

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Silenciamiento simultáneo no letal de los genes de arginina
descarboxilasa de *Arabidopsis thaliana* mediante un
microRNA artificial.

Tesis que presenta

Ana Isabel Chávez Martínez

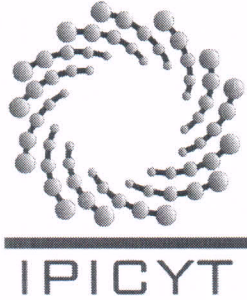
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., junio 2015.

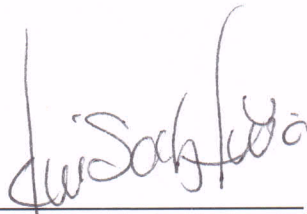


Constancia de aprobación de la tesis

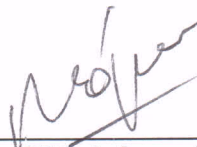
La tesis “**Silenciamiento simultáneo no letal de los genes de arginina descarboxilasa de *Arabidopsis thaliana* mediante un microRNA artificial**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ana Isabel Chávez Martínez** y aprobada el **diez de julio del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



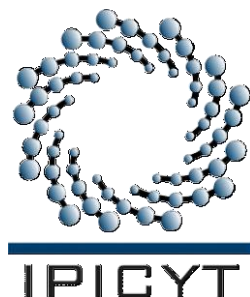
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Director de la tesis



Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Miembro del Comité Tutorial



Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de biología molecular de hongos y plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (559622) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 131 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana Isabel Chávez Martínez

sobre la Tesis intitulada:

Silenciamiento simultáneo no letal de los genes de arginina descarboxilasa de Arabidopsis thaliana mediante un microRNA artificial

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

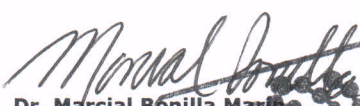
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:24 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de julio de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


INSTITUTO POTOSINO
DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA

Dedicatorias

A mis padres Alicia y J. Isabel quienes formaron la persona que hoy soy.

A mis hermanos Daniel y Edgar de quienes a pesar de ser su hermana mayor continuó aprendiendo.

A mi compañero de vida Julio Cesar por escuchar cuando necesito hablar, por no presionar cuando no quiero hacerlo y por su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos (Aida, Adriana, Azucena, Cindy, Diana, Emilio, Edgar, Israel, Itzel, Jocelin y Laura)

Agradecimientos

Agradezco al Concejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (559622).

Al instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por el espacio dentro del programa de posgrado.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, le agradezco la paciencia con la que enseña y motivación que inyecta cada día en cada uno de sus estudiantes.

A los doctores Rubén Hipólito López Revilla y Luis Antonio Salazar Olivo por sus sugerencias y comentarios que ayudaron a mejorar esta tesis.

A los doctores investigadores quienes me impartieron clases, por todas sus enseñanzas.

A la M. en C. Alicia Becerra Flora, por el apoyo técnico brindado para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra Diana Sánchez Rangel por sus enseñanzas y colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Aída Araceli Rodríguez Hernández por su apoyo y enseñanzas en el laboratorio

Al estudiante de doctorado Israel Maruri López por su apoyo y constante asesoría en la realización de esta tesis.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	Página ii
Créditos institucionales	Página iii
Acta de examen	Página iv
Dedicatorias	Página v
Agradecimientos	Página vi
Lista de figuras	Página vii
Lista de figuras suplementarias	Página viii
Resumen	Página ix
Abstract	Página x

I. Introducción	Página 1
II. Materiales y métodos	Página 2
III Resultados	Página 9
IV Discusión	Página 21
V Conclusión	Página 25
Referencias	Página 26

Lista de figuras

1. Vía de biosíntesis de la PAs.	Página 2
2. Expresión relativa de los genes <i>AtADC1</i> y <i>AtADC2</i> en las líneas silenciadas.	Página 10
3. Cuantificación del contenido de PAs libres en plantas de 12 y 28 días de edad de las líneas <i>Ws</i> , <i>adc1</i> , <i>adc2</i> y <i>mWs</i> .	Página 12
4. Fenotipo de las líneas <i>Ws</i> , <i>adc1</i> , <i>adc2</i> y <i>mWs8</i> .	Página 14
5. Porcentaje de germinación de las líneas <i>Ws</i> , <i>adc1</i> , <i>adc2</i> y <i>mWs8</i> bajo los tratamientos de ABA y/o PAs.	Página 17
6. Fenotipo y porcentaje de cotiledones verdes de las líneas <i>Ws</i> , <i>adc1</i> , <i>adc2</i> y <i>mWs8</i> bajo los tratamientos de ABA y/o PAs.	Página 18
7. Expresión del gen <i>ABI3</i> en las líneas <i>Ws</i> , <i>adc1</i> , <i>adc2</i> y <i>mWs8</i> bajo la aplicación exógena de ABA.	Página 20

Lista de figuras suplementarias

1. Diseño del microRNA <i>amirR:adc</i> .	Página 31
2. Construcción del vector <i>pMDC32-amirR:adc</i> .	Página 32
3. Fenotipo de la línea silenciada <i>mWs8</i> bajo la aplicación de ABA ó NaCl.	Página 33

Resumen

Silenciamiento simultáneo no letal de los genes de arginina descarboxilasa de *Arabidopsis thaliana* mediante un microRNA artificial.

Las poliaminas están involucradas en el crecimiento, desarrollo y respuesta al estrés en plantas. En *Arabidopsis thaliana*, el primer paso en la biosíntesis de las poliaminas (PAs) es catalizado por la arginina descarboxilasa (ADC), enzima limitante con dos isoformas codificadas por los genes parálogos *AtADC1* y *AtADC2*. Se ha descrito que mutantes insercionales de T-DNA sencillas de ambos parálogos no muestran fenotipos en desarrollo, sin embargo; la mutante *adc2* muestra sensibilidad al estrés salino. En el caso de la doble mutante de los genes *ADC1* y *ADC2* de *Arabidopsis* se ha descrito que sus semillas no son viables debido a que no se formaron los embriones. Para obtener plantas de *A. thaliana* con silenciamiento simultáneo no letal de los genes *AtADC1* y *AtADC2* se construyó un vector que expresa el microRNA artificial pMDC32-amirR:adc, cuyo blanco es la región conservada entre ambos parálogos. *Arabidopsis* fue transformada con el vector pMDC32-amirR:adc para generar plantas transgénicas en las que podría reprimirse la expresión de los genes *AtADC1* y *AtADC2*. Se obtuvieron 10 líneas de plantas transgénicas (mWs1 a mWs10) que fueron evaluadas bajo estrés salino (NaCl 125 mM) y en presencia de la fitohormona ácido abscísico (ABA 1 μ M). Se seleccionó la línea transgénica mWs8 que presentó mayor sensibilidad a los tratamientos en comparación con la parental y las mutantes sencillas *adc1* y *adc2*. Las plantas de la línea mWs8, tuvieron un retardo en la floración y defectos en la formación de semillas y en ellas disminuyeron los transcritos de los genes *AtADC1* y *AtADC2* y los niveles de PAs libres. Por lo tanto, el transgén amirR:adc sí provoca el silenciamiento simultáneo no letal de *AtADC1* y *AtADC2* que afecta el desarrollo de las plantas y aumenta su sensibilidad al estrés salino y a la aplicación de ABA. La sensibilidad de la línea mWs8 al ABA podría deberse a una mayor expresión del gen *ABI3*, regulador de la vía de señalización del ABA. La línea silenciante mWs8 es un nuevo sistema modelo para el estudio de la función de las PAs en el desarrollo y la respuesta al estrés en plantas.

PALABRAS CLAVE. Poliaminas, arginina descarboxilasa, ABA, *ABI3* y estrés abiótico.

Abstract

Nonlethal simultaneous silencing arginine decarboxylase gene of *Arabidopsis thaliana* using an artificial microRNA

Polyamines are involved in plant growth and development and plant stress responses. In *Arabidopsis thaliana*, the first step in biosynthesis of polyamines is catalyzed by arginine decarboxylase (ADC), rate-limiting enzyme with two isoforms coding by the paralogous genes *AtADC1* and *AtADC2*. It was described that the individual mutants of *ADC1* and *ADC2* doesn't have phenotype in development, but the *adc2* mutant showed sensibility to saline stress. The seeds double mutant of genes *ADC1* and *ADC2* are lethal in *Arabidopsis*, because the embryos were not formed. In order to obtain *A. thaliana* plants nonlethal simultaneous silencing of *ADC1* and *ADC2* genes, a vector that expressing an artificial microRNA pMDC32-amirR:adc build, whose target is the region conserved between paralogous. *Arabidopsis* was transformed with a pMDC32-amirR:adc vector for generating transgenic plants which could restrain the expression of genes *AtADC1* and *AtADC2*. 10 transgenic lines (mWs1 to mWs10) obtained were evaluated under saline stress (NaCl 125 mM) and the acid abscisic hormone (ABA 1 μ M). Transgenic line mWs8 was selected, this showed greater sensitivity to treatment compared to the parental and simple mutant *adc1* and *adc2*. Plants of mWs8 line, had a delay in flowering and defects in the formation of seeds and dropped them transcripts of genes *AtADC2* and *AtADC1* and levels of free PAs. Therefore, the transgene AmirR: adc causes nonlethal simultaneous silencing *AtADC1* and *AtADC2* that affects the development of plants and increases their sensitivity to saline stress and ABA application. The sensitivity of mWs8 line to exogenous application of ABA may be due to increased expression of *ABI3* gene regulator of ABA signaling pathway. Line silence mWs8 is a new model system for studying the role of APs in the development and stress response in plants.

KEY WORDS: Polyamines, arginine decarboxylase, ABA, *ABI3* and abiotic stress.

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas (PAs) son policationes de naturaleza alifática y bajo peso molecular con dos o más grupos amino. Estas aminos son esenciales para todos los organismos y están implicadas en diversos procesos celulares fundamentales, tales como condensación de la cromatina, replicación y transcripción del ADN, procesamiento del ARN síntesis de proteínas y modificación post-traduccional (Igarashi-Kashiwagi, 2000; Childs et al., 2003; Wallace et al., 2003; Jiménez et al., 2014). Además, las PAs tienen la capacidad de unirse a moléculas polianiónicas como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos de membrana, confiriendo protección y estabilidad. En las plantas, están involucradas en la embriogénesis, organogénesis, diferenciación, promoción de crecimiento, formación de polen, desarrollo del fruto y senescencia; además, están asociadas a la tolerancia a varios tipos de estrés como salinidad, temperaturas extremas, sequía, ozono y radiación UV, entre otros (Bouchereau et al. 1999, Urano et al. 2003, Alcázar et al. 2006, Groppa and Benavides 2008; Hectors et al. 2014).

