



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría en Ciencias Bioquímicas

**Localización del transcrito y la proteína del gen *AtLEA4-5* que participa en la respuesta al déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana***

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

Biol. Coral Martínez Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

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

Dr. Chris Wood

Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos, Diciembre 2016



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.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre han estado para mí. Gracias por estar conmigo incondicionalmente en los muy buenos, malos y peores momentos que he tenido. Los amo y admiro demasiado. Esto es gracias a ustedes.

A mi hermano, porque eres el mejor hermano que podría tener. Gracias por preocuparte siempre por mí. Te quiero mucho hermanito.

A Luis, por todo el apoyo que me has dado durante este bonito y difícil camino. Gracias por sacrificar tus fines de semana y algunas vacaciones con tal de que no me quedara solita cuando tenía que trabajar en esas fechas. Te quiero mucho.

A Ale, porque después de 5 años de estar en el laboratorio siempre he recibido tu apoyo tanto académica como personalmente. Gracias por la confianza que has depositado en mí todos estos años. Te quiero jefa.

A Pepe, porque siempre estas para nosotros cuando necesitamos un consejo, una crítica o simplemente que alguien nos escuche. Te quiero.

A Miguel, Cesar y Lupita por todas las risas y los buenos momentos vividos durante este tiempo de conocerlos. Gracias Mike, porque a pesar de todo siempre he recibido tu ayuda, aún con tu cara de no tengo amigos. Gracias Cesar, por apoyarme tanto académica como personalmente que lo necesité. Gracias Lupita por todo el apoyo y las sonrisas que siempre me causaste, nunca cambies. Los quiero mucho y les deseo lo mejor siempre.

A Betty, porque en ti encontré una gran amiga. Gracias por estar a mi lado en todo momento. Te quiero mucho. Éxito en todo lo que sigue.

A Sofía, porque las veces que me apoyaste cuando más lo necesitaba. Sigue adelante siempre.

A Yadira por los todas las pláticas, los ánimos y consejos que me brindaste aún cuando te encuentras lejos.

A todos los que conforman el laboratorio: Carlitos, Inti, Rosy, Ponchis, Jenny, Jauma, David, Perruchis, Dante, Caspar... y los que me falten. Gracias por los buenos ratos que siempre se viven dentro y fuera de el. Gracias por el apoyo, los consejos y charlas que me brindaron cada uno de ustedes. ¡Los quiero!

A mi hija académica Dany, por ser mi primera alumna. Sigue con ese entusiasmo siempre. Te quiero.

A mis amigos Paco, Lili y Elena por siempre estar conmigo y recordarme lo capaz que soy. Gracias por animarme en todo momento.

A mis compañeros de la generación de la maestría, por todas las buenas experiencias que vivimos durante este tiempo.

Al Dr. Chris Wood y a la Dra. Berenice García, por ser parte de mi comité tutorial. Gracias por el tiempo que me dedicaron y por todos los consejos que me dieron cada semestre.

Al comité de Sinodales, por el tiempo que me brindaron para revisar esta tesis. Gracias por los consejos y correcciones.

A Guadalupe Zavala, por la asistencia y el buen trato que me diste siempre que necesite de tu ayuda.

Al Laboratorio Nacional De Microscopia Avanzada y sus miembros, por permitirme utilizar sus instalaciones y por la asistencia en la toma de imágenes. Mis agradecimientos especiales a Xochitl Alvarado Affantranger por todos los consejos que me diste y por asistirme siempre en las largas sesiones de tomas de imágenes, a Arturo Pimentel por la ayuda en la reconstrucción de imágenes y a Adán Guerrero por la asesoría en el procesamiento de las imágenes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de Maestría (N° de registro de CVU: 502483) y por otorgarme una beca del proyecto Conacyt221448 para el termino de la Maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos otorgados para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

## ÍNDICE GENERAL

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>13</b> |
| El estrés y las plantas .....  | 13        |
| El déficit hídrico en las plantas .....  | 13        |
| <b>Respuesta de las plantas ante el déficit hídrico</b> .....                                  | <b>14</b> |
| ❖ <i>Cerrado de estomas</i> .....  | 16        |
| ❖ <i>Fotosíntesis</i> .....  | 17        |
| ❖ <i>Disminución del área de las hojas</i> .....   | 18        |
| ❖ <i>Aumento en la extensión de la raíz</i> .....  | 19        |
| ❖ <i>Ajuste osmótico</i> .....   | 19        |
| <b>Genes involucrados en la respuesta y tolerancia al déficit hídrico en las plantas</b> ..... | <b>19</b> |
| ❖ <i>Vía dependiente de ABA</i> .....  | 21        |
| ❖ <i>Vía independiente de ABA</i> .....  | 22        |
| <b>Proteínas involucradas en la respuesta al déficit hídrico</b> .....                         | <b>22</b> |
| ❖ <i>Proteínas LEA típicas (proteínas abundantes de la embriogénesis tardía)</i> .....         | 23        |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | <b>25</b> |
| Proteínas LEA del grupo 4 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                                 | 25        |
| Importancia de la localización de las proteínas LEA en plantas .....                           | 29        |
| <b>MODELO DE ESTUDIO: ARABIDOPSIS THALIANA</b> .....   | <b>32</b> |
| Hipótesis .....  | 33        |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>36</b> |
| Análisis de los promotores de <i>AtLEA4-2</i> y <i>AtLEA4-5</i> .....                          | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Construcciones .....</b>   | <b>36</b> |
| ❖ <i>Fusiones transcripcionales .....</i>   | 36        |
| ❖ <i>Fusiones traduccionales .....</i>  | 37        |
| <b>Material vegetal y condiciones de crecimiento .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>Transformación y obtención de plantas transgénicas.....</b>  | <b>39</b> |
| ❖ <i>Transformación de plantas de A. thaliana .....</i>   | 39        |
| ❖ <i>Selección de líneas transgénicas .....</i>   | 40        |
| <b>Análisis de localización de las líneas p4-5::EGFP-GUS y p4-5::EGFP-AtLEA4-5.....</b>   | <b>40</b> |
| ❖ <i>Etapas de desarrollo y condiciones de crecimiento .....</i>  | 40        |
| ❖ <i>Reacción de GUS y aclaramiento de muestras.....</i>  | 41        |
| ❖ <i>Inclusión de muestras y cortes transversales de raíces p4-5::EGFP-GUS.....</i>   | 41        |
| ❖ <i>Observaciones al microscopio y análisis de imágenes .....</i>  | 42        |
| <b>Experimentos tipo Western.....</b>   | <b>42</b> |
| ❖ <i>Extracción de proteína total.....</i>  | 42        |
| ❖ <i>Electroforesis de proteínas.....</i>   | 43        |
| ❖ <i>Western blot .....</i>   | 43        |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>45</b> |
| <b>Identificación de las regiones de DNA utilizadas como promotores de los genes AtLEA4-5 y AtLEA4-2 para las respectivas construcciones transcripcionales y traduccionales .....</b> | <b>45</b> |
| <b>Construcciones transcripcionales y traduccionales para los genes AtLEA4-2 y AtLEA4-5 .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>Análisis de las líneas p4-5::EGFP-GUS y p4-5::EGFP-AtLEA4-5 en diferentes etapas del desarrollo y en condiciones de estrés. ....</b>   | <b>51</b> |
| ❖ <i>Detección de la fusión EGFP-AtLEA4-5 mediante ensayos tipo western .....</i>   | 53        |
| ❖ <i>Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en raíces de plántulas de 5 y 7 dpg sometidas a estrés salino.....</i>   | 55        |
| ❖ <i>Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en la parte aérea de plántulas de 5 y 7 dpg sometidas a estrés salino.....</i>   | 65        |
| ❖ <i>Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 durante las últimas etapas de la embriogénesis, en embriones maduros y durante la germinación y el establecimiento de la plántula. ....</i>  | 68        |
| ❖ <i>Localización celular de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en células epidérmicas de la radícula de embriones embebidos.....</i>  | 72        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>73</b> |
| <b>Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en diferentes estadios del desarrollo .....</b>  | <b>75</b> |
| ❖ <i>Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en plantas sometidas a estrés salino.....</i>  | 75        |
| ❖ <i>Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en las últimas etapas del desarrollo del embrión, en embriones maduros y durante la germinación y establecimiento de la plántula .....</i>   | 77        |
| ❖ <i>Localización tisular de otras proteínas LEA.....</i>   | 79        |
| ❖ <i>Localización celular de la proteína AtLEA4-5 .....</i>   | 79        |
| ❖ <i>Localización de los transcritos y las proteínas de los otros dos miembros de la familia AtLEA4 en A. thaliana.....</i>   | 80        |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>81</b> |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b> | <b>83</b> |
| <b>ANEXO.....</b>         | <b>90</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Factores que determinan cómo las plantas responden ante un estrés ambiental.<br>.....  | 15 |
| Figura 2. Apertura y cerrado de estomas. ....  | 16 |
| Figura 3. Factores transcripcionales y elementos <i>cis</i> que participan en las vías dependiente e independiente de ABA para la activación de genes que se inducen por estrés abiótico en las plantas. ....  | 20 |
| Figura 4. Gráfico que representa a las proteínas LEA de acuerdo a las propiedades que las definen como hidrofílicas.....   | 23 |
| Figura 5. Patrones de expresión de los transcritos y las proteínas de <i>AtLEA4-1</i> , <i>AtLEA4-2</i> y <i>AtLEA4-5</i> en <i>A. thaliana</i> en flores, durante la embriogénesis, en semillas secas, semillas embebidas, germinación y establecimiento de la planta. ....   | 26 |
| Figura 6. Patrones de expresión de los transcritos y proteínas de plantas de <i>A. thaliana</i> de dos semanas de edad sometidas a tratamientos con ABA o estrés abiótico durante 12 horas. ....   | 27 |
| Figura 7. Análisis fenotípicos de plantas transgénicas adultas correspondientes a la familia LEA 4 en <i>A. thaliana</i> , sometidas a sequía severa. ....   | 28 |
| Figura 8. Esquema que muestra el contexto genómico en el cual se encuentran los genes <i>AtLEA4-2</i> y <i>AtLEA4-5</i> .....  | 45 |
| Figura 9. Esquema que muestra la estrategia seguida para la obtención de las construcciones <i>p4-2::EGFP-GUS</i> y <i>p4-5::EGFP-GUS</i> mediante el uso del sistema Gateway.<br>.....  | 47 |
| Figura 10. Esquema que muestra la sustitución del promotor p35S por los promotores de los genes <i>AtLEA4-2</i> y <i>AtLEA4-5</i> en los vectores <i>pB7WGF2</i> y <i>pH7FWG2</i> . ....   | 50 |
| Figura 11. Esquema que muestra cómo se obtuvieron las construcciones <i>p4-2::EGFP-AtLEA4-2</i> , <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-</i> , <i>p4-2::AtLEA4-2NS-EGFP</i> y <i>p4-5::AtLEA4-5NS-EGFP</i> mediante la recombinación de los vectores de origen <i>AtLEA42::pENTR</i> , <i>AtLEA4-5::pENTR</i> , <i>AtLEA4-2NS::pENTR</i> y <i>AtLEA4-5NS::pENTR</i> con los vectores de destino modificados <i>p4-2::pB7WGF2</i> , <i>p4-5::pB7WGF2</i> , <i>p4-2::pH7FWG2</i> y <i>p4-5::pH7FWG2</i> .. .... | 51 |
| Figura 12. Actividad del promotor del gen <i>AtLEA4-5</i> detectada por tinción histoquímica de GUS en plantas de dos semanas de edad en condiciones óptimas o sometidas a tratamiento con 200 mM de NaCl durante 12-13 h.....   | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 13. Detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 mediante anticuerpos contra la proteína AtLEA4-5 o contra la GFP en plántulas con la construcción <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> de 5 dpv crecidas en condiciones de estrés. ....             | 54 |
| Figura 14. Detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 mediante anticuerpos contra la proteína AtLEA4-5 o contra GFP en semillas con la construcción <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> . ....   | 55 |
| Figura 15. Reconstrucción con imágenes tomadas a lo largo de la raíz de plantas <i>p4-5::EGFP-GUS</i> de 5 dpv en condiciones óptimas de crecimiento.....   | 57 |
| Figura 16. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con <i>p4-5::EGFP-GUS</i> de 5 dpv sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h.....  | 58 |
| Figura 17. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> de 5 dpv en condiciones óptimas de crecimiento.....   | 59 |
| Figura 18. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> de 5 dpv sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h.....   | 60 |
| Figura 19. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con <i>p4-5::EGFP-GUS</i> de 7 dpv en condiciones óptimas de crecimiento.....  | 61 |
| Figura 20. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas <i>p4-5::EGFP-GUS</i> de 7 dpv sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h.....  | 62 |
| Figura 21. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> de 7 dpv en condiciones óptimas de crecimiento.....   | 63 |
| Figura 22. Reconstrucción de imágenes de la raíz de plantas de las líneas con <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> de 7 dpv sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h.....  | 64 |
| Figura 23. Cortes transversales de plantas con <i>p4-5::EGFP-GUS</i> o con <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> en la zona de diferenciación de raíces de plantas 5 de dpv sometidas a 200 mM NaCl por 12-13h.....  | 65 |
| Figura 24. Reconstrucción con imágenes de la parte aérea de plantas con <i>p4-5::EGFP-GUS</i> de 5 dpv de edad, sometidas a NaCl 200 mM por 12-13 h o crecidas en condiciones óptimas.....  | 66 |
| Figura 25. Reconstrucción con imágenes de la parte aérea de plantas <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> de 5 dpv sometidas a NaCl 200 mM por 12-13 h o crecidas en condiciones óptimas.....  | 67 |
| Figura 26. Detalle de la localización de GUS en plantas <i>p4-5::EGFP-GUS</i> y de la fluorescencia de la proteína EGFP en plantas <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i> en primordios foliares de plantas de 5dpv sometidas a 200 mM NaCl por 12-13 horas. .... | 68 |

Figura 27. Localización del GUS y EGFP-AtLEA4-5 en embrión maduro (19-20 dpa), embrión embebido, y en plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpv de las líneas *p4-5::EGFP-GUS* (arriba) o *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*..... 70

Figura 28. Cortes longitudinales de la radícula en los estadios 19-20 dpa, y embrión maduro embebido; y en raíz primaria de plántulas de 1 dpv y cortes longitudinales de hipocótilos de plántulas de 2 y 3 dpv de líneas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* o como control, de líneas con *p35S::GFP*..... 71

Figura 29. Localización celular de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en células epidérmicas de la radícula, en embriones imbibidos de plantas *p4-5::EGFP::AtLEA4-5*..... 72

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Los siete grupos de proteínas LEA y sus características más significativas. ....   | 24 |
| Tabla 2. Características generales de los miembros que componen a la familia 4 de <i>A. thaliana</i> .....  | 25 |
| Tabla 3. Reacciones de recombinación que se realizaron para obtener el set de construcciones necesarias para determinar la localización de los transcritos y proteínas de los genes <i>AtLEA4-2</i> y <i>AtLEA4-5</i> ..... | 38 |
| Tabla 4. Elementos en cis encontrados en cada uno de las regiones promotoras para los genes <i>AtLEA4-2</i> y <i>AtLEA4-5</i> . ....  | 46 |

## RESUMEN

El déficit hídrico o la falta de disponibilidad de agua es un tipo de estrés que afecta el desarrollo y la productividad de las plantas. Cuando la planta se encuentra sometida a este tipo de estrés, se presentan cambios tanto a nivel fisiológico como molecular, uno de los cuales es la acumulación de diferentes proteínas, entre ellas las proteínas abundantes durante la embriogénesis tardía (LEA, del inglés *Late Embryogenesis Abundant*). Las proteínas LEA se acumulan durante los últimos estadios del desarrollo de la semilla y en tejidos de plantas sometidas a condiciones de déficit hídrico. Se han clasificado en siete grupos de acuerdo a la similitud en su secuencia de aminoácidos, y la mayoría se caracteriza por ser hidrofílicas y tener un alto contenido de glicinas y otros aminoácidos pequeños. Estas proteínas juegan un papel importante durante la respuesta al déficit hídrico en plantas; sin embargo poco se sabe acerca de su función y localización en la planta. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* cuenta con 51 proteínas LEA de las cuales el grupo 4 es uno de los más pequeños con solo tres miembros: AtLEA4-1, AtLEA4-2 y AtLEA4-5 y, cuyas plantas mutantes, muestran susceptibilidad ante el déficit hídrico en diferentes estadios del desarrollo. Aunque se piensa que las proteínas LEA pueden llevar a cabo funciones similares, el hecho de que las plantas mutantes en estas proteínas exhiban fenotipos que no son compensados por la presencia de los otros miembros, puede ser debido a que cada una de estas proteínas presenta una distribución espacio-temporal distinta durante el déficit hídrico. Se propuso conocer la localización del transcrito y la proteína de los miembros *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* mediante el uso de genes reporteros como GUS ( $\beta$ -glucoronidasa) y EGFP (proteína verde fluorescente). En este trabajo se presentan los resultados obtenidos para el gen *AtLEA4-5* en plantas transgénicas que contienen las construcciones *p4-5::EGFP-GUS* o *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*. Se detectó la actividad de GUS y la fluorescencia de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 en la raíz primaria, en raíces laterales y en primordios foliares de plántulas de 5 y 7 dpv (días post germinación) sometidas a condiciones de déficit hídrico. Durante las últimas etapas de maduración del embrión, en embriones embebidos, durante la germinación y el establecimiento de la plántula, tanto GUS como EGFP-AtLEA4-5 se detectaron primero en todo el embrión y después en radícula, raíz primaria e hipocótilo. A nivel tisular, la proteína EGFP-AtLEA4-5 se localizó mayoritariamente en haces vasculares en la raíz de plantas de 5 y 7 dpv durante el estrés hídrico; y en epidermis durante la maduración del embrión y en embriones embebidos, así como durante la germinación y el establecimiento de la plántula. A nivel subcelular, esta proteína se localizó en núcleo y citoplasma de células de la epidermis de la radícula de embriones embebidos. Estos resultados indican que tanto el transcrito como la proteína de *AtLEA4-5* muestran una localización similar, y específica de ciertos tejidos, dependiendo del estadio del desarrollo en el cual se encuentre la planta, cuando está sometida a la falta de agua.

## ABSTRACT

Water deficit or lack of water availability is a type of stress that affects plant development and productivity. When plant is subjected to this type of stress, the changes of physiological and molecular levels occur, leading to the accumulation of different proteins, including Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA). LEA proteins accumulate during the last stages of seed development and in vegetative tissues of plants under water deficit. They are classified in seven groups according to the similarity in their amino acid sequence and most of them are characterized as hydrophilic with a high content of glycines and other small amino acids. These proteins play relevant roles during water deficit response in plants; however, little is known about their function and localization in plant organs and tissues. The model plant *Arabidopsis thaliana* has 51 LEA proteins, of which group 4 is one of the smallest with three members only: AtLEA4-1, AtLEA4-2 and AtLEA4-5. Plants deficient in any of the three genes show susceptibility to water deficit during different plant development stages. Although LEA proteins may perform similar functions, the fact that the single loss-of-function mutants exhibit detectable phenotypes that is not compensated by the other members of the group could be explained in part by specific spatio-temporal distribution of each of these proteins in the plant, during water deficit. With the aim to analyze the localization of *AtLEA4-5* transcript and protein we used GUS ( $\beta$ -glucuronidase) and EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) reporter proteins. This work presents the results on *p4-5::EGFP-GUS* and *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* expression in transgenic *Arabidopsis* plants. We detected the GUS activity and EGFP-AtLEA4-5 protein fusion in primary roots, lateral roots and leaf primordia of 5 and 7 dpg (days post germination) in seedlings subject to water deficit. During the last stages of embryo maturation, in embedded embryos, during germination and seedling establishment, GUS and EGFP-AtLEA4-5 were detected first in all embryo and then in radical, primary root and hypocotyl. At tissue level, the EGFP-AtLEA4-5 protein was located in vascular tissue of roots of 5 and 7 dpg during water stress; and in epidermis during embryo maturation and in embedded embryos, as well as during germination and seedling establishment. At cellular level, this protein was located in nucleus and cytoplasm of epidermal cells of radicle in embedded embryos. These results indicate that transcript and protein of *AtLEA4-5* show a similar tissue-specific expression pattern, which depend on the development stage when the plant is subjected to water deficit.

## INTRODUCCIÓN

### **El estrés y las plantas**

Las plantas a lo largo de su ciclo de vida pueden verse sometidas a diferentes tipos de estrés (Nilsen y Orcutt, 1996). El estrés se define como cualquier factor externo que ejerce una influencia negativa en la planta, limitando el funcionamiento óptimo de la misma y, por lo tanto, su crecimiento y productividad. El estrés puede ser del tipo biótico, dado por organismos tales como hongos, bacterias, virus, nematodos o insecto; o del tipo abiótico ejercido por factores ambientales como altas o bajas temperaturas, altas concentraciones de sal en el suelo, falta de agua o déficit hídrico, entre otros. Sin embargo, actualmente algunas actividades antropogénicas también han acentuado la existencia de factores de estrés para las plantas.

Actualmente, el estrés abiótico es la causa principal de la pérdida de millones de hectáreas de cultivo al año, amenazando la sostenibilidad de la industria agrícola (Mahajan y Tuteja 2005, Rowley y Mockler 2011). Estas condiciones ambientales adversas se han agudizado debido al fenómeno del calentamiento global, por la disminución de tierras cultivables debido a la ocupación humana y a la degradación del suelo causada por múltiples factores, principalmente de origen antropocéntrico. Esto último, aunado al aumento de la población humana, a las costumbres alimenticias de las regiones más poderosas económicamente y a las políticas económicas dominantes, entre otras razones, ha provocado un déficit de alimentos (Midgley 2007; Pareek et al., 2010). Por estas razones, resulta inminente el ofrecer alternativas para solucionar el problema agrícola que afecta a la población humana. Una de ellas es brindando diferentes opciones tecnológicas que se puedan adaptar y adoptar en las diversas regiones del mundo. Esta práctica ha existido desde tiempos remotos y, básicamente, ha consistido en la selección de cultivos mejorados para diferentes caracteres de interés utilizando métodos diversos, aunque la gran mayoría fundamentados en el conocimiento de la genética vegetal. Estos métodos de mejoramiento tradicional son los que han generado una gran diversidad de especies vegetales domesticadas y mejoradas capaces de crecer y reproducirse en ambientes adversos o de resistir plagas diversas. Sin embargo, el reto es cada vez mayor y resulta necesario generar mayor conocimiento sobre la respuesta de las plantas ante condiciones de estrés ambiental como la sequía o la inundación, las temperaturas extremas, la elevada intensidad luminosa, las altas concentraciones de sales y metales pesados, etc., lo cual permitirá concebir soluciones más efectivas y adecuadas ante esta problemática.

### **El déficit hídrico en las plantas**

De los diferentes factores físicos en el suelo que afectan el crecimiento y la productividad de la planta, la disponibilidad de agua es una de las más importantes (Kirkham 2005). El agua en las plantas constituye del 80 al 95% de la masa de los tejidos y desempeña funciones fundamentales para la vida en todos los organismos en general (Taiz y Zeiger 1991). Entendemos por déficit hídrico como la disminución en la disponibilidad de agua, lo

cual en las plantas provoca que la tasa de transpiración exceda la toma de agua (Brum 2011). Las plantas requieren agua para un gran número de procesos fisiológicos debido a lo cual una cantidad limitada de agua constituye un factor adverso o estresante e inductor de daños y reacciones en los seres vivos. La falta de agua o el déficit hídrico puede ser causada por bajas o altas temperaturas, por una elevada salinidad en el suelo o por una disminución en las precipitaciones. El estrés hídrico más frecuente en los últimos años ha sido la falta de disponibilidad de agua en el suelo provocado por la sequía. La sequía es la ausencia de lluvias o precipitaciones en un periodo y un área geográfica determinados, donde el agua no es suficiente para abastecer las necesidades de las plantas, los animales y en algunos casos de las poblaciones humanas. La disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes para la producción de cultivos agronómicos y, actualmente, ésta es una de las principales causas de la baja en la producción de estos cultivos (Kirkham 2005; Bray 2007; Moreno 2009).

La falta de agua o déficit hídrico es un tipo de estrés que pueden sufrir las plantas como parte de su programa de desarrollo o por las condiciones ambientales en las que se llegan a encontrar. En los últimos años este tipo de estrés ha cobrado gran importancia debido a los cambios drásticos que han ocurrido en el clima, lo cual ha limitado la productividad de diferentes cultivos. Estas condiciones adversas pueden alterar de diferentes maneras a la fisiología de la planta y, cuando se presenta por tiempos prolongados, el desarrollo y la productividad se pueden ver severamente afectados (Osakabe et al., 2014).

En la célula, el agua permite el transporte intra e intercelular, la difusión de moléculas grandes y pequeñas e influye en la estructura y en la estabilidad de éstas y la falta de agua afecta la fluidez e integridad de la membrana citoplasmática entre otras (Mahajan y Tuteja 2005). Además, algunas proteínas citosólicas pueden disminuir su actividad y, bajo condiciones muy severas, sufrir desnaturalización. La alta concentración que se puede alcanzar de los electrolitos o iones celulares, debido a la falta de agua en el citoplasma, también puede afectar proteínas, ácidos nucleicos y, en consecuencia, el metabolismo celular (Mahajan y Tuteja 2005; Caramelo y Iusem 2009).

### **Respuesta de las plantas ante el déficit hídrico**

Debido a la importancia que tiene el agua en el metabolismo de las plantas, el déficit hídrico afecta rápidamente diversos procesos que van desde la fotosíntesis hasta la respiración. Es por eso que la sensibilidad de las especies de plantas hacia los factores de estrés puede provocar cambios en las comunidades vegetales o su extinción. Debido a esto las plantas a lo largo de la evolución se han adaptado a la disponibilidad de agua que se presenta en su hábitat. De acuerdo al hábitat donde se desarrollan podemos dividir las en tres tipos: hidrófitas, las cuales están adaptadas a vivir total o parcialmente sumergidas en el agua; mesófitas, que están adaptadas a un aporte moderado de agua; y xerófitas, que están adaptadas a ambientes áridos (Nilsen y Orcutt, 1996).

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para contender contra el déficit hídrico. Las adaptaciones que confieren resistencia ante el déficit hídrico se han dividido en dos tipos que incluyen la evitación y la tolerancia a la desecación (Taiz y Zeiger 1991; Bray 2007). En la evitación existen plantas que “escapan” ante esta condición completando su ciclo de vida en épocas de disponibilidad de agua mientras que otras plantas evitan el déficit hídrico mediante diversas estrategias para la adquisición eficiente del agua, como el desarrollo de raíces largas. La evitación también se puede lograr mediante una mejor eficiencia en el uso del agua, como sucede en el caso del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), en el cual los estomas se abren de noche para disminuir la pérdida de agua (Moreno 2009). Por otro lado, en el caso de la tolerancia, podemos encontrar plantas que pueden tolerar un bajo potencial hídrico manteniendo el turgor en las células o que pueden tolerar la deshidratación mediante estrategias bioquímicas y morfológicas que protegen a la célula de daño (Taiz y Zeiger 1991; Bray 2007; Caramelo y Iusem 2009; Kooyers 2015). Las características genéticas de algunas especies que se traducen en propiedades anatómicas, fisiológicas y metabólicas particulares les permiten adaptarse a una supervivencia continua en ambientes áridos o con poca disponibilidad de agua; mientras que otras especies deben ajustarse o aclimatarse a este tipo de estrés para poder sobrevivir. Algunas respuestas en la planta pueden provocar daño por este tipo de estrés, mientras que otras pueden promover adaptaciones fisiológicas y la supervivencia, limitando el daño ocasionado (Bray 2007).

Ante el estrés hídrico, las plantas presentan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Bhatnagar-Mathur et al., 2008). Cuando se habla de mecanismo de respuesta de las plantas ante el estrés hídrico, se debe tomar en cuenta que dependiendo de la especie y el estado de desarrollo en el que se encuentre, éstas pueden responder de manera diferente ante la misma condición (Bray 1997). Con estos factores, la intensidad de la respuesta puede variar tanto en tiempo como en espacio, siendo diferente en los diferentes órganos de la misma planta (Fig. 1).

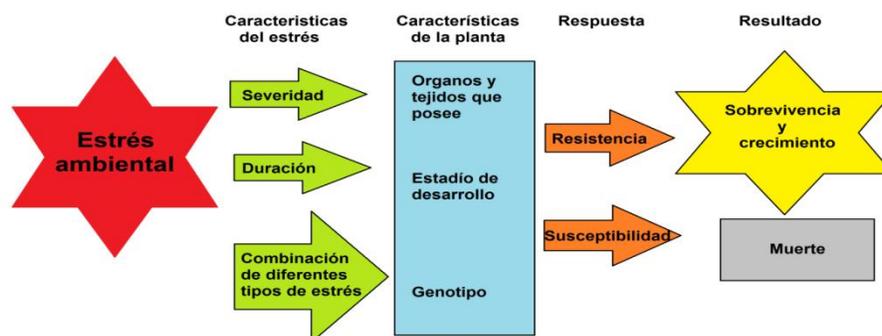


Figura 1. Factores que determinan cómo las plantas responden ante un estrés ambiental. Modificado de Buchanan et al., 2002.

### ❖ Cerrado de estomas

Cuando la planta se enfrenta a una limitación de agua, sus hojas son capaces de responder rápidamente y proteger a la planta de una deshidratación inminente. Las células de la epidermis modificadas conocidas como células guarda, forman un orificio conocido como estoma, cuya apertura se modula por diferentes estímulos ambientales como la intensidad luminosa, los niveles de  $\text{CO}_2$  y la disponibilidad de agua en el ambiente (atmósfera), entre otros. Esta última condición induce un cerrado de los estomas, así como una inhibición de su apertura, para con ello evitar la pérdida de agua (Fig. 2).

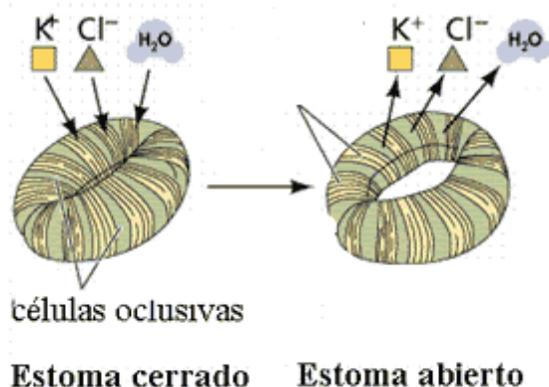


Figura 2. Apertura y cerrado de estomas. Cuando la planta se ve sometida a la falta de agua en el ambiente, la planta puede cerrar (izquierda) los estomas para controlar la salida de vapor de agua. Cuando las condiciones vuelven a ser óptimas en el ambiente, la planta puede volver a abrir los estomas (derecha) para permitir la entrada de dióxido de carbono y la salida de oxígeno y vapor de agua. Imagen tomada y modificada de la web: <https://matragut.wordpress.com/category/2%C2%BA-eso/page/9/>

Es posible distinguir dos fases del cierre estomático en condiciones de déficit hídrico:

- **Cierre hidropasivo.** Ocurre en la etapa inicial donde no interviene ningún proceso fisiológico, sino que se debe a un proceso físico. El aire muy seco provoca pérdidas muy rápidas de agua en la epidermis, lo que hace que disminuya el contenido hídrico relativo de la hoja y de las células oclusivas, provocando el cierre estomático.
- **Cierre hidroactivo.** Se lleva a cabo en una etapa donde la planta se ve sometida a un mayor grado de deshidratación en sus tejidos. Se ven implicados procesos fisiológicos, donde la disminución en la concentración de solutos en las células oclusivas implica un aumento en el potencial hídrico del interior celular; esto provoca que el agua salga al exterior y se lleve a cabo el cierre estomático. Durante este proceso, ocurre una re-distribución diferencial de la fitohormona ácido abscísico (ABA) en las células del mesófilo. Las células guarda presentan receptores que detectan el ABA, lo cual dispara una cascada de señalización que culmina con el cierre estomático. El cierre estomático implica un impedimento en la entrada de  $\text{CO}_2$ , al igual que evita la pérdida de agua por transpiración (Taiz y Zeiger 1991).

El ABA es una hormona que se caracteriza por producirse bajo condiciones de déficit hídrico y juega un papel esencial en la respuesta de las plantas a la sequía y a las altas concentraciones de sal. Participa de manera importante en los procesos de apertura y cierre de los estomas lo cual ayuda a generar una cierta tolerancia ante la limitación de agua. Estos fenotipos se acompañan de la inducción de genes implicados en el cerrado de estomas y de respuesta a estrés (Sauter et al., 2001; Cutler et al., 2010). El ABA se sintetiza en las células del mesófilo y cuando estas células sufren déficit hídrico ocurren diferentes procesos: primero, el ABA producido en las células del mesófilo se libera al apoplasto haciendo posible que el flujo de la transpiración lo dirija hacia las células guarda. A nivel subcelular, el ABA se acumula en los cloroplastos de tal forma que, ante una disminución en el agua disponible, se libera y pasa al citosol en donde regula diferentes canales iónicos, tales como el de  $K^+$ , que es activado e induce la salida de este catión a la célula ayudando a promover la salida de agua, disminuir el turgor de las células guarda, y con ello provocar el cerrado del estoma. Bajo estas condiciones, también se incrementa la síntesis de ABA y su redistribución en la célula, depende del pH intracelular y de la propiedad del ABA de transportarse a través de las membranas como anión pero no como catión (Taiz y Zeiger 1991).

#### ❖ *Fotosíntesis*

Las plantas en condiciones normales se encuentran en un proceso de intercambio de  $CO_2$  y  $O_2$  a través de los estomas. Cuando los estomas se encuentran abiertos, el  $CO_2$  se puede difundir hacia la hoja y el  $O_2$  producto de la fotosíntesis difundirse hacia el ambiente. Sin embargo, cuando los estomas se encuentran abiertos, la planta también pierde agua debido al proceso de transpiración. Durante las primeras etapas del estrés hídrico, el cierre de los estomas provoca que aumente la eficiencia del uso del agua. La fotosíntesis, junto con el crecimiento celular, es uno de los procesos primarios que se ven afectados por el déficit hídrico. Los efectos pueden ser directos, como la disminución de la disponibilidad de  $CO_2$  causada por las limitaciones en la difusión a través de los estomas y el mesófilo o las alteraciones del metabolismo fotosintético donde pueden surgir efectos secundarios como el estrés oxidativo. Este último puede afectar seriamente a la maquinaria fotosintética de la hoja. Estos efectos variarán según la intensidad y la duración del estrés, así como de acuerdo a la edad de la hoja (hojas con más edad se ven más afectadas) y a la especie de la planta (Chaves et al., 2009). La fotosíntesis es menos sensible que otros procesos al estrés hídrico, de modo que raramente la tasa fotosintética de la hoja se ve afectada durante un déficit hídrico leve; sin embargo, durante un estrés hídrico severo, la tasa fotosintética de la planta disminuye a causa de la poca disponibilidad de  $CO_2$ . Por ello, disminuye la actividad de carboxilación de la enzima RuBisCo (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) y aumenta su actividad como oxigenasa, promoviendo la fotorrespiración.

Cuando los estomas están cerrados, la entrada del  $CO_2$  se limita y el  $O_2$  se acumula debido a que no puede ser liberado. Debido a la deficiencia en el agua disponible, la tasa de transporte de electrones y la síntesis de NADPH se reduce, lo cual repercute en la

producción de ATP. Además, todos estos cambios conllevan a una elevación en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) que pueden dañar a la enzima ATP sintasa, entre otras enzimas más (Chaves et al., 2009; Pinheiro y Chaves 2011). Algunas plantas han adaptado sus mecanismos fotosintéticos para contender contra estas complicaciones durante un estrés hídrico severo. Las plantas con metabolismo C4 consiguen resolver estos problemas en condiciones donde el agua está poco disponible, ya que pueden mantener los estomas cerrados e incorporar el CO<sub>2</sub> de manera más eficiente. En el metabolismo C4 hay una separación física entre el proceso de asimilación de CO<sub>2</sub>, que se lleva a cabo en las células del mesófilo y, la reducción de éste a carbohidratos en las células de la vaina perivascular. La ventaja de este proceso radica en el hecho de que, al estar la enzima RuBisCO sólo en las células de la vaina, se impide que reaccione con el O<sub>2</sub> en situaciones en las cuales la concentración de CO<sub>2</sub> sea muy baja, reduciendo considerablemente la pérdida de energía y de CO<sub>2</sub> a través de la fotorrespiración (Taiz y Zeiger 1991; Sage et al., 2012). Otra estrategia que han desarrollado algunas plantas que crecen en ambientes áridos es implementar el metabolismo CAM para la fijación de CO<sub>2</sub>. Este tipo de metabolismo permite a los cloroplastos fijar el CO<sub>2</sub> durante la noche mediante la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en el citosol proceso que, generalmente forma malato el cual se almacena en la vacuola durante la noche cuando los estomas se encuentran abiertos. Durante el día los estomas se cierran y se lleva a cabo la descarboxilación de este compuesto de almacenamiento, lo cual crea una fuente de CO<sub>2</sub> que es asimilado por la enzima RuBisCO en el cloroplasto (Cushman 2001). Del mismo modo que ocurre en el metabolismo C4, el metabolismo CAM suprime la fotorrespiración, aumentando así la eficiencia de la fotosíntesis a temperaturas elevadas en comparación con las plantas C3 (Taiz y Zeiger 1991; Cushman 2001)

#### ❖ *Disminución del área de las hojas*

El área foliar en la planta es importante porque de ella depende la fotosíntesis y una rápida expansión foliar puede afectar negativamente la adaptación a condiciones de poca disponibilidad de agua (Moreno 2009). La baja disponibilidad de agua afecta procesos como el crecimiento de la planta, reduciendo el volumen celular y provocando una disminución en la presión hidrostática o turgor. Si la pérdida de agua se agrava y las células se contraen más, la concentración de solutos aumenta, la membrana plasmática se vuelve más gruesa y se comprime más, lo que deja un menor espacio en la célula. Debido a que la pérdida en la turgencia es el primer evento significativo ante una condición de estrés hídrico, el área de la hoja y la transpiración disminuye, para evitar una mayor pérdida de agua. Esto se considera como una de las primeras reacciones para defenderse contra el déficit hídrico y repercute en procesos como la fotosíntesis y asimilación de CO<sub>2</sub> (Lange et al., 1976; Taiz y Zeiger 1991)

### ❖ *Aumento en la extensión de la raíz*

Las relaciones entre la parte aérea y la raíz dependen de un equilibrio funcional entre la absorción de agua por la raíz, la fotosíntesis y la transpiración que se llevan a cabo en la parte aérea. Este equilibrio se modifica cuando la disponibilidad de agua disminuye y el desarrollo de la raíz se afecta en menor grado que el de la parte aérea que disminuye su crecimiento mientras que las raíces lo continúan en búsqueda de agua hacia zonas más profundas del suelo. Sin embargo, el déficit hídrico también afecta el desarrollo de la raíz, ya que existe una relación entre el agua disponible en la tierra y el tamaño que puede alcanzar la misma. Este crecimiento del sistema radicular es una segunda línea de defensa contra la sequía y varía dependiendo de la especie vegetal así como de la severidad del estrés (Nilsen y Orcutt 1996).

### ❖ *Ajuste osmótico*

A nivel celular, otra respuesta que le permite a la planta contender con esta situación adversa es el ajuste osmótico. El ajuste osmótico evita una disminución en el turgor de los tejidos al mantener el estatus hídrico de las células mediante la acumulación de osmolitos y, con ello, el funcionamiento de diversos procesos críticos para continuar, aunque a una tasa menor, con su crecimiento y desarrollo. Durante el ajuste osmótico se da la acumulación de dos tipos de osmolitos: iones y compuestos orgánicos. La acumulación de iones como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$  durante el ajuste osmótico ocurre principalmente en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos o compuestos orgánicos. Los solutos que comúnmente se acumulan en las plantas dependen de la especie; sin embargo, todos ellos se caracterizan por tener una alta solubilidad y no ser tóxicos a la célula por lo que se les conoce como osmolitos compatibles. Estas características fisicoquímicas les da la capacidad de proteger a macromoléculas (e.g. proteínas) y estructuras celulares (e.g. membranas) (Moreno 2009; Chen y Jiang 2010). Entre los compuestos que poseen estas propiedades están los polioles (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de ciertos aminoácidos. Una consecuencia metabólica y fisiológica del ajuste osmótico es que la planta invierte una proporción significativa de sus esqueletos de carbono en la síntesis de los osmolitos necesarios para ello, a costa de la eficiencia en otros procesos.

