



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Redundancia funcional entre proteínas abundantes en la
embriogénesis tardía (LEAs) del grupo 4 en *Arabidopsis thaliana***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Biol. David Felipe Rendón Luna

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Alejandra Covarrubias Robles
Instituto de Biotecnología, UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Berenice García Ponce de León
Instituto de Ecología, UNAM

Dra. Gladys Iliana Cassab López
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Mor., Septiembre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“...

*El infinito ciclo de las ideas y de los actos,
infinita invención, experimento infinito,*

...

*Todo nuestro conocimiento nos acerca a nuestra ignorancia,
Toda nuestra ignorancia nos acerca a la muerte,*

...

¿Dónde está la sabiduría que hemos perdido en conocimiento?

¿Dónde el conocimiento que hemos perdido en información?

...”

El Primer Coro de la Roca

Thomas S. Eliot

1934

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, María del Consuelo Luna Moreno, por siempre apoyarme en todo lo que hago; por siempre preocuparse por mí; por todos los valores que he aprendido de ella; por ser en definitiva un pilar muy importante en mi vida.

A mi papá, Jaime Roberto Rendón Moreno, por contagiarme de su carácter firme y disciplinado; por ser el culpable de que tenga un gran amor por los libros y la lectura, una sana enfermedad para toda la vida; por todas las pláticas que tenemos entre nosotros y con la familia, que van desde religión hasta política, pasando por deportes y trucos de cocina.

A mi hermana, Penélope Rendón Luna, por siempre escucharme cuando tengo algo que platicar, sin importar que tan simple sea; por animarme a seguir saliendo adelante en lo que hago.

A mi tío, Álvaro Rendón Moreno, por las pláticas interminables que ocurrían cuando iba a Los Mochis; por su inolvidable recuerdo de la virgen de manos tímidas; por su defensa de que el baseball es un deporte mágico; por haberme contagiado, igual que mi papá, con el amor por los libros y la lectura. Te sigo recordando Tío Rendón.

A la familia Rendón, por todas las historias que he escuchado de ellos; por todas las reuniones donde las risas, las anécdotas, los análisis deportivos y las cervezas nunca faltan; por el apoyo que he recibido de ellos.

A la familia Luna, por la hospitalidad que he recibido de todos por igual ahora que vine a hacer el posgrado al centro del país; en especial, a mi tío Antonio Luna Moreno, por sus valores humanos; por todas las historias que escucho de él, acompañados de un buen tequila.

Al Dr. Jorge Arturo Cid Becerra, por ser un excelente profesor y gran ser humano; por todo lo que he aprendido de él; por haberme animado a estudiar la maestría; por enseñarme que de nada sirve tener conocimiento si no lo transmitimos a los demás.

A la Dra. Alejandra Covarrubias Robles, por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio; por ser un gran ser humano dentro y fuera del laboratorio; por todo su conocimiento, del cual he aprendido mucho; por aguantar mi forma de ser y mi muy peculiar forma de hablar.

Al Dr. José Luis Reyes Taboada, por ser alguien de quien también he aprendido mucho; por siempre estar dispuesto a escuchar alguna opinión o ser parte de una buena discusión.

A la Dra. Catalina Arenas Huertero, por todo lo que aprendí de ella respecto al trabajo en laboratorio; por sus críticas hacía el proyecto que desarrollé; por todo lo que discutimos y seguimos discutiendo aunque sea a distancia.

A todos los miembros del laboratorio “Acovs”, en particular a César Cuevas, de quien también he aprendido mucho y que me ayuda a discutir resultados e ideas que van surgiendo cada día; a Carlos De la Rosa, por ser un gran amigo, un hermano, un excelente guitarrista; por todas las borracheras, las pláticas amenas, los raites, los consejos y las discusiones de proyectos; a Miguel Palomar, por las discusiones de protocolos y de resultados; por su excelente humor cuando no anda de malas; a Rosy Solorzano, por los regaños cuando hacemos algo mal y por los consejos para hacer bien nuestros experimentos; a Lupita Sosa, por las historias, frases y onomatopeyas que surgen a su alrededor; a Jenny García, por ser un Alma tan caritativa y dadivosa; a Claudia Dorantes, adoptada del laboratorio, una científica dedicada y excelente flautista; por todo el conocimiento musical que me ha transmitido; por aguantar mi forma de ser.

A todos mis amigos de la carrera de Biología, en especial a quienes también considero mis hermanos: a Joel Arce, por siempre estar ahí para entablar buenas pláticas; por su humor pesado; por todas las risas y desventuras; por lo que he aprendido de él, tanto de la vida, como de jardinería; al Dr. Daniel Rodríguez Leal, por contagiarme su pasión por la biología molecular de plantas; a Edgardo Rojo, por siempre tener lista su hielera con caguamas bien heladas; por ser mi fuente de información respecto a camaronicultura; a Samuel Castro, por siempre animarme cuando ando cabizbajo.

A toda la Orquesta de Cámara “Adolfo Hernández de la Mora”, en especial a Carolina Hernández, por permitirme pertenecer a dicha orquesta durante casi un año; a Jaime Soto, por las excelentes reuniones que tuve con él acompañados de música y unas cervezas; a Alejandro Magallanes, por sus preguntas filosóficas respecto al propósito de todo lo que existe en el mundo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la Beca de Maestría (No. de registro de CVU: 488918); a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por otorgarme una beca del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave del proyecto: IN208212).

A todos ellos, y también a los no mencionados, por cuestiones de espacio, pero con los que convivo cotidianamente, gracias por todo lo que he aprendido de ustedes. Quizá no lo perciban, pero de cada persona que conozco procuro quedarme al menos con una enseñanza, un buen hábito, una idea, una costumbre, una palabra... Si escribiera un libro de todo eso, sería más grande que esta tesis.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Estrés y la respuesta de las plantas ante él	3
La sequía como un tipo de estrés hídrico	4
Mecanismos vegetales para combatir el estrés hídrico	6
Semillas y germinación: características y factores influyentes	9
Las proteínas LEA: descubrimiento y clasificación	11
Las proteínas LEA: desambiguación y características particulares	15
El desorden en las estructuras proteicas: definición e importancia	16
Desorden, proteínas LEA y estructura proteicas	18
Deduciendo el funcionamiento de las proteínas LEA: estudios <i>in vitro</i>	20
Deduciendo el funcionamiento de las proteínas LEA: estudios <i>in vivo</i>	23
ANTECEDENTES	26
Redundancia genética vs. Redundancia funcional	29
DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO	33
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Análisis de los promotores de los genes <i>LEA</i> del grupo 4 de <i>A. thaliana</i>	37
Construcción del plásmido destino con el promotor del gen <i>AtLEA4-5</i>	37
Construcción de los plásmidos de entrada con los marcos abierto de lectura (ORF) de las proteínas LEA del grupo 4 y las versiones truncadas del ORF <i>LEA4-5</i>	38
Obtención de los plásmidos con los arreglos <i>pLEA4-5::LEA4-5</i> , <i>pLEA4-5::LEA4-2</i> , <i>pLEA4-5::LEA4-1</i> y <i>pLEA4-5::LEAH</i>	39
Material vegetal y condiciones de crecimiento	40
Esterilización de las semillas de <i>A. thaliana</i>	41

Transformación de <i>A. thaliana</i> por el método de inmersión floral.....	41
Obtención de líneas homocigotas	42
Verificación de la transformación de plantas mutantes	43
Caracterización fenotípica durante germinación	43
Extracción de proteína total de semilla.....	45
Cuantificación de proteína total de semilla.....	45
Detección de proteína AtLEA4-5 mediante experimentos tipo Western-blot.....	46
RESULTADOS	48
Análisis bioinformático de los promotores de los genes <i>LEA</i> del grupo 4	48
Construcción de plásmidos para la expresión de los ORF de interés bajo	
el promotor del gen <i>AtLEA4-5</i>	52
Verificación de la línea mutante <i>atlea4-5</i> mediante PCR y experimentos tipo	
Western-blot	58
Evaluación del fenotipo durante germinación de la mutante <i>atlea4-5</i>	60
Evaluación del fenotipo durante germinación de la mutante <i>atlea4-5/N4</i>	62
DISCUSIÓN	66
Sobre la redundancia funcional entre las proteínas LEA del grupo 4	
de <i>A. thaliana</i>	66
Sobre el análisis de promotores de los genes LEA del grupo 4 de <i>A. thaliana</i>	67
Sobre la germinación y compensación del fenotipo mutante	68
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	72
LITERATURA CITADA.....	73
ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Respuesta molecular de las plantas ante el estrés biótico y abiótico.....	4
Figura 2 Representación de los diferentes motivos que identifican a las proteínas LEA típicas	13
Figura 3 Diferencia conceptual entre redundancia genética y redundancia funcional	31
Figura 4 Representación gráfica de la ubicación de elementos regulatorios en <i>cis</i> probables de los promotores de los genes que codifican para los miembros de las proteínas LEA del grupo 4 de <i>A. thaliana</i>	51
Figura 5 Patrón de restricción de los vectores p4-5::pJET y pK2GW7 con enzimas de restricción <i>SacI</i> y <i>SpeI</i>	52
Figura 6 Esquema de los vectores pJET1.2/blunt (A) y pENTR/SD/D-TOPO.....	53
Figura 7 Esquema del plásmido pK2GW7 y diagrama de flujo seguido para la construcción del vector con las construcciones genéticas de interés	54
Figura 8 Patrón de restricción de los vectores p4-1::pJET y p4-2::pJET digeridos con las enzimas de restricción <i>SacI</i> y <i>XbaI</i> y del vector pK2GW7 digerido con las enzimas <i>SacI</i> y <i>SpeI</i>	55
Figura 9 Esquema de la reacción de recombinación entre ORF-LEA::pENTR y p4-5::pK2GW7	56
Figura 10 Esquema representativo de los productos de amplificación de las diferentes construcciones utilizando los oligonucleótidos pK2GW7-F y pK2GW7-R.....	57
Figura 11 Amplificación de las diferentes construcciones usando oligonucleótidos pK2GW7 Forward y Reverse.....	57
Figura 12 Verificación de la línea mutante <i>atlea4-5</i> mediante PCR	59
Figura 13 Detección mediante un experimento tipo Western-blot de la proteína AtLEA4-5 en extractos de semillas de las líneas Wt, <i>atlea4-5</i> , <i>atlea4-5/N4</i> , OE4-5 y p4-5::LEA4-5/G8.	60
Figura 14 Evaluación de la germinación de líneas Wt, <i>atlea4-5</i> y OE4-5 en medio MS	

y medio MS adicionado con 250 mM NaCl	61
Figura 15 Evaluación de la germinación de líneas Wt, N122943 y <i>atlea4-5/N4</i> en medio MS y medio MS adicionado con 250 mM de NaCl.....	63
Figura 16 Detección mediante experimento tipo Western-blot de la proteína AtLEA4-5 en extracto total de proteína de semillas de las líneas Wt, OE4-5, N122943 y <i>atlea/N4</i>	64
Figura 17 Evaluación de la germinación de líneas Wt y <i>atlea4-5/N4</i> en medio MS y medio MS adicionado con 300 mM de NaCl.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Algunas características fisicoquímicas y porcentaje de similitud e identidad de los tres miembros de proteínas LEA del grupo 4 de <i>A. thaliana</i>	28
Tabla 2 Identificación de elementos en <i>cis</i> en los promotores de los 3 genes <i>LEA</i> de la familia 4 de <i>A. thaliana</i> utilizando el servidor PLACE.....	48
Tabla 3 Evaluación estadística del porcentaje de germinación final y la pendiente al 50 % de germinación del experimento presentado en la figura 14	61
Tabla 4 Evaluación estadística del porcentaje de germinación final y la pendiente al 50 % de germinación del experimento presentado en la figura 15	63
Tabla 5 Evaluación estadística del porcentaje de germinación final y la pendiente al 50 % de germinación del experimento presentado en la figura 17	65

RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles que emplean estrategias particulares para hacer frente a condiciones ambientales estresantes, como la sequía, que afectan su desempeño. Una de esas estrategias es la expresión de proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, del inglés *Late Embriogenesis Abundant*). Se ha observado que estas proteínas se acumulan en tejido vegetativo expuesto a deshidratación y se argumenta que le confieren a la planta tolerancia a esa condición. Estas proteínas se clasifican en siete grupos, según motivos particulares presentes en sus secuencias de aminoácidos. *Arabidopsis thaliana* tiene 51 proteínas identificadas como LEAs, tres pertenecientes al grupo 4, caracterizado por tener motivos conservados en el extremo amino-terminal. Se predice que este dominio puede adquirir una estructura de alfa hélice, mientras que el dominio carboxilo-terminal, con motivos más variables, posee una estructura desordenada. Semillas de líneas mutantes, deficientes en la expresión de alguna de las proteínas LEA del grupo 4, muestran un fenotipo de sensibilidad a estrés osmótico o salino durante la germinación. Como las proteínas LEA del grupo 4 tienen similitud en sus secuencias de aminoácidos mayor al 50%, se puede sugerir que son redundantes genéticas; sin embargo, llama la atención que al parecer no sean redundantes funcionales. Asumiendo que estas proteínas pudieran tener patrones de expresión espacio-temporales diferenciales que impidieran detectar la redundancia funcional, se construyeron fusiones traduccionales para dirigir la expresión de las tres proteínas LEA del grupo 4 con el promotor del gen *AtLEA4-5*. Estas construcciones se usaron para transformar plantas mutantes *atlea4-5* y determinar si existe redundancia funcional entre las proteínas de este grupo mediante experimentos de germinación en condiciones de estrés salino. Se encontró que las semillas de la línea *atlea4-5* perdieron el fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante la germinación, posiblemente debido a un efecto de compensación fenotípica. Por lo tanto, se transformaron plantas de la línea *atlea4-5/N4*, sub-línea cuyas semillas fueron usadas en investigaciones previas y que mostraron un fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante la germinación, con las construcciones genéticas obtenidas.

ABSTRACT

Plants are sessile organisms that employ particular strategies to deal with environmental stressing conditions, like drought, that affect their performance. One of such strategies is the expression of Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins. It has been observed that these proteins accumulate in vegetative tissue exposed to dehydration conditions and it is argued that they confer tolerance to such conditions. These proteins are classified in seven groups according to particular motifs present in their amino acid sequences. *Arabidopsis thaliana* has 51 LEA proteins, three of them belong to the group 4, characterized by having conserved motifs in the N-terminal end. This domain is predicted to acquire an alpha helix structure, while C-terminal end, with a more variable motif, has a disordered structure. Seeds of mutant lines, deficient in the expression of any of the group 4 LEA proteins, show a sensitivity phenotype under osmotic or salt stress during germination. Because LEA proteins of group 4 have an amino acid sequence similarity higher than 50%, it could be suggested that these proteins are genetically redundant; however, it is interesting that apparently they are not redundant functionally. Assuming that these proteins could have differences in their temporal and spatial expression patterns, translational fusions were made to express each of the three LEA proteins of group 4 with the promoter of the *AtLEA4-5* gene. These constructs were used to transform mutant plants *atlea4-5* to determine if there is functional redundancy between the proteins of this group in germination experiments under salt stress conditions. It was found that the seeds of *atlea4-5* line lost the phenotype of sensitivity to salt stress during germination, possibly because of phenotypic compensation. Therefore, plants of the line *atlea4-5/N4*, a sub-line whose seeds were studied previously and show the phenotype of sensitivity to salt stress during germination, were transformed with the constructions obtained.

INTRODUCCION

El estrés y la respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés

En 1936, Hans Selye utilizó por primera vez el término "estrés" para referirse al proceso por el cual un organismo confronta a cualquier agente nocivo (Selye, 1936). Desde entonces se han propuesto varias definiciones para "estrés". En términos físicos se ha definido como cualquier factor capaz de inducir una tensión potencialmente injuriosa en un organismo vivo (Levitt, 1980). En términos botánicos se ha visto como un estado en que las crecientes demandas de la planta conllevan a una desestabilización inicial de las funciones de la misma, seguido de una normalización y posterior aclimatación (Larcher, 1987). En términos agronómicos, una situación de estrés es cualquier parámetro ambiental adverso que limite el crecimiento de una planta y disminuya su productividad (Claeys *et al.*, 2014). Finalmente, en términos genéticos es la condición que evita que un organismo exprese todo su potencial genético para la reproducción (Boyer, 1982). A lo largo del presente trabajo, por simplicidad y practicidad, se utilizará la definición propuesta por Lichtenthaler (1998): cualquier condición desfavorable o sustancia que afecte o bloquee el metabolismo, crecimiento o desarrollo de la planta.

A diferencia de los animales, las plantas están ligadas a su hábitat y no pueden desplazarse hacia distintos lugares para evitar ambientes estresantes naturales o antropológicos, por lo que necesitan mecanismos especiales para evitar, hacer frente y/o adaptarse al estrés. No todas las condiciones ambientales fluctuantes deben considerarse estresantes; *id est*, no debe aplicarse el término estrés a condiciones que provoquen, por ejemplo, reajustes rápidos del metabolismo, de la tasa fotosintética o de la transpiración cuando son inducidos por cambios naturales en el flujo de fotones, en la temperatura o en la humedad. Es por esto que una condición estresante puede clasificarse como eustrés (estrés estimulante, activador, un elemento positivo para el desarrollo de las plantas) o diestrés (estrés severo que afecta negativamente a las plantas y llega a ocasionar daños (Lichtenthaler, 1998).

Los tipos de estrés que puede experimentar una planta pueden dividirse en biótico, cuando el estrés es provocado por otro organismo, o abiótico, cuando es provocado por factores ambientales (Raven *et al.*, 1998). El estrés abiótico puede deberse al exceso o deficiencia en

diversos recursos como agua, nutrientes, luz, calor, CO₂, O₂, etc. Estas condiciones desencadenan una serie de respuestas morfológicas, fisiológicas y moleculares que les permiten a las plantas sobrevivir (Vashisht y Tuteja, 2006) (Fig. 1). De los factores antes mencionados, la disponibilidad de agua juega un papel determinante en la productividad de un cultivo (Claeys *et al.*, 2014). Este hecho, aunado al interés por conocer los mecanismos que se han seleccionado en las plantas para contender con esta situación adversa, ha llevado a varios grupos de investigación en diferentes partes del mundo a estudiar este fenómeno en diferentes especies vegetales.

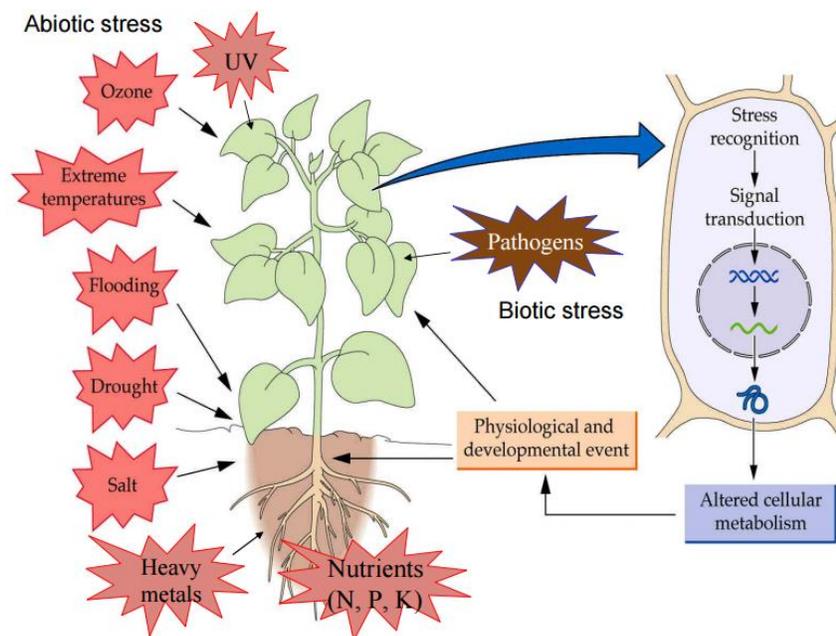


Fig. 1 | Respuesta molecular de las plantas ante el estrés biótico y abiótico. La percepción de condiciones estresantes provoca una cascada de señalización que conlleva a la expresión de genes inducibles y represión de genes reprimibles por dichas condiciones, lo cual provoca una alteración del metabolismo celular que permite a las plantas hacer frente a esas condiciones adversas. Modificado de Buchanan y Jones (2007).

La sequía como un tipo de estrés hídrico

El agua es el principal constituyente de los seres vivos (70-90% de la masa de plantas no leñosas) y es importante en muchos procesos biológicos. Entre las características fisicoquímicas que la hacen tan importante destacan: capacidad de formar puentes de hidrogeno debido a su polaridad, se le considera el solvente universal, actúa como reactivo

en muchas rutas anabólicas y catabólicas, y es una fuente reductora durante la fotosíntesis (Campbell y Farrell, 2007).

Tradicionalmente, la sequía se define como la escasez de agua con referencia a una necesidad específica de agua por parte de la planta, la cual a su vez está determinada por la relación entre el suministro (tasa de absorción) y la demanda (tasa de transpiración) (Dracup *et al.*, 1980). Sin embargo, Dracup (1991) también señala que existen varios problemas para tener una definición más precisa: primeramente, existe un conflicto de conceptos retenidos por varios campos de estudios académicos; luego, hay variedad de connotaciones de sequía en diferentes partes del mundo; además, en general se define la sequía en función de un solo parámetro; finalmente, no hay uniformidad respecto a los eventos que conforman la sequía. La definición de sequía más simple la proporciona la NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*): deficiencia en la precipitación a lo largo de periodos de tiempo extensos que resultan en una escasez de agua, causando impactos adversos en la vegetación, los animales y las personas (NOAA, 2012).

Implícitamente, todas las definiciones concuerdan en que la sequía representa un fenómeno más general denominado estrés hídrico, el cual es cualquier tipo de estrés relacionado con el agua, ya sea por exceso (inundación) o por inaccesibilidad (congelamiento, sequía) (Augé, 2001). En relación con las plantas, el estrés hídrico por sequía ocurre cuando la tasa de transpiración excede la toma de agua por parte de las raíces (Tardieu, 1996) y es un componente normal de algunos procesos naturales durante la vida de las plantas, como el desarrollo de la semilla (Bray, 1997).

Para poder cuantificar el estado hídrico de una planta se usa el término “potencial hídrico”, El potencial hídrico (ψ_w) es la tendencia del agua para moverse fuera de una solución, siguiendo siempre un gradiente cada vez más negativo. Mientras más negativo el ψ_w , más seca o estresada hídricamente está la muestra que se mide (Augé, 2001). Así, el agua tenderá a moverse desde el suelo a la planta y de la planta a la atmósfera siguiendo dicho gradiente. Los componentes que determinan el potencial hídrico se derivan de la presencia de solutos, de la presión que ejerza el agua sobre su contenedor, de los sólidos cercanos y de la gravedad,

aunque este último es despreciable para el estudio de plantas pequeñas. Por lo tanto, según Blum (2011) el potencial hídrico se puede expresar como:

$$\psi_w = \psi_s + \psi_p + \psi_m$$

donde:

- ψ_s : Potencial de solutos, el cual disminuye al disminuir el número de moléculas de H₂O en solución, siendo reemplazadas por el soluto. Los solutos retienen el H₂O en la célula en contra de la tracción externa.
- ψ_p : Potencial de presión, también llamado presión de turgor, el cual, a diferencia de los demás, siempre es positivo y está en función de la fuerza del H₂O sobre las paredes del recipiente que lo contienen.
- ψ_m : Potencial mátrico, está en función de la atracción que ofrezcan las superficies sólidas; a menor potencial mátrico, menor el potencial hídrico total.

La sequía provoca una disminución en el ψ_w del suelo, lo cual evita que el agua del suelo pueda entrar en las raíces de la planta. Sin embargo, la disminución del ψ_w también puede deberse a la presencia de sales en el suelo. La diferencia entre los ambientes con bajos ψ_w debido a salinidad o a sequía depende de la cantidad de agua total presente en el ambiente en cuestión. Durante una sequía, la cantidad de agua en el medio es limitada, y con el paso del tiempo el potencial se vuelve cada vez más negativo. En ambientes salinos, existen grandes cantidades de H₂O, pero la presencia de sales disminuyen el ψ_w (Ahmed *et al.*, 2015), lo que impide que las plantas puedan incorporar agua de dichos ambientes. Además, la alta concentración de sales en un ambiente determinado provoca un estrés doble: no sólo la presencia de sales disminuye el ψ_w del suelo, haciendo más difícil la toma de agua por parte de la planta, sino que muchos iones de las sales, en especial el sodio, son tóxicos para las células vegetales en altas concentraciones dentro de las células (Zhu, 2007).

Mecanismos vegetales para combatir el estrés hídrico

Para poder hacer frente a una condición de déficit hídrico, como potenciales hídricos muy bajos en el suelo, la planta necesita desarrollar **resistencia**, es decir, mecanismos que le permitan sobrevivir a la condición estresante, en este caso la disminución en la disponibilidad del H₂O (Gaspar *et al.*, 2002). Dichos mecanismos pueden dividirse en: **tolerancia**, que le

permiten a la planta alterar su fisiología para tener una tasa metabólica normal ante un estrés ligero, o bien reducir la tasa metabólica ante un estrés severo, *e.g.* el cerrado de estomas, la producción de enzimas encargadas de secuestrar las especies reactivas de oxígeno (ROS) o las encargadas de proteger la maquinaria fotosintética (Yordanov *et al.*, 2003; Osakabe *et al.*, 2014); y los mecanismos de **evasión**, que implican la reducción significativa de la actividad metabólica en algún momento del ciclo de vida hasta un estado de dormancia, *e.g.* formación de la semilla, así como el desarrollo de estructuras morfológicas especializadas como el área foliar disminuida, el aumento en la longitud de la raíz o la presencia de estomas hundidos (Gaspar *et al.*, 2002; Ramanjulu y Bartels, 2002; Jones *et al.*, 2012). Estos mecanismos le permiten a la planta ya sea adaptarse y/o aclimatarse al ambiente. La **adaptación** ocurre por varios mecanismos a nivel genético y sobre las poblaciones a lo largo de generaciones, lo cual provoca una selección en favor de la expresión de genes que le permiten a la planta hacer frente a la condición estresante, por lo que es un fenómeno netamente evolutivo. La **aclimatación** se refiere a ajustes fisiológicos y estructurales que le permiten a un solo organismo, es decir un único genotipo, alterar su homeostasis en respuesta a factores ambientales cambiantes (Gaspar *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2012).

En conjunto, las respuestas de las plantas ante un déficit hídrico están principalmente determinadas por alteraciones en la expresión génica en función tanto de la severidad del estrés, es decir, de la intensidad y el tiempo que dure el déficit hídrico (Dracup, 1991; Bray, 1997), como del genotipo de la planta, el estado de desarrollo en el que se encuentre, los factores ambientales (Bray, 1993), las condiciones de crecimiento, la vitalidad y la predisposición de la planta (Lichtenthaler, 1998). Estos cambios se reflejan en la disminución o aumento de la expresión de genes reprimibles e inducibles, respectivamente. Las proteínas que codifican los genes inducibles pueden agruparse en dos clases de acuerdo al papel que desempeñan: **funcionales**, que incluye a las chaperonas, las enzimas anticongelantes, las enzimas para síntesis de osmolitos, las acuaporinas, los transportadores de azúcares, las desintoxicantes, entre otros, y **regulatorias**, como los factores transcripcionales, las cinasas, las fosfatasa, los componentes del sistema de calmodulina, entre otros (Vashisht y Tuteja, 2006; Jones *et al.*, 2012). Todas estas proteínas realizan una acción protectora de las diferentes estructuras celulares, alteran el potencial hídrico de la célula favoreciendo la toma

de agua y controlan la acumulación de iones en el citoplasma, entre muchas otras actividades. Los cambios en la expresión genética que permiten que la planta se ajuste a una cierta condición de estrés no sólo son aquéllos que dan lugar a una mayor acumulación de una proteína y/o RNA determinados, sino también los que evitan que éstos se acumulen a ciertos niveles que no serían convenientes para un buen desempeño en las funciones celulares bajo condiciones desfavorables. Es decir, no sólo habría que considerar como relevantes a los genes inducibles, sino también a los que se reprimen ante condiciones estresantes.

El ajuste osmótico, ocasionado por la alteración en la expresión genética, es un proceso que involucra la síntesis de compuestos que incrementan la presión osmótica en el citoplasma, disminuyendo el ψ_s intracelular para evitar que el H₂O tienda a salir de la célula (Girma y Krieg, 1992). Los compuestos sintetizados son llamados osmolitos o solutos compatibles, y se definen como un grupo pequeño de compuestos químicos orgánicos solubles en H₂O que se pueden acumular a altas concentraciones sin interferir significativamente en el metabolismo celular, *e.g.* la glicina-betaína, el manitol, la prolina, la β -alanina betaína, el glicerol, el sorbitol, entre otros (Yancey, 2005; Kumar, 2009).

En el caso de un estrés salino, la planta no sólo debe combatir el estrés hídrico impuesto por la sal, sino también hacer frente a los iones tóxicos producidos por la disociación de la sal al entrar en solución. Para ello, en las plantas se han seleccionado mecanismos de tolerancia que pueden ser agrupados en diferentes categorías (Munns y Tester, 2008; Leksungnoen, 2012):

- **Tolerancia al estrés osmótico:** estrategias encaminadas a evitar la pérdida de H₂O celular, e involucran el cerrado de estomas, reducción de la expansión celular en la raíz o en hojas jóvenes, producción de osmolitos, entre otros.
- **Exclusión de Na⁺ de las células de las hojas y de las raíces:** estrategias que aseguran que el Na⁺ no se acumule a niveles tóxicos dentro de las células, especialmente en aquellas que realizan fotosíntesis.
- **Tolerancia de los tejidos:** estrategias para compartimentalizar el Na⁺ a nivel tisular, evitando que alcancen niveles tóxicos, sobre todo en células del mesófilo.

De acuerdo a su capacidad para tolerar el estrés, las plantas pueden clasificarse en **glicofitas**, aquellas que no toleran el estrés salino y su crecimiento se inhibe o incluso mueren a concentraciones de 100 - 200 mM de cloruro de sodio (NaCl). La planta modelo *Arabidopsis thaliana* no puede completar su ciclo de vida a concentraciones mayores de 100 mM de NaCl (Munns y Tester, 2008). Por otro lado, las **halofitas** pueden sobrevivir y crecer normalmente en condiciones de hasta 300 mM de NaCl. Algunas plantas pueden incluso sobrevivir en condición de extrema salinidad, como el caso de *Atriplex vesicaria* y *Salicornia europea* que pueden vivir en ambientes con hasta 700 mM y 1020 mM de NaCl, respectivamente (Zhu, 2007).

En general, la tolerancia a la salinidad es un carácter complejo de analizar (Zhang *et al.*, 2014). Como cualquier estrés, la tolerancia a la salinidad sólo puede evaluarse en la condición estresante, lo cual afecta múltiples respuestas fisiológicas de la planta; además, se requiere de condiciones muy controladas para evaluar cuantitativamente el nivel de tolerancia a la salinidad; por otro lado, el estrés “salino” puede estar ocasionado por diversas sales, no necesariamente por NaCl; por último, otros tipos de estrés están asociados al estrés salino en plantas, por ejemplo la sequía o la acidez, lo que dificulta el estudio de esta característica. Aun así, se han desarrollado diversas estrategias en el laboratorio para poder evaluar la tolerancia a la salinidad y a otros tipos de estrés, intentando superar las complejidades que representan la determinación de fenotipos en tales condiciones (Verslues *et al.*, 2006; Luhua *et al.*, 2013).

Una de las etapas de desarrollo más utilizadas para identificar algunos de los componentes o mecanismos de la resistencia al estrés abiótico en las plantas es la semilla. En esta etapa, el embrión permanece en un estado que le permiten resistir a condiciones desfavorables para su desarrollo, como niveles extremos de temperatura, limitación de agua, compuestos oxidantes, radiación, etc.

Semillas y germinación: características y factores influyentes

La semilla es una estructura que consiste de un embrión y una reserva de alimento, todo empacado en un contenedor resistente, la testa (Fosket, 1994). La semilla permanece

durmiente y le permite al embrión sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables en espera de condiciones favorables para la reactivación de su metabolismo y su desarrollo, asegurando así el inicio de la siguiente generación de plantas (Koornneef *et al.*, 2002). Las semillas son utilizadas ampliamente como un modelo para analizar la expresión genética dada su habilidad para sobrevivir a un proceso de deshidratación severa durante las etapas finales de su desarrollo (Campalans *et al.*, 1999), donde pierde hasta el 80% del H₂O. Este proceso les otorga la capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables. Junto con la remoción de H₂O, ocurre una acumulación de proteínas en el embrión, principalmente de proteínas de almacenamiento y de las llamadas proteínas de embriogénesis tardía o proteínas LEA (del Inglés: *Late Embryogenesis Abundant*), así como algunos carbohidratos que se propone le permiten a la semilla sobrevivir a la condición de deshidratación (Ingram y Bartels, 1996). Los estudios encaminados a comprender el papel que desempeñan estos compuestos en la semilla, y debido a la deshidratación natural que sufre ésta en las últimas etapas de su desarrollo, permitieron suponer que podría existir una relación entre estos compuestos y las respuestas moleculares que generan tolerancia a la deshidratación en plantas adultas.

A lo largo de varios años de estudio de los fenómenos de tolerancia y resistencia al déficit hídrico se han establecido diferentes condiciones experimentales que han permitido analizar diversos fenotipos en la planta en distintas etapas de su desarrollo (Verslues *et al.*, 2006). Entre ellos se encuentra la evaluación de la germinación en condiciones que simulen una condición de estrés osmótico o iónico. La germinación es un proceso complejo que involucra la recuperación del embrión de su estado deshidratado y latente a un estado de hidratación óptima para el establecimiento de un metabolismo basal y el inicio de su desarrollo vegetativo (Nonogaki *et al.*, 2010). La dormancia es una condición especial de detención del crecimiento del embrión en la semilla. Dicha detención hace que semillas vivas no germinen aún en condiciones ambientales favorables, debido a inhibidores endógenos que deben primero removerse o neutralizarse (Raven *et al.*, 1998). Existen dos tipos de dormancia: **primaria**, que evita que la semilla germine cuando se encuentra adherida a la planta madre, y **secundaria**, que retrasa la germinación hasta que se presenten condiciones favorables que permitan el crecimiento de la plántula emergente (Jones *et al.*, 2012).

Para que la semilla germine deben de ocurrir una serie de eventos internos y externos que eliminen la dormancia. Dentro de los **factores internos** podemos nombrar la traducción de los RNA mensajeros (mRNA) que se acumulan en la semilla y que darán lugar a proteínas esenciales para recuperar un estado metabólico adecuado, así como a enzimas que degraden a la hormona ácido abscísico (ABA), involucrada en la prolongación de la dormancia, o que estén involucradas en la síntesis de las giberelinas, las auxinas, las citocininas y los brasinosteroides, todas ellas hormonas que promueven la reactivación del crecimiento y el desarrollo del embrión (Miransari y Smith, 2014). Dentro de los **factores externos** se pueden mencionar la presencia del H₂O, niveles adecuados de O₂ y temperaturas óptimas (Raven *et al.*, 1998). Existen dos formas para eliminar la dormancia: mediante la exposición a condiciones húmedas y frías, un proceso denominado *estratificación*; o bien, mediante su almacenamiento en condiciones secas, denominado en la literatura como *after-ripening* (Jones *et al.*, 2012).

