



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INTRÍNSECAMENTE DESORDENADAS DE
TARDÍGRADOS EN PLANTAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
BRENDA VIRGINIA SÁNCHEZ GUILLÉN**

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. CÉSAR LUIS CUEVAS VELÁZQUEZ**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

1.	Introducción.	1
1.1.	El medio ambiente y su interacción con los seres vivos.	1
1.2.	Anhidrobiosis como método de sobrevivencia.	3
1.3.	Estrés hídrico y respuesta en plantas.	4
1.4.	Cambios morfológicos en plantas causados por déficit hídrico.	5
1.5.	Cambios fisiológicos en plantas causados por déficit hídrico.	6
1.6.	Cambios bioquímicos en plantas causados por déficit hídrico.	7
1.7.	Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía.	8
1.8.	Proteínas intrínsecamente desordenadas.	10
1.9.	Tolerancia a la desecación de los tardígrados.	11
1.10.	Proteína soluble en calor abundante en citoplasma (CAHS).	13
1.11.	Proteína soluble en calor abundante secretada (SAHS).	14
1.12.	Proteína soluble en calor abundante en mitocondria (MAHS).	15
2.	Planteamiento del problema.	18
3.	Hipótesis.	20
4.	Objetivos.	20
4.1.	Objetivo general.	20
4.2.	Objetivos particulares.	20
5.	Materiales y métodos.	21
5.1.	Análisis bioinformáticos.	21
5.2.	Material vegetal y condiciones de crecimiento.	21
5.3.	Obtención de plásmidos que codifican para las proteínas intrínsecamente desordenadas específicas de tardígrados.	22
5.4.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> .	22
5.5.	Transformación en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	23
5.6.	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> por el método de inversión floral.	24
5.7.	Selección de posibles líneas transgénicas.	24
5.8.	Genotipificación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	25
5.9.	Prueba de inserción en el genoma.	25
5.10.	Generaciones variantes de las TDPs fusionadas a la proteína fluorescente mNeonGreen.	27
5.11.	Transformación transitoria de TDPs fusionadas a mNeonGreen en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	29
6.	Resultados.	32
6.1.	Análisis bioinformático de las proteínas CAHS, MAHS y SAHS.	32
6.2.	Obtención de DNA plasmídico con las secuencias que codifican para CAHS, MAHS y SAHS.	36
6.3.	Obtención de líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que sobreexpresión a las proteínas CAHS, MAHS y SAHS.	39
6.4.	Selección de líneas transgénicas.	40
6.5.	Localización subcelular de las proteínas CAHS y SAHS en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	45
7.	Discusión.	56
8.	Conclusiones.	60
9.	Perspectivas.	61
10.	Referencias.	62
11.	Anexos.	67

ABREVIATURAS

CAHS: Proteína soluble en calor abundante en citoplasma (*Cytosolic Abundant Heat Soluble protein*).

IDP: Proteínas intrínsecamente desordenadas (*Intrinsically Disordered Proteins*).

LEA: Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (*Late Embryogenesis Abundant proteins*).

LB: Medio Luria-Bertani.

MAHS: Proteína soluble en calor abundante en mitocondria (*Mitochondrial Abundant Heat Soluble protein*).

MES: Ácido 2-(*N*-morfolino)-etanosulfónico).

MS: Medio Murashige & Skoog.

mNG: Proteína fluorescente mNeonGreen.

TAE: Amortiguador Tris Acetato-EDTA.

TDPs: Proteínas intrínsecamente desordenadas específicas de tardígrados (*Tardigrade Intrinsically Disordered Proteins*).

pb: Pares de bases.

P19: Supresor del silenciamiento génico postranscripcional – P19.

SAHS: Proteína soluble en calor abundante secretada (*Secreted Abundant Heat Soluble*).

FABP: Proteínas de unión a ácidos graso.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este proyecto se realizó con el apoyo del Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM Clave IA203422. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el donativo de Ciencia de Frontera CONACYT con la clave CF-2019/252952 al Dr. César Luis Cuevas Velázquez.

Este material está basado en trabajo realizado gracias al financiamiento del University of California Institute for Mexico and the United States (UC MEXUS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT). Proyecto CN-20-113 titulado “Sensibilidad al ambiente de proteínas intrínsecamente desordenadas de plantas inducidas por deshidratación”.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP) de la facultad de Química con la clave 5000-9182 al Dr. César Luis Cuevas Velázquez.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. César Luis Cuevas Velázquez.

Al Dr. César Luis Cuevas Velázquez, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en su grupo de investigación. Por su tutela en la realización de este proyecto, por su entusiasmo y goce que le caracteriza en el quehacer de la ciencia.

Al Dr. Thomas C. Boothby de la Universidad de Wyoming por proporcionar los plásmidos con los que se realizó el trabajo de esta tesis.

A la M. en C. Itzel Meneses Reyes. Gracias por su tutela al llevar a cabo este trabajo de tesis, por su ayuda, comprensión y paciencia que tuvo en enseñarme.

A todos los miembros del grupo del Dr. César Luis Cuevas Velázquez por su apoyo, consejos, ayuda, retroalimentación, por enseñarme que la ciencia es un trabajo en equipo.

Al comité de revisión de tesis Dra. Sánchez Nieto Sobeida, Dra. Coello Coutiño Martha Patricia, Dra. Lara Nuñez Aurora y Dr. Gutierrez Aguilar Manuel agradezco el tiempo dedicado a la revisión y contribuciones de esta tesis.

A la Facultad de Química, Departamento de Bioquímica, Conjunto E de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades.

A mi esposo Cesar A, Contreras quien me ha amado y apoyado incondicionalmente durante todo el proceso de esta tesis y todo el tiempo.

RESUMEN

Los seres vivos se enfrentan a condiciones adversas y cuentan con mecanismos que les permiten responder e incluso tolerar dichas condiciones. Los tardígrados son animales capaces de sobrevivir a diferentes condiciones adversas, como la desecación, a través de la acumulación de “proteínas intrínsecamente desordenadas específicas de tardígrados” (TDP, *Tardigrade Disordered Proteins*). El nivel de expresión de diferentes TDPs difiere entre especies de tardígrados y está asociado con el precondicionamiento a la desecación que necesitan algunas especies (Boothby et al. 2021).

Las TDPs que muestran una alta acumulación en condiciones de desecación son la proteína soluble en calor abundante en citoplasma (CAHS, *Cytosolic Abundant Heat Soluble protein*), la proteína soluble en calor abundante secretada (SAHS, *Secreted Abundant Heat Soluble protein*) y la proteína soluble en calor abundante en mitocondria (MAHS, *Mitochondrial Abundant Heat Soluble protein*). Las TDPs son necesarias para la tolerancia a la desecación de los tardígrados y son suficientes para conferir resistencia a la desecación cuando se expresan en levaduras y bacterias (Boothby et al, 2017).

Con el objetivo de estudiar si la expresión heteróloga de TDPs confiere resistencia a condiciones de desecación y/o deshidratación en plantas, en este trabajo se generaron líneas transgénicas que expresan cada una de las TDP mencionadas anteriormente, específicamente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Las TDPs que se expresaron en planta fueron las proteínas; CAHS_D, SAHS 33020 y MAHS. Además, se realizó el análisis bioinformático de las proteínas CAHS, MAHS y SAHS, utilizando herramientas bioinformáticas como PONDR, METAPREDIC, AGADIR, AlphaFold2 y CIDER. Se encontró que las proteínas CAHS y MAHS mostraron porcentajes altos de desorden, mientras que la proteína SAHS mostró un porcentaje de desorden bajo.

Para determinar si las proteínas CAHS, MAHS y SAHS son capaces de expresarse en tejido vegetal y saber su localización intracelular, se realizó la clonación

de las tres TDPs con la proteína fluorescente mNeonGreen (mNG) en el plásmido pGPTVII (plásmido binario de plantas). Los plásmidos se utilizaron para realizar la expresión transitoria en la planta *N. benthamiana*. La proteína SAHS se localiza en el espacio extracelular en células, mientras que la proteína CAHS se localiza en citoplasma de la epidermis de hojas de *N. benthamiana*. La proteína MAHS no se expresó en células de *N. benthamiana*.

El trabajo generado en esta tesis contribuirá a determinar si la expresión heteróloga de TDPs confiere tolerancia a la desecación en organismos multicelulares como las plantas, lo cual podría tener implicaciones en el campo de la biotecnología vegetal. La generación de plantas tolerantes a la desecación en tejidos vegetativos constituye una estrategia innovadora enfocada en mitigar los efectos del cambio climático.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El medio ambiente y su interacción con los seres vivos

El medio ambiente es la suma de los componentes vivos y los componentes abióticos que rodean a un organismo. Comprende componentes físicos, tales como aire, temperatura, relieve, suelos, cuerpos de agua, así como componentes vivos, como plantas, animales y microorganismos (Zavala, 2008).

Los elementos dentro de un medio ambiente no existen de forma aislada, sino que son parte de un sistema de procesos que los vinculan entre sí. Es decir, el medio ambiente es un complejo dinámico de propiedades que, además de tener su propia dinámica natural, se entrelazan con las conductas del hombre (Zavala, 2008). El medio ambiente afecta el crecimiento de los seres vivos. Los factores ambientales que afectan a los seres vivos incluyen la luz, la temperatura, el agua y disponibilidad de nutrientes (Van Der, 2008). Por otro lado, las condiciones cambiantes dentro de un ecosistema provocan eventos naturales extremos, o desastres naturales. A veces un evento extremo ocurre como resultado de un cambio lento a través de un largo periodo de tiempo (Zavala, 2008).

La degradación ambiental expone a los ecosistemas a un daño mayor frente a huracanes, maremotos, inundaciones, desecación, u otros fenómenos extremos. La degradación del medio ambiente, provocado por la actividad humana, ha contribuido a un incremento de la frecuencia e intensidad de los desastres de origen natural (Zavala, 2008). La actividad humana ha acelerado el cambio climático. El medio ambiente es afectado por el cambio climático. Este último provocado por la liberación antropogénica de dióxido de carbono y otros gases (VanDer, 2008). El factor climático representa la

mayor cantidad de variación en la estructura y función de los ecosistemas a nivel mundial. Se predice que las temperaturas globales podrían seguir aumentando durante las próximas décadas (Shaftel et al, 2022).

El cambio climático posee un carácter regional, el cual ocasiona que los efectos de este fenómeno sobre los sistemas de producción agrícola sean diversos. El incremento de la temperatura o la precipitación causan diversas combinaciones que alteran de diferente manera el agroclima para cultivos (Ruiz et al, 2016). Debido a la combinación de un aumento de las temperaturas y de un descenso de la precipitación provoca una disminución de los recursos hídricos disponibles para los seres vivos (Ayala, 2022).

La degradación del suelo representa el cambio en la salud del mismo. Implica la reducción de su complejidad biológica, de su capacidad para producir bienes económicos y de llevar a cabo funciones de regulación directamente relacionadas con el bienestar humano, siendo quizá las más importantes la producción de alimentos y la captación de agua. En el caso de los recursos hídricos, la superficie afectada a nivel nacional asciende a 64.8 % del territorio (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2016).

Aunque el déficit hídrico afecta gravemente al ambiente, algunos organismos cuentan con mecanismos para enfrentar estas condiciones adversas. Numerosos organismos son capaces de sobrevivir a una deshidratación esencialmente completa, incluso cuando se elimina más del 99 % del agua de su cuerpo, lo que da como resultado tejidos secos pero viables que contienen tan solo un 0.1 % de contenido de agua. A la capacidad de sobrevivir a la desecación se le conoce como anhidrobiosis (Boothby et al, 2021).

1.2 Anhidrobiosis como método de sobrevivencia

El ambiente extremo es aquel donde las condiciones fisicoquímicas difieren ampliamente de las requeridas para vivir. A través de la evolución, los organismos han desarrollado mecanismos eficaces de protección celular y molecular para poder adaptarse a ambientes extremos. Tal es el caso de los organismos anhidrobióticos, los cuales son capaces de sobrevivir a periodos de desecación mediante un fenómeno llamado anhidrobiosis (Vázquez, 2019).

La anhidrobiosis es la capacidad de sobrevivir a una pérdida casi total de agua. Puede ser una etapa normal de la vida de un organismo, como en el caso de las semillas de plantas, o puede ser una respuesta al ambiente (Boothby et al, 2017). Otros organismos sometidos a la desecación presentan un daño en sus orgánulos y membranas, como ocurre en la mayoría de los animales los cuales pueden llegar a morir si pierden más de un 15 % al 20 % de agua, lo mismo ocurre para la mayoría de las plantas superiores las cuales pueden morir si pierden del 20 % al 50 % de su contenido de agua (Vázquez, 2019).

Los animales que son capaces de realizar anhidrobiosis se pueden encontrar en todos los dominios de la vida. En bacterias predominan las bacterias gram positivas. En el caso de las eucariotas podemos encontrar hongos como *Saccharomyces* spp, o plantas como las briófitas. El polen y las semillas de angiospermas toleran la desecación. Además, entre las plantas existe un fenómeno peculiar en el caso de las plantas de resurrección, en las que incluso las hojas y raíces toleran la desecación. Se han descrito aproximadamente 300 de estas especies. Entre los animales, ningún vertebrado es capaz de experimentar anhidrobiosis. En el caso de los invertebrados, la tolerancia a la desecación es común en tres tipos: nematodos, rotíferos y tardígrados. Además, se ha observado el estado de anhidrobiosis en embriones de algunos crustáceos y larvas de insectos (Grzyb y Skłodowska, 2022).

La mayoría de los organismos que experimentan anhidrobiosis presentan estrategias para la deshidratación lenta, es decir que necesitan un primer periodo de pérdida de agua, de forma gradual. Otros organismos son capaces de pasar de un estado completamente hidratado a un estado de desecación total en cortos periodos de tiempo. En esta tolerancia a la desecación existe la expresión constitutiva de moléculas protectoras (Vázquez, 2019).

Muchos organismos capaces de realizar anhidrobiosis acumulan intracelularmente, durante el proceso de desecación, azúcares no reductores como la sacarosa en las plantas o la trehalosa en otros organismos. A su vez, muchos organismos que presentan anhidrobiosis, como los tardígrados y los rotíferos, no acumulan (o acumulan a niveles despreciables) estos azúcares en respuesta a la desecación. Estos animales utilizan diferentes proteínas intrínsecamente desordenadas para brindar protección adaptativa contra la desecación (Boothby et al, 2017).

1.3 Estrés hídrico y respuesta en plantas.

En las plantas, el agua constituye del 80 al 95 % de la masa de los tejidos en crecimiento y desempeña varias funciones. El agua permite el movimiento de moléculas dentro y entre las células. Debido a sus propiedades polares, el agua influye en la estructura y la estabilidad de moléculas tales como proteínas, polisacáridos, entre otras. Además, la integridad de la pared celular depende de la cantidad de agua disponible (Ramos et al, 2003).

La regulación de la osmolaridad, la tensión de la membrana y la presión hidrostática es crítica para el funcionamiento celular. Procesos como el crecimiento, proliferación, exocitosis, endocitosis, cambios en la forma celular, señalización de hormonas, metabolismo, excitabilidad, migración celular, obtención de nutrientes, filtración de desechos, exocitosis y apoptosis dependen del agua. En consecuencia, la

cantidad limitada o excesiva de agua es un factor inductor de situaciones estresantes (Ramos et al, 2003).

Las plantas son organismos sésiles, provocando que se encuentren constantemente expuestas a condiciones adversas que afectan su desarrollo (Zúñiga et al, 2012). Las plantas tienen diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir a condiciones adversas. Muchas de estas adaptaciones están relacionadas con una mayor capacidad de absorber agua o con un uso más eficiente de este recurso (Pereyra y Quiriban, 2014).

En el futuro, debido a cambios climáticos, muchas tierras agrícolas se verán afectadas por periodos prolongados de sequía (Osakabe et al, 2014). En muchas plantas, la falta de agua en el sustrato provoca daños significativos que pueden ocasionar su muerte (Zúñiga et al, 2012). Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, algunas plantas pueden presentar respuestas a nivel fisiológico, celular y molecular. Estas respuestas tienen efecto sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular. Un mecanismo a nivel fisiológico es el cierre de los estomas, respuesta mediada por el ácido abscísico (ABA) (Pereyra y Quiriban, 2014). La disminución de la apertura de los estomas produce la regulación a la baja de la fotosíntesis y la reducción de la disponibilidad de CO₂ (Kaur et al, 2021).

Una de las principales respuestas de la baja disponibilidad de agua a nivel molecular es la modificación de la expresión genética. Los genes inducidos por estrés hídrico incluyen genes que codifican para proteínas con funciones estructurales o enzimas, proteínas reguladoras y algunas proteínas con funciones desconocidas (Pereyra y Quiriban, 2014).

1.4 Cambios morfológicos en plantas causados por déficit hídrico

La privación de agua es un factor limitante para el crecimiento de la planta, afectando su elongación, aumentando su crecimiento radicular y la división celular. El marchitamiento, el amarillamiento, la etiolación, la caída prematura de las hojas y el crecimiento atrofiado son las primeras respuestas visibles de las condiciones de déficit hídrico. Posteriormente, si el déficit hídrico es extremo o muy largo, la planta usualmente muere. Rasgos morfológicos como la altura de la planta, el área foliar, la biomasa, el potencial de crecimiento de raíces, la tasa de germinación de semillas, la emergencia de la plántula, el crecimiento del hipocótilo y el crecimiento vegetativo se reducen significativamente bajo estrés por sequía (Kaur et al, 2021). El crecimiento celular se suprime debido a la pérdida de turgencia de las células en condiciones limitantes de agua, reduciendo el número de hojas y el área de la superficie de las hojas. También perjudica las etapas de floración de las plantas, generando esterilidad. Algunas plantas acortan el periodo vegetativo de crecimiento y presentan floración temprana para adaptarse a la sequía (Kaur et al, 2021).

1.5 Cambios fisiológicos en plantas causados por déficit hídrico.

Los procesos fisiológicos como el ajuste osmótico, la fotosíntesis, el intercambio iónico, la transpiración, la transferencia de solutos, las reacciones metabólicas, la respiración y la generación de ATP contribuyen al crecimiento de la planta. La integridad y la estabilidad de las membranas celulares se alteran bajo condiciones de déficit hídrico, causando lesión celular a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y el aumento de la temperatura celular que da como resultado el aumento de la viscosidad celular, la desnaturalización de proteínas, la agregación y alteración de las interacciones entre proteínas. La acumulación excesiva de solutos

conduce a la toxicidad celular y al mal funcionamiento de las enzimas, lo que da como resultado una reducción de la tasa fotosintética y la eficiencia del uso del agua (Kaur et al, 2021).

El estrés oxidativo (EO) es una situación de desequilibrio que puede ser el resultado de la disminución de los antioxidantes o del aumento en la producción de ROs. Cuando existe EO se produce la activación o silenciamiento de genes que codifican para proteínas que participan en mecanismos de defensa, factores de transcripción y proteínas estructurales. Las plantas tienen estrategias antioxidantes para eliminar estos compuestos tóxicos; adaptaciones anatómicas, desarrollo de epidermis refractaria, moléculas antioxidantes, enzimas y otros sistemas más complejos (Pereyra y Quiriban, 2014).

Los mecanismos de detoxificación de ROs incluyen la activación de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX), la peroxidasa (POD), la glutatión reductasa (GR) y el monodehidroascorbato reductasa (MDAR) (Pereyra y Quiriban, 2014).

1.6 Cambios bioquímicos en plantas causados por déficit hídrico

El estrés hídrico altera el metabolismo y los procesos bioquímicos de las plantas. Un mecanismo adaptativo para la protección es el mantenimiento de la turgencia celular regulando la presión osmótica de las células. La célula secuestra iones en los compartimentos celulares y sintetiza osmolitos especializados (Pereyra y Quiriban, 2014). Las plantas incrementan la expresión de osmoprotectores como la prolina, los polioles, la trehalosa y la glicina betaína, regulan el ajuste osmótico, protegen contra ROS, previene la lesión de las membranas celulares y estabilizan enzimas y proteínas. Además, las plantas regulan la homeostasis de nutrientes como mecanismo de defensa (Kaur et al, 2021). Los osmolitos también participan en el mantenimiento de la estructura

de las proteínas bajo condiciones de estrés. El aminoácido prolina y los azúcares como la trehalosa cubren las moléculas de proteínas excluyendo los solutos de su superficie y reduciendo el desplegamiento. Durante la desecación extrema, las plantas tolerantes sintetizan grandes cantidades de disacáridos no reductores, tales como trehalosa, que puede sustituir al agua en los requerimientos de puentes de hidrógeno con los residuos de aminoácidos polares en la superficie de la proteína y así mantener su estructura nativa (Kaur et al, 2021).

En respuesta a un estrés por déficit de agua, los sistemas de transporte de iones y agua a través de las membranas funcionan para controlar los cambios de presión de turgencia en las células protectoras y estimular el cierre de los estomas. ABA endógeno se produce rápidamente durante la sequía, lo que desencadena una cascada de respuestas fisiológicas, incluido el cierre de estomas, que está regulado por una red de transducción de señales. En respuesta al estrés por sequía, ABA estimula una vía de señalización que desencadena la producción de ROS, que a su vez induce un aumento en la concentración del ión Ca^{2+} citosólico (Osakabe et al, 2014).

Las proteínas de estrés como las dehidrinas, las acuaporinas y las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA, *Late Embryogenesis Abundant*) imparten tolerancia a la sequía en las plantas al regular el equilibrio hídrico y diferentes vías de señalización para iniciar el mecanismo de resistencia (Osakabe et al, 2014).

1.7 Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía.

Las proteínas LEA son parte de un grupo más amplio conocido como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, *Intrinsically Disordered Proteins*). Son unas de las proteínas más importantes por su efecto protector. Estas proteínas protegen a las proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación (Pereyra y Quiriban, 2014).

Las proteínas LEA se acumulan en niveles elevados durante la última etapa de maduración de la semilla y durante el déficit hídrico en los órganos vegetativo, sugiriendo un papel protector durante la limitación de agua (Battaglia et al, 2008). Estas son proteínas no estructuradas o flexibles que participan en la respuesta a condiciones adversas (Cuevas y Covarrubias, 2011).

