



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Determinación de la participación de la proteína AtLEA6-1 en el desarrollo de raíces de *Arabidopsis thaliana*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Harold Nicholay Diaz Ardila

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adriana Garay-Arroyo
[Instituto de Ecología](#)

Dra. Svetlana Shishkova
[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca, Mor., Marzo, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Al programa de maestría y doctorado en ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de becario 888203 y al apoyo brindado para el desarrollo de mi proyecto dentro del proyecto FC1615 a cargo de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles.

Al apoyo otorgado por el Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a un congreso internacional.

Al maestro en ciencias Héctor Hugo Torres, por ayudarme, asesorarme y enseñarme varias de las técnicas que implemente durante este proyecto.

Al maestro en ciencias Inti Alberto Arroyo, por ayudarme, enseñarme y brindarme todos los materiales necesarios para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Joseph Dubrovsky, por haberme asesorado, enseñado y escuchado en varias ocasiones con temas relacionados al desarrollo de este proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial por ser una parte fundamental en el desarrollo de mi proyecto de investigación:

A la Dra. Alejandra Covarrubias Robles, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de ser parte de su laboratorio. Además, por darme los recursos y la asesoría necesarios durante toda la maestría.

A la Dra. Adriana Garay-Arroyo, por haberme enseñado a trabajar con las raíces de *Arabidopsis thaliana* durante mi pasantía de pregrado y por asesorarme durante el desarrollo de mi proyecto de maestría.

A la Dra. Svetlana Shishkova, por tomarse el tiempo de leer detalladamente cada uno de mis escritos, por asesorarme y apoyarme durante el desarrollo de este proyecto.

Finalmente, a todos los miembros del consorcio Covarrubias-Robles y a los miembros del laboratorio del Dr. Joseph Dubrovsky por sus comentarios y apoyo para realizar mi proyecto de maestría.

DEDICATORIAS

A mi mamá **Clayre Camila Ardila**, por haberme apoyado desde pequeño a realizar todos mis sueños. Sin tu ayuda mami, no hubiera sido posible haber logrado todo lo que he conseguido. Te agradezco infinitamente todo el esfuerzo que has hecho por hacerme feliz, para darme la mejor educación posible y por todos los sacrificios que has tenido que hacer por mi hermana y por mí.

A mi compañera de vida **Verónica**, por ser ese apoyo incondicional de todos los días. Sin tu amor no hubiera alcanzado el nivel de felicidad que tengo actualmente, has sido un motivo de alegría desde que te conocí. Además, te agradezco infinitamente que me hayas acompañado durante esta travesía en México y por todas las que faltan. Aun me faltan muchos años por vivir y los quiero seguir viviendo contigo.

A mi hija **Annie**, por ser ese motor que me motiva a seguir adelante todos los días. Desde el día que naciste has sido una luz que guía mi sendero y me da ánimos para continuar progresando en mi vida profesional y personal. Te agradezco la comprensión que has tenido durante este tiempo, además, de todas las sonrisas, experiencias, caricias y amor que me has regalado.

A mi hermana **Lorette**, por haber compartido conmigo toda nuestra infancia. Me enseñaste que la familia es lo más importante que podemos tener como seres humanos. Recuerdo con mucho amor cada una de las experiencias que hemos vivido desde chiquitos, pues tu fuiste y seguirás siendo la mejor amiga que he tenido, mi confidente incondicional y la mejor hermana que pude haber deseado.

A mi tutora y amiga la **Dra. Alejandra Covarrubias Robles**, por haberme brindado la confianza y la oportunidad de ser parte de su investigación. Sin tu asesoría, ideas y ayuda nada de esto hubiera sido posible. Además, te agradezco por todos los consejos y espacios que me brindaste fuera de un ámbito académico, fueron de gran ayuda e importancia para mí.

A mi tutora y amiga la **Dra. Adriana Garay-Arroyo**, por haber sido mi primera mentora y quien me ayudo a descubrir mi pasión por el desarrollo de las plantas. Aún recuerdo con mucha alegría cuando me enseñabas personalmente a trabajar en el laboratorio.

A mis amigos **David, Luis, Brianda, Inti, Alexis, José, Jose, Héctor, Ingrid, Gustavo, Jorge y Kob** por brindarme una amistad incondicional durante la maestría. Gracias por todos esos momentos inolvidables que me obsequiaron, me divertí bastante compartiendo con ustedes.

Finalmente, a todas aquellas personas con las cuales tuve la oportunidad de compartir durante este tiempo, el espacio no me alcanza para agradecerle a cada uno de ustedes, sin embargo, cada uno contribuyo con un granito de arena en el desarrollo de este proyecto y en mi aprendizaje personal.

ABREVIATURAS

5' y 3' UTR Región 5' y 3' no traducida

ABA Ácido abscísico

ABF Factores de unión a ABRE

ABRE Elementos de respuesta a ácido abscísico

ADN Ácido desoxirribonucleico

AHK Histidina quinasa de Arabidopsis

AREB Proteínas de unión a ABRE

ARN Ácido ribonucleico

ARR Regulador de respuesta de Arabidopsis

ATP Adenosín trifosfato

BR Brasinoesteroides

BrdU Bromodesoxiuridina

CBF Factor de unión con C repetidas

cADN Ácido desoxirribonucleótido complementario

CK Citoquininas

CQ Centro quiescente

dds Días después de sembrada

ddt Días después de trasplante

DE Desviación estándar

DP Dominio de proliferación

DREB Proteína de unión a DRE

DRIP1/2 Proteína interactora con DREB2A 1/2

DT Dominio de transición

EE Error estándar

ET Etileno

EtOH Etanol

GFP Proteína verde fluorescente

GRF7 Factor de regulación del crecimiento 7

GTG Proteína G de tipo receptor acoplado a proteína G

GUS Enzima β -Glucoronidasa

IDP Proteína intrínsecamente desordenada

I_{LR1} Índice de iniciación de las raíces laterales

INRA del francés *Institut National Recherche Agronomique*

IP Yoduro de Propidio

IPT ATP/ADP isopentenil-transferasa

JA Jasmonato

LAX3 del inglés Like AUX1 3

LDH Lactato deshidrogenasa

LEA Proteínas abundantes de la embriogénesis tardía

MDH Malato deshidrogenasa

MS Medio Murashige & Skoog

NAC Factor transcripcional NAM, ATAC y CUC

NaCl Cloruro de sodio

NCED 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa

NCT Nicho de células troncales

ns No significativo

pb Pares de bases

PCA Análisis de componentes principales

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

POPP Perfil de probabilidad de proteínas u oligopéptidos

PRL Primordio de la raíz lateral

RAM Meristemo apical de la raíz

RL Raíz lateral

ROS Especies reactivas de Oxígeno

RTPCR transcriptasa reversa seguido de reacción en cadena de la polimerasa

SA Ácido salicílico

SLAC1 Canal aniónico lento tipo S

snRK2 Proteína Serina/Treonina quinasa tipo SRK2A

T-ADN Ácido desoxirribonucleico de transferencia proveniente de una bacteria

Ws Accesoión Wassilewskija de *Arabidopsis thaliana*

ZD Zona de diferenciación

ZE Zona de elongación

ZR Zona de ramificación

RESUMEN

Las plantas responden a varios estímulos ambientales, percibiendo y generando una cascada de señalización que da como resultado la traducción y acumulación de proteínas de respuesta, como es el caso de las proteínas LEA (del inglés: Late Embryogenesis Abundant), las cuales se expresan en diferentes condiciones de estrés, particularmente, en respuesta al déficit hídrico. Las proteínas LEA se clasifican en siete grupos diferentes basados en la similitud de aminoácidos, y la mayoría de estas proteínas se predicen como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP). Este proyecto de investigación se centró en las proteínas LEA del grupo 6 (LEA6). Las proteínas LEA del grupo 6 están altamente conservadas en monocotiledóneas y dicotiledóneas; la primera proteína reportada de este grupo es la de *Phaseolus vulgaris* (PvLEA6). Anteriormente, en el laboratorio se descubrió que la proteína PvLEA6 se acumula en respuesta al déficit hídrico y a tratamientos con ácido abscísico (ABA) en la mayoría de los tejidos de diferentes órganos vegetales. Además, la PvLEA6 también se acumula en regiones en elongación de hipocótilos y raíces de plántulas de frijol común cultivadas en condiciones de riego óptimo. En *Arabidopsis thaliana*, tres genes codifican proteínas LEA del grupo 6 (*AtLEA6-1*, *AtLEA6-2* y *AtLEA6-3*). Aunque las proteínas LEA se descubrieron hace bastante tiempo, hay poca información de la función de estas proteínas en las plantas, principalmente debido a la falta de mutantes disponibles con fenotipos evidentes. Previamente, en nuestro laboratorio se caracterizó una mutante en el gen *AtLEA6-1* (*atlea6-1*), la cual presentó fenotipos de susceptibilidad a condiciones de estrés hiperosmótico o salino en el desarrollo y crecimiento de plántulas de *A. thaliana*. Además, en estos análisis también se observó un efecto en la arquitectura raíz. En este proyecto que constituyó mi tesis de maestría se hizo un estudio del posible papel de la proteína *AtLEA6-1* en el crecimiento y / o desarrollo de la raíz de *A. thaliana*, mediante la caracterización fenotípica de la mutante *atlea6-1*. En este estudio se encontró que, cuando las plantas de *atlea6-1* crecen en condiciones control, de estrés salino o de estrés osmótico, muestran un cambio en la arquitectura de la raíz, principalmente, debido a una reducción en la densidad y longitud de las raíces laterales, así como a un incremento en el tamaño de la raíz primaria. Analizando la estructura del meristemo apical de la raíz de plántulas mutantes *atlea6-1*

crecidas en condiciones de estrés salino, se encontraron células corticales más largas, más células en el dominio de proliferación (DP), un ciclo celular más corto y un mayor número de células que abandonan el DP durante 24 horas con respecto a la línea de tipo silvestre, evidenciando que AtLEA6-1 participa en la elongación celular y, posiblemente, también en los procesos de proliferación y transición celular. Por otro lado, la mutante *atlea6-1* en condiciones de estrés salino presentó alteración en el proceso de emergencia de las raíces laterales, pero no en el proceso de iniciación de éstas. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la proteína AtLEA6-1 puede desempeñar una doble función en el desarrollo de la raíz, como un modulador positivo de la emergencia de las raíces laterales y, como un modulador negativo del crecimiento de la raíz primaria en condiciones de estrés salino, mostrando un papel novedoso para las proteínas LEA en la modulación de la arquitectura del sistema radical y sus componentes.

SUMMARY

Plants respond to several environmental stimuli, sensing and generating a signaling cascade to translate and accumulate response proteins, as it is the case of LEA proteins (Late Embryogenesis Abundant), which are expressed under different stress conditions, particularly in response to water deficit. LEA proteins are classified into seven groups based on their amino acid similarity; most of them are predicted to be intrinsically disordered proteins (IDPs). The research project that framed this thesis focused on group 6 LEA (LEA6) proteins. Group 6 LEA proteins are highly conserved in monocot and dicot; the first reported protein of this group was from *Phaseolus vulgaris* L (PvLEA6). Previously, in the laboratory, PvLEA6 protein was shown to accumulate in response to water deficit and abscisic acid (ABA) treatments in most cell types of different organs. Moreover, PvLEA6 also accumulates in the elongating regions of hypocotyls and roots in common bean seedlings grown under well-irrigated conditions. In *Arabidopsis thaliana*, three genes are encoding LEA6 proteins (*AtLEA6-1*, *AtLEA6-2* y *AtLEA6-3*). Even though LEA proteins were discovered a long time ago, there is little information regarding their role in the plant, mainly due to the lack of mutants with evident phenotypes. A mutant in *AtLEA6-1* gene (*atlea6-1*) was previously characterized in our laboratory. This *A. thaliana* mutant shows susceptibility to hyperosmotic or salt stress conditions during germination. Furthermore, it was observed that *atlea6-1* presents an altered phenotype in the root system architecture. The aim of this project was studying the possible role of LEA6 proteins in root growth and/or development through the phenotypic characterization of the *atlea6-1* mutant line. It was found that, *atlea6-1* plants change their root system architecture, reducing the density and length of lateral roots and, increasing primary root length, when grown under control conditions, salt or osmotic stress. Further analysis of the root apical meristem of *atlea6-1* mutants grown under salt stress showed, compared to the wild-type, longer cortical cells, more cells in the proliferation domain (PD), a shorter cell cycle, and a greater number of cells that leave the PD for a period of 24 hours, evidencing that *AtLEA6-1* participates in cell elongation and, possibly also in the processes of cell proliferation and cell transition from the PD to the transition zone. Moreover, *atlea6-1* mutant grown under salt stress conditions shows an altered lateral root emergency but no

effect on lateral root initiation. The results obtained in this work indicate that AtLEA6-1 protein can play a double role in root development, as a positive modulator of the lateral root emergence and, as a negative modulator of primary root growth under salt stress conditions, showing a novel role for LEA proteins in the modulation of the root system architecture and its components.

