
TRABAJO DE INTENSIFICACIÓN

**Especificidad en la expresión de la línea p11256-*GUS* en gemas de
Marchantia polymorpha L.**



Juan Sebastián Schneider

Tutor

Dra. María Soledad Ureta

Consejeros

Dr. Diego Carlos Zappacosta

Mag. Francisco Torres Carbonell

Consejero externo

Dra. Marina Lucía Díaz



Departamento de Agronomía
Universidad Nacional del Sur

**Trabajo desarrollado en la Universidad Veracruzana en colaboración con el
Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Xalapa, México.**



Universidad Veracruzana



Inbioteca

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
<i>Marchantia polymorpha</i> y su contexto	5
<i>Genes</i> y expresión	9
Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i>	11
La expresión genética en <i>Marchantia polymorpha</i>	13
Punto de partida	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Genotipificación	17
Tinción de GUS	18
Análisis de GUS en distintos estadios de crecimiento y desarrollo	19
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	23
Variaciones en el patrón	23
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXO	32
<i>Hemeritrina</i>	33

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	<i>Ejemplos de distintos trabajos donde se ha utilizado el gen reportero GUS y algunas características.</i>	32
Figura 1.	<i>Contexto filogenético de <i>Marchantia polymorpha</i> dentro del reino vegetal.</i>	5
Figura 2.	<i>Ciclo de vida de <i>M. polymorpha</i>.</i>	6
Figura 3.	<i>Talo femenino y talo masculino con arquegonióforos y anteridióforos.</i>	7
Figura 4.	<i>A. Gema. B. Dos conceptáculos con gemas.</i>	8
Figura 5.	<i>Individuo de <i>Marchantia polymorpha</i> con abundantes conceptáculos.</i>	8
Figura 6.	<i>Gráfico simplificado de la estructura de un gen eucariota.</i>	9
Figura 7.	<i>Talo de <i>M. polymorpha</i> de 3 días de crecimiento.</i>	10
Figura 8.	<i>Metodología utilizada para la transformación en <i>M. polymorpha</i>.</i>	11
Figura 9.	<i>A. Patrón de expresión observado en una gema. B. Patrón de expresión en un talo de tres semanas de crecimiento con conceptáculos.</i>	13
Figura 10.	<i>Esquema del trabajo previo realizado en el EPILAB de la INBIOTECA.</i>	14
Figura 11.	<i>Dos talos de 12 días de crecimiento luego de la tinción de GUS (construcción p11256-GUS). A la izquierda sin expresión del gen GUS; a la derecha una expresión casi constitutiva.</i>	19
Figura 12.	<i>Gel de agarosa realizado para observar que la calidad del ADN extraído sea la apropiada.</i>	20
Figura 13.	<i>Patrón de bandas correspondiente a las plantas analizadas de la línea p11256.</i>	20
Figura 14.	<i>Tinción de GUS sobre gemas.</i>	21
Figura 15.	<i>Tinción de GUS en distintos estadios de crecimiento en distintas líneas. A. Talo de la línea número 3 con seis días de crecimiento. B. Talo de la línea número 4 con tres días de crecimiento. C. Talo de la línea número 5 con nueve días de crecimiento. D. Talo de la línea número 6 con doce días de crecimiento.</i>	21
Figura 16.	<i>Resultados de la tinción de GUS a lo largo de 15 días para las seis líneas estudiadas.</i>	22
Figura 17.	<i>Distintos resultados de la transformación genética y sus posibles razones.</i>	24
Figura 18.	<i>Cadena de señales asociada al metabolismo del hierro intracelular.</i>	33

AGRADECIMIENTOS

A **Soledad Ureta**, por acompañarme, tolerarme y brindarme su apoyo tanto dentro del laboratorio de genética como en el resto de los aspectos de mi vida.

A mis consejeros **Diego Zappacosta** y **Francisco Torres Carbonell**, por evaluar el presente trabajo y por aconsejarme en distintos aspectos del ámbito académico y laboral.

A la Doctora **Marina Díaz**, por dedicarme su tiempo de manera desinteresada y contribuir a la corrección de este trabajo.

A todos mis **compañeros**, por hacer tan amena mi estancia al punto de no querer separarme del laboratorio.

A la **Universidad Nacional del Sur**, específicamente al **Departamento de Agronomía**, por brindarme todas las herramientas necesarias para mi formación... una carrera excelente, con excelentes personas y un ambiente de estudio incomparable.

A mi mamá **Estrella**, mi papá **Salvador**, mis hermanos **Cecilia** y **Esteban**... a mi **familia** entera, porque nunca faltó su acompañamiento, consejo y cariño.

A mi sobrino **Tobías**, por traer alegría a la familia.

RESUMEN

El interés por *Marchantia polymorpha* está creciendo en los últimos años. Su facilidad de manejo en laboratorio, la disponibilidad de la secuencia de todo el genoma y la ubicación estratégica que ocupa en la evolución de las plantas terrestres la vuelven una planta modelo que permite hacer inferencias de desarrollo y evolutivas para las plantas. En distintos momentos, a lo largo del desarrollo de un organismo y bajo diferentes condiciones, los genes son expresados. La transcripción de un gen está a cargo de secuencias llamadas promotoras, las cuales poseen información de la temporalidad y especificidad de cada gen. La utilización de genes reporteros permite detectar la expresión de un gen de interés en un momento y sitio específico. El objetivo principal de esta investigación fue caracterizar la actividad de los promotores pertenecientes a los genes *MpHHE* y *p85*, correspondientes a un gen responsable de producir la proteína llamada *hemeritrina* y a una secuencia cuya naturaleza es desconocida, respectivamente. Para esto se analizó el patrón de expresión de líneas de *Marchantia polymorpha* transformadas genéticamente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*. Dichas líneas fueron modificadas insertando una construcción molecular conteniendo los promotores de los genes *MpHHE* y *p85* fusionados transcripcionalmente con el gen reportero *GUS* (construcción p11256-*GUS* y p85-*GUS*, respectivamente). Se analizó entonces la expresión del gen reportero a lo largo del crecimiento vegetativo, desde estadio de gema y durante 15 días. Se analizaron seis líneas las cuales contenían la construcción p11256-*GUS*, dos de ellas presentaron expresión únicamente en gemas y cuatro en distintos momentos del crecimiento. Este gen mostró tendencia a expresarse mayormente en las gemas de *Marchantia polymorpha*, aunque se vio variación en los patrones observados atribuible a la aleatoriedad con que se insertó la construcción p11256-*GUS*. El interés de identificar promotores tejido-específico radica en la posibilidad de caracterizar finamente el desarrollo de las plantas y poder asignar la identidad celular visualmente gracias a la expresión de genes reporteros.

INTRODUCCIÓN

Marchantia polymorpha y su contexto

Las briófitas son plantas terrestres avasculares sin raíces verdaderas. Dentro de ellas encontramos a los musgos, los antoceros y las hepáticas. Estas plantas se caracterizan por poseer características que sirven de guía para comprender la evolución de las plantas terrestres (Bowman *et al.*, 2017). Las hepáticas son un grupo monofilético que se caracteriza por constituir el linaje más basal del grupo de las briofitas, lo que sugiere que éstas han sido las primeras plantas terrestres (Fig. 1). Por esto, este grupo es de gran interés en el estudio de la evolución de las plantas y su adaptación en tierra (Kubota *et al.*, 2013; Bowman *et al.*, 2017).