### **Genes involucrados en la respuesta y tolerancia al déficit hídrico en las plantas**

Además de que el estrés por déficit hídrico induce una serie de cambios a nivel fisiológico y celular, también se lleva a cabo una respuesta a nivel molecular. La respuesta al déficit hídrico involucra vías de señalización intracelular, complejos de regulación transcripcional y sistemas de comunicación intercelular. Estas respuestas están íntimamente relacionadas; algunas de ellas son consecuencia de la acumulación o reducción de los niveles de ciertas proteínas o de su actividad, lo cual a su vez dependerá de la inducción o represión de la expresión genética, de la estabilidad de sus RNA mensajeros, de la eficiencia de la traducción de los mismos, de la activación o inhibición de su actividad,

etcétera. A pesar de que existe evidencia de una regulación a diferentes niveles, la alta proporción de transcritos cuyos patrones de acumulación se modifican en respuesta a estas condiciones de estrés ha llevado a sugerir que la respuesta a déficit hídrico se modula mayoritariamente a nivel transcripcional (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007).

Durante la respuesta de la planta, se ha visto que la hormona ABA actúa como un mensajero entre el estímulo estresante y la respuesta a nivel molecular. Sin embargo, también se han detectado genes implicados en la respuesta de las plantas al déficit hídrico cuya expresión no se induce por el ABA, lo que indica que esta respuesta puede ser dependiente y/o independiente del ABA (Fig. 3).

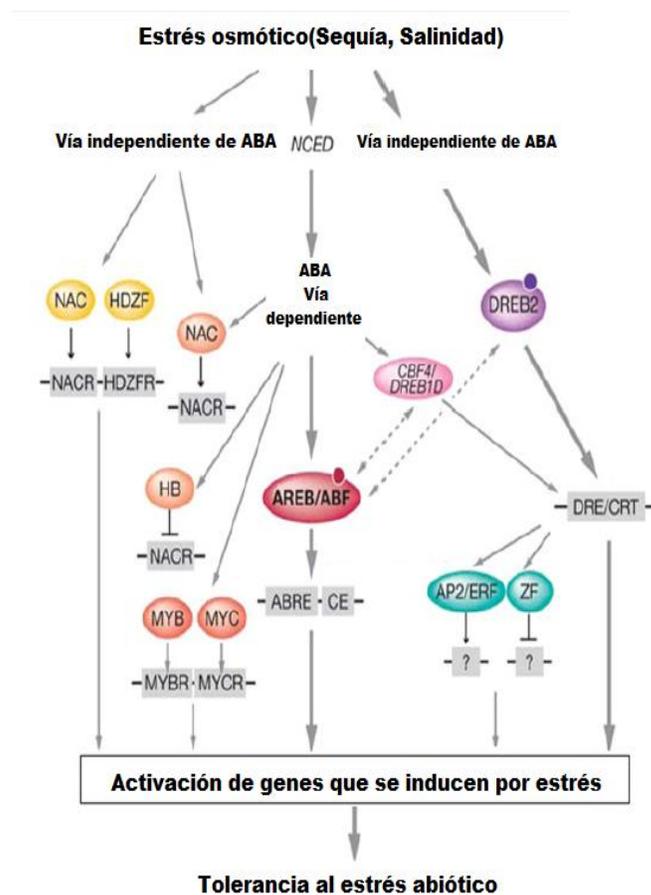


Figura 3. Factores transcripcionales (óvalos) y elementos *cis* (rectángulos) que participan en las vías dependiente e independiente de ABA para la activación de genes que se inducen por estrés abiótico en las plantas. Las flechas en color gris representan las principales vías de señalización que participan y que a su vez regulan muchos genes río abajo. Las flechas discontinuas en color gris indican interacciones entre proteínas de diferentes vías. Tomado y adaptado de Roychoudhury et al., 2013.

Los genes inducidos por el déficit hídrico pueden ser clasificados en dos grupos. El primer grupo incluye a proteínas reguladoras involucradas en modular la expresión genética tras recibir la señal a través de proteínas como cinasas, fosfatasa, proteínas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos, componentes en la señalización por ABA, factores transcripcionales(FT), entre otras. El segundo grupo incluye a aquellas proteínas efectoras

que funcionan durante el estrés como chaperonas, proteínas protectoras como las proteínas LEA (del inglés *Late Embryogenesis Abundant*), proteínas de unión a mRNA, proteínas involucradas en el transporte de carbohidratos y de agua, enzimas desintoxicadoras, inhibidores de proteasas o proteínas involucradas en la transferencia de lípidos, entre otras muchas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006). A la fecha, gracias al estudio de perfiles génicos mediante el uso de cDNA y microarreglos, se conocen una gran cantidad de genes cuya expresión se afecta por esta condición de estrés, de forma dependiente o independiente de ABA, a través de elementos que actúan en *cis* o en *trans* en sus regiones regulatorias (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2007; Huang et al., 2012)

#### ❖ *Vía dependiente de ABA*

La hormona ABA regula varios aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la tolerancia a la desecación de semillas y la latencia de las mismas (Fujita et al., 2011), desempeñando un papel crucial en la planta ante la respuesta al estrés abiótico. Una proporción significativa de los genes que se inducen por déficit hídrico también se inducen por la aplicación de ABA y, en mutantes que son deficientes en la biosíntesis de ABA o en la transducción de señales mediada por esta hormona, la expresión de varios genes de respuesta a déficit hídrico se reduce significativamente; esto resalta la importancia de la vía dependiente de ABA en las respuestas transcripcionales al déficit de agua (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006). Análisis de mutantes afectadas en la síntesis del ABA de *Arabidopsis* (*aba3* y *aba1*) muestran fenotipos de sensibilidad a condiciones de estrés osmótico demostrado que ABA desempeña un papel central en la respuesta de las plantas al mismo. Adicionalmente, la expresión de genes de respuesta a estrés osmótico o frío, tales como *RD29A*, *rd22*, *COR15A*, *COR47* y *P5CS*, se ve severamente reducida o completamente bloqueada en estas mutantes. Actualmente se sabe que existe una gran cantidad de genes cuyos niveles de expresión están mediados por ABA y, que esta regulación requiere de otros elementos que definen si la activación o la represión de un gen determinado se lleva a cabo (Narusaka et al., 2003).

La mayoría de los genes que responden a ABA presentan en su región promotora un elemento denominado ABRE (elemento de respuesta a ABA) con la secuencia ACGTGG/TC; sin embargo, en varios casos uno solo de estos elementos no es suficiente para que la activación por esta hormona ocurra (Uno et al., 2000). Los principales factores de transcripción que activan la expresión génica a través de los elementos ABRE son las proteínas/factores de unión a ABRE (AREBs / ABFS) (Fujita et al., 2011). Aunque el elemento ABRE parece ser el que prevalece en los genes regulados por ABA, existen otros elementos *cis* que también reciben la señalización mediada por esta hormona. Tal es el caso de los elementos MYC y MYB, los cuales unen a los factores transcripcionales de donde proviene su nombre (MYC y MYB). Los elementos de unión para estos factores transcripcionales se han identificado en genes que poseen también elementos ABRE, lo que indica que en algunos genes existe algún modo de cooperatividad entre estos factores transcripcionales y/o que los genes de respuesta pasan por más de una etapa de

inducción, quizás para reforzar la respuesta de la planta ante ciertas condiciones ambientales. Cabe mencionar que la función de estos factores en la respuesta de las plantas al estrés y al ABA se ve apoyada por observaciones como la sobre-expresión de ciertos FT como AtMYC2 y AtMYB2, que no sólo dan un fenotipo hipersensible a ABA en la planta, sino que también mejoran la tolerancia al estrés osmótico (Pareek et al., 2010).

#### ❖ *Vía independiente de ABA*

Existe una gran variedad de genes que se regulan por esta vía. Un ejemplo es el gen *RD29A/COR78/LTI78* de *Arabidopsis* que se induce en sequía, frío y en presencia de ABA exógeno; sin embargo también se induce en mutantes en la síntesis o señalización de ABA sometidas a frío o sequía (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006). Los análisis del promotor de este gen en diferentes especies vegetales muestran una secuencia conservada de 9 pb (TACCGACAT), denominada DRE (elemento de respuesta a deshidratación), que actúa como un elemento en *cis* esencial para que un gen determinado se active por déficit hídrico de manera independiente del ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 2000). Por lo tanto, el elemento DRE se ha encontrado en las regiones promotoras de otros muchos genes inducidos por sequía, salinidad o frío. Los factores transcripcionales responsables de este tipo de activación que se unen a los elementos DRE pertenecen a la familia de factores de transcripción llamada ERF/AP2, la cual comparte un dominio conservado con otros factores transcripcionales de esta familia, como aquéllos que regulan el desarrollo de la flor. Se han identificado varios factores de este clado que se han clasificado como CBF/DREB1 y DREB2 y ambos factores se unen a los elementos DRE/CRT; sin embargo, los factores DREB1/CBF se activan en condiciones de frío mientras que el factor DREB2 está implicado en la expresión de genes de respuesta a sequía. Esto indica que estos son capaces de discriminar a sus genes blanco por su interacción con otras proteínas reguladoras, antes o durante su unión a la región promotora de los mismos (Huang et al., 2012; Kuromori et al., 2013).

#### **Proteínas involucradas en la respuesta al déficit hídrico.**

Existen macromoléculas cuya abundancia correlaciona con la contención del estrés en las plantas; este es el caso de cierto grupo de proteínas que se acumulan abundantemente en la fase tardía de la embriogénesis, cuando la semilla entra en el proceso de pérdida de agua. Esta pérdida de agua es una etapa obligada en el desarrollo de las semillas ortodoxas, sin la cual el embrión es incapaz de germinar y, por tanto, de generar individuos viables. A este grupo de proteínas se les ha llamado proteínas abundantes de la embriogénesis tardía o proteínas LEA. En general, son proteínas pequeñas como es el caso de las proteínas pequeñas de choque térmico (o *small Heat Shock Proteins*, sHSPs) como Hsp26, Hsp21 y Hsp22. (Wise, 2003). Se han clasificado en dos sub-grupos de acuerdo a sus características físico-químicas, proteínas LEA típicas y atípicas. Las proteínas LEA atípicas se caracterizan por estar formadas en su mayoría por aminoácidos hidrofóbicos adquiriendo una estructura globular mientras que las proteínas LEA típicas se caracterizan

por su alto contenido en aminoácidos cargados e hidrofílicos, lo que predice una elevada flexibilidad estructural que promueve su despliegue en solución acuosa.

❖ *Proteínas LEA típicas (proteínas abundantes de la embriogénesis tardía)*

Las proteínas LEA típicas son proteínas que originalmente fueron identificadas en plantas (Dure y Galau 1981); sin embargo, actualmente se han identificado algunas proteínas similares en organismos pertenecientes a otros dominios taxonómicos en donde también se les ha encontrado asociadas a condiciones de estrés (Hand et al., 2011). Estas proteínas presentan propiedades fisicoquímicas que las distinguen de la mayor parte de las proteínas, como su elevada hidrofiliidad y un alto contenido de aminoácidos pequeños, particularmente, glicina pero también serina o alanina. Estas características las incluyen en un grupo más amplio de proteínas denominadas 'hidrofilinas', cuya abundancia se relaciona con condiciones de déficit hídrico en cualquier organismo en donde se presenten (Fig. 4). Las hidrofilinas presentan una amplia distribución y se han descrito en todos los dominios de la vida, desde procariotas y arqueas hasta animales (Battaglia et al., 2008). Aunque su función *in vivo* se desconoce, existe evidencia "*in vitro*" que indica que se encuentran involucradas en la tolerancia a la desecación protegiendo proteínas y, en algunos casos, membranas (Cuevas-Velázquez et al., 2016; Hundertmark et al., 2010; Reyes et al., 2008; Reyes et al., 2005). Por otro lado, se ha sugerido que las LEA pueden actuar como secuestradores de iones o como asistentes en el plegamiento de otras proteínas cuando la célula se encuentra bajo condiciones de escasez de agua (Olvera-Carrillo et al., 2010; Battaglia et al., 2008).

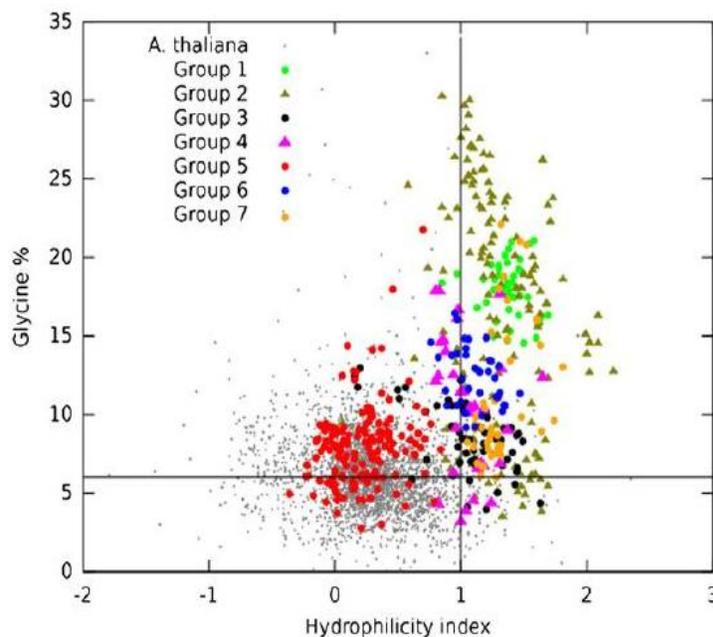


Figura 4. Gráfico que representa a las proteínas LEA de acuerdo a las propiedades que las definen como hidrofilinas. Este gráfico incluye datos de 378 proteínas LEA de diversas plantas. Los puntos ubicados en el cuadrante superior derecho corresponden a proteínas LEA que se consideran como hidrofilinas según su definición. Los puntos grises corresponden a 3,000 proteínas de Arabidopsis escogidas al azar como referencia. Tomado de Battaglia et al., 2008.

Si bien existen varias clasificaciones, en este trabajo se seguirá la propuesta dada por Battaglia et al. en 2008, en la cual las proteínas LEA se clasifican en siete grupos en base a la similitud en su secuencia de aminoácidos (Tabla 1). Esta clasificación muestra motivos conservados característicos de cada grupo y especies analizadas. Para cada grupo el número de miembros es diferente y varía en función de las especies de plantas analizadas (Olvera-Carrillo et al., 2010).

**Tabla 1. Los siete grupos de proteínas LEA y sus características más significativas. Los recuadros en morado corresponden al sub-grupo de las LEAs típicas mientras que el recuadro en azul corresponde al único grupo de proteínas LEA atípicas. Los nombres entre paréntesis corresponden a los originalmente asignados por Dure et al. (1989), o bien, los que se asignaron a las proteínas que inauguraron al grupo correspondiente (Battaglia et al., 2008).**

| Grupo                         | Características  |
|-------------------------------|--|
| 1<br>(D-19)                   | Representado principalmente por las proteínas D-19 y D-132 de semillas de algodón, que fue donde se encontraron en un principio. Contienen una gran proporción de residuos cargados y un alto contenido de glicinas (18%). Se predice que pueden formar una estructura desordenada tipo <i>random coil</i> . En plantas, éstas se acumulan principalmente durante la embriogénesis en el período de desecación de la semilla y en órganos bajo deshidratación como el polen.   |
| 2<br>(D-11)                   | A las proteínas en este grupo también se les conoce como dehidrinas. Fueron identificadas originalmente como el grupo D-11 en embriones de algodón. Son altamente hidrofílicas y contienen una gran cantidad de aminoácidos cargados o polares. Poseen un motivo conservado de 15 residuos, rico en lisinas denominado el segmento K.  |
| 3<br>(D-7/D-29)               | Se caracterizan por tener un motivo de 11 aminoácidos que se predice forma una estructura $\alpha$ -hélice anfipática. Existen muchas diferencias en el peso molecular de los miembros de esta familia debido a que este motivo se puede encontrar repetido varias veces. Además, se encuentran otros motivos conservados en el subgrupo D-7 y el un motivo en el subgrupo D-29, los cuales pueden o no estar repetidos y su secuencia de aminoácidos es distinta al 11-mero.  |
| 4<br>(D-113)                  | Este grupo de proteínas se encuentra conservada en su porción N-terminal, la cual abarca de 70 a 80 aminoácidos formando una $\alpha$ -hélice anfipática, mientras que la porción C-terminal es variable en cuanto a tamaño formando estructuras tipo <i>random coil</i> . Se dividen en dos sub-grupos debido a la ausencia de o presencia de un motivo.  |
| 5<br>Hidrofóbicas o atípicas. | Contienen un alto porcentaje de residuos hidrofóbicos y adquieren una estructura globular.   |
| 6<br>(PvLEA 18)               | Grupo que surgió tras el descubrimiento de la proteína LEA 18 en <i>Phaseolus vulgaris</i> . Se han identificado 36 miembros de esta familia en diferentes especies de plantas vasculares. Se caracterizan por su tamaño pequeño (7-14 kDa) y presentan 3 motivos , y pueden presentar un motivo característico adicional. La secuencia LEDYK presente en uno de los motivos y los aminoácidos prolina y treonina en la posición 6 y 7 de otro motivo se encuentran 100% conservada en todos los miembros de este grupo.   |
| 7<br>(ASR1)                   | Este grupo incluye las proteínas denominadas ASR (del inglés <i>ABA, stress and ripening-induce proteins</i> ; proteínas que se inducen por ABA y maduración) ya que éstas cumplen con todas las características fisicoquímicas (hidrofilicidad) y de acumulación que son comunes a las proteínas LEA típicas (se acumulan en semilla seca y bajo condiciones de déficit hídrico). Se han identificado muchos genes ASR en monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas como <i>Pinus taeda</i> y <i>Ginkgo biloba</i> . Poseen un motivo putativo de localización nuclear en la región C-terminal. |

## ANTECEDENTES

### Proteínas LEA del grupo 4 en *Arabidopsis thaliana*

El presente trabajo se llevó a cabo con uno de los miembros del grupo 4 en *A. thaliana*, cuya caracterización inicial fue reportada por Olvera-Carrillo et al., (2010). Este grupo se caracteriza por ser uno de los más pequeños dentro de *A. thaliana* con sólo 3 miembros identificados (Tabla 2). Las proteínas en este grupo presentan un alto contenido de alanina, de treonina y de glicina, y se predice que en su dominio N-terminal (en las posiciones 70-80) puede formar  $\alpha$ -hélices, en tanto que en el dominio C-terminal, de longitud variable, se predice una estructura desordenada o con plegamiento azaroso (*random coil*).

Tabla 2. Características generales de los miembros que componen a la familia de proteínas LEA4 de *A. Thaliana*. En la tabla se indica el número de aminoácidos, el peso molecular, el punto isoeléctrico, el cromosoma en el que se encuentran y la estructura que se predice para cada una de las proteínas que conforman esta familia. Las figuras del lado izquierdo indican la estructura predicha para estas proteínas; las líneas curvadas de color negro indican la formación de  $\alpha$ -hélices en el amino terminal mientras que las líneas rectas con puntos azules indican un plegamiento azaroso o "*random coil*" en el carboxilo terminal. Tomado de Olvera-Carrillo 2010b.

| Miembros  | Características |                      |                    |           |   |
|-----------|-----------------|----------------------|--------------------|-----------|---|
|           | # Aminoácidos   | Peso molecular (kDa) | Punto isoeléctrico | Cromosoma | Estructura (predicha)   |
| AtLEA 4-1 | 134             | 14.9                 | 8.95               | 1         |    |
| AtLEA 4-2 | 97              | 10.5                 | 9.67               | 2         |  |
| AtLEA 4-5 | 158             | 16.2                 | 9.45               | 5         |   |

En el trabajo de Olvera-Carrillo et al., (2010a) se llevó a cabo un análisis funcional, en donde se realizó la caracterización fenotípica bajo condiciones de limitación de agua, de plantas mutantes de pérdida de función y, por otro lado, sobre-expresoras de uno de los genes de esta familia (AtLEA4-5). Así mismo, se caracterizaron los patrones de acumulación de los transcritos y de las proteínas correspondientes a cada uno de los genes de este grupo en plantas sometidas a diferentes condiciones de estrés y en distintas etapas del desarrollo. Los resultados mostraron que los transcritos de todos estos genes se acumulan diferencialmente durante el desarrollo de la semilla y que se encuentran en niveles similares en la semilla seca. En los tres casos, los transcritos sólo permanecen durante la imbibición de la semilla (absorción de agua por la semilla) y durante las primeras horas de la germinación, bajo condiciones óptimas, para disminuir progresivamente a lo largo del desarrollo de la plántula. En el caso de los niveles de

proteína, los tres genes se acumulan abundantemente en la semilla seca. Las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 están también presentes a lo largo del desarrollo de la semilla, durante varios días después de la germinación y durante el desarrollo de la plántula. Esto contrasta con lo obtenido con la proteína AtLEA4-5 que sólo se detecta en la etapa tardía de la embriogénesis y disminuye rápidamente durante la germinación (Olvera-Carrillo et al., 2010a; Fig. 5 A y B). Los transcritos y las proteínas correspondientes a los tres genes se acumulan en respuesta a déficit hídrico en plántulas de dos semanas de edad. En el tratamiento por déficit hídrico inducido con polietilenglicol (PEG), se presenta la mayor acumulación tanto de los transcritos como de las proteínas, siendo el mayor nivel el correspondiente al transcrito y a la proteína del gen *AtLEA4-5*. En estrés por NaCl el transcrito de *AtLEA4-5* mostró mayor acumulación mientras que las tres proteínas se acumulan durante esta condición. El único transcrito y proteína que mostraron respuesta al tratamiento con 100  $\mu$ M de ABA fue el correspondiente a la proteína *AtLEA4-5* (Fig. 6 A y B).

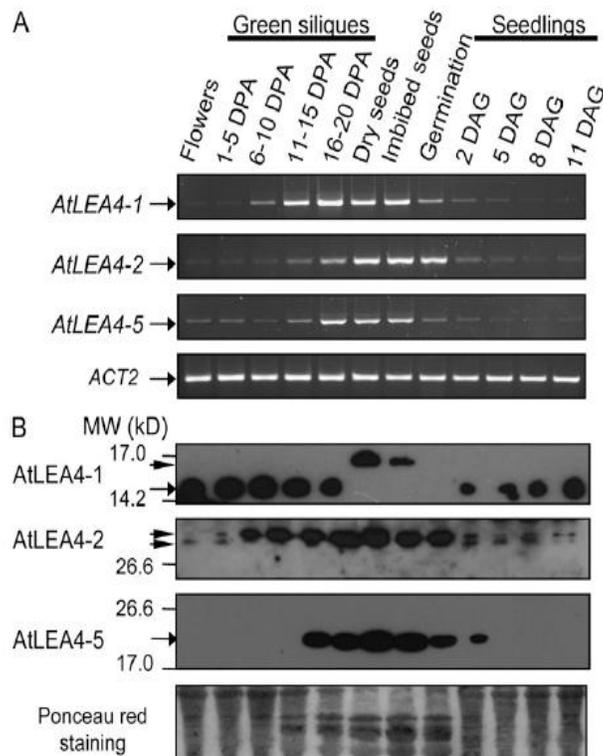


Figura 5. Patrones de expresión de los transcritos (A) y las proteínas (B) de *AtLEA4-1*, *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* en *A. thaliana* en flores, durante la embriogénesis (*green siliques*; silicuas verdes), en semillas secas, semillas embebidas, germinación y establecimiento de la planta (*seedlings*; plántulas). Mientras que los transcritos de los tres genes se acumulan durante la embriogénesis, la imbibición y la germinación, las tres proteínas se acumulan abundantemente en semilla seca (A). Se puede observar que la proteína *AtLEA4-5* se acumula en etapas tardías de la embriogénesis y disminuye después de la germinación, mientras que las proteínas *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* están también presentes a lo largo del desarrollo de la semilla y durante el desarrollo y establecimiento de la planta. Tomado de Olvera-Carrillo et al., 2010a.

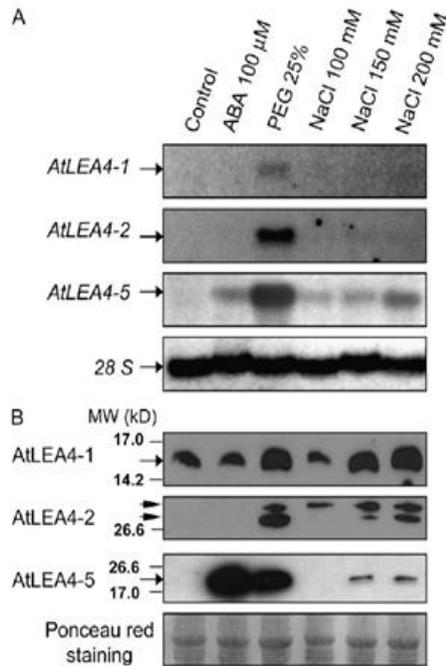
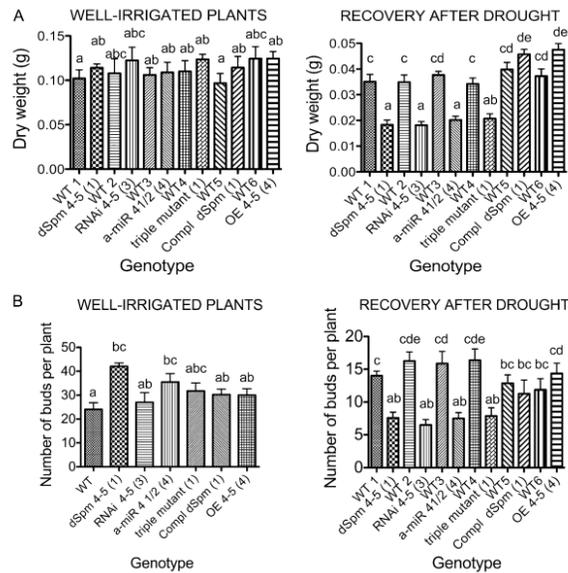


Figura 6. Patrones de expresión de los transcritos (A) y proteínas (B) de plantas de *A. thaliana* de dos semanas de edad sometidas a tratamientos con ABA o estrés abiótico durante 12 horas. Mientras que los transcritos de los tres genes se acumulan mayormente cuando las plantas son sometidas a PEG 25%, el transcrito de *AtLEA4-5* se acumula además en presencia de ABA y NaCl. En el caso de las proteínas, se observa que mientras que la proteína *AtLEA4-2* se acumula en PEG y NaCl y la proteína *AtLEA4-5* se acumula mayormente en ABA y PEG, la proteína *AtLEA4-1* se acumula en todos los tratamientos, incluyendo condiciones control. Tomado de Olvera-Carrillo et al., 2010a.

Como se puede observar en las Figuras 5B y 6B, las proteínas *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* muestran un patrón particular en cuanto a su migración en la electroforesis. En la semilla seca la proteína *AtLEA4-1* migra con una masa molecular mayor a la que presenta en cualquiera de las otras condiciones, sugiriendo posibles modificaciones post-traduccionales. Por otro lado, para la proteína *AtLEA4-2* se detectaron dos bandas con una masa molecular similar, cuyos niveles varían diferencialmente durante la embriogénesis, en semilla, durante la germinación y durante el establecimiento de la plántula, como en plántulas de dos semanas sometidas a déficit hídrico. Además, la forma de mayor migración electroforética, resulta más abundante con PEG y en condiciones de salinidad siendo la banda de mayor abundancia la que presenta una menor migración electroforética. Como se mencionó anteriormente, estas diferencias en migración pudieran ser el resultado de algún tipo de modificación post-traducciona (Olvera-Carrillo et al., 2010a).

El análisis fenotípico se llevó a cabo sometiendo a déficit hídrico a plantas adultas (cuando empiezan a producir flores) de *A. thaliana* Col-0 (*Wt*), de la línea sobre-expresante de la proteína *AtLEA 4-5* y de la línea mutante por inserción en el gen *AtLEA4-5* (*dSpm4-5*). El análisis inicial se realizó en estas líneas, ya que los patrones del transcrito y de la proteína

mostraron una mayor acumulación para la AtLEA4-5 en relación a los otros miembros de la familia. Posteriormente, también se analizaron plantas en donde los genes *AtLEA 4-2* y *AtLEA 4-1* se silenciaron mediante microRNAs artificiales; así como, plantas en las que los tres genes de la familia estaban silenciados (RNAi 4-5 y miRNA 4-1/2). Los resultados de este análisis mostraron que las plantas deficientes en estas tres proteínas presentaron un fenotipo de susceptibilidad al déficit hídrico; mientras que la sobre-expresora de la proteína AtLEA4-5 mostró una mayor tolerancia a estas condiciones de estrés (Fig. 7a; Olvera-Carrillo et al., 2010a)



**Figura 7. Análisis fenotípicos de plantas transgénicas adultas (cuando comienzan a producir flores) correspondientes a la familia LEA 4 en *A. thaliana*, sometidas a sequía severa. (A) El gráfico del lado izquierdo indica la biomasa de las plantas cuando se encuentran bien irrigadas mientras que el gráfico del lado derecho muestra la biomasa de las plantas 6 días después de recuperarse de la sequía severa. (B) El gráfico del lado izquierdo muestra el número de botones axilares y florales de plantas bien irrigadas, mientras que el del lado derecho muestra el número de botones axilares y florales 6 días después de recuperadas las plantas de la sequía severa. Todas las líneas de plantas utilizadas fueron homocigotas. *Wt*, wild type; OE4-5, sobre-expresora de la proteína ATLEA4-5; dSpm4-5, mutante por transposición de la proteína ATLEa4-5; Complem dSpm, sobre-expresora de ATLEA4-5 en el fondo mutante del transposón de la proteína ATLEA4-5; RNAi4-5, mutante silenciada por RNAi de la proteína ATLEA4-5; a-miR4-1/2, mutante silenciada por miRNA de las proteínas ATLEA4-1 y 4-2; triple silenciada, triple silenciada de la Familia ATLEA 4 generada por cruce de RNAi4-5 y a-miR4-1/2; compl dSpm, sobre-expresora de AtLEA4-5 en el fondo mutante. Tomado de Olvera-Carrillo et al., 2010a.**

Una característica sobresaliente del fenotipo que estas plantas mutantes mostraron fue el número de botones florales y axilares en plantas sometidas previamente a sequía severa; las plantas sobre-expresoras de AtLEA4-5 presentaron un mayor número de botones que las plantas silvestres y, en contraste, las plantas deficientes en estas proteínas mostraron una disminución considerable en el número de estos órganos, también en relación con las plantas silvestres (Fig. 7b). Esto llevó a hipotetizar que las proteínas de esta familia se acumulan en estos órganos y juegan un papel importante en su protección durante condiciones de estrés (Olvera-Carrillo et al., 2010a).

Adicionalmente, se ha demostrado que al igual que proteínas LEA de otros grupos (2, 3 y 7) (Reyes et al., 2005), dos proteínas de esta familia, AtLEA4-5 y AtLEA4-2, son capaces de prevenir la inactivación de enzimas reporteras causada por deshidratación parcial en ensayos *in vitro* (Reyes et al., 2005; Cuevas-Velázquez et al., 2016). También se ha demostrado que ambas proteínas pueden proteger la actividad de enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH) cuando ésta se somete a varios ciclos de congelamiento y descongelamiento (Cuevas-Velázquez et al., 2016). Estas observaciones sugieren que las proteínas de este grupo llevan a cabo funciones de protección de proteínas en plantas que se someten a condiciones de déficit hídrico, provocado por deshidratación parcial o por congelamiento.

### **Importancia de la localización de las proteínas LEA en plantas**

Si bien se ha estudiado la expresión de los transcritos de los genes *LEA* y, en algunos casos, de sus proteínas bajo condiciones específicas, se sabe muy poco acerca de su localización tisular e intracelular, lo cual podría aportar información acerca de los organelos y/o tejidos donde se acumulan y, por tanto, en donde llevan a cabo su función. Podemos citar algunos ejemplos como *TaLEA1* en *Tamarix androssowii*, la cual se expresa en estrés por metales pesados (Gao et al., 2012) o la LEA Mlg3 (de maíz) en células epidérmicas de tabaco (Amara et al., 2011) que se encuentran localizadas en el citoplasma y en el núcleo, respectivamente; o bien, el de la PvLEA18, una proteína del grupo 6 de *Phaseolus vulgaris*, que se localizó prácticamente en todos los tejidos en respuesta a estrés pero principalmente en los haces vasculares y en la epidermis de hojas, o en haces vasculares y córtex de raíz, e intracelularmente en el citoplasma y en el núcleo (Colmenero-Flores et al., 1999; Rivera-Najera et al., 2014). También se ha predicho la localización de las proteínas LEA mediante análisis computacionales, como es el caso de la proteína EMB564 de maíz perteneciente al grupo 1 de las LEA. Esta proteína podría estar localizada en el núcleo, debido a la presencia de motivos de unión a DNA (Wu et al., 2013). Se ha predicho que algunas de las proteínas LEA de *A. thaliana* podrían estar en el citoplasma, en los cloroplastos y en las mitocondrias, como es el caso de las proteínas del grupo 3 (Hundertmark e Hinch, 2008), debido a que estas proteínas muestran motivos de señalización para estos organelos. A pesar de que algunas de estas proteínas no muestran estos motivos, si tienen cierta especificidad en su localización. Un trabajo reciente sugiere que la mayoría de las proteínas LEA en *A. thaliana* se localizan en citosol y/o núcleo, una minoría se localiza en plástidos y/o mitocondria y tres en retículo endoplasmático (Candat et al., 2014). Esta amplia distribución subcelular podría implicar la necesidad de que cada compartimento celular cuente con mecanismos de “protección” para hacer frente a diferentes tipos de estrés como el déficit hídrico. Sin embargo, es necesario corroborar estos datos tanto en condiciones de estrés en la planta, además de utilizar el promotor de cada uno de estos genes de interés ya que el estudio reportado por Candat y colaboradores (2014) se realizó en protoplastos en condiciones óptimas y, además, utilizando el promotor constitutivo 35S, lo cual podría alterar su localización original en la planta durante estas condiciones.

Existen muchos avances en el campo de la biología celular de las plantas lo cual ha motivado a la creación de métodos que permitan la localización subcelular de las proteínas *in situ* e *in vivo*. Para lograrlo se han usado proteínas recombinantes fusionadas con proteínas reporteras fluorescentes y se han llevado a cabo inmunolocalizaciones mediante anticuerpos específicos contra la proteína de interés. Esto último tiene la ventaja de que nos permiten conocer dónde se acumula la proteína de interés, sin sufrir ninguna modificación adicional generada por la fusión de estas proteínas con proteínas reporteras. Específicamente es importante usar anticuerpos cuando la proteína a localizar es muy pequeña (como lo es el caso de las proteínas LEA), ya que la proteína de fusión pudiera presentar un patrón de localización artefactual debido a las alteraciones que esta fusión pudiera provocar a su estructura y/o localización funcional.

En el caso de la familia AtLEA4, si bien se ha estudiado la expresión de los transcritos y de las proteínas LEA del grupo 4 en plántulas y semillas de *A. thaliana*, poco se sabe acerca de su localización tisular e intracelular. Hasta el momento, mediante técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo específico contra la proteína AtLEA4-5, se ha determinado que ésta se localiza en casi todos los tejidos del tallo (epidermis, parénquima, esclerénquima y células de la médula) de plantas adultas en sequía. También se localizó en zonas meristemáticas con una mayor acumulación en células de la túnica que en células del corpus. Adicionalmente, se detectó en botones florales y en yemas axilares (Martínez, 2014 Tesis de Licenciatura) e, intracelularmente, se detectó en el citosol y en el núcleo. Desafortunadamente, no fue posible determinar la localización de esta proteína en otros órganos como la raíz y las hojas, los cuales son muy importantes en la percepción de los cambios en el medio ambiente, ya que los métodos de inclusión para inmunohistoquímica no permitieron mantener la integridad de estos tejidos bajo déficit hídrico, lo que impidió obtener una localización confiable de la proteína. Si bien estos datos nos arrojan información acerca del lugar donde la proteína AtLEA4-5 podría estar llevando a cabo su función protectora, aún desconocemos su localización tanto en hojas como en raíces y en diferentes etapas de desarrollo de la planta.

En cuanto a los otros dos genes que conforman a la familia 4, *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, los datos de acumulación de proteínas en algunos órganos de la planta, analizados mediante experimentos tipo Western, sugieren que estas dos proteínas se acumulan en flores, tanto en condiciones de irrigación óptima como de déficit hídrico (Fig. 5). Los transcritos de dichos genes también se detectaron acumulados en hoja y en raíz en respuesta a la limitación de agua; sin embargo, para el caso de la proteína AtLEA4-2 los niveles de acumulación fueron menores comparados con los de la AtLEA4-5 (Olvera-Carrillo et al., 2010; Olvera-Carrillo et al., 2010b).

A nivel subcelular, en el trabajo de Candat et al., (2014) se señala que las proteínas AtLEA4-5, AtLEA4-2 y AtLEA4-1, se encuentran en el citosol y núcleo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este análisis no deja en claro si el estrés afecta su localización tisular, ya que el estudio se realizó con proteínas fusionadas expresadas a partir del promotor 35S y en solo un tipo celular (protoplastos). Por lo anterior, es necesario

conocer con mayor precisión su distribución en los diferentes órganos y tejidos, y durante diferentes etapas del desarrollo de la planta; así como en respuesta a estrés. La comparación entre los patrones de distribución para las diferentes proteínas nos permitirá determinar si se localizan o no en los mismos tejidos u órganos de la planta.

Aún cuando el análisis de la secuencia de aminoácidos en las proteínas LEA4 indica que presentan una región altamente conservada y que, por tanto, pudieran realizar funciones similares, el estudio fenotípico de las mutantes (al menos en plantas adultas sometidas a condiciones de sequía) sugiere que sus funciones no son totalmente redundantes debido a que mutantes en cualquiera de los genes presenta un fenotipo. Sin embargo, el hecho de que aparentemente no exista redundancia genética completa también podría ser explicado por una distribución espacio-temporal diferencial para cada una de estas proteínas, dado posiblemente por los promotores que controlan la expresión de estos genes. Cabe destacar que el fenotipo de la mutante nula de *AtLEA4-5* durante la germinación en condiciones de estrés iónico y/o osmótico que fue reportado en el trabajo de Olvera-Carrillo et al., (2010a), no ha sido reproducible en replicas posteriores, aún cuando se ha comprobado que la mutante no produce proteínas (Rendón, 2015 Tesis de Maestría). En este caso, no se puede descartar un evento de compensación molecular por parte de los demás miembros de la familia *AtLEA4* o de otras proteínas LEA en *A. thaliana*, debido posiblemente a que estas se acumulen en los mismos tejidos u órganos en el embrión en los cuales se acumula la proteína *AtLEA4-5*. Dado lo anterior, resulta relevante determinar los patrones de acumulación espacial y temporal de estas proteínas en los diferentes tejidos de la planta. Así mismo, también resulta de interés el conocer la distribución de sus transcritos, para determinar si no existen diferencias entre la localización de la proteína y la de su transcrito. La información que se obtenga de este análisis aportará información para conocer la función de estas proteínas en la respuesta a la baja disponibilidad de agua en la planta.

Actualmente se sabe mucho acerca de la expresión de los genes de *Arabidopsis* bajo una amplia variedad de condiciones y tejidos. Aunque los datos sobre la expresión génica pueden decirnos mucho acerca de las interacciones genéticas, es necesaria la utilización de otros métodos que permitan conocer la localización de las proteínas mismas, ya que permite acercarse con mayor fundamento a la función que la proteína podría estar realizando en las células vegetales, una pregunta relevante en el caso particular de las proteínas LEA.

