

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 086**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2017** **PCT/EP2017/059029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017** **WO17178633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2017** **E 17717712 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2024** **EP 3443102**

54 Título: **Método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm**

30 Prioridad:

14.04.2016 WO PCT/EP2016/058282

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.06.2024

73 Titular/es:

RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL B.V.
(100.0%)
Burgemeester Crezeelaan 40
2678 KX De Lier, NL

72 Inventor/es:

KRAGLER, FRIEDRICH;
ZHANG, WENNA y
VERELST, WIM

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 974 086 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta.

10 **Antecedentes**

Uno de los principios más fundamentales en biología es la relación entre ADN, ARN y proteínas. Generalmente, en organismos eucariotas, el ADN comprende genes, que pueden transcribirse en moléculas de ARN mensajero (ARNm), y estas moléculas de ARNm se traducen posteriormente en proteínas. Estas diferentes etapas tienen lugar en diferentes ubicaciones en una célula eucariota, el ADN está contenido dentro de un orgánulo que está ubicado dentro del citoplasma de una célula eucariota (es decir, un núcleo, mitocondria o cloroplasto). Sin embargo, el transcrito de ARNm debe exportarse de ese orgánulo, porque la traducción típicamente tiene lugar en el citoplasma de la célula, que es donde se encuentran los ribosomas requeridos para la traducción.

Por tanto, es fundamental para el funcionamiento normal de los sistemas biológicos que los transcritos de ARNm se transporten a través de membranas orgánicas, de un compartimento subcelular a otro compartimento subcelular. De esta manera, la información genética de una célula se traduce eficientemente en un gran número de proteínas diferentes que trabajan juntas para permitir que la célula mantenga su propia funcionalidad y metabolismo, y para responder adecuadamente a su entorno y señales de otras células en el organismo, y señales del entorno del organismo. Esta denominada autonomía celular conduce así a una situación en la que el fenotipo y el comportamiento de una célula está directamente unido a la propia información genética propia de la célula, en un organismo multicelular.

Sin embargo, los investigadores también han observado casos de poca autonomía, en donde una célula influye en el fenotipo de otra célula. En un organismo multicelular, tal como una planta, diferentes células se comunican entre sí y, por lo tanto, influyen y coordinan cada uno de los comportamientos y fenotipo del otro. En algunos casos, una mutación presente en el genoma de una célula puede incluso influir en el fenotipo de otra célula que no tiene dicha mutación en su genoma.

Se ha observado un buen ejemplo de no autonomía en las plantas. En la savia del floema de las plantas, se han detectado muchos transcritos de ARNm que codifican proteínas, moléculas de ARN pequeño y proteínas que pueden moverse desde una ubicación en la planta hasta otra ubicación. C. Li y col. ("A cis Element within Flowering Locus T mRNA Determines Its Mobility and Facilitates Trafficking of Heterologous Viral RNA", JOURNAL OF VIROLOGY, 2009, 83(8): 3540-3548) describe una secuencia de ácido nucleico que tiene la capacidad de permitir la movilidad intercelular del transcrito de ARNm.

Por tanto, en algunos casos una célula produce un transcrito de ARNm, y luego exporta a otra célula, donde el transcrito de ARNm puede traducirse en una proteína, y donde la proteína cumple su función. Este intercambio de información sobre largas distancias, de un tipo de célula, tejido u órgano a otro a través del tejido vascular, es muy poco conocido, pero proporciona un nuevo nivel de complejidad en cómo funcionan las plantas, cómo coordinan su propio desarrollo y crecimiento, y cómo sus órganos presentan una respuesta concertada al entorno de la planta. Revela que las células y los órganos en diferentes partes de la planta se comunican entre sí, no solo por medio de pequeñas moléculas de señalización tales como hormonas, sino también intercambiando macromoléculas de manera coordinada. Sin embargo, el modo de acción de este sistema (motivos de ARN que desencadenan la movilidad, la extensión de su transporte y su potencial a traducir en proteínas funcionales después del transporte) se desconoce en la técnica anterior.

En la investigación que conduce a la presente invención, se observó que muchos transcritos de ARNm que están presentes en la savia del floema de las plantas (y que están enriquecidos en el grupo de transcritos de ARNm que se mueven a través de uniones de injerto químicas) comprenden una estructura tipo ARNt (TLS). Se demostró que las estructuras similares a ARNt son suficientes para movilizar transcritos de ARNm, mostrando que los ARNm que albergan TLS distintivos se mueven de las raíces transgénicas en hojas de tipo natural y de hojas transgénicas en flores o raíces de tipo natural, cuando las plantas de tipo natural y transgénicas se injertan entre sí. Además, se demostró que estos transcritos de ARNm móviles se traducen en proteínas después de su transporte. También se encontró que los transcritos de ARNm::ARNt bicistrónicos (es decir, transcritos de ARNm que albergan un TLS) se producen con frecuencia en *Arabidopsis thaliana*, y que están enriquecidas en la población de ARNm móviles de injerto. Los "ARNm móviles a través del injerto" son ARNm capaces de moverse a través de la unión del injerto.

Las moléculas de ARN son potencialmente las macromoléculas biológicas más funcionalmente diversas encontradas en las células, y sus diversas funciones están determinadas por su estructura tridimensional compleja y por su secuencia primaria. Un papel biológico adicional de las secuencias de ARNt (o estructuras similares a ARNt, TLS) ahora se ha descubierto en plantas: albergan un transporte de ARNm que media en motivo a células vegetales distantes. Curiosamente, la movilidad del transcrito fue inducida por *ARNt^{Met}* y *ARNt^{Gly}*, pero no por un *ARNt^{Leu}*, en particular, lo que se correlaciona con la ausencia de este *ARNt^{Leu}* en la savia del floema de calabaza. Como los presentes resultados indican que la movilidad de la transcripción está mediada por una estructura de ARN particular, un algoritmo de escaneo de motivo de ARNt reveló de hecho que un

número significativamente alto de ARNm móviles identificados alberga un motivo TLS o se transcribe por genes en estrecha proximidad de genes de ARNt anotados que parecen producir frecuentemente un poli(A)-ARN::ARNt bicistrónicos.

Si bien el papel funcional de muchos ARNm móviles en tejidos distantes sigue siendo dilucidado, la evidencia respalda la noción de que el tráfico de pequeños miARN/ARNip y grandes ARNm a través del floema juega un papel importante en la regulación del desarrollo de las plantas. Un número sorprendentemente alto de ARNm está presente en exudados floculares y se demostró que se desplazaba a través de las uniones de injerto, pero no se pudo identificar un motivo de ARN general y fácilmente predecible o una movilidad que media de secuencia conservada en las poblaciones de transcritos móviles de injerto. Sin embargo, la presente invención ahora demuestra que una fracción significativa de ARNm móviles porta un motivo de ARNt que media la movilidad en las uniones de injerto.

La transferencia de ARN mensajero no sigue estrictamente el flujo del floema de la fuente al sumidero, ya que se pudo demostrar que las fusiones *GUS::ARNt* no sólo se desplazan del vástago (fuente) a la raíz (sumidero), sino también *viceversa*. Se encontró que dos rutas de transporte existen para suministrar moléculas de ARNm. Uno se basa en el suministro pasivo no selectivo de la fuente para hundirse a través de los vasos del floema. Sin embargo, según la invención, también se encontró otra ruta en forma de un sistema de transporte dirigido y activo. Esta vía, *entre otras cosas*, media en la transmisión de ARNm desde la raíz hasta el vástago. La presencia de un mecanismo activo de suministro de ARNm se ve respaldada por dos hallazgos según la invención, a saber, que las secuencias derivadas del ARNt son suficientes para conferir movilidad a los ARNm heterólogos, y que la supresión de un ARNt en el transcrito bicistrónico endógeno vegetal *CK1::ARNt^{Gly}*, que es naturalmente móvil, lo hace inmóvil.

Se mostró según la invención que los ARNt o estructuras de ARN estrechamente relacionadas median el transporte de un número de transcritos móviles de injerto, y que las secuencias de ARNt específicas como secuencias derivadas de ARNt^{Gly}, ARNt^{Met} y ARNt^{Met} desencadenan el transporte de transcritos no móviles, y que un número significativo de ARNm móviles alberga un motivo de ARNt.

Por tanto, la invención se basa en el hecho de que el ARNt desempeña un papel en el transporte coordinado de larga distancia de transcritos de ARNm.

En animales, también existe evidencia de transporte de ARNm intercelular de larga distancia. En el plasma humano, por ejemplo, se ha observado que la presencia de ARNm libre de células de los genes *hTERT* y *MUC1* se correlaciona con el cáncer gástrico (Tani y col., 2007, Anticancer Res. 27: 1207-1212). Ambos genes se han relacionado con la oncogénesis en seres humanos. Es concebible que la aparición de ARNm libre de células de estos genes en plasma represente un modo de comunicación entre células cancerosas y células sanas. Si las células sanas tienen un medio de absorción para estos transcritos de ARNm, pueden comenzar a producir las proteínas codificadas. Se ha informado que las células de mamífero son capaces de tomar ARNm exógeno (véase, por ejemplo, Probst y col., 2007, Gene Ther. 14: 1175-1180). Diversas mutaciones en *hTERT* se han relacionado con un mayor riesgo de diversos cánceres y, al enviar transcritos de ARNm que incluyen dicha mutación, una sola célula que porta una mutación oncogénica en su genoma (por ejemplo, como resultado de una mutación *de novo* no heredada) puede tener la capacidad de distribuir su versión mutada del transcrito de ARNm a muchas otras células que pueden no albergar dicha mutación en su propio genoma, pero que son receptivas para tomar dicho transcrito de la matriz extracelular. De tal manera, las células sanas producirán una forma mutante (y potencialmente oncogénica) de la proteína codificada, incluso cuando su propio gen endógeno que codifica esa proteína no está mutado. En el caso de *MUC1*, se ha demostrado que la regulación positiva de este gen está asociada con el cáncer (Zaretsky y col., 2006, Mol. Cancer 5: 57). Una vez más, la presencia de transcritos de ARNm de este gen en el plasma sanguíneo brindaría una oportunidad para que las células absorbieran estos transcritos de ARNm libres de células y produjeran las proteínas codificadas por ellas, independientemente de la actividad promotora de su propio gen *MUC1* endógeno. Esto puede conducir a una producción más alta que la normal de esta proteína en muchas células en el plasma, que, a su vez, puede estar unida a oncogénesis.

La aparición de transcritos de ARNm específicos de enfermedad en sangre también se ha observado en, por ejemplo, pacientes con el trastorno neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer (Koh y col., 2014, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 111: 7361-7366). Esta secreción de ARNm de neuronas puede representar una forma en la que este trastorno progresa y se propaga entre las neuronas de un paciente.

En las células animales, las proteínas y el ARN pueden secretarse a partir de células a través de vesículas en un mecanismo de secreción no convencional, que es diferente de la ruta endoplásmica (ER) /Golgi. Es posible que los ARNt desempeñan un papel en la carga selectiva de transcritos de ARNm en vesículas y/o en la secreción específica de ARNm de células en la matriz extracelular (por ejemplo, sangre, plasma). Si la presencia de un ARNt también permite que un transcrito de ARNm sea absorbido por otras células, dicho ARNt mediría esencialmente el movimiento celular a célula de los transcritos de ARNm en animales, de manera similar a lo que se ha observado en plantas en la investigación que conduce a la presente invención.

Por tanto, la invención se refiere a un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, que comprende:

- modificar un ARNt presente en el ARNm mediante la mutación del gen a partir del cual se transcribe el ARNm, o

• incluir la secuencia de un ARNt en la parte transcrita del gen, en donde el ARNt se selecciona del grupo que consiste en ARNt^{Ala}, ARNt^{Arg}, ARNt^{Asn}, ARNt^{Asp}, ARNt^{Cys}, ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu}, ARNt^{Gly}, ARNt^{His}, ARNt^{Leu}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Met}, ARNt^{Phe}, ARNt^{Pro}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Thr}, ARNt^{Trp}, ARNt^{Tyr}, ARNt^{Val}.

5 Existen esencialmente tres formas en las que la presente invención puede aplicarse para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta. Por un lado, puede evitarse la movilidad de un transcrito de ARNm que es móvil en una planta de tipo natural, modificando el ARNt que está naturalmente presente en dicho transcrito de ARNm de tal manera que ya no promueve la movilidad del transcrito de ARNm.

10 Por otro lado, un transcrito de ARNm que no es móvil en una planta de tipo natural puede hacerse móvil, proporcionando dicho transcrito de ARNm con uno o más ARNt que tienen la capacidad de promover la movilidad del transcrito de ARNm. Esta realización se puede aplicar a transcritos de ARNm de genes que son endógenos a la planta, pero también a transcritos de ARNm de genes que no son endógenos a la planta, tales como genes que se han introducido en el genoma de la planta por medio de modificación genética, o que se han introducido en la planta de manera transitoria, por ejemplo, mediante inyección, ingestión, transfección o mediante aplicación
15 exógena de moléculas de ARNm que comprenden un ARNt en la superficie de la planta, y que posteriormente se transportan más dentro de la planta y se importan a las células en virtud de la presencia de dicho ARNt.

20 En una tercera realización, la movilidad de un transcrito de ARNm puede cambiarse en el sentido de que el destino de la transcripción dentro de la planta (es decir, el tipo de célula, tejido u órgano donde el transcrito de ARNm se mueve hacia en una planta de tipo natural) cambia como resultado de modificaciones en el ARNt. En caso de que se vinculen diferentes destinos en la planta a diferentes ARNt, la modificación del ARNt original de un ARNm puede dirigir la transcripción a un destino diferente dentro de la planta, lo que da como resultado una producción ectópica de la proteína codificada.

25 La modificación de ARNt e inclusión de dichos ARNt en transcritos se puede lograr mediante modificación genética. La modificación genética comprende modificación transgénica o transgénesis, usando un gen de una especie que no se puede cruzar o un gen sintético, y modificación cisgénica o cisgénesis, usando un gen natural, que codifica un rasgo de la propia planta o de una planta donadora de sexualmente compatible.

30 En una realización, la planta cuya movilidad intercelular del ARNm de un gen debe modificarse es una planta dicotiledónea, una planta monocotiledónea, una gimnosperma o una briófita.

35 En el contexto de esta invención, el término “planta” pretende incluir no sólo plantas multicelulares vivas, sino también cultivos de tejidos y cultivos celulares que se han derivado de plantas multicelulares vivas. Al igual que una planta viva, dichos cultivos de tejidos o cultivos celulares consisten en múltiples células, entre las cuales se puede intercambiar ARNm de células.

En una primera realización de la invención, la movilidad intercelular está entre células en diferentes órganos de una planta.

40 La movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta puede producirse a través de las membranas plasmáticas de las células vecinas en un tejido, o puede producirse a través de las membranas plasmáticas de las células que no están posicionadas adyacentes entre sí en un tejido. En la primera realización, dicha movilidad puede aprovechar los propios medios de la planta para el transporte de larga distancia y la comunicación de célula a célula y/o de la matriz extracelular, tal como el tejido vascular (floema y/o xilema) o el apoplasto en las plantas. Las células que no están situadas unas junto a
45 otras en un tejido pueden ser, por ejemplo, células que pertenecen a diferentes tejidos u órganos de la planta, o células que no están unidas ni conectadas a otras células, como los granos de polen en la antera de una planta, etcétera.

50 En el curso del desarrollo y crecimiento normales, el intercambio de transcritos de ARNm entre células parece ser común. Sin embargo, también puede ser un fenómeno que desempeña un papel importante en el establecimiento y/o progresión de una enfermedad o en la defensa de la planta contra la enfermedad, ya que permite el transporte de material genético, en forma de un ARNm ya transcrito, desde una célula hasta otras células, incluso a grandes distancias dentro de una planta. Esto implica que la presencia en una planta de una única célula que alberga en un gen de su genoma una mutación que provoca un determinado efecto en la proteína codificada por dicho gen, puede dar como resultado la exportación del ARNm que comprende dicha mutación a muchas otras células en la planta que, en su propio genoma, carecen de dicha
55 mutación. Por tanto, esto puede conducir a una situación en la que las células que carecen de una mutación en su propio material genético importan moléculas de ARNm que comprenden dicha mutación, y posteriormente traducen esa molécula de ARNm en la proteína que está codificada por dicha molécula de ARNm. El efecto del mismo es que las células que carecen de dicha mutación pueden producir y albergar una proteína que comprende dicha mutación. Los transcritos de ARNm de una célula mutada podrían afectar al comportamiento y/o fenotipo de una multitud de células no mutadas en la misma planta, si las moléculas de ARNm enviadas por dicha célula mutada son móviles y pueden moverse de la célula mediante la cual se han producido a otra célula en la misma planta donde pueden traducirse en proteínas. Este mecanismo puede ser, por ejemplo, relevante en la corriente sanguínea de animales, donde esencialmente todas las células están en una posición para comunicarse entre sí por medio de moléculas que están presentes en la sangre, y en plantas, en donde todos los órganos están conectados entre sí por medio del tejido vascular.

65

Alternativamente, la célula puede no estar mutada, pero puede someterse a un estímulo, lo que hace que produzca un transcrito de ARNm específico o una forma de empalme específica de un transcrito de ARNm. Este transcrito específico o forma de empalme del mismo puede transportarse posteriormente a otras células en la planta, que no habían recibido (aún) ese estímulo, o que son incapaces de responder al estímulo. En las plantas, por ejemplo, las células de una hoja pueden responder a un cambio en la calidad de la luz y señalar esta percepción a las raíces. Las células de la raíz pueden detectar cambios en la disponibilidad de agua en el suelo y comunicarlos, por ejemplo, a las células estomáticas. Los transcritos de ARNm móviles pueden constituir una parte de tales señales de comunicación intercelular entre diferentes partes de una planta.

En una realización, la invención se refiere a un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, que comprende modificar un ARNt presente en el ARNm mediante la mutación del gen a partir del cual se transcribe el ARNm. La mutación del gen puede incluir deleccionar la secuencia del ARNt del gen, mutar la secuencia del ARNt para cambiar la configuración tridimensional del mismo, o insertar un elemento genético (tal como, por ejemplo, un transposón, un retrotransposón, una inserción de T-ADN, o una secuencia repetida retroviral) en el gen para eliminar el ARNt, de la parte transcrita del gen, de manera que la secuencia que codifica el ARNt ya no se transcribe como parte del ARNm al que inicialmente pertenecía, cambiando así la movilidad de ese ARNm.

La delección de la secuencia del ARNt del gen se puede lograr, por ejemplo, usando herramientas de edición del genoma tales como CRISPR-Cas, usando dos ARN guía diseñados para dirigirse respectivamente a secuencias aguas arriba y aguas abajo de la secuencia codificante del ARNt en el gen, conduciendo así a roturas de doble cadena en el gen aguas arriba y aguas abajo de la secuencia codificante del ARNt en el gen, lo que puede dar como resultado la eliminación de dicha secuencia codificante del ARNt del gen. Alternativamente, la delección de la secuencia del ARNt del gen se puede lograr *in vitro*, usando técnicas convencionales de biología molecular o técnicas de síntesis de genes, y posteriormente introduciendo un constructo de ADN que codifica un transcrito bicistrónico de ARNt::ARNm, o el propio transcrito transcrito *in vitro*, en la planta.

La configuración tridimensional de un ARNt suele incluir estructuras de bucle de tallo: de 5' a 3' son el brazo D (o bucle de tallo D), el brazo A o anticodón (o bucle de tallo A, o bucle de tallo anticodón) y el brazo T (o brazo T Ψ C, brazo T Ψ C o bucle de tallo T Ψ C). Entre los brazos A y T puede estar presente un bucle variable. La mutación de la secuencia del ARNt para cambiar la configuración tridimensional de la misma puede comprender deleccionar parte de la secuencia transcrita de la misma, mutar uno o más nucleótidos implicados en la formación de una estructura de tallo-bucle en el ARNt, o insertar uno o más nucleótidos en un tallo-bucle del ARNt.

Las mutaciones pueden inducirse al azar o de manera dirigida, usando diversos métodos de mutagénesis conocidos en la técnica anterior. Los métodos de mutagénesis *in vitro* incluyen, por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio, la mutagénesis mediada por PCR y la síntesis total de genes. La mutagénesis *in vivo* puede conseguirse, por ejemplo, de forma aleatoria mediante uno o varios compuestos químicos, como el metanosulfonato de etilo, la nitrosometilurea, la hidroxilamina, la proflavina, la N-metil-N-nitrosoguanidina, la N-etil-N-nitrosourea, la N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina, sulfato de dietilo, imina de etileno, azida sódica, formalina, uretano, fenol, óxido de etileno, y/o por medios físicos, como irradiación UV, exposición a neutrones rápidos, rayos X, irradiación gamma, y/o por inserción de elementos genéticos, como transposones, ADN-T, elementos retrovirales. Las mutaciones también pueden introducirse específicamente por medio de recombinación homóloga, inducción de mutación basada en oligonucleótidos o métodos de edición del genoma dirigidos tales como TALEN, tecnología de dedos de zinc o CRISPR-Cas.

En una realización, deleccionar parte de la secuencia transcrita del ARNt en un gen comprende deleccionar los bucles de tallo A y/o T del ARNt. Tal como se muestra en el ejemplo 2, la eliminación de las estructuras de tallo-bucle A y T da como resultado la abolición de movilidad de un transcrito de ARNm que es móvil cuando están presentes las estructuras de tallo-bucle A y T. La eliminación del tallo-bucle D, de los bucles de tallo D y T o de los bucles de tallo D y A de un gen no abolió la movilidad del mismo transcrito de ARNm.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, en donde el cambio en la movilidad da como resultado una pérdida de la función del gen. Este es el caso de genes cuyo transcrito de ARNm se transcribe en un tipo de célula, tejido u órgano de una planta, pero cuyo producto génico (la proteína codificada) funciona en al menos otro tipo de célula, tejido u órgano de la planta, donde su transcrito de ARNm no se produce. Para tales genes, la movilidad intercelular de su transcrito de ARNm es, por tanto, esencial para la funcionalidad normal del gen en la planta. La pérdida de movilidad intercelular del transcrito de ARNm de dicho gen da como resultado una pérdida de la función del gen en las células, tejidos u órganos hacia los que se mueve el transcrito de ARNm durante el crecimiento, desarrollo y/o funcionamiento normal de la planta y en el que normalmente se traduce en proteína. La pérdida de movilidad intercelular del transcrito de ARNm conduce así a la ausencia o la presencia reducida del producto génico (es decir, la proteína codificada) en las células, tejidos u órganos donde el transcrito de ARNm se mueve durante el crecimiento normal, desarrollo y/o funcionamiento de la planta. El fenotipo de dichas células, tejidos u órganos puede verse afectado por esta ausencia o presencia reducida, y la morfología, capacidad de respuesta y/o funcionalidad de dichas células, tejidos u órganos puede verse afectada por el mismo. Esta situación se ilustra en el ejemplo 3, que muestra que la pérdida de movilidad del transcrito del gen *CK1* en las plantas da lugar a la ausencia del transcrito *CK1* en el floema, y a un fenotipo muy similar al que podría observarse en un mutante con inactivación génica que careciera por completo del transcrito *CK1*.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, que comprende la inclusión de la secuencia codificante de un ARNt en la parte transcrita del gen.

5 En una realización, la presente invención se refiere a un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, en el que el cambio en la movilidad resulta en la presencia ectópica del producto génico en la planta. De esta manera, un transcrito de ARNm que no muestra movilidad intercelular puede ser móvil, incluyendo un ARNt en dicho transcrito.

10 También se describe en el presente documento un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, en el que el gen es un gen no endógeno en al menos parte de la planta. Esta situación se ilustra en el ejemplo 2, en el que la adición de un ARNt a la 3'UTR del gen que codifica la β -glucuronidasa (*GUS*) hace que el transcrito *GUS* sea móvil, y conduce a la traducción de la proteína en partes distantes de la planta, a través de una unión de injerto. Esta situación también se ilustra en el ejemplo 1, en el que se proporciona una versión modificada de *DMC1* en forma de construcción de ADN en un portainjerto transgénico. La modificación comprende la adición de un ARNt en la 3'UTR del gen, y un truncamiento del gen que convierte la proteína codificada en una versión dominante-negativa que interfiere con la función de la *DMC1* de tipo natural. Se demuestra que dicho transcrito modificado es transportado hacia las esporas masculinas en una púa injertada, donde la proteína codificada (que es una versión dominante-negativa de *DMC1*) afecta posteriormente al desarrollo.

20 De manera adecuada, la inclusión de la secuencia codificante de un ARNt en la parte transcrita del gen se consigue introduciendo la secuencia complementaria del ARNt en una construcción de ADN que comprende la secuencia complementaria del ARNm, o introduciendo la secuencia complementaria del ARNt en el gen endógeno, mediante, por ejemplo, herramientas de edición del genoma tales como CRISPR-Cas.

25 En una realización, la secuencia codificante de un ARNt se introduce en la región 3' no traducida (3'UTR) del ARNm del gen. Preferiblemente, la secuencia codificante de un ARNt se introduce después del codón de parada de un gen, de forma que esté presente en la parte transcrita del gen pero no afecte al marco de lectura abierto del gen. Alternativamente, la secuencia codificante de un ARNt también puede introducirse en la región 5' no traducida (5'UTR) del ARNm del gen, o en el marco de lectura abierto del gen, de tal forma que la secuencia codificante no se interrumpa o el marco de lectura se desplace.

30 El constructo de ADN puede integrarse de forma estable en el genoma de la planta, expresarse transitoriamente en la planta o transcribirse *in vitro*. Dicho constructo de ADN comprende un promotor adecuado que es capaz de impulsar la expresión del gen en un entorno adecuado. Existen, por ejemplo, promotores ubicuos, específicos de un órgano, tejido o tipo celular, y promotores constitutivos o regulados por colas ambientales (físicas o biológicas) o endógenas (de desarrollo), o regulados por sustancias químicas.

35 Las secuencias de control del promotor constitutivo adecuadas para mamíferos incluyen, entre otras, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), el promotor del virus simio (SV40), el promotor tardío principal del adenovirus, el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK), promotor del factor de elongación (ED1)-alfa, promotores de ubiquitina, promotores de actina, promotores de tubulina, promotores de inmunoglobulina, fragmentos de los mismos, o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

40 Las secuencias de control de promotores constitutivos adecuadas para plantas incluyen, entre otros, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), promotores de opina, promotores de ubiquitina, promotores de actina, promotores de tubulina, promotores de alcohol deshidrogenasa, fragmentos de los mismos o combinaciones de cualquiera de los anteriores.

45 Los ejemplos de secuencias de control promotor reguladas adecuadas para animales o plantas incluyen, sin límite, las reguladas por choque térmico, frío, sequía, metales pesados, esteroides (tales como dexametasona, β -estradiol), antibióticos o alcoholes (tales como etanol).