TABLA DE CONTENIDO

RECONOCIMIENTOS	2
DEDICATORIAS	4
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	9
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Relaciones hídricas de las plantas.....	15
1.2. Las plantas ante un estrés hídrico.....	16
1.3. Factores ambientales que causan el déficit hídrico	18
1.4. Respuesta de las plantas a condiciones de déficit hídrico	19
1.5. El estrés osmótico y toxico inducido por sal.....	24
1.6. Las proteínas LEA en respuesta a condiciones de déficit hídrico	25
1.6.1. Clasificación de las proteínas LEA en el reino vegetal.....	27
1.6.2. Los diferentes grupos de las proteínas LEA	28
1.6.3. Las proteínas LEA del grupo 6	31
1.7. La raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	33
1.8. Antecedentes.....	34
2. HIPÓTESIS	36
3. OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. METODOLOGÍA	37
4.1. Material vegetal	37
4.2. Condiciones de crecimiento	38
4.3. Cinéticas de germinación	38
4.4. Cinética de crecimiento de la raíz primaria y análisis de la arquitectura de la raíz	38
4.5. Análisis cuantitativo del meristemo apical de la raíz a nivel celular	39
4.6. Análisis fenotípicos del desarrollo de las raíces laterales.....	40
4.7. Construcciones genéticas	40
4.9. Extracción de ARN, síntesis de cADN y RT-PCR de punto final.....	41
4.10. Análisis estadísticos.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Estandarización de las condiciones de crecimiento	43

5.2. La proteína AtLEA6-1 está involucrada en el tiempo de germinación de las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
5.3. La proteína AtLEA6-1 está involucrada en el desarrollo de las raíz primaria y raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
5.4. La proteína AtLEA6-1 es importante para el correcto desarrollo de la arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> en condiciones control y de estrés salino.....	57
5.5. La proteína AtLEA6-1 regula el crecimiento de la raíz primaria a través de la modulación de la proliferación y elongación celular.....	63
5.6. AtLEA6-1 promueve la emergencia de las raíces laterales en <i>A. thaliana</i>	68
5.7. El promotor de <i>AtLEA6-1</i> muestra una alta actividad en el cilindro vascular de la raíz de <i>A. thaliana</i> desde la zona de elongación celular.	73
6. DISCUSIÓN	76
7. CONCLUSIONES.....	84
8. BIBLIOGRAFÍA	85
9. ANEXOS	99

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Relaciones hídricas de las plantas

La molécula de agua es quizás el compuesto químico más importante para la vida en la Tierra (Chaplin, 2006). Debido a las características químicas y físicas del agua, ésta proporciona las condiciones adecuadas para que todas las biomoléculas que componen a los organismos vivos funcionen correctamente. De esta manera, el estudio del flujo de agua desde el suelo y a través de las plantas ha sido de gran importancia para comprender cómo se da el proceso de adquisición, transporte y pérdida de estas moléculas por parte de los organismos vegetales en un proceso conocido como el continuo suelo-planta-atmósfera (Hopkins, 1999).

En efecto, el continuo suelo-planta-atmósfera comienza con la captación de agua del suelo por parte de las raíces. Un contacto íntimo entre la superficie radical y el sustrato es importante para que se lleve a cabo de manera eficiente la captura de agua, por esta razón, para aumentar el área de absorción en la raíz, en la región subapical se encuentran unas prolongaciones de las células epidérmicas conocidas como pelos radicales. En la región donde se encuentran los pelos radicales es donde se da la mayor captación de agua (Taiz & Zeiger, 2006; McElrone *et al.*, 2013).

El agua entra en las células de la epidermis debido a las diferencias de potencial hídrico entre el sustrato y la raíz. Dentro de la raíz el agua puede viajar hasta la endodermis por tres rutas diferentes: 1) a través de la pared celular (ruta apoplástica), 2) cruzando la membrana plasmática de varias células a través de canales proteicos conocidos como acuaporinas (ruta transmembranal) (Chaumont & Tyerman, 2014), y 3) pasando entre los plasmodesmos que conectan dos células adyacentes (ruta simplástica). Para poder ingresar a la estela, el agua debe atravesar la endodermis por la ruta simplástica, ya que las células que forman este tejido vegetal tienen una banda radial en su pared celular conocida como la banda de Caspari, la cual está compuesta por lignina y suberina (Naseer *et al.*, 2012; Barberon *et al.*, 2015). La lignina es un biopolímero altamente hidrofóbico que evita el paso de agua a través de la ruta apoplástica (Naseer *et al.*, 2012).

Posteriormente, el agua dentro de la estela ingresa al xilema maduro, un tejido vegetal compuesto por células muertas lignificadas y cuya función es transportar agua y compuestos minerales a todos los órganos de la planta. El agua es transportada a través del xilema mediante fuerzas de capilaridad, presión radical, tensión-cohesión y diferencias de potencial (Taiz & Zeiger, 2006).

Finalmente, el agua llega a todos los órganos de la planta. En las células de las hojas es en donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso y se realiza la mayoría de la fotosíntesis en la planta. En las células del mesófilo el agua se adhiere a la celulosa y otros compuestos hidrofílicos presentes en la pared celular formando una delgada película que estará en contacto directo con la atmósfera debido a los grandes espacios intracelulares característicos de este tejido, de este modo se establece una interfase líquido-atmósfera en donde las moléculas de agua se evaporan. Cuando una molécula de agua pasa al estado gaseoso, está sale de planta y es remplazada por otra, formando una presión negativa que ocasiona que la planta capte más agua del suelo para remplazar las moléculas de agua perdidas y al mismo tiempo las transporte a través de todos sus órganos (Taiz & Zeiger, 2006). A causa de este proceso de evaporación, hay una alta concentración de agua en los espacios intracelulares, formando así un gradiente de concentración que promueve el movimiento de moléculas hacia una zona de menor concentración (atmósfera), ocasionando que el agua salga de la hoja a través de unas estructuras celulares conocidas como estomas.

1.2. Las plantas ante un estrés hídrico

El estrés puede definirse como un conjunto de factores externos que causan desventajas en el desarrollo de la planta (Taiz & Zeiger, 2006). Dentro de los factores que pueden producir una situación de estrés están los bióticos y abióticos, los cuales se miden en relación con la supervivencia de las plantas, acumulación de biomasa, rendimiento del cultivo y la asimilación de carbono (Taiz & Zeiger, 2006). Los factores causantes del estrés biótico involucran la interacción de la planta con organismos como los herbívoros, hongos, bacterias y virus; mientras que las causas del estrés abiótico se relacionan al exceso o déficit de las condiciones físicas o químicas del ambiente, como lo es la disponibilidad de nutrientes y agua, la temperatura y la intensidad lumínica, entre otros (Arroyo, 2015; Taiz & Zeiger, 2006).

De toda el agua que existe en la Tierra, solo el 2.5% es potable; sin embargo, de ésta solo el 1.2% se encuentra disponible en la superficie terrestre y de la cual el 70% está destinada para la agricultura (FAO, 2015; Shiklomanov, 1998). En algunas regiones del mundo el agua es sometida a una presión de uso creciente como resultado del acelerado aumento poblacional y actividad industrial. El cambio climático y a la distribución desigual de los recursos hídricos son factores para considerar. Por lo tanto, garantizar el abasto de agua para el desarrollo y sustento de la población es un reto para las naciones (FAO, 2015). Considerando lo anterior, se han propuesto sistemas económicos en los cuales la producción agrícola debería mantenerse mayoritariamente en aquellos países ricos en recursos hídricos, entre otras cosas, porque no se invertirían recursos en el transporte de agua ni se estaría compitiendo con el suministro de agua de la población (Elliot *et al.*, 2014). Debido a la falta de agua o el uso desigual de ésta, se hace evidente la importancia de estudiar el comportamiento de las plantas ante la deficiencia de este recurso, es decir, en situaciones de déficit hídrico.

El déficit hídrico se define como aquella situación en la cual una planta pierde más agua en el proceso de transpiración que la obtenida del sustrato (Taiz & Zeiger, 2006). Este es un problema común que presentan las plantas terrestres y hay varios factores ambientales que pueden generarlo; por ejemplo, la sequía, las temperaturas extremas y altas concentraciones de sales (Bray, 1997). El estado de déficit hídrico produce en las plantas una situación de estrés que conlleva a ajustes metabólicos, fisiológicos y moleculares para contrarrestar su efecto adverso y conferirle cierta tolerancia al estrés. Si la tolerancia al déficit hídrico es creciente, se dice que hay un proceso de aclimatación, el cual genera cambios a nivel morfológico, anatómico, celular, metabólico y molecular (Taiz & Zeiger, 2006). A pesar de esto, ciertas condiciones de estrés para una planta pueden no serlo para otra, lo cual estará determinado según el grado de adaptación que ésta presente que, a su vez, está establecido genéticamente gracias a un proceso de selección natural durante varias generaciones. Un claro ejemplo de esto son los metabolismos C3, C4 y CAM, los cuales evolucionaron en respuesta a las diferentes condiciones climatológicas, permitiendo a las

plantas colonizar un amplio rango de ambientes con una disponibilidad variable de recursos vitales (Taiz & Zeiger, 2006).

1.3. Factores ambientales que causan el déficit hídrico

El estrés hídrico es causado de manera natural por diversos factores ambientales. En el globo terráqueo hay una gran diversidad de ecosistemas que, dependiendo de las condiciones abióticas y bióticas, determinan la disponibilidad de recursos para los organismos vivos. La disponibilidad de agua junto con la temperatura son factores determinantes en la distribución de la flora a nivel mundial, por lo cual las plantas desarrollaron estrategias evolutivas que les permitieron tener acceso a los recursos hídricos presentes en el ambiente.

Hay varios factores ambientales que determinan la disponibilidad de agua, entre estos están la temperatura, las condiciones fisicoquímicas del suelo y la frecuencia de precipitación. En lugares donde ocurren temperaturas extremas, el acceso al agua es difícil para una planta. En altas temperaturas los puentes de hidrógeno que mantienen la interacción de las moléculas de agua se debilitan, lo cual facilita el paso de las moléculas de un estado líquido a gaseoso (Mizan *et al.*, 1996). Por otra parte, a baja temperatura los puentes de hidrógeno se acortan y fortalecen, agrupando a las moléculas de agua de manera tetraédrica, favoreciendo el paso del estado líquido a sólido (Nelson & Cox, 2017).

Generalmente, las temperaturas se encuentran relacionadas con otros factores abióticos como lo son la altitud y las precipitaciones. Las precipitaciones en la Tierra están determinadas por las características geomorfológicas de ésta y la localización espacial de los ecosistemas. En la Tierra las zonas de alta y baja presión de las corrientes atmosféricas determinan a nivel de biósfera donde hay regiones de mayor y menor precipitación (Carenas, *et al.*, 2014). Los fotones provenientes del sol pegan directamente a la Tierra en el ecuador terrestre, por ello el aire presente en esta zona se calienta rápidamente y por diferencias de densidad sube velozmente a la atmósfera, creando una región de baja presión (Carenas, *et al.*, 2014). El agua del aire al subir comienza a condensarse y agruparse formando gotas, éstas por la fuerza de gravedad descienden y caen en la litósfera. Sin embargo, no todo el aire caliente que sube a la atmosfera se condensa, una parte de este viaja a través de la atmósfera

y desciende cada 30° de latitud creando unas regiones de alta presión, en donde no son frecuentes las precipitaciones y por ende es donde se localizan la mayoría de los desiertos del planeta (Carenas, *et al.*, 2014). La presencia de cadenas montañosas también es un factor importante en la determinación de los patrones de lluvia a nivel global. Las regiones que se encuentran rodeadas por cadenas montañosas presentan una mayor frecuencia de lluvias.

No obstante, las características del suelo suelen determinar a nivel local la disponibilidad de agua de los ecosistemas. Las partículas que componen el suelo se pueden dividir, según su tamaño y propiedades, en arena y arcilla. El suelo arenoso se caracteriza por estar compuesto de partículas de aproximadamente 1 mm de diámetro y grandes espacios entre las partículas, dificultando la retención de agua. Por otra parte, los suelos arcillosos están compuestos por partículas más pequeñas con un mayor número de porosidades y un menor espacio entre las partículas, facilitando la retención de agua (Taiz & Zeiger, 2006).