La germinación es un proceso complejo que inicia con la toma de agua por la semilla (imbibición), y en el que ocurren múltiples cambios fisiológicos internos como lo son la movilización de reservas, la degradación y la producción de hormonas, la replicación del DNA (Nonogaki *et al.*, 2010), los cambios estructurales subcelulares, la hidratación de proteínas, la activación de la respiración (Bewley y Black, 1994), entre otros, y finaliza con la elongación del eje embrionario debido a la expansión celular en una zona proximal a la radícula (Sliwiska *et al.*, 2009), provocando así la emergencia de esta última a través de la testa, evento denominado germinación visible (Bewley, 1997; Jones *et al.*, 2012).

Las proteínas LEA: descubrimiento y clasificación

Durante el estudio de las proteínas que se acumulan en semillas de *Gossypium hirsutum* (L.), Dure y Chlan (1981) identificaron un grupo de proteínas que se acumulan durante la fase de la embriogénesis tardía y que disminuyen durante la germinación. Además, determinaron que los patrones de acumulación de estas proteínas y de sus RNA mensajeros estaban relacionados con la presencia del ABA y/o con una condición de deshidratación, condición que en las semillas ocurre de manera natural y necesaria para otorgarle a la semilla tolerancia

a la desecación. Posteriormente, se descubrió que estas proteínas pueden expresarse en tejidos vegetativos en condiciones que involucren un déficit hídrico (Dure y Galau, 1981; Dure *et al.*, 1981; Baker *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 2012). Estos estudios iniciaron una serie de investigaciones sobre estas proteínas que Galau *et al.* (1986) bautizaron con el nombre de *Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins* (proteínas Abundantes en la Embriogénesis Tardía) e identificaron a las clonas de cDNA que dieron origen a las primeras clasificaciones de estas proteínas. En esta tesis se usó la clasificación de Battaglia *et al.* (2008) que se basa en la presencia de motivos conservados entre las proteínas LEA de *A. thaliana*, algunas de los cuales no se habían incluido en reportes previos de otros trabajos (Dure *et al.*, 1989; Dure, 1993; Cumming, 1999).

Battaglia *et al.* (2008) identificaron 7 diferentes grupos de proteínas LEA (Fig. 2):

- **Grupo 1:** Presenta un 20-mero (TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]EMGRKGG [L/E]), que puede o no estar repetido, conservado en diversos taxones. Tienen aproximadamente 18% de residuos de Gly y se predice que el 70-82.5% de sus residuos están en conformación *desordenada*. Se acumulan durante el desarrollo del embrión, especialmente en semilla seca. También se detectan en granos de polen, una estructura que sufre deshidratación de manera natural durante su proceso de maduración (Prieto-Dapena *et al.*, 1999). Este grupo de proteínas LEA es el más ampliamente distribuido, ya que se han descrito proteínas similares en los tres dominios de la vida: *Eukarya*, *Bacteria* y *Archaea* (Campos *et al.*, 2013).

Grupo 2: Denominado también grupo de las *dehidrinas*, presenta un motivo característico denominado segmento K (EKKGIMDKIKEKLPG). También se pueden encontrar otros motivos distintivos como los segmentos Y, con secuencia consenso [V/T]D[E/Q]YGNP, y segmentos S que están enriquecidos en residuos de Ser. Estas proteínas son altamente hidrofílicas, con una alta proporción de residuos cargados y polares, pocos residuos hidrofóbicos y no presentan residuos de Trp. En solución acuosa están altamente hidratadas y en conformación no estructurada. Al igual que otras proteínas LEA, se acumulan durante la desecación de la semilla y en todos los tejidos vegetativos en respuesta a sequía, baja temperatura y salinidad.

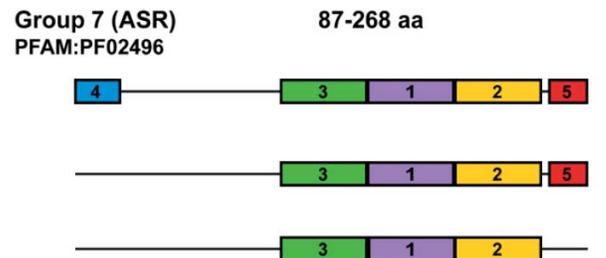
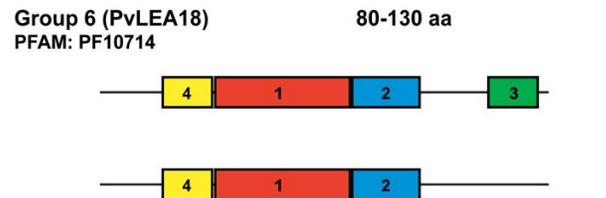
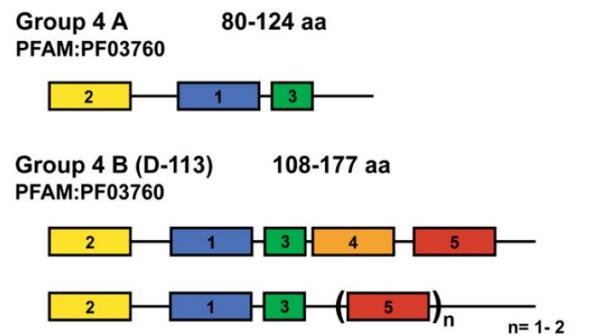
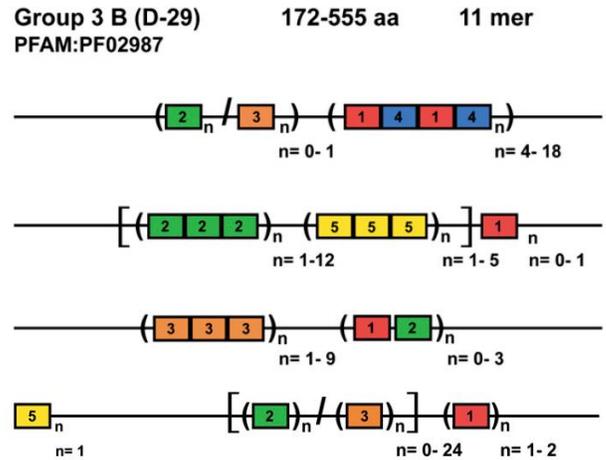
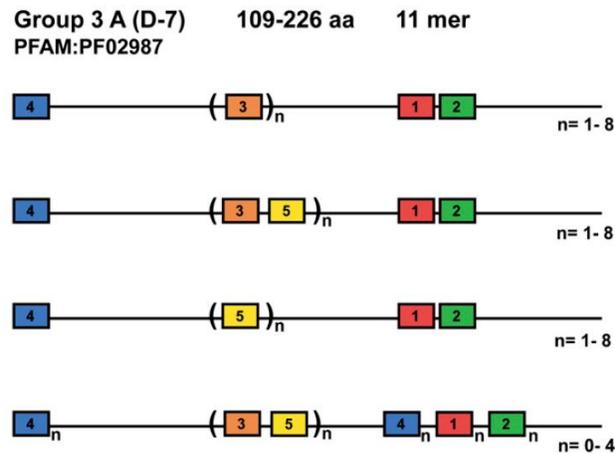
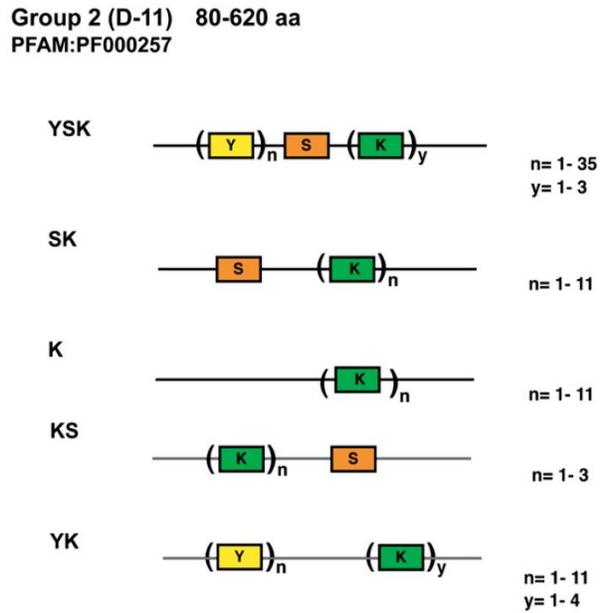
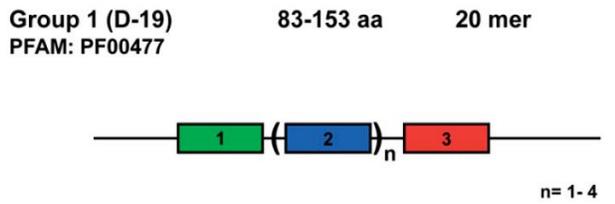


Figura 2 | Representación de los diferentes motivos que identifican a las proteínas LEAs típicas. Tomado de Battaglia *et al.* (2008). Las cajas representan los motivos identificados en dicho estudio y que fueron útiles para realizar la clasificación.

- **Grupo 3:** Se caracteriza por un 11-mero repetitivo (FF[E/Q]XFK[E/Q]KFX[E/D/Q]) que se predice que puede formar α -hélices anfipáticas. Las proteínas de este grupo carecen prácticamente de estructura secundaria, y en solución se presentan en una conformación mayoritariamente *desordenada*. Se acumulan en la semilla madura y en la respuesta a la deshidratación, la salinidad, la baja temperatura, la hipoxia o la luz intensa. Este grupo se caracteriza por una mayor variabilidad de secuencia, principalmente en el motivo que las distingue. A la fecha se considera como uno de los grupos más ampliamente distribuidos, ya que se han reportado proteínas similares en animales (Gal *et al.*, 2004; Hand *et al.*, 2007).
- **Grupo 4:** Presentan un motivo característico en su región N-terminal (AQEKAEKMTA[R/H]DPXKEMAHERR[E/K][A/E][K/R]). Se predice que sus primeros 70-80 residuos adoptan una estructura α -hélice, mientras el resto asume una conformación *desordenada*. Las proteínas de este grupo se acumulan en los embriones maduros y en los tejido vegetativo durante la respuesta a déficit hídrico y al ABA. Además, se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Cohen *et al.*, 1991; Shih *et al.*, 2004; Ali-Benali *et al.*, 2005; Senthil-Kumar y Udayakumar, 2006).
- **Grupo 5:** Denominado grupo hidrofóbico o grupo de proteínas LEAs atípicas, está definido por contener una proporción significativamente alta de residuos hidrofóbicos que adoptan una conformación globular. Sus transcritos se acumulan al final del desarrollo de la semilla y en respuesta a la sequía, la salinidad, el frío y a las heridas (Maitra y Cushman, 1994; Zegzouti *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).
- **Grupo 6:** Dos firmas de aminoácidos identifican a este grupo: la secuencia LEDYK en el motivo 1 y la secuencia SPY en el motivo 2. Las predicciones *in silico* muestran que estas proteínas son intrínsecamente desordenadas, propiedad que se demostró experimentalmente (Rivera-Najera *et al.*, 2014). Sin embargo, también se reportó que las proteínas de este grupo son capaces de adoptar cierto grado de estructura tipo α -hélice ante tratamientos que inducen una disminución en el agua disponible o que incrementan el amontonamiento molecular. Los estudios en *Phaseolus vulgaris* indican que estas proteínas se acumulan en semilla seca y granos de polen, y también se acumulan por déficit hídrico y ABA exógeno. Además, se pueden detectar en

regiones en crecimiento o expansión, tanto de hipocótilos como de raíces en plántulas de frijol crecidas bajo condiciones óptimas (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

- **Grupo 7:** También llamado grupo de proteínas ASR (del Inglés: *Abscisic acid Stress Ripening*). Las proteínas de este grupo contienen tres motivos altamente conservados, uno de ellos localizado en la región C-terminal, el cual contiene una señal putativa de localización nuclear. Se acumulan en la embriogénesis tardía, senescencia, maduración de los frutos, polen, y ante déficit hídrico, sal, frío y luz limitada.

Las proteínas LEA: desambiguación y características particulares

Para poder definir concretamente a una proteína LEA hay que tener en cuenta dos aspectos:

- a) Una proteína LEA canónica es aquella que se apega al significado sus siglas, esto es, que son abundantes durante la embriogénesis tardía. En semillas ortodoxas, es decir semillas que se secan naturalmente para sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables, la embriogénesis tardía ocurre cuando se da el inicio del proceso de desecación. Hay que tener en cuenta que existen otras proteínas que se acumulan durante esta etapa de desarrollo de la semilla, por lo que también podrían considerarse como proteínas LEA. Sin embargo, dichas proteínas no se expresan (o se expresan en ventanas temporales pequeñas) en otras etapas del desarrollo de la semilla, ni incrementan su acumulación durante la post-abscisión, alcanzan un máximo en la desecación y desaparecen durante la germinación.
- b) El conocimiento generado a partir del estudio de proteínas LEA típicas muestra que la gran mayoría de ellas, y otras que muestran similitud en su secuencia, se expresan en los tejidos vegetativos ante condiciones de limitación de agua, de salinidad, de frío o por tratamientos con ABA. Tal es el caso de las proteínas RD22 o PCC13-62 (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Zha *et al.*, 2013). Además, las proteínas LEA se acumulan también de manera natural en ciertas etapas del desarrollo de la planta, como ocurre con las proteínas LEA del grupo 6 que se acumulan en aquellas regiones de la planta que se encuentran en crecimiento (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

Lo anterior ocasiona que sea cada vez más común descubrir que existen proteínas con similitud a algunas proteínas LEA en organismos diferentes a plantas, pertenecientes a diferentes reinos de la vida. La confusión hasta ahora generada se debe a que, por su similitud en secuencia de aminoácidos, a estas proteínas también se les denomina como proteínas LEA, aún sin presentar la propiedad de acumularse durante una embriogénesis tardía. De hecho, hasta la fecha se ha adoptado la costumbre de llamarles proteínas LEA a todas aquellas proteínas que simplemente presenten similitud de secuencia con las proteínas LEA canónicas (Wise, 2003; Battaglia *et al.*, 2008). Aunque existen proteínas que presentan similitud con las proteínas LEA de plantas en organismos de diversos taxones, se ha sugerido que también se les llame proteínas LEA sin considerar el significado de las siglas (Shih *et al.*, 2008).

En este contexto cabe resaltar que las proteínas LEA forman parte de un conjunto más grande de proteínas a las que se les ha denominado *hidrofilinas*, término acuñado por Garay-Arroyo *et al.* (2000) y definido como todas aquellas proteínas con un alto contenido de glicina (>6%) y un alto índice de hidrofiliidad (>1.0) (Kyte y Doolittle, 1982). Estas características, junto con el sesgo que presentan las proteínas LEA de contener residuos polares, cargados y no cargados, pero no residuos hidrofóbicos, hacen que de manera general se considere a las hidrofilinas (entre ellas al subgrupo de proteínas LEA típicas o hidrofílicas) como proteínas intrínsecamente desordenadas (Hincha y Thalhammer, 2012). El grupo 5 no forma parte de las hidrofilinas aunque, por definición, sí son proteínas LEA. Además, las capacidades fisicoquímicas que caracterizan a las *hidrofilinas*, como son la unión a ciertos iones o al H₂O o su potencial para formar puentes de hidrógeno en las superficies de solvatación, pueden dar indicios acerca de su modo de acción (Shih *et al.*, 2008).

El desorden en las estructuras proteicas: definición e importancia

Desde la determinación de las primeras estructuras de proteínas (Kendrew *et al.*, 1958; Muirhead y Perutz, 1963) surgió el paradigma “estructura-función”, el cual establece que un patrón espacial único de residuos de aminoácidos propiamente ordenados crean un ambiente fisicoquímico adaptado a la unión extremadamente precisa y ajustada de los ligandos, que permite catalizar reacciones químicas, transportar iones o moléculas pequeñas, o ensamblar complejos macromoleculares específicos (Tompa y Fersht, 2009). Esto significa que una

estructura tridimensional particular es un prerrequisito para llevar a cabo una función específica.

Aunque no hay duda sobre la relación que existe entre una estructura proteica particular y una función específica, hay una creciente conciencia, basada en evidencia, de que no todas las proteínas funcionales se pliegan espontáneamente en estructuras globulares estables. Ahora se reconoce que muchos dominios proteicos, o incluso proteínas enteras, existen en un estado *no estructurado*, también llamado *desordenado*, *flexible* o *desplegado* (Dunker *et al.*, 1998; Wright y Dyson, 1999). Estas regiones no estructuradas varían en sus propiedades, siendo unas altamente móviles y otras con movilidad más restringida; también las hay con estructuras colapsadas pero no fuertemente empacadas (Dunker *et al.*, 1998).

La definición de desorden también ha causado algo de confusión en la literatura ya que no hay una definición precisa. Desde un punto de vista reduccionista, desorden puede ser visto como una falta de orden, definición negativa pero que captura la esencia del fenómeno. Las proteínas desordenadas pueden definirse biofísicamente como aquellas que no tienen un sólo arreglo mínimo global en el espacio conformacional, sino una multiplicidad de estados estructurales accesibles y separados por barreras energéticas pequeñas (Tompa y Fersht, 2009). Dunker *et al.* (2013) proponen que se use el término de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, *Intrinsically Disordered Proteins*) para aquellas proteínas cuya cadena polipeptídica presente una conformación no rígida o flexible, en tanto que el término de proteínas no estructuradas se utilice para proteínas cuya conformación es más bien desplegada o extendida pero rígida, y que en este caso se caracterizan por la ausencia casi absoluta de algún tipo de estructura. De manera general, las IDPs son ricas en Arg, Gly, Glu, Lys, Pro y Ser y son deficientes en Cys, Ile, Leu, Phe, Trp, Tyr y Val. La ausencia de una estructura tridimensional definida es debida precisamente a la presencia de aminoácidos cargados eléctricamente aún en pH neutro que ayudan a desestabilizar estructuras compactas (Hansen *et al.*, 2006).

La presencia de desorden en la estructura de las proteínas no es un fenómeno extraño. Los eucariontes multicelulares tienen más proteínas con algún grado de desorden que los

eucariontes unicelulares (Dunker *et al.*, 2000). En mamíferos ~50% de las proteínas se predice que tienen algún segmento desordenado, mientras que ~25% son totalmente desordenadas (Dunker *et al.*, 2008). Debido a su naturaleza, se esperaría que las IDPs cambiaran más rápidamente durante la evolución. Sin embargo, pareciera que el desorden es en cierta medida una característica necesaria para el correcto funcionamiento de las proteínas en donde esté presente. Entre las funciones que se le han atribuido a las regiones desordenadas están: sitios de reconocimiento molecular, sitios de modificaciones postraduccionales, permitir el ensamblaje molecular de complejos proteicos o servir como cadenas entrópicas, explotando los beneficios físicos del estado desordenado, así como incrementar la velocidad de interacción, unir moléculas débil y reversiblemente, unir moléculas con alta afinidad o una combinación de las anteriores (Dunker *et al.*, 2008; Kovacs *et al.*, 2008; Tompa *et al.*, 2009).

Tompa y Fuxreiter (2008) denominó “complejos difusos” a aquellos complejos de proteínas que se forman entre IDPs y proteínas blanco. Dichos complejos se caracterizan por una ambigüedad estructural respecto a sus interacciones proteína-proteína; es decir, son IDPs que siguen teniendo regiones desordenadas al interactuar con sus proteínas blanco. Estos complejos se caracterizan por un orden estructural transitorio en las IDPs, el cual ocurriría al unirse a la proteína blanco. Por su parte, la proteína blanco sufriría ligeros cambios en su orden estructural, sin afectar su funcionamiento. Estos complejos difusos son funcionales debido a que el desorden confiere adaptabilidad, versatilidad y reversibilidad de la unión con las proteínas, siendo blanco de regulación de la interacción proteína-proteína.

Desorden, proteínas LEA y estructuras proteicas

El conocimiento de las características estructurales de una proteína representa una gran ventaja para la determinación y el estudio de su función. La cristalización de una proteína pura y su posterior análisis por cristalografía de rayos X ha sido la principal técnica para conocer la estructura de una proteína. Debido a las particularidades de la técnica, las proteínas a cristalizar deben contar con un alto porcentaje de estructura que les permita formar cristales compuestos de unidades reiterativas. Las proteínas intrínsecamente desordenadas no cumplen este requisito (Tompa y Fersht, 2009). Por ejemplo, la proteína básica de mielina

(MBP), al entrar en solución con el medio de cristalización, adquiere una estructura desordenada, lo que provoca que se generen moléculas diferentes en estructura que impiden la formación de cristales, ya que no hay homogeneidad en cuanto a estructura terciaria (Sedzik y Kirschner, 1992).

De manera similar, se ha intentado cristalizar algunas proteínas LEA sin resultados satisfactorios (Goyal *et al.*, 2003). Por lo tanto, para determinar la estructura probable de proteínas intrínsecamente desordenadas es necesaria la aplicación de otras técnicas como el dicroísmo circular (CD), la resonancia magnética nuclear (NMR), la espectrometría infrarroja con transformación de Fourier (FTIR), la ultracentrifugación analítica, la infiltración en gel, la emisión de fluorescencia, entre otras. Soulages *et al.* (2002) analizaron la estructura de la proteína GmD-19 (*Glycine max*, LEA grupo 1), mediante calorimetría diferencial de barrido y dicroísmo circular, y mostraron que la proteína existe principalmente en un estado de desorden en solución, pero que puede adquirir hasta un 30% de contenido de α -hélices en presencia de 50% de trifluoroetanol (TFE). Además determinaron que el 14% de los residuos de aminoácidos de esta proteína pueden formar hélices poli-L-prolina tipo II, produciendo un área de solvatación más grande. Los autores sugieren que esta última se necesita para el funcionamiento de esta proteína LEA, previniendo así el daño ocasionado por estrés osmótico o hídrico a otras macromoléculas.

Goyal *et al.* (2003) determinaron que la proteína AavLEA1 del nemátodo *Aphelenchus avenae* adquiere una estructura más ordenada al momento de ser deshidratada. Por su parte, Shih *et al.* (2010) analizaron a la proteína OsLEA1 (*Oryza sativa*, LEA grupo 1) mediante dicroísmo circular de UV-lejano y determinaron que es principalmente desordenada en solución y que adquiere una estructura α -hélice con TFE o al ser sometida a deshidratación lenta. Tolleter *et al.* (2007) purificaron una proteína LEA mitocondrial de *Pisum sativum* y encontraron que la proteína está desplegada en solución, pero adopta estructuras de α -hélices cuando se deshidrata. Además, encontraron que esta proteína, que guarda relación a nivel de estructura secundaria con una lipoproteína de mamíferos, protege a liposomas sometidos a deshidratación. Wolkers *et al.* (2001) encontraron que una proteína LEA del grupo 3 se encuentra en el polen de *Typha latifolia* y, mediante FTIR, se determinó que la proteína en

solución estaba principalmente desordenada y cuando se sometía a una desecación rápida la proteína adoptaba una estructura de α -hélice. En este caso se propuso que podría formar puentes de hidrógeno que estabilizarían el citoplasma en deshidratación. Estos estudios sugieren que las proteínas LEA pueden adquirir una estructura secundaria en condiciones de deshidratación y es quizá entonces cuando realizan su función. Cabe recordar que las proteínas LEA también se acumulan en tejidos vegetativos sometidos a condiciones de déficit hídrico ligero o moderado (Colmenero-Flores *et al.*, 1999; Bies-Etheve *et al.*, 2008), lo que indica que también tienen una función en condiciones en donde aún existe agua disponible pero ésta es limitante, por lo que resulta relevante explorar si estas condiciones también son capaces de inducir cambios conformacionales en estas proteínas.

Deduciendo el funcionamiento de las proteínas LEA: estudios *in vitro*

Así como se utilizan varias técnicas para determinar la estructura de estas proteínas, otras estrategias son utilizadas para poder determinar su función *in vitro*. Hara *et al.* (2005) utilizaron cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados y demostraron que CuCOR15 (*Citrus unshui*, LEA grupo 2) es una proteína que une Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , pero no une Mg^{2+} , Ca^{2+} ni Mn^{2+} . Además, mostraron que los residuos de His son los responsables de estas uniones y dedujeron que CuCOR15 podría reducir la toxicidad por iones metálicos en células vegetales. Igualmente, Liu *et al.* (2011) demostraron que 2 proteínas LEA, GmPM1 y GmPM9 (*G. max*, proteínas LEA del grupo 4) unen Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} y no unen Mg^{2+} , Ca^{2+} ni Mn^{2+} . Además, estos autores señalan que estas proteínas pueden actuar como secuestradores de radicales hidroxilo, por lo que propusieron que podrían disminuir el daño por estrés oxidativo. Respecto a lo anterior, Hara *et al.* (2004) analizaron la actividad antioxidante de CuCOR19 (*C. unshui*, LEA grupo 2) y observaron que la proteína secuestró *in vitro* los radicales HO^{\cdot} , pero no podían secuestrar H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$. Concluyeron que los residuos de Gly, His y Lys eran los responsables de secuestrar los radicales HO^{\cdot} y también señalaron que estas proteínas podrían reducir el daño oxidativo, producto de la escasez de agua en las células de las plantas.

Lin y Thomashow (1992) desarrollaron una metodología para el estudio de la crioprotección que puede presentar una proteína sobre diversas enzimas sensibles a congelamiento, como la

lactato deshidrogenasa (LDH). A partir de entonces se han hecho diversos estudios siguiendo metodologías similares. El efecto crioprotector *in vitro* que proporcionan las proteínas LEA del grupo 2 ha sido reportado para SoCOR85 de *Spinacia oleracea* (Kazuoka y Oeda, 1994), TaWCS120 de *Triticum aestivum* (Houde *et al.*, 1995), PpPCA60 de *Prunus pérsica* (Wisniewski *et al.*, 1999), CuCOR19 de *C. unshiu* (Hara *et al.*, 2001), HvP-80/Dhn5 de *Hordeum vulgare* (Bravo *et al.*, 2003), GmDhn26 y GmDhn27 de *G. max* (Momma *et al.*, 2003), CrCor15 de *Citrus reticulata* (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004), ERD10 de *A. thaliana* (Reyes *et al.*, 2008), RcDHN5 de *Rhododendron catawbiense* (Reyes *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2008), ERD14 de *A. thaliana* (Tantos *et al.*, 2009), TaDHN5 de *T. aestivum* (Drira *et al.*, 2013), VrYSK₂ de *Vitis riparia* (Hughes y Graether, 2011; Hughes *et al.*, 2013), TsDHN2 de *Thellungiella salsuginea* y OpsDHN1 de *Opuntia streptacantha* (Hughes *et al.*, 2013). También se han reportado un efecto crioprotector por parte de AtCOR15am, una proteína LEA-like de *A. thaliana* (Lin y Thomashow, 1992; Leksungnoen, 2012), HIC6 y HIC12, ambas LEAS del grupo 3 de *Chlorella vulgaris* (Honjoh *et al.*, 2000) y WCI16, una proteína LEA-like de *Triticum vulgare* (Sasaki *et al.*, 2014).

Durante la deshidratación, las proteínas pueden sufrir modificaciones estructurales, las cuales conllevan a que la actividad de la proteína disminuya o se pierda. Si el proceso de deshidratación resulta muy severo, los cambios estructurales son más drásticos y se pueden llegar a exponer los residuos hidrofóbicos de la proteína, generando con ello una condición que favorece la agregación entre ellas. Este fenómeno de agregación se acentúa aún más cuando ocurre en la célula, ya que el estado aglomerado del medio intracelular provocaría un mayor nivel de interacciones intermoleculares y con ello la agregación con otras proteínas (Ellis, 2005). La agregación de proteínas se ha caracterizado con mayor detalle en el caso de estrés por calor, en donde la desnaturalización de las proteínas es muy evidente, por lo que la agregación es un fenómeno común. Sin embargo, se ha demostrado que las células de prácticamente cualquier organismo poseen proteínas capaces de prevenir los cambios conformacionales que pueden llevar a la agregación y/o de replegar a las proteínas en caso de que hayan perdido su conformación nativa funcional; a estas proteínas se les conoce de manera general como chaperonas. Ejemplos típicos de ellas son las llamadas chaperonas moleculares o proteínas de choque térmico (HSPs, *heat shock proteins*), las cuales son

capaces de replegar o renaturalizar a las proteínas cuando éstas pierden su conformación nativa, actividad que depende de ATP (Obermann *et al.*, 1998; Nakamoto *et al.*, 2014), y las proteínas de bajo peso molecular de respuesta a calor (sHSPs, *small heat shock proteins*), a las cuales se les ha demostrado una actividad que evita los cambios conformacionales en las proteínas que llevan a su agregación (Jakob *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 2009).

Se piensa que las proteínas LEA pueden tener una actividad protectora ante una condición de baja disponibilidad de agua, por lo que se han diseñado ensayos *in vitro*, parecidos a los realizados en las HSPs y sHSPs, para demostrar la actividad protectora de las chaperonas de calor. En estos ensayos, a diferencia del estrés por calor, las proteínas se someten a una condición que genera limitación de agua, en presencia o ausencia de una proteína LEA determinada (Goyal *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2005; Kovacs *et al.*, 2008).

Los ensayos de deshidratación mostraron ser ensayos relativamente fáciles de ejecutar en el laboratorio y arrojan resultados en relación a la capacidad de ciertas proteínas LEA para proteger del daño causado por esta condición estresante sobre otras proteínas. Reyes *et al.* (2005) fueron los primeros en demostrar que proteínas LEA de diferentes grupos (ERD10, LEA AtD113 y AtLEA76 de *A. thaliana*; de los grupos 2, 4 y 3, respectivamente), así como otras hidrofílicas de bacterias y levaduras, son capaces de prevenir la inactivación de enzimas sensibles a una deshidratación parcial y progresiva. También demostraron que durante estas condiciones de deshidratación parcial las enzimas reporteras lactato deshidrogenasa (LDH) o malato deshidrogenasa (MDH) pierden su conformación nativa, exponiendo residuos hidrofóbicos, y que las hidrofílicas utilizadas fueron capaces de evitar que ocurrieran tales cambios conformacionales en las enzimas reporteras que llevarían a su posterior agregación. También estos estudios indicaron que las proteínas LEA son capaces de realizar una función protectora, bajo condiciones similares a las que se pudieran encontrar en las células ante una condición de limitación de agua en tejidos vegetativos y no sólo en semilla, en donde ocurre una deshidratación severa. Poco tiempo después, Goyal *et al.* (2005) demostraron que la proteína LEA AavLEA1 de *A. avenae* y la proteína LEA Em (grupo 1) de *T. vulgare* no funcionan como chaperonas, pero sí fueron capaces de prevenir la agregación de otras proteínas y su inactivación por deshidratación severa. Por otra parte, en experimentos

similares, Kovacs *et al.* (2008) demostraron que las dehidrinas ERD10 y ERD14 de *A. thaliana* previene la agregación por choque térmico a las enzimas luciferasa, citrato sintasa y lisozima, así como la inactivación por choque térmico de la alcohol deshidrogenasa.

Utilizando el ensayo de deshidratación parcial *in vitro* se ha demostrado la protección de la actividad de enzimas como la MDH y la LDH, por las proteínas LEA DSP16 (*Craterostigma plantagineum*, grupo 2), ERD10, AtLEA76 (*A. thaliana*, grupo 3), AtD113 (*A. thaliana*, grupo 4), AavLEA1 (*A. avenae*, grupo 3) y Em (*T. vulgare*, grupo 3), mostrando en todo los casos una mayor protección que la proporcionada por la albúmina de suero bovino (BSA) o por la trealosa, dos conocidos estabilizadores de proteínas. Este efecto no se observó para la proteína PvLEA18 (*P. vulgaris*, grupo 6) (Goyal *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2008). Por su parte, Grelet *et al.* (2005) identificaron que la proteína PsLEAm (*P. sativum*, grupo 3) se localizó en la matriz mitocondrial en células de semilla, la cual también se induce por la aplicación de ABA, durante la germinación y en hojas sometidas a estrés hídrico severo. Además, *in vitro* esta proteína protege a la fumarasa y a la rodanasa, dos enzimas mitocondriales, de los efectos de la deshidratación. Este tipo de estudios permite suponer, por un lado, que estas proteínas están involucradas en la respuesta de la planta al estrés hídrico y, por otro, que es posible que las proteínas LEA de diferentes grupos ejerzan funciones similares, aunque no necesariamente al mismo nivel, ni por el mismo mecanismo y, probablemente, en diferentes tipos celulares.

Deduciendo el funcionamiento de las proteínas LEA: estudios *in vivo*

Las investigaciones *in vivo* se han enfocado mayoritariamente a analizar el efecto de la sobre-expresión de proteínas LEA de diversos taxones en organismos modelo. Xu *et al.* (1996) expresaron el gen *HVA1* (*H. vulgare*, Grupo 3) en *O. sativa* y observaron que las plantas transgénicas bajo estrés salino desarrollan mayor altura, más peso en las raíces y mostraban una mayor tasa de germinación que plantas tipo silvestres bajo estrés salino. Este fue el primer estudio en el cual se expresó una proteína LEA de manera heteróloga. Investigaciones similares se han realizado desde entonces, los cuales se centran en la sobre-expresión de los diferentes genes que codifican para proteínas LEA utilizando el promotor CaMV 35S o el promotor de *Actina1*, por ejemplo: PMA1959 y PMA80, proteínas LEA de los grupos 1 y 2,

respectivamente, de *T. aestivum* (Cheng *et al.*, 2002); Rab17, LEA del grupo 2 de *Zea mays* (Figueras *et al.*, 2004); ME-leaN4, LEA del grupo 3 de *Brassica napus* (Park *et al.*, 2005); ZmLEA3, LEA del grupo 3 de *Z. mays* (Liu *et al.*, 2013); SiLEA14, LEA del grupo 5 de *Setaria italica* (Wang *et al.*, 2014); CsLEA7, LEA del grupo 5 de *Camellia sinensis* (Paul *et al.*, 2014); AtLEA14, LEA del grupo 5 de *A. thaliana* (Jia *et al.*, 2014); SmLEA, LEA del grupo 5 de *Salvia miltiorrhiza* (Wu *et al.*, 2014). En conjunto, la sobre-expresión de algunos de estos genes en plantas modelo provocó fenotipos particulares en condiciones de estrés salino, tales como mayor longitud y peso seco de raíz, mayor contenido de clorofila, menor fuga de electrolitos, mayor porcentaje y velocidad de germinación, mayor contenido de prolina, cotiledones más grandes y mayor recuperación después del tratamiento estresante.

También se han llevado a cabo experimentos de sobre-expresión de algunas proteínas LEA en bacterias (Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). En estos estudios se observó una mayor tasa de crecimiento de las bacterias en condiciones de estrés salino, reflejado en el hecho de que el crecimiento exponencial ocurría más rápido en las bacterias que sobre-expresan la proteína LEA que en las que no la expresan. Cabe mencionar que al parecer estos resultados sólo se obtienen en ciertas cepas de *Escherichia coli*.