50 Los ejemplos no limitativos de promotores de mamíferos específicos de tejido incluyen el promotor de B29, el promotor de CD14, el promotor de CD43, el promotor de CD45, el promotor de CD68, el promotor de desmina, el promotor de elastasa-1, el promotor de endoglina, el promotor de fibronectina, el promotor de Fit-1, el promotor de GFAP, el promotor de GPIIb, el promotor de ICAM-2, el promotor de INF-13, el promotor de Mb, el promotor de Nphs1, el promotor de OG-2, el promotor de SP-B, el promotor de SYN1 y el promotor de WASP.

55 Los ejemplos no limitativos de promotores de tejidos específicos de plantas incluyen los promotores de β -faseolina, glutenina, a-Kaf, zeína, β -conglucina y AGPasa (para la expresión específica de semillas), los promotores de LAT52, GEX2, MAN5 y FRK4 (para la expresión específica de polen), los promotores de roId, REO, Prx y Tip2 (para la expresión específica de raíces), y los promotores de Zmglp1, PnGLP y PDX1 (para la expresión específica de hojas).

60

La secuencia promotora puede ser de tipo natural o puede modificarse para una expresión más eficiente o eficaz. En un ejemplo ilustrativo, el ADN codificante puede unirse operativamente a un promotor CMV para la expresión constitutiva en células de mamífero.

5 En determinadas realizaciones, la secuencia de un gen endógeno o no endógeno puede unirse operablemente a una secuencia promotora que es reconocida por una ARN polimerasa de fago para la síntesis *in vitro* de ARNm. En tales realizaciones, el ARN transcrito *in vitro* puede purificarse para su administración a una planta. Por ejemplo, la secuencia promotora puede ser una secuencia promotora T7, T3 o SP6 o una variación de una secuencia promotora T7, T3 o SP6. En una realización a modo de ejemplo, el ADN que codifica la proteína de fusión está unido de forma operable a un promotor T7 para la síntesis *in vitro* de ARNm usando ARN polimerasa T7.

En realizaciones alternativas, la secuencia de un gen endógeno o no endógeno puede unirse operablemente a una secuencia promotora para la expresión *in vitro* en células bacterianas o eucariotas.

15 El constructo de ADN o el transcrito de ARN sintetizado *in vitro* pueden introducirse en la planta por diversos métodos conocidos en la técnica anterior.

20 Cuando un constructo de ADN está destinado a la integración estable en el genoma de una planta o a la expresión transitoria en una planta, puede introducirse en dicha planta o en una célula derivada de ella mediante (micro)inyección, ingestión, transfección, electroporación, tratamiento con DEAE-dextrano, lipofección, transfección mediada por nanopartículas, transducción mediada por dominios de transducción de proteínas, administración de genes mediada por virus, transfección de protoplastos mediada por PEG, infección con un virus o bacteria adecuados (tal como *Agrobacterium* para plantas), etcétera.

25 Cuando un constructo de ADN se destina a la transcripción *in vitro* del ARNm codificado, la transcripción *in vitro* puede lograrse usando cualquier sistema de transcripción *in vitro* conocido en la técnica. Alternativamente, la transcripción también puede realizarse en una planta heteróloga, tras lo cual el transcrito de interés se purifica posteriormente para su uso posterior.

30 Un transcrito de ARN sintetizado *in vitro* puede introducirse en la planta o en una célula derivada de ella mediante los métodos enumerados anteriormente (tal como la inyección en el torrente sanguíneo de un mamífero o en el floema de una planta), y también mediante, por ejemplo, la aplicación exógena en la superficie de la planta. La aplicación exógena puede realizarse, por ejemplo, según lo descrito en la solicitud de patente WO2015/200539. La aplicación exógena a cultivos celulares o de tejidos puede realizarse, por ejemplo, mediante electroporación, transfección, etcétera.

35 Cuando se introduce en una planta un transcrito de ARN sintetizado *in vitro*, no se necesita un promotor adecuado, porque la transcripción no tiene por qué tener lugar dentro de las células de la planta. Dicho transcrito puede traducirse inmediatamente, y/o puede pasar a las células de la planta y de una célula de la planta a otras células de la planta. Según la invención, el movimiento del transcrito se debe a la presencia de ARNt.

40 Otra aplicación es el uso de células cultivadas que producen un transcrito de ARNm que alberga un ARNt para su aplicación *in vivo* en una planta. Por ejemplo, las células cultivadas que albergan un gen que, cuando se transcribe, da lugar a un transcrito de ARNm que alberga un ARNt, pueden inyectarse (o administrarse de otro modo) en el torrente sanguíneo de un mamífero, donde dichas células secretan un transcrito de ARNm que alberga un ARNt en la matriz extracelular. Este transcrito de ARNm puede ser captado posteriormente por otras células de la planta, debido a la presencia de un ARNt. Esto constituye una forma eficaz de administrar transcritos de ARNm *in vivo*. Dicho transcrito de ARNm puede codificar cualquier proteína que pueda administrarse a la planta. En una realización adicional, dicho transcrito de ARNm codifica una proteína terapéutica, una proteína de origen endógenamente o una versión modificada de la misma, o una proteína no endógena. De manera adecuada, la administración de dichas células a la planta es para el tratamiento de una enfermedad, o para terapia génica.

50 En una realización, la secuencia complementaria de un ARNt se introduce en la parte transcrita de un gen en un constructo de ADN, y el gen que comprende el ARNt se transcribe *in vitro*. El transcrito de ARNm que comprende el ARNt se introduce posteriormente en una planta, un cultivo celular o un cultivo de tejidos, de forma que pueda pasar a las células y de una célula a otras. Esta realización representa una aplicación de la presente invención que no requiere el uso de constructos de ADN *in vivo*. La manera en que el transcrito de ARNm que comprende el ARNt se introduce en una planta, cultivo celular o cultivo de tejidos, depende del tipo de planta, cultivo celular o cultivo de tejidos que se está utilizando. Los medios por los que se puede lograr la introducción comprenden, por ejemplo, la inyección en el torrente sanguíneo de los animales, la inyección en el tejido vascular o en el apoplasto de las plantas, o la aplicación exógena en la superficie de la planta. El uso de péptidos de penetración celular puede, por ejemplo, facilitar la entrada del transcrito de ARNm en la planta.

60 La eficacia de tales estructuras incompletas para conferir movilidad a un transcrito de ARNm se ha demostrado en el ejemplo 2 y en la figura 4C. En una realización, el ARNt se selecciona del grupo que consiste en ARNt^{Ala}, ARNt^{Arg}, ARNt^{Asn}, ARNt^{Asp}, ARNt^{Cys}, ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu}, ARNt^{Gly}, ARNt^{His}, ARNt^{Leu}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Met}, ARNt^{Phe}, ARNt^{Pro}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Thr}, ARNt^{Trp}, ARNt^{Tyr}, ARNt^{Val}. En otra realización, el ARNt se selecciona del grupo que consiste en ARNt^{Ala}, ARNt^{Arg}, ARNt^{Asn}, ARNt^{Asp}, ARNt^{Cys}, ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu}, ARNt^{Gly}, ARNt^{His}, ARNt^{Ile}, ARNt^{Leu}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Met}, ARNt^{Phe}, ARNt^{Pro}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Thr}, ARNt^{Trp}, ARNt^{Tyr}, ARNt^{Val} y y carece del tallo-bulce D, los tallo-bulces D y T, o los tallo-bucles D y A.

En otra realización, el ARNt comprende un anticodón de ARNt con una secuencia de 5' a 3' en el ARNm transcrito seleccionada del grupo que consiste en AGC, CGC, UGC, ACG, CCG, CCU, UCG, UCU, GUU, GUC, GCA, CUG, UUG, CUC, UUC, ACC, CCC, GCC, UCC, GUG, AAU, AAG, CAA, CAG, GAG, UAA, UAG, CUU, UUU, CAU, GAA, AGG, CGG, UGG, AGA, CGA, GCU, GGA, UGA, AGU, CGU, UGU, CCA, GUA, AAC, CAC, UAC. En otra realización, el ARNt comprende un anticodón de ARNt con una secuencia de 5' a 3' en el ARNm transcrito seleccionada del grupo que consiste en AGC, CGC, UGC, ACG, CCG, CCU, UCG, UCU, GUU, GUC, GCA, CUG, UUG, CUC, UUC, ACC, CCC, GCC, UCC, GUG, AAU, AAG, CAA, CAG, GAG, UAA, UAG, CUU, UUU, CAU, GAA, AGG, CGG, UGG, AGA, CGA, GCU, GGA, UGA, AGU, CGU, UGU, CCA, GUA, AAC, CAC, UAC y carece del tallo-bucle D, o el tallo-bulces D y T.

Tal como se muestra en el ejemplo 2, existen algunos ARNt que tienen una estructura tridimensional que no promueve la movilidad intercelular de un transcrito de ARNm, tal como ARNt^{lle} con anticodón UAU.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, en la que dicha planta consiste en un portainjerto de una primera planta sobre la que se ha injertado una púa de una segunda planta, y en la que se ha cambiado la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en la primera y/o la segunda planta. Esta realización se ha ilustrado en los ejemplos 1-3, con *Arabidopsis* y *Nicotiana* (tabaco).

Esta realización puede llevarse a cabo con cualquier especie vegetal para la que sea posible el injerto. Las plantas comercialmente relevantes que pueden injertarse son, por ejemplo, las pertenecientes a los géneros *Apium*, *Beta*, *Brassica*, *Capsicum*, *Cichorium*, *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Benincasa*, *Daucus*, *Eruca*, *Lactuca*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Lens*, *Raphanus*, *Solanum*, *Spinacia*, *Valerianella*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Arabidopsis*, *Capsella*, *Arabis*, *Cardamine*, *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Vitis*, *Rosa*, *Fragaria*, *Populus*, *Fagus*, *Pinus*, *Picea*, *Ginkgo*, *Larix*, *Betula*, *Quercus*, *Salix*, *Alnus*, *Corylus*, *Amygdalus*, *Vaccinium*, *Rubus*, *Persea*, *Citrus*, *Castanea*, *Acer*, *Fraxinus*, *Coffea*, *Camellia*, *Theobroma*, *Olea*, *Cicer*, *Juglans*, *Pistacia*, *Arachis*, *Anacardium*, *Macadamia*, *Ficus*, *Litchi*, *Actinidia*, *Bougainvillea*, *Helianthus*, *Hibiscus*, *Malva*, *Gossypium*, *Cannabis*, *Stevia*, *Opuntia* e *Ipomoea*. Esto es, por supuesto, una lista no exhaustiva.

En general, muchas plantas dicotiledóneas pueden injertarse, mientras que las monocotiledóneas no. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un método para injertar especies recalcitrantes como la soja (*Glycine max*) y especies comercialmente importantes de la familia Poaceae, como el maíz (*Zea mays*), el arroz (*Oryza sativa*), el trigo (*Triticum aestivum*), etcétera (*T. Harada*, solicitud de patente europea EP2918161). También se describe la aplicación del método anterior.

Este método tiene diversas aplicaciones distintas. En primer lugar, puede cambiarse la movilidad intercelular de un ARNm de un gen endógeno. Esto puede hacerse cambiando el gen codificador en el patrón o en la púa de una planta injertada, y puede conducir a una pérdida de movilidad para un transcrito de ARNm que es naturalmente móvil en la planta, o a una ganancia de movilidad para un transcrito de ARNm que es naturalmente no móvil en la planta. En caso de una ganancia de movilidad, el transcrito de ARNm puede moverse a través de la unión del injerto. En caso de pérdida de movilidad, el portainjerto o la púa pueden quedarse sin el transcrito del ARNm, lo que puede provocar efectos fenotípicos. La modificación del gen codificante puede realizarse de todas las formas descritas anteriormente, como la mutagénesis, la edición del genoma y/o el uso de transgenes.

El fenotipo del portainjerto y/o de la púa puede cambiar. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el movimiento de un transcrito de ARNm móvil a través de la unión del injerto, donde complementa la ausencia de ese transcrito de ARNm en el portainjerto o en la púa debido a una mutación. Esto representa, por tanto, un método de complementación de mutantes, mediante el injerto de una planta mutante en una planta de tipo natural y el rescate del fenotipo mutante por medio de un transcrito de ARNm móvil que compensa la ausencia del correspondiente transcrito de ARNm endógeno.

Además de cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen endógeno, es posible, por supuesto, inducir mutaciones adicionales en dicho transcrito de ARNm, como mutaciones puntuales, o inducir otras modificaciones en dichos transcritos de ARNm, tales como inserciones o deleciones. Tales mutaciones o modificaciones adicionales pueden, por ejemplo, tener un efecto sobre la secuencia primaria de la proteína codificada, y sobre la estructura y/o función de la proteína codificada. Un ejemplo de esto se presenta en el ejemplo 1, en el que se usa una forma modificada (dominante-negativa) de *DMC1* para interferir con la función de *DMC1* en las esporas masculinas.

En segundo lugar, un gen no endógeno puede ser móvil en una planta. El uso de genes no endógenos, tales como genes informadores, es una práctica común en la biología molecular, pero el patrón de expresión de dichos genes no endógenos depende completamente del uso de un promotor adecuado, que es capaz de impulsar la expresión de un gen en la planta. Los promotores adecuados se han analizado anteriormente en este texto. Esta situación se ilustra en el ejemplo 2, con β -glucuronidasa (GUS).

Otro ejemplo de gen no endógeno para el que es interesante hacer móvil su transcrito de ARNm en una planta es Cas9. Cas9 es una endonucleasa guiada por ARN que tiene la capacidad de crear roturas de doble cadena en el ADN *in vitro* e *in vivo*, también en células eucariotas. Forma parte de un sistema de defensa adaptativo mediado por ARN conocido como repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) en bacterias y arqueas. Cas9 adquiere especificidad de secuencia cuando se asocia con una molécula de ARN guía, que puede dirigirse a secuencias

presentes en el ADN de una planta en función de su secuencia. Cas9 requiere la presencia de un motivo adyacente protoespaciador (PAM) inmediatamente después de la secuencia de ADN a la que se dirige el ARN guía. La enzima Cas9 se aisló por primera vez de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), pero se han descrito homólogos funcionales de muchas otras especies bacterianas, tales como *Neisseria meningitidis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus thermophilus*, *Francisella novicida*, *Staphylococcus aureus*, etcétera. Para SpCas9, la secuencia PAM es 5'-NGG-3', mientras que se ha demostrado que varias proteínas Cas9 de otras bacterias reconocen secuencias PAM diferentes. En la naturaleza, el ARN guía es un dúplex entre ARNcr y ARNtracr, pero se ha demostrado que una sola molécula de ARN guía (ARNsg) que comprende tanto ARNcr como ARNtracr funciona igual de bien (Jinek y col., 2012, Science 337: 816-821). La ventaja de usar un ARNsg es que reduce la complejidad del sistema CRISPR-Cas9 hasta dos componentes, en lugar de tres. Para su uso en una configuración experimental (*in vitro* o *in vivo*) esto es una simplificación importante.

Una alternativa para Cas9 es, por ejemplo, Cpf1, que no necesita un ARNtracr para funcionar, que reconoce una secuencia PAM diferente y que crea cortes de extremos pegajosos en el ADN, mientras que Cas9 crea extremos romos.

Por un lado, pueden aplicarse técnicas de modificación genética para expresar una endonucleasa guiada por ARN y/o ARN guía en células eucariotas. Uno o más constructos de ADN que codifican una endonucleasa guiada por ARN y al menos un ARN guía pueden introducirse en una célula o planta mediante transformación estable (en donde el constructo de ADN se integra en el genoma) o mediante expresión transitoria (en donde el constructo de ADN no se integra en el genoma, pero expresa una endonucleasa guiada por ARN y al menos un ARN guía de forma transitoria). Este enfoque requiere el uso de un vector de transformación y un promotor adecuado para la expresión en dicha célula o planta. Las plantas en las que se ha introducido ADN extraño se consideran organismos modificados genéticamente (OMG), y lo mismo se aplica a las células derivadas de ellas y a la descendencia de estas plantas. En partes importantes del mercado alimentario mundial, los alimentos transgénicos no están permitidos para el consumo humano, y no son apreciados por el público. Por tanto, se necesita un método alternativo, "sin ADN", de suministro de componentes CRISPR-Cas en plantas intactas, que no implique la introducción de constructos de ADN en la célula o la planta.

En la técnica anterior, se ha descrito la introducción del ARNm que codifica Cas9 en una célula u organismo, tras la transcripción *in vitro* a partir de un constructo de ADN que codifica una endonucleasa guiada por ARN, junto con al menos un ARN guía. Este enfoque no requiere el uso de un vector de transformación y un promotor adecuado para la expresión en dicha célula u organismo.

Otro enfoque conocido es el ensamblaje *in vitro* de complejos de ribonucleoproteínas (RNP), que comprenden una proteína endonucleasa guiada por ARN (por ejemplo, Cas9) y al menos un ARN guía, y la posterior introducción del complejo RNP en una célula u organismo. El estatus de OMG de este enfoque aún no está claro, pero la introducción de complejos RNP en organismos intactos es un reto técnico.

En plantas, se ha demostrado el uso de RNP en protoplastos, por ejemplo con transfección con polietilenglicol (PEG) (Woo y col., 2015, Nat. Biotech. 33: 1162-1164). Sin embargo, la aplicabilidad de esta técnica depende completamente de la disponibilidad de protocolos para la regeneración de plantas completas de protoplastos. Dichos protocolos no están disponibles para todas las plantas y, por lo tanto, existe la necesidad de un método de administración alternativo de componentes CRISPR-Cas en células vegetales y en plantas intactas.

Una aplicación específica de la presente invención implica la movilización de un ARNm que codifica la endonucleasa guiada por ARN en una planta. Tal como se muestra en el ejemplo 1 con el ARNm que codifica *DMC1*, los transcritos de ARNm que están presentes en el floema de una planta son capaces de llegar a las esporas masculinas de la planta. Cuando se adopta un enfoque similar con un ARNm que codifica una endonucleasa guiada por ARN, no sólo es posible modificar el genoma de las células somáticas de una planta, sino también el genoma de su línea germinal masculina, en presencia de al menos un ARN guía adecuado. Esta última categoría de modificaciones del genoma es hereditaria, ya que puede transmitirse a la siguiente generación.

De manera adecuada, el gen de la endonucleasa guiada por ARN puede codificarse mediante una construcción de ADN que se integra en el genoma de una planta, sobre la que posteriormente se injerta otra planta. De este modo, las células del portainjerto albergan un constructo transgénico, pero las células de la púa no. Sin embargo, cuando el transcrito de ARNm que codifica la endonucleasa guiada por ARN comprende un ARNt, se vuelve móvil y es capaz de cruzar la unión del injerto, y el transcrito que codifica la endonucleasa guiada por ARN puede administrarse en células de la púa, donde la proteína endonucleasa guiada por ARN puede traducirse. En esta situación, las células de la púa producen una proteína que no está codificada en su propio genoma, y esta proteína es capaz de modificar una secuencia cromosómica en dichas células, cuando al menos un ARN guía adecuado está presente en dichas células.

Alternativamente, el transcrito de ARNm que codifica la endonucleasa guiada por ARN y que comprende un ARNt puede introducirse en una planta mediante inyección directa, por ejemplo, en el tejido vascular, o mediante aplicación exógena, como se ha descrito anteriormente. Dicho transcrito se comportará entonces como si se hubiera producido dentro de la planta, y se suministrará a las células de la planta, donde la proteína codificada se traducirá y donde realizará su función. El injerto no es entonces un requisito.

Después de que haya tenido lugar dicha modificación de una secuencia cromosómica, las células pueden usarse para producir plantas que alberguen dicha modificación en su genoma, usando cualquier método de regeneración de plantas conocido en la técnica (tal como cultivo de tejidos *in vitro*).

- 5 El transcrito de ARNm que codifica la endonucleasa guiada por ARN se puede traducir a la proteína codificada dentro de las esporas masculinas de una planta, donde la proteína codificada puede modificar una secuencia cromosómica en presencia de al menos un ARN guía adecuado. El al menos un ARN guía puede introducirse, por ejemplo, en las células mediante inyección en la antera, el floema u otras partes de la planta, transformación mediada por *Agrobacterium* o aplicación exógena, o puede estar codificado por un constructo de ADN que está presente en las células de la planta que produce dichas esporas masculinas. Dichas esporas pueden producirse por la púa de una planta injertada. Se ha demostrado que muchas moléculas de ARN pequeño (de tamaño comparable al de un ARN guía típico) son móviles en el floema y pueden desplazarse sistémicamente por toda la planta y a través de las uniones de los injertos. También se ha demostrado que dichas moléculas pequeñas de ARN son capaces de alcanzar las esporas masculinas de una púa cuando se transcriben en un portainjerto (véase, por ejemplo, la solicitud de patente WO2013017683).
- 10
- 15 Por tanto, también se describe un método para modificar una secuencia cromosómica en una célula o espora vegetal, que comprende:
 - a) combinar una primera planta que comprende un portainjerto, que alberga una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína endonucleasa modificada, no natural, guiada por ARN, con una púa de una segunda planta injertada en el portainjerto de dicha primera planta, por lo que dicha secuencia de ácido nucleico genera un transcrito en el portainjerto de la primera planta, transcrito que se transporta sistémicamente a través de la unión del injerto para entrar en la púa de la segunda planta, y transcrito que se importa en las células de la púa de la segunda planta, donde se traduce en una proteína funcional;
 - 20 b) proporcionar al menos un ARN guía o ADN que codifique al menos un ARN guía a al menos una célula o espora de la púa de la segunda planta, donde el al menos un ARN guía es una molécula única que comprende una región 5' que es complementaria a un sitio diana en una secuencia cromosómica de dicha segunda planta;
 - 25 c) permitir que cada ARN guía dirija una proteína endonucleasa guiada por ARN a un sitio diana en la secuencia cromosómica, donde la proteína endonucleasa guiada por ARN introduce una rotura de doble cadena en el sitio diana, y permitir que la célula repare la rotura de doble cadena mediante un proceso de reparación del ADN de forma que la secuencia cromosómica se modifique en al menos una célula o espora de la púa de la segunda planta.
- 30 La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína endonucleasa modificada, no natural, guiada por ARN puede ser un transgén integrado de forma estable o expresado transitoriamente.
- 35 La proteína endonucleasa guiada por ARN puede derivarse de una proteína Cas. La proteína Cas es adecuadamente Cas9, o una variante de la misma. La proteína Cas procede, por ejemplo, del género *Streptococcus*.
- 40 La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína endonucleasa modificada, no natural, guiada por ARN puede comprender un ARNt que permite que el transcrito sea transportado sistémicamente a través de la unión del injerto desde el portainjerto de la primera planta a la púa de la segunda planta. La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína endonucleasa modificada, no natural, guiada por ARN puede comprender además al menos una señal de localización a un orgánulo que contiene ADN y, opcionalmente, un dominio marcador. Los ejemplos no limitativos de dominios marcadores son marcadores fluorescentes (tales como la proteína fluorescente verde, la proteína fluorescente amarilla, mCherry), etiquetas epitópicas (tales como FLAG, His, HA, calmodulina), etcétera.
- 45 La señal de localización se selecciona adecuadamente del grupo que comprende una señal de localización nuclear, una señal de direccionamiento del cloroplasto, una señal de direccionamiento mitocondrial.
- 50 La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína endonucleasa modificada, no natural, guiada por ARN puede comprender opcionalmente además un dominio de endonucleasa FokI u otro dominio proteico.
- 55 El ARNt puede ser ARNt^{Ala}, ARNt^{Arg}, ARNt^{Asn}, ARNt^{Asp}, ARNt^{Cys}, ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu}, ARNt^{Gly}, ARNt^{His}, ARNt^{Leu}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Met}, ARNt^{Phe}, ARNt^{Pro}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Thr}, ARNt^{Trp}, ARNt^{Tyr}, ARNt^{Val}.
- El ARNt se localiza en la 3'UTR del transcrito, en la 5'UTR del transcrito o en la secuencia codificante del transcrito.
- 60 El ARN guía puede ser un ARN guía de cadena simple, en el que el ARN guía es un ARN dirigido al ADN que comprende a) un primer segmento que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia cromosómica en una célula vegetal o espora, y b) un segundo segmento que interactúa con una proteína endonucleasa guiada por ARN. De manera adecuada, el ARN guía es un ARN guía de cadena simple que comprende un ARNcr y un ARNtracr.
- 65 La expresión de una secuencia de ácido nucleico transgénico en la primera planta se consigue convenientemente uniendo operablemente dicha secuencia de ácido nucleico a una secuencia promotora que confiere a la secuencia

de ácido nucleico transgénico un perfil de expresión ubicuo o un perfil de expresión específico de tejido o tipo celular, y/o a un promotor inducible. Los promotores adecuados se han analizado anteriormente.

La secuencia promotora puede conferir a la secuencia de ácido nucleico transgénico un perfil de expresión que abarque las raíces.

Cuando la expresión de la secuencia de ácido nucleico transgénico en la primera planta es transitoria, la expresión transitoria se consigue adecuadamente mediante el uso de un promotor inducible, seleccionado del grupo que comprende promotores inducibles por calor, promotores inducibles por frío, promotores inducibles por sustancias químicas, promotores inducibles por esteroides y promotores inducibles por alcohol. Los promotores adecuados se han analizado anteriormente.

El suministro del al menos un ARN guía o del ADN que codifica el al menos un ARN guía a al menos una célula o espora de la púa de la segunda planta se realiza adecuadamente mediante inyección, transformación mediada por *Agrobacterium*, aplicación exógena, o integración estable o expresión transitoria de un constructo de ADN.

En el presente documento también se describe un método, en el que la aplicación exógena del al menos un ARN guía o ADN que codifica el al menos un ARN guía comprende aplicar sobre la púa de la segunda planta o una parte de la misma una mezcla que comprende:

a) un polímero catiónico;

b) un osmolito; y

c) el al menos un ARN guía o el ADN que codifica el al menos un ARN guía, en donde el al menos un ARN guía es una molécula única que comprende una región 5' que es complementaria a un sitio diana en una secuencia cromosómica de dicha segunda planta. La aplicación exógena puede realizarse según lo descrito en la solicitud de patente WO2015/200539.

En este último método, una secuencia cromosómica de al menos una célula o esporas de la segunda planta se modifica genéticamente sin la inserción de material genético externo.

En este último método, la primera planta y la segunda planta pertenecen en particular a la misma familia de plantas. De manera adecuada, la primera planta y la segunda planta pertenecen al mismo género, en particular a la misma especie vegetal.