Adicionalmente, otro factor influyente en la disponibilidad de agua son los solutos que se encuentran dispersos en el suelo, especialmente las sales. Las sales son compuestos iónicos formados por la unión de cationes (iones con carga positiva) y aniones (iones con carga negativa) (Chang, 2002). En solución acuosa estos compuestos iónicos suelen disociarse en sus respectivos iones y formar enlaces de hidrógeno con el solvente, en este caso el agua (Cox & Nelson, 2017). Entre mayor sea la concentración de solutos con carga o polaridad en el suelo, mayor será el número de moléculas de agua que se encontrarán formando enlaces de hidrógeno con éstas, disminuyendo el potencial osmótico del suelo y dificultando la captura de agua por parte de las raíces (Taiz & Zeiger, 2006).

1.4. Respuesta de las plantas a condiciones de déficit hídrico

La capacidad de ciertas plantas para crecer en ambientes con poca disponibilidad de agua depende en gran parte de que puedan tolerar el déficit hídrico desarrollando mecanismos que contrarresten los efectos adversos que imponen estas condiciones ambientales (Dodd & Ryan, 2016). Algunas plantas escapan del déficit hídrico al completar su ciclo de vida cuando hay disponibilidad de agua, otras lo hacen al desarrollar una raíz más profunda y algunas como los cactus suelen almacenar agua en sus tejidos (Dodd & Ryan, 2016).

En condiciones de déficit hídrico, la mayor cantidad de agua perdida por una planta se da a través de los estomas. El estoma es una estructura celular ubicada en la epidermis de la hoja que está compuesta por dos células oclusivas y un ostiolo o poro estomático. Cuando las células oclusivas se encuentran turgentes, es decir, con una alta cantidad de agua, adoptan una conformación de media luna que permite la apertura del ostiolo. Pero, en condiciones en las cuales las células oclusivas no tienen la cantidad de agua necesaria para alcanzar la turgencia adoptan una forma lineal que cierra el ostiolo (Fig. 1). La turgencia es un estado que alcanzan las células vegetales cuando la vacuola contiene altas cantidades de agua en su interior y junto con el citosol ejercen presión sobre la pared celular haciendo que la célula se hinche. En ciertos grupos de plantas como las herbáceas, la turgencia es esencial para mantener erguidas las estructuras aéreas vegetales ya que éstas presentan un crecimiento secundario mínimo.

La escasez de agua en el ambiente entre otros efectos ocasiona una pérdida de turgencia en las células oclusivas del estoma, disminuyendo la transpiración y por ende reduciendo la pérdida de agua. Otro mecanismo que tienen las plantas para que las células oclusivas pierdan turgencia y se genere un cierre estomático es a través de la síntesis de señales intracelulares que estimulen la pérdida de solutos en las células oclusivas, aumentando su potencial osmótico y generando la salida de agua por difusión pasiva. No obstante, el cierre estomático aparte de evitar la pérdida de agua trae consigo un efecto adverso en la fotosíntesis al limitar el ingreso de CO_2 (Dodd & Ryan, 2016), disminuyendo la síntesis de foto-asimilados y deteniendo el crecimiento vegetal (Fig. 1).

Generalmente, cuando las condiciones de falta de agua persisten durante un periodo de tiempo prolongado, se puede generar una fotoinhibición, la cual reduce la producción vegetal y causa daño a los cloroplastos (Dodd & Ryan, 2016). Por ejemplo, en condiciones de sequía disminuye el número, actividad y regeneración de enzimas involucradas en el proceso fotosintético, reduciendo la capacidad de asimilar y utilizar el carbono, que junto con el cierre estomático genera un desapareamiento en la cantidad de fotones absorbidos por los complejos cosechadores de luz y los utilizados en la fotosíntesis (Dodd & Ryan, 2016). Los fotones que no se utilizan en la formación de foto-asimilados son disipados a través de

mecanismos que pueden llegar a formar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dodd & Ryan, 2016), las cuales pueden dañar permanentemente los fotosistemas y reducir el crecimiento vegetal (Fig. 1; Miller *et al.*, 2010). Se ha reportado que en condiciones de déficit hídrico las concentraciones de las ROS tienden a aumentar drásticamente (Begcy *et al.*, 2011), no obstante, estas moléculas también pueden servir como moléculas señalizadoras que regulan la respuesta a estrés, por lo cual su producción puede ser vista como un prerrequisito para que se dé una respuesta adecuada al estrés y la inducción de una aclimatación por parte de la planta (Miller *et al.*, 2010).

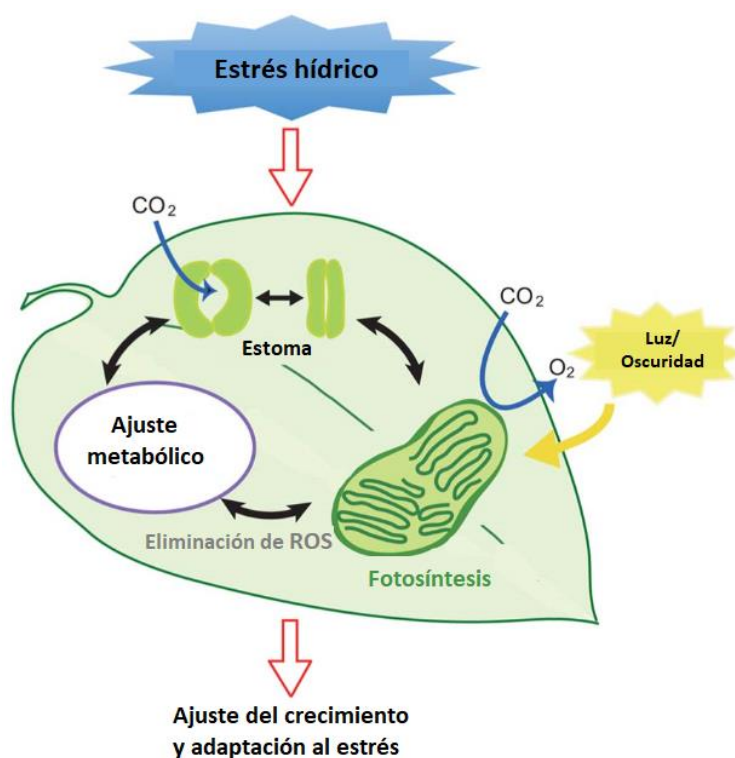


Figura 1. Respuesta de las plantas a condiciones de estrés hídrico. En condiciones de estrés hídrico las plantas sufren cambios en la respuesta estomática, eliminación de ROS, cambios metabólicos y, fotosíntesis. Todas estas respuestas ante las condiciones de déficit hídrico generan un ajuste en el crecimiento de las plantas como una respuesta adaptativa para la supervivencia. Imagen tomada y modificada de: Osakabe *et al.* (2014).

Otra estrategia que tienen las plantas para adaptarse al déficit hídrico es el ajuste osmótico (Fig. 1). Durante este proceso ocurre un incremento en la concentración de solutos

metabólicamente neutros a nivel intracelular como la prolina, azúcares y compuestos cuaternarios de amonio, entre otros, conduciendo a la reducción del potencial hídrico celular y generando un ingreso de agua por difusión pasiva (Dodd & Ryan, 2016). La capacidad de llevar a cabo un ajuste osmótico está determinada en gran medida genéticamente y varía según la especie, por lo que se ha intentado mejorar la tolerancia al estrés por déficit hídrico de algunas especies vegetales mediante la manipulación de los niveles de síntesis de osmolitos compatibles, encontrándose en algunos casos mayor resistencia a las condiciones de estrés de aquellas plantas genéticamente modificadas (Suprasanna et al., 2016; Hasanuzzaman et al., 2019). Además, se ha encontrado que la acumulación de osmolitos en condiciones de déficit hídrico mantiene la captura de agua por parte de la raíz (Dodd & Ryan, 2016) y, pueden proteger las células vegetales del daño producido por ROS (Matysik et al., 2002; Miller et al., 2010; Vendruscolo et al., 2007).

Otra manera que puede emplear la planta a nivel celular para señalar la falta de agua es aumentando las concentraciones del ácido abscísico (ABA) endógeno. El ABA es una molécula señalizadora que en condiciones de déficit hídrico sufre una alteración en su ruta biosintética y catabólica, aumentando o disminuyendo los niveles de expresión de los genes involucrados en su síntesis y catabolismo, ocasionando su acumulación en todos los órganos vegetales. Durante condiciones de sequía o salinidad, enzimas limitantes en el proceso biosintético y catabólico de ABA, como la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) que participa en la ruta biosintética o las P450 CYP707As que actúan en la vía catabólica, sufren cambios en su patrón de expresión, lo cual implica que debe haber una regulación precisa de la concentración de ABA mediada por la modulación de su biosíntesis y degradación. Por ejemplo, *NCED3* se regula negativamente en condiciones de rehidratación, mientras que se da un control positivo sobre *CYP707A3* (Hiroyama & Shinozaki, 2010). Además, ABA suele almacenarse en su forma inactiva (éster glucosil de ABA) en vacuolas y apoplasto y, bajo condiciones de déficit hídrico, se libera de estos organelos y se activa por la enzima β -glucosidasa (Hiroyama & Shinozaki, 2010).

La percepción de ABA a nivel celular puede ocurrir a través de la membrana plasmática mediada por los receptores GTGs (del inglés G protein-coupled receptor-type G

proteins), y/o a nivel citosólico por medio de los receptores PYR/PYL/RCAR (Golldack *et al.*, 2014; Hiroyama & Shinozaki, 2010). El reconocimiento de ABA por estos últimos receptores da lugar a la unión de las proteínas fosfatasa PP2Cs, las cuales en ausencia de ABA interaccionan y desfosforilan a la proteína quinasa SnRK2 (serine/threonine-protein kinase SRK2A-like), inactivándola (Osakabe *et al.*, 2013). En tanto que, en presencia de ABA, la unión de éste al receptor PYR/PYL/RCAR conlleva a un cambio conformacional en esta proteína permitiendo su unión a la fosfatasa, inhibiendo así su actividad y, por tanto, manteniendo la actividad de la quinasa SnRK2 (Golldack, *et al.*, 2014). Posteriormente, esta quinasa viaja al núcleo y fosforila una serie de factores transcripcionales, como las proteínas de unión a los elementos de respuesta a ABA, conocidos como elementos ABRE (AREB) y los factores de unión a ABRE (ABF) (Yoshida *et al.*, 2014). Los elementos ABRE son elementos de respuesta a ABA que actúan en *cis*, los cuales junto con los AREB y ABF tienen una función esencial en la expresión de genes dependientes de ABA (Yoshida *et al.*, 2014). Dentro de los genes de respuesta a ABA se encuentran algunos tales como *SLAC1* (S-type slow anion channel), implicado en el control de la respuesta estomática, o como los genes que codifican las proteínas LEA (del inglés: Late Embryogenesis Abundant proteins) (Osakabe *et al.*, 2013), entre otros.

Otras fito-hormonas también juegan roles sustanciales en la respuesta al déficit hídrico de manera directa e indirecta. El ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido jasmónico (JA) han demostrado afectar la respuesta a una condición de estrés a través de complejas interacciones con ABA (Yoshida *et al.*, 2014). Por ejemplo, el factor de transcripción AtMYC2 es un punto de convergencia entre la cascada de señalización de JA y ABA. Este tipo de interacciones pueden ser necesarias para integrar las señales de varios tipos de estrés y coordinar así la respuesta a nivel celular con la de toda la planta (Yoshida *et al.*, 2014).

Otros factores transcripcionales importantes en la respuesta a déficit hídrico que pueden o no ser regulados por ABA son los DREB (Dehydration Responsive Element -binding protein), CBF (C-repeat-binding factor), MYC, MYB y NAC (NAM, ATAC y CUC) (Arroyo, 2015). Estos factores transcripcionales se encuentran altamente regulados y se ha demostrado que todos promueven la transcripción de genes de respuesta a estrés. Por ejemplo, el factor

transcripcional DREB2A (Dehydration-Responsive Element Binding Protein 2) actúa en una vía de señalización independiente de ABA. En condiciones de déficit hídrico DREB2A participa en la regulación de varias proteínas de respuesta y tolerancia al estrés, pero también tiene efectos perjudiciales para el crecimiento vegetal. Por esta razón, en condiciones normales hay represión de la actividad de DREB2A a través del factor GRF7 (Grow-Regulating Factor 7) y DRIP1/2 (Dreb2A-Interacting Protein 1/2), los cuales actúan como represores transcripcionales y traduccionales, respectivamente (Yoshida *et al.*, 2014). No obstante, la expresión de DREB2A junto con los factores transcripcionales AREB/ABF se regula por SnRK2, indicando que estas quinasas pueden servir como un punto de convergencia en la expresión de genes que responden de manera dependiente e independiente de ABA (Yoshida *et al.*, 2014).

