



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

El rol de NST2 en la adaptación y aclimatación a la sequía.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Santos Molina, Manuela

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: Brunot Garau, Paula

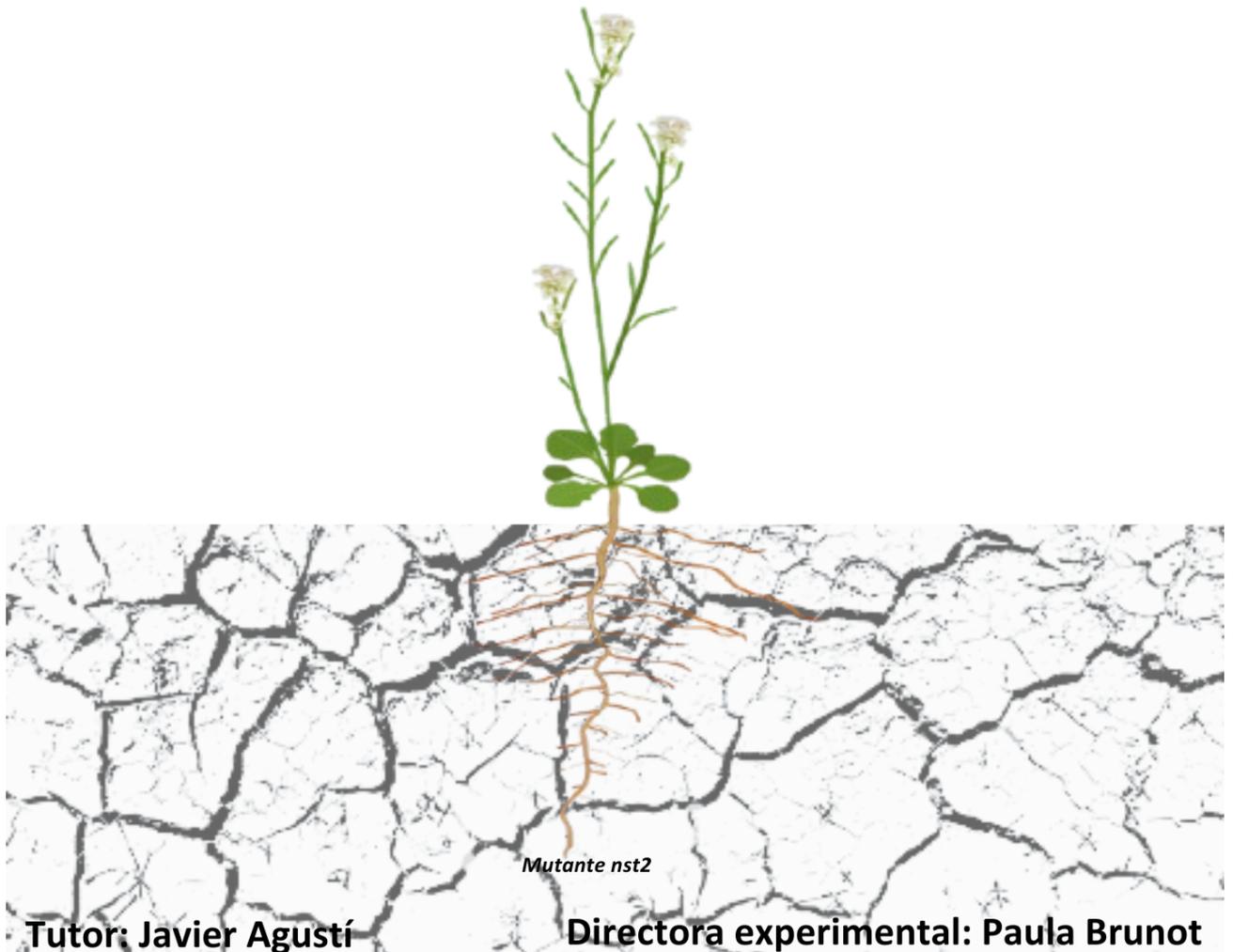
CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

El rol de NST2 en la adaptación y aclimatación a la sequía.

Máster universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Curso 2024-2025

Manuela Santos Molina



Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor, Javier Agustí, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por todo el apoyo dado, no solo a nivel académico, sino también a nivel personal. Su guía y confianza fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A mi directora experimental, Paula Brunot, quien ha sido una mentora excepcional. Las palabras se quedan cortas para describir todo lo que he aprendido de ella. Es, sin duda, una de las mejores personas y profesionales con las que he tenido el privilegio de trabajar. Pau, gracias por tu infinita paciencia, por tu interés genuino no solo en mi presente y futuro profesional, sino también en mi bienestar como persona, gracias por demostrarme lo que es ser un ejemplo de excelencia y humanidad. Espero que en el futuro nuestros caminos se vuelvan a cruzar.

También quiero agradecer a Santi por su disposición constante para ayudarme con todo lo que necesitaba, siempre diciéndome que sí y sacando un tiempo, aunque estuviese ocupado. ¡Gracias Santi!

Este grupo de investigación hizo que mi experiencia durante este año y medio de maestría fuera aún más enriquecedora y emocionante. Por ello, siempre estaré profundamente agradecida.

Resumen

Este estudio analiza la función del gen *NST2* en la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la sequía, enfocándose en su función en tejidos específicos a través de la complementación de mutantes *nst2* dirigida por promotores específicos de tipo celular. Para esto, se generaron líneas transgénicas de complementación y se evaluaron los fenotipos asociados a raíz y vasculatura secundaria bajo condiciones de sequía.

Los resultados demostraron que la capacidad de complementar el fenotipo mutante de *nst2* depende del promotor empleado. La expresión de *NST2* bajo los promotores de *ATHB8* y *CEL5* (específicos de tejido vascular en desarrollo y de organización de pared celular, respectivamente), lograron restaurar completamente los fenotipos de longitud de raíz principal y densidad de raíces laterales que mostraba el mutante. En cambio, la expresión del gen dirigida por el promotor de *VND7* mostró una complementación parcial, limitada principalmente a la densidad de raíces laterales, probablemente debido a la asociación de *VND7* con etapas avanzadas de formación de vasos xilemáticos. Por su parte, la expresión de *NST2* dirigida por el promotor de *NST3* no permitió la recuperación de ningún fenotipo en raíces, aunque evidenció una complementación parcial en la vasculatura secundaria.

Este estudio subraya la importancia de la localización y el momento de expresión del gen *NST2* para su función en diferentes tejidos. Estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión del papel de *NST2* en la respuesta de las plantas a la sequía, proporcionando bases para estrategias futuras de investigación y mejora genética en plantas.

Palabras clave: *NST2*, sequía, xilema secundario, raíces, *Arabidopsis thaliana*.

Abstract

This study analyzes the function of the *NST2* gene in the response of *Arabidopsis thaliana* to drought, focusing on its role in specific tissues through mutant complementation driven by specific promoters. For this purpose, transgenic complementation lines were generated, and phenotypes associated with root and secondary vasculature were evaluated under drought conditions.

The results showed that the ability to complement the phenotype depends on the promoter used. The promoters *ATHB8* and *CEL5* (specific to developing vascular tissue and cell wall organization, respectively), successfully restored the phenotypes of primary root length and lateral root density. In contrast, the *VND7* promoter exhibited partial complementation, mainly limited to lateral root density, likely due to its association with advanced stages of xylem vessel formation. Meanwhile, the *NST3* promoter did not recover any root phenotypes but showed partial complementation in secondary vasculature.

This study highlights the importance of the spatial and temporal expression of the *NST2* gene for its function in different tissues. These findings contribute to a better understanding of the role of *NST2* in plant responses to drought, providing a foundation for future research and genetic improvement strategies in plants.

Keywords: *NST2*, drought, secondary xylem, roots, *Arabidopsis thaliana*.

Contenido

Agradecimientos	1
Resumen	2
Abstract	3
Índice de figuras	6
Abreviaturas	8
1. Introducción	9
Mecanismos de adaptación a estrés abiótico en plantas.....	10
Estrés por sequía.	10
Pared celular secundaria	11
2. Objetivos	14
3. Materiales y Métodos	14
Material vegetal y condiciones de crecimiento	14
Esterilización de las semillas	15
Construcción de plásmidos	15
A. Líneas de complementación específicas de tipo celular	15
B. CRISPR-CAS9.....	17
Transformación de <i>A. thaliana</i> por inmersión floral.....	18
Genotipado de las muestras (CRISPR-CAS9)	18
Microscopía.....	18
A. Confocal	18
B. Óptico convencional (de luz)	19
Experimento sequía <i>in vitro</i>	19
Experimento sequía invernadero.....	19
Procesamiento de imágenes	20
4. Resultados	20
Línea de complementación en tejidos vasculares que desarrollan pared celular secundaria.	20
Línea de complementación de la mutación <i>nst2</i> específicamente en vasos xilemáticos ...	26
Línea de complementación de la mutación <i>nst2 específicamente</i> en xilema en desarrollo	28
Línea de complementación en tejidos vasculares asociados a la organización de pared celular	31
Línea de complementación de la mutación <i>nst2</i> específicamente en primordios de raíces laterales	34
Líneas generadas con CRISPR-CAS9.....	34
5. Discusión	35
Líneas de complementación generadas	35

6. Conclusiones	36
7. Bibliografía	37

Índice de figuras

Figura 1. La relación entre la señalización de estrés y el crecimiento de las plantas. El estrés abiótico inhibe pasivamente el crecimiento de las plantas (ruta morada) al causar daño celular y/o limitar recursos (por ejemplo, dióxido de carbono, nutrientes y energía). A través de la detección y señalización del estrés, el estrés abiótico inhibe activamente el crecimiento (ruta roja) y también activa respuestas al estrés para prevenir y reparar los daños celulares causados por este. Cuando los recursos son abundantes y no hay estrés, la señalización de crecimiento se activa, lo que reprime la señalización de estrés (ruta verde) además de promover el crecimiento. Las flechas indican regulación positiva y las barras indican regulación negativa. (Adaptado de Zhang et al.,2020).	9
Figura 2. Haplotipos del gen NST2. A) Haplotipo no relicto o de referencia, encontrado en Col-0. B) Haplotipo relicto encontrado en las accesiones ancestrales o relictas. Adaptado de Brunot, P., no publicado.	12
Figura 3. Fenotipo de crecimiento secundario en secciones transversales de hipocotilo de plantas de 17cms de plantas WT y mutante nst2. (Brunot P., no publicado)	13
Figura 4. Patrón de expresión del gen NST2 bajo el control de su promotor específico. A) Expresión del gen en root cap y vasculatura de raíz, B) Expresión del gen en hipocotilo. (Brunot, P. no publicado)	13
Figura 5. Densidad de raíces en plantas WT y plantas mutantes nst2 luego de experimento de sequía. (Brunot, P. no publicado)	14
Figura 6. Ensamblaje multipartito por reacción de GoldenBraid. La secuencia del promotor x fue introducida al vector destino pUPD2 luego de una digestión con Bsmbl. Su producto fue digerido por Bsal junto al siguiente vector destino pDGB3alpha2 y tres construcciones más que contenían el gen de referencia de NST2, una construcción con GFP y una última con el terminador. La construcción resultante fue a su vez, digerida por Bmsbl junto a un último vector destino pDGB3Omega2 y una construcción que contenía el gen de resistencia a higromicina. El producto obtenido es el producto final de las construcciones de las líneas reporteras. (Este ensamblaje se repite para las 6 construcciones que se generaron). Realizado con Biorender.....	17
Figura 7. Ensamblaje CRISPR-Cas9. Las guías diseñadas fueron introducidas en el vector destino pAGM55261 (Grützner et al., 2020) por medio de una digestión con Bsal. Realizado con Biorender.	18
Figura 8. Patrón de expresión del gen NST2 bajo el control del promotor NST3. A) patrón de expresión negativo en raíz, B) patrón de expresión negativo en el RAM, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo.....	21
Figura 9. Plantas de Arabidopsis thaliana WT, mutante nst2 y líneas reporteras a tres semanas de vida.	21
Figura 10. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (WT, nst2, pNST3.1:NST2:GFP:tNos y pNST3.2:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos in vitro).	22
Figura 11. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, nst2, pNST3.1:NST2:GFP:tNos y pNST3.2:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos in vitro).	23
Figura 12. Fenotipado de la línea de complementación pNST3:NST2:GFP:tNos. Fenotipo de crecimiento secundario en secciones transversales de hipocotilo de plantas de 17cms de los cuatro genotipos.	23
Figura 13. Área total de las muestras de hipocotilo luego de un experimento de sequía en genotipos WT, mutante nst2 y líneas de complementación generadas bajo el control del promotor NST3.	24
Figura 14. Área del xilema de las muestras de hipocotilo luego de un experimento de sequía en genotipos WT, mutante nst2 y líneas de complementación generadas bajo el control del promotor NST3.	25
Figura 15. Porcentaje del área xilemática frente al área total de las muestras de hipocotilo luego de un experimento de sequía en genotipos WT, mutante nst2 y líneas de complementación generadas bajo el control del promotor NST3.	25
Figura 16. Patrón de expresión del gen NST2 bajo el control del promotor VND7. A) Patrón de expresión transversal en raíz, B) patrón de expresión en raíz, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo, E) patrón de expresión negativo en RAM, F) patrón de expresión en raíz lateral.....	27
Figura 17. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (WT, nst2, pVND7.2:NST2:GFP:tNos y pVND7.4:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos “in vitro”).	27

Figura 18. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, nst2, pVND7.2:NST2:GFP:tNos y pVND7.4:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos “in vitro”).	28
Figura 19. Patrón de expresión del gen NST2 bajo el control del promotor ATHB8. A) Patrón de expresión transversal en raíz, B) patrón de expresión en raíz, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo, E) patrón de expresión negativo en RAM, F) patrón de expresión en raíz lateral.	29
Figura 20. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (WT, nst2, pATHB8.2:NST2:GFP:tNos y pATHB8.3:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos in vitro).	30
Figura 21. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, nst2, pATHB8.2:NST2:GFP:tNos y pATHB8.3:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos in vitro).	30
Figura 22. Patrón de expresión del gen NST2 bajo el control del promotor de CEL5. A) Patrón de expresión transversal en raíz, B) patrón de expresión en raíz, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo, E) patrón de expresión en el RAM, F) patrón de expresión en raíz lateral. 32	
Figura 23. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (WT, nst2, pCel5.2:NST2:GFP:tNos y pCel5.5:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos in vitro).	33
Figura 25. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, nst2, pCEL5.2:NST2:GFP:tNos y pCel5.5:NST2:GFP:tNos) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos in vitro).	33
Figura 25. Patrón de expresión del gen NST2 bajo el control del promotor de HB53.	34
Figura 27. Semilla de ecotipo Col-0 positiva luego de la transformación por el método de CRISPR-CAS9.	35

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
Col-0	Ecotipo Columbia <i>Arabidopsis Thaliana</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
MS	Medio Murashige y Skoog
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
PEG	Polietilenglicol
T1	Primera generación de plantas transformadas
T2	Segunda generación de plantas transformadas
T3	Tercera generación de plantas transformadas

1. Introducción

Los datos científicos más recientes confirman que el cambio climático está alterando rápidamente las condiciones ambientales de la Tierra. Debido al aumento de gases atmosféricos como el CO₂, las temperaturas globales han aumentado 1°C en lo que llevamos de siglo y se espera que siga aumentando en las próximas décadas. Estas variaciones afectan directamente a las plantas que se encuentran continuamente expuestas a factores ambientales bióticos como patógenos, parásitos, herbívoros, entre otros organismos, o factores ambientales abióticos como temperatura, agua, luz y nutrientes (Koyro et al., 2012).