Por otro lado, se observó que plantas *A. thaliana* mutantes en el gen *AtEM6*, LEA grupo 1 de *A. thaliana*, muestran un fenotipo caracterizado por una deshidratación de la semilla y maduración prematuras en el extremo distal de la silicua (Manfre *et al.*, 2006; Saavedra *et al.*, 2006). Estos autores proponen que la función de esta proteína es actuar como amortiguador de la pérdida de H₂O. Por otra parte, se ha determinado que plantas mutantes en el gen *AtLEA4-5*, LEA del grupo 4 de *A. thaliana*, muestran un fenotipo de sensibilidad durante la germinación en condiciones de estrés osmótico y iónico, así como un menor peso seco y menor número de botones florales después de un periodo de deshidratación, en comparación con plantas silvestres (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010).

Aunque su mecanismo de acción no se ha descrito en detalle a nivel molecular, el cúmulo de datos generado alrededor de las proteínas LEA, en términos de estructura y función, permite sugerir que su desorden estructural les permite llevar a cabo diferentes funciones protectoras

a distintos niveles (Hincha y Thalhammer, 2012). Esto probablemente ocurra al interactuar con diversos blancos, protegiéndolos de condiciones celulares que favorezcan su inactivación y agregación (Olvera-Carrillo *et al.*, 2011); o bien, mediante funciones adicionales, como podría ser el secuestro de iones y actividades antioxidantes, estabilizadoras de membranas y/o como amortiguadores de la deshidratación, disminuyendo la tasa de pérdida de agua, entre otras (Tunnacliffe y Wise, 2007; Cuevas-Velazquez *et al.*, 2014).

ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, se ha propuesto que las proteínas LEA son proteínas multifuncionales, actuando como secuestradoras de iones, de radicales hidroxilo, como crioprotectoras de otras enzimas o evitando la agregación de proteínas globulares en vías de desnaturalización provocada por condiciones de limitación de agua. Se ha argumentado que las proteínas LEA actúan como escudos moleculares, donde su función es la de generar interferencia estérica que reduce la tasa de colisiones entre proteínas que se encuentran en proceso de agregación (Chakrabortee *et al.*, 2012). Por su parte, Goyal *et al.* (2005) proponen que la estructura flexible y desordenada es la que le otorga a estas proteínas su función como escudo molecular. Sin embargo, la hipótesis del escudo implica que, si las proteínas LEA funcionaran como escudos moleculares, se necesitarían más de una proteína LEA para proteger una sola proteína blanco. Esto no se ha observado para todas las proteínas LEA analizadas en la literatura. Existen estudios que apoyan la hipótesis del escudo molecular (Hara *et al.*, 2001; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2013), mientras que otros la refutan, apoyando la hipótesis de la existencia de interacciones más específicas (Kazuoka y Oeda, 1994; Houde *et al.*, 1995; Bravo *et al.*, 2003; Momma *et al.*, 2003). Sin embargo, como fue señalado por Cuevas-Velazquez *et al.* (2014), estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes y podrían existir ambos mecanismos de protección como parte del mecanismo general de acción de las proteínas LEA.

Estudios *in vitro* han demostrado que estas proteínas son capaces de proteger enzimas lábiles de condiciones de deshidratación o congelamiento, mientras que estudios *in vivo* muestran que plantas que sobre-expresan alguna proteína LEA poseen una tolerancia aumentada a salinidad o déficit hídrico. Sin embargo, aparentemente existen puntos en contra respecto a estas estrategias de estudio utilizadas. En primer lugar, los análisis *in vitro* se parecen poco a las condiciones que existirían en una célula que experimenta una condición estresante. Además, las enzimas “modelo” que se utilizan son muy pocas comparadas con el arsenal proteico presente en el interior de una célula. Si bien se pueden obtener resultados de mecanismos generales de funcionamiento, sólo es posible inferir que alguna situación análoga ocurra realmente en el ambiente celular. En segundo lugar, los análisis *in vivo* de sobre-expresión de ciertas proteínas LEA en organismos modelo pueden estar sobre-

valorados debido a ganancias de función, producidas por la misma sobre-expresión de estas proteínas en todo momento y en todo tejido debido al promotor CaMV 35S.

Para poder determinar mejor la importancia de la presencia de las proteínas LEA en la planta se pueden realizar análisis fenotípicos de plantas mutantes que no expresen alguna proteína LEA. Este tipo de análisis no son abundantes debido a la suposición de que proteínas LEA de un mismo grupo podrían ser redundantes entre sí, enmascarando fenotipos de interés. Sin embargo, Manfre *et al.* (2006) discutieron que el patrón espacio-temporal de expresión de los genes *AtEM1* y *AtEM6* que analizaron es distinto y tratan el fenotipo detectado como una ausencia de redundancia funcional, lo que explica que puedan observar una deshidratación más rápida de las semillas ubicadas en el extremo distal de las silicuas de plantas mutantes *atem6*.

En el estudio realizado por Olvera-Carrillo *et al.* (2010) se caracterizaron las tres proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* (AtLEA4-1, AtLEA4-2 y AtLEA4-5, sufijo que históricamente se utilizó para denota el cromosoma en el que se encuentran los respectivos *locus*) (Tabla 1). Evidenciaron que esas tres proteínas se acumulan durante las etapas finales del desarrollo de la semilla, cuando ésta comienza a deshidratarse, teniendo un pico máximo de acumulación en la semilla seca y disminuyendo su abundancia durante la germinación. También se encontró que estas proteínas se acumulan en plántulas sometidas a estrés hídrico. Estos patrones de acumulación de las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* son similares a los reportados por Bies-Etheve *et al.* (2008), donde además se menciona que la proteína AtLEA4-1 se acumula en tallo mientras que las otras dos no. Aunado a lo anterior, Olvera-Carrillo (2010) predijo, con ayuda de bases de datos, que aproximadamente los primeros 77 aminoácidos de la proteína AtLEA4-5 (extremo N-terminal) pueden formar una estructura secundaria tipo α -hélice, mientras que el resto (extremo C-terminal) permanece en conformación de tipo *random coil* (Olvera-Carrillo, 2010). La proteína EgLEA4 de *Elaeis guineensis*, homóloga a las proteínas LEA del grupo 4, presenta también una α -hélice en su extremo N-terminal, mientras que su C-terminal es un *random coil* (Hualkasin *et al.*, 2013), lo que sugiere una conservación evolutiva de este grupo de proteínas. Además, encontraron que la región promotora de su gen codificante cuenta con elementos de respuesta a ABA

(ABRE) y de respuesta a deshidratación (DRE), y carece de elementos MYB/MYC, los cuales son elementos que junto con los ABRE controlan la expresión genética en respuesta a ABA durante estrés abiótico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Tabla 1 | Algunas características fisicoquímicas y porcentaje de similitud e identidad de los tres miembros de las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana*. Las líneas ondulantes en la estructura secundaria denotan alfa hélices, mientras que la línea recta representa regiones sin estructura. Los números de los motivos representan diferentes motivos encontrados por Olvera-Carrillo (2010).

Miembros	Motivos	Residuos de A.A.	kDa predicho	pI	Estructura secundaria predicha (N-terminal → C-terminal)
AtLEA4-5		158	16.2	9.45	
AtLEA4-2		134	14.9	8.95	
AtLEA4-1		97	10.5	9.67	

	AtLEA4-1 vs AtLEA4-2	AtLEA4-1 vs AtLEA4-5	AtLEA4-1 vs AtLEA4-5
% Similitud	66.7	44.3	40.5
% Identidad	56.3	32.9	29.7

De manera interesante, y como punto de partida del presente estudio, Olvera-Carrillo *et al.* (2010) reportaron que semillas de *A. thaliana* deficientes en la producción de la proteína AtLEA4-5 debido a una inserción del transposón dSpm en la región promotora del gen *AtLEA4-5* (línea mutante denominadas *atlea4-5*), muestran un fenotipo de sensibilidad a condiciones de estrés osmótico (350 mM de Manitol) y iónico (250 mM de NaCl) durante la germinación, en comparación con semillas de tipo silvestres. Otros fenotipos reportados en el mismo estudio incluyen menor peso seco y menos botones florales en plantas mutantes después de experimentos de deshidratación-hidratación.

Se sugirió que las proteínas LEA del grupo 4 en *A. thaliana* presentan diversificación funcional debido a patrones de acumulación diferencial en la semilla durante la embriogénesis y la germinación. La proteína AtLEA4-1 muestra un nivel de acumulación

continuo durante dichas etapas, mientras que los otros dos miembros incrementan su acumulación conforme la semilla se seca y disminuyen durante la germinación (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010), aunque no se especifican los tejidos donde ocurre su expresión. Dichos resultados contrastan con la similitud de resultados obtenidos en experimentos *in vitro* de crioprotección de enzimas lábiles utilizando a estas proteínas LEA, donde se observó crioprotección por parte de estas últimas (Cuevas-Velázquez, comunicación personal). Esta diferencia entre resultados, aunado al hecho de que no se observó evidencia de redundancia funcional entre proteínas LEA del grupo 4 durante la germinación, puede explicarse como una diferencia en los patrones espacio-temporales de acumulación de estas proteínas a nivel de tejido, lo cual impediría que ciertas proteínas LEA suplieran las funciones de las faltantes. Por lo tanto, no es posible excluir la posibilidad de que las proteínas LEA puedan cumplir funciones similares, mecánicamente hablando.

Redundancia genética vs. Redundancia funcional

Al parecer no existe una diferencia clara entre los conceptos de redundancia genética y redundancia funcional, por lo que generalmente son tratados como sinónimos. Para Nowak *et al.* (1997), el concepto de redundancia genética significa que dos o más genes realizan la misma función y que la desactivación de uno de ellos tiene poco o ningún efecto en el fenotipo. Mendonca *et al.* (2011) y Thomas (1993) también lo definen simplemente como dos o más genes que realizan la misma función. Por otro lado, Kafri *et al.* (2009) refiere el concepto de redundancia funcional como genes homólogos, producto de duplicaciones genéticas que, debido a una superposición parcial de sus funciones, compensan la pérdida de uno de ellos. Siguiendo esta última definición, Krakauer y Nowak (1999) señalan que la duplicación genética produce copias de genes que son redundantes funcionalmente, fenómeno observable cuando no existen efectos fenotípicos al mutar uno de los genes duplicados.

De acuerdo con estos conceptos, cabe hacer notar que la redundancia genética está asociada íntimamente con la redundancia funcional y con una alta similitud entre las secuencias de las proteínas involucradas. Sin embargo, podría darse el caso en el que, a pesar de la similitud entre las proteínas, mutaciones en sólo una de ellas diera lugar a un fenotipo, por lo que se

interpretaría como ausencia de redundancia genética. La explicación más simple para este caso sería que es consecuencia de una expresión diferencial de los genes para cada una de las proteínas implicadas, de tal manera que, a pesar de su similitud y muy posiblemente de su redundancia funcional, la falta de una de ellas causa un fenotipo debido a su ausencia en los tejidos en donde se produce. Por tanto, en este caso la falta de redundancia genética no es necesariamente ausencia de redundancia en su secuencia ni redundancia en su función, sino sólo diferencias en sus patrones de expresión.

Para evitar confusiones, y para efectos de una mejor comprensión del fenómeno, en el presente trabajo utilizamos los términos de **redundancia genética** y **redundancia funcional**. Cuando no es posible detectar un fenotipo en mutantes para genes de una misma familia, y que codifican para proteínas que muestran similitud en su secuencia, se puede decir que son **redundantes genéticos**, y se puede argüir que esta redundancia también es **funcional**, de tal manera que sólo sería posible detectar un fenotipo en el caso de que éstas se expresaran diferencialmente en el tiempo y/o en el espacio. Sin embargo, si la similitud entre las proteínas de una misma familia no se refleja en el desempeño de una misma función, entonces podemos decir que, aunque existe **redundancia génica**, no necesariamente hay **redundancia funcional**; es decir, sería posible detectar un fenotipo aún si las proteínas presentaran el mismo patrón de expresión (Fig. 3).

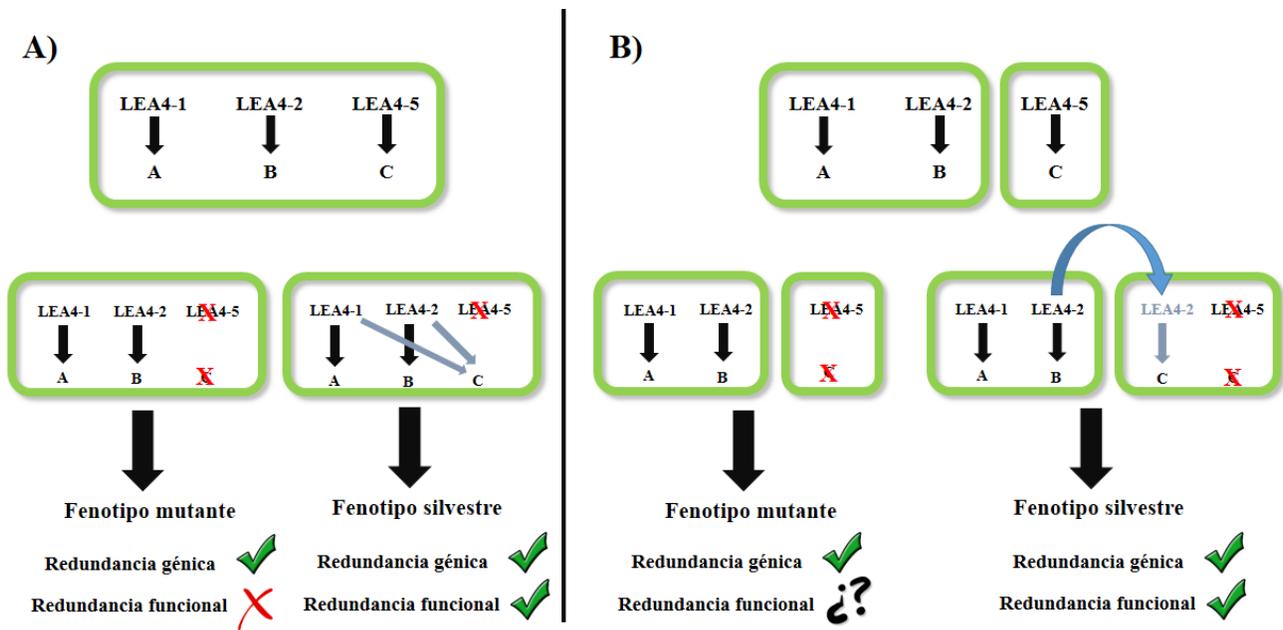


Figura 3 | Diferencia conceptual entre redundancia génica y redundancia funcional. **A)** Proteínas homólogas son consideradas redundantes génicas y, por extensión, se asume que podrían ser redundantes funcionales. En caso de tener patrones de expresión similares, el observar un fenotipo mutante es evidencia de ausencia de redundancia funcional, mientras que el observar un fenotipo de tipo silvestre es evidencia de presencia de redundancia funcional. **B)** Otra posible explicación de la detección de un fenotipo mutante es la expresión espacio-temporal diferencial de las proteínas redundantes, lo cual evitaría que proteínas genéticamente redundantes mostraran que son funcionalmente redundantes. Para saber si son redundantes funcionales, es necesario expresar las proteínas que son redundantes genéticamente bajo el control del promotor de la proteína de interés mutante. Si se observa una reversión al fenotipo silvestre, es posible afirmar que dichas proteínas son redundantes génica y funcionalmente pero muestran patrones de expresión diferentes.

Estos conceptos pueden ser aplicados a los experimentos realizados por Manfre *et al.* (2006), en donde la alta similitud entre las proteínas AtEM1 y AtEM6 permitiría suponer *a priori* que son redundantes génicas y funcionales. Sin embargo, se reporta que la mutante en uno de estos dos genes presenta un fenotipo de deshidratación de la semilla y maduración prematuras de las semillas en el extremo distal de la silicua, lo cual deja abierta al menos dos posibilidades: (a) sus patrones de expresión son diferenciales, lo cual permite detectar un fenotipo particular a pesar de la redundancia génica y posible redundancia funcional; o bien, (b) no existe redundancia funcional a pesar de mostrar redundancia génica y tener patrones de expresión similares, al menos en las condiciones en las que se analizó el fenotipo. Otros grupos de trabajo han reportado la presencia de redundancia génica y funcional entre

diversos genes, como *PLETHORAI* (*PLT1*) y *PLT2*, que son factores transcripcionales tipo AP2 necesarios para el establecimiento del centro quiescente en la raíz de *A. thaliana* (Aida *et al.*, 2004), así como entre los genes *FRUITFULL* (*FUL*), *APETALAI* (*API*) y *CAULIFLOWER* (*CAL*) que controlan la arquitectura de la inflorescencia en *A. thaliana* (Ferrandiz *et al.*, 2000).

Se predice que algunas de las 51 proteínas LEA de *A. thaliana* son producto de eventos de duplicación génica, y entre ellas se encuentran las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 (Hundertmark y Hinch, 2008). Esta suposición se favorece por la presencia de motivos de aminoácidos conservados entre los tres miembros de esta familia y que mantienen su carácter no estructurado. De ahí que se sugiera que entre los genes de esta familia existe redundancia génica, como ocurre en el caso de otras proteínas de *A. thaliana* (McLellan *et al.*, 2009). Aunque las proteínas LEA del grupo 4 presentan redundancia genética debido a la similitud en su secuencia de aminoácidos, el hecho de que plantas mutantes *atlea4-5* muestren un fenotipo de sensibilidad a condiciones de limitación de agua durante la germinación y en etapa adulta indica *a priori* que no debe existir redundancia funcional entre estas proteínas. Sin embargo, esto no excluye por completo la posibilidad de que proteínas LEA del grupo 4 sí presenten redundancia funcional. Lo anterior puede explicarse de la misma manera como se sugirió para las proteínas LEA del grupo 1, es decir, que tienen patrones de expresión espacio-temporales distintos (Fig. 3).

Para analizar la presencia de redundancia funcional suponiendo una expresión espacio-temporal diferencial, se propone expresar en semillas mutantes *atlea4-5* a las proteínas AtLEA4-1 o AtLEA4-2 bajo control del promotor del gen *AtLEA4-5*, de tal manera que, si ocurre complementación del fenotipo mutante, entonces se podría deducir que en esta familia existe redundancia genética y funcional. Si no se observa complementación del fenotipo de la mutante, entonces la conclusión sería que, a pesar de la redundancia genética en esta familia, tampoco existiría redundancia funcional, es decir, las pocas diferencias en secuencia entre sus diferentes miembros son suficientes para determinar funciones distintas.

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

De manera general, las plantas son útiles para el estudio de sistemas biológicos: tienen un patrón corporal simple, compuesto de elementos reiterantes, poseen un crecimiento y desarrollo postembrionario continuo de “fácil” acceso, y están expuestas a muchas perturbaciones ambientales. Puesto que las plantas son organismos sésiles, se han seleccionado en ellas mecanismos muy eficientes y diversos de respuesta, de ajuste y de adaptación al medio ambiente cambiante, como puede ser la modificación de su plan de desarrollo, de su metabolismo, de su crecimiento, etc.

Desde el punto de vista utilitarista, las plantas resultan de importancia vital para la obtención de alimento, para la construcción de refugios, para la generación de fibras, que son base de la obtención de papel y vestido, así como en la producción de medicinas y combustibles; sin olvidar que generan el oxígeno del aire, indispensable para la vida humana (Van Norman y Benfey, 2009). Las plantas han sido utilizadas como sistemas genéticos modelos. Basta mencionar a Gregor Mendel, quien utilizó a *P. sativum* para la deducción de las Leyes de la Herencia a finales del siglo XIX.

En 1987, se eligió a la especie *A. thaliana* (L.) Heynh como planta modelo de estudios genéticos y fisiológicos. Desde su implementación como modelo, los procesos biológicos complejos de las plantas se volvieron más entendibles, lo cual permitió comprender y resolver problemas en especies de interés agrícola como *Z. mays*.

Arabidopsis thaliana es un miembro de la familia *Cruciferae*, o *Brassicaceae* según el Art. 18.5 del Código Melbourne (McNeill, 2012), con una distribución que comprende desde Europa central, este y norte, estados atlánticos de Norteamérica y, en menor medida, regiones del Himalaya, Japón, Corea y África del Norte, en una altitud promedio de entre 2000 y 3500 m.s.n.m. (Hoffmann, 2002).

Las características que hacen de *A. thaliana* un buen modelo genético incluyen: un ciclo de vida corto de 6 semanas aproximadamente; flores autopolinizables con posibilidad de fertilización cruzada; produce una gran cantidad de semillas pequeñas de fácil recolección y

manejo, las cuales se desarrollan dentro de una silicua; un diámetro, en la planta adulta, de 2 a 10 cm; una altura, en la planta adulta, de 15 a 20 cm; su raíz es simple y fácil de estudiar. Todo esto permite cultivarla fácilmente *in vitro* o en macetas.

Además de lo anterior, en *A. thaliana* es posible realizar mutagénesis química con métodos sencillos; es posible introducir DNA a través de un proceso de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* lo que ha permitido generar miles de líneas de inserción aleatoria en el genoma, depositadas en almacenes públicos (Meinke *et al.*, 1998). Finalmente, en el año 2000 se secuenció totalmente su genoma (~125Mb), el primero de plantas, lo que permitió identificar ~20,000 genes distribuidos en 5 cromosomas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

HIPÓTESIS

Las proteínas LEA del grupo 4 presentan redundancia genética y funcional, ésta última al menos durante la germinación bajo condiciones de limitación de agua.

OBJETIVOS

General

- Determinar si existe redundancia funcional entre las proteínas LEA del grupo 4 en *A. thaliana*.

Específicos

- Realizar un análisis de los elementos en *cis* presentes en la región promotora de los genes *AtLEA4-5*, *AtLEA4-2* y *AtLEA4-1*.
- Construir vectores binarios donde el T-DNA contenga al promotor del gen *AtLEA4-5* dirigiendo los ORFs completos de los tres genes *LEA* del grupo 4 de *A. thaliana*, así como versiones del ORF que codifiquen por separado la región N-terminal y C-terminal del gen *AtLEA4-5*.
- Transformar plantas *atlea4-5* con las construcciones obtenidas y obtener líneas homocigotas.
- Detectar mediante experimentos tipo Western-blot la presencia, en las plantas transgénicas, de las diferentes proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* en las condiciones de inducción del gen *AtLEA4-5*.
- Evaluar el fenotipo durante germinación en condiciones de estrés hídrico de semillas de plantas *atlea4-5* transformadas con las construcciones obtenidas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para determinar si existe redundancia funcional entre las proteínas LEA de la familia 4 en *A. thaliana*, se realizaron construcciones genéticas donde los marcos abiertos de lectura (ORF's) de los tres genes de la familia LEA4 se expresaron bajo el control del promotor del gen *AtLEA4-5* (p4-5). Dichas construcciones se introdujeron en plantas de *A. thaliana* con fondo mutante para el gen *AtLEA4-5* y se evaluó la complementación del fenotipo previamente caracterizado en esta mutante, esto es, sensibilidad a condiciones de limitación de agua impuestas por NaCl durante la germinación.

Además de lo anterior, se consideró relevante incluir a proteínas truncadas, provenientes de la proteína *AtLEA4-5*: la proteína *AtLEA4H* que consiste en la mitad amino terminal de la *AtLEA4-5* (75 aminoácidos) y la proteína *LEA4RC* que corresponde a la mitad carboxilo terminal de la proteína *AtLEA4-5* (82 aminoácidos). Esto fue debido a que sería posible determinar cuál de estas regiones es necesaria para que la proteína *AtLEA4-5* lleve a cabo su función en condiciones de crecimiento estresantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de los promotores de los genes *LEA* del grupo 4 de *A. thaliana*

Se ingresó a la base de datos de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>) la cual contiene anotado el genoma de *A. thaliana*. Se extrajo la secuencia de los tres promotores de los LEA del grupo 4 (At5g06760, At2g35300 y At1g32560 para los genes *AtLEA4-5*, *AtLEA4-2* y *AtLEA4-1*, respectivamente). Se consideró como promotor la secuencia río arriba a partir del codón de inicio de la traducción (ATG) hasta llegar al 3'-UTR del gen río arriba, o hasta incluir 1500 pares de bases, en caso de que el gen río arriba estuviera alejado. Se ingresó la secuencia en la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) y se sometieron a análisis. Se identificaron todos aquellos elementos de respuesta a ABA, de respuesta al choque térmico, de expresión tisular específica, de respuesta a deshidratación, de respuesta a frío, de activación por giberelinas, elementos relacionados con MYBs o MYCs, con luz, elementos de respuesta a sal y cajas GATA.

Construcción del plásmido destino con el promotor del gen *AtLEA4-5*.

Se digirió el plásmido purificado pK2GW7 (Karimi *et al.*, 2002), de 11.1 kb, con las enzimas de restricción *SacI* (Thermo Scientific, #ER1131) y *SpeI* (Thermo Scientific, #ER1251) para remover el promotor 35S presente en el vector. Los productos de esta reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen, # cat. 15510-027) al 1% y la banda correspondiente al tamaño del vector pK2GW7 sin promotor 35S (~ 10 kb) se cortó y purificó del gel utilizando el paquete GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific, # cat. K0831).

Por otro lado, se amplificó por PCR el promotor del gen *AtLEA4-5* de DNA genómico de *A. thaliana* utilizando oligonucleótidos que agregan 4 nucleótidos (CACC) al extremo 5' para la ligación del amplicón al vector pENTR/SD/TOPO (Invitrogen, Ref. 450219), un sitio de restricción *SacI* en el extremo 5' del oligonucleótido *forward* (Prom-LEA4-5-F) y un sitio *SpeI* en el extremo 5' del oligonucleótido *reverse* (Prom-LEA4-5-R). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y la banda correspondiente al promotor *AtLEA4-5* (389 bp) se purificó utilizando el paquete descrito anteriormente. El promotor purificado se insertó en un vector intermediario pJET1.2/*blunt* utilizando el paquete

CloneJET PCR Cloning Kit (# cat. K1231) de Thermo Scientific. Posteriormente, la reacción de clonación fue utilizada para transformar bacterias de *E. coli* DH5 α . El vector p4-5::pJET se purificó de bacterias utilizando el paquete de miniprep GeneJET Plasmid Miniprep kit (# cat. K0502) y se sometió a una doble digestión con las enzimas *SacI* y *BcuI* (*SpeI*) por aproximadamente 18 hrs. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% y la banda correspondiente al tamaño del promotor p4-5 (389 bp) se purificó del gel.

Una vez obtenidos el vector pK2GW7 y el promotor p4-5, se ligaron utilizando el protocolo de ligación con T4 Ligasa (# cat. EL0014) de Thermo Scientific. Toda la reacción de ligación se utilizó para transformar *E. coli* DB3.1, la cual es una cepa que contiene una mutación que le confiere resistencia a la actividad de endonucleasa mediada por girasa de la proteína CcdB (Bernard y Couturier, 1992). Por lo tanto, la cepa sobrevive aunque produzca la proteína CcdB codificada por el gen *CcdB* presente en los plásmidos que contienen el cassette GATEWAY. Las colonias transformantes se seleccionaron por resistencia a espectinomicina y se verificaron purificando plásmido de algunas de ellas a partir de mini-cultivos (3 mL). Los plásmidos obtenidos se sometieron a un análisis por restricción y por secuenciación, en este último caso utilizando los oligonucleótidos Prom-LEA4-5-F y Prom-LEA4-5-R, utilizados para amplificar el fragmento que contiene el promotor LEA4-5.

Construcción de los plásmidos de entrada con los marcos abiertos de lectura (ORF) de los genes *LEA* del grupo 4 y las versiones truncadas del ORF del gen *LEA4-5*

Puesto que ya se contaba con la construcción con el ORF del gen *AtLEA4-5* en el vector pENTR (LEA4-5::pENTR), ésta se verificó por secuenciación (*Forward*: YOC-YLEA4-5-F; *Reverse*: YOC-YLEA4-5-R). A partir de este mismo plásmido se obtuvieron por PCR los fragmentos correspondientes a la región amino-terminal de la proteína LEA4-5 (LEA4H) (*Forward*: YOC-YLEA4-5-F; *Reverse*: CLEA4H-R) y la región carboxilo-terminal (LEA4RC) (*Forward*: CLEA4RC-F; *Reverse*: YOC-YLEA4-5-R). Cada uno de estos dos fragmentos se purificó utilizando el kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific, #K0831) y se ligó al vector pENTR/SD/D-TOPO utilizando el protocolo pENTR Directional TOPO Cloning Kit (Life Technologies, Cat. K2400-20). La

reacción resultante se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α , que fueron seleccionadas en medio LB sólido con kanamicina. Se aisló plásmido de las colonias transformantes siguiendo el protocolo del kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502). Para verificar los plásmidos producidos (LEA4H::pENTR y LEA4RC::pENTR) se realizaron PCRs con los oligonucleótidos correspondientes para determinar la presencia del ORF de interés. Una vez confirmada la presencia de los fragmentos de interés, los candidatos positivos se verificaron por secuenciación utilizando el oligonucleótido M13-F.

Para el caso del ORF del gen *AtLEA4-1*, éste se amplificó a partir del plásmido LEA4-1::pTYB11 (proporcionado por Cuevas-Velázquez) utilizando oligonucleótidos específicos (*Forward*: CLEA4-1-F; *Reverse*, CLEA4-1-R). El ORF para la construcción de este plásmido se obtuvo de cDNA, con la intención de eliminar el intrón presente en el gen de la construcción final. El fragmento amplificado se purificó utilizando el paquete GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit y se ligó al vector pENTR/SD/D-TOPO de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La reacción resultante se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α , de las que se seleccionaron aquéllas que crecieron en medio LB sólido con kanamicina. Posteriormente se aisló plásmido de las colonias transformantes, utilizando el paquete GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Se verificó por PCR la presencia del ORF de *AtLEA4-1* en el DNA plasmídico obtenido. Una vez confirmada la presencia del ORF de interés, se analizó por secuenciación utilizando el oligonucleótido M13 '*forward*'. Para la obtención del ORF del gen *AtLEA4-2*, se siguió un procedimiento similar al anterior, pero en este caso partiendo de DNA genómico debido a la ausencia de intrones y amplificando con oligonucleótidos específicos para el ORF del gen *AtLEA4-2* (*Forward*: CLEA4-2-F; *Reverse*: CLEA4-2-R)

Obtención de los plásmidos con los arreglos pLEA4-5::LEA4-5, pLEA4-5::LEA4-2, pLEA4-5::LEA4-1 y pLEA4-5::LEAH

Los plásmidos con los ORFs para las proteínas *AtLEA4-5*, *AtLEA4-2*, *AtLEA4-1* y el extremo amino y carboxilo de la proteína *AtLEA4-5* (*AtLEA4H* y *AtLEA4RC*, respectivamente) se recombinaron independientemente mediante el sistema GATEWAY en el vector p4-5::pK2GW7. Las reacciones de recombinación se utilizaron para transformar

bacterias *E. coli* DH5 α y las transformantes de interés se seleccionaron en medio LB sólido suplementado con espectinomicina. De las colonias transformantes se purificó DNA de plásmido siguiendo el protocolo del paquete GeneJET Plasmid Miniprep kit. Para verificar la organización de los plásmidos obtenidos de cada una de las recombinaciones, se realizaron PCRs con oligonucleótidos ubicados en el esqueleto del vector binario (pK2GW7-F y pK2GW7-R) y diseñados de tal manera que flanquearan toda la construcción de interés. Los productos de estas reacciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, considerando el tamaño estimado para cada uno de los amplicones de acuerdo con el mapa de cada una de las construcciones esperadas. Posteriormente, los plásmidos donde se obtuvieron los amplicones del tamaño esperado se analizaron por secuenciación utilizando los oligonucleótidos pK2GW7-F y pK2GW7-R. Al analizar las secuencias y comprobar que todas las construcciones (pLEA4-5::LEA4-5, pLEA4-5::LEA4-2, pLEA4-5::LEA4-1, pLEA4-5::LEAH y pLEA4-5::LEARC) estuvieran correctamente diseñadas, se procedió a transformar células de *A. tumefaciens* GV3010 con los diferentes plásmidos. Las colonias de *A. tumefaciens* que sobrevivieron a la selección en medio LB sólido adicionado con espectinomicina y rifampicina se verificaron por PCR, utilizando los oligonucleótidos pK2GW7-F y pK2GW7-R, para detectar la presencia de las construcciones en cuestión.

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia silvestres (Wt) y mutantes en el gen para la proteína LEA4-5, denominadas *atlea4-5* (# de acceso NASC: 122943), línea mutante que presenta una inserción del transposón dSpm en el promotor del gen AtLEA4-5, a 208 pb río arriba del codón ATG que marca el inicio de la traducción. Ya se ha reportado que dicha línea mutante es nula para la expresión de la proteína AtLEA4-5 (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). Las plantas *atlea4-5* se transformaron mediante inmersión floral (*floral dipping*) con las construcciones obtenidas. El cuarto de cultivo *in vitro* donde se crecieron las plantas en cajas Petri se mantuvo con las siguientes condiciones: temperatura = 25 °C; porcentaje de humedad = 30-35%; intensidad luminosa = 50-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; fotoperiodo = 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El cuarto de cultivo donde se crecieron las plantas en medio terreo se mantuvo con las siguientes condiciones: temperatura = 22 °C; porcentaje de humedad = 40-

50%; intensidad luminosa = 60-70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; fotoperiodo =16 horas luz y 8 horas oscuridad.

Esterilización de las semillas de *A. thaliana*

Las semillas que se utilizaron en los diferentes experimentos *in vitro* se esterilizaron en una campana de flujo laminar de la siguiente manera: las semillas a esterilizar (aproximadamente no más de 1000 semillas para garantizar eficiencia en la desinfección) se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se agregó 1 ml de etanol absoluto y se agitó vigorosamente durante 2 minutos. Se retiró el etanol, se agregó 1 ml de una solución de hipoclorito al 40% - tritón al 0.05% y se agitó vigorosamente por 10 minutos. Se retiró la solución y se hicieron 5 lavados con agua destilada estéril. Finalmente, se sembraron las semillas en cajas Petri con medio MS 1X (4.3 g L⁻¹ de MS Salt Mixture [Caisson Laboratories], 1% de Sacarosa [Research Organics], 0.5 g L⁻¹ de MES [Sigma], 0.65% de Agar-Agar [Sigma]; pH 5.7), adicionando el agente selectivo cuando fuera necesario. Las semillas ya sembradas en el medio se estratificaron colocando las cajas Petri boca abajo a 4°C y en completa oscuridad durante 3 días, periodo después del cual se transfirieron al cuarto de cultivo *in vitro*.

Cuando se requirió trasplantar las plántulas a medio férreo, se utilizó una mezcla de Peat Moss (Sunshine, Mezcla 3), Perlita (Agrolita) y Vermiculita (Sunshine) en proporción 3:1:1, respectivamente, adicionado con 9.45 g del fertilizante de liberación controlada Osmocote Plus 15-9-12 (Scotts). En caso de no utilizar el fertilizante Osmocote, se regó ocasionalmente con solución nutritiva para *A. thaliana*, la cual está compuesta de: 5 mM KNO₃, 2.5 mM KH₂PO₄ pH 5.6, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃), 50 μM FeEDTA, 70 μM H₃BO₃, 14 μM MnCl₂, 0.5 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.2 μM NaMoO₄, 10 μM NaCl, 10 nM CoCl₂.