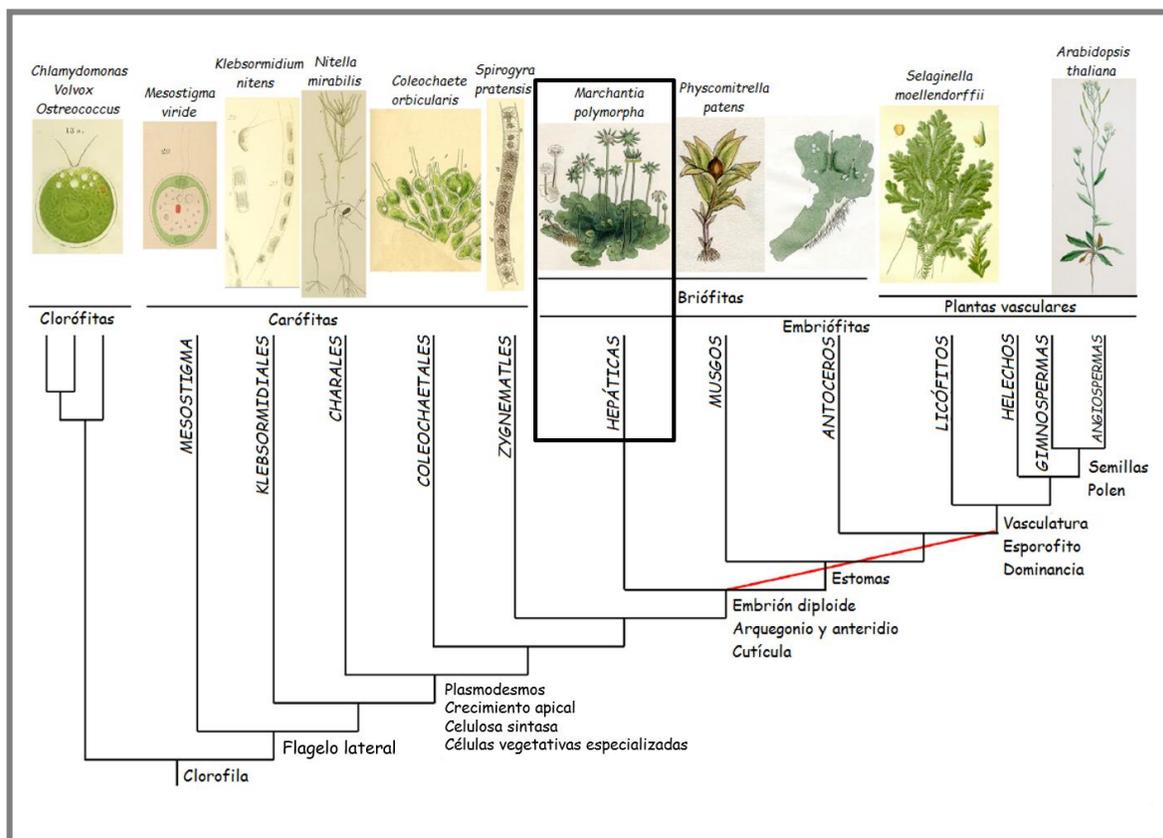


Figura 1. Contexto filogenético de *Marchantia polymorpha* dentro del reino vegetal. (Modificado de Bowman *et al.*, 2017)

Marchantia polymorpha L. es una planta hepática que ha sido utilizada con enfoques genéticos para responder diversas preguntas evolutivas en el linaje de plantas terrestres (Nishihama *et al.*, 2016). Su rápido ciclo de vida (3–4 semanas desde espora hasta talo maduro) y la reciente secuenciación de su genoma impulsan aún más la investigación sobre esta especie (Bowman *et al.*, 2016; Ishizaki *et al.*, 2016).

Marchantia se caracteriza por poseer rizoides unicelulares ventrales, no tiene estomas ni vascularización y se origina de una espora haploide. Un individuo desarrollado consta de un gametofito taloide (cuerpo haploide multicelular), el cual contiene los órganos sexuales.

La propagación de esta planta se presenta de dos maneras, sexual y asexual (Fig. 2).

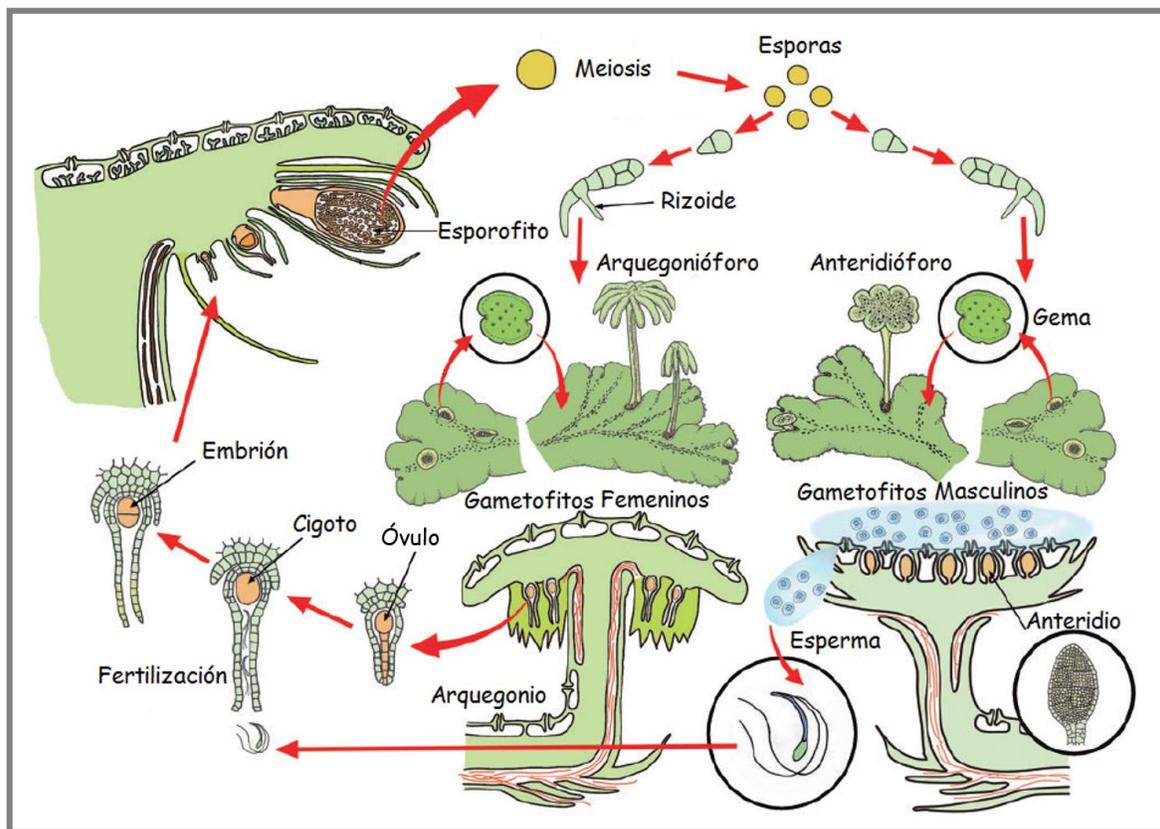


Figura 2. Ciclo de vida de *M. polymorpha*. (Modificado de Shimamura, 2016).

El ciclo de vida de una planta de *Marchantia* originada de manera sexual comienza con una espora haploide la cual da origen a un talo femenino o masculino (dioecia). Al desarrollarse el gametofito aparecen las estructuras reproductivas denominadas arquegoniόforos (femeninas) y anteridiόforos (masculinas) (*Fig. 3*). Al unirse una célula espermática con un óvulo se obtiene un cigoto, el cual se desarrolla para formar el esporofito. Aquí sucede la meiosis obteniendo miles de esporas haploides al final del ciclo.



Figura 3. Talo femenino y talo masculino con arquegoniόforos y anteridiόforos.

La manera asexual de reproducción es por medio de gemas (*Fig. 4 A*), tejidos pluricelulares discoides con dos puntos de crecimiento apical. Éstas se desarrollan en pequeñas estructuras con forma de copa llamadas conceptáculos (*Fig. 4 B y 5*). Dichos conceptáculos crecen sobre el talo de plantas adultas. Las distintas gemas que crecen dentro de un mismo conceptáculo son clones desarrollados mediante mitosis. Al madurar, las gemas se desprenden por acción de la lluvia. Una vez depositadas sobre un sustrato apropiado éstas emiten rizoides y comienzan a crecer (Shimamura, 2016).

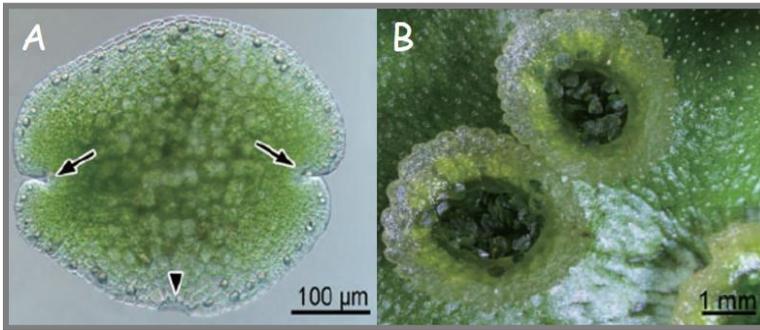


Figura 4. A. Gema (Las dos flechas del medio señalan dos sitios de crecimiento apical, la flecha inferior señala el punto de separación de la gema y conceptáculo) B. Dos conceptáculos con gemas. (Tomado de Shimamura, 2016).



Figura 5. Individuo de *Marchantia polymorpha* con abundantes conceptáculos.

Genes y expresión

La expresión específica de los genes es controlada fundamentalmente por secuencias denominadas “promotoras” (Fig. 6). Un promotor tejido–específico regula la transcripción en órganos y tejidos particulares (Díaz *et al.*, 2010). El conocimiento de éstos y su efecto tiene gran importancia para el estudio del desarrollo de los diferentes organismos (Buchanan *et al.*, 2015; Potenza *et al.*, 2004; De Guglielmo y Fernández Da Silva, 2016; Lackner y Bahler, 2008).