El estrés abiótico afecta negativamente al crecimiento de la planta puesto que las plantas no se encuentran bajo condiciones óptimas de crecimiento que permitan una división y expansión celular acorde con el desarrollo normal. El estrés por frío, por ejemplo, reduce el crecimiento en las plantas ya que debido a las bajas temperaturas la actividad de las enzimas y otras proteínas baja. Otro ejemplo es el estrés por sequía: las plantas, en este caso, también reducen su capacidad de crecimiento puesto que, al haber escasez de agua, estas cierran sus estomas para no perder agua, lo cual afecta directamente al proceso de fotosíntesis puesto que no pueden captar (Zhang et al., 2020). Sin embargo, esta reducción de crecimiento en las plantas no es únicamente una consecuencia del efecto ambiental, sino que las plantas también ralentizan activamente su crecimiento como una forma de respuesta al estrés para poder adaptarse a este. (Figura 1) (Zhang et al., 2020).

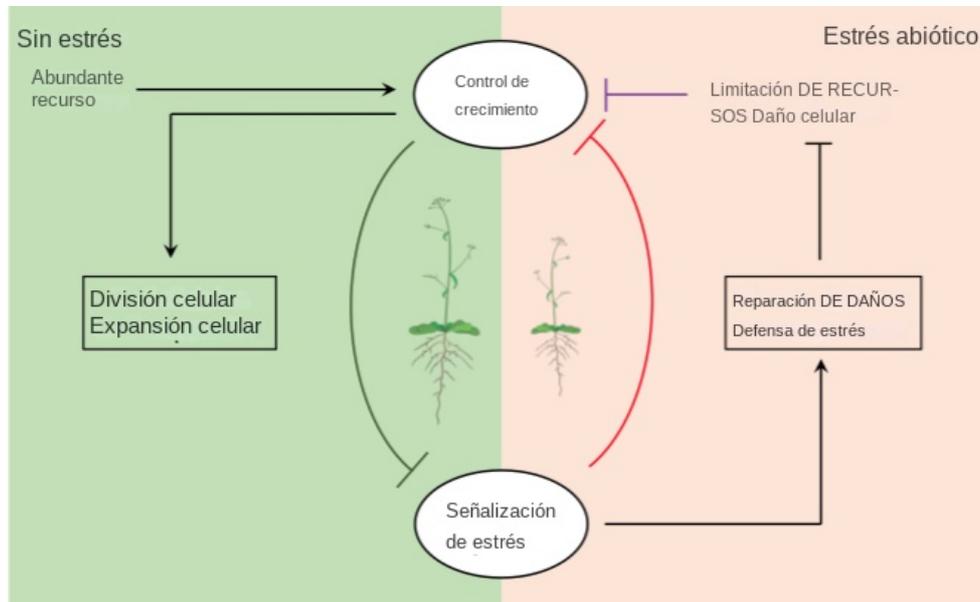


Figura 1. La relación entre la señalización de estrés y el crecimiento de las plantas. El estrés abiótico inhibe pasivamente el crecimiento de las plantas (ruta morada) al causar daño celular y/o limitar recursos (por ejemplo, dióxido de carbono, nutrientes y energía). A través de la detección y señalización del estrés, el estrés abiótico inhibe activamente el crecimiento (ruta roja) y también activa respuestas al estrés para prevenir y reparar los daños celulares causados por este. Cuando los recursos son abundantes y no hay estrés, la señalización de crecimiento se activa, lo que reprime la señalización de estrés (ruta verde) además de promover el crecimiento. Las flechas indican regulación positiva y las barras indican regulación negativa. (Adaptado de Zhang et al., 2020).

Mecanismos de adaptación a estrés abiótico en plantas.

La capacidad para detectar el estrés a tiempo que tienen las plantas es un aspecto de gran importancia, ya que les permite reaccionar de forma rápida y eficaz. Una vez las plantas identifican el estrés, los mecanismos básicos de defensa activan vías de señalización complejas que pueden ser diferentes dependiendo del estrés al cual está siendo sometida la planta (Ben Rejeb et al., 2014).

Tras enfrentar tanto estreses abióticos como estreses bióticos, en la planta se activan canales iónicos y cascadas de quinasas específicas, se incrementan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y se acumulan fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA) y el etileno (ET). Además, se reprograma la actividad genética, lo cual genera respuestas de defensa adecuadas y mejora la tolerancia de las plantas, reduciendo así el daño biológico causado por el estrés (Ben Rejeb et al., 2014).

Estrés por sequía.

La sequía es un efecto directo del cambio climático considerado como uno de los factores ambientales más perjudiciales para el crecimiento y la producción de las plantas. Este estrés afecta a la planta de diversas formas, generando una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que les permiten adaptarse y optimizar su crecimiento en dichas condiciones (Liu et al., 2021).

El ABA es una fitohormona clave para las plantas en respuesta al estrés por sequía. Esta fitohormona regula el cierre de los estomas y modula la transpiración de la planta, como la absorción de agua por las raíces (Lozano-Juste et al., 2023). En condiciones de sequía, el ABA se acumula principalmente en los vasos de las hojas puesto que la mayoría de las enzimas involucradas en su síntesis se encuentran en los tejidos vasculares. Además, los transportadores de ABA en las membranas celulares están presentes mayormente en estos tejidos (Kuromori et al., 2018).

A diferencia de los animales, las plantas no tienen un sistema nervioso central, pero su sistema vascular conecta las raíces y los brotes, integrando la información que tiene la planta sobre el estrés de las partes subterráneas y de las partes aéreas (Takahashi et al., 2020).

Cabe mencionar que el desarrollo vascular en las plantas es modulado por una serie de factores ambientales entre los cuales se encuentra la disponibilidad de agua. El agua es absorbida por las raíces y transportada hacia la parte aérea de la planta a través del xilema. La disponibilidad de agua es un factor clave en la plasticidad de la xilogénesis, lo cual es fundamental para que la planta se adapte a este estrés. Los mecanismos detrás de esta plasticidad requieren de la acción

de hormonas como mencionamos en el párrafo anterior. Volviendo a mencionar al ABA, esta fitohormona también regula varios aspectos de la formación y organización del xilema primario y secundario. Cuando se aplica ABA en las raíces de plantas *Arabidopsis thaliana*, se genera un aumento en las células de metaxilema y protoxilema (Agustí & Blázquez, 2020).

Pared celular secundaria

Es uno de los componentes más importantes del xilema, que como mencionamos anteriormente, es un tejido clave para el transporte de agua en la planta y además, es clave en la plasticidad de la planta frente al estrés por sequía (Agustí & Blázquez, 2020).

Las células vegetales están rodeadas por paredes celulares. Las células en elongación tienen paredes celulares primarias, compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectina. Algunos tipos específicos de células desarrollan paredes celulares secundarias más gruesas después de la elongación, lo que les permite realizar funciones especializadas como dar soporte mecánico, transportar agua y nutrientes a larga distancia, resistir el estrés biótico, entre otros. Las paredes secundarias están formadas principalmente por celulosa, lignina y hemicelulosa. La lignocelulosa de estas paredes es la biomasa más abundante en el planeta, utilizada para forraje y producción de biocombustibles (Liu et al., 2021).

La formación de estas paredes celulares secundarias es controlada por una red jerárquica de factores de transcripción (Taylor-Teeples et al., 2015). Un grupo de factores de transcripción NAC está en la parte superior de esta red y regula otros factores como los MYB, que a su vez controlan los genes responsables de la biosíntesis de las paredes secundarias. Investigaciones recientes han identificado varios genes que influyen en la formación de estas paredes al regular otros genes en esta red. Sin embargo, los factores que regulan los primeros pasos de esta red siguen siendo en su mayoría desconocidos (Liu et al., 2021).

Teniendo en cuenta esta información, en mi grupo de investigación hicieron un análisis de la variación genética natural en reguladores de pared celular secundaria que ya han sido identificados, con el objetivo de identificar variantes con un valor alto de potencial adaptativo. De los 245 genes que aparecen en la red (Taylor-Teeples et al., 2015), se analiza en las accesiones ibéricas la variación genética. Se centran en las accesiones ibéricas ya que la colección Ibérica cuenta con una gran variación genética y también la Península Ibérica se caracteriza por tener una variación climática amplia. Después de una serie de filtrados, identifican cuatro genes que pueden ser de gran interés, de los cuales uno ya está descrito en literatura, otros dos están asociados con estrés por calor, y el último está asociado con estrés por disponibilidad de agua.

Este gen asociado con la disponibilidad de agua es el gen *NST2*, fue el gen elegido para continuar con el estudio puesto que la distribución de los alelos candidatos

estudiados ubicados en este gen difería considerablemente con el resto en la población Ibérica.

Para entender más a profundidad la variación del gen *NST2* dentro de la población Ibérica, en el grupo de investigación descubrieron que este gen tiene dos haplotipos. Un haplotipo relicto que se encuentra en la mayoría de las accesiones relictas (Las accesiones relictas, que colonizaron la península ibérica tras la última glaciación, poseen un genoma muy adaptado a sus condiciones. A lo largo del tiempo, estas accesiones se han cruzado con otras que llegaron después, lo que permitió que sus genomas se integraran y ayudaran a las nuevas accesiones a adaptarse mejor al entorno de la península) (Figura 2B) y un haplotipo no relicto o de referencia que es el mismo de Col-0 (Figura 2A).

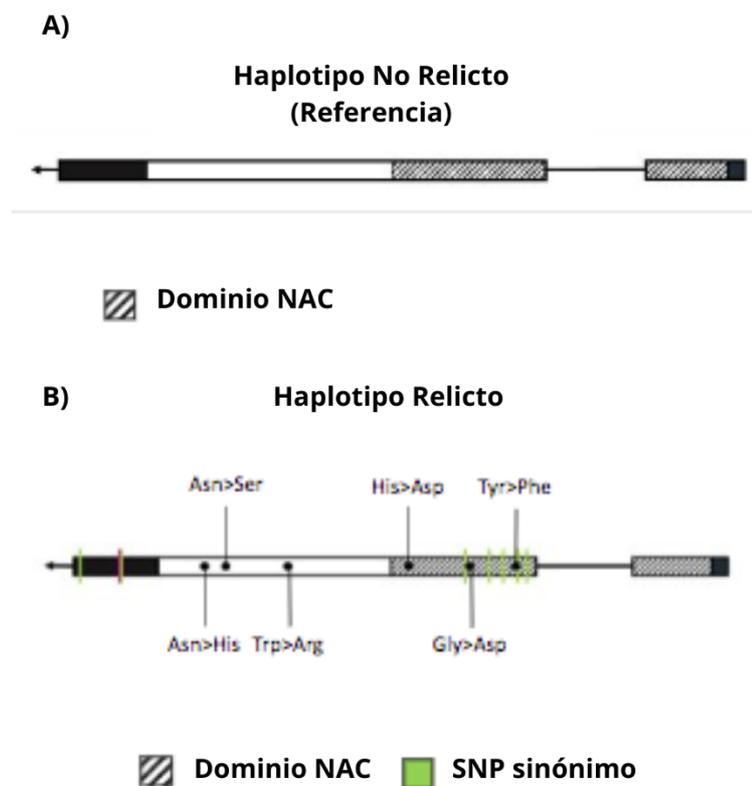


Figura 2. Haplotipos del gen *NST2*. A) Haplotipo no relicto o de referencia, encontrado en Col-0. B) Haplotipo relicto encontrado en las accesiones ancestrales o relictas. Adaptado de Brunot, P., no publicado.

Luego, analizaron si esos SNPs estaban asociados con factores ambientales y encontraron que estaban asociados a precipitación. Esto los llevó a preguntarse si este gen está involucrado en la tolerancia a diferentes condiciones de disponibilidad de agua. Se hicieron una serie de experimentos en sequía con el WT (Col-0 para este trabajo) y el mutante simple *nst2* y se evaluó si la morfología o abundancia del xilema cambiaba en alguno de los dos genotipos (Figura 3).

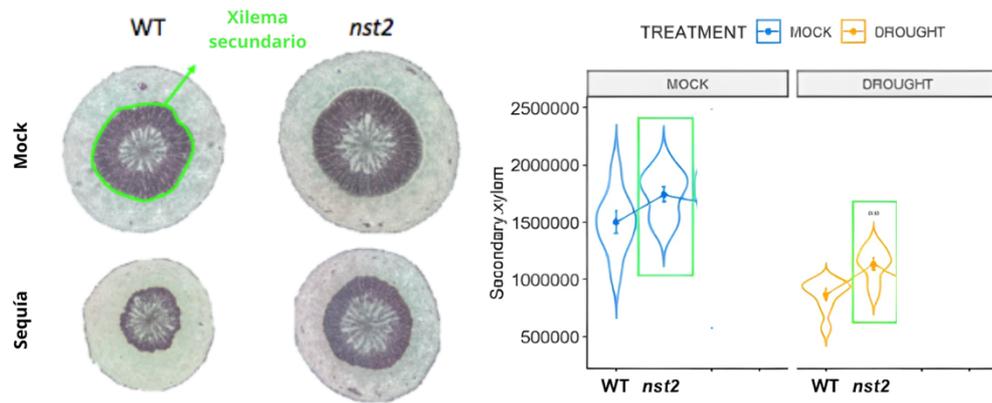


Figura 3. Fenotipo de crecimiento secundario en secciones transversales de hipocotilo de plantas de 17cms de plantas WT y mutante *nst2*. (Brunot P., no publicado)

Esta figura 3 demostró que el xilema secundario de las plantas WT expuestas a sequía mostraban un decrecimiento significativo con respecto al xilema secundario de las plantas mutante *nst2* expuestas a sequía. A su vez, se ve como el xilema secundario de las plantas mutantes en condición de sequía es significativamente mayor con respecto al xilema secundario de las plantas WT.

Teniendo en cuenta estos resultados, quisieron explorar si el gen *NST2* estaría también involucrado en la respuesta a sequía en otros órganos. Para esto, quisieron ver donde se expresaba el gen en la planta y encontraron que *NST2* se expresaba en la cofia radicular, en vasculatura de raíz y en vasculatura de hipocotilo (Figura 4).