### **Modelo de estudio: *Arabidopsis thaliana***

*A. thaliana* es una planta dicotiledónea de la familia Brassicaceae y, a pesar de que carece de valor comercial, ha demostrado ser un organismo ideal para estudiar varios aspectos de la vida de las plantas, como su desarrollo y sus respuestas a condiciones adversas en el ambiente. Crece naturalmente en regiones de Asia, Europa y en el Norte de África, y se ha introducido en otras áreas como Norteamérica y Australia.

Presenta varias ventajas que agilizan su investigación. Su tamaño es pequeño (30 cm aproximadamente) por lo que es posible crecer un gran número de plantas en un espacio reducido. Su ciclo de vida es relativamente corto (seis semanas) y produce más de 10,000 semillas por planta. Es diploide y se autofecunda, lo cual facilita mantener líneas y realizar cruces controladas. El tamaño de su genoma, organizado en 5 cromosomas, es uno de los más pequeños detectados en plantas (125 Mpb) y, es fácilmente transformable, empleando a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* por la técnica de infiltración en flores. Además de las ventajas naturales de la planta, la investigación en genómica funcional de *Arabidopsis* se ha facilitado gracias a la disponibilidad de la secuencia de su genoma, el cual se estima que tiene más de 33,000 genes. La información sobre el genoma de *Arabidopsis* se complementa ampliamente con un acervo muy completo de mutantes generadas y naturales, con datos de expresión global basados tanto en microarreglos como en secuenciación masiva de transcritos de diversos tejidos, estados de desarrollo, sometidas a diferentes tipos de estrés tanto biótico o abiótico, tratamientos con diferentes hormonas y químicos, mutantes, etcétera (Wilson 2000).

## **Hipótesis**

Los transcritos y proteínas de los genes de la familia LEA4 presentan una localización diferencial en la planta durante condiciones de baja disponibilidad de agua.

## **Objetivo general**

Determinar la localización de los transcritos y las proteínas de los genes de la familia LEA4 en *A. thaliana* en diferentes estadios del desarrollo y diferentes tejidos en condiciones de déficit hídrico.

## **Objetivos específicos**

- ❖ Determinar la localización de los transcritos de la familia AtLEA4 en diferentes etapas de desarrollo de la planta sometida a condiciones de déficit hídrico mediante el uso de fusiones de sus respectivos promotores a genes reporteros.
- ❖ Determinar la localización de las proteínas de la familia AtLEA4 en diferentes etapas de desarrollo de la planta sometida a condiciones de déficit hídrico utilizando construcciones con el promotor y la región codificante fusionadas a un gen reportero.
- ❖ Determinar la localización celular de las proteínas de esta familia utilizando las fusiones traduccionales antes mencionadas.
- ❖ Comparar los patrones de localización obtenidos para cada uno de los genes de la familia LEA4 en las diferentes condiciones y etapas analizadas.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Como lo describieron Olvera-Carrillo y colaboradores, el análisis filogenético hecho con las secuencias de proteínas similares provenientes de todas aquellas especies vegetales en donde se detectaron proteínas pertenecientes a la familia LEA 4, reveló que existe un punto de divergencia que permite agrupar las proteínas encontradas en los sub-grupos LEA4A y LEA4B. Todas las proteínas con similitud a las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 conforman el sub-grupo A, en tanto que las similares a la proteína AtLEA4-5 conforman el sub-grupo B. Mientras que las proteínas LEA4 en el sub-grupo A son más cortas y, están conformadas mayoritariamente por las proteínas que muestra mayor conservación en la región amino terminal, el sub-grupo B contiene a las proteínas LEA4 más largas debido a que contienen una región carboxilo terminal más larga y variable. En un principio para este proyecto, se planteó analizar la localización de los transcritos y proteínas de los genes AtLEA4-2 y AtLEA4-5, como representantes de los sub-grupos A y B.

Para determinar cuál podría ser la distribución de los transcritos de esta familia en diferentes estadios del desarrollo y en diferentes tejidos de la planta en condiciones de déficit hídrico, se planteó utilizar fusiones transcripcionales de sus respectivos promotores a genes reporteros (*EGFP* y *GUS*). Ya que lo que detectamos con este sistema es la reacción de la enzima GUS con su sustrato, o la fluorescencia de EGFP, (y no en transcritos *per se* de nuestro gen de interés) este sistema heterólogo nos permiten conocer de manera indirecta en que órganos y/o tejidos de la planta se podría acumular los transcritos de estos genes que se producen y se acumulan de acuerdo a las señales *in cis* contenidas en la región promotora de interés a las que fueron fusionados.

Se planteó utilizar fusiones entre sus promotores y las regiones codificantes correspondientes a cada uno de los genes, fusionadas a un gen reportero (*EGFP*) para conocer la localización de las respectivas proteínas. Ya que no se puede descartar que la proteína reportera EGFP pudiera tener un efecto en la localización de estas proteínas en alguno de los sitios de fusión, se planteó hacer fusiones del ORF del gen reportero en ambos extremos de las proteínas de interés para poder realizar un análisis comparativo de la señal de fluorescencia para ambas construcciones.

En este trabajo se planteó utilizar este tipo de técnicas moleculares, ya que nos permiten explorar la localización tanto de transcritos (de manera indirecta) como de proteínas en diferentes etapas de desarrollo, *in vivo* e *in situ*, sin la necesidad de inclusiones de las muestras en resina o parafina. Como se mencionó anteriormente, algunas técnicas de inclusión no permiten mantener la integridad de ciertos tejidos u órganos de plantas sometidas a condiciones de déficit hídrico, lo cual limita la localización de las proteínas e interés en estas condiciones (Martínez 2014, Tesis de Licenciatura). Sin embargo los resultados obtenidos anteriormente mediante inmunohistoquímica, junto con los obtenidos en este trabajo ayudaran a complementar más la información acerca de la localización de estas proteínas en la planta.

Aunque se realizaron las construcciones necesarias para este fin y se obtuvieron las plantas transgénicas necesarias, en esta tesis sólo se reporta el análisis de localización para las plantas transgénicas *p4-5::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* de *A. thaliana* ecotipo Col., esto considerando los tiempos límites en el programa de maestría. El análisis se hizo a través de microscopía óptica, confocal y multifotónica. Para el caso de las líneas transgénicas *p4-5::EGFP-GUS* se utilizó microscopía óptica e histoquímica, monitoreando el color producido por la reacción catalizada por GUS. En este trabajo solo se reporta la señal mostrada por la proteína reportera GUS, ya que, por razones que se explican más adelante, no fue posible detectar la señal de fluorescencia de EGFP. Para el caso de las líneas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, el análisis se hizo por microscopía confocal y microscopía multifotónica siguiendo la emisión de fluorescencia de la proteína EGFP fusionada al extremo amino de la proteína AtLEA4-5.

Se analizó la localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en las siguientes etapas de desarrollo de *A. thaliana*: en las últimas etapas de la embriogénesis, en embriones maduros embebidos, durante la germinación y establecimiento de la plántula bajo condiciones óptimas y en plántulas sometidas a déficit hídrico. Se utilizaron estas etapas de desarrollo, ya que los resultados obtenidos por Olvera-Carrillo et al., (2010) (Fig. 5 y 6) indican que existe una acumulación diferencial tanto de transcrito como de la proteína del gen *AtLEA4-5* durante estas etapas del desarrollo y en plántulas sometidas a déficit hídrico. Las condiciones de estrés que se aplicaron fueron mediante tratamientos con NaCl (200 mM por 12 h) que provocaría un estrés iónico y osmótico en plántulas juveniles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Análisis de los promotores de *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*

Se obtuvieron las secuencias de los promotores de los genes *AtLEA4-2* (At2g35300) y *AtLEA4-5* (At5g06760) de la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Como región promotora se consideró la secuencia comprendida entre el 3' UTR del gen río arriba de nuestro gen de interés, y el final del 5' UTR del gen *AtLEA4-2* o del gen *AtLEA4-5* (Fig. 8). Estas secuencias se introdujeron a la base de datos PLACE (Higo et al., 1999) y los diferentes elementos *cis* arrojados por el análisis se clasificaron manualmente en diferentes categorías.

### Construcciones

#### ❖ *Fusiones transcripcionales*

Para analizar la expresión de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* se elaboraron construcciones donde se fusionaron los promotores de estos genes a la región codificante de proteínas reporteras (EGFP y GUS). Para cada gen, se amplificó el promotor correspondiente mediante PCR (1492 pb para *AtLEA4-2* y 389 bp para *AtLEA4-5*) a partir de DNA genómico de *A. thaliana* con oligonucleótidos específicos para cada promotor que agregaron los nucleótidos CACC al extremo 5' del producto de PCR para su ligación al vector *pENTR/SD/D-TOPO*. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 1%, se cortó la banda correspondiente y se purificó mediante el paquete *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific #K0691). Se ligó cada promotor al vector *pENTR/SD/D-TOPO* mediante el protocolo *pENTR Directional TOPO Cloning Kit* (Invitrogen #K2420-20) y el producto de cada ligación se usó para transformar bacterias de *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ .

Las colonias transformantes se seleccionaron por resistencia a kanamicina. Estas colonias se sembraron en medio líquido LB adicionado con el antibiótico kanamicina y se purificó el plásmido mediante el paquete *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific #K0503). Se corroboró la correcta inserción mediante PCR y por secuenciación con oligos específicos para cada construcción. Posteriormente, con cada uno de los vectores de entrada que contenían a cada promotor, se realizó la reacción de recombinación por el sistema GATEWAY con el vector binario *pKGWFS7* (Karimi et al., 2002), el cual contiene las secuencias que codifican para las proteínas reporteras EGFP (*Green Fluorescent Protein*) y GUS ( $\beta$ -glucuronidasa); así como, un gen que confiere resistencia a kanamicina como marcador para la selección de las plantas que lo contengan. Este vector también contiene los bordes derecho e izquierdo necesarios para dirigir la inserción del T-DNA en el genoma vegetal, de tal forma que cualquier fragmento de DNA ubicado entre estos dos bordes se puede integrar en diferentes regiones en el genoma de la planta. La reacción de recombinación se hizo con el protocolo Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen #11791-020). El producto de la reacción de recombinación para cada uno de los promotores se usó para transformar bacterias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ . Las bacterias

transformadas se seleccionaron por su resistencia a espectinomicina. Estas colonias se sembraron en medio líquido LB adicionado con espectinomicina y, se purificó el plásmido mediante el paquete *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific #K0503). Se corroboró la correcta inserción mediante PCR y por secuenciación.

La construcción con el promotor del *AtLEA4-2* (*p4-2::pKGWFS7*) ya se tenía en el laboratorio y se generó por el mismo método por el M. en C. David Rendón.

#### ❖ *Fusiones traduccionales*

Para poder conocer la localización a nivel tisular y celular de estas proteínas en la planta durante condiciones de déficit hídrico, se hicieron construcciones con la región codificante de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* bajo su promotor correspondiente, fusionadas al gen de la proteína reportera EGFP. Para determinar si la fusión a la EGFP afecta la localización de las proteínas de interés se realizaron fusiones donde la proteína reportera quedó situada tanto en el lado N-terminal como en el C-terminal. Para esto se utilizaron vectores Gateway donde la proteína EGFP queda fusionada tanto del lado C-terminal (*pH7FWG2*) como del lado N-terminal (*pB7WGF2*), para cada proteína LEA (Karimi et al., 2002).

Para cada construcción se utilizó el promotor del gen de interés. Se eliminó el promotor 35S, contenidos en los plásmidos *pH7FWG2* y *pB7WGF,2* mediante una doble digestión con las enzimas *SacI* y *SpeI*. Se separaron los productos de la digestión en un gel de agarosa al 1% y la banda correspondiente a cada plásmido linealizado sin el promotor 35S se purificó mediante el paquete *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific #K0691). Los fragmentos correspondientes a cada promotor se obtuvieron de las siguientes fuentes: por un lado para el gen *AtLEA4-5*, el fragmento correspondiente al promotor se obtuvo de la construcción *p4-5::EGFP::GUS* en el plásmido *pKGWFS7*, mencionada arriba, mediante una doble digestión con *SacI* y *SpeI*; en tanto que para el gen *AtLEA4-2* se obtuvo a partir de una construcción donde el promotor en el plásmido pJET poseía en los extremos sitios de corte para *SacI* y *XbaI*. Estas construcciones fueron proporcionadas por el M. en C. David Rendón, estudiante del laboratorio. Se purificaron los fragmentos correspondientes a cada promotor en geles de agarosa al 1% y la banda correspondiente a cada promotor se purificó mediante el paquete *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific #K0691).

Se ligaron cada uno de los promotores a los plásmidos ya sin el promotor 35S usando el protocolo de ligación con la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific #EL0011). Posteriormente cada una de las reacciones de ligación se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* cepa DB3.1. Las colonias que crecieron en el medio LB sólido adicionado con el antibiótico espectinomicina se sembraron en medio LB líquido con el mismo antibiótico para proseguir con la purificación del plásmido utilizando el paquete *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific #K0503). Posteriormente, para cada plásmido modificado, se corroboró la inserción de los promotores mediante PCR y secuenciación.

Una vez que se obtuvieron los plásmidos modificados *prom4-2::pB7WGF2*, *prom4-5::pB7WGF2*, *prom4-2::pH7FWG2* y *prom4-5::pH7FWG2*, se realizaron las reacciones de recombinación con cada una de las regiones codificantes de los genes de interés mediante el paquete *Gateway LR Clonasa II Plus Enzyme Mix* (Invitrogen #12538-120). Las construcciones con las regiones codificantes de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* con codón de paro (*AtLEA4-5::pENTR* y *AtLEA4-2::pENTR*) y, sin codón de paro (*AtLEA4-5NS::pENTR* y *AtLEA4-2NS::pENTR*) en el vector de origen pENTR/SD/D-TOPO fueron proporcionadas por el I. B. Q. César Cuevas. Las reacciones de recombinación realizadas se llevaron a cabo como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Construcciones en diferentes vectores para determinar la localización de los transcritos y proteínas de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* como producto de las reacciones de recombinación que se realizaron mediante el paquete *Gateway LR Clonasa II Plus Enzyme Mix*.

| Vector de origen         | Vector destino       | Construcción obtenida        |
|--------------------------|----------------------|------------------------------|
| <i>AtLEA4-2::pENTR</i>   | <i>p4-2::pB7WGF2</i> | <i>p4-2::EGFP-AtLEA4-2</i>   |
| <i>AtLEA4-5::pENTR</i>   | <i>p4-5::pB7WGF2</i> | <i>p4-5::EGFP-AtLEA4-5</i>   |
| <i>AtLEA4-2NS::pENTR</i> | <i>p4-2::pH7FWG2</i> | <i>p4-2::AtLEA4-2NS-EGFP</i> |
| <i>AtLEA4-5NS::pENTR</i> | <i>p4-5::pH7FWG2</i> | <i>p4-5::AtLEA4-5NS-EGP</i>  |

El producto de cada recombinación se transformó en bacterias de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ . Las colonias transformantes se seleccionaron en medio LB sólido adicionado con el antibiótico espectinomomicina, se sembraron en medio LB líquido con el mismo antibiótico para proseguir con la purificación del plásmido con el paquete *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific #K0503). Posteriormente, se corroboró la inserción de las regiones codificantes para cada uno de los genes en los plásmidos correspondientes mediante PCR y secuenciación.

### Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron por el siguiente protocolo: las semillas se sumergieron por 2 minutos en etanol y después 15 minutos en una solución de cloro comercial (Cloralex: NaClO 4-6% y NaOH 0.05-0.10%) al 40% más Tritón X-100 al 0.02%; se enjuagaron 5 veces durante dos minutos por lavado con agua miliQ estéril y se resuspendieron en agarosa al 0.1% estéril. Posteriormente, las semillas esterilizadas se sembraron en cajas con medio MS (4.3 g de sales Murashige and Skoog, 1% sacarosa y 0.5 g/L de MES) pH 5.7 con agar al 0.65% para cajas Petri o al 0.9% en cajas cuadradas, cuando las plántulas se crecieron verticalmente. Las semillas se estratificaron durante 4 días a 4°C en oscuridad. Después se transfirieron a una cámara de crecimiento a 22°C, con fotoperiodo de 16/8 h (día/noche). El tiempo de incubación en la cámara de crecimiento fue dependiente del experimento a realizar, como se mostrará más adelante. Para los casos donde se utilizaron plantas adultas, una vez transferidas a la cámara de crecimiento,

se incubaron por 2 semanas y se trasplantaron posteriormente a macetas con una mezcla de Paet Moss (Sunshine mezcla 3), perlita (Agrolita) y vermiculita (Sunshine) en una proporción 3:1:1 Litros, adicionada con 9.45 g de fertilizante de liberación controlada Osmocote plus 15-9-12 (Scotts).

### **Transformación y obtención de plantas transgénicas**

Ya que se tenían cada una de las construcciones (*p4-2::EGFP-GUS*, *p4-5::EGFP-GUS*, *p4-2::EGFP-AtLEA4-2*, *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, *p4-2::AtLEA4-2-EGFP* y *p4-5::AtLEA4-5-EGFP*), se transformaron bacterias quimiocompetentes de *A. tumefaciens* (cepa GB3010) y se seleccionaron colonias positivas mediante el uso de medio LB sólido adicionado con los antibióticos necesarios y, mediante PCR con oligos específicos para cada construcción, para posteriormente transferir esta construcción al genoma de la planta.

#### ❖ *Transformación de plantas de A. thaliana*

Se transformaron plantas de *A. thaliana* (*Wt*) ecotipo Columbia (Col-0) mediante la técnica de inmersión floral (*floral dip*) siguiendo el protocolo de Zhang et al., (2006). Se inocularon colonias de *A. tumefaciens* (cepa GB3010) que contenían a cada una de nuestras construcciones de interés en 5 ml de medio LB líquido con los respectivos antibióticos y se incubaron por 2 días a 28° C. Estos cultivos se transfirieron a matraces con 500 ml de LB líquido con los respectivos antibióticos y se incubaron a 28°C por 16-20 horas (cuando la D.O. tuviera un valor de 0.8-1). Se centrifugaron cada uno de los cultivos a 4000 g por 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 500 ml de una solución 5% de sacarosa en agua. Se agregó silwet L-77 (Lehle Seeds, #VIS-30) en las siguientes concentraciones: 0.02 % v/v (100 µl por 500 ml de solución) a los cultivos *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, *p4-5::AtLEA4-5-EGFP* y *p4-5::EGFP-GUS* y 0.05 % v/v (250 µl por 500 ml de solución) a los cultivos *p4-2::EGFP-GUS*, *p4-2::EGFP-AtLEA4-2* y *p4-2::AtLEA4-2-EGFP*. Para la transformación se utilizaron plantas de *A. thaliana* adultas de 4-5 semanas de edad (que presentan botones florales) en donde la parte aérea se sumergió en la solución de *A. tumefaciens* durante 1 minuto para las construcciones *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, *p4-5::AtLEA4-5-EGFP* y *p4-5::EGFP-GUS* y, 6 minutos para *p4-2::EGFP-GUS*, *p4-2::EGFP-AtLEA4-2* y *p4-2::AtLEA4-2-EGFP*. Aunque el protocolo original indicaba utilizar 0.02 % v/v de silwet L-77 y un tiempo de 1 minuto para sumergir la planta en la solución, se modificó la concentración y el tiempo de transformación para las construcciones *p4-2::EGFP-GUS*, *p4-2::EGFP-AtLEA4-2* y *p4-2::AtLEA4-2-EGFP*, ya que con las condiciones originales no se pudieron obtener plantas transformadas.

Una vez sumergidas las plantas,, se secó el exceso de la suspensión bacteriana en un papel seco durante 3-5 segundos y se cubrieron las macetas con plástico adherente. Se acostaron las macetas en charolas y se mantuvieron durante 16-18 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se les retiró el plástico y se transfirieron al cuarto de crecimiento a 24°C, humedad relativa del 40-50% y fotoperiodo 16/8. Se mantuvieron por un mes más aproximadamente con riego óptimo y se colectaron las semillas para su

selección. La transformación de plantas de *A. thaliana* con las construcciones *p4-5::EGFP-GUS* y *p4-2::EGFP-GUS* fue realizada por el M. en C. David Rendón.

#### ❖ *Selección de líneas transgénicas*

Para la selección de líneas transgénicas homocigotas de las diferentes construcciones, se esterilizaron las semillas (T1) de las plantas transformadas (T0) con las distintas construcciones y se sembraron en cajas Petri con medio MS adicionado con los antibióticos de selección correspondientes a cada una de las construcciones: kanamicina para *p4-2::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-GUS*; metionina sulfoximina para *p4-2::EGFP-AtLEA4-2* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*; higromicina para *p4-2::AtLEA4-2-EGFP* y *p4-5::AtLEA4-5-EGFP*, a una concentración final de 50 µg/ml en todos los casos. Las semillas sobrevivientes que produjeron plántulas sanas (T1) se transfirieron a tierra y se dejaron crecer en condiciones óptimas hasta que produjeron semillas (T2). Se sembraron 100 semillas provenientes de cada una de las plantas seleccionadas en medio MS adicionado con el antibiótico de selección correspondiente y se escogieron aquellas líneas que tuvieron segregación 3:1 (75% resistentes, 25% sensibles). De estas líneas se tomaron 5-10 plantas resistentes al azar, se trasplantaron a tierra en macetas y se dejaron crecer en condiciones óptimas hasta la obtención de semillas (T3). Se sembraron 100 semillas T3 de cada una de las plantas seleccionadas y aquellas líneas que mostraron un 100% de sobrevivencia se seleccionaron para su análisis posterior.

#### **Análisis de localización de las líneas *p4-5::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5***

Los análisis de localización que se han llevado a cabo hasta el momento, tanto en condiciones de estrés como bajo condiciones óptimas de crecimiento, han sido con las líneas transgénicas *p4-5::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*. Para todos los experimentos se utilizaron 5 líneas transgénicas homocigotas de cada construcción, obtenidas de eventos independientes de transformación y que presentaban un fenotipo similar en cada uno de los experimentos.

#### ❖ *Etapas de desarrollo y condiciones de crecimiento*

Se analizó la expresión de GUS dirigida por el promotor del gen *AtLEA4-5* mediante el precipitado azul que forma en reacción con su sustrato; y la expresión de la proteína EGFP-AtLEA4-5 por fluorescencia en las siguientes etapas y condiciones de crecimiento:

1. Embriones de 19-20 días post-antesis (dpa) de plantas adultas crecidas en condiciones óptimas, a los cuales se les retiró la testa. Para marcar la edad de los embriones, se marcaron las flores que ya se encontraban expandidas y se contaron los días a partir del día de marcaje.
2. Embriones maduros embebidos durante 30-40 minutos en agua, a los cuales se les retiró la testa posteriormente.

3. Plántulas de 1, 2 3 y 4 días post-germinación (dpg) crecidas en cajas Petri con medio MS, agar 0.65 %.
4. Plántulas de 5 y 7 dpg. Estas fueron crecidas en posición vertical, en cajas con medio MS con 0.9% de agar durante 5 o 7 días. Posteriormente se trasladaron a cajas colocadas en posición vertical, con medio MS con agar 0.9% y NaCl 200 mM o, sólo medio MS con 0.9% de agar como control, durante 12-13 horas.

#### ❖ *Reacción de GUS y aclaramiento de muestras*

Las líneas *p4-5::EGFP-GUS* se sometieron al tratamiento necesario para ver la actividad de GUS en una solución con los sustratos necesarios; para lo cual, las muestras se colocaron en una solución de buffer de fosfato de sodio pH 7 100 mM, EDTA 10 mM, ferrocianuro de potasio (PM 329.2 ) 0.5 mM, ferrocianuro de potasio (PM 422.2) 0.5 mM, TritonX-100 0.5% y X-Gluc 1 mg/ml (Thermo Scientific #R0852). Las muestras sumergidas en esta solución se sometieron a vacío durante los siguientes tiempos: durante 1 minuto para plántulas de 5 dpg y 7 dpg, y, durante 5 minutos para embriones de 19-20 dpa, embriones maduros embebidos y para plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpg. Posteriormente, se incubaron durante 4 horas a 37°C en oscuridad. Al término de este período se retiró la solución y se fijaron las muestras con una solución de formaldehído:ácido acético:etanol 40% en una proporción 5:5:90 durante 15 minutos. Se retiró la solución y se sometieron las muestras a tratamientos con diferentes concentraciones de etanol: 50%, 60%, 70%, 80% y 90%, durante 15 minutos cada pase y se dejaron en etanol 100% durante toda la noche.

Con la finalidad de eliminar lo más posible las coloraciones del fondo en los tejidos bajo análisis, las muestras se sometieron a procedimiento de aclaramiento, para lo cual se utilizó el protocolo reportado por Hernández-Barrera et al., (2011). Se dejaron las muestras en una solución con 30% de glicerol y DMSO al 2% durante un día. Se colocaron posteriormente en una solución con yoduro de sodio 4.2 M, tiosulfato de sodio 8 mM, glicerol 65% y DMSO 2% durante un día para las plántulas de 5 dpg y 7 dpg y, durante 1-2 días para embriones de 19-20 dpa, embriones embebidos y plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpg. Con esta última solución, se montaron las muestras en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos de 0.13 mm-0.17 mm de grosor para su análisis al microscopio.

#### ❖ *Inclusión de muestras y cortes transversales de raíces p4-5::EGFP-GUS*

Se fijaron raíces de plántulas de 5 dpg sometidas a 200 mM de NaCl por 12-13 h en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante media hora. Posteriormente, las muestras se deshidrataron por tratamiento durante media hora con diferentes concentraciones de etanol: 50, 70, 85, 95 y 100%; media hora por cada solución. Las muestras se dejaron en una solución de resina líquida LR White y Etanol 100% en una proporción 1:1 durante media hora y, después sólo en resina líquida LR White durante toda la noche.

Las muestras se colocaron en capsulas con resina liquida LR White y se polimerizaron con luz UV durante 1-2 horas. Una vez polimerizadas, las muestras se orientaron y se obtuvieron cortes transversales de 3  $\mu\text{m}$  de grosor con un microtomo de rotación marca Leica modelo RM2125 RTS.

#### ❖ *Observaciones al microscopio y análisis de imágenes*

Las observaciones de la parte aérea de plántulas de 5dpg, de las raíces de 5 y 7 dpg, y plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpg de las líneas *p4-5::EGFP-GUS* se realizaron en un microscopio óptico de la marca Nikon modelo E600 utilizando los objetivos 10X 20X y 40X en campo claro. La reconstrucción de las imágenes se realizó con el plugin *Mosaic J* y *Pairwise Stitching* del software FIJI (<http://fiji.sc/Fiji>).

Las líneas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* se analizaron mediante microscopía confocal y microscopía multifotónica. Para la microscopia confocal, las muestras se tiñeron previamente con yoduro de propidio 20  $\mu\text{g/ml}$  durante media hora. La fluorescencia de la EGFP se excitó a 488 nm y la del yoduro de propidio se excitó a 568 nm. Las observaciones y las reconstrucciones automáticas de la parte aérea de plantas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, *p35S::GFP* y *Wt* de 5 dpg se hicieron en el microscopio confocal Olympus FV1000. Las observaciones de las raíces de plantas de 5 y 7 dpg y plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpg se realizaron en el microscopio confocal Zeiss LSM510 META, mientras que la reconstrucción de las imágenes se realizó con el plugin *Mosaic J* y *Pairwise Stitching* del software FIJI (<http://fiji.sc/Fiji>).

Para los cortes virtuales longitudinales de las muestras de 19-20 dpa, de embriones embebidos y de plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpg de la línea *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, se tomaron *stacks* de imágenes en el microscopio confocal Olympus FV1000 en modo Multi-fotónico, y con el objetivo 25W/1.05, donde la EGFP se excitó a 900 nm. Para el corte transversal de la raíz de la línea *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, se tomaron *stacks* de imágenes en el microscopio confocal Olympus FV1000 en modo Confocal, y con el objetivo 25W/1.05, donde EGFP se excitó a 488 nm y el yoduro de propidio se excitó a 568 nm. Posteriormente los cortes virtuales de estas muestras se hicieron con el plugin *volume viewer* del software FIJI.

El trabajo de microscopía confocal y multifotónica se realizó con el apoyo del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada de la UNAM (LNMA).

#### **Experimentos tipo Western**

##### ❖ *Extracción de proteína total*

Para la obtención de los extractos de proteína total, se congeló y molió con nitrógeno líquido, el tejido de las siguientes muestras: semillas secas y plántulas de 5 dpg en condiciones control y en estrés salino (NaCl 200 mM/12 horas) de las líneas *Wt* y las transgénicas con la construcción *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*. A las muestras congeladas (100-

200 µg) se le añadieron 200 µl de una mezcla en frío con 1/3 de buffer de extracción con PVPP [sacarosa 0.7 M, de Tris-Base 0.5 M pH, HCl 30 mM, EDTA 50 mM pH, KCl 0.1M, β-mercaptoetanol al 2% y 12 mg/ml de polivinilpolipirrolidona (PVPP)] y 2/3 de fenol. La muestra se homogenizó con un homogeneizador MARCA con pistilo de plástico, previamente enfriado en nitrógeno líquido durante 5 segundos, a velocidad máxima durante 2 a 3 min. Se agregaron 200 µl de la mezcla del buffer con el fenol y se agitaron vigorosamente durante 1 minuto. Después, las muestras se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se tomó la fase orgánica y se colocó en un tubo nuevo. Se agregó un volumen de una mezcla en una proporción de 1/3 parte del amortiguador de extracción, pero ahora sin PVPP y 2/3 partes de fenol. Se agitó vigorosamente durante un minuto y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó la fase orgánica y se colocó en un tubo eppendorf nuevo. Se agregó acetato de amonio 0.1 M en metanol hasta llenar el tubo (aproximadamente 1 ml) y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Después de este período, las muestras se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C después de lo cual se descartó el sobrenadante. La pastilla resultante constituida por las proteínas precipitadas se lavó con acetona al 80%, previamente enfriada a -20°C, para evitar que la pastilla se disolviera, y se dejó secando en la campana de extracción de 5 a 10 minutos, dependiendo de su tamaño. La pastilla se solubilizó con 10-20 µl de buffer de solubilización SDS (1% CHES, 2% SDS, 2% β-mercaptoetanol y 10% glicerol).

La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método de Lowry utilizando como referencia una curva estándar realizada con albúmina de suero bovino.

#### ❖ *Electroforesis de proteínas*

El análisis electroforético de las proteínas se llevó a cabo en geles SDS-PAGE con acrilamida/bisacrilamida al 15%. Las alícuotas (35 µg) de proteína total de semilla o de plántulas se cargaron en el gel y se separaron a 100 mV durante aproximadamente 1 ½ horas.

#### ❖ *Western blot*

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham, 0.2 µm) en una cámara de transferencia en líquido con un buffer que contenía Tris 25 mM, glicina 0.2 M y metanol al 20% (v/v) durante 1 hora a 100 mV. Las membranas se fijaron con 10% de ácido acético y 25% de isopropanol durante 30 minutos y se verificó la transferencia mediante una tinción reversible con rojo Ponceau (1% de rojo Ponceau en 5% de ácido acético) y se destiñó con agua miliQ estéril. Para bloquear las regiones sin proteína de la membrana, que pudieran producir reacciones inespecíficas con los anticuerpos o con los reactivos de revelado, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con PBST [PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), Tween al 0.1%] y leche descremada al 5%. Después se les agregó el anticuerpo primario anti-AtLEA 4-5 anti-conejo (Anticuerpo obtenido en el

laboratorio) a una concentración 1:2000 o el anticuerpo primario anti-GFP anti-ratón (Thermo Scientific #A-11121) a una concentración 1:3000, diluido en PBST y leche descremada al 5%. La membrana se incubó durante 3 horas para el anticuerpo anti-AtLEA 4-5 y durante 1 hora para el anticuerpo anti-GFP, a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente, se lavaron las membranas 5 veces con PBST durante 5 minutos por cada lavado, para posteriormente incubarla con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa a una concentración 1:30000, el cual fue utilizado para las membranas incubadas con anti-AtLEA4-5; en tanto que para las membranas incubadas con el anticuerpo anti-GFP, estas se reaccionaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa a una concentración 1:20000. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a la concentración requerida, diluidos en PBST y leche descremada al 5%. La membrana se lavó 5 veces durante 5 minutos con PBST y se incubó con peróxido y luminol (Marca Pierce) 1:1 durante 3 minutos. La membrana se colocó entre dos acetatos y se puso en un cassette para revelado. Se utilizó película Kodak X-Omat para detectar la señal de la actividad de peroxidasa, exponiendo la película de 30 s a 30 min para, posteriormente, revelar de manera estándar.

## RESULTADOS

### Identificación de las regiones de DNA utilizadas como promotores de los genes *AtLEA4-5* y *AtLEA4-2* para las respectivas construcciones transcripcionales y traduccionales

Para conocer la expresión como la localización de las proteínas de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* de manera visual en los diferentes tejidos de la planta, se utilizaron los promotores de cada uno de estos genes para cada una de las construcciones realizadas. Se decidió utilizar sus propios promotores para que la expresión y la acumulación de la proteína que se presenta en los tejidos y órganos de la planta fuera lo más semejante a los endógenos. Se sabe que es complicado delimitar un promotor ya que hasta el momento los diversos criterios que pueden tenerse para la elección de la longitud de un promotor pueden agregar o quitar elementos que puedan ser necesarios para la expresión del gen, además de que pueden existir elementos en regiones más alejadas o inclusive en otros cromosomas que pueden alterar su transcripción. En este caso, el criterio que se tomó para delimitar la longitud del promotor para cada uno de los genes de interés fue utilizar la región comprendida entre Como región promotora se consideró la secuencia comprendida entre el 3' UTR del gen río arriba de nuestro gen de interés, y el final del 5' UTR del gen *AtLEA4-2* o el gen *AtLEA4-5* (Fig. 8 línea negra y verde)). La región correspondiente para el promotor del gen *AtLEA4-2* es de 1492 pares de bases (pb), mientras que la del gen *AtLEA4-5* consta de 389 pb (Fig. 8).

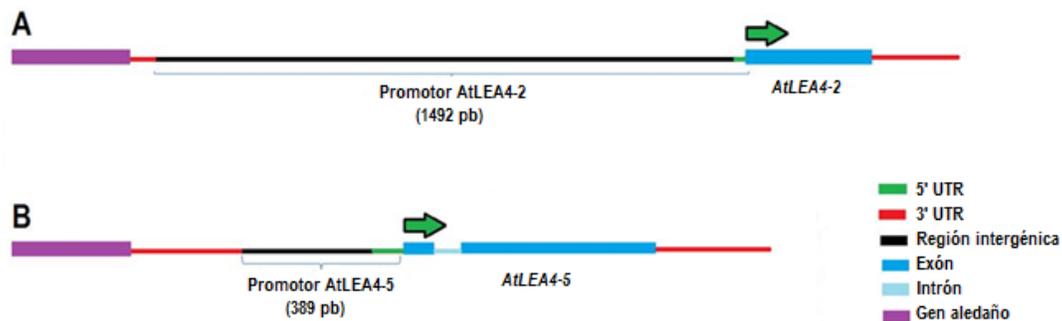


Figura 8. Esquema que muestra el contexto en el cual se encuentran los genes *AtLEA4-2* (A) y *AtLEA4-5* (B). En corchetes azules se señala la región que se delimitó como promotor para cada uno de los genes de interés. Estas regiones corresponden a la región intergénica entre el gen de interés y el gen aledaño (línea negra) el 5' UTR del gen de interés (línea verde) y el codón de inicio. Los colores a la derecha de la imagen representan las diferentes regiones del gen y aledaños.

Posteriormente se analizaron estas regiones para la búsqueda de posibles elementos en *cis* que indicaran que las regiones elegidas como promotores respondieran a las condiciones que previamente se habían establecido para cada uno de ellos. Estas regiones se analizaron con el servidor PLACE (Higo et al., 1999) y los diferentes elementos en *cis* que resultaron de este análisis, se clasificaron en diferentes categorías según sus características (Tabla 4 y Anexo 1).

En algunos análisis de promotores de los genes LEA de *A. thaliana* se ha observado que los elementos *cis* más representados son los elementos ABRE de respuesta a ABA y déficit hídrico, y el elemento LTRE de respuesta a frío, lo cual concuerda con los patrones de acumulación que se han observado para varios de los transcritos de estos genes en estas condiciones (Hundertmark y Hinch, 2008). En el caso de nuestro análisis, se identificaron estos y otros elementos *cis* implicados en la respuesta al estrés por frío o por déficit hídrico, lo cual es consistente con su expresión bajo estas condiciones. Cabe mencionar que, como podría esperarse, la mayoría de los elementos *cis* identificados están relacionados con la respuesta a ABA, fitohormona que realiza un papel importante en la respuesta a esta condición.

Tabla 4. Elementos en *cis* encontrados en cada uno de las regiones promotoras para los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*. En la columna izquierda se muestran las diferentes categorías en las que se encuentran involucrados cada uno de los elementos *cis* identificados. Entre paréntesis se indica la cantidad de elementos encontrados.

| CATEGORÍAS                           | Elementos en <i>cis</i> encontrados en el promotor de <i>AtLEA4-2</i> | Elementos en <i>cis</i> encontrados en el promotor de <i>AtLEA4-5</i> |
|--------------------------------------|---|---|
| Desarrollo de flor, meristemo floral | AGAMOUS (19), AP1 (3), CORE (35).                                     | AGAMOUS (3), CORE (6).  |
| Desarrollo en general                | GATABOX (16), ATHB-5 (12), PDF1 (1)                                   | GATABOX (8). ATHB1 (1), ATHB-5(3)                                     |
| Desarrollo de hoja y nuevos brotes   | ATHB-9 (4), Bellringer (2), AGL5-like (8). RAV1 (1).                  | ATHB-9 (1), RAV1 (6).   |
| Desarrollo de raíz                   | ARR10 (13), RHE (1).  | ARR10 (1), RHE (1).   |
| Inducción por luz, fitocromos        | PIF3 (5), LHCB1 (1), CCA1 (1), GT1 (11), IBOX (1), SORLIP1 (2).       | PIF3 (4).   |
| Frio                                 | LTRE (1), COR15 (1), MYC (14).  | COR15 (1), MYC (2)  |
| ABA/ déficit hídrico                 | ABRE (11), ERD1 (14), MYB (5), DPBF (2).                              | ABRE(12), ERD1 (8), MYB (14), DPBF (3).                               |
| Germinación/ ácido giberélico        | GADOWNAT (1), GARE (2).   |   |
| Citocininas                          | ARR1 (21).  | ARR1 (3).   |
| Ácido salicílico                     |   | ASF-1 (4), GT-1 (2), NPR1 (2).  |
| Auxinas                              |   | ASF-1 (4).  |
| Otros                                |   | SULTR1 (1).   |

Como ya se ha mencionado anteriormente, si bien se sabe que la mayoría de las proteínas LEA se acumulan en condiciones de déficit hídrico, no se sabe para la gran mayoría en que tejidos de la planta es donde se acumulan. Para el caso de *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*, los elementos *cis* encontrados nos podrían sugerir en que tejidos o regiones de la planta se podrían encontrar acumuladas estas proteínas. Los datos obtenidos mostraron presencia de algunos motivos conservados entre ambos promotores y otros particulares para cada uno. Por ejemplo, en el promotor del gen *AtLEA4-2* se identificaron un mayor número de elementos *cis* que están involucrados en el desarrollo de flor, raíz y hoja, o bien en procesos de desarrollo de la planta en general. También se identificaron elementos *cis* implicados en la regulación por luz/fitocromos en ambos promotores, encontrándose en

mayor abundancia en el promotor del gen *AtLEA4-5*. En ambos casos también se encontraron elementos de respuesta a otras hormonas como citocininas y ácido salicílico y, para auxinas sólo en el caso del promotor para el gen *AtLEA4-5*.