La planta puede pertenecer a uno de los siguientes géneros: *Beta*, *Brassica*, *Capsicum*, *Cichorium*, *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Benincasa*, *Daucus*, *Eruca*, *Lactuca*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Raphanus*, *Solarium*, *Spinacia*, *Valerianella*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Arabidopsis*, *Capsella*, *Arabis*, *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Vitis*, *Rosa*, *Fragaria*, *Populus*, *Fagus*, *Pinus*, *Picea*, *Ginkgo*, *Larix*, *Betula*, *Quercus*, *Salix*, *Alnus*, *Corylus*, *Amygdalus*, *Vaccinium*, *Rubus*, *Persea*, *Citrus*, *Castanea*, *Acer*, *Fraxinus*, *Coffea*, *Camellia*, *Theobroma*, *Olea*, *Cicer*, *Juglans*, *Pistacia*, *Arachis*, *Anacardium*, *Macadamia*, *Ficus*, *Litchi*, *Actinidia*, *Bougainvillea*, *Helianthus*, *Hibiscus*, *Malva*, *Glycine*, *Gossypium*, *Cannabis*, *Stevia*, *Opuntia* o *Ipomoea*.

También se describe en el presente documento el método en el que no se realiza el injerto (por ejemplo, cuando el ARN guía y el transcrito codificante de la endonucleasa guiado por ARN se administran a la planta mediante un método de administración sin ADN, como, por ejemplo, la inyección del ARN guía y el transcrito de ARNm codificante de la endonucleasa guiado por ARN en el floema de la planta), la planta puede pertenecer a uno de los siguientes géneros: *Allium*, *Apium*, *Beta*, *Brassica*, *Capsicum*, *Cichorium*, *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Benincasa*, *Daucus*, *Eruca*, *Lactuca*, *Lagenaria*, *Luffa*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Lens*, *Raphanus*, *Solanum*, *Spinacia*, *Valerianella*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Arabidopsis*, *Capsella*, *Arabis*, *Cardamine*, *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Vitis*, *Rosa*, *Fragaria*, *Populus*, *Fagus*, *Pinus*, *Picea*, *Ginkgo*, *Larix*, *Betula*, *Quercus*, *Salix*, *Alnus*, *Corylus*, *Amygdalus*, *Vaccinium*, *Rubus*, *Persea*, *Citrus*, *Castanea*, *Acer*, *Fraxinus*, *Coffea*, *Camellia*, *Theobroma*, *Olea*, *Cicer*, *Juglans*, *Pistacia*, *Arachis*, *Anacardium*, *Macadamia*, *Ficus*, *Litchi*, *Actinidia*, *Bougainvillea*, *Helianthus*, *Hibiscus*, *Malva*, *Glycine*, *Gossypium*, *Cannabis*, *Stevia*, *Opuntia*, *Ipomoea*, *Manihot*, *Humulus*, *Acacia*, *Medicago*, *Trifolium*, *Lotus*, *Vicia*, *Linum*, *Fagopyrum*, *Zea*, *Triticum*, *Avena*, *Hordeum*, *Oryza*, *Zizania*, *Secale*, *Triticosecale*, *Sorghum*, *Bambusa*, *Dendrocalamus*, *Saccharum*, *Cymbopogon*, *Pennisetum*, *Panicum*, *Festuca*, *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Miscanthus*, *Asparagus*, *Agave*, *Yucca*, *Cocos*, *Elaeis*, *Phoenix*, *Amaryllis*, *Narcissus*, *Aloe*, *Canna*, *Iris*, *Colchicum*, *Crocus*, *Gladiolus*, *Juncus*, *Lilium*, *Tulipa*, *Musa*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Vanilla*, *Typha*, *Zingiber*, *Curcuma*, *Lemna*.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los ejemplos que siguen y que no pretenden limitar la invención de ninguna manera. En los ejemplos se hace referencia a las siguientes figuras.

Figura 1. DMC1 dominante-negativo como constructo reportero causa esterilidad masculina en flores.

(A) Esquema de los constructos de ARN de fusión *DN*DMC1 usados. *A. thaliana* *DN*DMC1 codifica una proteína truncada que carece de los 92 aminoácidos N-terminales e interfiere de forma dominante en la meiosis, dando lugar a polen deforme y esterilidad masculina parcial. La secuencia codificante de *DN*DMC1 se fusionó con secuencias

StBEL5 móviles en el injerto o con *ARN^{tMet}* del floema en la 3'UTR para evaluar su potencial para desencadenar el transporte de ARNm de *DNDMC1* a través de las uniones del injerto.

(B) a (E) Las anteras fértiles de las plantas de *Nicotiana tabacum* de tipo natural muestran una producción regular de polen con un mínimo de polen de forma anómala (2-3 %), mientras que las plantas de tabaco transgénico con *ARNip hpDMC1* producen un elevado número de polen de forma anormal y son estériles, tal y como se ha descrito previamente (Zhang y col., 2014). Las plantas transgénicas *YFP-DNDMC1* tienen una producción de polen normal similar a las de tipo natural. Las plantas transgénicas que expresan *DNDMC1* fusionada con *ARN^{tMet}* o *StBEL5* en la 3'UTR muestran una mayor esterilidad masculina.

(C) y (E) Los granos de polen teñidos con yoduro de propidio cosechados de plantas transgénicas se visualizaron mediante microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) y se evaluaron mediante un algoritmo de análisis automático de imágenes para contar el polen con forma anormal (Zhang y col., 2014), indicado por números en %. Las flechas indican polen normal; las puntas de flecha indican polen de forma anómala. Barras de escala: 30 µm.

(F) y (G) Esquema de los injertos de tallo realizados para evaluar el transporte de ARNm a las flores de tipo natural.

Figura 2. El transporte del transcrito de fusión *DNDMC1* induce la formación aberrante de polen.

(A) Flores de plantas madre de tipo natural injertadas con *35S_{pro}*: Las púas transgénicas *YFP-DNDMC1* y los injertos recíprocos son fértiles.

(B) Panel superior: Las plantas injertadas de tipo natural/tipo natural o de tipo natural//*DNDMC1::ARN^{tMet}* mostraron una producción normal de polen cuando fueron tratadas con simulacro. Panel inferior: La expresión inducida por estradiol de *DNDMC1::ARN^{tMet}* en partes de la planta madre o púa dio lugar a anteras parcialmente estériles tanto en flores transgénicas como de tipo natural. Esto último sugiere el transporte del ARNm *DNDMC1::ARN^{tMet}* al interior de los meiocitos masculinos de tipo natural y la expresión de la proteína DMC1 truncada en los mismos.

(C) Flores de plantas transgénicas *DNDMC1::StBEL5* injertadas. Panel superior: Los injertos de tipo natural tratados con estradiol >>>*DNDMC1::StBEL5* mostraron una esterilidad masculina débil. Panel inferior: Las flores de las plantas injertadas tratadas con estradiol presentan esterilidad masculina parcial.

(D) Los ensayos RT-PCR en muestras de ARN de tejidos de tipo natural injertados revelaron que el transcrito de control *YFP-DNDMC1* no se asigna sobre las uniones de injerto en hojas de patrón de tipo natural (n=6) o flores de púa (n=8). La RT-PCR específica de *ACTIN2* (*ACT2*) se utilizó como control positivo.

(E) Ensayos RT-PCR en muestras de ARN de plantas injertadas. *DNDMC1::ARN^{tMet}* y *DNDMC1::StBEL5* se detecta en flores de púas transgénicas y de tipo natural. La aparición de un producto PCR específico en muestras de hojas de cepas de tipo natural injertadas y flores de tipo natural (asteriscos rojos) sugiere la movilidad del transcrito de fusión *DNDMC1::ARN^{tMet}*. El número de plantas injertadas probadas se muestra a la derecha.

(F) Imágenes CLSM de sépalos formados en púas productoras de *YFP-DNDMC1*. Panel superior: Injerto de control *YFP-DNDMC1* / *YFP-DNDMC1* con la esperada alta fluorescencia verde emitida por *YFP-DNDMC1*. Panel central: Injerto de control con plantas madre productoras de *ARNip (hpDMC1)* con baja fluorescencia YFP esperada y distribución en flores *YFP-DNDMC1* (Zhang y col., 2014). Panel inferior: La púa *YFP-DNDMC1* injertada en la cepa transgénica *DNDMC1::ARN^{tMet}* muestra niveles de fluorescencia YFP similares a los de los injertos de control *DNDMC1::ARN^{tMet}*. Obsérvese que la proteína de fusión *YFP-DNDMC1* se detecta en todas las células epidérmicas de la hoja, excepto cuando se injerta con líneas *hpDMC1* que producen *ARNip* de *DMC1*. El verde indica la presencia de *YFP-DNDMC1*; Azul: autofluorescencia plastidial. Barra de escala: 300 µm.

(G) Análisis estadístico del polen deforme que aparece en las plantas injertadas. La formación de polen deforme fue significativamente mayor en los injertos de tipo natural soportados por plantas madre *DNDMC1::ARN^{tMet}* y *DNDMC1::StBEL5* que en los injertos de control. Los asteriscos indican diferencias altamente significativas con respecto a los controles mediante la prueba de Chi-cuadrado para la independencia de variables en una tabla de contingencia. Repeticiones biológicas: n>8. Las barras de error indican D.E. Para obtener detalles, véase la **tabla 1**.

Figura 3. Movimiento de *ARN^{tMet}::DNDMC1* hacia las flores y fenotipo del polen.

(A) Panel superior: Las flores de plantas transgénicas no injertadas soportadas por *DNDMC1::ARN^{tMet}* y *ARN^{tMet}::DNDMC1* son fértiles cuando se tratan con simulación. Panel inferior: La aplicación de estradiol induciendo la expresión de *DNDMC1::ARN^{tMet}* y *ARN^{tMet}::DNDMC1* dio lugar a anteras parcialmente estériles, lo que sugiere la producción de la proteína *DNDMC1* dominante-negativa.

(B) Panel superior: Las plantas injertadas *ARN^{tMet}::DNDMC1* / tipo natural o tipo natural / *ARN^{tMet}::DNDMC1* mostraron una producción parcial de polen estéril cuando fueron tratadas con simulación. Panel inferior: Después de la aplicación de estradiol en plantas injertadas *ARN^{tMet}::DNDMC1* / de tipo natural o de tipo natural /

ARNt^{Met}::DNDMC1, la formación de polen aberrante / anteras estériles en flores de tipo natural sugiere el transporte de ARNm de *ARNt^{Met}::DNDMC1* y la expresión de la proteína DMC1 truncada en órganos masculinos de tipo natural.

(C) Los ensayos RT-PCR en muestras de poli(A)-ARN de tejidos transgénicos *DNDMC1::ARNt^{Met}* (n=6) y *ARNt^{Met}::DNDMC1* (n=7) indican la presencia de transcritos de fusión tanto en las flores transgénicas como en las de tipo natural (asteriscos rojos), lo que sugiere la movilidad del transcrito de fusión *ARNt^{Met}::DNDMC1* sobre las uniones de los injertos. A la derecha se muestra el número de plantas injertadas analizadas. La RT-PCR específica de *ACTIN2* (*ACT2*) se utilizó como control positivo.

(D) Análisis estadístico del polen deforme que aparece en las plantas injertadas (tabla 1). En comparación con los injertos de control tratados con simulación, la producción de polen deforme fue significativamente mayor en las plantas transgénicas *DNDMC1::ARNt^{Met}* y *ARNt^{Met}::DNDMC1* tratadas con estradiol y en los injertos de tipo natural soportados por *ARNt^{Met}::DNDMC1*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles mediante la prueba de Chi-cuadrado para la independencia de variables en una tabla de contingencia. Repeticiones biológicas: n>8. Las barras de error indican la D.E. Para obtener detalles, véase la **tabla 1**. Obsérvese que en los experimentos de injerto se usaron >3 líneas transgénicas independientes *DNDMC1::ARNt^{Met}* o *ARNt^{Met}::DNDMC1*.

Figura 4. Transcritos de fusión *GUS::ARNt* y movilidad en *Arabidopsis thaliana* injertada.

(A) Dibujo esquemático de los constructos de fusión *35S_{pro}::GUS::ARNt* usados (para las secuencias de las delecciones *ARNt^{Met}*, *ARNt^{Gly}*, *ARNt^{lle}*, y *ARNt^{Met}* véase la figura 5).

(B) Ejemplo de un hipocótilo injertado *GUS::ARNt^{Met}* / planta de tipo natural (Col-0). El color azul indica la presencia de actividad GUS en el hipocótilo por encima de la unión del injerto (flecha) y en la punta de la raíz de tipo natural.

(C) Actividad GUS en hojas y puntas de raíces primarias detectada en injertos *GUS::ARNt* / tipo natural. Los números indican la fracción de tinción GUS detectada en las puntas de las raíces de tipo natural o en la vasculatura foliar de tipo natural (flechas) de plantas injertadas con la línea transgénica indicada. Se usaron al menos 3 líneas transgénicas independientes para cada combinación de injerto (para imágenes adicionales de plantas injertadas, véase la **figura 6**).

(D) RT-PCR en muestras de poli(A)-ARN recogidas de plantas injertadas. Se agruparon tres muestras de 3-5 plantas injertadas y se comprobó la presencia de transcritos de *GUS* en el tejido de tipo natural (asteriscos). Los números indican la presencia de ARN poli(A) de *GUS* en las muestras de ARN de raíces u hojas de tipo natural analizadas. La RT-PCR específica de *ACTIN2* (*ACT2*) se utilizó como control positivo para confirmar la presencia de ARNm en las muestras.

Figura 5. Secuencias de ARNt fusionadas a la 3'UTR de *GUS*.

Alineación de secuencias de ARNt fusionadas con la secuencia de ADN codificante de *GUS*. La secuencia *GUS* que alberga un intrón se fusionó con *ARNt^{Met}* (CAU), *ARNt^{Gly}* (GCC), *ARNt^{lle}* (TAT) y variantes de delección de *ARNt^{Met}* (CAU) denominadas *ARNt^{Met} ΔD*, *ΔDA*, *ΔDT* y *ΔAT*. La longitud de las secuencias de ARNt (contadas a partir del codón de inicio *GUS* ATG) se indica a la derecha. Los asteriscos indican el codón de parada TGA de *GUS*. Los recuadros rojos indican la secuencia anticodón de los ARNt clonados.

Figura 6. Imágenes de plantas transgénicas de tipo natural / *GUS::ARNt* injertadas en el hipocótilo.

(A) Imágenes de ejemplo de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 que fueron injertadas en el hipocótilo. Las combinaciones de injerto de plantas transgénicas (Col-0) / de tipo natural presentados se indican anteriormente. Las imágenes ampliadas de las zonas foliares, las puntas de las raíces y la unión de los injertos (flechas) se indican con rectángulos naranjas. Los tejidos de color azul en las partes de la planta mostradas indican la presencia de actividad GUS.

(B) Micrografías de secciones finas realizadas en una planta injertada embebida en parafina. El tipo natural se injertó con cepas transgénicas *GUS::ARNt^{Met} ΔDT*. Se detectó actividad enzimática GUS (color azul) en células vasculares de hojas de tipo natural e hipocótilo de tipo natural en células asociadas a la vasculatura (flechas). Las puntas de flecha indican vasos del xilema.

Figura 7. ARNm móviles de *A. thaliana* y aparición de motivos similares a ARNt.

(A) Número de todos los transcritos móviles identificados (n = 3630) con estructuras similares a ARNt previstas encontradas por el descriptor de ARNt RNAMotif predeterminado, que no captura el *ARNt^{lle}* (TAT) (figura 8). Se muestran los recuentos absolutos, así como el enriquecimiento en relación con los transcritos que no se encuentran en la base de datos móvil. Los asteriscos indican recuentos significativos (p<0,05) según la prueba exacta de Fisher.

(B) Frecuencia normalizada (densidad estimada) y frecuencia relativa acumulada (ecdf) de las distancias intergénicas de los pares de genes en tándem ARNt-ARNm en los que el ARNt está situado en un radio de 1000 nucleótidos aguas arriba o aguas abajo de genes que codifican transcritos móviles (azul) o transcritos predichos no móviles (gris). Las líneas verticales discontinuas indican las medianas de las distribuciones mostradas. Los loci que codifican transcritos

móviles en comparación con los loci que no producen transcritos móviles muestran una proximidad significativamente mayor a los genes ARNt (prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras unilateral, $p < 0,004$; D de Cohen $d = 0,349$).

(C) Número de genes de ARNt según su anticodón, que se detectaron como transcritos bicistrónicos de poli(A)-ARN::ARNt en los datos de RNA-Seq. La distribución de los 94 genes ARNt observados bicistrónicamente se indican en naranja; la distribución de los 24 genes de ARNt asociados con los transcritos móviles se muestra en azul. El total de genes de ARNt anotados en TAIR10 se presenta en gris. Los genes de ARNt con transcritos bicistrónicos confirmados por RT-PCR se indican con asteriscos, las fusiones de ARNt probadas experimentalmente se marcan con flechas.

(D) Diagrama esquemático del gen colina cinasa 1 (*CK1*, AT1G71697) de *A. thaliana* y mutantes de inserción analizados. Obsérvese que el ARNm de *CK1* existe como un transcrito bicistrónico poli(A)-ARNt y que el mutante *ckl.2* alberga una inserción de ADN-T entre el codón de parada de *CK1* y el *ARNt^{Gly}* anotado (AT1G71700) en la 3' UTR, lo que da lugar a un transcrito poli(A) truncado que carece de las secuencias *ARNt^{Gly}*. Los cebadores de RT-PCR se indican de la siguiente manera: La unión de P1 al exón 7 del CDS de *CK1* y la unión de P3 a las secuencias *ARNt^{Gly}* se utilizaron para la identificación de *CK1::ARNt^{Gly}* de tipo natural. Para la detección específica de *ckl.2* se utilizaron P1 junto con P2, que estira el borde izquierdo del ADN-T, y *CK1* 3'UTR.

(E) La RT-PCR con los cebadores indicados reveló que el transcrito poli(A) de *CK1* está presente en las muestras mutantes *ckl.2* (asteriscos) procedentes de tejido Col-0 de tipo natural injertado en tallo. En las muestras recíprocas de tipo natural no se detectó un transcrito mutante *CK1* poli(A) producido en *ckl.2* y carente de la secuencia 3'UTR *ARNt^{Gly}*.

(F) Fenotipo de *ckl.1* y *ckl.2* y RT-PCR cuantitativa en tiempo real de los transcritos. Las plantas de tipo natural y *ckl.2* muestran niveles igualmente altos de expresión de *CK1*, mientras que los mutantes *ckl.1* muestran una expresión muy baja. Las mediciones del tamaño del área de la roseta en plantas adultas revelaron que tanto los mutantes *ckl.1* como *ckl.2* son significativamente más pequeños que el tipo natural (prueba de la t de Student, mutante frente a tipo natural; valor de p *ckl.1* = 0,006; valor de p *ckl.2* = 0,002; $n = 16$ plantas/línea). Barras de error: D.E.

(G) Estructura esquemática de plegamiento de los motivos TLS 3'UTR de *GUS* predichos según su energía libre mínima (MFE).

Figura 8. Análisis computacional de las secuencias similares a los ARNt (TLS) presentes en los ARNm móviles.

(A) Descriptor de la estructura del ARNt y alineación estructural de *ARNt^{Met}*, *ARNt^{Gly}* y *ARNt^{Ile}*. Los números indican los intervalos de descriptor aceptados de elementos estructurales (tallos y bucles). Obsérvese que el descriptor de ARNt no reconoce la estructura del *ARNt^{Ile}* que no confirió movilidad cuando se fusionó a *GUS*.

(B) Evaluación del espacio de parámetros para las restricciones del descriptor de ARNt. Dado un modelo de descriptor de ARNt, se probó el enriquecimiento de TLS en móvil con respecto a transcritos de genes predichos no móviles. El descriptor de ARNt predeterminado (indicado por un círculo rojo en origen de coordenadas, $p = 0,001$) indica un número enriquecido de aciertos en transcritos móviles en comparación con los transcritos no móviles. La desviación de los parámetros por defecto del descriptor del ARNt se expresa mediante la suma de las diferencias de los valores de restricción para la longitud mínima del elemento (eje y), así como mediante la suma de las diferencias de la longitud máxima del elemento (eje x). De los 20.000 descriptores producidos, se trazaron 13.598 que tienen menos de 5.000 coincidencias genéticas con el conjunto de datos no móviles (excluidos los genes ARNt). Los colores corresponden a los valores de p resultantes de los recuentos de coincidencias de motivos con secuencias de transcripción móviles frente a no móviles (prueba exacta de Fisher); el tamaño de los puntos indica el número de coincidencias con transcritos móviles. El aumento de las longitudes mínimas de tallo y bucle en los modelos de estructura de ARN da como resultado un menor número de coincidencias en el conjunto de datos de transcritos móviles. De manera similar, la relajación de las restricciones de longitud máxima da lugar a un mayor número de coincidencias positivas falsas en el conjunto de datos no móviles y, por tanto, las coincidencias de motivos con transcritos móviles frente a no móviles son menos significativas.

(C) Grado de estructuración asociado con la estructura predicha de la región de secuencia 3'-terminal de 150 nt de ARNm predichos móviles ($n = 3.606$) frente a no móviles ($n = 23.132$). El gráfico superior muestra la estructura en cuanto a número de bases emparejadas predichas. Gráfico inferior en cuanto a energía libre mínima prevista (MFE). Las líneas discontinuas verticales denotan las medianas de las dos distribuciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Los transcritos de fusión *ARNt^{Met}* pasan a las flores

Introducción

Para establecer un sistema sencillo de puntuación fenotípica de los ARNm que albergan motivos de movilidad predichos, como los TLS, se utilizó una variante dominante-negativa de DMC1 de *A. thaliana* (*DNDMC1*) que carece de los 92 residuos de aminoácidos N-terminales (**figura 1A**) y que interfiere con la progresión de la meiosis.

5 Métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se cultivaron plantas de tabaco (*N. tabacum* cv. Petite Havana) en condiciones asépticas en un medio consolidado con agar que contenía 30 g l⁻¹ de sacarosa. Las plantas de tabaco enraizadas se transfirieron al suelo y se cultivaron hasta la madurez en condiciones estándar de invernadero (humedad relativa: 55 %; temperatura diurna: 25 °C; temperatura nocturna: 20 °C; ciclo diurno: 16 h de luz/8 h de oscuridad; intensidad de luz: 190 - 600 µE·m⁻²·s⁻¹).

Tratamiento de injerto y estradiol

Las plantas de tabaco usadas para los experimentos de injerto se cultivaron de dos a tres meses en el suelo en el invernadero. Se usó un procedimiento de injerto de empalme convencional como se describió anteriormente (Zhang y col, 2014). En resumen, se usaron como material madre e injerto plantas con el mismo diámetro de tallo y cinco hojas completamente expandidas; los portainjertos se prepararon eliminando las hojas apicales de la parte superior de la planta y conservando de dos a tres hojas de origen. Las púas se prepararon cortando el tallo de 3 a 4 cm por debajo del ápice y eliminando las hojas de origen. Se realizó un corte oblicuo largo en el tallo del patrón (a unos 30 grados de la vertical) con un corte equivalente en la base de la púa. Las superficies de ambos cortes se presionaron inmediatamente y la unión se envolvió herméticamente con parafilm. La primera semana tras el injerto, la púa se cubrió con una bolsa de plástico y se mantuvo en condiciones de alta humedad.

Una vez establecida la unión del injerto, se eliminaron las ramas axilares y las hojas que emergían en la cepa con el fin de reforzar la dominancia apical de la púa. Antes de la inducción floral, se mezclaron 5 µM de 17-β-estradiol con Lanolina (Sigma-Aldrich) (solución madre 1000x: SmM 17-β-estradiol en DMSO, almacenado a -20 °C) se aplicó con papel de seda empapado sobre la cara adaxial de las superficies de las hojas de las plantas madre para inducir la expresión génica. El papel de seda se dejó en la superficie para marcar el sitio de inducción. Después de la aparición de las flores en la púa, se tomaron muestras de parte de la hoja inducida y de las primeras flores emergentes cerradas para detectar la presencia del transcrito de fusión mediante RT-PCR.

Reacciones de aislamiento de ARN y transcripción inversa

Las muestras se prepararon en 1 ml de reactivo Trizol (Invitrogen) (0,5 ml/100 mg de tejido) como se ha descrito previamente (Zhang y col., 2009). Después de la centrifugación (10.000 g, 10 minutos a 4 °C), el sobrenadante (~1 ml) se transfirió a un nuevo tubo libre de ARNasa y se extrajo una vez con 200 µl y otra con 50 µl de cloroformo. Para precipitar el ARN, el sobrenadante se completó con dos volúmenes de isopropanol al 99 %, 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,2), 1 µg de acrilamida lineal (Invitrogen), y se incubó > 1 h a -20 °C. Después de la centrifugación (16.000 g, 30 minutos a 4 °C), el precipitado resultante se lavó dos veces con etanol al 80 %, una vez con etanol al 99 %, se secó al aire y se resuspendió en 20 µl de agua libre de ARNasa. Para determinar la calidad y concentración del ARN, se sometieron 1 µl de cada muestra de ARN a electroforesis en gel de agarosa (2 %, agarosa, 1 x TBE) y se cuantificaron mediante el uso de un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo con 1 U/µl de transcriptasa inversa AMV (Promega) con las siguientes modificaciones: el ARN total (~4 µg) se desnaturalizó a 70 °C durante 10 minutos en presencia del cebador oligo (dT) seguido de una incubación de recocido de 5 minutos a 37 °C antes de la reacción de RT, luego se incubó a 42 °C durante una hora y a 72 °C durante 10 minutos para la desactivación. La RT-PCR se realizó en condiciones convencionales de PCR con 40-45 ciclos. Los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR se enumeran en la **tabla 2**.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en el estudio.