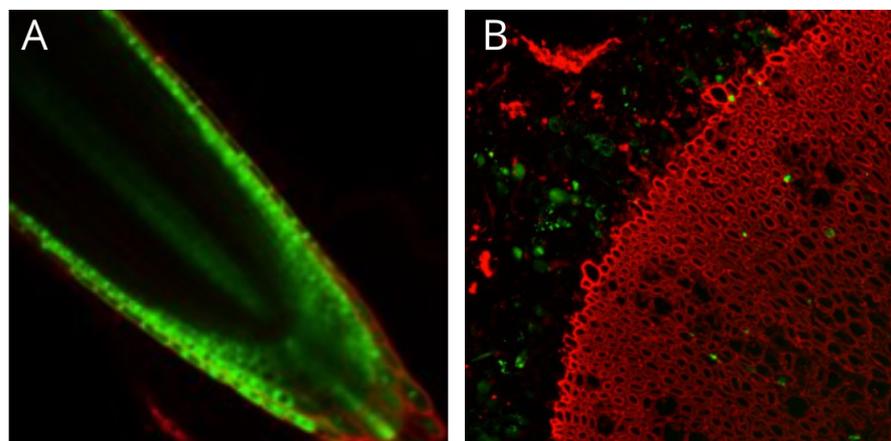


Figura 4. Patrón de expresión del gen *NST2* bajo el control de su promotor específico. A) Expresión del gen en root cap y vasculatura de raíz, B) Expresión del gen en hipocotilo. (Brunot, P. no publicado)

Sabiendo que el gen se expresaba también en raíz, decidieron realizar experimentos de sequía en raíz. Se evaluaron tres variables, formación de raíces laterales, longitud de raíz principal y densidad de raíces que es una división de las raíces laterales entre la longitud de la raíz principal. La figura 5 muestra que, bajo condiciones de estrés por sequía, la densidad de las raíces en el mutante es significativamente más alta que la densidad de raíces en plantas WT.

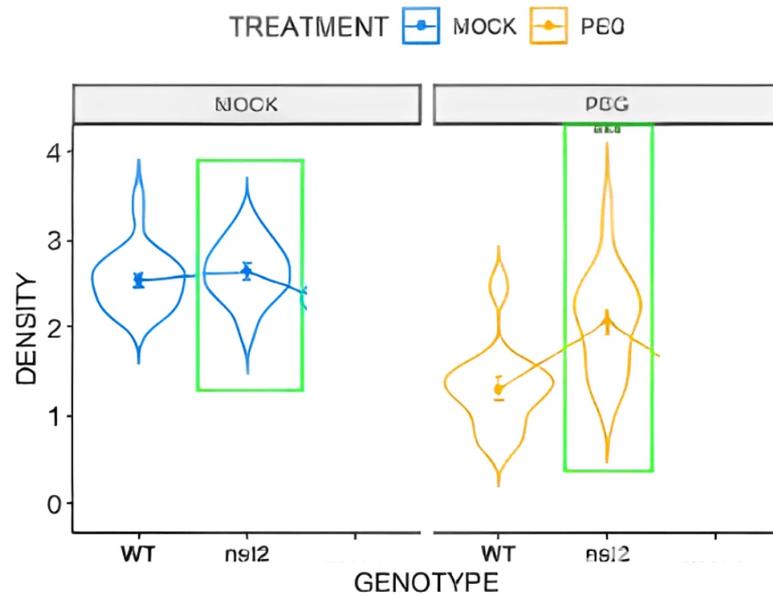


Figura 5. Densidad de raíces en plantas WT y plantas mutantes *nst2* luego de experimento de sequía. (Brunot, P. no publicado)

Es luego de todo esto que surgen dos preguntas claves que abren paso a los objetivos de este trabajo. 1. ¿El gen *NST2* está involucrado en la plasticidad El frente a diferentes condiciones de disponibilidad de agua? Y 2. ¿El gen *NST2* ha desempeñado un papel en la adaptación genética a diferentes condiciones de disponibilidad de agua a lo largo de la evolución?

2. Objetivos

- Identificar la función del gen *NST2* y los tejidos donde se expresa, mediante complementación específica de tejido.
- Evaluar el papel del gen *NST2* en la respuesta adaptativa al estrés por sequía en diferentes accesiones de *Arabidopsis thaliana*.

3. Materiales y Métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

La línea mutante utilizada en este trabajo y las líneas reporteras generadas pertenecen al ecotipo *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col0). El mutante pertenece a la colección SALK_022022 y se obtuvo del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). A su vez, se generaron mutantes del gen *NST2* en diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. Dichos ecotipos utilizados se pueden observar en la tabla suplementaria 1 en anexos, en el apartado de material vegetal.

Las plantas sembradas en tierra crecieron en condiciones controladas en invernadero a 22°C con un régimen de 16h de luz y 8h de oscuridad. Como sustrato se utilizó una mezcla de 3:1 (v/v) de compost de semillas y vermiculita, respectivamente.

Por otro lado, para los experimentos in vitro relacionados con el crecimiento de la raíz, las plantas crecieron en medio de cultivo con un contenido de 4,3 g/L de sales Murashige y Skoog (MS), 5 g/L de Phyto agar y 10 g/L de sacarosa en placas cuadradas de 12cm x 12cm a un pH de 5,7. Para la selección del material transgénico generado a este medio de cultivo se le agrega también higromicina. Las placas se mantuvieron en posición vertical durante todo el periodo de crecimiento.

Esterilización de las semillas

Se implementaron dos metodologías de esterilización de semillas. Uno de los métodos utilizados fue una modificación del protocolo de esterilización de semillas de Parsa *et al.*, (2018) en donde las semillas fueron tratadas con 1ml de etanol al 70% + Tryton X 0,05% durante 10 minutos en agitación. Acto seguido, se descarta el líquido y se añade 1ml de etanol absoluto que se deja por 2 a 3 minutos en agitación. Para finalizar, se descarta el etanol con las semillas sobre papel estéril en cabina de flujo laminar para continuar con la siembra de estas.

El otro método utilizado fue una modificación del protocolo Lindsey *et al.*, (2017) de esterilización de semillas con Cloro gaseoso. Para este protocolo, las semillas que se encuentran en eppendorfs de 1,5ml son puestas en un contenedor de vidrio dentro de una campana ya que aquí tomará lugar todo el proceso de esterilización. En el interior de la campana también se encontrará un vaso de precipitados de vidrio al cual se le agrega 97ml de lejía + 3ml de ácido clorhídrico. Taparemos el contenedor de vidrio y dejaremos actuar al gas durante 6h aproximadamente.

Construcción de plásmidos

A. Líneas de complementación específicas de tipo celular

1. Obtención de secuencias.

Las secuencias de los promotores fueron obtenidas en la base de datos Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>).

2. Ensamblaje mediante GoldenBraid.

GoldenBraid es un sistema de clonación que utiliza endonucleasas tipo IIS (en este caso Bsmbl y Bsal) para ensamblar diferentes fragmentos de ADN (promotores, genes, terminadores, ...) en un orden específico. Tras la digestión, se generan extremos cohesivos únicos que permiten unir las piezas correctamente utilizando la T4 ligasa, facilitando así la creación de construcciones genéticas complejas de manera precisa y eficiente (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011). Por su precisión, eficiencia y simplicidad en la construcción de vectores fue escogido Goldenbraid como sistema de clonaje para este proyecto.

Las construcciones de los vectores inicialmente se hicieron "*in silico*" utilizando la herramienta bioinformática Benchling (<https://www.benchling.com/>). Los vectores de destino y las piezas preformadas utilizadas en el clonaje GoldenBraid se encuentran en anexos sección GoldenBraid, enlistados en la tabla suplementaria 3.

3. Transformación *E. coli*.

Se utilizaron bacterias electrocompetentes para la introgresión de los diferentes plásmidos generados. Las cepas de *Escherichia Coli* (*E. coli*) utilizadas fueron TOP 10. Se añadieron 2uL de plásmido a 50uL de células electrocompetentes TOP10 en una cubeta de electroporación que luego se llevó al electroporador para darles un pulso de 1500V. Acto seguido, se le agregó 300uL de medio LB a las bacterias electroporadas y se dejaron a 37°C durante una hora en agitación. Las placas con medio de crecimiento contienen el medio de selección correspondiente para cada tipo de plásmido utilizado.

4. Transformación *A. tumefaciens*.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) utilizadas fueron C58. Se añadieron 2uL de plásmido a 50uL de células electrocompetentes C58 en una cubeta de electroporación que luego se llevó al electroporador para darles un pulso de 1440V. A continuación, se le agregó 1mL de medio LB a las bacterias electroporadas y se dejaron a 28°C durante 2h en agitación. Las placas con medio de crecimiento contienen el medio de selección correspondiente para cada tipo de plásmido utilizado.

5. Extracción plásmidos o Miniprep.

Para la extracción de los plásmidos se llevó a cabo paso a paso el protocolo que se encuentra en el kit de extracción de plásmidos *E.Z.N.A. * Plasmid Minikit II* (Omega Bio-Tek).

6. Secuenciación.

Realizamos la secuenciación en cada nivel de nuestro clonaje para verificar en cada etapa que el clonaje está funcionando y los insertos se están acoplando al vector sin ningún problema. Para esto, se utilizó el servicio de Secuenciación y Análisis de expresión génica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, los cuales necesitaban 10uL de plásmido y 5uL de los cebadores Forward y Reverse (enlistados en la tabla suplementaria 4 en anexos, en el apartado de cebadores) de cada nivel, respectivamente. El Secuenciador utilizado fue el Secuenciador capilar ABI 3130 XL.

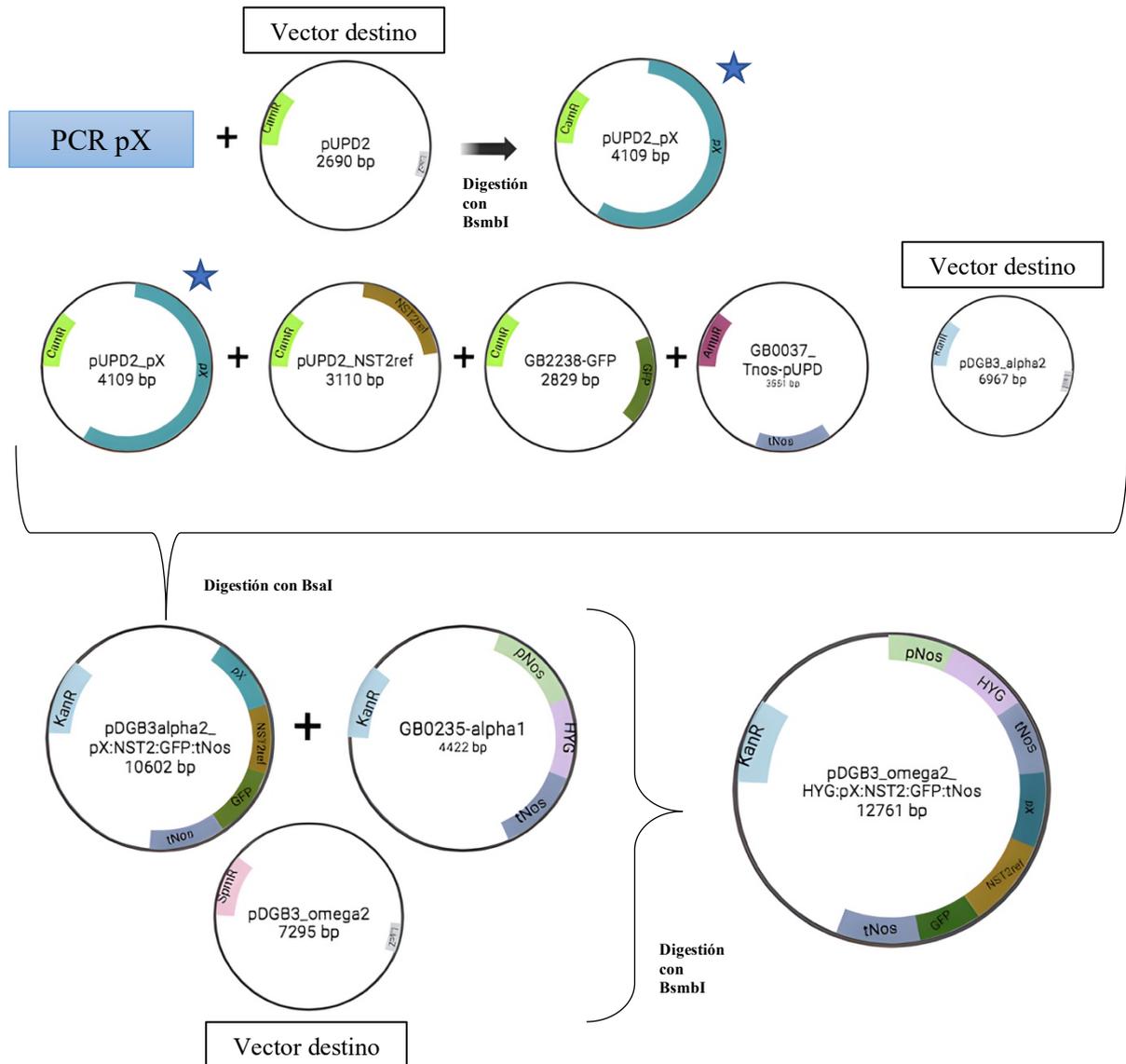


Figura 6. Ensamblaje multipartito por reacción de GoldenBraid. La secuencia del promotor *x* fue introducida al vector destino pUPD2 luego de una digestión con Bsmbl. Su producto fue digerido por BsaI junto al siguiente vector destino pDGB3alpha2 y tres construcciones más que contenían el gen de referencia de NST2, una construcción con GFP y una última con el terminador. La construcción resultante fue a su vez, digerida por Bsmbl junto a un último vector destino pDGB3Omega2 y una construcción que contenía el gen de resistencia a higromicina. El producto obtenido es el producto final de las construcciones de las líneas reporteras. (Este ensamblaje se repite para las 6 construcciones que se generaron). Realizado con Biorender.

B. CRISPR-CAS9

La construcción inicialmente se hizo *“in silico”* utilizando la herramienta bioinformática Benchling (<https://www.benchling.com/>). Esta herramienta tiene la opción del diseño de las guías CRISPR, donde se puede definir el tipo de nucleasa que se quiere utilizar, en este caso, la Cas9.

A continuación, al igual que en el apartado anterior, los pasos descritos desde la transformación en *E. coli* hasta la secuenciación (pasos 3 al 6) fueron realizados en la construcción del vector de CRISPR-Cas9.

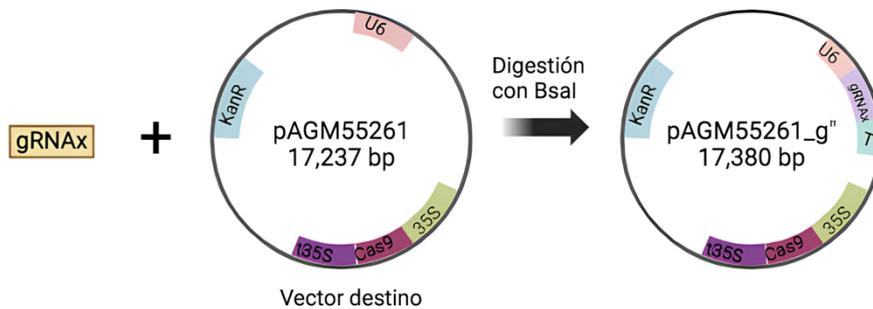


Figura 7. Ensamblaje CRISPR-Cas9. Las guías diseñadas fueron introducidas en el vector destino pAGM55261 (Grützner et al., 2020) por medio de una digestión con BsaI. Realizado con Biorender.