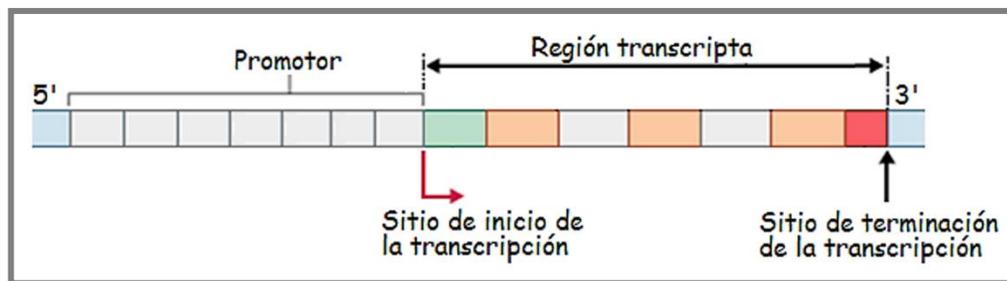


Figura 6. Gráfico simplificado de la estructura de un gen eucariota. La región transcrita contiene la secuencia molde para la síntesis de proteínas. Corriente arriba (5') se encuentra el promotor, el cual no es codificante, su función consiste en regular la expresión del gen. (Modificado de Buchanan *et al.*, 2015).

Diversos promotores han sido estudiados en muchas especies distintas, como los promotores *CaMV35S* y *CaMV19S*, aislados al comienzo de los años 80 del virus del mosaico del coliflor (CAMBIA, 2003); el promotor del virus del mosaico de la yuca (*CsVMV*) y el del virus rayado de banana (*BSV*), promotores ampliamente utilizados en pruebas para la detección molecular de organismos modificados genéticamente (Sanger *et al.*, 1990; Schenk *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Dorries *et al.*, 2010; Dutt *et al.*, 2014). Otros ejemplos son los promotores de Ubiquitina de maíz (*Ubi 1* y *Ubi 2*; Plesse *et al.*, 2001) y el promotor *MtHP* de *Medicago trunculata* aislado y caracterizado por Xiao *et al.* en el 2005. Tejido–específicos encontramos ejemplos de promotores como *hsp17* del tallo cebada; *TA29* de la antera de tabaco; *Bp10* de *Brassica* específico para polen; *TobRB7* de la raíz de tabaco y fosfoenolpiruvatocarboxilasa (PEPC) de maíz inducible por luz (Cheng *et al.*, 1998; Lamacchia *et al.*, 2001; Ghasimi *et al.*, 2009; Peremarti *et al.*, 2010).

Detectar la expresión de un gen, y con él al promotor que lo regula, comienza con el análisis del transcriptoma. Éste consiste en el conjunto de moléculas de ARN presentes en un tejido y en un momento determinado. La alta concentración de un transcripto en un tejido es indicador de un gen altamente expresado, lo que puede señalar su especificidad. Por medio de las secuencias obtenidas y mediante la bioinformática es que luego se seleccionan aquellos que reúnen las características apropiadas para ser considerados de expresión específica (Buchanan *et al.*, 2015).

Una vez seleccionadas una o varias secuencias pertenecientes a los genes cuyo transcripto se encuentra presente en un tejido específico, se procede a trabajar con los llamados “genes reporteros”. Estos genes posibilitan la observación directa de las células que los expresan. Así, al fusionar la región promotora de un gen específico con un gen reportero, se pone en evidencia el sitio de expresión que dirige el promotor (Díaz *et al.*, 2010; Buchanan *et al.*, 2015).

Un gen reportero ampliamente difundido es el gen de la β -glucuronidasa (cuyo acrónimo es *GUS*) proveniente de *E. coli*. Éste, al ser transcripto, produce un ARNm en el sitio que dirigió el promotor seleccionado, allí se traduce una enzima capaz de degradar un sustrato específico. Esta proteína puede ser detectada cualitativamente por tinción histoquímica ya que, en presencia del sustrato, cataliza la producción de un precipitado azul-índigo (Fig. 7) (Buchanan *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2010).

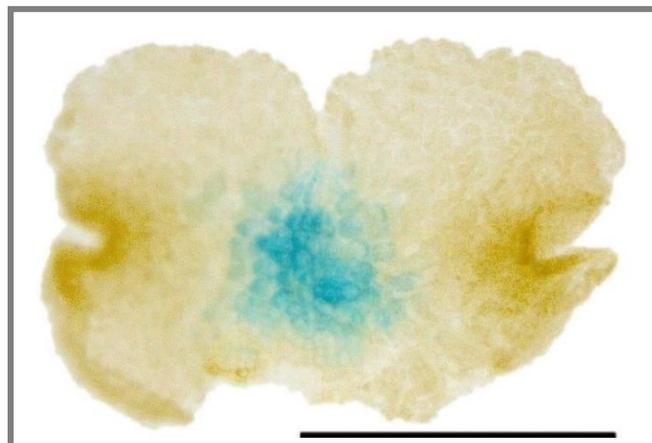


Figura 7. Talo de *M. polymorpha* de 3 días de crecimiento. El color azul indica la región donde se está expresando el gen *GUS*. La barra corresponde a 1mm.

Transformación mediada por *Agrobacterium*

Ya habiendo realizado la construcción conformada por el *promotor de interés-GUS* ésta debe integrarse al genoma de la planta estudiada. La transformación mediada por bacterias del género *Agrobacterium*, más específicamente *A. tumefaciens*, constituye uno de los métodos más difundidos en la actualidad para la integración de un transgen en un individuo. Cabe destacar que esta integración se produce al azar, cada individuo transformado contendrá el inserto en un sitio diferente de su genoma, por lo tanto, es esperable observar un fenotipo distinto entre todas las plantas provenientes de un mismo tratamiento (Díaz *et al.*, 2010).

La eficiencia de aplicación de los distintos métodos de transformación está ligada a la respuesta que presentan al cultivo *in vitro*, es por esto que *M. polymorpha* es una especie idónea para este tipo de tecnologías, ya que su cultivo en laboratorio está estandarizado y no conlleva un trabajo muy complejo (Kubota *et al.*, 2013).

La transformación en *Marchantia* tradicionalmente se realiza sobre esporas haploides, producto final de la meiosis que ocurre posteriormente al cruzamiento del talo masculino con el femenino (Fig. 8) (Ishizaki *et al.*, 2016). Esta metodología evita la formación de quimeras o mosaicos de células transformadas y sin transformar (Dong y McHughen, 1993).

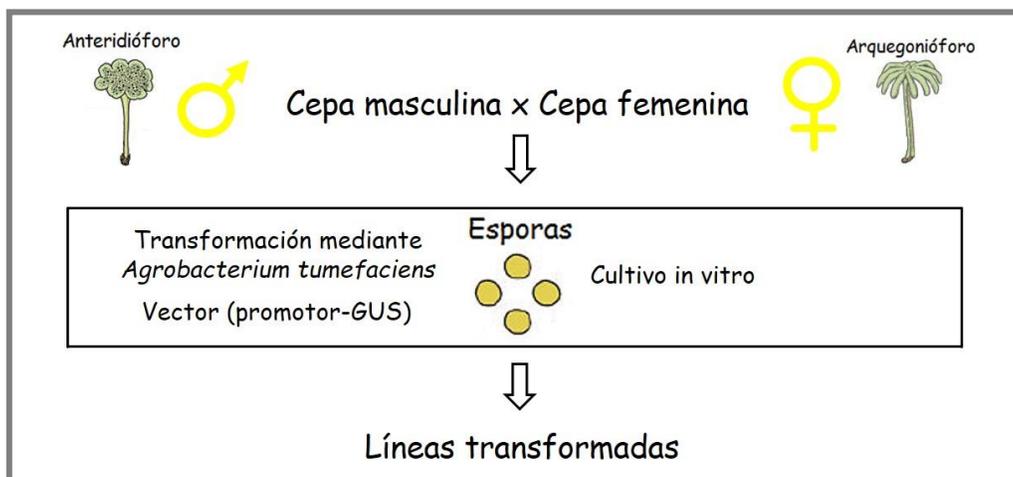


Figura 8. Metodología utilizada para la transformación en *M. polymorpha*.

Debido a que el material utilizado para la transformación es producto del cruzamiento de dos cepas distintas, el genotipo diferirá entre las plantas resultantes debido a la recombinación meiótica.

Otro método consiste en la transformación de gemas provenientes de la misma planta, las cuales se caracterizan por ser clones entre ellas y la planta que les dio origen. La importancia de este método radica en la obtención de plantas transformadas cuyo fondo genético es idéntico, además de una mayor practicidad en la metodología de trabajo que implica la manipulación de gemas en lugar de esporas (Ishizaki *et al.*, 2016).

Una vez logradas, estas plantas transformadas permiten conocer el patrón de expresión espacio-temporal controlado por la región promotora del gen de interés (Díaz *et al.*, 2010).

Son innumerables los trabajos publicados sobre la utilización del gen reportero *GUS* en distintas especies para analizar la expresión de un gen en un tejido y/o momento específico (resumen *ANEXO Tabla 1*).

La expresión genética en *Marchantia polymorpha*

Específicamente en *Marchantia* se han realizado varios trabajos con la finalidad de observar la expresión mediante genes reporteros.

Ishizaki y colaboradores en el 2012 evaluaron en plantas transgénicas de *M. polymorpha* un gen inducible por auxinas perteneciente a *Glycine max*, encontrando actividad del gen *GUS* en distintos tejidos y estadios de desarrollo. Sugirieron que las auxinas cumplen un importante papel en la propagación vegetativa.