Si bien no se ha comprobado la funcionalidad de los elementos *cis* encontrados en los promotores de nuestros genes de interés, este análisis nos sugiere que estas proteínas podrían presentar un patrón de localización distinto, dado por los diferentes elementos involucrados en desarrollo de diferentes órganos de la planta y por el número de veces que se encuentran representados en cada uno de los promotores.

### Construcciones transcripcionales y traduccionales para los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*

Para conocer la expresión de los dos genes en los diferentes tejidos y órganos de la planta, se realizaron construcciones donde se fusionó cada uno de los promotores de estos genes a la región codificante de los genes reporteros *EGFP* y *GUS* mediante recombinación, en donde el vector de origen o entrada (pENTR/SD/D-TOPO) contenía la región promotora del gen *AtLEA4-2* ó *AtLEA4-5*; en tanto que el vector destino *gateway* pKGWFS7 (Karimi et al., 2002, esquema en anexo 2) contenía las regiones codificantes de los genes reporteros *EGFP* y *GUS* (Fig. 9). Para la obtención de las construcciones adecuadas, se realizaron las reacciones de recombinación y se obtuvieron las construcciones correspondientes *p4-2::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-GUS*. Cabe mencionar que la construcción *p4-2::EGFP-GUS* ya se tenía en el laboratorio y fue elaborada por el M. en C. David Rendón. La construcción *p4-5::EGFP-GUS* se verificó por secuenciación con oligos específicos para cada promotor (Anexo 5).

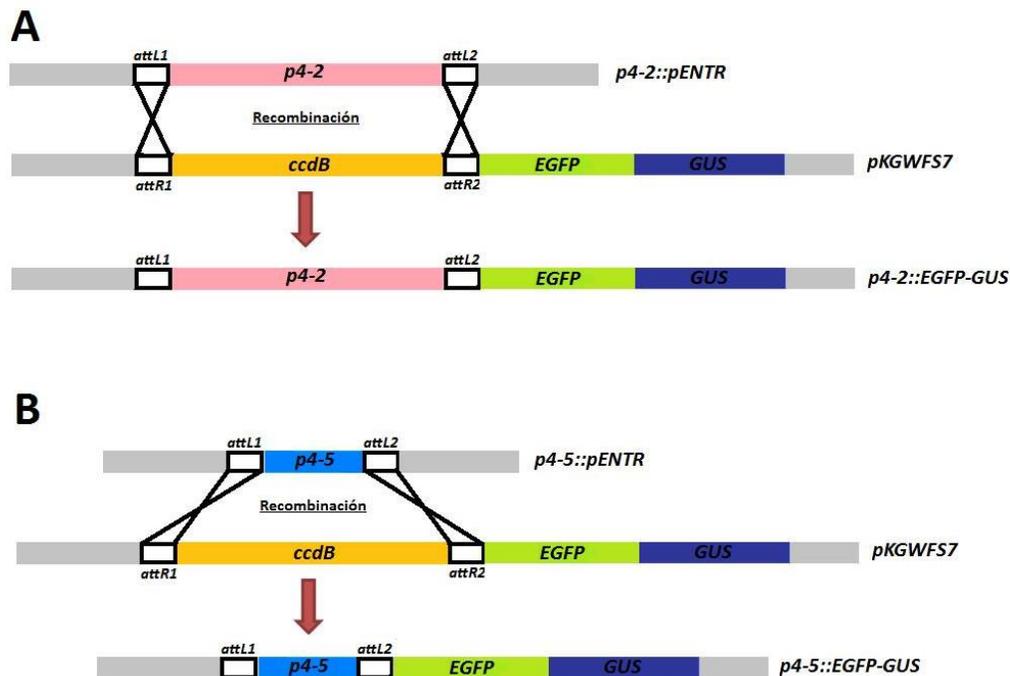


Figura 9. Esquema que muestra la estrategia seguida para la obtención de las construcciones *p4-2::EGFP-GUS* (A) y *p4-5::EGFP-GUS* (B) mediante el uso del sistema Gateway, donde el vector de origen contiene el promotor del gen

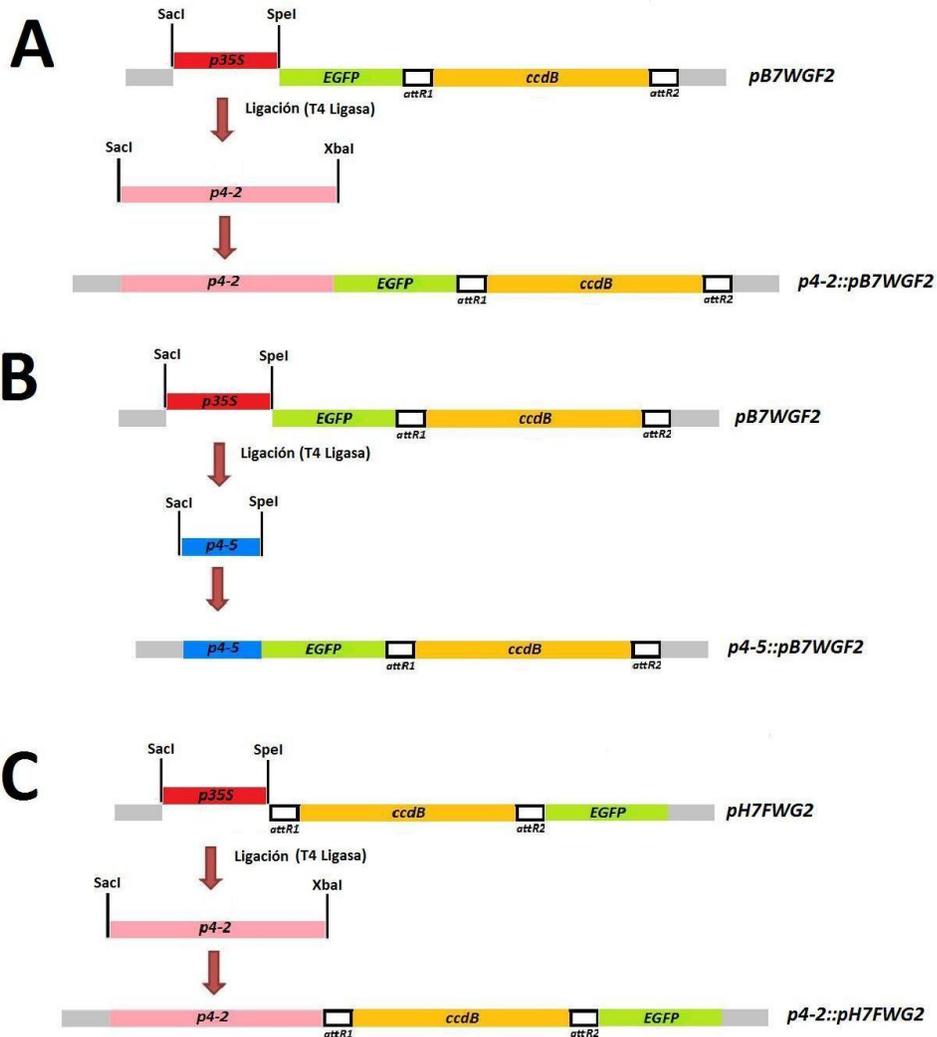
correspondiente y el vector de destino contiene los genes reporteros *EGFP* y *GUS*. *p4-2*, promotor de *AtLEA4-2*; *p4-5*, promotor de *AtLEA4-5*; *EGFP*, enhanced green fluorescent protein, proteína verde fluorescente mejorada; *GUS*,  $\beta$ -glucuronidase enzyme, enzima  $\beta$ -glucoronidasa; *attL1* y *attL2*, sitios de recombinación del vector origen; *attR1* y *attR2*, sitios de recombinación del vector destino; *ccdB*, control of cell death B protein, proteína de control de muerte celular tipo b.

Puesto que las fusiones traduccionales resultan en proteínas quiméricas que podrían presentar diferencias con los patrones de localización para la proteína nativa, la estrategia estándar que se ha adoptado en estos casos es fusionar las proteínas reporteras al N-terminal o al C-terminal de las proteínas de interés; bajo el supuesto de que si ambas fusiones presentan el mismo patrón, éste podría ser representativo al de la proteína *in planta*. Para ello se utilizaron el vector Gateway *pB7WGF2* (Karimi et al., 2002, esquema en anexo 3), en el cual la proteína EGFP queda en el extremo N-terminal de las proteínas a fusionar, y el vector Gateway *pH7FWG* (Karimi et al., 2002, esquema en anexo 4), en el que la proteína EGFP queda en el extremo C-terminal de cada una de las proteínas de interés. Dado que estos vectores poseían un promotor constitutivo *p35S*, éste se sustituyó por el promotor de cada uno de los genes de interés. Primero se eliminó el promotor *35S* mediante una doble digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *SpeI* que cortaban en el extremo 5' y 3' de este promotor. Una vez obtenidos los vectores sin el promotor *35S* se ligaron los fragmentos de cada uno de los promotores de interés, obtenidos a partir de dobles digestiones con enzimas específicas: *SacI* y *SpeI* del plásmido *p4-5::EGFP::GUS* y con *SacI* y *XbaI* del plásmido *p4-2::pJET* (proporcionado por el M. en C. David Rendón) que tenía incluidos por diseño los sitios de corte para estas enzimas (Fig. 10). La inserción independiente de los promotores de los genes *AtLEA4-5* y *AtLEA4-2* a los vectores *pB7WGF2* y *pH7FWG2* se corroboró por secuenciación (Anexo 6 y 7).

Una vez obtenidos los vectores modificados, mediante recombinación con vectores que contenían las regiones codificantes de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* con codón de paro (*AtLEA4-5::pENTR* y *AtLEA4-2::pENTR*) y sin codón de paro (*AtLEA4-5NS::pENTR* y *AtLEA4-2NS::pENTR*) en el vector de origen *pENTR/SD/D-TOPO* (proporcionadas por el I. B. Q. Cesar Cuevas), se obtuvieron las siguientes construcciones: *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* y *p4-2::EGFP-AtLEA4-2*, en donde la proteína EGFP queda situada en el lado N-terminal de las proteínas LEA (Fig. 11 A y B); *p4-5::AtLEA4-5NS-EGFP* y *p4-2::AtLEA4-2NS-EGFP*, en donde la proteína EGFP queda situada en el lado C-terminal de las proteínas LEA (Fig. 11 C y D). Estas construcciones se corroboraron por secuenciación con oligos específicos (Anexo 8 y 9).

Todas las construcciones obtenidas se introdujeron en *A. tumefaciens* (cepa GB3010) y se utilizaron para la transformación de plantas de *A. thaliana Wt* ecotipo Col mediante la técnica de inmersión floral (ver Materiales y métodos). Las semillas obtenidas se sometieron a selección en medio MS con los antibióticos correspondientes para cada construcción: kanamicina para *p4-2::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-GUS*; metionina sulfolximina para *p4-2::EGFP-AtLEA4-2* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*; e higromicina para *p4-2::AtLEA4-2-EGFP* y *p4-5::AtLEA4-5-EGFP*, a una concentración final de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Las plántulas T1 resistentes al antibiótico correspondiente se seleccionaron como eventos de transformación

independientes, y se crecieron para obtener semillas. Las semillas T2 obtenidas de estas plantas se sometieron nuevamente a selección y se escogieron aquellas líneas que segregaron 3:1 (75% resistentes, 25% sensibles), lo cual nos sugería un solo evento de inserción del T-DNA. Se escogieron entre 5-10 plantas para cada construcción y se crecieron y colectaron semillas (T3). Se sometieron a selección nuevamente y aquellas líneas que mostraron un 100% de supervivencia (homocigotas para la inserción de T-DNA) se seleccionaron para posteriores experimentos. En el caso de las líneas *p4-2::EGFP-AtLEA4-2*, no se obtuvieron plantas que presentaran las características antes descritas, por lo cual queda pendiente el volver a transformar plantas de *A. thaliana* para la obtención de líneas transgénicas.



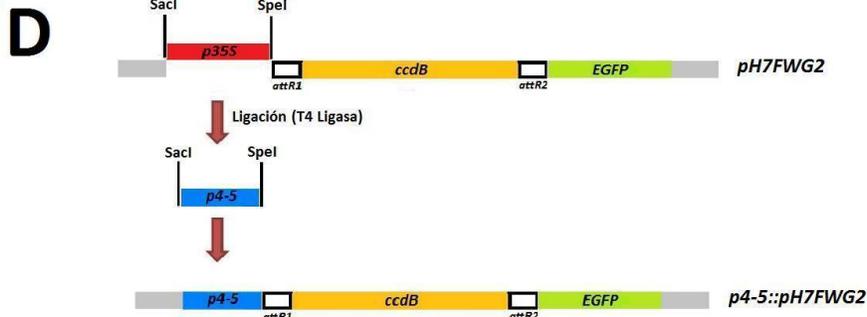
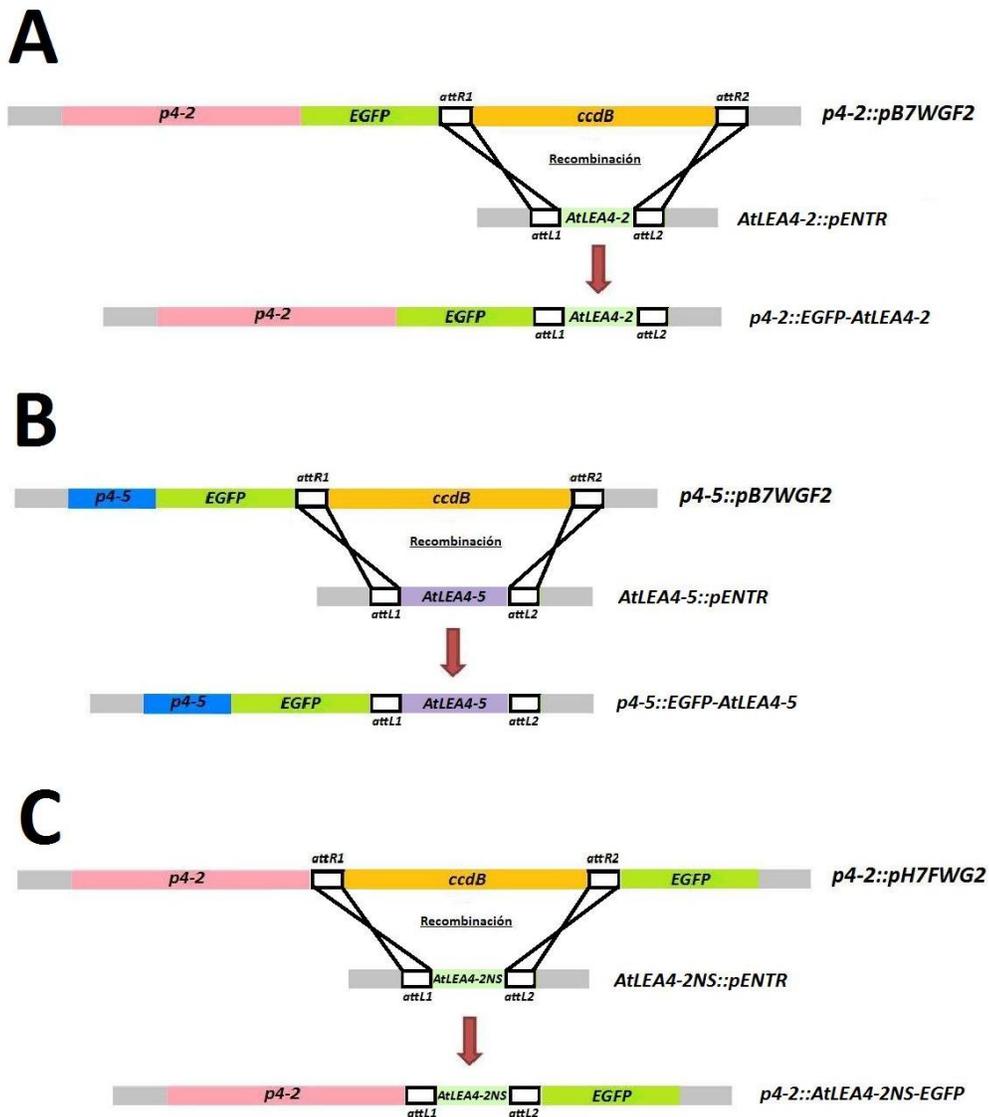


Figura 10. Esquema que muestra la sustitución del promotor p35S por los promotores de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* en los vectores *pB7WGF2* (A y B) y *pH7FWG2* (C y D). *p4-2*, promotor de *AtLEA4-2*; *p4-5*, promotor de *AtLEA4-5*; *EGFP*, enhanced green fluorescent protein, proteína verde fluorescente mejorada; *Sac1* y *Spe1*, enzimas de restricción; *attL1* y *attL2*, sitios de recombinación del vector origen; *attR1* y *attR2*, sitios de recombinación del vector destino; *ccdB*, control of cell death B protein, proteína de control de muerte celular tipo b.



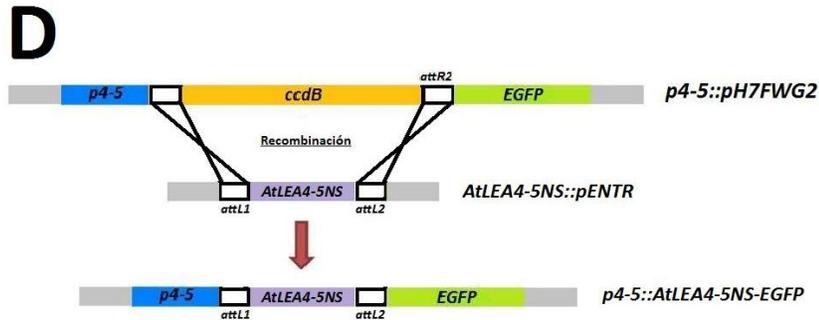


Figura 11. Esquema que muestra cómo se obtuvieron las construcciones *p4-2::EGFP-AtLEA4-2*, (A), *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (B), *p4-2::AtLEA4-2NS-EGFP* (C) y *p4-5::AtLEA4-5NS-EGFP* (D) mediante la recombinación de los vectores de origen *AtLEA42::pENTR*, *AtLEA4-5::pENTR*, *AtLEA4-2NS::pENTR* y *AtLEA4-5NS::pENTR* con los vectores de destino modificados *p4-2::pB7WGF2*, *p4-5::pB7WGF2*, *p4-2::pH7FWG2* y *p4-5::pH7FWG2*. *p4-2*, promotor de *AtLEA4-2*; *p4-5*, promotor de *AtLEA4-5*; *EGFP*, enhanced green fluorescent protein, proteína verde fluorescente mejorada; *attL1* y *attL2*, sitios de recombinación del vector origen; *attR1* y *attR2*, sitios de recombinación del vector destino; *ccdB*, *control of cell death B protein*, proteína de control de muerte celular tipo b.

### Análisis de las líneas *p4-5::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* en diferentes etapas del desarrollo y en condiciones de estrés.

En datos del trabajo reportado por Olvera-Carrillo et al., (2010), se había observado la acumulación del transcrito y de la proteína *AtLEA4-5* en plántulas de 2 semanas de edad que se sometían a diferentes condiciones de estrés (PEG-8000 25%, NaCl 100 mM, 150 mM y 200 mM) y al ABA durante un periodo de 12 h (Fig. 6). Para este trabajo, la condición de estrés que se utilizó para determinar la actividad del promotor mediada por la actividad de *GUS* y la localización de la proteína de este gen fue 200 mM de NaCl durante 12-13 horas, aunque no se descarta en un futuro trabajar con otros tipos de estrés como estrés osmótico mediada por PEG-8000 para comparar los resultados obtenidos en este trabajo. Para estos y los experimentos posteriores se utilizaron cinco líneas independientes de cada una de las construcciones.

La construcción *p4-5::EGFP-GUS* con la que sería posible determinar los patrones de expresión del gen *AtLEA4-5* utilizando la actividad de dos proteínas reporteras, lo que permitiría comparar los niveles de ambas bajo una condición dada, no mostraron resultados comparables. Cuando se analizaron las diferentes líneas que tenían esta construcción, no fue posible detectar la actividad de la *EGFP*, aún cuando la actividad de *GUS* siempre fue evidente. Estos resultados nos obligaron a analizar con detalle toda la secuencia para ambas proteínas reporteras en plásmidos de diferentes líneas. Se llegaron a detectar mutaciones en la región carboxilo de la región codificante para *EGFP*, lo cual explicaría la falta de actividad para esta enzima (Datos no mostrados). Es por esta razón que en las líneas *p4-5::EGFP-GUS* sólo se reporta la actividad de *GUS*, la cual mostró ser muy similar en los tejidos de las diferentes líneas independientes. Por tanto, se consideró que la actividad reportera de *GUS* era confiable y reflejaba la acumulación del transcrito de la *AtLEA4-5*.

En un primer acercamiento se examinó la inducción del promotor mediante la actividad de GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) en una condición ya reportada en el trabajo de Olvera-Carrillo et al., 2010. La actividad de GUS se determinó sometiendo a las plantas a una solución que contenía X-gluc (ácido 5-bromo-4-chloro-3-indolil glucurónico) el sustrato para la enzima GUS, a partir del cual genera como producto al ácido glucorónico que se detecta como un precipitado azul que podemos observar en las plantas bajo análisis. Este estudio se llevó a cabo con plántulas de líneas *p4-5::EGFP-GUS* de dos semanas de edad tratadas con NaCl 200 mM durante 12-13 h. Las plántulas tratadas, o bien, mantenidas bajo condiciones óptimas, se incubaron en las soluciones correspondientes para detectar la actividad de GUS, tanto en la raíz como en primordios foliares (Fig. 12). Como era de esperarse por los datos previos reportados se detectó actividad de GUS en las plantas tratadas con NaCl pero no así en las plantas que se mantuvieron en condiciones óptimas. A partir de estos resultados se propuso estudiar la actividad del promotor en plantas más jóvenes (5 y 7 dpv), cuando éstas se encuentran en su etapa de establecimiento, fase que es sensible a condiciones de estrés. Adicionalmente esta etapa también representaba una ventaja experimental pues facilitaba su manipulación, evitando así causar daño y generar con ello patrones espurios.

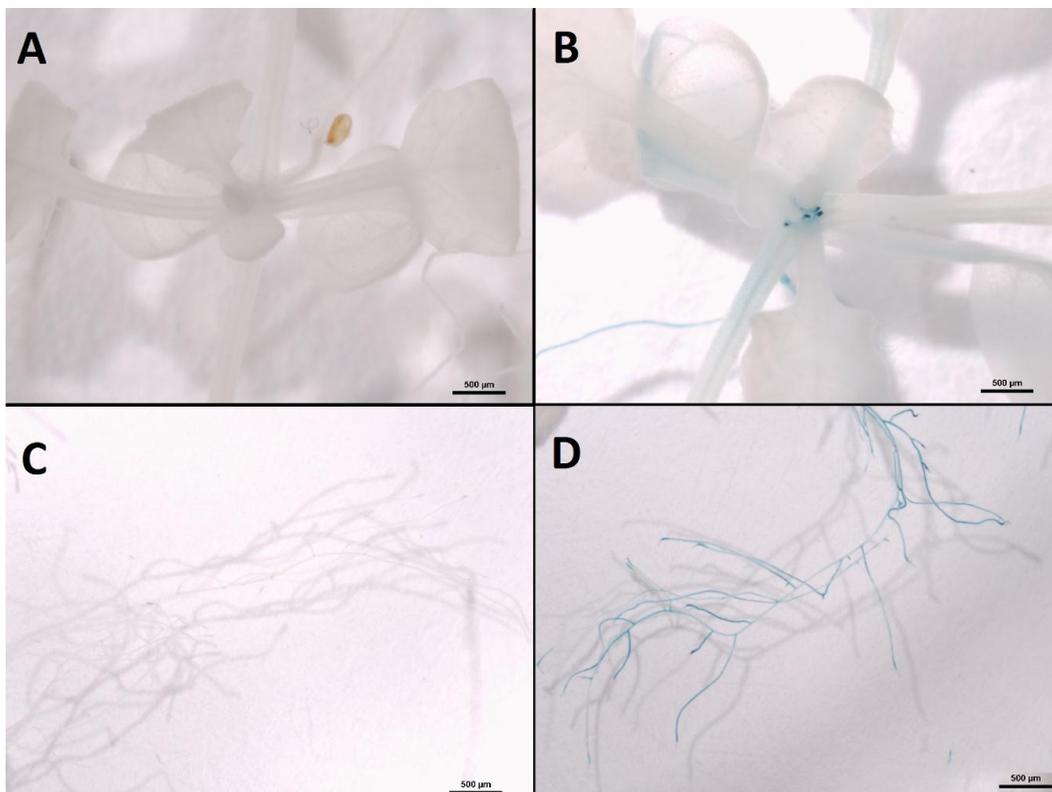


Figura 12. Actividad del promotor del gen *AtLEA4-5* detectada por tinción histoquímica de GUS en plantas de dos semanas de edad en condiciones óptimas (A y C) o sometidas a tratamiento con 200 mM de NaCl durante 12-13 h (B y D). Se observa actividad de GUS en primordios foliares (B) y en la raíz (D) de plantas sometidas a estrés mientras que en plantas en condiciones óptimas no se observa actividad de GUS tanto en la parte aérea (A) como en la raíz (C). La barra negra indica la escala, 500  $\mu$ m.

En el trabajo de Olvera-Carrillo et al. (2010) también se observó que tanto el transcrito como la proteína de este gen también se acumulaban diferencialmente en etapas tardías del desarrollo del embrión, en el embrión maduro y durante la germinación y el establecimiento de la plántula. Durante estas etapas, las plantas se encuentran sometidas a diferentes condiciones hídricas que implican una disminución de la cantidad de agua disponible, como lo es el caso de las últimas etapas del desarrollo del embrión y la formación de la semilla. Cuando la semilla se encuentra en las condiciones idóneas para germinar, entre ellas la disponibilidad de agua en el ambiente, el estatus hídrico cambia y la planta absorbe agua para poder desarrollarse. Por estas razones, y debido a que estas proteínas se acumulan típicamente de forma abundante durante la etapa de desecación de la semilla, se propuso analizar la localización de GUS y de la proteína EGFP-AtLEA4-5 durante estos estadios del desarrollo.

❖ *Detección de la fusión EGFP-AtLEA4-5 mediante ensayos tipo western*

Para corroborar que la señal de EGFP que se observó en los diferentes tejidos, etapas del desarrollo y condiciones de crecimiento hasta el momento analizadas y que se muestran más adelante correspondía a la fusión de esta proteína reportera con la proteína AtLEA4-5 en plantas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, se realizaron experimentos tipo western para la detección de esta fusión con anticuerpos específicos para ambas proteínas. Para la detección se utilizaron extractos de proteína total de plántulas de 5 dpg *Wt* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* en condiciones control y de estrés, y de semillas *Wt* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*. Como se muestra en la Fig. 13A, el anticuerpo anti-AtLEA4-5 detectó una banda con un peso molecular de aproximadamente 43.1 kDa (flecha roja), correspondiente al peso molecular esperado para la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5, y mayor al de la proteína AtLEA4-5 endógena (flecha azul), en extractos de proteína total obtenidos de plántulas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* sometidas a tratamientos con 200 mM NaCl por 12-13 horas. También se aprecia que el anticuerpo detectó proteína endógena, en menor abundancia comparada con la proteína EGFP-AtLEA4-5, en plantas *Wt* y en *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* sometidas a condiciones de estrés salino. De igual manera, la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 se detectó con el anticuerpo anti-GFP en plántulas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* sometidas a 200 mM NaCl por 12-13 horas (Fig. 13B, flecha roja). El hecho de que el anticuerpo anti-GFP sólo haya detectado la proteína de fusión en extractos proteicos obtenidos de plantas crecidas bajo condiciones de estrés y no bajo condiciones de irrigación óptima, como ocurrió en el caso anterior, sólo es un indicativo de la menor abundancia de la proteína bajo condiciones no estresantes y de un menor título del anticuerpo anti-GFP comparado con el anti-AtLEA4-5.

## Plántulas de 5 dpq

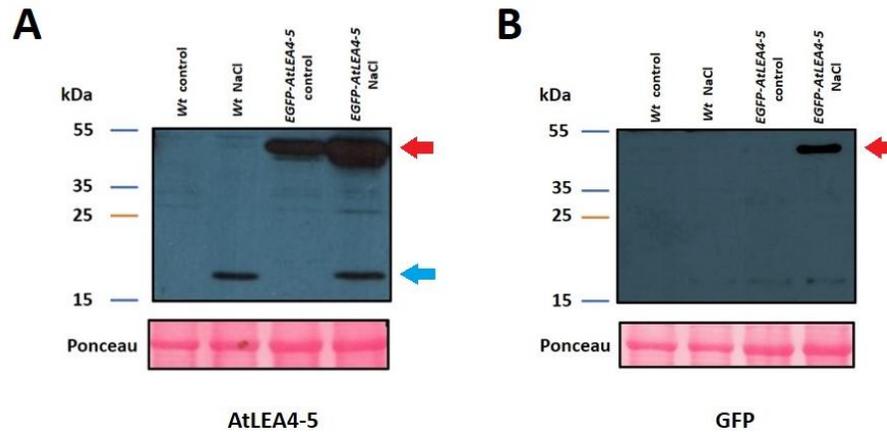


Figura 13. Detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 mediante anticuerpos contra la proteína AtLEA4-5 (A) o contra la GFP (B) en plántulas con la construcción *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* de 5 dpq crecidas en condiciones de estrés. En el panel A se muestra la detección con el anticuerpo anti-AtLEA4-5 de la proteína endógena AtLEA4-5 en extractos de proteínas de plantas *Wt* y de transgénicas con la construcción *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* crecidas bajo estrés salino (flecha azul) y, la detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 en plantas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* crecidas en condiciones de estrés y en menor abundancia en condiciones control (flecha roja). En el panel B se muestra la detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 en extractos de proteínas de plantas con la construcción *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (flecha roja) con el anticuerpo anti-GFP. El anticuerpo primario anti-AtLEA4-5 se utilizó 1:2000 y se incubó durante 3 horas, en tanto que el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa se usó 1:30,000 y se incubó durante 1 hora. La película se expuso durante 3 horas (A). El anticuerpo primario anti-GFP se utilizó 1:3000 y se incubó durante 1 hora, en tanto que, el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa se usó a una dilución 1:20,000 y se incubó durante 1 hora. En este caso la exposición fue de toda una noche (B). La parte inferior de la figura corresponde a la tinción reversible con rojo de Ponceu de la membrana que muestra la carga homogénea en los diferentes carriles con 35 µg de proteína total de cada una de las muestras.

Un experimento similar, se llevó a cabo utilizando extractos de proteína total obtenidos de semillas secas de plantas *Wt* o de plantas transgénicas con la construcción *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*. Como se muestra en la Fig. 14 A y B, ambos anticuerpos detectan las proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 (flecha roja), y en mayor abundancia comparado con la proteína AtLEA4-5 endógena (flecha azul).

Cabe destacar que el análisis de localización que se muestra más adelante en esta tesis, se realizó con cinco líneas independientes, las cuales mostraron una abundancia y un patrón de distribución similar entre ellas; lo que sugiere que están produciendo las proteínas esperadas y en niveles similares. Sin embargo, hasta ahora, la detección de las proteínas por experimentos tipo western sólo se ha llevado a cabo en dos de ellas. El análisis del resto se llevará a cabo en el futuro cercano.

## Semilla

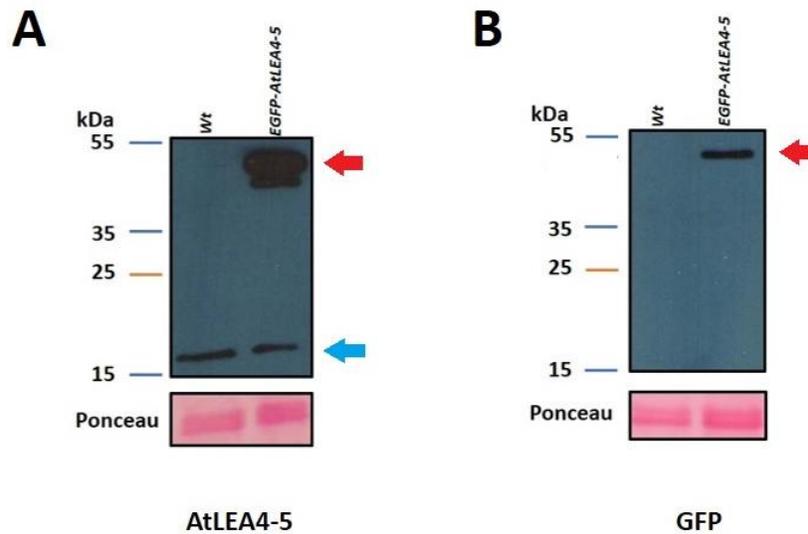


Figura 14. Detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 mediante anticuerpos contra la proteína AtLEA4-5 (A) o contra GFP (B) en semillas con la construcción *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*. En el panel A se muestra la detección con el anticuerpo anti-AtLEA4-5 de la proteína endógena AtLEA4-5 en extractos de proteínas de semillas *Wt* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (flecha azul) y la detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 solo en semillas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (flecha roja). En el panel B se muestra la detección de la proteína de fusión EGFP-AtLEA4-5 solo en semillas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (flecha roja) mediante un anticuerpo contra GFP. El anticuerpo primario anti-AtLEA4-5 se utilizó 1:2000 y se incubó durante 3 horas, en tanto que, el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa se utilizó 1:30,000 y se incubó durante 1 hora. La película se expuso durante 30 segundos (A). El anticuerpo primario anti-GFP se utilizó 1:3000 y se incubó durante 1 hora, en tanto que, el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa se utilizó 1:20,000 y se incubó durante 1 hora. La exposición fue de 3 horas (B). La parte inferior de la figura corresponde a la tinción reversible con rojo de Ponceu de la membrana que muestra la carga homogénea en los diferentes carriles con 35  $\mu$ g de proteína total de cada una de las muestra.

Como se hizo notar, utilizando el mismo anticuerpo se detectan niveles mayores de la proteína de fusión que de la proteína endógena. Esto sugiere que se produce más debido posiblemente a que no se hayan incluido todas las señales de regulación presentes en su contexto cromosómico original en el promotor utilizado para las construcciones; o bien, a que la proteína de fusión es más estable que la proteína del tipo silvestre. Esto último, bien pudiera ser posible dado que la proteína AtLEA4-5 al poseer las características de una proteína desordenada, podría encontrarse en tal conformación en la células, lo cual la haría una presa fácil de proteasas, como sucede comúnmente con las proteínas de este tipo.

### ❖ Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en raíces de plántulas de 5 y 7 dpG sometidas a estrés salino

Para este estudio se utilizaron plantas de 5 dpG y 7 dpG que se sometieron a tratamiento con NaCl 200 mM durante 12-13 h. Para poder tener un mejor panorama de los patrones

de acumulación de GUS, que nos indicaría de manera indirecta donde se acumula el transcrito de este gen; como de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en los diferentes tejidos y zonas de la raíz, se hizo una reconstrucción a partir de *stacks* de imágenes tomadas de las diferentes secciones a lo largo de toda la raíz de plántulas de 5 y 7 dpv tanto de las líneas con *p4-5::EGFP-GUS* como de las líneas con *p4-5::EGFP::LEA4-5*, crecidas en condiciones de estrés o en condiciones control (Fig. 15-22). También se realizaron cortes transversales y cortes transversales virtuales en ciertas zonas de la raíz de plantas de 5 dpv sometidas a estrés para determinar con mayor precisión los tejidos en donde se acumula GUS y la proteína EGFP-AtLEA4-5 (Fig. 23). Este análisis mostró que tanto GUS como EGFP-AtLEA4-5 se acumulan de manera similar a lo largo de toda la raíz en condiciones de estrés salino (Fig. 16, 18, 20 y 22), mientras que en condiciones óptimas no se observó acumulación alguna (Fig. 15, 17, 19 y 21). Se pudo observar que en raíces de plántulas de 5 dpv crecidas en condiciones de estrés, GUS se acumula a lo largo de la raíz con excepción de la zona apical. En raíces de 7 dpv la acumulación de GUS también ocurre a lo largo de la raíz, con excepción de la zona apical, aunque la acumulación se da mayoritariamente en la zona más próxima a la parte aérea, en donde se da la emergencia de raíces laterales. A nivel tisular, GUS se acumula en diferentes tejidos de la raíz, desde la epidermis hasta los haces vasculares, observándose una mayor acumulación en los haces vasculares más próximos a la parte aérea de la planta (Fig. 16 y 20). Este patrón es similar cuando se analiza la localización de la proteína EGFP-AtLEA4-5 a lo largo de la raíz (Fig. 18 y 22). Los cortes transversales que se realizaron en la zona de elongación de raíces de 5 dpv sometidas a estrés indicaron que GUS se encuentra en casi todos los tejidos de la raíz (epidermis, córtex, endodermis, periciclo y haces vasculares), con la mayor acumulación en endodermis, periciclo y haces vasculares (Fig. 23A), mientras que la proteína EGFP-AtLEA4-5 se acumula mayoritariamente en córtex, endodermis, periciclo y haces vasculares (Fig. 23B).



Figura 15. Reconstrucción con imágenes tomadas a lo largo de la raíz de plantas *p4-5::EGFP-GUS* de 5 dpv en condiciones óptimas de crecimiento. De lado izquierdo se muestra la raíz completa mientras que del lado derecho se muestran amplificadas distintas zonas de la raíz. Las líneas negras muestran la escala, 1 mm en la imagen izquierda y 100 μm en las imágenes del lado derecho.

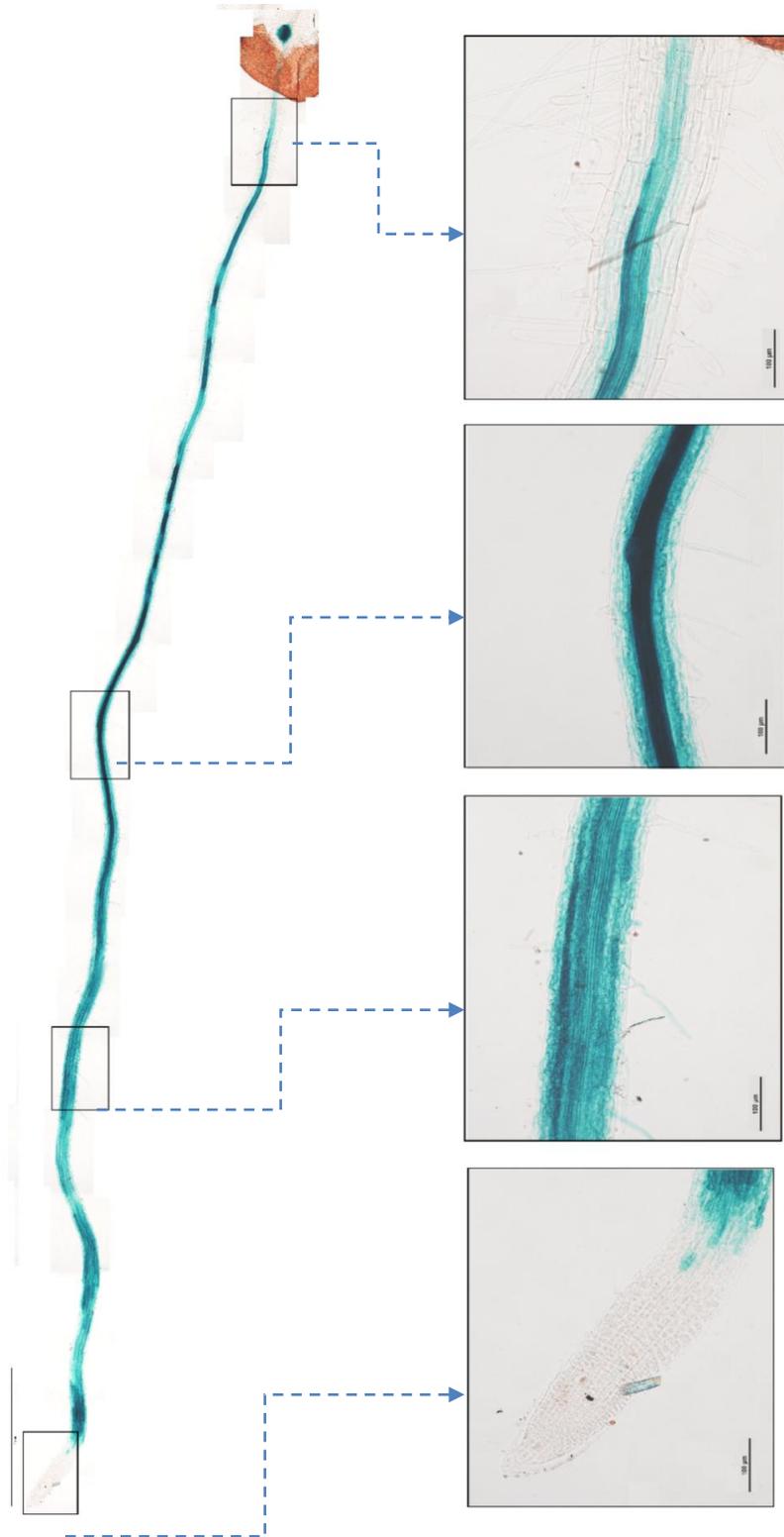


Figura 16. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con *p4-5::EGFP-GUS* de 5 dpg sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h. Del lado izquierdo se muestra la raíz completa mientras que del lado derecho se muestra la amplificación de distintas zonas de la raíz. Las barras negras muestran la escala, 1 mm en la imagen izquierda y 100  $\mu$ m en las imágenes del lado derecho.