Transformación de *A. thaliana* por inmersión floral

La transformación de las plantas de *A. thaliana* se realizó siguiendo una modificación del protocolo de inmersión floral de Clough & Bent, (1998). Se realizó un precultivo 5mL que contiene el plásmido, el cual se escala a uno de 200mL para poder llevar a cabo el proceso de inmersión de las flores. Se dejó overnight un día a 28°C. Al día siguiente, se toma el cultivo y se centrifuga a 4000rpm por 10 minutos a 25°C utilizando el rotor 16420j, descartamos el líquido y nos quedamos con el pellet formado luego de la centrifuga. A este pellet le agregamos 200mL de una solución de sacarosa al 5% con agua destilada que habíamos preparado previamente y diluimos. Antes del proceso de inmersión floral de las plantas, añadimos al cultivo 50uL de Silvet L-77, mezclamos y procedemos a transformar la parte aérea de las plantas, donde se encuentran las flores. El contacto de la parte aérea con el líquido de transformación tiene una duración de un minuto.

Genotipado de las muestras (CRISPR-CAS9)

Se recogió una hoja por planta adulta con ayuda de unas pinzas. Se introdujeron en tubos eppendorf y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Para la extracción de DNA genómico, se siguió paso a paso el protocolo de Edwards et al. (1991). Luego, realizamos una PCR, purificamos el producto de PCR y finalmente llevamos a secuenciar para identificar si la Cas9 editó correctamente nuestro gen.

Microscopía

A. Confocal

Se utiliza este tipo de microscopía para poder observar en qué tejidos está expresándose nuestro gen de interés ya que las líneas reporteras generadas tienen GFP en la construcción. Se verificó la expresión de NST2 en tres estructuras diferentes de la planta, raíz, hipocótilo y tallo para cada línea reportera con el microscopio Confocal Zeiss 780 AxioObserver. Se utilizó yoduro de propidio para la tinción de paredes celulares. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el software disponible en el microscopio Confocal Zeiss 780 AxioObserver.

B. Óptico convencional (de luz)

Se utiliza este tipo de microscopía para poder hacer un análisis fenotípico de crecimiento secundario de las líneas reporteras generadas luego del experimento de sequía.

Se recogieron hipocótilos de plantas con tallo de 17cm sometidas al experimento de sequía y las que estaban en control. Se incuban en solución FAE (solución fijadora de muestras biológicas) con composición de formaldehído, ácido acético y etanol, se dejan hasta el día siguiente. Al día siguiente, se procede a realizar el proceso de deshidratación pasando las muestras a etanol al 50% por 1h y luego a etanol al 70% hasta cuando las muestras se vayan a infiltrar en parafina.

Las muestras fueron embebidas en parafina tras ser procesadas con el procesador automático de tejidos Leica TP 1020. Se generaron secciones transversales de 8-10um usando el microtomo Microm HM 310, montando en agua sobre portaobjetos de vidrio y fijadas por calor. Las muestras fueron desparafinadas y teñidas con azul de toluidina al 0,05%.

Experimento sequía *in vitro*

Este experimento se realizó con plantas *wild type* (Ecotipo Col-0 pero en este trabajo se llamarán *wild type*), plantas mutantes *nst2* y las cuatro de líneas reporteras generadas que llegaron hasta la segunda generación de transformación – T2 (*pNST3:NST2:GFP:tNos*, *pVND7:NST2:GFP:tNos*, *pATHB8:NST2:GFP:tNos* y *pCEL5:NST2:GFP:tNos*).

Se comienza el experimento esterilizando las semillas de los genotipos *wild type* (WT), *nst2* y líneas reporteras correspondientes. El método utilizado es el de Parsa *et al.*, (2018) con una pequeña modificación luego del paso del etanol absoluto las semillas se ponen en agua destilada ya que estas serán sembradas con pipeta. Las semillas crecieron en medio de cultivo con un contenido de 4,3 g/L de sales Murashige y Skoog (MS), 5 g/L de Phyto agar y 10 g/L de sacarosa en placas cuadradas de 12cm x 12cm a un pH de 5,7. Estuvieron cinco días en oscuridad a 4°C estratificando, luego se llevan a cámara de cultivo *in vitro* que está a 22°C con un fotoperiodo de 16h luz por cinco más para que germinen las semillas. Se hacen nuevas placas con medio MS las cuales se tratarán la mitad con polietilenglicol (PEG), que funciona como un reductor del potencial hídrico del medio, y la otra mitad serán placas control (MOCK) tratadas con agua con MS. Se agregan a las placas 50ml de cada solución respectivamente. Se procede a transferir las plántulas que crecieron durante los 5 días que estuvieron en la cámara *in vitro*. Las placas se mantuvieron en posición vertical durante todo el periodo de crecimiento A los siete días después de transferir las plántulas, se finaliza el experimento escaneando las placas para posteriormente poder cuantificar las raíces principales de cada genotipo y sus respectivas raíces laterales.

Se hicieron dos réplicas técnicas para cada línea reportera con su respectivo set de plantas WT y plantas mutantes *nst2*.

Experimento sequía invernadero

Este experimento se realizó con plantas WT, plantas mutantes *nst2* y la segunda generación de plantas transformación (T2) de las dos líneas representativas *pNST3:NST2:GFP:tNos* (*pNST3.1* y *pNST3.2*).

Se sembraron las semillas en el invernadero y crecieron hasta que el botón floral alcanzara una altura de 3 o 4 cm, en ese punto se empezó el experimento de sequía dividiendo cada genotipo en dos condiciones (control y sequía). Las plantas en sequía se dejaron de regar por dos semanas, tras las cuales se recolectaron los hipocótilos para examinar posteriormente la vasculatura secundaria.

Procesamiento de imágenes

Se utilizó el software libre ImageJ (v.1.47) como procesador de todas las imágenes resultados de este trabajo. (<https://imagej.net/ij/>)

4. Resultados

Se da inicio a este apartado mostrando los promotores seleccionados para la realización de las líneas transgénicas de complementación junto con el tipo celular del cual son marcadores.

Promotor	Tejido/Estructura	Referencia
pNST3	Pared celular secundaria	(Mitsuda et al., 2007)
pVND7	Vasos xilemáticos	(Yamaguchi et al., 2008)
pATHB8	Xilema en diferenciación	(Baima et al., 2001)
pCEL5	Organización de pared celular	(UniProt, n.d.)
pHB53	Organogénesis de raíz lateral	(Serrano-Ron et al., 2021)
pGATA23	Desarrollo de raíz lateral	(De Rybel et al., 2010)

Tabla 1. Promotores escogidos para realizar las líneas de complementación con su respectivo tipo celular del cual son marcadores.

Línea de complementación en tejidos vasculares que desarrollan pared celular secundaria.

El análisis mediante microscopía confocal para esta primera línea de complementación (*pNST3:NST2:GFP:tNos*) demostró y confirmó lo descrito en literatura. El gen *NST2* bajo el control del promotor *NST3*, presenta un patrón de expresión localizado en tipos celulares con pared celular secundaria, muy asociado a fibras xilemáticas (aunque no exclusivamente). Esta observación es clara en la figura 8C y 8D en estructuras maduras como hipocótilo y tallo. En la figura 8A y 8B, patrón de expresión en raíz, no se observa expresión del gen puesto que la etapa en la que se encuentra la raíz es una etapa donde aún no hay desarrollo de pared celular secundaria.

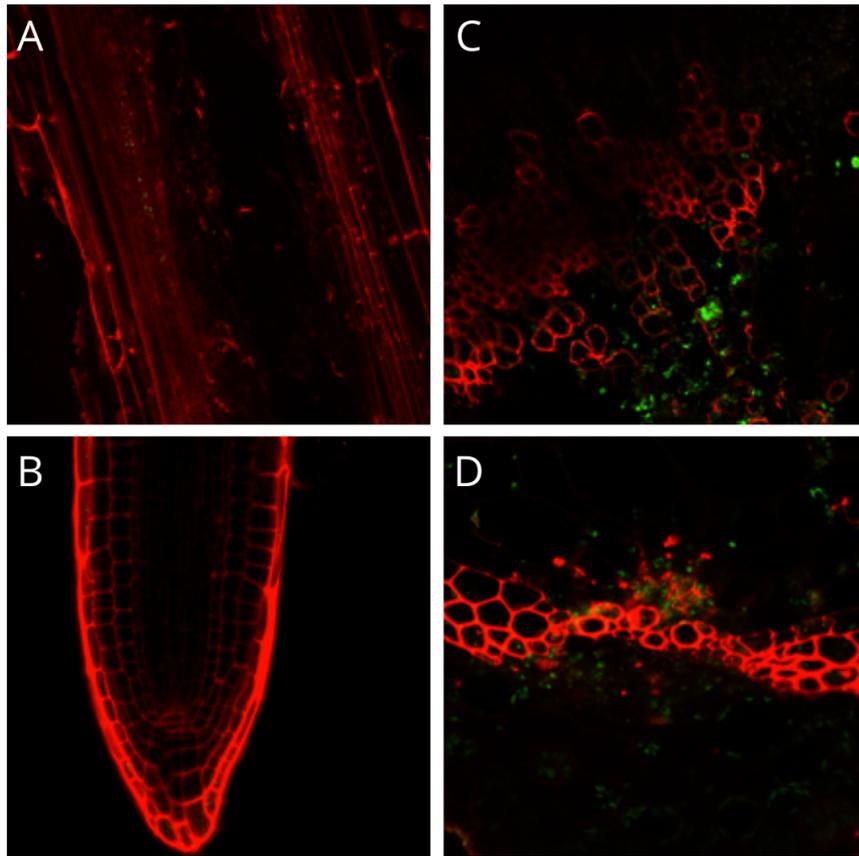


Figura 8. Patrón de expresión del gen *NST2* bajo el control del promotor *NST3*. A) patrón de expresión negativo en raíz, B) patrón de expresión negativo en el RAM, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo.

El análisis de la morfología de las rosetas en las líneas transgénicas generadas permitió evaluar su capacidad para recuperar el fenotipo observado en plantas WT en comparación con el fenotipo observado en plantas mutantes *nst2*. Para esto, Se cultivaron en el invernadero plantas WT, mutante *nst2* y las dos líneas elegidas representantes de la construcción de *pNST3:NST2:GFP:tNos*. Los cuatro genotipos se encuentran en la misma etapa de crecimiento, a 3 semanas de vida. Se puede observar en la figura 9 que la roseta de las plantas de las líneas de complementación presenta unas hojas con una forma ovalada y alargada que se asemeja más a la forma de las hojas que presenta el mutante simple *nst2* ya que las hojas de las plantas WT suelen ser más redondas y menos alargadas, esto confirma que la complementación es específica de tejido y no de toda la planta.



Figura 9. Plantas de *Arabidopsis thaliana* WT, mutante *nst2* y líneas reporteras a tres semanas de vida.

Además, se realizó un experimento de sequía *in vitro* para poder observar el fenotipo de raíz principal y raíces laterales en las líneas generadas frente a los genotipos WT y mutante *nst2*, permitiendo evaluar el nivel de complementación de cada línea para este fenotipo. En la figura 10, gráfica de longitud de raíz principal, se observa que tanto en condición Mock como en condición de sequía inducida por PEG, las líneas complementadas se comportan como el mutante *nst2*. Lo mismo se puede observar en la gráfica de densidad (figura 11), puesto que las líneas de complementación se comportan como el mutante simple y no como las plantas WT, lo cual una vez más confirma que la complementación es específica de tejido y no de toda la planta.

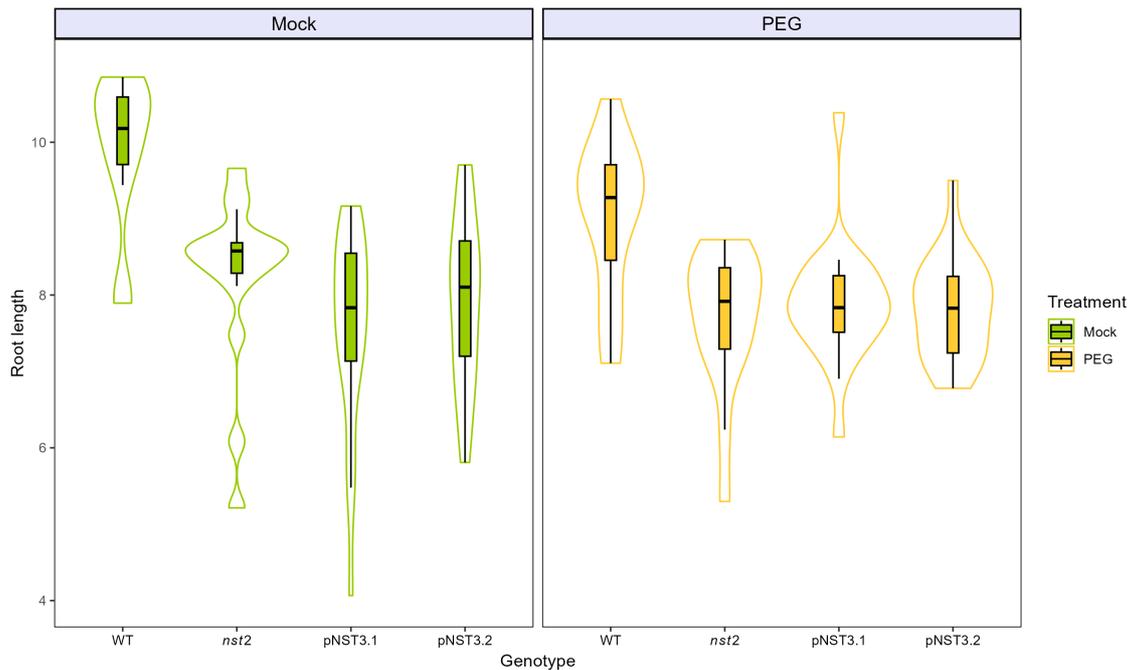


Figura 10. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (WT, *nst2*, pNST3.1:*NST2*:GFP:*tNos* y pNST3.2:*NST2*:GFP:*tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos *in vitro*).

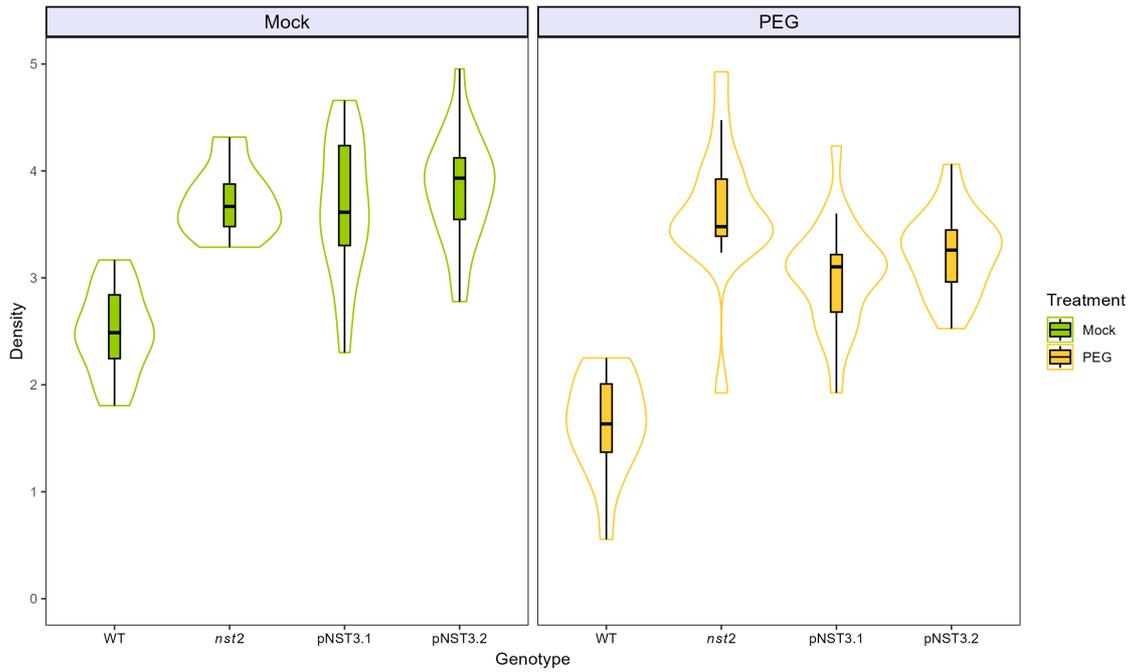


Figura 11. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, *nst2*, *pNST3.1:NST2:GFP:tNos* y *pNST3.2:NST2:GFP:tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos *in vitro*).