En el 2014 Althoff y colaboradores utilizaron dos promotores pertenecientes al virus del mosaico de la coliflor fusionados junto con el gen reportero *GUS* para analizar su expresión a lo largo del desarrollo de plantas de *Marchantia*. Observaron expresión en talo, meristemas y tejidos sexuales femeninos (Fig. 9. A).

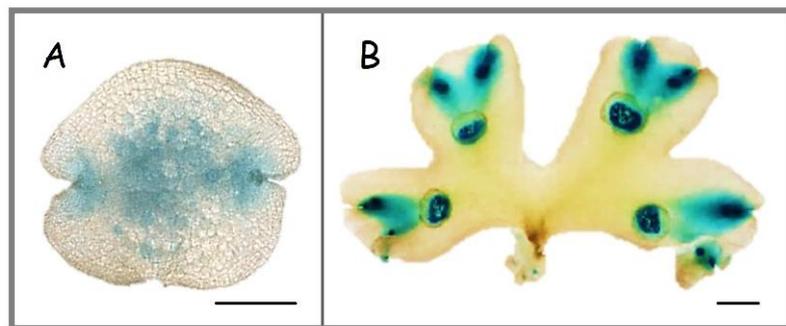


Figura 9. A. Patrón de expresión observado en una gema. La barra corresponde a 200 μ m. (Modificado de Althoff *et al.*, 2014). B. Patrón de expresión en un talo de tres semanas de crecimiento con conceptáculos. La barra corresponde a 2 mm. (Modificado de Yasui *et al.*, 2019).

Otros autores han utilizado un inserto promotor-*GUS* perteneciente a un gen inducible por choque térmico en *Marchantia*, observando la expresión en plantas sometidas a estrés térmico (Nishihama, *et al.* 2016).

Yasui y colaboradores en el 2019 analizaron el transcriptoma de los conceptáculos de *Marchantia* y aislaron un gen con gran actividad llamado GCAM1. Fusionar el promotor de este gen junto a *GUS* (GCAM1pro-*GUS*) y transformar plantas con dicha construcción les permitió detectar la expresión en regiones apicales de talos (Fig. 9. B)

Punto de partida

Previamente en el EPILAB de la INBIOTECA se analizó el transcriptoma proveniente de las gemas de *M. polymorpha*.

El transcriptoma obtenido del análisis de las gemas de *Marchantia* reveló dos moléculas de ARN altamente expresadas. Estas moléculas fueron convertidas a ADN_c para poder ser secuenciadas. Luego las secuencias se alinearon al genoma de *Marchantia* obteniendo así la ubicación específica de los dos genes y sus regiones colindantes.

La secuencia probable del promotor de cada gen fue tomada y utilizada para realizar una construcción molecular en la que se fusionó dicho promotor con el gen reportero *GUS* (Fig.10).

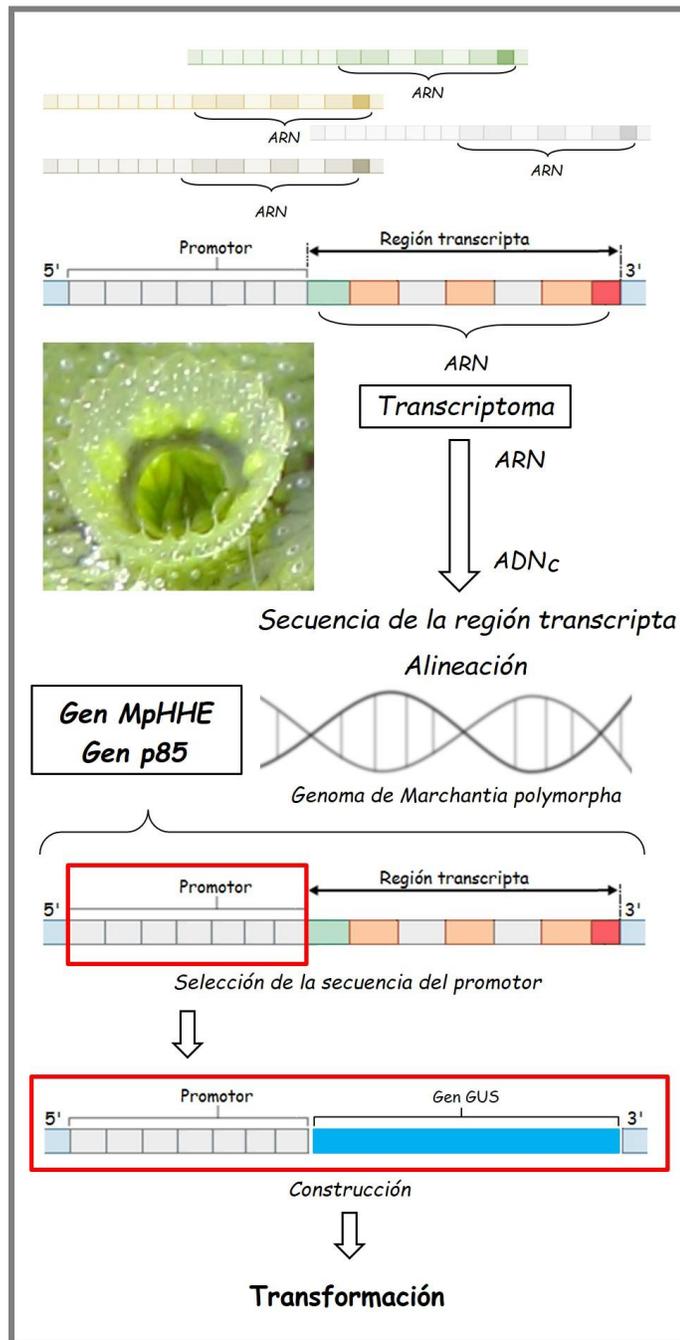


Figura 10. Esquema del trabajo previo realizado en el EPILAB de la INBIOTECA.

Por último, para obtener plantas transformadas, se cruzó la cepa masculina llamada Takaragaike-1 (Tak-1) con la femenina, Takaragaike-2 (Tak-2); ambas cepas aisladas en Kyoto Japón (Okada *et al.*, 2000). Las esporas obtenidas del cruzamiento fueron transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción antes mencionada obteniendo así las líneas p85 y p11256 (*MpHHE*), las cuales fueron utilizadas en este trabajo.

Las secuencias promotoras estudiadas pertenecen a los genes *MpHHE* y *p85*. El primero de ellos consiste en el gen responsable de producir una proteína llamada *hemeritrina* (*ANEXO Hemeritrina*). El segundo consiste en una secuencia cuyo transcripto se encontró presente en el transcriptoma, sin embargo su naturaleza es desconocida (al ser buscado en la base de datos GeneBank no se encontraron coincidencias).

Estos genes fueron seleccionados por medio del análisis del transcriptoma de las gemas de *Marchantia*, su funcionalidad no fue asociada al tejido estudiado. Este experimento forma parte de un gran número de trabajos similares desarrollados en la INBIOTECA y destinados a caracterizar los distintos genes presentes en esta planta.

HIPÓTESIS

– Los genes “p85” y “MpHHE” se expresan de manera específica en gemas de Marchantia polymorpha.

OBJETIVO GENERAL

– Analizar la expresión del gen reportero GUS en plantas transformadas de Marchantia polymorpha.

OBJETIVOS PARTICULARES

– Propagar líneas transformadas con el promotor del gen “MpHHE” y el gen GUS.

– Propagar líneas transformadas con el promotor del gen “p85” y el gen GUS.

– Identificar el patrón de expresión GUS mediante pruebas histológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

De la transformación realizada previamente se lograron 15 líneas p11256 y 20 líneas p85 (trabajo no publicado). Estas plantas fueron cultivadas en medio Gamborg (Agar 2,5 g; Azúcar 2,5 g; Gamborg 0,3875 g; Agua 250 mL) a 21 °C con luz artificial permanente durante un mes (Ishizaki *et al.*, 2016).

Genotipificación

Para verificar la presencia de la construcción en las plantas que crecieron a partir de las esporas transformadas se tomó una porción de talo con la cual se realizó la genotipificación.

Para la extracción de ADN se colocó un fragmento del talo de las plantas estudiadas en un tubo eppendorf de 1,5 mL, éste se mantuvo en nitrógeno líquido. Posteriormente se molió el material, se adicionó 500 µL de buffer CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y se incubó 15 minutos a 55 °C en un termoblock. Pasado ese tiempo se adicionaron 250 µL de la mezcla cloroformo–isopropanol (24:1) y se agitó con un vórtex. Para separar las fases se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo se tomaron 400 µL del sobrenadante y se trasvasó a un nuevo tubo donde se adicionaron 50 µL de Acetato de Sodio 7,5 M y 500 µL de etanol absoluto frío. Se invirtió suavemente y se colocó a –80 °C por 30 minutos para precipitar el ADN. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Para limpiar el pellet se agregaron 500 µL de etanol 75 % y se invirtió suavemente. Por último, se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, se eliminó el alcohol y se colocó el tubo invertido sobre papel absorbente hasta que se secó el pellet. Se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó hasta el momento de realizar la PCR (Modificado de Doyle y Doyle, 1987).

Una vez extraído el ADN, se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop.