Constructo	Secuencias de cebadores	Finalidad / Tamaño del fragmento para PCR
<i>DNDMC1::StBEL5</i>	FK868-F 5'-GATGCTCCGAATCTCGCTGA-3' FK869-R 5'-GTTGCTTGCTGCTGGTGAAG-3'	491 pb
<i>DNDMC1::MetARNt</i>	FK868-F 5'-GATGCTCCGAATCTCGCTGA-3' FK851-R 5'-TTCCGCTGCGCCACTCTGATT-3'	260 pb
<i>DMC1::MetARNt</i>	FK868-F 5'-GATGCTCCGAATCTCGCTGA-3' FK851-R 5'-TTCCGCTGCGCCACTCTGATT-3'	260 pb
<i>DNDMC1::ZmKN1HD</i>	FK868-F 5'-GATGCTCCGAATCTCGCTGA-3'	

	Construeto	Secuencias de cebadores	Finalidad / Tamaño del fragmento para PCR
5	<i>MetARNt::DN DMC1</i>	FK779-R 5'-TAGAAGGCATTGGTGGTG-3' FK774-F 5'-ATAACCCACAGGTCCCAG-3' FK771-R 5'-TTCCATTCCCTCCTTTCA-3'	495 pb 422 pb
10	YFP- <i>DN DMC1</i>	FK938-F 5'-CCCGACAACCACTACCTGAG - 3' FK858-R 5'-TCATCGAGAGCTTGACACCCTGT-3'	353 pb
15	<i>NbActina</i> (GB: X69885)	FK422-F 5'-CACCGGTATTGTGTTGGACTC-3' FK423-R 5'-AGGACCTCAGGACAACGGAAACG-3'	303 pb
15	<i>ACTIN2</i> (At3g18780)	FK424-F 5'-GGAAGGATCTGTACGGTAAC-3' FK425-R 5'-TGTGAACGATTCTGACCT-3'	245 pb
20	cebador BP para la verificación de la inserción de la <i>colina cinasa 1 (CK1)</i> en el ADN-T	FK907-F 5'- ATTTTGCCGATTTTCGGAAC -3'	504-804 pb
20	cebador LP salk_023420	FK908-R 5'- TGGTTCATTACAGGAGAACCG -3'	1096 pb
25	cebador RP salk_023420	FK909-F 5'- TTTGTGAATCTCAGGGAATGC -3'	BP+RP 504-804 pb
25	cebador LP salk_070759	FK914-R 5'- AGCAGCCATCTCACAAAAGTG -3'	1012 pb
25	cebador RP salk_070759	FK915-R 5'- TCTAAAACGCGTTTTTGCAAAC - 3'	BP+RP 492-792 pb
30	detección de la fusión <i>CK1- GlyARNt</i>	FK883-F 5'-CTATGGGGAATCATCTCGGG-3' FK884-R 5'-CACTAGACCACTGGTGCTTC-3'	331 pb
30	Detección de <i>CK1-GlyARNt</i>	FK883-F 5'-CTATGGGGAATCATCTCGGG-3' FK992-R 5'-CCGTGGCAGGGTACTATCAT -3'	392 pb
35	Detección de la movilidad de <i>CK1-GlyARNt</i> que se une a <i>ck1.2</i> (salk_023420)	FK883-F 5'-CTATGGGGAATCATCTCGGG-3' FK962- R 5' -GTAGACTATATATTGTGGTGTAAC-3'	309 pb
40	Construeto fusión <i>GUS-ARNt</i> cebador directo	FK963-F 5'-CTAG CCATGG TAGATCTGAGG -3'	
40	Construeto fusión <i>GUS- GlyARNt</i> cebador inverso	FK944-R 5'- GCG CGG TGA CCT GCA CCA GCC GGG AAT TGA ACC CGG GTC TGT ACC GTG GCA GGG TAC TAT CAT GCC ACT AGA CCA CTG GTG CAA TTC ACA CGT GAT GGT GAT GGTG- 3'	Tamaño de GUS- Gly ARNt 2141 pb
45	Construeto fusión <i>GUS- Met ARNt</i> cebador inverso	FK945-R 5'-GCG CGG TGA CCT ATC AG A GCC ACC IT CGA TCC TGG GAC CTG TGG G IT ATC. GGC CCA CCA CGC TTC CGC TGC GCC ACT CTG ATA ATT CAC ACG TGA TGG TGA TGG TG-3'	Tamaño de GUS- Met ARNt 2141 pb
50	Construeto fusión <i>GUS- ile ARNt</i> cebador inverso	FK946-R 5'- GCG CGG TGA CCG CTTCCG GCG GGG CTC GAA CCC GCG ACC TTC GGC TCA TAA GAC CAA CGC TCT AAC CAA CTG AGC TAC GGG AGC AAT TCA CAC GTG ATG GTG ATG GTG- 3'	Tamaño de GUS- Met ARNt 2142 pb
55	Construeto fusión <i>GUS- Met ARNt</i> deleción del bucle <i>D</i> cebador inverso	FK948-R 5'- GCG CGG TGA CCT ATC AGA GCC AGG TTT CGA TCC TGG GAC CTG TGG GTT ATG GGC CCA CCA CCA CTC TGA TAA TTC ACA CGT GAT GGT GAT GGT G - 3'	Tamaño de GUS- Met ARNt dD 2128 pb
60	Construeto de cebadores inversos de deleción de bucle anticodón (<i>dDA</i>) <i>GUS-MetARNt D</i>	FK950-R 5'- GCG CGG TGA CCT ATC AGA GCC AGG TTT C GAT CCT GGG ACC TGC CAC CAC TCT GAT AAT TCA CAC GTG ATG GTG ATG GTG - 3'	Tamaño de GUS- Met ARNt dDT 2113 pb
60	Construeto <i>GUS- MetARNt D</i> y deleción de bucle <i>TψC (dDT)</i> cebador inverso	FK949-R 5'- G CGC GGT GAC CTA TCA GAG CGG ACC TGT GGG TTA TGG GCC CAC CAC CAC TCT GAC AAT TCA CAC GTG ATG GTG ATG GTG - 3'	Tamaño de GUS- Met ARNt dDA 2113 pb
65	Construeto <i>GUS- MetARNt</i> anticodón y deleción de bucle <i>TψC (dAT)</i> cebador inverso	FK947-R 5'-GC GCG GTG ACC TAT CAG AGC GGA CCT GCC ACG CTT CCG CTG CGC CAC TCT GAT AAT TCA CAC GTG ATG GTG ATG GTG- 3'	Tamaño de GUS- Met ARNt dAT 2111 pb

	Construtto	Secuencias de cebadores	Finalidad / Tamaño del fragmento para PCR
5	Adición <i>Met</i> ARNt + XbaI + BstEII cebador inverso	FK951-R 5'-gcgc <u>GGTGACC TCTAGA</u> TATCAGAGC-3'	
	Adición <i>Gly</i> ARNt + XbaI + BstEII cebador inverso	FK952-R 5'-gcgc GGTGACC TCTAGA TGCACC- 3'	
	Adición <i>Ile</i> ARNt + XbaI + BstEII cebador inverso	FK953-R 5'-gcgc <u>GGTGACC TCTAGA</u> GCTTCCGG- 3'	
10	Prueba de movilidad de GUS	FK1091-F 5' CAACAGCTTCCGGACCGCAC- 3' FK1092-R 5' GATTGAGCGCGATGACGTCA- 3'	428 pb
	movilidad de <i>GUS-Met</i> ARNt	FK1079-F 5' CGAGTACTACCAGGCGAACC- 3'	316 pb
15	movilidad de <i>GUS-Gly</i> ARNt	FK1081-R 5' CAGAGCCAGGTTTCGATCCTG- 3' FK1079-F 5' CGAGTACTACCAGGCGAACC- 3'	281 pb
	movilidad de <i>GUS-Ile</i> ARNt	FK1086-R 5' GCAGGGTACTATCATGCCAC- 3' FK1080-F 5' ACCACGTCGTGTTTCGATGAG- 3'	272 pb
20	Construtto fusión de <i>GUS-Met</i> ARNt <i>deleción del bucle D</i> cebador inverso	FK1085-R 5' GGCTCATAAGACCAACGCTC- 3' FK1079-F 5' CGAGTACTACCAGGCGAACC- 3'	316 pb
	Verificación de movilidad de deleción de bucle <i>GUS-Met</i> ARNt <i>D</i> y <i>TψC</i>	FK1081-R 5' CAGAGCCAGGTTTCGATCCTG- 3' FK1080-F 5' ACCACGTCGTGTTTCGATGAG- 3'	255 pb
30	Verificación de la movilidad de <i>GUS-Met</i> ARNt <i>D</i> y de la <i>deleción</i> del bucle del anticodón (<i>dDA</i>)	FK1083-R 5' GTTATGGGCCACCACCACTC- 3' FK1079-F 5' CGAGTACTACCAGGCGAACC- 3'	274 pb
	<i>GUS-Met</i> ARNt anticodón y <i>deleción de bucle TψC</i> (<i>dAT</i>) cebador inverso	FK1084-R 5' GATCCTGGGACCTGCCAC- 3' FK1079-F 5' CGAGTACTACCAGGCGAACC- 3'	292 pb
35	Movilidad de GUS cebador poli A	FK1082-R 5' GCTGCGCCACTCTGATAATTC- 3'	
	Movilidad de GUS cebador poliA	FK1099-F 5' AGAACGCTAGCCATCACCATC- 3' FK1100-R 5'GCCAAATGTTTGAACGATCGGG- 3'	127 pb
40	Detección de GUS mediante QRT-PCR	FK1099-F 5' AGAACGCTAGCCATCACCATC- 3' FK1090-R 5'GCAAGACCGGCAACAGGAT- 3'	135 pb
	Cebador Actin2 QRT-PCR (AT3G18780)	FK1093-F 5' CGCGTCCAAGGAAACAAGAAG -3' FK1094-F 5' TTCACACGTGATGGTGATGGTGA-3'	142 pb
50	cebador de UBQ10 QRT-PCR (AT4G05320)	FK1097-F 5' TCCCTCAGCACATTCCAGCAGAT-3' FK1098-F 5' AACGATTCTGACCTGCCTCATC- 3'	69 pb
	Detección de CK1 y mutante mediante QRT-PCR	FK1095-F 5' CAACTTCACTTGGTCTTGCGT-3' FK1096-R 5' TAGTCTTCCGGTGAGAGTCTTCA- 3'	61 pb
55	Detección de CK1 y mutante mediante QRT-PCR	FK1105-F 5' ATCTTCTGGGACTATGGGGA -3' FK1106-R 5' TCATCCTTCAAGAAGCAAAGGC -3'	126 pb
		FK1107-F 5' TCATACACGCCAGAACTCTTTC -3'	198 pb
60	AT3G01700-ARNt ^{Pro} poli A bicistrónico A RT-PCR	FK1108-R 5' CCAACCGATACTTATCCATCTCTA - 3' FK1122-F 5' -CCGGATTCTTCATCTTCTCTCTCT - 3'	
	ARNt ^{Pro} -AT3G01710 poli A bicistrónico A RT-PCR	FK1122-F5'-CCGGATTCTTCATCTTCTCTCTCT-3' FK1123-R 5'- CCTAAGCGAGAATCATACCACTAGACC- 3'	305 pb
65		FK1124-F5'- GTTACAGTAGCAGAGAGGTCTTACA-3'	280 pb
		FK1125-R 5'- CGAGTTCAATTCTCGGAATGCC-3'	

Constructo	Secuencias de cebadores	Finalidad / Tamaño del fragmento para PCR
ARNt ^{P¹} -AT3G01710	FK1126-F 5'- CAACAGACCAAATAAGAAAGCTC-3'	305 pb
5 Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1125-R 5'- CGAGTTCAATTCTCGGAATGCC-3'	
AT4G34030-ARNt ^{Arg}	FK1127-F 5'- CCTTTAGAAGATACTCGATTTGGTGTC-3'	257 pb
10 Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1128-R5'- GTCTGATTAGAAGTCAGACGCCT-3'	
ARNt ^{Arg} -AT4G34040	FK1129-F 5'- CGACATAAAAAGCACCGTTCC-3'	514 pb
poli A bicistrónico RT-PCR	FK1130-R 5'- GGCCCAATGGATAAGGCGT-3'	
15 AT5G03740-ARNt ^{Leu}	FK1131-F 5'- CAGTGCAGCTGCTTGAGAAGA-3'	453 pb
Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1132-R 5'- GTCTTCCCCCTTAACCACTCG-3'	
ARNt ^{Leu} -AT5G03740	FK1133-F 5'- GGTTTGCCCGAGTGGTTAAG-3'	548 pb
20 Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1134-R 5'- GACAAGGTGCAGCTTCTTTGA-3'	
AT5G41600-ARNt ^{Leu} , Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1135-F5'- CTCTGAACAAGAAGAAGGATTAAGG-3'	741 pb
25 ARNt ^{Leu} -AT5G41610, Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1137-F 5'- GACTTCTACGGATAAAGACTCTGA-3'	399 pb
AT4G14410-ARNt ^{Thr}	FK1138-R 5'- TCTAAGGCGCCAGACTCAAG-3'	
Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1139-F 5'-GCCTCCTGCTGCTTAACTCT-3'	277 pb
30 ARNt ^{Thr} -AT4G14420	FK1140-R 5'- GTAAGCGGGAGGTCTTGAGT-3'	
Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1141-F 5'- GCTCCAAAGGCAAAAGCAAAC-3'	430 pb
AT2G33130-ARNt ^{Met}	FK1142-R 5'- AACGGGTGCTCTAACCAACT-3'	
35 Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1143-F 5'- GCTAGCGCGTAGGTCTCATA-3'	638 pb
AT2G33130-ARNt ^{Met}	FK1144-R 5'- GAAGCAAAGCTGCCGAGATG-3'	
Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1143-F 5'- GCTAGCGCGTAGGTCTCATA-3'	697 pb
40 ARNt ^{Met} -AT2G33150	FK1145-R 5'- TTCTCCACCGTCCATGCAAT-3'	
Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1146-F 5'- CGCTCGCTAGAGAGGACCAT-3'	432 pb
AT4G27870-ARNt ^{Gln}	FK1147-R 5'- GACCTACGCGCTAGCCAACT-3'	
Poli A bicistrónico RT-PCR	FK1148-F 5'- CTGAAACTGAATCTTGCCTGGAG-3'	284 pb
45 Actin2 (At3g18780)	FK1149-R 5'- GGA CTCTGAATCCAGTAACCCG-3'	
	FK1152-F 5'- ACTTTTCATCAGCCGTTTTGA-3'	190 pb
	FK1153-R 5'-ACGATTGGTTGAATATCATCAG-3'	

Constructos de expresión

Para producir un AtDMC1 dominante-negativo con una delección N-terminal de 92 aminoácidos en los transcritos de *A. thaliana* DMC1 (*DN*DMC1) con fusiones 3'UTR y 5'UTR se crearon unos constructos binarios de expresión denominados pRD1 y pRD4 basados en una estructura principal pMDC7 (Curtis y Grossniklaus, 2003). El fragmento de *DN*DMC1 se introdujo a 5' o 3' del casete de clonación de puerta de enlace *pMDC7*, lo que dio lugar a un vector binario plantilla utilizado para clonar mediante una reacción de puerta de enlace las secuencias de ARN de *StBELS*, o ARNt^{Met} entre el ORF de *DN*DMC1 y el promotor o el terminador (**figura 1A**).

Se utilizaron oligonucleótidos sintéticos para producir clones ENTRY de puerta de enlace con la secuencia correspondiente para la recombinación de puerta de enlace con el vector binario (**tabla 2**). Los constructos de vectores binarios basados en pMDC7 permiten la expresión de *DN*DMC1::ARN o ARN::DN^{DMC1} inducida por estradiol. *pEarlyGate104* se utilizó para la expresión de *35S_{pro}:YFP-DN*DMC1 y la línea de *N. tabacum* con ARNip de DMC1 (*35S_{pro}:BcDMC1 hpRNAi*) y su función se describió previamente (Zhang y col., 2014).

Análisis de microscopía y forma de polen

El análisis de forma de polen estadístico que indica la esterilidad se realizó como se describió anteriormente (Zhang y col., 2014). Se recogió polen de tabaco y se tiñó con yoduro de propidio (0,01 mg/ml, Molecular Probes, EE.UU.). Para obtener imágenes de la forma y el tamaño del polen se utilizó un microscopio confocal de barrido láser (CLSM; TCS SPS; Leica Microsystems). El sistema tenía la siguiente configuración: Detección del canal 2 (rojo): 570-650 nm. La ganancia del canal 2 (PMT) se ajustó entre 500-600 V, Pinhole: se fusionaron 1,0 unidades Airy, 5 pilas Z con 5-6 μm y se usaron para el algoritmo de reconocimiento de forma como se describe (Zhang y col., 2014).

Se detectó fluorescencia de YFP como se describe (Zhang y col., 2014) con la siguiente configuración: Modo de escaneo de canal secuencial con un orificio aéreo máximo de 1,5 unidades Airy. Para comparar la intensidad de fluorescencia de YFP entre plantas se utilizaron los mismos ajustes, como la potencia del láser, el voltaje de ganancia, el agujero de alfiler, el objetivo, el aumento y las longitudes de onda del canal/filtro. Las imágenes de pila Z se ensamblaron y procesaron usando el paquete de software Image J (NIH). Detección del canal 1 (verde): 535 a 617 nm; Detección del canal 2 (rojo): no usado; Detección del canal 3 (azul; Autofluorescencia de cloroplastos/plástidos): 695 a 765 nm. La ganancia de canal 1 (PMT) se estableció entre 500-600 V.

Resultados

DMC1 es un factor específico del ciclo celular meiótico y miembro de la familia de las recombinasas de tipo RecA, altamente conservada, de ATPasas dependientes del ADN activas durante la meiosis en células esporogénicas. La falta de un complejo DMC1/RAD51 funcional induce una meiosis aciasmática que da lugar a la formación de polen de forma anómala que contiene un número aberrante de cromosomas y, en consecuencia, es necesario para el correcto desarrollo del polen. Por tanto, la producción de polen deforme en las anteras y la disminución de la fertilidad sirven como lectura, indicando la presencia de ARNp *DMC1* móvil (**figura 1B, C**) y/o la presencia de un producto de traducción de un ARNm *DNDMC1* dominante-negativo móvil.

Para implementar un sistema reportero de la movilidad del ARNm, se produjeron plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que expresaban el ARNm de *DNDMC1* fusionado con el conocido transcrito móvil de longitud completa *StBEL5* (Cho y col., 2015) (*DNDMC1::StBEL5*) y un *ARNt^{Met}* de longitud completa (AT5G57885; *DNDMC1::ARNt^{Met}*; *ARNt^{Met}::DNDMC1*) (**figura 1A**) que se detectó en la savia del floema de la calabaza. Se verificó que las plantas que expresaban estos constructos mostraban un fenotipo de esterilidad al polen (**figura 1D, E**) y se utilizaron en experimentos de injerto (**figura 1F, G**) para evaluar la movilidad del transcrito del tejido de origen transgénico a flores de tipo natural.

En primer lugar, se confirmó mediante RT-PCR que el propio *DNDMC1* no es móvil y, por lo tanto, es adecuado como indicador de la movilidad del transcrito que produce un fenotipo polínico (**figura 2A**). A continuación, se abordó la movilidad de los transcritos de fusión injertando *DNDMC1::StBEL5*, *DNDMC1::ARNt^{Met}* o *ARNt^{Met}::DNDMC1* con plantas de tipo natural y esterilidad de polen y la presencia del transcrito de fusión en las flores de tipo natural examinadas (**figura 2B-G; figura 3**).

Como era de esperar, tras la inducción con estradiol, las púas *DNDMC1::StBEL5* injertadas en plantas de tipo natural mostraron un porcentaje significativamente mayor de formación de polen aberrante en sus flores ($30,9 \pm 7,6\%$) que las plantas de tipo natural injertadas ($4,0 \pm 3,0\%$) (**figura 2C; tabla 1**). Para confirmar que los transcritos de fusión *StBEL5* son móviles, las plantas de tipo natural injertadas en cepas *DNDMC1::StBEL5* produjeron un número significativamente mayor de polen mal formado ($19,7 \pm 14,3\%$) que los controles de tipo natural, y la presencia del transcrito de fusión se confirmó mediante RT-PCR en flores cerradas de tipo natural (**figura 2E**). Por tanto, los constructos de fusión *DNDMC1* - ARN pueden emplearse como sistema informador de la movilidad del ARN produciendo un fenotipo de polen cuantificable.

A continuación, para saber si un ARNt asignado al floema contiene la información estructural necesaria para mediar el movimiento del ARNm a larga distancia, se injertaron plantas transgénicas que expresaban el constructo de fusión 3'UTR *DNDMC1::ARNt^{Met}* (**figura 2B**) o 5'UTR *ARNt^{Met}::DNDMC1* (**figura 3**). La expresión se indujo aplicando estradiol a las hojas de la fuente transgénica (cepa) o al tallo transgénico (púa) ~ 1,5 semanas después del injerto y antes de la inducción floral. Las plantas injertadas tratadas con estradiol formaron un número significativamente mayor de polen deforme ($14,2 \pm 7,6\%$; **tabla 1**) en comparación con los injertos de control y las plantas de tipo natural (**figura 2A, B**), y los ensayos RT-PCR confirmaron la presencia de transcritos *DNDMC1::ARNt^{Met}* y *ARNt^{Met}::DNDMC1* poli(A) en flores de tipo natural formadas en plantas madre transgénicas (**figura 2E, figura 3**).

Tabla 1. Análisis de la forma del polen en plantas de *Nicotiana tabacum* de tipo natural, transgénicas e injertadas.

	Púa / madre	N.º de plantas con esterilidad de polen visual (n.º de plantas)	N.º de líneas independientes	N.º de polen analizado (n.º de plantas)	% de polen de forma incorrecta	Valor de P	Significación
Controles	ARNip de hpDMC1	10(10)	3	S101(10)	78,08 ± 10,86 %	0,0	***
	tipo natural	0(10)	3	5365(10)	7,51 ± 2,59 %	-	ns
	YFP-D _N DMC1	0(6)	3	941(4)	3,27 ± 1,84 %	-	ns
Injertos de control	tipo natural/tipo natural (antes de la inducción de estradiol)	0(12)	3	1187(7)	4,04±3,00 %	-	ns
	tipo natural/tipo natural (después de la inducción de estradiol)	0(6)	3	643 (6)	3,27 ± 3,96 %	-	ns
	tipo natural/YFP-D _N DMC1	0(8)	3	1068(4)	5,62 ± 3,10 %	-	ns
	YFP-D _N DMC1/tipo natural	0(6)	2	3664(5)	5,94 ± 1,31 %	-	rts
	YFP-D _N DMC1/YFP-D _N DMC1	0(6)	4	824(3)	4,13 * 2,83 %	-	ns
D _N DMC1::ARN ^{tMet} injertos	tipo natural / D _N DMC1::ARN ^{tMet} (antes de la inducción de estradiol)	0(6)	3	239(3)	3,35 ± 1,32 %	-	ns
	tipo natural / D _N DMC1::ARN ^{tMet} (después de la inducción de estradiol)	11 (17)	8	1525(6)	14,23 ± 7,60 %	3,76e-24	***
	D _N DMC1::ARN ^{tMet} /tipo natural (antes de la inducción de estradiol)	3(6)	3	416(3)	13,94±2,28 %	3,78e-10	***
	D _N DMC1:ARN ^{tMet} / tipo natural (después de la inducción del estradiol)	16(19)	9	2331 (8)	38,65±22,46 %	7,52e-270	***
	YFP:D _N DMC1/ D _N DMC1::ARN ^{tMet} (después de la inducción de estradiol)	2(5)	2	374(1)	10,96 ± 0,00 %	0,00417	**
D _N DMC1::StBEL5 Injertos	tipo natural / D _N DMC1::StBEL5 (antes de la inducción de estradiol)	0(4)	2	433 (2)	8,08±0,76 %	0,51261	ns
	tipo natural / D _N DMC1::StBEL5 (después de la inducción de estradiol)	10(14)	4	1398(10)	19,67 ± 14,33 %	3,60e-65	***
	D _N DMC1::StBEL5/ tipo natural (antes de la inducción de estradiol)	3(4)	2	243 (2)	21,40 ± 6,92 %	9,04e-65	***
	D _N DMC1::StBEL5/ tipo natural (después de la inducción de estradiol)	12(14)	6	1200(5)	30,92±7,56 %	8,43e-221	***

Para excluir la posibilidad de que las plantas quiméricas injertadas produzcan una señal silenciadora de *ARNip DMC1* móvil que se desplace a los tejidos florales de tipo natural y desencadene un fenotipo de esterilidad del polen, se injertaron las plantas *DNDMC1::ARNt^{Met}* con una línea informadora que produce una proteína de fusión YFP-DNDMC1 fluorescente amarilla. A diferencia de las líneas de control de *ARNip DMC1*, no se pudo detectar en los sépalos ningún silenciamiento sistémico mediado por ARNip del constructo informador YFP-DNDMC1 (**figura 2F**). Así, el transcrito de fusión *DNDMC1::ARNt^{Met}* no induce silenciamiento sistémico, y los defectos observados en la formación de polen en plantas injertadas (**figura 2G**) pueden atribuirse a la entrega sistémica de los transcritos de fusión *DNDMC1*.

En resumen, la presencia de la secuencia *ARNt^{Met}* de longitud completa en la UTR 5' o 3' desencadena el transporte del transcrito poli(A) de *DNDMC1* de las hojas madre a las hojas fuente y a los tejidos esporogénicos, donde se traduce al interferir con la meiosis en los tejidos masculinos.

Ejemplo 2

ARNt albergan una señal para el movimiento sistémico de ARNm

Para evaluar si determinadas secuencias de ARNt relacionadas con el TLS viral median el movimiento sistémico del ARNm, las secuencias de ARNt del núcleo del *ARNt^{Met}* importado por el floema (72 bases; AIR# AT5G57885) y *ARNt^{Gly}* (74 bases; TAIR#AT1G71700), y el no floema importado *ARNt^{Ile}* (73 bases; TAIR#AT3G05835) (Zhang y col., 2009) se fusionaron con la 3'UTR de la secuencia de ARNm β -GUS autónoma de la célula (**figura 4A, figura 5**). Para evaluar la movilidad de los transcritos de fusión, se produjeron líneas Col-0 de *A. thaliana* que expresaban constructos de fusión *35S_{pro}::GUS* o *35S_{pro}::GUS::ARNt* y se injertaron en el hipocótilo de Col-0 de tipo natural (brote o raíz).

Métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* de tipo natural (Col-0), y plantas transgénicas *35S_{pro}:β-GUS*, *ck1.1* (SALK_070759), *ck1.2* (SALK_023420) del ecotipo Col-0 y se cultivaron en cámaras de ambiente controlado para ensayos de crecimiento o en suelo en el invernadero (humedad relativa: 60 %; temperatura diurna: 22 °C; temperatura nocturna: 19 °C; ciclo diurno: 16 h de luz/8 h de oscuridad; intensidad de luz: 170-200 μE·m⁻²·s⁻¹). Las líneas SALK- se obtuvieron del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto Salk, California (Alonso y col., 2003).

Injerto

El injerto de hipocótilo de *A. thaliana* se realizó según lo descrito (Thieme y col., 2015). En resumen, las plantas se cultivaron verticalmente en medio sólido 0,5 MS (1 % de sacarosa) a 22 °C con un fotoperiodo de 8 h de luz (tasa de fluencia de 100 μmol m⁻² s⁻¹). La temperatura se aumentó a 26 °C 4 días después de la germinación para reducir la formación de raíces adventicias. De 6 a 7 días después de la germinación, las plántulas se utilizaron para injertar en condiciones estériles como se describe (Thieme y col., 2015).