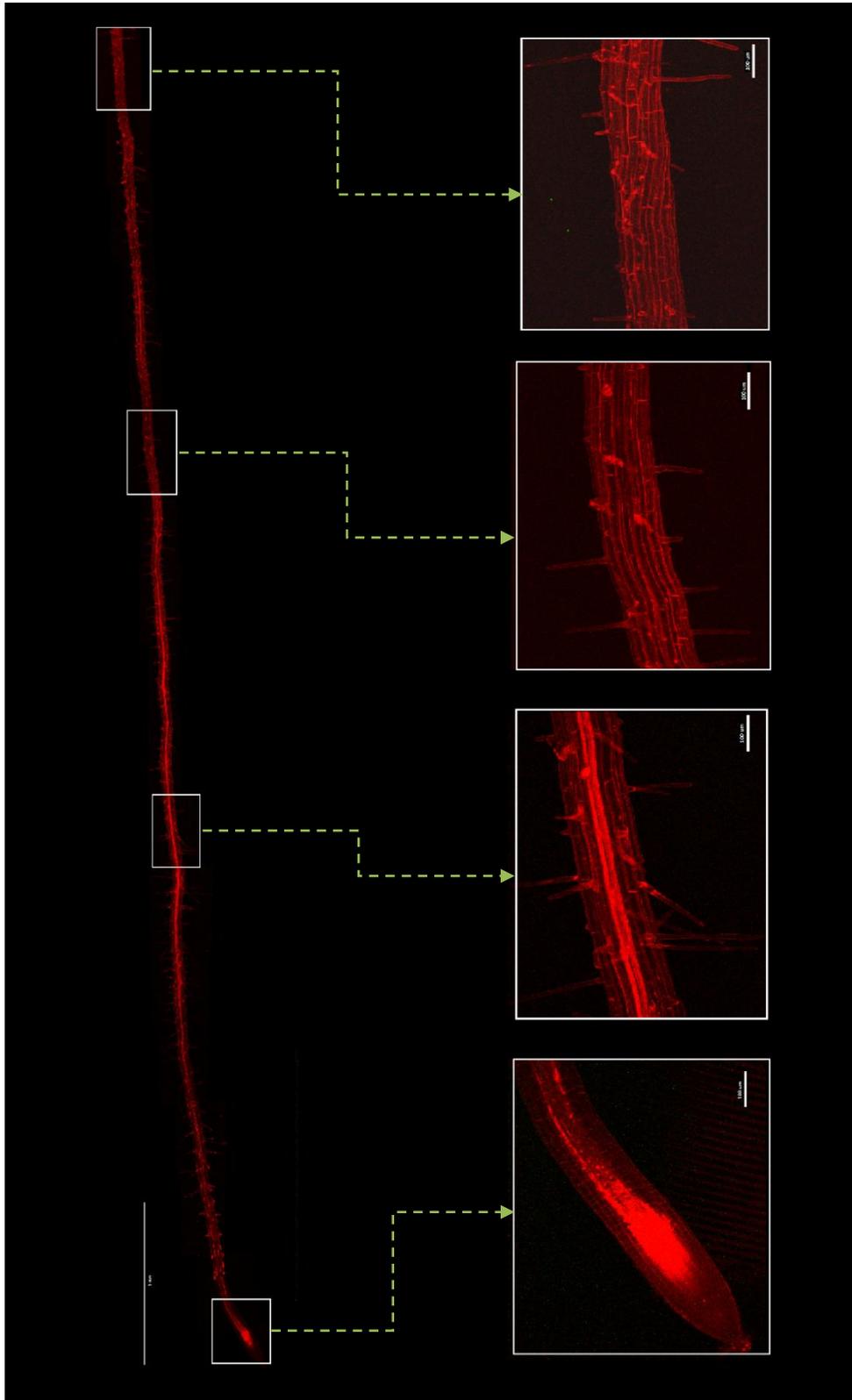


Figura 17. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* de 5 dpv en condiciones óptimas de crecimiento. Del lado izquierdo se muestra la raíz completa mientras que del lado derecho se muestran amplificadas distintas zonas de la raíz. Rojo, tinción con yoduro de propidio. Las barras blancas muestran la escala, 1 mm en la imagen del lado izquierdo y 100 μm en las imágenes del lado derecho.

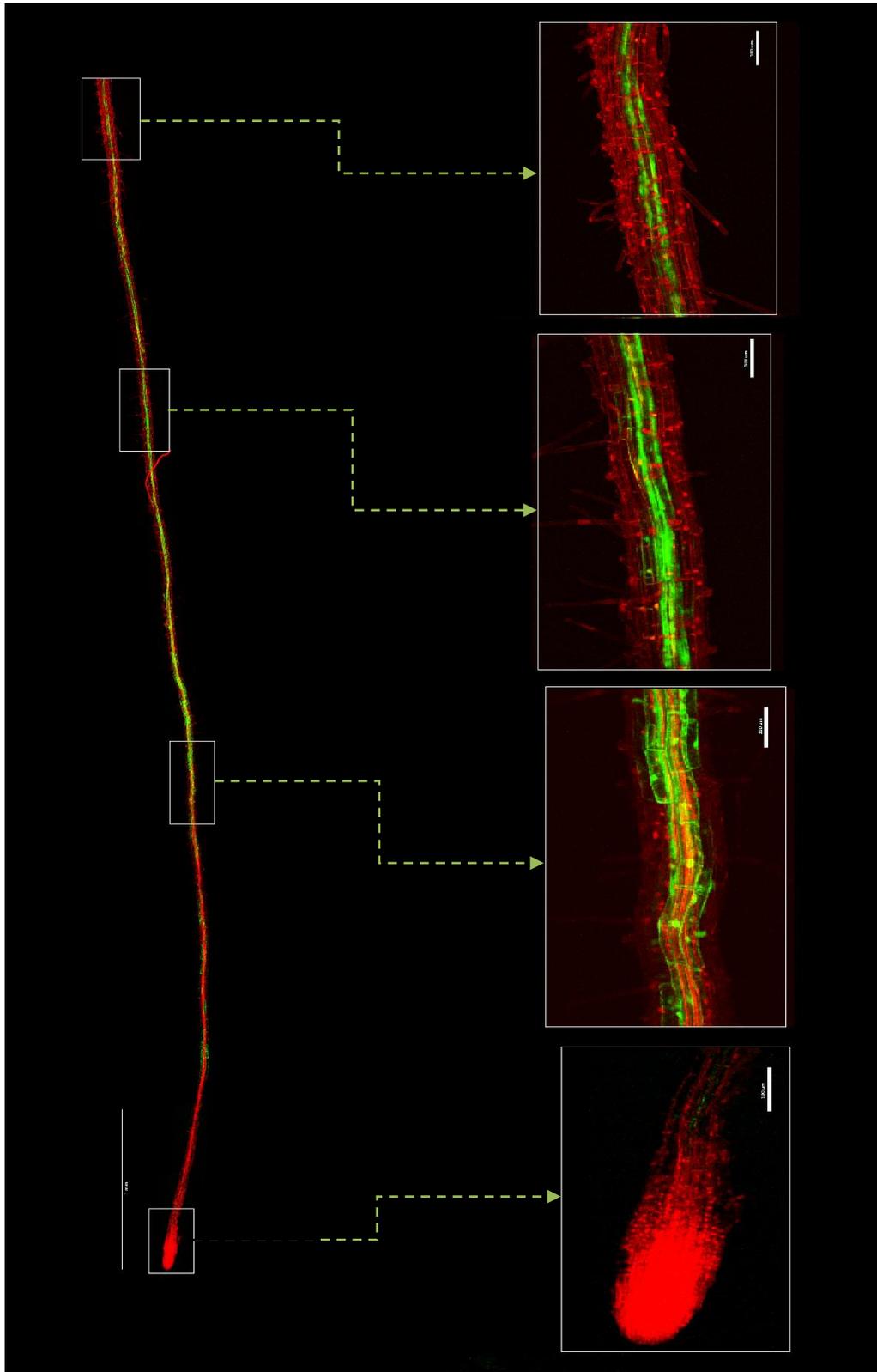


Figura 18. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* de 5 dpv sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h. De lado izquierdo se muestra la raíz completa mientras que del lado derecho se muestran amplificadas distintas zonas de la raíz. Rojo, tinción con yoduro de propidio; verde, señal de EGFP. Las barras blancas muestran la escala, 1 mm en la imagen del lado izquierdo y 100 μm en las imágenes del lado derecho.



Figura 19. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con *p4-5::EGFP-GUS* de 7 dpg en condiciones óptimas de crecimiento. De lado izquierdo se muestra la raíz completa, mientras que del lado derecho se muestran amplificadas distintas zonas de la raíz. Las líneas negras muestran la escala, 1 mm en la imagen izquierda y 100  $\mu$ m en las imágenes del lado derecho.

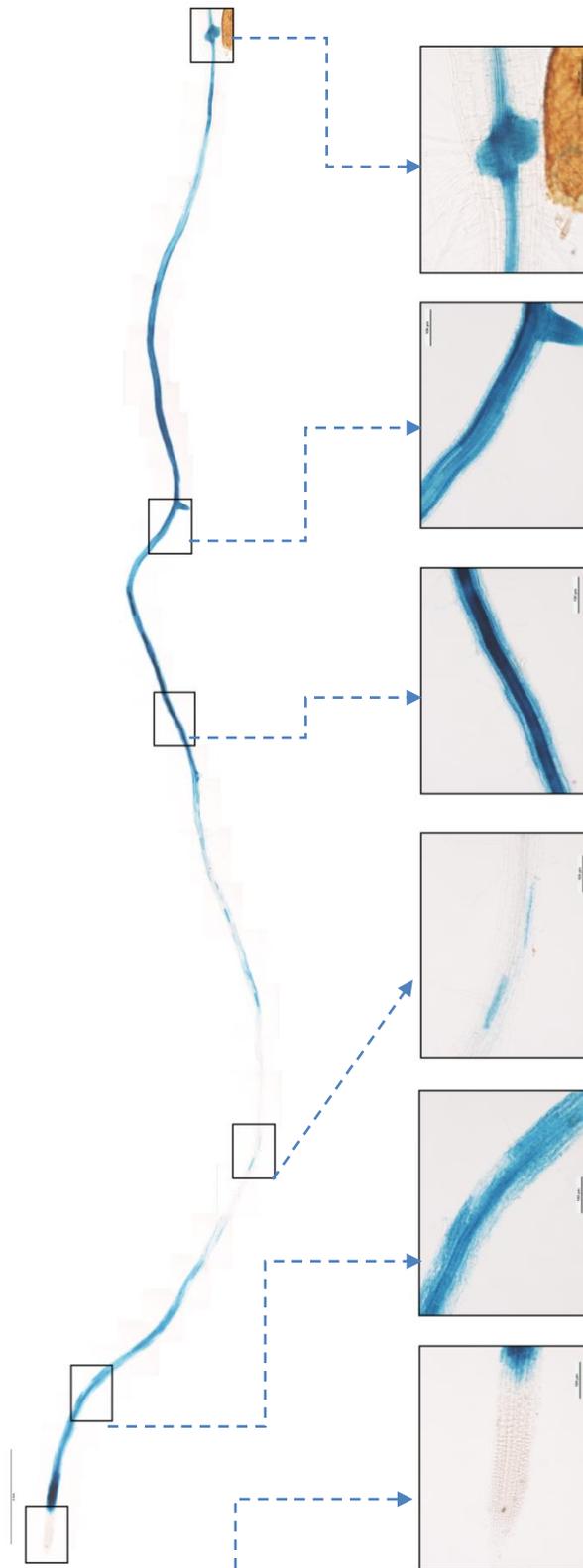


Figura 20. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas *p4-5::EGFP-GUS* de 7 dpg sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h. Del lado izquierdo se muestra la raíz completa mientras que del lado derecho se muestran amplificadas distintas zonas de la raíz. Las barras negras muestran la escala, 1 mm en la imagen izquierda y 100  $\mu$ m en las imágenes del lado derecho.

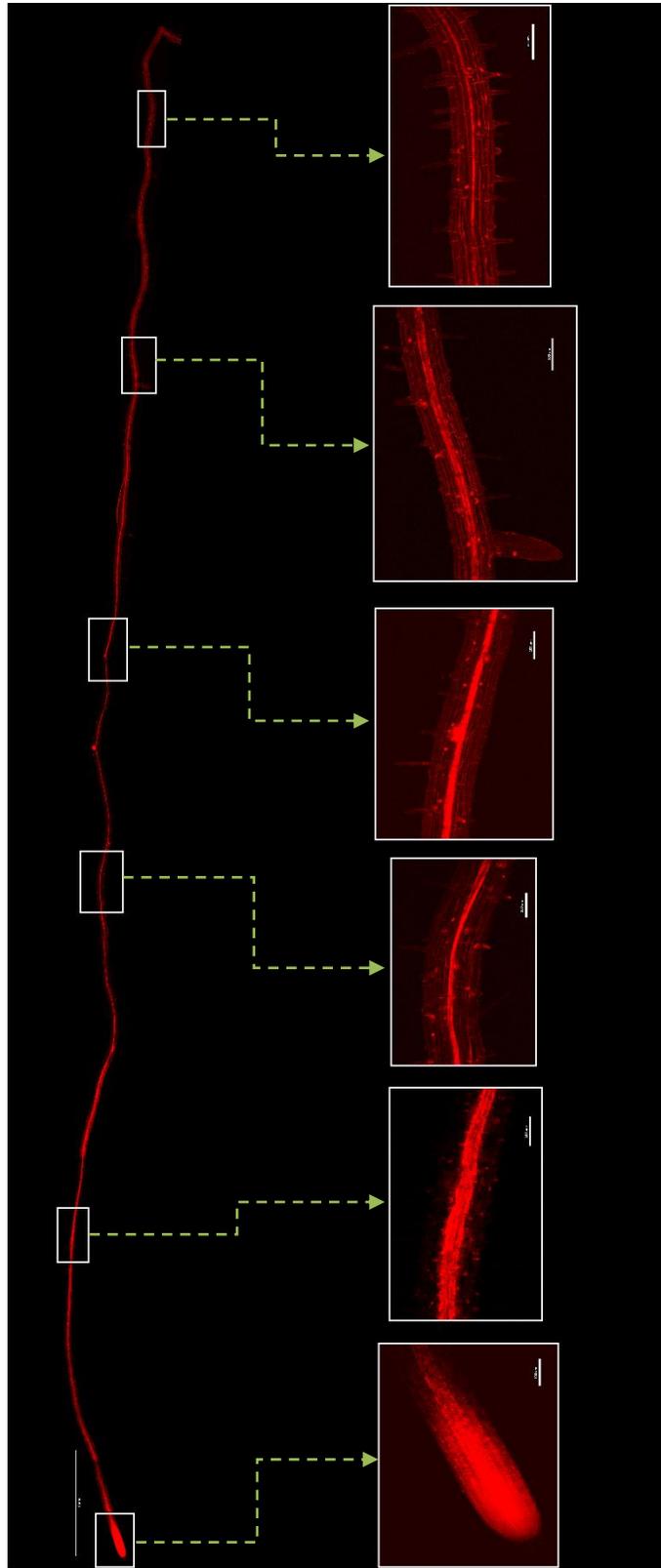


Figura 21. Reconstrucción con imágenes de la raíz de plantas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* de 7 dpv en condiciones óptimas de crecimiento. Del lado izquierdo se muestra la raíz completa mientras que del lado derecho se muestran amplificadas distintas zonas de la raíz. Rojo, tinción con yoduro de propidio. Las barras blancas muestran la escala, 1 mm en la imagen del lado izquierdo y 100  $\mu$ m en las imágenes del lado derecho.

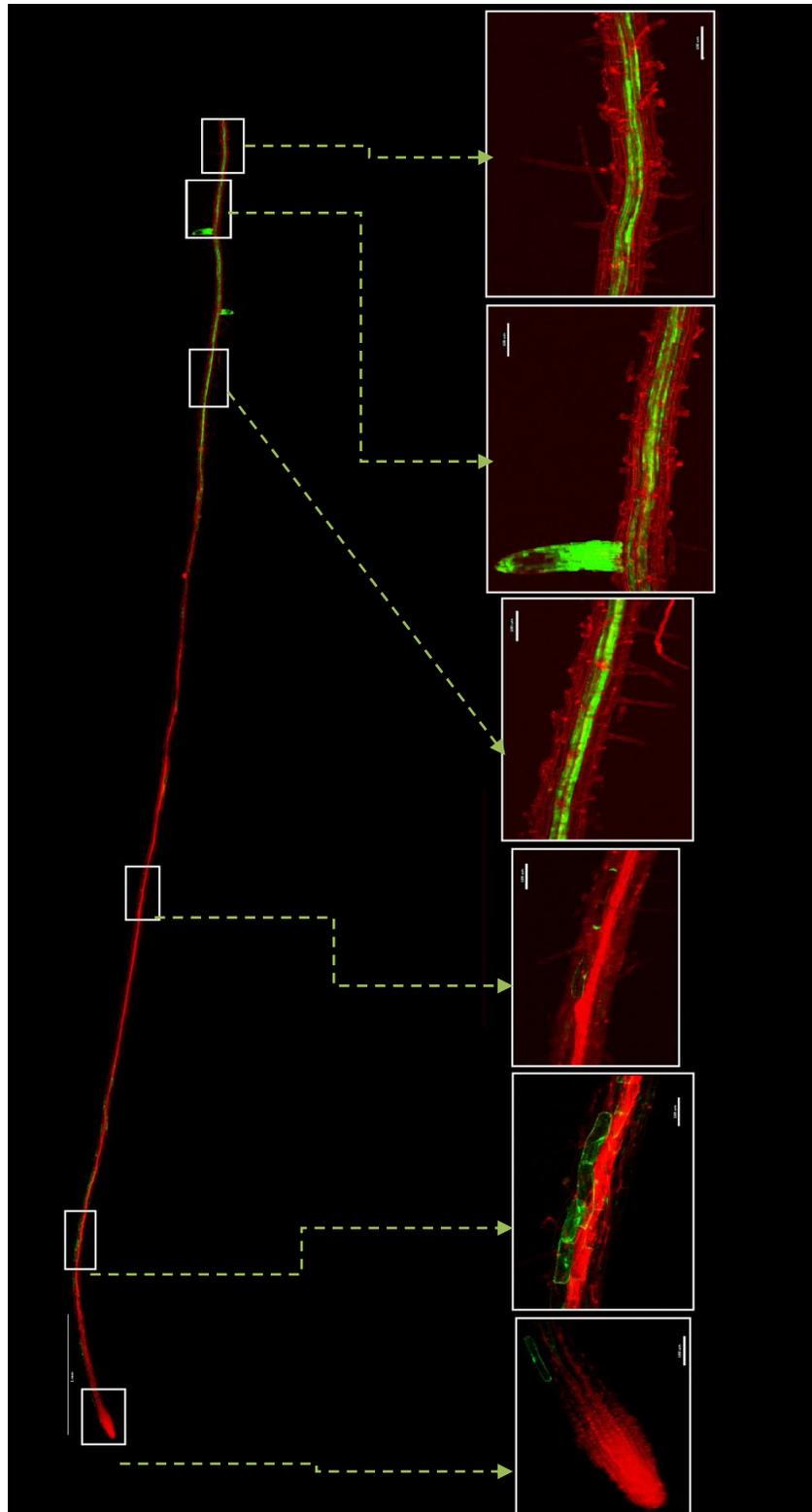


Figura 22. Reconstrucción de imágenes de la raíz de plantas de las líneas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* de 7 dpv sometidas a NaCl 200 mM durante 12-13 h. De lado izquierdo se muestra la raíz completa mientras que del lado derecho se muestran amplificadas distintas zonas de la raíz. Rojo, tinción con yoduro de propidio; verde, señal de EGFP. Las barras blancas muestran la escala, 1 mm en la imagen del lado izquierdo y 100 μm en las imágenes del lado derecho.

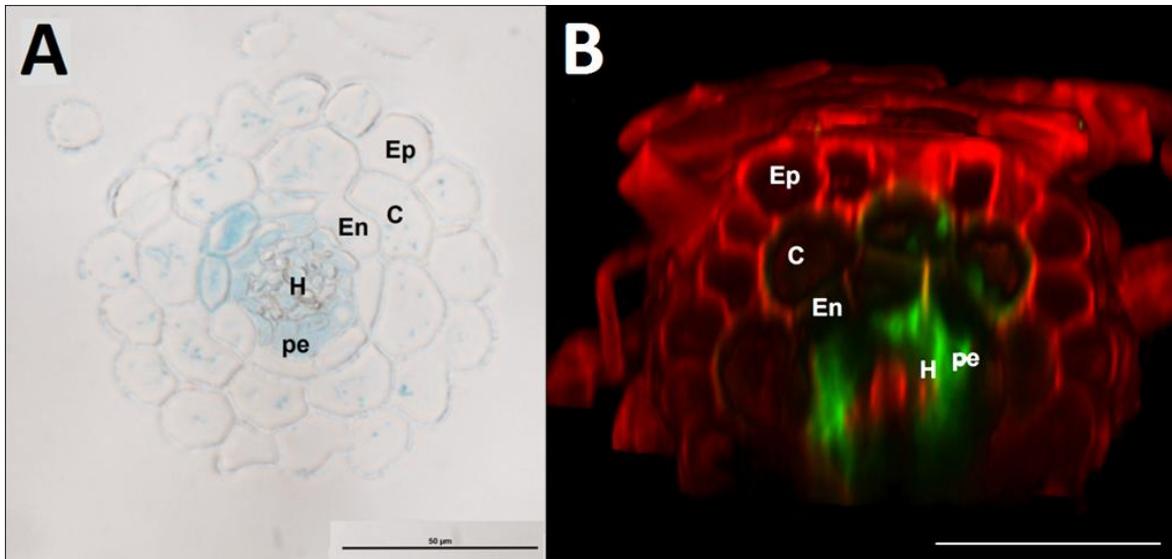


Figura 23. Cortes transversales de plantas con *p4-5::EGFP-GUS* (A) o con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (B) en la zona de diferenciación de raíces de plantas 5 de dpj sometidas a 200 mM NaCl por 12-13h. En plantas *p4-5::EGFP-GUS* (A) se muestra la actividad de GUS en azul, mientras que en plantas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (B) se muestra en verde la emisión de fluorescencia de la proteína EGFP y, en rojo el marcaje con yoduro de propidio de las paredes celulares. Epidermis (Ep), cortex (C), endodermis (En), periciclo (pe) y haces vasculares (H). Las barras en negro y blanco indican la escala de 50  $\mu$ m.

❖ *Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en la parte aérea de plántulas de 5 y 7 dpj sometidas a estrés salino*

Se realizó una reconstrucción de la parte aérea de plántulas de 5 dpj sometidas a condiciones óptimas de crecimiento o condiciones de estrés, a partir de diferentes stacks de imágenes tomados de las diferentes regiones de esta zona. En este caso se observó que tanto GUS como la proteína EGFP-AtLEA4-5 se acumulan en condiciones de estrés salino en primordios foliares (Fig. 24B, 25B y 26) mientras que en condiciones óptimas no se observó acumulación alguna (Fig. 24A y 25A). También se detectaron algunas diferencias entre la acumulación del transcrito y la proteína. Se observó que en plántulas con *p4-5::EGFP-GUS*, aparentemente GUS también se acumula en haces vasculares del peciolo y en las hojas cotiledonarias en una pequeña región próxima al peciolo (Fig. 24B), mientras que en las hojas cotiledonarias de plántulas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, la señal de EGFP se observó sólo en las células epidérmicas del peciolo y en algunas zonas de la epidermis (Fig. 25B). Llamó la atención que mientras que en plantas con *p4-5::EGFP-GUS* crecidas en condiciones óptimas no se observó señal de GUS (Fig. 24A) y, por tanto, no habría acumulación de transcrito, en plantas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* crecidas en condiciones óptimas sí fue posible detectar la señal de EGFP en el hipocótilo, indicando que existe acumulación de la proteína EGFP-AtLEA4-5 (Fig. 25A). Como referencia en la muestra y para corroborar que nuestra señal de EGFP no fuera fluorescencia de fondo de la clorofila, ésta se excitó en la longitud de onda 750 nm. También como control de fluorescencia y de la señal de EGFP, se hicieron reconstrucciones de la parte aérea de plantas *Wt* y *p35S::GFP* crecidas en condiciones óptimas (Anexo 10), lo cual nos indicó que la señal fluorescente

de la clorofila no estaba interfiriendo con la señal de EGFP y, que por tanto, la señal de esta última era un reflejo de su acumulación en función de la actividad del promotor AtLEA4-5.

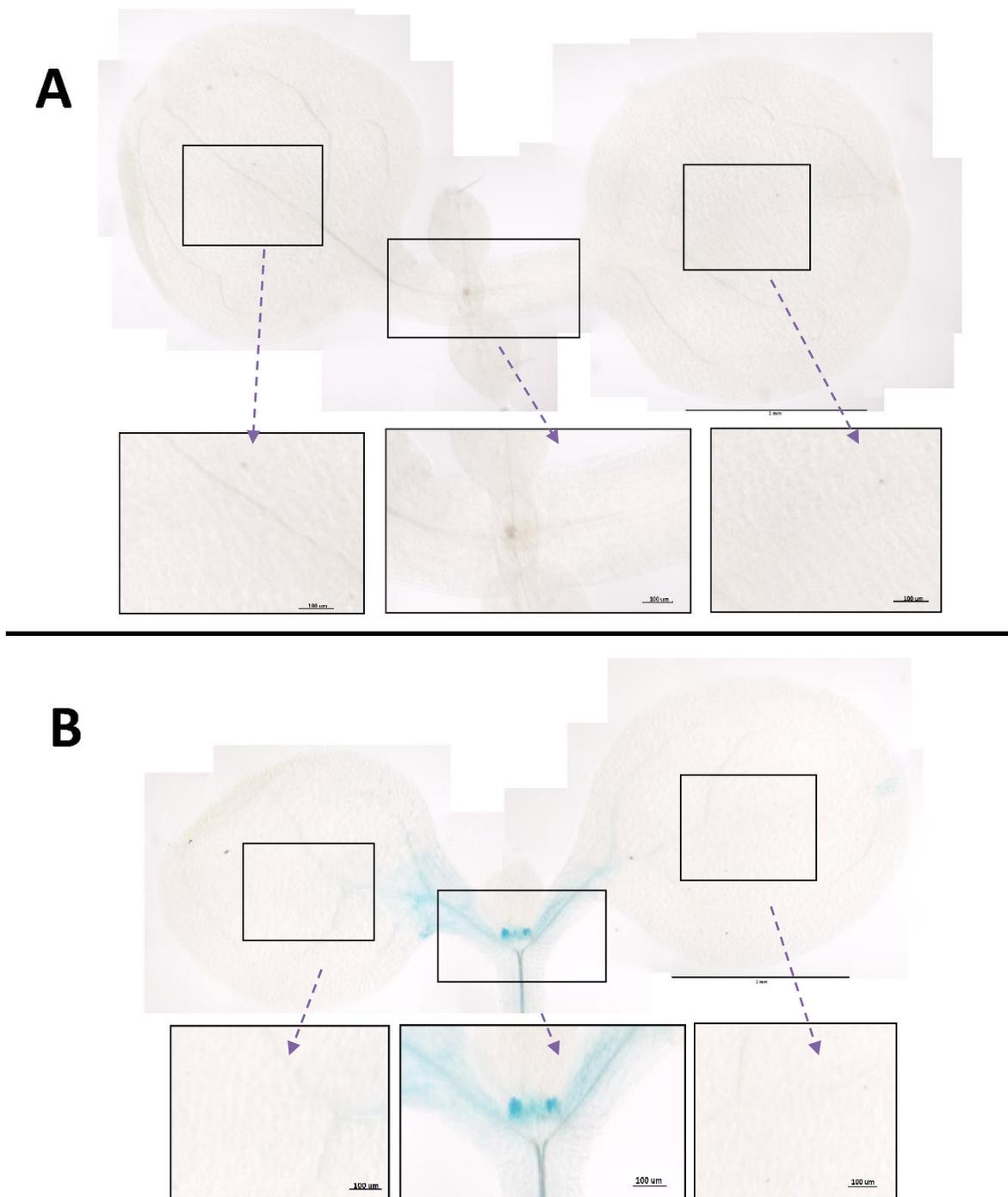


Figura 24. Reconstrucción con imágenes de la parte aérea de plantas con *p4-5::EGFP-GUS* de 5 dpq de edad, sometidas a NaCl 200 mM por 12-13 h (B) o crecidas en condiciones óptimas (A). Los recuadros indican acercamientos de la región central de las hojas cotiledonarias y de la región central de la roseta, donde emergen las hojas verdaderas. Las barras negras indican la escala, la barra más larga indica 1 mm, mientras que las barras pequeñas en los recuadros indican 100 μm.

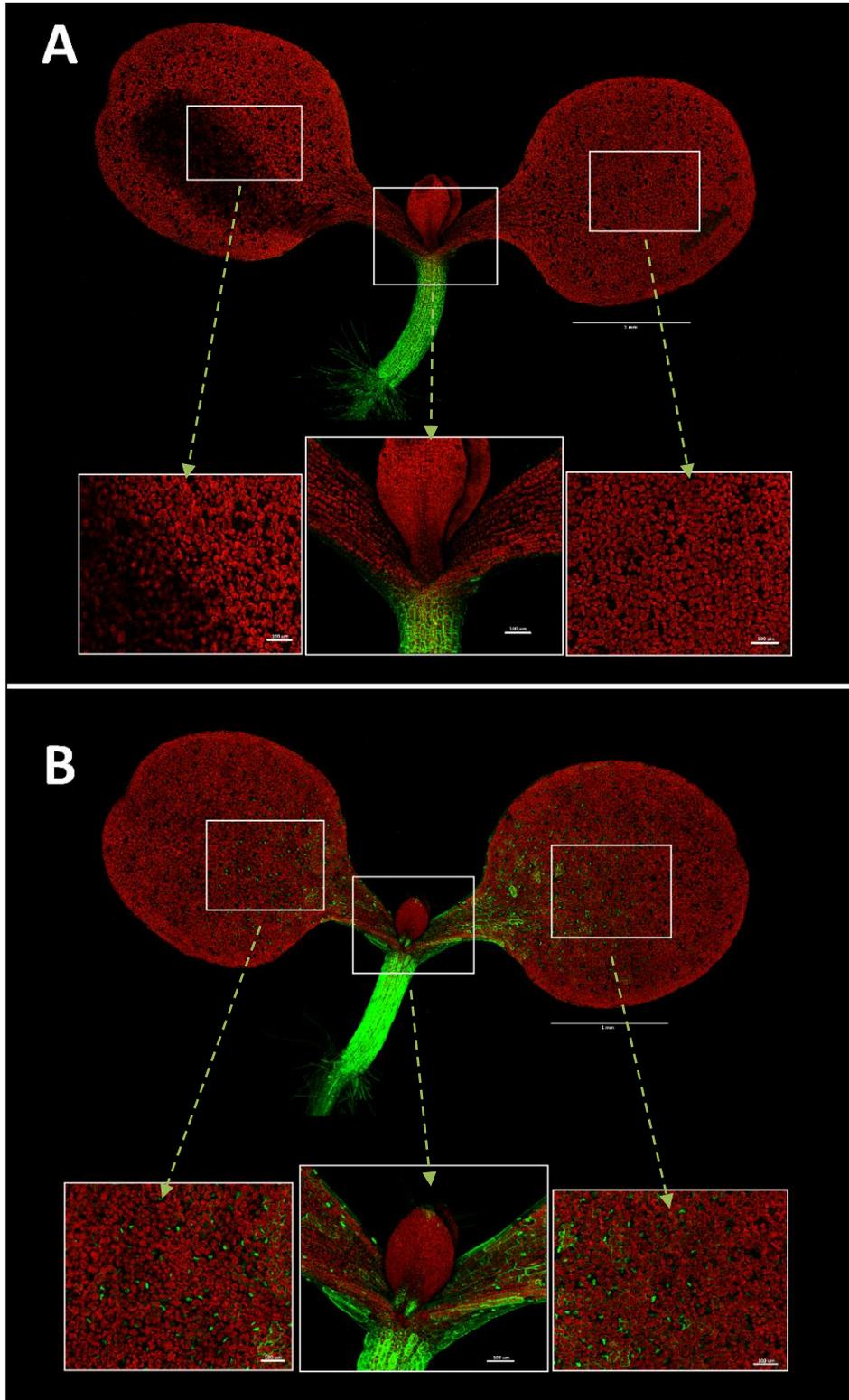


Figura 25. Reconstrucción con imágenes de la parte aérea de plantas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* de 5 dpv sometidas a NaCl 200 mM por 12-13 h (B) o crecidas en condiciones óptimas (A). Los recuadros indican acercamientos de la región central de las hojas cotiledonarias y de la región central de la roseta, donde emergen las hojas verdaderas. En rojo se

muestra la señal de la clorofila y en verde la de EGFP. Las barras negras indican la escala, la barra más larga indica 1 mm, mientras que las barras pequeñas en los recuadros indican 100  $\mu$ m.

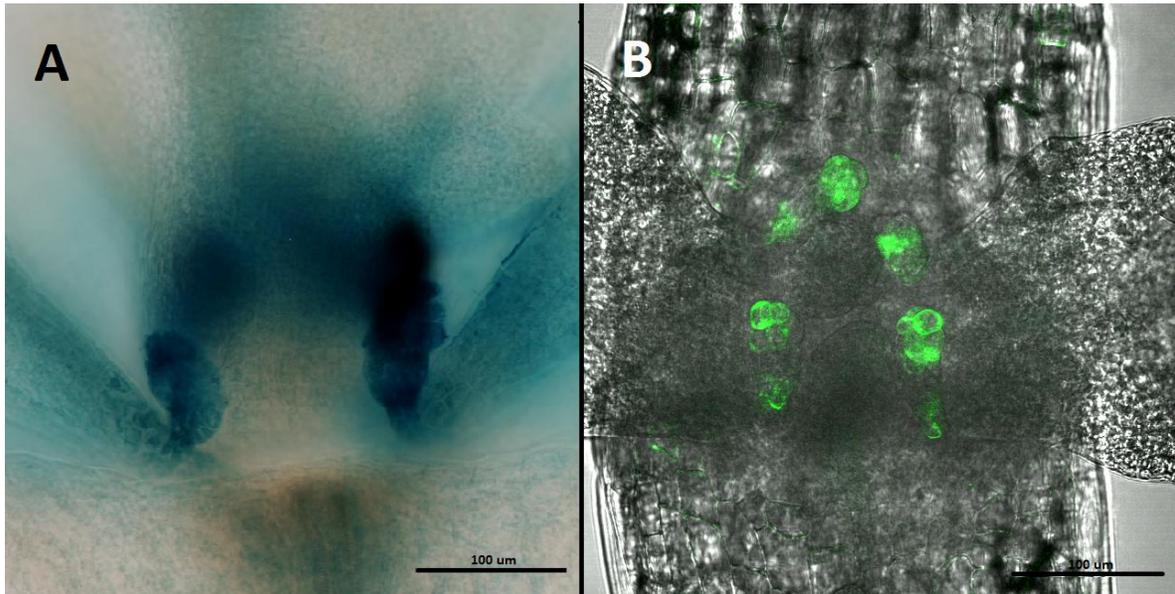


Figura 26. Detalle de la localización de GUS en plantas *p4-5::EGFP-GUS* y de la fluorescencia de la proteína EGFP en plantas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* en primordios foliares de plantas de 5dpg sometidas a 200 mM NaCl por 12-13 horas. La barra negra indica la escala de 100  $\mu$ m.

- ❖ *Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 durante las últimas etapas de la embriogénesis, en embriones maduros y durante la germinación y el establecimiento de la plántula.*

Se analizaron embriones de 19-20 dpa, embriones maduros embebidos en agua y plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpg. Durante estas etapas se observó una acumulación tanto de GUS como de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en regiones específicas de la planta (Fig. 27). No se observó acumulación en la testa del transcrito ni de la proteína (datos no mostrados). Durante las últimas etapas del desarrollo del embrión (19-20 dpa), cuando se da la pérdida de agua, se observó acumulación de GUS y de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en la radícula y en los cotiledones. Sin embargo y de manera interesante, una vez que la semilla entra en contacto con el agua (imbibición), se observó que la acumulación se presenta mayoritariamente en la radícula (Fig. 27). Posteriormente durante el primer día de la germinación, esta acumulación se mantiene, pero a los 2 dpg la localización cambia, y ahora se detectan sólo en la zona del hipocótilo. A los 3 dpg, esta acumulación disminuye notablemente hasta que a los 4 dpg, cuando la plántula se encuentra más desarrollada, ya no se observa acumulación alguna (Fig. 27).

Como control de la señal de fluorescencia de EGFP se realizaron observaciones en plantas *Wt* y en plantas con una construcción que sólo expresa GFP bajo control del promotor 35S (*p35S::GFP*) (Anexo 11). En plantas *Wt* sólo se observó señal de fluorescencia de la tinción con yoduro de propidio, mientras que en las líneas *p35S::GFP* se detectó fluorescencia de

GFP pero en regiones distintas a las que se detectaron en las líneas con las construcciones de interés, indicando que la señal observada en estos casos realmente provenía de promotor del gen *AtLEA4-5*.

Una vez que se determinaron las regiones de la planta en donde se acumulan el transcrito y la proteína de este gen, resultaba relevante determinar el patrón de acumulación en los diferentes tejidos de estas regiones. Para ello se planteó, tanto para la línea *p4-5::EGFP-GUS* como para la línea *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, analizar cortes transversales o longitudinales, para tener más detalle en la localización en los tejidos. Para las líneas *p4-5::EGFP-GUS*, las muestras obtenidas se incluyeron en resina LR White; sin embargo, aunque se realizaron cortes transversales gruesos de hasta 4  $\mu\text{m}$ , la tinción de GUS se perdía, por lo cual no se pudieron obtener datos sobre la localización del transcrito en los diferentes tejidos. Para el caso de las líneas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* en donde se analiza fluorescencia, se utilizó microscopia multifotónica para determinar la localización de la proteína de fusión, técnica que permite una alta penetración de los fotones en muestras gruesas o muy densas, como es el caso. Por tanto, se llevaron a cabo cortes longitudinales virtuales de las diferentes regiones donde se había detectado acumulación de la proteína, lo que mostró que el tejido en donde mayormente se acumula la proteína en los estadios 19 dpa, embrión embebido, 1, 2 y 3 dpg es en la epidermis (Fig. 28); tanto para la radícula como para el hipocótilo, órganos en donde se había observado la señal de fluorescencia de EGFP (Fig. 28). Como control se hicieron observaciones en líneas sobre-expresoras de GFP (*p35S::GFP*) las cuales emitieron fluorescencia en tejidos más internos donde nuestras líneas no lo mostraban; esto indicó que la fluorescencia verde detectada en las plantas de las líneas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* es debido al promotor del gen *AtLEA4-5*. Este resultado sugiere que la epidermis, al ser el tejido más expuesto al ambiente y al ser la capa que tiene a los pelos radiculares que son los encargados de la absorción de agua, puede requerir de mayor protección a una condición en la que el agua disponible resulta limitante; o bien, por la misma razón, ser un tejido más sensible a esta condición de estrés y, por tanto responder con mayor eficiencia o rapidez.

