard y Mittelsten Scheid, 2014).

Por otro lado, la regulación postranscripcional también es crucial para la respuesta al estrés en plantas. El splicing alternativo, transporte y/o degradación del mRNA es regulado por diferentes complejos proteicos y moléculas como los RNAs pequeños de bajo peso molecular, estas últimas muestran funciones especializadas a nivel postranscripcional (degradación de RNA y represión traduccional) o transcripcional (silenciamiento génico por metilación de DNA). La gran versatilidad de sus funciones permite a las plantas defenderse contra virus y transgenes, ejercer programas clave del desarrollo y contender con diversos tipos de estrés biótico o abiótico (Dinkova y Juárez-González, 2016).

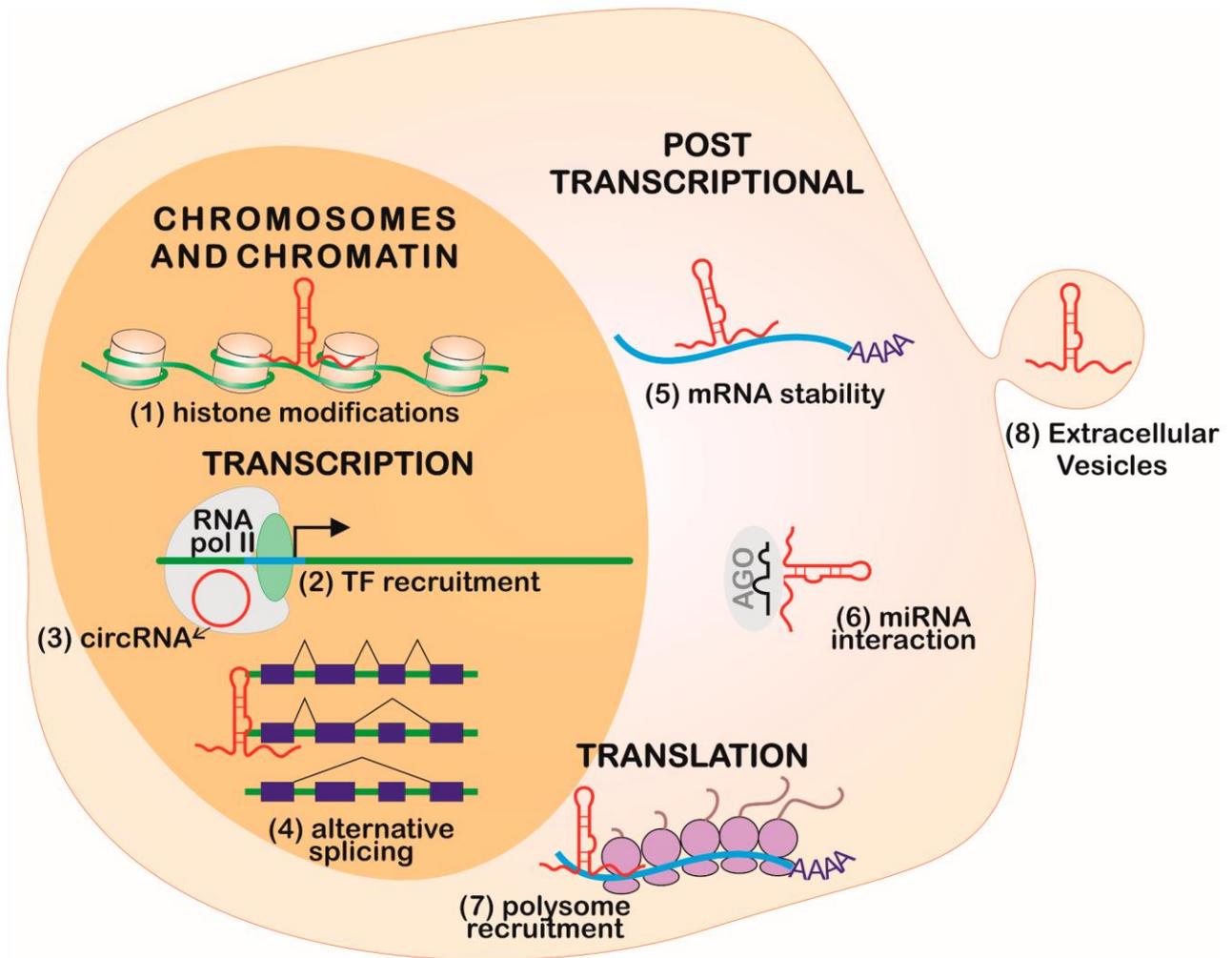


Figura 5. Niveles de control de la expresión génica. (1) cromatina y condensación cromosómica a través de modificaciones de histonas, (2) reclutamiento directo de factores de transcripción (TF), (3) unión a la RNA polimerasa (pol) II, (4) empalme alternativo de intrones, (5) estabilidad del mRNA, (6) regulación por microRNAs, (7) reclutamiento de polisomas y (8) modulación de la expresión génica en células vecinas a través del empaquetamiento en vesículas extracelulares (Tomado de Fernandes et al., 2019).

Factores de transcripción en plantas.

Los TFs son proteínas que interactúan directamente con secuencias de DNA ubicadas en regiones promotoras. Algunas familias de factores de transcripción están presentes en la mayoría de los eucariotas, mientras que otras son específicas de ciertos linajes, lo que sugiere que son adquisiciones más recientes. Una característica fundamental de estas proteínas es que contienen un dominio que se une a secuencias específicas del DNA, estos dominios se nombran según sus características estructurales y la mayoría de los organismos tienen varios factores de transcripción que comparten el mismo tipo de dominio de unión al DNA. La actividad represora o activadora es llevada a cabo, en muchos casos, por dominios proteicos independientes al dominio de unión a DNA, además, esta funcionalidad también puede depender de su interacción con otros componentes de la maquinaria de transcripción, lo cual involucra interacciones proteína-proteína ya sea con moléculas diferentes (heterodímeros) o idénticas (homodímeros). Estas interacciones se logran a través de dominios de interacción que pueden promover cambios conformacionales y dar estabilidad al complejo transcripcional. También, pueden tener dominios que permiten la unión de moléculas de señalización. La actividad de los TFs se puede ver afectada por diferentes señalizaciones que regulan su localización, estabilidad o interacciones en la célula.

Las características generales de la transcripción en las plantas son similares a las de otros eucariotas. En consecuencia, muchas familias de factores de transcripción de plantas también están presentes en hongos y animales, lo que sugiere que son adquisiciones antiguas. Las características de las diferentes familias de factores de transcripción vegetales, así como su papel en la regulación transcripcional de diferentes procesos, hacen del estudio de los TFs vegetales una vía necesaria para entender la función de la planta a nivel molecular (González, 2016).

Existen diversos factores transcripcionales que están relacionados con la respuesta a diferentes tipos de estrés en plantas. Además, las familias de factores transcripcionales pueden regular varios procesos vegetales diferentes, por ejemplo, la familia WRKY se ha estudiado en las regulaciones de defensa de las plantas bajo estrés biótico, abiótico, mediación de la respuesta inmunitaria, latencia y germinación de semillas (Rushton et al., 2010). La familia de proteínas APETALA2/*Ethylene Response Factor* (AP2/ERF) se ha estudiado ampliamente en la mediación de las respuestas al estrés mediante su participación en la biosíntesis de metabolitos secundarios como los alcaloides de indol terpenoides (TIA), nicotina y nornicotina en el tabaco, saponinas, entre otros. Los TFs pertenecientes a la familia bHLH (basic helix-loop-helix) han sido estudiados como potenciales reguladores de mecanismos de respuesta al estrés en plantas, involucrados en la biosíntesis de flavonoides y antocianinas mediante la regulación de la ruta de los fenilpropanoides. Muchos metabolitos secundarios que poseen propiedades farmacológicas importantes, como la tanshinona y la artemisinina, están regulados por la familia de factores de transcripción bZIP,

además están relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios antipatógenos (Meraj et al., 2020).

Ya que el proceso de ES involucra una reprogramación de células altamente compleja, se han reportado diferentes factores transcripcionales involucrados en la inducción y desarrollo de embriones somáticos en diferentes especies de plantas. Análisis de transcriptomas relacionados con ES indican que genes que codifican a factores de transcripción pertenecientes a familias como MYB, MADS, AP2/ERF, bHLH, C2H2, WRKY, NAC, HB, LEC, WUS, AGL, entre otras, participan en la inducción de ES en diferentes especies. Se ha encontrado que los TFs involucrados en la ES participan en la regulación transcripcional de las respuestas hormonales y de estrés, así como controlan procesos de desarrollo de las plantas, predominantemente el desarrollo de embriones y flores. Entre estos, se incluyen los reguladores centrales de la señalización por auxinas, los genes AUX/IAA y ARF, ya se definió antes. Mutantes de algunos miembros de estas familias en *Arabidopsis thaliana* presentan defectos sustanciales en la respuesta embriogénica. También, se han observado cambios en la expresión de estos factores transcripcionales durante la inducción de ES en arroz, algodón, maíz, *Cyclamen persicum* y *Gossypium hirsutum*. Debido al gran número de integrantes de estas familias en plantas, el conocimiento sobre las funciones particulares de los ARF en diferentes procesos de desarrollo es aún fragmentario (Nowak y Gaj M, 2016).

Factores de respuesta a auxinas (ARF).

Los genes cuya expresión cambia en respuesta a gradientes de auxina se transcriben en un tiempo y espacio diferentes a lo largo de las distintas etapas de desarrollo de las plantas. Esta transcripción se ve regulada al alza o a la baja por TFs pertenecientes a la familia ARF, los cuales se unen a elementos de respuesta a auxinas TGTCTC (AuxRE) en los promotores de genes que responden a estas hormonas. Las proteínas ARF presentan un dominio N-terminal de unión a DNA (DBD) tipo B3 que reconoce al elemento AuxRE (Figura 6). Los DBD de tipo B3 también se encuentran en otros TFs de plantas que funcionan fuera de la vía de respuesta a auxina. Árboles filogenéticos realizados únicamente con alineamiento de secuencias del dominio DBD B3 de ARF son similares a los realizados con proteínas ARF completas, lo que plantea la posibilidad de que las variaciones en este dominio contribuyan a las distintas propiedades de los ARF (Guilfoyle y Hagen, 2007; Boer et al., 2014).

Además del DBD B3, los ARF comparten un dominio medio de regulación (MR) el cual presenta ciertas variaciones de aminoácidos en diferentes miembros de la familia, que han permitido distinguir a ARFs que actúan como activadores de aquellos que actúan como represores transcripcionales (Figura 6). Un dominio de activación, AD, contiene residuos de glutamina (Q),

serina (S) y leucina (L), mientras que un dominio de represión, RD, se encuentra enriquecido en serina (S) y, en algunos casos, prolina (P), leucina (L) y/o glicina (G). Sin embargo, esta observación aún no ha ido más allá de una correlación, y no está claro qué mecanismos subyacen a la activación o represión transcripcional (Guilfoyle y Hagen, 2007).

Algunos ARF comparten una región de dimerización C-terminal denominada PB1, conformada por los dominios III y IV que les permiten interactuar con las proteínas inhibidoras AUX/IAA (Figura 6). Tanto ARF, como AUX/IAA contienen un dominio de interacción proteína-proteína PB1 (Phox y Bem1) similar (anteriormente denominado dominio III/IV o dominio III y dominio IV) que facilita la formación de dímeros ARF-ARF, ARF-Aux/IAA, y Aux/IAA-Aux/IAA (Figura 7B). La interacción ARF activador-Aux/IAA facilita la represión de los genes de respuesta de auxina cuando las concentraciones de auxina en una célula son bajas (Figura 7A) (Guilfoyle, 2015).

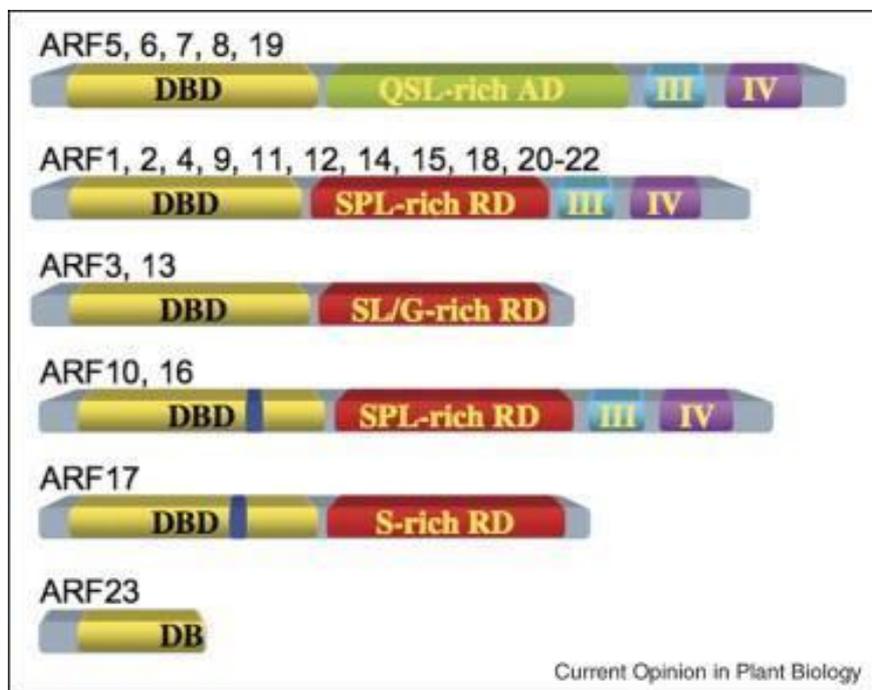


Figura 6. La familia ARF en *Arabidopsis thaliana*. La familia ARF consta de cinco activadores transcripcionales (ARF5–8 y 19) con un AD enriquecido en glutamina (Q), serina (S) y leucina (L). Se cree que el resto de los miembros de la familia ARF consiste en represores transcripcionales con un RD que suele estar enriquecido en serina (S) y, en algunos casos, prolina (P), leucina (L) y/o glicina (G); sin embargo, hasta la fecha, solo se ha demostrado experimentalmente que ARF2–4 y 9 funcionan como represores y contienen un RD activo en ensayos de transfección de protoplastos de plantas. Todos los ARF contienen un DBD conservado; sin embargo, el DBD en ARF10, 16 y 17 contiene entre 32 y 36 residuos adicionales (indicados en azul dentro del DBD), y ARF23 contiene solo un DBD truncado. ARF3, 13 y 17 carecen del CTD conservado que se encuentra en la mayoría de los ARF, responsable de la interacción con Aux/IAA (Tomado de Guilfoyle y Hagen, 2007).

El efecto de gradientes de auxina en plantas se divide en tres partes: percepción, señalización y respuesta. La percepción de un máximo de auxina se logra a través de la proteína receptora TIR1/AFB y su unión a Aux/IAA (Figura 7B). Las proteínas TIR1/AFB son subunidades del complejo ubiquitin ligasa E3 SCF (del inglés “S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 1-CULLIN 1-F-BOX”) y promueven la degradación de Aux/IAA en presencia de auxina elevada (señalización). Esto promueve la liberación de ARFs activadores y la transcripción de genes diana con AuxRE en promotores como respuesta a la auxina.

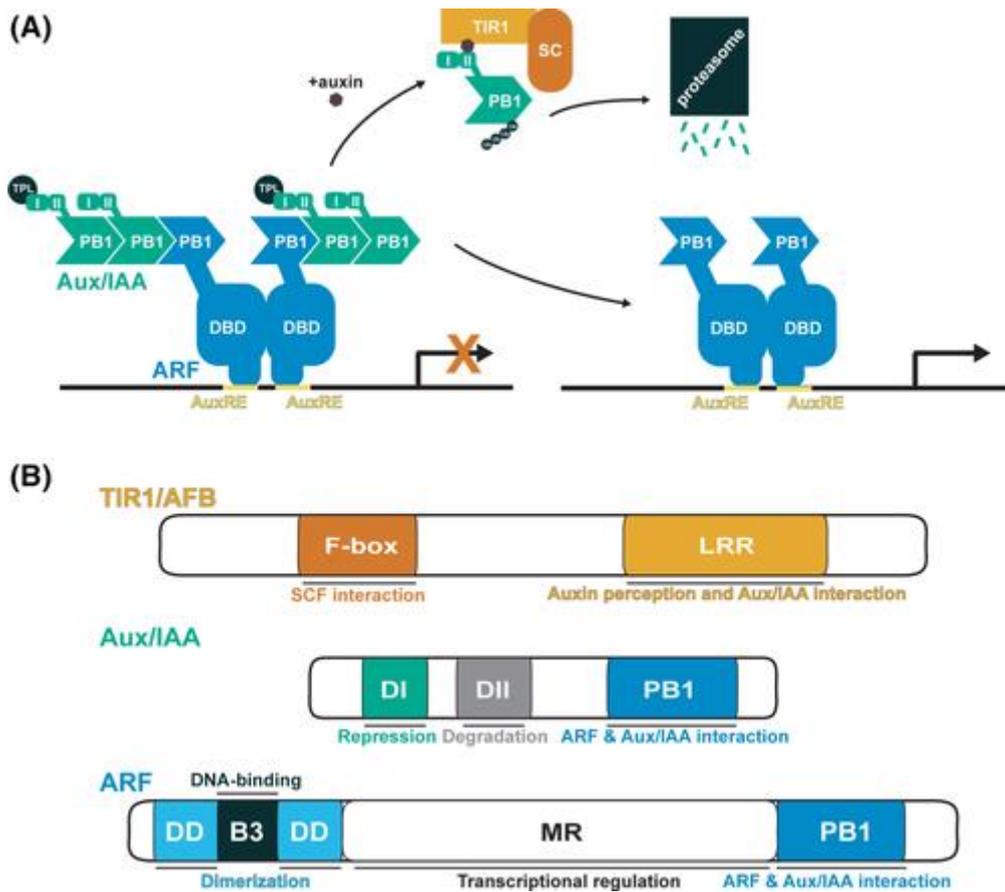


Figura 7. Señalización de auxinas a través de la vía SCF TIR1/AFB. (A) En el modelo de señalización de auxina, las proteínas represoras de auxina/indol-3-ácido acético (Aux/IAA) interactúan y reprimen la transcripción mediada por el factor de respuesta de auxina (ARF). En presencia de auxina, la respuesta del inhibidor de transporte 1 (TIR1) forma un complejo de co-receptor con Aux/IAA y lo dirige para su degradación. Tras la degradación de Aux/IAA, el factor de transcripción ARF media la transcripción sensible a auxina. (B) Esquema de las estructuras de los dominios de los componentes de señalización y su función en la regulación de la respuesta de las auxinas. (Tomado de Powers y Strader, 2020).

Debido a que los ARF son componentes clave en la respuesta a auxinas, activando o reprimiendo la transcripción de una gran cantidad de genes en tejidos específicos, ha sido de interés conocer su importancia en la evolución de plantas terrestres. En 2013 Finet y col. realizaron un análisis filogenético que comprendió 224 secuencias de proteínas relacionadas con ARF que representan todas las principales divisiones vivas de las plantas terrestres y encontraron que todas se distribuyen en tres subfamilias (A, B y C), donde eventos repetidos de duplicación de genes contribuyeron a la expansión de esas subfamilias originales (Figura 8A). No se detectó el dominio ARF AD/RD en varios carófitos, los parientes acuáticos más cercanos de las plantas terrestres, a pesar de la presencia de los dominios B3, III y IV, por lo que se infiere que el dominio medio de los ARF es una innovación de plantas terrestres. Además, gran parte de la diversificación de estas proteínas es debido a truncamiento genómico y empalme alternativo (Figura 9). Los truncamientos genómicos, que dan como resultado proteínas con carencia del dominio PB1, están restringidos a los clados B y C pero ocurren independientemente en diversos taxones, estos ARF carecen de dominios de interacción con Aux/IAA, lo cual se sugiere que podría intervenir en la funcionalidad de las proteínas. La estructura de la familia ARF en las plantas con semillas ha sido moldeada principalmente por duplicaciones anteriores a la radiación de las angiospermas. En la filogenia mostrada en la Figura 8B, 9 de las 13 subfamilias actuales aparecieron después de la divergencia de las gimnospermas, además, el patrón de duplicación observado en la familia ARF coincide notablemente bien con la ocurrencia de duplicaciones del genoma completo durante la evolución de las plantas con semillas.

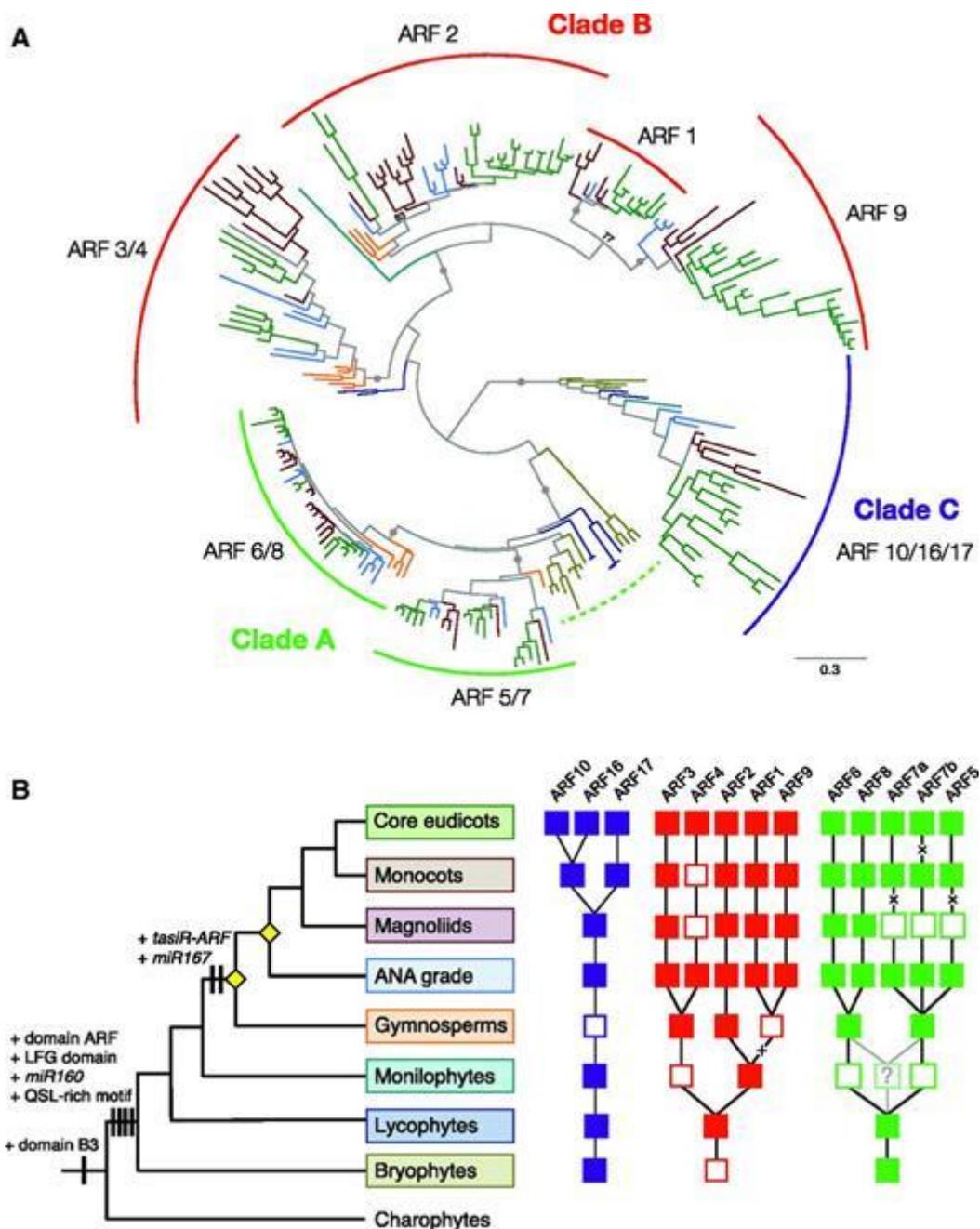


Figura 8. Filogenia y estructura de genes ARF en plantas terrestres. (A) Filograma de los 224 taxones. Los resultados obtenidos a través de análisis de máxima verosimilitud y bayesianos se realizaron utilizando una mezcla de LG+ Γ 4 y C20, respectivamente. Los bloques seleccionados utilizados para la reconstrucción filogenética abarcan el dominio B3, el dominio ARF y los dominios III y IV. La barra de escala indica el número de cambios por sitio. (B) Origen evolutivo de los principales dominios ARF estructurales y reguladores. Los cuadrados rellenos indican la presencia de datos genómicos, los cuadrados abiertos indican la falta de datos, las líneas punteadas indican hipótesis alternativas y los rombos amarillos indican un evento de duplicación del genoma completo. (Tomado de Finet et al., 2013).

