

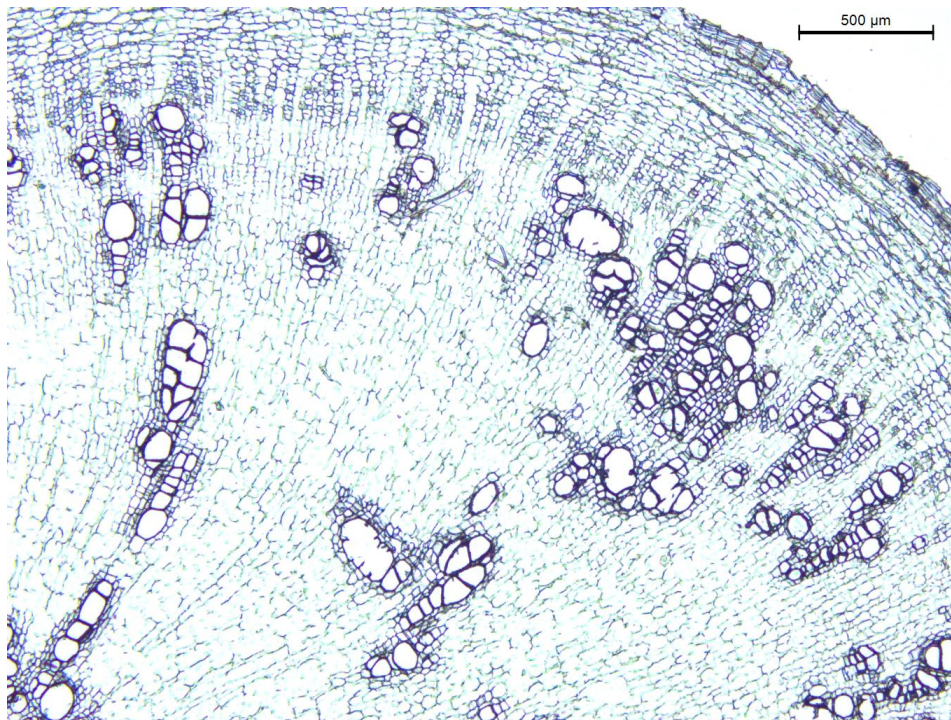


UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

MASTER UNIVERSITARIO EN  
SANIDAD Y PRODUCCIÓN  
VEGETAL

DEPARTAMENTO DE  
ECOSISTEMAS  
AGROFORESTALES

# CONTROL DEL DESARROLLO DE LAS RAÍCES EN YUCA (*Manihot esculenta*)



Curso académico 2020-2021

Anselmo López Sánchez-Ortiz

Prof. D. Carlos Mesejo Conejos

D. Javier Agustí Feliú

Dña. Anna Solé-Gil



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

## RESUMEN

### Control del desarrollo de las raíces en yuca (*Manihot esculenta*).

La raíz de acumulación de reservas de la yuca (*Manihot esculenta*) constituye el alimento principal de 500 millones de personas en África sub-Sahariana debido a su alta capacidad de acumular almidón. En el sistema radicular de la yuca, las raíces de acumulación de reservas coexisten con las raíces leñosas, las cuales absorben y transportan agua y nutrientes desde el suelo. Que una raíz sea leñosa o de acumulación depende de los tipos celulares xilemáticos que se desarrollan. Así, las raíces leñosas desarrollan vasos y fibras xilemáticas y apenas xilema parenquimático, mientras que en las de acumulación solo se desarrolla (masivamente) xilema parenquimático, que es el tipo celular que acumula el almidón. Actualmente se desconocen las bases genéticas y moleculares que median la determinación de la identidad de raíces leñosas o de acumulación. La hipótesis de partida de este proyecto es que los genes de la familia de factores de transcripción HD-ZIP III (CORONA, REVOLUTA, PHABULOSA, PHAVOLUTA y AtHB8) juegan un papel importante en dicha determinación de identidad. Esta hipótesis se basa en que, en *Arabidopsis thaliana*, estos genes regulan, entre otros procesos, la determinación de la identidad de xilema. Para validar nuestra hipótesis, el proyecto consistirá en abordar los siguientes objetivos: 1) Identificación mediante herramientas bioinformáticas de los genes ortólogos de la familia de HD-ZIP de clase III en yuca. 2) Analizar el perfil transcripcional de esta familia de genes en los distintos órganos y tejidos de la planta y 3) Llevar a cabo una caracterización molecular de un HD-ZIP de clase III, comprobando su unión y capacidad de activación a la región promotora de un gen marcador de raíz de acumulación. Se ha conseguido identificar ocho genes ortólogos de HD-ZIP III en la yuca y, tras analizar el perfil transcripcional de cada uno de ellos se han comprobado diferencias en su expresión en los distintos tejidos, siendo el *MesHD-ZIP III-1* y 6 aquellos que más se expresan en la raíz de acumulación respecto a la fibrosa. Además, se han podido comprobar diferencias significativas en los niveles de expresión de cada uno de ellos en los distintos tejidos de la raíz de acumulación. Finalmente, se identificó una región promotora de un gen marcador que, potencialmente, está regulada por el HD-ZIP III-1 y se iniciaron los experimentos para comprobar dicha activación.

*Manihot esculenta*; HD-ZIP III; xilema; floema; cambium; raíz de acumulación; qRT-PCR.

Anselmo López Sánchez-Ortiz

Valencia, a 16 de julio de 2021

Prof. D. Carlos Mesejo Conejos

D. Javier Agustí Feliú y Dña. Anna Solé Gil.

## **ABSTRACT.**

### **New insights in Cassava (*Manihot esculenta*) root development.**

The storage root of Cassava (*Manihot esculenta*) is best known for being the main staple food for over 500 million people in sub-Saharan Africa, due to its outstanding capacity for starch storage. Cassava's root system consists on two types of roots: the woody roots (specialized in transporting water and solutes from the soil) and the above mentioned storage roots, which massively store starch. Whether a root becomes woody or storage depends on the xylem cell types that it develops: woody roots develop xylem vessels and fibers, while storage roots develop, exclusively, xylem parenchyma -the cell type accommodating the starch-. The genetic and molecular bases by which a root acquires the woody or the storage identity is a question that remains elusive nowadays. In this respect, this project's hypothesis is that the HDZIPIII transcription factors (*CORONA*, *REVOLUTA*, *PHABULOSA*, *PHAVOLUTA* and *ATHB8*) play a key role in determining such root identity and in its development. The rationale behind this hypothesis is that, in the model system *Arabidopsis thaliana*, these proteins regulate, among other processes, the determination of the xylem identity. To validate our hypothesis, this project will address the following objectives 1) Identification of the HDZIPIII genes in cassava using phylogenetic analyses. 2) Analyses of the expression level of HDZIPIII genes in Cassava in cambium, xylem and phloem (the vascular tissues) using qRT-PCR. 3) Molecular characterization of a class III HD-ZIP, checking its ability to bind and activate the promoter region of an accumulation root marker gene. Eight HDZIPIII orthologs have been identified in cassava and, after analysing the transcriptional profile of each of them, differences in their expression were found in the different tissues, with *MesHDZIPIII-1* and *6* being those which were more expressed in the storage root compared with the fibrous root. In addition, significant differences were found in the expression levels of each one of them in the different tissues of the storage root. Finally, a promoter region of a marker gene that is potentially regulated by HDZIPIII-1 was identified and the experiment to test this interaction and activation are currently being performed.

*Manihot esculenta*; HD-ZIP III; xylem; phloem; cambium; storage root; qRT-PCR.

Anselmo López Sánchez-Ortiz

Valencia, a 16 de julio de 2021

Prof. D. Carlos Mesejo Conejos

D. Javier Agustí Feliú y Dña. Anna Solé Gil.

## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar, agradecer este trabajo a Javi. Gracias por la oportunidad de conocer más a fondo este mundo, por tu interés, por despertar el mío y por la confianza que me has mostrado en todo momento.

GRACIAS en mayúsculas a Anna, por la paciencia, las charlas, las explicaciones, la paciencia otra vez y las muchas muchas risas. Igualmente, gracias a Paula, quizás la persona que más paciencia ha tenido conmigo en años. Nos hemos reído mucho. Sois geniales.

Gracias al 2.07 y 2.08. Sois maravillosos.

## INDICE.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La yuca ( <i>Manihot esculenta</i> ).....	1
1.2. Formación de la raíz de acumulación y xilema parenquimático. ....	2
1.3. Desarrollo del tejido vascular en raíz.....	5
1.3.1. Regulación de la diferenciación del xilema. ....	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Análisis filogenéticos.....	9
3.2. Búsqueda de promotores. ....	10
3.3. Análisis de la expresión génica.....	11
3.3.1. Recolección del material vegetal.....	11
3.3.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	11
3.3.3. Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	12
3.3.4. Análisis estadístico de los datos.....	13
3.4. Caracterización anatómica.....	13
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Se han identificado 8 ortólogos de <i>HD-ZIP</i> de clase III en <i>Manihot esculenta</i> . ....	15
4.2. HDZIPIII-1 muestra una marcada expresión preferencial en cambium y xilema de la raíz de acumulación. ....	16
4.3. Identificación de promotores de genes potencialmente regulados por la función HDZIPIII durante el desarrollo de la raíz de acumulación. ....	21
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES.....	26
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27

## ANEXOS.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

AtHB8: ARABIDOPSIS THALIANA HOMEobox 8.

cDNA: DNA complementario.

CNA: CORONA.

EtOH: Etanol.

FR: Raíz fibrosa.

GA: Ácido giberélico.

HCl: ácido clorhídrico.

HD-ZIPs III: CLASS III HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER.

miRNA165: micro RNA165.

miRNA166: microRNA166.

NST: NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR.

PHB: PHABULOSA.

PHV: PHAVOLUTA.

PIN1: PINFORMED 1.

RAM: Meristemo apical de la raíz.

REV: REVOLUTA.

RNA: Ácido ribonucleico.

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

SAM: Meristemo apical del brote.

SR: Raíz de acumulación.

TF: Factor de transcripción.

WT: Wild-type.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. La yuca (*Manihot esculenta*).**

Los cultivos en los que se aprovecha la raíz y los tubérculos son básicos para la agroeconomía de muchos países tropicales por varios motivos. Este tipo de cultivos suponen la segunda mayor fuente de hidratos de carbono a nivel mundial (Villordon et al., 2014), por lo que tienen un papel muy importante en cubrir las necesidades alimentarias en muchos países. Además de esto, también se pueden comercializar como productos frescos o elaborados. Entre ellos, los que destacan en términos de producción son la patata (*Solanum tuberosum*), la yuca o cassava (*Manihot esculenta*) y la batata (*Ipomoea batata*) (Medina et al., 2007).

La yuca es una planta arbustiva perteneciente a la familia de las euforbiáceas cuyo ciclo vegetativo, en condiciones de cultivo, comprende el crecimiento vegetativo (crecimiento y desarrollo de raíces, tallos y hojas) y el crecimiento y desarrollo de la raíz de acumulación de recursos mediante la propia acumulación de los mismos. (Alves, 2002). Realmente, se trata de un arbusto leñoso el cual es cultivado principalmente en los trópicos y aprovechado por sus raíces capaces de almacenar grandes cantidades de almidón. Además, los procesados de esta planta tienen mucha aplicación en determinadas industrias como la textil o servir de fuente para la producción de bioetanol (Howeler et al., 2013). Se trata de una planta con muy buen rendimiento en suelos poco fértiles o en zonas de lluvias irregulares, mostrando cierta tolerancia a la sequía. Todo esto, sumado a su fácil sistema de propagación, pocas exigencias de cultivo y cierto potencial para resistir plagas y enfermedades hacen que se considere un recurso alimenticio básico para los pequeños agricultores de las zonas más desfavorecidas (Ramcharan et al., 2017). Aunque original de Brasil y de algunos países de centro y sur de América, su producción siempre ha estado ligada a los países del continente africano, pero actualmente, su producción está mucho más repartida, siendo un cultivo muy importante también en Asia (Lebot 2009). En el año 2018, en todo el mundo, el área cosechada de yuca fue más de 24 millones de hectáreas, con una producción total de cerca de 278 millones de toneladas (FAO, 2018).