Las PAs más abundantes son la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) y las tetraminas espermina (Spm) y termoespermina (tSpm). Las plantas pueden sintetizar PAs mediante dos vías (Fig. 1). La primera deriva directamente de la ornitina mediante la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) para producir Put. La segunda es una vía indirecta, la cual genera Put a partir de la arginina en varios pasos sucesivos catalizados por las enzimas arginina descarboxilasa (ADC), agmatina iminohidrolasa (AIH) y N-carbomil putrescina aminohidrolasa (NCPAH). La síntesis de las PAs superiores espermidina (Spd), espermina (Spm) y termoespermina (tSpm) se lleva a cabo mediante la adición secuencial de grupos aminopropilo a una molécula amino-aceptora (Put o Spd); esta reacción es catalizada por las aminopropil transferasas espermidina sintasa (SPDS), espermina sintasa (SPMS) o termoespermina sintasa (tSPMS), respectivamente. Los grupos aminopropilo son derivados de la metionina, la cual es convertida a *S*-adenosil metionina y después es descarboxilada por la *S*-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC).

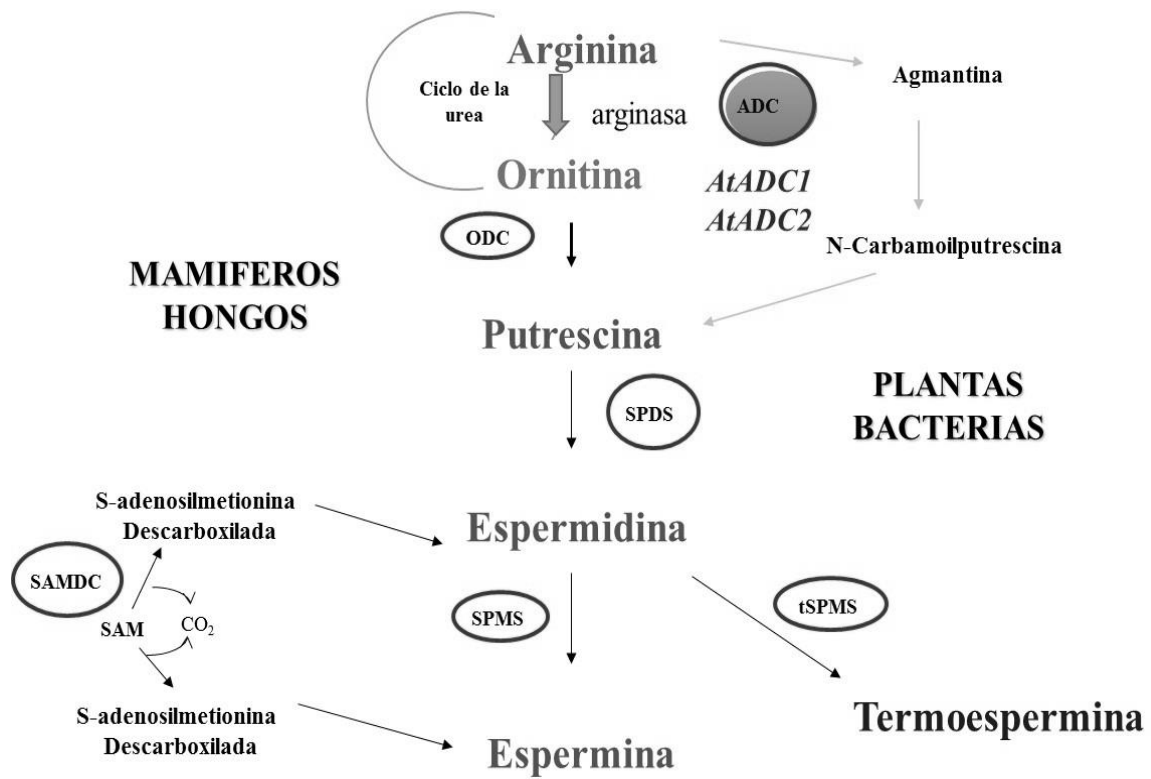


Fig. 1. Vía de biosíntesis de la PAs. ADC, arginina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; SAM, S-adenosil metionina; SAMDC, S-adenosil metionina descarboxilasa; SPDS, espermidina sintasa; SPMS, espermina sintasa; tSPMS, termoespermina sintasa (Urano *et al.*, 2003).

En *A. thaliana* la biosíntesis de Put es a través de la descarboxilación de la arginina (Hanfrey et al., 2001). En este sentido, *Arabidopsis* cuenta con dos copias de los genes *ADC* (*ADC1* y *ADC2*), una sola copia de los genes *AIH*, *NCPAH*, dos genes *SPDS* (*SPDS1* y *SPDS2*), un gen *SPMS* y *tSPMS*, y cuatro genes *SAMDC* (*SAMDC1-4*) (Kusano et al., 2010). El estudio de diversas enzimas de la biosíntesis de las PAs revela un gran panorama del papel de estas aminas, en el crecimiento, desarrollo y en la supervivencia de las plantas. Particularmente, en *A. thaliana* las semillas de la doble mutante homocigota para los genes *ADC1* y *ADC2* son abortivas, ya que presentan un defecto en el desarrollo del embrión (Urano et al., 2005).

Por otro lado, las líneas mutantes del gen *ADC2* son sensibles a estrés abiótico y muestran una disminución del 75% del contenido de Put, siendo más sensibles a estrés salino comparadas con la línea parental, incluso también a las líneas mutantes *adc1* (Urano et al., 2004). Esto indica que el gen *ADC2* es esencial en tolerancia al estrés salino y que la Put sería una PA clave en la tolerancia al estrés abiótico en plantas.

Debido a que las PAs son esenciales para el desarrollo embrionario, no se ha logrado generar mutantes auxotróficas en plantas. En este estudio se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan constitutivamente un microRNA artificial (*amirR:adc*) con el objetivo de silenciar la expresión ambos genes *ADC*. Se seleccionaron plantas transgénicas T1 (mWs) que presentaron fenotipos de sensibilidad a la aplicación de cloruro de sodio ó a la fitohormona ácido abscísico (ABA). Las líneas mWs3 y la mWs8 fueron las más afectadas bajo estos tratamientos, y fueron las que mostraron los niveles más bajos de expresión de los genes *ADC1* y *ADC2*. Se seleccionó la línea de silenciamiento génico mWs8 para los posteriores estudios. Cuando se analizaron los niveles de PAs libres en la línea mWs8, se observó una disminución drástica de las tres PAs en comparación a la parental Ws, incluso con niveles menores de PAs que las líneas mutantes sencillas *adc1* y *adc2*. Se sometió a las líneas mWs8, *adc1*, *adc2* y Ws bajo estrés salino o bien, a la aplicación exógena de ABA y se analizaron durante la germinación y en etapa de producción de hojas. Debido al fenotipo de sensibilidad mostrado por la línea de silenciamiento génico mWs8, se analizó la expresión de un regulador central de la vía de señalización del ABA como el factor de transcripción ABI3. Por otro lado, se analizó el

fenotipo de la línea mWs8 durante el inicio de la floración, observando un retraso en el brote de las inflorescencias en comparación a la línea parental WS. Además observamos que una población de las semillas de la línea mWs8 produce semillas oscuras, las cuales no son viables. Estos resultados confirman que bajos niveles de PAs en plantas de Arabidopsis afectan al desarrollo y la respuesta al estrés.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* ecotipo wassilewskija (Ws) Las líneas mutantes insercionales para los genes *AtADC1* y *AtADC2* fueron proporcionadas por Urano et al. (2005). Las semillas de cada uno de los genotipos fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v) por 7 min; después, se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril. Las semillas limpias fueron sembradas en placas con medio Murashige y Skoog (MS) 0.5X, pH de 5.7, suplementado con 0.5% (w/v) de sacarosa y 1% (w/v) de agar (Murashige and Skoog. 1962). Las placas fueron incubadas a 4°C en oscuridad por dos días y después se transfirieron a una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad a una temperatura de 22 ±2 °C.

2.2. Construcción de plásmidos

Las regiones codificantes de los genes *AtADC1* y *AtADC2* fueron utilizadas para el diseño de un microRNA artificial basado en la tecnología desarrollada por Schwab y Weigel (Schwab et al., 2006). El microRNA seleccionado para silenciar dichos genes tiene como blanco una región conservada entre *AtADC1* y *AtADC2* (nucleótidos 1418-1438 y 1535-1535, respectivamente) (Suplementaria 1A). Este micro-RNA se generó mediante PCR de sobrelape utilizando 4 oligonucleotidos, como molde para este PCR se utilizó el vector pRS300 que contiene el precursor del microRNA de *A. thaliana* mir319 (Suplementaria 1B). Como se muestra en la Fig. suplementaria, el PCR de sobrelape permite la mutagénesis en el precursor del mir319 para generar el producto deseado amiR:adc. El producto de PCR amplificado se clonó en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), posteriormente, este fue subclonado en el vector de expresión pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003) (Suplementaria 2A), el cual contiene el promotor constitutivo 35S (Suplementaria 2B), mediante recombinación sitio específica usando la enzima LR Clonasa II (Invitrogen). Finalmente, la construcción pMDC32-amiR:adc fue transformada en células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV2260.

2.3. Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para la generación de líneas transgénicas de *A. thaliana*, plantas del ecotipo WS de 21 días de edad en etapa de floración fueron transformadas mediante el método “floral dip” (Zhang et al., 2006) con la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* la cual contiene el vector pMDC32-amirR:adc. Las semillas transformantes fueron seleccionadas en medio MS 0.5X suplementado con Hígromicina (50 mg/mL). Para este estudio se utilizaron plantas de la generación T3.