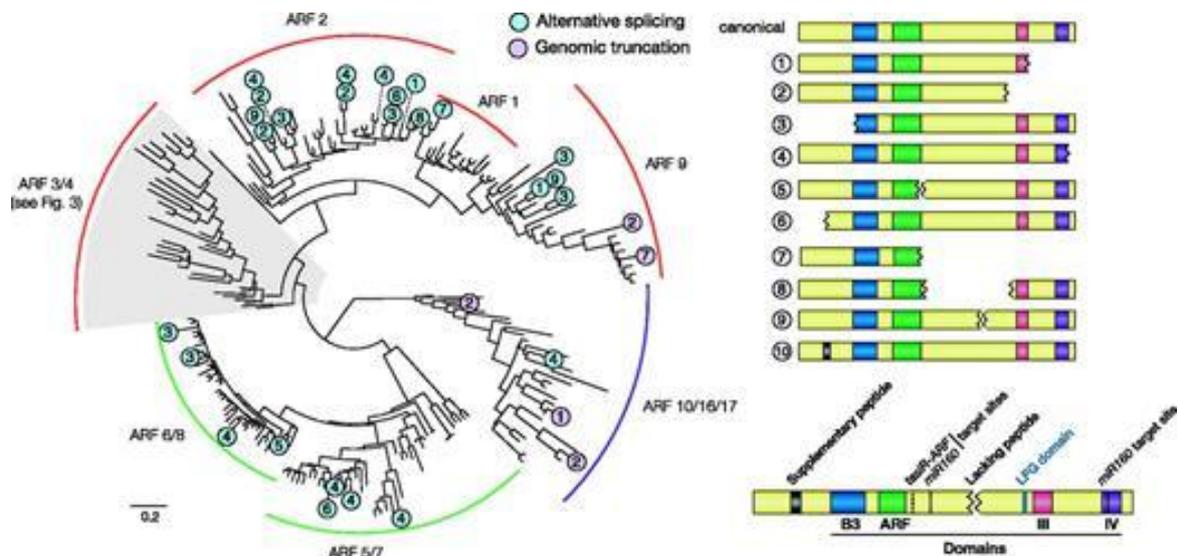


Figura 9. Diversidad estructural de proteínas ARF en plantas terrestres. (Panel izquierdo) Los casos identificados de empalme alternativo (verde) y truncamiento genómico (violeta) se mapean en el árbol filogenético ARF obtenido en la Figura 8. (Panel derecho) Las variantes de las estructuras de la proteína ARF se predicen a partir de las variantes transcripcionales principales de ARF. (Tomado de Finet et al., 2013).

Se ha resuelto la estructura a partir de cristales, tanto para el DBD como para el dominio C-terminal, pero el MR no ha sido explorado estructuralmente. Se sabe que grandes fracciones de proteomas de eucariotas contienen desorden intrínseco (ID). El ID se caracteriza por la falta de estructura tridimensional estable y grandes tramos de residuos de aminoácidos cargados y polares. La mayoría de proteínas que contienen este desorden están relacionadas con procesos como el ciclo celular, el metabolismo del DNA, el empalme del RNA y la señalización, además se ha observado que la mayoría de las regiones ID en los factores de transcripción se encuentran dentro de los dominios reguladores de la transcripción. El genoma de *Arabidopsis* codifica 23 ARF que se dividen en las tres subclases A, B y C. Un análisis bioinformático utilizando el algoritmo de predicción desordenada PONDR-FIT (Xue et al., 2010) mostró un alto grado de desorden en el dominio medio de regulación de los ARF de clase A, mientras que en la clase B/C no se observa este desorden (Figura 10) (Roosjen et al., 2018).

En 2019, Powers y col. demostraron que dos ARF activadores de *A. thaliana* (AtARF7 y AtARF19) en tejidos radiculares con respuestas amortiguadas de auxina forman ensamblajes con localización citoplasmática denominados como condensados de proteínas ARF no estequiométricas que se forman de manera dependiente de la concentración de auxina. Una lisina conservada (K962) y un grupo de residuos cargados negativamente en el dominio PB1 de los AtARF conducen a asimetrías en los potenciales electrostáticos superficiales que impulsan las interacciones del dominio ARF-ARF y la formación de multímeros. Además, encontraron que la región media intrínsecamente desordenada de estos ARF también es fundamental en la formación de estos condensados citoplasmáticos. La interrupción de la formación de estos condensados citoplasmáticos da como resultado defectos morfológicos y una respuesta transcripcional alterada de las auxinas, lo que

sugiere un modelo en el que la partición nucleocitoplasmática del ARF mediada por este mecanismo regula las respuestas transcripcionales de las auxinas en una célula específica.

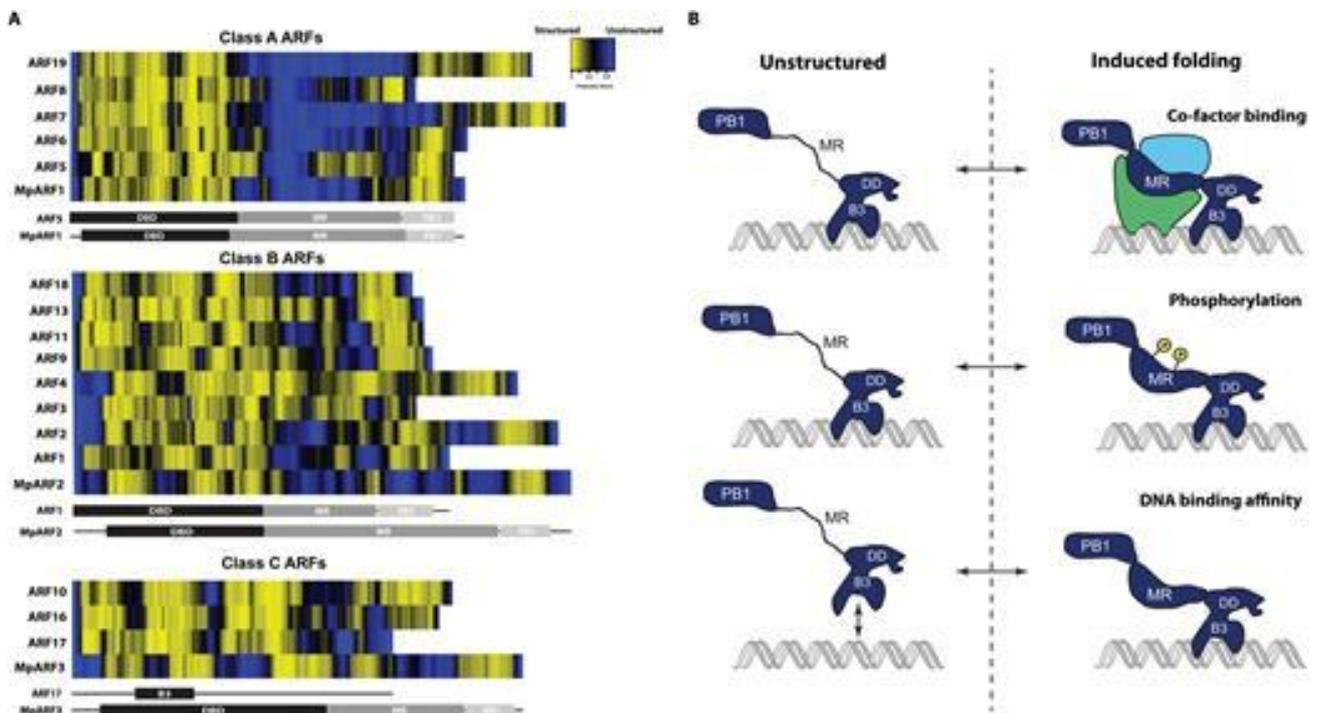


Figura 10. Desorden intrínseco en la región media de ARF. (A) El desorden previsto en la región media parece ser una característica prominente y conservada en los ARF "activadores" de clase A. Las secuencias de proteína ARF de longitud completa de *Arabidopsis*, así como las de *Marchantia polymorpha* (MpARF), se usaron como entrada en la herramienta de predicción de trastornos DisProt usando el algoritmo PONDR-FIT (Xue et al. , 2010). Los valores desordenados se visualizaron en R para generar un mapa de calor utilizando el paquete gplot con la función estándar heatmap.2. Las ubicaciones de los dominios se recuperaron de UniProt. (B) Las regiones desordenadas pueden servir como un centro de señalización focal mediante la obtención de una estructura inducida con cofactores, la modulación mediante modificaciones postraduccionales o la ayuda en la afinidad/especificidad de unión al ADN. Abreviaturas: ARF, factor de respuesta de auxina; PB1, dominio C-terminal Phox y Bem1 ; MR, región media; DD, dominio de dimerización. (Tomado de Roosjen M. et al., 2018).

Alineamiento múltiple de secuencias

El alineamiento múltiple de secuencias corresponde a un conjunto de 3 o más secuencias de proteínas (o ácidos nucleicos) que se encuentran parcial o totalmente alineados en columnas a lo largo de su secuencia. Los residuos alineados pueden ser homólogos en el sentido evolutivo: que derivan de un ancestro común, o un sentido estructural: estos residuos de aminoácidos alineados tienden a ocupar posiciones que permiten tener una estructura tridimensional en particular. Aunque no existe un único alineamiento correcto para un conjunto de secuencias de proteínas, al carecer de datos estructurales de alta resolución para muchas proteínas, los datos a nivel de secuencia pueden otorgar mucha información.

Existen diversos métodos de alineamiento múltiple de secuencias que emplean algoritmos diferentes pero que comparten ciertas características, por ejemplo, en su mayoría emplean programación dinámica, un algoritmo que optimiza la resolución de un problema dividiéndolo en subproblemas, basándose en el hecho de que la solución más adecuada al problema en general depende de la solución óptima de cada subproblema. Estas soluciones son almacenadas para finalmente tener la solución óptima.

En el caso de alineamiento de secuencias, el algoritmo devolverá los alineamientos óptimos para el par de secuencias dado un esquema de puntuación que consiste en una matriz de puntuación de aminoácidos y penalizaciones asignadas para la apertura y extensión de huecos. Los alineamientos de secuencias por pares pueden abarcar toda la secuencia (alineamiento global) o solo ciertos fragmentos donde hay mayor conservación (alineamiento local). En el caso del alineamiento de 3 o más secuencias, estos algoritmos son optimizados. Existen métodos de alineamiento múltiple de secuencias exactos, progresivos, iterativos, basados en la consistencia y basados en la estructura.

Los más utilizados por emplear menor espacio y memoria computacional, son los basados en métodos progresivos e iterativos. MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation; Edgar, 2004) es un programa muy utilizado actualmente por su rapidez y alta confiabilidad. El programa primero realiza un alineamiento progresivo de pares de secuencias utilizando alineamiento global, con base en las similitudes de secuencia calcula una matriz de distancia Kimura y genera un árbol filogenético por el método UPGMA, las secuencias se añaden de manera progresiva al alineamiento siguiendo el orden de ramificación del árbol (Figura 11). MUSCLE mejora el árbol, se realiza otro alineamiento y otra matriz de distancia. El árbol guía se refina iterativamente mediante la partición sistemática del árbol para obtener subconjuntos; se

elimina un borde (rama) del árbol para crear una bipartición. Este método iterativo es rápido y aumenta la precisión del alineamiento múltiple de secuencias (Pevsner J., 2015).

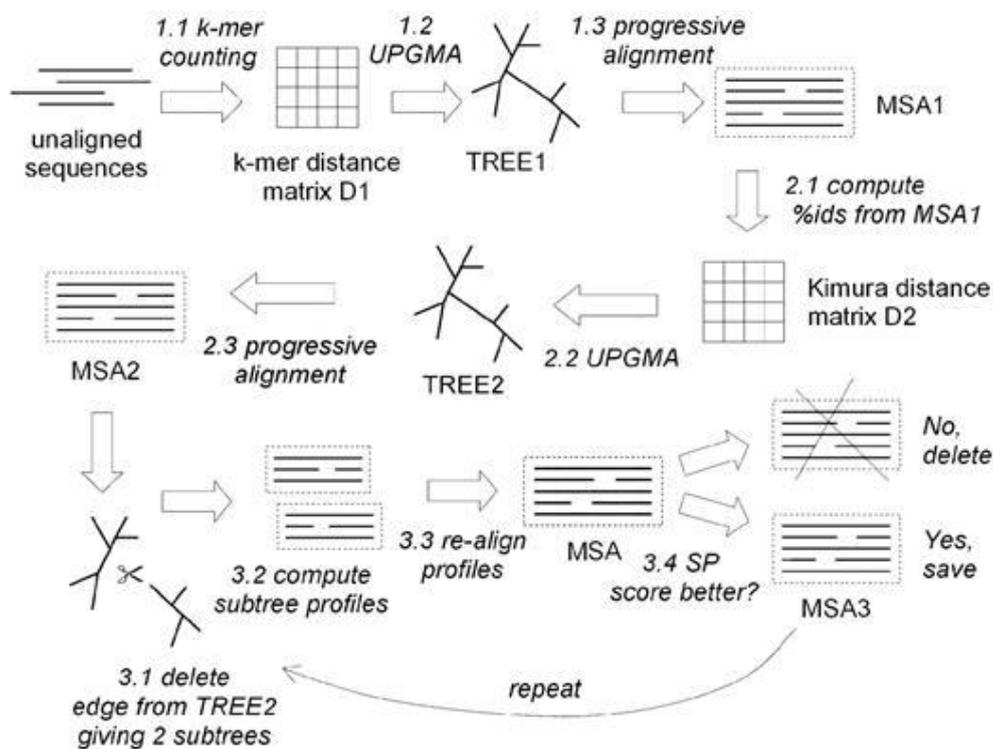


Figura 11. Diagrama de flujo del algoritmo MUSCLE. Hay tres etapas principales: Etapa 1 (borrador progresivo), Etapa 2 (progresivo mejorado) y Etapa 3 (refinamiento). Una alineación múltiple está disponible al final de cada etapa, momento en el cual el algoritmo puede terminar. (Tomado de Edgar, 2004)

Las inferencias de homología confiables requieren estimaciones estadísticas fiables. Las estimaciones estadísticas realizadas por BLAST, FASTA, SSEARCH y otros programas de búsqueda por similitud ampliamente utilizados son muy confiables. Si bien la homología se infiere del exceso de similitud entre las secuencias, y este exceso se reconoce a partir de estimaciones estadísticas (valores E), suele ser más oportuno describir la similitud en términos de "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad describe cuantos caracteres de las secuencias son exactamente idénticos. Cuanto mayor sea el porcentaje de identidad, más significativa será la coincidencia.

El valor E indica el número de aciertos o puntuaciones esperadas que podrían encontrarse por casualidad, por ejemplo, un valor E de 10 significa que se pueden encontrar hasta 10 coincidencias por casualidad, dado el mismo tamaño de una base de datos aleatoria. Así, mientras menor sea el valor E, las coincidencias en la base de datos serán de mayor calidad y confiabilidad.

La puntuación de bits mide la similitud de las secuencias, independientemente de la longitud de la secuencia de consulta y del tamaño de la base de datos. Es una puntuación normalizada en función de la puntuación del alineamiento por pares sin procesar. Cuanto mayor sea la puntuación de bits, mayor significativa será la coincidencia. Se considera que una puntuación de bit por debajo de 50, no es confiable.

Genes reporteros para monitorear la expresión génica en respuesta a estímulos.

Las moléculas reporteras son ampliamente utilizadas para poder visualizar la expresión de genes, la localización de proteínas u otras actividades celulares. Se aprovechan propiedades fisicoquímicas de las proteínas como la fluorescencia, luminiscencia o colorimetría para poder visualizar fácilmente la expresión del gen reportero.

El producto de un gen reportero es una enzima que cataliza una reacción química o bien, una proteína que emite fluorescencia. Un gen regulado por hormonas o su región sensible a hormonas se fusiona con el gen reportero, estas secuencias reguladoras pueden ser naturales o sintéticas. De esta forma, al aplicar el estímulo hormonal es posible observar la regulación a nivel transcripcional (Figura 12). En el estudio de plantas, se han descrito diversos reporteros basados en expresiones sintéticas y se generan docenas de útiles sensores de hormonas (Fernández-Moreno y Stepanova, 2020). Las construcciones que contienen fusiones con genes reporteros pueden ser transcripcionales o traduccionales. Las fusiones transcripcionales se utilizan en experimentos de análisis de promotores, cuyo extremo 3' está ubicado dentro de la región transcrita pero no traducida del gen, 5' respecto al codón de iniciación ATG del gen reportero, por lo que la transcripción del gen reportero está bajo el control del promotor introducido. En el caso de las fusiones traduccionales, el sitio de fusión se encuentra dentro de las regiones codificantes de los genes, es importante que se conserve el marco de lectura correcto en la unión de las dos regiones codificantes.

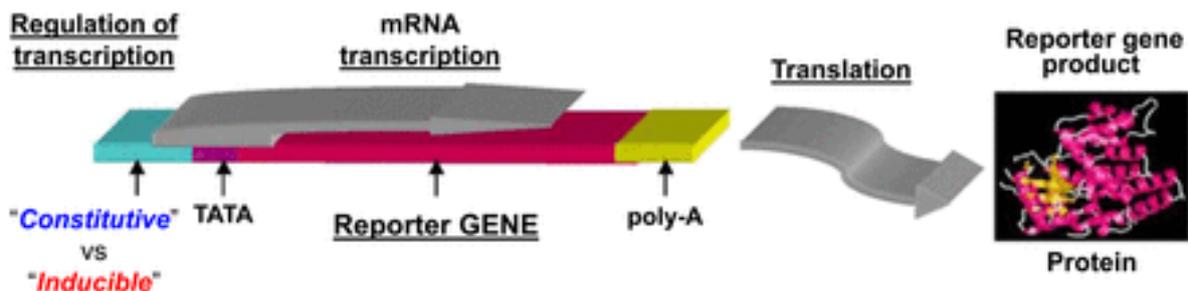


Figura 12. Ejemplo de un sistema reportero. Los genes reporteros se pueden clonar bajo el control de promotores constitutivos o inducibles. Los promotores constitutivos como CMV, el factor de elongación 1 α y otros siempre están "activados". Los promotores inducibles son activados por factores transcripcionales específicos y pueden funcionar como sensores genéticos moleculares endógenos. (Tomado de Serganova y Blasberg, 2019).

Ejemplos de genes reporteros.

El gen reportero GUS que codifica para la proteína GUS (β -glucuronidasa) de *Escherichia coli* se usa frecuentemente para el análisis de promotores involucrados en diferentes aspectos de la regulación de expresión génica, tales como regulación específica de tejido, desarrollo y regulación hormonal. La enzima β -glucuronidasa presenta diversos sustratos β -glucurónidos incoloros específicos o sustratos no fluorescentes, los metaboliza en productos coloreados o fluorescentes. Estos sustratos están disponibles comercialmente y permiten hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas de la actividad proteica y expresión génica. Además, la actividad enzimática de GUS está ausente en la mayoría de plantas, por lo que se pueden detectar niveles bajos de actividad en tejidos transformados. (Hull y Devic, 1995).

La proteína verde fluorescente (GFP) es otro reportero biológico utilizado ampliamente para estudios de expresión génica. Es sintetizada por la medusa *Aequorea victoria* y emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible. A diferencia de otros reporteros bioluminiscentes, el cromóforo en GFP es intrínseco a la estructura primaria de la proteína y su fluorescencia no requiere de algún sustrato o cofactor. La fluorescencia de GFP es estable, independiente de la especie y se puede controlar de forma no invasiva en células vivas o en organismos transparentes completos (Kain, et al., 1995). No obstante, los sistemas que incluyen GFP son menos sensibles que los sistemas indicadores basados en enzimas y requieren promotores potentes para impulsar la expresión suficiente para la detección, en particular en células de mamíferos y en sistemas de animales pequeños.

El gen lacZ, que codifica la enzima β -galactosidasa de *E. coli* (β -gal) también se emplea como gen reportero para estudiar numerosos sistemas vivos. Se han utilizado cuatro ensayos principales para la detección bioquímica de β -gal. Para los extractos proteicos, se recurre a ensayos espectrofotométricos y fluorométricos, mediante los cuales los compuestos incoloros son convertidos por β -gal en la célula transducida con indicador en productos de colores intensos que pueden medirse utilizando técnicas ópticas. Para las células completas, se emplea como sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-3-o-galactósido incoloro, que cambia a un color azul intenso después de la conversión por la enzima β -gal y permite la visualización de β -gal. Se ha desarrollado un ensayo de β -gal basado en clasificación de células activadas por fluorescencia que utiliza fluoresceína-di- β -D-galactopiranosido que brinda la capacidad de clasificar y analizar células según el nivel de expresión del indicador β -gal. El ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia es tanto cuantitativo como extremadamente sensible (~20 veces más sensible que la histoquímica de β -gal) (Serganova y Blasberg, 2019).

La luciferasa es otra proteína utilizada para estudiar la actividad transcripcional. Existen 3 clases de proteínas luciferasa: la de luciérnaga (*Photinus pyralis*) que utiliza luciferina como sustrato, oxidándola a oxiluciferina en una reacción que utiliza oxígeno molecular, ATP y libera luz a 560 nm; las luciferasas Renilla y Gaussia (de *Renilla reniformis* y el copépodo marino *Gaussia princeps*), en las que se usa coelenterazina como sustrato y O₂ como cofactor; y la luciferasa bacteriana, que está codificada por el operón *luxCDABE* que se obtiene comúnmente de *Photorhabdus luminescens*, *Vibrio harveyi* o *Vibrio fischeri*. La luciferasa bacteriana cataliza la oxidación del mononucleótido de flavina reducido (FMNH₂) y miristil aldehído a ácido mirístico y FMN, una reacción que libera luz a 490 nm (Botella et al., 2012).

Antecedentes.

La señalización de auxinas y la regulación de expresión de genes a través de los factores de respuesta a auxinas en la embriogénesis somática ha sido estudiada en diferentes especies de plantas. En 2017, Wojcikowska y Gaj, realizaron un análisis de expresión de genes ARF durante la embriogénesis somática en *Arabidopsis thaliana* utilizando la auxina exógena 2,4-D y embriones cigóticos inmaduros en la etapa cotiledónea tardía de desarrollo como explante. Observaron que 14 de los 23 ARF reportados en *A. thaliana* se transcriben a lo largo de la ES. La expresión de seis ARF (ARF5, ARF6, ARF8, ARF10, ARF16 y ARF17) estaba significativamente regulada al alza (Figura 13), mientras que la de otros cinco genes (ARF1, ARF2, ARF3, ARF11 y ARF18) estaban significativamente regulados a la baja (Figura 14) en los explantes inducidos en diferentes puntos de tiempo del cultivo embriogénico. Para explorar más a fondo la participación de los genes ARF en ES, analizaron mutantes de inserción de ARF en términos de su capacidad para la inducción de ES directa, donde observaron que la ausencia de ARF1, ARF5 y ARF7 resulta en una reducción significativa de la eficiencia y productividad de ES. Particularmente ARF5, que tuvo una transcripción sustancialmente disminuida y que al sobreexpresar este gen da como resultado un desarrollo defectuoso de las plantas, incluidas inflorescencias distorsionadas, que pueden terminar en puntas de inflorescencia en forma de alfiler y deficiente esterilidad de la planta.