Las proteínas LEA son ubicuas en el reino vegetal. Su presencia ha sido confirmada no sólo en angiospermas y gimnospermas sino también en plantas vasculares sin semillas e incluso en briofitas, pteridofitas y algas (Battaglia et al, 2008). La mayoría de las proteínas LEA muestran alta hidrofiliidad, alto contenido de aminoácidos pequeños y ausencia de residuos hidrofóbicos (Cuevas et al, 2016). Con base en su similitud de secuencia, las proteínas LEA se han clasificado en siete grupos o familias, cada uno caracterizado por la presencia de motivos de secuencia específicos (Battaglia et al, 2008).

Las proteínas LEA son capaces de preservar la actividad de enzimas como la citrato sintasa y la lactato deshidrogenasa después de la desecación o congelación (Dirk et al, 2012). Además, tienen fuertes efectos protectores sinérgicos con la trehalosa y pueden realizar blindaje molecular y/o secuestro de iones (Tanaka et al, 2022).

Las proteínas LEA del grupo 4 se encuentran desordenadas en solución acuosa *in vitro*, pero adquieren estructura tipo alfa hélice después del secado completo, sugiriendo que forman este tipo de estructura en las semillas secas. Además, las proteínas LEA del grupo 4 se caracterizan por una región N-terminal que contiene motivos de secuencia de aminoácidos conservados, la cual es necesaria y suficiente para las transiciones conformacionales y que es quién proporciona (Cuevas et al, 2016). Las proteínas de este grupo se encontraron originalmente altamente acumuladas en embriones secos, pero también se acumulan en las hojas y otros tejidos vegetativos bajo condiciones de déficit hídrico (Cuevas et al, 2016).

1.8 Proteínas intrínsecamente desordenadas

Las IDP difieren de las proteínas ordenadas en varios aspectos, a nivel estructural, funcional y conformacional (Uversky, 2009). Las IDP carecen total o parcialmente de una estructura tridimensional fija y estable (Cuevas et al, 2011). Las IDPs son proteínas que presentan baja complejidad con nula o baja abundancia de aminoácidos hidrofóbicos y/o voluminosos (Val, Ile, Met, Phe, Trp y Tyr). Poseen una alta proporción de aminoácidos cargados o polares (Gln, Ser, Pro, Lys y Arg) y en algunos casos tienen una alta abundancia de aminoácidos pequeños (Gly, Ala).

Las IDPs pueden presentar una alta sensibilidad estructural al ambiente. Las IDPs pueden plegarse a conformaciones tipo hélice alfa en respuesta a cambios en el ambiente fisicoquímico, o a la interacción con otras proteínas. Este comportamiento es desencadenado por dos componentes; la presencia de elementos de interacción o el ambiente (Uversky y Dunker, 2010). Las IDPs poseen un área superficial extendida, siendo altamente expuestas a los cambios en las condiciones del ambiente, como la osmolaridad, el pH y el hacinamiento macromolecular, lo que induce cambios conformacionales (Uversky 2009).

Las IDPs son proteínas fundamentales para el adecuado funcionamiento de las funciones celulares basales. Además, participan en la respuesta a distintos estímulos desfavorables (Cuevas et al, 2011). Las IDPs cuentan con diferentes funciones, entre las que destacan la regulación de la transcripción y traducción, almacenamiento de moléculas pequeñas, autoensamblaje de complejos multiproteicos, tolerancia a la desecación, entre otros (Uversky 2017).

1.9 Tolerancia a la desecación de los Tardígrados

El filo Tardigrada pertenece al linaje Panarthropoda. El filo comprende alrededor de 1,200 especies, y se divide en dos clases; Heterotardigrada y Eutardigrada. Los miembros de Eutardigrada tienen una cutícula desnuda o lisa sin placas, mientras que los Heterotardigrada tienen una cutícula acorazada con placas (Britannica, Editors of Encyclopedia, 2022). Los tardígrados, son micrometazoos hidrófilos con un cuerpo bilateralmente simétrico y cuatro pares de patas. El cuerpo se divide en tres secciones; la cabeza (cefálica), tres regiones del tronco (cada una con un par de patas) y la región caudal (con el cuarto par de patas dirigido hacia atrás) (Guidetti, 2022). Los osos de agua miden en su mayoría 1mm o menos. Viven en una serie de hábitats en todo el mundo (Randolph, 2022).

Los tardígrados están presentes en todos los ambientes marinos, desde la costa hasta las profundidades abisales, en todos los continentes, desde altitudes altas a bajas, en todas las latitudes, de norte a sur, y en ambientes que van desde acuáticos hasta desiertos áridos, hielo congelado, pasando por climas templados y cálidos (Guidetti et al, 2022). Las especies terrestres viven en la humedad interior de musgos, líquenes, hojarasca y suelo; otras especies se encuentran en agua dulce o salada (Britannica. Editors of Encyclopedia, 2022).

Los tardígrados constituyen un filo de animales pequeños, pero extremadamente robustos, reconocidos por su capacidad para sobrevivir a diferentes tipos de estrés, incluida la desecación (Chavez et al, 2019). Son capaces de sobrevivir a la desecación en una “etapa de reposo”, permitiendo que sobrevivan en condiciones extremas. Los estados de reposo abarcan una amplia gama de estrategias de latencia; diapausa (enquistamiento) y criptobiosis. Los tardígrados que realizan criptobiosis son capaces de resistir la desecación (anhidrobiosis) y la congelación (criobiosis) en cualquier etapa de

su ciclo de vida, suspendiendo su metabolismo por completo. Cuando las condiciones ambientales son favorables, restablecen su actividad metabólica (Guidetti et al, 2022). En condiciones de deshidratación, los tardígrados contraen sus cuerpos en una forma redonda encogida llamada *tun*. Los tardígrados deshidratados son excepcionalmente estables. Incluso después de la exposición a factores estresantes extremos, los tardígrados pueden reanimarse unas pocas docenas de minutos después de la rehidratación (Tanaka et al, 2022).

La trehalosa y las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) se han estudiado ampliamente como potentes protectores contra la deshidratación en otros organismos anhidrobióticos sin embargo, los tardígrados producen grandes cantidades de proteínas protectoras exclusivas de estos organismos (Tanaka et al, 2022). En condiciones de desecación, las proteínas desordenadas específicas de tardígrados (TDP, *Tardigrade Disordered Proteins*) son inducidos en el tardígrado *H. dujardini* y desempeñan un papel en la tolerancia al estrés hídrico (Boothby et al, 2017).

Los tardígrados presentan tres tipos de TDPs: proteína soluble en calor abundante en mitocondria (MAHS), proteína soluble en calor abundante secretada (SAHS) y proteína soluble en calor abundante en citoplasma (CAHS). El nivel de expresión de diferentes TDPs difiere entre especies de tardígrados y está asociado con el preacondicionamiento a la desecación que necesitan. Las especies *H. dujardini* y *P. richtersi*, requieren un preacondicionamiento extenso a la desecación y estas especies aumentan la expresión de TDPs tras la preaclimatación. Mientras que los tardígrados que requieren poco preacondicionamiento, como *M. tardigradum*, no muestra un aumento en la expresión de TDPs, pero se expresan constitutivamente a niveles altos (Boothby et al, 2017).

La proteína que más se enriquece durante la desecación, en *H. dujardini*, es CAHS. Previamente, diferentes genes que codifican para las proteínas CAHS se han

expresado en levaduras y bacterias, y algunas de ellas han sido capaces de conferir resistencia a condiciones de desecación (Boothby et al, 2017).

Los TDP expresados en altos niveles en el secado de tardigrado son esenciales para que los tardígrados sobrevivan a la desecación. Thomas Boothby y colaboradores (2017) interrumpieron la función de TDP altamente inducidas (CAHS y SAHS) mediante RNAi específicos y probaron la capacidad de *H. dujarini* para sobrevivir en condiciones secas. Cuatro genes *CAHS* altamente inducidos (de 13 a 22 veces) y un gen de *SAHS* inducido (5 veces) mostraron ser esenciales para la sobrevivencia a la desecación (Boothby et al, 2017).

1.10 Proteína soluble en calor abundante en citoplasma (CAHS).

En tardígrados extremadamente tolerantes, se han identificado familias de proteínas altamente hidrofílicas y solubles en calor, entre las que destacan las proteínas solubles en calor abundantes citoplasma, que son partes integrales de la respuesta de los tardígrados a la desecación (Yagi et al, 2021).

La proteína CAHS D es una proteína intrínsecamente desordenada perteneciente a las TDPs, la cual experimenta transición de fase soluble-gel, pasando de un estado líquido a un estado sólido similar a un gel, la cual es reversible y depende de la concentración (Boothby et al, 2021). La gelificación de CAHS D está impulsada por interacciones intermoleculares beta-beta. Gracias a que los extremos N y C de la proteína forman regiones relativamente colapsadas separadas por una región enlazadora extendida y altamente cargada (LR, *Linker Region*). Además, se observan hélices transitorias metaestables en toda la región LR, mientras que se observan hojas beta transitorias en las regiones N- y C-terminales (Boothby et al, 2021). La protección está basada en el movimiento molecular lento que reduce la frecuencia y la velocidad de los procesos dañinos. Se propone que ocurre a través de una alta viscosidad en el

sistema, ralentizando la difusión, el movimiento molecular y los procesos biológicos se detienen en esencialmente, lo que evita una mayor degradación del sistema (Boothby et al, 2021).

La gelificación de CAHS D promueve la ralentización de la difusión y la coordinación del agua residual. Además, proporciona una estabilización robusta de la enzima lactato deshidrogenasa ante tratamientos de desecación y rehidratación. También brinda protección contra la desecación cuando se expresa heterológicamente en levaduras y bacterias (Boothby et al, 2021). Por otro lado, se ha observado que la proteína CASH 1, una isoforma de las proteínas CAHS de *Ramazzottius varieornatus*, también se homooligomeriza y forman una transición de solución-gel a medida que aumentaba su concentración (Yagi et al, 2021).

1.11 Proteína soluble en calor abundante secretada (SAHS).

La proteína soluble en calor abundante secretada (SAHS, *Secretory Abundant Heat Soluble*) es una proteína intrínsecamente desordenada específica de tardígrados. Esta proteína confiere tolerancia a la desecación al formar sólidos amorfos no cristalinos tras la desecación en *Ramazzottius varieornatus*. Se cree que las proteínas SAHS protegen los componentes extracelulares y orgánulos (Fukuda, e Inoue, 2018)

A diferencia de las otras TDPs, las proteínas SAHS tienen regiones intrínsecamente desordenadas mucho menores, lo que hace que los dominios de proteínas SAHS sean susceptibles a cristalización (Hesgrove y Boothby, 2020). Además, las proteínas SAHS tienen una estructura de barril β , voluminasas e hidrofílicas que se asemeja a las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) (Fukuda, e Inoue, 2018). Una proteína SAHS llamada RvSAHS1 se une a los ácidos grasos pequeños, pero los residuos voluminosos presentes en sus dos sitios de unión al ligando (LBS1 y LBS2) evitan que esta proteína se una a los fosfolípidos de membrana. El tamaño de los sitios

de unión al ligando y sus cargas implican diversidad en la capacidad de unión y especificidad dentro de la familia de proteínas SAHS. Dado que las FABP son capaces de unirse a una amplia gama de moléculas más allá de los ácidos grasos, la búsqueda de posibles blancos de unión para una proteína SAHS podría ser cualquier número de moléculas presentes en la vía secretora o espacio extracelular (Hesgrove y Boothby, 2020). Además, una proteína SAHS del tardígrado *R. variornatus* (Rv SAHSS1) se secreta al medio de cultivo cuando se expresan en células humanas, por lo que se propone que las proteínas SAHS protegen a los componentes extracelulares y/o los orgánulos secretores en la anhidrobiosis (Fukuda, e Inoue, 2018).

1.12 Proteína soluble en calor abundante en mitocondria (MAHS).

La familia de proteínas solubles en calor abundantes en la mitocondria de TDPs protege a las mitocondrias del daño a la desecación y uno de los daños es la oxidación de sus lípidos. Las mitocondrias y los peroxisomas son responsables de crear y eliminar ROS, durante el metabolismo celular. Si no se controlan, las ROS pueden causar daños severos a la célula (Hesgrove y Boothby, 2020). La capacidad de mantener o restaurar la fluidez de la membrana mitocondrial es fundamental para mantener la integridad de la membrana en respuesta al estrés osmótico. Las membranas pueden constar de diferentes fases, siendo las más importantes la fase de cristal líquido laminar y la fase de gel laminar. La fase de cristal líquido laminar tiene una mayor fluidez de membrana, un espesor de membrana reducido y cabezas menos compactas. La fase de gel es lo contrario: las membranas son menos fluidas, más gruesas y consisten en cabezas de fosfolípidos muy compactas. En la deshidratación, el cambio de volumen que se produce cuando se pierde agua, los lípidos de la membrana en fase de gel se adhieren fuertemente, aunque la composición de la membrana no cambia. Cuando se rehidrata la membrana deshidratada, la transición de la fase de gel a la fase cristalina líquida en la

membrana no se produce de manera uniforme; algunas regiones quedan atrapadas en la fase de gel, mientras que otras se extienden hasta la fase de cristal líquido. Debido a esta transición de fase desigual, la membrana no puede expandirse para acomodar un gran volumen de agua durante la rehidratación, lo que eventualmente conduce a la formación de poros temporales en la membrana. Para mantener la integridad de la membrana, debe mantenerse un espacio adecuado entre las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana. El grosor exacto de la membrana y el espacio necesario entre los grupos de cabeza de fosfolípidos están determinados por la composición de la membrana (Hesgrove y Boothby, 2020).

Dado que las proteínas de la familia MAHS se localizan en las mitocondrias, pueden desempeñar un papel en la preparación de las mitocondrias para la desecación al reducir la capacidad de las mitocondrias para producción de ROS dañinas. Además, dado que las mitocondrias en los tardígrados rehidratados están intactas, las proteínas MAHS también pueden desempeñar un papel en la remodelación estructural de la membrana y en el mantenimiento de la integridad de la membrana (Hesgrove y Boothby, 2020).

Las proteínas de la familia MAHS pueden proteger la membrana de la mitocondria a través de mantener el espacio adecuado entre los grupos de cabeza de fosfolípidos. El mecanismo por el que lo hacen puede ser similar al de las proteínas LEA del grupo 3. Las proteínas LEA del grupo 3, que preservan la integridad de la membrana, experimentan una transición estructural tras la desecación a hélices alfa. Estas hélices tienen una composición particular de residuos cargados y no cargados en la hélice, que les permite intercalarse entre los grupos de la cabeza de fosfolípidos, manteniendo así el espacio adecuado entre los grupos de cabeza. La proteína LEA mitocondrial *PsLEAM* se pliega de tal manera que la hélice que se forma tiene residuos cargados negativamente a lo largo de la cara inferior de la hélice, con residuos no polares orientados opuestamente a las cargas negativas a lo largo de la cara superior de la

hélice. La cara cargada negativamente de la hélice se orienta hacia el citoplasma, mientras que las cargadas positivas se colocan entre los grupos de cabeza de fosfolípidos cargados negativamente de los fosfolípidos de membrana adyacentes. Las proteínas de la familia MAHS muestran arreglos similares de residuos cargados y no cargados, lo que indica que pueden seguir un mecanismo similar de formación helicoidal que podría permitir la asociación de membrana y la estabilización de las mismas (Hesgrove y Boothby, 2020).

La expresión constitutiva de proteínas individuales de la familia MAHS en células humanas mejoró la tolerancia hiperosmótica, en comparación con las células que no expresan proteínas MAHS (Tanaka et al, 2015).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cambio climático es uno de los problemas ambientales más graves al que nos enfrentamos actualmente, provocando cambios drásticos y en ocasiones adversos en el ambiente al cual están sometidos los seres vivos. Debido a la combinación de un aumento de las temperaturas y de un descenso de la precipitación, se genera una disminución de los recursos hídricos (Ayala, 2022). Algunos organismos cuentan con mecanismos para enfrentar estas condiciones adversas. A la capacidad de sobrevivir a la desecación se le conoce como anhidrobiosis. En algunos organismos y estadios del desarrollo como las semillas de las plantas, azúcares no reductores como sacarosa o trehalosa se acumulan intracelularmente durante el proceso de desecación, además de presentar cambios morfológicos y fisiológicos cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente (Kaur et al, 2021). Sin embargo, la capacidad de realizar anhidrobiosis en plantas se ve limitada a las semillas, gracias a las proteínas LEA.

También llamados osos de agua, los tardígrados pertenecen a un *phylum* de animales microscópicos que tienen la habilidad de sobrevivir a diferentes condiciones adversas como la desecación, gracias a la criptobiosis. Para poder tolerar las condiciones de desecación, los tardígrados acumulan TDPs (Boothby et al, 2017).

Las TDPs que presentan los tardígrados son MAHS, SAHS y CAHS. La expresión constitutiva o enriquecimiento de TDPs durante la desecación se conserva entre tardígrados (Boothby et al, 2021). Previamente se ha reportado que la expresión ectópica de genes que codifican para proteínas CAHS en levaduras y bacterias induce la capacidad de conferir y aumentar la tolerancia a la desecación casi 100 veces. Además, la proteína CAHS es capaz de proteger, *in vitro*, a la proteína lactato deshidrogenasa de la desnaturalización cuando la enzima se somete a desecación y rehidratación (Boothby et al, 2021). Por otro lado, la proteína MAHS es capaz de conferir resistencia a la desecación a células humanas (Tanaka et al, 2015).

Dado esto, nos preguntamos si las TDPs serán capaces de expresarse en organismos multicelulares como *A. thaliana*. La expresión de TDPs en *A. thaliana* es necesaria para determinar si este tipo de proteínas serán capaces de conferir resistencia a la desecación a tejidos vegetativos y reproductivos, como lo hicieron en levaduras y células humanas.

3. HIPÓTESIS.

La transformación individual de plásmidos que codifican para las proteínas intrínsecamente desordenadas específicas de tardígrados CAHS, MAHS y SAHS en *A. thaliana* y en *N. benthamiana* permitirá expresar dichas proteínas en células vegetales.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Obtener líneas transgénicas estables de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* capaces de expresar individualmente proteínas intrínsecamente desordenadas específicas de tardígrados: proteína soluble en calor abundante en mitocondria (MAHS), proteína soluble en calor abundante secretada (SAHS) y proteína soluble en calor abundante en citoplasma (CAHS).

4.2 Objetivos particulares.

- Analizar bioinformáticamente las secuencias de las proteínas CAHS, MAHS y SAHS.
- Generar líneas transgénicas estables de *A. thaliana* que expresan individualmente las proteínas CAHS, MAHS y SAHS.
- Obtener constructos reporteros fluorescentes de las proteínas CAHS, MAHS y SAHS.
- Caracterizar la localización subcelular de las proteínas CAHS, MAHS y SAHS en células de *N. benthamiana*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Análisis bioinformáticos.

Los niveles de predicción de desorden estructural se determinaron utilizando los servidores PONDR (<http://www.pondr.com/>) y METAPREDICT (<https://metapredict.net/>). En los gráficos de desorden, cuando los niveles de PONDR Score son mayores a 0.5 se considera que es significativamente desordenado. Además, se obtuvo cuantitativamente el nivel global de desorden de las proteínas CAHS, MAHS y SAHS en ambos servidores. El porcentaje de predicción de hélices alfa se calculó con en el servidor AGADIR (<http://agadir.crg.es/>). La estructura tridimensional de las proteínas se realizó utilizando el algoritmo AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). Los parámetros de hidropatía media, desorden y carga neta media se analizaron con el servidor CIDER.

5.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Para la obtención de líneas transgénicas homocigotas se utilizó el ecotipo Columbia (Col-0) de *A. thaliana* donadas por el laboratorio de la Dra. Marina Gavilanes Ruiz del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM. Para la transformación transitoria se utilizaron semillas de *N. benthamiana*. El cultivo de las semillas se realizó en sustrato estéril compuesto de tres partes de sustrato Sunshine, una parte de Vermiculita y una parte de tierra amarilla. Las semillas después de sembrarse se incubaron dos días a -4°C en oscuridad, después se colocaron en invernadero y crecieron en un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad a 20°C. Para las

plantas de *N. bentamiana*, el cultivo y las condiciones de crecimiento fueron las mismas que para las plantas de *A. thaliana*.

5.3 Obtención de plásmidos que codifican para las proteínas intrínsecamente desordenadas específicas de tardígrados.

Los plásmidos NLS-SED1-pGPTVII_CAHS_WT, NLS-SED1-pGPTVII_SAHS_33020 y NLS-SED1-pGPTVII_MAHS que contienen los marcos de lectura que codifican para las secuencias de las proteínas TDP fueron generados por el laboratorio del Dr. Thomas C. Boothby (Universidad de Wyoming). Los plásmidos cuentan con un vector backbone pGPTVII, promotor constitutivo de ubiquitina, resistencia a kanamicina (bacteria) y al herbicida BASTA.

5.4 Transformación de *Escherichia coli*

Los plásmidos se recibieron del laboratorio del Dr. Thomas C. Boothby y se utilizaron para transformar 100 μ l de células competentes de *E. coli* One Shot Mach1. Las construcciones se transformaron de forma individual con el protocolo de choque térmico (Anexo 1). Las colonias transformadas se seleccionaron en placas Petri con medio LB suplementado con kanamicina. Se verificó que las colonias tuvieran los marcos de lectura que codifican para las TDPs mediante PCR de colonia (Anexo 2) con los oligonucleótidos IMR10 (Oligonucleótido con sentido forward) e IMR11 (Oligonucleótido reverso).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para el análisis de las colonias transformantes

Nombre	Secuencia 5'-3'
IMR10	CAC AAA CTT AAG CAC ACA AGC
IMR11	CGA TTT GTG ATT TCT ATC TAG ATC TGG

5.5 Transformación en *Agrobacterium tumefaciens*.

A. tumefaciens es una bacteria capaz de transferir su material genético a plantas. Esta característica es utilizada como herramienta para estudios biotecnológicos de introducción de material genético en células vegetales (transformación). Por esta razón, se transformó a la bacteria *A. tumefaciens* con los plásmidos que codifican para las TDPs para después expresarlas en la planta modelo *A. thaliana*. Se extrajo DNA plasmídico de las células One shot mach1, transformadas anteriormente, mediante miniprep clásico (Anexo 3). Posteriormente, se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 con un protocolo de choque térmico (Anexo 4). Las colonias transformadas se seleccionaron en placas Petri que contenían medio LB suplementado con kanamicina y rifampicina. Se confirmaron las colonias positivas mediante PCR de colonia con el “método de 30 minutos” (Anexo 5) con los oligonucleótidos IMR10 (Oligonucleótido sentido forward) e IMR11 (Oligonucleótido reverso).