Transformación de *A. thaliana* por el método de inmersión floral

Para la transformación de plantas se siguió el protocolo de inmersión floral descrito por Zhang *et al.* (2006). Brevemente, se crecieron células de *A. tumefaciens* GV3010, previamente transformadas con las construcciones de interés, en tubos de ensaye con 6 ml de medio LB líquido adicionado con los antibióticos apropiados (espectinomicina a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ para la selección de transformantes, más rifampicina y/o

gentamicina para la selección de *A. tumefaciens*, a una concentración final de 50 o 25 µg/ml, respectivamente), por 48 horas a 28°C con agitación ligera. Posteriormente, se tomaron 5 ml de estos cultivos para inocular 500 ml de LB líquido conteniendo los antibióticos de selección apropiados. Los cultivos se incubaron durante 16-24 hrs a 28°C con agitación. Luego, se colectaron las células mediante centrifugación a 4,500 g por 10 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 250 ml de una solución de sacarosa (Research Organics) al 5% y Silwet L-77 (Lehle Seeds, cat. VIS-30) al 0.02%.

Se tuvo cuidado de que las plantas que se utilizaron para transformar tuvieran un buen número de botones florales para obtener una eficiencia de transformación adecuada. Dichas plantas se sumergieron en la suspensión previamente preparada de *A. tumefaciens* (ver párrafo anterior) por 6 minutos, se dejaron escurriendo por 1 minuto, se envolvió la parte aérea con película plástica adherente y se dejaron horizontalmente en completa oscuridad a 28°C durante 24 hrs. Después, se removió la película plástica y se colocaron las plantas en posición vertical en el cuarto de crecimiento hasta que produjeron semillas, las cuales se recolectaron teniendo cuidado de no mezclar las plantas T0 y/o las semillas transformadas (T1) con las diferentes construcciones.

Obtención de líneas homocigotas

Para la obtención de líneas homocigotas para las diferentes construcciones, se esterilizaron las semillas (T1) de plantas transformadas (T0) con las diferentes construcciones y se sembraron en cajas Petri con MS 1X adicionado con kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml. Las semillas que sobrevivieron a la selección se transfirieron a medio térreo para *A. thaliana*, cuidando de colocar sólo una planta en cada maceta e identificando cada planta con una letra. Cada una de estas plantas representa la generación T1. Cuando las plantas crecieron, se tomó una hoja de la roseta y se extrajo DNA utilizando la resina Chelex-100 (HwangBo *et al.*, 2010), con el cual se verificó por PCR la presencia de las construcciones con las cuales fueron transformadas. Se obtuvieron semillas de estas plantas (T2), cuidando de no mezclar las semillas provenientes de diferentes plantas.

Posteriormente, se tomaron semillas T2 de ocho plantas distintas portadoras de cada una de las cinco construcciones y se efectuó una prueba de segregación de la resistencia a kanamicina. Se sembraron 100 semillas por cada línea. Se prestó particular atención a aquellas líneas que segregaron 3:1 (75% semillas resistentes al antibiótico, 25% sensibles), lo cual sería una indicación de que dichas líneas contaban con sólo una inserción de T-DNA. De aquellas líneas que segregaron 3:1, se tomaron 10 plántulas sobrevivientes al azar y se trasplantaron a medio terreo en macetas individuales. Estas plantas representaron la generación T2 y se identificaron con un número. Se obtuvieron semillas (T3) de dichas plantas, cuidando de no mezclarlas, y de nuevo se hicieron experimentos de segregación en kanamicina. En esta ocasión, se seleccionaron las líneas que mostraron el 100% de supervivencia. Las líneas identificadas de esta manera se consideraron como homocigotas y fueron las que se utilizaron para realizar los experimentos para la caracterización fenotípica en germinación.

Verificación de la transformación de plantas mutantes

Para confirmar que las plantas transformadas con las diversas construcciones estuvieran en el fondo *atlea4-5*, se sembraron las semillas de las generaciones T1, T2 y T3 de cada construcción y las semillas silvestres en medio MS 1x adicionado con 5 μ M de L-metioninsulfoximina (MSO), un derivado de glutamato, análogo al glufosinato (marca comercial: BASTA), que inhibe el crecimiento de plantas dicotiledóneas ya que actúa como un inhibidor competitivo de la glutamina sintetasa (GS). Se esperó que las semillas silvestres murieran, mientras que las semillas de las diferentes líneas con las construcciones de interés sobrevivieran al 100%, ya que el transposón dSpm que interrumpe el promotor del gen *AtLEA4-5* contiene el gen *bar*, el cual codifica para la enzima fosfotrisina-N-acetiltransferasa. Dicha enzima le confiere a la planta resistencia al MSO, ya que inactiva al MSO acetilando sus grupos amino, lo cual impide la inhibición a la GS y permite el crecimiento en presencia del inhibidor (MSO).

Caracterización fenotípica durante germinación

Se tomaron aproximadamente 1000 semillas de cada una de las líneas a analizar (*Wt*, *atlea4-5* y transformantes con pLEA4-5::*LEA4-5*, pLEA4-5::*LEA4-2*, pLEA4-5::*LEA4-1*, pLEA4-

5::LEAH y pLEA4-5::LEA4H), se esterilizaron y se sembraron 300 semillas (100 semillas por caja, cuidando de distribuir las uniformemente) en los diferentes tratamientos: MS, MS + 350 mM de manitol y MS + 250 mM de NaCl (condiciones previamente utilizadas por Olvera-Carrillo et al., 2010). Las semillas se estratificaron como se describió previamente y se dejaron germinar en el cuarto de cultivo *in vitro*.

Se monitoreó la germinación aproximadamente cada 4 horas utilizando un microscopio estereoscópico, considerando germinación a la emergencia evidente de la radícula a través de la testa de la semilla. Las gráficas donde se muestran las cinéticas de germinación se construyeron utilizando el programa GraphPad Prism v6.01, ajustando los datos a una curva sigmoideal de dosis-respuesta de pendiente variable, también conocida como ecuación logística de cuatro parámetros:

$$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{(LogEC50 - X) * Hillslope}}$$

Donde:

- *Bottom*: Valor del eje Y en el inicio de la curva, el cual fue ajustado a 0.
- *Top*: Valor de Y al final de la curva de germinación.
- *LogEC50*: Valor de X cuando la respuesta está en el intermedio entre Bottom y Top.
- *Hillslope*: Pendiente de la curva.

Los datos correspondientes a porcentaje de germinación final (Top) y la pendiente de la curva (Hillslope) que arrojó el programa GraphPad Prism v6.01 se tomaron para realizar análisis estadístico de germinación utilizando el software Microsoft Excel 2013. Primero, se realizó una prueba F de Fisher para varianzas de dos muestras con el fin de determinar si los conjuntos de datos a analizar eran heterocedásticos, es decir, si sus varianzas eran significativamente diferentes. Si los conjuntos de datos no eran heterocedásticos (P-value > 0.05), se les realizó un análisis tipo “t” de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales, con un intervalo de confianza del 95% y teniendo como hipótesis nula que no había diferencias entre genotipos en un mismo tratamiento (P-value > 0.05). Si el conjunto de datos resultaba heterocedástico (P-value < 0.05), se realizó un análisis tipo “t” de Student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, con un intervalo de confianza del 95%, teniendo

como hipótesis nula que no había diferencias entre genotipos en un mismo tratamiento (P-value > 0.05).

Extracción de proteína total de semilla

Para la extracción de proteína total de semilla se siguió el protocolo reportado por Olvera-Carrillo *et al.* (2010). Brevemente, se tomaron aproximadamente 100 mg de las semillas de interés, las cuales se molieron en un mortero con ayuda de un pistilo, congelándolas continuamente con N₂ líquido y evitando que se descongelaran. Las semillas molidas se colocaron en un microtubo Eppendorf de 1.5 ml y se les agregaron 400 µL de una mezcla de buffer de extracción:fenol en proporción 3:1, adicionado con polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) (Buffer de extracción: 0.7 M de Sacarosa, 0.5 M de Tris, 30 mM de HCl, 50 de mM EDTA, 0.1 M de KCl, 2% de β-mercaptoetanol y 12 mg/mL PVPP). Se recuperó la fase orgánica (sobrenadante) y se repitió el proceso. Nuevamente, se recuperó la fase orgánica y se agregó un volumen de buffer de extracción:fenol en proporción 3:1, sin adicionarle PVPP. Después de esta extracción se volvió a recuperar la fase orgánica en un microtubo Eppendorf de 1.5 mL, de la que se separó 1/5 del volumen y se colocó en otro tubo para la cuantificación de proteína. Ambos tubos se procesaron de igual forma. Posteriormente, se agregaron 800 µL de una solución fría de acetato de amonio 0.1 M disuelto en metanol para inducir la precipitación de las proteínas. La mezcla se incubó a -20 °C por 2 horas y se centrifugó para formar una pastilla que se lavó con acetona al 80% fría, después de lo cual se repitió la centrifugación y la pastilla obtenida se disolvió en 30 µL de buffer de solubilización CHES-SDS (CHES al 1%, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 2% y glicerol al 10%). Para cuantificar la proteína de este extracto, la pastilla de la alícuota separada en el inicio de la extracción se disolvió al final en 0.5M de NaOH y se continuó el procedimiento de cuantificación por el método de Lowry. Ambos extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Cuantificación de proteína total de semilla

Las proteínas totales obtenidas se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (1951). Brevemente, se preparó una solución que contenía 2% de Na₂CO₃ en 0.1N de NaOH, 1% de CuSO₄ + 5H₂O y 2% de tartrato de Na/K, en proporción 10:0.1:0.1. Se tomaron 5 µL de la proteína solubilizada en 0.5M de NaOH y se diluyeron con en 195 µL de H₂O. A esta

preparación se le agregó 1 mL de la solución preparada al inicio, se agitó vigorosamente y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu 1 N, se agitó vigorosamente y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de la preparación a una longitud de onda de 750 nm y se calculó la cantidad de proteína presente tomando como referencia una curva estándar construida con albúmina sérica bovina (BSA) desde 0 a 70 μ g/ml. Con estos datos, se hicieron los cálculos respectivos para determinar la concentración de proteínas en la solución de proteínas en buffer CHES-SDS.

Detección de proteína AtLEA4-5 mediante experimentos tipo Western-blot

Con el fin de determinar la presencia de la proteína AtLEA 4-5 en extractos de proteínas, se realizaron experimentos tipo Western-blot, para lo cual las proteínas del extracto total resuspendidas en buffer CHES-SDS se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando aproximadamente 25 μ g de proteína solubilizada en buffer SDS. Para ello, se utilizó un gel desnaturizante al 15% de acrilamida (30% acrilamida: 0.8% bis-acrilamida). Después de la electroforesis, se realizó una transferencia húmeda de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham). Las proteínas transferidas se fijaron por 1 hora con solución fijadora (10% de ácido acético, 25% de isopropanol). Posteriormente, se detectó la carga de proteínas tiñendo la membrana con Rojo Ponceau (1% de Rojo Ponceau en 5% de ácido acético). La membrana se destiñó con lavados con buffer TBST 1X (10 mM de Tris Base, 150 mM de NaCl, 0.1% de Tween-20) y se bloqueó en TBST 1X con 5% (w/v) de leche sin grasa durante toda la noche a 4°C con balanceo constante. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario anti-LEA4-5 en una dilución 1:5,000 diluido en TBST 1X con 5% (w/v) de leche sin grasa. Se incubó por 3 horas a temperatura ambiente y balanceo constante. Se retiró la solución y se hicieron tres lavados con TBST 1X. Luego, se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la enzima HRP (Horse Radish Peroxidase) en una dilución 1:40,000 diluido en TBST 1X con 5% (w/v) de leche sin grasa y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente y balanceo constante. Al final de este tiempo, se retiró la solución y se hicieron tres lavados más con TBST 1X.

La detección de la proteína de interés mediante la enzima HRP consistió en una reacción de oxidación del sustrato luminol por parte del H_2O_2 utilizando como catalizador la enzima HRP acoplada al anticuerpo secundario, producido para reconocer al anticuerpo primario. La reacción de la HRP produjo el compuesto 3-aminofalato excitado, que decayó a un estado de menor energía liberando un fotón, el cual se detectó mediante la ayuda de una película fotográfica. Por lo tanto, se preparó 1 ml de solución de H_2O_2 :luminol (1:1), la cual se puso en contacto con la membrana durante 2 minutos. Se retiró el exceso de reactivo y se colocó entre dos acetatos. Finalmente, la membrana se expuso a una película fotográfica MBX de KODAK (# cat. 6040331) en la oscuridad y dentro de un cassette durante diferentes lapsos dependiendo de la señal obtenida, y luego se reveló el film mediante el procedimiento especificado por KODAK.

RESULTADOS

Análisis bioinformático de los promotores de los genes *LEA* del grupo 4

Para identificar los probables elementos en *cis* presentes en los promotores de los genes *LEA* del grupo 4, se realizó un análisis, con ayuda del servidor PLACE (Higo *et al.*, 1999), de las regiones promotoras de los tres genes *LEA* de la familia 4 de *A. thaliana*. Se consideró como promotor la región comprendida entre el sitio de inicio de la traducción y el final del 3' UTR del gen río arriba (para el gen *AtLEA4-5*) o 1500 bases río arriba a partir del sitio de inicio de la traducción (para los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*). Los resultados condensados se muestran en la Tabla 2, así como un esquema de la localización espacial relativa de dichos elementos en la Fig. 4 y una tabla con todos los elementos arrojados por el servidor PLACE en el Anexo III.

Tabla 2 | Identificación de elementos en *cis* en los promotores de los tres genes *LEA* de la familia 4 de *A. thaliana* utilizando el servidor PLACE (Higo *et al.*, 1999). Se muestra el tamaño considerado de cada promotor para efectuar el análisis, así como el número de elementos encontrados por categoría en cada promotor.

Categoría*	Descripción	No. de elementos identificados		
		p4-1 (1500 pb)	p4-2 (1500 pb)	p4-5 (389 pb)
ABA RELATED	Elementos relacionados con ABA	13	4	8
HSP RELATED	Elementos encontrados en promotores de proteínas de choque térmico	5	3	1
TISSUE SPECIFICITY	Elementos de expresión tejido-específica	68	86	28
DEHYDRATION RELATED	Elementos relacionados con la respuesta a deshidratación	9	10	6
GA RELATED	Elementos relacionado a ácido giberélico	0	2	0
GATABOX	Caja GATA	6	9	1
GT1GMSCAM4	Elemento que induce a SCaM-4 por NaCl	1	1	0
LTRE RELATED	Elementos relacionados con la respuesta a baja temperatura	1	2	1
MYB/C RELATED	Elementos de reconocimiento de factores tipo MYB/MYC	16	10	5
LIGHT RELATED	Elementos relacionados con expresión regulada por luz	20	17	6

* Los elementos se agruparon en categorías discretas de acuerdo a características particulares. El desglose de las categorías se muestra en el Anexo III.

Dentro de la categoría “*ABA RELATED*” se incluyeron todos los elementos con una referencia directa a la secuencia consenso de los elementos responsivos a ABA (ABRE), elementos similares a ABRE que responden negativamente a ácido giberélico o elementos

que son sitios de unión del factor transcripcional tipo bZIP ABI5. El promotor p4-1 mostró el mayor número de elementos “*ABA RELATED*”, mientras que p4-2 contenía el menor número de estos elementos. En la categoría “*HSP RELATED*” se incluyeron dos elementos en *cis* cuya anotación indicaba que formaban parte de promotores de *Heat Shock Proteins* (proteínas de choque de calor). El promotor p4-5 mostró un solo elemento y mientras que el promotor p4-2 hasta cinco.

En la categoría “*TISSUE SPECIFICITY*” se incluyeron todos los elementos en *cis* anotados con alguna referencia explícita de su relación con una expresión tisular específica. Ésta resultó ser la categoría más sobrerrepresentada e incluyó elementos en *cis* relacionados con la expresión específica en raíz, tallo, polen, células guarda, semilla, de manera general, y embrión, de manera particular (ver Anexo III). Se incluyeron también elementos que regulaban la expresión de genes durante la embriogénesis. El promotor p4-2 mostró la mayor cantidad de elementos bajo esta categoría. En la categoría de “*DEHYDRATION RELATED*” se incluyeron todos los elementos en *cis* anotados con alguna referencia directa de ser encontrados en genes que se inducen por deshidratación. De nueva cuenta, el promotor p4-2 es el que contó con el mayor número de elementos en esta categoría.

En el análisis se incluyeron a los elementos en *cis* relacionados con ácido giberélico bajo la categoría de “*GA RELATED*”, debido a que esta fitohormona promueve la germinación y podrían ser elementos involucrados en una regulación negativa de aquellos genes que se inducen por ABA. Sólo p4-2 mostró contener este tipo de elementos, presentes en dos ubicaciones.

Las cajas GATA (“*GATABOX*”) forman su propia categoría particular debido a que, de acuerdo a su anotación, podían situarse en diversas categorías, siendo este elemento necesario para elevar los niveles de expresión de un gen, así como estar involucrados en regulación por luz y en la expresión tisular específica. El promotor p4-2 contó con nueve cajas GATA, mientras que p4-5 sólo presentó una. Al igual que el elemento anterior, se manejó al elemento en *cis* “*GTIGMSCAM4*” solo en su propia categoría ya que estaba anotado con la característica particular de regular la expresión del gen *SCaM-4* en presencia de NaCl o por

infección por patógenos. Los promotores p4-1 y p4-2 mostraron uno de estos elementos en sus secuencias, mientras que p4-5 no mostró la presencia de este elemento.

Debido a que la disminución de la temperatura afecta la toma de H₂O por parte de la planta, se incluyeron elementos con una relación directa a bajas temperaturas bajo la categoría “*LTRE RELATED*”. Los promotores p4-1 y p4-5 mostraron un elemento de esta categoría, mientras que p4-2 que mostró dos de estos elementos.

En la categoría “*MYB/C RELATED*” se incluyeron todos los elementos *cis* donde en su anotación se hiciera referencia directa a ser sitios de unión de factores transcripcionales tipo MYB o MYC, factores necesarios para la expresión de genes involucrados en deshidratación o cuya expresión está regulada por ABA. El análisis del promotor p4-1 presentó 16 de ellos, en tanto que p4-2 mostró tener 10 de estos elementos, y p4-5 sólo cinco.

Por último, debido a la notable presencia de elementos en *cis* con alguna anotación referente a regulación por luz, se decidió incluirlos en el análisis bajo la categoría “*LIGHT RELATED*”. El promotor p4-5 cuenta con sólo seis de estos elementos mientras que p4-1 llegó a tener hasta 20.

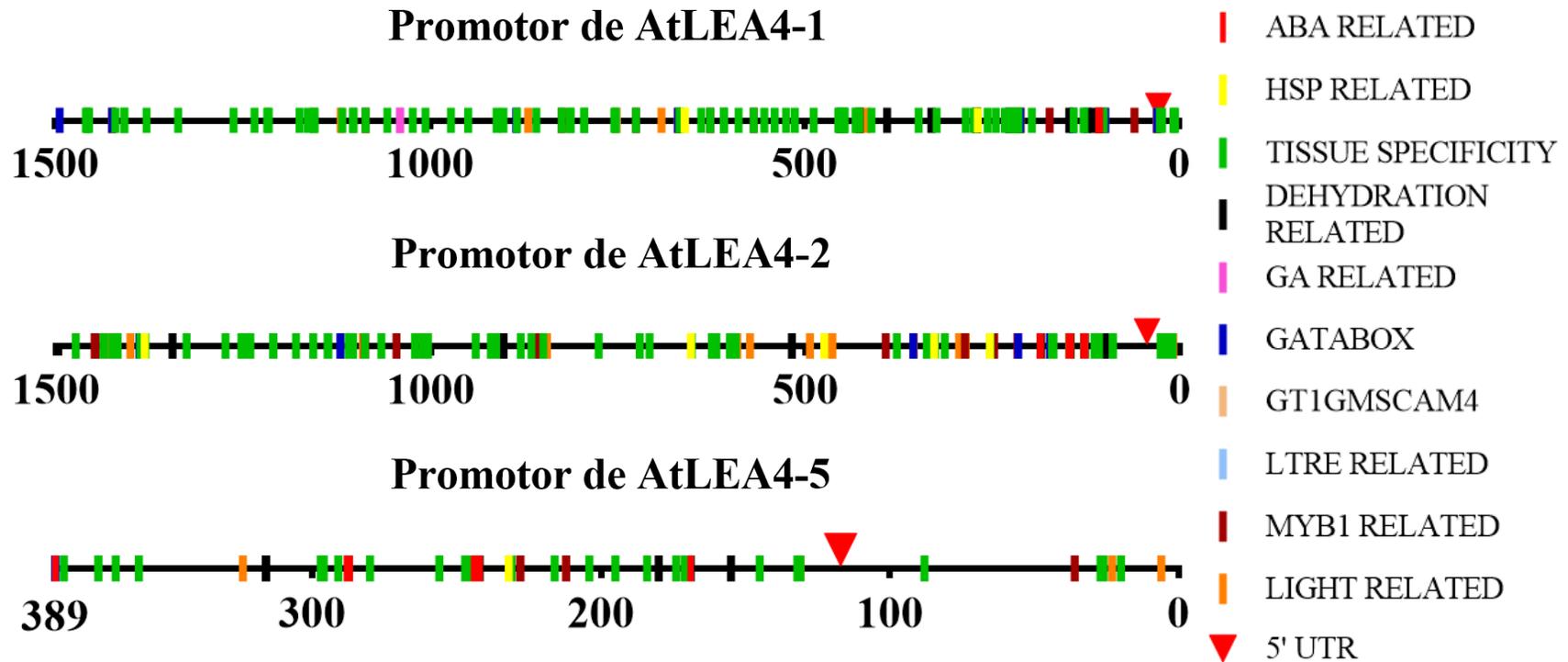


Figura 4 | Representación gráfica de la ubicación de elementos regulatorios *in cis* probables en los promotores de los genes que codifican para los miembros de las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana*. Para una descripción y ubicación más precisa cada uno de los elementos encontrados en los promotores, ver el Anexo III.

Construcción de plásmidos para la expresión de los ORF de interés bajo el promotor del gen *AtLEA4-5*

Con el fin de expresar las diferentes proteínas LEA que componen a la familia 4 bajo el control del promotor del gen *AtLEA4-5* (p4-5), se digirió primero el vector pK2GW7 con las enzimas de restricción *SacI* y *SpeI* para cortar el promotor 35S. Por otro lado, el promotor p4-5 se obtuvo a partir del plásmido p4-5::pJET, previamente construido en el laboratorio durante la investigación de Olvera-Carrillo *et al.* (2010). Las bandas correspondientes al vector pK2GW7 sin 35S y al promotor p4-5 se cortaron y purificaron a partir de un gel de agarosa al 1% como se muestra en la Fig. 5.

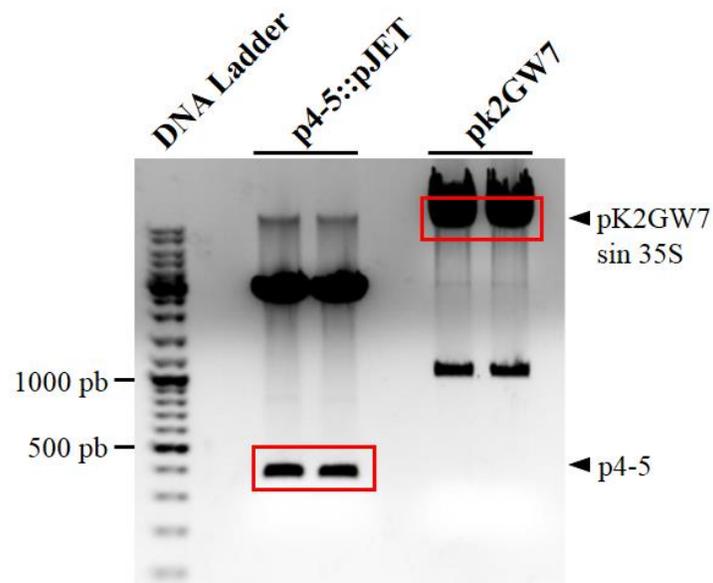


Figura 5 | Patrón de restricción de los vectores p4-5::pJET y pK2GW7 con enzimas de restricción *SacI* y *SpeI*. Los cuadros rojos indican las zonas del gel de donde se extrajeron las bandas que fueron purificadas y que corresponden al promotor p4-5 (recuadro inferior, ~395 pb) y al vector pK2GW7 sin el promotor 35S (recuadro superior, ~10 kb). Las flechas marcan el tamaño de las bandas marcadoras utilizadas como referencia.

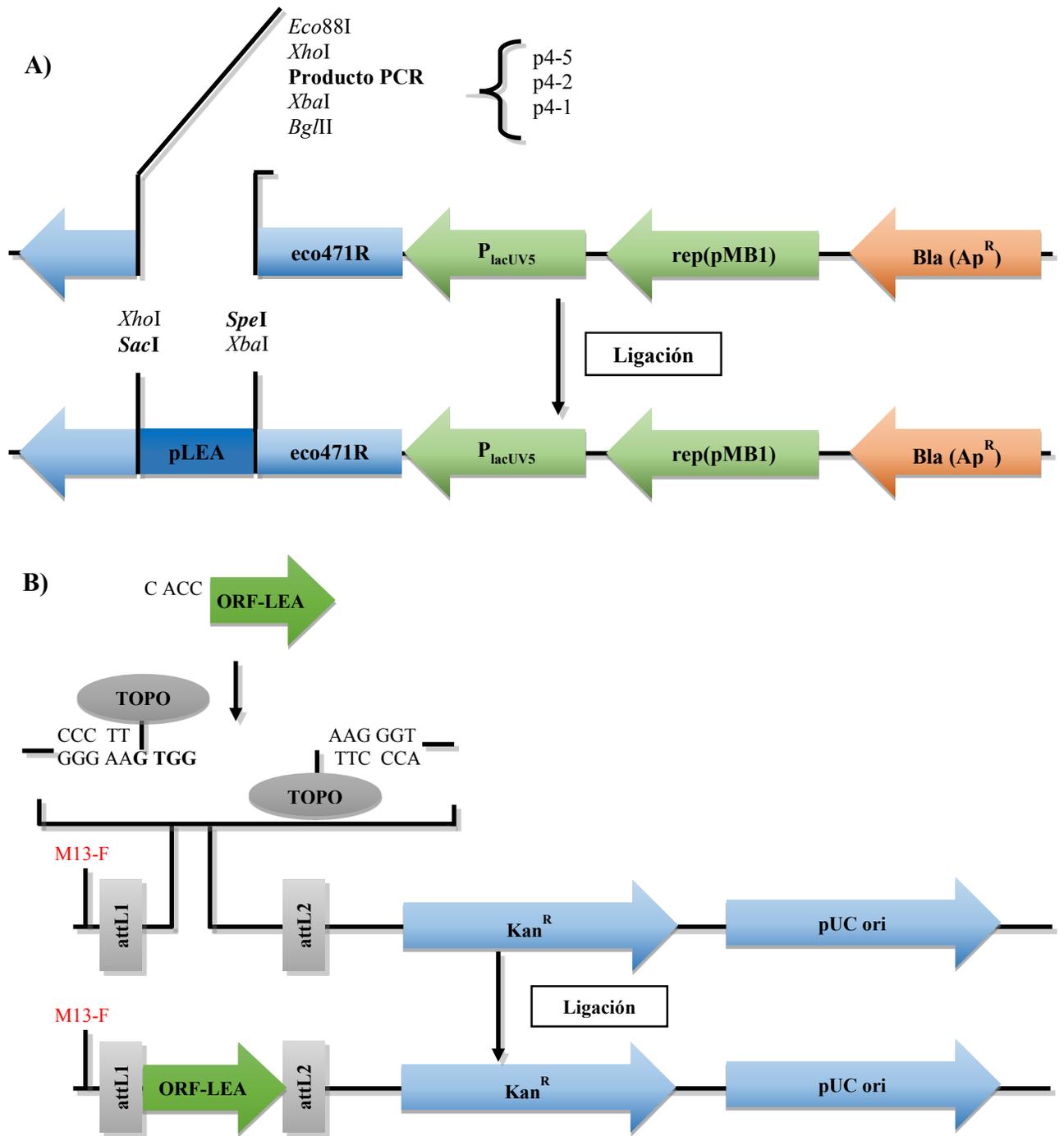


Figura 6 | Esquema de los vectores pJET1.2/*blunt* (A) y pENTR/SD/D-TOPO (B). En estos vectores fueron clonados los promotores y los ORF de los genes *LEA* del grupo 4, respectivamente. Eco471R, gen de la enzima de restricción ECO471; PlacUV5, variante del promotor de lactosa; rep(PMB1), origen de replicación derivado del plásmido pMB1, gen de resistencia a ampicilina; TOPO; topoisomerasa; attL1 y attL2, sitios de recombinación; Kan^R, gen de resistencia a kanamicina; pUC ori, origen de replicación derivado del plásmido pUC; M13-F, sitio de unión del oligonucleótido M13-F.

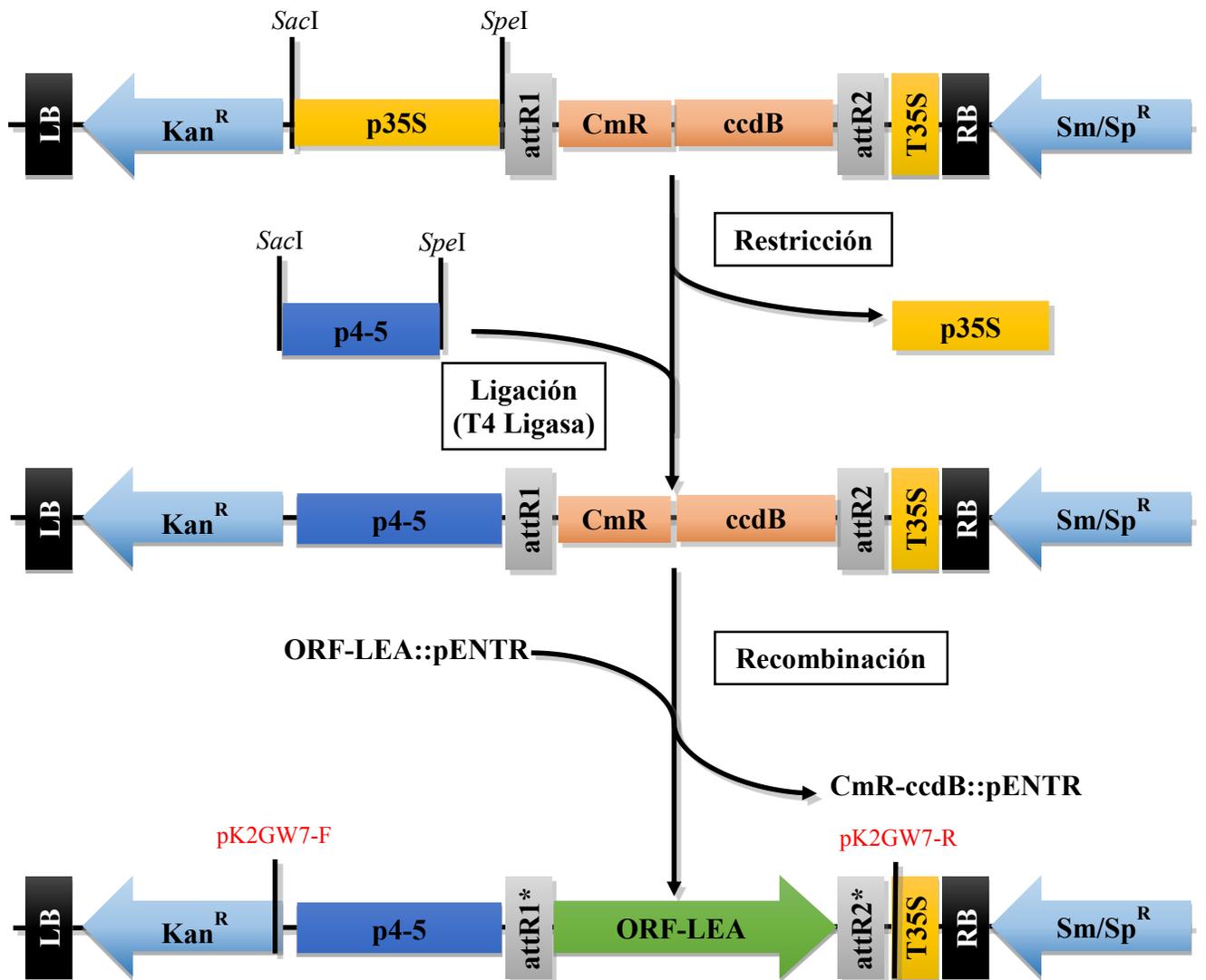


Figura 7 | Esquema del plásmido pK2GW7 y diagrama de flujo seguido para la construcción del vector con las construcciones genéticas de interés. Las letras rojas indican la ubicación de los sitios de alineamiento de los oligonucleótidos pK2GW7-F y pK2GW7-R que se utilizaron para verificar las construcciones finales mediante PCR de punto final. Kan^R, gen de resistencia a kanamicina en plantas; attR1 y attR2, sitios de recombinación; CmR, gen de resistencia a cloranfenicol en bacteria; CcdB, gen que codifica para la proteína CcdB; T35S, terminador 35S; LB, borde izquierdo del T-DNA; RB, borde derecho del T-DNA; Sm/Sp^R, gen de resistencia a espectinomomicina en bacteria

Los productos purificados se ligaron siguiendo el protocolo de ligación con T4 ligasa (ver Materiales y métodos) (Fig. 7). La reacción de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DB3.1 quimiocompetentes, después de lo cual se plaquearon en medio LB (ver Anexo IV para composición) adicionado con espectinomicina. De las colonias que crecieron se obtuvo DNA de plásmido que se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *SpeI* para comprobar la inserción del promotor p4-5 en el vector indicado.

Por otro lado, a partir de DNA genómico se amplificaron los fragmentos con los promotores de los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* (p4-1 y p4-2, respectivamente) y se ligaron al vector pJET para en posteriores estudios generar los plásmidos p4-1::pK2GW7 y p4-2::pK2GW7 (Fig. 8).