2.3. Extracción de ácidos nucleicos de plantas de *A. thaliana*

El RNA total de *A. thaliana* fue obtenido a partir de plántulas de 15 días de edad usando el reactivo Concert Plant Reagent (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante; las muestras fueron almacenadas a -70°C para análisis posteriores. El DNA genómico fue removido mediante el tratamiento con DNAsa Turbo (Ambion). La concentración del RNA fue medida en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV (Tecnología NanoDrop) antes del tratamiento con DNAsa Turbo.

2.4. Análisis de expresión por PCR en tiempo Real (qRT-PCR)

Este análisis se llevó a cabo mediante la síntesis y cuantificación de cDNA usando el kit iScript™ One-Step RT-PCR y el fluoróforo SYBR Green (Bio-Rad, Laboratories, Inc., USA). La mezcla de reacción se realizó en un volumen total de 10 µL a una concentración de 50ng de RNA total, 5 µL Power SYBR Green RT-Mix (2X), 200 nM de cada oligonucleótido, y 0.08 µL del mix de enzima RT (125X); usando el sistema de detección StepOne Real-Time PCR con el software StepOne V2.1 (Applied Biosystems, USA). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 30 min a 48°C (síntesis de cDNA), 10 min a 95°C (activación de la polimerasa AmpliTaq Gold DNA) seguido por 40 ciclos de PCR de 15 s a 95°C (desnaturalización) y un minuto 60°C (alineación y extensión). La curva de alineamiento fue hecha con ciclos de 15 s a 95°C (desnaturalización), 15 s a 60°C (alineamiento) y 15 s a 95°C (desnaturalización), incrementando la temperatura 0.3°C por ciclo. La cuantificación se basó sobre el valor umbral del ciclo, con el nivel de expresión de los genes *ADC* y *ABI3* relativo al valor umbral del ciclo del gen ubiquitina 5 (UBQ 5) (Livak & Schmittgen, 2001). Para el gen *AtADC1* se utilizaron los oligonucleotidos 5'CCTTGGCGTTTACTACTGCG3' y el 5'CGGTGAAGATCAAAGACAGAGG3'; para

el gen *AtADC2* se usaron el 5'GCCGTATCTTGCAACTGAGC3' y el 5'TGCAACAACAAACCACACGA3'; para el gen *ABI3* se emplearon el 5'CACAGCCAGAGTTCCTTCCTT3' y el 5'ATGTGGCATGGGACCAGACT33'. Finalmente, para el gen de ubiquitina 5 se usaron; 5'TCGACGCTTCATCTCGTCCT3' y el 5'CGCTGAACCTTCCAGATCC3' (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014).

2.5. Extracción de poliaminas libres

Las poliaminas libres (Put, Spd y Spm) fueron determinadas como dansil-derivados por HPLC de fase reversa (Marcé *et al.*, 1995). Para este estudio se utilizaron 0.2 g de material vegetal proveniente de plántulas de 12 días y plantas de 4 semanas de edad de *A. thaliana*. La extracción se realizó con 0.8 mL de ácido perclórico (PCA) al 5% (v/v), incubando las muestras por 12 h a 4°C. Después estas fueron centrifugadas y se recuperaron los sobrenadantes de cada una. Posteriormente fueron dansilados mediante la adición de una mezcla de 0.1 mL Na₂CO₃ sobresaturado, 0.2 mL cloruro de dansilo (5 mg/mL acetona), y 1 mM 1,7-diamino heptano (HTD) como estándar interno y fueron incubados por 12 h en oscuridad a temperatura ambiente. Habiendo transcurrido este periodo se detuvo la reacción de dansilación mediante la adición de prolina (100 mg/mL). Finalmente las poliaminas dansiladas fueron extraídas con tolueno usando un concentrador de vacío. Los extractos de las poliaminas dansiladas fueron resuspendidas en 0.05 mL de acetonitrilo.

2.6. Cuantificación de PAs por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Las Poliaminas fueron determinadas HPLC. Se empleó una columna de C18 4.6×150 mm fase reversa (Zorbax Eclips) de 15 cm. La columna fue equilibrada con acetonitrilo/agua (70:30) y se trabajó con un flujo de 1.5 mL/min a una temperatura de 30°C. Se inyectaron 12 µL por muestra. La detección de fluorescencia fue programada a una longitud de onda de excitación y emisión de 415nm y 510nm respectivamente acorde a lo reportado por Flores y Galston (1982). Para realizar la medición de las poliaminas libres se realizó una curva de calibración empleando el rango de concentración de 0.3 a 1.5 nmoles de las poliaminas sintéticas (Put, Spd y Spm) y el estándar interno 1-7diaminoheptano (HTD), el cual es un análogo de las poliaminas; estos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich en México. Todos nuestros resultados están expresados en nanomoles por gramos de peso fresco.

2.7. Análisis de expresión del gen *ABI3* en la línea mWs8

Los niveles de expresión del gen *ABI3* fueron medidos en plantas de 15 días de edad de *A. thaliana* de las diferentes líneas utilizadas para este trabajo (Ws, mutantes *adc1* y *adc2* y la silenciante mWs8) bajo un tratamiento de 10 μ M de ABA. Las semillas fueron germinadas en medio sólido MS 0.5X y después las plántulas de 2 semanas de edad fueron transferidas a medio líquido suplementado o no con 10 μ M de ABA, donde se mantuvieron por un periodo de 24 h. Posteriormente las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y se extrajo el RNA que sería utilizado para el análisis qRT-PCR.

2.8. Ensayo de germinación bajo tratamiento con ABA y PAs

Las semillas de los diferentes genotipos, Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8 fueron germinadas en presencia o no de la fitohormona ABA y co-tratamiento con PAs (Put, Spd y Spm). El ensayo de germinación fue llevado a cabo usando 16 semillas de cada una de las líneas por cada tratamiento. Todas las semillas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de plantas maduras crecidas al mismo tiempo bajo las mismas condiciones de desarrollo y almacenadas por un mes en oscuridad a temperatura ambiente. Los datos son la media del error estándar de cinco replicas biológicas. Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri de forma vertical. Cada semilla fue considerada como germinada un vez que la radícula emergió rompiendo la testa. Aunado a esto, el número de cotiledones verdes de las plántulas fue contado a los 18 días.

2.9. Análisis estadístico

Los datos presentados en este trabajo fueron examinados mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de Tukey utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0b (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los datos representan la desviación estándar (n=3). Los datos que difieren de $P < 0.05$ fueron consideradas como significativos.

III. RESULTADOS

3.1. El microRNA artificial amirR:adc reprime la expresión de los genes *ADC1* y *ADC2* de *Arabidopsis thaliana*.

Con la finalidad de silenciar los genes *AtADC1* y *AtADC2* se generó un microRNA artificial (amirR:adc), el cual tiene como blanco una región conservada del RNAm entre ambos parálogos. El amirR:adc fue clonado en el vector de expresión pMDC32, bajo el control de un promotor constitutivo 35S, y transformado en plantas de *A. thaliana* ecotipo Ws. Para seleccionar líneas silenciadas (mWS) que expresaran bajos niveles de los genes *ADC*, primero las semillas transformadas se sometieron a estrés salino o a la aplicación de la hormona ABA, para identificar las líneas que mostrarían mayor sensibilidad al estrés, con la premisa de que las líneas más sensibles tendrían la mayor represión en los genes *AtADC1* y *AtADC2*. En este sentido, se germinaron semillas de 10 líneas transgénicas mWS en medio MS suplementado con NaCl (125mM) o con ABA (1 μ M), y seleccionamos las líneas mWs3 y mWs8 ya que fueron las más sensibles a estas condiciones (suplementaria 3). Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de los genes *AtADC1* y *AtADC2* en plántulas de 15 días de edad de las líneas mWs3 y mWs8 mediante qRT-PCR. La línea mWs3 presentó una disminución en la expresión de ambos genes *ADC1* y *ADC2* de 12.9 y 10 veces, respectivamente en comparación de la parental Ws. De la misma manera, en la línea mWs8 la expresión de los genes *ADCs* disminuyó 10 y 9.4 veces (Figura 2). Estos datos sugieren que el fenotipo de sensibilidad de las líneas mWs3 y mWs8 al NaCl ó al ABA es debido a los bajos niveles de expresión de los genes *ADCs*.

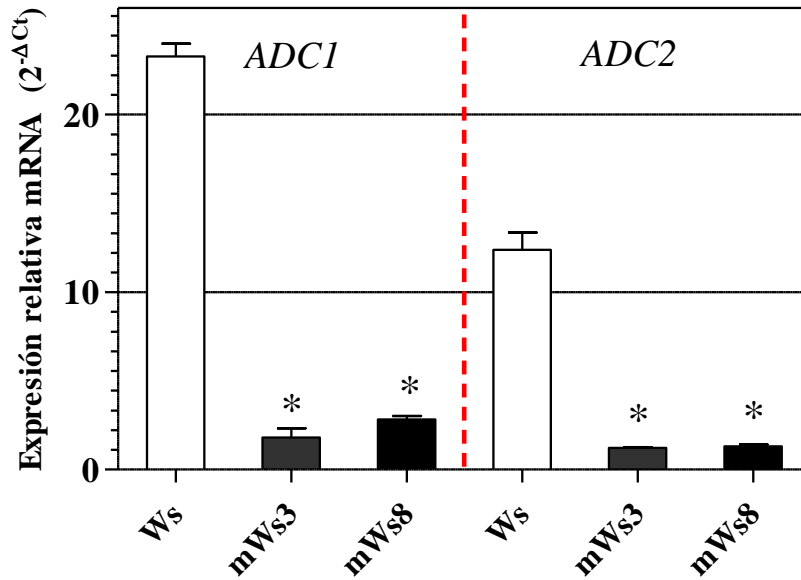


Fig. 2. Expresión relativa de los genes *AtADC1* y *AtADC2* en las líneas silenciadas. El nivel de transcrito de los genes *ADC1* y *ADC2* en *Arabidopsis* fue determinado en plántulas de 15 días de edad de las líneas Ws, mWs3 y mWs8. La expresión fue determinada mediante un análisis de qRT-PCR usando el agente intercalante SYBR green. La cuantificación fue relativa al valor umbral del ciclo del gen ubiquitina 5 (*UBQ5*). Las barras representan la media \pm del error estándar (n=3). Los asteriscos indican la diferencia significativa entre las líneas mWS3 y mWS8 comparados con la parental Ws, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