5.6 Transformación de *Arabidopsis thaliana* por el método de inversión floral.

El método de inversión floral o *floral dip*, es un método simplificado de la filtración al vacío para la transformación de *A. thaliana* mediado por *A. tumefaciens*. Para ello, las colonias positivas, previamente obtenidas de *A. tumefaciens* GV3101 que contienen los constructos de interés se crecieron en una caja de LB con kanamicina por dos días. Posteriormente, las células se resuspendieron en 300 mL de solución que contiene 15 g de sacarosa, 0.6 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 7.5 μL de tensoactivo Silwet L-77. Se transformaron plantas de *A. thaliana*, para cada construcción, de 5 semanas de edad en la que presentó la mayor cantidad de botones florales cerrados. La agroinfiltración o inmersión floral, se llevó a cabo sumergiendo los botones florales en la solución de infiltración durante 5 minutos (Figura 1). Concluida la infiltración de las plantas, se colocaron acostadas de forma horizontal en una charola limpia de plástico y se cubrieron con un domo el cual se retiró después de 24 horas y las plantas se colocaron nuevamente en posición vertical. Las plantas infiltradas se mantuvieron en cuarto de crecimiento hasta que se recolectaron las semillas correspondientes a la generación T1.

5.7 Selección de posibles líneas transgénicas.

Las semillas recolectadas se almacenaron en microtubos a temperatura ambiente. Después, se seleccionaron las semillas transformadas T1 (Figura 1).

Las semillas se esterilizaron lavando con 1 mL de etanol en un tubo con semillas por 5 minutos, seguido de un lavado de 20 minutos con 1 mL de hipoclorito de sodio al 20 % y 1 μL de Tween 20, y consecutivamente cinco lavados de 1 mL con desionizada agua estéril para eliminar residuos de hipoclorito de sodio. Las semillas estériles se sembraron en medio MS suplementado con 1 % de sacarosa, 0.5g/L de MES, 0.7 % de gelzan, 50 μM de BASTA y 50 $\mu g/mL$ de ampicilina. Para romper la latencia, las semillas

se incubaron durante 3 días a 4 °C en oscuridad. Se seleccionaron como posibles líneas transgénicas las plantas que resisten al medio de selección.

5.8 Genotipificación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Se extrajo el DNA genómico de las posibles líneas transgénicas mediante el método de CTAB (Anexo 6) y se realizó genotipificación mediante PCR con los oligonucleótidos IMR10 (Oligonucleótido sentido forward) e IMR11 (Oligonucleótido reverso). Las plantas que resultaron positivas se crecieron y se recolectaron semillas de la generación T2. Posteriormente las semillas recolectadas se seleccionaron nuevamente en un medio MS con BASTA 50 µM.

5.9 Prueba de inserción en el genoma.

Se evaluó el porcentaje de semillas T2, de cada construcción, resistentes al herbicida BASTA, con la finalidad de registrar el patrón de segregación de la resistencia y encontrar líneas con una sola inserción del transgén en el genoma. El patrón esperado de segregación de la resistencia al herbicida, de las líneas transgénicas, deben de cumplir la segregación mendeliana para un locus 3:1, es decir que el 75 % de plantas crecieran en presencia de BASTA y el 25 % fueran sensibles y murieran (Figura 1). Se cuantificaron los fenotipos observados y se realizó la prueba estadística chi-cuadrada (χ^2). La prueba de Chi cuadrada es un procedimiento estadístico utilizado para determinar si existe una diferencia significativa entre los resultados esperados y los observados en una o más categorías. La prueba se realizó con la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Donde O son el número de plantas observadas en una categoría y E es el número de plantas esperadas en dicha categoría. Los grados de libertad son:

$$(df) = (\text{número de clases} - 1), \alpha = 0.01.$$

Con la cual se eligieron las líneas transgénicas independientes, candidatos a portar sólo una inserción del transgén. Las plántulas de las líneas seleccionadas se transfirieron a tierra después de tener hojas verdaderas y se obtuvieron semillas de las mismas (semillas T3). Seleccionando únicamente las líneas homocigotas. Las líneas transgénicas que mostraron una resistencia de 100 % se consideraron como líneas homocigotas y las que mostraron un genotipo sensible se consideraron heterocigotas.

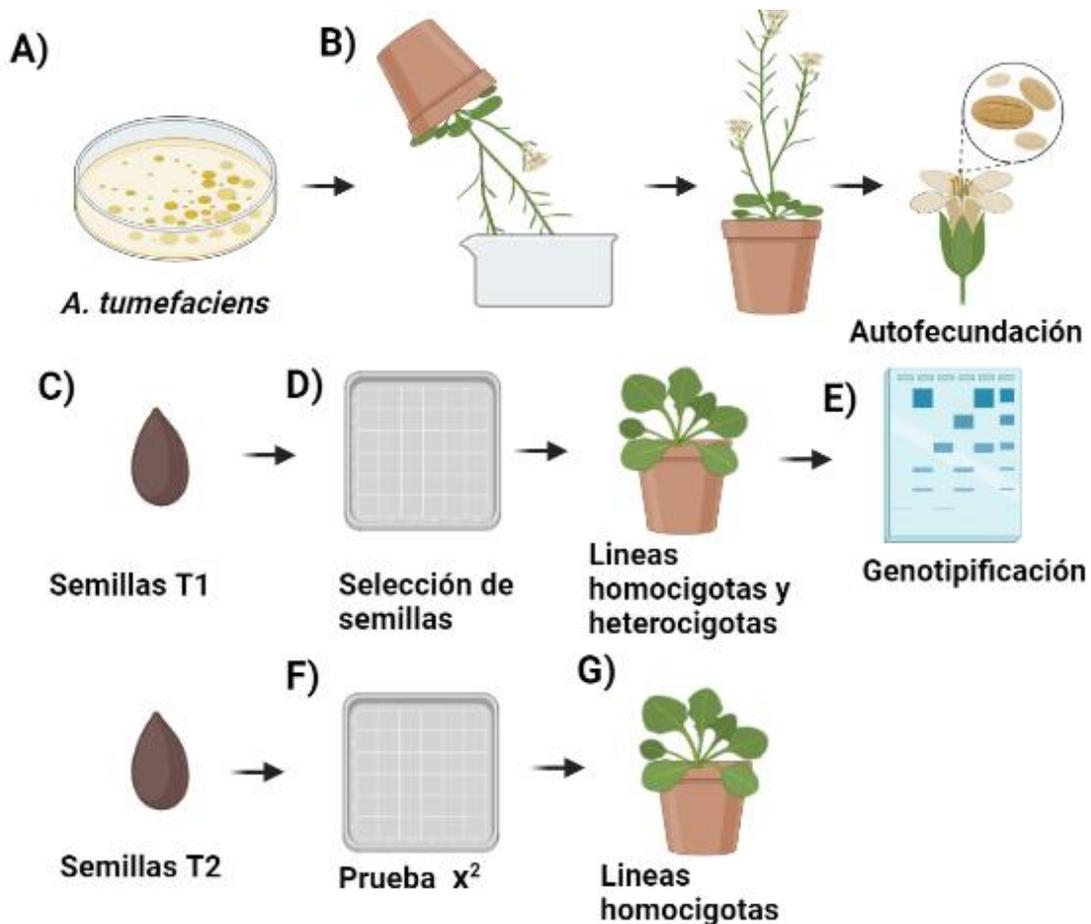


Figura 1. Esquema del procedimiento de transformación y obtención de líneas transgénicas. A) Crecimiento de *A. tumefaciens* GV3101 que tienen las construcciones de interés en una caja grande de LB con kanamicina. B) Las plantas de *A. thaliana* Col-0 con botones cerrados se sumergen en el medio de infiltración de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción de interés. C) Recolección de semillas. D) Selección de posibles líneas transgénicas por resistencia a BASTA, cada planta representa un evento de transformación diferente. E) Las plantas T1 crecen en sustrato y se realiza genotipificación por PCR sobre el DNA plasmídico, las semillas obtenidas de estas plantas corresponden a la generación T2. F) Las semillas T2 se evalúa el porcentaje de germinación a través de la resistencia a BASTA y se realiza la prueba χ^2 , si corresponde a 3:1 se eligen las plantas. G) Se crecen en sustrato 15 plantas para cada línea transgénica independiente obtenida y se colectan las semillas T3 donde se obtienen las líneas transgénicas homocigotas.

5.10 Generación de variantes de las TDPs fusionadas a la proteína fluorescente mNeonGreen.

Para probar que las proteínas CAHS, MAHS Y SAHS pueden ser expresadas en células vegetales y determinar su localización subcelular se realizó la clonación de los marcos de lectura abierta de cada TDP con la proteína fluorescente mNeonGreen en el plásmido pGPTVII-nlsSED1 (plásmido binario para plantas), digerido con las enzimas SpeI y XmaI. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región codificante de CAHS, MAHS, SAHS y mNeonGreen (mNG), con homología con las diferentes TDP, propuestos con ayuda del software *SnapGene* (Tabla 2). Se amplificó la región codificante de las TDP y mNG mediante PCR con la polimerasa de alta fidelidad DNA polimerasa Platinum II *Taq* Hot-Start. Una vez amplificadas las regiones de interés se incubaron con el vector digerido pGPTVII-nlsSED1 y se clonaron utilizando el método de clonación Gibson Assembly (Anexo 7). Después se transformaron en la cepa de *E. coli* One Shot Mach1 de forma individual con el protocolo de choque térmico (Anexo 1). Las colonias transformadas se seleccionaron en placas que contenían medio LB suplementado con kanamicina. Las colonias se genotipificaron amplificando las regiones codificantes de

TDPs mediante PCR de colonia (Anexo 2) con los oligonucleótidos diseñados específicos para cada construcción y los oligonucleótidos IMR10 e IMR11.

Por otro lado, se realizó PCR overlapping para la construcción de MAHS con mNG. La PCR overlapping o también llamada PCR de extensión superpuesta es una técnica que se usa para clonar fragmentos grandes o fusionar dos elementos genéticos. Primero se amplificaron los fragmentos de MAHS y mNG con homología entre los dos y se sometieron a un PCR con una polimerasa de alta fidelidad, sin adicionar los oligonucleótidos correspondientes. Se realizó un segundo PCR con una polimerasa de alta fidelidad, adicionando los oligonucleótidos BVSG04 e IMR06. Se aisló el DNA mediante purificación de banda. Una vez amplificadas las regiones de interés se clonaron con el vector digerido pGPTVII-nlsSED1, utilizando el método de clonación Gibson Assembly (Anexo 7). El producto de clonación se transformó en células de *E. coli* One Shot Mach1, con protocolo de choque térmico (Anexo 1). Las colonias transformadas se seleccionaron en placas de LB con Kanamicina. Las colonias obtenidas se confirmaron como positivas mediante PCR de colonia con los oligonucleótidos específicos para cada construcción (Anexo 5).

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para amplificar CAHS, MAHS, SAHS y mNeonGreen con homología específica para cada construcción.

Nombre	Secuencia	Tm(°C)
BVSG01	CTGATTAACAGACTAGTGGAGGGATGGACTATAAGGACG ACG	68.4
BVSG02	GGAAATCAAGAGGAACACTAGTAGATCTATGGTTAGCAAGGGCG	68.3
BVSG03	CGCCCTTGCTAACCATAGATCTACTAGTGTTCCCTCTTGATTTC	68.3
BVSG04	CAGACTAGTGGAGGGATGGATTATAAGGACGACGATG	55.7

BVSG05	GGTCGCATTTCGAAAGCACTAGTAGATCTATGGTTAGCAAGGGC	69.3
BVSG06	GCCCTTGCTAACCATAGATCTACTAGTGCTTTTCTGAATGCGAC	68.4
BVSG07	CAGACTAGTGGAGGGATGGACTATAAAGACGACGACG	67.8
BVSG08	AACCCCGCAGCAACTAGTAGATCTATGGTTAGCAAGGGC	68.7
BVSG09	GCCCTTGCTAACCATAGATCTACTAGTTGCTGCGGGGTTT	68.3

5.11 Transformación transitoria de TDPs fusionadas a mNeonGreen en hojas de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria en plantas permite la expresión rápida de proteínas en células vegetales. Las células de *Nicotiana sp* son las células más utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes, esto gracias a su rápido crecimiento, alta densidad y que son aptas para la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*. Se extrajo DNA plasmídico de las células One shot Mach1, transformadas anteriormente, mediante miniprep clásico (Anexo 3). Posteriormente, se transformó en células de *A. tumefaciens* GV3101 con protocolo de choque térmico (Anexo 4). Las colonias transformadas se seleccionaron en placas de LB con Kanamicina (50mg/mL) y Rifampicina (50mg/mL). Las colonias obtenidas se confirmaron como positivas mediante PCR de colonia con los oligonucleótidos IMR10 e IMR11 (Anexo 5). Con las colonias positivas de *A. tumefaciens* que portan las construcciones de interés se creció un preinóculo de 3 mL de medio LB líquido con 3 μ l de kanamicina a 50mg/mL y 3 μ l de rifampicina 50 mg/mL toda la noche (O.N, *Over Night*) con agitación constante a 30°C. Además, se colocó un inóculo de colonias que expresan el supresor del silenciamiento génico postranscripcional – p19 en las mismas condiciones. Posteriormente se midió la absorbancia de ambos precultivos y se llevó cada uno a una OD600nm de 0.5, en 3 mL

de medio LB líquido con kanamicina y rifampicina y se dejó incubar en O.N con agitación constante a 30°C.

Posteriormente, las células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se suspendió en 3 mL de MgCl₂ 10 mM y se midió su absorbancia. Se realizó una dilución tal que la absorbancia fuera de 0.75 en 3 mL de MgCl₂ 10 mM, usando como blanco MgCl₂ (10 mM), se mezcló con 3 μ l de acetosiringona (As) 150 mM y una cantidad de MgCl₂ (10 mM) tal que el volumen final fuera de 3 mL. La mezcla se dejó incubar por 3h a temperatura ambiente. Se infiltraron plantas de *N. benthamiana* de 4-5 semanas, periodo en el que presentaron hojas grandes y ausencia de botones florales. Por cada construcción se infiltraron 4 hojas de *N. benthamiana*. Con una aguja se realizaron heridas superficiales en la parte abaxial de la mitad de la hoja, después con una jeringa sin aguja de 1 mL se inyectó la solución previamente incubada por 3 horas. Concluida la infiltración, las hojas se secaron con papel. La parte de la hoja que no fue infiltrada con la construcción de interés se infiltró con pGPTVII-nlsSED1 como un control positivo. Las plantas infiltradas se mantuvieron en el invernadero hasta que mostraron fluorescencia (Figura 2). Se tomaron imágenes con microscopía confocal en el área de la epidermis de la hoja.

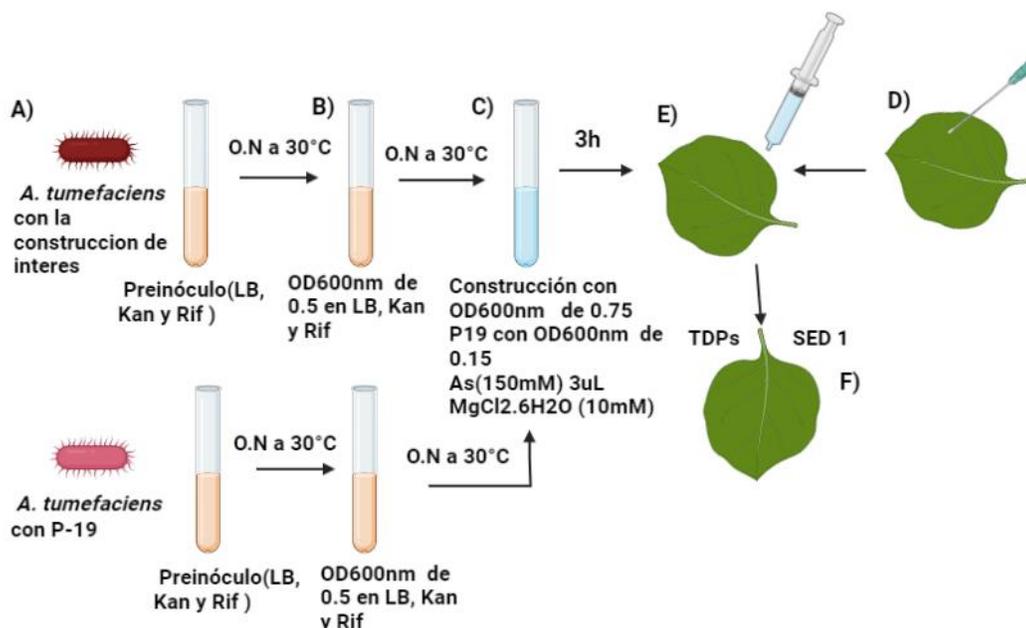


Figura 2. Esquema del proceso de transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana*. A) Se crece un preinóculo de las colonias de *A. tumefaciens*, en 3 mL de LB líquido con 3 μ l de kan (50mg/mL) y 3 μ l de Rif (50 mg/mL) dejándose incubar O.N a 30°C. B) Se midió la absorbancia y se llevó cada uno a una OD600nm de 0.5, en 3 mL de medio LB líquido con Kanamicina (50 mg/mL) y Rifampicina (50 mg/mL) se dejó incubar O.N e a 30°C. C) Se centrifugó a 4,000 rpm, 10 minutos y se resuspendió en 3 mL de MgCl₂ y se midió su absorbancia. Se midió la absorbancia y se realizó una dilución tal que la absorbancia fuera de 0.75 en 3 mL de MgCl₂ con 3 μ l de As. Se deja incubar por 3 h a temperatura ambiente. D) Con una aguja se realizaron heridas superficiales en la parte abaxial de la mitad de la hoja. E) Con una jeringa sin aguja de 1 mL se inyectó la solución a la mitad de la hoja. F) La parte de la hoja que no fue infiltrada con la construcción de interés se infiltró con SED1 como un control positivo.

6. RESULTADOS.

6.1 Análisis bioinformático de las proteínas CAHS, MAHS Y SAHS.

Para caracterizar bioinformáticamente a las proteínas CAHS, MAHS y SAHS, se predijeron los niveles de desorden mediante los servidores PONDR y METAPREDICT. Los gráficos de desorden muestran los resultados del porcentaje de desorden a lo largo de cada proteína. Cuando los niveles de PONDR Score son mayores a 0.5, se considera significativamente desordenado, mientras que el consenso de desorden en METAPREDICT debe de ser mayor a 0.3 para considerarse significativamente desordenado. De acuerdo a lo esperado, se encontró que las proteínas CAHS es altamente desordenada (Figura 3A y 3B). La proteína MAHS también se predice como desordenada, principalmente en su región C-terminal (Figura 3C y 3D). En contraste, la proteína SAHS se predice mayoritariamente ordenada (Figura 3E y 3F). Además, se obtuvo cuantitativamente el desorden de las proteínas en ambos servidores (Tabla 2).

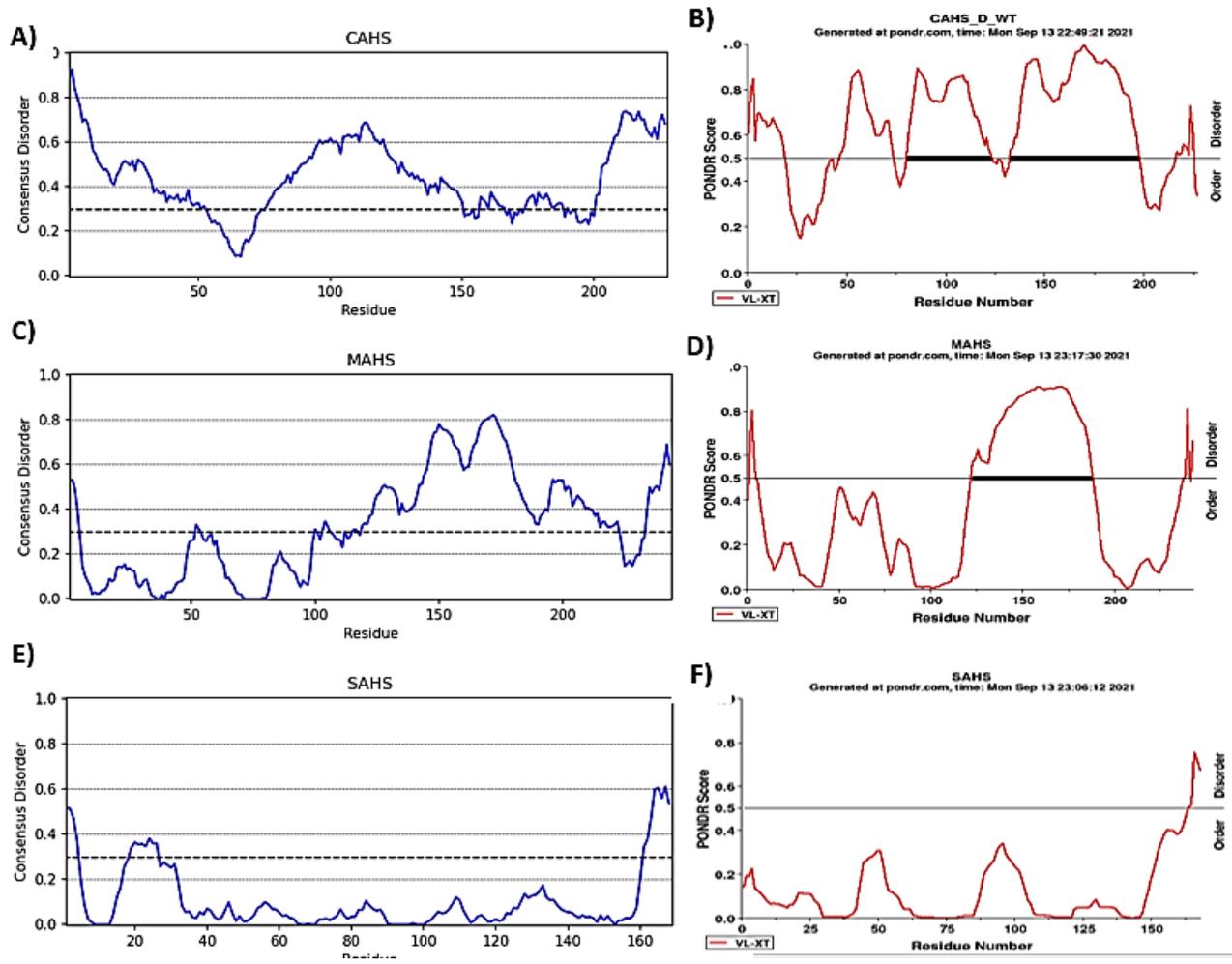


Figura 3. Gráficos de predicción de desorden de las TDPs mediante el servidor METAPREDICT (A, C y E) y PONDR (B, D y F).