1.5. El estrés osmótico y toxico inducido por sal

La salinización del suelo es un problema creciente para la agricultura a nivel mundial. La acumulación de sal en los suelo cultivables se deriva principalmente de malas prácticas agrícolas, como es el riego de suelos arables con agua que contiene cantidades trazas de cloruro de sodio (NaCl; Deinlein, *et al.*, 2014; Flowers & Yeo, 1995; Tester & Davenport, 2003). Se calcula que aproximadamente el 20% de la tierra utilizada en los cultivos a nivel mundial presenta problemas de salinidad (Qadir *et al.*, 2014). Las altas concentraciones de NaCl ocasionan dos tipos de efectos en las plantas: 1) producen un estado de déficit hídrico al no hacer accesible el agua por la acumulación de solutos en el suelo y 2) un efecto tóxico producto de las altas concentraciones intracelulares que llega a alcanzar el NaCl (Taiz & Zeiger, 2002; Isayenkov & Maathuis, 2019).

El efecto tóxico producido por altas concentraciones salinas en las células ocasiona daños en la integridad de las membranas, disminuye actividades enzimáticas, la toma de nutrientes y la función de los aparatos fotosintéticos (Zhu, 2001; Shahzad *et al.*, 2019). Ante esta situación estresante, las plantas sometidas a estrés salino responden a diferentes niveles (metabólico, fisiológico y molecular) con el fin de ajustarse al ambiente adverso. Entre las respuestas mejor estudiadas está la acumulación de solutos compatibles en sus órganos vegetativos para contrarrestar la alta concentración de solutos extracelulares y mantener el

agua intracelular necesaria para sus funciones (Zhu *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2018). Más recientemente se ha descrito una compleja respuesta a nivel molecular que involucra la activación y represión de genes, entre otros procesos. También se han encontrado bajo estas condiciones de estrés respuestas específicas de órganos y tejidos (Chen *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2018). En el caso de la raíz, se ha documentado que el estrés salino genera cambios en el sistema arquitectónico de la raíz (RSA; Galvan-Ampudia & Testerink, 2011)

1.6. Las proteínas LEA en respuesta a condiciones de déficit hídrico

Entre las respuestas comunes a condiciones de sequía, salinidad y frío, en diferentes especies vegetales, se encuentra la inducción de los genes que codifican para las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins; Bray, 1997; Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Hoekstra *et al.*, 2001). Estas proteínas se identificaron originalmente en semillas secas de algodón, en donde se encontraron acumuladas en altos niveles (Dure *et al.*, 1989). La presencia de estas proteínas en todas las diferentes especies vegetales en donde se han buscado sugiere fuertemente que son ubicuas en el reino vegetal (Olvera-Carrillo *et al.*, 2011). Su caracterización inicial mostró que se acumulan en la fase tardía de la embriogénesis, cuando la semilla inicia su período de desecación, de ahí su nombre. Además, estas proteínas también se acumulan en órganos vegetativos en plantas que se encuentran en situaciones de déficit hídrico (Battaglia *et al.*, 2008).

La mayoría de las proteínas LEA se pueden clasificar dentro de un grupo de proteínas que se encuentran presentes en los diferentes dominios de la vida, las hidrofílinas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Las hidrofílinas se caracterizan por presentar un contenido mayor al 6% de Gly, un alto porcentaje de aminoácidos hidrofílicos y una falta o deficiencia en aminoácidos hidrofóbicos y cisteínas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Battaglia *et al.*, 2008). Todas las hidrofílinas reportadas hasta el momento están asociadas a condiciones de déficit hídrico, por lo cual se ha propuesto que estas proteínas constituyen un mecanismo conservado que presentan los organismos vivos para contender con los efectos de la baja disponibilidad de agua (Arroyo, 2015; Battaglia *et al.*, 2008).

Aunque no se ha encontrado una secuencia característica que defina a todas las proteínas LEA, la mayoría de éstas se caracterizan por tener una alta hidrofiliidad, un alto contenido de aminoácidos pequeños como Gly, Ala y Ser y una falta o baja proporción de aminoácidos de Trp y Cys (Dure, 1993; Baker *et al.*, 1998; Battaglia *et al.*, 2008). Estas características en la secuencia de aminoácidos de las proteínas LEA indican que la mayoría adopta una estructura tipo “random coil” en solución acuosa, es decir, que muestran una alta flexibilidad estructural, adoptando múltiples estructuras en una condición determinada, por lo que se consideran proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP) (Battaglia *et al.*, 2008). Sin embargo, hay ciertas proteínas LEA que se conocen como “atípicas” puesto que no comparten estas características, aunque se acumulan durante la embriogénesis tardía (Singh *et al.*, 2005; Olvera-Carrillo *et al.*, 2010).

A pesar de que las proteínas LEA se han estudiado desde hace tiempo, no se ha logrado determinar cuál es su función molecular *in vivo*. No obstante, hay evidencia *in vitro* que muestra que ciertas proteínas LEA en ensayos de deshidratación tienen la capacidad de prevenir cambios conformacionales y la pérdida de actividad de enzimas reporteras como la Malato Deshidrogenasa (MDH) y Lactato Deshidrogenasa (LDH) (Reyes *et al.*, 2005; Battaglia *et al.*, 2008; Olvera-Carrillo *et al.*, 2011). Las proteínas LEA se diferencian de las chaperonas moleculares en que su actividad protectora no utiliza ATP, y en que son incapaces de devolver la conformación nativa de las enzimas reporteras si se agregan después de la deshidratación; es decir, no renaturalizan una proteína después del estímulo estresante (Olvera-Carrillo *et al.*, 2011). También se ha propuesto que estas proteínas pueden actuar preferencialmente con las moléculas de agua disponibles y proveer un escudo de hidratación para proteger la integridad de las moléculas blanco (Bray, 1997; Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Hoekstra *et al.*, 2001; Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). No obstante, se ha demostrado que algunas proteínas LEA en relaciones molares 1:1 con las enzimas MDH y LDH tienen actividad protectora (Reyes *et al.*, 2005, 2008), apoyando la idea de que la actividad protectora de las proteínas LEA no se debe únicamente a la formación de un escudo de agua sino también a el establecimiento de interacciones con las proteínas blanco (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010, 2011).

La baja disponibilidad de agua, como se ha mostrado en ensayos *in vitro*, promueve la formación de estructuras secundarias en las proteínas LEA (Goyal *et al.*, 2003; Cuevas-Velazquez *et al.*, 2016). Esta plasticidad estructural, al parecer, se necesita para que haya un reconocimiento adecuado del ligando o para la estabilización de las interacciones entre las proteínas, lo cual puede explicar el por qué algunas proteínas LEA que no comparten ningún grado de similitud pueden llevar a cabo funciones similares *in vitro* (Olvera-Carrillo *et al.*, 2011). Sin embargo, miembros de un mismo grupo de proteínas LEA comparten unos motivos altamente conservados aparentemente relacionados con el reconocimiento de sus moléculas blanco, la formación de estructuras secundarias en condiciones de déficit hídrico y el establecimiento de homo y hetero-oligómeros (Olvera-Carrillo *et al.*, 2011).

Aunque parece que las proteínas LEA tienen funciones similares, la existencia de diferentes grupos de estas proteínas es un indicativo de la diversidad funcional que hay dentro de este conjunto de proteínas (Olvera-Carrillo *et al.*, 2011). Por ejemplo, mutantes nulas en genes que codifican para proteínas LEA del grupo 4 presentan susceptibilidad a condiciones de déficit hídrico, lo cual sugiere que estas proteínas están involucradas en la respuesta de ajuste de las plantas a la falta de agua y, que la ausencia de ellas no se puede compensar por miembros de otros grupos de proteínas LEA (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010).

1.6.1. Clasificación de las proteínas LEA en el reino vegetal

Aunque las proteínas LEA no comparten un alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos, estas pueden clasificarse en diferentes grupos teniendo en cuenta la semejanza de sus secuencias y la presencia de motivos conservados. No obstante, la clasificación de estas proteínas varía según el autor, en donde se han llegado a proponer desde cinco hasta nueve grupos diferentes (Tabla 1, Arroyo, 2015). Además, algunos autores han sugerido mecanismos de clasificación basados en herramientas bioinformáticas como el perfil de probabilidad de proteínas u oligopéptidos (POPP del inglés: Protein or Oligonucleotide Probability profile) (Wise & Tunnacliffe, 2004). POPP es un método desarrollado con el objetivo de clasificar todas las proteínas LEA existentes según semejanzas en la composición peptídica, no según similitudes entre sus secuencias. Esta metodología se desarrolló porque algunas proteínas LEA no encajaban dentro de los grupos establecidos

según la similitud de secuencias (Tunnacliffe & Wise, 2007), por lo cual eran destinadas a un grupo particular. Sin embargo, esta clasificación no coincide con la obtenida por similitud de secuencias, además, no es aconsejable utilizar esta metodología porque no permite distinguir los motivos conservados característicos de cada grupo. Por esta razón es que en este trabajo se utilizara la clasificación de Battaglia *et al.* (2008), en la cual según la conservación de ciertos motivos se pueden diferenciar siete familias.

Tabla 1. Principales clasificaciones propuestas para grupos de las proteínas LEA. Tomado y modificado de Arroyo (2015).

PFAM El-Gebali <i>et al.</i> (2019)	Dure <i>et al.</i> (1989)	Bies-Ethève <i>et al.</i> (2008)	Tunnacliffe & Wise (2007)	Battaglia <i>et al.</i> (2008)	Hundertmark & Hinch (2008)
PF00477	D-19	1	1	1	5
PF00257	D-11	2	2	2	Dehidrinas
PF02987	D-7	3	3	3A	4
	D-29			3B	
PF03760	---	4	4	4A	1
	D-113			4B	
PF04927	D-34	5	6	5A	SMP
PF03242	D-73	6	Lea5	5B	3
PF03168	D-95	7	---	5C	2
PF10714	---	8	---	6	PvLEA18
PF02496	---	---	---	7	---
---	---	---	---	---	AtM

--- Grupos no identificados por estos autores

1.6.2. Los diferentes grupos de las proteínas LEA

Como se mencionó anteriormente, la clasificación de las proteínas LEA aún es objeto de controversia, por lo cual en este estudio se utilizó la propuesta por Battaglia *et al.* (2008) que distingue siete familias diferentes basadas en la similitud de su secuencia y la presencia de motivos conservados.

El grupo 1 de las proteínas LEA se caracteriza por tener una gran cantidad de residuos cargados, un alto porcentaje de Gly (aproximadamente 18%) y un alto grado de desorden en solución acuosa (Battaglia *et al.*, 2008). Dentro de los motivos característicos de este grupo se encuentra uno muy importante compuesto de 20 aminoácidos (TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]EMGRKGG[L/E]) que puede tener varias copias consecutivas dentro de una proteína. Además, se ha identificado otro motivo distintivo en la región N-terminal (TVVPGGTGGKSLEAQE[H/N]LAE) y otro en la región C-terminal (Battaglia *et al.*, 2008). Lo más interesante de este grupo es que es el único grupo de proteínas LEA representado en todos los dominios de la vida; un ejemplo de esto es su presencia en el crustáceo de agua salada *Artemia* (Wang, *et al.*, 2007) y en bacterias de diferentes géneros (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2017).

Los miembros del grupo 2 son conocidos comúnmente como “dehidrasas” y constituyen el grupo más grande de todas las proteínas LEA. Estas proteínas se caracterizan por poseer una alta proporción de aminoácidos polares y cargados, una pequeña cantidad de aminoácidos no polares y la falta de residuos de Trp y Cys (Battaglia *et al.*, 2008). Dentro de este grupo se encuentra un motivo de 15 residuos rico en Lys altamente conservado, (EKKGIMDKIKEKLPG) conocido como el segmento K (Close *et al.*, 1989, 1993). Algunas dehidrasas presentan otros motivos como el segmento Y en la región N-terminal y el segmento S, rico en Ser, en la región C-terminal, el cual en algunas proteínas puede estar fosforilado (Vilardell *et al.*, 1990). Las dehidrasas se pueden subclasificar en diferentes categorías dependiendo de la presencia y arreglo en su secuencia de los motivos anteriormente mencionados; es así que las proteínas clasificadas en el subgrupo K son aquellas que únicamente poseen este elemento en la cadena polipeptídica, en tanto que las que presentan el elemento K, seguido del elemento S, son parte del subgrupo KS, encontrando así un total de cinco subgrupos (K, KS, SK, YSK y YK) (Battaglia *et al.*, 2008).