En el sistema radicular de la yuca se pueden distinguir distintos tipos de raíces adventicias. Por un lado, están las raíces fibrosas (Fibrous roots, FRs), las cuales se caracterizan por absorber agua y sales minerales o por cumplir funciones de sostén; y por

otro lado están las raíces de acumulación (SRs), cuyas células están especializadas en la acumulación de almidón como sustancia de reserva (Medina et al., 2007). El proceso por el cual el brote o la raíz sufre una serie de modificaciones morfológicas que determinan que se transforme en un órgano de acumulación es complejo y no está muy comprendido por su dificultad de estudio, pero se sabe que sucede como respuesta a una interacción entre factores ambientales, genéticos y bioquímicos. Dado que la identificación de genes relacionados con el desarrollo de la raíz de yuca es, como se ha mencionado, complicado si se trabaja exclusivamente con esta especie, en este trabajo se ha optado por aprovechar el amplio conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* para determinar posibles paralelismos entre las dos especies. De hecho, aunque *Arabidopsis* no desarrolla raíces de acumulación de reservas, sí desarrolla los distintos tipos celulares xilemáticos y, puesto que la diferencia anatómica más obvia entre las FR y las SR en yuca es, precisamente, la abundancia relativa de estos tipos celulares, entender la posible función en yuca de los ortólogos de algunos de los genes reguladores del desarrollo xilemático descritos en *Arabidopsis*, puede ser una estrategia eficiente.

## **1.2. Formación de la raíz de acumulación y xilema parenquimático.**

En primer lugar, conviene aclarar que los órganos encargados de almacenar reservas en los cultivos de raíz, como es la yuca, proceden de un engrosamiento de las raíces primarias o adventicias, mientras que, en los cultivos tuberosos, como por ejemplo la patata, el tubérculo procede de un brote subterráneo (Hoang et al., 2020). Un ejemplo típico de planta capaz de dar lugar a un órgano de acumulación a partir de una raíz principal es la zanahoria o la remolacha azucarera, mientras que la yuca y la batata lo forman a partir de raíces adventicias.

En estadios iniciales del desarrollo, en la yuca, todas las raíces son fibrosas. Sin embargo, en un momento determinado, algunas de estas sufren una transformación y pasan a ser órganos de acumulación (El-Sharkawy, 2004). A pesar de que los mecanismos moleculares que hacen que esta transformación tenga lugar no están esclarecidos, se sabe que son muchos los factores que actúan de manera sinérgica en la formación de raíz de acumulación, entre los que destacan el balance hormonal y las condiciones ambientales (temperatura y sequía).



Las raíces de acumulación se consideran importantes sumideros dentro de la planta y, por tanto, para su crecimiento, muchos de los fotoasimilados generados en las fuentes (las hojas) tienen que ser traslocados hasta ellas. Como explican Medina et al. (2007), algunas hormonas pueden generar una movilización de nutrientes creando nuevas relaciones entre la fuente y el sumidero, especialmente las citoquininas, que actúan en los sumideros favoreciendo la entrada de metabolitos, considerando esta hormona como una pieza clave para la formación de este tipo de raíces (Dong et al., 2019). Otra hormona que interviene en la formación y desarrollo de órganos de acumulación es el ácido giberélico (GA). Se sabe que las giberelinas son importantes estimuladores del crecimiento de las plantas, sin embargo, un desequilibrio del contenido endógeno de giberelinas puede reducir la biomasa de las raíces de acumulación (revisado en Hoang et al., 2020).

En cuanto a la temperatura, se sabe que interviene en los procesos que regulan el balance de crecimiento entre brote y raíz (Ravi et al., 2009) y se ha comprobado que la temperatura óptima para la formación de raíz de acumulación, en el caso de la batata, es de 26,5 °C (Gajanayake et al., 2014). Por su parte, la humedad, en especial la del suelo, es esencial para la formación de una raíz capaz de acumular azúcares. Aun así, el impacto de la sequía varía mucho dependiendo del estado fenológico en el que tenga lugar y es mayor durante la fase de engrosamiento de la raíz (Hoang et al., 2020).

Las diferencias principales que se producen en esta transformación de raíz fibrosa a raíz de acumulación se reflejan, principalmente, en el tipo de células xilemáticas que conforman ambos tejidos: las raíces fibrosas están formadas principalmente por vasos y por fibras xilemáticas, mientras que en las raíces de acumulación predomina el xilema parenquimático (Fig. 1). Numerosos estudios histológicos han demostrado que son esas células que conforman el xilema parenquimático las encargadas de sintetizar y acumular los gránulos de almidón (Chaweewan & Taylor, 2015; Siebers et al., 2017). Estas células parenquimáticas presentes en el xilema difieren de las fibras y vasos en varios aspectos. Son células vivas cuya pared celular es mucho más delgada que la de las fibras y, normalmente, tienen forma cuadrada o rectangular. En función de su orientación y disposición respecto al eje principal, las células del parénquima se clasifican en radiales y axiales. Estas células difieren en cómo se producen. Las primeras se producen a partir de células iniciales de la zona cambial que se extienden de manera radial; mientras que las células axiales se producen a partir de células fusiformes (Morris et al., 2016).

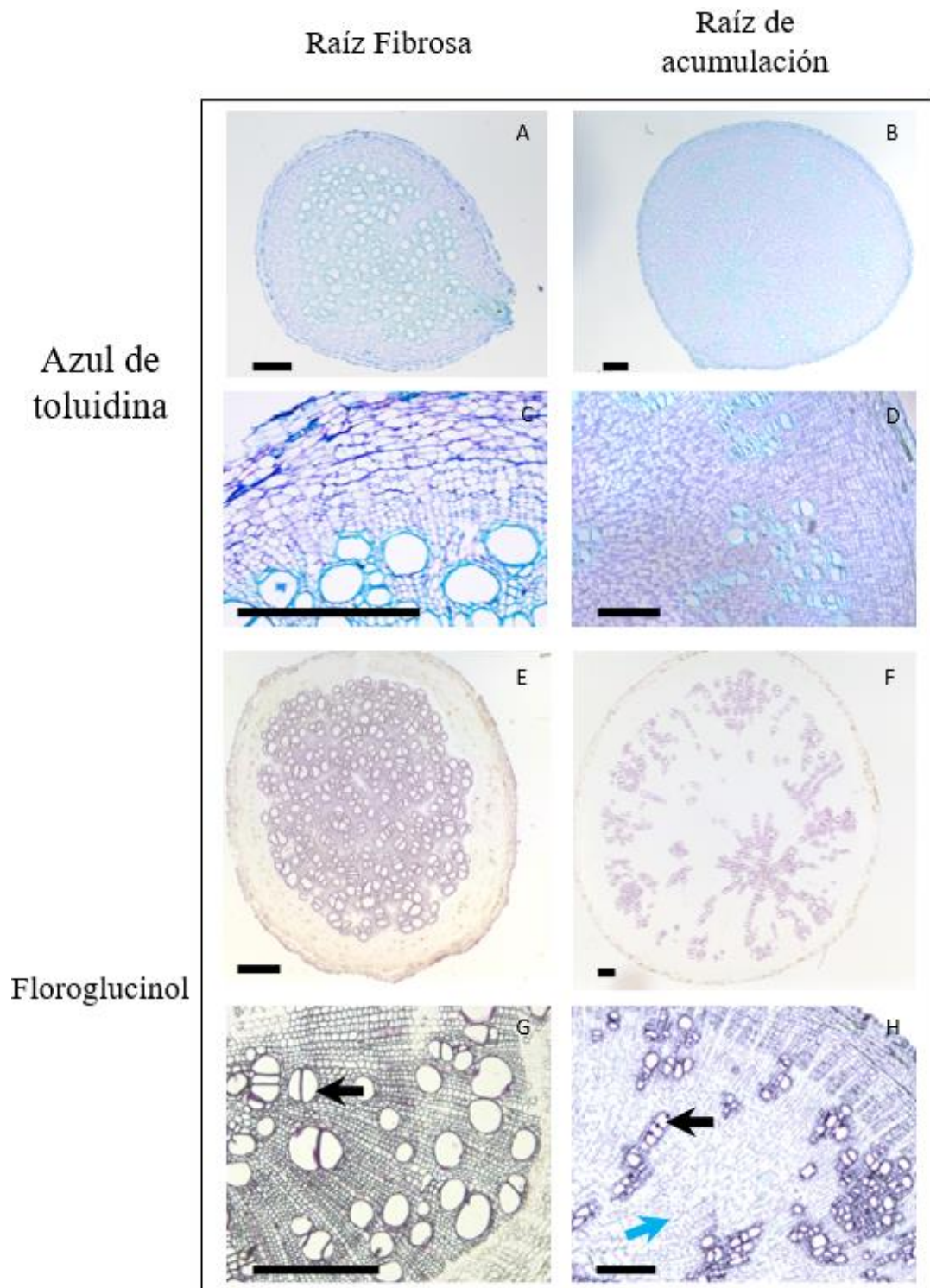


Figura 1. Secciones transversales de los distintos tipos de raíz, fibrosa y de acumulación, teñidas con azul de toluidina y con floroglucinol. A y C corresponden a raíces fibrosas teñidas con azul de toluidina; mientras que C y D corresponden a raíces de acumulación. Por su parte, E y G corresponden a raíces fibrosas con floroglucinol; y F y H a raíces de acumulación. Las **flechas negras** indican vasos y fibras y la **flecha azul** indica xilema parenquimático. La escala en cada una de las fotos es de 0,5 mm.

### **1.3.Desarrollo del tejido vascular en raíz.**

Como se ha mencionado anteriormente, a la hora de estudiar determinados procesos que ocurren en las plantas, el conocimiento genético y molecular existente en *Arabidopsis thaliana* puede servir de guía.

Las plantas dicotiledóneas desarrollan su vasculatura mediante el crecimiento apical (denominado crecimiento primario) y el crecimiento lateral (o secundario) gracias a la actividad de los meristemos primarios y secundarios, respectivamente. Los meristemos se pueden definir como un reservorio de células madre indiferenciadas con elevada actividad mitótica capaces de proveer células para el crecimiento primario y secundario (Caño-Delgado et al., 2010). Por un lado, el crecimiento primario hace que tanto los brotes como las raíces crezcan en longitud; mientras que el crecimiento secundario hace que la planta aumente el grosor de los brotes y de las raíces. Los meristemos primarios se establecen durante la embriogénesis en los ápices del brote y de la raíz (SAM y RAM, respectivamente) y los meristemos secundarios se establecen durante el desarrollo post-embriionario e incluyen, entre otros, el cambium vascular y el cambium suberoso, de los cuales, el cambium vascular es el principal contribuidor al crecimiento secundario (Hoang et al., 2020).