En resumen, las plántulas se cortaron transversalmente en el centro del hipocótilo con una cuchilla de afeitar (Dumont; n.º 5) y un collar de silicio (NeoTecha; Ø 0,30x 0,60 mm) se deslizó sobre la cepa en la que se insertó la púa. Las plántulas injertadas se colocaron en medio MS sólido 0,5 (suplementado con un 1 % de agar y un 1 % de sacarosa) y se cultivaron a 22 °C (8 h de luz). Las raíces adventicias que aparecían se cortaban cada dos días y, al cabo de dos semanas, las plantas injertadas con éxito se sometían a ensayos histoquímicos de tinción de GUS, o se recolectaban por separado los materiales de raíz y brote para la detección por RT-PCR de transcritos de GUS.

Constructos de expresión

Se crearon constructos de fusión *GUS* que albergaban variantes *ARNt^{Met}* (AUG), *ARNt^{Gly}* (GGC), o *ARNt^{Ile}* (AUA) y *ARNt^{Met}* (AUG) en la 3'UTR mediante amplificación por PCR utilizando un cebador *NcoI* *GUS* directo que cubría el codón de inicio *GUS* y un cebador *BstEII* *GUS* inverso que cubría el codón de parada *GUS* y la secuencia *ARNt*. El fragmento de PCR resultante se amplificó de nuevo con un cebador inverso *XbaI* inespecífico que albergaba un sitio *XbaI* para la identificación del fragmento clonado. Los fragmentos digeridos *NcoI*-*BstEII* resultantes se clonaron en el *pCambia1305.1* (Chen y col., 1998) digerido en consecuencia, lo que permitió la expresión de los constructos *GUS::ARNt* dirigidos por un promotor *35S*. Todos los oligonucleótidos sintéticos utilizados en las reacciones de PCR se enumeran en la **tabla 2**.

Detección de β-glucuronidasa (GLIS)

Las reacciones histoquímicas con sustrato X-Gluc se realizaron con material vegetal incubado en acetona al 80 % durante 20 minutos a -20 °C, lavado 2 veces con tampón NaPO₄ 50 mM pH 7,0. La solución de tinción (X-Gluc 1 mM diluida en 25 mg/ml, en tampón NaPO₄ pH 7,0 50 mM, suplementado con ferricianuro de potasio 2 mM, ferrocianuro de potasio 2 mM, Triton X-100 al 0,1 %) se infiltró al vacío durante 15 minutos. La reacción de tinción se llevó a cabo a 37 °C durante la noche y se detuvo enjuagando los tejidos tres veces en etanol al 70 % durante 1 h.

El material vegetal teñido se examinó mediante estereomicroscopía (Leica, DFC300, FX). Para secciones delgadas, las muestras teñidas con GUS se deshidrataron en una serie de etanol que incluyó un paso de fijación: 20 % de etanol, 35 % de etanol, 50 % de etanol, FAA preparado fresco (50 % de etanol, 3,7 % de formaldehído, 5 % de ácido acético), 70 % de etanol durante 30 minutos cada uno a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incluyeron en parafina con el procesador de tejidos adjunto Leica ASK300S y el centro de inclusión Leica EG1160. Se colocaron secciones longitudinales y transversales de 10 μm y 20 μm en portaobjetos recubiertos con poli L-lisina.

Después de secar las muestras durante la noche a 42 °C, los portaobjetos se quitaron la cera dos veces en histoclear durante 10 minutos y luego se incubaron dos veces en etanol al 99,8 % durante 10 minutos en movimiento constante a temperatura ambiente. Después de secar durante la noche, los cubreobjetos se montaron con Entellan nuevo (Merck Millipore) y se examinaron mediante un microscopio de epifluorescencia (BX61, Olympus).

Análisis bioinformático

Escaneo de motivos de ARNt

Las secuencias de referencia de todos los genes que codifican proteínas [datos de secuencia de ADNc disponibles asociados con todos los genes de *Arabidopsis* que codifican proteínas, TAIR10 (Lamesch y col., 2012), excluyendo los genomas de organelos] se dividieron en conjuntos distintos según su anotación como móviles o no móvil como se detecta en registros de *Arabidopsis* heteroinjertadas o en interacciones *Cuscuta*-parásito *Arabidopsis*-huésped (Thieme y col., 2015). Se generaron subconjuntos para genes comunes a ambos conjuntos móviles (n=486), presentes en al menos uno de ellos (n=3606), así como según la dirección de movimiento observada (raíz a vástago, brote a raíz) y bidireccional. Todos los genes y transcritos asociados asignados como no móviles se usaron como controles. Se filtraron todos los conjuntos en busca de secuencias duplicadas y se eliminaron los genes de ARNt anotados. Los datos de secuencias de ARNt se obtuvieron de tRNADB (Juhling y col., 2009). Antes de escanear el motivo de la estructura, cada secuencia se rellenó con 50 caracteres "N" iniciales y finales para facilitar la detección de estructuras de ARNt situadas en posición terminal sin extremos

asimétricos en el brazo aceptor del ARNt, como requiere el descriptor de ARNt por defecto. Todos los conjuntos se analizaron con la versión 3.1.1 de RNAMotif (Macke y col., 2001) utilizando el descriptor de estructura de ARNt proporcionado y los ajustes de parámetros por defecto. El enriquecimiento de motivos asociado a genes que codifican transcritos móviles en comparación con los datos de fondo se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher. La especificidad de la estructura tipo ARNt buscada se evaluó mediante escaneos de permutación del descriptor de ARNt por defecto.

Se produjeron 20.000 descriptores de ARNt diferentes alterando aleatoriamente los límites de longitud mínima y máxima aceptados para los tallos y los bucles monocatenarios en el modelo (distribución normal utilizando $\mu=0$, $\sigma=5$; longitud mínima del tallo fijada en 3nt). Cada descriptor se evaluó con los datos móviles/no móviles mediante RNAMotif con la configuración predeterminada. Estructuración; es decir, el porcentaje de nucleótidos con bases apareadas y la energía asociada, dentro de la 3'UTR se abordó mediante la escisión de la porción de secuencia 3'-terminal de 150nt y el posterior análisis de su estructura secundaria predicha (RNAfold, configuración predeterminada).

Escaneos en tándem ARNt-ARNm

Los genes adyacentes a los loci de ARNt se identificaron según los modelos de genes TAIR10, incluyendo genes codificantes de proteínas, genes no codificantes y pseudogenes. La significación estadística de la diferencia de las distribuciones de proximidad génica (distancias entre genes-ARNt y vecinos génicos móviles frente a no móviles) se estimó mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (prueba unilateral); la relevancia se evaluó mediante el tamaño del efecto (D de Cohen) basado en las diferencias medias observadas y las desviaciones estándar asociadas.

Análisis de ARNt bicistrónico

La información de la secuencia del genoma de referencia de *A. thaliana* (TAIR10) se obtuvo de The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org>), las descripciones de los modelos de genes asociados (gtf versión 10.30) se tomaron de <http://plants.ensembl.org>. Los datos de RNA-Seq de fin pareado (lecturas de 100 nt de ambos extremos) se recuperaron del Sequence Read Archive (SRA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), accesiones SRX853394 (14,1G bases, muestra de raíz) y SRX853395 (15,3G bases, muestra de brote) (Thieme y col., 2015), así como DRX014481 (19G bases, muestra de raíz) y DRX014482 (32,7G bases, muestra de raíz). Los datos de lectura se recortaron por calidad y las secuencias adaptadoras de Illumina se recortaron utilizando los ajustes estándar de Trimmomatic (Lohse y col., 2012) (ILLUMINACLIP:<adapterfile>;2:40:15, LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15 y MINLEN:36).

El mapeo de los pares de secuencias mate con el genoma de referencia de *A. thaliana* (TAIR10) se realizó mediante STAR v2.5.1 (Dobin y col., STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, Bioinformatics 2012) basándose en las descripciones de los modelos de genes de Ensembl. Teniendo en cuenta el elevado número de genes de ARNt en el genoma de *Arabidopsis* y sus secuencias similares, se excluyeron las lecturas con alineaciones múltiples, la proyección mínima para las uniones de genes se fijó en 10 nt para las uniones anotadas y en 20 nt para las uniones no anotadas, el número máximo de desajustes permitidos por par fue de 10 nt (outFilterMultimapNmax 1, alignSJDBoverhangMin 10, alignSJoverhangMin 20, outFilterMismatchNmax 10).

Posteriormente, se comprobó que todos los pares de lecturas que correspondían a los cromosomas 1 a 5 con una calidad de alineación mínima $Q \geq 10$ se cruzaban con las anotaciones de genes de ARNt y ARNm. Por último, los 132 transcritos bicistrónicos poli(A)-ARN::ARNt identificados se agruparon por su identidad génica de ARNt (118 genes de ARNt únicos, **figura 7C**), así como por el gen codificador de proteínas (120 genes únicos) y la movilidad de transcrito asignada. Los resultados se compararon con la lista de tándems ARNt-ARNm anotados y la significación estadística del solapamiento observado con los transcritos bicistrónicos se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher.

Resultados

Dos semanas después del injerto, se visualizó *in situ* la actividad de la enzima GUS (**figura 4B, C; figura 6**). Los injertos de control con plantas transgénicas *35S_{pro}:GUS* que carecían de las secuencias de ARNt en la UTR 3' no mostraron actividad GUS ni presencia de ARNm GUS en tejidos distantes de raíz de tipo natural ($n = 0/55$ injertos) u hoja ($n = 0/43$ injertos), lo que indica que ni el ARNm GUS ni la proteína GUS se desplazan por las uniones de injerto (**figura 4C, D**).

Sin embargo, se detectó actividad GUS en células asociadas al floema en raíces de tipo natural tras el injerto del hipocótilo con plantas madre transgénicas que expresaban *GUS::ARNt^{Met}* ($n = 9/44$ injertos) o *GUS::ARNt^{Gly}* ($n = 6/25$ injertos). No se observó actividad GUS en las raíces de tipo natural injertadas con plantas que expresaban *GUS::tRNA^{1^{le}}* ($n = 0/57$ injertos). De nuevo, los ensayos RT-PCR confirmaron la presencia de *GUS::ARNt^{Met}* y *GUS::ARNt^{Gly}*, y la ausencia de transcritos *GUS::ARNt^{1^{le}}* en las raíces de tipo natural tras el injerto (**figura 4D**). En particular, los injertos inversos con raíces transgénicas e injertos de tipo natural indican que el transcrito de fusión *GUS::ARNt^{Met}* móvil de brote a raíz no se desplaza de raíz a brote ($n = 0/36$ injertos) y que *GUS::ARNt^{Gly}* apenas se desplaza de raíz a brote ($n = 3/26$ injertos).

Para saber si se requiere toda la secuencia de ARNt o si basta con una subsecuencia para mediar en la movilidad del ARNm, se utilizaron constructos de delección de *ARNt^{Met}* que carecían de las estructuras de brazo/bucle de dihidrouridina (D), anticodón (A) o T ψ C (T) asignadas y combinaciones de las mismas (**figura 4C**). Una vez más, las plantas que expresaban estos constructos de fusión de ARNm GUS se injertaron con plantas de tipo natural y, a continuación, se examinaron para

determinar la actividad GUS y la presencia del transcrito de fusión. Como indican los ensayos de GUS y RT-PCR, los constructos ΔD , ΔDT , y ΔDA , pero no el constructo de delección de $\Delta AT\ ARNt^{Met}$, fueron suficientes para mediar el transporte de GUS a las raíces de tipo natural y, con una frecuencia muy baja, a las hojas de la púa (**figura 4C, D**). La presencia del transcrito $GUS::\Delta DARNt^{Met}$ y la traducción en células asociadas al floema de raíces y hojas de tipo natural demuestra que sólo se requiere una parte de la secuencia $ARNt^{Met}$ para activar la movilidad. Esto también demuestra que las secuencias de horquilla A y T ψ C tienen funciones redundantes en la activación del transporte de ARNm, ya que sólo las delecciones de las secuencias de horquilla A y T ψ C eliminaron la movilidad del transcrito de fusión GUS.

Para dilucidar si las secuencias de ARNt o los motivos TLS relacionados confieren movilidad al ARNm, se evaluó si la población de ARNm móvil endógena encontrada en *A. thaliana* está enriquecida en secuencias de ARNt relacionadas con TLS virales. Para ello, se examinó la base de datos del transcriptoma móvil de injerto de *A. thaliana* (n = 3606) (Thieme y col., 2015) para detectar la presencia de motivos TLS en las UTR del ARNm y las secuencias codificantes (CDS) (**figura 7A**). Se realizaron escaneos en busca de motivos estructurales independientes de la secuencia utilizando un descriptor de consenso de ARNt proporcionado (Macke y col., 2001) que reconoce las disposiciones de bucle de tallo de ARNt (**figura 8**). El análisis reveló que un número significativo de transcritos móviles encontrados en *A. thaliana* (11,4 %; n = 411 de 3606) o vid (*Vitis vinifera*) (7,5 %; n = 249 de 3333) albergan un motivo TLS que se encuentra enriquecido en la CDS y la 3'UTR (**figura 7A**). Además, los genes de ARNt anotados estaban sobrerrepresentados en estrecha proximidad de genes que codifican transcritos móviles. Independientemente de la asignación de ADN-cadena, 158 de 1.125 genes flanqueados por un gen de ARNt produjo ARN móviles, y de estos 158 casos, 113 se ubican dentro de intervalos de distancia de 1.000 pb (**figura 7B**).

Ejemplo 3

La movilidad del ARNm mediada por una estructura similar al ARNt es importante para el desarrollo y la función normales

Introducción

Para confirmar los hallazgos de los ejemplos 1 y 2, y para corroborar la noción de que los TLS desempeñan un papel en la movilidad del transcrito de genes endógenos, se utilizaron mutantes de inserción de la *colina cinasa 1* (*CK1*; gen TAIR#AT1G71697), que produce un transcrito móvil de injerto (Thieme y col, 2015), que está muy cerca de un locus $ARNt^{Gly}$ y que produce un transcrito bicistrónico según los datos de secuenciación de extremos emparejados.

Métodos

Injerto

El procedimiento detallado de injerto de tallo de inflorescencia de *Arabidopsis* utilizado para los ensayos de movilidad de CK1 se realizó según lo descrito (Nisar y col., 2012) y las muestras se cosecharon para la extracción de ARN y la detección de RT-PCR una semana después del injerto.

RT-PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó según el método SYBR Green en un volumen de 5 μ l utilizando 4 μ g de ARN total, 2,5 μ l de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), cebadores directos e inversos 0,2 μ M. Para cada mutante *ck1* genómicamente confirmado se aisló y utilizó el ARN de 3-5 plantas individuales. Se realizaron al menos tres réplicas técnicas. Se utilizó un detector de secuencias ABI System (Applied Biosystems 7900HT fast Real time PCR) con el siguiente regimiento de termociclado: Fase 1: 1 ciclo, 2 minutos a 50 °C; Fase 2: 1 ciclo, 10 minutos a 95 °C; Fase 3: 40 ciclos, 15 segundos a 95 °C, 1 minuto 60 °C. Fase de disociación: 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C, 15 segundos a 95 °C. Los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR se enumeran en la **tabla 2**.

Resultados

CK1 cataliza la reacción de colina a fosfatidilcolina (y el transcrito *CK1* es bicistrónico, que alberga una secuencia de $ARNt^{Gly}$ (TAIR#AT1G71700) en la región 3'UTR ($CK1:ARNt^{Gly}$). Para comprobar si la movilidad del ARNm de *CK1* depende de la presencia de $ARNt^{Gly}$ en la 3'UTR, primero se confirmaron y luego se utilizaron dos líneas de inserción de ADN-T SALK para experimentos de injerto: *ck1.1* (SALK_070759) y *ck1.2* (SALK_023420) (**figura 7D**). En los mutantes *ck1.1*, el ADN-T se localiza dentro del primer intrón, mientras que los mutantes *ck1.2* tienen una inserción de ADN-T entre el codón de parada del gen *CK1* y la secuencia $ARNt^{Gly}$ anotada, lo que provoca que la secuencia codificante de *CK1* y la secuencia $ARNt^{Gly}$ estén muy separadas entre sí.

Se realizaron experimentos de injerto en tallos de *Arabidopsis* con *ck1.2* y de tipo natural (Col-0) y se analizó la presencia de $CK1::ARNt^{Gly}$ de tipo natural y ARNm de *ck1.2* truncado en muestras de cepas y púas mediante RT-PCR (**figura 7E**).

Aunque los mutantes *ck1.2* producen un transcrito poli(A) *CK1* de longitud completa que contiene todas las secuencias que codifican proteínas, el transcrito truncado que carece de la secuencia $ARNt^{Gly}$ no pudo detectarse en las muestras

de tipo natural. Por el contrario, el transcrito *CK1::ARNt^{Gly}* de tipo natural estaba presente tanto en las muestras de tejido de púa *ckl.2* como en las de cepa *ckl.2*. Esto sugiere que el transcrito *CK1::ARNt^{Gly}* era bidireccionalmente móvil de la cepa a la púa (**figura 7E**), mientras que el transcrito mutante *ckl.2* que carecía de la secuencia *ARNt^{Gly}* no se transportaba a través de las uniones de los injertos. Así pues, la movilidad de injerto del transcrito bicistrónico *CK1::ARNt^{Gly}* producido endógenamente depende de la presencia de la secuencia 3'UTR *ARNt^{Gly}*.

Dado que la falta de movilidad detectable del transcrito *ckl.2* podría deberse a bajos niveles de expresión, se realizaron ensayos cuantitativos de RT-PCR para evaluar los niveles de expresión de *CK1* en los dos mutantes *ckl.1* y *ckl.2* y en las plantas de tipo natural. Aquí, sólo se pudo detectar una expresión mínima en el mutante *ckl.1*, mientras que los niveles de transcripción de *CK1* en el mutante *ckl.2* fueron similares a los encontrados en el tipo natural (**figura 7F**). A pesar de que las plantas de tipo natural y las mutantes *ckl.2* produjeron niveles similares de transcrito de ARN poli(A) *CK1*, tanto la línea *ckl.2* como la línea *ckl.1* mostraron una disminución significativa del tamaño de la hoja en roseta en comparación con el tipo natural (figura 7F). Esto implica que no sólo se requiere la presencia de ARNm de *CK1* en las células que lo expresan para el comportamiento de crecimiento normal de *Arabidopsis*, sino también la movilidad del ARNm de *CK1* por toda la planta.

Referencias citadas

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., y Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Cho, S.K., Sharma, P., Butler, N.M., Kang, I.H., Shah, S., Rao, A.G., y Hannapel, D.J. (2015). Polypyrimidine tract-binding proteins of potato mediate tuberization through an interaction with StEELS RNA. *J Exp Bot* 66, 6835-6847.
- Curtis, M.D., y Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133, 462-469.
- Juhling, F., Morl, M., Hartmann, R.K., Sprinzl, M., Stadler, P.F., y Putz, J. (2009). tRNAdb 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 37, D159-162.
- Lamesch, P., Berardini, T.Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D.L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A.S., Lee, C.H., Nelson, W.D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., y Huala, E. (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Res* 40, D1202-1210.
- Lohse, M., Bolger, A.M., Nagel, A., Fernie, A.R., Lunn, J.E., Stitt, M., y Usadel, B. (2012). RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res* 40, W622-627.
- Macke, T.J., Ecker, D.J., Gutell, R.R., Gautheret, D., Case, D.A., y Sampath, R. (2001). RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic acids research* 29, 4724-4735.
- Nisar, N., Verma, S., Pogson, B.J., y Cazzonelli, C.I. (2012). Inflorescence stem grafting made easy in *Arabidopsis*. *Plant Methods* 8, 50.
- Thieme, C.J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., Miambres, M., Walther, D., Schulze, W.X., Paz-Ares, J., Scheible, W.-R.D., y Kragler, F. (2015). Endogenous *Arabidopsis* messenger RNAs transported to distant tissues. *Nature Plants* 1, 15025.
- Zhang, S., Sun, L., y Kragler, F. (2009). The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiology* 150, 378-387.
- Zhang, W., Kollwig, G., Stecyk, E., Apelt, F., Dirks, R., y Kragler, F. (2014). Graft-transmissible movement of inverted-repeat-induced siRNA signals into flowers. *The Plant journal* 80, 106-121.

REIVINDICACIONES

1. Método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, que comprende:
5 -modificar un ARNt presente en el ARNm mediante la mutación del gen a partir del cual se transcribe el ARNm,
 o
 -incluir la secuencia de un ARNt en la parte transcrita del gen,
10 en donde el ARNt se selecciona del grupo que consiste en ARNt^{Ala}, ARNt^{Arg}, ARNt^{Asn}, ARNt^{Asp}, ARNt^{Cys},
 ARNt^{Gln}, ARNt^{Glu}, ARNt^{Gly}, ARNt^{His}, ARNt^{Leu}, ARNt^{Lys}, ARNt^{Met}, ARNt^{Phe}, ARNt^{Pro}, ARNt^{Ser}, ARNt^{Thr}, ARNt^{Trp},
 ARNt^{Tyr}, ARNt^{Val}.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la movilidad intercelular está entre diferentes órganos.
15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde mutar el gen es para inducir la pérdida de movilidad del
 transcrito y comprende delecionar la secuencia del ARNt del gen, mutar la secuencia del ARNt para
 cambiar la configuración tridimensional de la misma, o insertar un elemento genético en el gen para eliminar
 el ARNt de la parte transcrita del gen.
20 4. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde mutar el gen es para inducir un cambio en el destino del
 transcrito y comprende modificar la secuencia del ARNt del gen de manera que el transcrito se dirija
 a una ubicación diferente del destino original del transcrito.
25 5. Método según la reivindicación 3, en donde mutar el ARNt comprende delecionar parte de la secuencia transcrita
 de la misma, mutar uno o más nucleótidos implicados en la formación de una estructura de tallo-bucle en el
 ARNt, insertar uno o más nucleótidos en un tallo-bucle del ARNt para cambiar su configuración tridimensional.
30 6. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde la inclusión de la secuencia codificante de un ARNt en la
 parte transcrita del gen es mediante la introducción de la secuencia complementaria del ARNt en un
 constructo de ADN que comprende la secuencia complementaria del ARNm.
35 7. Método según la reivindicación 6, en donde el ARNt se introduce en la región no traducida 3' del ARNm, o
 en la región no traducida 5' del ARNm.
40 8. Método según las reivindicaciones 6 o 7, en donde el constructo de ADN es para una integración estable
 en el genoma de la planta, o para la expresión transitoria en el organismo, o para transcripción *in vitro*.
45 9. Método según la reivindicación 1 o 2, que comprende:
 a) introducir la secuencia complementaria de un ARNt en la parte transcrita del gen *in vitro*;
 b) transcribir el gen que comprende el ARNt *in vitro*; e
 c) introducir el ARNm así obtenido en la planta.
50 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el cambio en la movilidad da como
 resultado una pérdida de la función del gen.
 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el cambio en la movilidad da como
 resultado la producción ectópica del producto génico en la planta.
 12. Método para cambiar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en una planta, en donde dicha planta
 consiste en un portainjerto de una primera planta sobre el que se ha injertado una púa de una segunda
 planta, y en donde el método comprende modificar la movilidad intercelular de un ARNm de un gen en la
 primera y/o la segunda planta según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-11.