El grupo 3 se caracteriza por poseer un motivo de 11 aminoácidos (Dure, 1993a), el cual está repetido hasta cinco veces de manera consecutiva a lo largo de la proteína (Arroyo, 2015; Battaglia *et al.*, 2008). Debido a la variabilidad en el motivo de 11 aminoácidos, estas proteínas se subclasifican en dos grupos más, el 3a y 3b. El subgrupo 3b se diferencia del 3a

principalmente por la presencia de un motivo altamente conservado único de este subgrupo (ESW[T/A][E/G]WAK[E/D]KI) (Battaglia *et al.*, 2008). La posición de algunos de los residuos del motivo de 11 aminoácidos está altamente conservada y se cree que éstos están involucrados en promover la formación de α -hélices anfipáticas, las cuales permitirían interacciones intra e intermoleculares (Arroyo, 2015; Battaglia *et al.*, 2008).

Las proteínas que forman parte del grupo 4 son de tamaño variable (88 a 175 aminoácidos), ricas en Gly, Thr y, a diferencia de otros grupos, en Ala. Poseen de 70 a 80 aminoácidos altamente conservados en la región N-terminal que tienen propensión a formar α -hélices (Dure, 1993b). Además, en la región N-terminal también se localiza el motivo que caracteriza a este grupo de proteínas (AQEKAEKMTA[R/H]DPXKEMAHK[E/K][A/E] [K/R]). No obstante, se han logrado definir otros dos motivos que subdividen al grupo 4 de las proteínas LEA en los subgrupos 4a y 4b.

El grupo 5 de las proteínas LEA lo integran proteínas catalogadas como “atípicas” ya que no presentan el mismo grado de hidrofiliidad que caracteriza al resto de las proteínas LEA, sino que más bien son hidrofóbicas, y no contienen en su secuencia los motivos característicos de los otros grupos (Arroyo, 2015). Además, presentan propensión a formar estructuras globulares.

Las proteínas del grupo 6 son pequeñas (80 a 130 aminoácidos) y tienen regiones altamente conservadas, en especial la secuencia LEDYK en el motivo 1 y los residuos de Pro y Thr presentes en la posición 6 y 7 del motivo 2 (Battaglia *et al.*, 2008). Algo interesante de estas proteínas es que, al parecer, responden al estatus hídrico de la planta durante el desarrollo, ya que no sólo se expresan en plantas sometidas a déficit hídrico sino también en zonas en crecimiento de plantas bien irrigadas (Colmeneros-Flores *et al.*, 1997).

Por último, se encuentran las proteínas LEA del grupo 7 (también conocidas como ASR). Estas son proteínas pequeñas (80 a 260 aminoácidos), estables a altas temperaturas y con propensión al desorden estructural. Este grupo no se ha identificado en *A. thaliana*. Todas las proteínas ASR conocidas hasta el momento presentan motivos altamente conservados, ricos en His; además, se ha identificado en ellas una señal de localización

nuclear en la región C-terminal (Wang *et al.*, 2003, 2005). También se ha demostrado que puede unir DNA y se han involucrado como señalizadores de la percepción de glucosa (Çakir *et al.*, 2003; Maskin *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2015).

1.6.3. Las proteínas LEA del grupo 6

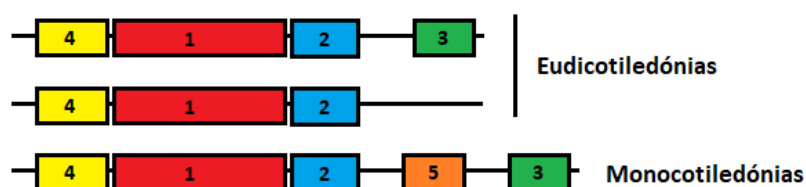
Entre las proteínas LEA estudiadas en nuestro grupo de trabajo están las pertenecientes al grupo 6. La primera proteína reportada de este grupo es la PvLEA18 (más tarde denominada PvLEA6) de *Phaseolus vulgaris* (Colmeneros-Flores *et al.*, 1997). Esta proteína está presente en semillas secas, cilindro vascular y epidermis del meristemo apical de la raíz y en protoxilema radical de plántulas de frijol sometidas a condiciones de déficit hídrico; además, también se ha detectado en plantas bien irrigadas, particularmente en las zonas de expansión de los hipocótilos y raíces de plántulas de frijol, en el meristemo apical del vástago, en el primordio de la raíz, en el cilindro vascular y en la epidermis (Colmeneros-Flores *et al.*, 1999; Moreno-Fonseca & Covarrubias, 2001).

Las proteínas del grupo 6 poseen cuatro motivos distintivos que se encuentran presentes en monocotiledóneas y eudicotiledóneas; sin embargo, en monocotiledóneas los alineamientos de secuencias polipeptídicas mostraron la presencia de un motivo adicional que no se encuentra presente en eudicotiledóneas (Fig. 2; Rodríguez-Valentín *et al.*, 2014). Además, otra característica de las plantas monocotiledóneas es que poseen un único gen que codifique para una proteína LEA del grupo 6 en todo su genoma (Rodríguez-Valentín *et al.*, 2014).

Plantas de *Oryza sativa* sometidas a condiciones de déficit hídrico mostraron una alta acumulación del transcrito de un gen en raíces que codifica para una proteína LEA del grupo 6 (OsLEA6; Rodríguez-Valentín *et al.*, 2014). El hecho de que los patrones de acumulación de los transcritos de las proteínas LEA del grupo 6 analizadas hasta el momento en plantas monocotiledóneas y eudicotiledóneas se acumulen altamente en raíz muestra la importancia de este grupo a nivel evolutivo como un mecanismo de respuesta de las raíces a las condiciones de déficit hídrico.

Hasta el momento, la evidencia más relevante que demuestra la importancia de las proteínas LEA del grupo 6 en las raíces de plantas eudicotiledóneas proviene de fusiones entre el promotor del gen *PvLEA6* y el gen reportero *GUS*, introducidas en *A. thaliana*. Estas líneas transgénicas de *A. thaliana* mostraron que el promotor de *PvLEA6* se expresa en los mismos sitios detectados previamente para la localización de la proteína en frijol (Colmeneros-Flores *et al.*, 1999), pero de forma interesante también se detectó su expresión en el periciclo, un grupo de células involucradas en la formación de las raíces laterales (Moreno-Fonseca *et al.*, 2001). Por otro lado, la *PvLEA6* es una proteína desordenada que muestra modificaciones post-traduccionales (fosforilación; Arroyo, 2015) y que, ante condiciones de estrés hídrico, es capaz de adquirir estructuras secundarias como alfa hélices *in vitro*. También se ha demostrado que puede formar oligómeros (Rivera-Najera *et al.*, 2014).

A



B

Motivo	Eudicotiledóneas	Monocotiledóneas
1	DLEDYKR[KQ][AG]YG[TA][EQ]GH[QL]	[YD][DE]GLEDYKMR[GA]YGAQGHLPSVDVPH
2	EQ[PV]KPG[RQ]G[GA]G[AS]T[DE]APT[LP]SG[A GS]AV[SAP][SA]GA	GSGT[DE]APT[VI]PGTA[VI]P[VT]A[KH][PL][KNQ][RL][HR] [DG][DR]
3	LP[LM][EK][DS]SPY[LV][KQ]Y[KE]	[AEK][AR][ARG]AE[EG][GE]GD[TS]VQLPTETSPYVQ
4	S[AS]T[DE]AINRQGV	[RD][PR][GD][DE][AT][AS]TD[ATV]INRHGVP
5	-----	[VQ][QL]PQR[DG][LA]G

Figura 2. Motivos característicos de las proteínas LEA del grupo 6. A) Esquema representativo de la localización de los motivos característicos de las proteínas LEA del grupo 6 en plantas eudicotiledóneas y monocotiledóneas. En monocotiledónas hay un motivo conservado que no se encuentra presente en eudicotiledóneas. Tomado y modificado de: Battaglia *et al.* (2008); Rodríguez-Valentín *et al.* (2014). B) La tabla contiene las secuencias consenso de los motivos característicos de las proteínas LEA del grupo 6 en monocotiledóneas y eudicotiledóneas. Tomado y modificado de: Rodríguez-Valentín *et al.* (2014).

En *A. thaliana* se han identificado tres proteínas pertenecientes a esta familia, la AtLEA6-1, AtLEA6-2 y AtLEA6-3. La proteína AtLEA6-1 presenta los cuatro motivos característicos del grupo 6 de las proteínas LEA, la proteína AtLEA6-2 tiene los motivos uno y dos y, la proteína AtLEA6-3 alberga los motivos uno, dos y cuatro. Por otra parte, los genes *AtLEA6-1* y *AtLEA6-2* se expresan altamente en semillas y plantas sometidas a condiciones de déficit hídrico, mientras que el gen *AtLEA6-3* se expresa únicamente en botones florales. Adicionalmente, se ha encontrado que mutantes de pérdida de función del gen que codifica para la proteína AtLEA6-1 (*atlea6-1*) en *A. thaliana*, accesión WS, crecidas en condiciones de estrés osmótico y salino presentan sensibilidad en ensayos de germinación (Fig. 3; Arroyo, 2012). También, plántulas mutantes *atlea6-1* sometidas a salinidad muestran etiolación, una reducción significativa del peso fresco y, presentan una raíz primaria corta y menor número de raíces laterales en comparación con plantas de tipo silvestre (Arroyo, datos no publicados).

1.7. La raíz primaria de *A. thaliana*.

La raíz primaria de *A. thaliana* se ha utilizado ampliamente como modelo de estudios en biología del desarrollo, entre otras cosas, debido a la simplicidad de su organización en distintos tipos celulares. Por una parte, en el eje transversal de la raíz, se pueden diferenciar el cilindro vascular, el cual se encuentra localizado en la región concéntrica, seguido de las células del córtex y, finalmente, por las células epidérmicas en la periferia. Por otra parte, en el eje longitudinal, se pueden distinguir tres zonas diferentes: 1) El meristemo apical de la raíz (RAM), 2) la zona de elongación celular y, 3) la zona de diferenciación o maduración celular. El RAM se compone del nicho de células troncales (NCT), del dominio de proliferación (DP) y del dominio de transición (DT; García-Gómez et.al., 2017). El NCT se localiza en la punta de la raíz y está formado por las células del centro quiescente (CQ) y las células que lo rodean, conocidas como células iniciales. Las células del CQ son células con una baja tasa de división y, se ha demostrado que estas células se requieren para mantener a las células iniciales en un estado desdiferenciado (Van den Berg et al., 1997). En contraste, las células iniciales se caracterizan por tener una tasa de división celular mayor a las células del CQ y se especifican según el tejido al cual van a dar origen; es así como se generan las células iniciales de

córtex/endodermis, periciclo, cilindro vascular, epidermis/cofia lateral y de columela (Dolan et al., 1993). Después de la división celular, las células iniciales se regeneran ellas mismas y producen células hijas que abandonan el NCT, entrando en el DP (Campilho et al., 2006). En el DP, las células se caracterizan por tener una tasa de división mayor que las células del NCT (García-Gómez et al., 2017). Luego de varios ciclos de división, las células en el DP pasan al dominio de transición. En el DT, las células presentan una disminución en su tasa de división y, comienzan a darse eventos de endorreduplicación (Hayashi et al., 2013). Una vez abandonado el DT, las células entran en la zona de elongación (ZE) y diferenciación (ZD), en donde las células comienzan una rápida expansión y adquieren las características morfológicas respectivas de cada tejido (Ivanov & Dubrovsky, 2013).

1.8. Antecedentes

En el grupo de trabajo en el que participo, durante el análisis funcional de las proteínas LEA del grupo 6 de *A. thaliana*, encontraron una mutante en el gen que codifica para la proteína LEA6-1, la cual mostró un fenotipo de germinación retardada (Fig. 3) y una alteración en la arquitectura de la raíz bajo condiciones de déficit hídrico, siendo más severo el efecto cuando las semillas y/o plántulas estaban en medios con altas concentraciones de sal (Arroyo, tesis doctoral en proceso).