3.2. La línea silenciante mWs8 presenta bajos niveles de PAs libres

Para determinar el contenido de PAs libres (Put, Spd y Spm) en plántulas y plantas adultas (en etapa de generación de inflorescencias) en las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8, las PAs fueron extraídas a partir de 200 mg de muestras de *Arabidopsis* de 12 y 28 días de edad y analizadas por HPLC. En este sentido, en plántulas de 12 días de edad los niveles de PAs libres en la línea mutante *adc1*, no disminuyeron. Sin embargo, la línea mutante *adc2* mostró una disminución en el contenido de Put del 23.7% en comparación a la parental Ws. Esta tendencia en cuanto a los niveles de PAs libres, ya había sido reportada para estas líneas mutantes (*adc1* y *adc2*). Por otro lado, en la línea silenciante mWs8 el contenido de PAs libres disminuyó drásticamente, en donde observamos un 85% de disminución en Put, un 87.7% en Spd y un 89.2% en Spm, respecto a los niveles de PAs que presentó la parental Ws (Figura 3A). En el caso de las plantas de todas las líneas analizadas de 28 días de edad, se observó también una fuerte disminución en los niveles de PAs libres, incluso no se detectó Spm, en comparación a los datos obtenidos a los 12 días. En el caso de la línea mutante *adc1* muestra una disminución en los niveles de Put (80.3%) comparada con la línea parental Ws; sin embargo, los niveles de Spd fueron más altos en esta línea (47.5%). Por otro lado, la línea mutante *adc2* presentó un bajo contenido de Put (89.6%) comparado con las líneas mutante *adc1* y la parental Ws. De la misma manera, los niveles de Spd en la línea mutante *adc2* disminuyeron un 50%. Finalmente, observamos una fuerte disminución en los niveles Put y Spd en la línea silenciante mWs8 (96.5 y 67.6%, respectivamente) comparada con la parental Ws (Figura 3B). Estos datos muestran que la línea silenciante mWS8 tiene una clara disminución en los niveles de las tres PAs libres (Put, Spd y Spm) en dos etapas diferentes de desarrollo, la cual es incluso mucho más drástica que la disminución observada en las mutantes sencillas *adc1* y *adc2*. Lo que sugiere, que la biosíntesis de PAs en la línea mWs8 de *A. thaliana* está afectada drásticamente por el silenciamiento de los genes *ADCs*.

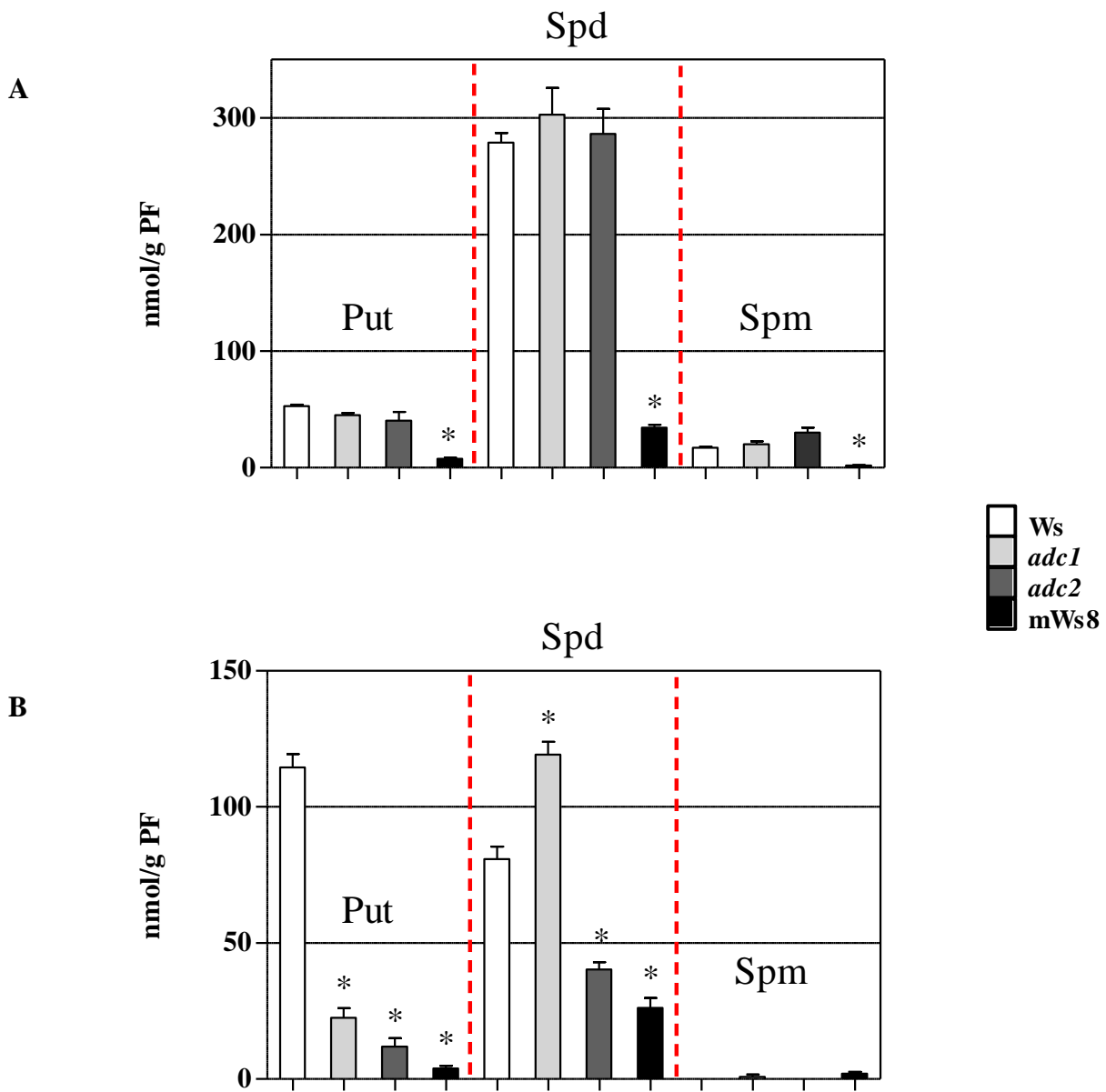


Fig. 3. Cuantificación del contenido de Poliaminas libres en plantas de 12 (A) y 28 (B) días de edad de las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8. Los niveles de putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) fueron detectados mediante HPLC. Las barras representan la media \pm del error estándar (n=3). Los asteriscos indican la diferencia significativa de los contenidos de PAs de las línea *adc1*, *adc2* y mWS8 comparados con la parental Ws, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

3.3. La línea silenciante mWs8 presenta retraso en la floración y defectos en el desarrollo de la semilla

Las plantas de la línea mWs8, las cuales tienen bajos niveles de transcritos *ADCs* y una disminución en el contenido de las PAs libres, presentaron un fenotipo de retraso de una semana en la generación de inflorescencias en comparación a las plantas de la línea *Ws* y las líneas mutantes *adc1* y *adc2* (Figura 4A). Además las plantas de la línea silenciante mWs8, presentan silicuas con un 20% de semillas anormales, con una coloración oscura y un tamaño más pequeño en comparación al resto de las semillas normales (Figura 4B). Interesantemente, las semillas anormales fueron incapaces de germinar en medio MS (datos no mostrados). Posteriormente, se analizaron las características morfológicas de los embriones procedentes de las semillas oscuras, los cuales tienen una reducción en tamaño en comparación a los embriones de las semillas de la línea parental *Ws*. Concretamente, los embriones defectuosos están arrestados entre las fases de corazón a torpedo de la formación del embrión (Figura 4C) Este dato coincide con la doble mutante de la SPDS en *Arabidopsis*, donde hay disminución de Spd y aumento de Put y tienen un arresto en el desarrollo embrionario en la fase corazón-torpedo. Adicionalmente, cuando evaluamos los fenotipos de plántulas procedentes de semillas aparentemente normales de línea silenciante mWs8, que no presentan la coloración oscura, plántulas de 12 días de edad presentaron cotiledones más pequeños, así como una longitud de raíz principal más corta respecto a la parental *Ws* y a las mutantes *adc1* y *adc2* (Figura 4D). Estos datos indican que la línea silenciante mWs8, la cual tiene un bajo contenido de poliaminas, presenta fenotipos anormales en el crecimiento y desarrollo de las plantas y semillas de *A. thaliana*.

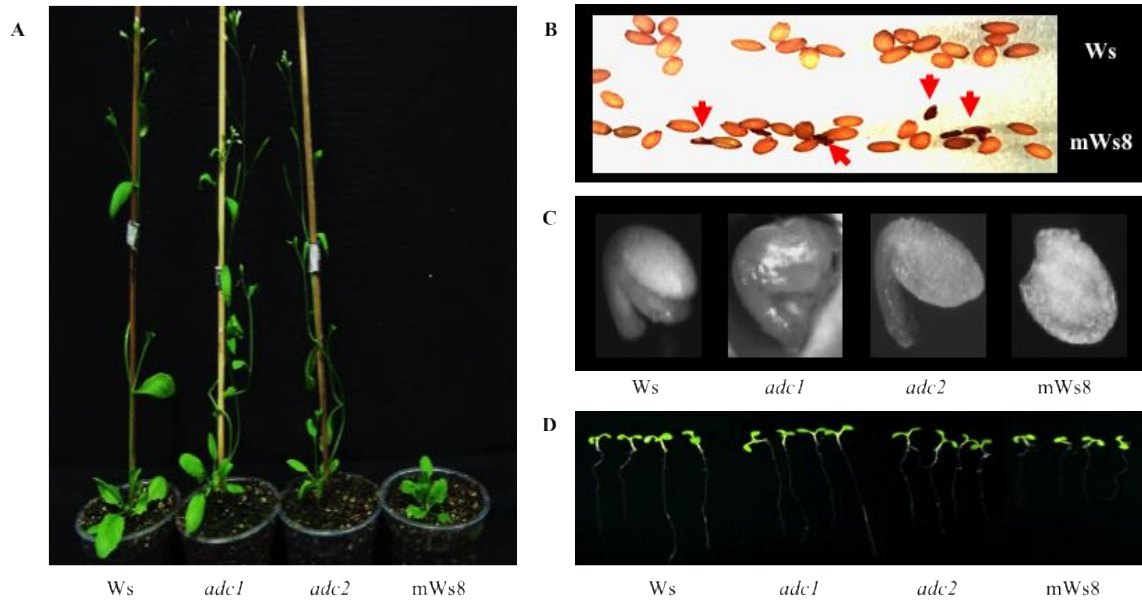


Fig. 4. Fenotipo de las líneas *Ws*, *adc1*, *adc2* y *mWs8*. A) Registro de fenotipo de las plantas de 21 días de edad de las líneas *Ws*, *adc1* y *adc2* y *mWs8* en condiciones normales de crecimiento. B) Morfología de la semilla de la parental *Ws* y la silenciante *mWs8* (T4). C) Fenotipo de los embriones extraídos de semillas secas maduras de las líneas *Ws*, *adc1* y *adc2* y *mWs8*. D) Plántulas de 12 días de edad de las líneas *Ws*, *adc1* y *adc2* y *mWs8*, crecidas en placas de MS bajo las mismas condiciones de desarrollo.