Según diversos autores (Zhang et al., 2011; Ruonala et al., 2017; Hoang et al., 2020) el desarrollo de los tejidos vasculares se puede dividir en tres fases: en primer lugar, el establecimiento y mantenimiento del cambium vascular; a continuación, la especificación de los tipos celulares vasculares; y, finalmente, la diferenciación en floema y xilema. De estas fases, nos vamos a centrar en la diferenciación del xilema y su regulación, ya que es el tipo celular mayoritario presente en las raíces de acumulación.

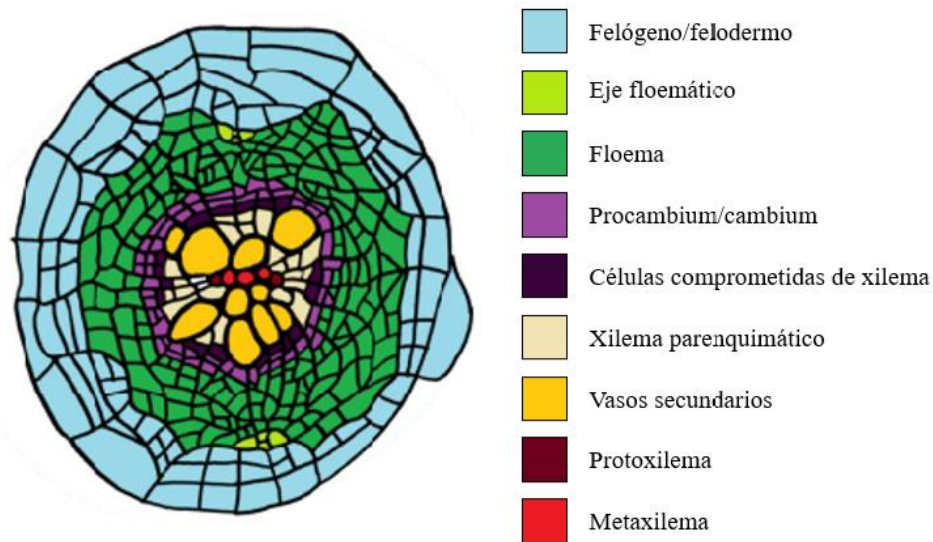


Figura 2. Representación esquemática de una sección transversal de raíz de *Arabidopsis* justo debajo del hipocótilo, durante el desarrollo secundario. El resto de tejidos de raíz, endodermis, cortes y epidermis, no se muestran en la figura.

### 1.3.1. Regulación de la diferenciación del xilema.

Estudios sobre el establecimiento de la polaridad abaxial-adaxial (muy importante durante la formación del patrón interno-externo del tejido vascular en el tallo o la raíz) muestran la importancia de los factores de transcripción *HD-ZIPs III* (*CLASS III HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER*) y los *KANADI*; y como su regulación antagonista es capaz de establecer este patrón. Los *HD-ZIPs III* se expresan en el dominio del xilema del cambium vascular (la parte interna o abaxial) y son capaces de inducir el desarrollo de xilema, mientras que los *KANADI* se expresan en el floema en desarrollo, en la parte externa o adaxial (Fig. 2) (Hoang et al., 2020). A pesar de que no hay evidencias de una interacción directa entre las proteínas de ambas familias de genes, se piensa que sus acciones sobre el desarrollo se deben a efectos en los transportadores de auxinas, como *PINI* (Izhaki & Bowman 2007, Ilegems et al. 2010).

La familia de los HD-ZIPs III está compuesta por cinco factores de transcripción en *Arabidopsis thaliana*: PHABULOSA (PHB), REVOLUTA (REV), PHAVOLUTA (PHV), CORONA (CNA) y ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 8 (AtHB8). A pesar de que la mayoría de ellos muestra un patrón de expresión similar en la vasculatura, sus funciones en el desarrollo no son iguales (Nieminen et al., 2015). PHB, CNA y AtHB8 se encuentran principalmente en las células precursoras del xilema, *REV* se expresa en la vasculatura en el RAM y *PHV* no se expresa en la vasculatura radicular (Fig.3)

(Carlsbecker et al., 2010). Estudios funcionales de esta familia de genes han demostrado que resultan esenciales para controlar el número de células en el cambium vascular y la diferenciación del xilema. En la raíz de *Arabidopsis* se ha sugerido que los HD-ZIPs III controlan la formación *de novo* de xilema, ya que una pérdida de función en los 5 genes deriva en un fenotipo en el que no tiene lugar la formación de xilema; bajos niveles de expresión inducen protoxilema y una sobreexpresión conduce a la formación de metaxilema ectópico en el lugar donde debería de haber protoxilema. (Carlsbecker et al., 2010).

Existe una regulación postranscripcional sobre los niveles de mRNA de los *HDZIPIII* a través de la acción de los *micro RNA165/166*, los cuales tienen como diana a los mensajeros de los *HD-ZIPIII*s para degradarlos (Carlsbecker et al., 2010). Con ayuda de la genómica y de análisis moleculares, el papel de los HD-ZIPs III y su interacción con los *miRNA 165/6* en la formación de madera han sido demostrados también en otras especies como *Populus* y *Eucalyptus*, en las cuales genes homólogos muestran patrones de expresión muy similares. Esto nos indica que la ruta HD-ZIPIII-miRNA165/6 está conservada en distintas especies (Ko, Prassions y Han, 2006).

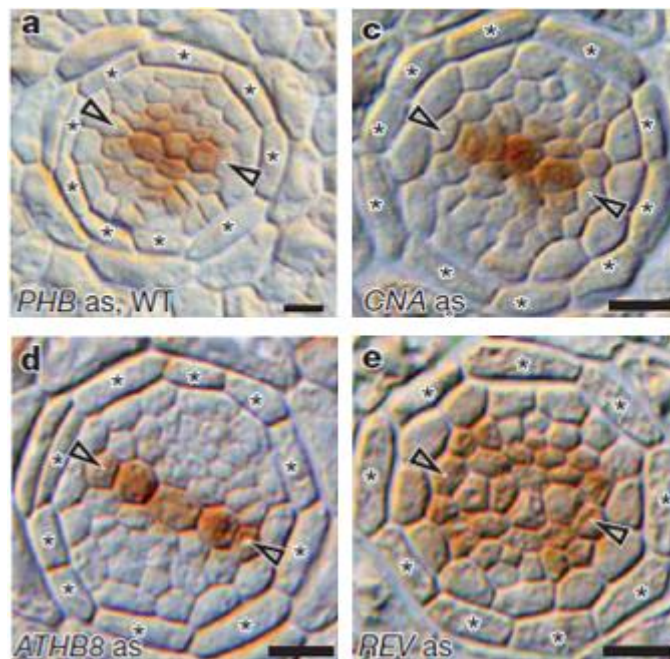


Figura 2. Hibridación *in situ* con sondas de mRNA específicas para PHB (a), CNA (c), ATHB8 (d) y REV (e) en secciones transversales de raíces WT. El mRNA de PHV no se detectó. Los asteriscos marcan la posición de la endodermis, las flechas indican la posición del protoxilema y las barras muestran la escala de 10  $\mu$ m. Figura tomada de Carlsbecker et al., 2010.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Recabando lo mencionado anteriormente en el apartado de introducción y, asumiendo que *Manihot esculenta* tiene HD-ZIP de clase III y que tienen una función parecida a la de *Arabidopsis*, la hipótesis de este trabajo es:

Los ortólogos de HD-ZIP de clase III de yuca son esenciales para la formación y desarrollo de raíces de acumulación. Esto podría verse reflejado en un perfil transcripcional diferencial de estos TF entre la raíz de acumulación y la raíz fibrosa, lo cual implicaría una correlación positiva entre la mayor cantidad de xilema parenquimático de una raíz respecto a la otra y el nivel de expresión de los *HDZPIII*.

Para comprobar esta hipótesis, los objetivos que tiene este trabajo son los siguientes:

- 1) Identificación mediante herramientas bioinformáticas de los genes ortólogos de la familia de HD-ZIP de clase III en yuca.
- 2) Analizar el perfil transcripcional de esta familia de genes en los distintos órganos y tejidos de la planta.
- 3) Llevar a cabo una caracterización molecular de un HD-ZIP de clase III, comprobando su unión y activación a la región promotora de un gen marcador de raíz de acumulación.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. Análisis filogenéticos.

Con el objetivo de identificar todos los HDZIP de clase III presentes en yuca, se llevó a cabo un análisis filogenético. Para ello, se utilizaron las secuencias de los HDZIP de clase III de *Arabidopsis thaliana* como *bait* para encontrar los posibles HDZIP de clase III de *Manihot esculenta*. Se hizo un análisis BLAST (blastp) con las secuencias de aminoácidos de *AtHB8* (AT4G32880), *CORONA* (CNA-AT1G52150), *PHABULOSA* (PHB-AT2G34710), *phavoluta* (PHV-AT1G30490.1) y *REVOLUTA* (REV-AT5G60690) de *Arabidopsis thaliana* contra 11 especies de angiospermas (tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas) utilizando la base de datos Phytozome v12.1. Como monocotiledónea, se seleccionaron las secuencias de *Oriza sativa*; el resto de secuencias pertenecen a dicotiledóneas. Se han utilizado las secuencias de *Brassica rapa*, *Daucus carota* y *Solanum tuberosum* debido al parecido con yuca a la hora de formar órganos vegetativos subterráneos a partir del tallo o de la raíz. El resto de secuencias pertenecen a especies que se seleccionaron para abarcar órdenes distintos: *Glycine max*, *Nicotiana sylvestris*, *Prunus pérsica*, *Setaria italica*, *Solanum lycopersicum*, *Populus trichocarpa* y *Manihot esculenta*. Se utilizó también la secuencia de *Illicium floridanum*, una angiosperma perteneciente al ANA clade, (las llamadas angiospermas primitivas), con el fin de usar esas secuencias como *outgroup* en el árbol filogenético final.

A continuación, mediante un diagrama de Venn, se eliminaron las duplicaciones del total de secuencias obtenidas. Con las secuencias resultantes, se llevó a cabo un primer árbol filogenético, con las familias de HD-ZIPs (I, II, III y IV), eligiendo para ello una secuencia de *Arabidopsis thaliana* de un gen de cada familia. Esto permitió poder seleccionar las secuencias de aminoácidos que pertenecían únicamente a los HD-ZIP de clase III.

El siguiente paso fue llevar a cabo el árbol final (Fig. 4), en el que se incluyeron las secuencias de los HD-ZIP de clase III de *Arabidopsis thaliana*, las secuencias de los HD-ZIPs III de las 11 especies anteriormente mencionadas y, como *outgroup*, la secuencia del único gen que supuestamente cumple la función de HD-ZIP de clase III de *Illicium floridanum*. El árbol se construyó usando el servidor NGPhylogeny.fr (ngphylogeny.fr), siguiendo el modelo de maximum likelihood PhyML v3.0 (Guindon et al., 2010). Como input, se incluyeron las secuencias de aminoácidos en formato FASTA. El alineamiento



múltiple de las secuencias se llevó a cabo con la herramienta MAFFT v7 (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (Kato et al., 2013) con los parámetros predeterminados. La significancia estadística se evaluó mediante aLRT Likelihood statistics y, finalmente, tanto la representación gráfica del árbol como su edición se hizo con iTOL v6 (itol.embl.de).