Tabla 2. Porcentajes de desorden obtenidos en los servidores PONDR y METAPREDICT

	% de desorden en PONDR	% de desorden en METAPREDIC
CAHS	71.81	80.2
MAHS	30.04	52.7
SAHS	2.98	11.89

Posteriormente, se calculó el porcentaje de predicción de alfa-hélice con el servidor AGADIR, obteniendo que CAHS presentó el mayor porcentaje de predicción en alfa-hélice (25.6 %), presentándose en la parte central de la proteína (Figura 4). Por otro lado, la proteína MAHS mostró un porcentaje de predicción de alfa-hélice menor (3.13 %), mientras que la proteína SAHS tiene un porcentaje de predicción de alfa-hélice menor a 1 (0.75 %). Para caracterizar más a fondo la estructura de las proteínas CAHS, MASH y SAHS se predijo su estructura tridimensional con el servidor AlphaFold2. Las estructuras obtenidas son consistentes con los resultados de los servidores anteriores, es decir, CAHS y MAHS se predicen con altos niveles de desorden (Figura 5). Por otro lado, la proteína SAHS muestra una estructura mayoritariamente de barril β .

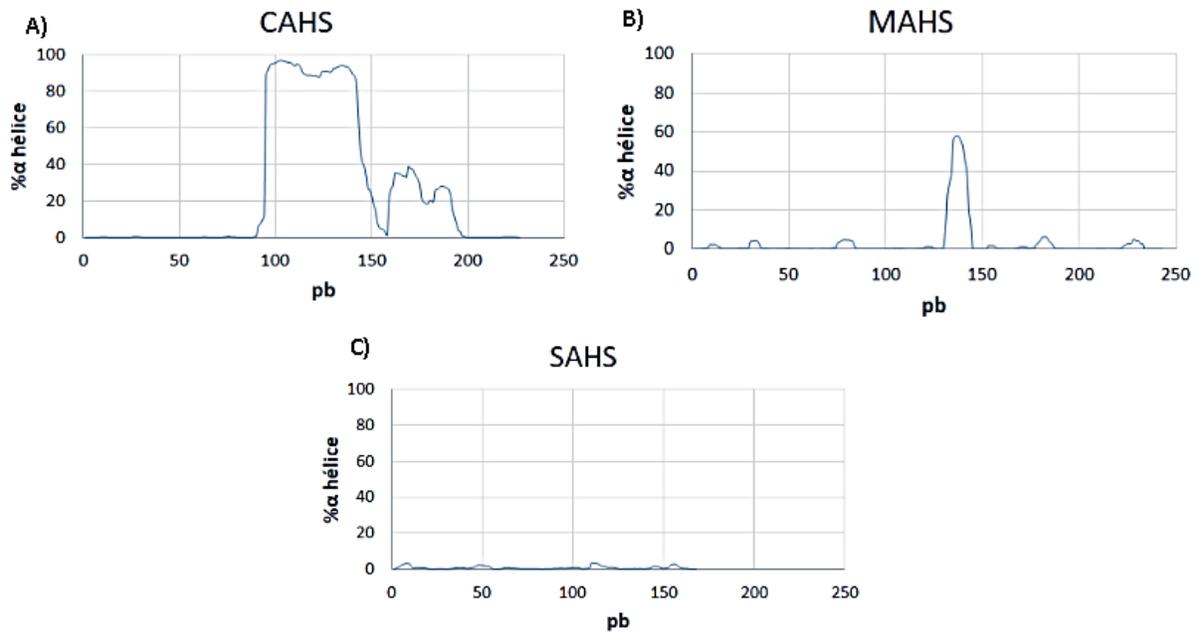


Figura 4. Gráficos de predicción alfa-hélice de las TDP mediante el servidor AGADIR

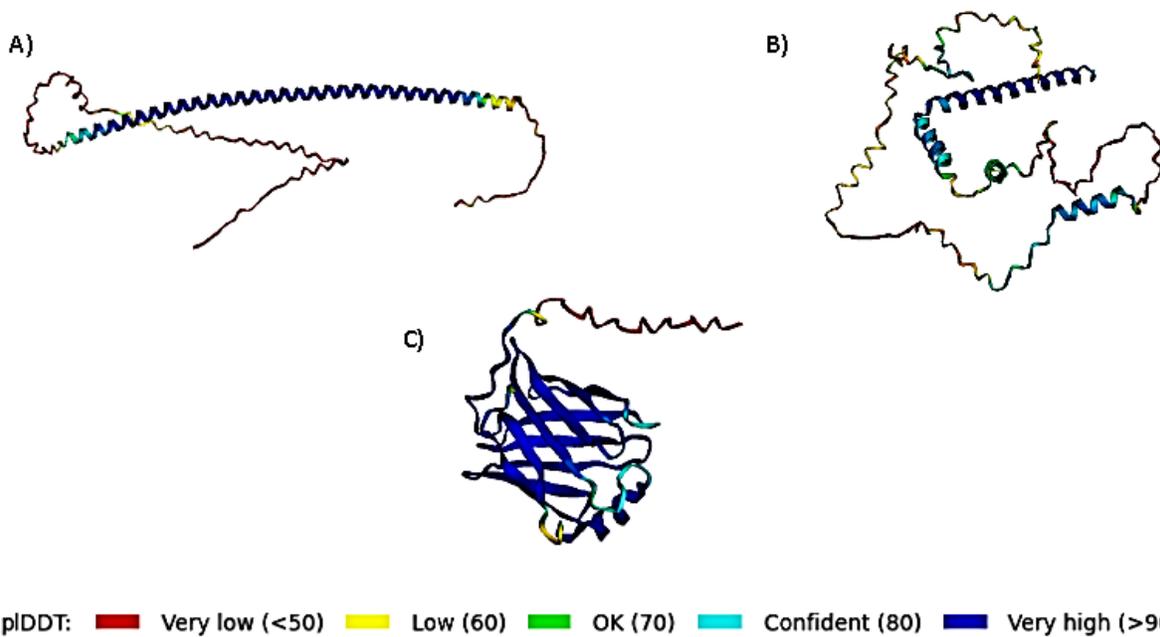


Figura 5. Predicción de la estructura tridimensional de las proteínas TDP mediante el servidor AlphaFold2. A) Predicción de estructura de CAHS, B) Predicción de estructura de MAHS, C) Predicción de estructura de SAHS.

Para determinar si las proteínas CAHS, MAHS y SAHS comparten propiedades fisicoquímicas similares a las proteínas LEA, otro tipo de proteínas que se acumulan durante condiciones de desecación, se compararon los parámetros de hidropatía media, desorden y carga neta media de estas proteínas, mediante el algoritmo CIDER. Se sabe que las proteínas LEA usualmente tienen fracción de residuos que se predice que promueven el desorden mayor o igual a 0.76, hidropatía media menor a 0.46 y una carga neta media menor a 0.035 (Lozano Ortega, 2023). Se puede observar que la proteína CAHS es la única que cumple con los parámetros de hidropatía media, desorden y carga neta media, siendo la única proteína con propiedades fisicoquímicas similares a las proteínas LEA (Figura 6).

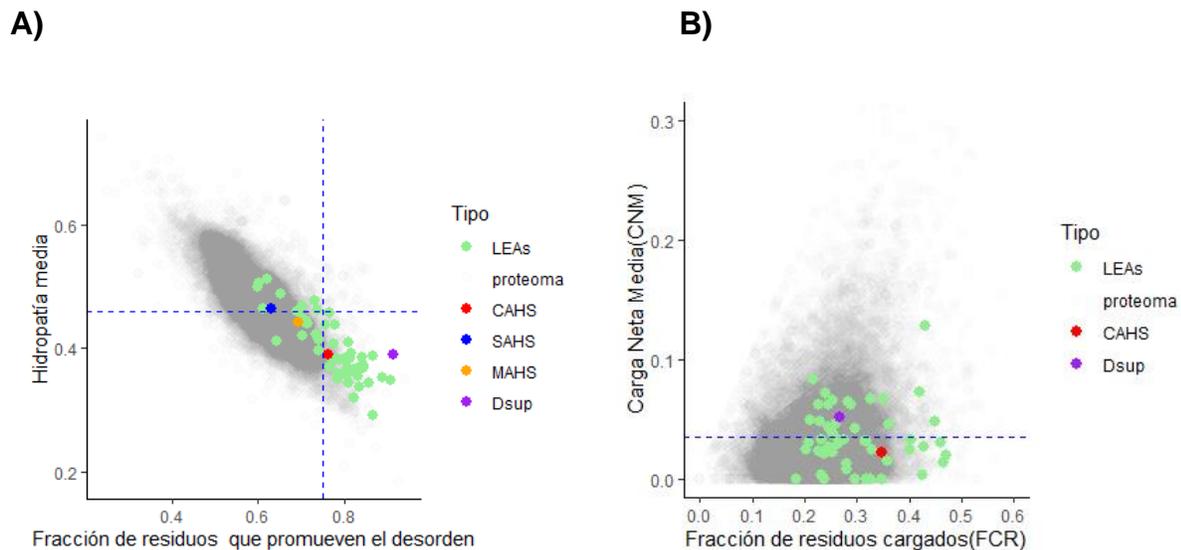


Figura 6. Comparación de proteínas TDPs con las proteínas LEA mediante diferentes parámetros. A) Gráfica de hidropatía media contra la fracción de residuos que promueven el desorden, B) Gráfica de carga neta media contra fracción de residuos cargados (FCR).

El análisis bioinformático muestra que las proteínas CAHS y MAHS son proteínas con una alta predicción de desorden, lo que podría ser relevante para su función molecular. Por otro lado, la proteína SAHS se predice como una proteína plegada con una estructura tipo barril β .

6.2 Obtención de DNA plasmídico con las secuencias que codifican para CAHS, MAHS y SAHS-

Este proyecto de tesis forma parte de un proyecto cuyo objetivo es dilucidar si las proteínas CASH, SAHS y MAHS son capaces de tolerancia a la desecación a tejidos vegetativos de plantas. Para ello, en colaboración con el Dr. Thomas C. Boothby (Universidad de Wyoming) buscamos expresar heterológamente estas proteínas en la planta modelo *A. thaliana*. La región codificante de cada una de las TDPs se clonó en el vector pGPTVII-nlsSED1. Los tamaños de las regiones codificantes de las TDPs se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tamaño de las regiones codificantes de las TDPs clonadas en el vector pGPTVII-nlsSED1

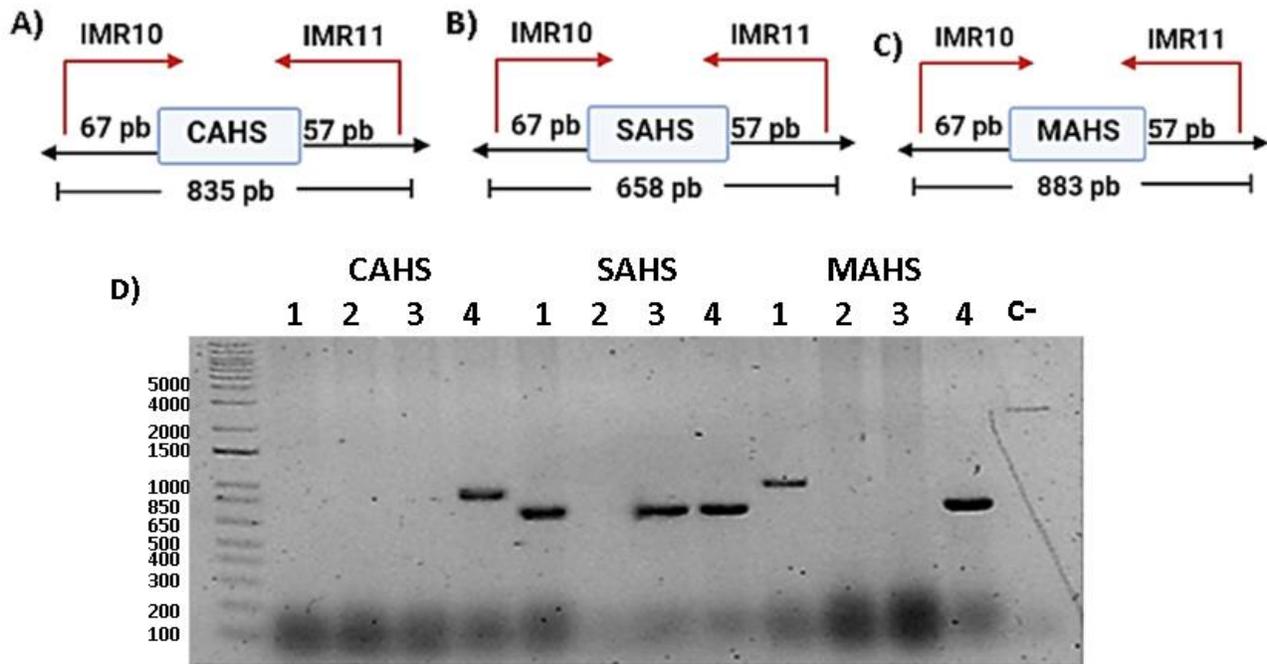
Proteína	MAHS	CAHS_D	SAHS_ 33020
Tamaño(pb) de la región	759 pb	711 pb	534 pb

El DNA plasmídico de estas construcciones se transformó en *E. coli* One Shot Mach1 y se seleccionaron colonias en medio LB con kanamicina. Se seleccionaron cuatro colonias para cada una de las construcciones y se corroboró si contaban con el plásmido correspondiente mediante PCR de colonia. En las Figura 7 se muestra el análisis por PCR de las colonias para las construcciones usando los oligonucleótidos

IMR10 (oligonucleótido sentido forward) e IMR11 (Oligonucleótido reverso) que flanquea a la región codificante para cada una de las regiones que codifican las TDPs.

Figura 7. Confirmación de la presencia de CAHS, SAHS y MAHS en las colonias de *E.coli* One Shot Mach1.

A) Esquema del fragmento amplificado que incluye a la región codificante de CAHS (711 pb) y parte del vector, 124 pb, con una longitud total de 835 pb. Se muestran los sitios de apareamiento de los



oligonucleótidos. B) Esquema del fragmento amplificado que incluye a la región codificante de SAHS (534 pb) y parte del vector, 124 pb, con una longitud total de 658 pb. C) Esquema del fragmento amplificado que incluye a la región codificante de MAHS (759 pb) y parte del vector, 124 pb, con una longitud total de 883 pb. D) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestran los fragmentos correspondientes de 4 colonias diferentes de CAHS, SAHS y MAHS, en el orden correspondiente. En el control negativo no se añadió ninguna colonia. Los esquemas no están a escala.

La región amplificada para las construcciones CAHS, MAHS y SAHS incluye parte de la secuencia del vector, por ello el tamaño esperado es de 835 pb para CAHS, 658 pb para SAHS y 883 pb para MAHS. Los resultados mostraron que algunas colonias amplificaron fragmentos con el tamaño esperado (Figura 7). Se seleccionó la colonia 4

de CAHS, la colonia 3 de SAHS y la colonia 1 de MAHS. Las colonias seleccionadas se conservaron en gliceroles y se almacenaron a -70°C . Además, se extrajo el DNA plasmídico usando miniprep clásico, obteniendo las siguientes concentraciones:

- CAHS: $70,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- MAHS: $50.9 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- SAHS: $91,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$

6.3 Obtención de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan a las proteínas CAHS, MAHS y SAHS.

Para obtener las líneas de *A. thaliana* sobreexpresoras de las proteínas TDPs, se transformó el DNA plasmídico de cada una de las construcciones provenientes de las colonias confirmadas por PCR en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 y se seleccionaron en medio LB con antibióticos. Se seleccionaron cinco colonias positivas y se corroboraron por PCR de colonia empleando los oligonucleótidos IMR10 (Oligonucleótido sentido forward) e IMR11 (Oligonucleótido reverso). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de los plásmidos esperados en las colonias seleccionadas para cada una de las construcciones (Figura 8). Se eligió una colonia de cada construcción para transformar plantas de *A. thaliana* por agroinfiltración. Las colonias seleccionadas fueron la colonia 1 para CAHS, la colonia 3 para MAHS y la colonia 3 para SAHS. Las colonias seleccionadas se crecieron para almacenar gliceroles para su conservación y se almacenaron a -70°C .

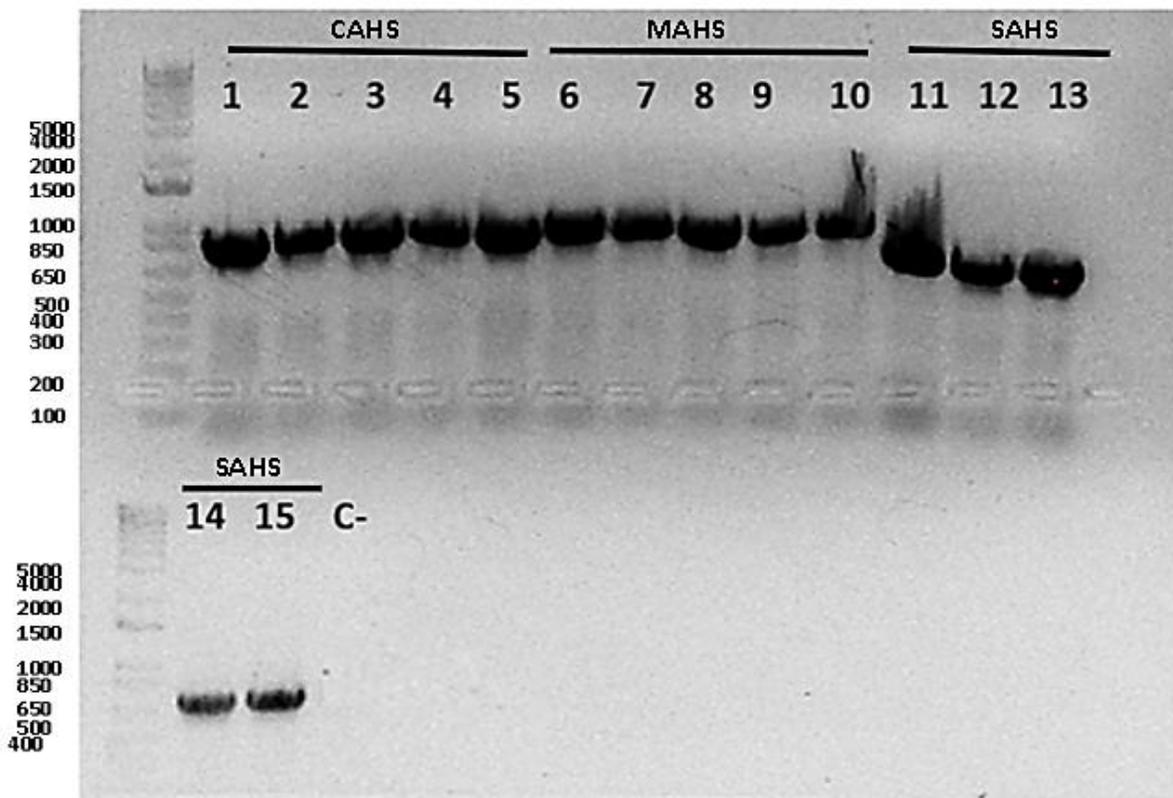


Figura 8. Confirmación de la presencia de los genes que codifican para CAHS, SAHS y MAHS en las colonias de *A. tumefaciens* GV3101. Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestran los fragmentos correspondientes de 5 colonias diferentes de CAHS con 835 pb (1,2,3,4,5), MAHS con 883 pb (6,7,8,9,10) y SAHS con 685 pb (11,12,13,14,15), en el orden correspondiente. En el control negativo (C-) no se colocó colonia.

6.4 Selección de líneas transgénicas.

Para cada construcción se transformaron plantas de *A. thaliana* Col-0. Las plántulas resistentes a BASTA se les nombró como posibles líneas transgénicas. Para corroborar si las posibles líneas transgénicas de *A. thaliana* contienen el transgén, se realizó la extracción de DNA genómico y se genotipificó mediante PCR. Las muestras de material vegetal que no se amplificaron fueron descartadas y las que amplificaron fueron

consideradas líneas transgénicas independientes, las cuales habían integrado el T-DNA a su genoma.

En el caso de las líneas transgénicas de SAHS, las tres líneas probadas resultaron positivas (Figura 9). Para la construcción de MAHS, con un tamaño total de 883 pb, se obtuvo el fragmento del peso esperado para una posible línea transgénica (Figura 10). Finalmente, para la construcción de CAHS, las dos posibles líneas transgénicas amplificaron un fragmento de 835 pb (Figura 11).