En este estudio también se realizó un análisis espacio-temporal de expresión de los ARF en los embriones inmaduros inducidos utilizando líneas indicadoras GFP. La señal GFP se identificó en nueve líneas reporteras que monitoreaban la expresión de diferentes ARFs y en seis de ellas (ARF2, ARF3, ARF5, ARF6, ARF10 y ARF16) se detectó una señal reportera en las regiones del embrión involucradas en la inducción a ES (Figura 15).

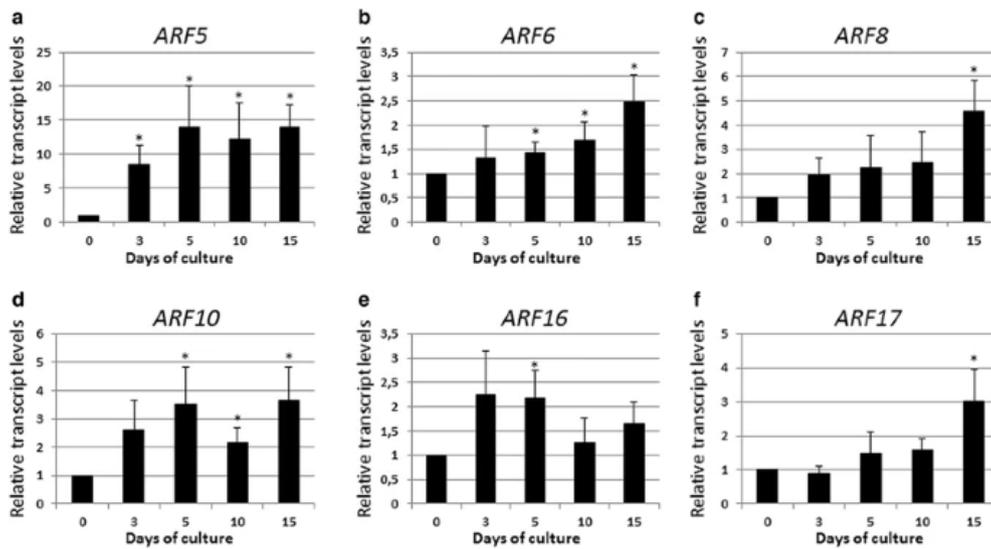


Figura 13. Niveles relativos de transcritos de ARF que aumentan durante la embriogénesis somática de *Arabidopsis thaliana*. ARF5 (a), ARF6 (b), ARF8 (c), ARF10 (d) ARF16 (e) y ARF17 (f) presentan expresión regulada al alza durante el proceso ES utilizando embriones cigóticos inmaduros como explante. Asterisco representa el nivel de expresión significativamente diferente ($P < 0.05$) al observado el día 0. Se muestran las medias y las desviaciones estándares de tres réplicas biológicas. (Tomado de Wojcikowska y Gaj, 2017).

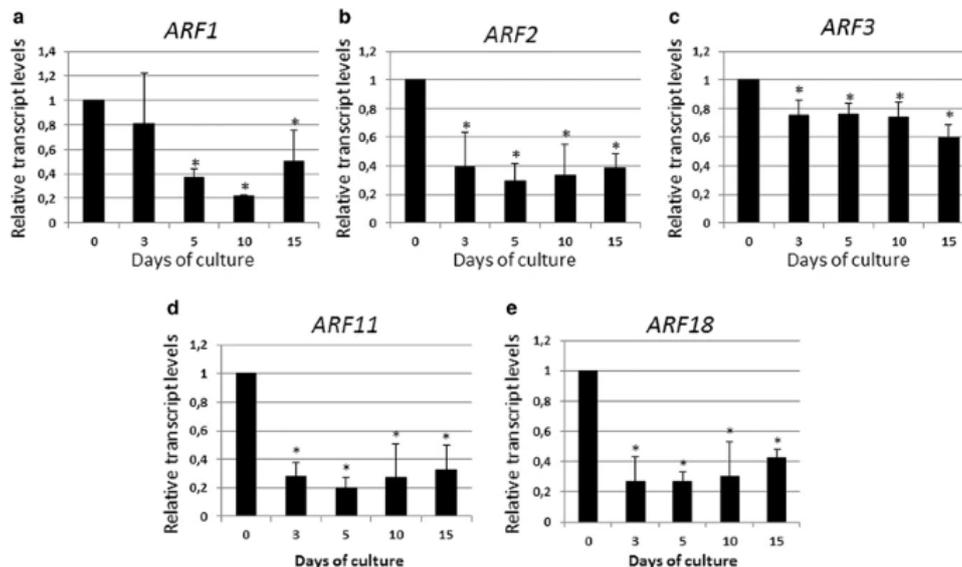


Figura 14. Niveles relativos de transcritos de ARF que disminuyen durante la embriogénesis somática de *Arabidopsis thaliana*. ARF1 (a), ARF2 (b), ARF3 (c), ARF11 (d) y ARF18 (e) presentan expresión regulada negativamente durante el proceso ES utilizando embriones cigóticos inmaduros como explante. Asterisco representa el nivel de expresión significativamente diferente ($P < 0.05$) al observado el día 0. Se muestran las medias y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. (Tomado de Wojcikowska y Gaj, 2017).

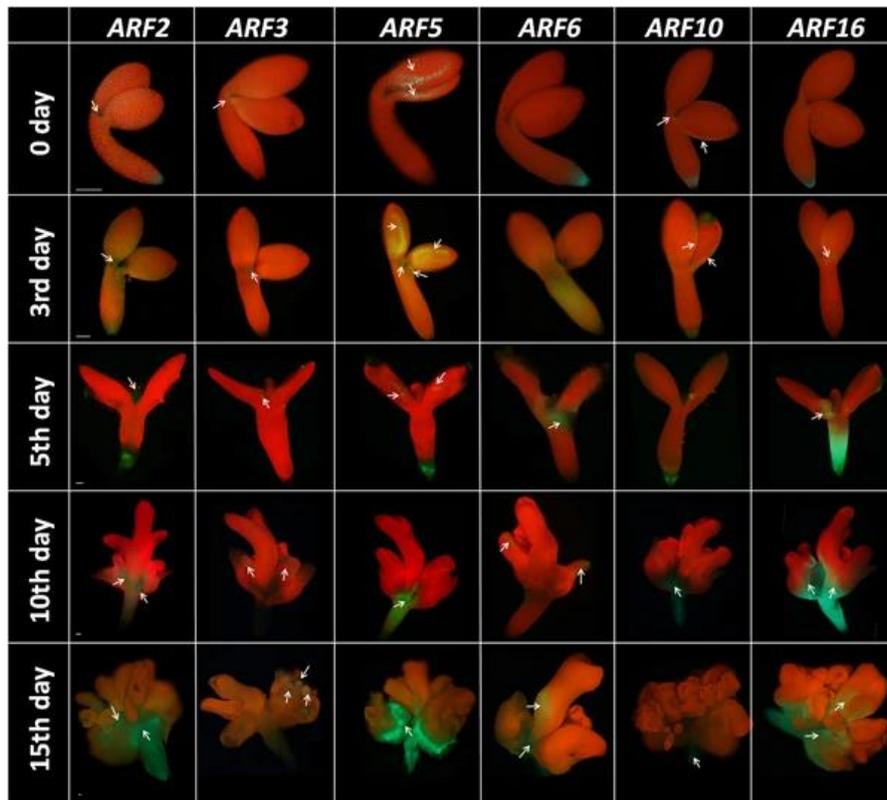


Figura 15. Localización espacio-temporal de ARFs de *Arabidopsis thaliana* durante la ES directa. Expresión de ARF2, ARF3, ARF5, ARF6, ARF10 y ARF16 monitoreada por GFP en los explantes que se habían cultivado durante 0, 3, 5, 10 y 15 días en un medio de inducción ES. La señal de GFP en las regiones de los explantes involucradas con ES se indica con una flecha. (Tomado de Wojcikowska y Gaj, 2017)

En 2021, Sims y col. analizaron la expresión de OsARF11, miembro de la familia ARF en *Oryza sativa* debido a su homología con ARF5 de *A. thaliana*. La evaluación fenotípica de organismos con sobreexpresión del gen OsARF11 (*osarf11^{TRIM}*) reveló que se producen menos raíces y más cortas así como hojas más cortas y menos anchas en comparación con el tipo silvestre. Del mismo modo los mutantes tenían una sensibilidad reducida a la formación de callo embriogénico mediada por auxina. Después de dos semanas en presencia de 2,4-D, las semillas de *osarf11^{TRIM}* presentaron reducción del 28 % y del 21 % en la incidencia de callos cuando fueron incubadas con 2,4-D 1 mg/L y 2 mg/L, respectivamente (Figura 16). OsARF11 está involucrado en el crecimiento mediado por auxinas de múltiples órganos y venas de las hojas, también parece desempeñar un papel central en la formación de meristemos de raíz lateral, rama de panícula y grano.

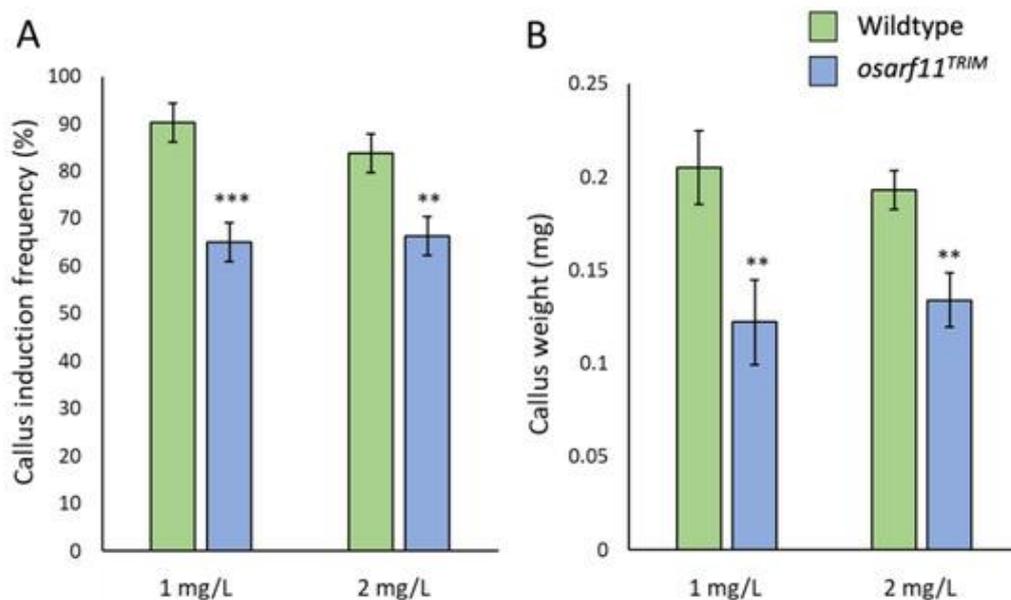


Figura 16. Callo inducido a partir de osarf11^{TRIM} y semillas de tipo silvestre con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en arroz. (A) Frecuencia de inducción del callo. Cada columna representa la frecuencia promedio de cinco ensayos. Frecuencia de inducción de callos (%) = número de semillas que producen callos/número de semillas inoculadas × 100. (B) Peso de los callos inducidos por semillas después de cuatro semanas de exposición al 2,4-D. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al tipo salvaje (Prueba t de Student; ** P < 0.01, *** P < 0.001). Barras de error = error estándar. (Tomado de Sims et al., 2021).

En 2019, Juárez-González y col. realizó un análisis fisiológico y transcriptómico durante la inducción de ES indirecta en maíz (*Zea mays*), tomando como explantes embriones inmaduros (15 y 23 días después de la polinización) y embriones maduros (45 días después de la polinización). Los embriones recolectados se dividieron en diferentes lotes para la inducción de embriogénesis somática, caracterización morfológica y extracciones de RNA. Después de dos semanas a tratamiento con la auxina exógena 2,4-D, se produjeron callos embriogénicos de los cuales se registró el estado de los mismos y se tomaron muestras de tejido para la caracterización morfológica y extracción de RNA. Los tejidos obtenidos IE15, IE23 y ME al mes de la inducción de ES se denominaron C15, C23 y CM, respectivamente. Con estas muestras se construyeron bibliotecas para ser analizadas por RNA-seq (dos por cada muestra IE15, IE23, EM, C15, C23 y CM) y las lecturas en cada biblioteca se ajustaron a lecturas por diez millones (RPTM). Los análisis de acumulación diferencial se realizaron utilizando el lenguaje de programación R siguiendo el protocolo estándar del paquete DESeq2, con los valores p-adj para la significación log₂FC (p-adj < 0,05).

Se demostró que la etapa de desarrollo del explante impacta en el proceso de dediferenciación a callo durante la etapa de inducción. Los embriones a los 15 días después de la polinización (IE15)

presentaron un mayor potencial para la inducción de callos embriogénicos capaces de regenerar plantas, en comparación con embriones a los 23 días después de la polinización (IE23) y embriones maduros (ME). El análisis masivo de RNA arrojó resultados que permitieron apreciar diferencias significativas entre los niveles de expresión de un gran número de ARFs reportados para maíz entre explantes y durante el proceso de inducción. En la Figura 17 se muestran mediante mapa de calor las diferencias observadas entre los explantes IE15 y ME (rojo, más abundante en IE15; azul, más abundante en ME), así como entre cada explante y el callo inducido (rojo, más abundante en explante; azul, más abundante en callo) o entre callos C15 y CM, donde C15 corresponde al callo embriogénico obtenido a partir del explante IE15 y CM al callo no embriogénico obtenido a partir del explante ME (rojo, más abundante en C15; azul, más abundante en CM). De manera interesante, se observó que ARF4 de maíz, que es ortólogo de ARF5 de *Arabidopsis*, es significativamente más abundante en C15 que en CM, mientras que varios, como ARF24, ARF25, ARF26, ARF34 mostraron mayor abundancia en CM. La inducción del explante IE15 a C15 se caracterizó por la disminución de muchos ARFs, con la notable excepción de ARF1, ARF20 y ARF27 que conforman el grupo de ortólogos de ARF7/19 de *Arabidopsis* y algunos otros.

En la imagen de la Figura 17, los ARFs de maíz se agruparon por colores acorde a la clasificación realizada por Xing et al. (2011). Sin embargo, algunos ARFs identificados después de esta publicación quedaron sin clasificación. Si bien en varias de las clases se observaron patrones de acumulación diferencial similares, para algunos casos no fue así. Para poder tener mejor acercamiento a los patrones de expresión de diferentes grupos o clases de ARF durante la ES de maíz, se hace necesario realizar un análisis filogenético actual donde se incluyan todas las secuencias reportadas para maíz en conjunto con las de *Arabidopsis* y arroz.

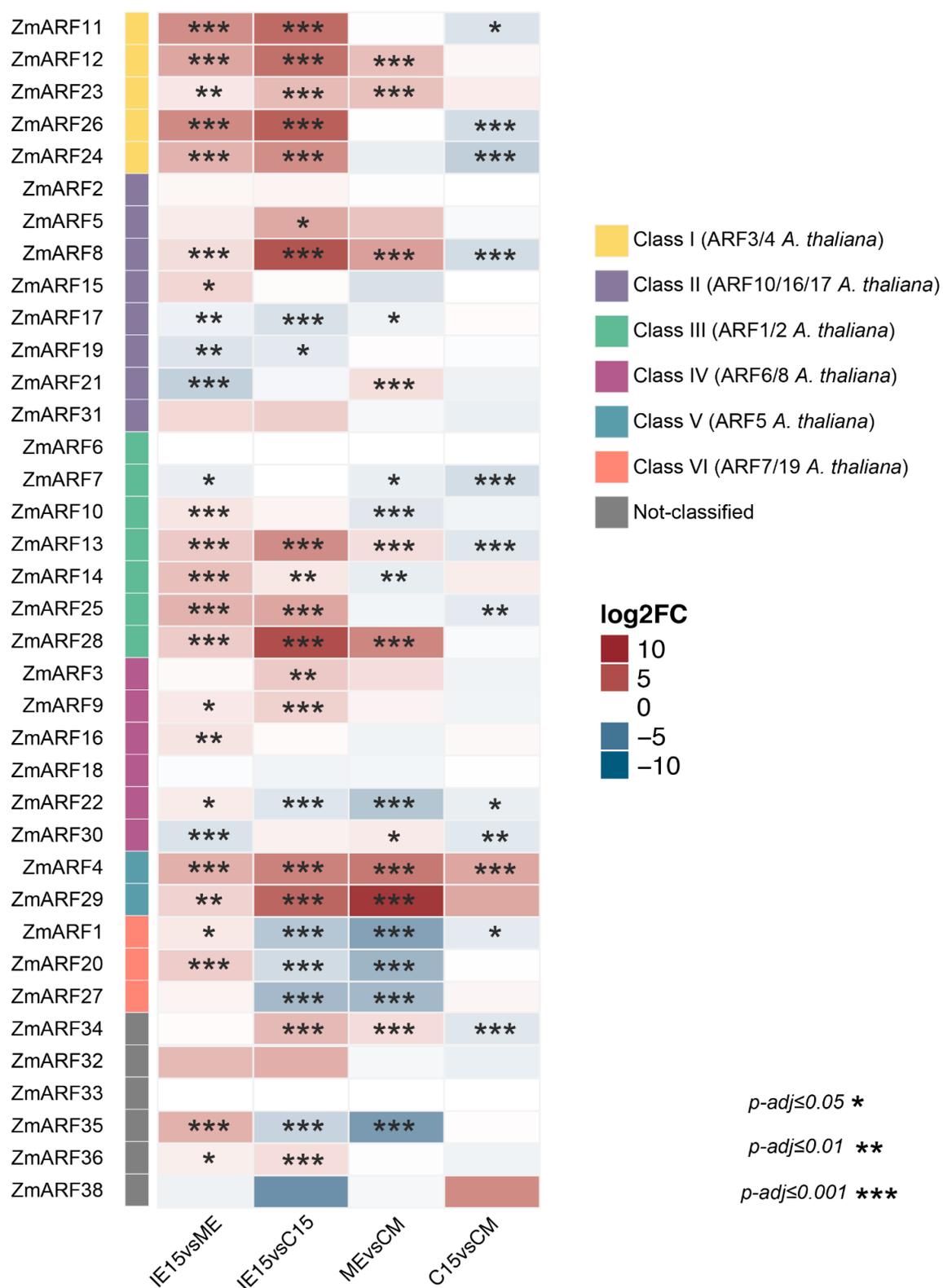


Figura 17. Expresión diferencial de ARF de maíz (*Zea mays*) durante la inducción de embriogénesis somática entre los diferentes tipos de explante. (Tomado de Juárez-González et al., 2019).

Planteamiento del problema.

El conocimiento sobre los factores de respuesta a auxinas y su participación en diferentes procesos de desarrollo vegetal aún tiene mucho por indagar. En diferentes especies se ha evaluado la importancia de algunos ARF durante la embriogénesis somática, sin embargo, en maíz no se ha investigado a fondo su participación. Debido a la alta conservación de dominios en estas proteínas, es posible relacionar la estructura-función de los factores de respuesta a auxinas a través de análisis filogenéticos que permitan dar dirección a la investigación de ARFs en la embriogénesis somática de maíz. Además, la actualización del genoma de maíz y arroz hace crucial una nueva relación filogenética que permita clasificar y analizar todos los factores de respuesta a auxinas reportados hasta la fecha.

Por otro lado, para analizar de forma experimental la acumulación de ARFs en tejido embriogénico de maíz, resulta importante obtener una construcción reportera que permita visualizar la expresión génica dirigida por auxinas, por lo que en este proyecto también se abarca la obtención de un vector reportero unido a un elemento sintético de respuesta a auxinas para su posterior evaluación en maíz.

Hipótesis.

La estructura y composición de dominios de los factores de respuesta a auxinas es altamente conservada en plantas. Los ARF de *Zea mays* y las proteínas ortólogas que pertenecen a los mismos clados pueden presentar la misma distribución de dominios y patrones de actividad similares, lo cual podrá ser analizado mediante un vector de expresión reportera con el promotor sintético DR5 de respuesta a auxinas. Este promotor es funcional para visualizar la señalización de auxinas y con el diseño adecuado de cebadores se podrá amplificar y clonar la secuencia reportera en un vector para emplearlo en transformaciones transitorias de protoplastos o callos embriogénicos de maíz y observar la señalización por auxinas.

Objetivo.

Analizar y clasificar los factores de respuesta a auxinas en maíz para evaluar posteriormente sus patrones de expresión y función en embriogénesis somática.

Objetivos particulares.

- Construir y analizar un árbol filogenético que incluya los ARF reportados para *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Marchantia polymorpha*.
- Analizar la base de datos de transcriptoma generada en el laboratorio empleando diferentes tipos de explantes de maíz inducidos a embriogénesis somática, acorde a la clasificación actualizada por la filogenia encontrada.
- Obtener una construcción reportera que contenga un promotor sintético de respuesta a auxinas para evaluar la función de ARFs relevantes en embriogénesis somática de maíz.

Metodología.

Análisis *in silico*.

Se recopilaron las secuencias de aminoácidos de ARF reportados para *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha* en las bases de datos Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB: <https://www.maizegdb.org/>), Rice Genome Annotation Project (<http://rice.uga.edu/>) Arabidopsis Information Resource (TAIR: <https://www.arabidopsis.org/>) y MarpolBase (<https://marchantia.info/>) respectivamente.

Se identificaron 38 secuencias de ARF de *Zea mays*, 27 de *Oryza sativa*, 23 de *Arabidopsis thaliana* y 3 de *Marchantia polymorpha*, obteniendo un total de 91 secuencias de proteínas. Para este análisis bioinformático se excluyó a la secuencia identificada para ZmARF37 ya que no presenta ningún dominio completo y al consultar la base de datos de maíz, esta secuencia se ha denominado como “rechazada”, de baja confianza y no aparece en el último volumen anotado del genoma de maíz.

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el algoritmo MUSCLE (versión 3.8) (Edgar, 2004) y la identidad de las secuencias se determinó mediante la línea de comando de BLAST (BLASTP) (Altschul et al., 2005). El alineamiento múltiple de secuencias se visualizó en Unipro UGENE.

Para consultar que el alineamiento que se realizó en MUSCLE con las 90 secuencias de ARF de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Marchantia polymorpha* fuera óptimo para construir el árbol filogenético, se compararon los datos obtenidos del alineamiento con un alineamiento realizado en el programa BLAST (BLASTP) que compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la importancia estadística de las coincidencias. BLAST se puede utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes. (Altschul et al., 1990). En este caso, a través de línea de comando de BLASTP se creó una base de datos con las 90 secuencias de ARF y después se realizó la comparación estadística de las 90 secuencias con esa misma base de datos, por ejemplo, la secuencia ARF1 de *Arabidopsis thaliana* (AtARF1) se comparó con las 90 secuencias de la base de datos creada y se obtuvieron valores de los siguientes parámetros: porcentaje de identidad, número de aminoácidos alineados, número de huecos en el alineamiento, número de aminoácidos no alineados, valor e (e value) y puntaje “bit” (bit score). Este cálculo estadístico se realizó para cada secuencia, cada una comparada con la base de datos generada. Se buscaron dominios conservados de las secuencias en la base de datos de Pfam (Pfam 34.0 <http://pfam.xfam.org/>) (Bateman et al., 2002).

La construcción del árbol filogenético se realizó en el programa FastTree 2.1 (N. Price *et al.*, 2009) con el método de construcción de Máxima verosimilitud aplicando el modelo de sustitución de aminoácidos de Jones Taylor Thornton (Jones, D., Thornton, 1992). También se construyó una filogenia de las 37 secuencias de ARF de maíz identificadas empleando los mismos parámetros mencionados.