### **3.2. Búsqueda de promotores.**

En primer lugar, la búsqueda se basó en el paper de Mark C. Wilson et al. (2016) en el cual, mediante una serie de RNA-seq ejecutados en 11 tipos celulares diferentes, encontraron un total de 3485 genes diferencialmente expresados en la raíz de acumulación respecto la raíz fibrosa. Con esta lista de genes como referencia, se filtró manualmente según el valor del ratio de expresión (expresión en la raíz de acumulación dividido por la expresión en la raíz fibrosa) y se seleccionaron los 250 genes que tienen el ratio de expresión más elevado. A continuación, se utilizó el sitio web Phytozome v12.1, para encontrar y descargar secuencias de 1000 pares de bases (pb) upstream del ATG de cada uno de los genes, donde se encuentra la región promotora.

El siguiente paso fue encontrar un motivo de unión canónico de la familia de genes HD-ZIP de clase III. Para ello, se utilizó la base de datos JASPAR (jaspar.genereg.net), una colección de los perfiles de unión de factores de transcripción curados y almacenados como matrices de frecuencia de posición (PFM), lo cual facilita que se utilicen para scanning de secuencias genómicas. Se utilizó la matriz del AtHB15 o CORONA (CNA), cuyo sitio de unión canónico es AATGAT. Seguidamente, se utilizó esta matriz para analizar los sitios de unión de CORONA en las 250 secuencias promotoras en el sitio web MORPHEUS, el cual permite analizar secuencias de DNA para predecir y encontrar sitios de unión de factores de transcripción. Este recurso online utiliza la matriz de unión de los factores de transcripción, en este caso CNA, basándose en CHIPseq y otros análisis de unión al DNA, y con esa matriz analiza los posibles sitios de unión en la región promotora. Los criterios que se establecieron para considerar a una secuencia como válida, fueron que tuviera dos o más sitios de unión al final de la región promotora y con un Score superior a -10 en Morpheus. Se estableció de esta manera porque es en esa región donde normalmente está la caja TATA, una secuencia conservada en gran número de genes que marca el inicio de la transcripción ya que facilita que se unan factores de transcripción. Además, esa zona, la cercana al ATG inicial, es una zona con un alto nivel de regulación transcripcional. El Score -10 en Morpheus, es una condición restrictiva que



indica posiciones en la secuencia de los promotores que son más probables de ser detectadas por los factores de transcripción, en este caso AtHB15, basándose en la estadística de la matriz.

### **3.3. Análisis de la expresión génica.**

#### **3.3.1. Recolección del material vegetal.**

Se tomó una raíz fibrosa y una raíz de acumulación de una planta de yuca adulta (60444WT, *Manihot esculenta*, Crantz) crecida en una mezcla 3:1 (v/v) de compost de semilla y vermiculita y, con ayuda de un cúter, se separaron los tejidos del cambium vascular, xilema y floema de la raíz de acumulación. Además, se tomó una muestra del tallo, de una hoja adulta y de un brote. El material se machacó en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido y seguidamente fue congelado a -80 °C.

#### **3.3.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.**

Se extrajo RNA de cada una de las muestras de tejido vegetal siguiendo el protocolo Pineapple RNA Extraction Method. Se trata de un protocolo de extracción basado en el método tradicional fenol-cloroformo en el que se modifica el tampón de extracción para optimizar la extracción de RNA de tejidos con alto contenido en almidón y otros productos secundarios del metabolismo. En primer lugar, se debe de triturar 200 mg de tejido vegetal utilizando N<sub>2</sub> líquido. A este triturado, se le añaden 600 µL del tampón de extracción de RNA (Tabla 1), al cual se le añade B-Mercaptoetanol al 1%, y se agita durante dos minutos. A continuación, se añaden 150 µL de etanol 100% junto con 66 µL de acetato de potasio 5M y se agita durante 1 minuto. A esta mezcla se añaden 750 µL de cloroformo:isoamílico (24:1) y se le aplica una centrifuga a máxima velocidad durante 3 minutos. Después, se toma el sobrenadante, el cual se pasa a un nuevo tubo eppendorf que contiene previamente 700 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifuga a máxima velocidad durante 3 minutos. De nuevo se pasan 500 µL del sobrenadante a un nuevo eppendorf. A continuación, se añade 1 mL de etanol 100%, y tras un vortex, se incuba a -80°C durante 30 minutos. El siguiente paso es aplicar una centrifuga a 14000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Se descarta el sobrenadante y se añaden 170 µL de etanol 80% y se aplica una centrifuga durante 3 minutos a máxima velocidad. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 150 µL de ddH<sub>2</sub>O junto con 50 µL de LiCl 8M. Se incuba durante toda la noche a 4 °C y, al día siguiente, se centrifuga a 14000 rpm y 4°C durante 30 minutos. Tras la centrifuga, se descarta el

sobrenadante, se añaden 170  $\mu\text{L}$  de etanol 80% y se da una centrifuga de 3 minutos a máxima velocidad. Se descarta el sobrenadante y el pellet se seca mediante vacío durante 15 minutos. Finalmente, se resuspende el pellet en 35  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O. A continuación, se mide la concentración de RNA obtenido utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

A partir del RNA obtenido se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis kit provisto por NZYTech-Genes & Enzymes. Este kit incluye todos los componentes necesarios para llevar a cabo la síntesis de cDNA. Para ello, se prepara un mastermix en el que ponen 10  $\mu\text{L}$  de NZYRT 2x Master Mix, 2  $\mu\text{L}$  de Enzyme Mix, RNA (hasta 5  $\mu\text{g}$ ) y ddH<sub>2</sub>O hasta completar los 20  $\mu\text{L}$  de reacción. En el termociclador, en primer lugar, una incubación de 25 °C durante 10 minutos y, a continuación, a 50°C 30 minutos. La reacción se inactiva aumentando la temperatura a 85°C durante 5 minutos y, finalmente, se añade 1  $\mu\text{L}$  de RNase H para eliminar los restos de RNA que se hayan podido quedar unidos al cDNA. El cDNA obtenido siguiendo el protocolo se resuspende en 80  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O y se almacena a -20 °C hasta su uso para la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

*Tabla 1. Composición del tampón de extracción de RNA Pineapple.*

Concentración del stock	Conc. final	
	100 mL	
1M Tris pH 7.5 (pH with solid boric acid)	150 mM	15 mL
10% SDS	2%	20 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	50 mM	10 mL
H <sub>2</sub> O		55 mL

### **3.3.3. Análisis de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).**

En primer lugar, se diseñaron los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la reacción utilizando las herramientas del sitio web Benchling, como están descritos en la tabla 2. Los oligos se diseñaron para que su temperatura de unión a la secuencia de DNA fuera alrededor de los 60 grados y para que el producto amplificado se encontrara cerca de la región de 3' y tuviera un tamaño entre las 80 y las 120 pb. Su eficiencia se comprobó estudiando la Standard Curve mediante RT-qPCR utilizando como material genético 4

diluciones (1:1, 1:5, 1:25, 1:125). La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction (Applied Biosystems), y se empleó Sybr Green Mix 2x (TakaRa) con ROX como reportero. Se emplearon un total de 3 réplicas técnicas para cada una de las muestras biológicas estudiadas: brote, hoja adulta, tallo, raíz fibrosa (FR), raíz de acumulación (SR), cambium, floema y xilema. Además, la reacción se llevó a cabo por triplicado. Los valores de expresión de los *HD-ZIP III* se normalizaron analizando también la expresión de la ubiquitinina carboxiterminal hidroxilasa de yuca.

*Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de RT-qPCR. Todos ellos fueron diseñados utilizando el software Benchling. Todos ellos tienen una longitud de entre 20 y 22 pares de bases.*

<b>Nombre</b>	<b>ID en M. esculenta</b>	<b>Sentido</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>
MesHDZIPIII-1	Manes.04G133100	Reverse	CGAGCAGAGAGTCTTTTCGACCA
MesHDZIPIII-1	Manes.04G133100	Forward	GTGCTGCTCTCTGAAGGCTTTG
MesHDZIPIII-2	Manes.11G034600	Reverse	AGGTGCCAACGTTGTTGGTGCA
MesHDZIPIII-2	Manes.11G034600	Forward	CTGAATGTGCTGCCACTGCCA
MesHDZIPIII-3	Manes.16G074600	Reverse	GTGCTCCCACAATTGCCTGAAA
MesHDZIPIII-3	Manes.16G074600	Forward	ACTCCCGGATGGATGCAACTAG
MesHDZIPIII-4	Manes.03G059200	Reverse	AAGCGCTTCGGGAGTACCAGGT
MesHDZIPIII-4	Manes.03G059200	Forward	ATGGCTCGGCAGTACGTCCGTA
MesHDZIPIII-5	Manes.11G146000	Reverse	AACCAGCCTTCAATGATGCAGC
MesHDZIPIII-5	Manes.11G146000	Forward	GCTATTGCAAATGTCCCGCCA
MesHDZIPIII-6	Manes.04G020100	Reverse	CAAAGTGCCTTGCGTCCAGATT
MesHDZIPIII-6	Manes.04G020100	Forward	TTGTTTCATTGAAGTCGCTGCCG
MesHDZIPIII-7	Manes.14G122900	Reverse	GGCACAGGCACCAATAGCATTT
MesHDZIPIII-7	Manes.14G122900	Forward	CGAGGAGTTCTTGGAGGTGGTT
MesHDZIPIII-8	Manes.06G055000	Reverse	GTGTGGATCCTGTAGCTTCGGT
MesHDZIPIII-8	Manes.06G055000	Forward	AGGGTTGCAATGGCTATTTTCGC

### **3.3.4. Análisis estadístico de los datos.**

El análisis estadístico se realizó aplicando los métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS para Windows (Versión 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los valores medios se compararon mediante el test de Duncan al nivel de probabilidad del 0,05.

### **3.4. Caracterización anatómica.**

Para tener un mayor conocimiento del material vegetal que se utilizó para llevar a cabo los análisis de expresión génica, se llevaron a cabo una serie de tinciones. Para ello, el material vegetal se fijó en FAE y posteriormente deshidratado con baños de etanol 70%, en el cual quedan fijadas las muestras a largo plazo. A continuación, con las muestras ya

fijadas, se realizan unos baños en soluciones de EtOH en orden creciente de concentración para deshidratarlas. Esto se hace para poder incluir las muestras en parafina, la cual es hidrófoba. En los últimos pasos, la muestra se pasa a parafina y se da un golpe de vacío, favoreciendo la inclusión de la parafina dentro del tejido.

El siguiente paso es embeber la muestra en parafina y, a continuación, realizar cortes transversales de 10  $\mu\text{m}$  de grosor, utilizando para ello el microtomo Microm Leica.

Una vez que las muestras estaban montadas, se siguieron los protocolos para las tinciones de azul de toluidina y floroglucinol como están descritas en Anexos. Las muestras teñidas fueron observadas y fotografiadas tanto con el microscopio Leica 5000 como con el macroscopio Leica 5000.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Se han identificado 8 ortólogos de *HD-ZIP* de clase III en *Manihot esculenta*.

Para llevar a cabo la identificación de los HD-ZIP III de yuca, en primer lugar, se hizo un análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de estos genes en 13 plantas, incluyendo yuca. Se llevó a cabo un análisis BLAST de las secuencias de aminoácidos (blastp) utilizando el sitio web Phytozome, el cual permite encontrar los genes ortólogos de los de *Arabidopsis thaliana* en otras especies (ver el apartado de “Materiales y Métodos” para más detalles). Tras eliminar las secuencias duplicadas y descartar aquellas secuencias que pertenecen a los HD-ZIP de clase I, II y IV, el total de secuencias obtenidas fue de 174. Estas secuencias se alinearon con la herramienta MAFFT y fueron utilizadas para la construcción del árbol filogenético (Fig. 4).