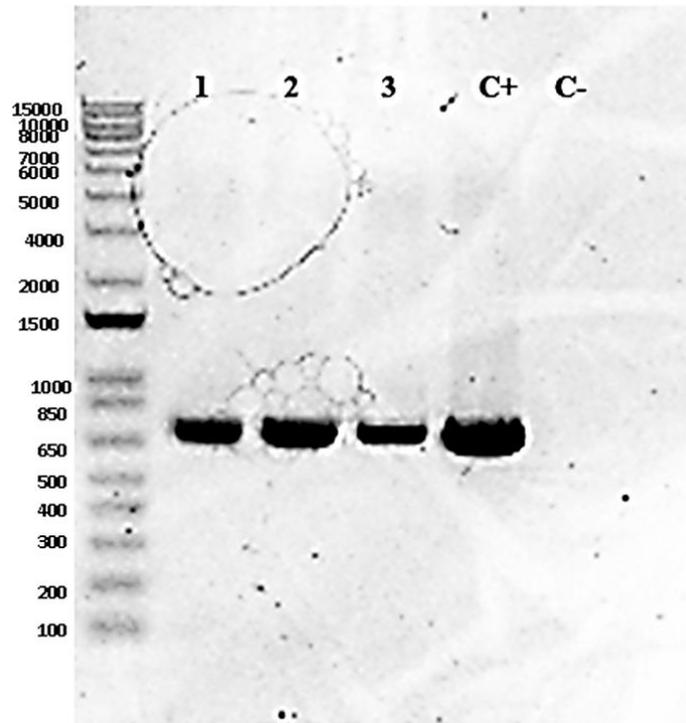


Figura 9. Genotipificación de la presencia de SAHS en plantas de *A. thaliana*. Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestran los fragmentos correspondientes de 3 diferentes posibles líneas transgénicas de la construcción SAHS (1,2,3,4), de plantas de *A. thaliana*. Como control positivo (C+) se utilizó el DNA extraído de las células de *E. coli* One Shot Mach1. El control negativo (C-) se utilizó tejido vegetal de una planta *A. thaliana* Col-0.

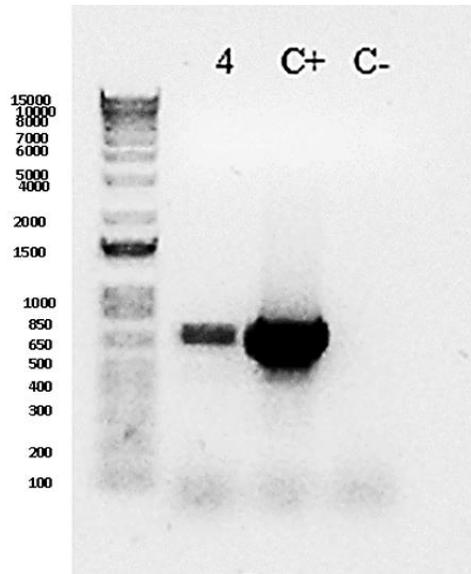


Figura 10. Genotipificación de la presencia de MAHS en plantas de *A. thaliana*. Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestran los fragmentos correspondientes de 1 posible línea transgénica de la construcción MAHS, de plantas de *A. thaliana*. Como control positivo (C+) se utilizó el DNA extraído de las células de *E. coli* One Shot Mach1. El control negativo (C-) se utilizó tejido vegetal de una planta *A. thaliana* Col-0.

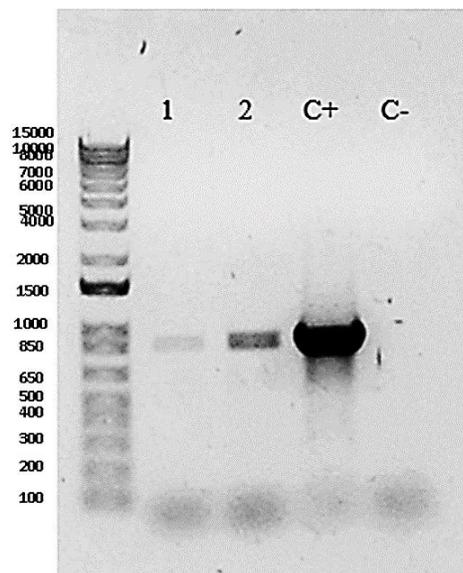


Figura 11. Genotipificación de la presencia de CAHS en plantas de *A. thaliana*. Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestran los fragmentos correspondientes de 2 diferentes posibles líneas transgénicas de la construcción CAHS, de plantas de *A. thaliana*. Como control positivo

(C+) se utilizó el DNA extraído de las células de *E. coli* One Shot Mach1. El control negativo (C-) se utilizó tejido vegetal de una planta *A. thaliana* Col-0.

Las líneas transgénicas se mantuvieron hasta plantas adultas y se obtuvieron semillas correspondientes a la generación T2. Se evaluó el número de inserciones del transgene en el genoma de las líneas midiendo la segregación de la resistencia a BASTA con la prueba χ^2 . Las líneas que presentaron una segregación cercana al 75 % de la resistencia a BASTA pasaron la prueba de χ^2 , lo que indica la presencia de una inserción única del transgene del interés (Figura 12 y Tabla 4).

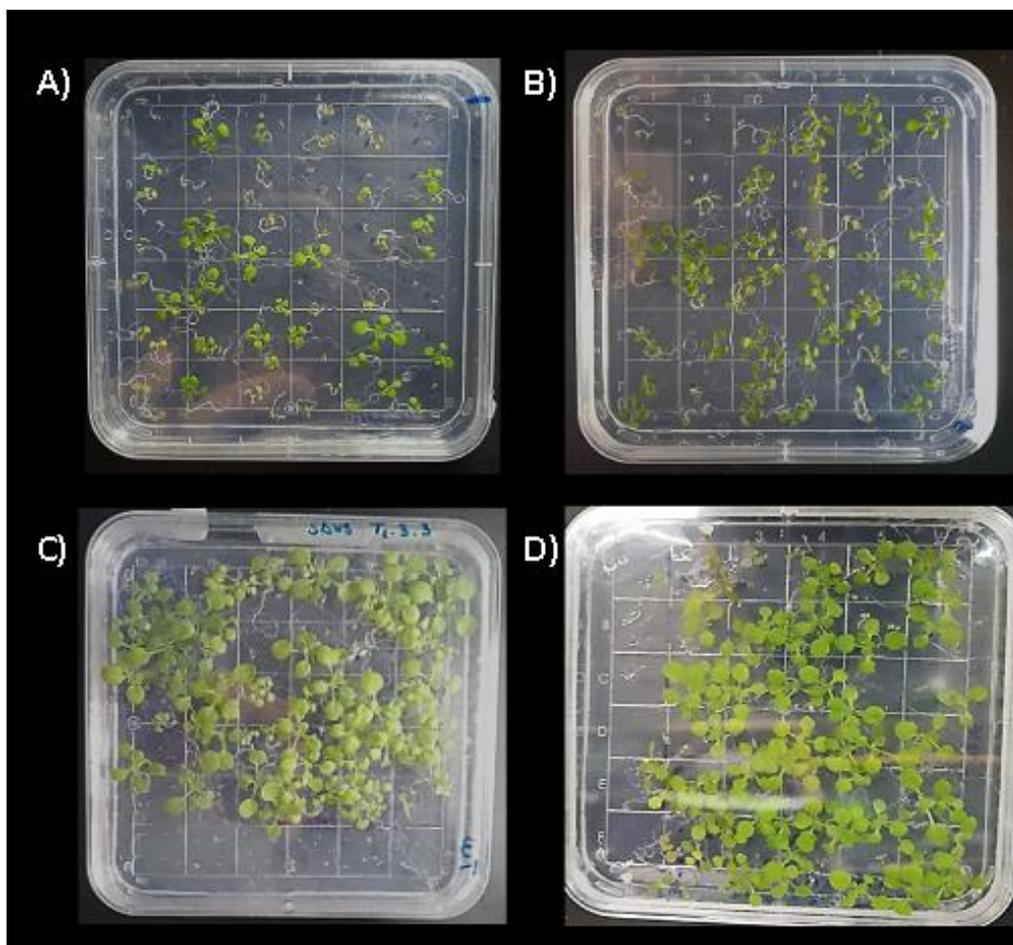


Figura 12. Germinación de semillas T2 de líneas transgénicas de SAHS. A) Semillas T2 de la línea transgénica 1 (L1), B) Semillas T2 de la línea transgénica 2 (L2), C) Semillas T2 de la línea transgénica 3 (L3). D) Semillas T2 de la línea transgénica 4(L4).

Tabla 4. Segregación de posibles líneas transgénicas SAHS

Línea	Fenotipo	Observados	Esperado	Porcentaje de semillas germinadas	Valor p
SAHS L1	Sensible	23	17.5	67.14 %	0.128978043
	Resistente	47	52.5		
SAHS L2	Sensible	17	17.5	75.71 %	0.8902300549
	Resistente	53	52.5		
SAHS L3	Sensible	46	30	61.67 %	0.00074328
	Resistente	74	90		
SAHS L4	Sensible	25	25	75 %	1
	Resistente	75	75		

Las líneas transgénicas SAHS L1, L2 y L4 tienen un porcentaje de germinación cercana al 75 % y pasaron la prueba de χ^2 siendo el valor $p > 0.05$. Mientras la línea transgénica SAHS L3 tiene un porcentaje de germinación cercano a 75 % pero no pasa la prueba de χ^2 (Tabla 4). Por lo tanto, las líneas transgénicas seleccionadas fueron SAHS L1, L2 y L4.

Las plántulas T3 de cada línea transgénica independiente se dejaron crecer y se seleccionaron las líneas homocigotas por resistencia a BASTA (Figura 13).

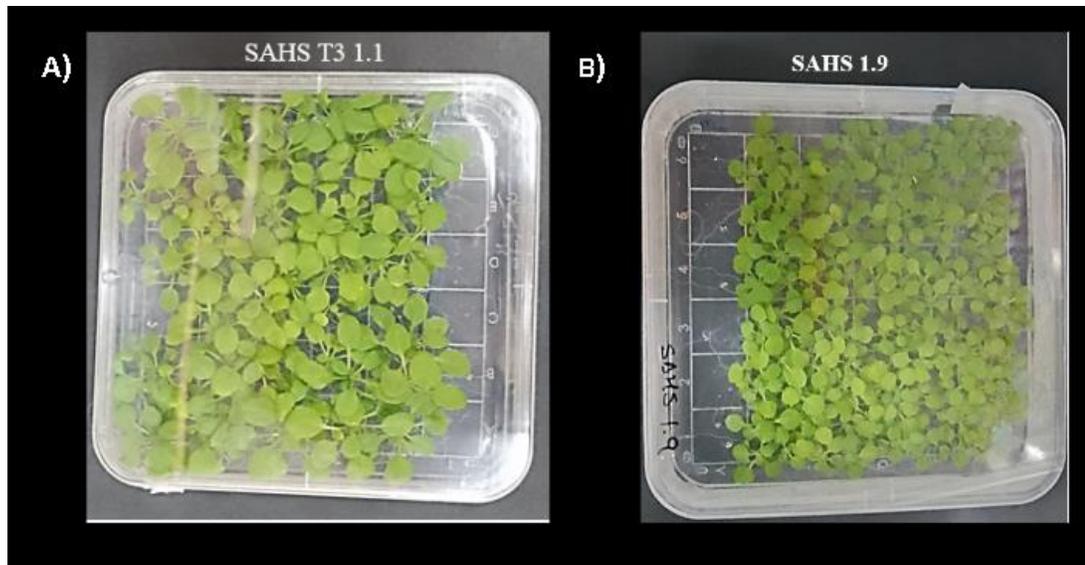


Figura 13. Segregación de líneas homocigotas transgénicas de SAHS.

6.5 Localización subcelular de las proteínas CAHS y SAHS en hojas de *N. benthamiana*

Con el objetivo comprender la localización subcelular de las diferentes proteínas TDPs (CAHS, MAHS y SAHS) y determinar si son capaces de expresarse en tejido vegetal, se realizó la clonación de la región codificante de las diferentes TDP fusionada con la región codificante de la proteína fluorescente mNeonGreen en el plásmido pGPTVII. Para ello se diseñaron oligonucleótidos para amplificar cada fragmento con ayuda del software *SnapGene* (Tabla 2). Se amplificaron las regiones codificantes de MAHS, SAHS y mNeonGreen mediante PCR con la DNA polimerasa de alta fidelidad Platinum II *Taq* Hot-Start. Por otro lado, la región codificante de CAHS fue amplificada mediante PCR con la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion. Además, se digirió el plásmido pGPTVII-nlsSED1 con las enzimas *SpeI* y *XmaI*. La región amplificada esperada para la construcción de CAHS fue de 711 pb, para MAHS fue de 759 pb, para SAHS fue de 534 pb y para mNeonGreen fue de 711 pb. Se lograron amplificar bandas con el tamaño esperado para todas las construcciones (Figura 14).

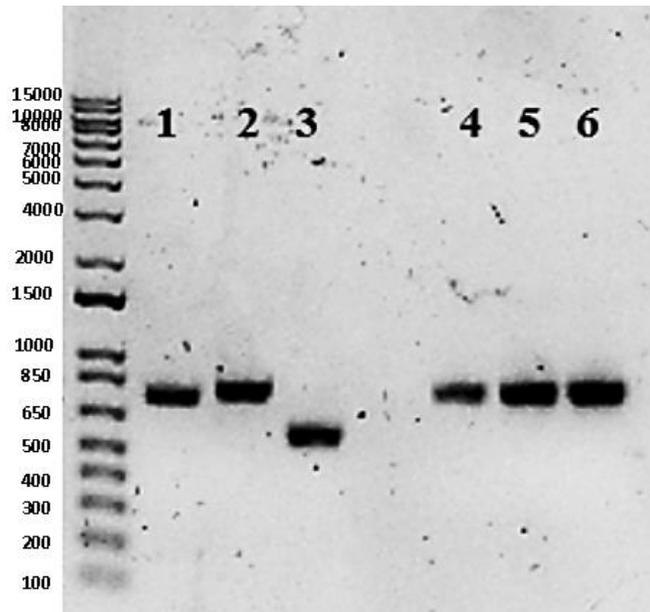


Figura 14. Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestran los fragmentos correspondientes a la amplificación de 1) CAHS (711 pb), 2) MAHS (759 pb), 3) SAHS (534 pb), 4) mNeonGreen (711 pb) con homología con CAHS, 5) mNeonGreen (711 pb) con homología con MAHS y 6) mNeonGreen (711 pb) con homología con SAHS.

En la Figura 15 se muestra la digestión del vector pGPTVII-nlsSED1 con *SpeI* y *XmaI*, el cual mide 11,802 pb (Figura 15). Además, observamos el fragmento liberado correspondiente al resto del vector, el cual corresponde a 1,908 pb (Figura 15) por lo tanto la digestión del vector fue exitosa.

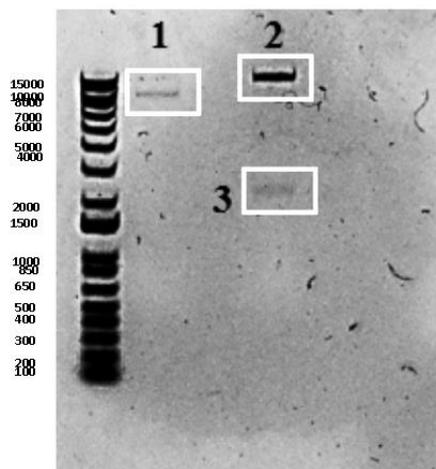


Figura 15. Digestión del plásmido pGPTVII-nlsSED1 con las enzimas *SpeI* y *XmaI*. Gel de agarosa al 0.75 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestra la digestión del plásmido pGPTVII-nlsSED1. Se observa la banda del vector sin digerir (1), la banda del vector digerido de 11,802 pb (2), mientras que la banda del fragmento que se retiró del vector es de 1,908 pb (3).

Los fragmentos amplificados de las TDPs se clonaron con el fragmento que codifica para la proteína fluorescente mNeonGreen, en el vector pGPTVII-nlsSED1 digerido con *SpeI* y *XmaI*, mediante el método Gibson Assembly. Las construcciones obtenidas de la clonación se nombraron como pGPTVII-CAHSmNG a la clonación de CAHS con mNeonGreen, pGPTVII-MAHSmNG a la clonación de MAHS con mNeonGreen y pGPTVII-SAHSmNG a la clonación de SAHS con mNeonGreen.

Tras la reacción de clonación, se transformaron células competentes de *E. coli* One Shot Mach1 y se aislaron varias colonias transformantes resistentes a kanamicina. Se evaluó la presencia del plásmido correspondiente mediante PCR de colonia usando los oligonucleótidos IMR10 (oligonucleótido sentido forward) e IMR11 (oligonucleótido reverso), los cuales aparean con la región promotora y terminadora localizadas en el plásmido destino.

En la figura 16 se muestra el análisis por PCR de las colonias para las construcciones que flanquean a la región codificante para cada una de las regiones que

codifican MAHS, SAHS y MAHS. Además, se utilizaron los oligonucleótidos específicos para cada TDPs y mNG específica, descritos en la Tabla 2.

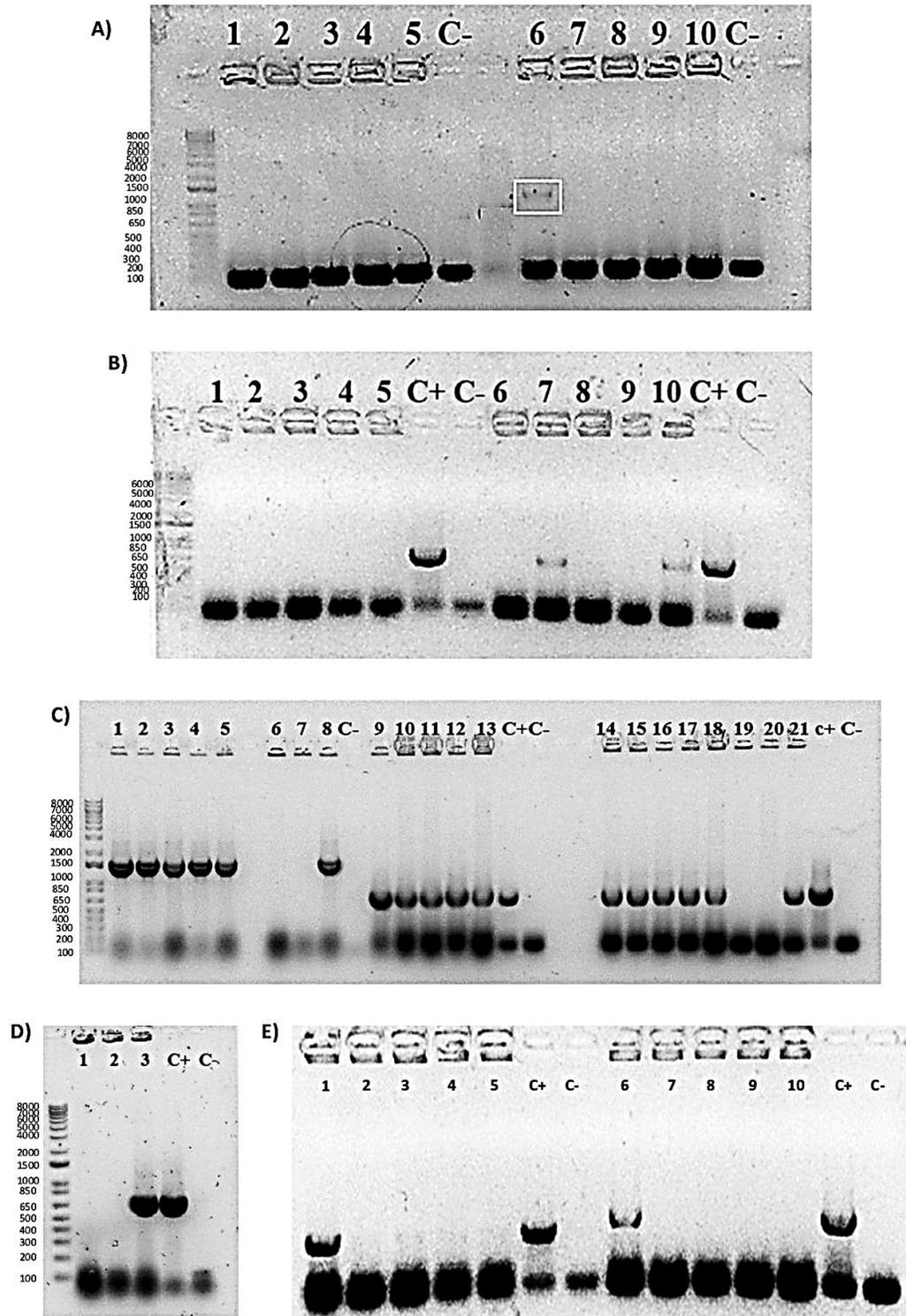


Figura 16. PCR de colonia de las posibles construcciones pGPTVII-MAHSmNG y pGPTVII-SAHSmNG. A) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe de las posibles colonias transformantes pGPTVII-MAHSmNG (A1-A5) y pGPTVII-SAHSmNG (A6-A10) con los oligonucleótidos IMR10 e IMR11. B) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde la región amplificada correspondientes de 5 colonias diferentes de la región codificante de MAHS (B1-B5) y mNG con homología con MAHS (B6-B10) con sus oligonucleótidos específicos mostrados en la Tabla 2. C) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se la región amplificada correspondientes de 5 colonias diferentes de pGPTVII-nlsCAHSmNG (C1-C5) y pGPTVII-nlsMAHSmNG (C6-C8), la región codificante de CAHS (C9-C13), la región codificante de MAHS de la clonación de los fragmentos individuales de MAHS y mNG(D1 y D2), la región codificante de MAHS proveniente de clonación con la región amplificada con PCR overlapping (D3), mNG con homología con CAHS (C14-C18) y mNG con homología a MAHS (C19-C21). El control positivo de CAHS(C+), y el control positivo de mNG(c+) tienen el DNA plasmídico específico para cada construcción. El control negativo no tiene colonia ni DNA. E) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestra la región amplificada correspondientes de 5 colonias diferentes de la región codificante de SAHS (E1-E5) y mNG (E6-E10) con sus oligonucleótidos específicos. El control negativo no tiene colonia.