Habiendo corroborado que la concentración de ADN y su calidad fueran las apropiadas, se amplificó el gen *GUS* mediante PCR. En un volumen final de reacción de 11 μL se colocaron: 6 μL Go Taq (Promega®), 1 μL primer *GUS* Forward (0,5 μmol), 1 μL primer *GUS* Reverse (0,5 μmol), 3 μL H_2O ultrapura y 1 μL de ADN genómico (30 ng). Para la amplificación se utilizó un programa de PCR modificado de Saiki, 1990. La desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 4 minutos, seguida por un ciclo a 94 °C por 30 segundos, a 60 °C por 30 segundos y a 72 °C por 45 segundos. Este ciclo se repitió 35 veces y se finalizó con un ciclo a 72 °C por 7 minutos.

Para observar la presencia o ausencia del gen se corrió un gel de agarosa al 2 % a 100 V por 20 minutos (Modificado de Saiki, 1990).

Tinción de GUS

Aquellas plantas cuya presencia del gen fue corroborada mediante PCR se dejaron crecer hasta obtener gemas, las cuales se utilizaron para detectar la actividad de la enzima β -glucuronidasa por medio de *tinción de GUS*.

Para la tinción se colocaron cinco gemas de cada planta en un tubo eppendorf de 1,5 mL con 100 μL de *buffer de GUS* [(pH 7.2), 0.5 mM Ferrocianuro de potasio, 10 mM EDTA, 0.01 % Triton X100 y 1 mM ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronico)]. El tubo fue colocado en vacío por 20 minutos, posteriormente se incubó durante 24hs a 37 °C. Cumplido ese tiempo se extrajo el buffer y se eliminó la clorofila del tejido con sucesivos lavados de etanol al 75, 80 y 90 % en continua agitación.

Por último, se montó el tejido en un portaobjetos con glicerina para su observación al microscopio (Althoff *et al.*, 2014).

Análisis de GUS en distintos estadios de crecimiento y desarrollo

Para observar el patrón de expresión de nuestro gen se trabajó con gemas pertenecientes a las plantas cuya PCR y tinción de *GUS* resultaron positivas. Se colocaron de diez a veinte gemas en placas de petri (dos por cada planta) con medio Gamborg. Luego se tomaron plantas cada tres días (cuatro por vez) desde el estado de gema hasta los 15 días.

Para analizar la expresión de *GUS* (Fig. 11) se procedió de la forma anteriormente descrita. A medida que las plantas eran de mayor tamaño se incrementó la cantidad de *buffer de GUS* y de las soluciones de alcohol utilizadas para clarear el tejido.

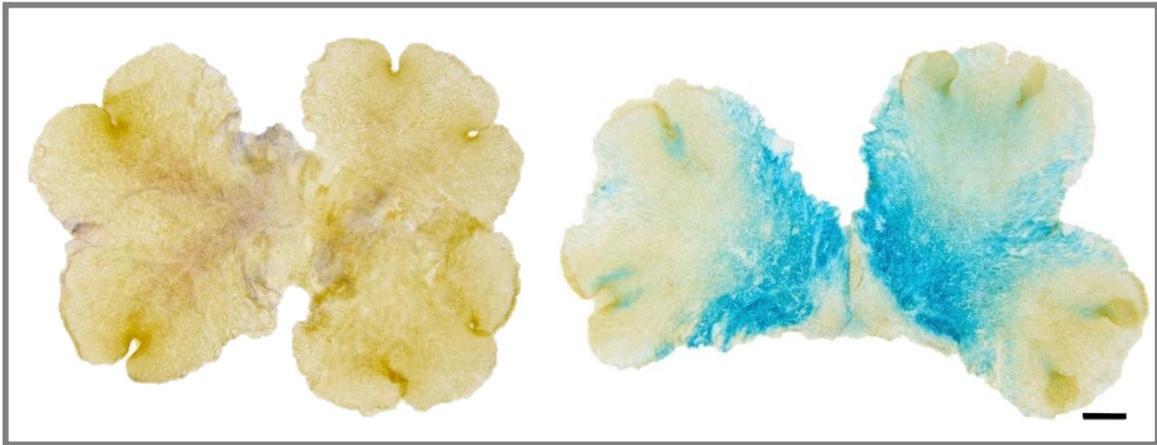


Figura 11. Dos talos de 12 días de crecimiento luego de la tinción de *GUS* (construcción p11256-*GUS*). A la izquierda sin expresión del gen *GUS*; a la derecha una expresión casi constitutiva. La barra inferior corresponde a 1 mm.

RESULTADOS

El ADN obtenido fue chequeado en agarosa y se pudo observar que no estaba degradado (Fig. 12).

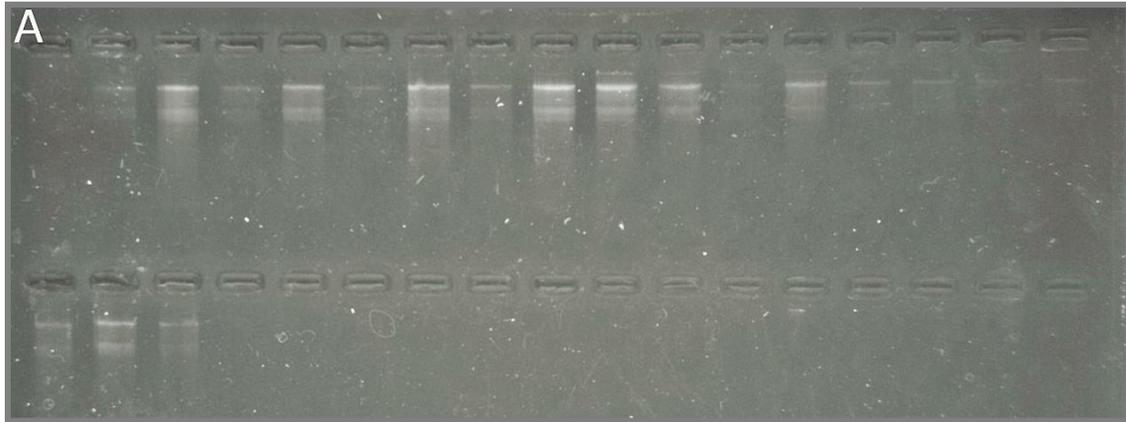


Figura 12. Gel de agarosa realizado para observar que la calidad del ADN extraído sea la apropiada.

De las 15 líneas p11256 analizadas por medio de PCR solo 7 poseían el fragmento (p11256-GUS) inserto en alguna región de su ADN (Fig. 13). De las 20 líneas p85, 18 tuvieron la construcción (p85-GUS).

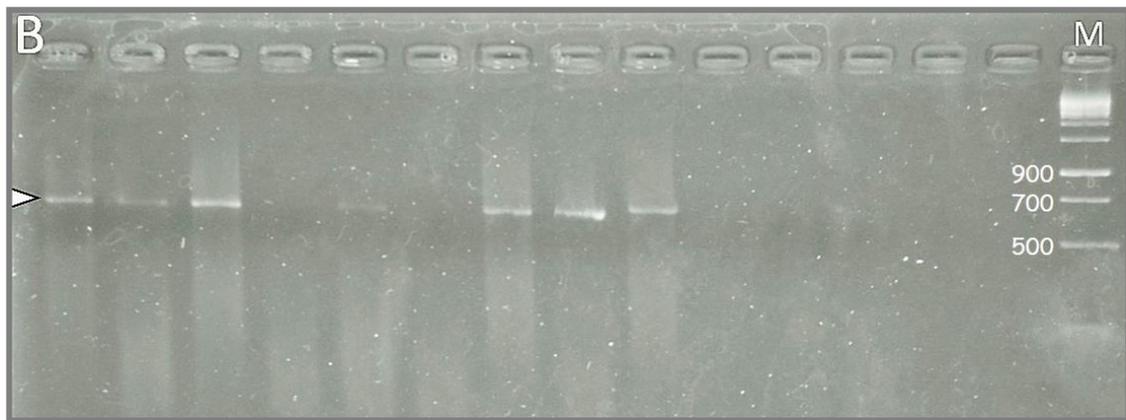


Figura 13. Patrón de bandas correspondiente a las plantas analizadas de la línea p11256. La flecha señala la banda de 600 pb correspondiente al amplicón del gen GUS. La letra M señala el marcador de peso molecular.

Ninguna de las 18 líneas p85 positivas en la PCR se tiñó al realizar la *tinción de GUS* en gema, por lo que no se pudo analizar la expresión de dicho gen en este experimento. Solo 6 de las 7 líneas p11256 que mostraron tener el fragmento dieron positivo en el ensayo histológico de *GUS*, éstas son las que se utilizaron para observar la expresión controlada por el promotor del gen *MpHHE* a lo largo del experimento.

El análisis histológico se inició en el estado de gema y se continuó durante el crecimiento de los talos hasta el día 15.

En la *Fig. 14* se muestra la actividad del gen *MpHHE* reportada por *GUS* en gemas de las seis líneas seleccionadas para el experimento. Las distintas líneas presentan una clara tendencia a la expresión en la región central en el estadio de gema.