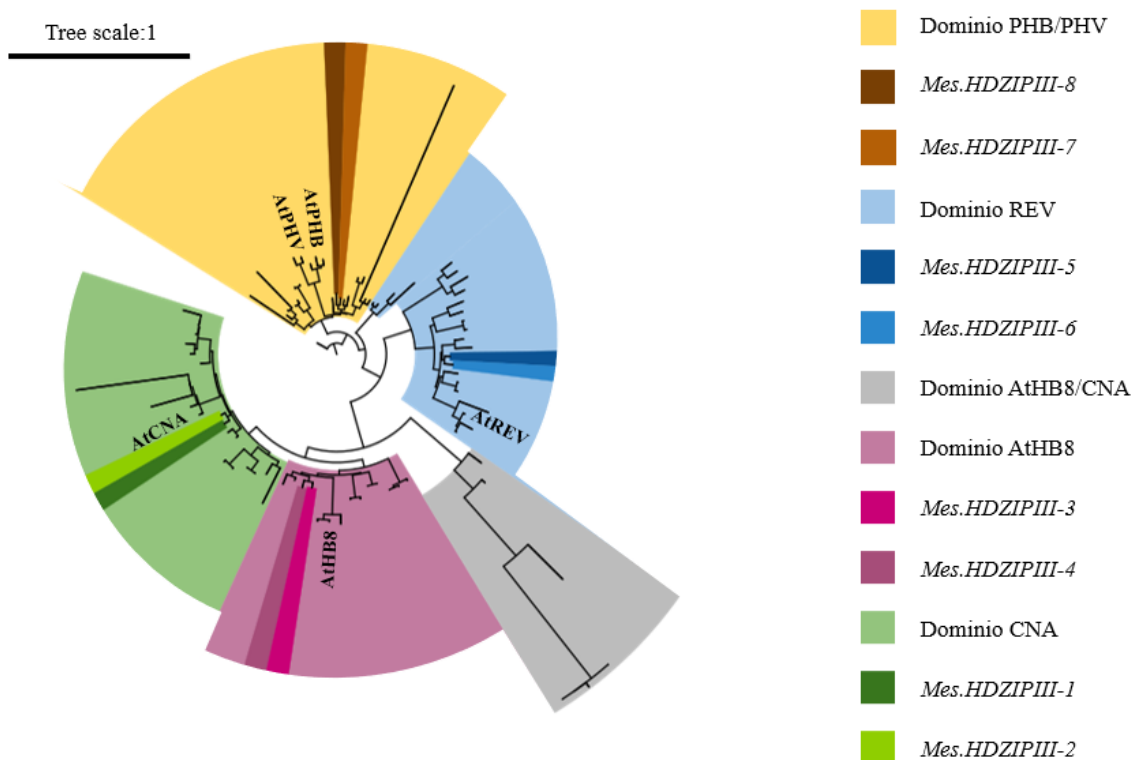


Figura 4. Análisis filogenético de los HD-ZIP de clase III. Los distintos colores de la leyenda indican las cinco familias de HD-ZIP III representadas en el árbol: Phabulosa/phavoluta (PHB/PHV), Revoluta (REV), AtHB8 y Corona (CNA). En el mismo color, pero en distinta tonalidad, se representan los HD-ZIP III de yuca. Las líneas, cuanto más largas, representan mayor distancia evolutiva.

Para obtener el árbol representado en la figura 5, se empleó como outgroup (grupo de genes control) la secuencia de aminoácidos del único gen que cumple la función de HD-ZIP de clase III de *Illicium floridanum*, una angiosperma del orden de las austrobaileyales.

Esta planta pertenece un clado conocido como ANA (Amborellales-Nymphaeales-Austrobaileyales), siendo estas las angiospermas basales o más antiguas.

Con ayuda del árbol, se han podido identificar un total de ocho secuencias pertenecientes a la familia de HD-ZIP III en yuca. En el árbol se pueden observar cinco colores diferentes, representando cada uno de ellos un miembro diferente de esta familia de factores de transcripción (Fig. 4). En naranja, las secuencias correspondientes con *PHB/PHV*, cuyos ortólogos son *MesHDZIPIII-7* y *MesHDZIPIII-8*; en azul, las secuencias correspondientes al dominio *REV*, cuyos ortólogos son *MesHDZIPIII-5* y *MesHDZIPIII-6*; en gris un dominio intermedio entre *AtHB8* y *CNA*; en morado, *AtHB8* y sus ortólogos *MesHDZIPIII-3* y *4*; y, finalmente, en verde, *CNA* con sus ortólogos en yuca *MesHDZIPIII-1* y *2*. Para cada uno de estos genes de *Arabidopsis thaliana*, vemos que, en yuca, hay dos secuencias. Esto quiere decir que, en un momento determinado, en yuca, estos genes sufrieron una duplicación.

#### **4.2. HDZIPIII-1 muestra una marcada expresión preferencial en cambium y xilema de la raíz de acumulación.**

Una vez identificados los HD-ZIP de clase III presentes en yuca, el siguiente paso fue caracterizar el perfil de expresión de estos genes en distintos órganos y tejidos de la planta. Se diseñaron una serie de oligonucleótidos específicos de cada uno de los genes (Tabla 2) y solo aquellos que presentaron una eficiencia de unión adecuada fueron utilizados, para el resto se diseñaron oligos nuevos. Para normalizar los valores de expresión de los HD-ZIP de clase III, se analizó también la expresión del gen de ubiquitina carboxiterminal hidroxilasa, utilizado como “housekeeping” o gen control. Las qRT-PCRs se llevaron utilizando tres réplicas biológicas de cada uno de las muestras y se hicieron por triplicado.

En primer lugar, se analizó la expresión relativa de cada uno de los genes en los distintos órganos de la planta (Tabla S1). Nuestros resultados indican que la mayoría de los 8 genes se expresan de manera diferencial en el sistema radicular, principalmente en la raíz de acumulación, con respecto al tallo, brote y hoja. De hecho, todos ellos tienen una expresión muy baja en brote y en hoja, exceptuando el *MesHDZIPIII-7*, el cual tiene unos valores de expresión muy parecidos en todos los órganos de la planta estudiados. Sin embargo, tanto el *MesHDZIPIII-5* como el *6*, que corresponden a *REVOLUTA* (Fig. 4),

se expresan prácticamente al mismo nivel entre los dos tipos de raíces y el tallo, no presentando diferencias significativas entre los 3 órganos.

La siguiente aproximación que se hizo fue analizar la expresión relativa de cada uno de los genes en la raíz fibrosa, para, de esta manera, encontrar cuál de ellos es el que mayor expresión tiene en este órgano. En la figura 5A, se puede observar como el gen que más se expresa en este tipo de raíz es el *MesHDZPIII-1* (Manes.04G133100), con un valor de 1. Salvo el *MesHDZPIII-6* (Manes.04G020100), con una expresión relativa de 0,89 respecto al *MesHDZPIII-1*, el resto de genes, se expresan mucho menos en la raíz fibrosa. De hecho, en nuestros experimentos, ninguno de ellos alcanzaba un valor de expresión superior al 0,4 respecto del primero.

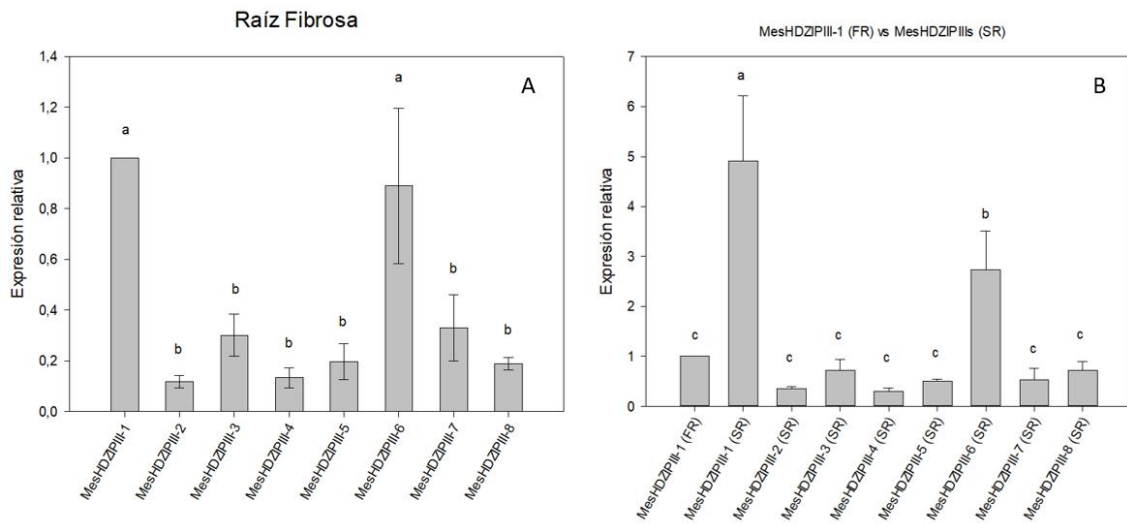


Figura 5. A) Valores de expresión relativa de los distintos HD-ZIPs de clase III en la raíz fibrosa de yuca. B) Valores de expresión relativa de los distintos HD-ZIPs de clase III en la raíz de acumulación (SR) tomando como referencia el valor de expresión del HD-ZIP III-1 en la raíz fibrosa (FR). Los resultados son la media de tres réplicas biológicas. Las barras de error indican SD. Las diferencias significativas con el grupo control son el resultado de aplicar el test de Duncan. Las **letras minúsculas** representan diferencias significativas en la expresión entre los distintos genes.

Una vez identificado el gen que más se expresa en la raíz fibrosa, lo que se hizo a continuación fue analizar los valores de expresión relativa de los *HDZPIII*s en la raíz de acumulación, tomando como referencia el valor de expresión del *MesHDZPIII-1* (Manes.04G133100), al ser este el que más se expresa en raíz fibrosa (Fig. 5B). Este análisis nos da una información más aproximada sobre si la expresión de alguno de los HD-ZIPs de clase III es exclusiva o mayoritaria en un tipo de raíz o cuál de ellos se expresa de manera más marcadamente diferencial en un tipo de raíz respecto a la otra. Se puede observar cómo los *MesHDZPIII-1* y *6* son los genes que se expresan más en la raíz de acumulación respecto al gen que más se expresa en la raíz fibrosa. Concretamente,

el primero se expresa casi 5 veces más en una raíz que en otra, mientras que el 6 se expresa 2,73 veces más en la raíz de acumulación que el gen que más se expresa en la raíz fibrosa. Ambos genes, el 1 y el 6, presentan diferencias significativas con respecto tanto al valor de expresión de referencia, como al valor de expresión del resto de genes en ese tejido. El resto de genes se expresan mucho menos en este tipo de raíz, ninguno de ellos alcanza el valor de expresión del gen de referencia.

Este mismo tipo de análisis se llevó a cabo para comparar la expresión de los ocho *HDZIPIII*s de yuca en los distintos tejidos dentro de la raíz de acumulación. Los tejidos en los que se analizó la expresión de los genes fueron en floema (phl), xilema (xyl) y cambium (cam) (Fig. 6A, B y C, respectivamente; Fig. 7). El objetivo de esta aproximación era comprobar donde se expresan estos genes dentro de la raíz de acumulación y si alguno de los genes se expresa más que el resto o de manera exclusiva en alguno de los tejidos mencionados. Asimismo, la comparación con el gen que más se expresa en raíz fibrosa es indicativo de la diferencia de los niveles de expresión.