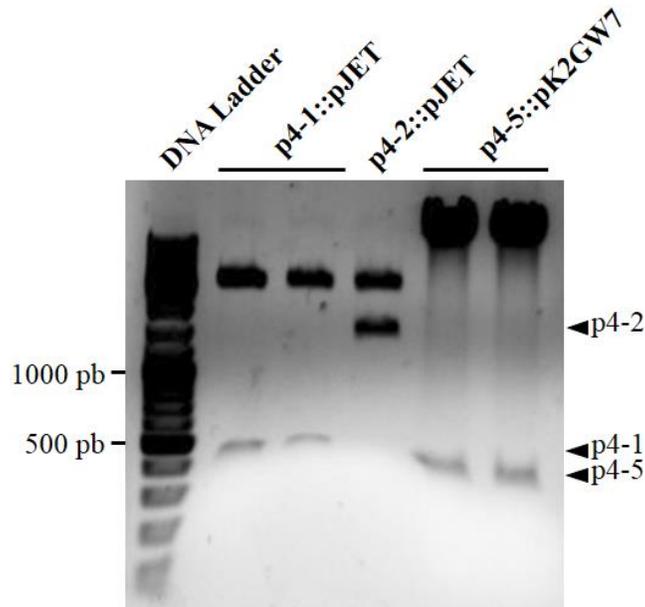


Figura 8 | Patrón de restricción de los vectores p4-1::pJET y p4-2::pJET digeridos con las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI* y del vector pK2GW7 digerido con las enzimas *SacI* y *SpeI*. Electroforesis realizada en gel de agarosa al 1 %.

El plásmido p4-5::pK2GW7 se recombinó mediante el sistema GATEWAY (Karimi *et al.*, 2007) con el plásmido LEA4-5::pENTR, el cual ya había sido construido a partir de cDNA (Fig. 6 y 9). Los productos de la recombinación se utilizaron para transformar *E. coli* DH5 α quimiocompetentes para posteriormente plaquear en medio LB adicionado con espectinomicina. De las colonias resultantes, se extrajo el vector binario con la construcción

p4-5::LEA4-5. De manera similar, el plásmido p4-5::pK2GW7 se recombinó con el plásmido LEA4-2::pENTR, el cual tenía el ORF del gen *AtLEA4-2*, amplificado de DNA genómico, y con el plásmido LEA4-1::pENTR, con el ORF del gen *AtLEA4-1*, amplificado de cDNA. Para determinar la región de la proteína necesaria para producir un fenotipo silvestre, también se realizaron recombinaciones entre p4-5::pK2GW7 y el plásmido LEA4H::pENTR, es decir con el ORF de la mitad 5' del gen *AtLEA4-5*, y con el plásmido LEA4RC::pENTR, con el ORF de la mitad 3' de ese mismo gen.

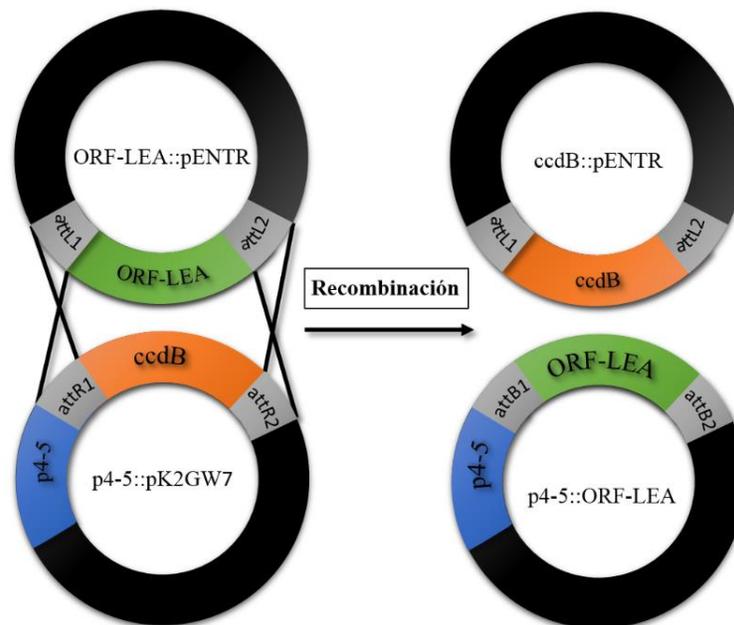


Figura 9 | Esquema de la reacción de recombinación entre ORF-LEA::pENTR y p4-5::pK2GW7. El producto de la recombinación (una mezcla entre vectores *ccdB::pENTR* y p4-5::ORF-LEA) se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α quimiocompetentes, las cuales son sensibles a la toxina codificada por el gen *ccdB*.

Cada construcción final se verificó por PCR utilizando los oligonucleótidos pK2GW7-F y pK2GW7-R, que flanqueaban toda la construcción. Esta estrategia permitió observar, utilizando siempre los mismos oligonucleótidos, bandas de diferentes tamaños predichos a partir de la longitud en pares de bases del promotor p4-5 y el ORF que lo acompañaba (Fig. 10 y 11). Aunado a lo anterior, se secuenciaron los plásmidos respectivos utilizando los oligonucleótidos pK2GW7-F y pK2GW7-R. Las secuencias obtenidas mostraron que las

construcciones fueron las esperadas, y que incluían remanentes del sitio attR1 utilizado en la recombinación, el cual no agregó un sitio de inicio de la traducción alternativo (Anexo II).

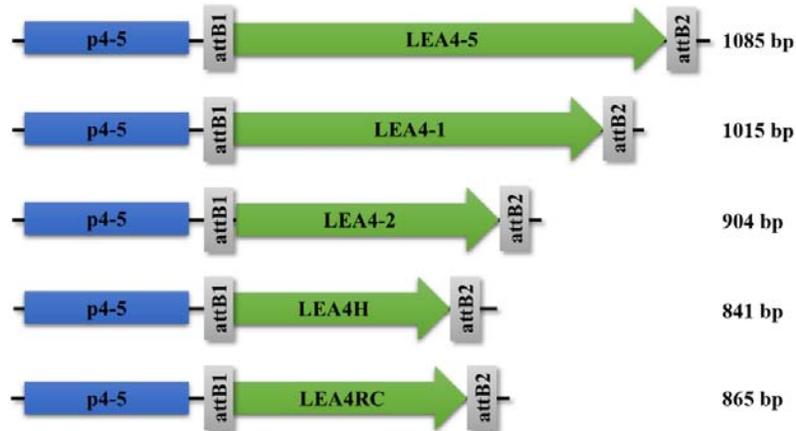


Figura 10 | Esquema representativo de los productos de amplificación de las diferentes construcciones utilizando los oligonucleótidos pK2GW7-F y pK2GW7-R. La diferencia en longitud debido a las longitudes de los diferentes ORFs se aprovechó para verificar las construcciones por PCR punto final.

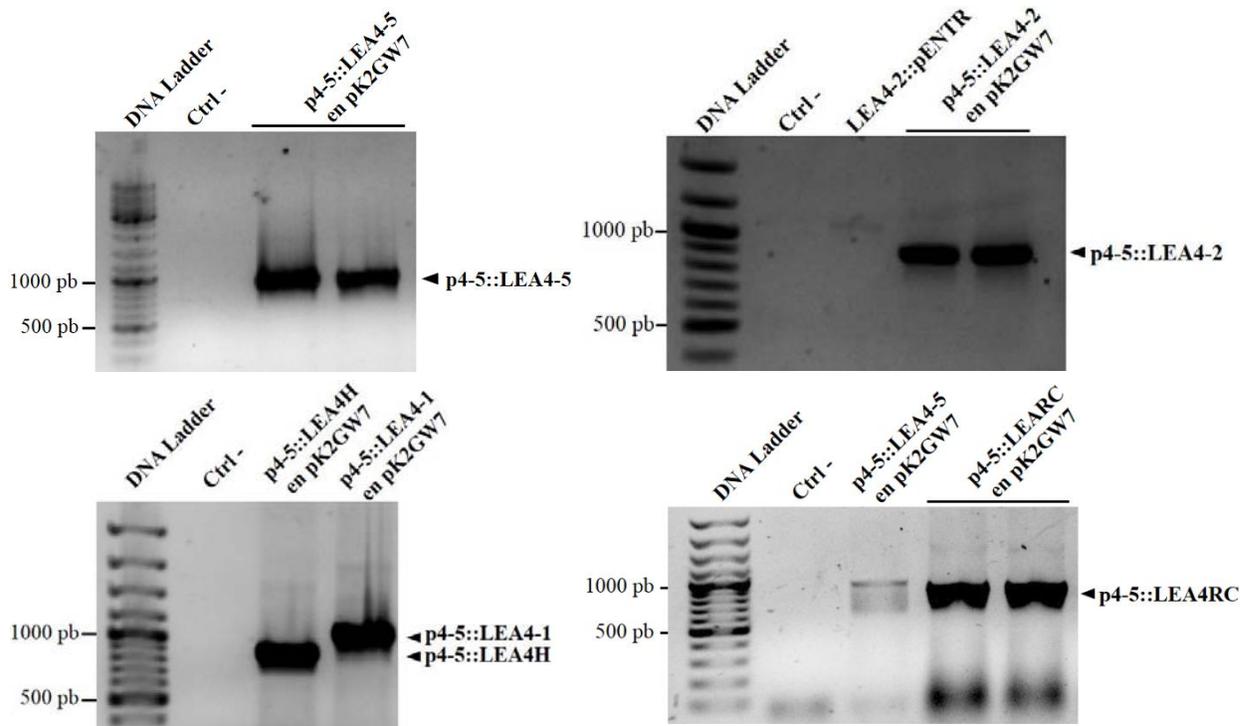


Figura 11 | Amplificación de las diferentes construcciones usando oligonucleótidos pK2GW7 *Forward* y *Reverse*. Para estimar el tamaño de las construcciones, se consideraron 389 pb del promotor, más 180 pb desde el sitio de alineamiento de los oligonucleótidos hacia las construcciones, más el ORF de los genes de interés (LEA4-5, 477 pb; LEA4-1, 401 pb; LEA4-2, 294 pb; LEA4H, 228 pb, LEA4RC, 252 pb). Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Una vez obtenidas y verificadas las construcciones mediante secuenciación, se procedió a transformar plantas mutantes *atlea4-5* mediante el método de inmersión floral (ver Materiales y métodos). Se obtuvieron semillas y se sometieron a selección en medio MS con kanamicina. Las plantas sobrevivientes se seleccionaron como sublíneas independientes y se obtuvieron semillas de ellas. Se verificó la segregación de cada una de las líneas y se seleccionaron aquellas que mostraron una segregación 3:1, lo que sugirió la presencia de un solo evento de inserción de T-DNA en el genoma de la planta, esto con el fin de evitar la caracterización de sublíneas con numerosas inserciones.

De las sublíneas que mostraban segregación 3:1 (12 sublíneas independientes homocigotas, tres con la construcción p4-5::LEA4-5 o p4-5::LEA4-2, cuatro con la construcción p4-5::LEA4-1 y p4-5::LEA4H) se tomaron 10 plántulas sobrevivientes al azar, se crecieron y se obtuvieron semillas de cada una de ellas. Se repitió el ensayo de segregación en medio MS con kanamicina para identificar las sublíneas que mostraran 100% de supervivencia, es decir, que fueran homocigotas para la inserción de T-DNA. Se planteó que las sublíneas que mostraron esta característica fueran utilizadas en los experimentos de análisis fenotípico durante germinación en condiciones de estrés, con el fin de que no existiera ruido producto de las diferencias en la sensibilidad a estrés en semillas heterocigotas para la construcción o sin ésta, el cual pudiera generar confusión en el análisis.

Verificación de la línea mutante *atlea4-5* mediante PCR y experimentos tipo Western-blot

Con el fin de verificar la interrupción del promotor del gen *AtLEA4-5* debida a la inserción del transposón dSpm en la línea mutantes denominada simplemente *atlea4-5*, se extrajo DNA genómico a partir de hojas de la roseta utilizando el protocolo de Chelex-100 (ver Materiales y métodos). Para amplificar el promotor p4-5, se utilizaron los oligonucleótidos Prom-LEA4-5-F y Prom-LEA4-5-R. Como control de la extracción de DNA, se amplificó el gen eIF4 a partir plantas adultas silvestres y mutantes. (Fig. 12). Se detectó que no hubo amplificación del promotor p4-5 debido a la presencia del transposón dSpm cuyo tamaño es de aproximadamente 2.5 kb, lo cual que evita la terminación de la PCR con 30 segundos en la fase de extensión.

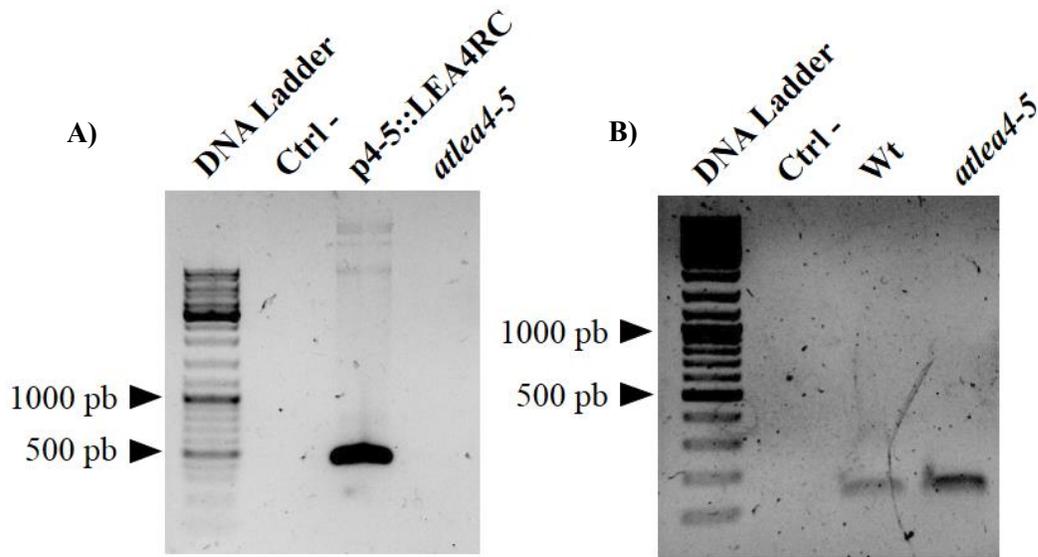


Figura 12 | Verificación de la línea mutante *atlea4-5* mediante PCR. A) Amplificación del promotor del gen *AtLEA4-5* a partir de DNA genómico. Como control positivo de la reacción se utilizó el plásmido p4-5::LEA4RC. B) Control de obtención de DNA genómico, amplificando el factor de iniciación eIF4.

Para verificar que la línea mutante no expresara la proteína LEA4-5, se realizó un experimento tipo Western-blot (ver Materiales y métodos), utilizando extracto de proteína total de semilla seca, en donde se ha determinado que la proteína LEA4-5 se acumula abundantemente (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). Los extractos se obtuvieron de semillas de tipo silvestre (Wt), de la línea *atlea4-5*, de la línea mutante denominada *atlea4-5/N4* (línea almacenada por Olvera-Carrillo durante su investigaciones) y de una línea sobre-expresora de la proteína AtLEA4-5 con fondo *atlea4-5*. También se incluyó extracto total de proteínas de las semillas de las líneas complementadas con la construcción control (p4-5::LEA4-5, línea G8) para verificar su funcionamiento.

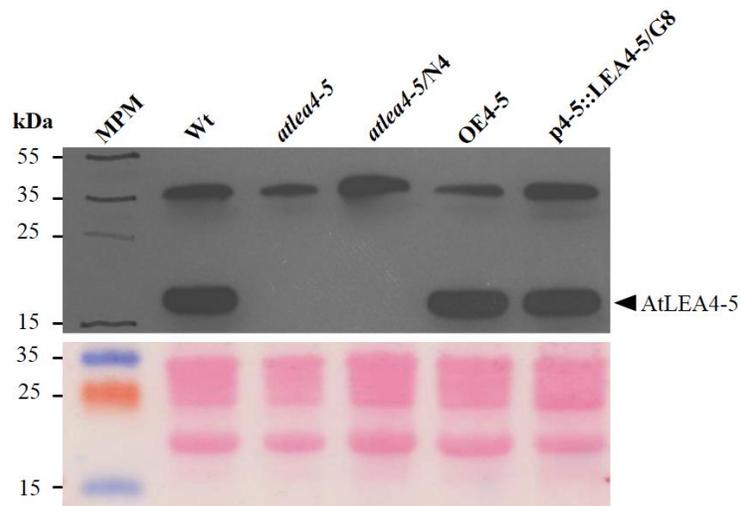


Figura 13 | Detección mediante un experimento tipo Western-blot de la proteína AtLEA4-5 en extractos de semillas de las líneas Wt, *atlea4-5*, *atlea4-5/N4*, OE4-5 y p4-5::LEA4-5/G8. La imagen inferior muestra la carga total de proteína en cada carril detectada con Rojo Ponceau. MPM: Marcador de Peso Molecular; kDa: kilodaltones.

Como se puede apreciar en la Fig. 13, las dos líneas mutantes, *atlea4-5* y *atlea4-5/N4*, no mostraron acumulación de la proteína LEA4-5, en tanto que las semillas silvestres (Wt) y sobre-expresoras mostraron la señal esperada a 16.1 kDa. De las semillas complementadas con la construcción control (p4-5::LEA4-5), sólo una de las cuatro líneas homocigotas obtenidas (p4-5::LEA4-5/G8) presentó acumulación de la proteína. Cabe mencionar que se detectó una banda con un peso molecular aproximado de 35 kDa incluso en los carriles con extracto de proteínas de las líneas mutantes, por lo que se infirió que se trataba de inespecificidad del anticuerpo anti-LEA4-5.

Evaluación del fenotipo durante germinación de la mutante *atlea4-5*

Antes de proceder a realizar los experimentos de germinación en las líneas homocigotas obtenidas, se repitieron los experimentos reportados por Olvera-Carrillo *et al.* (2010). Los resultados obtenidos mostraron que, tras numerosas repeticiones del mismo experimento, la línea mutante utilizada (*atlea4-5*) no presentaba el fenotipo esperado, es decir, un menor porcentaje de germinación final bajo condiciones de déficit hídrico. Las gráficas mostradas

en la Fig. 14 son representativas de los resultados obtenidos. El análisis estadístico de dichos datos se presenta en la Tabla 3.

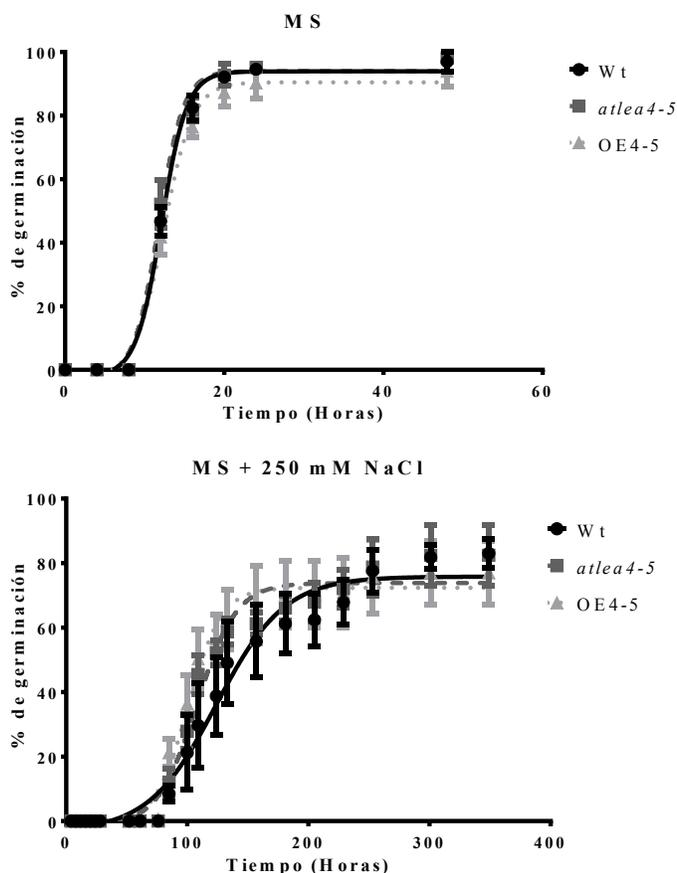


Figura 14 | Evaluación de la germinación de líneas Wt, *atlea4-5* y OE4-5 en medio MS y medio MS adicionado con 250 mM NaCl. No se observó un fenotipo evidente por parte de la línea *atlea4-5* utilizada para obtener transgénicas con las construcciones realizadas. n=300 semillas por línea, 3 réplicas de 100 semillas.

Tabla 3 | Evaluación estadística del porcentaje de germinación final y la pendiente al 50 % de germinación del experimento presentado en la figura 14.

Poblaciones confrontadas	Porcentaje de germinación final				Pendiente			
	MS		MS + 250 mM NaCl		MS		MS + 250 mM NaCl	
	Prueba F P-value	Prueba t P-value	Prueba F P-value	Prueba t P-value	Prueba F P-value	Prueba t P-value	Prueba F P-value	Prueba t P-value
Wt vs <i>atlea4-5</i>	0.1351	0.2276	0.0961	0.4502	0.4184	0.2558	0.2139	0.0613
Wt vs OE4-5	0.1982	0.1331	0.0816	0.1258	0.2683	0.1323	0.292	0.0019 *
<i>atlea4-5</i> vs OE4-5	0.0319 *	0.0601	0.4597	0.1999	0.3389	0.035 *	0.0958	0.1532

* Resultado estadísticamente significativo a un nivel de significancia del 95%.

Es importante señalar que los experimentos realizados se llevaron a cabo en un cuarto de crecimiento en el que las condiciones ambientales correspondientes a temperatura, humedad e intensidad luminosa fueron completamente diferentes a las utilizadas por Olvera-Carrillo *et al.* (2010), esto debido a la remodelación que se llevó a cabo de este espacio. Aunque la diferencia en las condiciones utilizado en los experimentos ya reportados pudieran ser la causante de no observar un fenotipo evidente por parte de las semillas *atlea4-5*, el hecho de haber sido plantas de esta línea mutante las utilizadas para producir las plantas transgénicas con las construcciones genéticas consideradas en esta estrategia, tiene como consecuencia que sea imposible discernir si existe o no complementación fenotípica.

Evaluación del fenotipo durante germinación de la mutante *atlea4-5/N4*

Las semillas de la línea *atlea4-5/N4* provienen de una caracterización fenotípica de un lote de semillas originalmente enviadas por NASC (# catalogo: N122943), el cual se caracterizó por tener la inserción del elemento dSpm a 208 pb río arriba del codón de inicio del gen *AtLEA4-5*. Dicha caracterización fue realizada por Olvera-Carrillo *et al.* (2010) donde, después de propagar y obtener sublíneas de las semillas enviadas por NASC, identificó que la sublínea *atlea4-5/N4* mostraba un fenotipo de sensibilidad a estrés hídrico más evidente.

Con la finalidad de evaluar si el resultado de los experimentos de germinación en condiciones de estrés hídrico se debió a una posible supresión de la mutación o a variaciones en las condiciones de crecimiento, primeramente se tomaron semillas de líneas N122943, *atlea4-5/N4* y Wt, se esterilizaron y se sembraron en medio MS. Después de ser estratificadas, se crecieron por dos semanas, lapso después del cual se transfirieron a medio térreo hasta la producción de semillas, las cuales, una vez colectadas, se secaron una semana en un desecador con silicato. Estas semillas se utilizaron para realizar nuevamente los experimentos de germinación (ver Materiales y métodos). Sorprendentemente, los resultados mostraron que las semillas propagadas a partir del lote de NASC no presentaron el fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante germinación, mientras que las semillas propagadas a partir de semillas *atlea4-5/N4* sí mostraron tal sensibilidad (Fig. 15 y Tabla 4)

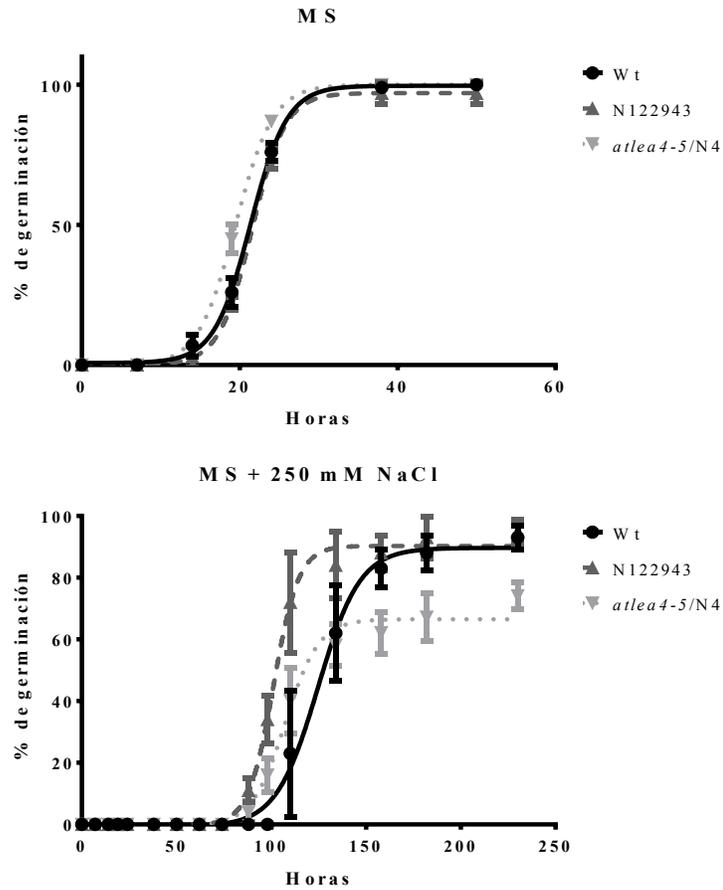


Figura 15 | Evaluación de la germinación de líneas Wt, N122943 y *atlea4-5/N4* en medio MS y medio MS adicionado con 250 mM de NaCl. La semillas *atlea4-5/N4* utilizadas por Olvera-Carrillo *et al.* (2010) mostraron un fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante germinación.

Tabla 4 | Evaluación estadística del porcentaje de germinación final y la pendiente al 50 % de germinación del experimento presentado en la figura 15.

Poblaciones confrontadas	Germinación Final				Pendiente			
	MS		MS + 250 mM NaCl		MS		MS + 250 mM NaCl	
	Prueba F P-value	Prueba t P-value						
Wt vs N122943	0 * §	0.1075	0.5	0.244	0.2354	0.1031	0.0002 *	0.2465
Wt vs <i>atlea4-5/N4</i>	1 §	1 §	0.4161	0.0003 *	0.3747	0.4639	0.1475	0.2398
N122943 vs <i>atlea4-5/N4</i>	0 * §	0.1075	0.4161	0.0001*	0.1537	0.1026	0.0018 *	0.22

* Resultado estadísticamente significativo a un nivel de significancia del 95%.

§ Valor estadístico debido a que los valores de las réplicas (n=3) fueron exactamente iguales.

Para verificar que la proteína LEA4-5 no se acumulara en semillas de las líneas N122943 y *atlea4-5/N4*, se realizó un experimento tipo Western-blot utilizando extracto total de proteínas de semilla y el anticuerpo anti-LEA4-5, tomando como controles positivos los extractos de semillas Wt y sobre-expresoras de la proteína LEA4-5 (OE4-5). Se observó que las líneas mutantes N122943 y *atlea4-5/N4* no acumulan la proteína AtLEA4-5 mientras que los controles sí acumulan la proteína (Fig. 16).

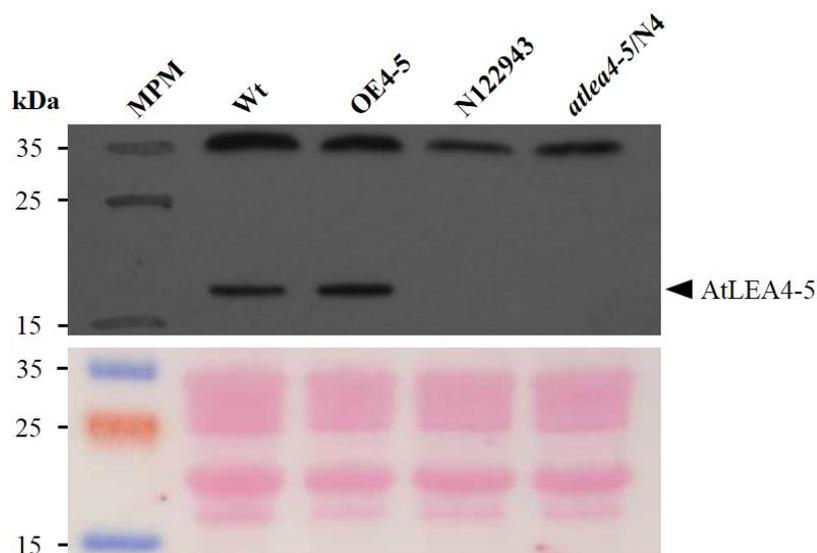


Figura 16 | Detección mediante experimento tipo Western-blot de la proteína AtLEA4-5 en extracto total de proteínas de semillas de las líneas Wt, OE4-5, N122943 y *atlea/N4*. El panel inferior muestra la carga total de proteína detectada con Rojo Ponceau. MPM: Marcador de Peso Molecular; kDa: kilodaltones.

Posteriormente, el experimento de germinación se repitió utilizando 300 mM de NaCl, con el fin de exacerbar el fenotipo. Las semillas *atlea4-5/N4* mostraron claramente un fenotipo de sensibilidad a la salinidad durante la germinación (Fig. 17), de acuerdo a lo reportado por Olvera-Carrillo *et al.* (2010). El análisis estadístico respectivo se presenta en la Tabla 5.

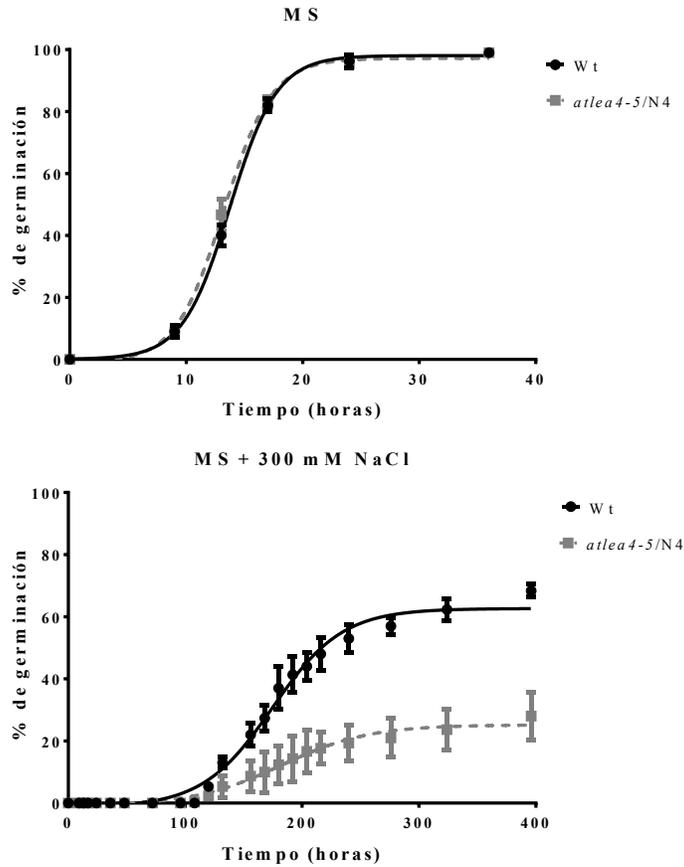


Figura 17 | Evaluación de la germinación de líneas (Wt) y *atlea4-5/N4* en MS y MS adicionado con 300 mM de NaCl. Al igual que en la figura anterior, se observó un fenotipo de sensibilidad al estrés salino en el caso de las semillas *atlea4-5/N4*.

Tabla 5 | Evaluación estadística del porcentaje de germinación final y la pendiente al 50 % de germinación del experimento presentado en la figura 17.

Población confrontada	Germinación Final				Pendiente			
	MS		MS + 300 mM NaCl		MS		MS + 300 mM NaCl	
	Prueba F	Prueba t	Prueba F	Prueba t	Prueba F	Prueba t	Prueba F	Prueba t
	P-value	P-value	P-value	P-value	P-value	P-value	P-value	P-value
Wt vs <i>atlea4-5/N4</i>	0 *	0.5	0.0663	0.0004 *	0.259	0.4105	0.1248	0.1906

* Resultado estadísticamente significativo a un nivel de significancia del 95%.

Por lo tanto, estas semillas que mostraron el fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante germinación se utilizaron para obtener plantas, las cuales se transformaron mediante inmersión floral con las construcciones genéticas producidas. Actualmente, se está en espera de obtener líneas homocigotas para realizar el análisis fenotípico correspondiente.

DISCUSIÓN

Sobre la redundancia funcional entre las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana*

El concepto de redundancia originada por la duplicación de genes, la forma más común por la que puede surgir la redundancia genética, implica un fenómeno donde uno de los pares redundantes puede ser objeto de mutaciones que muy probablemente modificarían su función, sin que esto provoque un fenotipo evidente sobre el cual pudiera actuar la selección natural. Lo anterior, provocaría que el miembro del par de genes redundantes sujeto a la mayor cantidad de mutaciones fuera evolutivamente inestable y que sería seleccionado para su eliminación de la población. A pesar de esto, la preservación evolutiva de los elementos redundantes en lugar de su eliminación parece ser más la regla que la excepción. La redundancia parece ser un fenómeno bastante común, aunque su ventaja evolutiva no sea evidente (Thomas, 1993). Como bien concluye Bouche y Bouchez (2001), el concepto de redundancia esconde una diversidad evolutiva y fisiológica que necesita analizarse caso por caso y con estrategias experimentales apropiadas. Brookfield (1997) acertadamente señala también que el problema de los estudios en torno a redundancia podría deberse, en parte, a nuestra falta de habilidad o modelos para medir el nivel adaptativo (*fitness*) de la especie en estudio.

En el caso particular del presente trabajo, el estudio de la redundancia funcional *in vivo* de las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* se enfocó en proponer algún significado biológico al hecho de que entre las tres proteínas que componen al grupo 4 existe un porcentaje de similitud significativo, de 40.5% hasta 66.7% (Olvera-Carrillo, 2010). A este hecho habría que adicionar la elevada conservación de dominios que existe en la región amino terminal (75 aminoácidos) de estas proteínas, por lo que se sugiere que existe una redundancia funcional entre los tres miembros de esta familia. Dado que las proteínas LEA consideradas típicas muestran propiedades fisicoquímicas comunes, como son su elevada hidrofiliidad y su tendencia a presentar estructuras desordenadas en solución acuosa, sugerimos que existe redundancia funcional incluso entre grupos, los cuales no presentan una similitud significativa entre sus miembros a nivel de estructura primaria.

En este proyecto, se decidió analizar si entre las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* existe redundancia funcional mediante el estudio del fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante germinación, debido a que mutantes en uno, dos o los tres genes que la componen mostraron previamente dicho fenotipo. Esta observación sugiere *a priori* que si las tres proteínas de esta familia realizan funciones similares entonces la aparición de un fenotipo de sensibilidad podría deberse a que se están expresando diferencialmente en el tiempo y en el espacio. En el caso de revertir el fenotipo mutante al expresar una proteína del mismo grupo bajo el promotor del gen mutado, indicaría que sí existe redundancia funcional entre las proteínas.

Sobre el análisis de promotores de los genes LEA del grupo 4 de *A. thaliana*

La hipótesis de la redundancia funcional entre proteínas LEA del grupo 4 se apoya por el resultado que arrojó el análisis de los promotores de los genes en cuestión (Tabla 2; Fig. 10; Anexo III), el cual muestra que los promotores de cada uno de los genes presentan diferentes elementos de regulación en *cis*, lo que sugiere que cada una de estas proteínas podría expresarse en diferentes tejidos, ante diferentes circunstancias ambientales o durante diferentes etapas del desarrollo. Es importante señalar que el análisis *in silico* es especulativo y la relevancia de los elementos en *cis* particulares en el promotor de los genes evaluados en relación con la expresión de los mismos debe ser confirmada experimentalmente.