3.4. La línea silenciante mWs8 es hipersensible al ácido abscísico.

Para analizar el efecto de la aplicación exógena de la hormona ABA en la línea mWs8, se analizó la tasa de germinación de la línea mWs8 en medio MS suplementado con 3 μ M de ABA. La germinación se evaluó durante los primeros tres días posteriores a la siembra y fue comparada con la de las líneas Ws, *adc1* y *adc2* (Figura 5). En el primer día, las líneas mWs8 y la *adc2* fueron claramente afectadas en la germinación (46.7 y 48.9%, respectivamente) en comparación a la Ws y *adc1* (68.9 y 60%, respectivamente). Sin embargo, en el segundo día se observó un aumento en el porcentaje de germinación de las líneas mWs8 y *adc2* (62%). Finalmente, en el tercer día todas las líneas evaluadas alcanzaron su máxima tasa de germinación (Ws, 100; *adc1*, 100; *adc2*, y mWs8,). Posteriormente, se evaluó la tasa de germinación de las líneas Ws, *adc1* y *adc2* en medio MS suplementado con 3 μ M de ABA y 10 μ M de PAs (Put o Spd o Spm). Cuando se aplicó Put, se observó un aumento en el porcentaje de germinación en las líneas mWS8 y *adc2* (día 1, 53.3 y 53.7%; día 2, 71.1 y 68.8%, respectivamente) comparado a la germinación de estas líneas en medio MS suplementado con ABA. Sorprendentemente, en presencia de ABA y Spd se observó una drástica disminución del porcentaje de germinación de la líneas mWs8 y *adc2* (día 1, 26.6 y 46.6%; día 2, 53.3 y 48.9%, respectivamente) comparado a la observada en presencia de ABA. Finalmente, también se observó una recuperación en la germinación de las líneas mWs8 y *adc2* al suplementar con Spm (día 1, 51.1 y 53.3%; día 2, 71.1 y 57.8%, respectivamente).

Después de 15 días de crecimiento bajo los tratamientos antes mencionados, se evaluó el porcentaje de cotiledones verdes de las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8 (Figura 6A). Bajo el tratamiento de 3 μ M de ABA se observó una disminución en el porcentaje de cotiledones verdes de las líneas mWs8 y *adc2* (2.23 y 20%, respectivamente) en comparación a las líneas Ws y *adc1* (66.6 y 60%, respectivamente) (Figura 6B). Con respecto a los tratamientos de ABA suplementado con PAs, en presencia de Put se observó un aumento en el porcentaje de cotiledones verdes de las líneas mWs8 y *adc2* (3 y 42.2%, respectivamente) comparado con lo observado bajo el tratamiento de ABA (Figura 6C). En el caso de la combinación de ABA más Spd se observó una fuerte disminución del porcentaje de los cotiledones verdes en las líneas mWS8 y *adc2* (0 y 33.3%) (Figura 6D).

Finalmente, la combinación de ABA y Spm logró un aumento en los cotiledones verdes de la línea mWs8 (4.46%) comparado con el tratamiento de ABA (Figura 6E). Bajo condiciones control, no se observaron diferencias significativas en la tasa de germinación y en el desarrollo de cotiledones verdes entre las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8. Estos resultados muestran que la Put y Spm restablecen el efecto negativo del ABA en la germinación y en los germinados de las líneas mutantes; sin embargo, la combinación de ABA y Spd genera un efecto negativo en la tasa de germinación y una disminución en el desarrollo de cotiledones verdes.

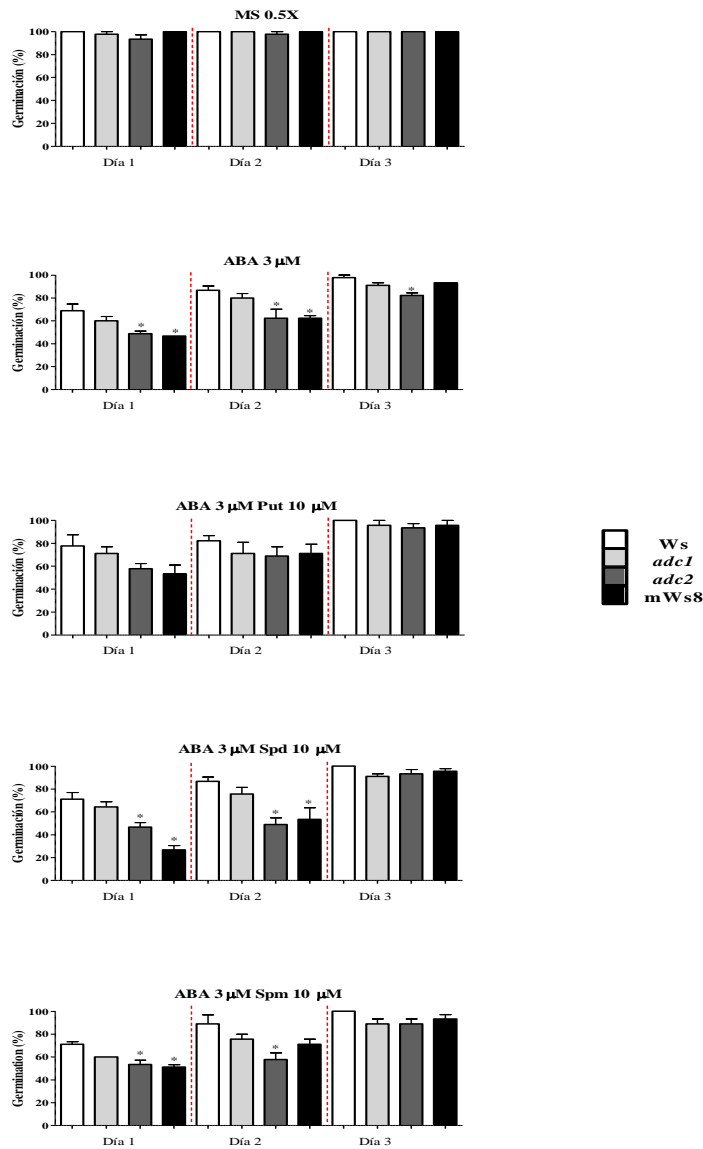


Fig. 5. Porcentaje de germinación de las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8 bajo los tratamientos de ABA y de ABA con poliaminas. Las semillas de Arabidopsis de las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8 fueron germinadas en medio MS 0.5X suplementado con 3μM de ABA y/o con PAs putrescina (Put) o espermidina (Spd) o espermina (Spm). El porcentaje de germinación fue evaluado los tres días posteriores a la siembra de las semillas. Las barras representan la media ± del error estándar (n=15) de cinco replicas. Los asteriscos indican la diferencia significativa entre las líneas (*adc1*, *adc2* y mWs8) y la parental, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