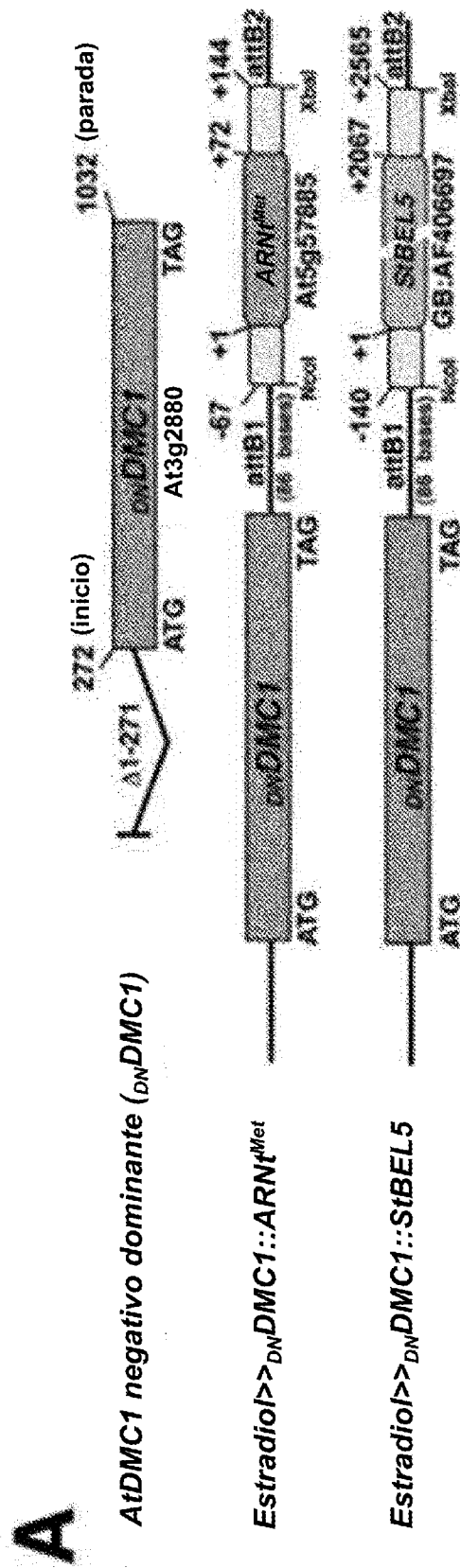


Figura 1A

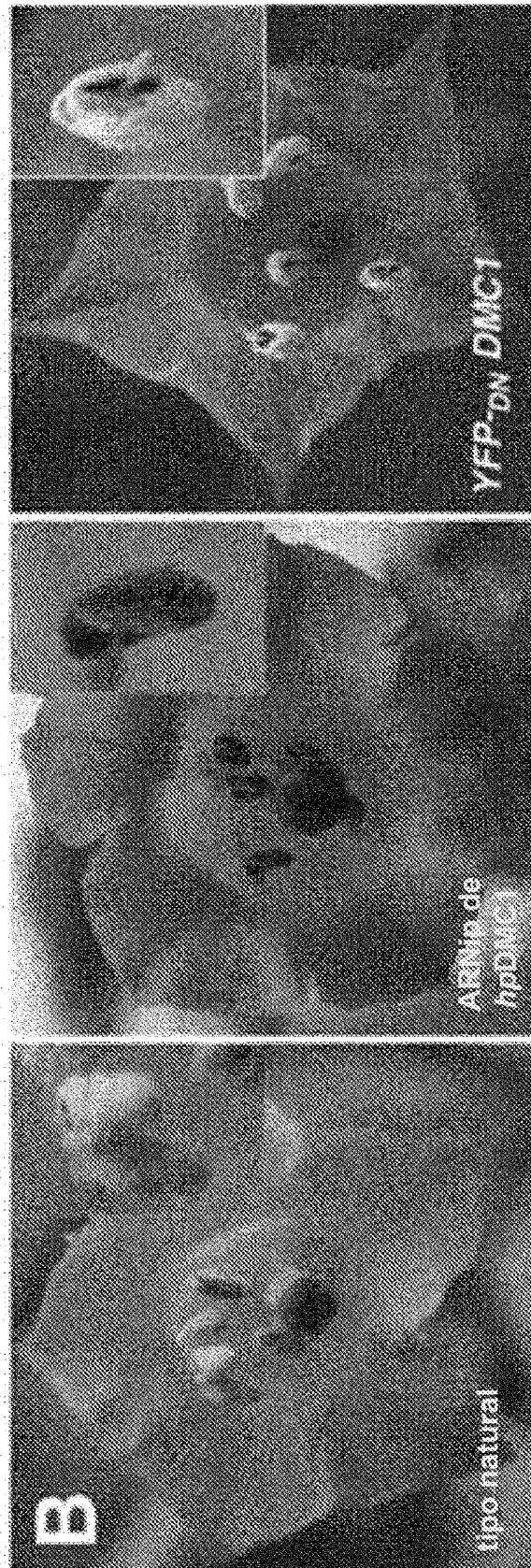


Figura 1B

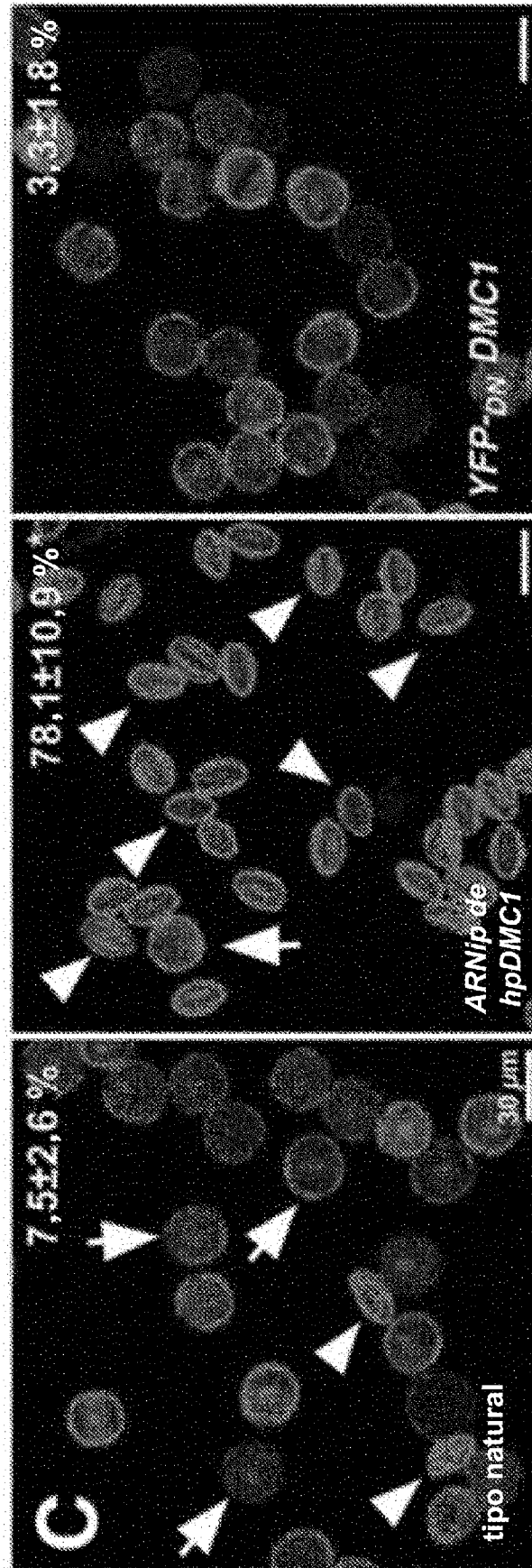


Figura 1C

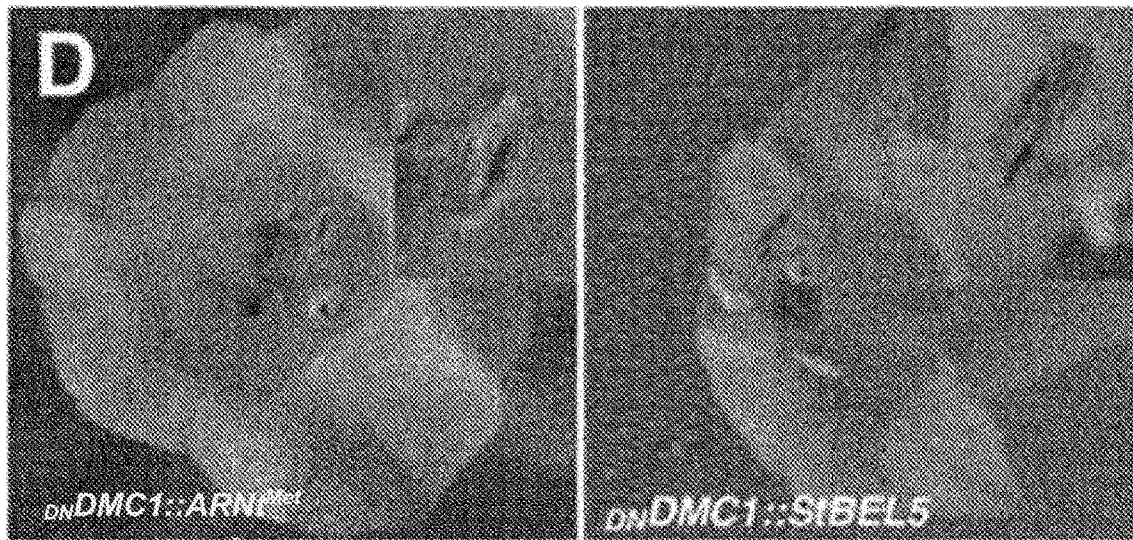


Figura 1D

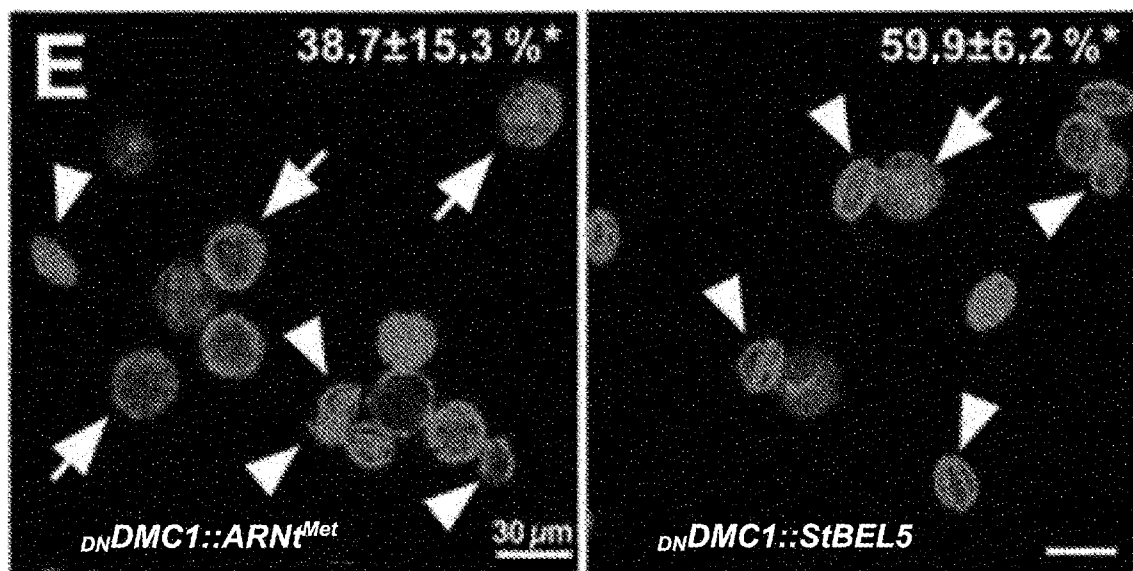


Figura 1E

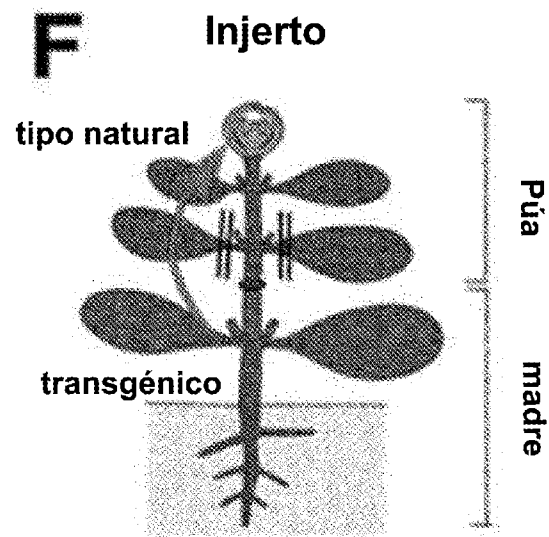


Figura 1F

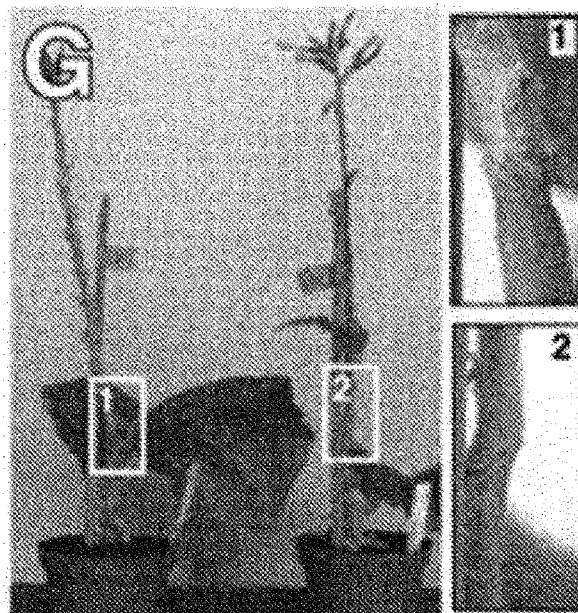


Figura 1G

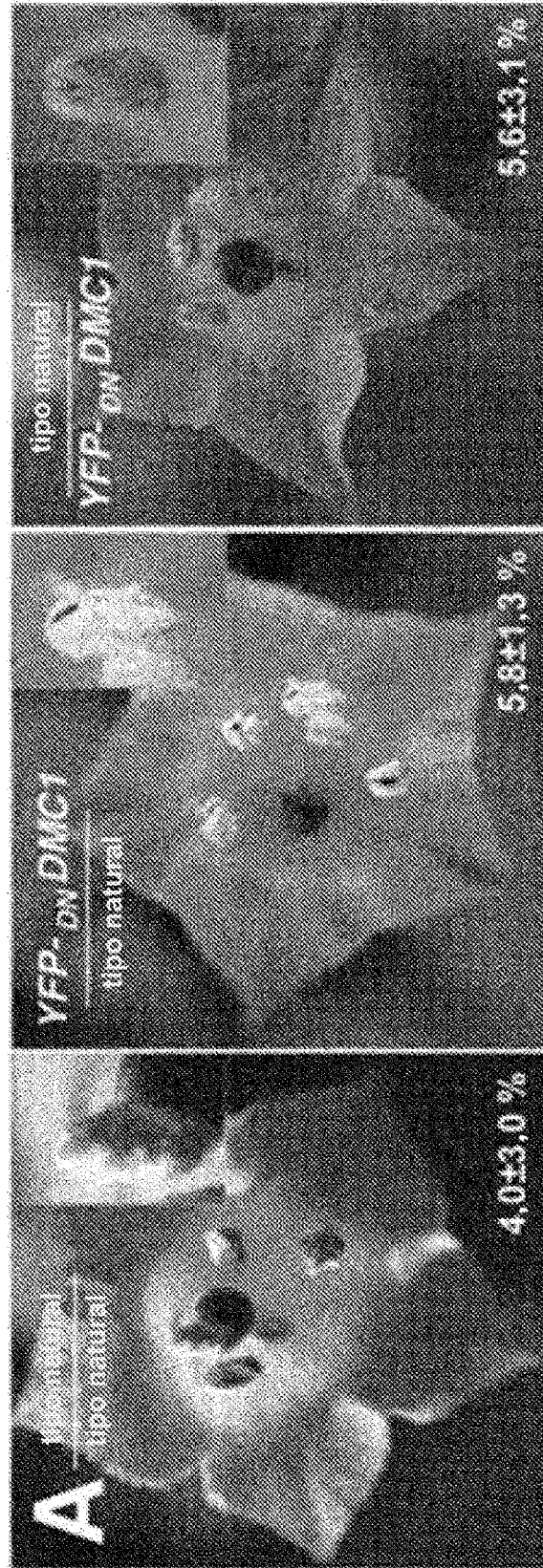


Figura 2A

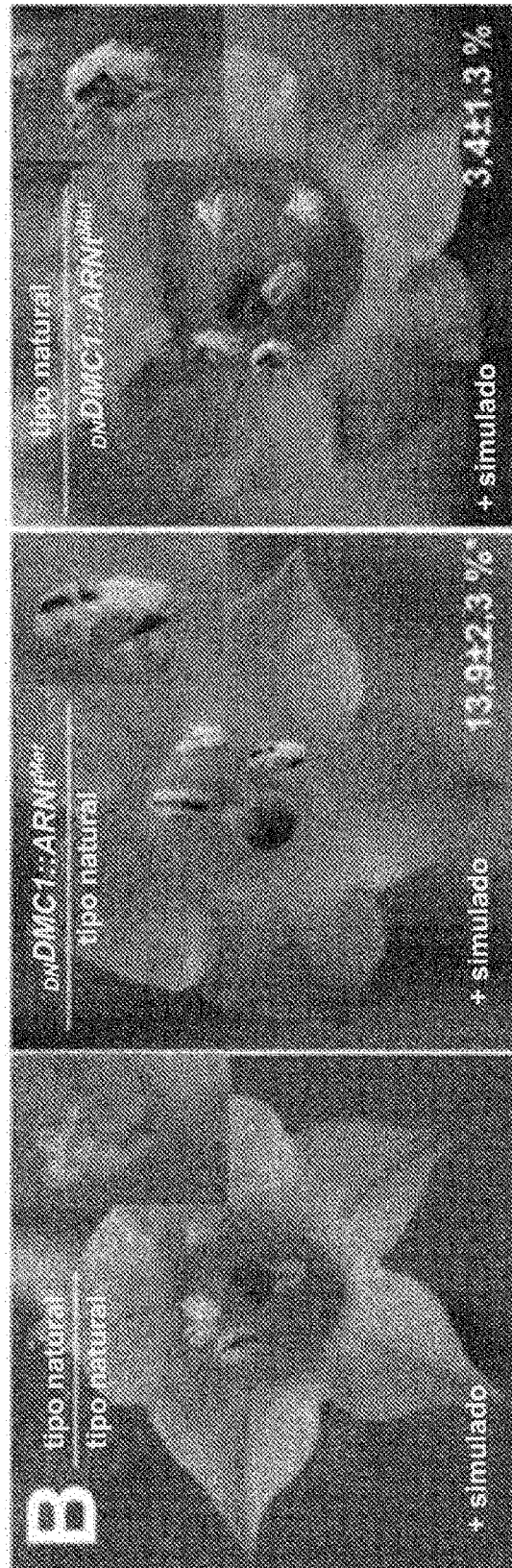


Figura 2B



Figura 2B continuación

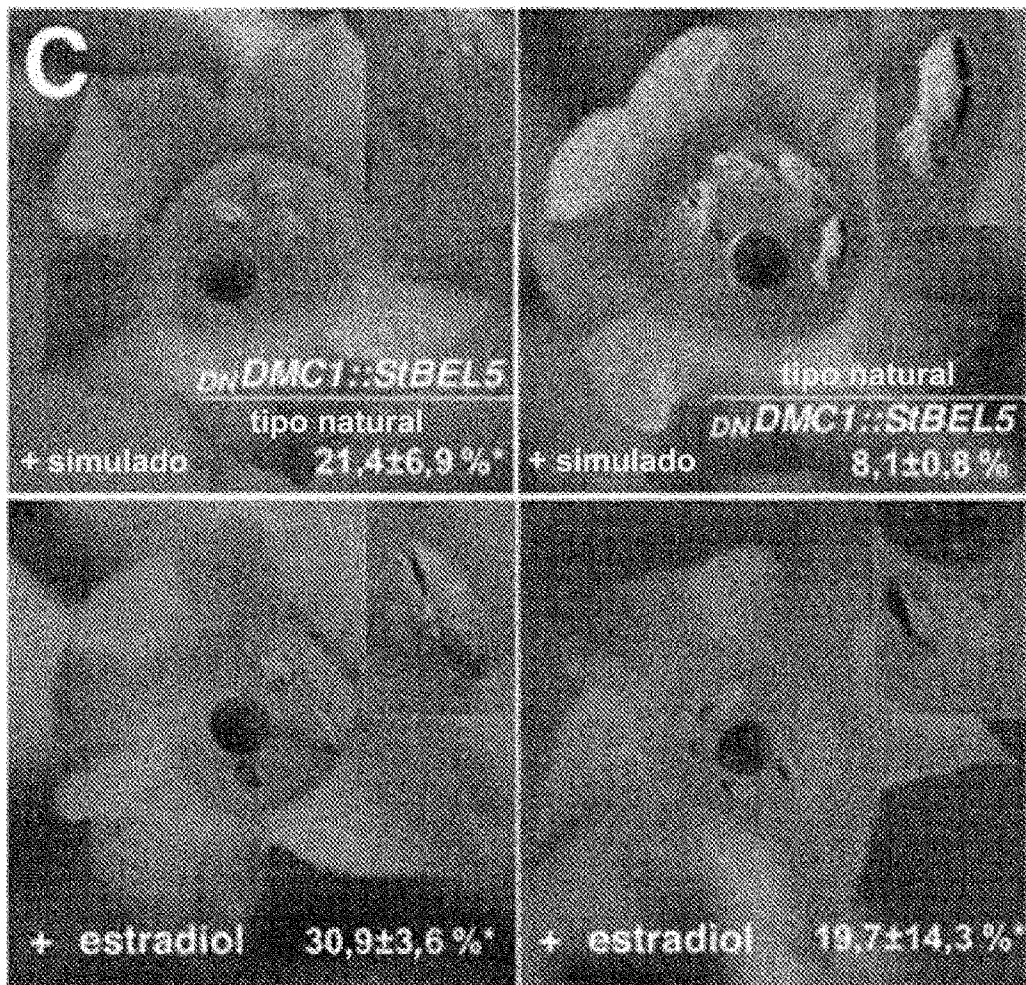
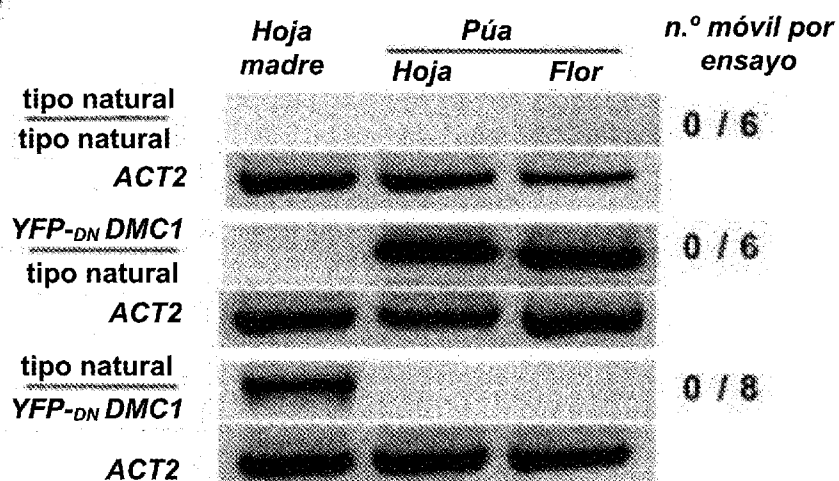
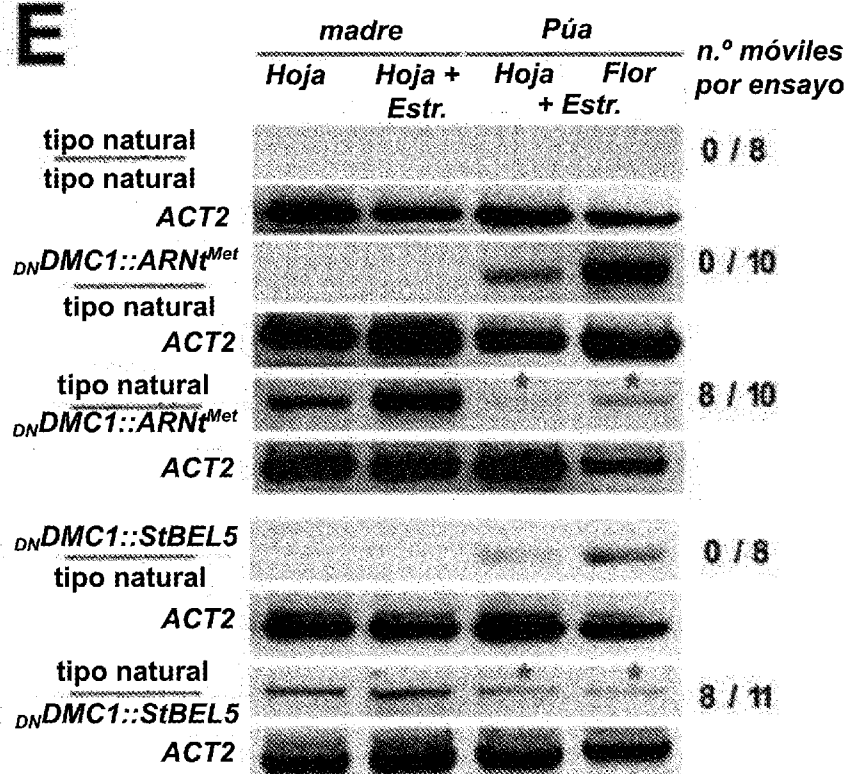