Por otro lado, se analizó la base de datos de transcriptoma de maíz durante la embriogénesis somática realizada por Juárez-González en 2019 para observar patrones de acumulación de transcritos de ARF de maíz en diferentes tejidos sometidos a inducción en ES.

Metodología experimental.

Desinfección y siembra de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Se utilizaron semillas silvestres (WT) y semillas que contienen la construcción reportera DR5::GUS (Ulmasov *et al.*, 1997).

Las semillas se colocaron en un tubo de microfuga y se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 2%, 1 μ L de Tween 20 (concentración final de 0.1%) y se agitó vigorosamente por 20 min. Posteriormente el tubo se centrifugó por 10 s y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron 5 lavados con 1 mL de agua destilada estéril, agitando por 20 s cada lavado; al terminar el lavado, las semillas se resuspendieron en 100 μ L de agua estéril.

Las semillas se sembraron en medio con sales MS pH= 5.7 y se estratificaron por 48 h a 4°C. Posteriormente se incubaron a 16 h de luz y 8 h de oscuridad a temperatura ambiente durante 6 a 8 días. Finalmente, las plántulas fueron tomadas para realizar los experimentos posteriores.

Aplicación de estímulo con auxinas.

Las plántulas se colocaron en una placa de 24 pozos y se agregó la auxina sintética 1-NAA (ácido 1-naftalenacético) 50 μ M disuelto de solución X-Gluc o H₂O (tratamiento control). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas en oscuridad.

Ensayo histoquímico de actividad de GUS.

Solución de sustrato X-Gluc.

Se preparó una solución que contenía amortiguador Tris-HCl 100 mM pH= 7.0, NaCl 50 mM, Tritón X-100 0.01%, ferrocianuro de potasio 0.5 mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM y sustrato X-Gluc 2 mM (para 10 mL de X-Gluc 0.5 mM, disolver 10.41 mg de X-Gluc en 0.4 mL de N,N-dimetilformamida

(DMF) previo a la adición con los demás componentes de la disolución). Se recomienda tener un stock de las soluciones empleadas almacenadas en refrigeración.

Se retiró el tratamiento con auxinas a las plántulas utilizando una pipeta y se procedió a agregar la solución de sustrato X-Gluc a cada pozo. La placa se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente en oscuridad.

Pasado el tiempo indicado, se removi6 cuidadosamente la solución de sustrato y se realizaron 3 lavados con amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH= 7.0.

Clareado de plántulas.

Se hizo una serie de lavados con soluciones incrementadas de etanol (30, 50, 70, 90 y 100%) durante 5 minutos cada uno, para llevar a cabo la deshidratación del tejido. Posteriormente el tejido se rehidrató sumergiendo las plántulas en disoluciones de etanol (70, 50 y 30%) cada lavado y finalmente se suspendieron en amortiguador Tris-HCl 0.1 M. Las plántulas se observaron en un microscopio estereoscópico.

Ensayo fluorométrico cuantitativo de actividad de GUS.

Plántulas transgénicas y silvestres fueron trituradas con tampón de extracción en hielo. El homogeneizado se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 20,000 x g durante 20 minutos. Alícuotas de este sobrenadante fueron mezcladas con 4-metil-umbeliferil-beta-D-glucurónido (4-MUG) 2 mM preparado en el tampón de extracción. Los tubos con mezcla se cubrieron de la luz y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La reacción se detuvo agregando Na₂CO₃ y se midió la fluorescencia utilizando un espectrofluorómetro a 460 nm ajustando una longitud de onda de excitación a 365 nm.

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la construcción DR5::GUS.

La construcción reportera generada por Ulmasov y col. en 1997 contiene siete copias de DR5 (CCTTTTGTCTC) que contiene el elemento de respuesta a auxinas TGTCTC clonado 5' de un promotor mínimo 35S (CaMV), que se emplea para la expresión tanto los genes GUS como los de hígromicina fosfotransferasa (HPH) y una secuencia TMV 5' líder. Ambos genes quiméricos terminan en la región no traducida 3' de la nopalina sintasa (Figura 18). El vector también codifica un gen de resistencia a la kanamicina (KAN) para la selección de plantas transgénicas. Nuestro interés fue obtener la parte de la construcción que contiene únicamente el promotor DR5, promotor mínimo 35S CaMV, gen GUS y terminador 3' de la nopalina sintasa, por lo que se buscó la secuencia de estos fragmentos y se unieron para formar el cassette **DR5::GUS** para posteriormente diseñar los oligonucleótidos para la amplificación y clonación de la construcción (Figura 19).

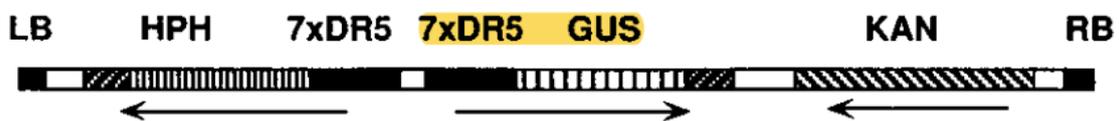


Figura 18. Diagrama del vector binario que contiene el promotor DR5(7x)::GUS. Las flechas debajo del diagrama indican la dirección de transcripción de cada gen. LB, borde izquierdo de T-DNA; RB, borde derecho de T-DNA.

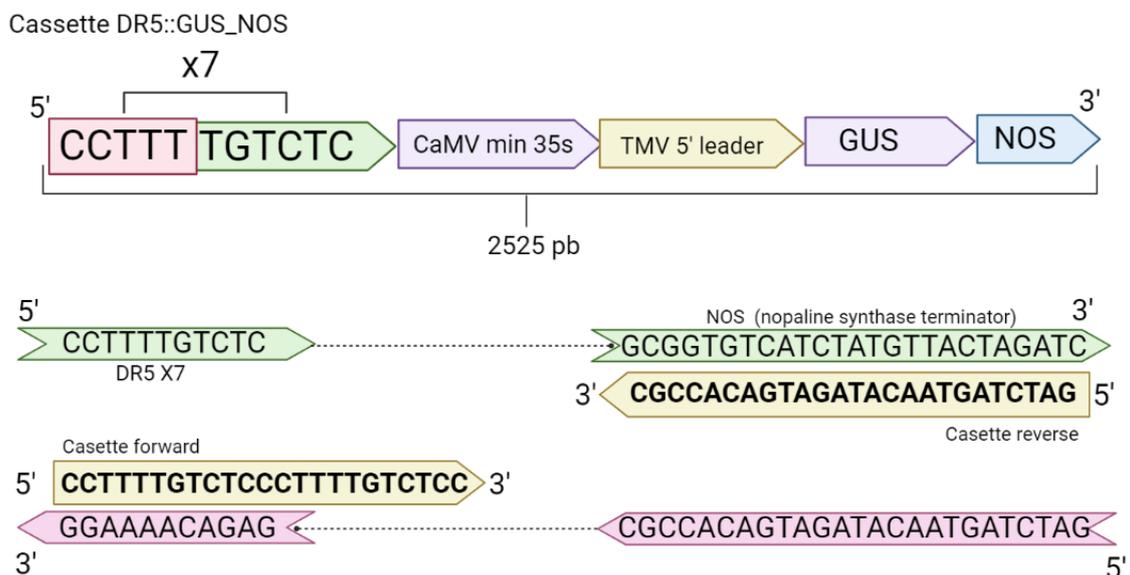


Figura 19. Diagrama de la construcción DR5::GUS de interés a amplificar y oligonucleótidos diseñados para la amplificación. La construcción de interés que abarca incluye el promotor DR5 (Secuencia CCTTTTGTCTC), el promotor mínimo 35S, la secuencia 5' líder TMV, el gen GUS y el terminador de la nopalina sintasa (NOS).

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del cassette de expresión DR5::GUS.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Casete_fw1:	CCTTTTGTCTCCCTTTTGTCTCC
Casete_rv1	GATCTAGTAACATAGATGACACCGC
Lac_prom_rv:	TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG
5RD-DR5_fw	GACAAAAGGGAGACAAAAGGGA
NcoI_fw1	CCATGGCCTTTTGTCTCCCT
SACI_rv1	GAGCTCGATCTAGTAACATAGATGACA

Extracción de DNA genómico de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Se trituraron alrededor de 200 mg de plántulas a polvo fino usando mortero y pistilo estériles y nitrógeno líquido. Se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se combinó con 500 µL de amortiguador CTAB evitando la formación de grumos. La mezcla se incubó a 55°C durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 x g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 250 µL de CHCl₃/alcohol isoamílico 24:1 y se mezcló con vortex. El tubo se centrifugó a 13250 g por 1 minuto y la fase acuosa se recuperó en otro microtubo de 1.5 mL. Se agregaron 50 µL de acetato de amonio 7.5 M y 500 µL de etanol absoluto frío. Se mezcló por inversión para promover la precipitación del DNA y se incubó a -20°C por 15 minutos.

Pasado el tiempo, el tubo se centrifugó a 13250 g por 2 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet se lavó con 500 µL de etanol 70% frío y se centrifugó a 13250 g por 1 minuto. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet para disolver en 100 µL de H₂O DEPC estéril. Se incubó el tubo a 65°C por 20 minutos para inhibir DNAsas.

Amplificación de DR5::GUS y clonación en el vector pGEM T-Easy.

Se empleó el kit KAPA Ready Mix (Roche) para la amplificación de DR5::GUS utilizando los oligonucleótidos "Casete_fw1" y "Casete_rv1" (Tabla 1). La temperatura de alineamiento se estandarizó mediante una PCR con gradiente de temperatura utilizando las temperaturas de 55, 60 y 63°C. La temperatura óptima de amplificación de la construcción fue 63°C.

Una vez estandarizado el proceso, se purificó el fragmento y se ligó al vector pGEM T-Easy (Promega) mediante una reacción con la enzima T4 DNA ligasa. La reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4°C.

Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α

Se prepararon placas con medio LB+ampicilina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se agregaron 100 μL de IPTG 0.1 M, se dejaron incubar aproximadamente 10 minutos y se agregaron 40 μL de X-Gal. Se centrifugaron los tubos con la reacción de ligación y se agregaron 10 μL a 50 μL de bacterias *E. coli* DH5 α competentes (descongelarse 5 minutos antes de su uso).

Las bacterias se incubaron 30 minutos en hielo y posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por 45 segundos. Las bacterias fueron colocadas inmediatamente en hielo por 2 minutos y se agregaron 950 μL de medio LB líquido sin antibiótico a temperatura ambiente. Las bacterias se incubaron a 37°C por 1 hora y media aproximadamente con agitación. Posteriormente, se centrifugó el tubo a 80 g y las bacterias se resuspendieron en 200 μL de medio LB sin antibiótico. Finalmente, las bacterias se sembraron de manera masiva en las placas de LB+ampicilina con IPTG y X-Gal y las cajas se incubaron a 37°C.

Purificación de plásmidos en columna.

Se tomó una colonia del cultivo sólido y se crecieron las bacterias transformadas en medio LB líquido (50 mL) con ampicilina. Las bacterias se incubaron durante 24 horas a 37°C. Las bacterias fueron centrifugadas a 4000 x g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de amortiguador de resuspensión adicionado con RNasa A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se agregaron 500 μL de amortiguador de lisis, se mezcló por inversión cuidadosamente y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente se agregaron 500 μL de amortiguador de neutralización y se mezcló por inversión 3 o 4 veces. El lisado se distribuyó en tubos de 1.5 mL por decantación y se centrifugaron los tubos a 13200 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se colectó el sobrenadante en tubos de 1.5 mL, se agregó el mismo volumen de etanol absoluto y se mezcló en vortex 5 segundos.

La mezcla se cargó en la columna del kit RNA Clean & Concentrator kits de Zymo Research en adiciones de 700 μL , posteriormente se centrifugaron los tubos con la columna a 13200 x g por 30 segundos. Se repitió el procedimiento hasta cargar toda la muestra. La columna se lavó 2 veces con 500 μL de amortiguador de lavado y se centrifugó a 13200 x g por 5 minutos. Finalmente, se centrifugó en seco la columna a 13200 x g por 1 minuto y se añadieron 30 μL de H₂O_{DEPC} para eluir el plásmido de la columna. Se incubó el tubo por 2 minutos a temperatura ambiente.

Digestión del plásmido con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* para confirmar la clonación.

Se adicionó a un tubo de 1.5 mL 1.5 μ L (1 μ g) de plásmido extraído, 1 μ L de enzima (*EcoRI* o *NcoI* 10 U/mL), 5 μ L del amortiguador correspondiente a cada enzima y 42.5 μ L de H₂O_{DEPC}. El tubo se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% para confirmar la digestión del plásmido.

Ensayo de transfección de protoplastos de *A. thaliana* con el vector pGEM_DR5::GUS.

Tabla 2. Soluciones de trabajo para la extracción y transfección de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*.

Soluciones de trabajo			
Solución de enzimas		Solución W5	
Celulasa R10	1.5%	NaCl	154 mM
Macerozima R10	0.4%	CaCl ₂	125 mM
Manitol	0.4 M	KCl	5 mM
MES pH=5.7	20 mM	MES pH=5.7	2 mM
KCl	20 mM?	Solución W1	
CaCl ₂	10 mM	MES pH=5.7	4 mM
BSA	0.1%	Manitol	0.5 M
β -mercaptoetanol	1 μ L	KCl	20 mM
Solución MMg		Sol. PEG4000	
MES pH=5.7	400 mM	PEG4000	40% m/v
MgCl ₂	15 mM	Manitol	0.2 M
Manitol	0.4 M	CaCl ₂	0.1 M

Obtención de protoplastos.

DÍA 1.

Se tomaron plántulas sanas de *Arabidopsis thaliana* de 11 a 18 días de edad. Con unas pinzas se tomaron las plántulas procurando arrastrar lo menos posible el medio y se colocaron en una caja Petri de vidrio con 2 mL de la solución de enzimas. Con ayuda de una navaja, se cortó el tejido haciendo golpes secos. Se agregaron 18 mL de la solución de enzimas estéril (filtrada a través de filtro de 45 μ M) y se agitó suavemente procurando que todo el tejido tuviera contacto con la solución. Se colocó la caja Petri en un desecador (protegido de la luz) durante 2 minutos a oscuridad, posteriormente se retiró el vacío y la placa se colocó en agitación suave (50 rpm) por 16 horas en oscuridad.

DÍA 2.

Primero se preparó la solución PEG4000 (Tabla 2), esta solución siempre se debe preparar el día de uso.

Se agregaron 5 mL de solución MMg (Tabla 2) y se agitó a 80 rpm por 2 minutos para promover la liberación de los protoplastos. Utilizando filtros Nylon mesh (de 8x8 cm humedecidos con la solución MMg) en un embudo, se vertió la solución de la placa y se recibió el filtrado en un tubo de fondo redondo. Se lavaron los filtros con 5 mL de solución MMg.

Se realizó la primera centrifugación del tubo con fondo redondo a 200 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante sin tocar el pellet y se resuspendió con ligeros golpes. Se agregaron 5 mL de la solución MMg y se agitó suavemente.

Se realizó la segunda centrifugación a 200 x g por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió con ligeros golpes. Se lavó el pellet con 5 mL de solución W5 (Tabla 2) agitando suavemente.

Se realizó una tercera centrifugación a 200 x g por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con ligeros golpes. Se agregaron 4 mL de solución W5 y se incubó el tubo en hielo y en oscuridad por 1.5 horas.

Los protoplastos se contaron utilizando una cámara de Neubauer (10 μ L x ranura). Una vez cuantificados, se hizo una cuarta y última centrifugación del tubo con protoplastos a 200 x g por 3 minutos. El pellet se resuspendió en solución MMg fría con un volumen que permitiera tener 200 mil protoplastos por reacción que se vaya a realizar.

Transfección de protoplastos.

Se utilizaron de 10 a 20 μ g de DNA plasmídico junto con MÍNIMO 200 mil protoplastos por reacción (en una buena extracción esto equivale a 200 μ L aproximadamente).

En microtubos eppendorf de 2 mL se agregó el volumen equivalente a 200 mil protoplastos, el DNA y se agitó con ligeros golpes. Los tubos se incubaron a 25°C por 10 minutos en oscuridad.

Se agregó a cada tubo un volumen equivalente de la solución PEG4000 (por ejemplo, si son 210 μL de la reacción, agregar 210 μL de la solución PEG4000) y se mezclaron los tubos por inversión lenta. Las reacciones se incubaron a 25°C por 20 minutos. Las reacciones se detuvieron con 860 μL de solución W5 y se mezclaron los tubos por inversión. Se centrifugaron los tubos a 200 x g por 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de solución W5 y se resuspendió el pellet con golpes suaves. Los tubos se centrifugaron a 200 x g por 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de solución W1 (Tabla 2).

Los tratamientos de los protoplastos con la auxina 1-NAA 1 μM se realizaron en la solución W1 como se indica en la Tabla 3 y se dejaron incubando los tubos en oscuridad durante 16 a 20 horas. Posteriormente, se agregó 4-metil-umbeliferil-beta-D-glucurónido (4-MUG) 2 mM preparado en amortiguador de extracción. Los tubos se cubrieron e incubaron a 37°C durante 24 horas. La reacción se detuvo agregando Na_2CO_3 y se midió la fluorescencia utilizando un espectrofluorómetro a 460 nm ajustando la longitud de onda de excitación a 365 nm.

Tabla 3. Reacciones de transfección de protoplastos y tratamientos con auxinas

Nombre de muestra con protoplastos	Plásmido añadido	Tratamiento con ácido 1-naftalenacético (NAA) 1 μM
Sin transfectar (s/t)	Ninguno	No
Sin transfectar (s/t)	Ninguno	Si
35S::GUS	35S CaMV::GUS	No
35S::GUS	35S CaMV::GUS	Si
DR5::GUS	pGEM_DR5::GUS	No
DR5::GUS	pGEM_DR5::GUS	Si
DR5::GUS+ZmARF34	pGEM_DR5::GUS y pENTR_ZmARF34	No
DR5::GUS+ZmARF34	pGEM_DR5::GUS y pENTR_ZmARF34	Si

Resultados.

Dominios conservados en los ARF de maíz.

Con el fin de conocer la relación estructural entre los ARF de las especies *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Zea mays*, se realizó una revisión de la arquitectura y organización de los dominios de proteínas en la base de datos Pfam.

En el caso de *Arabidopsis thaliana*, todas las secuencias conservan el dominio B3 de unión a DNA y el dominio medio de regulación, excepto AtARF23, considerado un pseudogen, que solo tiene el dominio DBD B3 (Okushima et al, 2005 Esta referencia no aparece en la Bibliografía). Ambos dominios están separados por 20-35 aminoácidos aproximadamente. El dominio PB1 es compartido por AtARF1, AtARF2, AtARF5, AtARF6, AtARF7, AtARF8, AtARF11, AtARF13, AtARF14, AtARF15, AtARF18, AtARF19, AtARF20, estos dominios se ubican entre 120 y 700 aminoácidos de la región media. Curiosamente, se identificaron dos dominios PB1 en AtARF2, AtARF9, AtARF12 y AtARF22, sin embargo, este segundo dominio se encuentra truncado.

Los 38 factores de respuesta de auxina identificados en *Zea mays* (ZmARF) comparten el dominio N-terminal B3 y el dominio medio de regulación (MR), que se encuentra a 20-60 aminoácidos de distancia. El dominio PB1 se conserva únicamente en ZmARF1, ZmARF3, ZmARF4, ZmARF7, ZmARF8, ZmARF9, ZmARF10, ZmARF13, ZmARF14, ZmARF16, ZmARF18, ZmARF20, ZmARF22, ZmARF25, ZmARF27, ZmARF28, ZmARF29, ZmARF30, ZmARF34, ZmARF35 y ZmARF36. Además, en ZmARF10, ZmARF25 y ZmARF14 se identificaron dos dominios PB1. La secuencia ZmARF37 presenta 2 dominios B3 truncados, y 2 dominios medios de regulación, sin embargo, solo uno de ellos está completo.

Se identificó una secuencia para ZmARF39 que únicamente conserva el dominio B3, no obstante, en la base de datos de maíz, esta secuencia se reporta como un factor de transcripción tipo ABI3/VP1, un tipo de proteínas que actúan como intermediarias en la regulación de genes que responden al ácido abscísico (ABA) durante el desarrollo de la semilla (Suzuki, et al., 2003), por lo que esta secuencia no fue considerada para el alineamiento múltiple.

En el caso de *Oryza sativa*, las 27 secuencias identificadas conservan el dominio B3. OsARF26 tiene un dominio B3 que comienza en el aminoácido 337, a diferencia de las otras proteínas, donde este dominio comienza entre los 70 y 120 aminoácidos (al igual que en las otras especies). El dominio medio de regulación se encuentra a 20-30 aminoácidos del dominio B3. La proteína OsARF20 tiene dos dominios B3 y dos dominios reguladores, pero solo uno está completo. Del mismo modo, OsARF27 conserva dos dominios B3 completos separados por 219 aminoácidos y un

dominio regulador. El dominio PB1 se mantiene en OsARF1, OsARF5, OsARF6, OsARF7, OsARF11, OsARF12, OsARF16, OsARF17, OsARF19, OsARF21, OsARF23, OsARF24 y OsARF25. Se identificaron dos dominios PB1 en OsARF4 y OsARF9, de los cuales uno de ellos está incompleto.

Alineamiento múltiple de secuencias.

El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de ARF de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha* se realizó en MUSCLE, este alineamiento fue visualizado en Unipro UGENE, en donde podemos observar sitios altamente conservados. La región de las secuencias donde se encuentra el dominio B3 de unión a DNA es de los sitios más conservados en el alineamiento (Figura 20), mientras que el dominio medio de regulación, a pesar de tener muchos residuos conservados, presenta variabilidad en algunos sitios (Figura 21). Esto puede relacionarse con la variación de residuos que caracteriza a los ARF como activadores (enriquecidos en glutamina, serina y leucina) o represores (enriquecidos en serina, prolina, leucina y/o glicina).

La región C-terminal, correspondiente al dominio PB1, también muestra un alto grado de conservación en muchas de las secuencias (Figura 22). De acuerdo con la búsqueda de dominios en la base de datos de Pfam, muchos ARF no contienen este último dominio, lo cual se relaciona con los resultados descritos por Finet y col. en 2013, donde el análisis evolutivo señala pérdida o ganancia de dominios debido principalmente a truncamiento genómico.