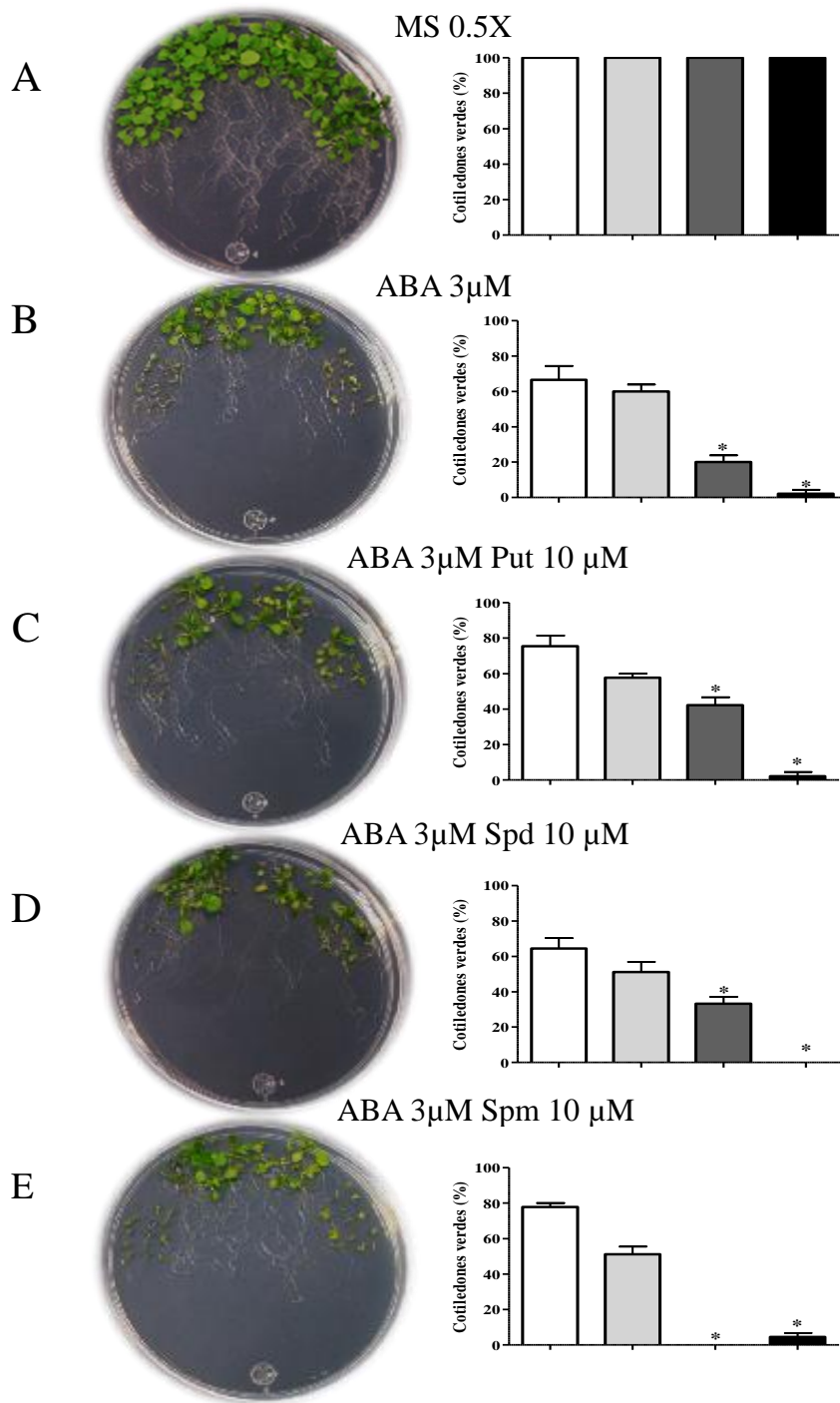


Fig. 6. Fenotipo y porcentaje de cotiledones verdes de las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y *mWs8* bajo los tratamientos de ABA y/o Poliaminas. Las semillas de *Arabidopsis* de las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y *mWs8* fueron crecidas en medio MS 0.5X suplementado con 3µM de ABA y/o con putrescina (Put) o espermidina (Spd) o espermina (Spm). El fenotipo y porcentaje de cotiledones verdes fue evaluado los 15 días posteriores a la germinación, bajo los tratamientos de: B) 3µM de ABA C) 3µM de ABA más 10µM de Put D) 3µM de ABA más 10µM de Spd E) 3µM de ABA más 10µM de Spm. Las barras representan la media ± del error estándar (n=15) de cinco replicas. Los asteriscos indican la diferencia significativa entre las líneas (*adc1*, *adc2* y *mWs8*) y la parental, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

3.5. El gen *ABI3* es inducido en la línea mWs8 bajo la aplicación de la hormona ABA.

Para buscar una conexión entre la disminución de los niveles PAs y la vía de señalización del ABA, se analizó la expresión del factor de transcripción *ABI3* mediante qRT-PCR. Este análisis se realizó en plántulas de 15 días de edad de las líneas *Ws*, *adc1*, *adc2* y *mWs8*, las cuales fueron germinadas en medio MS y posteriormente transferidas a medio MS suplementado con 10 μ M de ABA por 12 h (Figura 7). Bajo el tratamiento de ABA, se observó que la expresión del gen *ABI3* se indujo 10.8 y 16 veces en las líneas *mWs8* y *adc2*, respectivamente en comparación con la parental *Ws*. Mientras que en la mutante *adc1* solo se presentó una inducción de 1.2 veces respecto la línea parental. Bajo condiciones control, no se observó diferencias significativas en la expresión del gen *ABI3* en las líneas evaluadas. Estos datos sugirieron una relación entre el nivel de PAs y la señalización del ABA mediante la regulación del factor de transcripción *ABI3*.

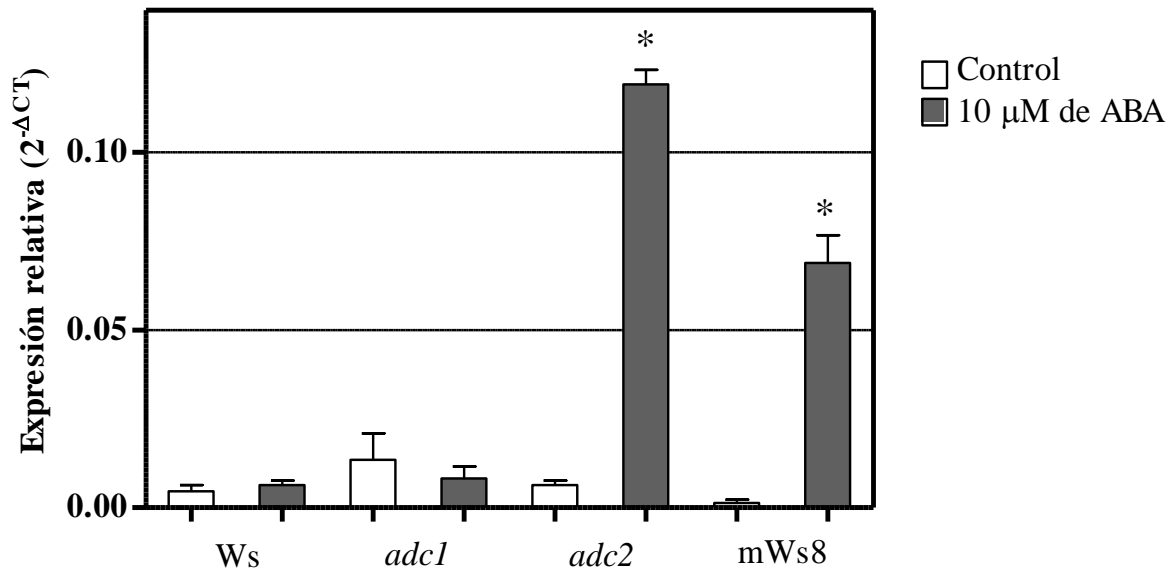


Fig. 7. Expresión del gen *ABI3* en las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8 bajo la aplicación exógena de ABA. Plántulas de las líneas Ws, *adc1*, *adc2* y mWs8 fueron tratadas con 10μM de ABA por 12 horas. La expresión del gen *ABI3* fue analizada mediante qRT-PCR usando el agente intercalante SYBR green. La cuantificación fue relativa al valor umbral del ciclo del gen ubiquitina 5 (*UBQ5*). Las barras representan la media ± del error estándar (n=3). Los asteriscos indican la diferencia significativa entre las líneas (*adc1*, *adc2* y mWS8) y la parental, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey (P<0.05).

IV. DISCUSIÓN

Las poliaminas (PAs) están implicadas en un amplio rango de procesos celulares fundamentales, tales como desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta a estrés biótico y abiótico (Bouchereau *et al.*, 1999; Martin y Tanguy, 2001; Jiménez-Bremont *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2014). La biosíntesis de las PAs inicia por la formación de la diamina putrescina (Put). En *Arabidopsis*, la enzima arginina descarboxilasa es la responsable de la síntesis de Put; esta planta cuenta con dos copias de los genes *ADC* (*ADC1* y *ADC2*) (Kusano *et al.*, 2010). A nivel de proteína estos dos genes tienen una identidad del 80%. Sin embargo, a nivel de promotor presentan solo un 28.8% de identidad en nucleótidos, a lo que se atribuye que cada parólogo posea un patrón de expresión diferencial (Amrani *et al.*, 2002); así, transcripcionalmente estos genes son inducidos por diversos tipos de estrés. En este sentido, se ha reportado que el estrés osmótico, la sequía, la salinidad, las heridas y deficiencia de K⁺ inducen la expresión del gen *ADC2* (Perez-Amador *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2003; Armengaud *et al.*, 2004; Alcázar *et al.*, 2006); por su parte la expresión del gen *ADC1* es inducida por frío (Hummel *et al.*, 2004), y recientemente se ha reportado que este gen se induce en respuesta a la infección por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas viridiflava* en *Arabidopsis* (Rossi *et al.*, 2014).

En este estudio se silenciaron los genes *ADC1* y *ADC2* de *Arabidopsis thaliana* mediante un microRNA artificial (amirR:adc) diseñado para hibridar en ambos genes. Las plantas transgénicas seleccionadas (mWs3 y mWs8) que expresan el amirR:adc mostraron una drástica disminución en la expresión de ambos genes *ADC* respecto a la de la parental Ws. Lo cual, es congruente con la disminución de PAs libres (Put, Spd y Spm) observada en la línea silenciante seleccionada (mWS8) en plantas de 12 y 28 días de edad (Put, 85%; Spd, 87.7 y Spm, 89%; Put, 89%; Spd, 67.6%, respectivamente). Estos datos son congruentes con lo que se sabe de la biosíntesis de novo de PAs en *A. thaliana*, donde la formación de PAs ocurre únicamente a través de la vía de la arginina (Hanfrey *et al.*, 2001) por lo que la doble mutación en los genes *ADC* es letal en *Arabidopsis* (Urano *et al.*, 2005). Aunado a esto, el 20% de las semillas de la línea mWS8 presentaron una coloración café oscura y reducción en el tamaño de las semillas, así como defectos morfológicos en los embriones. Este fenotipo de semillas oscuras fue observado anteriormente, cuando se intentó obtener dobles mutantes homocigotas de *Arabidopsis* para los genes *ADC* (*adc1^{-/-}/adc2^{-/-}*) y para los genes

SPDS (*spds1*^{-/-}/*spds2*^{-/-}), las cuales no fueron viables debido a defectos en el desarrollo del embrión (Urano *et al.*, 2005; Imai *et al.*, 2004). Otro fenotipo interesante fue el retraso en el crecimiento de la raíz principal y en el brote de inflorescencias en las plantas de la línea mWS8 respecto a las plantas de la parental. En este sentido, se ha reportado que las PAs están estrechamente relacionadas con el crecimiento vegetal, en particular se ha observado incrementos de estas aminos durante el ciclo celular. La aplicación exógena de Spd y Spm a plantas de *Arabidopsis* genera un mayor número de raíces laterales, así como un incremento en la longitud de la raíz principal; esto mediante la regulación de los genes de las ciclinas tipo A y B, las cuales son esenciales para la transición de la fase G1/S y la G2/M, modulando de esta forma los puntos de control del ciclo celular (Ortega *et al.*, 2012). Aunado a esto, la aplicación exógena de Spd restablece el fenotipo de floración tardía de las plantas mutantes del gen GIGANTEA (CS 3123); el cual, está involucrado en la regulación de la floración mediada por fotoperiodo. Esto sugiere que los niveles de Spd están estrechamente ligados al proceso de floración (Applewhite *et al.*, 2000). Además, se ha reportado que líneas de *Arabidopsis* que sobre-expresan el gen *ADC2* genera plantas con un fenotipo de retraso en la floración y una disminución de la elongación del tallo (Alcázar *et al.*, 2010). Este fenotipo ha sido relacionado con que altos niveles de Put afectan el metabolismo de las giberelinas (Alcázar *et al.*, 2005). Por otro lado, estudios con mutantes de las enzimas de la biosíntesis de las PAs han demostrado que están estrechamente ligadas al desarrollo de las plantas (Park, 2006). Particularmente, la mutante *acaulis5* (*acl5*) de *Arabidopsis thaliana*, la cual no produce termoespermina, tiene un fenotipo enano (Takahashi *et al.*, 2010). Esta mutante está afectada en la expresión del factor de transcripción SAC51, el cual controla la diferenciación de los vasos del xilema, permitiendo la correcta elongación del tallo. Ahora se sabe que la termoespermina potencia la traducción de SAC51 mediante la reducción del efecto inhibitorio de pequeños marcos abiertos de lectura (uORFs) localizados en la secuencia líder 5' del ARNm del SAC51, además de brindar estabilidad a su estructura secundaria, de manera que el ribosoma puede leer eficientemente el ORF principal del gen SAC51 (Imai *et al.*, 2006; Tong *et al.*, 2014). Estos datos revelan que la disminución en los niveles de las PAs afecta diversos procesos de crecimiento y desarrollo, como la floración.