Figura 2C

D**Detección de ARNm de RT-PCR****Figura 2D****E****Figura 2E**

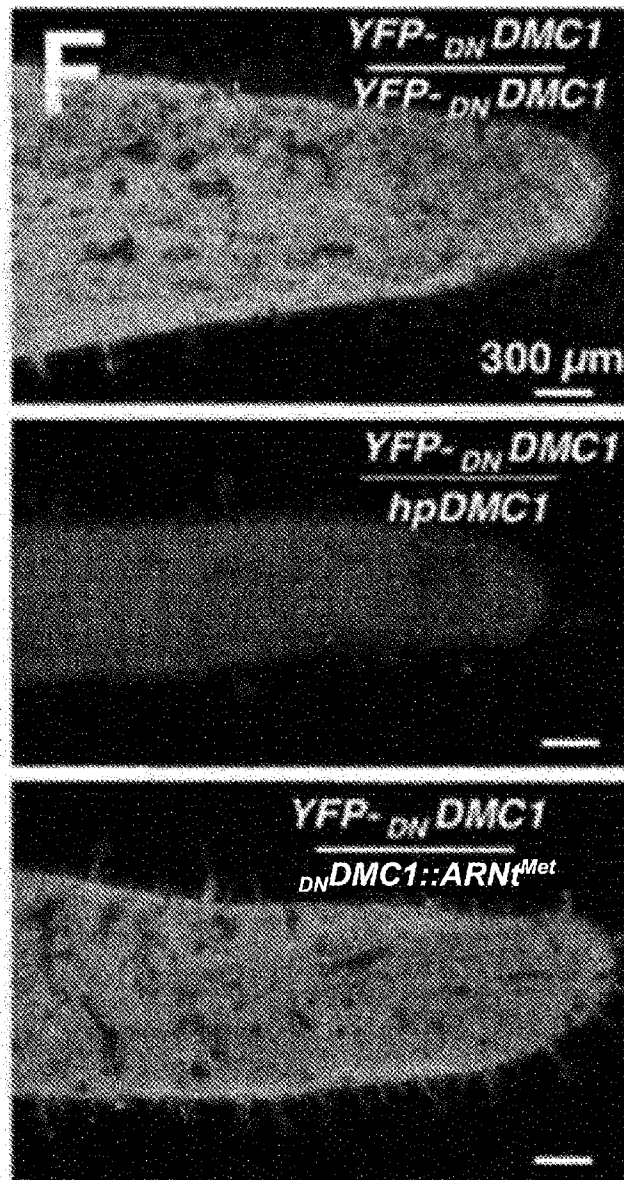


Figura 2F

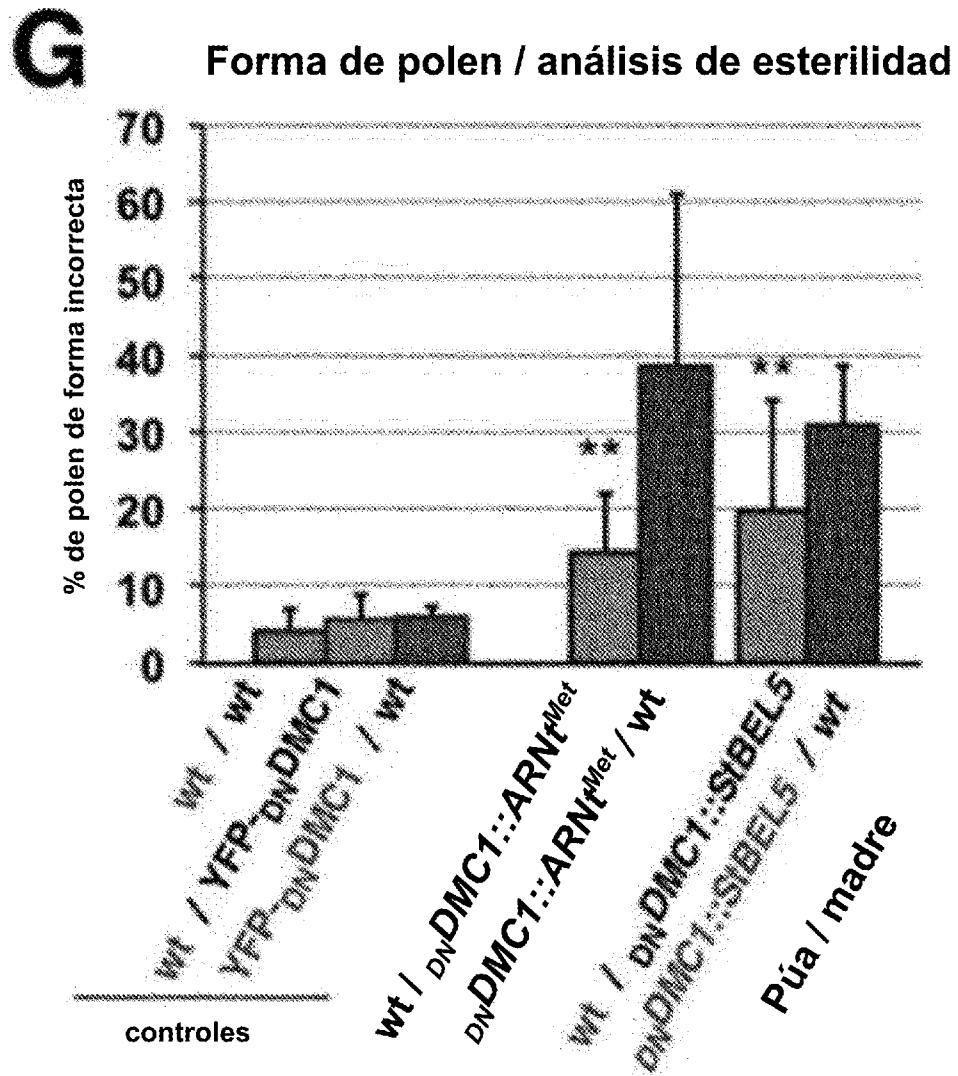


Figura 2G

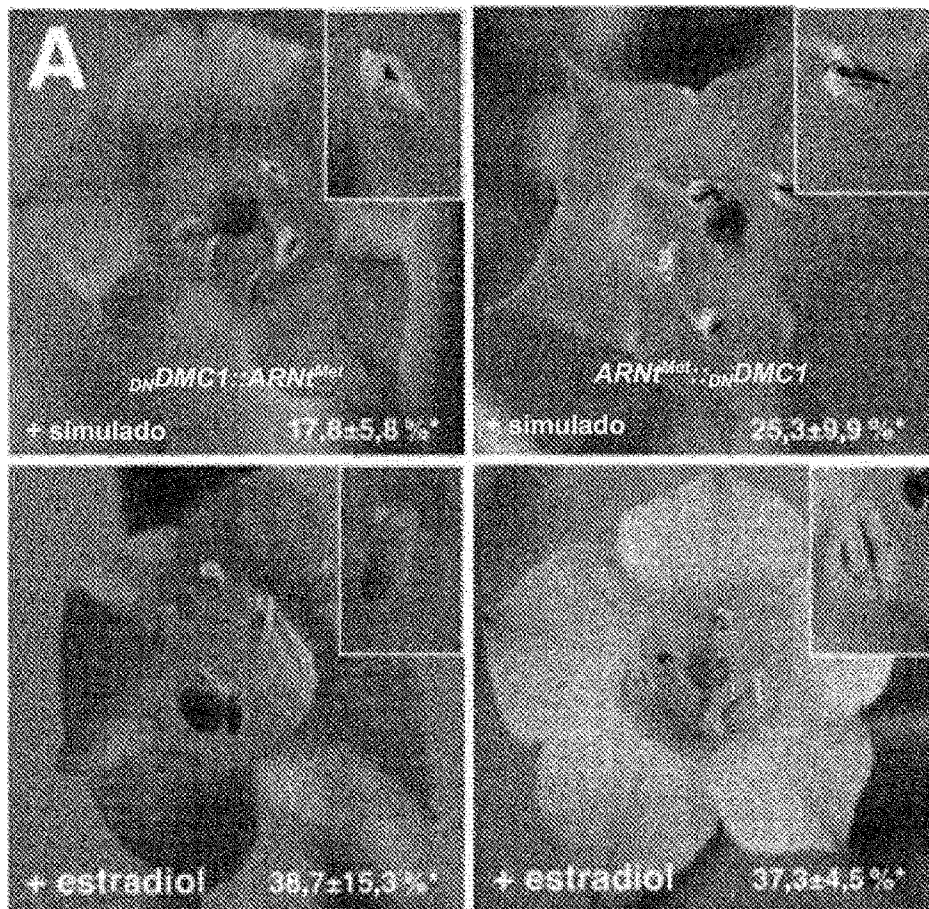


Figura 3A

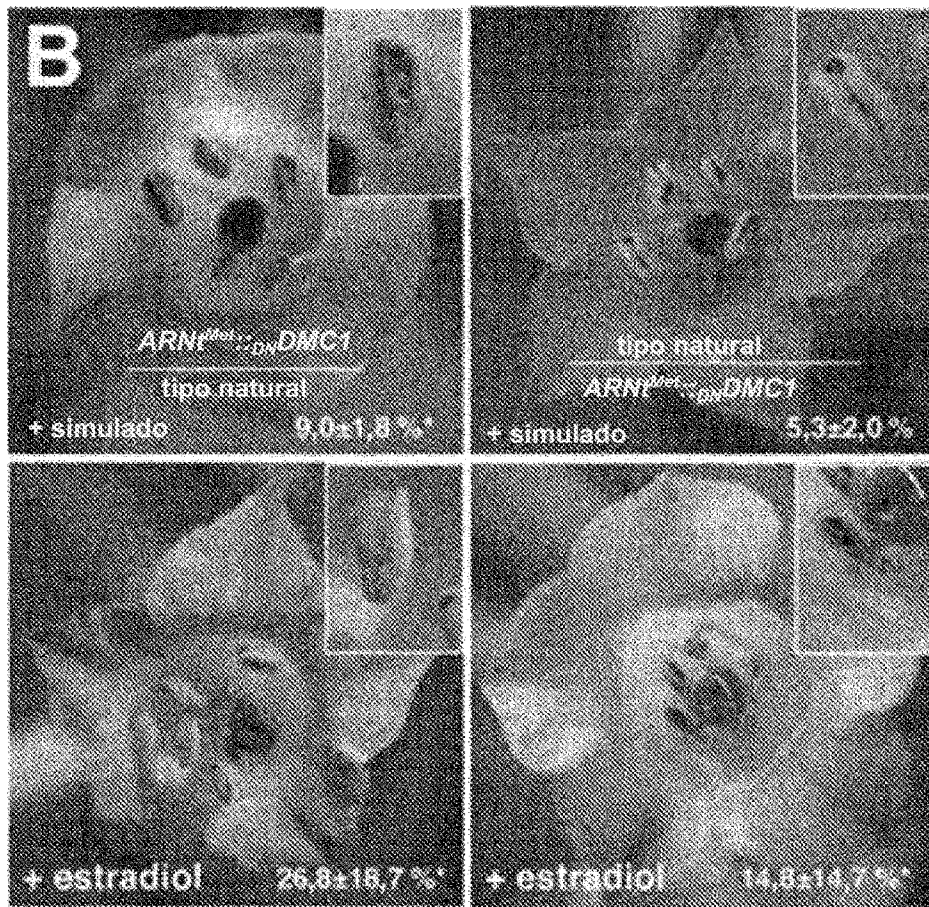


Figura 3B

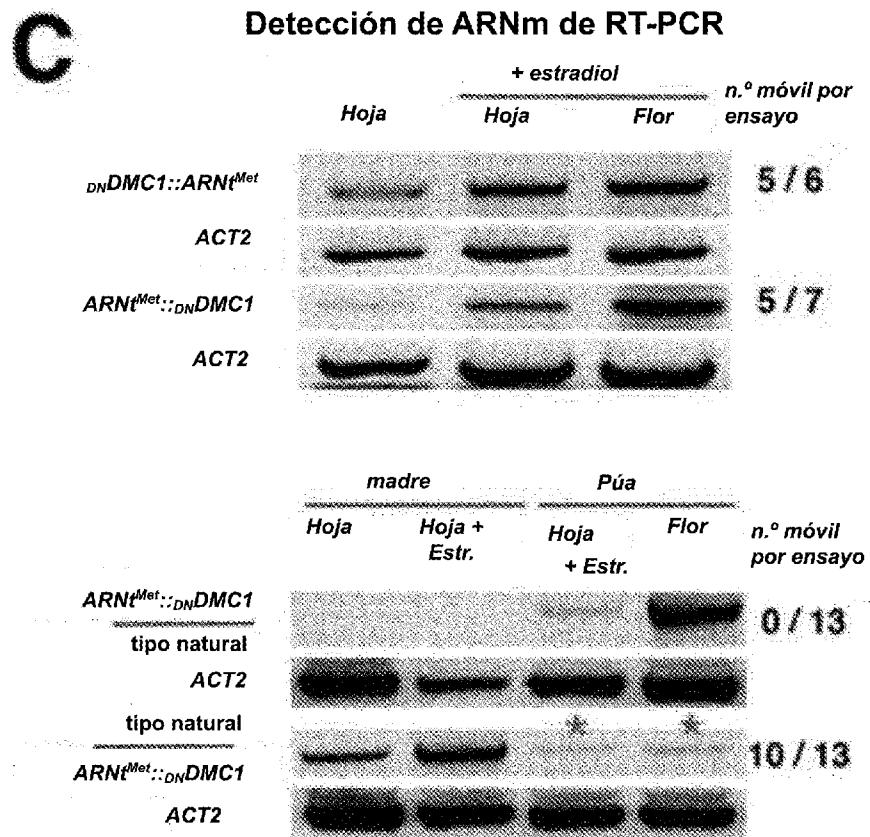


Figura 3C

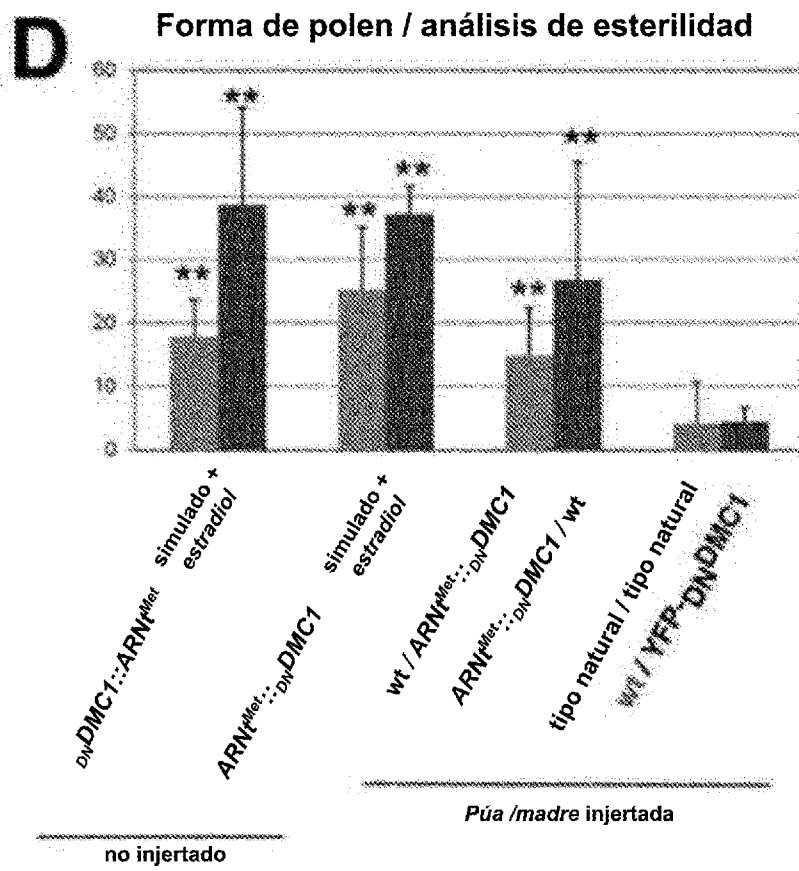


Figura 3D

A

Construuto de fusiónGUS::ARNt

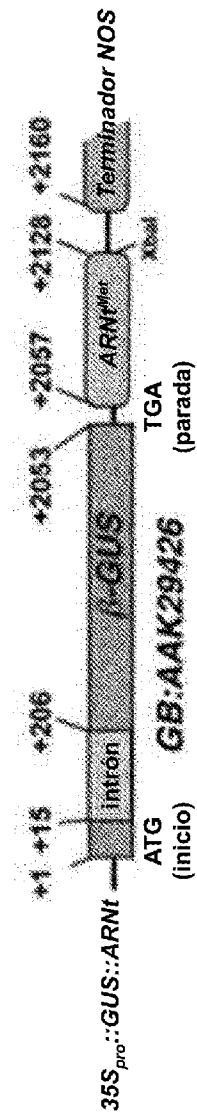


Figura 4A

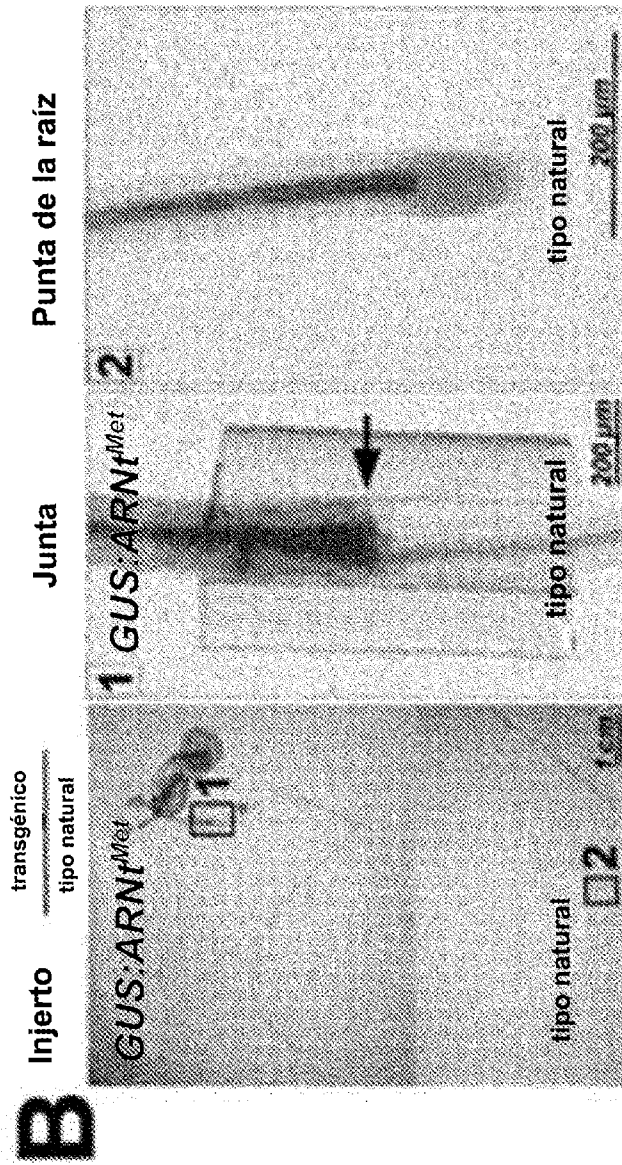
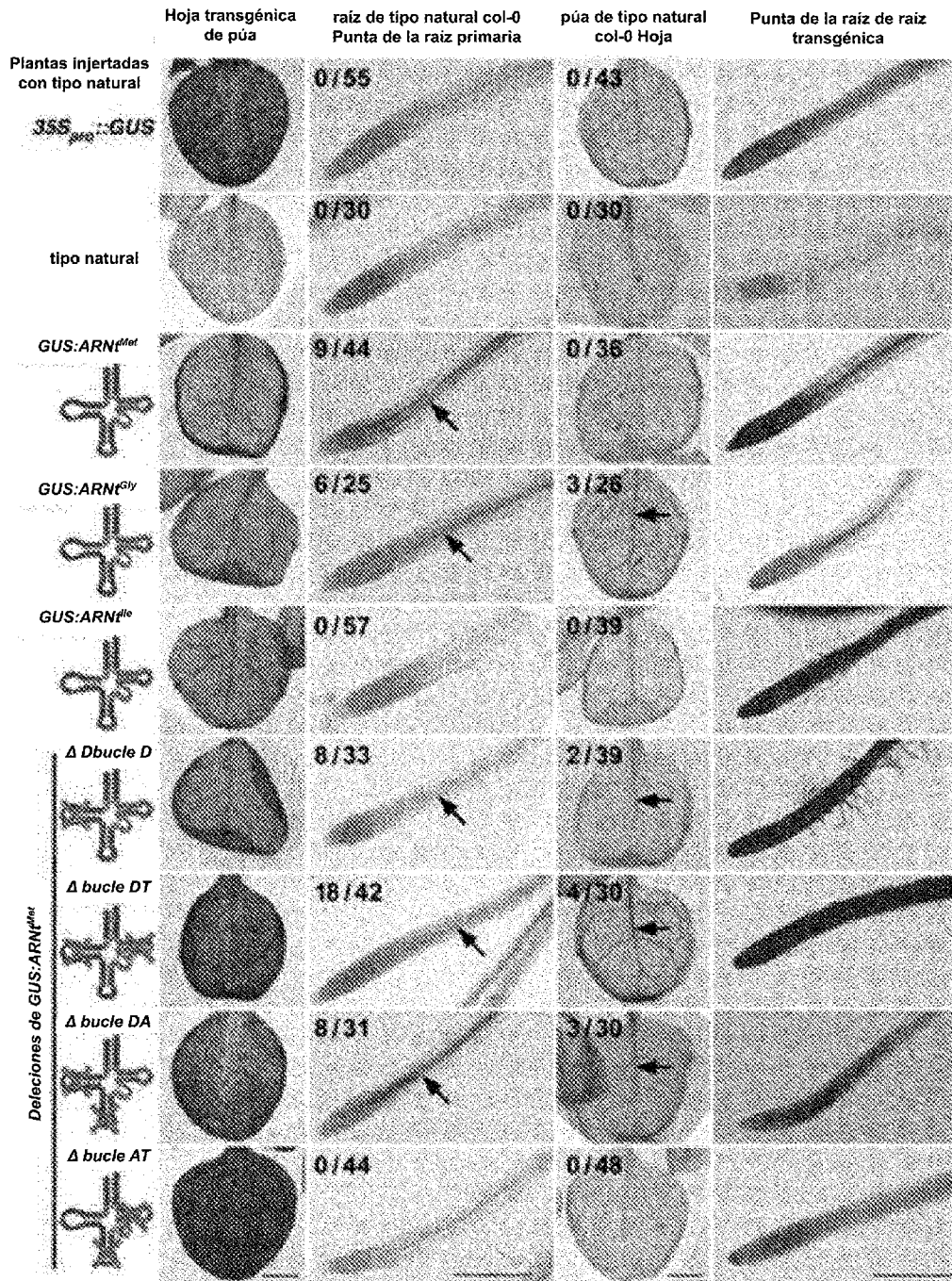