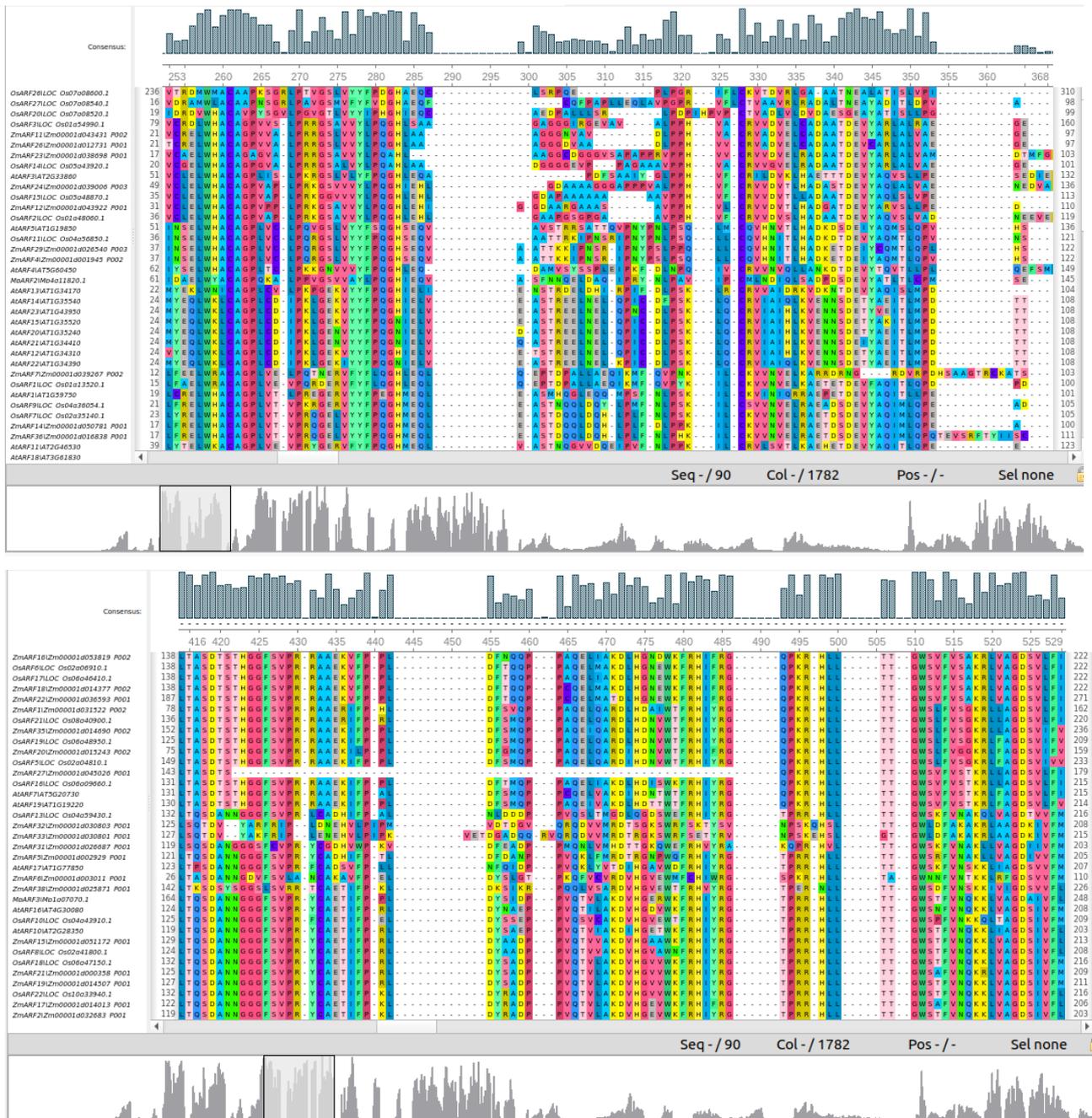


Figura 20. Visualización de parte del alineamiento de secuencias de ARF de diferentes especies en el dominio de unión a DNA, B3. Región que comprende el dominio DBD B3 de las secuencias de ARF de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha*. Alineamiento múltiple de secuencias realizado en MUSCLE y visualizado en Unipro UGENE.



Figura 21. Visualización de parte del alineamiento de secuencias de ARF de diferentes especies en el dominio medio de regulación (MR). Región del dominio medio de regulación de secuencias de ARF de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha*. Alineamiento múltiple de secuencias realizado en MUSCLE y visualizado en Unipro UGENE.

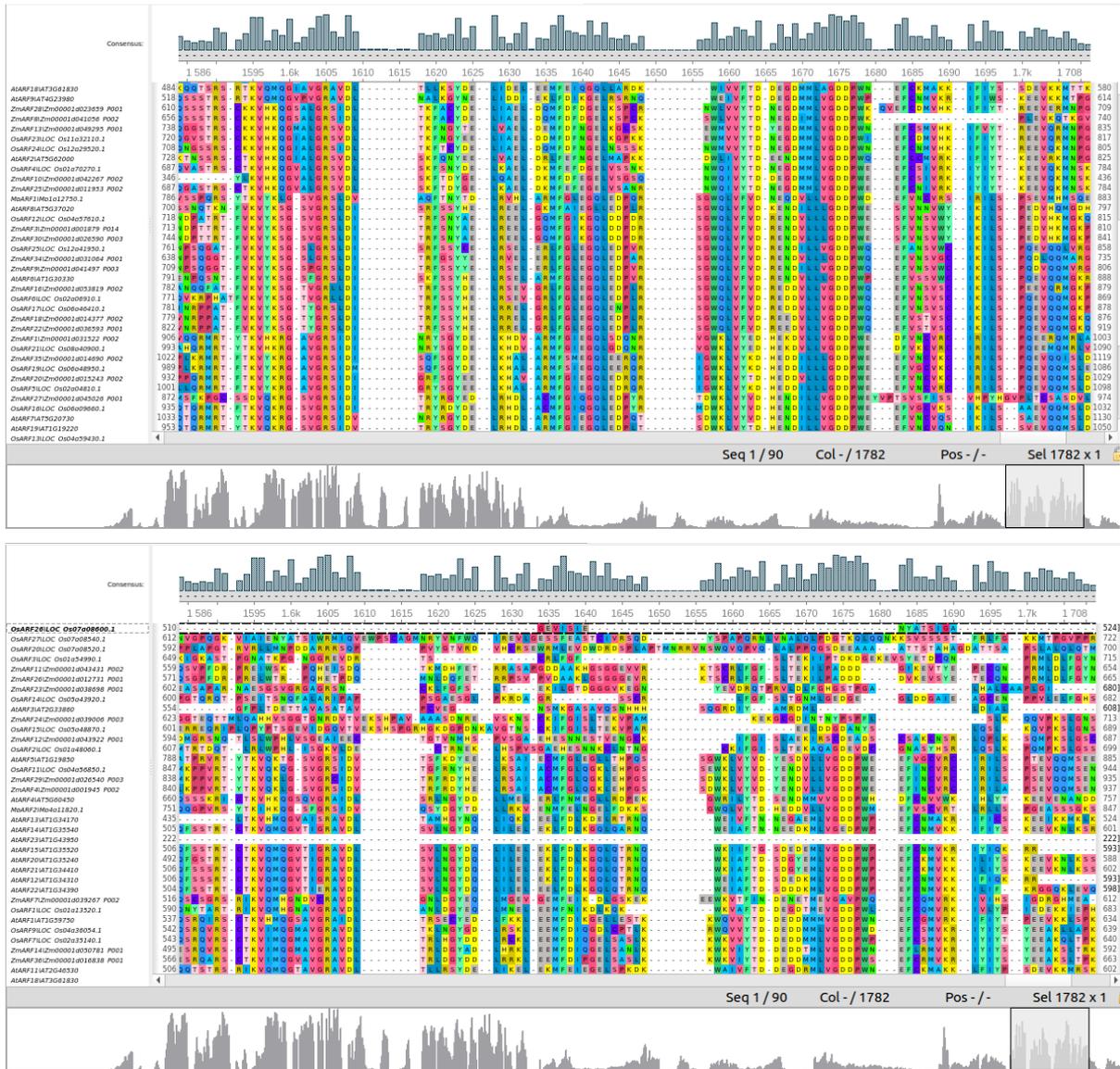


Figura 22. Visualización de parte del alineamiento de secuencias de ARF de diferentes especies en el dominio C-terminal PB1. Región del dominio PB1 compartido por algunas secuencias de ARF de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha*. Alineamiento múltiple de secuencias realizado en MUSCLE y visualizado en Unipro UGENE.

Árbol filogenético de los factores de respuesta a auxinas.

El algoritmo del programa FastTree 2.1 (Prince et al., 2009) emplea una metodología que permite inferir árboles filogenéticos ocupando menos tiempo y espacio computacional. Las etapas de la construcción del árbol filogenético incluyen: unión heurística de vecinos, reducción de longitud del árbol mediante intercambios de vecinos más cercanos (NNI) y movimientos de re-injerto de poda de subárbol (SPR) (reordenamientos de evolución mínima) y finalmente optimización de la filogenia a través de reordenamiento de máxima verosimilitud empleando el modelo de sustitución de aminoácidos Jones Taylor Thorton.

El árbol filogenético generado para ARFs de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha* comprendió 90 secuencias. Las ramas de esta construcción en su mayoría presentaron valores de bootstrap arriba del 0.8, es decir, que más del 80% de las iteraciones realizadas al momento de hacer la construcción filogenética arrojaron el mismo resultado, por lo que la inferencia del árbol tiene alta confiabilidad (Figura 23).

Observamos que se generaron 9 clados, donde los 3 primeros comprenden a los ARF denominados como activadores transcripcionales (clado A) y los restantes corresponden a los ARF represores, de acuerdo con lo descrito por Guilfoyle y Hagen en 2007 en *Arabidopsis thaliana*. De estos, en el cuarto clado se encuentran los ARF que pertenecen al clado C y los restantes agrupan a los ARF del clado B, descrito en el análisis filogenético realizado por Finet y col. en 2013 con 224 ARF de diferentes especies de plantas terrestres.

La inclusión de las 3 secuencias de ARF de la planta *Marchantia polymorpha* permitieron generar un árbol filogenético con raíz, en donde observamos que cada secuencia de esta especie se encuentra en cada uno de los 3 clados principales **A**, **B** y **C** reportados anteriormente.

Los ARF en cada uno de los 9 clados presentan una longitud de secuencia de aminoácidos y distribución de dominios bastante similar. Los ARF activadores presentan las secuencias más largas, entre 770 aminoácidos (ZmARF34) y 1165 (ZmARF35), además, todos los ARF activadores conservan los tres dominios (DBD B3, dominio medio de regulación y PB1), los cuales se encuentran aproximadamente a la misma distancia.

Los ARF represores que agrupan en el clado C, son aquellos que no cuentan con el dominio C-terminal PB1 y en su mayoría, son proteínas con las longitudes de secuencia más cortas (ZmARF6 con 201 aminoácidos). En este clado, la secuencia de la planta ancestral *Marchantia polymorpha* (MpARF3) tampoco conserva este dominio.

En los ARF represores que corresponden al clado B, solo algunos no conservan el dominio represor PB1 y en algunos casos, este dominio se encuentra duplicado o truncado, además, son secuencias más cortas en comparación con los ARF activadores.

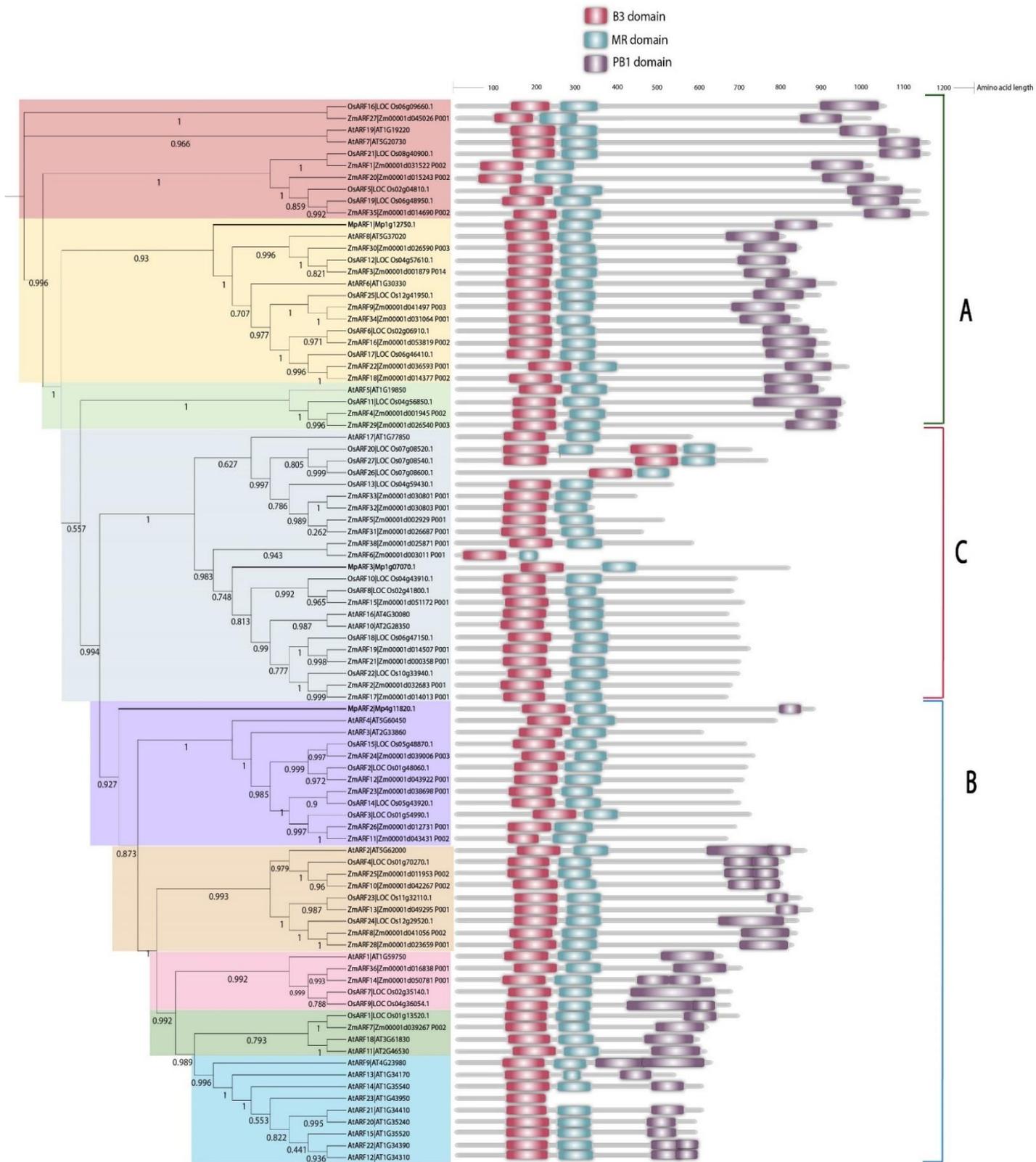


Figura 23. Árbol filogenético de los factores de respuesta a auxinas de *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Marchantia polymorpha*. Los 9 clados están diferenciados por colores, la escala en la parte superior indica la longitud de aminoácidos de cada proteína. Para cada ARF se muestra la organización de los dominios B3 (rojo), dominio medio de regulación MR (azul) y PB1 (morado). Se señalan los clados A, B y C reportados por Finet y col. en 2013.

Acumulación diferencial de transcritos de ARF de maíz durante la inducción a callo embriogénico de maíz.

Con la información obtenida previamente a partir de transcriptomas de diferentes explantes e inducciones de ES en maíz (Figura 17), se realizó un nuevo análisis de mapa de calor para los ARF de maíz a la luz de la clasificación obtenida por análisis filogenético en este trabajo (Figura 37). Este mapa se generó con base a la información de transcritos por millón (TPM), lo que permite reflejar, además de una expresión diferencial para cada ARF en las comparaciones de tejido, la abundancia relativa de diferentes ARF en el mismo tejido. Podemos observar que el ARF con menor abundancia en el análisis fue ARF5, mientras que varios ARF del clado B (represores) fueron muy abundantes en el explante IE15. En general, se aprecia una disminución de los niveles para la gran mayoría de ARF en el callo inducido respecto al explante, excepto para los de Clase VI activadores que presentaron aumento en los callos. Es notable que ARF4 (activador de clase IV) mantiene mayores niveles en C15, respecto a CM, lo cual coincide con lo mostrado en la Figura 17 y con el reporte de *Arabidopsis* (Wojcikowska y Gaj, 2017).

Obtención de un vector reportero GUS bajo un promotor que responde a auxinas.

Debido a la necesidad de contar con un ensayo de evaluación para la respuesta a auxinas en maíz, nos propusimos obtener un vector reportero GUS bajo el promotor DR5 que contiene 7 elementos AuxRE para transformaciones transitorias en protoplastos y ES. Para esto, se tomaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contenían insertada en su genoma la construcción reportera DR5::GUS (Ulmasov et al., 1997). Para comprobar su genotipo, se realizó un ensayo histoquímico en comparación con plantas silvestres y en condiciones control, así como bajo el tratamiento con la auxina exógena 1-NAA (ácido 1-naftalenacético) (Figura 24). Con ayuda de un microscopio estereoscópico se observó que aquellas plántulas que tienen DR5::GUS y que fueron tratadas con la auxina 1-NAA presentaron coloración azul en prácticamente toda la hoja (pecíolo, nervios, limbo y bordes) y algunas zonas de la raíz y raíces laterales. En el caso de las plántulas con DR5::GUS que no recibieron el tratamiento con auxina, también hubo actividad de GUS pero con menor intensidad y localización más restringida. Notamos que la acumulación de auxinas endógenas en estas plántulas se presenta principalmente en los bordes de la hoja y en la formación de raíces laterales. Las plántulas silvestres, con o sin el tratamiento con auxinas, no presentaron coloración azul a lo largo de toda su estructura.

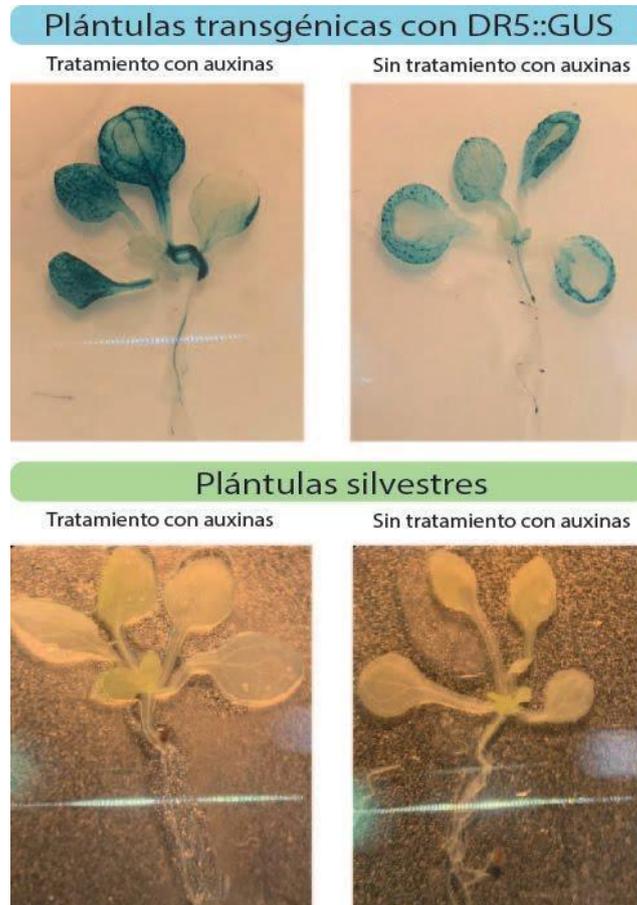


Figura 24. Confirmación de la actividad de GUS dirigida por DR5 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

También se midió la actividad de GUS de manera cuantitativa a través de un ensayo fluorométrico, utilizando el sustrato 4-MUG, que al perder el grupo glucurónico forma la molécula fluorescente MU (4-Metilumbelliferilo) la cual se excita a 365 nm y emite a 460 nm. En la Figura 25 se observa que los extractos de proteína de plántulas transgénicas que fueron tratadas con la 1-NAA presentan mayor fluorescencia a comparación de las plántulas transgénicas sin tratamiento. Del mismo modo, las unidades relativas de fluorescencia son significativamente menores en los extractos de proteína de plántulas silvestres. Se puede observar una baja actividad de GUS en las muestras silvestres, debido a que *A. thaliana* presenta cierta actividad endógena de GUS (Eudes et al., 2009), la cual fue considerablemente menor a comparación de las plántulas que contienen la construcción DR5::GUS.

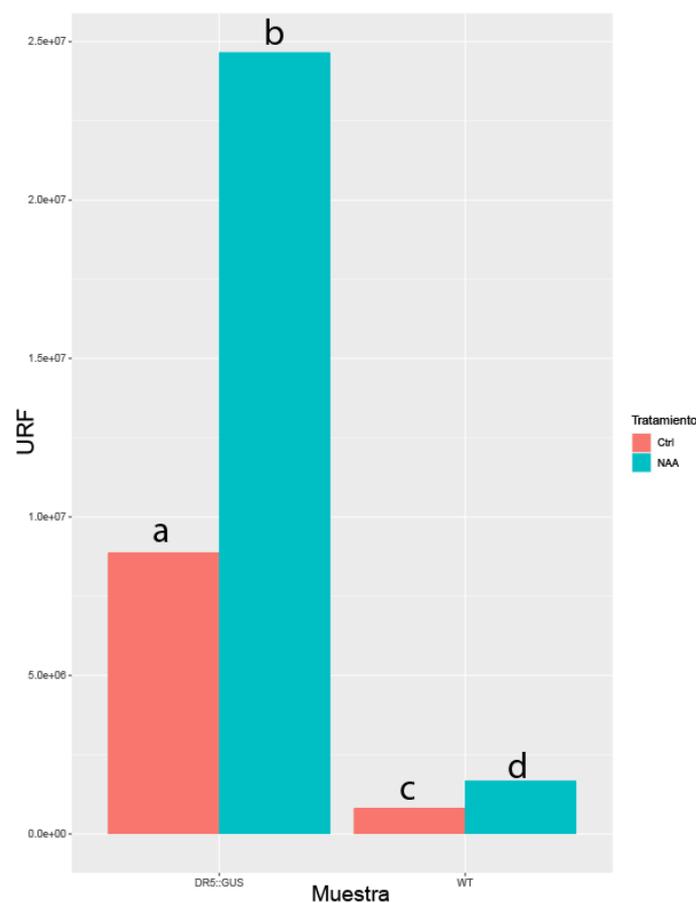


Figura 25. Cuantificación de actividad de GUS. Extractos de proteína de plántulas transgénicas y silvestres de *Arabidopsis thaliana* con o sin tratamiento con la auxina exógena 1-NAA (ácido 1-naftalenacético). URF: Unidades relativas de fluorescencia. Se realizó análisis de ANOVA con prueba de Tukey $p < 0.05$.

Una vez comprobada la actividad de GUS dirigida por el promotor sintético DR5, se amplificó la construcción reportera utilizando oligonucleótidos que flanquean a DR5 y el terminador de la nopalina sintasa. La longitud de DR5::GUS es de 2525 pb (Figura 18 y 26), fragmento que se insertó en el plásmido pGEM T-Easy (Figura 27) y transformó en las bacterias *E. coli* DH5- α . Se seleccionaron 3 colonias blancas que crecieron en el medio de cultivo Amp+/X-Gal/IPTG. La comprobación del vector recombinante se realizó mediante digestión con las enzimas *EcoRI* o *NcoI*. En la Figura 27 observamos que *EcoRI* tiene dos sitios de corte, los cuales se encuentran en los extremos del sitio múltiple de clonación por lo que al hacer digestión con esta enzima, se espera obtener un fragmento de 2525 pb (correspondientes a DR5::GUS) y otro de 3015 pb (correspondiente al vector pGEM T-Easy). La enzima *NcoI* tiene un único sitio de corte por lo que se esperaría obtener un fragmento de 5539 pb que corresponden a pGEM T-Easy junto con DR5::GUS linealizado. En la Figura 28 observamos que la banda del plásmido sin digerir se encuentra entre 3000 y 4000 pb, esto debido a que puede encontrarse superenrollado. Sin embargo, al realizar la digestión con *NcoI* obtenemos una banda poco más arriba de 5000 pb, la cual corresponde a la longitud del plásmido con el inserto. Las dos bandas resultantes de la digestión de *EcoRI* también corresponden a los fragmentos de 2525 pb (DR5::GUS) y 3015 pb (pGEM T-Easy). El resultado fue el mismo para las tres colonias que se analizaron, por lo que se infiere que la clonación fue exitosa.

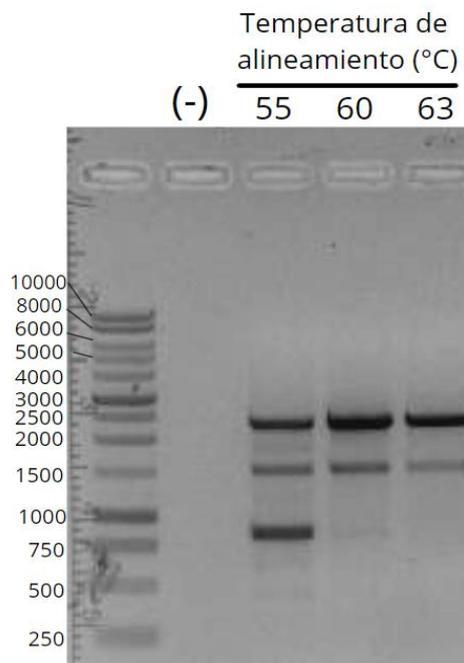


Figura 26. Amplificación de la construcción reportera DR5::GUS de DNA genómico de semillas de *A. thaliana*. Se realizó un gradiente de temperatura para determinar la temperatura adecuada de amplificación y optimizar la purificación del fragmento en el gel de agarosa.