Cuando las semillas de la línea mWs8 fueron germinadas *in vitro* en un medio MS con NaCl, o suplementado con la hormona ABA presentan retraso en la germinación en comparación a las semillas de la línea parental (ecotipo Ws). Además los germinados de la línea mWs8, crecidos bajo estrés ya sea con NaCl o ABA, lograron menor número de cotiledones verdes, y una menor tasa de supervivencia en comparación a las plántulas de la Ws. Este fenotipo de sensibilidad al ABA fue parcialmente revertido por la adición de Put a las líneas *adc2*, mWs8. De forma similar, la recuperación de la mutante *adc2* al estrés salino fue lograda con la aplicación de Put (Urano et al., 2004). Estos datos muestran que los fenotipos de sensibilidad a la aplicación de NaCl o ABA en las líneas mutantes afectadas en los genes *ADC* (KO o silenciadas) son revertidos con la adición de Put, la poliamina que es producida por la *ADC*. Lo anterior, confirma que la línea mWs8 está afectada en la biosíntesis de Put. Un dato interesante fue que la línea mWs8 presentó un fenotipo de mayor sensibilidad al ABA cuando intentamos revertir con el tratamiento de Spd. Se ha propuesto que cada una de las PAs participa de forma amino-específica en la respuesta a estrés. En el caso de la Spd, se sabe que esta PA reduce la toxicidad por metales, tales como el Cu y Al (Pirintsos *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2014). Aunado a ello, la acumulación de Spm mediante la sobreexpresión de los genes *SAMDC* o *SPMS* tiene un impacto positivo en la regulación de genes involucrados en procesos relacionados con tolerancia a estrés biótico y abiótico (Marco *et al.*, 2014).

Cuando se analizó la expresión de un gen de la vía de señalización del ABA, como el gen *ABI3*, en la línea silenciada mWs8 bajo la aplicación exógena de 10 μ M de ABA, observamos un aumento en la expresión del gen *ABI3*. Este dato es congruente con lo reportado con el perfil de expresión del gen *ABI3*, cuando existe un incremento en su expresión, el fenotipo es de insensibilidad al ABA (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2014). Se ha propuesto que existe una relación entre las PAs y el ABA en respuesta a estrés en plantas. Por ejemplo, se sabe que la expresión de varios de los genes implicados en la biosíntesis de PAs tales como *ADC2*, *SAMDC2* y *SPMS* son inducidos por el ABA (incluir una cita). Por su parte, se ha reportado que la Put incrementa la biosíntesis de ABA a nivel transcripcional mediante la inducción del gen *NCED3* en respuesta a bajas temperaturas y en estrés por sequía (Cuevas *et al.*, 2008; Espasandin *et al.*, 2013). En contraste, Marco *et al.*, 2011 reportaron que la sobreexpresión de los genes *ADC* inhibe la biosíntesis de ésta

fitohormona mediante la represión de los genes *ABAI*, *NCED3* y *NCED4*. Esto sugiere una conexión entre la expresión de los genes *ADC* y la señalización del ABA, que es dependiente del tipo de estrés y estadio en el que se encuentre la planta. Aunado a esto, se ha propuesto que las PAs actúan en conjunto con otras fitohormonas como las auxinas, giberelinas, citocininas y el etileno en respuesta a las condiciones medioambientales, como el cambio de luz, temperatura, disponibilidad de agua, nutrientes y CO₂ (Anwar *et al.*, 2015). Recientemente se reportó que el factor de transcripción WRKY70 así como el factor de transcripción ICE1 regulan la respuesta a estrés por sequía y congelamiento respectivamente, mediante la inducción de los genes *ADC*, lo cual a su vez genera un incremento en los niveles de las PAs (Gong *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015).

En general, en este trabajo se generó una línea silenciante de los genes *ADC* (mWs8) de *A. thaliana*, la cual logra reducir los niveles de expresión de los genes *ADC1* y *ADC2*. Este es el primer reporte de una línea afectada en la biosíntesis de PAs, la cual presenta una reducción importante en sus niveles de PAs, sin llegar a ser letal. Esta línea silenciante mWS8 presenta diversos fenotipos incluso en desarrollo, así como sensibilidad incrementada a condiciones de estrés salino y a la aplicación de ABA. Por lo tanto, a pesar de que los mecanismos moleculares mediante el cual las poliaminas actúan siguen siendo un enigma, consideramos que la línea mWs8 generada en esta tesis permitirá obtener información muy valiosa respecto a la función de las poliaminas en desarrollo y respuesta a estrés.

V. CONCLUSIONES

1. El silenciamiento génico mediante el uso de un microRNA artificial (amirR:adc) permitió obtener líneas con una eficaz disminución de la expresión de los genes ADCs.
2. El silenciamiento de los genes *ADC* en la línea mWs8 generó una drástica disminución en los niveles de PAs aún con respecto a las mutantes sencillas *adc1* y *adc2*.
3. La disminución en la biosíntesis de las PAs generó defectos en diversos procesos de crecimiento y desarrollo, como la floración y la formación de la semilla en *A. thaliana*.
4. La Spd, en comparación a la Put, y Spm, presenta un efecto negativo en la planta cuando se adiciona con la fitohormona ABA.
5. Bajos niveles de PAs como los observados en la línea mWs8 inducen la expresión del gen *ABI3* bajo la aplicación del ABA, lo que molecularmente explicaría el fenotipo de sensibilidad al ABA en esta mutante mWs8.

REFERENCIAS

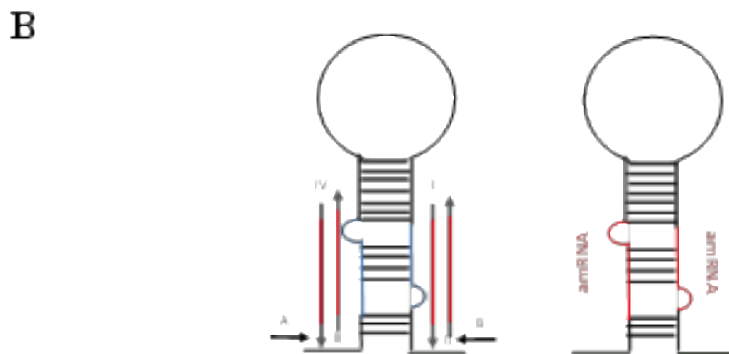
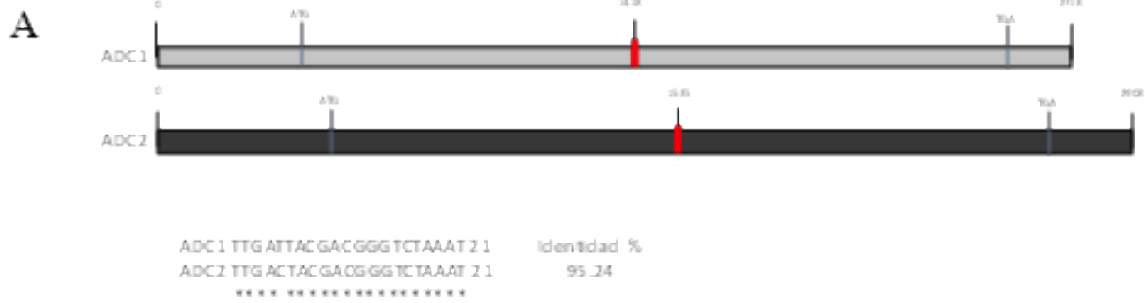
- Alcázar R., García-Martínez J.L., Cuevas J.C., Tiburcio A.F. and Altabella T. (2005). Overexpression of ADC2 in Arabidopsis induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J.* 43, 425-436.
- Alcázar R., Marco F., Cuevas J.C., Patron M., Ferrando A., Carrasco P., et al. (2006). Involvement of Polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 28, 1867-1876.
- Alcázar R., Planas J., Saxena T., Zarza X., Bortolotti C., Cuevas J., Bitrián M., Tiburcio A.F. and Altabella T. (2010b). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic Arabidopsis plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase2 gene. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 547-552.
- Amrani A.E., Marie L., Anouche A., Nicolas J. and Coué I. (2002). Genome-wide distribution and potential regulatory functions of AtATE, a novel family of miniature inverted-repeat transposable elements in Arabidopsis thaliana. *Mol Genet Genomics* 267, 459-471.
- Applewhite P.B., Kaur-Sawhney R. and Galston A.W. (2000). A role for spermidine in the bolting and flowering of Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* 108: 314-320.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140, 103-125
- Childs A.C., Mehta D.J., and Gerner E.W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1394-1406.
- Cuevas J.C., López-Cobollo R., Alcázar R., Zarza X., Koncz C., Altabella T., Salinas J., Tiburcio A.F. and Ferrando A. (2008). Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol. Biochem.* 148, 1094-1105.
- Espasandin F.D., Maiale S.J., Calzadilla P., Ruiz O.A. and Sansberro P.A. (2014). Transcriptional regulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene by putrescine accumulation positively modulates ABA synthesis and drought tolerance in Lotus tenuis plants. *Plant Physiol. Biochem.* 76, 29-35.
- Flores H.E. and Galston A.W. (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol. Biochem.* 69, 701-706.