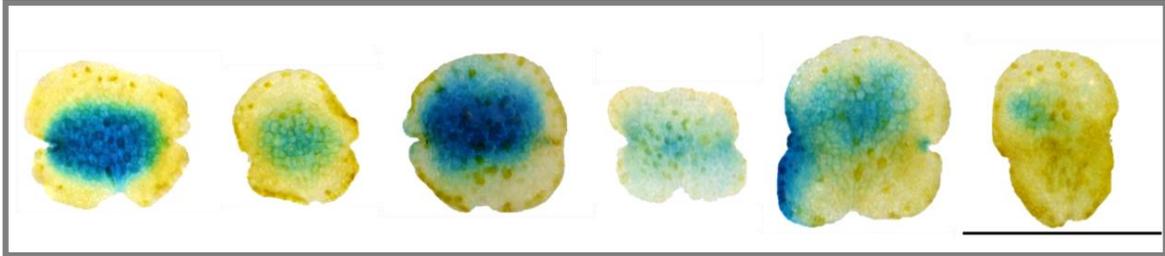


Figura 14. Tinción de *GUS* sobre gemas. De izquierda a derecha las líneas 1-6 (construcción p11256-*GUS*). La barra inferior corresponde a 1 mm.

A lo largo del crecimiento el patrón de expresión varió entre las distintas líneas. Solo dos de ellas mostraron expresión del gen únicamente en estado de gema, en las otras cuatro líneas la expresión se mantuvo hasta distintos momentos del crecimiento del talo (*Fig. 15*). Caso extremo fue la línea número 6, la cual mostró actividad del gen *GUS* durante los 15 días que duró el experimento.

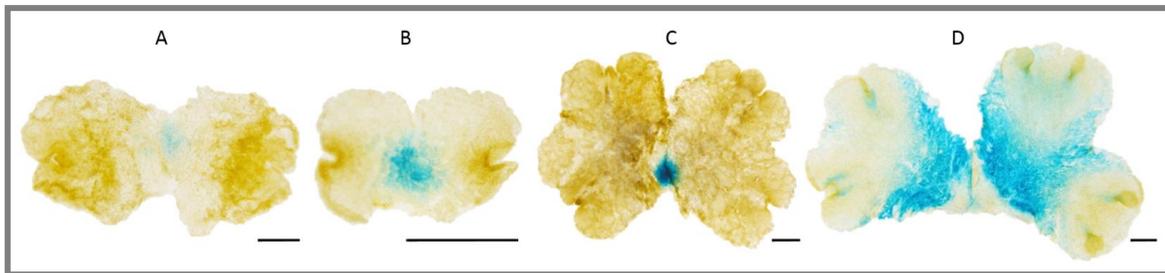


Figura 15. Tinción de *GUS* en distintos estadios de crecimiento en distintas líneas. A. Talo de la línea número 3 con seis días de crecimiento. B. Talo de la línea número 4 con tres días de crecimiento. C. Talo de la línea número 5 con nueve días de crecimiento. D. Talo de la línea número 6 con doce días de crecimiento. La barra inferior corresponde a 1 mm.

En la *Fig. 16* se muestra el patrón observado en cada línea. Las fotografías son representativas.



Figura 16. Resultados de la tinción de GUS a lo largo de 15 días para las seis líneas estudiadas. De izquierda a derecha las líneas estudiadas. De arriba hacia abajo primero las gemas y luego el talo tomado a 3, 6, 9, 12 y 15 días. Como puede observarse las líneas 1 y 2 solo han mostrado actividad del gen GUS en gemas. Las otras líneas, en cambio, mantuvieron la expresión durante más días. Nótese como la coloración azul se localiza en las distintas líneas en el centro del talo, salvo en la línea 6, la cual presentó una expresión prácticamente constitutiva. La barra de escala corresponde a 1 mm para cada grupo de muestras tomadas el mismo día.

DISCUSIÓN

Variaciones en el patrón

El patrón de expresión de un gen está determinado principalmente en la región promotora, sin embargo, esta región no es la única que ejerce control sobre él, un gen también recibe influencia del entorno donde se encuentra inserto. Otros componentes reguladores de la expresión genética, como intensificadores y silenciadores, la estructura de la cromatina o el patrón de metilación, influyen sobre el nivel y la especificidad con la que se expresa un gen transferido (transgen) (Grigliatti y Mottus, 2001; Díaz *et al.*, 2010).

Cuando se realiza una transformación con el fin de obtener un Organismo Genéticamente Modificado nos encontramos con cierta incertidumbre respecto a la posición donde se ubican los transgenes y al número de copias que se transfieren (Bhat y Srinivasan, 2002; Gelvin, 2003). Estas dos características están correlacionadas con la expresión de dicho gen. La expresión variable o la carencia de expresión del gen *GUS* pueden deberse así al llamado “*efecto de posición*”, haciendo referencia a la influencia que ejerce el sitio de ubicación sobre el inserto (Matzke y Matzke, 1998), o a la adición aleatoria de múltiples copias.

Un nivel de expresión elevado (línea 6) puede presentarse si el transgen se encuentra cerca de un elemento potenciador. Un ejemplo de un sitio con efecto de posición positivo es la región subtelomérica de los cromosomas (Bhat y Srinivasan, 2002; Gelvin, 2003).

Con respecto al silenciamiento genético (plantas cuya PCR ha señalado que tienen el gen pero no lo han expresado), tenemos dos tipos: el silenciamiento genético transcripcional, resultante de la inactivación del promotor; y el silenciamiento genético post-transcripcional, donde el promotor está activo pero los ARNm no se acumulan (Stam *et al.*, 1997).

Producto de la transformación a menudo son comunes las variaciones en la organización transgénica. Con el método utilizado para obtener las líneas para este trabajo no se puede descartar que ocurran inserciones incompletas (Gelvin, 2003; Stam *et al.*, 1997).

Si el transgen se localiza en una región heterocromática, cerca de ADN repetitivo o cromatina, su expresión puede suprimirse debido a que estas regiones del genoma son susceptibles a la metilación del ADN (Bhat y Srinivasan, 2002; Gelvin, 2003; Stam *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2010).

En el silenciamiento transgénico postranscripcional a pesar de que el transgen se transcribe el ARN resultante es inestable. Aunque la transformación mediada por *Agrobacterium* generalmente resulta en un menor número de transgenes integrados (en comparación con otros métodos), es posible encontrar copias en tándem de unos pocos fragmentos, lo que puede traducirse en una expresión baja o nula.

Por otro lado, la relación del transgen con las secuencias del gen huésped podría ser un factor importante que conduzca a la co-supresión (Stam *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 2010).

La siguiente figura resume los posibles factores responsables de la variación en la expresión.

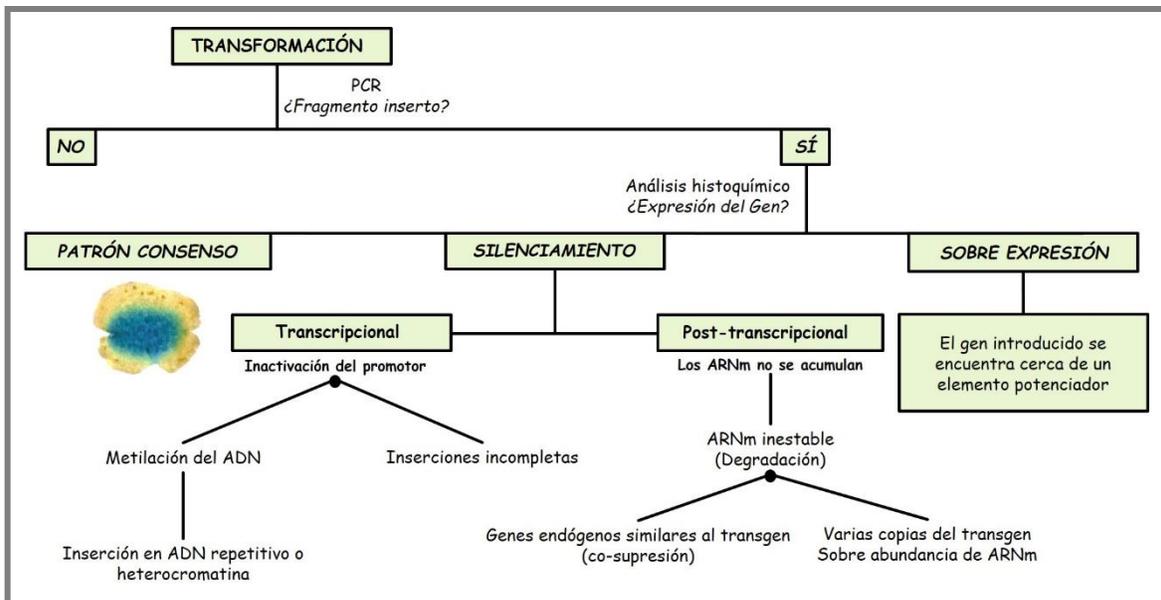


Figura 17. Distintos resultados de la transformación genética y sus posibles razones. (Modificado de Stam *et al.*, 1997)

CONCLUSIONES

Se puede afirmar que existe una tendencia a la expresión alta de la construcción *promotorMpHHE-GUS* en gemas, especialmente en su región central. La expresión continua del gen reportero en distintos momentos del crecimiento de las plantas transformadas podría significar que el promotor no es específico de un determinado estado de desarrollo. Por otro lado, la expresión centralizada señalaría cierta selectividad de tejido.