Así, cabe hacer notar que: 1) los elementos en *cis* dentro de las categorías *ABA RELATED* y *MYB/C RELATED* parecen estar relacionados, ya que se observó que dichos elementos se encuentran cercanos entre sí, y principalmente están presentes antes del 5'-UTR de los genes en cuestión; 2) los elementos *ABA RELATED* muestran la mayor abundancia en el promotor p4-1 (13 elementos) y la menor abundancia en el promotor p4-2 (4 elementos). Los genes dirigidos por estos promotores no muestran una diferencia en la acumulación de su producto proteico al momento de tratar plántulas con ABA (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010), caso que contrasta con el promotor p4-5 que, con 8 de estos elementos, muestra una fuerte inducción por ABA; 3) la presencia de los elementos en *cis* de diversas clases dentro de las categorías *TISSUE SPECIFICITY* es distinta en cada promotor; 4) el elemento *GTIGMSCAM4*, aunque está presente en los promotores de los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, no se encuentra presente

en la región promotora del gen *AtLEA4-5*. La acumulación de transcrito y proteína de dicho gen cuando se somete a plántulas de 2 semanas a tratamientos con 200 mM de NaCl (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010) puede deberse a que el NaCl activa la cascada de señalización por ABA y provoca la inducción de la transcripción del gen *AtLEA4-5*, por lo que la presencia del elemento *GTIGMSCAM4* no es absolutamente necesaria para que se regule la expresión del gen en cuestión en condiciones de estrés salino.

Por lo anterior, la diferencia en los elementos en *cis* presentes en los promotores podría explicar la presencia de un fenotipo mutante durante germinación en condiciones de estrés salino, a pesar de que pudieran tener redundancia funcional. Esto puede deberse a diferencias probables en patrones de expresión espacio-temporales, inferidos por los elementos probables en *cis* de cada promotor. Aún con esta información, sin los análisis experimentales correspondientes es imposible determinar si la presencia o ausencia de cada elemento en *cis* influirá en la expresión del gen de interés.

El promotor p4-5, de 389 bp, utilizado en este trabajo para elaborar las construcciones genéticas es lo suficientemente grande para promover la expresión de la proteína en semillas, debido a que en líneas *atlea4-5* transformadas con la construcción control p4-5::*LEA4-5* se puede reestablecer la expresión de la proteína *AtLEA4-5* (Fig. 13), aunque esto aconteció en una de cuatro líneas independientes. Esto sugiere, por un lado, que sería necesario analizar numerosas líneas genéticas para poder identificar aquellas que tienen alta expresión del trasgen y, por otro lado, que quizá existan más elementos necesarios para la correcta regulación del promotor p4-5.

Sobre la germinación y compensación del fenotipo mutante

Antes de proceder a realizar los experimentos de germinación con las líneas transgénicas homocigotas obtenidas, se realizaron experimentos control de germinación con semillas de líneas silvestres y *atlea4-5*. Sin embargo, después de varias repeticiones y modificaciones de las condiciones del experimento, nunca se logró obtener el fenotipo de sensibilidad por parte de las líneas mutantes reportado por Olvera-Carrillo *et al.* (2010) (Fig. 14).

Debido a lo anterior, y a que las construcciones genéticas se transfectoron a plantas con el fondo mutante *atlea4-5*, la cual resultó ser una línea que no mostró fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante germinación, fue imposible proceder a analizar las líneas transgénicas obtenidas debido al enmascaramiento del fenotipo de sensibilidad durante la germinación en condiciones de estrés salino que mostró la línea *atlea4-5*.

Después del análisis de germinación de las líneas N122943 y *atlea4-5/N4* almacenadas en frío por Olvera-Carrillo *et al.* (2010), pudimos reproducir el fenotipo de sensibilidad a condiciones de estrés salino durante germinación, en comparación con la línea tipo silvestre (Fig. 15 y 17). Por lo tanto, se generaron nuevamente plantas transgénicas con las construcciones de interés utilizando esta vez la línea *atlea4-5/N4* que mostró tener el fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante germinación. Con este material se espera poder obtener y analizar líneas homocigotas con el fin de dar respuesta al objetivo principal de la presente tesis.

En general la manipulación genética, como la ejercida en el presente trabajo, ha posibilitado la expresión dirigida de genes relacionados con sequía *in vivo*. Este tipo de estrategias ha permitido evaluar la función o tolerancia a estrés que confieren diversas proteínas en esta etapa del desarrollo (Ingram y Bartels, 1996). Aun así, ha sido difícil distinguir los componentes moleculares que se consideran importantes, si bien no indispensables, para la germinación de los que no lo son. Aunque se conoce de manera general los procesos moleculares y fisiológicos que ocurren durante la germinación, aún no es claro de manera específica lo que ocurre durante ella (Nonogaki *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos de los análisis de germinación, tomando como parámetros de interés la pendiente de la curva de germinación y el porcentaje de germinación final, mostraron que las semillas de la línea *atlea4-5* no muestran el fenotipo de sensibilidad a condiciones de estrés salino como fue previamente reportado por Olvera-Carrillo *et al.* (2010) (Tabla 3, Fig. 14), mientras que las semillas de la línea *atlea4-5/N4*, proveniente de las semillas originalmente utilizadas en dicho estudio, sí lo muestran (Tablas 4 y 5; Figs. 15 y 17). Esta discrepancia podría deberse a dos factores: 1) las semillas podrían estar mostrando una

diferencia fenotípica producto de las diferencias en las condiciones de crecimiento utilizadas en los experimentos originales y en los realizados durante esta tesis, o 2) las semillas podrían estar llevando a cabo un evento de compensación, es decir, que de alguna forma se está compensando molecularmente la falta de la proteína AtLEA4-5. Dicha compensación es entendida como una forma de “acomodamiento genético” donde fenotipos ancestrales (el fenotipo silvestre en este caso) se restauran en la presencia de algún estímulo ambiental (Grether, 2005). La compensación puede ser debida, por ejemplo, a la inducción de la expresión en la mutante de genes parálogos, donde la función de uno es compensada por su copia, o bien mediante la alteración de rutas metabólicas o regulatorias (Gu *et al.*, 2003).

El enfoque *in vivo* que se utilizó para analizar la redundancia funcional de estas proteínas es importante para comprender mejor el funcionamiento de las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* en un contexto más real, es decir, en el ambiente celular durante germinación. Además, permite arrojar cierta información respecto al funcionamiento estas proteínas y permite otorgarle más o menos importancia al desorden estructural de las proteínas LEA con respecto a la función que desempeñan, aunque en el presente trabajo no logró esclarecerse.

En general, los experimentos de germinación han permitido determinar que existen muchas variables que pueden afectar los resultados obtenidos. Por ejemplo, se ha visto que la época del año en que son colectadas las semillas es importante debido a variaciones en el grado de dormancia que muestran las semillas. Esto último es causado por factores ambientales como calidad de luz durante la maduración de la semilla, el fotoperíodo al que se encuentre sujeta la planta madre, la temperatura ambiental o la disponibilidad de nutrientes, como nitratos (Derckx y Karssen, 1993). La dificultad de controlar todo este tipo de variables, si bien no obstaculiza, al menos ralentiza los estudios en relación con la germinación y la dormancia. Aunque los experimentos realizados en la presente tesis se llevaron a cabo en condiciones controladas, no es posible tener la certeza de que alguna variable no controlada pudo ser suficiente para afectar el fenotipo analizado.

Los diversos factores ambientales pudieran incluso tener un efecto sobre la planta madre que, de alguna manera, afectaría los fenotipo de las semillas producidas por dicha planta. He *et*

al. (2014) señalan que el factor ambiental más importante que determina el desempeño final de las semillas es la temperatura ambiental a la cual está sometida la planta madre durante la embriogénesis. Encontraron, por ejemplo, que cuando la planta madre se expone a altas temperaturas y luz intensa, la dormancia de la semilla disminuye pero su longevidad aumenta. De esta manera, concluyeron que la germinación está más controlada por las señales ambientales que reciba la planta madre que por la dormancia *per se* de la semilla. Es interesante resaltar esto debido a que las plantas utilizadas durante esta tesis se crecieron en un cuarto con condiciones ambientales óptimas para el cumplimiento del ciclo de vida de la planta. Sin embargo, no se permitió que las plantas terminaran la producción de semillas en dicho cuarto, por lo que fueron trasladadas a zonas de laboratorio donde las condiciones ambientales, evidentemente, no son óptimas.

Otros efectos maternos que influyen en la germinación de las semillas reportados por Donohue (2009) incluyen: 1) herencia de plástidos; 2) el endospermo, cuyo origen es 2/3 materno debido a su naturaleza triploide; 3) la testa, que es un tejido netamente materno que impone una limitación mecánica a la germinación, además de regular la permeabilidad de H₂O, O₂ y luz, y de evitar que compuestos inhibitorios sean removidos por lixiviación (Jones *et al.*, 2012); 4) el aprovisionamiento de reservas a la semilla durante la embriogénesis; 5) la densidad de cultivo de plantas madre; 6) la frecuencia de riego; 7) la temperatura ambiental; 8) el fotoperiodo; y muchos otros factores aún no identificados.

Son diversos los factores ambientales que afectan directa o indirectamente la respuesta germinativa final y que, por extensión, pueden afectar la reproducibilidad en los resultados de experimentos de germinación aún en condiciones controladas. Es Brookfield (1997) quien hace una anotación interesante, señalando que uno de los componentes del problema de medir la eficiencia biológica de una especie en estudios de redundancia es precisamente la duplicación de las condiciones experimentales, ya que se pueden encontrar plantas mutantes que muestran la misma eficiencia biológica de las plantas tipo silvestre en ambientes donde la función que han perdido los individuos mutantes no se requiera.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El análisis *in silico* realizado a los promotores de los tres genes que codifican para las tres proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* permitió identificar que la cantidad de elementos en *cis* de diferentes grupos presentes en estos promotores es variable. El promotor p4-1 mostró varios elementos relacionados con ABA (13), MYB/C (16), HSP (5) y luz (20), mientras que p4-2 mostró más elementos relacionados con expresión tisular específica (86), deshidratación (10), giberelinas (2), baja temperatura (2) y cajas GATA (9). El promotor p4-5 mostró menos elementos debido a su menor tamaño. Estas variaciones en abundancia de distintos elementos en *cis* sugieren posibles diferencias en los patrones de expresión y acumulación de las proteínas LEA del grupo 4.

Por otro lado, no se logró evidenciar el fenotipo de sensibilidad a estrés hídrico durante germinación encontrado en los experimentos reportados por Olvera-Carrillo *et al.* (2010) por parte de plantas mutantes *atlea4-5*, aún y cuando estas líneas no mostraron acumulación de la proteína AtLEA4-5 en semilla. Sin embargo, el fenotipo de sensibilidad a estrés salino durante germinación sí se observó en semillas de la línea *atlea4-5/N4*, línea mutante almacenada por Olvera-Carrillo durante su investigación.

Debido a lo anterior, se descartaron las plantas *atlea4-5* transformadas con las construcciones genéticas elaboradas y se transformaron plantas *atlea4-5/N4* con las construcciones genéticas producidas. Se espera producir líneas transgénicas homocigotas a partir de la transformación de plantas *atlea4-5/N4*, línea que muestra el fenotipo de sensibilidad durante germinación en estrés salino, con las construcciones elaboradas, con el fin de determinar si las proteínas LEA del grupo 4 de *A. thaliana* son redundantes funcionalmente.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, I. M.; Nadira, U. A.; Bibi, N.; Zhang, G. y Wu, F. (2015). "Tolerance to Combined Stress of Drought and Salinity in Barley". Combined Stresses in Plants. *Mahalingam, R. Springer International Publishing*: 93-121. DOI: 10.1007/978-3-319-07899-1_5.
- Aida, M.; Beis, D.; Heidstra, R.; Willemsen, V.; Blilou, I.; Galinha, C.; Nussaume, L.; Noh, Y.-S.; Amasino, R. y Scheres, B. (2004). "The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche". *Cell* **119**(1): 109-120. DOI: j.cell.2004.09.018.
- Ali-Benali, M. A.; Alary, R.; Joudrier, P. y Gautier, M. F. (2005). "Comparative expression of five Lea Genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR". *Biochim Biophys Acta* **1730**(1): 56-65. DOI: 10.1016/j.bbaexp.2005.05.011.
- Augé, R. M. (2001). "Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis". *Mycorrhiza* **11**(1): 3-42. DOI: 10.1007/s005720100097.
- Baker, J.; Van Dennsteele, C. y Dure, L., 3rd (1988). "Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton". *Plant Mol Biol* **11**(3): 277-291. DOI: 10.1007/bf00027385.
- Battaglia, M.; Olvera-Carrillo, Y.; Garcarrubio, A.; Campos, F. y Covarrubias, A. A. (2008). "The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins". *Plant Physiol* **148**(1): 6-24. DOI: 10.1104/pp.108.120725.
- Bernard, P. y Couturier, M. (1992). "Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes". *J Mol Biol* **226**(3): 735-745.
- Bewley, J. D. (1997). "Seed Germination and Dormancy". *The Plant Cell Online* **9**(7): 1055-1066. DOI: 10.1105/tpc.9.7.1055.
- Bewley, J. D. y Black, M. (1994). "Seeds: Physiology of Development and Germination". *Springer*. ISBN: 9780306447471.
- Bies-Etheve, N.; Gaubier-Comella, P.; Debures, A.; Lasserre, E.; Jobet, E.; Raynal, M.; Cooke, R. y Delseny, M. (2008). "Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in Arabidopsis thaliana". *Plant Mol Biol* **67**(1-2): 107-124. DOI: 10.1007/s11103-008-9304-x.
- Bimboim, H. C. y Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Research* **7**(6): 1513-1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
- Blum, A. (2011). "Plant Water Relations, Plant Stress and Plant Production". *Plant Breeding for Water-Limited Environments. Springer New York*: 11-52. DOI: 10.1007/978-1-4419-7491-4.
- Bouche, N. y Bouchez, D. (2001). "Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted". *Curr Opin Plant Biol* **4**(2): 111-117. DOI: 10.1016/S1369-5266(00)00145-X.
- Boyer, J. S. (1982). "Plant productivity and environment". *Science* **218**(4571): 443-448. DOI: 10.1126/science.218.4571.443.
- Bravo, L. A.; Gallardo, J.; Navarrete, A.; Olave, N.; Martínez, J.; Alberdi, M.; Close, T. J. y Corcuera, L. J. (2003). "Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley". *Physiologia Plantarum* **118**(2): 262-269. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00060.x.
- Bray, E. A. (1993). "Molecular Responses to Water Deficit". *Plant Physiology* **103**(4): 1035-1040. DOI: 10.1104/pp.103.4.1035.

- Bray, E. A. (1997). "Plant responses to water deficit". *Trends in Plant Science* **2**(2): 48-54. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)82562-9.
- Brookfield, J. F. (1997). "Genetic redundancy: screening for selection in yeast". *Curr Biol* **7**(6): R366-368. DOI: 10.1016/S0960-9822(06)00176-X.
- Buchanan, B. B. y Jones, R. L. (2007). "Biochemistry and Molecular Biology of Plants". *I.K. International Publishing House Pvt. Limited*. ISBN: 9788188237111.
- Campalans, A.; Messeguer, R.; Goday, A. y Pagès, M. (1999). "Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins". *Plant Physiology and Biochemistry* **37**(5): 327-340. DOI: 10.1016/S0981-9428(99)80039-4.
- Campbell, M. y Farrell, S. (2007). "Biochemistry". *Cengage Learning*. ISBN: 9780495390411.
- Campos, F.; Cuevas-Velazquez, C.; Fares, M. A.; Reyes, J. L. y Covarrubias, A. A. (2013). "Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archaee and bacteria domains". *Mol Genet Genomics* **288**(10): 503-517. DOI: 10.1007/s00438-013-0768-2.
- Claeys, H.; Van Landeghem, S.; Dubois, M.; Maleux, K. y Inze, D. (2014). "What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used in Vitro Stress Assays". *Plant Physiol* **165**(2): 519-527. DOI: 10.1104/pp.113.234641.
- Cohen, A.; Plant, A. L.; Moses, M. S. y Bray, E. A. (1991). "Organ-Specific and Environmentally Regulated Expression of Two Abscisic Acid-Induced Genes of Tomato : Nucleotide Sequence and Analysis of the Corresponding cDNAs". *Plant Physiol* **97**(4): 1367-1374.
- Colmenero-Flores, J. M.; Moreno, L. P.; Smith, C. E. y Covarrubias, A. A. (1999). "Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings". *Plant Physiol* **120**(1): 93-104. DOI: 10.1104/pp.120.1.93.
- Cuevas-Velazquez, C. L.; Rendón-Luna, D. F. y Covarrubias, A. A. (2014). "Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins". *Frontiers in Plant Science* **5**: 583. DOI: 10.3389/fpls.2014.00583.
- Cumming, A. C. (1999). "LEA proteins". Seed proteins. *Shewry, P. y Casey, R.* Boston. *Kluwer Academic Publishers*: 753-780.
- Chakrabortee, S.; Tripathi, R.; Watson, M.; Schierle, G. S.; Kurniawan, D. P.; Kaminski, C. F.; Wise, M. J. y Tunnacliffe, A. (2012). "Intrinsically disordered proteins as molecular shields". *Mol Biosyst* **8**(1): 210-219. DOI: 10.1039/c1mb05263b.
- Cheng, Z.; Targolli, J.; Huang, X. y Wu, R. (2002). "Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.)". *Molecular Breeding* **10**(1-2): 71-82. DOI: 10.1023/A:1020329401191.
- Derx, M. P. M. y Karssen, C. M. (1993). "Variability in light-, gibberellin- and nitrate requirement of *Arabidopsis thaliana* seeds due to harvest time and conditions of dry storage". *Journal of Plant Physiology* **141**(5): 574-582. DOI: 10.1016/s0176-1617(11)80459-1.
- Donohue, K. (2009). "Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1520): 1059-1074. DOI: 10.1098/rstb.2008.0291.
- Dracup, J. A. (1991). "Drought monitoring". *Stochastic Hydrology and Hydraulics* **5**(4): 261-266. DOI: 10.1007/BF01543134.

- Dracup, J. A.; Lee, K. S. y Paulson, E. G. (1980). "On the definition of droughts". *Water Resources Research* **16**(2): 297-302. DOI: 10.1029/WR016i002p00297.
- Drira, M.; Saibi, W.; Brini, F.; Gargouri, A.; Masmoudi, K. y Hanin, M. (2013). "The K-segments of the wheat dehydrin DHN-5 are essential for the protection of lactate dehydrogenase and beta-glucosidase activities in vitro". *Mol Biotechnol* **54**(2): 643-650. DOI: 10.1007/s12033-012-9606-8.
- Dunker, A.; Garner, E.; Guilliot, S.; Romero, P.; Albrecht, K.; Hart, J.; Obradovic, Z.; Kissinger, C. y Villafranca, J. (1998). "Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations". *Pac Symp Biocomput.*
- Dunker, A. K.; Babu, M. M.; Barbar, E.; Blackledge, M.; Bondos, S. E.; Dosztányi, Z.; Dyson, H. J.; Forman-Kay, J.; Fuxreiter, M.; Gsponer, J.; Han, K.-H.; Jones, D. T.; Longhi, S.; Metallo, S. J.; Nishikawa, K.; Nussinov, R.; Obradovic, Z.; Pappu, R. V.; Rost, B.; Selenko, P.; Subramaniam, V.; Sussman, J. L.; Tompa, P. y Uversky, V. N. (2013). "What's in a name? Why these proteins are intrinsically disordered". *Intrinsically Disordered Proteins* **1**(1): e24157. DOI: 10.4161/idp.24157.
- Dunker, A. K.; Obradovic, Z.; Romero, P.; Garner, E. C. y Brown, C. J. (2000). "Intrinsic protein disorder in complete genomes". *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **11**: 161-171. DOI: 10.11234/gi1990.11.161.
- Dunker, A. K.; Silman, I.; Uversky, V. N. y Sussman, J. L. (2008). "Function and structure of inherently disordered proteins". *Curr Opin Struct Biol* **18**(6): 756-764. DOI: 10.1016/j.sbi.2008.10.002.
- Dure, L., 3rd (1993). "A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation". *Plant J* **3**(3): 363-369.
- Dure, L., 3rd; Greenway, S. C. y Galau, G. A. (1981). "Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis". *Biochemistry* **20**(14): 4162-4168. DOI: 10.1021/bi00517a033.
- Dure, L. y Chlan, C. (1981). "Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination : XII. PURIFICATION AND PROPERTIES OF PRINCIPAL STORAGE PROTEINS". *Plant Physiol* **68**(1): 180-186. DOI: 10.1104/pp.68.1.180.
- Dure, L. y Galau, G. A. (1981). "Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination : XIII. REGULATION OF BIOSYNTHESIS OF PRINCIPAL STORAGE PROTEINS". *Plant Physiol* **68**(1): 187-194. DOI: 10.1104/pp.68.1.187.
- Dure, L., III; Crouch, M.; Harada, J.; Ho, T.-H.; Mundy, J.; Quatrano, R.; Thomas, T. y Sung, Z. R. (1989). "Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants". *Plant Molecular Biology* **12**(5): 475-486. DOI: 10.1007/BF00036962.
- Ellis, R. J. (2005). "From chloroplasts to chaperones: how one thing led to another". Discoveries in Photosynthesis. *Springer*: 745-755. DOI: 10.1023/B:PRES.0000030439.62331.d0.
- Ferrandiz, C.; Gu, Q.; Martienssen, R. y Yanofsky, M. F. (2000). "Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER". *Development* **127**(4): 725-734.
- Figueras, M.; Pujal, J.; Saleh, A.; Save, R.; Pages, M. y Goday, A. (2004). "Maize Rab17 overexpression in Arabidopsis plants promotes osmotic stress tolerance". *Annals of Applied Biology* **144**(3): 251-257. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2004.tb00341.x.
- Fosket, D. E. (1994). "Plant growth and development: a molecular approach". *Academic Press Inc.* ISBN: 0122624300.

- Gal, T. Z.; Glazer, I. y Koltai, H. (2004). "An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress". *FEBS Lett* **577**(1-2): 21-26. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.09.049.
- Galau, G. A.; Hughes, D. W. y Dure, L., 3rd (1986). "Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs". *Plant Mol Biol* **7**(3): 155-170. DOI: 10.1007/bf00021327.
- Garay-Arroyo, A.; Colmenero-Flores, J. M.; Garcarrubio, A. y Covarrubias, A. A. (2000). "Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit". *J Biol Chem* **275**(8): 5668-5674. DOI: 10.1074/jbc.275.8.5668.
- Gaspar, T.; Franck, T.; Bisbis, B.; Kevers, C.; Jouve, L.; Hausman, J. F. y Dommes, J. (2002). "Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures". *Plant Growth Regulation* **37**(3): 263-285. DOI: 10.1023/A:1020835304842.
- Girma, F. S. y Krieg, D. R. (1992). "Osmotic Adjustment in Sorghum: I. Mechanisms of Diurnal Osmotic Potential Changes". *Plant Physiology* **99**(2): 577-582. DOI: 10.1104/pp.99.2.577.
- Gong, W.; Yue, M.; Xie, B.; Wan, F. y Guo, J. (2009). "Inhibition of Citrate Synthase Thermal Aggregation In Vitro by Recombinant Small Heat Shock Proteins". *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**(12): 1628-1634. DOI: 10.4014/jmb.0901.0046.
- Goyal, K.; Tisi, L.; Basran, A.; Browne, J.; Burnell, A.; Zurdo, J. y Tunnacliffe, A. (2003). "Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein". *J Biol Chem* **278**(15): 12977-12984. DOI: 10.1074/jbc.M212007200.
- Goyal, K.; Walton, L. J. y Tunnacliffe, A. (2005). "LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress". *Biochem. J.* **388**(1): 151-157. DOI: 10.1042/bj20041931.
- Grelet, J.; Benamar, A.; Teyssier, E.; Avelange-Macherel, M.-H.; Grunwald, D. y Macherel, D. (2005). "Identification in Pea Seed Mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant Protein Able to Protect Enzymes from Drying". *Plant Physiology* **137**(1): 157-167. DOI: 10.1104/pp.104.052480.
- Grether, G. F. (2005). "Environmental Change, Phenotypic Plasticity, and Genetic Compensation". *The American Naturalist* **166**(4): E115-E123. DOI: 10.1086/432023.
- Gu, Z.; Steinmetz, L. M.; Gu, X.; Scharfe, C.; Davis, R. W. y Li, W.-H. (2003). "Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations". *Nature* **421**(6918): 63-66. DOI: 10.1038/nature01198.
- Hand, S. C.; Jones, D.; Menze, M. A. y Witt, T. L. (2007). "Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod". *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **307**(1): 62-66. DOI: 10.1002/jez.a.343.
- Hansen, J. C.; Lu, X.; Ross, E. D. y Woody, R. W. (2006). "Intrinsic protein disorder, amino acid composition, and histone terminal domains". *J Biol Chem* **281**(4): 1853-1856. DOI: 10.1074/jbc.R500022200.
- Hara, M.; Fujinaga, M. y Kuboi, T. (2004). "Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin". *Plant Physiol Biochem* **42**(7-8): 657-662. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.06.004.
- Hara, M.; Fujinaga, M. y Kuboi, T. (2005). "Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains". *J Exp Bot* **56**(420): 2695-2703. DOI: 10.1093/jxb/eri262.
- Hara, M.; Terashima, S. y Kuboi, T. (2001). "Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from Citrus unshiu". *Journal of Plant Physiology* **158**(10): 1333-1339. DOI: 10.1078/0176-1617-00600.

- He, H.; de Souza Vidigal, D.; Snoek, L. B.; Schnabel, S.; Nijveen, H.; Hilhorst, H. y Bentsink, L. (2014). "Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in Arabidopsis". *J Exp Bot* **65**(22): 6603-6615. DOI: 10.1093/jxb/eru378.
- Higo, K.; Ugawa, Y.; Iwamoto, M. y Korenaga, T. (1999). "Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999". *Nucleic Acids Research* **27**(1): 297-300. DOI: 10.1093/nar/27.1.297.
- Hincha, D. K. y Thalhhammer, A. (2012). "LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance". *Biochem Soc Trans* **40**(5): 1000-1003. DOI: 10.1042/bst20120109.
- Hoffmann, M. H. (2002). "Biogeography of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (Brassicaceae)". *Journal of Biogeography* **29**(1): 125-134. DOI: 10.1046/j.1365-2699.2002.00647.x.
- Honjoh, K.-i.; Matsumoto, H.; Shimizu, H.; Ooyama, K.; Tanaka, K.; Oda, Y.; Takata, R.; Joh, T.; Suga, K.; Miyamoto, T.; Iio, M. y Hatano, S. (2000). "Cryoprotective Activities of Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins from *Chlorella vulgaris* C-27". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**(8): 1656-1663. DOI: 10.1271/bbb.64.1656.
- Houde, M.; Daniel, C.; Lachapelle, M.; Allard, F.; Laliberte, S. y Sarhan, F. (1995). "Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues". *Plant J* **8**(4): 583-593. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1995.8040583.x.
- Hualkasin, W.; Thongin, W.; Petsean, K.; Phongdara, A. y Nakkaew, A. (2013). "Molecular cloning and characterization of the late embryogenesis abundant group 4 (EgLEA4) gene from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq)". *Songklanakar Journal of Science and Technology* **35**(3): 275-285.
- Hughes, S. y Graether, S. P. (2011). "Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein". *Protein Sci* **20**(1): 42-50. DOI: 10.1002/pro.534.
- Hughes, S. L.; Schart, V.; Malcolmson, J.; Hogarth, K. A.; Martynowicz, D. M.; Tralman-Baker, E.; Patel, S. N. y Graether, S. P. (2013). "The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins". *Plant Physiol* **163**(3): 1376-1386. DOI: 10.1104/pp.113.226803.
- Hundertmark, M. y Hincha, D. K. (2008). "LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana". *BMC Genomics* **9**: 118. DOI: 10.1186/1471-2164-9-118.
- HwangBo, K.; Son, S.; Lee, J.; Min, S.; Ko, S.; Liu, J.; Choi, D. y Jeong, W. (2010). "Rapid and simple method for DNA extraction from plant and algal species suitable for PCR amplification using a chelating resin Chelex 100". *Plant Biotechnology Reports* **4**(1): 49-52. DOI: 10.1007/s11816-009-0117-4.
- Ingram, J. y Bartels, D. (1996). "THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS". *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 377-403. DOI: 10.1146/annurev.arplant.47.1.377.
- Jakob, U.; Gaestel, M.; Engel, K. y Buchner, J. (1993). "Small heat shock proteins are molecular chaperones". *Journal of Biological Chemistry* **268**(3): 1517-1520.
- Jia, F.; Qi, S.; Li, H.; Liu, P.; Li, P.; Wu, C.; Zheng, C. y Huang, J. (2014). "Overexpression of Late Embryogenesis Abundant 14 enhances Arabidopsis salt stress tolerance". *Biochem Biophys Res Commun* **454**(4): 505-511. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.136.
- Jones, R.; Ougham, H.; Thomas, H. y Waaland, S. (2012). "The Molecular Life of Plants". *Wiley*. ISBN: 9780470870136.

- Kafri, R.; Springer, M. y Pilpel, Y. (2009). "Genetic redundancy: new tricks for old genes". *Cell* **136**(3): 389-392. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.027.
- Karimi, M.; Depicker, A. y Hilson, P. (2007). "Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors". *Plant Physiology* **145**(4): 1144-1154. DOI: 10.1104/pp.107.106989.
- Karimi, M.; Inze, D. y Depicker, A. (2002). "GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation". *Trends Plant Sci* **7**(5): 193-195. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02251-3.
- Kazuoka, T. y Oeda, K. (1994). "Purification and Characterization of COR85-Oligomeric Complex from Cold-Acclimated Spinach". *Plant and Cell Physiology* **35**(4): 601-611.
- Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H. y Phillips, D. C. (1958). "A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis". *Nature* **181**(4610): 662-666. DOI: 10.1038/181662a0.
- Kim, H. S.; Lee, J. H.; Kim, J. J.; Kim, C. H.; Jun, S. S. y Hong, Y. N. (2005). "Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*". *Gene* **344**: 115-123. DOI: 10.1016/j.gene.2004.09.012.
- Koornneef, M.; Bentsink, L. y Hilhorst, H. (2002). "Seed dormancy and germination". *Curr Opin Plant Biol* **5**(1): 33-36.
- Kovacs, D.; Agoston, B. y Tompa, P. (2008). "Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones". *Plant signaling & behavior* **3**(9): 710-713. DOI: 10.4161/psb.3.9.6434.
- Kovacs, D.; Kalmar, E.; Torok, Z. y Tompa, P. (2008). "Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins". *Plant Physiol* **147**(1): 381-390. DOI: 10.1104/pp.108.118208.
- Krakauer, D. C. y Nowak, M. A. (1999). "Evolutionary preservation of redundant duplicated genes". *Semin Cell Dev Biol* **10**(5): 555-559. DOI: 10.1006/scdb.1999.0337.
- Kumar, R. (2009). "Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **491**(1-2): 1-6. DOI: 10.1016/j.abb.2009.09.007.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein". *J Mol Biol* **157**(1): 105-132. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- Larcher, W. (1987). "Streß bei Pflanzen". *Naturwissenschaften* **74**(4): 158-167. DOI: 10.1007/BF00372919.
- Leksungnoen, N. (2012). "The Relationship Between Salinity and Drought Tolerance In Turfgrasses and Woody Species". *Tesis Doctoral*
- Levitt, J. (1980). "Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses". *Academic Press*. ISBN: 0124455026.
- Lichtenthaler, H. K. (1998). "The stress concept in plants: an introduction". *Ann N Y Acad Sci* **851**: 187-198. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x.
- Lin, C. y Thomashow, M. F. (1992). "A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity". *Biochem Biophys Res Commun* **183**(3): 1103-1108. DOI: 10.1016/S0006-291X(05)80304-3.