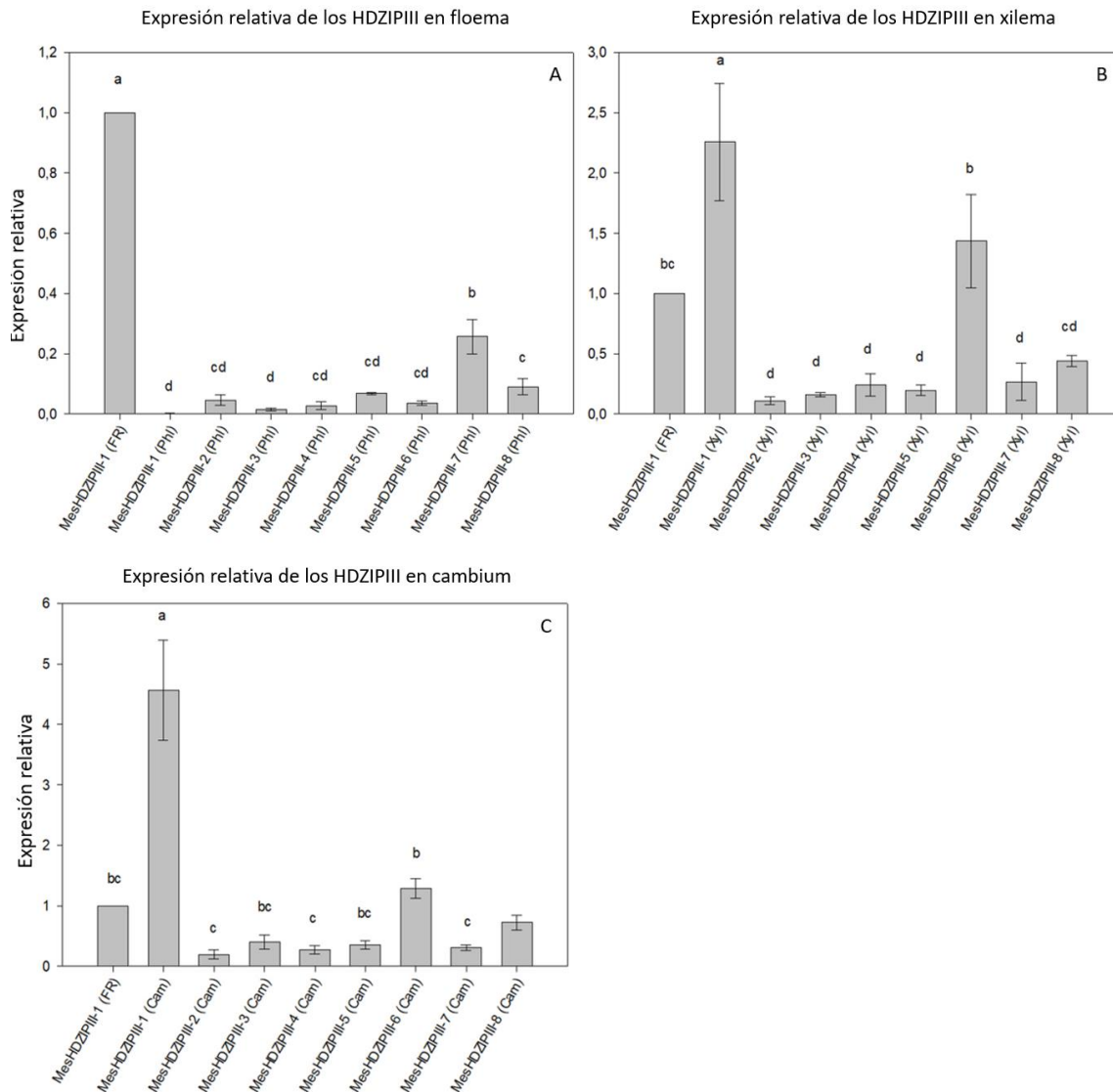


Figura 6. A) Valores de expresión relativa de los distintos HD-ZIPs de clase III en floema (Phl), B) xilema (Xyl) y C) cambium (Cam) tomando como referencia el valor de expresión del HD-ZIP III-1 en la raíz fibrosa (FR). Las barras de error indican SD. Las **letras minúsculas** representan diferencias significativas en la expresión entre los distintos genes. Las diferencias significativas con el grupo control son el resultado de aplicar el test de Duncan.

En primer lugar, se puede apreciar como el gen que más se expresa en la raíz de acumulación, se expresa de manera diferencial respecto al resto de genes en el cambium y en el xilema, donde alcanza un valor de expresión relativa de 4,5 y 2,25, respectivamente. Además, su expresión es prácticamente nula en el floema (Fig. 6A, B, C y Fig. 7). El *MesHDZIP III-2*, el cual tiene una expresión relativa de 0,34 en la raíz de acumulación (Fig. 5B), se expresa prácticamente igual en cambium y xilema, mientras que en floema se expresa menos (Fig. 6A, B, C y Fig. 7). El *MesHDZIP III-3*, cuya expresión relativa en la raíz de acumulación es de 0,73 (Fig. 5B), muestra un dominio de expresión localizado, sobre todo, en el cambium, con una expresión relativa de 0,4 (Fig.

6C y 7). Por otro lado, el *MesHDZIII-4* presenta una expresión más homogénea en los tejidos de la raíz de acumulación, siendo sus valores de expresión relativa en cambium y xilema de 0,273 y 0,24, respectivamente (Fig. 6B y C y 7).

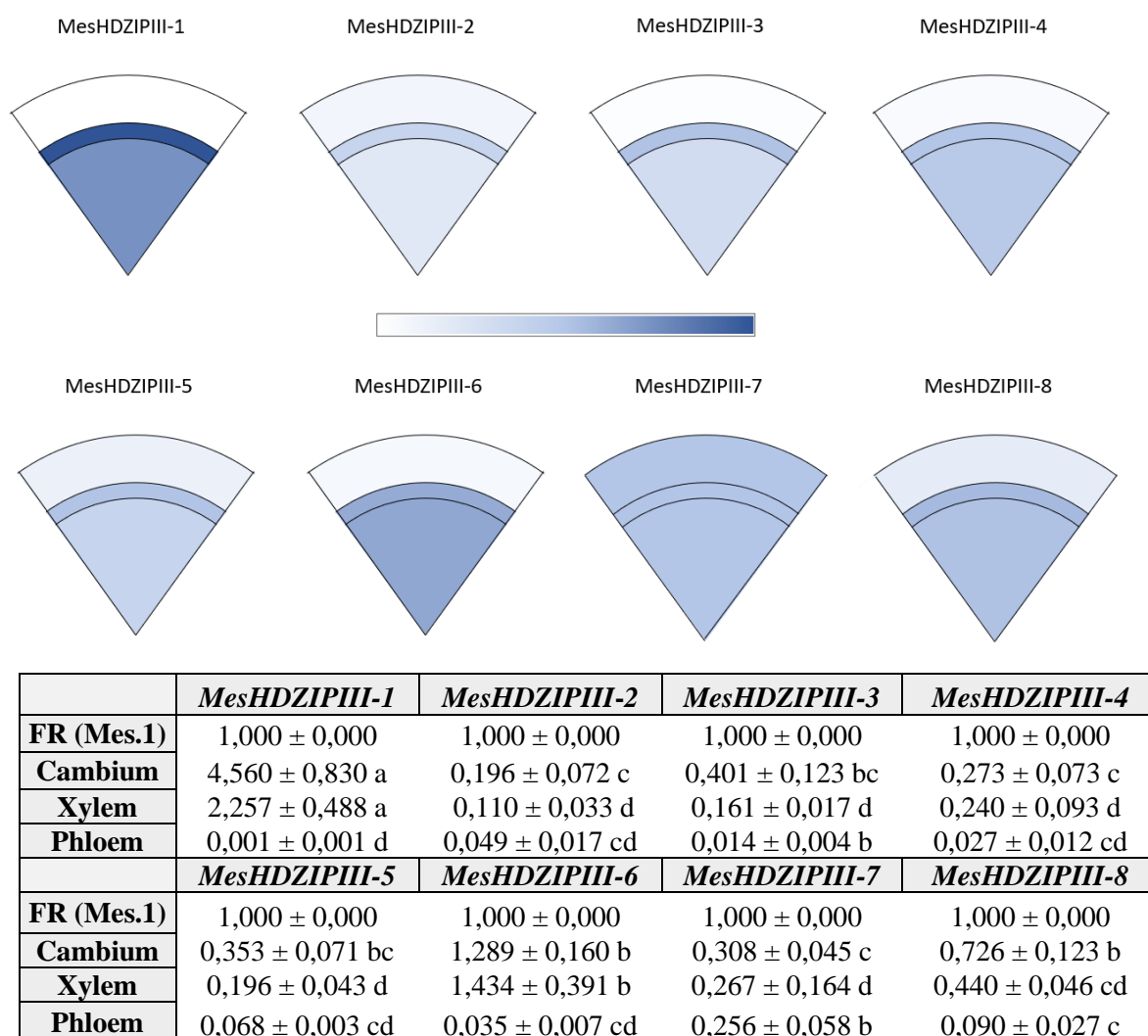


Figura 7. Arriba. Representación esquemática de la anatomía de una raíz de acumulación de yuca. Las distintas tonalidades de azul representan el rango de los valores de expresión relativa de los HD-ZIPs III en floema, cambium y xilema. En azul más oscuro, los valores más próximos al valor más alto de expresión relativa, y en azul más claro, los valores de expresión relativa más bajos. En blanco el valor de expresión igual a 0. Abajo. Tabla con los valores de expresión relativa de los distintos HD-ZIPs III en los tejidos de la raíz de acumulación de yuca en comparación con el gen que más se expresa en la raíz fibrosa, el HD-ZIP III-1. Tras el ± se indica el error (SD). Las **letras minúsculas** representan diferencias significativas en la expresión entre los distintos genes. Las diferencias significativas con el grupo control son el resultado de aplicar el test de Duncan.

El *MesHDZIII-5*, que tiene una expresión relativa en la raíz de acumulación de 0,5 (Fig. 5B), mantiene la misma tendencia que el resto de genes: se expresa principalmente en cambium y xilema (Fig. 6B, C y 7). El dominio de expresión del *MesHDZIII-6*, el cual

es el segundo gen que más se expresa en la raíz de acumulación respecto a la raíz fibrosa, está localizado, principalmente, en cambium y xilema. donde muestra un valor de expresión relativa de 1,3 y 1,4, respectivamente; mientras que en el floema es tan solo de 0,035 (Fig. 6A, B, C y 7). El *MesHDZIPIII-7* no presenta especificidad de tejido ya que sus niveles de expresión relativa son muy parecidos en los tres tejidos (Fig. 7). Finalmente, el *MesHDZIPIII-8* es, tras el anterior, el gen que más se expresa en el floema, 0,9 (Fig. 6A). Aun así, este gen se expresa principalmente en cambium y xilema, con un valor de expresión relativa de 0,73 y 0,44 en ambos tejidos respectivamente (Fig. 7). En conclusión, se observa una mayor expresión, en general, de cada uno de los genes en la raíz de acumulación respecto a la leñosa y una mayor expresión en cambium y xilema respecto a floema. Además, nuestros datos identifican a *MesHDZIPIII-1* como aquel con más expresión diferencial entre ambos tipos de raíces.