Los resultados de la presente investigación no permiten determinar la especificidad en la expresión del gen, el patrón presente en seis líneas no es suficiente para hacer un consenso al respecto. Bhat y Srinivasan en su trabajo publicado en 2002 señalan que para cualquier tipo de análisis significativo se deben incluir diez o más líneas transformadas independientemente. De esta manera no se puede concluir que el promotor del gen *MpHHE* sea funcional únicamente en gemas, es necesario generar una gran cantidad de transgénicos para hallar los verdaderos efectos del transgen y eliminar los efectos asociados. Detectar el sitio en el que se ha insertado el transgen podría ayudar a dilucidar el grado de expresión asociado a la posición que este ocupa.

Por otro lado, podría estudiarse la secuencia del promotor, analizar sus elementos, y determinar si es necesario ampliar o acortar su longitud.

Utilizar gemas para la transformación en *Marchantia polymorfa* eliminaría el efecto del genotipo presente en las esporas, aunque podría resultar en la formación de quimeras. Debe evaluarse si las variables del experimento disminuirían considerando el posible riesgo de un tejido heterogéneo.

El mejoramiento molecular involucra tanto asistencia de marcador como ingeniería genética. La información obtenida en este trabajo permite ampliar el área de conocimiento y aplicación de la biotecnología agrícola, ofreciendo herramientas con alto potencial en el mejoramiento de la composición en las características vegetales y cultivos de adaptación.

BIBLIOGRAFÍA

- Althoff, F.; Kopischke, S.; Zobell, O.; Ide, K.; Ishizaki, K.; Kohchi, T. y Zachgo, S. (2014). Comparison of the *MpEF1a* and *CaMV35* promoters for application in *Marchantia polymorpha* overexpression studies. *Transgenic Res.* 23, 235–244.
- Bae, H.; Sicher, R.; Natarajan, S. y Bailey, B. (2009). In situ expression of trehalose synthesizing genes, *TPS1* and *TPPB*, in *Arabidopsis thaliana* using the *GUS* reporter gene. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 98, 311–319.
- Beck, G.; Coman, D.; Herren, E.; Ruiz–Sola, M. A.; Rodríguez–Concepción, M.; Gruissem, W. y Vranová, E. (2013). Characterization of the GGPP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 82, 393–416.
- Benyon, L. S.; Stover, E.; Bowman, K. D.; Niedz, R.; Shatters, R. G.; Zale, J. y Belknap, W. (2013). *GUS* expression driven by constitutive and phloem–specific promoters in citrus hybrid US–802. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 49, 255–265.
- Bernal, M. P.; Remedios, D. A.; Pérez, O. V.; Rigo, M. D. y Ramos, R. A. (2016). Assessment three constitutive promoters for *GUS* expression in rice (*Oryza sativa* L., var. J–104). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18 (1), 81–89.
- Bhat, S. R. y Srinivasan, S. (2002). Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. Review. *Plant Sci.* 163, 673–681.
- Bowman, J. L.; Araki, T. y Kohchi, T. (2016). *Marchantia*: Past, Present and Future. *Plant Cell Physiol.* 57 (2), 205–209.
- Bowman, J. L.; Kohchi, T.; Yamato, K. T.; Jenkins, J.; Shu, S.; Ishizaki, K.; Yamaoka, S.; Nishihama, R.; Nakamura, Y.; Berger, F.; Adam, C.; Aki, S. S.; Althoff, F.; Araki, T. *et al.* (2017). Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome. *Cell* 171, 287–304.

- Buchanan, B. B.; Gruissem, W. y Russell L. J. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*.
- CAMBIA. (2003). Promoters used to regulate gene expression. Disponible en: http://www.patentmaze.cougarlaw.com/linked_files/promoters-for-gene-regulation.pdf.
- Cheng, X.; Sardana, R.; Kaplan, H. y Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium* transformed rice plants expressing synthetic *cryIA b* and *c* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95 (1), 2767–2772.
- De Guglielmo, C. Z. y Fernández Da Silva, R. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18 (2), 119–128.
- Díaz, M. L.; Zappacosta, D. C.; Franzone, P. M. y Ríos, R. D. (2010). Parte II capítulo 6 “Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal”. En G. Levitus; V. Echenique; C. Rubinstein; E. Hopp; L. Mroginski. (Ed.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (pp. 243–357). INTA
- Dong, J. y McHughen, A. (1993). Transgenic flax plants from *Agrobacterium* mediated transformation: incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant Sci.* 91 (2), 139–148.
- Dorries, H.; Remus, I.; Gronewald, A.; Gronewald, C. y Berghof, K. (2010). Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal. Chem.* 396, 2043–2054.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Dutt, M.; Dhekney, S.; Soriano, L.; Kandel, R. y Grosser, J. (2014). Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticul. Res.* 1, 14047.

- Fan, B.; Gao, S.; Hou, X. y Shi, G. (2010). Cloning of a flower-specific expression promoter from *Arabidopsis thaliana* and its plant expression vector construction. *For. Stud. China* 12 (4), 201–205.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (1), 16–37.
- Ghasimi, Z.; Rahnama, H.; Panahandeh, J.; Kohneh, B.; Arab, K. y Mahna, N. (2009). Green-tissue-specific, *C4-PEPC-promoter-driven* expression of *Cry IAb* makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (*Phthorimaea perculella*, Zeller). *Plant Cell Rep.* 28 (1), 1869–1879.
- Grigliatti, T. y Mottus, R. (2001). "Position Effects". En S. Brenner; J. H. Miller. (Ed.). *Encyclopedia of Genetics* (pp. 1523–1530). Academic Press.
- Hou, L.; Chen, L.; Wang, J.; Xu, D.; Dai, L., Zhang, H. y Zhao, Y. (2012). Construction of Stress Responsive Synthetic Promoters and Analysis of Their Activity in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 30, 1496–1506.
- Ishizaki, K.; Nishihama, R.; Yamato, K. T y Kohchi, T. (2016). Molecular Genetic Tools and Techniques for *Marchantia polymorpha* Research. *Plant Cell Physiol.* 57 (2), 262–270.
- Ishizaki, K.; Nonomura, M; Kato, H.; Yamato, K. T. y Kohchi, T. (2012). Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant. Res.* 125, 643–651.
- Kato, H.; Xie, G.; Sato, Y. y Imai, R. (2010). Isolation of Anther-specific Gene Promoters Suitable for Transgene Expression in Rice. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 28, 381–387.
- Kobayashi, T.; Nozoye, T; Nishizawa, N. K. (2019). Iron transport and its regulation in plants. Review Article. *Free Radic. Biol. Med.* 133, 11–20.

- Kubota, A.; Ishizaki, K.; Hosaka, M.; y Kohchi, T. (2013). Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 77 (1), 167–172.
- Lackner, D.H. y Bahler J. (2008). Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes. *Int. Rev. Cel. Mol. Bio.* 271, 199–251
- Lamacchia, C.; Shewry, P.; Di Fonzo, N.; Forsyth, J.; Harris, N.; Lazzeri, P.; Napier, J.; Halford, N. y Barcelo, P. (2001). Endosperm specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *J Exp Bot.* 52 (1), 243–250.
- Li, Z.; Jayasankar, S. y Gray, D. (2001). Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci.* 160 (1), 877–887.
- Liu, Y. J.; Han, X. M.; Ren, L. L.; Yang, H. L. y Zeng, Q. Y. (2013). Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Supergene Family in *Physcomitrella patens* Reveals Complex Patterns of Large Gene Family Evolution in Land Plants. *Plant Physiol.* 161, 773–786.
- Matzke, A. J. y Matzke, M. A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Plant Bio.* 1, 142–148
- Monticolo, F.; Colantuono, C.; y Chiusano, M.L. (2017). Shaping the evolutionary tree of green plants: evidence from the GST family. *Sci. Rep.* 7 (1), 1–9.
- Nishihama, R.; Ishida, S.; Urawa, H.; Kamei, Y. y Kohchi, T. (2016). Conditional Gene Expression/Deletion Systems for *Marchantia polymorpha* Using its Own Heat-Shock Promoter and Cre/loxP-Mediated Site-Specific Recombination. *Plant Cell Physiol.* 57 (2), 271–280.
- Okada, S.; Fujisawa, M.; Sone, T.; Nakayama, S.; Nishiyama, R.; Takenaka, M.; Yamaoka S.; Sakaida M.; Kono K.; Takahama M.; Yamato K. T.; Fukuzawa H.; Brennicke A. y Ohyama K. (2000). Construction of male and female PAC genomic libraries suitable for