La región amplificada con los oligonucleótidos IMR10 y e IMR11 incluye la región codificante de las TDP con la región codificante para la proteína fluorescente mNeonGreen, además parte de la secuencia del vector (134 pb), por ello los tamaños esperados para SAHSmNG y MAHSmNG son 1,469 pb y 1,694 pb respectivamente (Figura 16A). En la Figura 16B se muestran las regiones que codifican para SAHS y mNG de manera individual, la Figura 16D muestra la región codificante de MAHS y mNG de manera individual para cada colonia. El PCR de la colonia 1 de la construcción de SAHSmNG mostró una banda correspondiente a los pares de base de la región codificante de SAHSmNG (1,269 pb), SAHS, figura E10-E13 (534 pb) y mNeonGreen (711 pb) (Figura E14-E18). Por lo tanto, estos resultados demostraron la identidad de las colonias positivas para la construcción de SAHSmNG. Se eligió la colonia 1 de la construcción SAHSmNG.

Además, la región amplificada de pGPTVII-nlsCAHSmNG se muestra en la Figura 16C (C1-C5), con un tamaño de 1,629 pb, la región que codifica para la proteína CAHS (Figura 16C C10-C13) tiene un tamaño de 835 pb y la región que codifica para la proteína mNG con homología a CAHS tiene un tamaño de 711 pb, los cuales corresponden a los tamaños esperados. Estos resultados demostraron la identidad de todas las colonias positivas para la construcción de CAHSmNG. Se eligió la colonia 3 de la construcción CAHSmNG

Sin embargo, ninguna colonia de la construcción MAHSmNG mostraron la región de CAHSmNG con los oligonucleótidos IMR10 e IMR11 (Figura 16A), tampoco se obtuvieron fragmentos individuales de la región amplificante de MAHS (759 pb). Por otro lado, ninguna colonia de MAHSmNG resultó positiva, por lo que se prosiguió a realizar PCR overlapping (Figura 17).

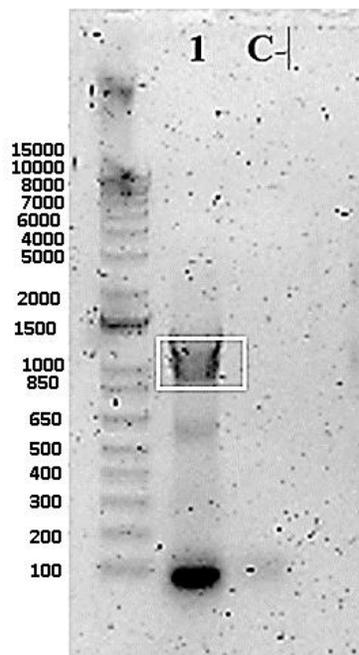


Figura 17. Reacción en cadena de la polimerasa de extensión superpuesta (PCR overlapping) de MAHSmNG. Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestra el PCR overlapping de MAHS con mNG. El tamaño esperado fue de 1,594 pb, el recuadro blanco muestra la banda con el tamaño esperado. En el control negativo (C-) no se colocó DNA.

Como se mencionó anteriormente, el tamaño esperado para la región codificante de MAHSmNG con los oligonucleótidos IMR10 e IMR11 fue de 1,594 pb. En la figura 17 se muestran las diferentes bandas del PCR overlapping. En el carril 1, se observa la banda consistente con el tamaño esperado de la construcción. Una vez purificada la banda, se realizó la clonación del fragmento MAHSmNG con el vector pGPTVII-nlsSED1 digerido. Además, se realizó nuevamente la clonación con los fragmentos amplificados individuales de MAHS y mNG con el vector pGPTVII-nlsSED1 digeridos (Figura 17).

Se extrajo el DNA plasmídico de cada una de las posibles colonias positivas mediante miniprep clásico y se corroboró su identidad por secuenciación por el método de Sanger en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Para confirmar la homología con la construcción esperada, los resultados de la secuenciación se usaron para realizar un alineamiento de secuencia mediante la herramienta T-Coffee de cada una de las secuencias provenientes de las regiones clonadas contra la secuencia esperada (Anexo 8).

Tabla 5. Análisis de las regiones que codifican para CAHSmNG, MAHSmNG y SAHSmNG.

	SAHSmNG	CAHSmNG	MAHSmNG
Cambios en la secuencia	0	1 mutación con cambio de sentido en CAHS y 1 mutación con cambio de sentido en mNG	2 mutaciones con cambio de sentido en MAHS y 2 mutantes con cambio de sentido en mNG
Pares de bases ausentes	0	0	0
Pares de bases insertados	0	0	0

Se analizaron los cambios en la secuencia de las diferentes construcciones con el programa *SnapGene* y no se observó que los cambios previamente mencionados se

localizan en regiones importantes como la unión entre las proteínas TDP y la proteína mNG, lo cual descartó su relevancia para el estudio de localización.

Para poder realizar la expresión transitoria de *N. benthamiana* con las regiones codificantes de las proteínas TDPs con mNeonGreen, se transformó a *A. thaliana* con las colonias confirmadas por PCR en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 y se seleccionaron en medio LB con antibióticos. Se seleccionaron seis colonias positivas y se corroboraron por PCR de colonia por el método de 30 minutos (Figura 18) empleando los oligonucleótidos IMR10 (Oligonucleótido sentido forward) e IMR11 (Oligonucleótido reverso).

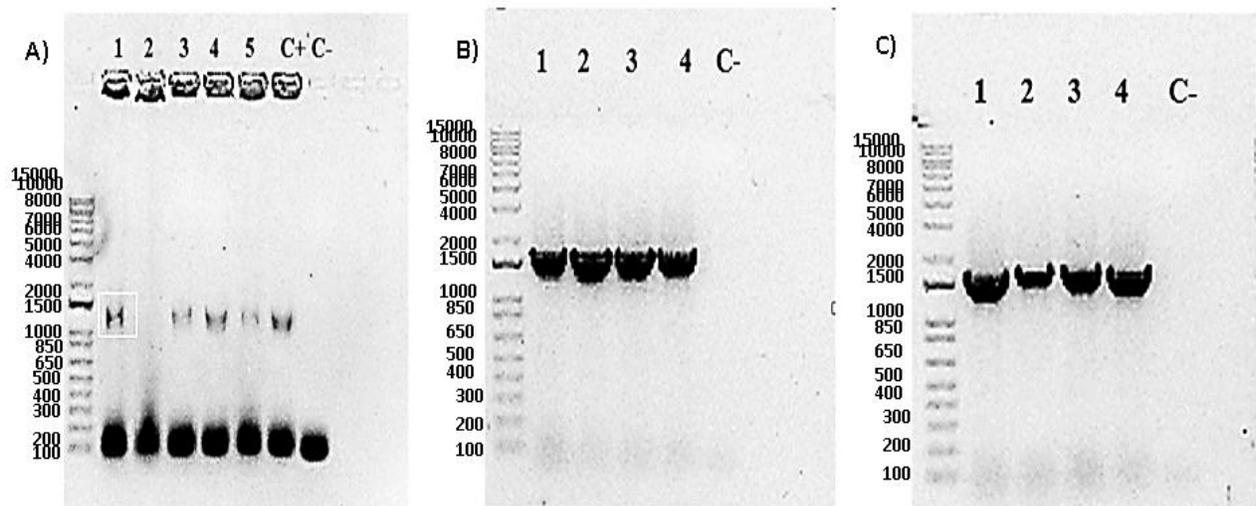


Figura 18. Confirmación de la presencia del plásmido pGPTVII-SAHSmNG, pGPTVII-CAHSmNG y pGPTVII-MAHSmNG en *A. tumefaciens* GV3101. A) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestra el fragmento correspondiente de la región codificante de SAHSmNG en 5 colonias. B) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestra el fragmento correspondiente de la región codificante de CAHSmNG en 4 colonias. C) Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X teñido con SYBR Safe, donde se muestra el fragmento correspondiente de la región codificante de MAHSmNG en 5 colonias. Como control positivo (C+) se utilizó DNA plasmídico. Para el control negativo no se utilizó colonia.

La región amplificada de la construcción SAHSmNG, CAHSmNG y MAHSmNG incluye la parte de la secuencia del vector, por ello los tamaños esperados son 1,469 pb, 1,646 pb y 1,694 pb, respectivamente. En todas las construcciones se obtuvo el tamaño esperado en casi todas las colonias (Figura 18). Se seleccionó una colonia positiva para cada construcción y se prosiguió a realizar la transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana*.

Para cada construcción se transformaron 5 hojas, las cuales mostraron fluorescencia a partir de 5 días posteriores a la infiltración (Figura 19) y se observaron inicialmente en un transiluminador y posteriormente en el microscopio confocal.

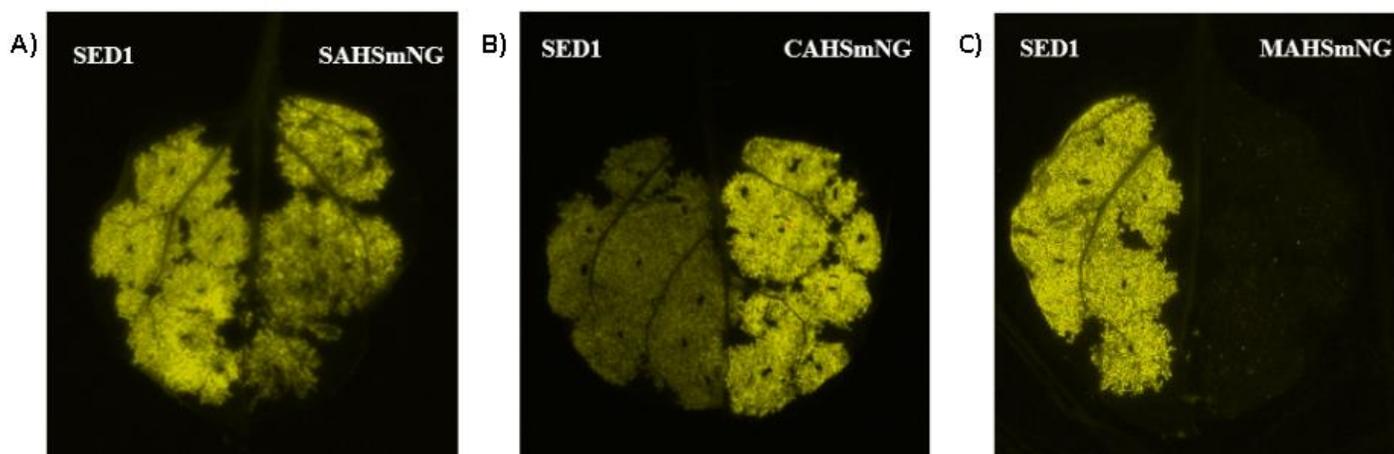


Figura 19. Imágenes de fluorescencia de la transformación transitoria en hojas de *N. benthamiana* con las construcciones (A) pGPTVII-SAHSmNG, (B) pGPTVII-CAHSmNG y (C) pGPTVII-MAHSmNG. Se utilizó la construcción SED1 como control positivo de transformación.

Se observó la expresión de las construcciones con el vector pGPTVII-SAHSmNG, pGPTVII-CAHSmNG y pGPTVII-MAHSmNG a los 5 días de la infiltración. Se observó fluorescencia solo en las construcciones con el vector pGPTVII-SAHSmNG y pGPTVII-CAHSmNG, aunque a diferentes niveles. Para observar más claramente la intensidad de la expresión se obtuvieron imágenes en 3D de *N. benthamiana*.

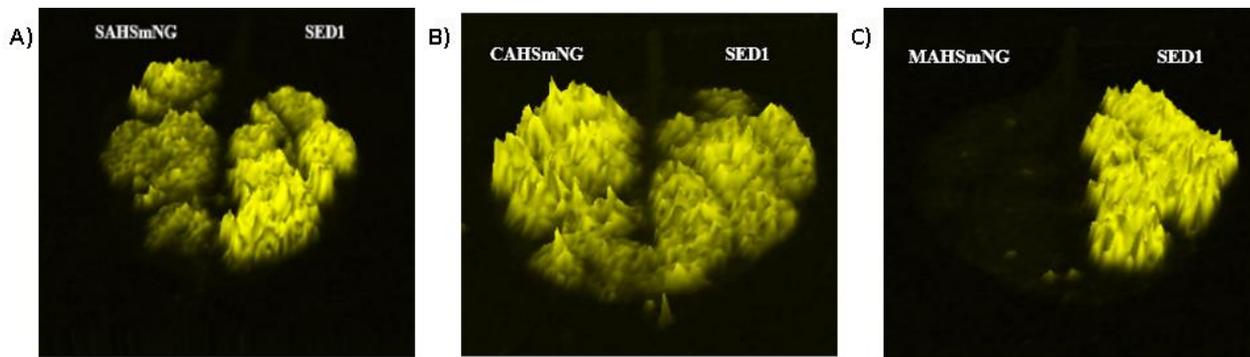


Figura 20. Imágenes en 3 dimensiones de la transformación transitoria en hojas de *N.benthamiana* con las construcciones (A) pGPTVII-SAHSmNG, (B) pGPTVII-CAHSmNG y (C) pGPTVII-MAHSmNG. Se utilizó la construcción SED1 como control positivo de transformación.

La intensidad de la fluorescencia de las hojas de nicotina mostró que la construcción de pGPTVII-CAHSmNG (Figura 20B) es la que muestra el mayor nivel de fluorescencia, siendo esta incluso mayor a la expresión del control SED1. De forma similar, la hoja transformada con la construcción pGPTVII-SAHSmNG (Figura 20A) mostró una alta fluorescencia, sin embargo, esta fue menor que la de SED1. Por el contrario, pGPTVII-MAHSmNG no mostro fluorescencia.

Finalmente, se observó la localización subcelular de las proteínas CAHS y SAHS mediante microscopía confocal. Se observó que la proteína CAHS se localiza en el citoplasma, mientras que la proteína SAHS se encuentra en el espacio extracelular.

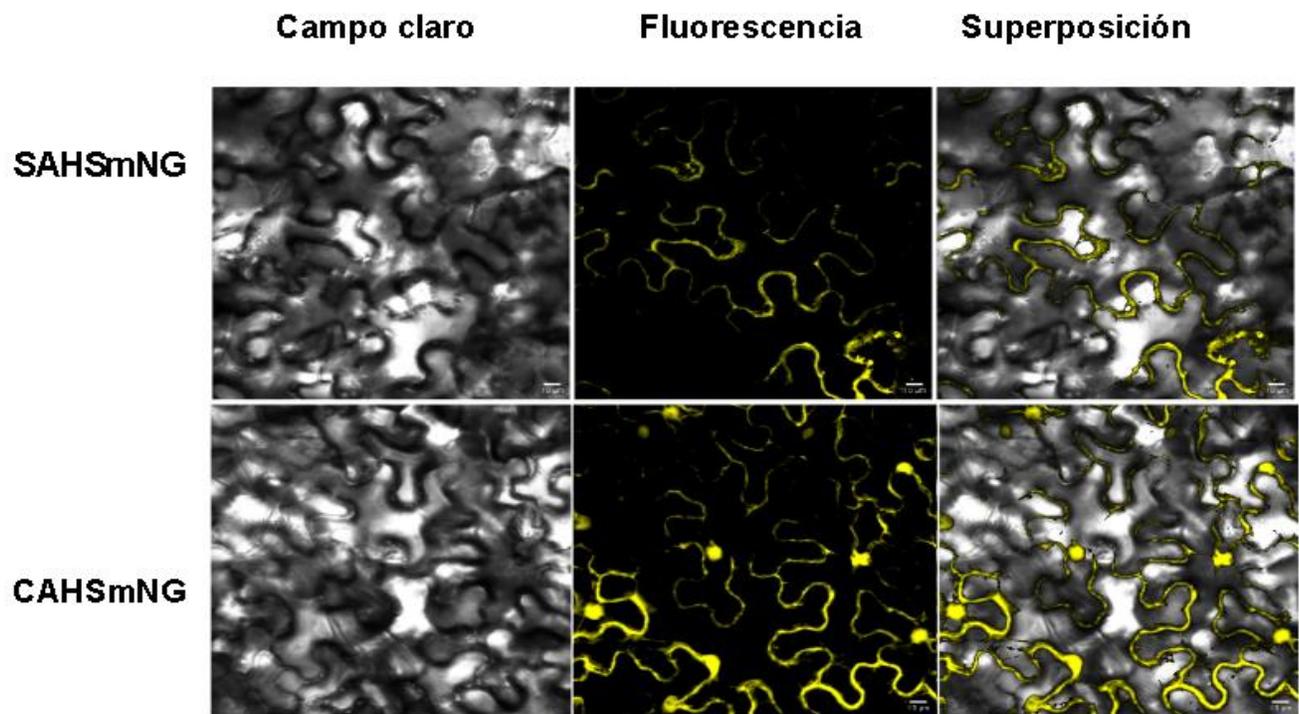


Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de la transformación transitoria en hojas de *N.benthamiana* de las construcciones pGPTVII-SAHSmNG y pGPTVII-CAHSmNG.

7. DISCUSIÓN.

En este trabajo se analizaron las predicciones de los niveles de desorden de las proteínas intrínsecamente desordenadas específicas de tardígrados (TDPs). Se esperaba que todas las TDPs tuvieran un alto porcentaje de desorden a lo largo de su estructura, ya que las proteínas intrínsecamente desordenadas están altamente relacionadas con la resistencia a la desecación en diferentes organismos (Boothby et al, 2017). Las proteínas CAHS y MAHS tienen un alto porcentaje de desorden predicho a lo largo de toda la secuencia. A diferencia de las proteínas anteriores, la proteína SAHS cuenta con un porcentaje bajo de desorden en su estructura. Debido a que el porcentaje de desorden en la estructura de las proteínas puede tener relación en su mecanismo de protección, será necesario realizar experimentos de biofísica de proteínas con proteínas puras para determinar los niveles de desorden experimentalmente.

La proteína CAHS muestra una alta predicción de desorden a lo largo de su secuencia, siendo los extremos N y C donde se muestra principalmente. Además de que se predice una forma de alfa hélice que conecta a las dos regiones terminales. La predicción es consistente con la literatura, donde se reporta que los extremos N y C terminal de la proteína forman regiones relativamente colapsadas que se mantienen interaccionando entre sí por una región de alfa hélice (Boothby et al, 2021). En el modelo de “*adhesivos y espaciadores*”, es un modelo de polimerización, donde los sitios discretos a lo largo de una proteína se designan como adhesivos (regiones que contribuyen con interacciones intermoleculares atractivas) o espaciadores (regiones que no lo hacen, con gran volumen). Ajustándose al modelo de gelificación a través de la polimerización de, las regiones N y C terminal pueden considerarse adhesivos, mientras que la región con alfa hélice se considera un espaciador (Boothby et al, 2021). Basándose en el movimiento molecular lento que reduce la frecuencia y la velocidad de los procesos dañinos durante condiciones de desecación, se propone que la acumulación de TDPs genera una red polimérica que genera una alta viscosidad en el

sistema, ralentizando la difusión y el movimiento molecular (Boothby et al, 2021). Los procesos biológicos se tienen esencialmente, lo que evita una mayor degradación del sistema.

De modo similar a la proteína CAHS, la proteína MAHS cuenta con un porcentaje de desorden alto (52.7 %) y cuenta con regiones que podría formar alfa hélice. La proteína MAHS es estructuralmente similar a las proteínas LEA de la familia 3, por lo tanto, la proteína MAHS podrían proteger las membranas de las mitocondrias mediante un mecanismo similar a las proteínas LEA del grupo 3. Las proteínas LEA del grupo 3 experimentan una transición estructural tras la desecación a hélices α . La proteína LEA mitocondrial *Ps*LEAM se pliega de tal manera que la hélice α que se forma tiene residuos cargados negativamente a lo largo de la cara inferior de la hélice, con residuos no polares orientados opuestamente a las cargas negativas a lo largo de la cara superior de la hélice. La cara cargada negativamente de la hélice se orienta hacia el citoplasma, mientras que las cargadas positivas se colocan entre los grupos de cabeza de fosfolípidos cargados negativamente de los fosfolípidos de membrana adyacentes. Las proteínas de la familia MAHS muestran arreglos similares de residuos cargados y no cargados, lo que indica que pueden seguir un mecanismo similar de formación helicoidal que podría permitir la asociación de membrana y la estabilización de las mismas (Hesgrove y Boothby, 2020). El alfa hélice de la proteína MAHS podría interaccionar con la membrana mitocondrial y, así como mencionan Hesgrove C. S y Thomas C. B (2020), prevenir la transición del estado cristalino al mantener el espacio adecuado entre los grupos de cabeza de fosfolípidos mediante el alfa hélice de la proteína. Además, la expresión constitutiva de proteínas individuales de la familia MAHS en células humanas mejoró la tolerancia hiperosmótica, en comparación con las células que no expresan proteínas MAHS (Tanaka et al, 2015).

Comparado con las proteínas anteriores, la proteína SAHS mostró un porcentaje de desorden menor (11.89 %) y una estructura de barril beta. Como se mencionó anteriormente, existe similitud entre algunas proteínas SAHS y las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) (Hesgrove y Boothby, 2020). Las proteínas FABP son un tipo de proteínas solubles que se encuentra abundantemente en el citoplasma de los hepatocitos y en menor medida en el núcleo y la membrana mitocondrial externa (Wang et al, 2015). Las proteínas FABP están caracterizadas por una estructura de barril β antiparalelo con un bolsillo de unión FA interno y una tapa de hélice-giro-hélice. Dado que las FABP son capaces de unirse a una amplia gama de moléculas, no solamente ácidos grasos, la proteína SAHS podría unirse a otras moléculas presentes en vía secretora o espacio extracelular (Boothby, 2020). Además, las regiones desordenadas de las proteínas SAHS pueden darle plasticidad en la estructura y función. Dicho lo anterior podemos sugerir que las proteínas SAHS pueden actuar como moléculas chaperonas. El mecanismo de las moléculas chaperonas es similar entre ellas, basándose en la unión de superficies hidrofóbicas expuestas de la proteína, la forma dimérica favorece la flexibilidad de la estructura de las chaperonas volviéndose más dinámicas y en algunos casos, se pueden organizar en oligómeros de dímeros (Nava et al, 2020). En la proteína SAHS esta unión puede ser gracias a la estructura de barril beta, además esta proteína podría hacer contactos cuaternarios lo cual favorece su flexibilidad de su estructura.