Por último, para realizar un análisis de xilema bajo condiciones de sequía, se cultivaron plantas en el invernadero con los cuatro genotipos (WT, *nst2*, *pNST3.1:NST2:GFP:tNos* y *pNST3.2:NST2:GFP:tNos*). En la figura 12 el xilema secundario de los cuatro genotipos en condiciones control y sequía se representa en un color azul-verdoso.

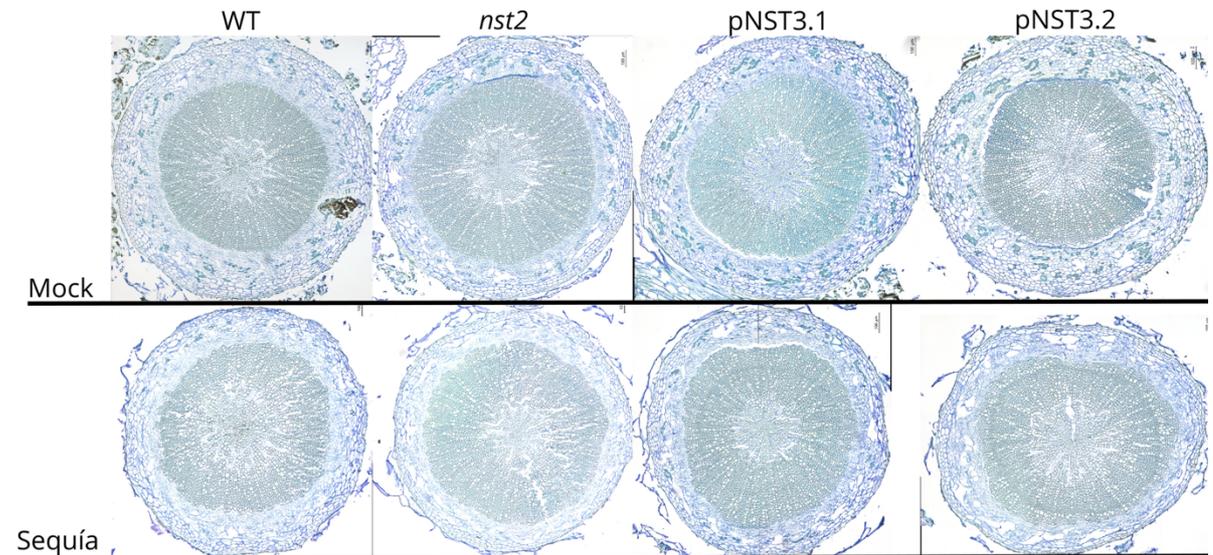


Figura 12. Fenotipado de la línea de complementación *pNST3:NST2:GFP:tNos*. Fenotipo de crecimiento secundario en secciones transversales de hipocotilo de plantas de 17cms de los cuatro genotipos.

Las figuras 12, 13 y 14 demuestran como las áreas totales y las áreas del xilema secundario, respectivamente, son altamente variables en las líneas de complementación, lo cual puede que se deba a que es una población segregante (T2) y además que la n utilizada en el experimento fue baja. Esta variabilidad en las muestras se puede apreciar mejor en la figura 15, que representa el porcentaje de área xilemática que hay frente al área total (%Á. Xilema = área xilema/área total). En esta figura se ve un claro comportamiento intermedio de las líneas reporteras generadas.

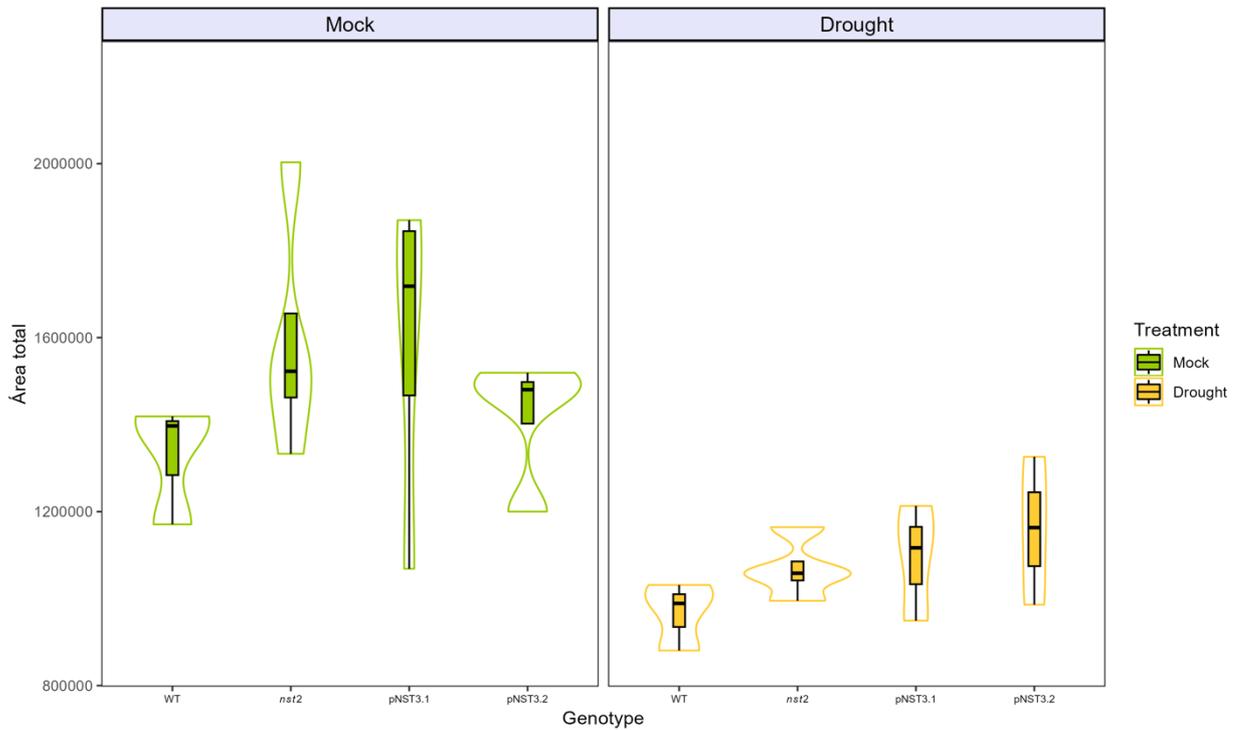


Figura 13. Área total de las muestras de hipocotilo luego de un experimento de sequía en genotipos WT, mutante *nst2* y líneas de complementación generadas bajo el control del promotor *NST3*.

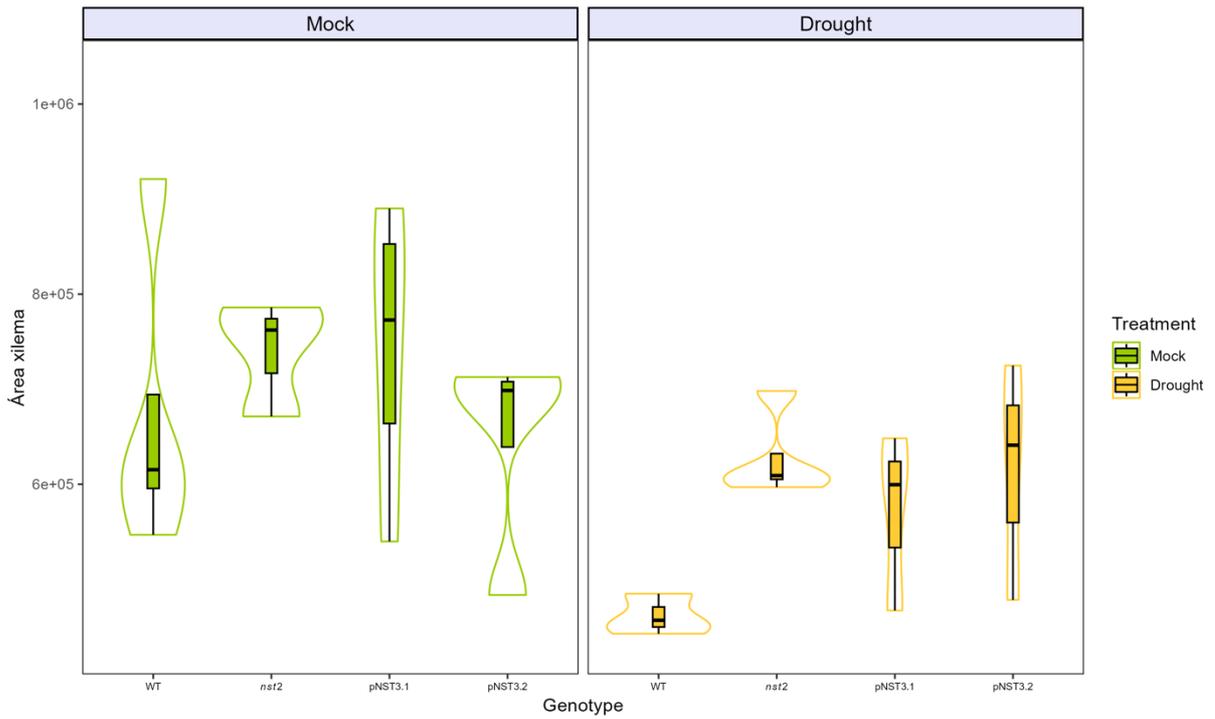


Figura 14. Área del xilema de las muestras de hipocotilo luego de un experimento de sequía en genotipos WT, mutante *nst2* y líneas de complementación generadas bajo el control del promotor *NST3*.

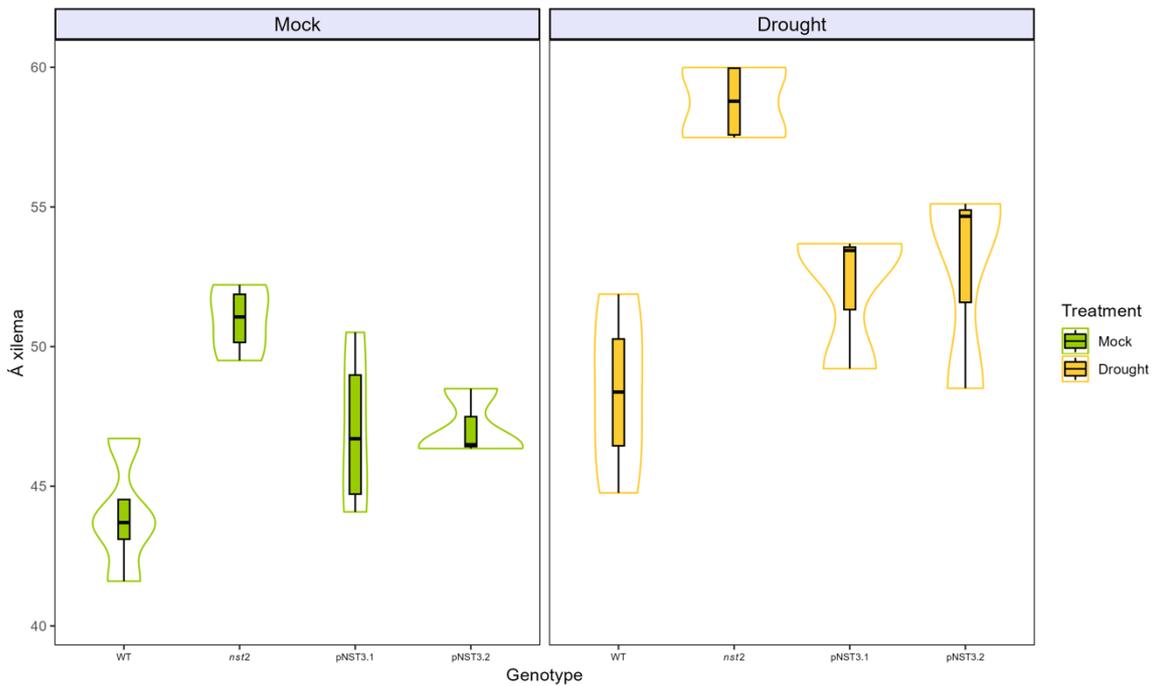


Figura 15. Porcentaje del área xilemática frente al área total de las muestras de hipocotilo luego de un experimento de sequía en genotipos WT, mutante *nst2* y líneas de complementación generadas bajo el control del promotor *NST3*.

Línea de complementación de la mutación *nst2* específicamente en vasos xilemáticos

El análisis mediante microscopía confocal para esta línea de complementación *pVND7:NST2:GFP:tNos* demostró y confirmó lo descrito en literatura. El gen *NST2* bajo el control del promotor *VND7*, presenta un patrón de expresión localizado en vasos xilemáticos. Viendo la figura 16, se puede ver claramente que hay expresión del gen en xilema. Si observamos las figuras 16C y 16D, se puede apreciar de forma más clara que efectivamente esta expresión está localizada en los vasos xilemáticos.