Resulta relevante determinar los tejidos en los que se acumulan el transcrito y la proteína del gen *AtLEA4-5* durante estos estadios del desarrollo, bajo déficit hídrico. En el trabajo de Olvera-Carrillo et al. (2010) se observó que las mutantes que no producían la proteína *AtLEA4-5* presentaban una tasa de germinación menor a la de semillas *Wt* en condiciones de estrés salino (250 mM NaCl), incluso menor que la doble mutante de las proteínas *AtLEA4-2* y *AtLEA4-1*. Los primeros análisis con microscopia de epifluorescencia de embriones germinando bajo condiciones de estrés salino (200 mM NaCl) muestran que la proteína EGFP-*AtLEA4-5* se expresa en radícula y en cotiledones (anexo 12), a diferencia de cuando las semillas germinan en condiciones normales en donde la proteína se acumula mayoritariamente en radícula. Sin embargo aun es necesario realizar más replicas de los experimentos y hacer observaciones con Microscopia confocal y multifotónica para reforzar estos resultados y conocer si la localización es la misma a nivel tisular.

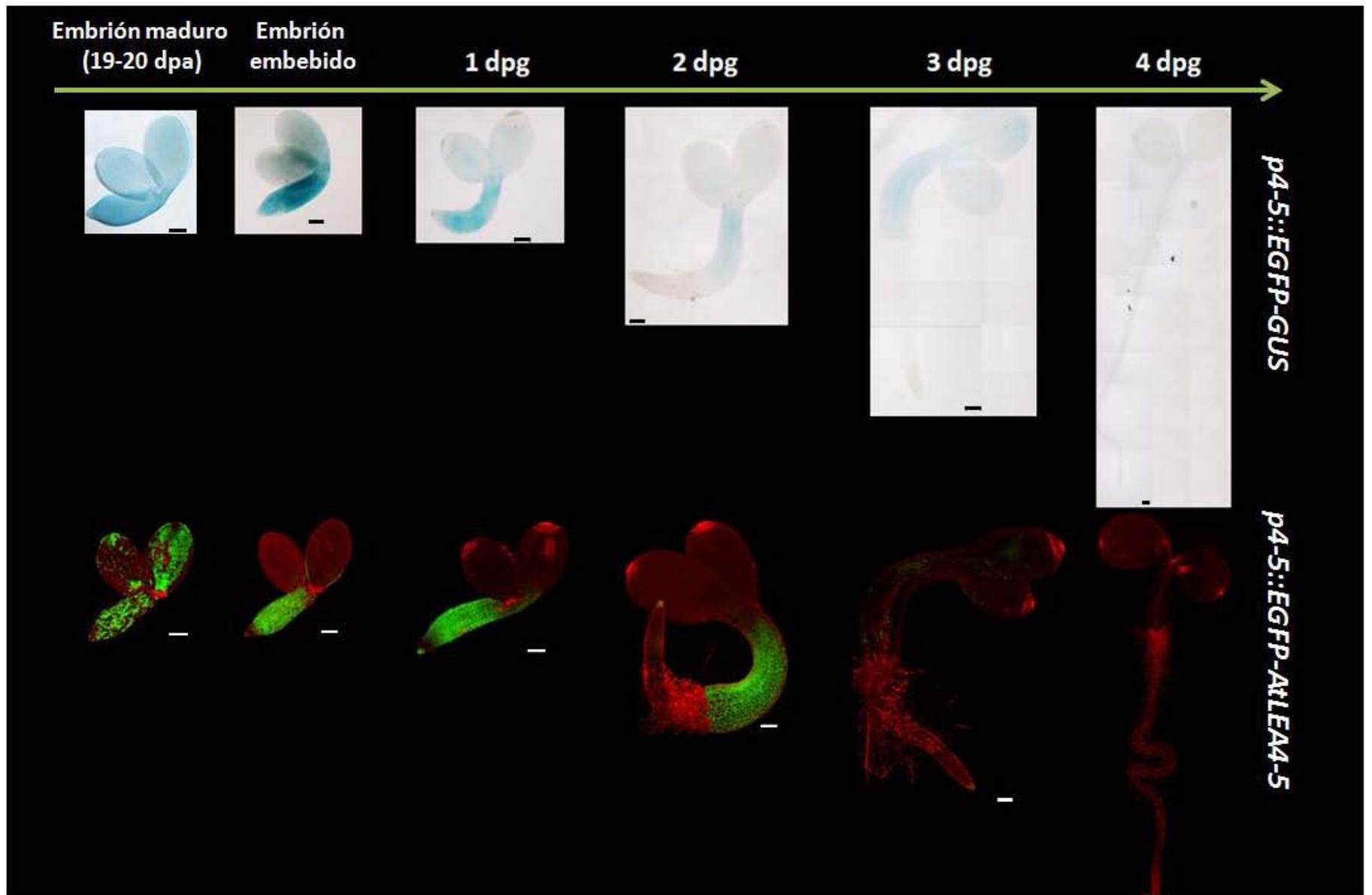


Figura 27. Localización GUS y EGFP- AtLEA4-5 en embrión maduro (19-20 dpa), embrión embebido, y en plántulas de 1, 2, 3 y 4 dpg de las líneas *p4-5::EGFP-GUS* (arriba) o *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* (abajo). En azul se observa GUS, mientras que en verde se muestra la fluorescencia de EGFP. En rojo se muestra la tinción con yoduro de propidio. La barra negra y blanca indica la escala de 100  $\mu\text{m}$ .

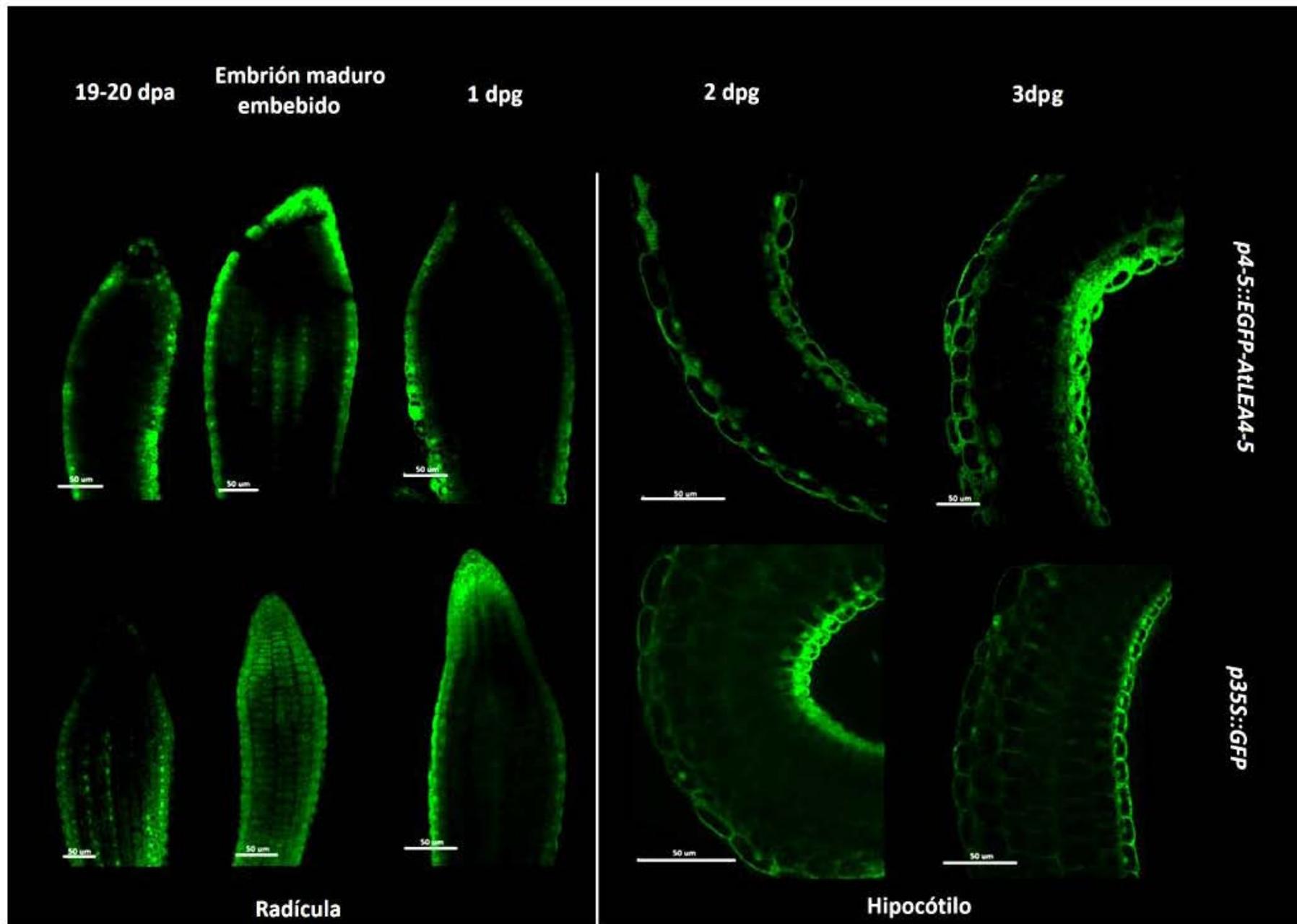


Figura 28. Cortes longitudinales de la radícula en los estadios 19-20 dpa, y embrión maduro embebido; y en raíz primaria de plántulas de 1 dp. Por otro lado, también se incluyeron cortes de hipocótilos de plántulas de 2 y 3 dp de líneas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* o como control, de líneas con *p35S::GFP*. En verde se muestra la señal de EGFP y GFP. La barra blanca indica la escala, 50 µm.

❖ *Localización celular de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en células epidérmicas de la radícula de embriones embebidos*

Para relacionar la función de una proteína con su papel *in planta* es necesario conocer no sólo su localización tisular sino también intracelular. Por tanto, se llevó a cabo un análisis de las imágenes obtenidas a partir de las líneas con *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, en donde era posible distinguir células y algunos de sus compartimentos. Los resultados de esta exploración mostraron que en células epidérmicas de la radícula de embriones maduros embebidos, la proteína quimérica EGFP-AtLEA4-5 se localiza en núcleo como de hecho ya se había observado anteriormente (Martínez, Tesis licenciatura), y en estructuras que parecen corresponder al retículo endoplásmico (Fig. 29). Esto último será necesario confirmarlo comparando con la localización en otros tejidos y estadios del desarrollo, donde ya se ha observado la presencia de esta proteína, y, sobre todo con el uso de líneas que expresan marcadoras específicos para ciertos compartimentos celulares (Nelson et al., 2007).

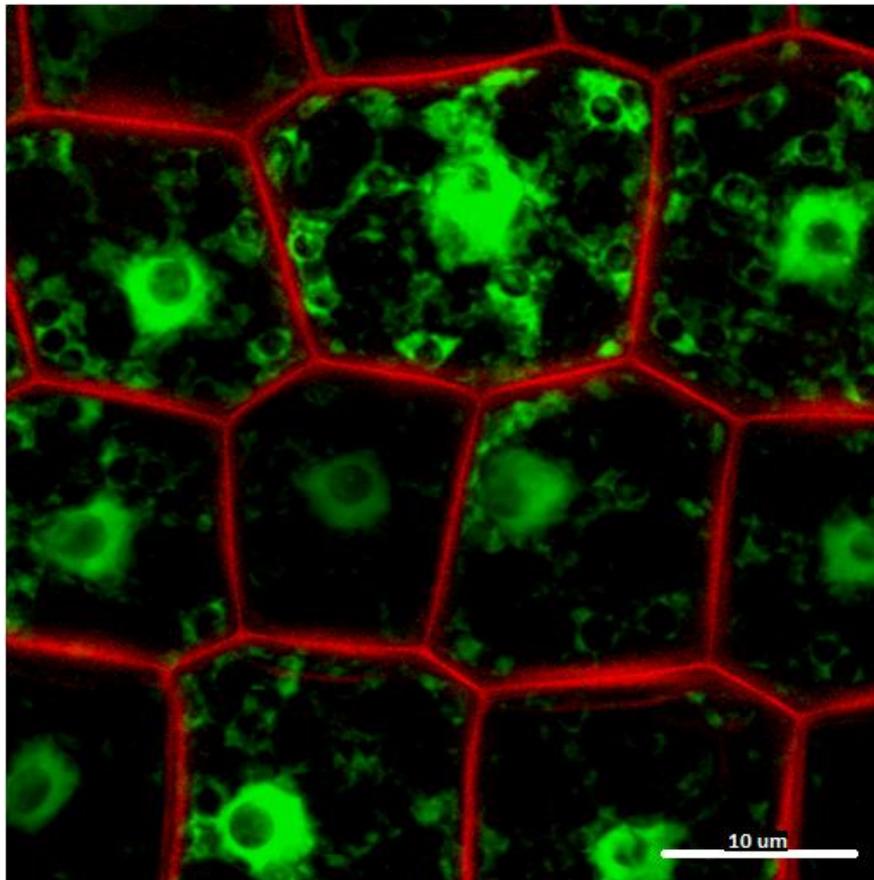


Figura 29. Localización celular de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en células epidérmicas de la radícula, en embriones embebidos de plantas *p4-5::EGFP::AtLEA4-5*. En rojo se muestra el marcaje de la pared celular con yoduro de propidio, mientras que en verde se muestra la señal de EGFP. La barra blanca indica la escala, 10 µm.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se planteó conocer la localización de los transcritos y proteínas de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*, pertenecientes a la familia LEA 4 de *A. thaliana* para poder determinar si estos presentan una localización diferencial o similar en los distintos órganos y tejidos; y a nivel subcelular durante diferentes etapas del desarrollo en condiciones de déficit hídrico. Los resultados obtenidos podrían indicar si los fenotipos que se observan en las mutantes de cada uno de estos genes son debido a que no se expresan en los mismos tejidos o compartimentos celulares; además de obtener información sobre su localización tisular e intracelular, lo que ayudaría en la dilucidación de la función de estas proteínas durante la respuesta de la planta ante déficit hídrico.

Para lograr este objetivo se propuso el uso de los genes reporteros EGFP y GUS. Para que la localización tanto de los transcritos como de las proteínas fuera similar a la que presentan de manera endógena en la planta, se utilizaron las regiones promotoras de cada uno de los genes en las construcciones transcripcionales y traduccionales. Con estas regiones se llevó a cabo un análisis *in silico* utilizando el servidor en línea PLACE, el cual nos permitió predecir posibles elementos reguladores en *cis*. Este análisis mostró que estas regiones poseen una variedad de probables elementos *cis* que han sido relacionados con la promoción de la expresión de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* ante déficit hídrico o frío, en procesos de desarrollo de diferentes órganos o por la acción de distintas hormonas (Tabla 3). Anteriormente, en el trabajo de Olvera-Carrillo et al., (2010a) se reportó que las plantas que no producen alguna de las proteínas de esta familia presentan diferentes niveles de susceptibilidad en condiciones de déficit hídrico; ya sea durante la germinación o durante la fase adulta. También se detectó la disminución en la producción de botones florales en la mutante del gen *AtLEA4-5* y, por tanto, en la cantidad de semillas. Estos fenotipos sólo se observaron cuando la planta se sometía a condiciones de déficit hídrico, mientras que en condiciones óptimas de crecimiento no se detectó fenotipo durante su desarrollo. Estos resultados en conjunto, sugieren que estas proteínas se expresan en diferentes tejidos y durante diferentes etapas del desarrollo bajo control hormonal o de algún otro estímulo ambiental. Debido a la presencia y abundancia de posibles elementos *cis* implicados en la respuesta a ABA o a deshidratación; así como, a los patrones de acumulación de transcritos conocidos hasta ahora, resulta válido considerar que estos genes responden a condiciones de limitación de agua en diferentes tejidos y durante diferentes etapas de desarrollo de la planta.

Para conocer la localización de los transcritos de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* se realizaron construcciones que contenían al promotor de cada gen dirigiendo la expresión de los genes reporteros GUS y EGFP, mientras que para la localización de las proteínas *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* se elaboraron construcciones que contenían al promotor y la región codificante de cada uno de los genes fusionada a la región codificante de la proteína reportera EGFP. Para este último caso, previendo que la fusión a alguno de los extremos de las proteínas LEA pudiera afectar su localización nativa, la secuencia para EGFP se

fusionó en el extremo N-terminal o C-terminal. Hasta el momento se cuenta con el grupo de construcciones tanto transcripcionales como traduccionales para ambos genes y, con la mayoría de las líneas transgénicas de *A. thaliana* (con excepción de las plantas *p4-2::EGFP-AtLEA4-2*) para poder realizar los diferentes experimentos de localización de GUS y de las proteínas de interés fusionadas a EGFP.

Como se muestra en los resultados de esta tesis, se analizó el patrón de expresión del gen quimérico *p4-5::EGFP-GUS* en varias líneas transgénicas independientes, lo que proporciona información sobre la localización del transcrito de *AtLEA4-5*, así como del gen *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, lo que proporciona información sobre la localización de la proteína *AtLEA4-5*. En el caso de las líneas *p4-5::EGFP-GUS*, aunque la localización del transcrito podría seguirse con la señal de EGFP y GUS, no fue posible detectar fluorescencia de EGFP en ninguno de los estadios y condiciones utilizados en las cuales se había reportado acumulación del transcrito (Olvera-Carrillo et al., 2010a); caso contrario para GUS, en donde la actividad de esta enzima fue visible (mediante el precipitado azul formado por la reacción con su sustrato), reproducible y similar en las cinco líneas independientes utilizadas. Por esta razón, se decidió utilizar la actividad de GUS como reportera de la localización del transcrito de este gen. La falta de detección de fluorescencia de la proteína EGFP pudo deberse a las diferentes mutaciones que se observaron en el extremo C-terminal al analizar la secuencia de este gen reportero (datos no mostrados).

Mediante experimentos tipo Western Blot con anticuerpos específicos para la proteína *AtLEA4-5* y la proteína fluorescente EGFP, se corroboró que la proteína quimérica EGFP-*AtLEA4-5* se produce en las líneas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* tanto en semilla como en plántulas en estrés, además de que en las cinco líneas utilizadas la señal de fluorescencia era similar, lo cual indicó que la señal de fluorescencia emitida en las distintas etapas y condiciones utilizadas correspondía a la proteína EGFP-*AtLEA4-5*. Llamó la atención que la proteína EGFP-*AtLEA4-5* es más abundante que la proteína endógena *AtLEA4-5*, lo cual podría reflejar que la región promotora utilizada no contiene todos los elementos reguladores necesarios para la expresión de esta proteína; o bien, que el contexto cromosómico en donde se insertó la construcción es diferente al original. Por ello, es necesario comparar los niveles de acumulación de esta proteína fusionada en las cinco líneas que se utilizaron. Otra posibilidad que no se puede descartar es que la proteína de fusión sea más estable, favoreciendo por tanto una mayor acumulación. Por las consideraciones antes mencionadas, será necesario que, en los casos en donde sea posible, se lleven a cabo experimentos de localización utilizando otras técnicas como la inmunohistoquímica, la cual requiere de disponer de anticuerpos altamente específicos, esto para corroborar que la región promotora utilizada no favorezca o afecte la localización en otros tejidos o compartimentos celulares. Estos mismos experimentos se sugieren para la localización del transcrito y de la proteína del gen *AtLEA4-2* en un futuro.

## Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en diferentes estadios del desarrollo

Para la localización del transcrito y la proteína codificada por el gen *AtLEA4-5* se exploraron diferentes etapas de desarrollo que abarcaron desde las últimas etapas del desarrollo de la semilla hasta plantas de 7 dpg sometidas a condiciones de estrés (200 mM NaCl/12-13 h), condiciones en las cuales ya había sido reportado que se acumulan el transcrito y la proteína de este gen (Olvera-Carrillo et al., 2010a). Al abordar diferentes etapas del desarrollo se podía obtener un mejor panorama de la distribución del transcrito y la proteína de este gen, en los diferentes tejidos y/o condiciones ambientales, y así determinar si la localización es dependiente o independiente de estos factores.

### ❖ *Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en plantas sometidas a estrés salino*

Es bien sabido que las altas concentraciones de sal en el medio afectan a la planta de dos maneras: afectan la capacidad de toma de agua en las raíces de la planta (estrés osmótico), además de que las altas concentraciones de iones como  $\text{Na}^+$  en los tejidos pueden afectar a la planta de diversas maneras (Carrillo et al., 2011). Debido a que en los distintos órganos y tejidos de la planta se llevan a cabo diferentes procesos, la respuesta ante este tipo de estrés será particular para cada tejido y, consecuentemente, para cada órgano de la planta. En el caso particular del gen *AtLEA4-5*, el patrón de localización de GUS y EGFP-*AtLEA4-5* sugiere que la acumulación de el transcrito y la proteína de *AtLEA4-5* en plantas de 5 y 7 dpg sometidas a esta condición de estrés no es generalizada, sino que es específica para ciertos tejidos y regiones de la planta. Para el caso de la raíz, es necesario considerar la evidencia que indica que la respuesta que tendrá cada región y tejido que la conforma ante el estrés osmótico e iónico provocado por la presencia de NaCl en el medio será distinta (Dinneny 2010). En este caso, el patrón de acumulación encontrado podría estar relacionado con el estatus hídrico que presentan estas regiones y tejidos ante la baja disponibilidad de agua; mientras que en la raíz tejidos como la epidermis y el córtex se ven afectados principalmente en la pared celular; en la endodermis se puede limitar la difusión de solutos hacia los haces vasculares mediante modificaciones en la pared como la banda de Caspary y la suberización de las paredes celulares (Moller et al., 2009; Dinneny 2010; Chen et al., 2011). En el caso de los haces vasculares, estos tejidos se encuentran más expuestos a los cambios en el potencial hídrico debido a las funciones que realiza como el transporte de agua y nutrientes a la planta, lo cual afectará, además la disponibilidad de agua en las regiones de la raíz más próximas a la parte aérea, ya que en estas condiciones disminuye el transporte de agua hacia esas regiones. (Taiz y Zeiger 1991; Carrillo et al., 2011; Lucas et al., 2013).

El patrón de localización de GUS y EGFP-*AtLEA4-5* sugiere también que el transcrito y la proteína del gen *AtLEA4-5* se acumula diferencialmente a lo largo de la raíz. Mientras que en el ápice no observamos acumulación alguna, conforme observamos las diferentes regiones de la raíz hasta llegar a la zona próxima a la parte aérea, la acumulación cambia en los diferentes tejidos hasta irse concentrando más en los haces vasculares y

acumularse en raíces laterales, todo esto durante estrés salino. Esto, una vez más, podría deberse a estatus hídrico en las diferentes regiones de la raíz relacionado con el transporte de agua y solutos a lo largo de este órgano, y que podría afectar el crecimiento y desarrollo de órganos como las raíces laterales (Duan et al., 2013), razón por la cual el transcrito y la proteína de este gen se acumula en estas condiciones.

La disminución en la disponibilidad de agua, además de afectar los diferentes tejidos y zonas de la raíz, también puede afectar distintas regiones en la parte aérea. La disminución en el transporte de agua hacia la parte aérea afecta su crecimiento y desarrollo, mientras que el sodio que se acumula en los tejidos de la raíz también puede ser transportado hacia la parte aérea y resultar tóxico para los tejidos (Moller et al., 2009; Carillo et al., 2011). Para el caso particular de la parte aérea de plántulas de 5 dpg sometidas a estrés salino, la acumulación del transcrito y de la proteína del gen *AtLEA4-5* se observó principalmente en primordios foliares y en algunas zonas de la epidermis del peciolo y parte de la epidermis de las hojas cotiledonarias. En este caso, la acumulación del transcrito y la proteína de este gen parece estar relacionada, además de con la falta de disponibilidad de agua en estas estructuras, al momento en el desarrollo en que se encuentran las hojas ya que una vez que estas estructuras se encuentran más desarrolladas, la acumulación ya solo se presenta en algunas regiones de la hoja, pero no en toda la hoja.

Dado el patrón de acumulación encontrado en este estadio del desarrollo y en esta condición de estrés, se verificó en el análisis *in silico* de la región promotora utilizada, si existían elementos reguladores en la región promotora de *AtLEA4-5* que pudieran estar dirigiendo su expresión a ciertas regiones o tejidos de la planta. El análisis indica que este patrón de acumulación observado tanto en raíz como en la parte aérea, también podría estar dado por los diferentes motivos encontrados relacionados a la expresión en ciertos tejidos y órganos de la planta como: desarrollo en raíz y hoja (*Athb-9* y *RAV1*) y elementos vasculares en la raíz (*GATABOX*, *Athb-5* y *ARR10*), además de los diversos motivos de respuesta al déficit hídrico encontrados (*ABRE*, *ERD1*, *MYB* y *DPBF*).

Aunque nuestros resultados sugieren que la localización entre el transcrito y la proteína *AtLEA4-5* es muy similar en los diferentes tejidos y órganos, también se detectaron algunas diferencias en zonas y tejidos donde detectamos la actividad del promotor *AtLEA4-5*, pero no se acumula la proteína EGFP-*AtLEA4-5*. Mientras que en plántulas *p4-5::EGFP-GUS*, se detectó la actividad enzimática de GUS en haces vasculares en el peciolo y una pequeña región próxima al peciolo en las hojas cotiledonarias (Fig. 24B), en plántulas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* la señal de EGFP se observa sólo en las células epidérmicas del peciolo, en una pequeña región próxima al peciolo en las hojas cotiledonarias y en el hipocótilo, pero no en haces vasculares (Fig. 25B); en el caso de la raíz, mientras que GUS se acumula a lo largo de toda la raíz con excepción del ápice (Fig. 16 y 20), EGFP-*AtLEA4-5* se acumula mayormente en regiones próximas a la parte aérea (Fig. 18 y 22). Para estos casos no se puede descartar que pudieran existir mecanismos de regulación en donde a pesar de que GUS nos sugiere que el transcrito se acumula en estas zonas, no es requerido

su procesamiento para que se promueva la acumulación de la proteína en estos tejidos, como nos indica el patrón de localización de EGFP-AtLEA4-5; otra razón que no se puede descartar es que el transcrito o la proteína de *AtLEA4-5* pudieran transportarse a otros tejidos, como lo hacen algunos mRNAs o proteínas a través de plasmodesmos (Lucas et al., 2009). Sin embargo, para comprobar esta última posibilidad, se necesitan de más experimentos, como la localización *in situ* del transcrito o la localización de la proteína, ya sea por técnicas de inmunohistoquímica o fusiones a proteínas reporteras, en diferentes tiempos de exposición al estrés. En el caso contrario donde se observó acumulación de EGFP-AtLEA4-5 en el hipocótilo de plántulas de 5 dpv en condiciones óptimas pero no de GUS, pudiera deberse a que al encontrarse la proteína AtLEA4-5 fusionada a otra proteína (EGFP) se podría promover la acumulación de esta fusión en otras regiones donde generalmente no se observa en condiciones control, como lo es en este caso. Se sabe de varios ejemplos en la literatura en donde puede alterar la localización de la proteína de interés en el organismo, debido a la fusión con GFP (Hanson y Köhler 2001) por lo cual no se podría descartar que pudiera pasando esto en este caso particular.

❖ *Localización de GUS y EGFP-AtLEA4-5 en las últimas etapas del desarrollo del embrión, en embriones maduros y durante la germinación y establecimiento de la plántula*

Las proteínas LEA se acumulan abundantemente durante las últimas etapas de la embriogénesis, alcanzando su nivel máximo en la semilla seca, por lo cual resultaba relevante conocer cómo se distribuyen en estos estadios; así como, durante la germinación y el establecimiento de la plántula. Durante estas diferentes etapas, el estatus hídrico de la planta cambia, y la acumulación de estas proteínas podría variar. Durante la fase de maduración de la semilla se presenta la pérdida de agua por parte del embrión y la adquisición de tolerancia a esta condición, la cual se pierde cuando la semilla encuentra condiciones idóneas (entre ellas la disponibilidad de agua) para dar lugar a la germinación y establecimiento de la plántula (Bewley et al., 2013; Bas et al., 2015).

El patrón de acumulación observado en estas etapas del desarrollo indica una relación entre el estatus hídrico de la planta, la emergencia de la radícula y el desarrollo de la planta durante estos estadios. Durante la maduración del embrión, donde la disponibilidad de agua disminuye drásticamente, GUS y EGFP-AtLEA4-5 se acumulan en todo el embrión; sin embargo cuando existen condiciones favorables para germinar, y por tanto la planta comienza a adquirir agua del medio, uno de los primeros órganos en emerger al ambiente es la radícula, que al emerger se convierte a la raíz primaria. En este órgano se observa una mayor acumulación de ambas proteínas. Conforme la raíz primaria desarrolla pelos radicales, lo cual aumenta su capacidad de toma de agua, ya no se observa acumulación de esta proteína en este órgano; en tanto que, en el hipocótilo sucede lo contrario, ya que este comienza a elongarse liberándose completamente de la testa y exponiéndose al ambiente, momento en el cual se observa la acumulación de dicha proteína en esta región. Posteriormente, a los 3 y 4 dpv, estadios en los cuales la planta ya

se encuentra más desarrollada y por tanto presenta una mayor turgencia en sus tejidos y órganos, esta proteína disminuye su acumulación hasta desaparecer. A nivel tisular, el hecho de que la acumulación sea mayormente en la epidermis de la radícula y del hipocótilo, contrario a lo observado en plántulas sometidas a estrés salino en donde la acumulación se da mayormente en tejidos internos de la raíz, podría deberse a que este es un tejido externo y por tanto el más expuesto a los posibles cambios en el ambiente durante estos estadios, por lo cual la acumulación de este tipo de proteínas se vea favorecida. Cabe mencionar que durante la germinación, el embrión va perdiendo la capacidad de tolerar la desecación volviéndose sensible a cambios que puedan ocurrir durante este periodo y durante su establecimiento en el ambiente (Mai et al., 2011; Bewley et al., 2013; Mai et al., 2014), por lo cual en estos estadios la planta podría requerir la presencia de ciertas proteínas como las proteínas LEA, mientras se activan distintos procesos que dotarán a la planta de herramientas que promuevan el crecimiento y el establecimiento de la planta en el ambiente.

Dado que las plantas pueden verse sometidas al déficit hídrico en cualquier etapa del desarrollo, y que las proteínas LEA están relacionadas con esta condición, resulta interesante conocer que ocurre con la localización del transcrito y la proteína durante la germinación en estas condiciones. Se sabe que una vez que la semilla germina, ésta pierde su capacidad de tolerancia a la desecación (Bewley et al., 2013). Sin embargo, esta capacidad puede re-establecerse si se exponen a un estrés osmótico moderado durante una ventana de tiempo en el desarrollo que comprende el lapso entre la ruptura de la testa y el período previo a la aparición de los primeros pelos radicales (López-Molina et al., 2001; Bas et al., 2015). Además, se ha observado que la ausencia de la proteína AtLEA4-5 disminuye la tasa de germinación de la semilla en condiciones de estrés salino (Olvera-Carrillo et al., 2010a) por lo cual se sugiere que estas proteínas podrían tener una función relevante en la tolerancia a déficit hídrico en estos estadios del desarrollo. Hasta el momento, se ha observado mediante microscopía de epifluorescencia que si se germinan semillas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* en condiciones de estrés salino (200 mM NaCl), la localización de la proteína ahora se presenta tanto en radícula como en cotiledones durante 24 y 48 horas de exposición al estrés, lo cual sugiere hasta el momento que la acumulación de esta proteína puede cambiar en los distintos órganos (y posiblemente en los distintos tejidos) que componen a la planta dependiendo de la disponibilidad de agua que exista en el ambiente al momento de germinar, pudiendo tener una función relevante durante estas condiciones.

Estos patrones de acumulación observados durante los diferentes estadios de desarrollo analizados tanto en condiciones óptimas y en condiciones de estrés, al igual que en las plántulas de 5 y 7 dpg sometidas a estrés salino, pudieran también ser efecto producido por los elementos reguladores que se encuentran en la región promotora utilizada para el gen *AtLEA4-5*, ya que encontramos motivos relacionados a la expresión durante el desarrollo de la raíz (*Athb-9* y *RAV1*), a la expresión en la epidermis (*GATABOX*) y a la expresión en hipocótilo durante la germinación (*Athb-1* y *Athb-5*). Estos elementos reguladores junto con los elementos de respuesta a déficit hídrico y/o la hormona ABA

(ABRE, MYB y DPBF1), podrían estar dirigiendo algunos de los patrones de expresión que se observan en estos estadios del desarrollo de la planta.

#### ❖ *Localización tisular de otras proteínas LEA*

La mayoría de las proteínas LEA de plantas, como es sabido, se acumulan en semilla. También se ha observado la acumulación de los transcritos o proteínas de estos genes en otros órganos vegetativos de la planta (Battaglia et al., 2008; Hundertmark y Hinch 2008; Battaglia y Covarrubias 2013; Amara et al., 2014), sin embargo poco se sabe acerca de su localización tisular en los diferentes órganos de la planta, lo cual podría aportar conocimiento acerca de la posible función de estas proteínas en la planta. Existen pocos reportes en los cuales utilizando técnicas de inmunohistoquímica, hibridación *in situ* o fusiones a genes reporteros, se ha abordado la localización de los transcritos y las proteínas de genes LEA en algunos estadios de la planta, y en condiciones de déficit hídrico o la presencia de la hormona ABA. Para el grupo 1 de proteínas LEA en *A. thaliana*, se ha observado que el promotor del gen *AtEm1* se induce en tejido vascular de embriones o de raíces de plántulas expuestas a ABA, mientras que el promotor del gen LEA *AtEm6* se induce en todos los tejidos del embrión y en tejidos externos de raíces de plántulas expuestas a ABA (Vicent et al., 2000). En otras especies de plantas como frijol, se ha observado que la proteína PvLEA-18 del grupo 6 se acumula en epidermis y en tejido vascular del hipocótilo, en raíz primaria y en raíces laterales. Otro ejemplo que se puede citar es en semillas de soya, en donde se ha analizado la localización *in situ* de los transcritos de diferentes genes LEA pertenecientes a distintos grupos. Se observó que la mayoría de estos transcritos se acumulan en tejidos vasculares y algunos otros tejidos como epidermis o córtex en radícula y cotiledones de embriones (Shih et al., 2010). Aunque estos datos indican una predominancia de algunas proteínas LEA a acumularse en tejidos vasculares en algunos estadios del desarrollo, aún queda mucho por saber acerca de lo que pasa con otras proteínas LEA de otros grupos, en otros estadios de la planta, y si la localización de estas proteínas se conserva en diferentes especies de plantas. Como se ha observado con los resultados de este trabajo, la localización tisular puede variar dependiendo del estadio de desarrollo en el cual se lleve a cabo el análisis, y de las proteínas LEA que se deseen estudiar. Sin embargo, también cabe resaltar que la información que se tiene hasta el momento de estas proteínas indica que su localización es específica de tejidos en la planta.

#### ❖ *Localización celular de la proteína AtLEA4-5*

Además de conocer la localización en los diferentes órganos y tejidos en los estadios analizados, resulta relevante conocer cuál es la distribución a nivel subcelular de la proteína AtLEA4-5 en los diferentes tejidos donde se observó su acumulación, para conocer más acerca de la posible función de estas proteínas en diversas estructuras o compartimentos celulares. Si bien, esta proteína no contiene ningún péptido señal que indique su localización en algún compartimento celular, diferentes programas de predicción de localización subcelular sugieren que la presencia de aminoácidos cargados

negativamente (aspartato y glutamato) en la región N-terminal indican una mayor probabilidad de que esta proteína se localice en citosol y núcleo (Pierleoni et al., 2006; Briesemeister et al., 2010; Candat et al., 2014). En este trabajo se observó que la proteína AtLEA4-5 se localiza en núcleo y citoplasma, y aparentemente en retículo endoplásmico de células epidérmicas de la radícula de embriones embebidos de plantas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*, mientras que en los tejidos de la raíz donde se observó acumulación, la proteína también se localiza aparentemente en núcleo y citoplasma (observaciones en proceso). Es necesario reforzar los resultados obtenidos en este trabajo con el uso de diferentes marcadores celulares fluorescentes y hacer más observaciones en otros tejidos; sin embargo, la localización al menos en citoplasma y núcleo, ya había sido observada en diferentes tipos celulares de tallos de plantas adultas sometidas a sequía mediante ensayos de inmunohistoquímica (Martínez 2014). Estos datos, junto con las predicciones bioinformáticas, indican que la proteína AtLEA4-5 es específica de estos compartimentos celulares en los diferentes tejidos donde se expresa.

Si bien, aun no se conoce cuál es la función de esta y otras proteínas LEA en diferentes compartimentos celulares, en *A. thaliana* existe una preferencia de estas a ser localizadas en núcleo y citoplasma en *A. thaliana* (Hundertmark y Hinch 2008; Candat et al., 2014). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de las proteínas LEA se acumulan en dichos compartimentos, la ausencia de una de estas generalmente no es compensada por la presencia de otras proteínas LEA (Olvera-Carrillo et al., 2010a; Olvera-Carrillo et al., 2011) lo cual nos habla de la diversidad de funciones que podrían tener en los diferentes compartimentos celulares y en los diferentes tejidos donde se expresan. Esto también surge del hecho de que se ha observado que diversas proteínas LEA de plantas pueden proteger la actividad de enzimas reporteras como LDH (Lactato deshidrogenasa) o MDH (Malato deshidrogenasa) (Lin y Thomashow 1992; Grelet et al., 2005; Reyes et al., 2005; Reyes et al., 2008; Cuevas-Velázquez et al., 2016), unir metales (Liu et al., 2011), eliminar radicales (Hara et al., 2004), o unir DNA (Sasaki et al., 2014; Li y Cao 2016). En el caso particular de la proteína AtLEA4-5, si bien se localiza en núcleo y citoplasma, los tejidos en donde se acumula son distintos en los diferentes estadios del desarrollo analizados hasta el momento; además se ha observado que puede proteger la función de enzimas reporteras como LDH y MDH y unir metales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (French et al., datos no publicados). Estos datos en conjunto indican que al menos la proteína AtLEA4-5 podría tener distintas funciones en estos compartimentos celulares, lo cual podría depender del momento del desarrollo y del tejido en el cual se expresan cuando la planta se encuentra sometida a la falta de disponibilidad de agua.

❖ *Localización de los transcritos y las proteínas de los otros dos miembros de la familia AtLEA4 en A. thaliana*

Aunque hasta el momento solo se tienen resultados que nos sugieren la localización del transcrito y de la proteína del gen *AtLEA4-5*, es necesario conocer la localización del transcrito y la proteína del gen *AtLEA4-2* y también realizar las construcciones necesarias para el gen *AtLEA4-1*. Esto nos permitiría obtener un análisis detallado sobre la

acumulación de las proteínas codificadas por estos genes en los diferentes estadios, tejidos y órganos de la planta y así determinar si el hecho de que no exista redundancia entre los diferentes miembros de la familia *AtLEA4* cuando alguno de éstos no está presente en la planta, sea debido a su localización diferencial o, a que a pesar de que pudieran presentar una localización similar pudieran tener distintas funciones en las regiones donde se acumulan. Este análisis comparativo ayudará a dilucidar la función de las proteínas LEA del grupo 4 en la planta durante el déficit hídrico

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que:

- La localización del transcrito y de la proteína del gen *AtLEA4-5* es específica de ciertos tejidos de la planta, dependiendo del estadio del desarrollo en el cual se encuentra la planta cuando está sometida a una condición de déficit hídrico.
- Esta localización puede estar dada por la acción conjunta de los diferentes elementos reguladores encontrados en la región promotora del gen *AtLEA4-5*.
- A nivel subcelular la proteína *AtLEA4-5* se localiza en núcleo y citoplasma, al menos en células epidérmicas de la radícula, en embriones maduros embebidos.

## PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

Con los resultados obtenidos hasta el momento y para poder completar y responder a la hipótesis planteada en este trabajo se sugiere:

- Analizar el patrón de expresión de la proteína *AtLEA4-5-EGFP* en plantas transgénicas *p4-5::AtLEA4-5-EGFP* utilizando las condiciones y estadios del desarrollo empleados; esto para corroborar los datos de localización obtenidos con plantas *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*.
- Corroborar la localización subcelular de la proteína *AtLEA4-5* en plantas *p4-5::AtLEA4-5-EGFP* y mediante técnicas de inmunohistoquímica. Así mismo utilizar marcadores de estructuras celulares que permitan delimitar los diferentes compartimentos celulares donde se encuentra esta proteína.
- Utilizar las mismas condiciones y estadios del desarrollo utilizados en este trabajo para la localización del transcrito y la proteína del gen *AtLEA4-2*. Esto permitirá realizar un análisis comparativo entre patrones de expresión de estos dos genes y determinar si existe una localización diferencial o similar a nivel tisular y subcelular, al menos entre estos dos miembros de la familia *AtLEA4*.

- Corroborar los datos de localización de cada uno de los miembros de la familia con otras técnicas como inmunohistoquímica y localización *in situ* de transcritos, en los estadios en los cuales las condiciones de inclusión de tejidos lo permitan.

## BIBLIOGRAFÍA

Amara I, Odena A, Oliveira E, Moreno A, Masmoudi K, Pages M y Goday A. 2011. *Insights into maize LEA proteins: From proteomics to functional approaches*. Plant & Cell Physiology. 52(2): 312-329.

Amara I, Zaidi I, Masmoudi K, Ludevid M D, Pagés M, Goday A y Brini F. 2014. *Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions*. American Journal Of Plant Sciences. 5: 3440-3455.

Bas JWD, Costa MCD, Maia J, Bentsink L, Ligterink W y Hilhorst HWM. 2015. *Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance*. Planta. 241: 563-577.

Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A., Campos F. y Covarrubias A.A. 2008. *The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins*. Plant Physiology. 148(1): 6–24.

Bewley DJ, Bradford KJ, Hilhorst HWM y Nonogaki H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. Springer, New York.

Bray E A. 1997. *Plants response to water deficit*. Trends in plant sciences. 2 (2): 48-54.

Bray E A. 2007. *Plant response to water-deficit stress*. Encyclopedia of Life Sciences.

Bhatnagar-Mathur P, Vadez V y Sharma K K. 2008. *Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects*. Plan Cell Reports. 7: 411-424.

Briesemeister S, Rahnenführer J y Kohlbacher O. 2010. *YLoc an interpretable web server for predicting subcellular localization*. Nucleic Acids Research. 38: W497-W502.

Brum A. 2011. *Plant breeding for water-limited environments*. Springer-Verlag. New York. 255 pp.

Buchanan B, Gruissem W y Jones R. 2002. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Life Sciences.

Candat A, Paszkiewicz G, Neveu M, Gautier R, Logan DC, Avelange-Macherel MH y Macherel D. 2014. *The ubiquitous distribution of late embryogenesis abundant proteins across cell compartments in Arabidopsis offers tailored protection against abiotic stress*. The Plant Cell. 26: 3148-3166.

Caramelo J J y Iusem N D. 2009. *When cells lose water: Lessons from biophysics and molecular biology*. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 99:1–6.

Carrillo P, Annunziata M G, Pontecorvo G, Fuggi A y Woodrow P. 2011. *Abiotic stress in plants. Mechanisms and adaptations*. InTech. Rijeka, Croacia.

Chaves M M, Flejaz J y Pinheiro C. 2009. *Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell*. Annals of Botany. 103: 551-560.

Chen H y Jiang J G. 2010. *Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity*. Environmental Reviews. 18: 309-319.

Chen T, Cai X, Karahara I, Schreiber L y Jin J. 2011. *Casparian strip development and its potential function in salt tolerance*. Plant Signal & Behavior. 6 (10):1499-1502.

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 Physiology. 120(1): 93-104.

Cuevas-Velázquez C L, Saab-Rincon G, Reyes J L y Covarrubias A A. 2016. *The unstructured N-terminal region of Arabidopsis group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA) is required for folding and for chaperone-like activity under water deficit*. The Journal of Biological Chemistry.

Cushman J C. 2001. *Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments*. Plant Physiology. 127: 1439-1448.

Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R y Abrams S R. 2010. *Abscisic acid: Emergence of a core signaling network*. Annual Review of Plant Biology. 61: 651-659.

Dinneny JR. 2010. *Analysis of the salt-stress response at cell-type resolution*. Plant Cell and Environment. 33: 543-551.

Dure L y Galau G A. 1981. *Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination*. Plant Physiology. 68:184-194.

Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. *ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants*. Journal of Plant Research. 124 (4):509-525.

Gao C, Wang C, Zheng L, Wang L y Wang Y. 2012. *A LEA gene regulates cadmium tolerance by mediating physiological responses*. International Journal of Molecular Sciences. 13: 5468-5481.

Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH, 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.

Hand C S, Menze M A, Toner M, Boswell L y Moore D. 2011. *LEA proteins during water stress: Not just for plants anymore*. The Annual Review of Physiology. 73: 15.1-15.20.

Hanson M R y Köhler R H. 2001. *GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants*. Journal of Experimental Botany. 52(356): 529-539.

Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003) *Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco*. Planta 217(2):290–298

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M y Korenaga T. 1999. *Plant cis-acting regulatory elements (PLACE) database*. Nucleic Acid Research. 27(1): 297-300.

Huang G T, Liang Ma S, Bai L P, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M. y Guo Z. F. 2012. *Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants*. Molecular Biology Reports. 39: 969–987.

Hundertmark M y Hinch D K. 2008. *LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics. 9(118).

Hundertmark M, Dimova R, Lengefeld J, Seckler R y Hinch D K. (2011) *The intrinsically disordered late embryogenesis abundant protein LEA18 from Arabidopsis thaliana modulates membrane stability through binding and folding*. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes. 1808: 446-453.

Karimi M, Inzé D y Depicker A. 2002. *GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation*. Trends in Plant Science. 7(5):193-195.

Kirkham, M. 2005. *Principles of soil and plant water relations*. Elsevier Academic Press. Boston.

Kooyers, N J. 2015. *The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations*. Plant science. 234: 155-162.

Kuromori T, Mizoi J, Umezawa T, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. (2013). *Stress signaling networks: Drought stress*. En Howell S H (Eds). Molecular Biology. Springer, New York.

Lange O L, Kappen L y Schulze E D. 1976. *Water and plant Life. Problems and modern approaches*. Springer-Verlag. Berlin.

Lin C y Thomashow M F. 1992. A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 183(3):1103–1108.

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 Physiology*. 52(6), 994-1002.

Lopez-Molina L, Mongrand S y Chua N-H. 2001. *A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis*. *PNAS*. 98 (8): 4782-4787.

Lucas W J, Ham B K y Kim J Y. 2009. Plasmodesmata – bridging the gap between neighboring plant cells. *Cell Press Review*. 10:495-503.

Lucas W J , Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav S-R, Helariutta Y, He X-Q, Fukuda H, Kang J, Brady S M, Patrick J W, Sperry J, Yoshida A, Lopez-Mill A-F, Grusak M A y Kachroo P. 2013. *The plant vascular system: evolution, development and functions*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 55(4): 294-388.

Mahajan S y Tuteja N. 2005. *Cold, salinity and drought stresses: An overview*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444: 139–158.

Maia J, Dekkers B J W, Provart N J, Ligterink W y Hilhorst H W M. 2011. *The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome*. *Plos One* 6 (12): e29123.

Maia J, Dekkers B J W, Dolle M J, Ligterink W y Hilhorst H W M. 2014. *Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis* seeds*. *New Phytologist*. 203: 81-93.

Martínez C. 2014. *Localización de la proteína AtLEA4-5 en *Arabidopsis thaliana**. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias.

Midgley G F. 2007. *Plant physiological responses to climate and environmental change*. *Encyclopedia of Life Sciences*.

Moller I S, Gilliam M, Jha D, Mayo G M, Roy S J, Coates J C, Haseloff J y Tester M. 2009. *Shoot Na<sup>+</sup> exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alterations of Na<sup>+</sup> transport in *Arabidopsis**. *The Plant Cell*. 21:2163-2178.

Moreno P L. 2009. *Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión*. *Agronomía Colombiana*. 27(2), 179-191.

Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z K, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses*. The Plant Journal. 34: 137-148.

Nelson B K, Cai X y Nebenführ A. 2007. *A multi-color set of in vivo organelle markers for colocalization studies in Arabidopsis and other plants*. The Plant Journal 51:1126-1136.

Nilsen, E T. y Orcutt D M. 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley and Sons, New York, NY.

Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J L, Garciarubio A. y Covarrubias A A. 2010. *Running head: LEA proteins and adaptation to water deficit*. Plant Physiology. 10:1104-1110.

Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J L, Garciarubio A y Covarrubias A A. 2010a. *Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis*. Plant Physiology. 154: 373–390.

Olvera-Carrillo Y. 2010b. *Estudio de la función de la familia 4 de proteínas LEA de Arabidopsis thaliana en la respuesta a sequía*. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K y Tran L P. 2014. *Response of plants to water stress*. Frontiers in Plant Science. 5(86): 1-8.

Pareek A, Sopory S K, Bohnert H J y Govindjee. 2010. *Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, molecular and genomic foundation*. Springer Science. Urbana, USA.

Pierleoni A, Martelli P L, Fariselli P y Casadio R. 2006. *BaCeLlo: a balanced subcellular localization predictor*. Bioinformatics. 22(14): e408-e416.

Pinheiro C y Chaves M M. 2011. *Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?* Journal of experimental Botany. 62 (3): 869-882.

Reyes J L, Rodrigo M J, Colmenero-Flores J M, Gil J V, Garay-Arroyo A., Campos F, Salamini F, Bartel D y Covarrubias AA. 2005. *Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro*. Plant, Cell and Environment. 28: 709–718.

Reyes J L, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y y Karlson D T. 2008. *Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection*. Plant Cell and Environment. 31:1781–1790.

Rivera-Najera L Y, Saab-Rincón G, Battaglia M, Amero C, Pulido N O, García-Hernández E, Solórzano R, Reyes JL y Covarrubias AA. 2014. *A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties*. The Journal of Biological Chemistry. 289:31995-32009.

Rowley E R y Mockler T C. 2011. *Plant abiotic stress: Insights from the genomics era*. En Shanker A y Venkateswarlu B (Eds). *Abiotic stress response in plants. Physiological, biochemical and genetic perspectives*. Intech. Croacia.

Sage R F, Sage T L y Kocacinar F. 2012. *Photorespiration and evolution of C4 photosynthesis*. Annual Review of Plant Biology. 63:19-47.

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.

Sauter A, Davies W J y Hartung W. 2001. *The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot*. Journal of Experimental Botany. 52 (363): 1991-1997.

Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. *Gene networks involved in drought stress response and tolerance*. Journal of Experimental Botany. 58(2): 221-227.

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. 3:217-223.

Taiz L y Zeiger E. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cumming Publishing Company. Redwood, California.

Tunnacliffe A y Wise M. 2007. *The continuing conundrum of the LEA proteins*. Naturwissenschaften. 94: 791- 812.

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. *Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions*. PNAS. 97(21): 11632-11637.

Vicent C M, Hull G, Guilleminot J, Devic M y Delseny M. 2000. *Differential expression of the Arabidopsis genes coding for Em-like proteins*. Journal of Experimental Botany. 51(348):1211-1220.

Wilson Z.A. 2000. *Arabidopsis: A practical approach*. Oxford Press. New York, USA.

Wu X, Gong F y Wang W. 2013. *Functional assignment to maize group 1 LEA protein EMB564 within the cell nucleus using computational analysis*. Biomedical Informatics. 9(6): 276-280.

Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. 2006. *Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stress*. The Annual Review of Plant Biology. 57: 781-803.

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*. Nature Protocols. 1(2): 1-6.

❖ Páginas consultadas

<https://www.arabidopsis.org/>

<http://fiji.sc/Fiji>

## ANEXO

**Anexo 1. Factores transcripcionales que se unen a los diferentes elementos *cis* encontrados en cada uno de los promotores de *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*. En la tabla se enlista el factor transcripcional que se une al elemento *cis* encontrado, el número de elementos *cis* encontrados a lo largo del promotor, la o las especies donde se han encontrado y las características generales de los factores transcripcionales.**

### Promotor de *AtLEA4-2*

| Factor transcripcional | Cantidad de elementos <i>cis</i> encontrados | Especie(s) en donde se han encontrado estos sitios | Características del factor transcripcional  |
|------------------------|--|--|---|
| <b>AG (Agamous)</b>    | 19   | Arabidopsis  | Factor de transcripción AGAMOUS tipo MADS. Gen homeótico floral que se encuentra involucrado en la identidad del meristemo floral y los estambres   |
| <b>AP1</b>             | 3  | Arabidopsis  | Proteína homeótica floral APETALA 1. Promueve el establecimiento y mantenimiento de la identidad floral en nuevos primordios florales. Involucrado en determinar el desarrollo de sépalos y pétalos.  |
| <b>Core</b>            | 25   | Arabidopsis  | Proteína homeobox/ dedo de zinc que se expresa predominantemente en tejido floral, lo cual indica que podría tener un papel regulatorio durante el desarrollo floral.   |
| <b>GATABOX</b>         | 16   | Petunia/Arabidopsis/rice                           | Caja GATA box. Involucrada en regulación por luz y expresión tisular específica. Se conserva en los promotores de genes LHCII tipo I Cab. Se une a ASF-2 dirigiendo su expresión en tricomas, elementos vasculares y células de la epidermis y mesófilo.  |
| <b>ATHB-5</b>          | 12   | Arabidopsis  | ATHB5 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 5); factor de transcripción involucrado en mediar el efecto inhibitorio de ABA en el crecimiento, durante el establecimiento de la plántula. Se acumula rápidamente después de la germinación y se localiza en el hipocótilo de plántulas germinadas. Se acumula en el tejido vascular de la zona de diferenciación de la raíz principal y de raíces laterales. |
| <b>L1BOXATPDF1</b>     | 1  | Arabidopsis/Algodón                                | L1 box se encuentra en el promotor del gen. PROTODERMAL FACTOR1 (PDF1) que está involucrado en la expresión de la capa L1 en el meristemo apical y en primordios de órganos.  |
| <b>ATHB-9</b>          | 4  | Arabidopsis  | PHV (PHAVOLUTA); Factor de transcripción. Mutantes en este factor provocan que la zona abaxial de la hoja muestre un fenotipo adaxial. Involucrado en la determinación adaxial-abaxial de las hojas. Se expresa en hojas y raíz.  |
| <b>Bellringer</b>      | 2  | Arabidopsis  | BELLRINGER funciona junto con STM y BP en el meristemo, regulando la identidad meristemática y la filotaxia en el tallo en desarrollo.  |

|                               |    |   |   |
|-------------------------------|----|---|---|
| <b><u>C8GCARGAT</u></b>       | 8  | Arabidopsis                             | AGL15 (AGAMOUS-like 15), miembro de los factores reguladores de tipo MADS. Se acumula preferencialmente en los estados tempranos del desarrollo de la planta. AGL15 se acumula en los brotes apicales en el peciolo de hojas, en plántulas.                                       |
| <b><u>RAV1</u></b>            | 1  | Arabidopsis                             | Factor transcripcional RAV1 represor de la transcripción. Su expresión está involucrada con la maduración de las hojas y su senescencia. Se expresa abundantemente en hojas de roseta y raíz. Se predice que funciona como un regulador negativo del crecimiento y el desarrollo. |
| <b><u>ARR10</u></b>           | 13 | Arabidopsis                             | ARR10 está involucrado en la diferenciación del protoxilema en raíz. Plantas mutantes muestran inhibición en la elongación de la raíz. Involucrado en la vía dependiente de AHK que regula negativamente la diferenciación del protoxilema en los tejidos vasculares de la raíz.  |
| <b><u>RHERPATEXPA7</u></b>    | 1  | Arabidopsis                             | RHEs (Root Hair-specific cis-Elements) elemento conservado en diversas angiospermas. Se expresa en pelos radicales.   |
| <b><u>PIF3</u></b>            | 5  | Arabidopsis                             | PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3); Factor transcripcional que interactúa con los fotoreceptores phyA y phyB. Actúa como regulador negativo de phyB.   |
| <b><u>CCA1ATLHCB1</u></b>     | 1  | Arabidopsis                             | Proteína CCA1 es un factor transcripcional relacionado a myb involucrado en la regulación por fitocromos del gen Lhcb en <i>Arabidopsis</i> .   |
| <b><u>CCA1</u></b>            | 1  | Arabidopsis                             | Factor transcripcional relacionado a myb involucrado en la regulación por fitocromos del gen Lhcb en <i>Arabidopsis</i> .   |
| <b><u>GT1CONSENSUS</u></b>    | 11 | Chícharo/avena/Arroz tabaco/Arabidopsis | Sitio consenso de unión de GT-1 en varios genes regulados por luz.  |
| <b><u>IBOX</u></b>            | 1  | Tomate/Arabidopsis                      | Secuencia conservada río arriba en genes regulados por luz.   |
| <b><u>SORLIPAT</u></b>        | 2  | Arabidopsis                             | Secuencia sobre-representada en promotores inducidos por luz (SORLIPs) en <i>Arabidopsis</i> .  |
| <b><u>LTREATLT178</u></b>     | 1  | Arabidopsis/cebada                      | Elemento putativo de respuesta a bajas temperaturas encontrado en genes que se inducen en temperaturas bajas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .   |
| <b><u>LTRECOREATCOR15</u></b> | 1  | Arabidopsis/uva                         | Elemento de respuesta a bajas temperaturas (LTRE) del gen cor15a en <i>Arabidopsis</i> .  |
| <b><u>MYCONSENSUSAT</u></b>   | 14 | Arabidopsis                             | El sitio de reconocimiento MYC se encuentra en el promotor del gen de respuesta a deshidratación rd22 y de ICE1 que regula la transcripción de los genes CBF/DREB1 en frío en <i>Arabidopsis</i> .  |
| <b><u>ABRE</u></b>            | 11 | Arabidopsis                             | Familia de factores de transcripción de respuesta a ABA   |
| <b><u>ACGTATERD1</u></b>      | 14 | Arabidopsis                             | Secuencia ACGT que se requiere para la inducción de erd1 (early responsive to dehydration) en <i>Arabidopsis</i> .  |
| <b><u>DPBFCOREDCC3</u></b>    | 2  | Zanahoria/Arabidopsis                   | DPBF, Dc3 promoter-binding factor-1 y 2. Se induce por ABA.   |

|                             |    |                       |  |
|-----------------------------|----|-----------------------|--|
| <b>MYB</b>                  | 5  | Arabidopsis           | Sitio de reconocimiento MYB encontrado en el promotor del gen rd22 involucrado en la respuesta a deshidratación. Proteínas MYB de Arabidopsis como AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) funcionan como activadores transcripcionales en la señalización por ácido abscísico. |
| <b><u>DPBFCOREDCDC3</u></b> | 2  | Zanahoria/Arabidopsis | DPBF, Dc3 promoter-binding factor-1 y 2. Se induce por ABA.  |
| <b><u>GADOWNAT</u></b>      | 1  | Arabidopsis           | Secuencia encontrada en 24 genes de respuesta a ácido giberélico (GA) durante la germinación en <i>Arabidopsis</i> . Este motivo es similar a los motivos ABRE.  |
| <b><u>GAREAT</u></b>        | 2  | Arabidopsis           | GARE, elemento de respuesta a ácido giberélico (GA) ; involucrado en los genes inducibles por GA y de respuesta a GA y genes a GA durante la germinación en <i>Arabidopsis</i> .   |
| <b><u>ARR1AT</u></b>        | 21 | Arabidopsis           | El elemento ARR1-binding se encuentra en <i>Arabidopsis</i> y arroz. ARR1 es un regulador de respuesta a citocininas y funciona como activador transcripcional. Involucrado en la inhibición de la elongación del hipocótilo mediada por citocininas.                  |

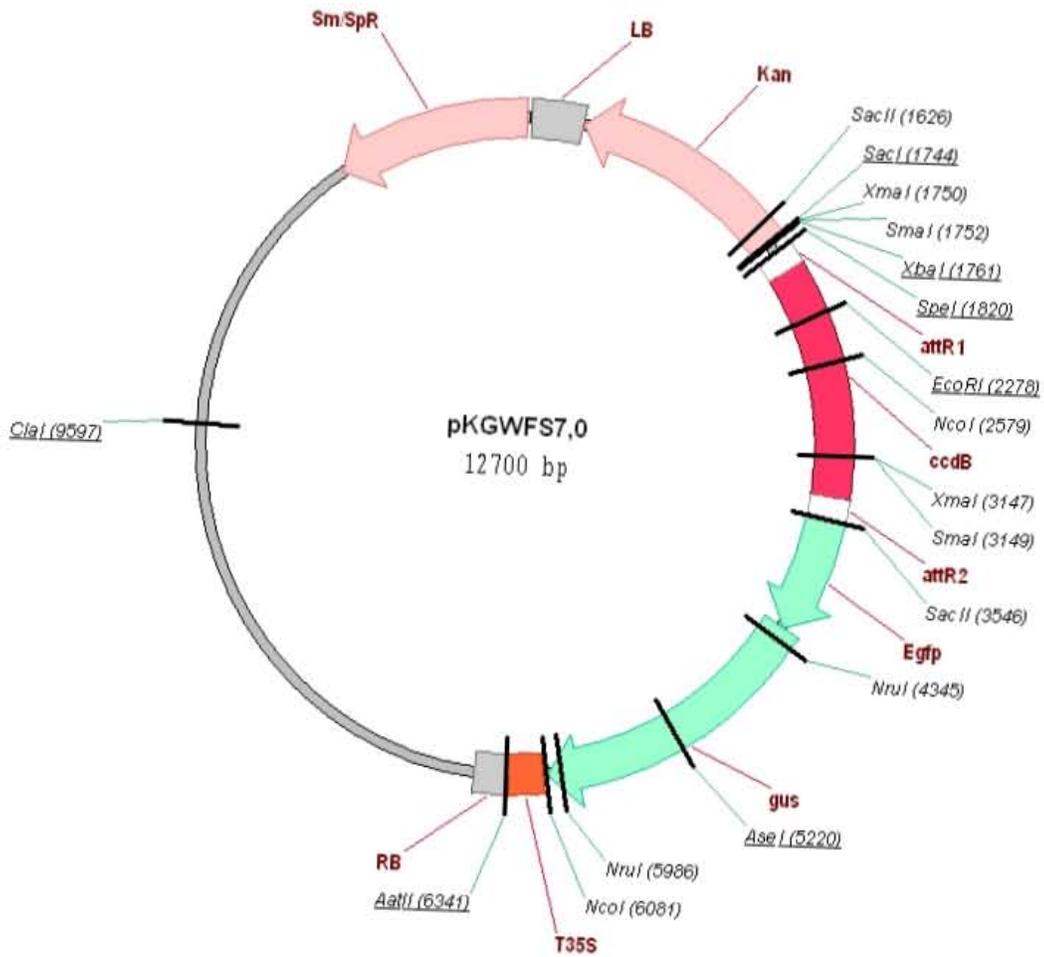
#### Elementos en *cis* del promotor del gen *AtLEA4-5*

| Factor de transcripción | Cantidad de elementos <i>cis</i> encontrados | Especie(s) en donde se han encontrado estos sitios | Características del factor transcripcional  |
|-------------------------|--|--|---|
| <b><u>AG</u></b>        | 3  | Arabidopsis  | Factor de transcripción AGAMOUS tipo MADS. Gen homeótico floral que se encuentra involucrado en la identidad del meristemo floral y los estambres.  |
| <b><u>Core</u></b>      | 6  | Arabidopsis  | Proteína homeobox/ dedo de zinc que se expresa predominantemente en tejido floral, lo cual indica que podría tener un papel regulatorio durante el desarrollo floral.   |
| <b><u>GATABOX</u></b>   | 8  | Petunia/Arabidopsis/arroz                          | Caja GATA box. Involucrada en regulación por luz y expresión tisular específica. Se conserva en los promotores de genes LHCI tipo I Cab. Se une a ASF-2 dirigiendo su expresión en tricomas, elementos vasculares y células de la epidermis y mesófilo.   |
| <b><u>Athb-1</u></b>    | 1  | Arabidopsis  | ATHB-1 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 1). Factor transcripcional involucrado en procesos de desarrollo. Involucrado en el desarrollo del hipocótilo y la hoja. Se expresa en hipocótilo y raíz, aumentando su expresión en plántulas crecidas en un periodo de fotoperiodo corto. Se induce después del inicio de la germinación expresándose principalmente en el hipocótilo de plantas en germinación. |
| <b><u>ATHB-5</u></b>    | 3  | Arabidopsis  | ATHB5 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 5); factor de transcripción involucrado en mediar el efecto inhibitorio de ABA en el crecimiento, durante el establecimiento de la plántula. Se acumula rápidamente después de la germinación y se localiza en el hipocótilo de plántulas germinadas. Se acumula en el tejido vascular de la zona de diferenciación de la raíz principal y de               |

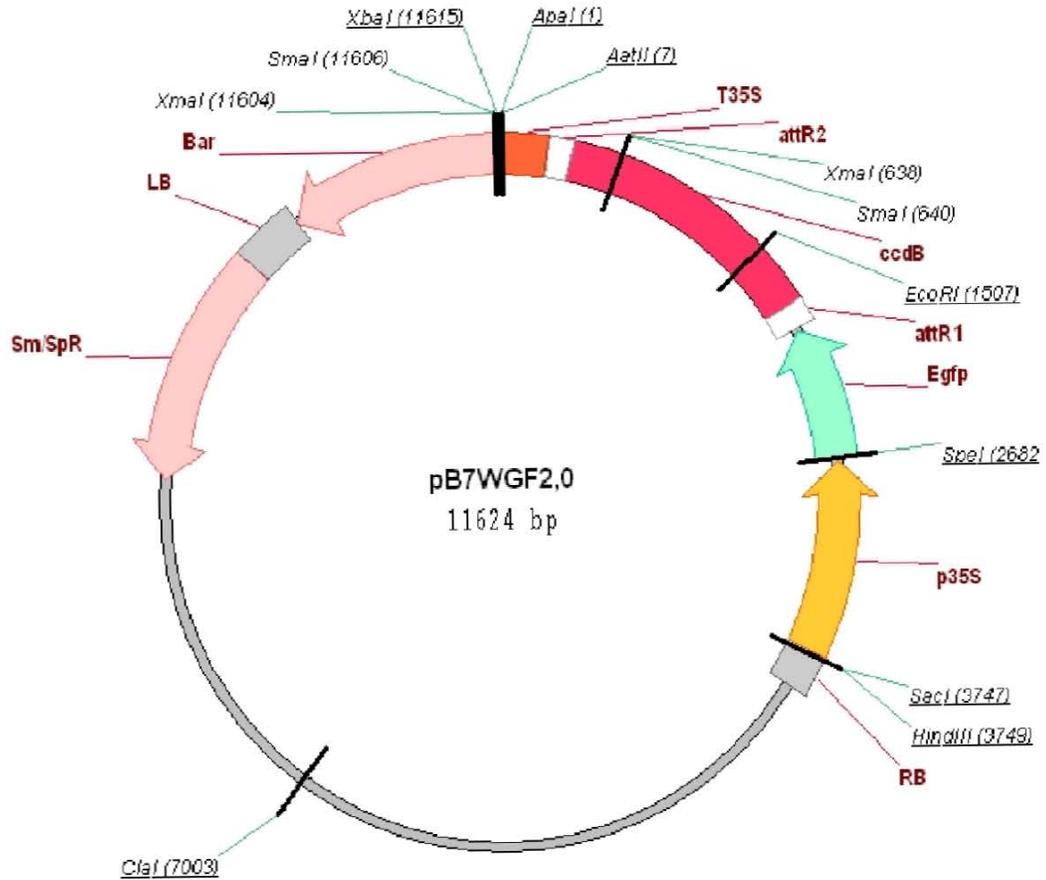
|                               |    |   |   |
|-------------------------------|----|---|---|
|                               |    |   | raíces laterales.   |
| <b><u>ATHB-9</u></b>          | 1  | Arabidopsis                             | PHV (PHAVOLUTA); Factor de transcripción. Mutantes en este factor provocan que la zona abaxial de la hoja muestre un fenotipo adaxial. Involucrado en la determinación adaxial-abaxial de las hojas. Se expresa en hojas y raíz.  |
| <b><u>RAV1</u></b>            | 6  | Arabidopsis                             | Factor transcripcional RAV1 represor de la transcripción. Su expresión está involucrada con la maduración de las hojas y su senescencia. Se expresa abundantemente en hojas de roseta y raíz. Se predice que funciona como un regulador negativo del crecimiento y el desarrollo. |
| <b><u>ARR10</u></b>           | 1  | Arabidopsis                             | ARR10 está involucrado en la diferenciación del protoxilema en raíz. Plantas mutantes muestran inhibición en la elongación de la raíz. Involucrado en la vía dependiente de AHK que regula negativamente la diferenciación del protoxilema en los tejidos vasculares de la raíz.  |
| <b><u>RHERPATEXPA7</u></b>    | 1  | Arabidopsis                             | RHEs (Root Hair-specific cis-Elements)" elemento conservado en diversas angiospermas. Se expresa en pelos radicales.  |
| <b><u>PIF3</u></b>            | 4  | Arabidopsis                             | PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3); Factor transcripcional que interactúa con los fotoreceptores phyA y phyB. Actúa como regulador negativo de phyB .  |
| <b><u>LTRECOREATCOR15</u></b> | 1  | Arabidopsis/Uva                         | Elemento de respuesta a bajas temperaturas (LTRE) del gen <i>cor15a</i> en <i>Arabidopsis</i> .   |
| <b><u>MYCCONSENSUSAT</u></b>  | 2  | Arabidopsis                             | El sitio de reconocimiento MYC se encuentra en el promotor del gen de respuesta a deshidratación <i>rd22</i> y de <i>ICE1</i> que regula la transcripción de los genes <i>CBF/DREB1</i> en frío en <i>Arabidopsis</i> .   |
| <b><u>ABRE</u></b>            | 12 | Arabidopsis                             | Familia de factores de transcripción de respuesta a ABA.  |
| <b><u>ACGTATERD1</u></b>      | 8  | Arabidopsis                             | Secuencia ACGT que se requiere para la inducción de <i>erd1</i> (early responsive to dehydration) en <i>Arabidopsis</i> .   |
| <b><u>MYB2AT</u></b>          | 14 | Arabidopsis                             | Sitio de unión para el factor transcripcional <i>ATMYB2</i> . <i>ATMYB2</i> está involucrada en la regulación de genes que responden al estrés por déficit hídrico en <i>Arabidopsis</i> .  |
| <b><u>DPBFCOREDCDC3</u></b>   | 3  | Zanahoria/Arabidopsis                   | DPBF, Dc3 promoter-binding factor-1 y 2. Se induce por ABA.   |
| <b><u>ARR1AT</u></b>          | 3  | Arabidopsis                             | El elemento ARR1-binding se encuentra en <i>Arabidopsis</i> y arroz. ARR1 es un regulador de respuesta a citocininas y funciona como activador transcripcional. Involucrado en la inhibición de la elongación del hipocótilo mediada por citocininas.                             |
| <b><u>ASF1MOTIFCAMV</u></b>   | 4  | Tabaco/Arabidopsis                      | El motivo ASF-1 se encuentra en promotores de genes involucrados en la activación transcripcional por auxinas o ácido salicílico de diferentes genes.   |
| <b><u>GT1CONSENSUS</u></b>    | 2  | Chicharo/avena/arroz tabaco/Arabidopsis | La unión de GT-1 al promotor de <i>PR-1a</i> promueve la expresión de genes inducibles por ácido salicílico.  |

|                                 |   |             |  |
|---------------------------------|---|-------------|--|
| <b><u>WBOXATNPR1</u></b>        | 2 | Arabidopsis | "W-box" que se encuentra en el promotor del gen NPR1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Este es reconocido por la proteína WKRY que se induce por ácido salicílico . |
| <b><u>SURECOREATSULTR11</u></b> | 1 | Arabidopsis | Sulfur-responsive element (SURE) que se encuentra en el promotor de SULTR1;1 involucrado en el transporte de sulfatos.   |

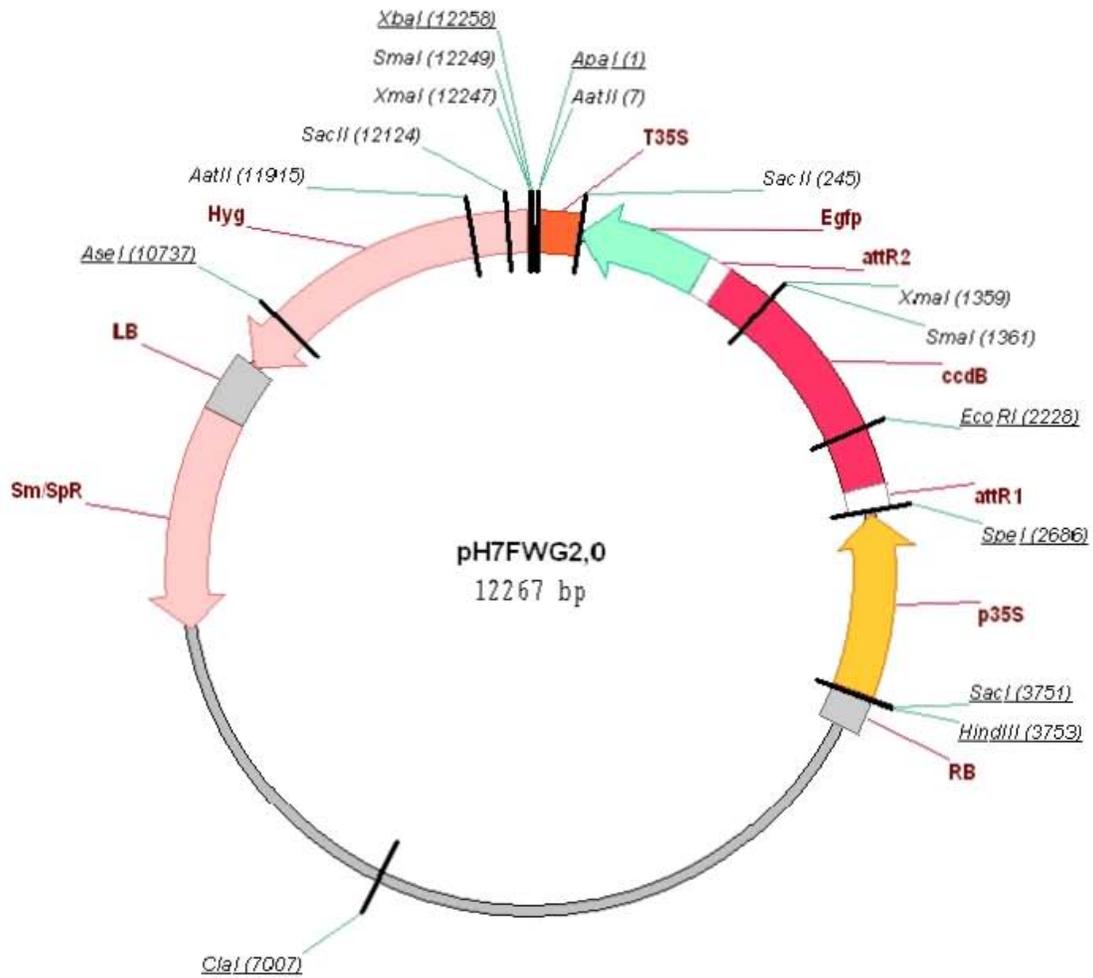
Anexo 2. Esquema del vector GATEWAY pKGWFS7 (Karimi et al., 2002) utilizado para las construcciones *p4-2::EGFP-GUS* y *p4-5::EGFP-GUS*



Anexo 3. Esquema del vector Gateway pB7WGF2 (Karimi et al., 2002) utilizado para las construcciones *p4-2::EGFP-AtLEA4-2* y *p4-5::EGFP-AtLEA4-5*.



Anexo 4. Esquema del vector Gateway pH7FWG2 (Karimi et al., 2002) utilizado para las construcciones *p4-2::AtLEA4-2-EGFP* y *p4-5:: AtLEA4-5-EGFP*.