Además, en este trabajo se compararon los parámetros de hidropatía media, desorden y carga neta media de las TDPs con las proteínas LEA. En trabajos anteriores, se realizó un análisis masivo para comparar los parámetros fisicoquímicos de las proteínas LEA y el resto de proteínas de proteomas de distintas especies de plantas (Lozano, 2021). En dicho trabajo se encontró que valores altos de desorden promovido (≥ 0.76) baja hidropatía (> 0.46) y baja carga neta media (≤ 0.035) separaban hasta en un 98.56 % a un grupo de proteínas LEA del resto de las proteínas de su proteoma, las cuales nombraron proteínas tipo-LEA. Se puede observar que la proteína CAHS es la

única que cumple con los parámetros de hidropatía media, desorden y carga neta media, siendo por lo tanto la única proteína que es similar a las proteínas LEA. Debido a que la presencia de proteínas LEA en plantas y levaduras confiere tolerancia al déficit hídrico sugiere que la similitud estructural con las proteínas CAHS podrían conferir resistencia al ser expresadas en plantas.

Para saber si las proteínas CAHS, MAHS y SAHS eran capaces de expresarse en células vegetales y conocer su localización en la célula, se realizó la clonación de la región codificante de las diferentes TDP con la proteína fluorescente mNeonGreen en el plásmido pGPTVII. Al ser expresadas las construcciones de CAHS, MAHS y SAHS fusionadas a la proteína mNeonGreen, no todas las proteínas se expresaron adecuadamente en *N. benthamiana*. La construcción MAHS-mNG no fue capaz de expresarse en hojas de *N. benthamiana*. Esta construcción tiene 6 mutaciones de cambio de sentido en su secuencia, siendo esta la posible razón por la que es incapaz de ser expresada en células vegetales. La proteína CAHS-mNG se acumuló en citoplasma y posiblemente en núcleo, mientras que la proteína SAHS-mNG se encuentra en el espacio extracelular, siendo esta la localización esperada para dichas proteínas. Debido a que la proteína SAHS se localizó en el espacio extracelular es probable que la proteína SAHS proteja los componentes extracelulares y/o los orgánulos secretores en la anhidrobiosis cuando sea expresado en plantas.

8. CONCLUSIONES

Las proteínas CAHS y MAHS mostraron porcentajes altos de desorden, mientras que la proteína SAHS mostró un porcentaje de predicción bajo.

La proteína CAHS tiene características fisicoquímicas semejantes a las proteínas LEA sobreexpresadas en condiciones de desecación.

Se generaron líneas transgénicas homocigotas que expresan a la proteína SAHS y líneas heterocigotas que expresan a las proteínas CAHS y MAHS.

La proteína SAHS se localiza en el espacio extracelular en células de la epidermis de hojas de *N. benthamiana*.

La proteína CAHS se localiza en citoplasma y posiblemente en núcleo en células de la epidermis de hojas de *N. benthamiana*.

9. PERSPECTIVAS

Realizar western blot para detectar la correcta expresión de las proteínas MAHS, CAHS y SAHS en las plantas transgénicas de *A. thaliana*.

Realizar experimentos de desecación con las líneas transgénicas homocigotas para determinar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas CASH, SAHS o MAHS sobre el fenotipo de resistencia a condiciones de estrés en *A. thaliana*.

10. REFERENCIAS.

1. Zavala G. (2008). Medio Ambiente. International Recovery Platform. International Strategy for Disaster Reduction. Obtenido el 08/03/2022, de:<https://www.eird.org/pr14/cd/documentos/espanol/Publicacionesrelevantes/Recuperacion/5-Med-Ambiente.pdf>
2. Van Der Z. (2008). Environmental Factors Affecting Plant Growth. Oregon State University. Obtenido el 06/03/2022, de <https://extension.oregonstate.edu/node/115936/printable/print>
3. Shafteel H, Callery S, Jackson R, Bailey D. (2022). The Effects of Climate Change. Global Climate Change.Nasa. Obtenido el 06/03/22. de:<https://climate.nasa.gov/effects/>
4. Ruiz C, Medina G, Sánchez G, Villavicencio G, Durán P, Grageda G y García R. (2016). Regionalización del cambio climático en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(spe13), 2451-2464. Obtenido el 10/3/22 de:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000902451&lng=es&tlng=es.
5. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2016). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México.Gobierno de México. Obtenido el 11/03/2022, de: <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/cap3.html#tema2>
6. Boothby T, Hesgrove C, Nguyen K, Childs C, Shraddha K, Medina B. ,...:(2021). Molecular Swiss Army Knives: Tardigrade CAHS Proteins Mediate Desiccation Tolerance Through Multiple Mechanisms. *bioRxiv/ 2021.08.16.456555*. Obtenido el 21/03/2022 de:<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.08.16.456555v3>
7. Vazquez S. (2019).Búsqueda de genes relacionados con la resistencia a desecación en bacterias, mediante metagenómica de suelos de Puebla y Querétaro para obtener el grado de maestro en Ciencias (Microbiología) con

opción en Bioquímica y Genética microbiana. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

8. Boothby T, Tapia H, Brozena A, Pielak G, Koshland D, Goldstein B. (2017). Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Molecular cell*, 65(6), 975–984.e5. Obtenido el 11/03/2021 de: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.018>
9. Grzyb, T., Skłodowska, A. (2022). Introduction to Bacterial Anhydrobiosis: A General Perspective and the Mechanisms of Desiccation-Associated Damage. *Microorganisms*, 10(2), 432. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020432>
10. Pereyra C, Quiriban (2014). Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico. SEMIÁRIDA Revista de Facultad de Agronomía UNLPam Vol 24(1): 55-67 6300. Obtenido el 15/03/22 de: <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/semiarida/article/view/3024/2935>
11. Ramos A, Molina M y García G (2003). Tolerancia a la desecación y deterioro fisiológico en semillas de calabaza (cucurbita moschata duchesne ex lam.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26 (3), 161-166. Obtenido el 23/1/22 de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61026305>
12. Zuñiga G, Pizarro M . Contreras, A, Kohler H .(2012). TOLERANCIA LA DESECACION EN BRIOFITAS . PARTICIPACION DE AZUCARES. Obtenido 15/03/22. de: <https://online.unisc.br/seer/index.php/cadpesquisa/article/view/4404>
13. Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L. (2014). Response of plants to water stress . *Frontiers in Plant Science* DOI: 10.3389/fpls.2014.00086 Obtenido el 15/03/22 de: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00086>
14. Cuevas V, C. L., Saab, G., Reyes, J. L., & Covarrubias, A. A. (2016). The Unstructured N-terminal Region of Arabidopsis Group 4 Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins Is Required for Folding and for Chaperone-like Activity

- under Water Deficit. *The Journal of biological chemistry*, 291(20), 10893–10903. Obtenido el: 16/03/22 de: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720318>
15. Tanaka A, Nakano T, Watanabe K, Masuda K, Honda G, Kamata S, Yasui R, Kozuka-Hata H, Watanabe C, Chinen T, Kitagawa D, Sawai S, Oyama M, Yanagisawa M, Kunieda T. (2022) Stress-dependent cell stiffening by tardigrade tolerance proteins that reversibly form a filamentous network and gel. *PLoS Biol.* 6;20(9):e3001780. doi: 10.1371/journal.pbio.3001780. PMID: 36067153; PMCID: PMC9592077
16. Uversky, V. (2009.). Intrinsically disordered proteins and their environment: Effects of strong denaturants, temperature, pH, Counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding. *Protein Journal*, 28(7–8), 305–325. Obtenido el 23/1/22 de: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s10930-009-9201-4>
17. Uversky, V y Dunker, A. (2010). Understanding protein non-folding. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1804, 1231–1264. Obtenido el 13/2/22 de: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.017>
18. Uversky V. N. (2017). Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membraneless organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Curr Opin Struct Biol.* 2017 Jun;44:18-30. doi: 10.1016/j.sbi.2016.10.015. Epub 2016 Nov 10. PMID: 27838525.
19. Britannica, T. Editors of Encyclopedia (2022). *Tardigrade*. *Encyclopedia Britannica*. Obtenida el 23/1/22 de: <https://www.britannica.com/animal/tardigrade>
20. Guidetti, R.; McInnes, S.J.; Kristensen, R.M. McInnes, Sandra J. (2022). World List of Tardigrada. Obtenido el: 05/04/22 de: <https://www.marinespecies.org/tardigrad>. doi:10.14284/361
21. Randolph. W.(2022). Tardigrades. *American Scientist*. Obtenido el:05/04/22 de: <https://www.americanscientist.org/article/tardigrades>

22. Chavez, C., Cruz-Becerra, G., Fei, J., Kassavetis, G. A., & Kadonaga, J. T. (2019). The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals. *eLife*, 8, e47682. Obtenido el 06/04/22 de: <https://doi.org/10.7554/eLife.47682>.
23. Yagi-Utsumi, M., Aoki, K., Watanabe, H., Song, C., Nishimura, S., Satoh, T., Yanaka, S., Ganser, C., Tanaka, S., Schnapka, V., Goh, E. W., Furutani, Y., Murata, K., Uchihashi, T., Arakawa, K., & Kato, K. (2021). Desiccation-induced fibrous condensation of CAHS protein from an anhydrobiotic tardigrade. Obtenido el 06/04/22. *Scientific reports*, 11(1), 21328. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00724-6>
24. Fukuda, Y., Inoue, T. (2018). Crystal structure of secretory abundant heat soluble protein 4 from one of the toughest "water bears" micro-animals *Ramazzottius varieornatus*. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 27(5), 993–999. <https://doi.org/10.1002/pro.3393>
25. Hesgrove, C. y, Boothby, T.C.(2020). The biology of tardigrade disordered proteins in extreme stress tolerance. *Cell Commun Signal* 18, 178 . <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00670-2>
26. Tanaka, S., Tanaka, J., Miwa, Y., Horikawa, D. D., Katayama, T., Arakawa, K., Toyoda, A., Kubo, T., & Kunieda, T. (2015). Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic Tardigrade improve osmotic tolerance of human cells. *PloS one*, 10(2), e0118272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118272>
27. Ayala C. (2022) NOTAS SOBRE IMPACTOS FÍSICOS PREVISIBLES DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE LOS LAGOS Y HUMEDALES ESPAÑOLES. Instituto Geológico y Minero de España. Obtenido el 09/03/22, de [:https://www.divulgameteo.es/uploads/Impacto-CC-lagos-humedales.pdf](https://www.divulgameteo.es/uploads/Impacto-CC-lagos-humedales.pdf)

28. Kaur, H., Kohli, SK, Khanna, K. y Bhardwaj, R. (2021). Scrutinizing the impact of water deficit in plants: Transcriptional regulation, signaling, photosynthetic efficacy, and management. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 935–962. <https://doi.org/10.1111/ppl.13389>
29. Cuevas V y Covarrubias R.(2011). Las proteínas desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 14: 97-105.
30. Battaglia, M, Olvera C, Garciarubio, A, Campos, F y Covarrubias, A.. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology*, 148(1), 6–24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
31. Wang G, Bonkovsky HL, de Lemos A, Burczynski FJ.(2015). Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J Lipid Res*. Dec;56(12):2238-47. doi: 10.1194/jlr.R056705. Epub 2015 Oct 6. PMID: 26443794; PMCID: PMC4655993.
32. Nava R y Hansberg, W. (2020). Características comunes de las chaperonas pequeñas y diméricas. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23, e20200234. Epub 07 de octubre de 2020. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.234/>
33. Dirk K. Hinch, Anja Thalhammer; LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochem Soc Trans* 1 October 2012; 40 (5): 1000–1003. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20120109>
34. Michelle Lozano (2023). Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas LEA y su participación en la tolerancia a la desecación de diversos organismos (Tesis para optar por el grado de Químico Farmacéutico Biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México

11. ANEXOS

Anexo 1. Transformación de One shot Mach1

1. Descongelar 2 tubos de células competentes One shot Mach1, plásmidos y H₂O (Control negativo)
2. En tubos de 0.5 colocar 1 μ L de plásmidos y H₂O NF, respectivamente.
3. Dejar reposar en hielo(15-30 minutos)
4. Dar un golpe de calor a 42°C por 45s
5. Pasar inmediatamente al hielo y dejarlo por 2 minutos.
6. Recuperar en 1 mL de LB estéril e incubar a 37°C por 1h
7. Centrifugar a máxima velocidad (12000 rpm) por 1h.
8. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón (pipeteando) con el sobrenadante que sobró.
9. Plaquear usando perlas de vidrio estériles en cajas de LB + antibiótico
10. Incubar a 37°C

Anexo 2. PCR de colonia. One shot Mach

1. Colocar 1 fragmento de la colonia en un tubo de PCR con 50 μ L H₂O
2. Preparar 25 μ L de mix de PCR. En un tubo aparte
3. Correr el PCR

Mix PCR

Reactivos	1x
Go Taq	12.5 μ L
H ₂ O NF	5.5 μ L
Oligo reverse (IMR11)	2.5 μ L
Oligo forward (IMR10)	2.5 μ L
Colonia	.-
Total	25 μ L

Condiciones de PCR

35 ciclos

94°C 10 minutos

94°C 30s

69°C 1 minuto

72°C 2 minutos

72°C 5 minutos

4°C ∞

Anexo 3. Miniprep clásico. ZYMO RESEARCH

1. Un día anterior se colocó un inóculo de la bacteria E.coli con la construcción en 3 mL de medio LB con kanamicina..
2. Centrifugar los 3 mL del cultivo bacteriano en un tubo limpio de 1.5mL por 30s a 16,000rpm. Descartar el sobrenadante
3. Adicionar 200 de amortiguador P1(Red) al botón bacteriano y resuspender.
4. Adicionar 200 µl de amortiguador P2 (Blue) e inmediatamente mezclar por inversión de 2-4 veces. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las células están completamente lisadas cuando la solución está clara, morada y viscosa.
5. Adicionar 400 µl de amortiguador P3 (Yellow) y mezclar gentilmente por inversión. El tubo se tornará amarillo cuando la neutralización esté completa.
6. Centrifugar el lisado neutralizado por 5 minutos a 16,000rpm
7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL y colocar 300µl de etanol puro frío.
8. Adicionar la mezcla completa del paso 7 dentro de la columna de Zymo-Spin™ IIN. Centrifugar por 60s a 14,000rpms. Descartar el sobrenadante.
9. Adicionar 200 µl de amortiguador Endo-Wash a la columna Zymo-Spin™ IIN. Centrifugar por 30s a 16000rpm. Descartar el sobrenadante.
10. Adicionar 400 µl de amortiguador Plasmid Wash a la columna. Centrifugar por 30s a rpm. Descartar el sobrenadante.
11. Centrifugar el tubo con la columna por 30s a 16,000rpm
12. Adicionar 32 µl de H₂O caliente(50°C). Incubar por 8 minutos a temperatura ambiente.
13. Colocar la columna en un tubo de 1.5mL nuevo. Centrifugar a 16000 rpm por 1 minuto.
14. Medir concentración en nanodrop.

Anexo 4. Transformación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

1. Descongelar las células competentes de *A.tumefaciens* en hielo por 15 minutos
2. Añadir 2 μL de DNA plasmídico a 100 μL de células competentes
3. Congelar las células en N₂ líquido por 5 minutos
4. Incubar a 37°C por 25 minutos en thermodock
5. Agregar 1mL de medio LB sin antibiótico
6. Incubar las células a 30°C por 3 h en agitación.
7. Plaquear 100 μL de células y 900 μL de medio LB. Se mezcla previamente en un tubo y después con una pipeta traspasa a placas.
8. Plaquear las células en cajas de medio LB con rifampicina (250 μL) y kanamicina (500 μL). Se siembra para aislar colonias
9. Incubar a 28°C por 2-3 días

Anexo 5. PCR de colonia. *Agrobacterium tumefaciens* (Método de 30 minutos)

1. Colocar 1 fragmento de la colonia en un tubo de PCR con 50 μ L H₂O
2. Preparar 25 μ L de mix de PCR. En un tubo aparte
3. Correr el PCR

Mix PCR

Reactivos	1x
Go Taq	12.5 μ L
H ₂ O NF	5.5 μ L
Oligo reverso (IMR11)	2.5 μ L
Oligo forward (IMR10)	2.5 μ L
Colonia	.
Total	25 μ L

Condiciones de PCR

35 ciclos

94°C 10 minutos

94°C 30s

69°C 1 minuto

72°C 2 minutos

72°C 5 minutos

4°C ∞

Anexo 6. Extracción de DNA de *Arabidopsis thaliana* mediante CTAB

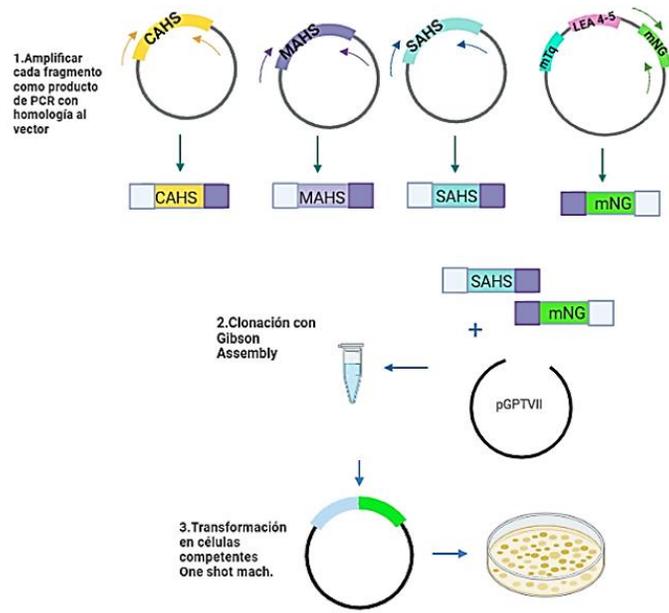
1. Cortar 200 mg de tejido planta, sumergir con pinzas en N₂ líquido y en tubos de 2 mL transferir. Adicionar 500 uL de amortiguador CTAB / Machacar con un pistilo y vortexear.
2. Inocular CTAB/extracto de planta por 15 minutos a 55 °C.
3. Centrifugar CTAB/extracto de planta a 14000 rpm por 5 min. Transferir sobrenadante a tubo limpio, descartar el precipitado.
4. Adicionar 250 uL de Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:1). Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto. Transferir la fase orgánica a un tubo limpio.
5. Adicionar 50 uL de 7.5 M de acetato de amonio y 500 uL de etanol absoluto frío (-20°C).
6. Invertir tubos despacio
7. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto, descartar sobrenadante.
8. Realizar 2 lavados con 500 uL de etanol al 70 % frío. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
9. Descartar sobrenadante y colocar el tubo de cabeza por 10 o 15 min para secar.
10. Resuspender en 62 uL de H₂O NF.
11. Centrifugar e incubar a 65 °C por 10 min.
12. Medir concentración en nanodrop.