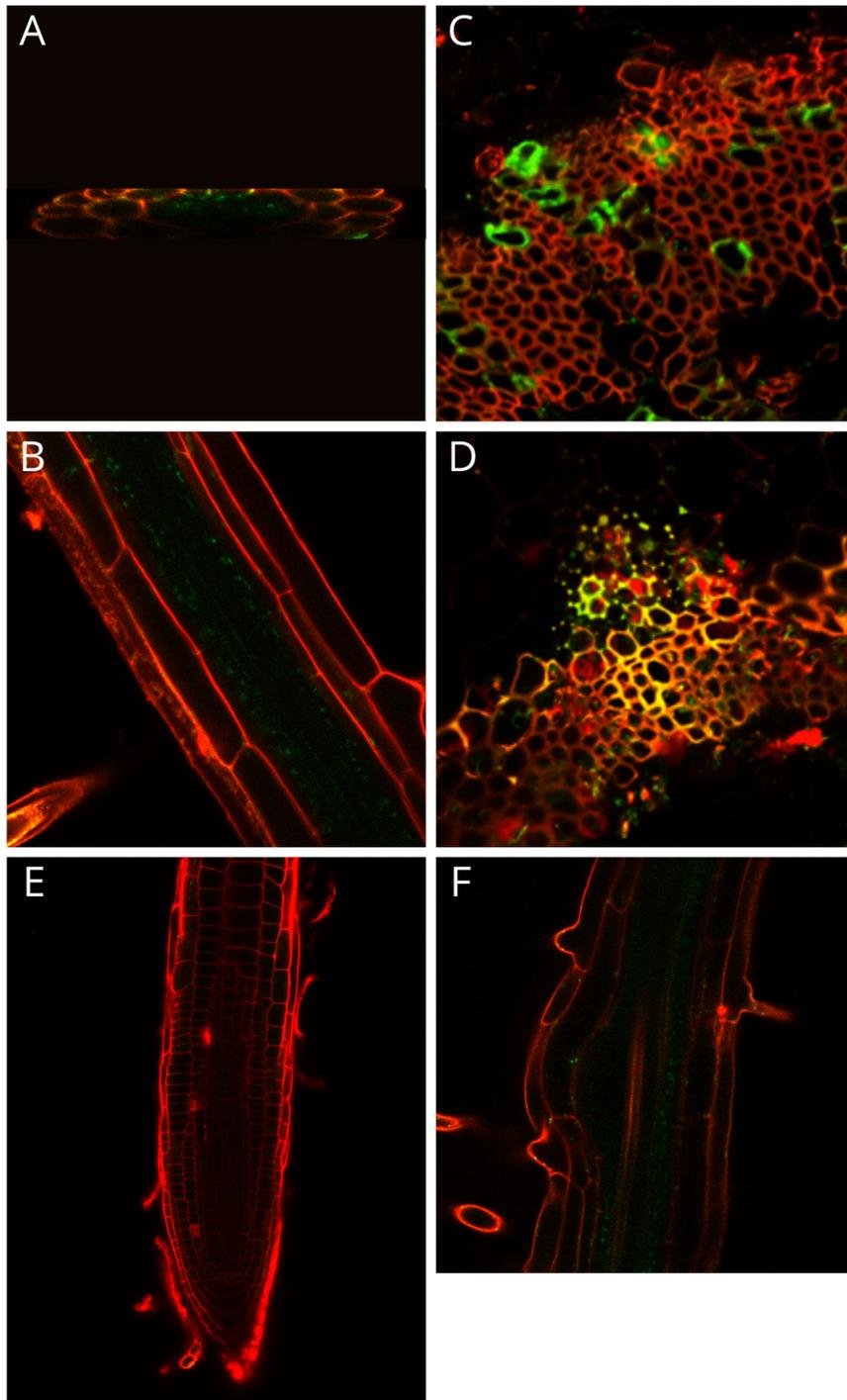


Figura 16. Patrón de expresión del gen *NST2* bajo el control del promotor *VND7*. A) Patrón de expresión transversal en raíz, B) patrón de expresión en raíz, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo, E) patrón de expresión negativo en RAM, F) patrón de expresión en raíz lateral.

La longitud de la raíz principal de las líneas *pVND7.2* y *pVND7.4*, como se observa en la figura 17, muestran un claro comportamiento como las plantas mutantes *nst2* en ambas condiciones estudiadas en el experimento. En cambio, en la figura 18 donde se está graficando la densidad este comportamiento es intermedio entre las plantas WT y las plantas mutantes, indicando que la complementación es parcial para este caso.

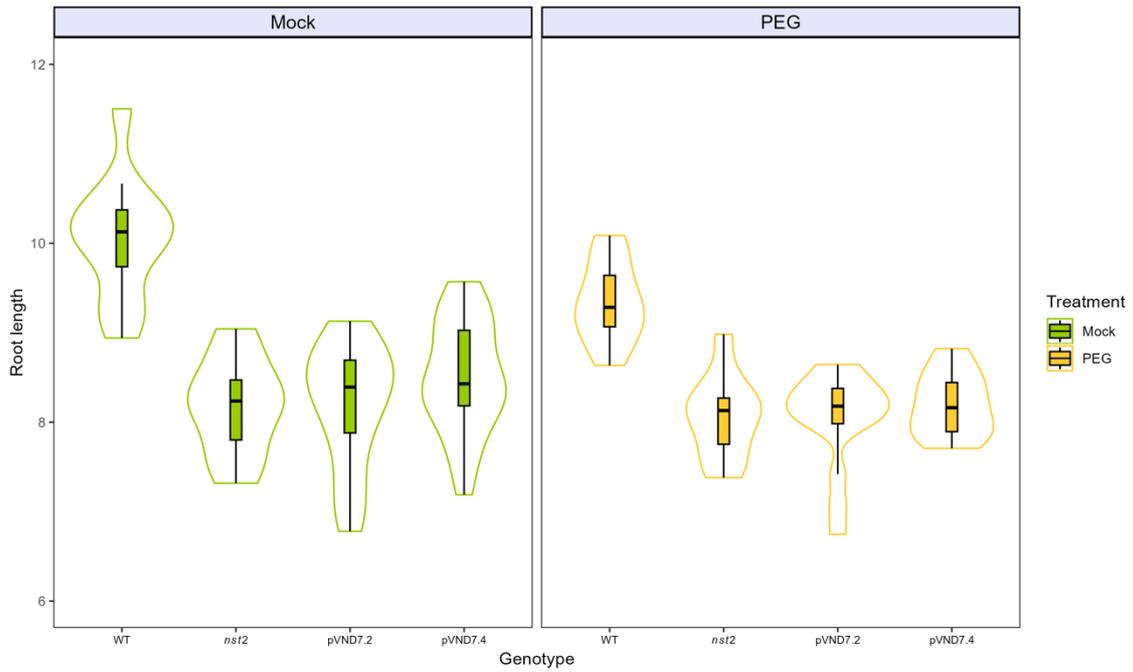


Figura 17. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (*WT*, *nst2*, *pVND7.2:NST2:GFP:tNos* y *pVND7.4:NST2:GFP:tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos “in vitro”).

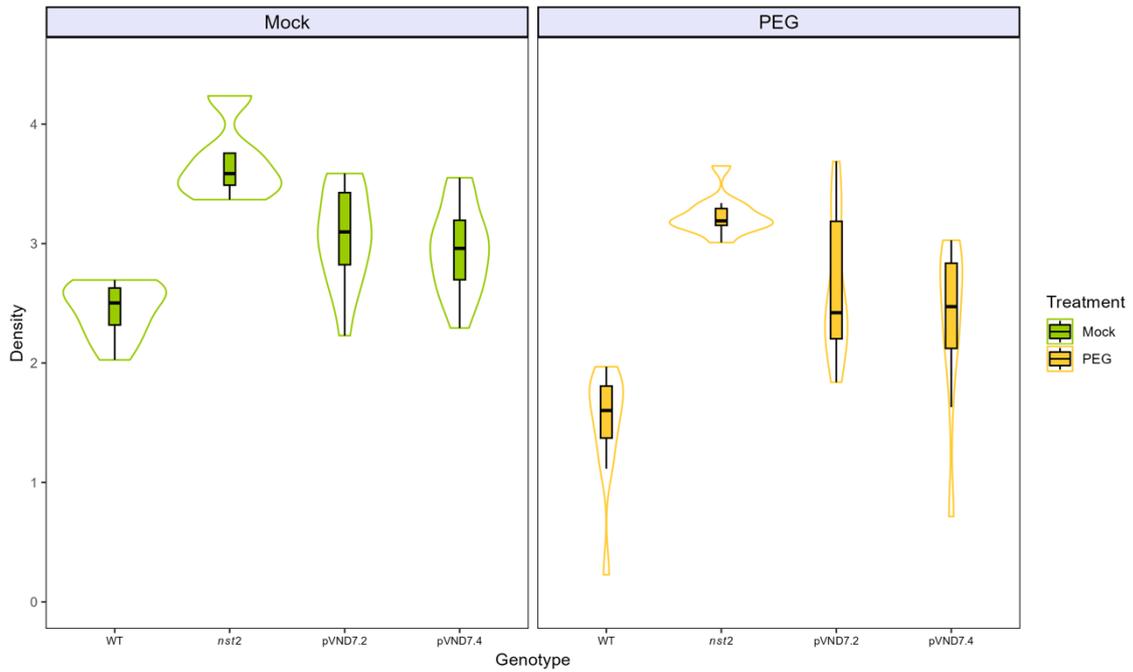


Figura 18. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, *nst2*, *pVND7.2:NST2:GFP:tNos* y *pVND7.4:NST2:GFP:tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos “in vitro”).

Línea de complementación de la mutación *nst2* específicamente en xilema en desarrollo

El análisis mediante microscopía confocal para esta línea de complementación *pATHB8:NST2:GFP:tNos* demostró y confirmó lo descrito en literatura, al igual que las líneas anteriores. El gen *NST2* bajo el control del promotor de *ATHB8*, presenta un patrón de expresión localizado en xilema puesto que es un promotor asociado a xilema en diferenciación. Observando la figura 19, se puede ver claramente que hay expresión del gen en xilema.

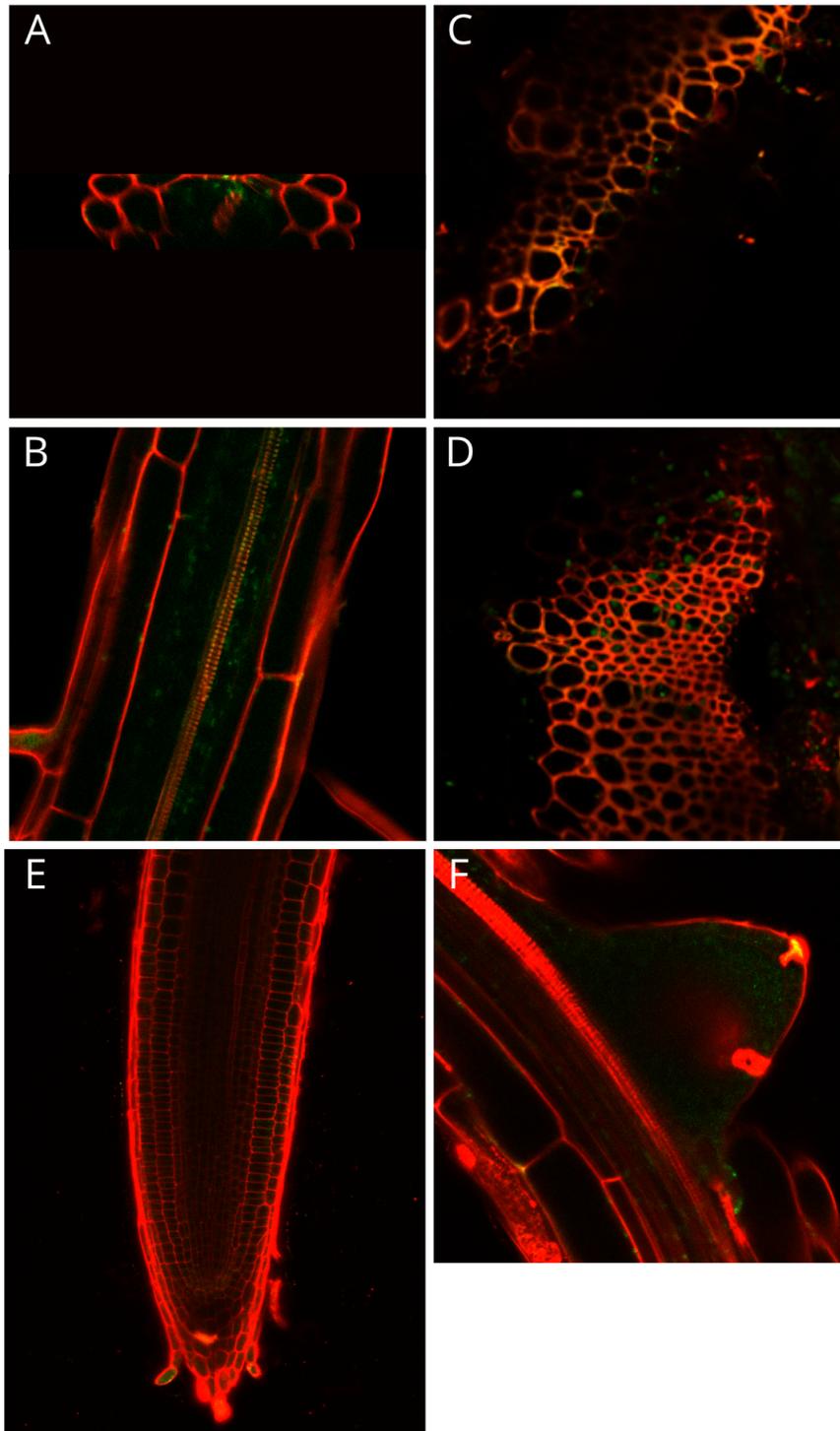


Figura 19. Patrón de expresión del gen *NST2* bajo el control del promotor *ATHB8*. A) Patrón de expresión transversal en raíz, B) patrón de expresión en raíz, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo, E) patrón de expresión negativo en RAM, F) patrón de expresión en raíz lateral.

La figura 20 muestra que las líneas *pATHB8.2* y *pATHB8.3* presentan una longitud de raíz principal para la condición Mock igual que las plantas WT, pero en la condición PEG se puede observar un ligero incremento con respecto a las plantas WT. En cambio, en la figura 21 donde se grafica la densidad, se puede observar que el comportamiento de las

raíces de ambas líneas reporteras en ambas condiciones se comporta como las raíces de las plantas WT.

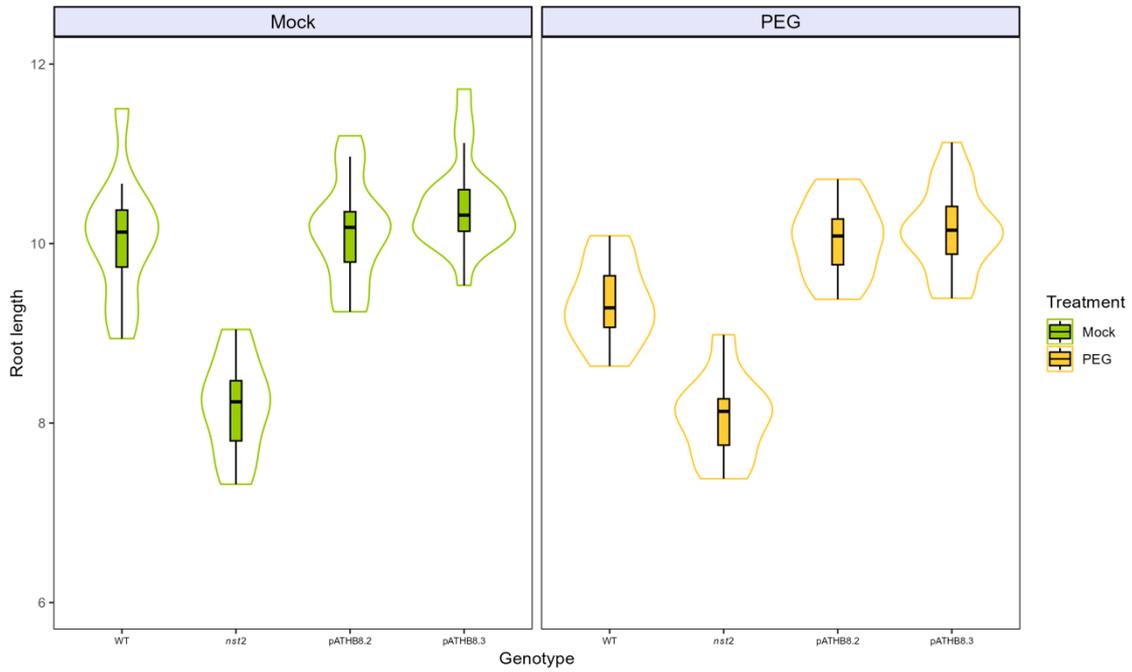


Figura 20. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (WT, *nst2*, *pATHB8.2:NST2:GFP:tNos* y *pATHB8.3:NST2:GFP:tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos *in vitro*).