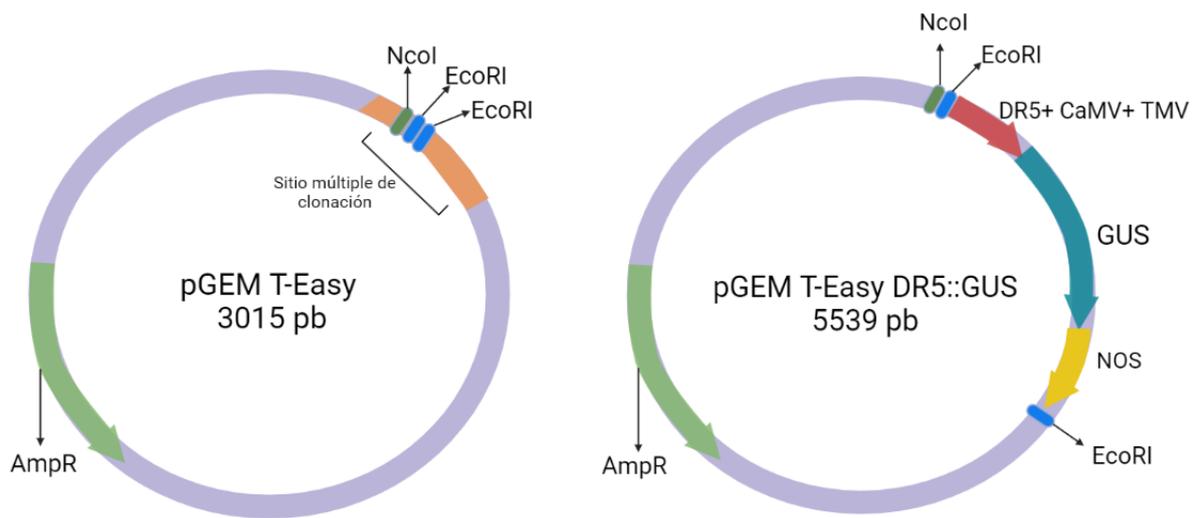


Figura 27. Representación gráfica del plásmido pGEM T-Easy vacío (A) y con la construcción DR5::GUS insertada (B). Se indica también el gen de resistencia a ampicilina y el sitio de clonación múltiple, donde se encuentran los sitios de restricción para las enzimas *NcoI* y *EcoRI*. En el plásmido B, se representa la inserción esperada de DR5::GUS entre los sitios de reconocimiento para *EcoRI*, lo cual se confirma con la digestión del plásmido.

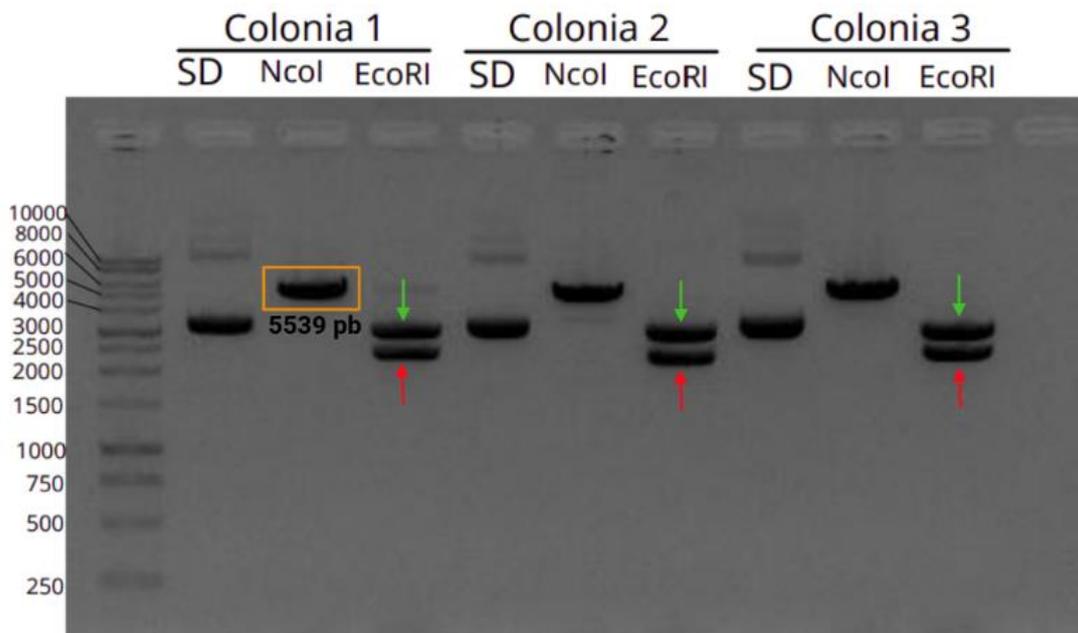


Figura 28. Digestión del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con *NcoI* y *EcoRI* para confirmar la clonación. Se purificó plásmido de tres colonias transformadas y se trataron con las enzimas de restricción *NcoI* que linealiza el plásmido de 5539 pb (señalado en el recuadro amarillo) y *EcoRI*, que permite obtener un fragmento de 3015 pb (señalado con flechas verdes) y un fragmento de 2525 pb (señalado con flechas rojas) que corresponde a DR5::GUS.

Finalmente, la construcción fue secuenciada para asegurar que contenía a DR5::GUS sin alteraciones importantes en su secuencia. Se emplearon 4 oligonucleótidos para realizar la secuenciación del plásmido: T7 y M13 reverso, “GUS Fw” y “GUS Rv” que se unen en los extremos de la construcción DR5::GUS y en dentro del gen GUS como se muestra en la Figura 29.

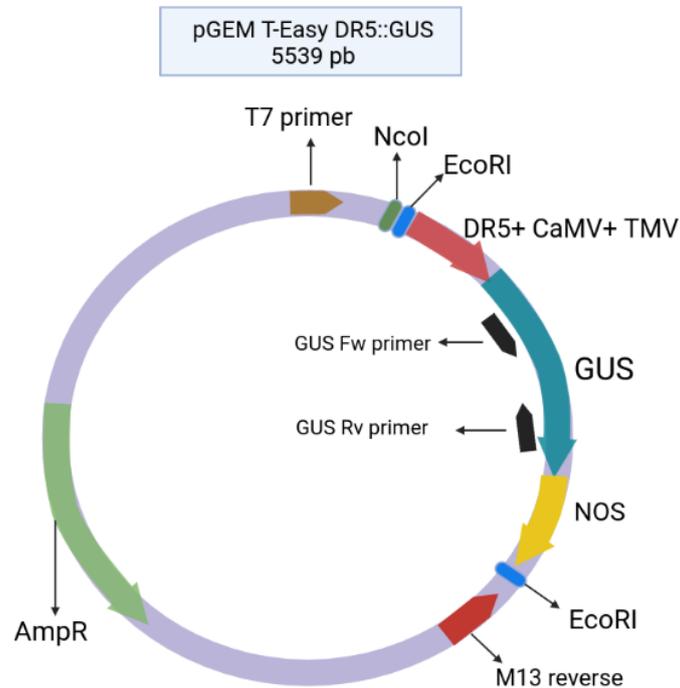


Figura 29. Representación gráfica del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con los oligonucleótidos empleados para su secuenciación. T7 (café), M13 reverso (rojo), GUS Fw y GUS Rv (flechas negras).

Los oligonucleótidos “T7” y “GUS Rv” nos permiten determinar la secuencia a partir del promotor DR5 hasta una fracción de GUS y los oligonucleótidos “M13 reverso” y “GUS Fw” permiten ver la secuencia desde una porción de GUS hasta el terminador de la nopalina sintasa.

Los resultados de secuenciación fueron visualizados en Unipro UGENE, donde se reconocieron las secuencias del promotor DR5::GUS, el promotor mínimo 35S CaMV, la secuencia 5’ TMV, el gen GUS y el terminador de NOS (Figuras 30-33).

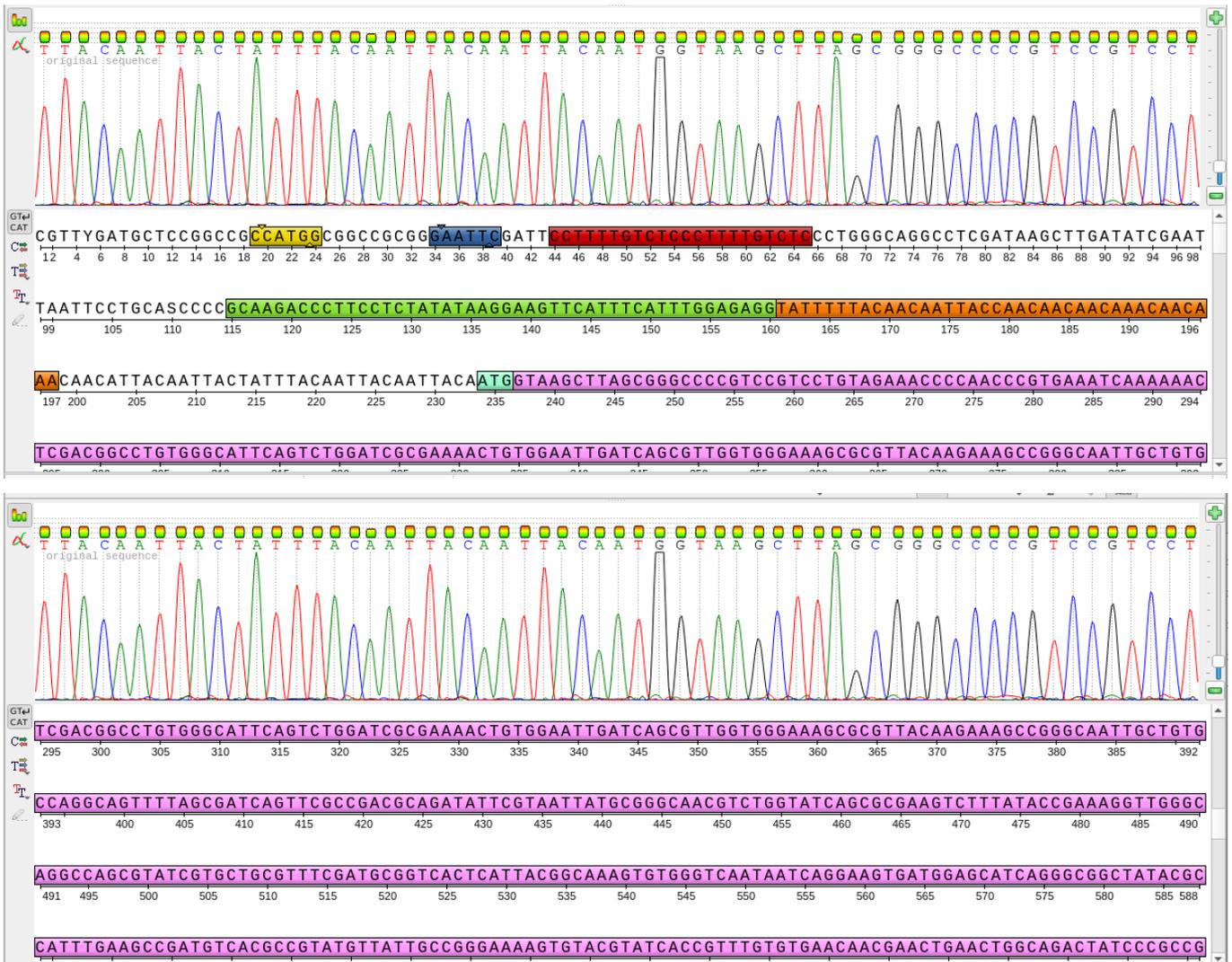


Figura 30. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con el oligonucleótido T7. Se muestran las secuencias de *Nco*I (amarillo), *Eco*RI (azul), 2 repeticiones de la secuencia DR5: CCTTTTGTCTC (rojo), promotor mínimo 35s (verde), secuencia 5' TMV (naranja), el codón de inicio de la traducción de GUS (azul claro) y el marco de lectura del gen GUS (rosa).

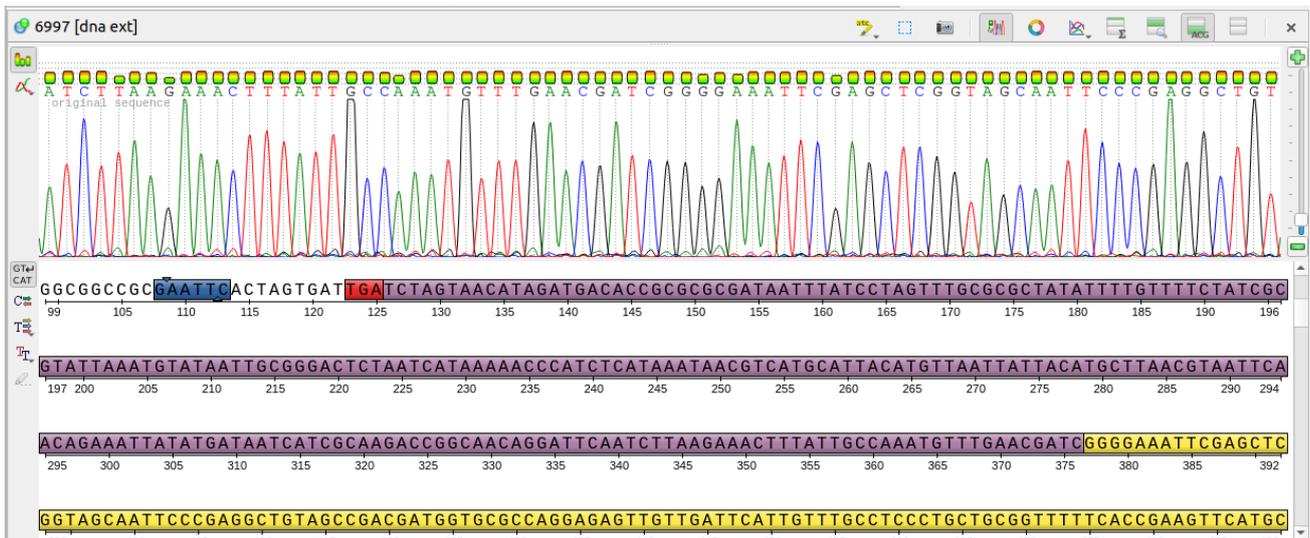


Figura 31. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con el oligonucleótido M13 reverso. Se muestran la secuencia de *EcoRI* (azul) que flanquea la secuencia de codón de paro (rojo), el terminador de NOS (morado) y el final del marco de lectura del gen GUS (amarillo).

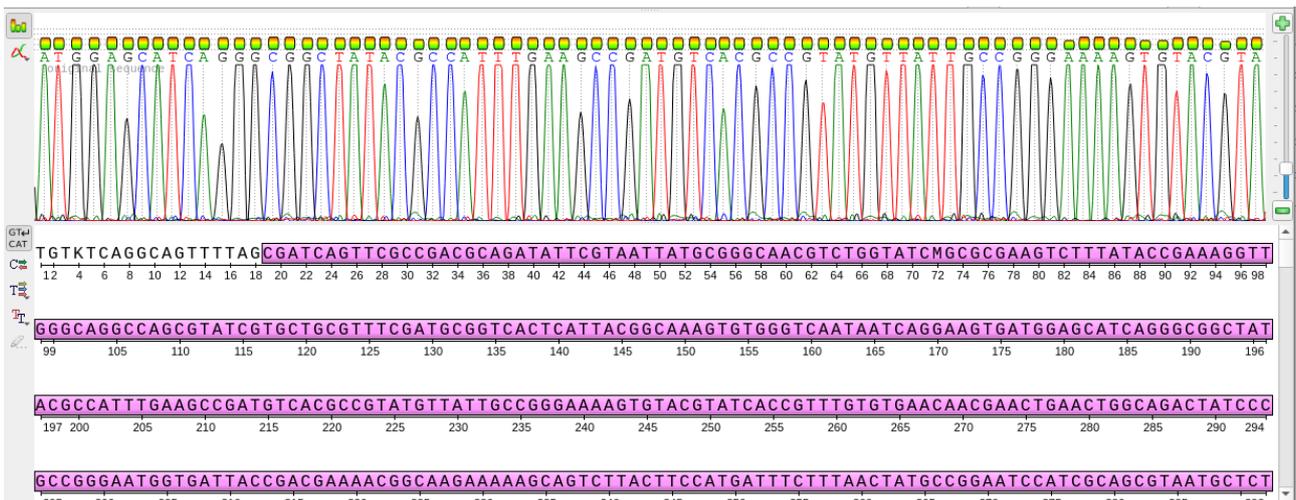


Figura 32. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy DR5::GUS con el oligonucleótido GUS Fw. Se muestra parte de la secuencia del gen GUS (rosa) hasta 500 pb antes de llegar al terminador de NOS.

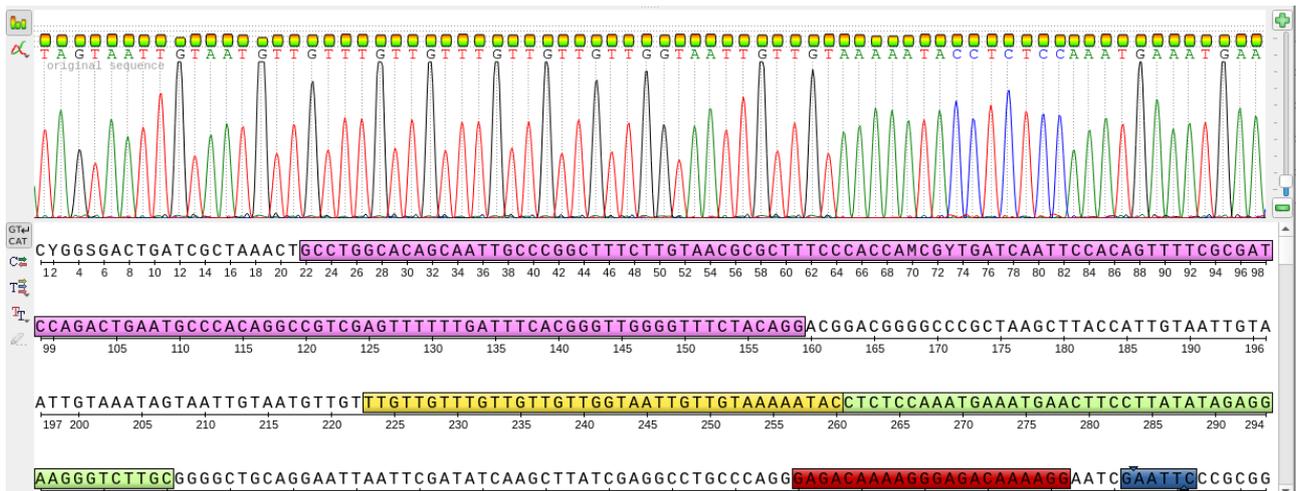


Figura 33. Determinación de la secuencia de nucleótidos del plásmido pGEM T-Easy con el oligonucleótido GUS Rv. Se muestra la secuencia de *EcoRI* (azul), la secuencia complementaria de los dos repetidos del promotor DR5: **CCTTTTGTCTC** (rojo), la secuencia complementaria del promotor mínimo 35s (verde) seguido de la secuencia 5' TMV (amarillo) y finalmente el inicio del gen GUS (rosa).

Ensayo de transfección de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* con pGEM_DR5::GUS y cotransfección con pENTR_ZmARF34.

Se transfectaron protoplastos con la construcción 35S::GUS para comparar la actividad de un promotor constitutivo con el promotor sintético que contiene las dos repeticiones de DR5. Observamos en la Figura 34 que los protoplastos sin transfectar muestran una baja actividad de GUS, a comparación de los protoplastos transfectados con 35S::GUS y DR5::GUS. Para los protoplastos transfectados con 35S::GUS, al ser tratados con auxinas, notamos que hay una ligera disminución de actividad, lo que es contrario en los demás casos, donde al aplicar el estímulo, la actividad enzimática aumenta. La construcción DR5::GUS parece mostrar una respuesta efectiva al estímulo con auxinas, pues la actividad de GUS aumenta después del tratamiento.

Para conocer si las dos repeticiones de GUS son suficientes para la unión de ARF, se cotransfectaron protoplastos con el vector pGEM_DR5::GUS y pENTR_ARF34 que contiene el marco de lectura de ZmARF34 bajo el promotor CaMV 35S. Observamos en la Figura 34 que la actividad de GUS es ligeramente mayor en los protoplastos con DR5::GUS, sin embargo, al añadir el estímulo con auxinas, notamos que la actividad enzimática aumenta en los protoplastos cotransfectados con DR5::GUS y pENTR_ZmARF34.

Actividad de GUS en protoplastos de *A. thaliana*

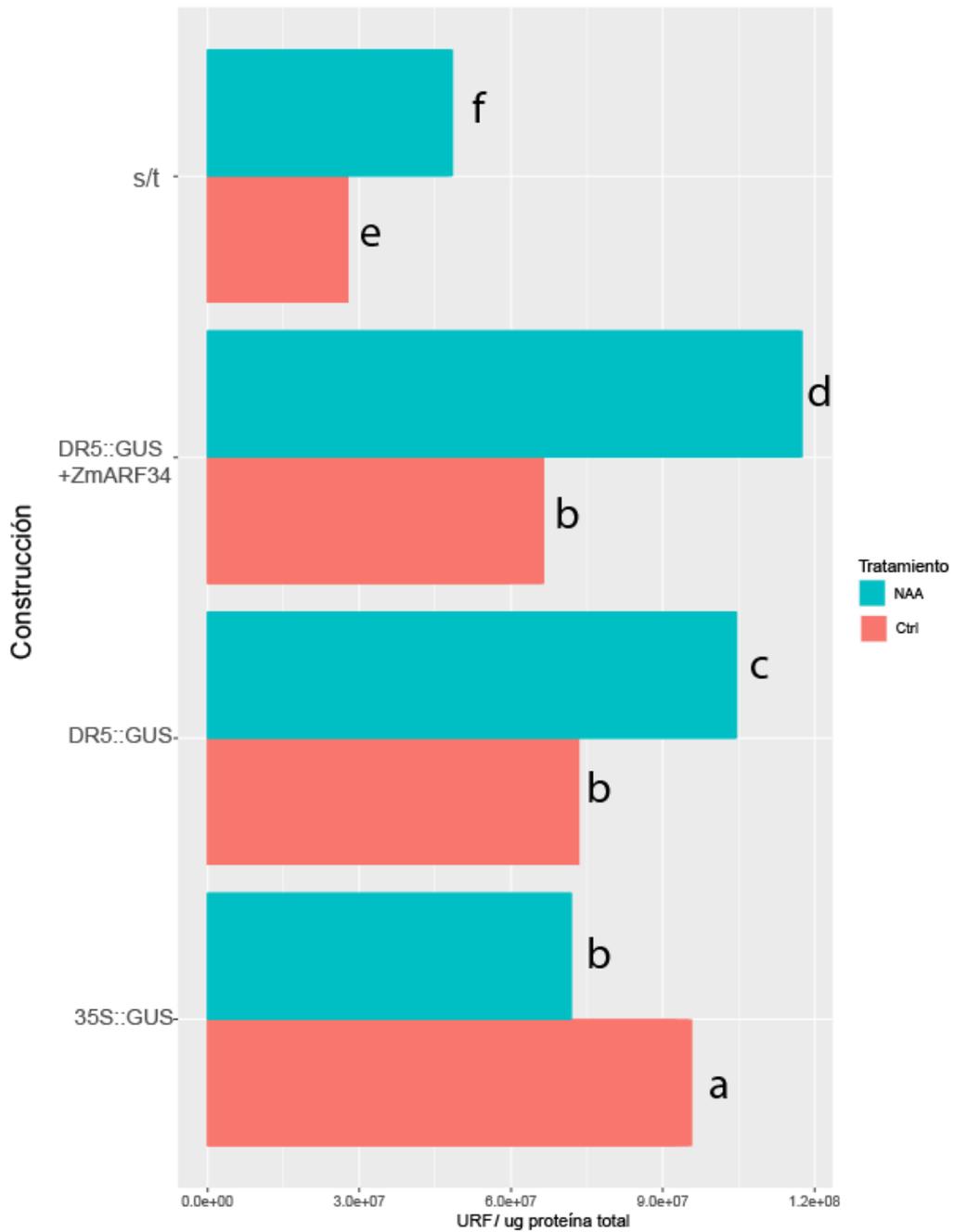


Figura 34. Cuantificación de actividad de GUS en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Se realizó análisis de ANOVA con prueba de Tukey $p < 0.05$.