Figura 4B

C**Detección de actividad enzimática de GUS****Figura 4C**

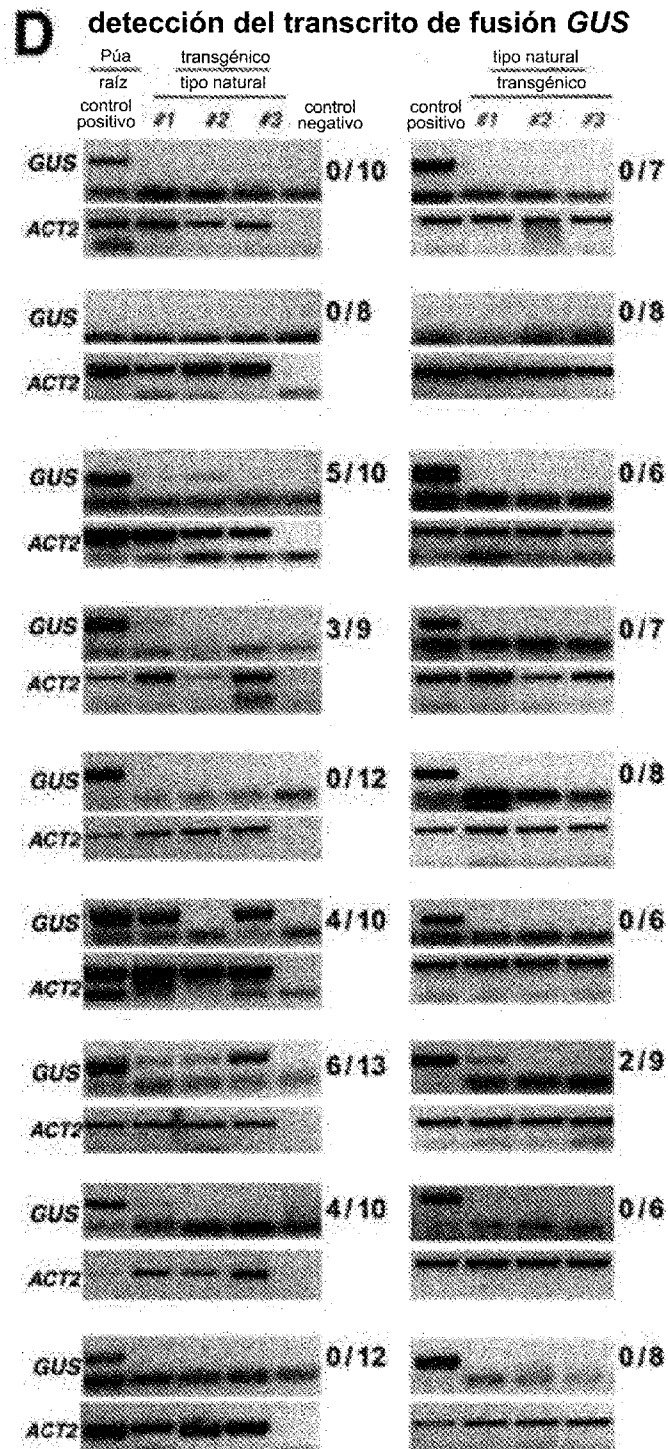


Figura 4D

***GUS:ARNT* secuencias de constructo de fusión**

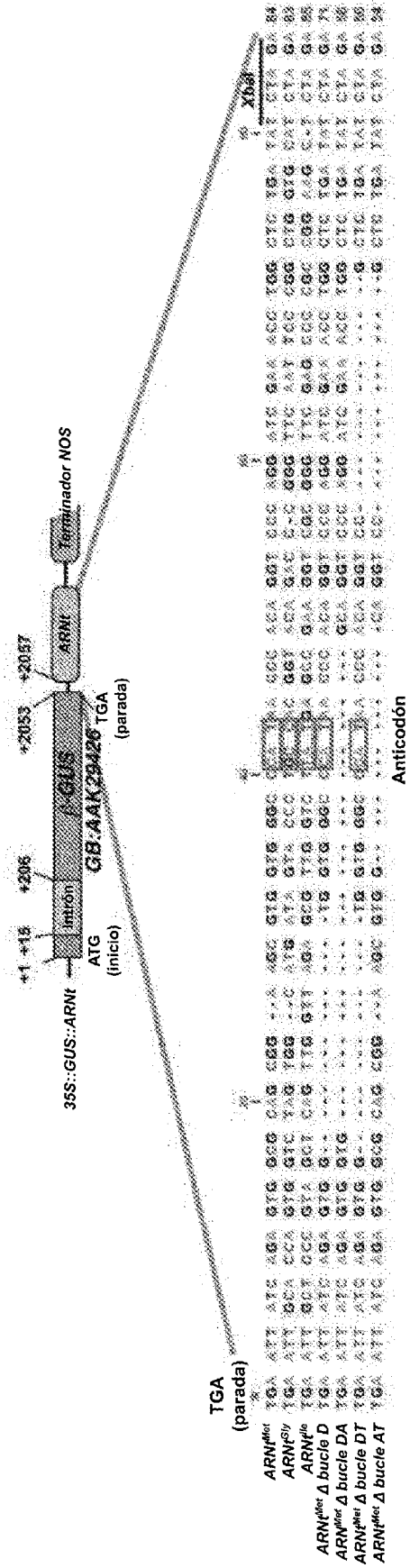


Figura 5

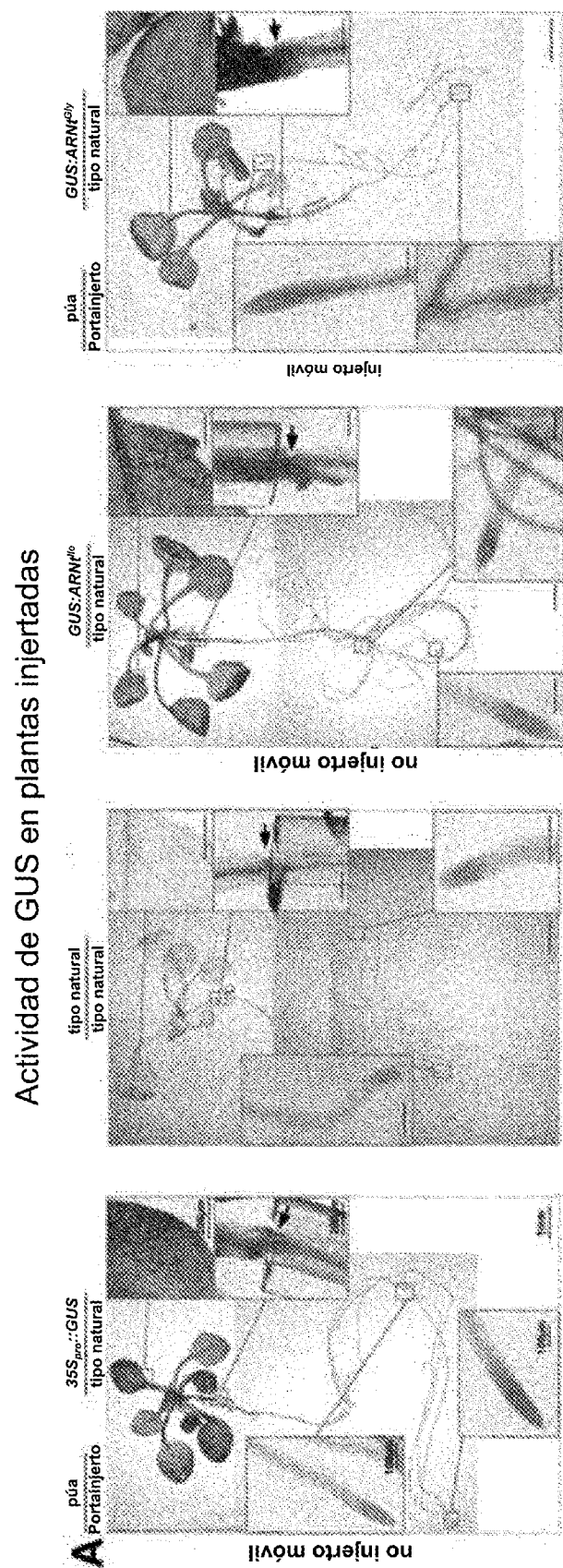


Figura 6A

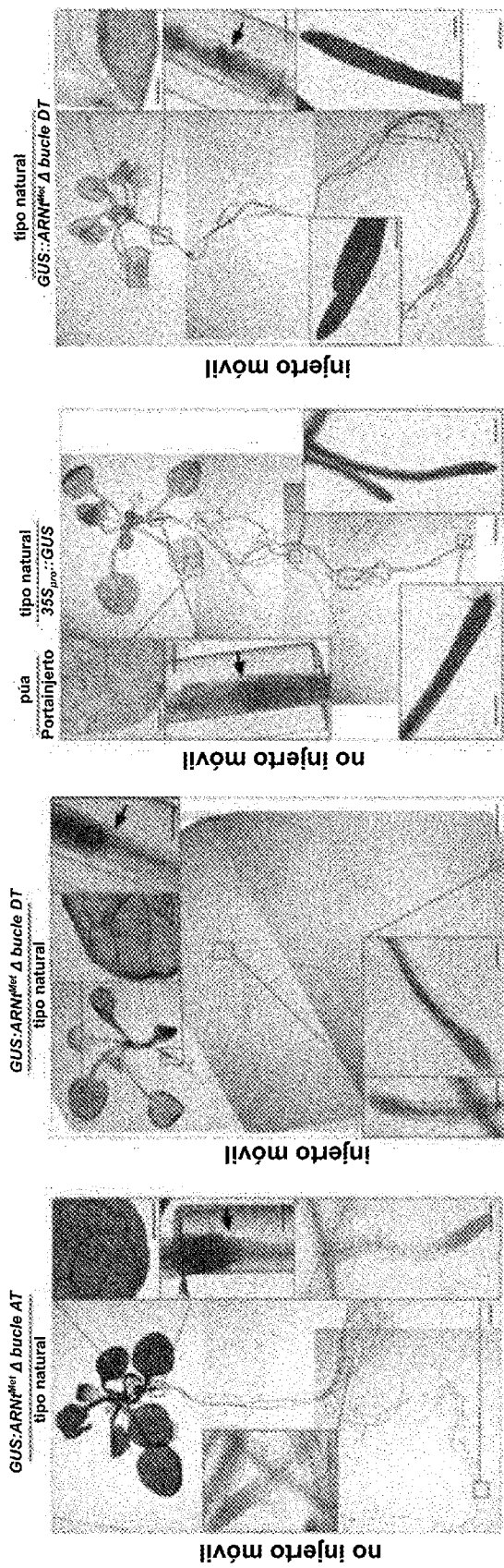


Figura 6A continuación

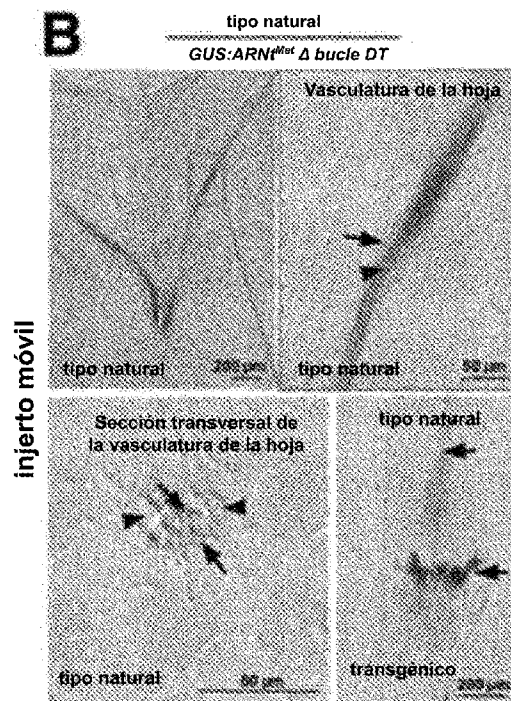


Figura 6B

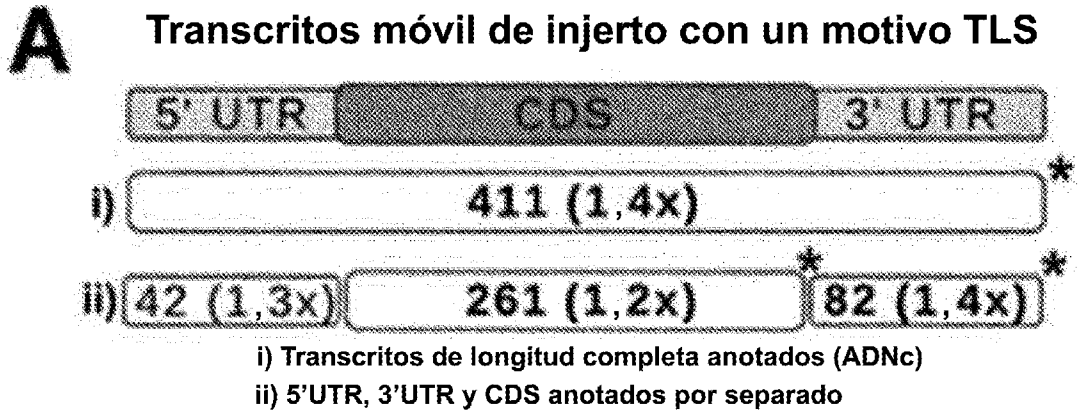


Figura 7A

B Proximidad de secuencias de ARNt a genes que codifican transcritos móvil

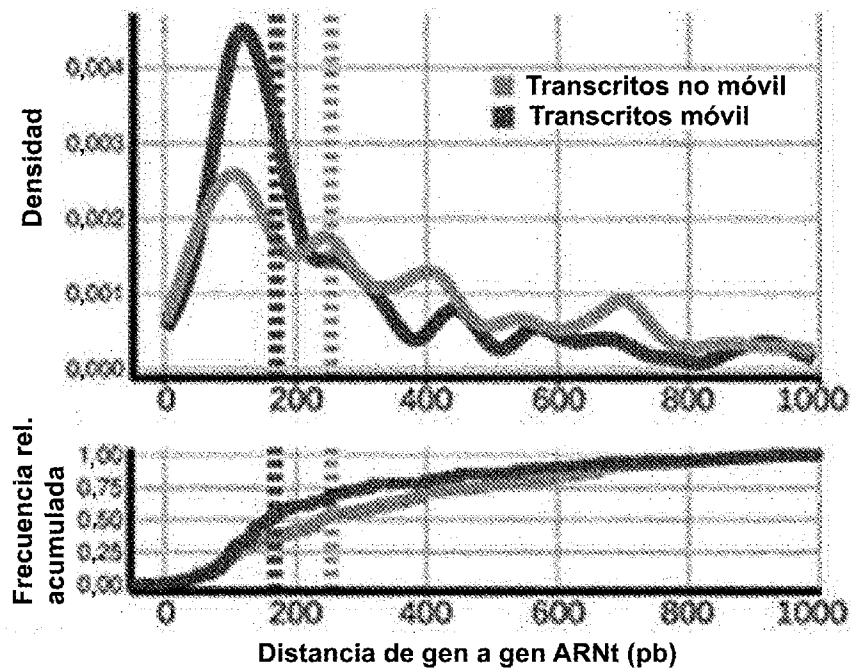


Figura 7B

C Secuencias de ARNt dicistrónicas cubiertas por lecturas de ARN-Seq

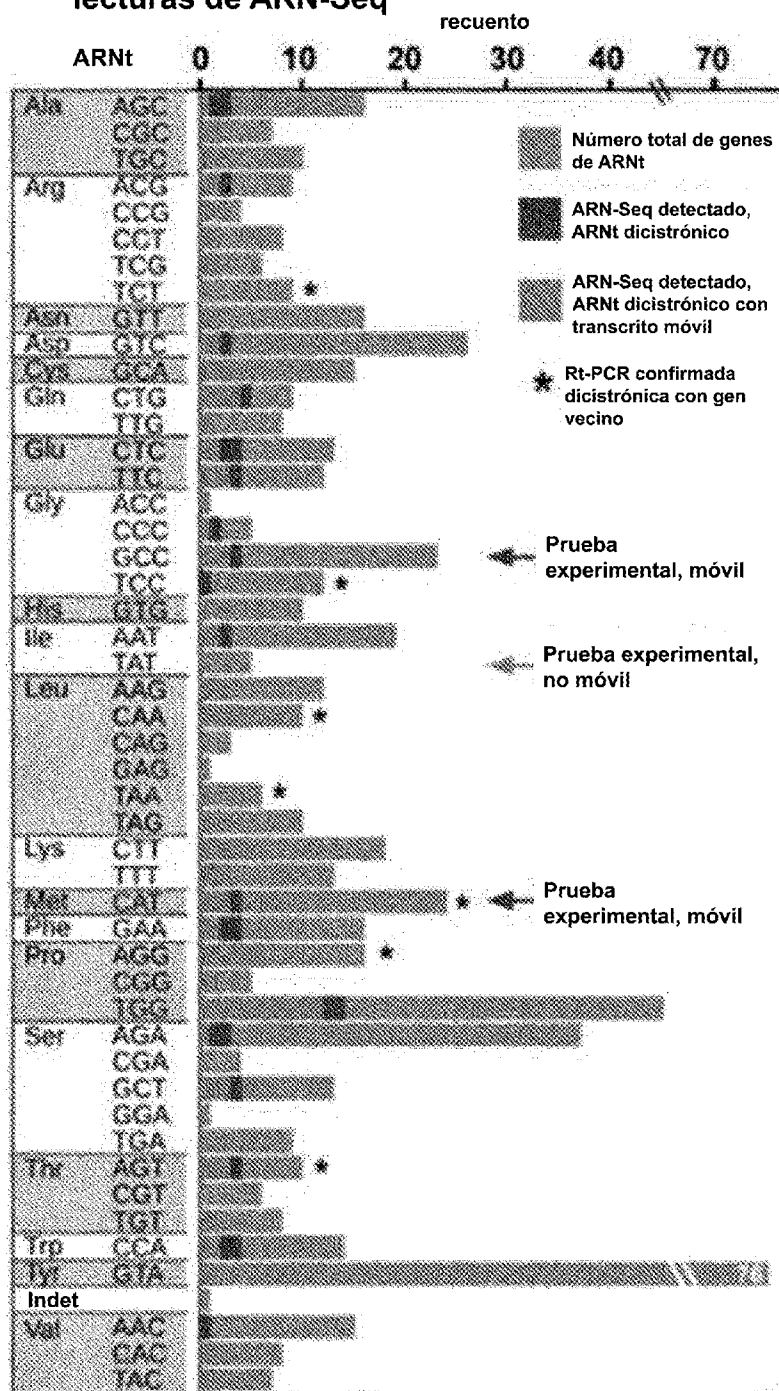


Figura 7C

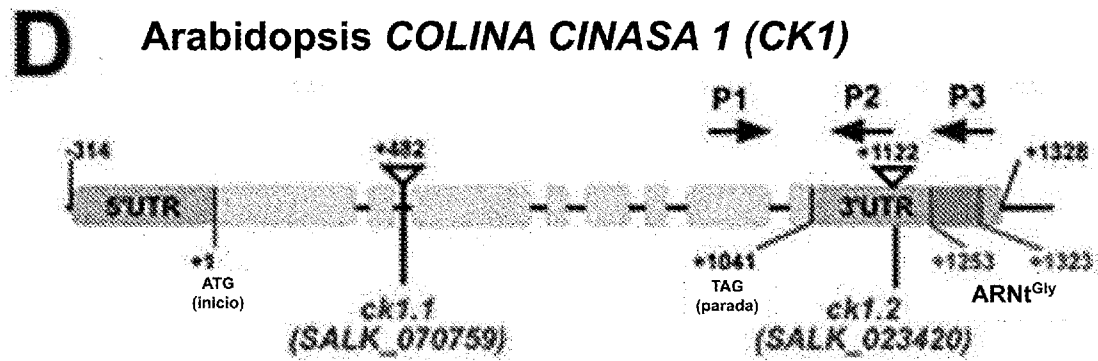


Figura 7D

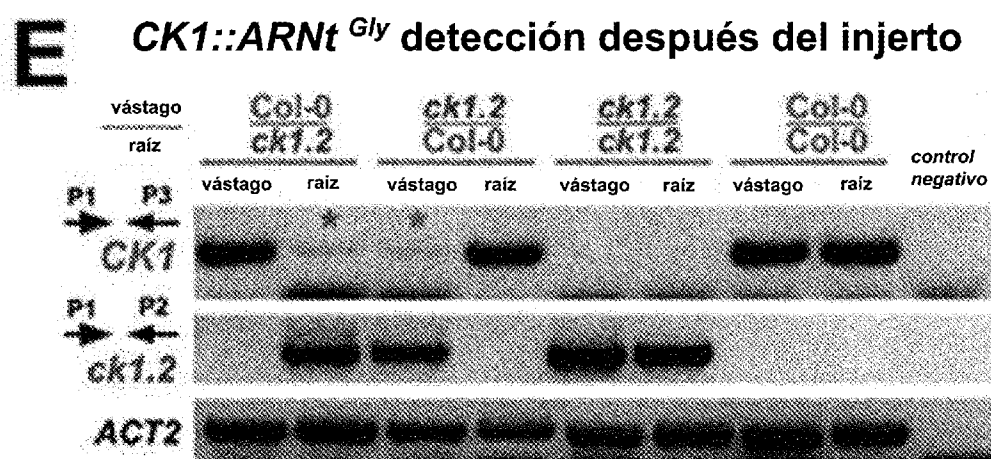


Figura 7E

F

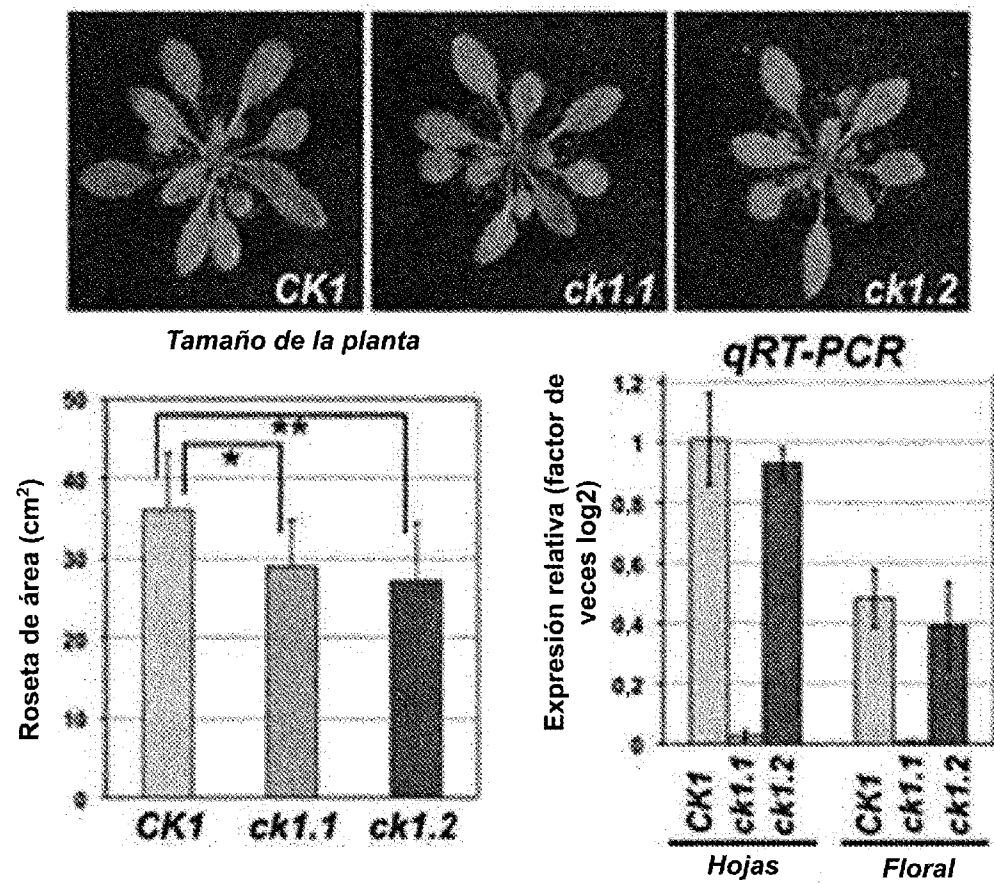


Figura 7F

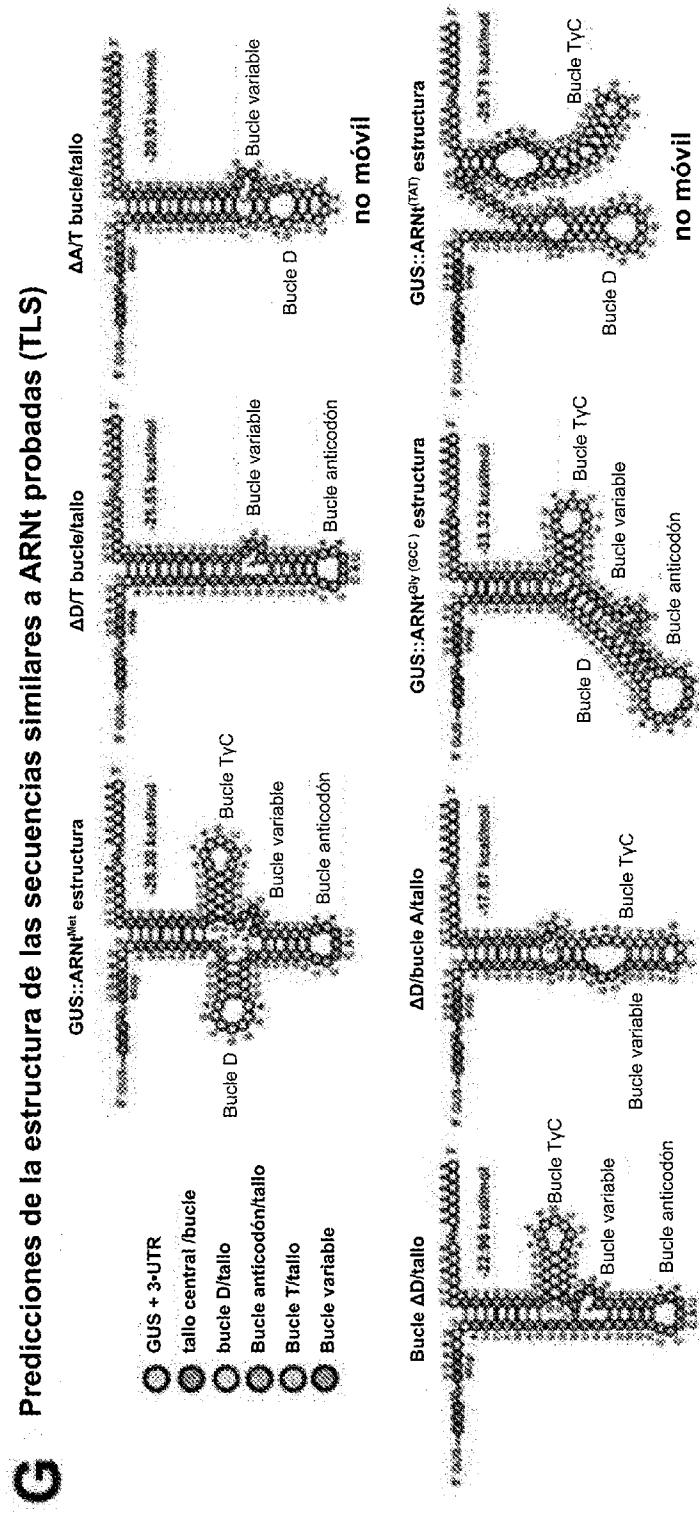


Figura 7G

A

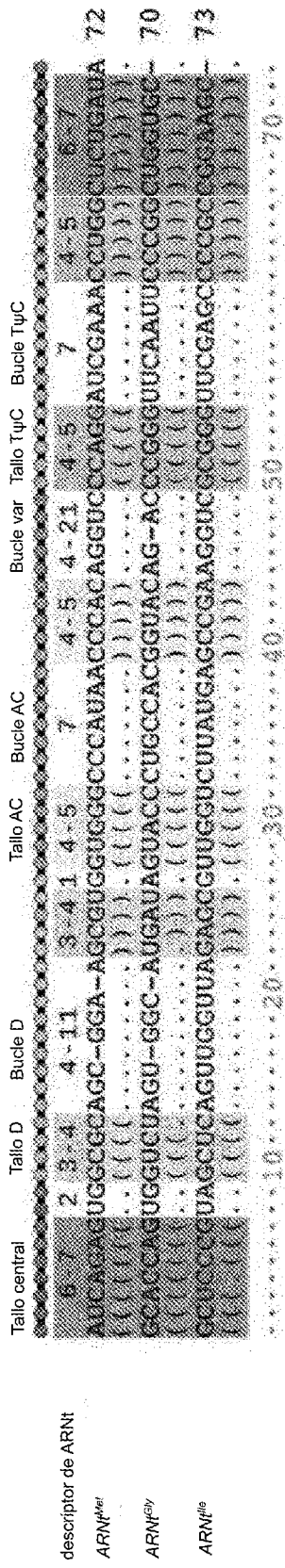


Figura 8A

B

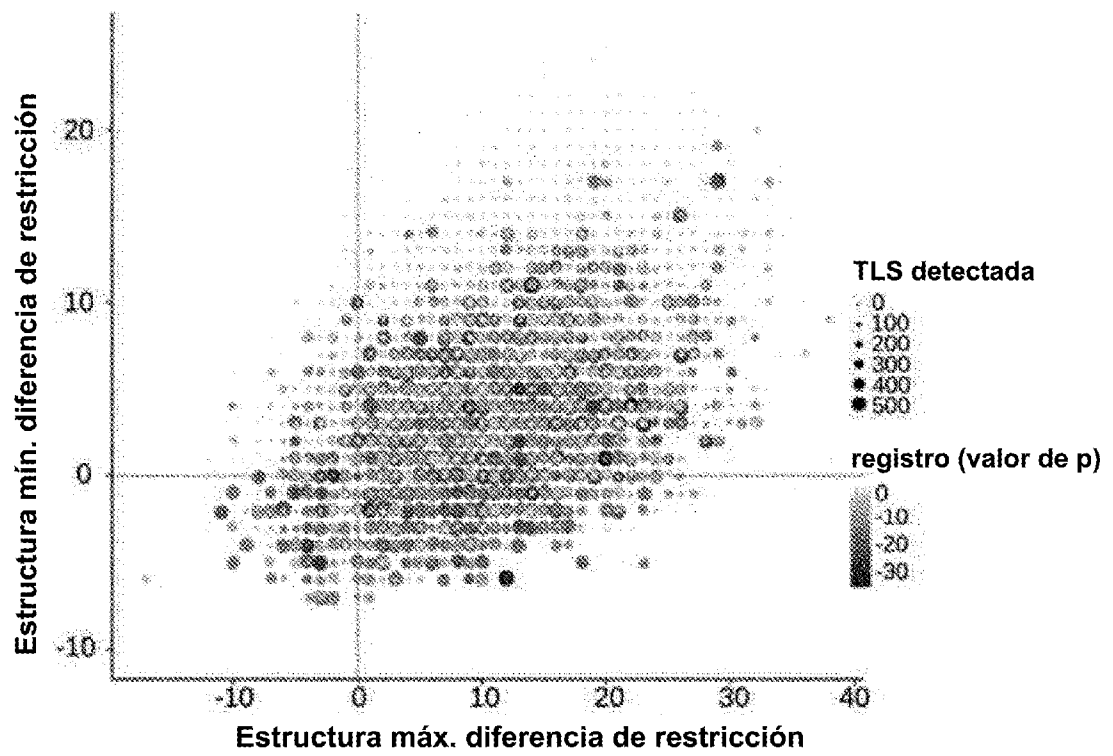


Figura 8B

C

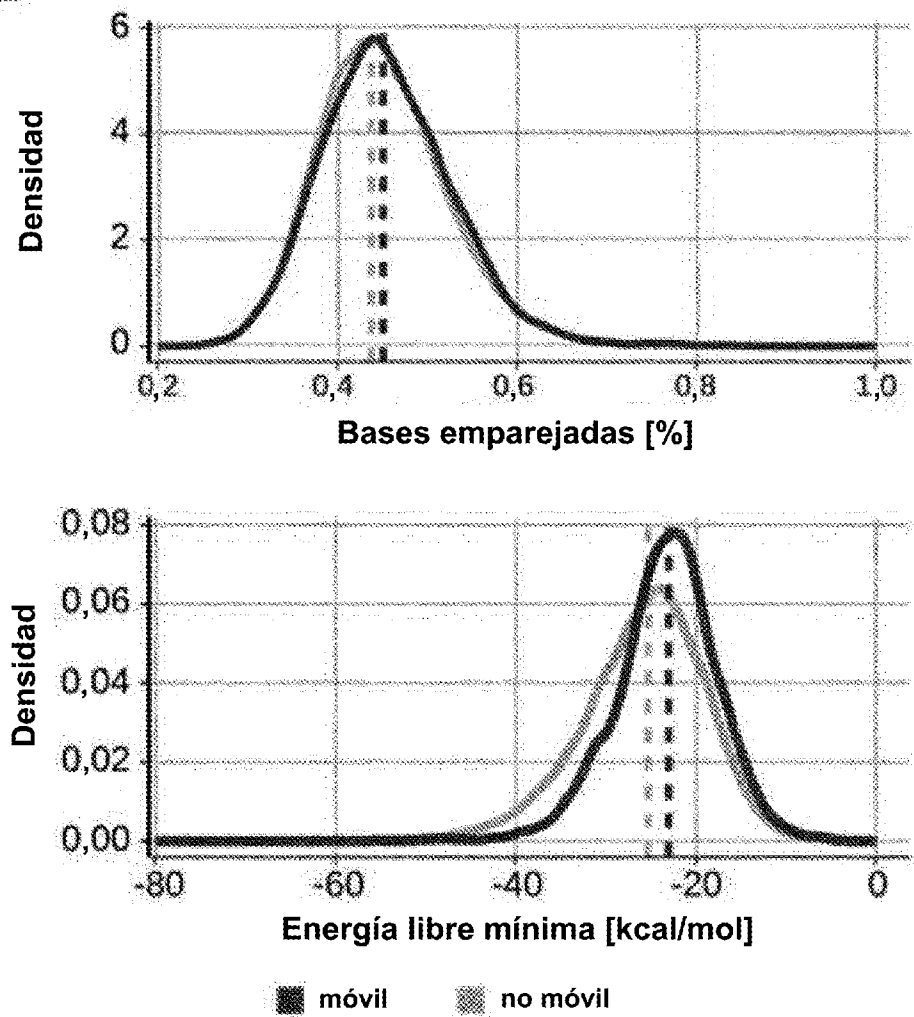


Figura 8C