- Liu, G.; Xu, H.; Zhang, L. y Zheng, Y. (2011). "Fe binding properties of two soybean (*Glycine max* L.) LEA4 proteins associated with antioxidant activity". *Plant Cell Physiol* **52**(6): 994-1002. DOI: 10.1093/pcp/pcr052.
- Liu, Y.; Wang, L.; Xing, X.; Sun, L.; Pan, J.; Kong, X.; Zhang, M. y Li, D. (2013). "ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses". *Plant Cell Physiol* **54**(6): 944-959. DOI: 10.1093/pcp/pct047.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.
- Luhua, S.; Hegie, A.; Suzuki, N.; Shulaev, E.; Luo, X.; Cenariu, D.; Ma, V.; Kao, S.; Lim, J.; Gunay, M. B.; Oosumi, T.; Lee, S. C.; Harper, J.; Cushman, J.; Gollery, M.; Girke, T.; Bailey-Serres, J.; Stevenson, R. A.; Zhu, J. K. y Mittler, R. (2013). "Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening". *Physiol Plant* **148**(3): 322-333. DOI: 10.1111/pp1.12013.
- Maitra, N. y Cushman, J. C. (1994). "Isolation and characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a D95 family late-embryogenesis-abundant protein". *Plant Physiology* **106**(2): 805-806. DOI: 10.1104/pp.106.2.805.
- Manfre, A. J.; Lanni, L. M. y Marcotte, W. R., Jr. (2006). "The Arabidopsis group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT protein ATEM6 is required for normal seed development". *Plant Physiol* **140**(1): 140-149. DOI: 10.1104/pp.105.072967.
- McLellan, H.; Gilroy, E. M.; Yun, B. W.; Birch, P. R. y Loake, G. J. (2009). "Functional redundancy in the Arabidopsis Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence". *New Phytol* **183**(2): 408-418. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02865.x.
- McNeill, J. (2012). "International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code)".
- Meinke, D. W.; Cherry, J. M.; Dean, C.; Rounsley, S. D. y Koornneef, M. (1998). "Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis". *Science* **282**(5389): 662, 679-682. DOI: 10.1126/science.282.5389.662.
- Mendonca, A. G.; Alves, R. J. y Pereira-Leal, J. B. (2011). "Loss of genetic redundancy in reductive genome evolution". *PLoS Comput Biol* **7**(2): e1001082. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1001082.
- Miransari, M. y Smith, D. L. (2014). "Plant hormones and seed germination". *Environmental and Experimental Botany* **99**(0): 110-121. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.005.
- Momma, M.; Kaneko, S.; Haraguchi, K. y Matsukura, U. (2003). "Peptide mapping and assessment of cryoprotective activity of 26/27-kDa dehydrin from soybean seeds". *Biosci Biotechnol Biochem* **67**(8): 1832-1835. DOI: 10.1271/bbb.67.1832.
- Muirhead, H. y Perutz, M. F. (1963). "Structure Of Haemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis of Reduced Human Haemoglobin at 5.5 [angst] Resolution". *Nature* **199**(4894): 633-638. DOI: 10.1098/rspa.1962.0002.
- Munns, R. y Tester, M. (2008). "Mechanisms of salinity tolerance". *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651-681. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- Nakamoto, H.; Fujita, K.; Ohtaki, A.; Watanabe, S.; Narumi, S.; Maruyama, T.; Suenaga, E.; Misono, T. S.; Kumar, P. K. R.; Goloubinoff, P. y Yoshikawa, H. (2014). "Physical Interaction between Bacterial Heat Shock Protein (Hsp) 90 and Hsp70 Chaperones Mediates Their Cooperative Action to Refold

- Denatured Proteins". *Journal of Biological Chemistry* **289**(9): 6110-6119. DOI: 10.1074/jbc.M113.524801.
- NOAA. (2012). "Drought: Fact Sheet." 2015.
- Nonogaki, H.; Bassel, G. W. y Bewley, J. D. (2010). "Germination—Still a mystery". *Plant Science* **179**(6): 574-581. DOI: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010.
- Nowak, M. A.; Boerlijst, M. C.; Cooke, J. y Smith, J. M. (1997). "Evolution of genetic redundancy". *Nature* **388**(6638): 167-171. DOI: 10.1038/40618.
- Obermann, W. M.; Sondermann, H.; Russo, A. A.; Pavletich, N. P. y Hartl, F. U. (1998). "In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis". *J Cell Biol* **143**(4): 901-910.
- Olvera-Carrillo, Y. (2010). "Estudio de la función de la familia 4 de proteínas LEA de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta a sequía". *Tesis Doctoral*
- Olvera-Carrillo, Y.; Campos, F.; Reyes, J. L.; Garcíarrubio, A. y Covarrubias, A. A. (2010). "Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*". *Plant Physiol* **154**(1): 373-390. DOI: 10.1104/pp.110.158964.
- Olvera-Carrillo, Y.; Luis Reyes, J. y Covarrubias, A. A. (2011). "Late embryogenesis abundant proteins: Versatile players in the plant adaptation to water limiting environments". *Plant Signaling & Behavior* **6**(4): 586-589. DOI: 10.4161/psb.6.4.15042.
- Osakabe, Y.; Osakabe, K.; Shinozaki, K. y Tran, L.-S. P. (2014). "Response of plants to water stress". *Frontiers in Plant Science* **5**: 86. DOI: 10.3389/fpls.2014.00086.
- Park, B.-J.; Liu, Z.; Kanno, A. y Kameya, T. (2005). "Genetic improvement of Chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a *B. napus* LEA gene". *Plant Science* **169**(3): 553-558. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.05.008.
- Park, J.-A.; Cho, S. K.; Kim, J. E.; Chung, H. S.; Hong, J.-P.; Hwang, B.; Hong, C. B. y Kim, W. T. (2003). "Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the Ca-LEAL1 gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang)". *Plant Science* **165**(3): 471-481. DOI: 10.1016/s0168-9452(03)00165-1.
- Paul, A.; Singh, S.; Sharma, S. y Kumar, S. (2014). "A stress-responsive late embryogenesis abundant protein 7 (CsLEA7) of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] encodes for a chaperone that imparts tolerance to *Escherichia coli* against stresses". *Mol Biol Rep* **41**(11): 7191-7200. DOI: 10.1007/s11033-014-3602-y.
- Peng, Y.; Reyes, J. L.; Wei, H.; Yang, Y.; Karlson, D.; Covarrubias, A. A.; Krebs, S. L.; Fessehaie, A. y Arora, R. (2008). "RcDhn5, a cold acclimation-responsive dehydrin from *Rhododendron catawbiense* rescues enzyme activity from dehydration effects in vitro and enhances freezing tolerance in RcDhn5-overexpressing *Arabidopsis* plants". *Physiol Plant* **134**(4): 583-597. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01164.x.
- Prieto-Dapena, P.; Almoguera, C.; Rojas, A. y Jordano, J. (1999). "Seed-specific expression patterns and regulation by ABI3 of an unusual late embryogenesis-abundant gene in sunflower". *Plant Mol Biol* **39**(3): 615-627. DOI: 10.1023/A:1006178220289.

- Ramanjulu, S. y Bartels, D. (2002). "Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants". *Plant, Cell & Environment* **25**(2): 141-151. DOI: 10.1046/j.0016-8025.2001.00764.x.
- Raven, P. H.; Evert, R. F. y Eichhorn, S. E. (1998). "Biology of Plants". *W. H. Freeman*. ISBN: 9781572590410.
- Reyes, J. L.; Campos, F.; Wei, H.; Arora, R.; Yang, Y.; Karlson, D. T. y Covarrubias, A. A. (2008). "Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection". *Plant Cell Environ* **31**(12): 1781-1790. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01879.x.
- Reyes, J. L.; Rodrigo, M.-J.; Colmenero-Flores, J. M.; Gil, J.-V.; Garay-Arroyo, A.; Campos, F.; Salamini, F.; Bartels, D. y Covarrubias, A. A. (2005). "Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro". *Plant, Cell & Environment* **28**(6): 709-718. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01317.x.
- Rivera-Najera, L. Y.; Saab-Rincon, G.; Battaglia, M.; Amero, C.; Pulido, N. O.; Garcia-Hernandez, E.; Solorzano, R. M.; Reyes, J. L. y Covarrubias, A. A. (2014). "A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is a disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties". *J Biol Chem* **289**(46): 31995-32009. DOI: 10.1074/jbc.M114.583369.
- Saavedra, L.; Svensson, J.; Carballo, V.; Izmendi, D.; Welin, B. y Vidal, S. (2006). "A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance". *Plant J* **45**(2): 237-249. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02603.x.
- Sanchez-Ballesta, M. T.; Rodrigo, M. J.; Lafuente, M. T.; Granell, A. y Zacarias, L. (2004). "Dehydrin from citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves". *J Agric Food Chem* **52**(7): 1950-1957. DOI: 10.1021/jf035216+.
- Sasaki, K.; Christov, N. K.; Tsuda, S. y Imai, R. (2014). "Identification of a Novel LEA Protein Involved in Freezing Tolerance in Wheat". *Plant & Cell Physiology* **55**(1): 136-147. DOI: 10.1093/pcp/pct164.
- Sedzik, J. y Kirschner, D. (1992). "Is myelin basic protein crystallizable?". *Neurochemical Research* **17**(2): 157-166. DOI: 10.1007/BF00966794.
- Selye, H. (1936). "A syndrome produced by diverse nocuous agents". *Nature* **138**(3479): 32. DOI: 10.1038/138032a0.
- Senthil-Kumar, M. y Udayakumar, M. (2006). "High-throughput virus-induced gene-silencing approach to assess the functional relevance of a moisture stress-induced cDNA homologous to lea4". *J Exp Bot* **57**(10): 2291-2302. DOI: 10.1093/jxb/erj200.
- Shih, M.-D.; Hoekstra, F. A. y Hsing, Y.-I. C. (2008). "Late Embryogenesis Abundant Proteins". **48**: 211-255. DOI: 10.1016/s0065-2296(08)00404-7.
- Shih, M.-D.; Huang, L.-T.; Wei, F.-J.; Wu, M.-T.; Hoekstra, F. A. y Hsing, Y.-I. C. (2010). "OsLEA1a, a New Em-Like Protein of Cereal Plants". *Plant and Cell Physiology* **51**(12): 2132-2144. DOI: 10.1093/pcp/pcq172.
- Shih, M. D.; Lin, S. C.; Hsieh, J. S.; Tsou, C. H.; Chow, T. Y.; Lin, T. P. y Hsing, Y. I. (2004). "Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16". *Plant Mol Biol* **56**(5): 689-703. DOI: 10.1007/s11103-004-4680-3.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). "Gene expression and signal transduction in water-stress response". *Plant Physiology* **115**(2): 327. DOI: 10.1104/pp.115.2.327.

- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). "Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways". *Current Opinion in Plant Biology* **3**(3): 217-223. DOI: 10.1016/S1369-5266(00)80068-0.
- Sliwinska, E.; Bassel, G. W. y Bewley, J. D. (2009). "Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl". *J Exp Bot* **60**(12): 3587-3594. DOI: 10.1093/jxb/erp203.
- Soulages, J. L.; Kim, K.; Walters, C. y Cushman, J. C. (2002). "Temperature-Induced Extended Helix/Random Coil Transitions in a Group I Late Embryogenesis-Abundant Protein from Soybean". *Plant Physiology* **128**(3): 822-832. DOI: 10.1104/pp.010521.
- Tantos, A.; Friedrich, P. y Tompa, P. (2009). "Cold stability of intrinsically disordered proteins". *FEBS Lett* **583**(2): 465-469. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.12.054.
- Tardieu, F. (1996). "Drought perception by plants Do cells of droughted plants experience water stress?". *Plant Growth Regulation* **20**(2): 93-104. DOI: 10.1007/BF00024005.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*". *Nature* **408**(6814): 796-815. DOI: 10.1038/35048692.
- Thomas, J. H. (1993). "Thinking about genetic redundancy". *Trends Genet* **9**(11): 395-399. DOI: 10.1016/0168-9525(93)90140-D.
- Tolleter, D.; Jaquinod, M.; Mangavel, C.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Manon, S.; Teyssier, E.; Payet, N.; Avelange-Macherel, M. H. y Macherel, D. (2007). "Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation". *Plant Cell* **19**(5): 1580-1589. DOI: 10.1105/tpc.107.050104.
- Tompa, P. y Fersht, A. (2009). "Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins". *CRC Press*. ISBN: 9781420078930.
- Tompa, P. y Fuxreiter, M. (2008). "Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions". *Trends Biochem Sci* **33**(1): 2-8. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.10.003.
- Tompa, P.; Fuxreiter, M.; Oldfield, C. J.; Simon, I.; Dunker, A. K. y Uversky, V. N. (2009). "Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins". *Bioessays* **31**(3): 328-335. DOI: 10.1002/bies.200800151.
- Tunnacliffe, A. y Wise, M. J. (2007). "The continuing conundrum of the LEA proteins". *Naturwissenschaften* **94**(10): 791-812. DOI: 10.1007/s00114-007-0254-y.
- Van Norman, J. M. y Benfey, P. N. (2009). "Arabidopsis thaliana as a model organism in systems biology". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **1**(3): 372-379. DOI: 10.1002/wsbm.25.
- Vashisht, A. A. y Tuteja, N. (2006). "Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance". *J Photochem Photobiol B* **84**(2): 150-160. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2006.02.010.
- Verslues, P. E.; Agarwal, M.; Katiyar-Agarwal, S.; Zhu, J. y Zhu, J. K. (2006). "Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status". *Plant J* **45**(4): 523-539. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x.

- Wang, M.; Li, P.; Li, C.; Pan, Y.; Jiang, X.; Zhu, D.; Zhao, Q. y Yu, J. (2014). "SiLEA14, a novel atypical LEA protein, confers abiotic stress resistance in foxtail millet". *BMC Plant Biol* **14**: 290. DOI: 10.1186/s12870-014-0290-7.
- Wise, M. J. (2003). "LEAping to conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles". *BMC Bioinformatics* **4**: 52-52. DOI: 10.1186/1471-2105-4-52.
- Wisniewski, M.; Webb, R.; Balsamo, R.; Close, T. J.; Yu, X.-M. y Griffith, M. (1999). "Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*)". *Physiologia Plantarum* **105**(4): 600-608. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1999.105402.x.
- Wolkers, W. F.; McCready, S.; Brandt, W. F.; Lindsey, G. G. y Hoekstra, F. A. (2001). "Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro". *Biochim Biophys Acta* **1544**(1-2): 196-206. DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00220-X.
- Wright, P. E. y Dyson, H. J. (1999). "Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm". *J Mol Biol* **293**(2): 321-331. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3110.
- Wu, Y.; Liu, C.; Kuang, J.; Ge, Q.; Zhang, Y. y Wang, Z. (2014). "Overexpression of SmLEA enhances salt and drought tolerance in *Escherichia coli* and *Salvia miltiorrhiza*". *Protoplasma* **251**(5): 1191-1199. DOI: 10.1007/s00709-014-0626-z.
- Xu, D.; Duan, X.; Wang, B.; Hong, B.; Ho, T. H. D. y Wu, R. (1996). "Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice". *Plant Physiology* **110**(1): 249-257. DOI: 10.1104/pp.110.1.249.
- Yancey, P. H. (2005). "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses". *Journal of Experimental Biology* **208**(15): 2819-2830. DOI: 10.1242/jeb.01730.
- Yordanov, I.; Velikova, V. y Tsonev, T. (2003). "Plant responses to drought and stress tolerance". *Bulgarian Journal of Plant Physiology Special Issue*: 187-206. DOI: citeulike-article-id:7216904.
- Zegzouti, H.; Jones, B.; Marty, C.; Lelievre, J. M.; Latche, A.; Pech, J. C. y Bouzayen, M. (1997). "ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding". *Plant Mol Biol* **35**(6): 847-854. DOI: 10.1023/A:1005860302313.
- Zha, H. G.; Liu, T.; Zhou, J. J. y Sun, H. (2013). "MS-desi, a desiccation-related protein in the floral nectar of the evergreen velvet bean (*Mucuna sempervirens* Hemsl): molecular identification and characterization". *Planta* **238**(1): 77-89. DOI: 10.1007/s00425-013-1876-2.
- Zhang, X.; Henriques, R.; Lin, S. S.; Niu, Q. W. y Chua, N. H. (2006). "Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method". *Nat Protoc* **1**(2): 641-646. DOI: 10.1038/nprot.2006.97.
- Zhang, X.; Lu, G.; Long, W.; Zou, X.; Li, F. y Nishio, T. (2014). "Recent progress in drought and salt tolerance studies in Brassica crops". *Breed Sci* **64**(1): 60-73. DOI: 10.1270/jsbbs.64.60.
- Zhu, J.-K. (2007). "Plant Salt Stress". *eLS*. John Wiley & Sons Ltd, C. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001300.pub2.

ANEXO I

Tabla de oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo

Etiqueta	Secuencia (5' → 3')
Prom-LEA-4-5-F	CAC CGA <u>GCT</u> CAA CTC TTA AGA TAT CAT GCA C
Prom-LEA-4-5-R	GTG ATG <u>GAC</u> <u>TAG</u> TTT TTA CCA AAT CTC TCT C
Prom-LEA4-2-F	CAC CGA <u>GCT</u> CGA GAT ACT GAA AAT TTC AAA ATT TGG
Prom-LEA4-2-R	ACC <u>ACT</u> <u>AGT</u> CTT CTT TCT TCT TCT TCT TAC TTT TC
Prom-LEA4-1-F	CAC CGA <u>GCT</u> CAG TTT TGG AGG ATT TTG ATT TTC G
Prom-LEA4-1-R	ACC ACT AGT ATT TTT TTT CTT TAG TTT TCT GTT T
CLEA4H-R	<i>TTA</i> TCC GGC TCC AGC CGC TCC TTT CAT GGC
CLEA4RC-F	CAC CAT GAC CGG TTT AGG TTT GGG GAC
CLEA4-2-F	CAC CAT GCA GTC GGC GAA G
CLEA4-2-R	<i>TTA</i> GAT CTG TCC CGG CGG G
CLEA4-1-F	CAC CAT GCA ATC GGC GAA ACA GAA G
CLEA4-1-R	<i>TTA</i> GTA GTG ATG ATG ATT ATG ATG
pK2GW7-F	GTC ATC GGC GGG GGT CAT AAC G
pK2GW7-R	GTA GAG AGA GAC TGG TGA TTT TTG CGG
YOC-YLEA4-5-F	ACA CAT ATG <i>ATG</i> CAG TCG ATG AAA GAA ACA GCT TCG
YOC-YLEA4-5-R	AAA GGA TCC <i>TTA</i> TCC AGT ATA TCC CCC GCC G
M13- F	GTA AAA CGA CGG CCA G

Negritas: Secuencia CACC agregada para clonar direccionalmente en el vector pENTR/SD.

Cursivas: Codones de inicio o término de la traducción.

Subrayado: Sitios de restricción.

p4-5::LEA4-5 Teórica	CACCGAGCTCAACTCTTAAGATATCATGCACAATAATACTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA
p4-5::LEA4-5 Construcción	CACCGAGCTCAACTCTTAAGATATCATGCACAATAATACTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT
p4-5::LEA4-5 Construcción	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTCTTCTTTCATGACACGCTCTCACTGACGTGTCGTC
p4-5::LEA4-5 Construcción	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTCTTCTTTCATGACACGCTCTCACTGACGTGTCGTC *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	AGAACGTAATTAATTAATAACTATCGTGACGAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA
p4-5::LEA4-5 Construcción	AGAACGTAATTAATTAATAACTATCGTGACGAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGAGATTTGGTAAAAA
p4-5::LEA4-5 Construcción	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGAGATTTGGTAAAAA *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	CTAGT----- <u>ATGCAGTCGATGAAAGAAACAGCT</u>
p4-5::LEA4-5 Construcción	CTAGT <u>GATATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCGCGCGCCCTTACCATGCAGTCGATGAAAGAAACAGCT</u> *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	TCGAATATGTCAGCTTCTGCAAAATCTGGCATGGACAAAACCAAAGCTACCTTGGAGGAAAAGGCGGAGAAGATGAAGAC
p4-5::LEA4-5 Construcción	TCGAATATGTCAGCTTCTGCAAAATCTGGCATGGACAAAACCAAAGCTACCTTGGAGGAAAAGGCGGAGAAGATGAAGAC *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	ACGAGACCCTGTTTCAGAAACAGATGGCTACACAGGTTAAAGAAGATAAGATCAATCAAGCTGAGATGCAGAAGAGAGAAA
p4-5::LEA4-5 Construcción	ACGAGACCCTGTTTCAGAAACAGATGGCTACACAGGTTAAAGAAGATAAGATCAATCAAGCTGAGATGCAGAAGAGAGAAA *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	CGCGTCAGCACAAACGCGCCATGAAAGAAGCGGCTGGAGCCGGAACCGGTTTAGGTTTGGGGACGGCCACTCACTCGACC
p4-5::LEA4-5 Construcción	CGCGTCAGCACAAACGCGCCATGAAAGAAGCGGCTGGAGCCGGAACCGGTTTAGGTTTGGGGACGGCCACTCACTCGACC *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	ACTGGACAAGTCGGACACGGCACTGGGACACATCAGATGTCGGCTCTGCCTGGTCACGGAACGGGACAACCTGACCGACCG
p4-5::LEA4-5 Construcción	ACTGGACAAGTCGGACACGGCACTGGGACACATCAGATGTCGGCTCTGCCTGGTCACGGAACGGGACAACCTGACCGACCG *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	CGTTGTGGAGGGCAGCGCTGTGACCGACCCGATTGGAAGGAACACTGGAACCTGGTCGGACAACCGCTCATAACACTCAGC
p4-5::LEA4-5 Construcción	CGTTGTGGAGGGCAGCGCTGTGACCGACCCGATTGGAAGGAACACTGGAACCTGGTCGGACAACCGCTCATAACACTCAGC *****
p4-5::LEA4-5 Teórica	TTGGTGGTGGTGGTGCCACCGGTACGGAACCGCGGGGGATATACTGGATA <u>AA</u>
p4-5::LEA4-5 Construcción	TTGGTGGTGGTGGTGCCACCGGTACGGAACCGCGGGGGATATACTGGATA <u>AA</u> *****

Alineamiento entre la construcción teórica p4-5::LEA4-5 y el resultado de la secuenciación de la construcción p4-5::LEA4-5. Los nucleótidos en cursivas representan los remanentes del sitio de recombinación attR1. Los nucleótidos subrayados representan los codones de inicio y término del ORF del gen *AtLEA4-5*. El nucleótido sombreado representa una mutación puntual, la cual encontrada en varias muestras, lo que sugiere que es una diferencia entre el ORF utilizado para armar esta construcción y la base de datos TAIR. Aun así, representa una mutación sinónima que no modifica la identidad del aminoácido traducido (ACT y ACA codifican para treonina)

p4-5::LEA4H Teórica	CACCGAGCTCAACTCTTAAAGATATCATGCACAATAATATACTTGTGTTTTGTCTTAACTATCGATTACAAAACCGGGTTAA
p4-5::LEA4H Construcción	CACCGAGCTCAACTCTTAAAGATATCATGCACAATAATATACTTGTGTTTTGTCTTAACTATCGATTACAAAACCGGGTTAA *****
p4-5::LEA4H Teórica	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT
p4-5::LEA4H Construcción	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT *****
p4-5::LEA4H Teórica	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTCTTCTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCA
p4-5::LEA4H Construcción	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTCTTCTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCA *****
p4-5::LEA4H Teórica	AGAACGTAATTAATATTAAGTATCGTGACGAAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA
p4-5::LEA4H Construcción	AGAACGTAATTAATATTAAGTATCGTGACGAAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA *****
p4-5::LEA4H Teórica	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTTTCGCTAAAGGAAAAGAGAGAGATTTGGTAAAAA
p4-5::LEA4H Construcción	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTTTCGCTAAAGGAAAAGAGAGAGATTTGGTAAAAA *****
p4-5::LEA4H Teórica	CTAGT----- <u>ATG</u>
p4-5::LEA4H Construcción	CTAGT <u>GATATCACAAGTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGCGCCTTGTTAACTTTAAGAAGGAGCCCTTACCATG</u> *****
p4-5::LEA4H Teórica	CAGTCGATGAAAGAAACAGCTTCGAATATGTCAGCTTCTGCAAAATCTGGCATGGACAAAACCAAGCTACCTTGGAGGA
p4-5::LEA4H Construcción	CAGTCGATGAAAGAAACAGCTTCGAATATGTCAGCTTCTGCAAAATCTGGCATGGACAAAACCAAGCTACCTTGGAGGA *****
p4-5::LEA4H Teórica	AAAGGCGGAGAAGATGAAGACACGAGACCCTGTTTCAGAAACAGATGGCTACACAGGTTAAAGAAGATAAGATCAATCAAG
p4-5::LEA4H Construcción	AAAGGCGGAGAAGATGAAGACACGAGACCCTGTTTCAGAAACAGATGGCTACACAGGTTAAAGAAGATAAGATCAATCAAG *****
p4-5::LEA4H Teórica	CTGAGATGCAGAAGAGAGAAAACGCGTCAGCACACGCGCCATGAAAGAAGCGGCTGGAGCCGGATAA
p4-5::LEA4H Construcción	CTGAGATGCAGAAGAGAGAAAACGCGTCAGCACACGCGCCATGAAAGAAGCGGCTGGAGCCGGATAA *****

Alineamiento entre la construcción teórica p4-5::LEA4H y el resultado de la secuenciación de la construcción p4-5::LEA4H. Los nucleótidos en cursivas representan los remanentes del sitio de recombinación attR1. Los nucleótidos subrayados representan los codones de inicio y término de la mitad 5' del ORF del gen *AtLEA4-5*.

p4-5__LEA4RC_Teórica	CACCGAGCTCAACTCTTAAAGATATCATGCACAATAATACTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA
p4-5__LEA4RC_Construcción	CACCGAGCTCAACTCTTAAAGATATCATGCACAATAATACTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT
p4-5__LEA4RC_Construcción	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTCTTCTTTCATGACACGCTCACTGACGTGTCGTC
p4-5__LEA4RC_Construcción	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTCTTCTTTCATGACACGCTCACTGACGTGTCGTC *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	AGAACGTAATTAATATTAACACTATCGTGACGAACGCGAGGCCATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA
p4-5__LEA4RC_Construcción	AGAACGTAATTAATATTAACACTATCGTGACGAACGCGAGGCCATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGATTTGGTAAAAA
p4-5__LEA4RC_Construcción	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGATTTGGTAAAAA *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	CTAGT-----ATG
p4-5__LEA4RC_Construcción	CTAGT <i>GATATCACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGCCGCTTGTTAACTTTAAGAAGGAGCCCTTACCATG</i> *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	ACCGGTTTAGGTTTGGGGACGGCCACTCACTCGACCCTGGACAAGTCGGACACGGCACTGGGACACATCAGATGTCGGC
p4-5__LEA4RC_Construcción	ACCGGTTTAGGTTTGGGGACGGCCACTCACTCGACCCTGGACAAGTCGGACACGGCACTGGGACACATCAGATGTCGGC *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	TCTGCCTGGTCACGGAACGGGACAACCTGACCCGACCGGTTGTGGAGGGCACGGCTGTGACCCGACCCGATTGGAAGGAACA
p4-5__LEA4RC_Construcción	TCTGCCTGGTCACGGAACGGGACAACCTGACCCGACCGGTTGTGGAGGGCACGGCTGTGACCCGACCCGATTGGAAGGAACA *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	CTGGAACCTGGTCGGACAACCGCTCATAACACACACGTTGGTGGTGGTGGTGCCACCGGGTACGGAACCGCGGGGGATAT
p4-5__LEA4RC_Construcción	CTGGAACCTGGTCGGACAACCGCTCATAACACACACGTTGGTGGTGGTGGTGCCACCGGGTACGGAACCGCGGGGGATAT *****
p4-5__LEA4RC_Teórica	<u>ACTGGATAA</u>
p4-5__LEA4RC_Construcción	<u>ACTGGATAA</u> *****

Alineamiento entre la construcción teórica p4-5::LEA4RC y el resultado de la secuenciación de la construcción p4-5::LEA4RC. Los nucleótidos en cursivas representan los remanentes del sitio de recombinación attR1. Los nucleótidos subrayados representan los codones de inicio y término de la mitad 3' del ORF del gen *AtLEA4-5*. El punto representa una mutación puntual. Dicha mutación fue encontrada en varias muestras, lo que sugiere que es una diferencia entre el marco abierto de lectura utilizado para armar esta construcción y la base de datos TAIR. Aun así, representa una mutación sinónima, que no modifica la identidad del aminoácido traducido (ACT y ACA codifican para treonina)

p4-5__LEA4-1_Teórica	CACCGAGCTCAACTCTTAAGATATCATGCACAATAATATACTTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA
p4-5__LEA4-1_Construcción	CACCGAGCTCAACTCTTAAGATATCATGCACAATAATATACTTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT
p4-5__LEA4-1_Construcción	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTCTCTCTTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTC
p4-5__LEA4-1_Construcción	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTCTCTCTTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTC *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	AGAACGTAATTAATTAATACTATCGTGACGAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA
p4-5__LEA4-1_Construcción	AGAACGTAATTAATTAATACTATCGTGACGAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGAGATTTGGTAAAA
p4-5__LEA4-1_Construcción	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGAGATTTGGTAAAA *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	CTAGT-----ATGC
p4-5__LEA4-1_Construcción	CTAGTGATATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGCCGCTTGTTAACTTTAGAAGGAGCCCTTACCATTGC *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	AATCGGCGAAACAGAAGATAAGCGATATGGCTAGTACAGCCAAGGAGAAGATGGTGATATGTCAAGCAAAAGCTGATGAG
p4-5__LEA4-1_Construcción	AATCGGCGAAACAGAAGATAAGCGATATGGCTAGTACAGCCAAGGAGAAGATGGTGATATGTCAAGCAAAAGCTGATGAG *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	AAGGCAGAGCGGGCGATGGCGAGGACGAAAGAGGAGAAAGAGATAGCGCACCAACGGAGAAAGGCGAAGGAAGCAGAAGC
p4-5__LEA4-1_Construcción	AAGGCAGAGCGGGCGATGGCGAGGACGAAAGAGGAGAAAGAGATAGCGCACCAACGGAGAAAGGCGAAGGAAGCAGAAGC *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	GAATATGGATATGCACATGGCTAAAGCGGCTCATGCGGAAGACAAGCTTATGGCTAAGCAATCTCACTACCATGTTACTG
p4-5__LEA4-1_Construcción	GAATATGGATATGCACATGGCTAAAGCGGCTCATGCGGAAGACAAGCTTATGGCTAAGCAATCTCACTACCATGTTACTG *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	ATCATGGTCCCCACGTGCCTCAACAAGCGCCTGTACCGGCTCCCGCACCGGTTATGGGACACGGTTACGGGCATAATCCT
p4-5__LEA4-1_Construcción	ATCATGGTCCCCACGTGCCTCAACAAGCGCCTGTACCGGCTCCCGCACCGGTTATGGGACACGGTTACGGGCATAATCCT *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	ACCGGAGTTACCTCAGTGCCTCCTCAGACCTATCATCCGACTTATCCTCCGACGGGACATCATAATCATCATCACTACTA
p4-5__LEA4-1_Construcción	ACCGGAGTTACCTCAGTGCCTCCTCAGACCTATCATCCGACTTATCCTCCGACGGGACATCATAATCATCATCACTACTA *****
p4-5__LEA4-1_Teórica	<u>A</u>
p4-5__LEA4-1_Construcción	<u>A</u> *

Alineamiento entre la construcción teórica p4-5::LEA4-1 y el resultado de la secuenciación de la construcción p4-5::LEA4-1. Los nucleótidos en cursivas representan los remanentes del sitio de recombinación attR1. Los nucleótidos subrayados representan los codones de inicio y término del ORF del gen *AtLEA4-1*.

p4-5__LEA4-2_Teórica	CACCGAGCTCAACTCTTAAGATATCATGCACAATAATATACTTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA
p4-5__LEA4-2_Construcción	CACCGAGCTCAACTCTTAAGATATCATGCACAATAATATACTTGTTTTGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAA *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT
p4-5__LEA4-2_Construcción	CCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGT *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTCTCTCTTTTCATGACACGCTCTCACTGACGTGTCGTC
p4-5__LEA4-2_Construcción	GTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTCTCTCTTTTCATGACACGCTCTCACTGACGTGTCGTC *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	AGAACGTAATTAATTAATAACTATCGTGACGAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA
p4-5__LEA4-2_Construcción	AGAACGTAATTAATTAATAACTATCGTGACGAACGCGAGGCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAA *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGATTTGGTAAAAA
p4-5__LEA4-2_Construcción	CAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGATTTGGTAAAAA *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	CTAGT-----ATG
p4-5__LEA4-2_Construcción	CTAGTGATATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCGCGCGCCCTTGTTAACTTTAAGAAGGCCCTCACCATG *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	CAGTCGGCGAAGGAAAAGATCAGTGACATGGCCAGTACGGCCAAGGAGAACTCAACATCGGTGGCGCAAAGGCACAAGG
p4-5__LEA4-2_Construcción	CAGTCGGCGAAGGAAAAGATCAGTGACATGGCCAGTACGGCCAAGGAGAACTCAACATCGGTGGCGCAAAGGCACAAGG *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	TCATGCGGAGAAGACGATGGCAAGGACCAAAAAGAGAAGAAGTTGGCCCAAGAGCGAGAGAAGTCTAAGGAGGCGCAGG
p4-5__LEA4-2_Construcción	TCATGCGGAGAAGACGATGGCAAGGACCAAAAAGAGAAGAAGTTGGCCCAAGAGCGAGAGAAGTCTAAGGAGGCGCAGG *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	CCAAAGCTGACCTCCATCAATCCAAGGCTGAGCATGCTGCGGACGCTCAGGTTACGGCCACCATCTTCCCGGTCACCTC
p4-5__LEA4-2_Construcción	CCAAAGCTGACCTCCATCAATCCAAGGCTGAGCATGCTGCGGACGCTCAGGTTACGGCCACCATCTTCCCGGTCACCTC *****
p4-5__LEA4-2_Teórica	ACCTACCCTACCGAGCCACCGGAGCTAATTACCCGCGGGACAGATCTAA
p4-5__LEA4-2_Construcción	ACCTACCCTACCGAGCCACCGGAGCTAATTACCCGCGGGACAGATCTAA *****

Alineamiento entre la construcción teórica p4-5::LEA4-2 y el resultado de la secuenciación de la construcción p4-5::LEA4-2. Los nucleótidos en cursivas representan los remanentes del sitio de recombinación attR1. Los nucleótidos subrayados representan los codones de inicio y término del ORF del gen *AtLEA4-2*.

ANEXO III

Desglose de las categorías en las que se agruparon los diferentes elementos en *cis* encontrados en los promotores. Además, se señala la cantidad de elementos en *cis* encontrados en cada promotor. Tamaño de promotores considerado para el análisis: p4-1 = 1500 pb, p4-2 = 1500 pb, p4-5 = 389 pb. Posteriormente se muestra la distribución de todos los elementos en *cis* encontrados en cada promotor y su distancia con respecto al ATG de inicio de la traducción.

Elemento <i>cis</i>		p4-1	p4-2	p4-5	Descripción Detallada
ABA RELATED	ABREATCONSENSUS	2	0	0	Elemento de respuesta a ABA (ABRE) encontrado en el promotor de genes regulados por ABA o estrés.
	ABREATRD22	1	1	0	ABRE encontrado en el gen de respuesta a deshidratación <i>rd22</i> en <i>A. thaliana</i> .
	ABRELATERD1	3	1	2	ABRE requerido para la expresión inducida por etiolación de <i>erd1</i> (respuesta temprana a deshidratación) en <i>A. thaliana</i> .
	ABRERATCAL	2	1	2	Secuencia relacionada con ABREs identificado río arriba de genes regulados positivamente por Ca ²⁺ .
	ACGTABREMOTIFA2OSEM	2	0	1	Elemento con secuencia determinada experimentalmente a partir del en un el elemento ABRE del gen de arroz OSEM.
	DPBFCOREDCDC3	2	1	2	Sitio de unión de factores transcripcionales tipo bZIP como ABI5.
	EMBP1TAEM	1	0	0	Sitio de unión del factor EMBP1 y de factores de unión a ABRE de <i>A. thaliana</i> , inducidos por ABA y diversos tipos de estrés.
HSP RELATED	GADOWNAT	0	0	1	Secuencia presente en genes regulados negativamente por ácido giberélico (GA), expresados durante la germinación de semillas de <i>A. thaliana</i> ; Motivo similar a ABRE.
	CCAATBOX1	4	0	1	Caja encontrada en promotores de <i>Heat Shock Proteins</i> .
TISSUE SPECIFICITY	PRECONSCRHSP70A	1	3	0	Secuencia consenso de elemento de respuesta plástica en el promotor de <i>HSP70A</i> .
	CAATBOX1	7	6	2	Secuencia consenso encontrada en el promotor del gen <i>legA</i> de chícharo.
	CACGTGMOTIF	2	1	1	Sitio de unión de GBF1 y 2, ambos represores, esenciales para expresión de beta faseolina durante embriogénesis.
	CACTFTPPCA1	9	8	2	Componente de MEM1 (módulo de expresión en mesófilo) encontrado en promotor de fosfoenolpiruvato carboxilasa A1.
	CANBNNAPA	0	0	2	Núcleo de elementos (CA) _n en genes de proteínas de almacenamiento de <i>B. napus</i> ; involucrado en la transcripción específica en embrión y endospermo del gen <i>napA</i> .
	DOFCOREZM	9	15	5	Núcleo requerido para la unión de proteínas Dof; PBF es una Dof específica de embrión.
	EBOXBNNAPA	5	7	1	Caja E del gen <i>napA</i> , proteína de almacenamiento en semilla; incluye un consenso Myc.
	GTGANTG10	6	5	2	Elemento encontrado en el promotor de <i>g10</i> , un gen de polen tardío de tabaco.
	IRO2OS	2	1	0	Sitio blanco de OsIRO2, factor inducido exclusivamente por deficiencia de Fe en raíz y tallo.
	NTBBFIARROLB	0	1	0	Sitio de unión de NtBBF1 (Dof de tabaco). Requerido para expresión tejido específica.
	OSE1ROOTNODULE	0	2	0	Motivo característico de elementos específicos de órganos y característico de promotores activados en células infectadas en nódulos de raíz.
	OSE2ROOTNODULE	0	0	3	Uno de las secuencias consenso de elementos específicos de órganos, característico de promotores activados en nódulos de raíces.
	POLASIG1	0	2	0	Señal poli-A encontrado en promotor de <i>legA</i> .
	POLLEN1LELAT52	7	7	0	Uno de dos elementos regulatorios codependientes, responsables de activación del gen <i>lat52</i> , específico de polen; Secuencia requerida para expresión específica en polen.
	RAV1AAT	4	1	2	Secuencia consenso de unión de RAV1, que contiene dominios AP-2 y B3. Expresión alta en hojas de la roseta y raíces.
	RHERPATEXPA7	0	1	0	Parte del elemento específico de pelo radical.
	ROOTMOTIFTAPOX1	4	9	1	Motivo encontrado en promotor de <i>rolD</i> expresado en raíz.
	RYREPEATBNNAPA	2	2	1	Repetido RY con una G-box encontrada en <i>napA</i> ; requerido para expresión específica de semilla; transactivado por ABI3.
	RYREPEATGMGY2	2	2	0	Repetido CATGCAT presente en 5' en gen de <i>Gl2</i> expresado en semillas.
	RYREPEATLEGUMINBOX	2	2	1	Repetido CATGCAY encontrado en proteínas de almacenamiento en semillas.
	SEF1MOTIF	0	1	0	Sitio de unión de SEF1. Encontrado en el promotor del gen de la beta-conglicina acumulada en semilla.
	SPHCOREZMC1	0	1	0	Sitio de unión de VP1, requerido para expresión del programa de maduración en el desarrollo de la semilla.
	TAAAGSTKST1	4	4	2	Sitio blanco de StDof1, controlan la expresión génica en células guarda; Encontrado en promotor de <i>KST1</i> .
	TATABOX2	0	2	0	Caja tata encontrada en región promotora del gen <i>legA</i> y de beta faseolina.
	TATABOX4	0	1	0	Caja TATA encontrada en el promotor de gen de esporamina A y de beta-faseolina.
	WRKY71OS	3	5	3	Núcleo TGAC en caja W. Sitio de unión de WRKY71, un represor transcripcional de la vía de señalización por giberelinas en células de la aleurona.