**Anexo 5. Resultado de secuenciación obtenida que muestran la inserción del promotor del gen *AtLEA4-5* en el vector *pKGWFS7*. En gris claro se muestra la secuencia del promotor, en verde se muestra parte de la secuencia del gen *EGFP* y en gris oscuro se muestra parte de la secuencia del gen *kanamicina*.**

Secuencia 3050, Oligo CPLEA4-5F Forward, Colonia 1

AMATGCTTTTGTCTTACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAACCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCYAA  
CACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGTGTAGGACCAATAACTGAAACACA  
AAGCCTACCACCTCTTCTTCTTCTTTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCAAGAACGTAATTAATAT  
TAAACTATCGAGACGAACGCGAGGCCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAAACAATAAAC  
AAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTTTCGCTAAAGGAAAAGAGAGAGATTTGGTAAAA  
AGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTGTACAAAAGTGGTGATATCCC GCGGATGGTGAGCAAGGGCGAG  
GAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCG  
TGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA  
GCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGA  
CCACATGAAGCAGCAGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTT  
CAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC  
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAATAACA  
GCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAAC  
ATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT  
GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAA GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT  
GGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACGACCCGCATGTACT  
CTGTAGAACCCCAACCGTGAATCAAAAAAACCTYSGAAC

Secuencia 3051, oligo CPLEA4-5R Reverse, colonia 1

CAGGCACCGGACAGTCGGTTCTGCAAAGTCCGGGGTCCCTTGC GCGTGACAGCCGAACMTGGSGGCMT  
CAAGAGCMAGCGATKYTKTKGTGCCAGTTCAWAGCCGAATAGCCTYTCCMCCCAGCGGACGGRGAACC  
TGSGKGGCAAATCCATTCTTGTTCAATCATGCCTCGATCGAGGTGGAGRRGKGGAAATWTGARGACTYTAA  
TGGATACCGRGGGAATTTATGGAACGTCAGKGGGAGGCATTTTGACCAAGAAAATATTTGCTAGCTGATAG  
KGACCTTAGGCGACTTTGAACSCGCAATAATGGTTTCTGACGTATGKGCTTAGCTCATTAACTCCAGAAAC  
CCGCGGCTCAGTGGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTGAGTTCCAAACGTAACGCTTGTCCC GCGTCAT  
CGGCGGGGGTCATAACGTGACTCCTTAATTCTCCGCTCATGATCGATAATTGAGCTCGGTACCCGGGGATC  
CTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTCTCCCATATGGTGCACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATAT  
CACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTACCAACTCTTAAGATATCATGCACAATAA  
TATACTTGTGGTCTTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAACCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCC  
TAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGTGTAGGACCAATAACTGAAAC  
ACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTTCTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCAAGAACGTAATTA  
ATATTAACATATCGAGACGAACGCGAGGCCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAAACAAT  
AAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTGTAACATCTTGRT

**Anexo 6. Resultado de secuenciación que muestra la ligación de los promotores de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* al vector *pB7WGF2*. En gris se muestra la secuencia del promotor, en verde se muestra parte de la secuencia del gen *EGFP* y en rojo se muestra parte de la secuencia de *RB* (*right border*).**

❖ Ligación del promotor del gen *AtLEA4-2*

Secuencia 7191, oligo Prom4-2 F Forward, colonia 2

```
GCTAAAGGTTTATTGCAAAGAAAGTACTAATTTTTGTTGTTTTGTTTCCTGATAATTTACAAAAAAGAT
GTGTATTTAAGTGTAGTGTGAGCAAAGCAGAGAGAGTCGTCTGCTTACATCATCTATTTACCAAAAAAGT
TTAGACCTTCAAATTTGTTTTCTTGTGTCTGGCTCTTCTCGCTCTGTTTTGATTTTTGTAATTTATATACTTTCT
TTTAGATCAAATCTTTTGTCTACTAATATATCCTTCTATATAAATTTGATGGACACATAATTTAGTTAGGAT
CTCTATCAATCCAAAATCACTAGTATAAAGCTGAATCTTATTTGTTTTGTTTCCAACGATTCAATCTTTTTTC
TATAAAGGTTTAATTAATCATATGTTTGTATGTATGTACATAAAATTGTGAATTCAAATATGATTAACAAAA
TGAAATTCGACTTTAATTAACCTAATACTAATCTATCTTTTTGTTTTGTTTTCTGTGCAATAAATTATTATCT
TTCACACACAATGTTTGAACATAATGTTTCTTATTATTTCGTATCTAATAAATGGTATAAATCGTTTTTCTCGA
TATTTCTTTATAATCTCATTTTGAATATTTTATTCGTTCTAAGTTTTATAATTTACATCATATGTAGTAGTGAC
TGTAGTATCTTGAAATATTTATTTTTATTTGTAAGTTCACACCAACTTTTTGAAAGAAAAAAAACCCGTATA
CACCATTTCGCATATGTATAATTACAACGAGAATTGTAGAATAGCCACACCCAAGTCCATCGATAAAG
ACGCGACTAATTAACATAGCCTCACTCAGAATCGCAGATGCAGAATATAACCCATGCATATAATATACAT
TTATATTCATAACTCGGCAAGTCATTTGCTTCATTATACTAGCTAATTATTGACACCAACTTAGGCAATCTAT
GAAACAATCCCTAAATTTGTTAGAAATTTTTGGGCCAATTTAGCCGAAAGGAAGGGTTCGGAAAGGAAAT
CCCTCCTCCTCAACGGTTCCAATGGCCACTCTTTTTTACGTGACCAGGTTGTTTTGGATTAAAAGGTAACGC
GAGGGTTATATTGTGAAACCACTATCGGCCTTCA
```

Secuencia 7192, oligo Promo4-2 R Reverse, colonia 2

```
CGTCCTAAAAAAGCTTAATTAATCATTATGTGTAAGGTAGTAACAGACATGTGAATTTCAAATATGATAAC
AAAATGAAATTCGACTTAATAAACTAAAATACTAATCTATCTTTTTGTTTTGTTTTCTGTGCAATAAATTAT
TATCTTTCACACACAATGTTTGAACATAATGTTTCTTATTATTTCGTATCTAATAAATGGTATAAATCGTTTTTC
TCGATATTTCTTTATAATCTCATTTTGAATATTTTATTCGTTCTAAGTTTTATAATTTACATCATATGTAGTAG
TGACTGTAGTATCTTGAAATATTTATTTTTATTTGTAAGTTCACACCAACTTTTTGAAAGAAAAAAAACCC
GTATACACCATTTCGCATATGTATAATTACAACGAGAATTGTAGAATAGCCACACCCAAGTCCATCGA
TAAAGACGCGACTAATTAACATAGCCTCACTCAGAATCGCAGATGCAGAATATAACCCATGCATATAATA
TACATTTATATTATAACTCGGCAAGTCATTTGCTTCATTATACTAGCTAATTATTGACACCAACTTAGGCAAT
CTATGAAACAATCCCTAATTGTAGATTTTTGGGCCAATTTAGCGAAGGAGGGTGAAGGAATCTCTCTCACGT
TCCATGCATCTTTTTATGTGACCAGTTGTTTTGGTTAAAAAGTAACGAGTTATGGAACACTACGTACACCGCAA
ATCCAAAAATGTGTTTAGCCAAATAACATCAACATTTTTTTTTCAAACGTATAATTTTCAGCTTTTTTTTTGT
TAAAAACAGCTACCTTAAATATTATGTAACACTACCGACAAAAAAAATATTATGTAATACTTGAGAATCTGA
CAAGATAAAGAAAGAAAAGATAATGCAAAATCAAGAACTATTGTCGTGTTGTTGTTAGATTTGCTTTTGCAT
GAGCGCAACCCACGTAGATATTTCGTAGCTTGACACGTATCTACGTATTACACGTGGTGATAACCCAGTAG
TCGTTAAATTAGATCGGAGAGCATATAAACCATTAAGCCAAATAAGTTATGTGAAATGGAGCGTG
```

❖ Ligación del promotor del gen *AtLEA4-5*

Secuencia 4009, oligo CPLEA4-5F Forward, colonia 1

TMKTGATTTTTGTCTTAMCTATCGATTACRAAAACCGGGTTAACCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCT  
AACACGSGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTCCWACACGTGTAGGACCAATAACTGAAACA  
AAGCCCATACCACCTCTTCTTCTTCTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCAAGAACGTAATTAAT  
ATTAAACTATCGTGACGAACGCGAGGCCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAACAATAA  
ACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTCGCTAAAGGAAAAGAGAGATTGGTAA  
AAACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGG  
CGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACC  
CTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC  
GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGG  
CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCG  
AGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG  
GCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA  
AGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA  
CACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGSCCCTGAGCA  
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGKGAACCGGCCGCCGGGATCACTCTCG  
GCATGGACGAGCTGTAMCAGGGATATCAAAAGTTGTACAAAAAAGCCTGAAMCGAGAAACGTAATGA  
ATATAAAAYATCAAAAATAATAATWAGAATGTTGGCATWAAAAAAMCGRAAC

Secuencia 4013, oligo CPLEA4-5R Reverse, colonia 1

CCATAAGKCCCAGCAGTCAAGCGGACGCTCTTGGTCCATGGCGTTACGGTCCTCAGTTYTAGTTGCGAGGTA  
TTCTACCTTTAWTGCGGACCTAAAACMCCGGGACMAAGAAATCGCCCAGAAAACGGCAGGCGGCCAGCT  
GTTTCGCTACTTAGACTTGTGGCGACATGTCGTTTTAGAAAAGACGGCTGCACTGACGTGAGGCCGACTG  
CACTATAGCAGCGGAGGGGTGGATCAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTGATCCCG  
AGGGGAACCTGTGGTTGGCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTACGCCCCTTTAAATATC  
CGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTAAA  
CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCCAAGCTCAAGCTAAGCTTGAGCTCAACTCTTAAAGATATCATGCA  
CAATAATATACTTGTCTTAACTATCGATTACAAAACCGGGTTAACC GCCGACATGAGGCGAACTCT  
AAAGCCTAACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTCCAACACGTGTAGGACCAATAAC  
TGAAACACAAAGCCTACCACCTCTTCTTCTTCTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCAAGAACGT  
AATTAATAATTAACACTATCGTGACGAACGCGAGGCCTATGGCTATAWMMWATGGGACATGCTCGGTGAGC  
AAAACAATAAACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTT

**Anexo 7. Resultado de secuenciación que muestra la ligación de los promotores de los genes *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5* al vector *pH7FWG2*. En gris se muestra la secuencia del promotor, en verde se muestra parte de la secuencia del gen *EGFP*, en rojo se muestra parte de la secuencia de *RB (right border)*, en amarillo se muestra la secuencia *attR1* y en verde oscuro se muestra parte de la secuencia de *ccdB*.**

❖ Ligación del promotor del gen *AtLEA4-2*

Secuencia 13602, oligo RB-F Forward, colonia 4

```
CCTTTTATATCCGATTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACT
G ATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCCAAGCTCAAGCTAAGCT TGAGCTCGAGATACTG
AAATTTCAAAATTTGGGGCTTTAATTGAAAAGAAAGTACTAATTTTTGTTGTTTTGTTTTCTGATAATATTTA
CAAAAAAAGATGTGTATTTAAGTGTAGTGTGTCAGCAAAAGCAGAGAGAGTCTGCTGCTTACATCATCTATTTT
ACCAAAAAGGTTTAGACCTTCAAATTTGTTTTCTGTGTCTGGCTCTTCTCGCTCTGTTTTGATTTTTGTAATT
TATATACTTTCTTTAGATCAAATCTTTGTCTACTAATATATCCTTCCTATATAAAATTTGATGGACACATAATT
TTAGTTAGGATCTCTATCAATCCAAAATCACTAGTATAAAGCTGAATCTTATTTGTTTTGTTTCCAACGATT
CAATCTTTTTCTATAAAGGTTTAATTAATCATATGTTTGTATGTATGTACATAAAATTGTAATTCAAATAT
GATTAACAAAATGAAATTCGACTTTAATTAACTTAAATACTAATCTATCTTTTTGTTTTGTTTTCTGTGCAAT
AAATTATTATCTTTCACACACAATGTTTGAACATAATGTTTCTTATTATTTCGTATCTAATAAATGGTATAAAT
CGTTTTCTCGATATTTCTTATAATCTCATTGGAATATTTATTTCGTTCTAAGTTTTATAATTTACATCATAT
GTAGTAGTGACTGTAGTATCTTGAATATTTATTTTTATTTGTAAGTTCACACCAACTTTTTGAAAGAAAA
AAAACCGTATACACCATTTCGCATATGTATAAATCACAACGAGAATTGTAGAATAGCCACACCCAACCTAGCT
CCATCGATAAAGACGCGACTAATTAACATAGCCTCACTCAGAATCGCAGATGCAGAATATACCCATGCAT
ATATATACATTATATTCATAACTCGGCAGTCATTGCTCATATACTAGCTATAATGACACACTAGCATCTATGA
AMCATCCTACTGTAGATTTGGCCAGTACGAAGGAGGGTCAAGGAAGTCT
```

❖ Ligación del promotor del gen *AtLEA4-5*

Secuencia 13066 oligo CPLEA4-5F Forward, colonia 3

```
TMGTTGATTTGTCTTACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAACCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTA
ACACGCGTCAACATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGTGTAGGACCAATAACTGAAACAC
AAAGCCTACCACCTCTTCTTCTTCTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCAGAACGTAATTAAT
ATTAACCTATCGTGACGAACGCGAGGCCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAAACAATAA
ACAAAAGTAATCAGAAGATATCTTTGTAACATCTTTGAATTTGCTAAAGGAAAAGAGAGATTTGGTAA
AACTAGTGATATCA CAAGTTTGTACAAAAAGCTGAACGAGAAACGTA AAATGATATAAATATCAATATA
TTAAATTAGATTTTGCATAAAAAACAGACTACATAACTGTAAACACAACATATCCAGTCACTATG GCGG
CCGCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGATTTGAGTTAGGATCC
GTCGAGATTTT CAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACGTTGATATAT
CCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTT GAGGCATTT CAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTC
AGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATT CACA
TTCTTGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTATATGG
GATAGTGTTCACCCTTGTACACCGTTTTCCATGAGCAAACGTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACC
ACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATT
TCCCTAAAGGTTTATTGAGAATATGTTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTT
```

AACGTGACCAATATGGACAACCTCCTCGCCCCGTTTACATGGGCAATATTATACGCAAGGCGAMCAAGG  
GTGGG

Secuencia 13067, oligo CPLEA4-5R Reverse, colonia 3

CGAATTGGATTAAGGAATCGCTCGAYAGCATGCCGCGACACGGTTCACACCCATGCGGGCGGCGGCCTGGT  
GGTGTGCGCCACGCTCTGTCTCAGCTACGCAGGCCCGCGCCGCTCCTGGAATGGCGTCGGCAATGTCCAGTA  
GGTCGCGGGTGTGCTGCGGGCCAGGCGGTCTAGCCTGGTCACTGTCAACAGTCGCCAGGGCGTAGGTGGTC  
AAGCATCCTGGCCAGCTCCGGGCGGTGCGGCCTGGTCCGGTGATCTTCTCGGAAAACAGCTTGGTGCAGC  
CGGCCGCGTGCAGTTCGGCCCGTTGGTTGGTCAAGTCTGGTCTGTCGGTGTGACGCGGGCATAGCCCCAG  
CAGGCCAGCGGCGGCGCTCTTGTTTCATGGCGTAATGTCTCCGGTCTAGTCGCAAGTATTCTACTTTATGCG  
ACTAAAACACGCGACAAGAAAACGCCAGGAAAAGGGCAGGGCGGCAGCCTGTGCGGTAACCTTAGGACTTG  
TGCGACATGTCGTTTTAGAAAGACGCTGCACTGAACGTCAGAAGCCGACTGCACTATAGCAGCGGAGGGG  
TTGGATCAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTAAAGTACTTTGATCCCGAGGGGAACCCTGTGGTTG  
GCATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTACGCCCTTTTAAATATCCGATTATTCTAATAAACG  
TCTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGAC  
AATCTGATCCAAGCTCAAGCTAAGCTTGAGCTAACTCTTAAGATATCATGCACAATAATACTTGTGTTTGTG  
TTAACCTATCGATTACAAAACCGGGTTAACCGCCGACATGAGGCGAACTCTAAAGCCTAACACGCGTCAAC  
ATCTATCTTCTCAACGACTCAAAGGCTTTCCAACACGTGTAGGACCAATAACTGAAACACAAAGCCTACCAC  
CTCTTCTCCTCTTCTTTCATGACACGTCTCACTGACGTGTCGTCGAAGAACGTAATTAAATATTAAACTATCGT  
GACGAACGCGAGGCCTATGGCTATATCTATGGGACATGCTCGGTGAGCAAAACAATAAACAAAAGTAATCA  
GAAGATATCTTGAAGCT

**Anexo 8. Secuencias obtenidas que muestran la incorporación de la región codificante del gen *AtLEA4-2* al vector *p4-2::pB7WGF2*; y de la región codificante del gen *AtLEA4-5* al vector *p4-5::pB7WGF2*. En azul claro se muestra la secuencia de las regiones codificantes, en rosa se muestra el codón de inicio, en azul oscuro se muestra el codón de término, en verde se muestra parte de la secuencia del gen *EGFP*, en naranja se muestra parte de la secuencia del terminador *T35*.**

❖ Región codificante del gen *AtLEA4-2* en el vector *p4-2::pB7WGF2*

Secuencia 9498, Oligo ORF4-2F Forward, colonia Rec4

TMTTAGTMGGCCAGGAGA**ACTCAACATCGGTGGCGCAAAGGCACAAGGTCATGCGGAGAAGACGATGGC**  
**AAGGACCAAAAAAGAGAAGAAGTTGGCCAAGAGCGAGAGAAGTCTAAGGAGGCGCAGGCCAAAGCTGA**  
**CCTCCATCAATCCAAGGCTGAGCATGCTGCGGACGCTCAGGTTACGGCCACCATCTTCCGGTCACTCCAC**  
**CTACCCTACCCGAGCCACCGGAGCTAATTACCCGCCGGACAGATCTAA**AAAGAGAAGGGTGGGCGCGCC  
GACCCAGCTTTCTTGACAAAGTGGTGATATCCCG**CGGCCATGCTAGAGTCCGCAAAAATCACCAGTCTCTC**  
**TCTACAAATCTATCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTCCAGATAAGGGAATTAGGGTT**  
**CTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCT**  
**ATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAATCCAGTGACCT**GCAGGCATGCGACGTCGGGCCCTTAGAG  
GATCCCGGGTACCGCGAATTATCGATCATGAGCGGAGAATAAGGAGTACGTTATGACCCSCCGATGACG  
CGGACAGCGTTTTACKTTGAACTGACAGACCGCACGTGAAGAGCACTGAGCGSGTTCTGGAGTTTATG  
AGCTAGCACAWCGTCGAMCATATGSCSGTTCAAAGTCGCTAAGGYMTATCASTWGMAAWTTCTGTCAAT  
GYCCATGMGTCAATATCCCYGGTCATTARGTYCAATACTCACTCRCGRGATCMTAGTCGAARCCGCGAATC  
GCTGCAAGGGATKCGGGTCACTGCACWMTAGAACGTATCTCACTGAACCRTRGMACTCTSGGAMTCGTC  
AGMGAGTGCWWCAGCTGAGACCWTAGCTGAGYGGATTTCGAGATGATCACAGWGATCARTAGGTCTGA

Secuencia 9499, Oligo ORF4-2R Reverse, colonia Rec4

GAATACCAGTAKTGCGTATTRTCGAAGCATTACCATAGCCAATAGTTWAGTTGWAGAAGTAGAGAGAAGA  
GAAGCTAGTGGATCTTCTAGTATGKGAGCAGGCGAGGAGCGTCACGGGGTGGGTGCCATCTGTGAGCTG  
ACGCGACGTAACGACACAGTCAGCGKTCGCGAGGGCGAGGGSGATGCCACTACGGCAAGCTGACCTGAA  
GTCATCTGCACCACCGCAAGTGCCGTGCCCTGGCCACCCTCGKGACCACCTGACCTACGGCGTGCACT  
GCTCAGCC**GCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCA**  
**GGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC**  
**ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGACAAGC**  
**TGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA**  
**CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCA**  
**TGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC**  
**AACGAGAAGCGCGATCATATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACG**  
**AGCTGTACAAG**GATATACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCTTGTAACTTTAAGAAG  
GAGCCCTTCACCATG**CAGTCGGCGAAGGAAAAGATCAGTGACATGGCCAGTACGGCCAAGGAGAACTCA**  
**ACATCGGTGGCGCAAAGGCACAAGGTCATGCGGAGAAGACGATGGCAAGGACCAAAAAAGAGAAGAAGT**  
**TGGCCAAAGAGCGARARAAGTCTAAGGAGGCGCAGGCCAAAGCTGACCTCCATC**MAYCCAAG**STGAGCA**  
TGCTGCGGACGCTCAGGTTACGGCCACCATCTTCCGGTCACTCCACCTACCCTACCRGACCCG

❖ Región codificante del gen *AtLEA4-5* en el vector *p4-5::pB7WGF2*

Secuencia 4808, Oligo DMLEA45 F Forward, colonia 1

CTGATTGCAGCTTCTGCAAATCTGGCATGGACAAAACCAAAGCTACCTTGGAGGAAAAGGCGGAGAAGAT  
GAAGACACGAGACCCTGTTTCAGAAACAGATGGCTACACAGGTTAAAGAAGATAAGATCAATCAAGCTGAG  
ATGCAGAAGAGAGAAACGCGTCAGCACAACGCGGCCATGAAAGAAGCGGCTGGAGCCGGAACCGGTTTA  
GGTTGGGGACGGCCACTACTCGACCCTGGACAAGTCGGACACGGCACTGGGACACATCAGATGTCGG  
CTCTGCCTGGTCACGGAACGGGACAACCTGACCGACCGGTTGTGGAGGGCACGGCTGTGACCGACCCGAT  
TGAAGGAACACTGGAACCTGGTCGGACAACCGCTCATAACACACACGTTGGTGGTGGTGGTCCACCGGG  
TACGGAACCGGGGGGGATATACTGGATAAGTCGACCGCAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGT  
ACAAAGTGGTGATATCCCGCGGCCATGCTAGAGTCCGCAAAAATCACCAGTCTCTCTACAAATCTATCTC  
TCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTTCCAGATAAGGGAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCT  
CATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAATAACTTCTATCAATAAAAATTTCTA  
ATTCTAAAACCAAAAATCCAGTGACCTGCAGCATGCGACGTCGGCCCTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGC  
GAATTATCGATCATGAGCGGAGATTAAGGAGTCACGTTATGACCCCGCGATGACGCGGACAGCCGTTTAC  
GTTGGAACCTGACAGAACCGCACGTTGAGAGCMCTGAGCGCGGTTYTGAGTTTATGAGCTAGCACATACG  
TCAGAAACATTATGCCGTCAAAGTCGCTAGTCACTATCAGCTAGCAATATTTCTTGCAAAATGCTCCMTGA  
CGTCATAATCCCTCGAWCATTAAAGTYCWATCACTYTCACYGATCGAGGGATCTACATGATTGACGACCTGC  
GATCCGTACAAGGCAATGCAGCTGCATTGACTATCTGGACAAACGG

Secuencia 4811, oligo YOC-YLEA45R Reverse, colonia 1

CGGCCACACAGTTCAGCGTTCGTCAGCAGGGSATGCACTACGCAGCTGAACTGAGTCATTGCACCACGGC  
AGCTGCCGTTCTTGTACCTCGTGACACTGACTACGRCTGCAGTGCTCAGCGCTACCCGACACATGAGCAG  
CAGACTTCTCAAGTCGCCATGCCGAGCTACGTCCAGAGCGCACCATCTTCTTCAAGACGACGGCACTACAG  
ACCCGCGCCGAGGKGAAGTTCGAGRGCACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA  
AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGC  
CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG  
CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTG  
AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGAC  
CGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGATATCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT  
CCGCGGCCGCCCCCTTACCATGTCAGTCGATGAAAGAAAACAGCTTTCGAATATTGCAGCTTCTGCAAAATCTG  
GCATGGACAAAACCAAAGCTACCTTGGAGGAAAAGGCGGAGAAGATGAAGACACGAGACCCTGTTTCAGA  
AACAGATGGCTACACAGGTTAAAGAAGATAAGATCAATCAAGCTGAGATGCAGAAGAGAGAAACGCGTCA  
GCACAACGCGGCCATGAAAGAAGCGGCTGGAGCCGGAACCGGTTTAGGTTTGGGGACGGCCACTCACTCG  
ACCACTGGACAAGTCGGACACGGCACTGGGACACATCAGATGTGGCTCTGCCTGGTCACGGAACGGGAC  
AACTGACCGACCGGTTGTGGAGGGCACGGCTGTGACCGACCCGATTGGAAGGAACACTGGAACCTGGTGC  
GACAACCGCTCATAACACACACSTTGGTGGTGGTGTGCCACCGGTACGATCGGCCTATCGCT

**Anexo 9. Secuencias obtenidas que muestran la incorporación de la región codificante del gen *AtLEA4-2* al vector *p4-2::ph7Fwg2*; y de la región codificante del gen *AtLEA4-5* al vector *p4-5::pH7FWG2*. En azul claro se muestra la secuencia de las regiones codificantes, en rosa se muestra el codón de inicio, en verde se muestra parte de la secuencia del gen *EGFP*, en gris se muestra parte de la secuencia de los promotores correspondientes.**

❖ Región codificante del gen *AtLEA4-2* en el vector *p4-2::pH7FWG2*

Secuencia 15491, Oligo ORF4-2F Forward, colonia 4

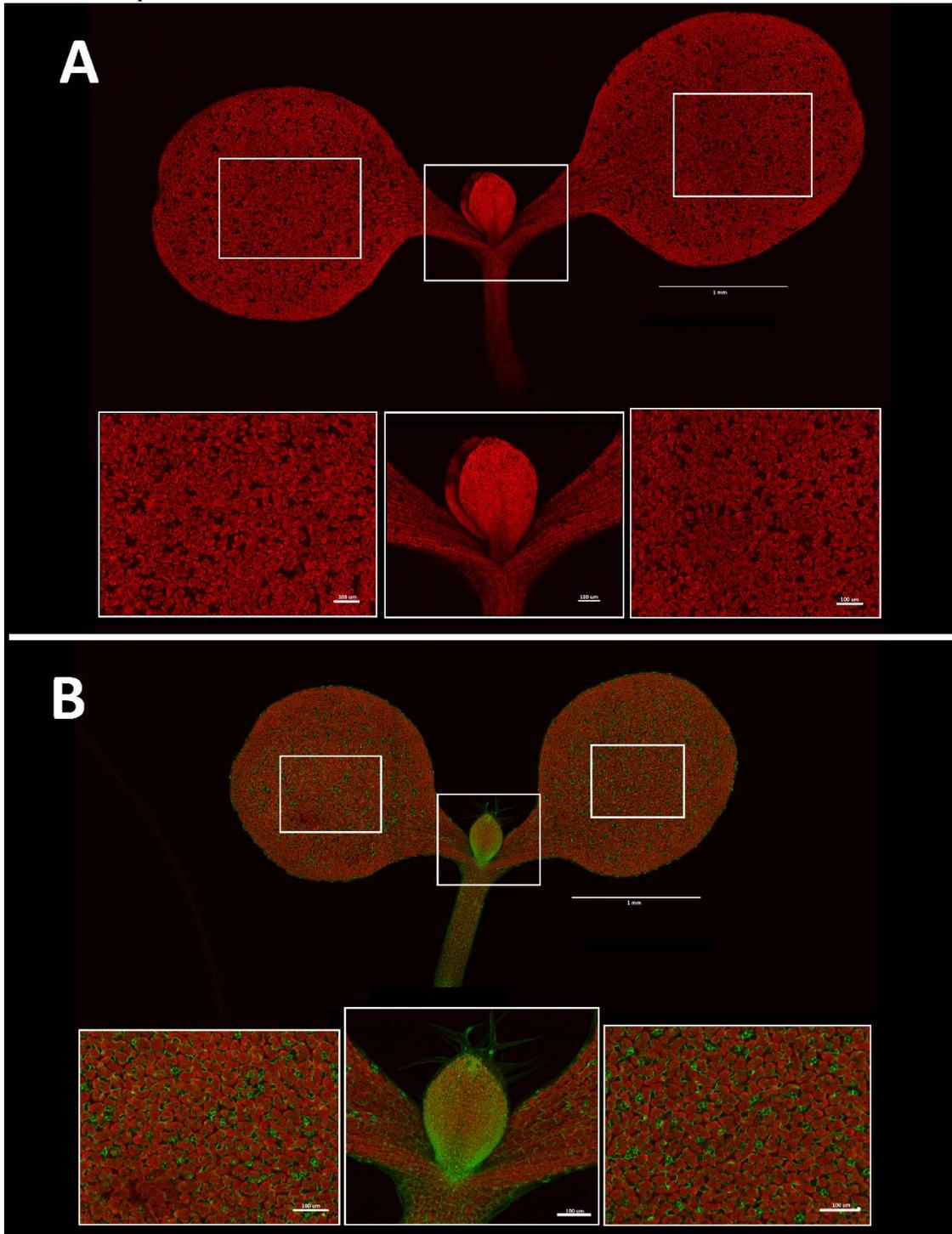
GCAKGCAGTMGGCCAGGAGAACTCAA **CATCGGTGGCGCAAAGGCACAAGGTCATGCGGAGAAGACGATG**  
**GCAAGGACCAAAAAAGAGAAGAAGTTGGCCAAGAGCGAGAGAAGTCTAAGGAGGCGCAGGCCAAAGCT**  
**GACCTCCATCAATCCAAGGCTGAGCATGCTGCGGACGCTCAGGTTACGGCCACCATCTCCCGGTCACTCC**  
**ACCTACCCTACCCGAGCCACCGGAGCTAATTACCCGCCGGGACAGAT** AAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCT  
TTCTTGACAAAGTGGTGATATCA **ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACCGGGTGGTGCCCAAT**  
**CCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGC**  
**CACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGT**  
**GACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAA**  
**GTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGA** GCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC  
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGCATCGACTTCAAGGAG  
GACGGCAACATCCTGGGGCACAGCTGGAGTACACTACAACAGCCACACGTCTATATCATGGCCGACAGCAG  
AAGACGGCATCAAGGTGACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCGACCACT  
ACAGCARAACMCCCYCATCGGCGACGGCCCGGTGCTGCTGCCCGACACACTACTGAGCACCAGTCCGCCTG  
RRCAAAGACCCACGARASCSGATCMATGTCTGCTGAAGTCGTGACCCGCGGATCACTYTCGCATGGACRCT  
GCCAGTACCSGCCATGCTARGTCGAAATCACAGTCTCTCWTCAGCTATCTTCAAGGTGCAATGTGGAGT  
GTCCGATAGGAGTTAGGTCYTTAG

Secuencia 15492, Oligo ORF4-2R Reverse, colonia 4

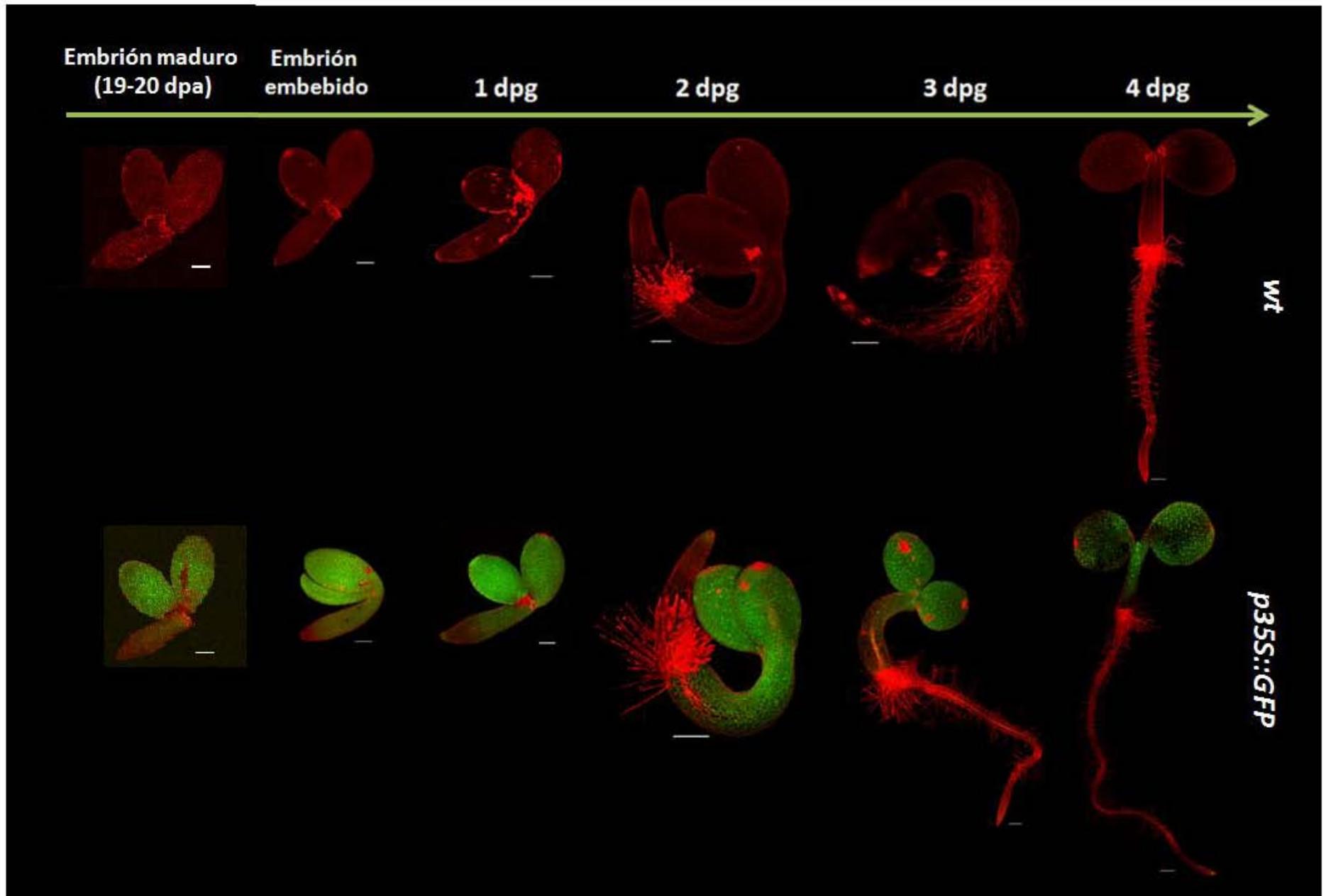
CTGAAATACTTAATTGTATTGGAAGTCMACCACTTTTGTATGAATGCCGGTATAMGCATCGCAWTGTATAAT  
CACACGAGATGTAGAATAGCACMCCCACTAGCTCATCGATAAGACGCGACTAGTAAAACATAGCTCACTCA  
GATCGCAGATGCAGAATATAACCCATGCATATAATATACATTTATATTCATAACTCGGCAAGTCATTTGCTTC  
ATTATACTAGCTAATTATTGACACCAACTTAGGCAATCTATGAAACAATCCCTAATTGTAGATTTTTGGGCAA  
TTTAGCGAAGGAGGGTCAAGGAATCTCTCTCACGTTCCATGCATCTTTTTATGTGACCAGTTGTTTTGGTTA  
AAAAGTAACGAGTTATGGAACACGTACACCGCAAATCCAAAAATGTGTTTAGCCAAATAACATCAACATTT  
TTTTTCAAACGTATAATATTTAGCTTTTTTTTTGTTAAAACAGCTACCTTAAATATTATGTAACACTACCGA  
CAAAAAAATATTATGTAATACTTGAGAATCTGACAAGATAAAGAAAAGAAAAGATAATGCAAAATCAAGA  
AACTATTGTCGTGTTTCGTGTAGATTTGCTTTTGCATGAGCGCAACCCACGTAGATATTCGTAGCTTGTGACAC  
GTATCTACGTATTACACGTGGTGATAACCCAGTAGTCGTTAAATTAGATCGGAGAGCATATAAACCATTAAG  
CCAAATAAGTTTATAGTTTGATAAGAAAAGTAAGAAGAAGAAGAAAGAAAGACTAGTGGTATCTTTCTAGTG  
ATATCAAAAGTTTGACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGCCCTTACCA  
**TG** **CAGTCGGCGAAGGAAAAGATCAGTGACATGGCCAGTACGGCCAAGGAGAAACTCAACATCGGTGGCGC**  
**AAAGGCACAAGGTCATGCGGAGAAGACGATGGCAAGGACCAAAAAAGAGAAGAAGTTGGCCCAAGAGCG**  
**AGAGAAGTCTAAGGAGGCGCAGGCCAAAGCTGACCTCCATCAATCCAAGGCTGAGCATGCTGCGGACGCT**  
**CAGGTTACAGGCC** ACCATCTTCCCGTCACTCCACCTACCCWCCCRGMCCG



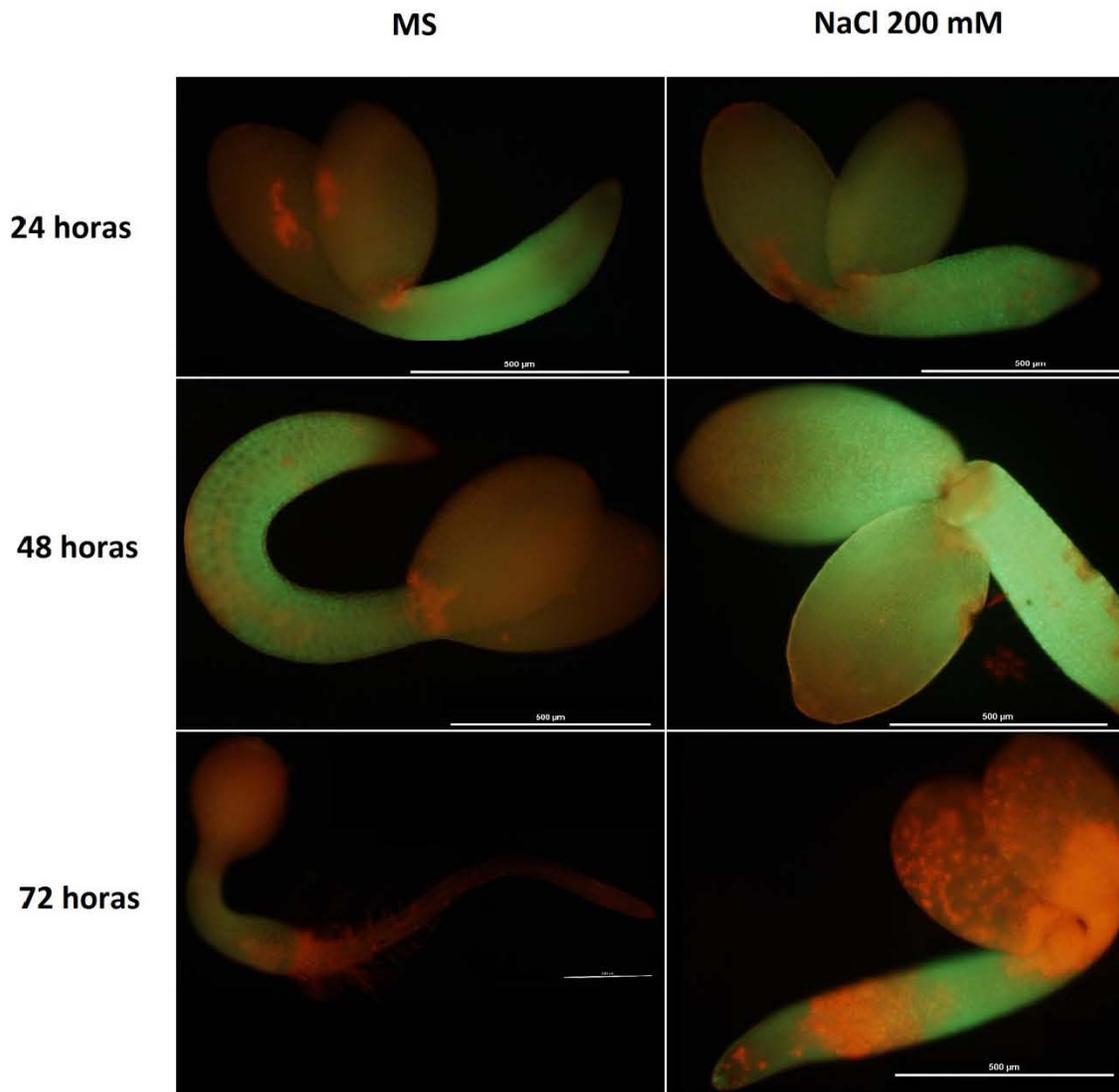
Anexo 10. Reconstrucción de imágenes de la parte aérea de plántulas de 5 dpg *Wt* (A) y *p35S::GFP* (B) crecidas en condiciones óptimas. En los recuadros blancos se muestran acercamientos de algunas zonas. En rojo se muestra la fluorescencia de la clorofila mientras que en verde se muestra la fluorescencia de GFP. Las barras blancas indican la escala, las barras más largas indican 1 mm; las barras pequeñas dentro de los recuadros indican 100  $\mu$ m.



Anexo 11. Reconstrucción de imágenes de las etapas 19-20 dpa, embrión maduro embebido, 1, 2, 3, y 4 dpj de las líneas *Wt* y *p35S::GFP* en condiciones óptimas de crecimiento. En rojo se muestra la señal fluorescente de la tinción con yoduro de propidio y en verde la señal fluorescente de GFP. Las barras blancas indican la escala, 100  $\mu$ m.



Anexo 12. Imágenes de epifluorescencia que muestran la localización de la proteína EGFP-AtLEA4-5 en embriones *p4-5::EGFP-AtLEA4-5* expuestos a NaCl 200 mM durante 24, 48 y 72 horas. Como control se muestra la germinación en condiciones óptimas durante los mismos periodos de exposición.



## Anexo 12. Lista de oligos utilizados para las construcciones y la secuenciación

| Nombre del oligo | secuencia                            |
|------------------|--------------------------------------|
| CPLEA45          | CACCAACTCTTAAGATATCATG               |
| CPLEA45R         | TTTTACCAAATCTCTCTTTTTCC              |
| DMLEA45 F        | CACCATGCAGTCGATGAAAGAAACAGC          |
| ORF4-5F          | ATGCAGTCGATGAAAGAAACAGCTTC           |
| ORF4-5R          | TTATCCAGTATATCCCCGCCGGTTC            |
| CLEA42F          | CACCATGCAGTCGGCGAAGG                 |
| CLEA42R          | TTAGATCTGTCCCGGCCGGG                 |
| PROM4-2 F        | CACCGAGCTCGAGATACTGAAAATTTCAA        |
| PROM4-2 R        | ACCACTAGTCTTCTTTCTTCTTCTTACTTTTC     |
| ORF4-2F          | ATGCAGTCGGCGAAGGAAAAGATC             |
| ORF4-2R          | TTAGATCTGTCCCGGCCGGTAATT             |
| RB-F             | CAAATGGACGAACGGATAAACC               |
| YOC-YLEA45F      | ACACATATGATGCAGTCGATGAAAGAAACAGCTTCG |
| YOC-YLEA45R      | AAAGGATCCTTATCCAGTATCCCCGCCG         |