Discusión

Homología de los ARF.

Al analizar la base de datos generada en BLASTP, observamos que aquellas regiones de las secuencias de aminoácidos donde se marca un % de identidad mayor al 50% pertenecen a las regiones donde se encuentran los dominios DBD B3, el dominio medio de regulación y el dominio PB1 de las 90 secuencias de ARF.

Por ejemplo, ARF5 de *A. thaliana* (AtARF5) tiene un 66.67% de identidad con ARF29 de *Zea mays* (ZmARF29) en la región que abarca del aminoácido 31 al 465, donde se encuentra el DBD B3 y el dominio medio de regulación, con un valor E de 0.00 y puntuación de bits de 583, por lo que la coincidencia es significativa. Además, la región del aminoácido 786 al 890, tiene un 77.14% de identidad también con ZmARF29, que abarca la región del dominio PB1, con valor E de 2.4×10^{-48} y puntuación de bit de 178.

Las secuencias alineadas en MUSCLE y visualizadas en UGENE, muestran un mismo patrón de alineamiento que la base de datos de alineamiento generada en BLASTP, por lo que podemos indicar que es un alineamiento confiable para construir la relación filogenética.

Clasificación de los factores ARF.

Xing y col. en 2011 realizaron un análisis filogenético de los factores de respuesta a auxinas de maíz, en donde identificaron 31 secuencias de ARF en la base de datos Maize Assembled Genomic Island en el volumen 2 del genoma de maíz (Figura 35). En esta filogenia, los ARF se dividen en 6 clases (Clase I-VI), acorde a una clasificación previa de ARF en *Arabidopsis thaliana*. En 2016 se ensambló y anotó en la base de datos MaizeGDB el 4to volumen del genoma de maíz (Jiao et al., 2016) el cual era el más reciente cuando iniciamos este trabajo. En esta base de datos identificamos 37 secuencias de ARF de maíz y se generó una filogenia en FastTree2.0 empleando el método de máxima verosimilitud y 1000 iteraciones. En esta construcción filogenética, los 37 ARF se ordenan en 7 clados principales, cuya organización es bastante similar a la presentada en la filogenia de Xing y col., pero se incluyen los nuevos ARF identificados (ZmARF32, ZmARF33, ZmARF34, ZmARF35, ZmARF36 y ZmARF38). Los ARF de la clase II de la filogenia de Xing y col. 2011 se distribuyen en dos clados diferentes en este nuevo árbol filogenético (Figura 36), como un clado AtARF10/16-like (Clase II) y otro AtARF17-like (Clase VII). En este caso, también cambia la clasificación de ZmARF8 como AtARF2-like (Clase III), en lugar de AtARF10/16-like.

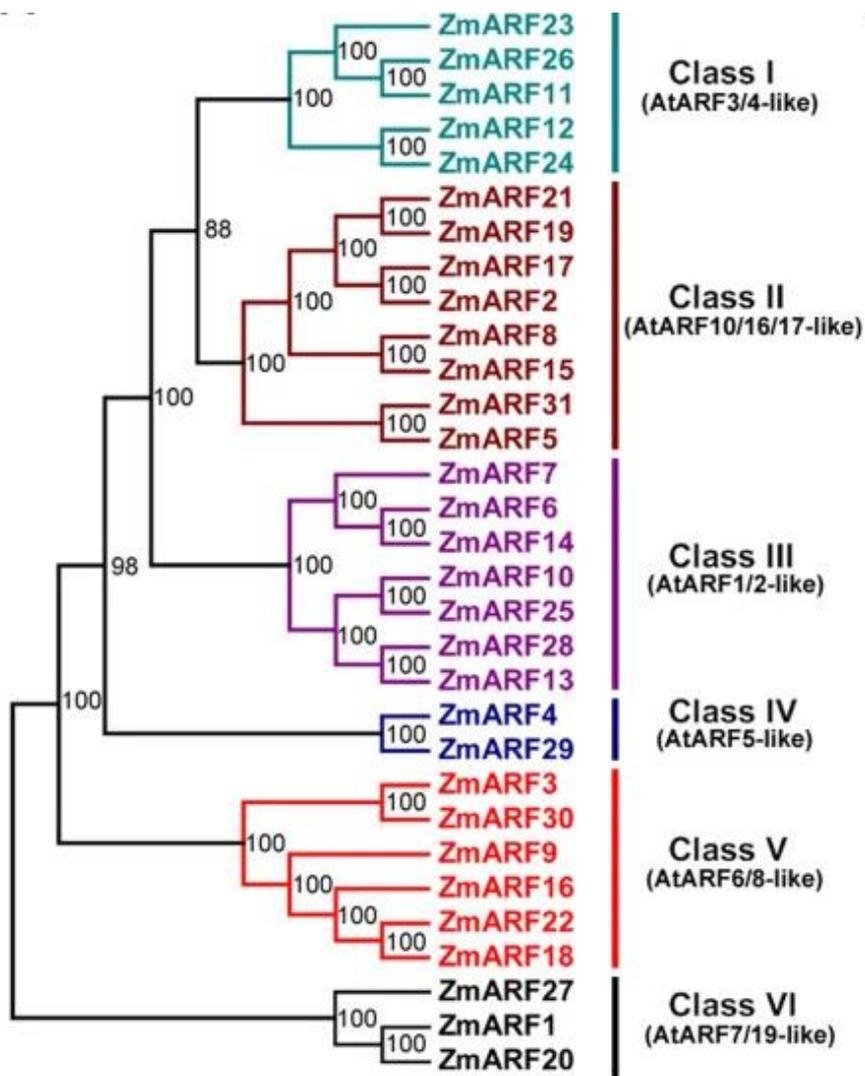


Figura 35. Relación filogenética entre las proteínas ZmARF. Relación filogenética entre las proteínas ARF del maíz. El árbol desarraigado se generó con el programa Mr. BAYES por método bayesiano y se realizó la prueba de bootstrap con 20.000 iteraciones. Los números en los nodos indican los valores de credibilidad del clado. Las clases de genes se indicaron con diferentes colores. (Tomado de Xing et al., 2011)

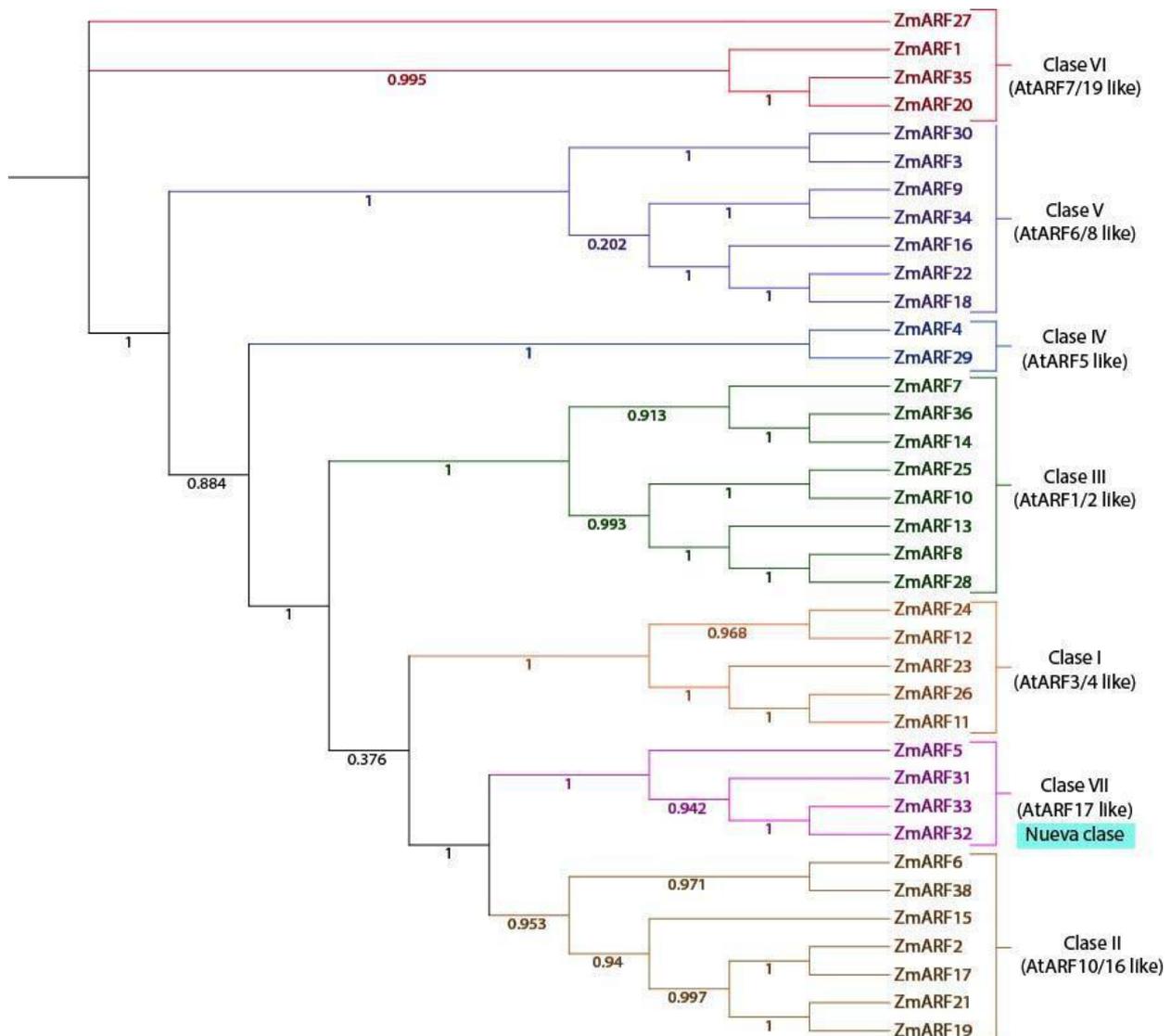


Figura 36. Análisis filogenético de los factores de respuesta a auxinas en maíz. La filogenia comprende 7 clados principales diferenciados por colores. Se indica la relación con las seis clases determinadas en el análisis de Xing y col. en 2011 además de la nueva clase formada en esta construcción.

De acuerdo con la clasificación de los ARF de Finet y col. realizada con 224 secuencias de proteínas relacionadas con ARF, que representan todas las principales divisiones vivas de las plantas terrestres, los ARF se dividen en 3 clados principales, A, B y C. Dentro del clado A, se encuentran aquellos ARF denominados activadores de la transcripción (donde se encuentran los activadores ARF5, ARF6, ARF7, ARF8 y ARF19 de *A. thaliana*). En la filogenia construida con las secuencias de ARF de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha* (Figura 23), en los 3 primeros clados agrupan estos ARF activadores de la transcripción, incluyendo como más recientes a ZmARF34 y ZmARF35. Estos corresponden a las clases IV, V y VI de la Figura 30. El ARF5 de *A. thaliana* (AtARF5) que se ha descrito como activador transcripcional relevante en la inducción de embriogénesis somática de *Arabidopsis* (Wojcikowska y Gaj, 2017) y ARF11 de arroz (OsARF11) agrupa con ZmARF4 y ZmARF29 de maíz (Figura 23; color verde). La distribución de

dominios es muy similar entre estos ARF, por lo que pueden ser candidatos importantes para su estudio en la embriogénesis somática de maíz.

Los ARF represores de la transcripción que corresponden al clado B de Finet y col., 2013 (Figura 8) y agrupan a las clases I y III (Figura 36; Figura 23). De la clase I, ninguno presenta el dominio C-terminal PB1, el cual le permite formar heterodímeros con las proteínas represoras AUX/IAA. En la clase III, varios ARF conservan el dominio PB1 y otros lo tienen truncado o duplicado, por lo que la interacción con las proteínas AUX/IAA de ARF represores de la transcripción parece ser variable. Los ARF de clase II y VII (Figura 36), designados como AtARF10/16/17-like, pertenecen al clado C cuyo rol en la transcripción podría ser activador o represor (Finet et al., 2013). Estos ARF tampoco poseen dominio PB1 (Figura 23).

La falta de interacción entre los ARF de clase B y C con proteínas PB1 sugiere que las proteínas ARF represoras funcionan independientemente de la regulación canónica por auxinas y, en cambio, compiten por los sitios de unión al DNA o se heterodimerizan con otras proteínas ARF para bloquear la transcripción. Por otra parte, se ha demostrado un mecanismo de percepción directo de las auxinas para AtARF3 de *Arabidopsis* (ETTIN), el cual no posee dominio PB1 (Simonini et al., 2018), por lo que puede existir una mayor variedad para la acción de ARF en respuesta al estímulo. Además, aún no está claro si los ARF activadores y represores regulan a los mismos genes o si los ARF represores tienen un papel específico en la selección de genes regulados a la baja. Se ha propuesto que los ARF represores y activadores podrían competir por unirse a los mismos promotores. Pruebas experimentales con líneas mutantes de *Physcomitrella patens* que carecen de PB1 muestran cambios masivos en la transcripción con mala regulación de más de un tercio de los genes anotados. Además, la mutante *aux/iaa (pb1)* generada mostró ser insensible a la auxina, lo que indica que la regulación transcripcional por parte de la auxina se produce exclusivamente a través de PB1. Por otro lado, se observó que los ARF represores coordinan la inducción de genes junto con los ARF activadores y los Aux/IAA (Lavy et al., 2016). Con esto, recalamos que el hecho de presentar o no el dominio C-terminal PB1 en los ARF resulta interesante para comprender cómo se regulan estos ARF y cómo inducen o reprimen la transcripción.

Acumulación diferencial de transcritos de ARF de maíz durante la inducción a callo embriogénico de maíz.

De acuerdo con los análisis de Juárez-González 2019 (Figura 17) y el realizado en este trabajo (Figura 37), el embrión a los 15 días después de la polinización (EI15) presenta patrones de acumulación de ARF únicos para la inducción de callos a partir de este explante, en comparación con los embriones maduros. ZmARF4 y ZmARF29 son ortólogos de AtARF5 y OsARF11, los cuales han mostrado ser importantes durante la inducción a embriogénesis y desarrollo de callo embriogénico. ZmARF4 y ZmARF29 presentan un patrón de acumulación más elevado en embriones que en callo, tanto para IE15 como para EM, pero es notorio que en C15 sus niveles son mayores que en CM. Estos ARF de maíz se clasifican dentro de los activadores transcripcionales, conservan los tres dominios (DBD B3, dominio medio de regulación y PB1), y podrían ser candidatos importantes para profundizar su participación en la regulación genética dirigida por auxinas en tejidos con elevado potencial embriogénico.

ZmARF1, ZmARF20, ZmARF27 y ZmARF35, que se encuentran dentro del clado de los ARF activadores de la transcripción, muestran una expresión más abundante en callos que en embriones (tanto para C15, como para CM). Estos 4 ARF pertenecen al mismo clado en la filogenia reconstruida, son los miembros de la Clase VI descrita por Xing y col. (2011), se agrupan en el primer clado de la filogenia con las secuencias de ARF de *A. thaliana*, *O. sativa* y *Marchantia polymorpha* y conservan los tres dominios. Su comportamiento parece reflejar la respuesta generalizada a la inducción de callos por 2,4-D, independientemente de la embriogenicidad del explante.

Varios ARF represores muestran patrones de acumulación diferencial bastante notables entre explantes y entre embrión y callo embriogénico. ZmARF11, ZmARF12, ZmARF24 y ZmARF26 pertenecen a la misma clase (Clase I de Xing y col. 2011), las 4 proteínas presentan aproximadamente la misma longitud de aminoácidos y ninguna conserva el dominio C-terminal PB1, estos ARF presentan mayor acumulación de transcritos en embriones que en callos, particularmente se acumulan más en IE15, explante con mayor potencial para formar callo embriogénico y posterior regeneración de la planta. Su disminución en C15 respecto al explante, es mucho más notoria, que la observada para CM. De la misma forma se comportan ZmARF13, ZmARF25 y ZmARF28. Estos ARF también son represores y pertenecen a un mismo clado que conserva el dominio PB1 (Clase III de Xing y col. 2011). Resulta interesante observar que los patrones de acumulación de ARF en embriones y callos son similares para una misma clase de ARF. Sería oportuno indagar cómo el hecho de conservar o no el dominio PB1, el cual le permite interactuar con los represores AUX/IAA, afecta la regulación de la actividad de estos ARF represores.

El hecho de que los patrones de acumulación de los ARF de maíz se relacionen con la organización de la filogenia construida nos hace sugerir que la función y especificidad de la actividad de los ARF es altamente conservada en plantas. Resultaría importante conocer qué factores influyen para que

los ARF activadores o represores de un mismo clado se expresen más en callo embriogénico que en los embriones o viceversa, posiblemente a nivel de secuencia de aminoácidos se lleven a cabo diversas formas de regulación transcripcional.

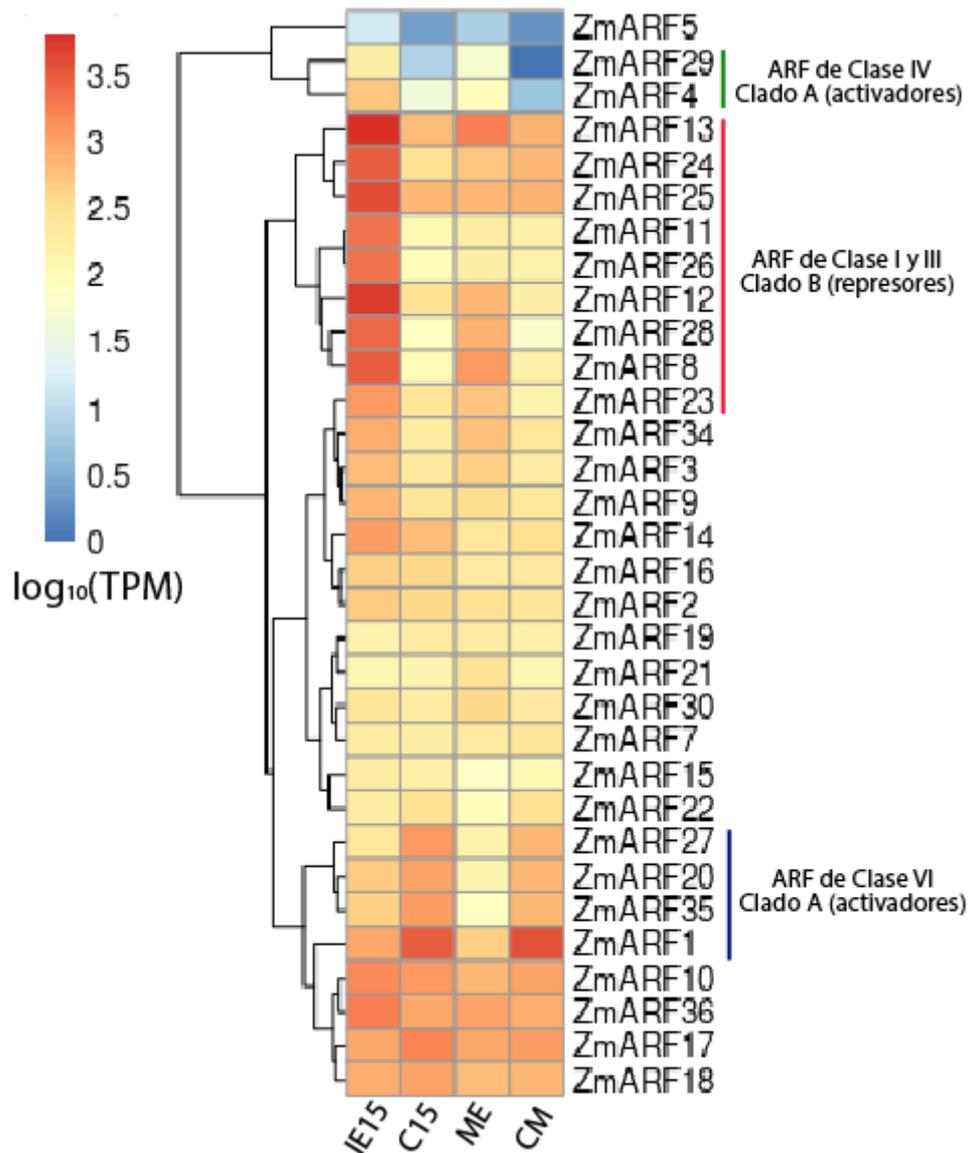


Figura 37. Acumulación de transcritos de ARF de maíz en inducción a embriogénesis somática. El mapa de calor muestra la acumulación en transcritos por millón (TPM) de ARF en embrión de 15 días después de la polinización (IE15), embrión maduro (ME15), callo embriogénico formado a partir de IE15 (C15) y callo embriogénico a partir de ME (CM). Para los ARF que muestran un patrón de acumulación diferencial entre explante y callo se ha señalado la clase a la que pertenecen.

Promotor sintético DR5 para observar la señalización de auxinas.

Para comprender la regulación génica mediada por auxinas es importante visualizar en donde se está llevando a cabo la señalización hormonal. Como se ha señalado anteriormente, la auxina se une al receptor de auxina nuclear TIR1/AFB en los complejos de ubiquitina ligasa SKP1-CUL1-F-box (SCF), lo cual aumenta la afinidad entre los complejos de ubiquitina ligasa SCF TIR1/AFB y las proteínas Aux/IAA que actúan como inhibidores de los factores de respuesta a auxina. Estos factores de transcripción se unen a la secuencia promotora AuxRE a través de su dominio de unión a DNA B3 y actúan activando o reprimiendo la transcripción. El promotor sintético DR5 diseñado por Ulmasov y col. en 1997 consta de un repetido de 7 veces la secuencia CCTTTTGTCTC que contiene la secuencia promotora TGTCTC, una secuencia consenso en varios promotores de genes de respuesta a auxina. Actualmente se conocen otras variantes de AuxRE que también pueden ser funcionales, como TGTCCC o TGTCAC, sin embargo, la secuencia clásica TGTCTC ha demostrado tener buena afinidad por ARF en diferentes ensayos *in vivo* (Sghaier et al., 2018).

El promotor DR5 se ha utilizado ampliamente en construcciones reporteras para visualizar la señalización de auxinas en diferentes tejidos empleando genes reporteros como GUS y GFP, permitiendo observar de manera eficiente la señalización hormonal.

Se ha informado que plantas modelo como *A. thaliana*, *Zea mays*, *N. tabacum* y *O. sativa* presentan actividad GUS de manera natural, la cual está presente en tejidos en desarrollo y parece responder también a estímulos hormonales (Sudan et al., 2006); sin embargo, esta actividad es muy baja, en algunos casos imperceptible y es dependiente del pH. Se puede llegar a observar actividad endógena de GUS a pH entre 4 y 5. No obstante, al trabajar con amortiguadores que permiten tener un pH superior a 7 (valor óptimo para la enzima GUS de *E.coli*) se puede identificar actividad de GUS transgénica. También se ha demostrado que el uso de ferricianuro de potasio y ferrocianuro de potasio agregadas en el tampón de pH mejora la tasa de expresión del gen gus introducido en comparación con la actividad GUS endógena, debido a que estos compuestos aceleran la formación del producto color azul y evitan su oxidación. Con esto, los ensayos en plantas con construcciones reporteras de GUS resultan ser confiables y precisas (Abdollahi et al., 2011).