En la actualidad, hay muy pocos reportes de la función de las proteínas LEA relacionados con el desarrollo de la raíz. Chen *et al.* (2015) y Magwanga *et al.* (2018) demostraron que la sobre-expresión de proteínas LEA de arroz y algodón son capaces de promover el crecimiento de la raíz y conferir una mayor tolerancia a la sequía. Ambos estudios llegaron a la misma conclusión utilizando proteínas LEA de grupos diferentes. Por una parte, en los estudios realizados por Chen *et al.* (2015), estos autores sobre-expresaron a la proteína HVA1 (perteneciente al grupo 3 de las proteínas LEA) en arroz y, por otra parte, en los estudios de Magwanga *et al.* (2018), ellos sobre-expresaron una proteína LEA del grupo 2 de algodón (CotAD_24498) en líneas transgénicas de *A. thaliana*. En ambos casos, no es posible deducir con certeza que la función natural de estas proteínas está involucrada con el desarrollo de la raíz ya que estos fenotipos podrían ser el resultado de una ganancia de función consecuencia de la sobre-expresión ectópica de estas proteínas. Adicionalmente,

se ha encontrado la acumulación de altas concentraciones de ZmLEA4 y PvLEA6 en la raíz de *Zea mays* y *P. vulgaris*, respectivamente (Colmenero-Flores *et al.*, 1999; Zamora-Briseño & de Jiménez, 2016). Estos estudios propusieron que no es exclusivo el papel de las proteínas LEA del grupo 6 en el desarrollo de la raíz, sino que varios grupos de estas proteínas podrían estar involucrados en este proceso.

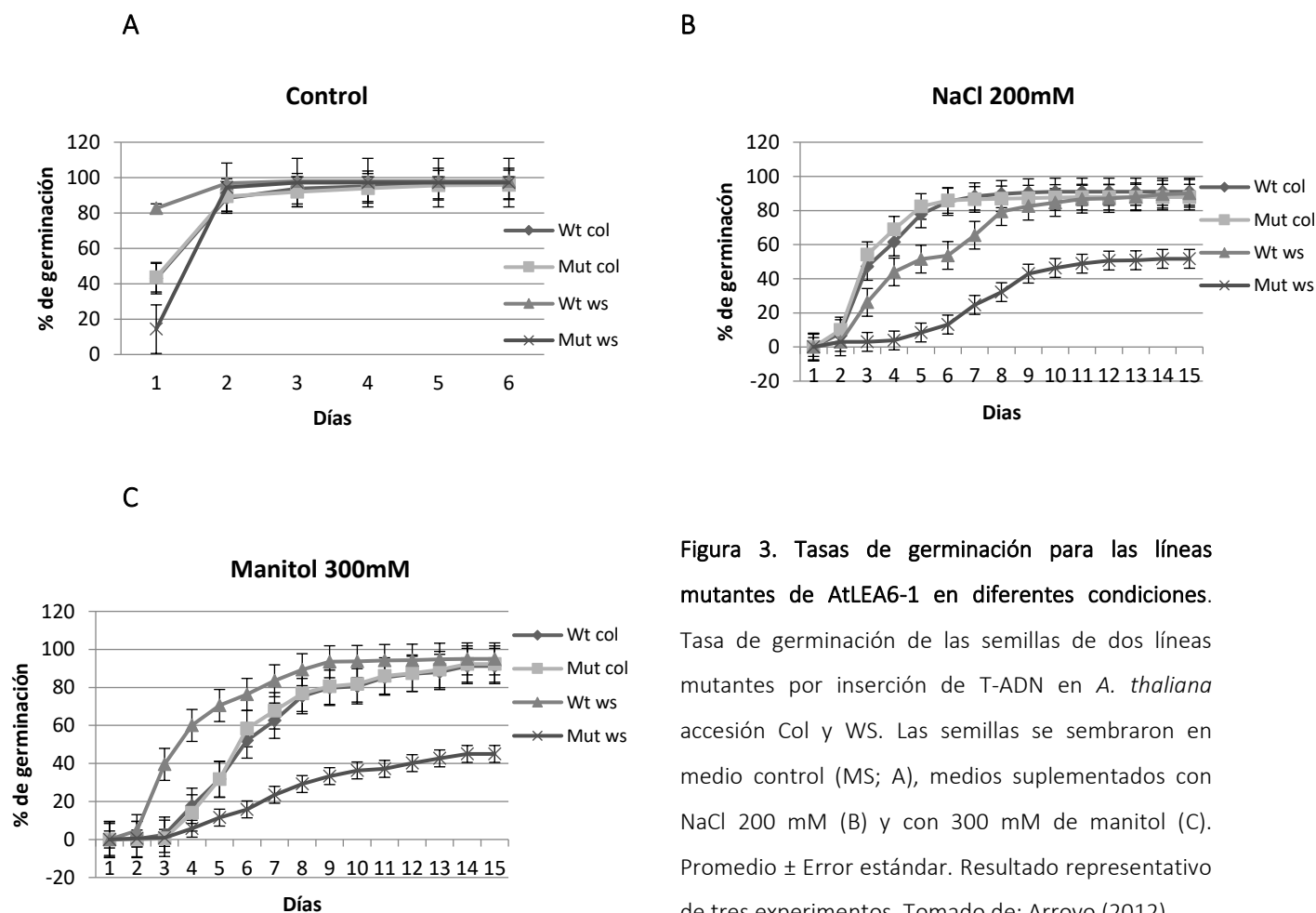


Figura 3. Tasas de germinación para las líneas mutantes de AtLEA6-1 en diferentes condiciones. Tasa de germinación de las semillas de dos líneas mutantes por inserción de T-ADN en *A. thaliana* accesión Col y WS. Las semillas se sembraron en medio control (MS; A), medios suplementados con NaCl 200 mM (B) y con 300 mM de manitol (C). Promedio \pm Error estándar. Resultado representativo de tres experimentos. Tomado de: Arroyo (2012)

Salleh *et al.* (2012) encontraron que líneas mutantes anti-sentido de *A. thaliana* en el gen *SAG21/AtLEA5* que codifica para una proteína LEA atípica, presentaban una raíz primaria más corta y un menor número de raíces laterales en comparación a la línea de tipo silvestre, cuando las plántulas crecieron bajo condiciones de irrigación óptima; además, cuando la raíz crece bajo condiciones de déficit hídrico, hay una acumulación en altas concentraciones de

SAG21. El estudio llevado a cabo por Salleh *et al.* (2012) es la primera evidencia concreta que demuestra la participación de una proteína LEA en el desarrollo radical. Sin embargo, SAG21 es una proteína LEA atípica que no comparte las características de las proteínas LEA 'típicas' o hidrofílicas, por lo que sus estudios dejan abierta la pregunta de si las proteínas LEA típicas también juegan un papel en el desarrollo de la raíz en condiciones óptimas de crecimiento y/o de estrés.

Debido a la escasa información que hay hasta el momento del papel de las proteínas LEA en el desarrollo de la raíz se consideró relevante analizar el fenotipo de la mutante en el gen *AtLEA6-1* (*atlea6-1*) con el objetivo de conocer la función que esta proteína pudiera tener en los procesos de crecimiento y/o desarrollo de la raíz de *A. thaliana*. Además de los antecedentes antes citados, la proteína AtLEA6-1 se escogió porque según los resultados de secuenciación de ARN disponibles en TAIR, el transcrito del gen *AtLEA6-1* se acumula en la raíz de plántulas sometidas a condiciones de déficit hídrico; además, en el laboratorio se cuenta con una línea mutante en el gen *AtLEA6-1* que en análisis previos presentó una raíz primaria más corta y menor número de raíces laterales, en comparación con la línea de tipo silvestre, en plántulas crecidas en condiciones de déficit hídrico. Dado estos antecedentes, se planteó la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

La proteína AtLEA6-1 participa como un modulador del desarrollo y/o crecimiento de la raíz primaria y raíces laterales de *A. thaliana* en condiciones de estrés salino.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la proteína AtLEA6-1 en el desarrollo de la raíz primaria y de las raíces laterales mediante la caracterización fenotípica de la mutante de pérdida de función *atlea6-1* de *A. thaliana* en condiciones de estrés salino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la participación de la proteína AtLEA6-1 en el desarrollo de la raíz primaria de *A. thaliana* ante estrés salino.
- Determinar la participación de la proteína AtLEA6-1 en el desarrollo de las raíces laterales de *A. thaliana* ante un estrés salino.
- Evaluar los procesos de crecimiento y/o desarrollo en los cuales participa AtLEA6-1 en las zonas meristemática y de elongación de la raíz primaria.
- Determinar la actividad del promotor de *AtLEA6-1* en la raíz de *A. thaliana* mediante el análisis de líneas transgénicas que contienen el promotor de *AtLEA6-1* fusionado a genes reporteros.

4. METODOLOGÍA

4.1. Material vegetal

Todas las líneas utilizadas en este proyecto están en el fondo genético de *A. thaliana* accesión Wassilewskija (Ws) puesto que es el fondo genético en el que se encontraban las mutantes accesibles. La mutante *atlea6-1* (FLAG_584B07) se obtuvo del *Institut National Recherche Agronomique* (INRA, Versailles, Francia). Para determinar la ubicación de la inserción de T-ADN en el genoma de línea *atlea6-1* se utilizaron los oligonucleótidos 35SFW (5' GGG TCT TGC GAA GGA TAG TGG 3') y AtLEA6-1Rv (5' CGG AAC GCC CTG ACG G 3'). La inserción de T-ADN está a 17 pares de bases antes del ATG del marco de lectura en el gen *AtLEA6-1* (AT2G23110).

Para la esterilización, las semillas se agitaron en 1 ml de etanol (EtOH) al 100% durante 3 minutos, se decantó y se agitaron durante 7 minutos con una solución que contenía hipoclorito al 40% (Cloralex) y tritón X-100 0.02% (Sigma, St. Louis. MO, USA). Posteriormente, se hicieron seis lavados durante 30 segundos cada uno con agua destilada estéril y las semillas se estratificaron en oscuridad y a 4°C durante tres días.

4.2. Condiciones de crecimiento

Para las condiciones *in vitro*, las plantas crecieron de manera vertical en placas Petri cuadradas de medidas 12x12x1.7 cm de largo, ancho y alto, respectivamente, que contenían medio Murashige & Skoog (MS) al 0.2X, 1% de sacarosa, 0.5 g/L MES y 1% de Bacto-agar. Para las condiciones de estrés salino se prepararon medios de cultivo con concentraciones de NaCl 50 mM, 75 mM ó 100 mM. Por otra parte, para las condiciones de estrés osmótico se usó una concentración 300 mM de manitol. Las plantas crecieron en cámaras de crecimiento Percival con las siguientes condiciones: 75 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de iluminación, un fotoperiodo largo (16 horas luz y 8 horas oscuridad) y una temperatura de 22°C.

Para llevar a cabo los tratamientos de estrés salino y osmótico, las semillas germinaron en condiciones control sobre celofán dulce. Posteriormente, al segundo día de sembradas, se trasladaron a los diferentes tratamientos (Control, NaCl y manitol).

4.3. Cinéticas de germinación

Se realizaron estudios de la cinética de germinación de semillas provenientes de la línea de tipo silvestre y de la línea mutante *atlea6-1*. Para ello, 100 semillas de cada línea se sembraron sobre medio de crecimiento con las condiciones control. La germinación de las semillas se monitoreó observándolas cada seis horas (de 0 a 72 h) bajo un microscopio estereoscópico NIKON® SMZ1500, considerando una semilla germinada aquélla en donde la radícula claramente había roto la testa. Debido a que el tiempo de germinación de las semillas de la línea mutante y de tipo silvestre varía según el lote, cada vez que se recolectaban semillas nuevas se debía repetir el estudio de la cinética de germinación. El experimento se repitió dos veces.

4.4. Cinética de crecimiento de la raíz primaria y análisis de la arquitectura de la raíz

Para realizar los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria y el análisis de la arquitectura de la raíz, las semillas de la línea de tipo silvestre y de la *atlea6-1* se esterilizaron y sembraron sobre celofán dulce en condiciones control. Considerando el retraso registrado en la germinación de las semillas pertenecientes a la línea *atlea6-1*, estas se sembraron entre 6 y 12 horas de diferencia con respecto a las semillas de la línea de tipo silvestre, con el

propósito de garantizar una germinación sincronizada. Al segundo día de sembradas las semillas, estas se trasplantaron a medios control suplementados con NaCl 50 mM, NaCl 75 mM, NaCl 100 mM, manitol 300 mM o a medio sin agentes estresantes. Se sembraron 30 semillas por cada línea y para cada tratamiento, y solo se realizó el seguimiento de la cinética de crecimiento de la raíz primaria durante nueve días de aquellas plántulas que germinaron hasta el segundo día, las demás se descartaron. Finalizado el estudio de la cinética de la raíz primaria, las cajas donde crecieron las plántulas se escanearon en un Scanner EPSON® Perfection V600 Photo y se analizaron con el programa ImageJ®. El experimento se repitió tres veces.