- Gong X., Zhang J., Hu J., Wang W., Wu H., Zhang Q. and Liu J. (2015). FcWRKY70, a WRKY protein of *Fortunella crassifolia*, functions in drought tolerance and modulates putrescine synthesis by regulating arginine decarboxylase gene. *Plant, Cell and Environment*. doi: 10.1111/pce.12539.
- Hanfrey C., Sommer S., Mayer M.J., Burtin D. and Michael A.J. (2001). Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J* 27, 551-560.
- Handa A.K. and Mattoo A.K. (2010). Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 540–546.
- Huang X.S., Zhang Q., Zhu D., Fu X., Wang M., Zhang Q., Moriguchi T. and Liu J.H. (2015). ICE1 of *Poncirus trifoliata* functions in cold tolerance by modulating polyamine levels through interacting with arginine decarboxylase. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erv138.
- Hummel I., Gouesbet G., El Amran A., Aïnouche A and Couée I. (2004). Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression during development and response to environmental stress. *Gene* 342, 199-209.
- Igarashi K. and Kashiwagi K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271, 559-564.
- Imai A., Matsuyama T., Hanzawa Y., Akiyama T., Tamaoki M., Saji H., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Komeda Y. and Takahashi T. (2004). Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* 135, 1565-1573.
- Imai A., Hanzawa Y., Komura M., Yamamoto K.T., Komeda Y. and Takahashi T. (2006). The dwarf phenotype of the Arabidopsis *acl5* mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene. *Development* 133, 3575-3585.
- Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz O.A., and Rodríguez-Kessler, M. (2007). Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 812-821.

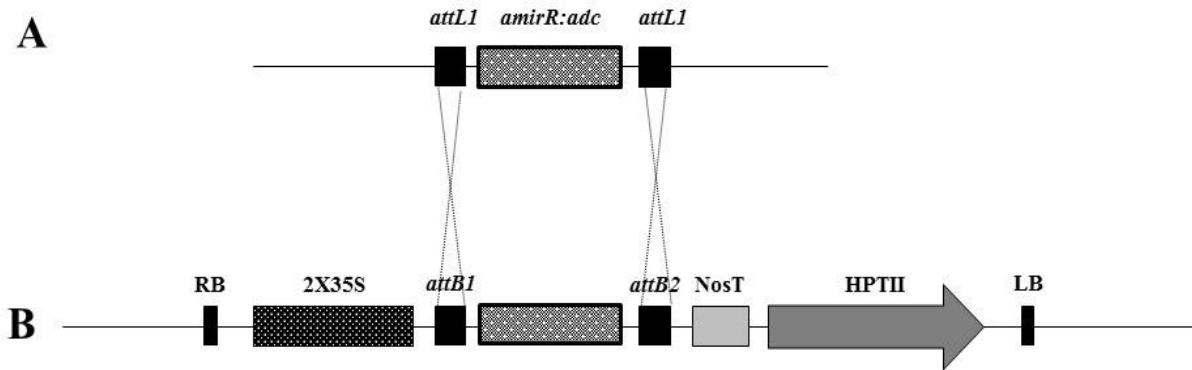
- Jiménez-Bremont J.F., Marina M., Guerrero-González M.L., Franco R.R., Sánchez-Rangel D., Rodríguez-Kessler M., Ruiz O.A. and Gárriz A. (2014). Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Front Plant Sci*, 5, 95:1-14
- Takehi J., Kuwashiro Y., Niitsu M. and Takahashi T. (2008). Thermospermine is Required for Stem Elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 49, 1342-1349.
- Kasukabe Y., He L., Nada K. Misawa S., Ihara I. and Tachibana S. (2004). Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 45, 712-722.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Plant* 228, 367-381.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Marcé M., Brown D.S., Capell T., Figueras X. and Tiburcio A.F. (1995) Rapid high performance liquid chromatographic method for the quantitation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. *J Chromat B* 666, 329-335
- Marco F., Alcázar R., Tiburcio A.F. and Carrasco P. (2011). Interactions between polyamines and abiotic stress pathway responses unraveled by transcriptome analysis of polyamine overproducers. *OMICS A Journal of Integrative Biology*. 15, 11.
- Marco F., Busó E. and Carrasco P. (2014). Overexpression of SAMDC1 gene in *Arabidopsis thaliana* increases expression of defense-related genes as well as resistance to *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Sci*. 5, 115.
- Martin-Tanguy ,J. (2001).Metabolism and function of polyamines in plants: Recent development (new approaches). *Plant Growth Regul*. 34, 135-148.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*. 15, 473-497.
- Ortega-Amaro M.A., Rodríguez K.M., Becerra F.A. and Jiménez-Bremont J.F. (2012). Modulation of *Arabidopsis* CYCB1 expression patterns by polyamines and salt stress. *Acta Physiol Plant* 34, 461-469.

- Panicot M., Minguet E.U., Ferrando A., Alcázar R., Blázquez M.A., Carbonell J., Altabella T., Koncz C., and Tiburcio A.F., (2002). A Polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in arabidopsis. *The Plant Cell*.14, 2539-2551.
- Perez-Amador M.A., Leon J., Green P.J., and Carbonell J. (2002). Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of Polyamines in the wound response in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 130, 1454-1463.
- Pirintsos, S.A., Munzi, S., Loppi, S., and Kotzabasis, K., (2009). Do polyamines alter the sensitivity of lichens to nitrogen stress? *Ecotoxicol. Environ. Safe*. 72, 1331-1336
- Rodríguez-Hernández A.A., Ortega-Amaro M.A., Delgado-Sánchez P., Salinas J. and Jiménez-Bremont J.F. (2014). *AtGRDP1* Gene Encoding a Glycine-Rich Domain Protein is Involved in Germination and Responds to ABA Signalling. *Plant Mol. Biol. Rep.* 32, ISSN 0735-9640 doi 10.1007/s11105-014-0714-4
- Rossi F.R., Marina M. and Pieckenstain F.L. (2014). Role of Arginine decarboxylase (ADC) in Arabidopsis thaliana defence against the pathogenic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiol*. ISSN 1435-8603.
- Sen G., Eryilmaz I.E. and Ozakca D. (2014). The effect of aluminium-stress and exogenous spermidine on chlorophyll degradation, glutathione reductase activity and the photosystem II D1 protein gene (psbA) transcript level in lichen *Xanthoria parietina*. *Phytochemistry* 98, 54-59.
- Takahashi Y., Cong R., Sagor G.H.M., Niitsu M., Berberich T. and Kusano T. (2010). Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 29, 955-965.
- Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Igarashi Y., Seki M., Sekiguchi F., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2003) Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* 26, 1917-1926.
- Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Ito T., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2004) Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 369-375

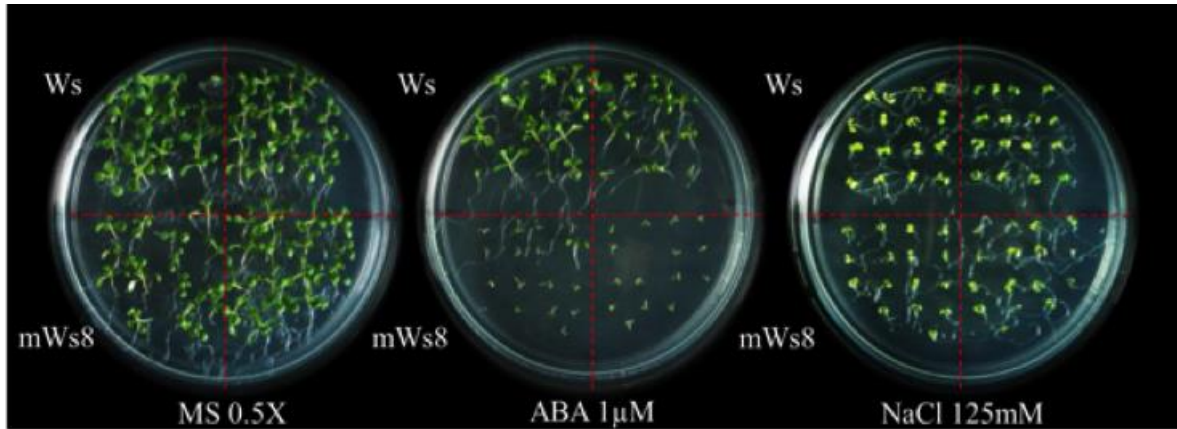
- Urano K., Hobo T. and Shinozaki K. (2005) Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett.* 579, 1557-1564
- Zhang X., Roman M., Kimmel D., McGilliard C. and Boicourt W. (2006). Spatial variability in plankton biomass and hydrographic variables along an axial transect in Chesapeake Bay. *J. Geophys. Res-Oceans.* 111, 1978-2012.



Suplementaria 1. Diseño del microRNA amirR:adc. A) Representación a escala de los genes *AtADC1* y *AtADC2*. Las regiones en donde hibrida el microRNA artificial se encuentran señaladas en rojo. Se realizó un alineamiento de ambas regiones. B) PCR de solapamiento para inducir mutagénesis en el precursor del mir319. Los oligonucleótidos del I al IV fueron usados para reemplazar la secuencia del endógeno (azul) por la secuencia artificial (rojo). Los primers A y B reconocen una secuencia del plásmido y la generación del microRNA artificial fue realizada mediante la combinación de los productos de PCR de A-IV, II-III, y I-B en reacciones independientes.



Suplementaria. 2. Construcción del vector pMDC32-amirR:adc. A) El precursor del mir319 modificado con un tamaño de 700pb fue insertado en el vector de entrada pCR8. B) Este precursor fue brincado por recombinación sitio específica al vector binario pMDC32, el cual contiene un borde derecho RB para la integración del T-DNA, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor 2x35S, los sitios *attB1* y *attB2* para la recombinación, el precursor del *amirR:adc*, una región terminadora Nos T de la nopalina sintasa, el gen de resistencia a higromicina HPTII y el borde izquierdo LB para la integración del T-DNA.



Suplementaria 3. Fenotipo de la línea silenciante mWs8 bajo la aplicación de ABA ó NaCl. Las semillas de la parental Ws y la generación T1 de las líneas silenciantes mWs fueron sembradas en medio MS suplementado con 1 μ M de ABA o 125mM de NaCl. El registro fue realizado a los 12 días posteriores a la siembra de las semillas.