Las semillas de *A. thaliana* que contienen la construcción reportera DR5::GUS mostraron mayor actividad de GUS al ser tratadas con la auxina exógena 1-NAA (ácido 1-naftalenacético), esto se refleja en la coloración azul más intensa en plántulas tratadas con la hormona. Las plántulas silvestres no mostraron actividad de GUS aún tratadas con la hormona (Figura 24). Observamos además que las regiones de la plántula donde se visualiza mayor actividad enzimática son raíces, raíces laterales y gran parte de la hoja. En el desarrollo post-embriionario las auxinas participan en el establecimiento y la formación de las hojas, las flores y las raíces. En las hojas, las auxinas inducen la formación y el desarrollo del tejido vascular (Figura 38). El desarrollo de las raíces laterales está controlado por un reloj interno que genera la expresión periódica de genes, algunos de los cuales son importantes en la señalización de las auxinas como LBD16 (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16) y ARF7 (Garay-Arroyo, et al., 2014).

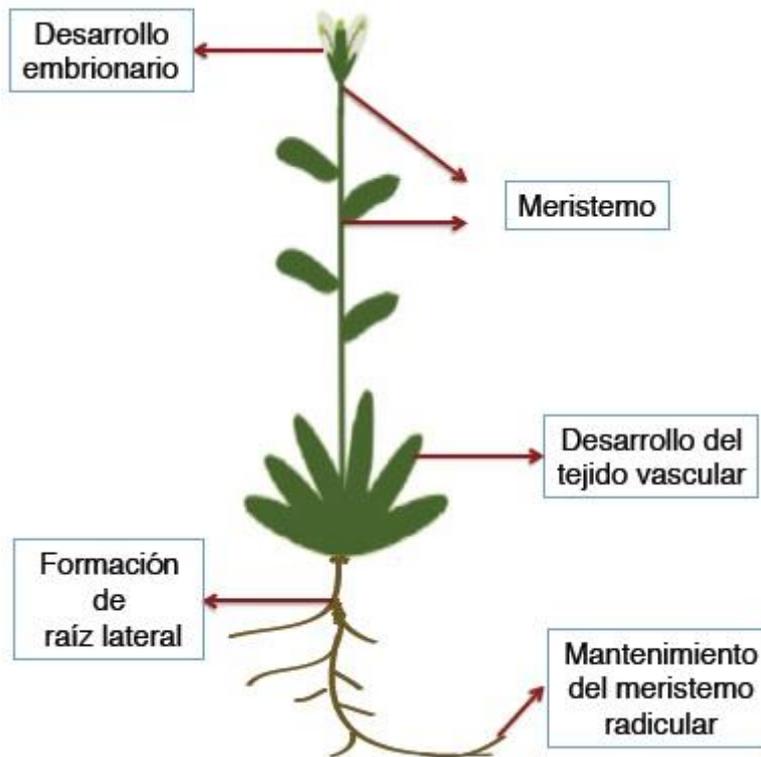


Figura 38. Las auxinas afectan diversos procesos del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. (Tomado de Garay-Arroyo et al., 2014)

Al realizar la cuantificación de actividad enzimática de GUS a través del ensayo fluorométrico notamos que los valores de fluorescencia relativa son significativamente más elevados en los extractos proteicos tratados con 1-NAA (Figura 25). En los extractos donde no hay transgen *gus* esta actividad es básicamente nula. Con esto, confirmamos que la construcción DR5::GUS es confiable para detectar la señalización de auxinas en plantas.

Se amplificó la construcción reportera DR5::GUS integrado en semillas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, con el fin de insertarlo en un plásmido que pudiese ser útil en la visualización de señalización de auxinas en protoplastos o callo embriogénico.

La construcción DR5::GUS, que consta de 2525 pares de bases se amplificó utilizando cebadores que flanquean la región 5' donde se encuentra el repetido DR5 y la región 3' con el terminador de nopalina sintasa (NOS). Este amplicón se insertó en el vector pGEM T-Easy (Figura 27).

El plásmido pGEM_DR5::GUS fue purificado de bacterias transformadas de *E. coli* DH5- α que y se sometió a pruebas con enzimas de restricción para confirmar la obtención adecuada del plásmido el cual también fue secuenciado. Las digestiones del vector nos dieron los fragmentos esperados, en la Figura 28 observamos la banda de aproximadamente 2525 pb (DR5::GUS) y 3015 pb (pGEM T-Easy) en las tres colonias seleccionadas después de la transformación. No obstante, los resultados de la secuenciación nos permitieron notar que la secuencia DR5 de 11 pb

CCTTTTGTCTC se encuentra únicamente en dos repeticiones y no en siete como lo reportado por Ulmasov y col. en 1997, esto puede ser debido a que el oligonucleótido “forward” que se une a la secuencia **CCTTTTGTCTC** se uniera a la región del promotor sintético de forma tal que solo amplificó 2 repeticiones arriba del promotor 35S y no las 7 repeticiones como se esperaba. Sin embargo, notamos que la secuencia del promotor mínimo 35S, la secuencia 5' líder TMV, el gen *gus* y el terminador de NOS se encuentran íntegros en el plásmido (Figuras 30-33).

Conociendo la secuencia de la construcción en el plásmido, se realizaron los ensayos de transfección de protoplastos y estímulos con auxinas, en donde observamos que efectivamente hay actividad de GUS dirigida por las dos repeticiones de DR5 y al añadir el estímulo hormonal, esta actividad se ve aumentada (Figura 34).

Ulmasov y col. en 1997 realizaron diferentes construcciones con repetidos de DR5 para determinar el efecto del número de copias del AuxRE sintético, donde indican que una sola copia de DR5 muestra una respuesta a auxinas equivalente al promotor mínimo 35S. Dos copias de DR5 muestran hasta tres veces mayor respuesta a auxinas y la orientación del AuxRE no tiene un efecto en la actividad promotora y de respuesta a auxinas. Los nucleótidos TGTC en las posiciones +1 a +4 son esenciales para la unión del ARF al DNA y el TC en las posiciones +5 y +6 son más importantes para la unión de algunos ARF que otros.

Se ha reportado que la unión de ARF al DNA se estabiliza cuando estas proteínas se dimerizan uniéndose a 2 secuencias del AuxRE *in vitro*. Esta interacción, además de estar mediada por el DBD también se ve influenciada por la interacción entre los dominios PB1 que le permiten interactuar tanto con proteínas AUX/IAA como con los mismos ARF (Ulmasov et al., 1997, Boer et al., 2014). Además de DR5, que consta de repeticiones directas (DR) del AuxRE **TGTCNN**, existen otros promotores con secuencias repetidas invertidas (IR) y evertidas (ER), como IR8 que consta de 8 repeticiones de **TGTCNN** invertidas y ER7 que consta dos repetidos palindrómicos. En 2020, Freire-Ríos y col. realizaron un metanálisis de conjuntos de datos transcriptómicos disponibles públicamente (5 conjuntos de datos de RNA-Seq y 10 de microarreglos) relacionados con la auxina y estimaron estadísticamente si alguna de las 33 repeticiones de AuxRE **TGTCNN** (IR0-10, ER0-10, DR0-10) se enriqueció en regiones 5' de genes dependientes de auxina. Se observaron genes que estaban regulados a la alza o a la baja después del tratamiento con auxina. Los elementos DR5 e IR8 se distribuyeron uniformemente en la región 5' de -3000 pb en todo el genoma de *Arabidopsis*. Además, encontraron que el motivo DR5 estaba más fuertemente asociado con la regulación a la alza que con la regulación a la baja, mientras que el motivo IR8 estaba asociado tanto con regulación a la alza como a la baja. Esto sugiere que hay dos repeticiones principales de AuxRE vinculadas a la respuesta transcripcional de auxinas: DR5 está mayormente asociado con la activación de genes e IR8 con activación y represión.

Con esto, se realizaron los ensayos de cotransfección de protoplastos con un vector que expresa a ZmARF34, que pertenece a la clase V de la filogenia generada de ARFs de *Zea mays* (Figura 36),

agrupa en los ARF que son activadores de la transcripción (Figura 23) y conserva el dominio PB1. De acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 34, no se observa un aumento importante en la actividad enzimática en los protoplastos cotransfectados sin estímulo hormonal, sin embargo, al agregar auxinas la actividad de GUS se eleva de forma considerable, por lo que podemos inferir que las dos repeticiones de DR5 que se encuentran en el plásmido permiten la unión de ZmARF34 el cual podría formar dímeros a través de su dominio DBD y PB1 y por lo tanto, una regulación a la alza de la transcripción de GUS, lo cual coincide con lo reportado anteriormente.

Conclusiones

Se confirmó que la arquitectura y organización de dominios de de los factores de respuesta a auxinas de *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha* es altamente conservada entre las subfamilias de ARF en las que se clasifican, además, aquellos ARF que son denominados activadores transcripcionales se agrupan en los mismos clados, lo mismo ocurre con los represores. Esto concuerda con los patrones de acumulación diferencial de transcritos de ARF de maíz durante la embriogénesis somática, ya que hay una relación con la organización filogenética obtenida y nos permite inferir que también hay conservación a nivel funcional.

La filogenia construida permitió la clasificación de los nuevos ARF anotados para maíz (ZmARF32, ZmARF33, ZmARF34, ZmARF35, ZmARF36, ZmARF38), así como la re-clasificación de algunos mediante su ubicación en clados diferentes. Los clados obtenidos concuerdan con la agrupación general previa en clado **A** integrado por ARF activadores, **B** integrado por represores y **C** donde agrupan los de actividad transcripcional ambigua.

Por otro lado, se confirmó la actividad del reportero GUS dirigido por el promotor sintético DR5 en plántulas de *A. thaliana*. Esta construcción fue amplificada y clonada en el vector pGEM-T Easy para su posterior expresión en protoplastos. A pesar de tener un reportero con solo dos repeticiones del AuxRE sintético DR5, demostramos que este promotor de dos repeticiones muestra respuesta a auxinas y puede establecer interacción con el activador transcripcional ZmARF34.

Perspectivas

- Realizar ensayos de transfección de protoplastos de maíz con el vector pGEM_DR5::GUS y de cotransfección con ZmARF de diferentes clases, activadores y represores para observar la respuesta a auxinas.
- Realizar bombardeo de callos embriogénicos y no embriogénicos con el vector pGEM_DR5::GUS para observar la señalización de auxinas en el tejido.
- Tomar el vector pGEM_DR5::GUS como punto de partida para la adición de más repeticiones de DR5 u otros AuxRE que tengan interacción específica con ARF de interés de estudio en el laboratorio para su análisis en embriogénesis somática.

Referencias.

Abdollahi, M. R., Memari, H. R., & van Wijnen, A. J. (2011). Factor affecting the endogenous β -glucuronidase activity in rapeseed haploid cells: How to avoid interference with the Gus transgene in transformation studies. *Gene*, 487(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.07.007>

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.

Balzan, S., Johal, G. S., & Carraro, N. (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00393>

Bateman A., Birney E., Cerruti L., Durbin R., Etwiller L., Eddy S. R., Griffiths-Jones S., L. Howe K., Marshall M., Sonnhammer E. L. L., (2002) The Pfam Protein Families Database, *Nucleic Acids Research*, Volume 30, Issue 1, 1, Pages 276–280, <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.276>

Bilas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., & Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2), 269–287. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1057-7>

Boer, D. R., Freire-Rios, A., van den Berg, W. A. M., Saaki, T., Manfield, I. W., Kepinski, S., López-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J. M., de Vries, S. C., Solano, R., Weijers, D., & Coll, M. (2014). Structural Basis for DNA Binding Specificity by the Auxin-Dependent ARF Transcription Factors. *Cell*, 156(3), 577–589. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.027>

Botella, E., Noone, David., Salzberg, L. I., Hokamp, Karsten., Devine, S. Krogh., Fogg, Mark., Wilkinson, A. J., & Devine, K. M. (2012). High-resolution temporal analysis of global promoter activity in *Bacillus subtilis* (pp. 1–26). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099387-4.00001-6>

Budak, H., & Akpinar, B. A. (2015). Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Functional & Integrative Genomics*, 15(5), 523–531. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0451-2>

Chandler, J. W. (2016). Auxin response factors. *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 1014–1028. <https://doi.org/10.1111/pce.12662>

Jones David T., Taylor William R., Thornton Janet M., (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences, *Bioinformatics*, Volume 8, Issue 3, Pages 275–282, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>

Dinkova y Juárez-González (2016) EL UNIVERSO DE RNAs PEQUEÑOS EN PLANTAS: SU VERSATILIDAD EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA, *Mensaje Bioquímico*, Vol. XL, 87-110, Depto. De Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, CDMX, MÉXICO, (<http://bioq9c1.fmedic.unam.mx/TAB>)

Fehér, A. (2019). Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>

Fernandes, J., Acuña, S., Aoki, J., Floeter-Winter, L., & Muxel, S. (2019). Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Non-Coding RNA*, 5(1), 17. <https://doi.org/10.3390/ncrna5010017>

Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C. P., & Marlétaz, F. (2013). Evolution of the ARF Gene Family in Land Plants: Old Domains, New Tricks. *Molecular Biology and Evolution*, 30(1), 45–56. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss220>

Freire-Rios, A., Tanaka, K., Crespo, I., van der Wijk, E., Sizentsova, Y., Levitsky, V., Lindhoud, S., Fontana, M., Hohlbein, J., Boer, D. R., Mironova, V., & Weijers, D. (2020). Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(39), 24557–24566. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009554117>

Fujimura, T. (2014). Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? *Plant Biotechnology Reports*, 8(1), 23–28. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0295-y>

Fukui, K., & Hayashi, K. (2018). Manipulation and Sensing of Auxin Metabolism, Transport and Signaling. *Plant and Cell Physiology*, 59(8), 1500–1510. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy076>

Galli, M., Liu, Q., Moss, B. L., Malcomber, S., Li, W., Gaines, C., Federici, S., Roshkovan, J., Meeley, R., Nemhauser, J. L., & Gallavotti, A. (2015). Auxin signaling modules regulate maize inflorescence architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43), 13372–13377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516473112>

- Garay-Arroyo A, de la Paz SM, García-Ponce B, et al. La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *Rev Educ Bioquímica*. 2014;33(1):13-22
- Gonzalez, D. H. (2016). Introduction to Transcription Factor Structure and Function. In *Plant Transcription Factors* (pp. 3–11). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00001-4>
- Guilfoyle, T. J. (2015). The PB1 Domain in Auxin Response Factor and Aux/IAA Proteins: A Versatile Protein Interaction Module in the Auxin Response. *The Plant Cell*, 27(1), 33–43. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132753>
- Guilfoyle, T. J., & Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.014>
- Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M. Q., Sayeed, R., Mangain, J., & Ejaz, B. (2020). Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00047-5>
- Han, Z., Wang, B., Tian, L., Wang, S., Zhang, J., Guo, S., Zhang, H., Xu, L., & Chen, Y. (2020). Comprehensive dynamic transcriptome analysis at two seed germination stages in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, 168(1), 205–217. <https://doi.org/10.1111/pp1.12944>
- He, G., Elling, A. A., & Deng, X. W. (2011). The Epigenome and Plant Development. *Annual Review of Plant Biology*, 62(1), 411–435. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103806>
- Huang, D., Kosentka, P. Z., & Liu, W. (2021). Synthetic biology approaches in regulation of targeted gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 63, 102036. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102036>
- Hull, G.A., Devic, M. (1995). The β -Glucuronidase (gus) Reporter Gene System. In: Jones, H. (eds) *Plant Gene Transfer and Expression Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 49. Springer, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/0-89603-321-X:125>
- Jiao, Y., Peluso, P., Shi, J. et al. Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature* 546, 524–527 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature22971>
- Juárez-González, V. T., López-Ruiz, B. A., Baldrich, P., Luján-Soto, E., Meyers, B. C., & Dinkova, T. D. (2019). The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation

at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis. *Scientific Reports*, 9(1), 14511. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50962-y>

Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W., & Kitts, P. (1995). Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *BioTechniques*, 19(4), 650–655.

Korasick, D. A., Westfall, C. S., Lee, S. G., Nanao, M. H., Dumas, R., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Jez, J. M., & Strader, L. C. (2014). Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5427–5432. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400074111>

Kumar, J., Singh, S., Singh, M., Srivastava, P. K., Mishra, R. K., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2017). Transcriptional regulation of salinity stress in plants: A short review. *Plant Gene*, 11, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.001>

Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development*, 143(18), 3226–3229. <https://doi.org/10.1242/dev.131870>

Lavy, M., Prigge, M. J., Tao, S., Shain, S., Kuo, A., Kirchsteiger, K., & Estelle, M. (2016). Constitutive auxin response in *Physcomitrella* reveals complex interactions between Aux/IAA and ARF proteins. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.13325>

Li, S.-B., Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., & Zhang, J.-Z. (2016). A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>

Liu, H., Jia, S., Shen, D., Liu, J., Li, J., Zhao, H., Han, S., & Wang, Y. (2012). Four AUXIN RESPONSE FACTOR genes downregulated by microRNA167 are associated with growth and development in *Oryza sativa*. *Functional Plant Biology*, 39(9), 736. <https://doi.org/10.1071/FP12106>

Liu, Y., Jiang, H., Chen, W., Qian, Y., Ma, Q., Cheng, B., & Zhu, S. (2011). Genome-wide analysis of the auxin response factor (ARF) gene family in maize (*Zea mays*). *Plant Growth Regulation*, 63(3), 225–234. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9519-0>

Long, Y., Scheres, B., & Blilou, I. (2015). The logic of communication: roles for mobile transcription factors in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(4), 1133–1144. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru548>

Martin-Arevalillo, R., Thévenon, E., Jégu, F., Vinos-Poyo, T., Vernoux, T., Parcy, F., & Dumas, R. (2019). Evolution of the Auxin Response Factors from charophyte ancestors. *PLOS Genetics*, *15*(9), e1008400. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008400>

Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>

Meraj, T. A., Fu, J., Raza, M. A., Zhu, C., Shen, Q., Xu, D., & Wang, Q. (2020). Transcriptional Factors Regulate Plant Stress Responses Through Mediating Secondary Metabolism. *Genes*, *11*(4), 346. <https://doi.org/10.3390/genes11040346>

Nowak, K., & Gaj, M. D. (2016). Transcription Factors in the Regulation of Somatic Embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 53–79). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_5

Petrillo, E., Godoy Herz, M. A., Barta, A., Kalyna, M., & Kornblihtt, A. R. (2014). Let there be light: Regulation of gene expression in plants. *RNA Biology*, *11*(10), 1215–1220. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.972852>

Pevsner, J. (2015). *Bioinformatics and Functional Genomics*. 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK 111 River Street, Hoboken, NJ 07030-5774, USA: WILEY Backwell

Pikaard, C. S., & Mittelsten Scheid, O. (2014). Epigenetic Regulation in Plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(12), a019315–a019315. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019315>

Powers, S. K., & Strader, L. C. (2020). Regulation of auxin transcriptional responses. *Developmental Dynamics*, *249*(4), 483–495. <https://doi.org/10.1002/dvdy.139>

Quiroz-Figueroa, F., Monforte-González, M., Galaz-Ávalos, R.M., Loyola-Vargas, V.M. (2006). Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. In: Loyola-Vargas, V.M., Vázquez-Flota, F. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 318. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:111>

Powers, S. K., Holehouse, A. S., Korasick, D. A., Schreiber, K. H., Clark, N. M., Jing, H., Emenecker, R., Han, S., Tycksen, E., Hwang, I., Sozzani, R., Jez, J. M., Pappu, R. v., & Strader, L. C. (2019). Nucleo-cytoplasmic Partitioning of ARF Proteins Controls Auxin Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Cell*, 76(1), 177-190.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.044>

Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2009) FastTree: Computing Large Minimum-Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Molecular Biology and Evolution* 26:1641-1650, doi:10.1093/molbev/msp077

Radoeva, T., Lokerse, A. S., Llavata-Peris, C. I., Wendrich, J. R., Xiang, D., Liao, C.-Y., Vlaar, L., Boekschoten, M., Hooiveld, G., Datla, R., & Weijers, D. (2019). A Robust Auxin Response Network Controls Embryo and Suspensor Development through a Basic Helix Loop Helix Transcriptional Module. *The Plant Cell*, 31(1). <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00518>

Riechmann, J. L. (2002). Transcriptional Regulation: a Genomic Overview. *The Arabidopsis Book*, 1, e0085. <https://doi.org/10.1199/tab.0085>

Robert C. Edgar, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, Volume 32, Issue 5, 1 March 2004, Pages 1792–1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Roosjen, M., Paque, S., & Weijers, D. (2018). Auxin Response Factors: output control in auxin biology. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 179–188. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx237>

Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.006>

Serganova, I., & Blasberg, R. G. (2019). Molecular Imaging with Reporter Genes: Has Its Promise Been Delivered? *Journal of Nuclear Medicine*, 60(12), 1665–1681. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.220004>

Sghaier, N., ben Ayed, R., Gorai, M., & Rebai, A. (2018). Prediction of auxin response elements based on data fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 763–772. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4216-6>

Simonini, S., Mas, P. J., Mas, C. M. V. S., Østergaard, L., & Hart, D. J. (2018). Auxin sensing is a property of an unstructured domain in the Auxin Response Factor ETTIN of *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 8(1), 13563. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31634-9>

Sims, K., Abedi-Samakush, F., Szulc, N., Macias Honti, M. G., & Mattsson, J. (2021). OsARF11 Promotes Growth, Meristem, Seed, and Vein Formation during Rice Plant Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4089. <https://doi.org/10.3390/ijms22084089>

Sudan, C., Prakash, S., Bhomkar, P., Jain, S., & Bhalla-Sarin, N. (2006). Ubiquitous presence of β -glucuronidase (GUS) in plants and its regulation in some model plants. *Planta*, 224(4), 853–864. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0276-2>

Suzuki M, Ketterling MG, Li QB, McCarty DR. Viviparous1 alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. *Plant Physiol.* 2003 Jul;132(3):1664-77. doi: 10.1104/pp.103.022475. PMID: 12857845; PMCID: PMC167103.

Swinnen, G., Goossens, A., & Pauwels, L. (2016). Lessons from Domestication: Targeting Cis - Regulatory Elements for Crop Improvement. *Trends in Plant Science*, 21(6), 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.014>

Ulmasov, T. (1997). ARF1, a Transcription Factor That Binds to Auxin Response Elements. *Science*, 276(5320), 1865–1868. <https://doi.org/10.1126/science.276.5320.1865>

Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2020). Current Perspectives on the Auxin-Mediated Genetic Network that Controls the Induction of Somatic Embryogenesis in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1333. <https://doi.org/10.3390/ijms21041333>

Wojcikowska, B., & Gaj, M. D. (2017). Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 36(6), 843–858. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2114-3>

Xing, H., Pudake, R.N., Guo, G. *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of *auxin response factor (ARF)* gene family in maize. *BMC Genomics* 12, 178 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-178>

Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr;1804(4):996-1010. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.01.011 . Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100603 ; PMCID: PMC2882806.

Zhang, X., Wang, Y., Yan, Y., Peng, H., Long, Y., Zhang, Y., Jiang, Z., Liu, P., Zou, C., Peng, H., Pan, G., & Shen, Y. (2019). Transcriptome sequencing analysis of maize embryonic callus during early redifferentiation. *BMC Genomics*, 20(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5506-7>

Zhao, Y. (2014). Auxin Biosynthesis. *The Arabidopsis Book*, 12, e0173. <https://doi.org/10.1199/tab.0173>

Zhou, W.-Y., Cai, Z.-R., Liu, J., Wang, D.-S., Ju, H.-Q., & Xu, R.-H. (2020). Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Molecular Cancer*, 19(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01286-3>