Al finalizar el estudio de la cinética de crecimiento de la raíz primaria, se recortó el vástago de las plántulas de las líneas de tipo silvestre y mutante *atlea6-1*. Posteriormente, las raíces se escanearon nuevamente a 800 dpi y se determinaron los diferentes parámetros de la arquitectura de la raíz con ayuda del 'software' de libre acceso Ez-Root-VIS (Armengaud et al., 2009; Shahzad et al., 2018).

4.5. Análisis cuantitativo del meristemo apical de la raíz a nivel celular

Para realizar el análisis cuantitativo del meristemo apical de la raíz (RAM, de sus siglas en inglés *Root Apical Meristem*) a nivel celular, se tomaron 10 plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* sometidas durante 7 días a condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM), las cuales se tiñeron por el método de Pseudo-Shiff (Truernit et al., 2008) y se aclararon usando las modificaciones para esta técnica de Napsucialy-Mendivil *et al.* (2014). Desde las células del Centro Quiescente (CQ) hasta 20 células después de la aparición del primer pelo radical, se contaron y midieron las células corticales de la misma fila celular en el software ImageJ®. El análisis cuantitativo del RAM se realizó con el algoritmo de Pacheco-Escobedo *et al.* (2016). Por otra parte, la duración del ciclo celular y el número de células que abandonan el dominio de proliferación durante 24 horas se determinó siguiendo la metodología de Ivanov & Dubrovsky (1997) (López-Bucio *et al.*, 2014) y Napsucialy-Mendivil et al. (2014), respectivamente. Estos experimentos se repitieron dos veces.

4.6. Análisis fenotípicos del desarrollo de las raíces laterales

Para los análisis fenotípicos del desarrollo de las raíces laterales, se seleccionaron 10 plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1*, sometidas durante 8 días a condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM). En este periodo las plántulas de la línea *atlea6-1* presentaban al menos 5 raíces laterales visibles. Las raíces se aclararon utilizando NaOH y metanol (Malamy & Benfey, 1997), siguiendo las indicaciones de Napsucially-Mendivil & Dubrovsky (Ristova *et al.*, 2018). El conteo de los primordios de las raíces laterales y de las raíces laterales se realizó según Napsucially-Mendivil & Dubrovsky (Ristova *et al.*, 2018).

4.7. Construcciones genéticas

Las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* se produjeron por el maestro en ciencias Inti Arroyo (Arroyo, no publicado). Para la obtención de las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1*, el gen *AtLEA6-1* se amplificó incluyendo sus regiones 5' y 3' no traducidas con los cebadores FwNcoI_AtLEA6-1 (5' GGT GGT CCA TGG AGG ATC AGA AAA AGC C 3') y RvBstEII_AtLEA6-1 (5' GGT GGT GGT NAC CTC ACG GAA CGC CCT GAC GG 3'), los cuales tienen en sus extremos los sitios de restricción para BstEI y NcoI, respectivamente. El producto de PCR que contenía el *AtLEA6-1* y los sitios de restricción BstEI y NcoI se clonó en el vector pCAMBIA 1304. El plásmido *p35S:AtLEA6-1;pCAMBIA1304* se verificó por secuenciación y se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* GV 301 para posteriormente transformar plantas de *A. thaliana atlea6-1* con esta construcción genética por el método de inmersión floral (Clough & Bent, 1998).

Las líneas reporteras *pAtLEA6-1:GUS* y *pAtLEA6-1:GFP* se obtuvieron amplificando 1 kb de la región promotora del gen *AtLEA6-1* con los cebadores CACCpAtLEA6-1Fw (5' CAC CGG TGT TTA GTT GGT GGC CGT TGC 3') y pAtLEA6-1Rv (5' CTT GTT ATG CGT TTT GCT AAA TG 3'). El producto de PCR se insertó en el vector de entrada pENTR/SD/D'TOPO (Invitrogen) y se recombinó con la LR Clonase™ (Invitrogen) en los vectores destino pMDC107 y pMDC163, los cuales contienen el gen que codifica para la proteína reportera GFP y GUS, respectivamente. Por último, estas construcciones genéticas se corroboraron por secuenciación para, subsecuentemente, introducir las en *Agrobacterium tumefaciens* GV

3010 y transformar plántulas de *A. thaliana* accesión WS de la línea de tipo silvestres por el método de inmersión floral (Clough & Bent, 1998). La tinción de GUS se hizo en siete líneas independientes que se encontraban en la generación T2 o T3 siguiendo la metodología de Jefferson *et al.* (1987). El análisis de las líneas reporteras *pAtLEA6-1:GFP* se realizó en 5 líneas independientes que estaban en la generación T2 o T3. Las raíces analizadas crecieron en medios control y suplementados con NaCl 75 mM.

4.8. Microscopia óptica y confocal

Las raíces teñidas mediante el método de Pseudo-Shiff (Truernit *et al.*, 2008) se observaron a través de un microscopio Olympus BX40 que contaba con óptica Normaski; las fotografías se tomaron con una cámara Evolution MP (Media Cybernetics) y se superpusieron en Image-Pro® Insight (Media Cybernetics).

Por otra parte, las raíces aclaradas con NaOH y metanol (Malamy & Benfey, 1997) se observaron en un microscopio Nikon® ECLIPSE E600 equipado con lentes Normaski; algunos primordios se fotografiaron con una cámara Nikon® DS Fi1.

Finalmente, algunos de los análisis por microscopia confocal se realizaron en un sistema de microscopia de escaneo laser confocal (CLSM), construido en un microscopio Zeiss Axiovert 200M, el cual está equipado con un objetivo EC Plan-NEO FLUAR 20x (Oberkochen, Alemania). El microscopio cuenta con un láser que emite luz de 488 nm con filtros de paso de banda de 630/92 nm, para detectar la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) y del yoduro de propidio, respectivamente. Mayor información del funcionamiento del microscopio se encuentra en Reyes-Hernández *et al.* (2019). También, se utilizó un microscopio confocal Olympus FV100 invertido equipado con un objetivo 20X.

4.9. Extracción de ARN, síntesis de cADN y RT-PCR de punto final.

Se extrajo el ARN total de la raíz de plántulas de las líneas de tipo silvestre, *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* crecidas en medios control y medios suplementados con sal (NaCl 75 mM). Para este fin, se sembraron 100 semillas de cada línea en medio control y al segundo día de sembradas, las semillas se trasplantaron a los medios que contenían los diferentes

tratamientos. Al sexto día se cortaron las raíces de todas las plántulas y se extrajo ARN total de este órgano vegetal. El ARN se extrajo con CTAB siguiendo el protocolo de Acosta-Maspons *et al.* (2019). Después, la integridad del ARN extraído se analizó en un gel que contenía hipoclorito 6% (Cloralex) y agarosa 1% (Aranda, *et al.*, 2012). Luego, 500 ng de ARN se trataron con ADNasa I (Thermo Fisher) según las indicaciones del proveedor. Posteriormente, el cADN se obtuvo utilizando la RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) y el cebador poli-dT, según el protocolo de manufactura. Por último, para la RT-PCR semicuantitativa se tomó 1 µL del cADN de cada muestra y se amplificó con los cebadores eIF4Fw y eIF4Rv, el cADN de eIF4 se usó como gen de referencia, en tanto que los cebadores CACCA_tLEA6-1ATGFw y AtLEA6-1TGARv se utilizaron para amplificar el cADN de *AtLEA6-1*, por último, se usaron los oligonucleótidos cTADN-LEA6-1Fw (5' CGA TTG CCC TCA TTT TTA GC 3') y AtLEA6-1Rv c/stop (5' TCA CGG AAC GCC CTG ACG G 3') para determinar el inicio del transcrito de *AtLEA6-1* en las líneas *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1*. Los productos de las reacciones de PCR (10 µL) se analizaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio 4%. El gel de agarosa se corrió durante 40 minutos a 80 V. Los geles se fotografiaron en el foto documentador ImageQuant 300™ (General Electric®).

4.10. Análisis estadísticos

Para cada experimento se realizaron tres o dos replicas biológicas según se indica. Al finalizar el experimento, se verificó que los datos distribuyeran de manera Gaussiana mediante la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson. En el caso de que algún tratamiento no pasara la prueba de normalidad se realizó una exclusión de datos atípicos con el método de ROUT (Motulsky *et al.*, 2006). Finalmente, para la comparación de medias se hicieron pruebas paramétricas *t*-Student con un diseño experimental apareado y una diferencia estadísticamente significativa a partir de un $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos univariados se realizaron en el programa GraphPad Prism®.

Los análisis de componentes principales (PCA) se llevaron a cabo con el 'software' estadístico de libre acceso PAST (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>) y Rstudio® (<https://www.rstudio.com/>). Debido a que todas las variables introducidas en el PCA no tenían las mismas unidades, se incluyeron los resultados de la arquitectura de la raíz en una

matriz de correlación, en la cual se normalizaron todas las variables al dividir las por su desviación estándar (Hammer, 2019). Finalmente, el PCA de tres dimensiones se realizó en el programa Rstudio® con la paquetería pcd3 diseñada para realizar este tipo de gráficos.

5. RESULTADOS

5.1. Estandarización de las condiciones de crecimiento

Anteriormente, en el laboratorio se encontró que la mutante en el gen que codifica para la proteína AtLEA6-1 presenta una raíz primaria más corta y un menor número de raíces laterales en comparación con la línea de tipo silvestre en condiciones de déficit hídrico. Estas observaciones se hicieron en plántulas que crecieron en medio MS 1X y que al sexto día después de sembradas se trasladaron a medios que contenían 125 mM de NaCl (Arroyo, no publicado). Debido a que este era el único experimento realizado durante la exploración fenotípica inicial de la mutante *atlea6-1* en el desarrollo de la raíz, el objetivo de este proyecto fue analizar a más detalle el fenotipo de las raíces en esta línea mutante con el fin de determinar la participación de esta proteína LEA en este proceso de desarrollo. En este proyecto se decidió disminuir la concentración del medio de crecimiento MS de 1X a 0.2X, ya que en muchos de los estudios relacionados con el análisis del desarrollo de la raíz de *A. thaliana* se utilizan medios a esta concentración.

Al realizar los primeros estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria de *atlea6-1*, se observó que en medios control (MS 0.2X), o adicionados con sal (50 mM, 75 mM y 100 mM) o con manitol (300 mM), las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos de déficit hídrico presentaban un menor número de raíces laterales pero una raíz primaria más larga (Fig. 6). Por consiguiente, se probaron diferentes condiciones experimentales para el seguimiento de la cinética de crecimiento de la raíz primaria, incluyendo las mismas utilizadas por Arroyo (datos no publicados). Las condiciones probadas fueron las siguientes: 1) las semillas se sembraron en medio MS 1X y las plántulas correspondientes se transfirieron al sexto día después de sembradas (dds) a medios control (MS 1X) o a medios adicionados con NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM; 2) las semillas se sembraron sobre celofán dulce en medio MS 1X y las plántulas se trasladaron en el segundo dds a medios control (MS 1X), o suplementados con NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM;

3) las semillas se sembraron en medio MS 0.2X y al sexto día las plántulas se trasplantaron a medios control (MS 0.2X) o suplementados con NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM; y 4) las semillas se sembraron sobre celofán dulce en medio MS 0.2X, cuyas plántulas se trasplantaron en el segundo dds a condiciones control (MS 0.2X) y medios suplementados con NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM. Para cada condición se analizaron 10 plántulas del tipo de tipo silvestre y 10 plántulas de la línea mutante *atlea6-1*.

Los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria en tres de las cuatro condiciones probadas mostraron que la raíz primaria de la línea *atlea6-1* crece más en condiciones de déficit hídrico en comparación con la línea de tipo silvestre (Anexo 2), tanto en medio MS 1X como 0.2X, corroborando los resultados obtenidos en los primeros estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria realizados en este proyecto. Adicionalmente, se utilizó el osmómetro WESCOR® SMZ1500 para determinar la diferencia en la concentración de solutos que había entre los medios preparados con MS al 1X y al 0.2X (Tabla 2). Se encontró que el promedio de la diferencia entre los medios MS1X y 0.2X sin suplementar o suplementados con NaCl o manitol en la osmolalidad es de 71.7 ± 13.3 mmol/kg, siempre con mayor osmolalidad en los medios preparados con MS1X. En términos de osmolalidad esta diferencia implicaría que es similar tener un medio de cultivo MS 1X que un medio de cultivo MS 0.2X adicionado con NaCl 30 mM. Asimismo, el aumento en la concentración de NaCl en los medios MS genera un incremento en la osmolalidad de manera lineal, con un R^2 de 0.998 y 0.995 para medios preparados con MS 0.2X y MS 1X, respectivamente (Tabla 2).