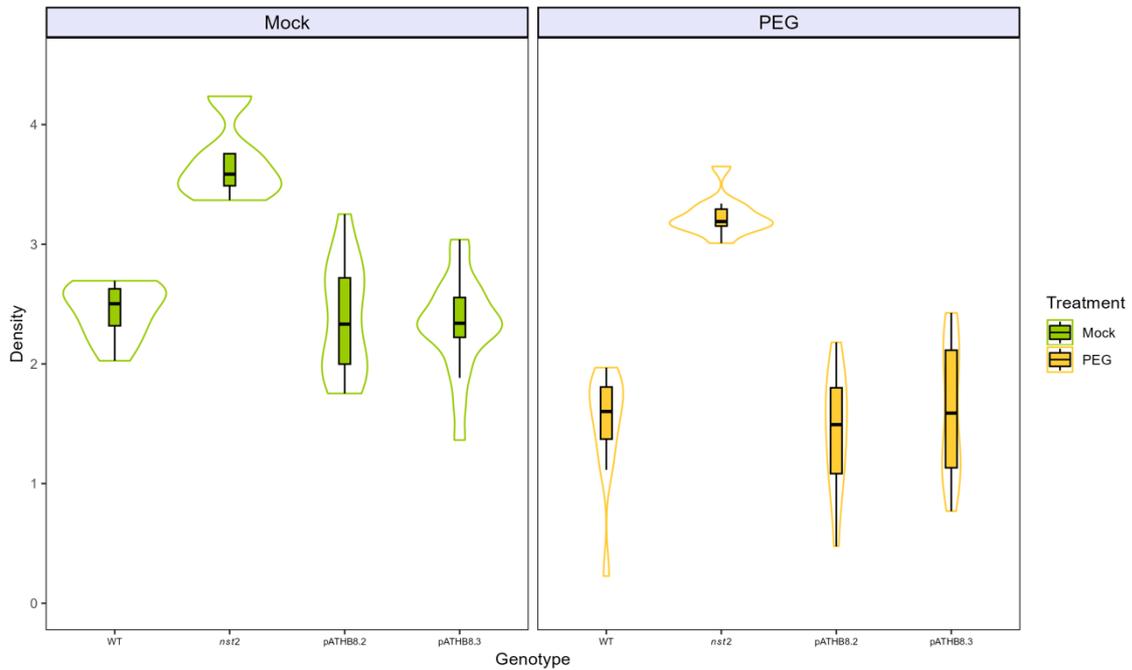


Figura 21. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, *nst2*, *pATHB8.2:NST2:GFP:tNos* y *pATHB8.3:NST2:GFP:tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos *in vitro*).

Línea de complementación en tejidos vasculares asociados a la organización de pared celular

El análisis mediante microscopía confocal para esta línea de complementación *pCEL5:NST2:GFP* nos demostró que el gen *NST2* bajo el control del promotor de *CEL5*, presenta un patrón de expresión localizado por toda la vasculatura de raíz y es acorde con lo encontrado en literatura. Esto se confirma con la figura 22, donde se puede ver que en las tres estructuras analizadas (raíz, hipocótilo y tallo) hay una alta expresión del gen *NST2* bajo control del promotor de *CEL5*.

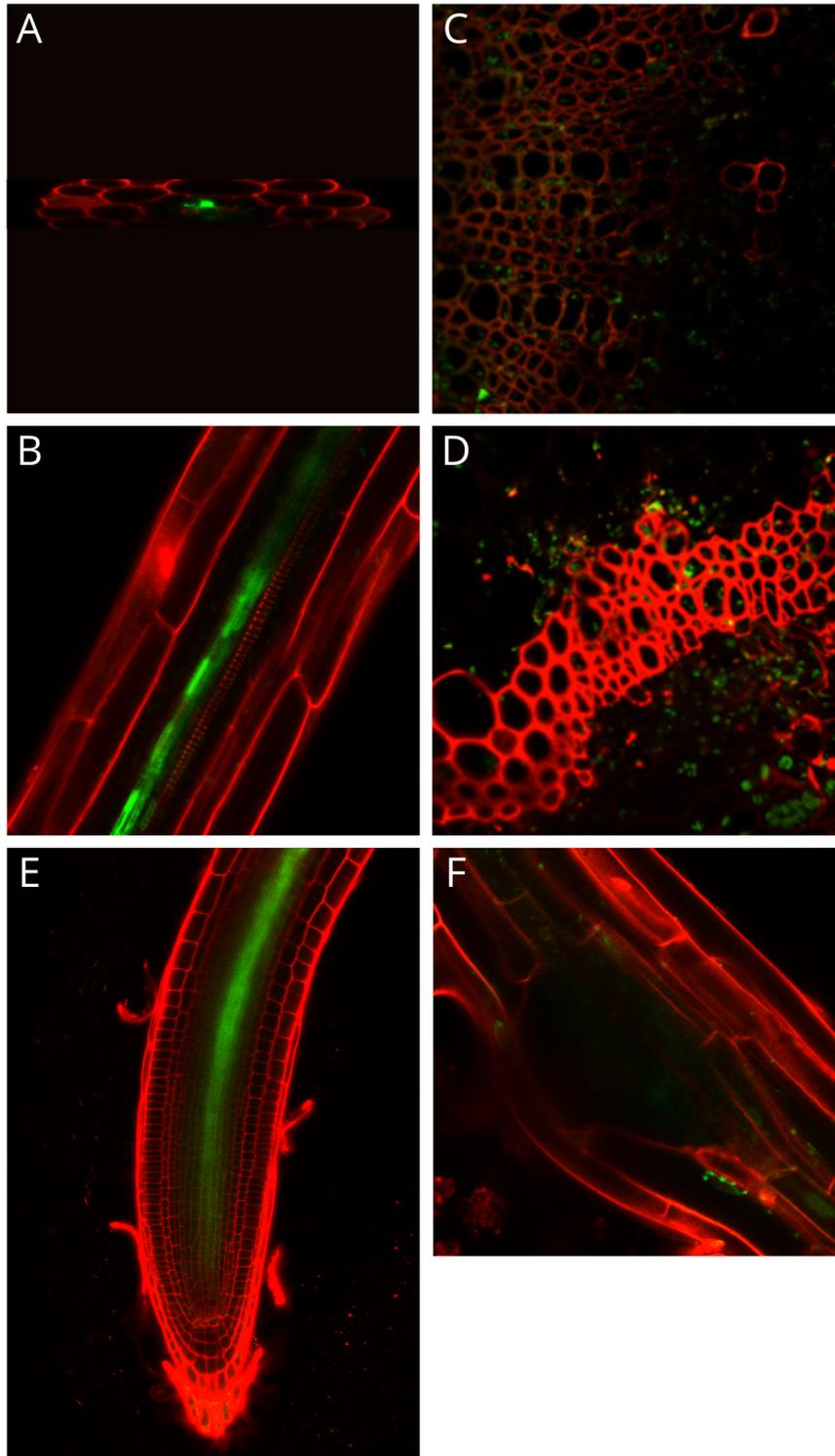


Figura 22. Patrón de expresión del gen *NST2* bajo el control del promotor de *CEL5*. A) Patrón de expresión transversal en raíz, B) patrón de expresión en raíz, C) patrón de expresión en hipocotilo, D) patrón de expresión en tallo, E) patrón de expresión en el RAM, F) patrón de expresión en raíz lateral.

Para esta línea de complementación, la longitud de su raíz principal en la condición mock presenta un comportamiento ligeramente similar a las raíces de las plantas WT, mientras que en la condición PEG se ve claramente que las raíces de las líneas se comportan como las raíces de las plantas WT (figura 23). Para el caso de la densidad pasa algo parecido (figura 24), ya que para la condición Mock se ve claramente que las

plantas de las líneas generadas se comportan como las plantas WT. Sin embargo, en la condición PEG las plantas de las líneas complementadas tienen una ligera diferencia con las plantas WT, aunque esta no es significativa, por lo que se puede decir que se comportan más como WT que como mutantes.

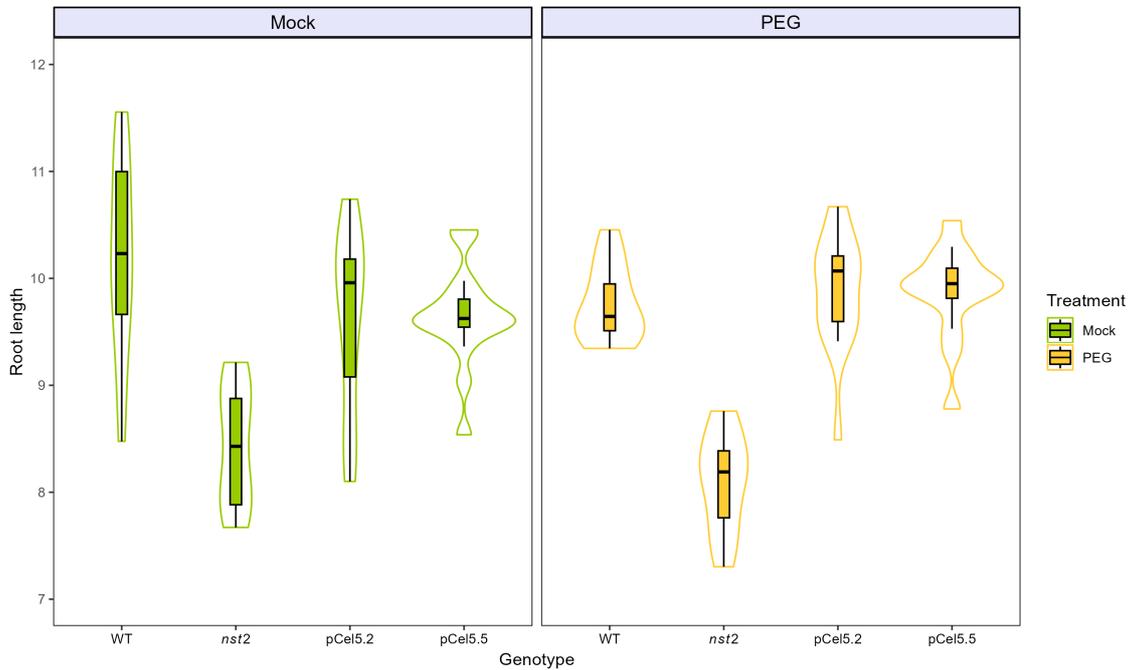


Figura 23. Cuantificación de longitud de raíz principal para cuatro genotipos (WT, *nst2*, *pCel5.2:NST2:GFP:tNos* y *pCel5.5:NST2:GFP:tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos *in vitro*).

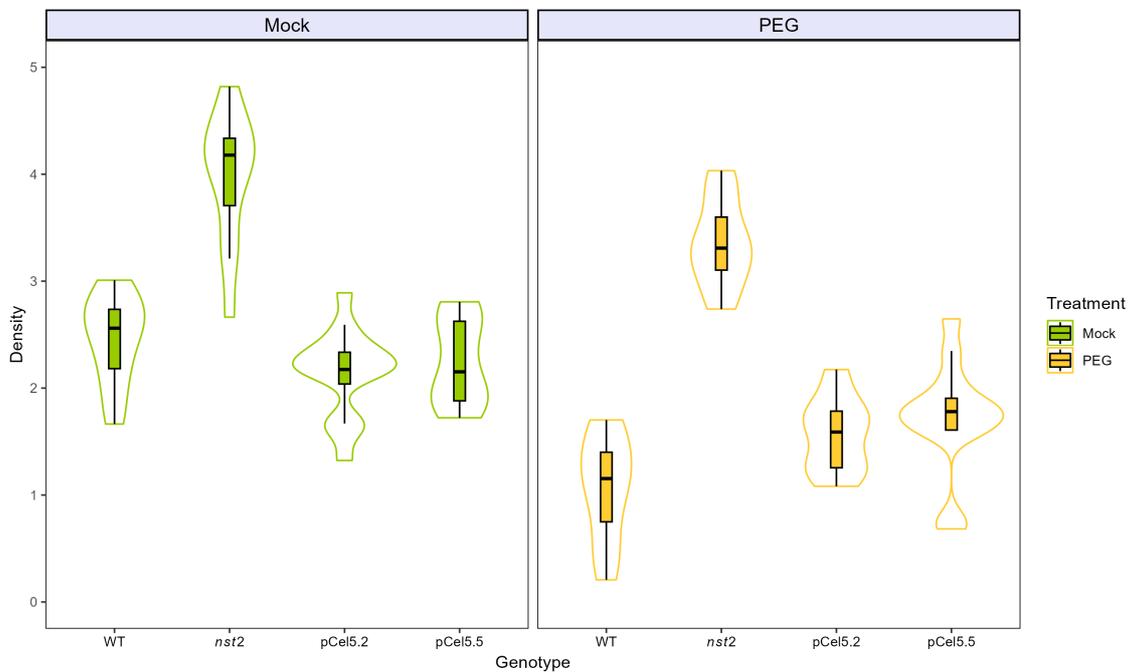


Figura 24. Cuantificación de densidad para cuatro genotipos (WT, *nst2*, *pCEL5.2:NST2:GFP:tNos* y *pCel5.5:NST2:GFP:tNos*) en condiciones Mock (control) y PEG (representación de estrés por sequía en experimentos *in vitro*).

Línea de complementación de la mutación *nst2* específicamente en primordios de raíces laterales

El análisis mediante microscopía confocal para esta línea de complementación se realizó en la T1 y demostró que el patrón de expresión del gen *NST2* bajo el control del promotor *HB53* se encuentra, efectivamente, localizado en zonas adyacentes al xilema como es el periciclo -el tejido encargado de iniciar las divisiones celulares que dan origen a los primordios de los que emergen las raíces laterales- (figura 25). Cabe mencionar que el promotor de *HB53* es un promotor asociado con organogénesis de raíces laterales.

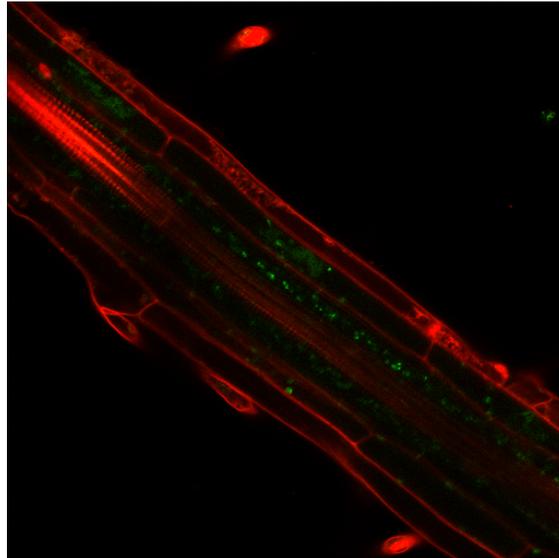


Figura 25. Patrón de expresión del gen *NST2* bajo el control del promotor de *HB53*.