Anexo 7. Método de clonación *Gibson Assembly*

1. Se mezcló la siguiente reacción en hielo.

Componentes	10 μ L
Mezcla maestra de montaje de Gibson (2X)	5 μ L
H ₂ O libre de nucleasas	Para que el volumen total sea 10 μ L
mNG	0.5 μ L
TDPs	0.5 μ L
Plasmido pGPTVII-nlsSED2	20 ng

2. Se incubaron las muestras en un termociclador a 50°C durante 20 minutos.
3. Se transformaron las células de *E. coli* competentes (One Shot Mach1) con 2 μ l de la reacción de Gibson



Anexo 8. Resultado de la secuenciación de la región codificante de CAHS

Clave:CAHS3VForward

Oligo: IMR010

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
ORIGINAL      TGTTAG-----TTTC---TA-----GTTTGTGCGATCGAATTTGTGCG
RESULTADO     TCCACCRSCCWAWAGACMCWTAWYWMKGTGTTGCGATCGAATTTGTGCG
*              *   **      * *****
```

```
ORIGINAL      ATTAATCTGAGTTTTTCTGATTAACAGACTAGTGGAGGGATGGACTATAA
RESULTADO     ATTAATCTGAGTTTTTCTGATTAA-AGACTAGTGGAGGCATGGACTATAA
*****
```

```
ORIGINAL      GGACGACGACGATAAAAATGTCTGGCAGG-----AATGTCGAGTCTCACA
RESULTADO     GGACGACGACGATAAAAATGTCTGGCAGGMWYYTYG-----AGTCTCACA
*****
```

```
ORIGINAL      TGGAACGTAATGAGAAGGTAGTCGTGAATAATTCAGGCCACGCCGACGTA
RESULTADO     TGGAACGTAATGAGAAGGTAGTCGTGAATAATTCAGGCCACGCCGACGTA
*****
```

```
ORIGINAL      AAGAAGCAACAGCAACAAGTAGAACATACGGAGTTTACCCATACGGAAGT
RESULTADO     AAGAAGCAACAGCAACAAGTAGAACATACGGAGTTTACCCATACGGAAGT
*****
```

```
ORIGINAL      AAAGGCTCCGCTGATACACCCAGCACCGCCATTATATCCACCGGTGCCG
RESULTADO     AAAGGCTCCGCTGATACACCCAGCACCGCCATTATATCCACCGGTGCCG
*****
```

```
ORIGINAL      CAGGTTTGGCGGAAGAGATTGTCGGTCAAGTTTTACCGCCAGCGCTGCT
RESULTADO     CAGGTTTGGCGGAAGAGATTGTCGGTCAAGTTTTACCGCCAGCGCTGCT
```

ORIGINAL AGAATTAGTGGAGGCACAGCCGAGGTCCACCTCCAGCCATCCGCAGCAAT

RESULTADO AGAATTAGTGGAGGCACAGCCGAGGTCCACCTCCAGCCATCCGCAGCAAT

ORIGINAL GACAGAGGAGGCTCGAAGGGATCAGGAACGTTATAGACAGGAGCAGGAGA

RESULTADO GACAGAGGAGGCTCGAAGGGATCAGGAACGTTATAGACAGGAGCAGGAGA

ORIGINAL GTATCGCAAAACAACAAGAACGTGAGATGGAAAAAAAAACTGAGGCTTAC

RESULTADO GTATCGCAAAACAACAAGAACGTGAGATGGAAAAAAAAACTGAGGCTTAC

ORIGINAL CGAAAGACAGCCGAAGCAGAGGCAGAAAAAATAAGAAAAGAGCTAGAGAA

RESULTADO CGAAAGACAGCCGAAGCAGAGGCAGAAAAAATAAGAAAAGAGCTAGAGAA

ORIGINAL ACAGCATGCGAGGGATGTTGAGTTCAGAAAGGACCTCATAGAAAGCACAA

RESULTADO ACAGCATGCGAGGGATGTTGAGTTCAGAAAGGACCTCATAGAAAGCACAA

ORIGINAL TCGACCGTCAAAGAGGGAAGTGGATCTTGAGGCAAAGATGGCAAAGA

RESULTADO TCGACCGTCAAAGAGGGAAGTGGATCTTGAGGCAAAGATGGCAAAGA

ORIGINAL GAACTCGATAGAGAAGGGCAATTAGCCAAAGAGGCTCTTGAAAGGAGCCG

RESULTADO GAACTCGATAGAGAAGGGCAATTAGCCAAAGAGGCTCTTGAAAGGAGCCG

ORIGINAL ATTGGCTACGAATGTCGAAGTAACTTTGATTCAGCAGCAGGACATACTG

RESULTADO ATTGGCTACGAATGTCGAAGTAACTTTGATTCAGCAGCAGGACATACTA

ORIGINAL TGTCCGGCGGTACAACAGTTAGTAC--G-----AGT----GA-----
RESULTADO TGTCCGGCGGTACAACAGTTAGTACSAGTGGSGAGAAGGGGAAAWWRAG
***** * ** **

ORIGINAL -----
RESULTADO GAAAACMATWTAAWCTMTGGGTTKKRARGGGGRARRRAAAAAAWGK GSM

ORIGINAL -----C-----AAGAT
RESULTADO GRSTGSGCCWSCCCCCMKAGMGTGCACYTYTCTGTARATAAWAACGGC
* **

ORIGINAL GGAAATCA----AGA-----
RESULTADO GGAAATTTTRATATGGGGGGCGGGKMSCGGTACCCAMWMGACGGTTMSAR
***** *

ORIGINAL -----GGA-----
RESULTADO GAAMTRAACYTGAAAKARCACCAAAGAAATSGGAGCTMCCCGGGAATCTG

ORIGINAL -----ACACTAGTAG-----ATCT-A-----
RESULTADO GGTGCCGCACTGGTAAGCTGCCCAAMKCGCATCARATGAWGRCCATCMC
**** ** ** *

ORIGINAL -----TGTTAGC-----AAGGGC-GA-GGA-----
RESULTADO GCAGGRGAWGAAGCTCAGCGCKMACGCATGAAGGCCTGACGGAATAACCT
* * *** ***** * ** **

ORIGINAL -----AGACAAC
RESULTADO TATCTCAAGTACATC
*** *

Clave:CAHS3VReverse

Oligo: IMR11

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
ORIGINAL      TGA---C---AA-----G
RESULTADO     CAGAGGCAGAAAAAATTARGAAAWGAGYTWAGGGAATCAGCMTTCGAGTG
                *   **                               *
```

```
ORIGINAL      ATG-----GA-----AA-----TCA--
RESULTADO     ATGTTGWKTTTCAGAAAGGACCTCMTWGAAAAGCCCATTTCGTCCGTTCAAA
                ***           **             **           ***
```

```
ORIGINAL      -AGAG-----GAACA-----
RESULTADO     AAGAGGGAASSAGGATCTTKAGGCAAAGATGGCAAAAAGRGAACCTCGATA
                ****                               ****
```

```
ORIGINAL      -----C-----T-
RESULTADO     GAGAAGGGCAATTAWCCAAAAGAKGCTTTTTTAAWAGGAKYCRATTGGCTA
                                *                               *
```

```
ORIGINAL      -----AGTA-----G-----
RESULTADO     CGAATGTCGAAGTAACTTTGATTTCAGCAGCAGGWCATAMTAKTGTCCGG
                ****           *
```

```
ORIGINAL      -----ATCTATG-----
RESULTADO     CGGTTCAACAAAWRKTCGRGKGACAAGATKGAAATCAAAGAGGAACACTA
                                *** * *
```

```
ORIGINAL      ---G-----TTAGCAAGGGCGAGGAAGACAACATGGCCAGCCTGCCA
RESULTADO     GTAGATYTTATGKTTAGCAAGGGCGAGGAAGACAACATGGCCARCCTGCCA
                *           ****
```

ORIGINAL GCCACCCATGAGCTGCACATCTTCGGTAGCATTAAACGGCGTGGACTTT--
RESULTADO KCCACCCATGAGCTGCACATCTTCGGTAGCATTAAACGGCGTGGAC--TWW
***** *

ORIGINAL GATATGGTGGGTACGGGTACCGGTAACCCAAATGACGGTTACGAGGAACT
RESULTADO GATATGGTGGGTACGGGTACCGGTAACCCAAATGACGGTTACGAGGAACT

ORIGINAL GAACCTGAAGAGCACCAAAGGCGATCTGCAGTTCAGCCCGTGGATCCTGG
RESULTADO GAACCTGAAGAGCACCAAAGGCGATCTGCAGTTCAGCCCGTGGATCCTGG

ORIGINAL TGCCGCACATTGGTTATGGCTTTCACCAGTATCTGCCGTATCCAGATGGT
RESULTADO TGCCGCACATTGGTTATGGCTTTCACCAGTATCTGCCGTATCCAGATGGT

ORIGINAL ATGAGCCCATTCCAGGCTGCGATGGTGGATGGTAGCGGCTA-CCAGGTGC
RESULTADO ATGAGCCCATTCCAGGCTGCGATGGTGGATGGTAGCGGCTASC-AGGTGC
***** *

ORIGINAL AC--CGTACCATGCAGTTTGAAGACGGCGCCAGCCTGACCGTGAAGTACC
RESULTADO ACMRT--ACCATGCAGTTTGAAGACGGCGCCAGCCTGACCGTGAAGTACC
** *****

ORIGINAL GCTATACCTACGAGGGTAGCCACATCAAGGGCGAAGCGCAGGTGAAAGGT
RESULTADO GCTATACCTACGAGGGTAGCCACATCAAGGGCGAAGCGCAGGTGAAAGGT

ORIGINAL ACCGGCTTCCCGGCTGATGGTCCGGTATGACCAACAGCCTGACCGCTGC
RESULTADO ACCGGCTTCCCGGCTGATGGTCCGGTATGACCAACAGCCTGACCGCTGC

ORIGINAL CGACTGGTGCCGTAGCAAGAAAACCTATCCGAACGATAAGACCATCATT

RESULTADO C GMY TGGTGCCGTAGCAAGAAAACCTATCCGAACGATAAGACCATCATTA

** *****

ORIGINAL GCACCTTTAAATGGAGCTATAACCACCGGTAACGGCAAGCGTTACCGCAGC

RESULTADO GCACCTTTAAATGGAGCTATAACCACCGGTAACGGCAAGCGTTACCGCAGC

ORIGINAL ACCGCTCGTACCACCTATACCTTTGCCAAGCCGATGGCGGCTAACTATCT

RESULTADO ACCGCTCGTACCACCTATACCTTTGCCAAGCCGATGGCGGCTAACTATCT

ORIGINAL GAAAAACCAGCCGATGTACGTGTTCCGCAAGACCGAGCTGAAGCACAGCA

RESULTADO GAAAAACCAGCCGATGTACGTGTTCCGCAAGACCGAGTTGAAGCACAGCA

***** *****

ORIGINAL AAACCGAG--CTGAACTTCAAGGAATGGCAGAAAGCGTTTACCGACGTGA

RESULTADO AAACCGAGSKG--AACTTCAAGGAATGGCAGAAAGCGTTTGCCGACGTGA

***** *****

ORIGINAL TGGGCATGGATGAACTGTACAAATAACCCGGGTAGGAGCTCATATGAAGA

RESULTADO CG-GCATGGATGAACTGTACAAATAACCCGGGTAGGAGCTCATATGAAGA

* *****

ORIGINAL --TGA-AGAT--G-----AAATATTTGGTGTGTCAAAT-----AAAT

RESULTADO KAAGAKAAATYTTRWYYYWTWAAA-----AAGKKS YKTTTT

Anexo 9. Resultado de la secuenciación de la región codificante de MAHS

MAHSmNG

Clave:MAHSForward

Oligo: BMSG004

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

ORIGINAL ATA-----AAATGGCCCGTTTTATGATTAAAGACCTGCAAG
RESULTADO GTGCGGCACTCCTTTTATAATGGCCCGTTT-TGATTAAAGACCTGCAAG
 * ***** *****

ORIGINAL CAGTTTTTAGGGTTTCCAACAGGTTG-CCCAAAGCAGCGTTGAGCACCA
RESULTADO CAGTTTTTAGGGTTTCCAACAGGTTGRCC-AGAGCAGSGTTGAGCACCA
 ***** ** * *****

ORIGINAL GCTGACGGAGACTGCACT---ACGTTGGCAC--ACGCTTTCCTTACGACC
RESULTADO GCTGACGGAGACTGCACTMCST---TK--GCRSGCGCTTTCCTTACGACC
 ***** * * *****

ORIGINAL GCTCGTTCAGGGCTGCGTAAACCGAATGCAGGAAAGTCAGCGATCCACAG
RESULTADO GCTCGTTCAGGGCTGCGTAAACCGAATGCAGGAAAGTCAGCGATCCACAG

ORIGINAL TCCCCCTCCGTGAGTTTCCTGCTAGGGTAGGAGCCGTCGTGCAGGGGATC
RESULTADO TCCCCCTCCGTGAGTTTCCTGCTAGGGTAGGAGCCGTCGTGCAGGGGATC

ORIGINAL CAAGAACAGATGAAAATACTGGCTGGATTTCTTCTCCAGCTTTAGTTAC
RESULTADO CAAGAACAGATGAAAATACTGGCTGGATTTCTTCTCCAGCTTTAGTTAC

ORIGINAL CCGGAGGGATTTGTATTTTATACGGACAAGGTAAATAAGGATACGCACA

RESULTADO CCGGAGGGATTTGTATTTTATACGGACAAGGTAAATAAGGATACGCACA

ORIGINAL AAGAATATCCCGCTGTTGCTGACGAAGTCCATAGCGCGAAGCTACAGGGT

RESULTADO AAGAATATCCCGCTGTTGCTGACGAAGTCCATAGCGCGAAGCTACAGGGT

ORIGINAL CTGAAACCTGAATCTGGTGAAGCCTGTGAGGCGGCTAAACGAGCGAAGGA

RESULTADO CTGAAACCTGAATCTGGTGAAGCCTGTGAGGCGGCTAAACGAGCGAAGGA

ORIGINAL GTTTATGAATCCTCCAGTCAGCCCCTTGATCCTGAAGATAAAAATGAAG

RESULTADO GTTTATGAATCCTCCAGTCAGCCCCTTGATCCTGAAGATAAAAATGAAG

ORIGINAL TAGTGAGGACGCCTGAGATGTCTGGTAGCACTGCAGCAGAAGACCAAAAC

RESULTADO TAGTGAGGACGCCTGAGATGTCTGGTAGCACTGCAGCAGAAGCCAAAAC

ORIGINAL GCAGACGAGAGTGGTAAAGCAGCAAAAAGACTTGGAAAGTTTATGAATGA

RESULTADO GCAGACGAGAGTGGTAAAGCAGCAAAAAGACTTGGAAAGTTTATGAATGA

ORIGINAL GGAAATCGCCCCTGAAAGTAAGCCTTTCAAACCATTCGCTAAAGATAGCG

RESULTADO GGAAATCGCCCCTGAAAGTAAGCCTTTCAAACCATTCGCTAAAGATAGCG

ORIGINAL CAAAACGACAGTAAGTTTCACTGACGCCACCGGGGAGAATTTCCGTATA

RESULTADO CAAAACGACAGTAAGTTTCACTGACGCCACCGGGGAGAATTTCCGTATA

ORIGINAL CAGGATCTCAAAAAAGTTCAAGTATTTCCGGAACGCCGGTCGCATTCTGA

RESULTADO CAGGATCTCAAAAAAGTTCAAGTATTTCCGGAACGCTGGTCGCATTCTGA

ORIGINAL AAGCACTAGTAGATCTATGGTTAGCAAGGGCGAGGAAGACAACATGGCCA

RESULTADO AAGCACTAGTAGATCTATGGTTAGCAAGGGCAAGGAAGACAACATGGCCA

ORIGINAL GCCTGCCAGCCACCCATGAGCTGCACATCTTCGGTAGCATTAAACGGCGTG

RESULTADO GCCTGCCAGCCACCCATGAGCTGCACATCTTCGGTAGCATTAAACGGCGT-

Clave:MAHSReverse

Oligo: BVAG006

ORIGINAL -----

RESULTADO CCACCGGGGAGAATTTTCYGTATACAGGATCTCAAAAAAGTTCAAGTATTT

ORIGINAL -----AAGCACTAGTAGATCTATGGTTAGCAA

RESULTADO CCGGGAACGCTGGTYGCATTYGA AAGCACTAGTAGATCTATGGTTAGCAA

ORIGINAL GGGCGAGGAAGACAACATGGCCAGCCTGCCAGCCACCCATGAGCTGCACA

RESULTADO GGGCAAGGAAGACAACATGGCCAGCCTGCCAGCCACCCATGAGCTGCACA

ORIGINAL TCCTCGGTAGCATTAAACGGCGTGGACTTTGATATGGTGGGTGAGGTACC

RESULTADO TCCTCGGTAGCATTAAACGGCGTGGACTTTGATATGGTGGGTGAGGTACC

ORIGINAL GGTAACCCAAATGACGGTTACGAGGAACCTGAACCTGAAGAGCACCAAAGG

RESULTADO GGTAACCCAAATGACGGTTACGAGGAACCTGAACCTGAAGAGCACCAAAGG

ORIGINAL CGATCTGCAGTTCAGCCCCTGGATCCTGGTGCCGCACATTGGTTATGGCT

RESULTADO CGATCTGCAGTTCAGCCCCTGGATCCTGGTGCCGCACATTGGTTATGGCT

ORIGINAL TTCACCAGTATCTGCCGTATCCAGATGGTATGAGCCCATTCCAGGCTGCG

RESULTADO TTCACCAGTATCTGMCGTATCCAGATGGTATGAGCCCATTCCAGGCTGCG

ORIGINAL ATGGTGGATGGTAGCGGCTACCAGGTGCACCGTACCATGCAGTTTGAAGA

RESULTADO ATGGTGGATGGTAGCGGCTACCAGGTGCACCGTACCATGCAGTTTGAAGA

ORIGINAL CGGCGCCAGCCTGACCGTGAACCTACCGCTATACCTACGAGGGTAGCCACA

RESULTADO CGGCGCCAGCCTGACCGTGAACCTACCGCTATACCTACGAGGGTAGCCACA

ORIGINAL TCAAGGGCGAAGCGCAGGTGAAAGGTACCGGCTTCCCGGCTGATGGTCCG

RESULTADO TCAAGGGCGAAGCGCAGGTGAAAGGTACCGGCTTCCCGGCTGATGGTCCG

ORIGINAL GTGATGACCAACAGCCTGACCGCTGCCGACTGGTGCCGTAGCAAGAAAAC

RESULTADO GTGATGACCAACAGCCTGACCGCTGCCGACTGGTGCCGTAGCAAGAAAAC

ORIGINAL CTATCCGAACGATAAGACCATCATTAGCACCTTTAAATGGAGCTATACCA

RESULTADO CTATCCGAACGATAAGACCATCATTAGCACCTTTAAATGGAGCTATACCA

ORIGINAL CCGGTAACGGCAAGCGTTACCGCAGCACCGCTCGTACCACCTATACCTTT

RESULTADO CCGGTAACGGCAAGCGTTACCGCAGCACCGCTCGTACCACCTATACCTTT

Anexo 10. Resultado de la secuenciación de la región codificante de SAHS

Clave: SAHBForward

Oligo: IMR0010

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```
ORIGINAL_      T-G-TTAGTTTCTAGT-----TTGTGCGATCGAATTTGTCGATTAATC
SOLICITUD_     GWAAAAAATACGGGARYTTTTGTAGTGCATCGAATTTGTCGATTAATC
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```
ORIGINAL_      TGAGTTTTTCTGATTAACAGACTAGTGGAGGGATGGACTATAAA--GACG
SOLICITUD_     TGAGTTTTTCTGATTAACAGACTAGTGGAGGGAGGGACAAT--ARRGACG
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```
ORIGINAL_      ACGACGATAAGATGGCGCGTTTCCTCGTTGCTTTGGCCCTATTCGGTGTG
SOLICITUD_     ACGACGATAAGATGGCGCGTTTCCTCGTTGCTTTGGCCCTATTCGGTGTG
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```
ORIGINAL_      GTGGCGATGACTGCTGCAAGCGGGGATGCACCTAAGGAGTGGAGTGGTAA
SOLICITUD_     GTGGCGATGACTGCTGCAAGCGGGGATGCACCTAAGGAGTGGAGTGGTAA
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```
ORIGINAL_      ACCCTGGCTAGGTAAATTTGTCGCCGAGGTAAGCGACAAATCCGAGAATT
SOLICITUD_     ACCCTGGCTAGGTAAATTTGTCGCCGAGGTAAGCGACAAATCCGAGAATT
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```
ORIGINAL_      GGAAGCATTGTAGACGCCCTCGGGCTGCCGGATCAGTACCCGCGAGCG
SOLICITUD_     GGAAGCATTGTAGACGCCCTCGGGCTGCCGGATCAGTACCCGCGAGCG
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

ORIGINAL_ CAGCTAAAGACCATTACAGCTTCTATAAGCAAGGAGAACATTACCATCA

SOLICITUD_ CAGCTAAAGACCATTACAGCTTCTATAAGCAAGGAGAACATTACCATCA

ORIGINAL_ CATACTCAGCCTTCCCGAT-AAAAATATAAACAAGGATATAGAATTTACT

SOLICITUD_ CATACTCAGCCTTCCCGATRAAAAATATAAACAAGGATATAGAATTTACT

ORIGINAL_ TTAGGCCAGGAAGTCGAGATCAAACATGGTGAACATTCATTAAAAATTAA

SOLICITUD_ TTAGGCCAGGAAGTCGAGATCAAACATGGTGAACATTCATTAAAAATTAA

ORIGINAL_ GTACTTCGAAGACGGCAACAAGCTAGTGGCAGATGTCAGTATCCCTGCTA

SOLICITUD_ GTACTTCGAAGACGGCAACAAGCTAGTGGCAGATGTCAGTATCCCTGCTA

ORIGINAL_ AAGGGAAATCCATACATGATGTATATGACGTCCAGGGTGACCAACTTATT

SOLICITUD_ AAGGGAAATCCATACATGATGTATATGACGTCCAGGGTGACCAACTTATT

ORIGINAL_ AAGTCTTATAAGGTTGGGGACGTCGTCGCAAAGAAGTGGTTCAAAAAGGT

SOLICITUD_ AAGTCTTATAAGGTTGGGGACGTCGTCGCAAAGAAGTGGTTCAAAAAGGT

ORIGINAL_ TGCAAACCCCGCAGCAACTAGTAGATCTATGGTTAGCAAGGGCGAGGAAG

SOLICITUD_ TGCAAACCCCGCAGCAACTAGTAGATCTATGGTTAGCAAGGGCGAGGAAG

ORIGINAL_ ACAACATGGCCAGCCTGCCAGCCACCCATGAGCTGCACAT-CTTCGGTAG

SOLICITUD_ ACAACATGGCCAGCCTGCCGGCCACCCATGAGCTGCACATTCTTCGGAAG

CLAVE:SAHReverse

OLIGO:IMR11

Original GTTTGAAGACGGCGCCAGCCTGACCGTGA ACTACC--GCTATACCTACG

Resultado GTTTGAAGAKGGCGCCAGCCKGACCGTGAW--CTWMCGYTATACCTACG

***** * * * * *

Original AGGGTAGCCACATCAAGGGCGAAGCGCAGGTGAAAGGTACCGGCTTCCCG

Resultado AGGGTAGCCACATCAAGGGCGAAGCGCAGGTGAAAGGTACCGGCTTCCCG

.....*****

Original GCTGATGGTCCGGTGATGACCAACAGCCTGACCGCTGCCGACTGGTGCCG

Resultado GCTGATGGTCCGGTGATGACCAACAGCCTGACCGCTGCCGACTGGTGCCG

Original TAGCAAGAAAACCTATCCGAACGATAAGACCATCATTAGCACCTTTAAAT

Resultado TAGCAAGAAAACCTATCCGAACGATAAGACCATCATTAGCACCTTTAAAT

Original GGAGCTATACCACCGGTAACGGCAAGCGTTACCGCAGCACCGCTCGTACC

Resultado GGAGCTATACCACCGGTAACGGCAAGCGTTACCGCGGCACCGCTCGTACC

Original ACCTATACCTTTGCCAAGCCGATGGCGGCTAACTATCTGAAAAACCAGCC

Resultado ACGTATACCTTTGCCAAGCCGATGGCGGCTAACTATCTGAAAAACCAGCS

** *****

Original GATGTACGTGTTCCGCAAGACCGAGCTGAAGCACAGCAAACCGAGCTGA

Resultado GATGTACGTGTTCCGCAAGACCGAGCTGAAGCACAGCAAACCGAGCTGA

Original ACTTCAAGGAATGGCAGAAAGCGTTTACCGACGTGATGGGCATGGATGAA

Resultado ACTTCAAGGAATGGCAGAAAGCGTTTACCGACGTGATGGGCATGGATGAA

Original CTGTACAAATAA CCCGGGTAGGAGCTCA-----T-ATGA--

Resultado CTGTACAAATAA CCCGGGTAGRARCTCATATGAAGAAGAAGATKAAAWWW

***** * ***** * *