#### **4.3. Identificación de promotores de genes potencialmente regulados por la función HDZIPIII durante el desarrollo de la raíz de acumulación.**

Una vez identificado el *MesHDZIPIII-1* de yuca como el que más se expresa más en la raíz de acumulación y, en concreto, en el cambium se procedió a determinar si la proteína codificada por este gen tiene actividad HDZIPIII. Para ello, se decidió estudiar si esta proteína (i) es capaz de unirse a la región promotora de un gen -potencialmente diana de proteínas HDZIPIII- y (ii) si dicha unión entraña activación de la expresión de dicho gen diana. Los criterios que se establecieron para definir un gen como diana (y, por tanto, un promotor como válido para este ensayo) fueron los siguientes: i) que regule la expresión de un gen que se expresa de manera muy marcada en la raíz de acumulación respecto a la raíz fibrosa y ii) que tuviera al menos dos sitios de unión de HD-ZIP III en su promotor, cerca del inicio de la secuencia génica -siendo esta característica la que determinaría la posibilidad de que el gen sea, efectivamente, diana-. Para ello, en primer lugar, se seleccionaron una serie de genes diferencialmente expresados entre ambas raíces a partir de datos transcriptómicos previamente publicados (Marc C. Wilson et al., 2016). A continuación, se extrajo la secuencia de sus promotores utilizando la herramienta Phytozome v12.1 (mirar el apartado de “Materiales y Métodos” para más detalles). Tras identificar 250 secuencias candidatas, se utilizó el software MORPHEUS para determinar cuál de estas secuencias se ajustaba mejor al segundo criterio. Las secuencias eran de 1000 pb aguas arriba del primer ATG, debido a que si en esta secuencia hay sitios de unión para los HD-ZIP III, es muy probable que estos controlen la expresión del gen. Aun

así, se tomaron como buenas candidatas las que presentaron varios sitios de unión HD-ZIP III al final de la secuencia (5' → 3') y con un Score superior a -10, indicando mayor probabilidad de que se una el factor de transcripción a dicha región promotora, basándose para ello en las estadísticas que nos aporta la matriz.

Esta búsqueda permitió encontrar 2 secuencias promotoras candidatas: un ortólogo de Arabidopsis de *ATOX1* (Manes.06G121400), una metalochaperona implicada en la homeostasis del cobre (Phytozome v12.1) y Manes.02G031900, cuya función no está anotada. Estas secuencias tienen varios sitios de unión HD-ZIP III con buena puntuación y muy cerca del inicio de la secuencia codificante (Fig. 8).

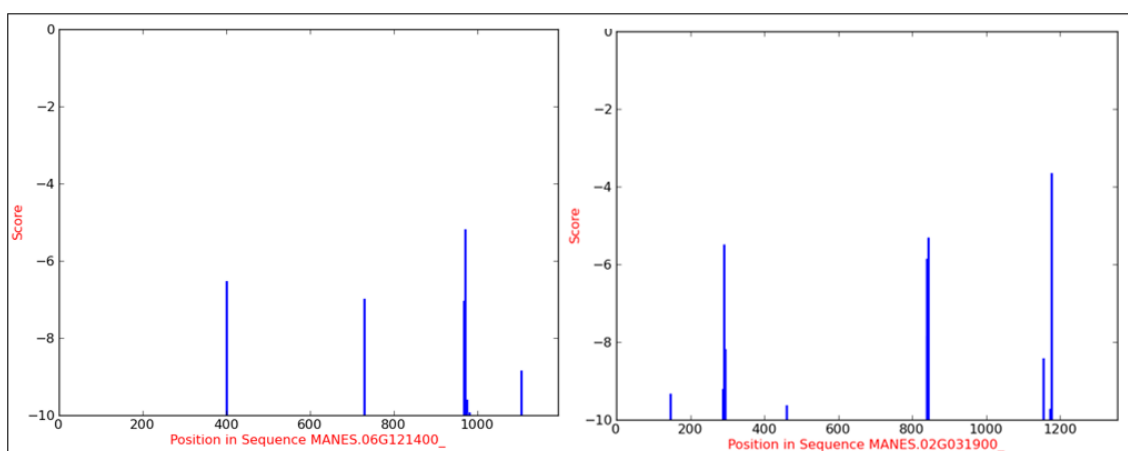


Figura 8. Gráficas de las dos secuencias promotoras candidatas obtenidas en MORPHEUS. El eje de abscisas indica la posición en la secuencia donde se encuentra el sitio de unión HD-ZIP III, mientras que el eje de ordenadas indica el score o la puntuación de dichos sitios de unión. A la izquierda, la secuencia del ortólogo de *ATOX1* (Manes.06G121400) y a la derecha, la secuencia de Manes.02G031900.

Con el objetivo de determinar la capacidad de unión y activación del *MesHDZIPIII-1*, se ha diseñado un ensayo de luciferasa para ser usado en un sistema heterólogo, *Nicotiana benthamiana*. La CDS del *MesHDZIPIII-1* se ha clonado en un vector que contiene en 5' un promotor 35S, para lograr su sobreexpresión. También se ha clonado en un vector que, además, contiene una secuencia VP16 en la N terminal de la proteína, para favorecer su unión al DNA. Con ellos se ha logrado transformar con éxito cepas electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*. La secuencia promotora se ha clonado en un vector pGreen 0800 II que contiene el gen reportero de la luciferasa y un 35S::Renilla para normalizar el valor de las medidas de bioluminiscencia. De esta forma, si la proteína del HDZIPIII-1 es capaz de unirse y activar la secuencia promotora, se verá reflejado en un aumento del valor de la luciferasa. Por problemas técnicos y por falta de tiempo, a día de hoy, no se ha podido avanzar más en este ensayo.

## 5. DISCUSIÓN.

Determinar las bases moleculares que actúan controlando la transformación de una raíz fibrosa a una raíz de acumulación en un punto determinado del desarrollo de la yuca sigue siendo, a día de hoy, un reto. Para ello, comprender el patrón de expresión de genes que, potencialmente, controlen la formación de tejido parenquimático en la raíz de acumulación, representa una pieza más del puzle para entender como ocurre la formación de este órgano.

En este estudio, como una primera aproximación para identificar genes cuya expresión pueda estar relacionada con el desarrollo de raíces de acumulación, se usó una estrategia basada en la identificación de genes ortólogos en yuca que, se sabe, participaban en el desarrollo de xilema en *Arabidopsis thaliana*, los HDZIPs de clase III (Ragni et al., 2018). Se identificaron *MesHDZIPIII-1* y *MesHDZIPIII-2* como ortólogos potenciales de *CORONA (CNA)*; *MesHDZIPIII-3* y *MesHDZIPIII-4* como ortólogos potenciales de *AtHB8*; *MesHDZIPIII-5* y *6* como ortólogos potenciales de *REVOLUTA (REV)*; y *MesHDZIPIII-7* y *8* como ortólogos potenciales de *PHB/PHV*. Es importante decir que en el árbol filogenético que se elaboró para identificar estos ortólogos (Fig. 4), el dominio PHB y PHV se agrupan dentro del mismo clado. Esto se debe a que estos genes son duplicaciones relativamente recientes y apenas hay distancia evolutiva entre ellos en *Arabidopsis*. Además, en el dominio *AtHB8/CNA* las secuencias correspondientes se agrupan con las de *Oriza sativa*, única monocotiledónea utilizada en este análisis. Esto es debido a que es la más distante evolutivamente del resto, que son dicotiledóneas.

El análisis de los niveles de expresión de estos genes en distintos órganos y tejidos de la planta (Tabla S1), indica que estos genes presentan un patrón de expresión muy parecido en prácticamente la totalidad de los órganos de la planta, teniendo una función redundante entre ellos. Esto ocurre de manera similar en *Arabidopsis*, donde se ha comprobado que sus funciones están altamente interconectadas, formando una red genética muy compleja (Nieminen et al., 2015). A pesar de esto, encontramos dos genes se expresan más en la raíz de acumulación respecto a la fibrosa: *MesHDZIPIII-1 (CNA)* y *MesHDZIPIII-6 (REV)* (Fig. 5A). Esto podría deberse, en parte, a la velocidad a la que se están produciendo las células en ambos tejidos. En una raíz de acumulación, se producen células xilemáticas más rápidamente que en la raíz fibrosa, ya que este es un tejido que tiene que crecer mucho más. En yuca, solo uno de los genes ortólogos de *CNA*

(*MesHDZIPIII-1*) mostró expresión en la raíz de acumulación, mientras que la expresión de *MesHDZIPIII-2* apenas fue detectada. Igual ocurre con los ortólogos de *REV*, se detectan elevados niveles del *MesHDZIPIII-6*, mientras el *MesHDZIPIII-5* apenas se detecta (Fig. 5B) Esto sugiere que, al menos en el contexto de la raíz de acumulación, es el primero de ellos el que tiene mayor aporte en la función HDZIPIII. Este patrón dispar en cuanto a niveles de expresión de genes duplicados no es sorprendente y, de hecho, se ha descrito previamente en yuca. Por ejemplo, en un estudio previo, se identificaron dos ortólogos en yuca del gen *NST3*, el cual codifica un factor de transcripción implicado en la regulación de la diferenciación de fibras xilemáticas en *Arabidopsis* (Siebers et al., 2007) y, al analizar la expresión de dichos ortólogos, uno presentó elevados niveles de expresión en ambos tipos de raíces mientras que la expresión del otro apenas fue detectable (Siebers et al., 2007).

Cuando se analizan los niveles de expresión génica de cada uno de los ocho *MesHDZIP* de clase III en cambium, xilema y floema de la raíz de acumulación, hay que tener en cuenta que estos tejidos se cortaron a mano. Esto hace que los tejidos no sean completamente limpios, en el sentido en el que, por ejemplo, las muestras de cambium contienen trazas tanto de floema como de xilema. Es lógico pensar que el gen cuya expresión es más diferencial en la raíz de acumulación frente a la fibrosa (*MesHDZIPIII-1*, *CNA*), también sea aquel que más se expresan en el cambium, debido a que este tejido tiene mucha actividad en el órgano de acumulación (Fig. 6A y 7). De igual manera, la expresión de este gen en el xilema de la raíz de acumulación es mayor, en tanto en cuanto, este órgano tiene mucha mayor cantidad de xilema que floema. Un patrón similar, aunque con menores niveles de expresión, se observa con el *MesHDZIPIII-6* (*REV*). Por tanto, a falta de más estudios, se puede decir que, en yuca, de entre los distintos ortólogos identificados de los genes *HDZIP* de clase III, el gen que muestra una expresión más diferencial en la raíz de acumulación (rica en xilema parenquimático) es *MesHDZIPIII-1* (*CNA*). Esto sugiere que la proteína *MesHDZIPIII-1* podría ser la más implicada en la formación de xilema parenquimático, pudiendo, por tanto, jugar un importante papel en la regulación de las grandes diferencias anatómicas entre la raíz fibrosa y la de acumulación.

Hacen falta más estudios funcionales para determinar si los genes potencialmente ortólogos de los *HD-ZIP III* en yuca cumplen realmente la función que tienen estos genes en *Arabidopsis*. Esto podría ayudar a saber si estos genes tienen una implicación más o

menos directa en la formación del órgano de acumulación. Desde un punto de vista biotecnológico, de confirmarse (i) la actividad HDZIPIII de la proteína codificada por *MesHDZIPIII-1* y (ii) que alteraciones en el nivel de expresión de este gen repercuten en modificaciones de la producción de xilema parenquimático, la modulación de la expresión de genes podría llevar al desarrollo de raíces de acumulación más grandes, o con una mejor capacidad para almacenar azúcares. Esto ayudaría a mejorar la productividad de los cultivos de yuca, suponiendo un mejor aprovechamiento de los recursos en los países en los que se cultiva y asegurando la producción a un gran número de agricultores.