- identification of Y–chromosome–specific clones from the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant J.* 24, 421–428.
- Peremarti, A.; Twyman, R.; Gomez–Galera, S.; Naqvi, S.; Farré, G.; Sabalza, M.; Miralpeix, B.; Dashevskaya, S.; Yuan, D.; Ramessar, K.; Christon, P.; Zhu, C.; Bassie, L. y Capell, T. (2010). Promotor diversity in multigene transformation. *Plant. Mol. Biol.* 73 (1), 363–378.
- Plesse, B.; Criqui, M.; Durr, A.; Parmentier, Y.; Fleck, J. y Genschik, P. (2001). Effects of the polyubiquitin gene *Ubi.U4* leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* 45 (1), 655–667.
- Potenza, C.; Aleman, L. y Sengupta–Gopalan, C. (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 40 (1), 1–22.
- Ramírez, E.; Szurek, B. y Lopez Carrascal, C. E. (2018). Factores que afectan la expresión transitoria del gen *GUS* en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 20 (2), 57–67.
- Rodríguez–Celma, J.; Chou, H.; Kobayashi, T.; Long T. A. y Balk, J. (2019). Hemerythrin E3 Ubiquitin Ligases as Negative Regulators of Iron Homeostasis in Plants. *Front. Plant Sci.* 10: 98.
- Ron, M.; Kajala, K.; Pauluzzi, G.; Wang, D.; Reynoso, M.; Zumstein, K.; Garcha, J.; Winte, S.; Masson, H.; Inagaki, S.; Federici, F.; Sinha, N.; Deal, R.; Bailey–Serres, J.; y Brady, S. (2014). Hairy Root transformation Using *Agrobacterium rhizogenes* as a Tool for Exploring Cell Type–Specific Gene Expression and Function Using Tomato as a Model. *Plant Physiol.* 166, 455–469.
- Saiki, R. K. (1990). “*PCR Protocols*”. En Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sinisky, J. T.; White, T. J. (Eds.) Academic Press Inc., 13–20.

- Sanger, M.; Daubert, S. y Goodman, R. (1990). Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaicvirus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol. Biol.* 14, 433–443.
- Schenk, P.; Remans, T.; Sagi, L.; Elliott, A.; Dietzgen, R.; Swennen, R.; Ebert, P.; Grof, C. y Manners, J. (2001). Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. *Plant Mol. Biol.* 47 (1), 399–412.
- Shimamura, M. (2016). *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant Cell Physiol.* 57 (2), 230–256.
- Stam, M.; Mol, J. N. M. y Kooter, J. M. (1997). The Silence of Genes in Transgenic Plants. Review. *Ann. Bot.* 79, 3–12
- Xiao, K.; Zhang, C.; Harrison, M. y Wang, Z. (2005). Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Mol. Breeding.* 15 (1), 221–231.
- Yan, H.; Ma, L.; Wang, Z.; Lin, Z.; Su, J.; y Lu, B. (2015). Multiple tissue-specific expression of rice seed-shattering gene *SH4* regulated by its promoter pSH4. *Rice* 8, 12.
- Yang, J.; Ordiz, M. I.; Semenyuk, E. G.; Kelly, B. y Beachy, R. N. (2012). A safe and effective plant gene switch system for tissuespecific induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica juncea*. *Transgenic Res.* 21, 879–883.
- Yasui, Y.; Tsukamoto, S.; Sugaya, T.; Nishihama, R.; Wang, Q.; Kato, H.; Yamato, K. T.; Fukaki, H.; Mimura, T.; Kubo, H.; Theres, K.; Kohchi, T. y Ishizaki, K. (2019). GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1, an Ortholog of Axillary Meristem Regulators, Is Essential in Vegetative Reproduction in *Marchantia polymorpha*. *Curr. Biol.* 29, 1–9.

ANEXO

Tabla 1. Ejemplos de distintos trabajos donde se ha utilizado el gen reportero GUS y algunas características.

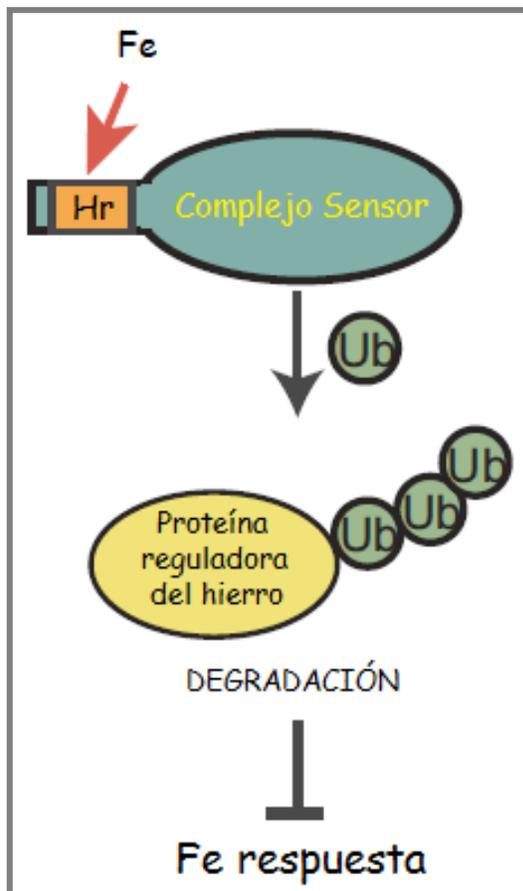
REFERENCIA Y ESPECIE	CARACTERÍSTICAS – GEN/PROMOTOR
Bae et al., 2009 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Analizaron las regiones promotoras de <i>AtTPS1</i> y <i>AtTPPB</i> . Ambos genes estudiados se expresaron casi constitutivamente. Observaron una alta expresión en tejido joven dividiéndose activamente
Fan et al., 2010 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Observaron la expresión en flor controlada por el promotor pAt <i>Chs</i> (perteneciente al gen <i>Chs</i>)
Kato et al., 2010 <i>Oryza sativa</i>	Por medio del transcriptoma confirmaron la expresión específica de genes en anteras en condiciones de enfriamiento. Aislaron las regiones promotoras de estos genes inducibles y los fusionaron con el gen <i>GUS</i>
Hou et al., 2012 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Por medio de un análisis histoquímico observaron la expresión de <i>GUS</i> impulsada por tres promotores sintéticos inducibles. Vieron un aumento de expresión en condiciones de desecación, frío y sal
Yang et al., 2012 <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Brassica juncea</i>	Señalan que con los promotores adecuados es posible controlar la expresión inducible de genes en muchos tipos diferentes de tejidos vegetales
Benyon et al., 2013 Cítricos	Expresión de promotores constitutivos y tejido específico
Beck et al., 2013 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Analizaron la expresión diferencial regulada por promotores de genes GGPPS (geranilgeranil difosfato)
Ron et al., 2014 <i>Solanum lycopersicum</i>	Utilizaron un grupo de promotores de <i>Arabidopsis thaliana</i> para evaluar los patrones de expresión en tomate
Yan et al., 2015 <i>Oryza sativa</i>	Ligaron el gen reportero <i>GUS</i> al promotor pSH4 (responsable del desgrane) para observar el sitio donde se activaba este gen. Observaron que el gen SH4 se expresaba fuertemente en la unión de la semilla y el pedicelo (y con menor intensidad en otros tejidos)
Bernal et al., 2016 <i>Oryza sativa</i>	Observaron el sitio, el nivel y el momento de expresión de genes regulados por tres promotores distintos
Ramírez et al., 2018 <i>Manihot esculenta</i>	Expresión transitoria de <i>GUS</i> en hojas de yuca

Hemeritrina

La hemeritrina es una clase de proteína perteneciente al grupo de las glutatión-S-transferasas (GST). Ésta está asociada a la síntesis de metabolitos secundarios, la defensa contra los patógenos y la desintoxicación de metales pesados y herbicidas en plantas (Liu *et al.*, 2013; Monticolo *et al.*, 2017).

Son muchos los genes que codifican estas proteínas; Monticolo y colaboradores en 2017 encontraron 37 genes GST (y dentro de ellos genes de las hemeritinas) en *Physcomitrella patens*, un musgo representante de las plantas avasculares. Por otro lado Liu y colaboradores en 2013 reportaron mediante un árbol filogenético que todos los dominios de hemeritina estaban agrupados en un clado, señalando que ésta surgió en el ancestro de las plantas terrestres.

La Hemeritina forma parte del complejo proteico asociado al metabolismo del hierro intracelular (Fig. 18). Dicho complejo media la ubiquitinación (adición de una o varias moléculas de ubiquitina) de la proteína a cargo de regular la homeostasis del Fe intracelular, esto resulta en la degradación de la proteína cuando existe un excedente de Fe.



El hierro es un nutriente esencial para las plantas, pero a la vez sus propiedades pueden volverlo tóxico. La hemeritina forma parte del balance entre la absorción, el uso y el almacenamiento de Fe, evitando un desequilibrio que pueda terminar en la intoxicación de la planta (Kobayashi *et al.*, 2019; Rodríguez–Celma *et al.*, 2019).

Figura 18. Cadena de señales asociada al metabolismo del hierro intracelular. Hr: Molécula de Hemeritina. Ub: Moléculas de Ubiquitina. (Modificado de Kobayashi *et al.*, 2019)