DROUGHT RELATED	ACGTATERD1	6	7	4	Secuencia ACGT requerida para la expresión inducida por etiolación de <i>erd1</i> (respuesta temprana a deshidratación) en <i>A. thaliana</i> .
	CBFHV	1	1	1	Sitio de unión de CBF1 y CBF2 de <i>H. vulgare</i> . Los CBFs se conocen como proteínas de unión (DREBs) a elementos de respuesta a deshidratación (DREs).
	DRE2COREZMRAB17	1	1	0	Núcleo de DRE2 en el promotor del gen <i>rab17</i> de <i>Z. mays</i> , el cual se expresa durante la embriogénesis tardía y es inducido por ABA.
	DRECRTCOREAT	1	1	1	Motivo núcleo de DRE/CRT, encontrado en muchos de genes de <i>A. thaliana</i> y <i>O. sativa</i> .
GA RELATED	GAREAT	0	1	0	Elemento de respuesta a GA. Presente en genes inducidos por GA, responsivos y no responsivos durante la germinación de <i>A. thaliana</i> .
	MYBGAHV	0	1	0	Elemento central del complejo de respuesta a GA; Similar a los sitios de unión de c-Myb y v-Myb.
GATABOX		3	6	1	Motivo GATA en el promotor 35S; Requerido para expresión en altos niveles, específica de tejidos e inducidos por luz.
GT1GMSCAM4		1	1	0	Motivo encontrado en el promotor de la isoforma del gen <i>CaM</i> de <i>G. max</i> , <i>SCaM-4</i> ; involucrado en la inducción de <i>SCaM-4</i> por sal y patógenos.
LTRE-RELATED	LTREATLT178	0	1	0	Elemento de respuesta a baja temperatura (LTRE) putativo; Encontrado en genes de <i>A. thaliana</i> inducidos por baja temperatura; Repetido 4 veces en los genes <i>cor78</i> and <i>rd29A</i> .
	LTRECOREATCOR15	1	1	1	Núcleo de LTRE en el gen <i>cor15a</i> en <i>A. thaliana</i> ; Responde a ABA.
MYB RELATED	BOXLCOREDCPAL	1	0	0	Consenso de una secuencia parecida a una caja L. DCMYB1 de zanahoria se une a esta región <i>in vitro</i> .
	EECCRCAH1	3	1	1	Motivo consenso de <i>enhancer</i> EE1 y EE2; Sitio de unión del factor MYB LCR1.
	MYB1AT	0	1	0	Sitio de reconocimiento MYB encontrado en el promotor del genes de respuesta a <i>rd22</i> y muchos otros en <i>A. thaliana</i> .
	MYB2AT	1	0	1	Sitio de unión de ATMYB2, un homólogo MYB de <i>A. thaliana</i> .; ATMYB2 está involucrado en la regulación de genes que responden a estrés hídrico.
	MYB2CONSENSUSAT	0	0	1	Sitio de reconocimiento de los MYB encontrado en el gen de respuesta a deshidratación <i>rd22</i> y muchos otros genes en <i>A. thaliana</i> .
	MYBCORE	1	1	0	Sitio de unión de todos los MYB de animales y al menos dos de plantas (AtMYB1 y AtMYB2); ATMYB2 está involucrado en la regulación de genes que responden a estrés hídrico en <i>A. thaliana</i> .
	MYBPLANT	2	0	0	Sitio de unión de MYBs específicos de plantas.
	MYBPZM	5	0	1	Núcleo del sitio consenso de unión de un homólogo de MYB de maíz.
	MYBST1	1	0	0	Núcleo del sitio de unión de MybSt1 (un homólogo de MYB de papa).
LIGHT RELATED	ASF1MOTIFCAMV	0	0	2	Sitio de unión de ASF1 en 35S y en HBP1 del gen <i>H3</i> ; presente en promotores con activación transcripcional debida a auxinas y ácido salicílico. Quizá es relevante en la regulación por luz; estrés biótico y abiótico pueden regularlo diferencialmente.
	BOXIIPCCHS	2	0	0	Núcleo de Caja BoxII/G. Esencial para regulación por luz.
	GBOXLERBCS	1	0	0	Caja G; elemento conservado en genes regulados por luz.
	GT1CONSENSUS	6	5	2	Consenso de sitio de unión de GT-1 en muchos genes regulados por luz.
	GT1CORE	0	1	1	Crítico para la unión de GT-1 a la caja II de <i>rbcS</i> ; correlaciona con secuencias dependientes de luz para transcripción.
	HBOXCONSENSUSPVCHS	0	0	1	Caja H; esencial para regulación por luz y por inducción de elicitor, por heridas y por estrés abiótico.
	IBOX	1	1	0	Secuencia conservada de la caja I en promotores de genes de respuesta a luz.
	IBOXCORE	1	6	0	Secuencia conservada de la caja I en promotores de genes de respuesta a luz.
	IBOXCORENT	1	1	0	Caja I asociada a regiones del promotor de respuesta a luz.
	INRNTPSADB	1	2	0	Elemento iniciador encontrado en el promotor del gen <i>psaDB</i> el cual responde a luz.
	LRENPCABE	1	0	0	Elemento de regulación positiva por luz en tabaco.
	REALPHALGLHCB21	4	0	0	Elemento encontrado en el promotor de <i>LHCB21</i> ; unido por <i>Rea</i> en plantas etioladas.
	SORLIPIAT	1	1	0	Una de las secuencias sobrerrepresentadas en promotores inducidos por luz. Sobrerrepresentado en cotiledones inducidos por luz y genes de raíz.
	TBOXATGAPB	1	0	0	Caja T. Mutantes en la caja T muestran una reducción en la transcripción de genes activada por luz.

Elemento Cis	PB
CACTFTPPCA1	1474
MYBPLANT	1449
BOXLCOREDCPAL	1448
MYBPZM	1447
TAAAGSTKST1	1437
DOFCOREZM	1436
GT1CONSENSUS	1427
TAAAGSTKST1	1425
DOFCOREZM	1424
MYBST1	1420
GATABOX	1419
ROOTMOTIFTAPOX1	1418
INRNTPSADB	1401
GATABOX	1389
ROOTMOTIFTAPOX1	1388
CCAATBOX1	1382
CAATBOX1	1381
ARR1AT	1354
ACGTATERD1	1345
CURECORECR	1343
CURECORECR	1329
RAV1AAT	1326
CACTFTPPCA1	1274
DOFCOREZM	1253
CACTFTPPCA1	1247
RAV1AAT	1241

RYREPEATBNNAPA	1210
RYREPEATGMGY2	1210
RYREPEATLEGUMINBOX	1210
GTGANTG10	1180
ARR1AT	1179
SREATMSD	1171
CACTFTPPCA1	1157
TAAAGSTKST1	1138
DOFCOREZM	1137
CARGCW8GAT	1130
GATABOX	1121
GTGANTG10	1110
WRKY71OS	1109
POLLEN1LELAT52	1104
REALPHALGLHCB21	1091
EBOXBNNAPA	1088
MYB2CONSENSUSAT	1088
MYCCONSENSUSAT	1088
CAATBOX1	1066
MYBCOREATCYCB1	1046
ARR1AT	1026
EBOXBNNAPA	1021
MYCCONSENSUSAT	1021
CAATBOX1	1011
CACTFTPPCA1	1004
RAV1AAT	940
ARR1AT	935

CACTFTPPCA1	920
CAATBOX1	913
ACGTATERD1	903
RAV1AAT	880
ROOTMOTIFTAPOX1	866
D3GMAUX28	865
MYBIAT	856
REALPHALGLHCB21	855
DOFCOREZM	850
SORLIP1AT	845
ANAERO2CONSENSUS	839
POLLEN1LELAT52	776
ANAERO1CONSENSUS	774
AGMOTIFNTMYB2	727
DOFCOREZM	721
LECPLEACS2	714
ROOTMOTIFTAPOX1	708
SREATMSD	657
TATCCAOSAMY	656
CCAATBOX1	653
CAATBOX1	652
GTGANTG10	625
CACTFTPPCA1	619
GTGANTG10	601
GTGANTG10	594
WBOXHVIS01	593
WBOXNTERF3	593

WRKY71OS	593
TBOXATGAPB	591
REALPHALGLHCB21	574
ACGTATERD1	518
CGACGOSAMY3	498
GT1CONSENSUS	494
PRECONSCRHSP70A	475
ARR1AT	474
GT1CONSENSUS	465
GT1CONSENSUS	464
CURECORECR	441
CURECORECR	432
ARR1AT	400
ARR1AT	394
ECCRCAH1	393
E2FCONSENSUS	390
CACTFTPPCA1	378
GATABOX	356
IBOX	356
IBOXCORE	356
IBOXCORENT	356
POLLEN1LELAT52	338
DOFCOREZM	335
SURECOREATSULTR11	332
CCAATBOX1	328
CAATBOX1	327
CACTFTPPCA1	314

GT1CONSENSUS	295
MYBIAT	287
REALPHALGLHCB21	286
CCAATBOX1	254
CAATBOX1	253
POLASIG2	252
MYBIAT	248
MYBST1	217
GATABOX	216
ARRIAT	210
ABREATCONSENSUS	187
ABRELATERD1	186
ACGTABREMOTIFA2OSEM	186
ACGTATERD1	186
BOXIIPCCHS	186
LRENPCABE	186
GATABOX	174

BOXIINTPATPB	173
POLLEN1LELAT52	171
DOFCOREZM	169
ABREATRD22	148
DPBFCOREDCDC3	148
GBOXLERBCS	148
ABREATCONSENSUS	147
ABRERATCAL	147
CACGTGMOTIF	147
EBOXBNNAPA	147
EMBPITAEM	147
IRO2OS	147
MYCCONSUSAT	147
ABRELATERD1	146
ACGTABREMOTIFA2OSEM	146
ACGTATERD1	146
BOXIIPCCHS	146

DPBFCOREDCDC3	129
ABRERATCAL	128
CACGTGMOTIF	128
EBOXBNNAPA	128
IRO2OS	128
MYCCONSUSAT	128
ABRELATERD1	127
ACGTATERD1	127
GTGANTG10	114
WBOXNTERF3	113
WRKY71OS	113
EBOXBNNAPA	108
MYCCONSUSAT	108
CBFHV	101
DRE2COREZMRAB17	101
DRECRTCOREAT	101
LTRECOREATCOR15	100

CGACGOSAMY3	99
RYREPEATBNNAPA	90
RYREPEATGMGY2	90
RYREPEATLEGUMINBOX	90
TATABOX5	75
TATABOXOSPAL	74
POLLEN1LELAT52	26
POLLEN1LELAT52	20
TAAAGSTKST1	13
DOFCOREZM	12
POLLEN1LELAT52	10
GT1CONSENSUS	9
GT1GMSCAM4	9

7

Elementos *cis* encontrados por el servidor PLACE al analizar el promotor del gen *AtLEA4-1*. PB: pares de bases de distancia río arriba a partir codón de inicio de la traducción.

Elemento Cis	PB
GATABOX	1494
CACTFTPPCA1	1492
ERELEE4	1485
-300ELEMENT	1463
DOFCOREZM	1459
POLLEN1LELAT52	1457
DOFCOREZM	1455
CURECORECR	1452
CACTFTPPCA1	1451
CARGCW8GAT	1449
SEF4MOTIFGM7S	1446
GATABOX	1424
GT1CONSENSUS	1424
IBOXCORE	1424
ROOTMOTIFTAPOX1	1420
DOFCOREZM	1408
NODCON1GM	1408
OSE1ROOTNODULE	1408
TATABOXOSPAL	1399
BIHD1OS	1386
DOFCOREZM	1378
DOFCOREZM	1336
NODCON2GM	1297
OSE2ROOTNODULE	1297
ARRIAT	1280
SEF4MOTIFGM7S	1278

TATAPVTRNALEU	1268
CACTFTPPCA1	1262
CACTFTPPCA1	1234
TATABOX4	1217
TATABOX2	1215
CAATBOX1	1174
RBCSCONSensus	1173
CACTFTPPCA1	1163
TAAAGSTKST1	1155
DOFCOREZM	1154
TATABOX5	1143
SEF4MOTIFGM7S	1136
ARRIAT	1122
INRNTPSADB	1119
CAATBOX1	1117
TAAAGSTKST1	1103
DOFCOREZM	1102
POLASIG2	1094
CATATGGMSAUR	1086
EBOXBNNAPA	1086
MYCCONSensusAT	1086
CURECORECR	1069
CARGCW8GAT	1066
GTGANTG10	1057
ERELEE4	1054
ARRIAT	1044
AMYBOX1	1040

GAREAT	1040
MYBGAHV	1040
NTBBFIARROLB	1023
SURE2STPAT21	1008
CACTFTPPCA1	1006
SEF4MOTIFGM7S	989
POLASIG1	972
CAATBOX1	949
CARGCW8GAT	913
POLASIG1	911
S1FBOXSORPSIL21	906
TATABOX2	902
GATABOX	885
ROOTMOTIFTAPOX1	884
INRNTPSADB	869
ROOTMOTIFTAPOX1	858
CATATGGMSAUR	824
EBOXBNNAPA	824
MYCCONSensusAT	824
GTGANTG10	813
WBOXHVIS01	812
WBOXNTERF3	812
WRKY71OS	812
ROOTMOTIFTAPOX1	794
SEF1MOTIF	794
TATABOX5	790
TATABOX5	783

DOFCOREZM	754
POLLEN1LELAT52	752
GT1CONSENSUS	751
GT1GMSCAM4	751
CATATGGMSAUR	725
EBOXBNNAPA	725
MYCCONSensusAT	725
SORLIPIAT	691
GATABOX	669
GT1CONSENSUS	669
IBOXCORE	669
TAAAGSTKST1	667
DOFCOREZM	666
PRECONSCRHSP70A	660
PRECONSCRHSP70A	660
POLASIG2	654
CACTFTPPCA1	638
EBOXBNNAPA	626
MYCCONSensusAT	626
SEF3MOTIFGM	612
RYREPEATBNNAPA	608
RYREPEATGMGY2	608
RYREPEATLEGUMINBOX	608
ROOTMOTIFTAPOX1	588
EBOXBNNAPA	568
MYCCONSensusAT	568
CACTFTPPCA1	554

Elementos *cis* encontrados por el servidor PLACE al analizar el promotor del gen AtLEA4-2. PB: pares de bases de distancia al codón de inicio de la traducción. (Continúa en la página siguiente)

CARGCW8GAT	548
WBOXATNPR1	541
WRKY7IOS	540
CAATBOX1	525
CAATBOX1	513
ARR1AT	499
SEF4MOTIFGM7S	497
CAATBOX1	488
RHERPATEXPA7	455
ACGTATERD1	453
SPHCOREZMC1	449
RYREPEATBNNAPA	447
RYREPEATGMGY2	447
RYREPEATLEGUMINBOX	447
GTGANTG10	432
WBOXNTERF3	431
WRKY7IOS	431
EBOXBNNAPA	427
MYBCORE	427
MYCCONSUSAT	427
GTICORE	417
DOFCOREZM	411
ACGTABOX	391

ACGTATERD1	390
CURECORECR	388
RBCSCONSUSAT	378
RAV1AAT	348
ACGTATERD1	331
ROOTMOTIFTAPOX1	324
MARTBOX	314
ROOTMOTIFTAPOX1	285
CACTFTPPCA1	274
CBFHV	270
DRE2COREZMRAB17	270
DRECRTCOREAT	270
LTREATLTI78	270
LTRECOREATCOR15	269
PRECONSCRHSP70A	269
ROOTMOTIFTAPOX1	256
CACTFTPPCA1	245
WRKY7IOS	233
GATABOX	227
GTICONSUSAT	227
IBOXCORE	227
TAAAGSTKST1	225
DOFCOREZM	224

POLLEN1LELAT52	222
DOFCOREZM	220
POLLEN1LELAT52	218
DOFCOREZM	215
NODCON1GM	215
OSE1ROOTNODULE	215
GATABOX	212
GTICONSUSAT	212
IBOXCORE	212
-300ELEMENT	207
POLLEN1LELAT52	197
ARR1AT	174
ECCRCRAH1	173
SEF3MOTIFGM	152
ACGTATERD1	147
GATABOX	142
ROOTMOTIFTAPOX1	141
GTGANTG10	128
WRKY7IOS	127
ACGTATERD1	123
ACGTABOX	116
ACGTATERD1	115
ABRETRD22	108

DPBFCOREDCDC3	108
ABRERATCAL	107
CACGTGMOTIF	107
EBOXBNNAPA	107
IRO2OS	107
MYCCONSUSAT	107
ABRETRD1	106
ACGTATERD1	106
GTGANTG10	101
GATABOX	99
IBOXCORE	99
SEF3MOTIFGM	96
MYB1AT	60
GATABOX	30
IBOX	30
IBOXCORE	30
IBOXCORENT	30
POLLEN1LELAT52	26
DOFCOREZM	23
POLLEN1LELAT52	8
DOFCOREZM	6

Elementos *cis* encontrados por el servidor PLACE al analizar el promotor del gen *AtLEA4-2*. PB: pares de bases de distancia río arriba a partir codón de inicio de la traducción.

1

Elemento Cis	PB
NODCON2GM	386
OSE2ROOTNODULE	386
GATABOX	379
RYREPEATBNNAPA	374
RYREPEATLEGUMINBOX	374
CAATBOX1	368
POLASIG3	367
CACTFTPPCA1	360
ARR1AT	338
GT1CORE	324
CBFHV	316
DRECRTCOREAT	316
LTRECOREATCOR15	315
TAAAGSTKST1	297
DOFCOREZM	296
CANBNNAPA	291

DPBFCOREDCDC3	288
ABRERATCAL	287
CGCGBOXAT	286
RAV1AAT	280
DOFCOREZM	256
CANBNNAPA	247
RAV1AAT	246
DPBFCOREDCDC3	244
ABRERATCAL	243
CACGTGMOTIF	243
EBOXBNNAPA	243
MYCCONSENSUSAT	243
ABRELATERD1	242
ACGTATERD1	242
CCAATBOX1	232
CAATBOX1	231
MYB2AT	228

MYB2CONSENSUSAT	228
DOFCOREZM	216
HBOXCONSENSUSPVCHS	212
MYBPZM	212
NODCON2GM	204
OSE2ROOTNODULE	204
NODCON2GM	195
OSE2ROOTNODULE	195
WRKY71OS	184
ACGTATERD1	180
CACTFTPPCA1	174
ASF1MOTIFCAMV	171
TGACGTVMAMY	171
WRKY71OS	171
ABRELATERD1	169
ACGTABREMOTIFA2OSEM	169
ACGTATERD1	169

GADOWNAT	169
ACGTATERD1	155
POLASIG2	151
ROOTMOTIFTAPOX1	145
GTGANTG10	132
ASF1MOTIFCAMV	131
WRKY71OS	131
GTGANTG10	88
ECCRCAH1	36
TAAAGSTKST1	27
DOFCOREZM	26
GT1CONSENSUS	23
DOFCOREZM	20
ARR1AT	12
GT1CONSENSUS	6

2

3

4

Elementos *cis* encontrados por el servidor PLACE al analizar el promotor del gen *AtLEA4-5*. PB: pares de bases de distancia río arriba a partir codón de inicio de la traducción.

ANEXO IV
PROTOCOLOS

SOLUCIÓN NUTRITIVA PARA *A. thaliana*

Stocks de soluciones	g en 100 ml de H₂O
Solución 1 – KNO ₃ 1M (MW 101.11)	10.011 g
Solución 2 – KH ₂ PO ₄ 1M (MW 136.09)	13.609 g
Solución 3 – MgSO ₄ 1M (MW Anh 120.3)	24.64 g
Solución 4 – Ca(NO ₃) ₂ 1M (MW 236.15)	23.61 g
Solución 5 – FeEDTA 20 mM (MW 367)	0.734 g
Solución 6 – Micronutrientes	*

*Stock de micronutrientes	g en 100 ml de H₂O
H ₃ BO ₃ 70mM (MW 61.83)	0.42 g
MnCl ₂ 14mM (MW 197.91)	0.276 g
CuSO ₄ 0.5mM (MW 249.68)	0.012 g
ZnSO ₄ 1mM (MW 287.44)	0.028 g
Na ₂ MoO ₄ 0.2 mM (MW 241.96)	20 µl de stock 1M
NaCl 10 mM (MW 58.44)	0.584 g
CoCl ₂ 0.01mM (144.95)	1 µl de stock 100 mM

Solución Nutritiva de Plantas (Hugh)	ml de stock / litro de solución
KNO ₃ 1M	5.0
KH ₂ PO ₄ 1M pH = 5.6	2.5
MgSO ₄ 1M	2.0
Ca(NO ₃) ₂ 1M	2.0
FeEDTA 20mM	2.5
Micronutrientes	1.0

REACCIONES DE RESTRICCIÓN

Para cortar el promotor 35S del vector pK2GW7, o el p4-5 del vector p4-5::pJET:

Reactivo	Volumen
H ₂ O esterilizada	15.5 µl
10X Buffer Tango	2 µl
DNA sustrato (plásmido)	1 µg
<i>SacI</i> (10 U/µl)	0.5 µl
<i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>) (10 U/µl)	1 µl
Volumen Total	20 µl

- Cortar las bandas deseadas y purificar mediante el kit GeneJET Gel Purification Kit (Thermo Scientific, #K0831).

LIGACIÓN DEL PROMOTOR p4-5 EN pK2GW7 SIN 35S

- Calcular los ng de inserto a utilizar de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ng(inserto) = \frac{5 \times Kb(inserto) \times ng(vector)}{Kb(vector)}$$

- Mezclar en un microtubo Eppendorf:
 - 2 µl de Buffer para T4 Ligasa 10X.
 - 1 U de enzima T4 Ligasa (5 U/ µl).
 - X µl inserto (p4-5)
 - Y µl vector (20-100 ng del vector pK2GW7 sin 35S)
- Aforar la reacción a 20 µl con H₂O destilada estéril.
- Incubar 20 min a 22°C.
- Transformar *E.coli* DB3.1 quimiocompetentes con toda la reacción de ligación.

REACCIONES DE RECOMBINACIÓN POR GATEWAY

Para recombinar el vector p4-5::pK2GW7 con los vectores pENTR ligados a los ORF de las LEAs:

Reactivo	Volumen
p4-5::pK2GW7	1000 µg (~3 µl)
LEA4-*::pENTR	100 µg (~1 µl)
LR Clonase Mix	1 µl
Volumen Total	5 µl

- Dejar incubando la reacción toda la noche a temperatura ambiente.
- Agregar 1 µl de proteinasa K e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- Transformar *E.coli* DH5α quimiocompetentes con toda la reacción de recombinación.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- Pesar 1 gr de agarosa ultrapura en un matraz.
- Disolver completamente en 99 ml de Buffer TBE 0.5X en microondas

Solución TBE 5X

Reactivo	Volumen
Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M pH 8	20 mL
H₂O	Aforar a 1 litro

- Enfriar hasta ~50°C
- Agregar 5 µl de bromuro de etidio
- Verter la agarosa en la charola de gelificación y colocar los peines para pozos.
- Dejar gelificar por 30 minutos.
- Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar buffer TBE 0.5X hasta cubrir el gel.
- Mezclar encima de papel parafilm 5 µl de muestra con 1 µl de buffer de carga.
- Cargar los 6 µl de muestra en un pozo. Proceder igual para todas las muestras.
- Cargar 1 µl de marador de peso molecular de DNA.

- Conectar la cámara y dejar corriendo a ~90 V por 30 minutos.
- Fotografiar el gel en fotodocumentador.

TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* QUIMIOCOMPETENTES

- Descongelar una alícuota de *E. coli* quimiocompetentes lentamente en hielo por 10 minutos.
- Agregar 50 µg de DNA plasmídico purificado (o el volumen entero de las reacciones de ligación o recombinación) e incubar en hielo 5 minutos.
- Dar un shock térmico a 42 °C durante 1 minuto.
- Pasar a hielo durante 1 minuto.
- Repetir los dos pasos anteriores
- Agregar 1 ml de LB líquido estéril.
- Recuperar durante 1 hora a 37°C en agitación constante.
- Plaquear 100 µl y 900 µl en LB adicionado con el antibiótico para seleccionar el plásmido.
- Incubar durante 1 día a 37 °C.

TRANSFORMACIÓN DE *A. tumefaciens* QUIMIOCOMPETENTES

- Descongelar una alícuota de *A. tumefaciens* quimiocompetentes lentamente en hielo por 10 minutos.
- Agregar 1 µg de DNA plasmídico e incubar en hielo 5 minutos.
- Congelar en N₂ líquido 1 minuto.
- Descongelar e incubar a 37°C por 3 minutos.
- Incubar en hielo por 1 minuto.
- Agregar 1 ml de LB líquido estéril.
- Recuperar durante 2 horas a 28°C en agitación lenta.
- Plaquear 50 µl y 150 µl en LB con gentamicina y/o rifampicina, más el antibiótico para seleccionar el plásmido.
- Dejar creciendo durante 2-3 días a 28 °C.

MINIPREP DE PLÁSMIDOS DE *E. Coli* MEDIANTE LISIS ALCALINA.

Para la purificación de plásmidos, se siguió el protocolo de miniprep por lisis alcalina reportado por Bimboim y Doly (1979), incorporando modificaciones:

Solución I	Conc. Final	Solución II	Conc. Final	Solución III	Conc. Final
Glucosa	50 mM	NaOH	0.2 N	Acetato de K	3.0 M
Tris-HCl	25 mM	SDS	1 %	Ácido acético	11.5 %
EDTA	10 mM				
RNasa	10 µg/ml				

1. Inocular 3 ml de medio LB, adicionado con antibiótico de selección, con la cepa de *E.coli* de donde se extraerá el plásmido. Crecer toda la noche a 37°C con agitación constante.
2. Transferir 1 ml del cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Centrifugar 1 minuto a velocidad máxima. Desechar el sobrenadante. Repetir hasta centrifugar todo el cultivo.
3. Resuspender el pellet en 100 µl de solución I.
4. Agregar 200 µl de solución II. Mezclar suavemente. No incubar más de 5 minutos.
5. Agregar 150 µl de solución III y mezclar.
6. Centrifugar 7 minutos a máxima velocidad.
7. Recuperar el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
8. Agregar 1/10 de volumen de acetato de amonio 10M y 1 volumen de etanol al 70%.
9. Incubar 2 horas a -20°C.
10. Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad y descartar el sobrenadante.
11. Lavar la pastilla con 500 µl de etanol 70%
12. Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad, secar el pellet 15 minutos a temperatura ambiente y resuspender en 40 µl de H₂O.

En caso de requerir plásmido para secuenciar, se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Cat. K0502) de Thermo Scientific.

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO CON CHELEX-100

- Cortar 1 o 2 discos de tejido usando la tapa de tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Agregar 100 μ L de resina Chelex-100 (Bio-Rad) al 5-10%.
- Homogeneizar tejido con un pistilo previamente lavado con etanol absoluto.
- Calentar a 100°C durante 5-10 minutos, cuidando de que los tubos no se abran.
- Centrifugar 1 min a máxima velocidad.
- Transferir aproximadamente 20 μ L del sobrenadante a tubos nuevos rotulados.
- Almacenar a -20°C.
- Utilizar 1-2 μ L de este sobrenadante por reacción de PCR.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR LOWRY

Soluciones:

- A. Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N (1 g de Na_2CO_3 + 0.5 mL NaOH 10N. Aforar a 50 mL con H_2O)
- B. $\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%
- C. $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 2%
- D. Soluciones A:B:C en proporción 10:0.1:0.1

Procedimiento:

- A 200 μ L de muestra agregar 1 mL de buffer D.
- Agitar e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Agregar 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N.
- Agitar e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Leer absorbancia en espectrofotómetro a 750 nM.

Nota: Durante la extracción de proteína debe de separarse 1/5 de la muestra antes de agregar acetato de amonio 0.1M y se procesa de la misma manera. Se resuspende en 30 μ L de NaOH 1N y esta muestra es la que se utiliza para la cuantificación.

ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Reactivo	Volumen para gel	Volumen para concentrador
Acrilamida/Bis-acrilamida (30:0.8)	2.5 mL	0.333 mL
Tris 1M pH8.8	1.875 mL	0.312 mL
SDS 10%	50 µL	25 µL
TEMED	4.25 µL	1.25 µL
Persulfato de Amonio 10%	20 µL	25 µL
H ₂ O	0.54 mL	1.8 µL

Buffer de corrida 1X

Reactivo	Volumen
Glicina	14.4 g
Tris Base	3 g
SDS 10%	10 mL
H ₂ O	Aforar a 1 litro

Buffer de transferencia 1X

Reactivo	Volumen
Glicina	29 g
Tris Base	5.8 g
Metanol	200 mL
SDS 10%	10 mL
H ₂ O	Aforar a 1 litro

Buffer Laemmle 6X

Reactivo	Volumen
SDS	1.2 g
Azul de bromofenol	6 mg
Glicerol	4.7 mL
Tris 0.5M pH 6.8	1.2 mL
dTT	0.93 g
H ₂ O	2.1 mL

Solución fijadora de proteínas

Reactivo	Volumen
Glicina	29 g
Tris Base	5.8 g
Metanol	200 mL
SDS 10%	10 mL
H ₂ O	Aforar a 1 litro

Solución de Rojo Ponceau 0.1%

Reactivo	Cantidad
Rojo Ponceau	0.05 g
Ácido Acético Glacial	2.5 mL
H ₂ O	Aforar a 50 mL

TBST 5X

Reactivo	Cantidad
Tris 1M pH 8	50 mL
NaCl 5M	150 mL
Tween 20	5 mL
H ₂ O	Aforar a 1 L

- Preparar un gel de poliacrilamida entre dos vidrios moldes utilizando los reactivos anteriores, colocando un gel concentrador en la parte superior con peines para moldear los pozos.
- Colocar el gel con los vidrios en una cámara de electroforesis vertical.
- Llenar la cámara con buffer de transferencia.
- Preparar las muestras de proteína. Para ello, tomar los μL equivalentes a $30 \mu\text{g}$ de proteína, agregar $1 \mu\text{L}$ de buffer Laemmli 6X y aforar a $6 \mu\text{L}$ con H_2O .
- Hervir durante 5 minutos en baño María.
- Centrifugar las muestras 5 segundos a máxima velocidad
- Cargar las muestras en el gel de poliacrilamida. Incluir un carril con $3 \mu\text{L}$ de marcador de peso molecular de proteínas.
- Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder. Correr la electroforesis a 60 volts hasta que las proteínas entren al gel desnaturizante. Posteriormente subir el voltaje a 150 volts. Detener la electroforesis cuando el buffer Laemmli alcance la parte inferior del gel.
- Hacer una cama consistente en fibra de cocina y 3 papeles filtro, todo mojado en buffer de transferencia.
- Al finalizar la electroforesis, retirar con mucho cuidado el gel de poliacrilamida de los vidrios, quitando el concentrador.
- Colocar el gel encima de la cama previamente hecha. Colocar encima una membrana de nitrocelulosa, y cubrir con más papel filtro y otra fibra de cocina.
- Colocar todo el sándwich en un cassette para transferencia. Colocar el cassette en una cámara de transferencia llena de buffer de transferencia.
- Conectar la cámara de transferencia a la fuente de poder. Transferir a 300 mA durante 90 minutos en un cuarto frío.
- Al finalizar la electroforesis, abrir el cassette y con cuidado retirar la membrana de nitrocelulosa. Colocar en una caja Petri cuadrada, con el lado que estuvo en contacto con el gel de poliacrilamida hacia arriba.
- Agregar 10 mL de solución fijadora de proteínas y dejar incubando 1 hora con agitación ligera.

- Retirar la solución fijadora y agregar 10 mL de solución de Rojo Ponceau 0.1%. Incubar 1 minuto con agitación ligera.
- Retirar la solución de Rojo Ponceau y lavar la membrana con H₂O varias veces para quitar el exceso de solución. Las proteínas se teñirán de rojo.
- Colocar la membrana entre dos acetatos y escanearla.
- Lavar con TBST 1X 3 veces por 5 minutos para remover el Rojo Ponceau de las proteínas.
- Proceder a realizar el experimento tipo Western Blot.

MEDIO DE CULTIVO LB

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar* (para medio sólido)	*15 g
H₂O	Aforar a 1 litro

- Disolver los reactivos en H₂O con ayuda de una barra magnética y un agitador magnético.
- Para medio líquido se debe distribuir 3 mL en tubos de ensaye con tapa o 100 mL en matraces Erlenmeyer sellados con algodón.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- Para medio sólido:
 - Enfriar a ~45°C.
 - Agregar antibiótico de selección.
 - Distribuir en cajas Petri (~30 ml)
- Dejar gelificar y almacenar a 4°C.