Tabla resumen

Línea reportera generada	Promotor	Tejido/Estructura	Generación de transformación	Fenotipo que complementa		
				Raíz	Roseta	Vasculatura
pNST3:NST2:GFP:tNos	pNST3	Pared celular secundaria	T2	No	No	Parcialmente
pVND7:NST2:GFP:tNos	pVND7	Vasos xilemáticos	T2	No	*	*
pATHB8:NST2:GFP:tNos	pATHB8	Xilema en diferenciación	T2	Sí	*	*
pCel5:NST2:GFP:tNos	pCel5	Organización de pared celular	T2	Sí	*	*
pHB53:NST2:GFP:tNos	pHB53	Organogénesis de raíz lateral	T1	*	*	*
pGATA23:NST2:GFP:tNos	pGATA23	Desarrollo de raíz lateral	T1	*	*	*

Tabla 2. Resumen de resultados para las líneas reporteras generadas. "*" hace referencia a que los experimentos no fueron realizados por falta de tiempo.

Líneas generadas con CRISPR-CAS9.

Para poder evaluar el papel del gen *NST2* en la respuesta adaptativa al estrés por sequía se decidió realizar mutaciones dirigidas con CRISPR-CAS9 en diferentes accesiones de *Arabidopsis thaliana*. Con este enfoque se busca determinar cómo la pérdida de función de *NST2* afecta a los fenotipos relacionados con la tolerancia a sequía como los mencionados anteriormente. Los ecotipos seleccionados se encuentran enlistados en la tabla 3. Los criterios utilizados para escoger estos ecotipos fueron dos: el haplotipo de *NST2* que poseen y el tiempo de floración que tienen. Se buscó elegir accesiones que

contaran tanto con el haplotipo relicto como con el haplotipo de referencia y además, se buscó que el tiempo de floración de las accesiones fuera el menor posible.

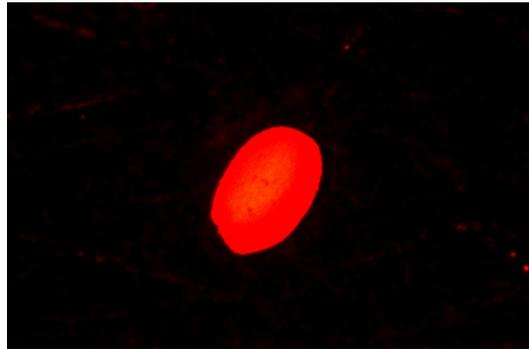


Figura 26. Semilla de ecotipo Col-0 positiva luego de la transformación por el método de CRISPR-CAS9.

Tabla Resumen

Ecotipos transformados	Haplotipo	Semillas positivas	Estado en el que quedaron
Col-0	Referencia	Sí	Genotipado en proceso
Vid-1	Referencia	Sí	Genotipado en proceso
Oja-0	Relicto	No	Se volvieron a sembrar
Lum-0	Relicto	No	Se volvieron a sembrar
Vis-0	Relicto	En espera	/

Tabla 3. Resumen de resultados con las líneas generadas por CRISPR-CAS9.

5. Discusión

Líneas de complementación generadas

En este estudio, se observó que el gen *NST2* bajo el control del promotor *NST3* en general presentó comportamientos fenotípicos similares al mutante *nst2* en lugar de las plantas WT. Tomando en cuenta que este promotor está asociado a la formación de pared celular secundaria en xilema secundario, frecuentemente asociado a fibras vasculares (aunque no exclusivamente), en *Arabidopsis thaliana* (Mitsuda et al., 2007), es claro que en raíz no encontraremos expresión del gen (figuras 8A y 8B) y por consiguiente explicaría porqué al realizar el fenotipado de raíces (figuras 10 y 11) luego del experimento de sequía, las líneas generadas muestran una tendencia mutante en lugar de una tendencia WT. Por otro lado, el fenotipado de xilema secundario muestra un comportamiento variable. En otras palabras, no hay una complementación clara ni un comportamiento completamente mutante, sino más una complementación parcial. Esto pudo haber sido por haber utilizado una n baja y, además, el estar trabajando con plantas en la segunda generación de transformación (T2) la segregación juega un papel importante en el resultado obtenido del experimento. Este resultado sugiere que el fenotipo mutante observado en raíz no es consecuencia de su pérdida de función en el xilema secundario, o viceversa. Por lo que probablemente *NST2* actúa de manera independiente en cada órgano evaluado.

En el caso de las líneas de complementación bajo el control del promotor del gen *VND7*, un gen clave en la regulación de la formación de los vasos xilemáticos (Yamaguchi et al., 2008) que tiene expresión tanto en raíz como en hipocótilo y tallo, demostró dos

resultados interesantes en el fenotipado de raíces. Si bien se encontró expresión del gen *NST2* en raíz en las líneas generadas, la recuperación del fenotipo no fue completa sino parcial. Al encontrar una complementación parcial en la densidad de raíces laterales y un comportamiento mutante en la raíz principal, se puede observar desacoplamiento entre ambos procesos. Esto puede deberse a que desde los vasos xilemáticos es capaz de regular la formación de raíces laterales, pero no el crecimiento de la raíz primaria.

Por otro lado, las líneas de complementación bajo el control de los promotores *ATBH8* y *CEL5* lograron complementar completamente los fenotipos de raíz. Esto puede ser porque ambos promotores dirigen una expresión del gen *NST2* suficiente en los tipos celulares específicos como para complementar el fenotipo no solo en la raíz principal sino también en las raíces laterales. Además, son promotores que están asociados con procesos clave en el desarrollo y funcionalidad de esta estructura. *ATBH8* regula la diferenciación de células xilemáticas, asegurando un desarrollo vascular adecuado (Baima et al., 2001), y *CEL5* está relacionado con la organización de pared celular, un proceso importante para el crecimiento y estabilidad de las raíces (*UniProt*, n.d.). Cabe mencionar que no se observa expresión del gen en el meristemo apical de la raíz para ninguna de estas líneas de complementación por lo que parece no ser necesaria la localización de *NST2* en este tejido para regular el crecimiento primario de esta.

El comportamiento observado en las líneas de complementación podría estar influenciado por el tamaño de la muestra y la segregación genética en la segunda generación (T2) de las plantas transformadas. Esto es un factor importante que podría afectar los resultados experimentales y la interpretación de la complejidad fenotípica.

Estos resultados sugieren que *NST2* controla la respuesta a sequía a múltiples niveles. En principio, los distintos factores de respuesta a la sequía que controla el gen no parecen estar relacionados entre sí, aunque solo se podrán obtener conclusiones sólidas en este sentido cuando se tengan las líneas en la tercera generación de plantas transformadas (T3). Es por esto que el grupo de investigación continuara con este estudio cuando se tengan estas líneas.

Para finalizar, Los resultados obtenidos refuerzan la idea de que la recuperación total del fenotipo de la planta depende no solo de la expresión del gen *NST2*, sino también de la localización precisa de dicha expresión en los tejidos. Hecho que se debería tener en cuenta en las estrategias de mejora genética. Teniendo en cuenta la complementación específica de tejido se podrían adquirir rasgos beneficiosos en un órgano (como, por ejemplo, mayor crecimiento secundario o una mayor densidad de raíces laterales) evitando rasgos perjudiciales en otros órganos o procesos (así como un menor crecimiento de la raíz primaria en el caso concreto de *NST2*).

6. Conclusiones

1. El gen *NST2* actúa de manera independiente en diferentes órganos, regulando procesos específicos en raíces y xilema secundario que no están interrelacionados.

2. Los promotores *ATHB8* y *CEL5* lograron una complementación completa en raíces, mientras que *VND7* y *NST3* solo lograron complementaciones parciales o no rescataron el fenotipo, destacando la importancia de la localización específica de la expresión de *NST2*.

7. Bibliografía

- Agustí, J., & Blázquez, M. A. (2020). Plant vascular development: mechanisms and environmental regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(19), 3711–3728. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03496-w>
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, A., Wisman, E., Altamura, M. M., Ruberti, I., & Morelli, G. (2001). The Arabidopsis ATHB-8 HD-Zip Protein Acts as a Differentiation-Promoting Transcription Factor of the Vascular Meristems. *Plant Physiology*, 126(2), 643. <https://doi.org/10.1104/PP.126.2.643>
- Ben Rejeb, I., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants 2014*, Vol. 3, Pages 458–475, 3(4), 458–475. <https://doi.org/10.3390/PLANTS3040458>
- CEL5 - Endoglucanase 3 - Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress) | UniProtKB | UniProt.* (n.d.). Retrieved December 18, 2024, from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q2V4L8/entry>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1998.00343.X>
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., ... Beeckman, T. (2010). A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology : CB*, 20(19), 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2010.09.007>
- Grützner, R., Martin, P., Horn, C., Mortensen, S., Cram, E. J., Lee-Parsons, C. W. T., Stuttmann, J., & Marillonnet, S. (2020). High-efficiency genome editing in plants mediated by a Cas9 gene containing multiple introns. *Plant Communications*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2020.100135>
- Koyro, H. W., Ahmad, P., & Geissler, N. (2012). Abiotic Stress Responses in Plants: An Overview. *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*, 1–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_1
- Kuromori, T., Seo, M., & Shinozaki, K. (2018). ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 23(6), 513–522. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2018.04.001>
- Lindsey, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2017). Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 2017(128), e56587. <https://doi.org/10.3791/56587>
- Liu, C., Yu, H., Rao, X., Li, L., & Dixon, R. A. (2021). Abscisic acid regulates secondary cell-wall formation and lignin deposition in *Arabidopsis thaliana* through

phosphorylation of NST1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(5), e2010911118.

https://doi.org/10.1073/PNAS.2010911118/SUPPL_FILE/PNAS.2010911118.SAPP.PDF

- Lozano-Juste, J., Infantes, L., Garcia-Maquilon, I., Ruiz-Partida, R., Merilo, E., Benavente, J. L., Velazquez-Campoy, A., Coego, A., Bono, M., Forment, J., Pampín, B., Destito, P., Monteiro, A., Rodríguez, R., Cruces, J., Rodriguez, P. L., & Albert, A. (2023). Structure-guided engineering of a receptor-agonist pair for inducible activation of the ABA adaptive response to drought. *Science Advances*, 9(10). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADE9948/SUPPL_FILE/SCIADV.ADE9948_SM.PDF
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2007). NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(1), 270–280. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047043>
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PLOS ONE*, 6(7), e21622. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021622>
- Serrano-Ron, L., Perez-Garcia, P., Sanchez-Corrionero, A., Gude, I., Cabrera, J., Ip, P. L., Birnbaum, K. D., & Moreno-Risueno, M. A. (2021). RECONSTRUCTION OF LATERAL ROOT FORMATION THROUGH SINGLE-CELL RNA-SEQ REVEALS ORDER OF TISSUE INITIATION. *Molecular Plant*, 14(8), 1362. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2021.05.028>
- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2020). Drought Stress Responses and Resistance in Plants: From Cellular Responses to Long-Distance Intercellular Communication. *Frontiers in Plant Science*, 11, 556972. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.556972/BIBTEX>
- Taylor-Teeple, M., Lin, L., De Lucas, M., Turco, G., Toal, T. W., Gaudinier, A., Young, N. F., Trabucco, G. M., Veling, M. T., Lamothe, R., Handakumbura, P. P., Xiong, G., Wang, C., Corwin, J., Tsoukalas, A., Zhang, L., Ware, D., Pauly, M., Kliebenstein, D. J., ... Brady, S. M. (2015). An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*, 517(7536), 571–575. <https://doi.org/10.1038/NATURE14099>
- Yamaguchi, M., Kubo, M., Fukuda, H., & Demura, T. (2008). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots. *The Plant Journal*, 55(4), 652–664. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2008.03533.X>
- Zhang, H., Zhao, Y., & Zhu, J.-K. (2020). Thriving under Stress: How Plants Balance Growth and the Stress Response. *Developmental Cell*, 55, 529–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.012>

ANEXO 1. Relación del proyecto con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

Grado de relación del proyecto con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenible	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				x
ODS 2. Hambre cero	x			
ODS 3. Salud y bienestar.		x		
ODS 4. Educación de calidad.				x
ODS 5. Igualdad de género.				x
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				x
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				x
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				x
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.		x		
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				x
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.			x	
ODS 12. Producción y consumo responsables.		x		
ODS 13. Acción por el clima.	x			
ODS 14. Vida submarina.				x
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				x
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				x
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				x

ODS 2. Hambre Cero, específicamente en la meta 2.4, que busca garantizar sistemas sostenibles de producción de alimentos y prácticas agrícolas resilientes que ayuden a incrementar la productividad, la adaptación al cambio climático y la resistencia frente a sequías.

ODS 13. Acción por el Clima, ya que aborda cómo las plantas responden al estrés por sequía, un problema ocasionado por el cambio climático, y proporciona herramientas genéticas para desarrollar cultivos más resilientes en condiciones de estrés hídrico.

ANEXO 2

Material vegetal

ID de accesión	Nombre accesión	Haplotipo
-	Col-0	Referencia
9512	Vid1	No relicto
9874	Oja-0	Relicto
9860	Lum-0	Relicto
9600	Vis-0	Relicto

Tabla suplementaria 1. Ecotipos de *Arabidopsis thaliana* utilizados en el proyecto.

Líneas reporteras generadas	
<i>pNST3:NST2:GFP:tNos</i>	Santos et al., no publicado
<i>pVND7:NST2:GFP:tNos</i>	Santos et al., no publicado
<i>pATHB8:NST2:GFP:tNos</i>	Santos et al., no publicado

<i>pCEL5:NST2:GFP:tNos</i>	Santos et al., no publicado
<i>pHB53:NST2:GFP:tNos</i>	Santos et al., no publicado
<i>pGATA23:NST2:GFP:tNos</i>	Santos et al., no publicado

Tabla suplementaria 2. Líneas reporteras generadas durante el proyecto.

Vectores GoldenBraid

Denominación	Código GB
pUPD2	GB0307
pDGB3_alpha1	GB0235
pDGB3_alpha2	GB0017
pDGB3_omega2	GB0021
GFP	GB2238
pUPD2_NST3ref	Sin código (Generado previamente en el laboratorio)
pTnos	GB0037
pAGM55261	Sin código (no pertenece a GB)

Tabla suplementaria 3. Vectores de entrada, vectores destino y piezas preconstruidas utilizadas en el clonaje GoldenBraid.

Cebadores

Plásmido/Nivel GB	Cebadores	Secuencia
pUPD2	GBS1(Forward)	5'GCTTTTCGCTAAGGATGATTTCTGG3'
	GBS2(Reverse)	5'GGCAAGGTGTCACCACCCTG3'
Nivel GB alpha pNST3	Forward	5'TGTAGGGTAACAACCTTTTATGT3'
	Reverse	5'CGTCATCTACATTCTACCATGT3'
Nivel GB alpha pVND7	Forward	5'CATCTCCTTCTTCTTCTTCTTC3'
	Reverse	5'TTCGCCTTCTACATACCGAACG3'
Nivel GB alpha pATHB8	Forward	5'CAACTGTTATTAGATCAACAG3'
Nivel GB alpha pCEL5	Forward	5'AGAACAGAGCAATCTGCGAT3'

Tabla suplementaria 4. Tabla de cebadores utilizados en la secuenciación de cada una de las etapas de clonaje.