## 6. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se han recabado con este trabajo son las siguientes:

- La yuca (*Manihot esculenta*) contiene en su genoma ocho genes potencialmente ortólogos de los *HD-ZIP* de clase III de *Arabidopsis*. Dos de ellos ortólogos potenciales de *PHB/PHV*, dos de *REV*, dos de *AtHB8* y dos de *CNA*.
- *MesHDZIPIII-1*, ortólogo de *CNA*, es el HDZIP de clase III de yuca que más se expresa en la raíz de acumulación, mayoritariamente en cambium y en xilema.
- *MesHDZIPIII-1* es el candidato principal dentro de la familia de los HDZIP de clase III más probable de estar implicado en el desarrollo de las raíces de acumulación en yuca.
- Son necesarios ensayos para determinar la posible función HD-ZIP III que cumplen estos genes ortólogos en yuca.



## 7. BIBLIOGRAFÍA.

Alves, A. A. C. (2002). Cassava botany and physiology. *Cassava: biology, production and utilization*, 1, 67-89.

Caño-Delgado, A., Lee, J. Y., & Demura, T. (2010). Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 605-637.

Carlsbecker, A., Lee J-Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueño, M.A., Vatén, A., Thitamadee, S., Campilho, A., Sebastian, J., Bowman, J.L., Helariutta, Y. & Benfey, P.N. 2010. Cell signaling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465: 316-32.

Chaweewan, Y., & Taylor, N. (2015). Anatomical assessment of root formation and tuberization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Tropical Plant Biology*, 8(1-2), 1-8.

Dong, T., Zhu, M., Yu, J., Han, R., Tang, C., Xu, T., ... & Li, Z. (2019). RNA-Seq and iTRAQ reveal multiple pathways involved in storage root formation and development in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *BMC plant biology*, 19(1), 1-16.

El-Sharkawy, M. A. (2004). Cassava biology and physiology. *Plant molecular biology*, 56(4), 481-501.

FAOSTAT (2018). Faostat: Food and Agriculture Data. Rome: FAOSTAT. (Visitado Sept 22, 2020).

Gajanayake, B., Reddy, K. R., Shankle, M. W., Arancibia, R. A., & Villordon, A. O. (2014). Quantifying storage root initiation, growth, and developmental responses of sweetpotato to early season temperature. *Agronomy Journal*, 106(5), 1795-1804.

Guindon, S. and Dufayard, J. F. and Lefort, V. and Anisimova, M. and Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59:307–321 - doi:10.1093/sysbio/syq010

Hoang, N. V., Park, C., Kamran, M., & Lee, J. Y. (2020). Gene regulatory network guided investigations and engineering of storage root development in root crops. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 762.

Howeler, R., Litaladio, N., & Thomas, G. (2013). Save and grow: cassava. *A guide to sustainable production intensification*, *1*, 87-97.

Ilegems, M., Douet, V., Meylan-Bettex, M., Uyttewaal, M., Brand, L., Bowman, J.L. & Stieger, P.A. 2010. Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development* *137*: 975-984.

Izhaki, A. & Bowman, J.L. 2007. KANADI and Class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* *19*: 495-508.

Katoh, K. and Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*:772–780 - doi:10.1093/molbev/mst010

Ko, J. H., Prassinis, C., & Han, K. H. (2006). Developmental and seasonal expression of PtaHB1, a *Populus* gene encoding a class III HD-Zip protein, is closely associated with secondary growth and inversely correlated with the level of microRNA (miR166). *New Phytologist*, *169*(3), 469-478.

Lebot, V. (2019). *Tropical root and tuber crops*. Cassava, sweet potato, yams and aroids. Crop production science in horticulture series (17). CAB books Cabi. Wallingford, UK.

Medina, R. D., Faloci, M. M., Gonzalez, A. M., & Mroginski, L. A. (2007). In vitro cultured primary roots derived from stem segments of cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. *Annals of botany*, *99*(3), 409-423.

Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J.Y. & Helariutta, Y. 2013. Stem cell function during plant vascular development. *The European Molecular Biology Organization Journal* *32*: 178-193.

- Morris, H., Plavcová, L., Cvecko, P., Fichtler, E., Gillingham, M. A., Martínez-Cabrera, H. I., ... & Jansen, S. (2016). A global analysis of parenchyma tissue fractions in secondary xylem of seed plants. *New Phytologist*, 209(4), 1553-1565.
- Nieminen, K., Blomster, T., Helariutta, Y., & Mähönen, A. P. (2015). Vascular cambium development. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 13.
- Ragni, L., & Greb, T. (2018, July). Secondary growth as a determinant of plant shape and form. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 79, pp. 58-67). Academic Press.
- Ramcharan, A., Baranowski, K., McCloskey, P., Ahmed, B., Legg, J., & Hughes, D. P. (2017). Deep learning for image-based cassava disease detection. *Frontiers in plant science*, 8, 1852.
- Ravi, V., Naskar, S. K., Makesh Kumar, T., Babu, B., & Krishnan, B. P. (2009). Molecular physiology of storage root formation and development in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *J Root Crops*, 35(1), 1-27.
- Ruonala, R., Ko, D., & Helariutta, Y. (2017). Genetic networks in plant vascular development. *Annual review of genetics*, 51, 335-359.
- Siebers, T., Catarino, B., & Agusti, J. (2017). Identification and expression analyses of new potential regulators of xylem development and cambium activity in cassava (*Manihot esculenta*). *Planta*, 245(3), 539-548.
- Villordon, A. Q., Ginzberg, I., & Firon, N. (2014). Root architecture and root and tuber crop productivity. *Trends in plant science*, 19(7), 419-425.
- Wilson, M. C., Mutka, A. M., Hummel, A. W., Berry, J., Chauhan, R. D., Vijayaraghavan, A., ... & Bart, R. S. (2017). Gene expression atlas for the food security crop cassava. *New Phytologist*, 213(4), 1632-1641.
- Zhang, J., Elo, A., & Helariutta, Y. (2011). Arabidopsis as a model for wood formation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 293-299.

## **ANEXOS.**

### **FLOROGLUCINOL EN CORTES DE PARAFINA**

Esta tinción se llevó a cabo para poder visualizar en el microscopio el xilema, ya que es un tejido lignificado y, con esta tinción, la lignina se tiñe de color rojo violáceo.

En primer lugar, se preparan las dos soluciones que hacen falta: floroglucinol al 2% (v/v) y HCl al 50% (v/v). Para la primera de ellas, se pesaron 200 mgr de floroglucinol en polvo, se disolvieron en 10 mL de EtOH 96°C y se protegieron de la luz. Para la segunda solución, se disolvieron 15 mL de HCl al 37% en 15 mL de ddH<sub>2</sub>O.

El protocolo que se siguió para llevar a cabo la tinción fue el siguiente:

1. Eliminar la parafina e hidratar de las secciones:
  - 1.1. Un lavado con xilol/histoclear durante 10'.
  - 1.2. Dos lavados de 5' con EtOH 100%, dos lavados de 5' con EtOH 70% y un último lavado de 5' con EtOH 100%.
2. Teñir con la solución de floroglucinol durante 2 minutos aproximadamente.
3. Sumergir los cortes en HCl 50% (v/v) durante unos segundos.
4. Montar la muestra y secar los extremos del cubre para prevenir el daño que podría causar el ácido la platina del microscopio.
5. Examinar la muestra inmediatamente al microscopio ya que la tinción dura aproximadamente 20 min.

### **AZUL DE TOLUIDINA EN CORTES DE PARAFINA.**

Esta tinción también se utiliza para observar la presencia de lignina, ya que produce una reacción metacromática en la que, según el tipo de tejido, se observan distintos colores. En este caso, las células lignificadas se tiñen de color azul-verdoso brillante, mientras que el resto de células de color morado.

El primer paso es preparar la solución de azul de toluidina al 0,02%. Para ello, se pesaron 20 mgr de azul de toluidina en polvo y se disolvieron en 1L de ddH<sub>2</sub>O.

El protocolo que se siguió para llevar a cabo la reacción fue el siguiente:

1. Desparafinar e hidratar los cortes:
  - 1.1. Un lavado con xilol/histoclear durante 10'.

- 1.2. Un lavado con EtOH 100% durante 10'.
- 1.3. Un lavado con EtOH 90% durante 5'.
- 1.4. Un lavado con EtOH 70% durante 5'.
- 1.5. Un lavado con EtOH 50% durante 5'.
- 1.6. Un lavado con EtOH 30% durante 5'.
- 1.7. Un lavado con H<sub>2</sub>O durante 10'.
2. Teñir con Azul de Toluidina al 0,02% durante entre 2 y 10'.
3. Lavar con H<sub>2</sub>O para eliminar los restos de la solución y un último lavado con EtOH 70%.
4. Dejar secar.
5. Montar el cubre.

Tabla S1. Valores de expresión relativa de cada uno de los HD-ZIP de clase III en los distintos órganos de la yuca y en los distintos tejidos de la raíz de acumulación. Los valores de referencia de cada uno de los genes corresponden con el valor de expresión de ese gen en la raíz fibrosa (FR).

	<i>MesHDZIPIII-1</i>	<i>MesHDZIPIII-2</i>	<i>MesHDZIPIII-3</i>	<i>MesHDZIPIII-4</i>	<i>MesHDZIPIII-5</i>	<i>MesHDZIPIII-6</i>	<i>MesHDZIPIII-7</i>	<i>MesHDZIPIII-8</i>
<b>FR</b>	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000	1,000 ± 0,000
<b>Brote</b>	0,371 ± 0,188	0,496 ± 0,124	0,813 ± 0,525	0,843 ± 0,062	0,751 ± 0,173	0,361 ± 0,036	1,069 ± 0,452	0,699 ± 0,397
<b>Tallo</b>	0,842 ± 0,160	0,751 ± 0,173	0,603 ± 0,043	0,779 ± 0,335	3,019 ± 1,451	0,687 ± 0,345	0,779 ± 0,294	1,234 ± 0,135
<b>Hoja</b>	0,035 ± 0,007	0,120 ± 0,028	0,058 ± 0,025	0,282 ± 0,098	0,296 ± 0,079	0,157 ± 0,040	0,154 ± 0,051	0,126 ± 0,046
<b>SR</b>	2,933 ± 1,182	2,492 ± 0,270	2,464 ± 0,699	2,846 ± 1,289	3,167 ± 0,911	1,079 ± 0,031	2,036 ± 1,158	3,737 ± 0,549
<b>Cambium</b>	4,369 ± 0,371	1,337 ± 0,352	1,334 ± 0,202	2,332 ± 0,869	2,108 ± 0,546	1,091 ± 0,120	1,351 ± 0,617	4,208 ± 1,419
<b>Floema</b>	0,001 ± 0,001	0,313 ± 0,076	0,073 ± 0,049	0,180 ± 0,043	0,457 ± 0,155	0,057 ± 0,027	0,975 ± 0,398	0,562 ± 0,268
<b>Xilema</b>	2,356 ± 0,718	0,796 ± 0,265	0,716 ± 0,356	2,429 ± 1,498	1,198 ± 0,396	1,788 ± 0,273	0,708 ± 0,176	2,604 ± 0,922