Debido a que los resultados en varias de las condiciones probadas mostraron que la raíz primaria de la línea mutante *atlea6-1* crece más que la raíz primaria de las plántulas de tipo silvestre, se decidió utilizar medios MS 0.2X, ya que presentan una menor osmolalidad en comparación a los medios que contenían MS 1X, reduciendo así la posibilidad de generar un estrés adicional debido a las altas concentraciones de solutos en el medio. Además, no se encontró en los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria una afectación en el desarrollo de la raíz por parte del celofán dulce, por lo cual se concluyó sembrar las semillas

sobre este y trasplantarlas a los diferentes tratamientos al segundo día después de sembradas (48 horas).

Tabla 2. Osmolalidad de los medios de cultivo utilizados durante la estandarización de condiciones de crecimiento.

	MS 0.2X	MS 1X
	Osmolalidad promedio (mmol/kg)	Osmolalidad promedio (mmol/kg)
NaCl 0 mM	11.3 ± 3.1	67.0 ± 1.7
NaCl 50 mM	111.7 ± 5.5	175.0 ± 2.6
NaCl 75 mM	158.0 ± 1.0	246.3 ± 2.1
NaCl 100 mM	218.7 ± 3.1	288.0 ± 6.2
Manitol 300 mM	360.0 ± 3.6	441.7 ± 5.9
Ecuación	$y=2.05x+9.8$	$y=2.26x+67$
R^2	0.998	0.995

Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Se muestran los promedios ± desviación estándar.

No obstante, cuando se realizó el seguimiento de la cinética de crecimiento de la raíz primaria con un nuevo lote de semillas en las condiciones ya establecidas, se observó que en medios control la raíz primaria de la línea de tipo silvestre creció más que la raíz primaria de la línea *atlea6-1* (Fig. 4). Adicionalmente, en condiciones de estrés salino y osmótico la longitud de la raíz primaria de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* no presentaron diferencias significativas (datos no mostrados). Estos resultados no coincidían con los obtenidos anteriormente. Sin embargo, se encontró que esta diferencia en la longitud de la raíz primaria se debe a que las plantas no germinaron de manera sincronizada (Arroyo, no publicado). Por ello se realizaron estudios de la cinética de germinación con el fin de determinar el tiempo de retraso que presentaban las semillas *atlea6-1*.

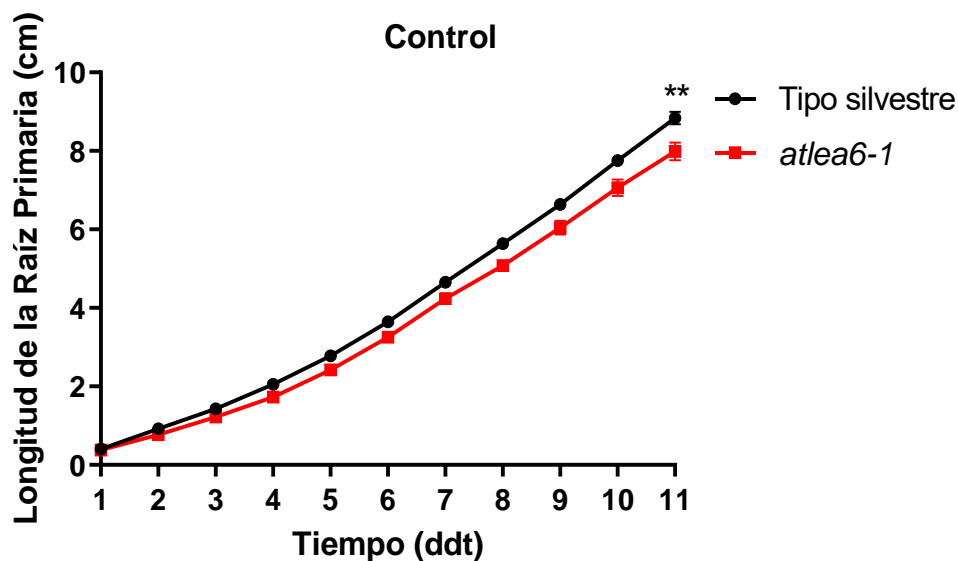


Figura 4. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* sembradas a la misma hora en condiciones control. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* crecidas en medios control y trasplantadas al segundo día después de sembradas (dds) a medios con las condiciones control. La cinética de crecimiento se estudió durante 11 días después del trasplante (ddt). Promedio \pm Error estándar (EE), tipo silvestre $n=27$, *atlea6-1* $n=26$). $**P<0.0021$. ddt: días después del trasplante. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

5.2. La proteína AtLEA6-1 está involucrada en el tiempo de germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Debido a que las semillas de línea mutante *atlea6-1* no germinaban sincronizadamente con las semillas de la línea de tipo silvestre, se realizó un estudio de la cinética de germinación para determinar la diferencia que presentaban ambas líneas en los medios control. Aunque ya se había observado que las semillas de la línea *atlea6-1* tienen una germinación tardía en medios control MS 1X (Arroyo, sin publicar), estos análisis se realizaron en condiciones de luz y en medio de cultivos diferentes a los utilizados en este estudio.

Para los estudios de la cinética de germinación, después de esterilizadas, las semillas de las líneas de tipo silvestre y mutante *atlea6-1* se dejaron estratificar tres días en oscuridad a 4°C. Luego, éstas se sembraron en cajas Petri redondas y se determinó cada seis horas la cantidad de semillas germinadas. Las semillas de la línea de tipo silvestre comenzaron a

germinar entre las cero y seis horas después de sembradas (dds), presentando el 100% de germinación entre las 24 y 30 horas dds (Fig. 5). Por el contrario, las semillas de la línea mutante *atlea6-1* comenzaron a germinar entre las 6 y 12 horas dds, lo cual muestra un retraso en la germinación de aproximadamente 12 horas (Fig. 5). No obstante, todas las semillas viables de la línea de tipo silvestre germinaron en un lapso de 30 horas, mientras que las semillas de la línea *atlea6-1* lo hicieron en 36 horas. Estos resultados muestran que cuando se encuentra mutado el gen *AtLEA6-1*, las semillas de *A. thaliana* tardan más tiempo en germinar, indicando que *AtLEA6-1* está involucrada en la regulación del tiempo de germinación de las semillas. Además, en las mismas condiciones se encontró que, a diferencia de la línea de tipo silvestre, la capacidad de germinación de las semillas de la línea mutante es del 97% a las 78 horas y no del 100%, confirmando los resultados obtenidos en otros estudios en donde las semillas de *atlea6-1* mostraron un envejecimiento acelerado (Arroyo, no publicado).

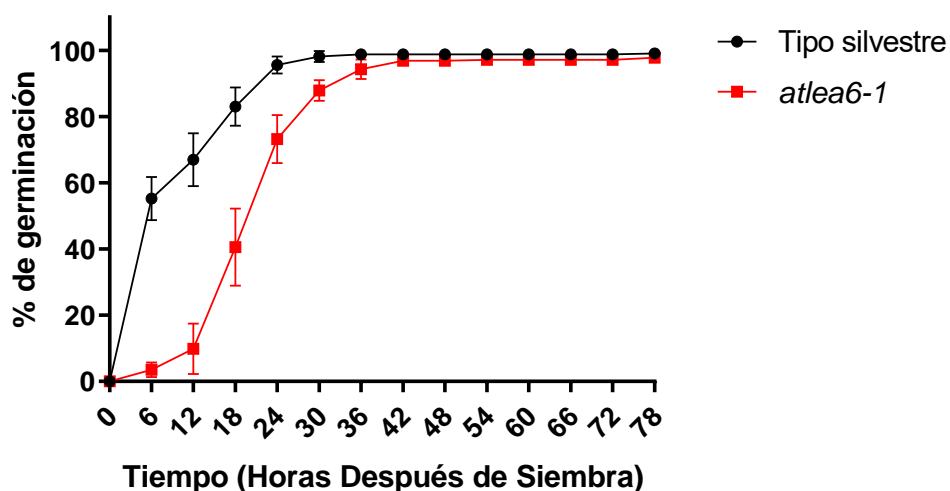


Figura 5. La proteína *AtLEA6-1* participa en la modulación del tiempo de germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones control. Porcentaje de germinación acumulada de las semillas de las líneas de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones óptimas de crecimiento. La germinación se cuantificó considerando la emergencia de la radícula al romper claramente la testa. Se utilizaron semillas de líneas homocigotas colocadas sobre medio MS 0.2X. Promedio \pm desviación estándar (DE). tipo silvestre $n= 278$, *atlea6-1* $n=304$. Resultados representativos de tres experimentos.

5.3. La proteína AtLEA6-1 está involucrada en el desarrollo de las raíz primaria y raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*.

Las proteínas LEA se expresan prácticamente en cualquier condición que cause déficit hídrico, y en algunos casos bajo otras condiciones de estrés; sin embargo, aunque se conoce que, al menos para algunas de ellas, su ausencia genera susceptibilidad de las plantas a condiciones de estrés, se desconoce cuál es la función o funciones que estas proteínas realizan *in vivo* ante la deficiencia de agua. Además, hasta el momento, no hay ningún reporte de una línea mutante de pérdida de función de una LEA típica que genere un efecto en el crecimiento de la raíz ante condiciones de estrés hídrico. Anteriormente, por ensayos de inmunodetección con un anticuerpo anti-PvLEA6 se demostró que la proteína LEA del grupo 6 de *Phaseolus vulgaris* (PvLEA6) se acumula altamente en la raíz del frijol común (Colmeneros-Flores *et al.*, 1999) y, debido al gran grado de similitud que hay entre la PvLEA6 y AtLEA6-1, se infiere que la proteína AtLEA6-1 también se acumula en la raíz de *A. thaliana* y, que realiza alguna función durante el desarrollo de este órgano en condiciones de déficit hídrico.

Para determinar si la falta de la proteína AtLEA6-1 ocasiona un efecto en el crecimiento de la raíz primaria y en el número de raíces laterales en *A. thaliana*, se hizo un estudio de la cinética de crecimiento de la raíz primaria de la línea de tipo silvestre y de *atlea6-1* en medios control, o en medios suplementados con 50 mM, 75 mM ó 100 mM de NaCl, ó 300 mM de manitol. Debido a que las semillas de la línea *atlea6-1* presentan un retraso en su germinación de seis a 12 horas (Fig. 5), para realizar los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria, las semillas de *atlea6-1* se sembraron en medios control con seis horas de anticipación a las semillas de la línea de tipo silvestre. A los dos días después de sembradas, cuando ya habían germinado todas las semillas, estas se trasplantaron a medios control y medios suplementados con sal o manitol. Se encontró que la raíz primaria de la línea *atlea6-1* en los diferentes medios probados crece más rápido que la raíz primaria de la línea de tipo silvestre (Fig. 6). En los primeros días después del trasplante (ddt) no se observaron diferencias en la longitud de la raíz primaria; sin embargo, después del tercer ddt en condiciones de déficit hídrico y a los seis ddt en los medios control, la raíz primaria de la

línea mutante es más larga que la raíz de las plántulas de tipo silvestre; diferencia que tiende a aumentar con el tiempo (Fig. 6). Adicionalmente, se observó que las condiciones de déficit hídrico generan una disminución en el número de raíces laterales en la línea de tipo silvestre y mutante (Fig. 7). La disminución en el número de raíces laterales se correlaciona de manera negativa con la concentración de osmolitos en el medio, por ende, a medida que aumentan la concentración de osmolitos disminuye el número de raíces laterales en ambos genotipos (Fig. 7). Además, en los diferentes medios causantes de déficit hídrico analizados, las plántulas de *atlea6-1* presentaron un menor número de raíces laterales en comparación a la línea de tipo silvestre (Fig. 7). La diferencia que hay entre la línea de tipo silvestre y la *atlea6-1* en el número de raíces laterales es un efecto que parece aumentar al incrementar las concentraciones de solutos en el medio (Fig. 7). En efecto, a concentraciones de NaCl 100 mM y de manitol 300 mM (Fig. 7) es donde se presentaron mayores diferencias entre el número de raíces laterales entre ambas líneas ($P < 0.0002$ y $P < 0.0021$, respectivamente), incluso a concentraciones de 300 mM de manitol varias plántulas de la línea *atlea6-1* no presentaron ninguna raíz lateral (Fig. 7).

Los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria y el conteo del número de raíces laterales de las líneas de tipo silvestre y *atlea6-1* muestran que *AtLEA6-1* podría funcionar como un modulador negativo del crecimiento de la raíz primaria en condiciones control y de déficit hídrico (Fig. 6) y, como un modulador positivo del desarrollo de las raíces laterales (Fig. 7) de *A. thaliana* en condiciones de déficit hídrico.

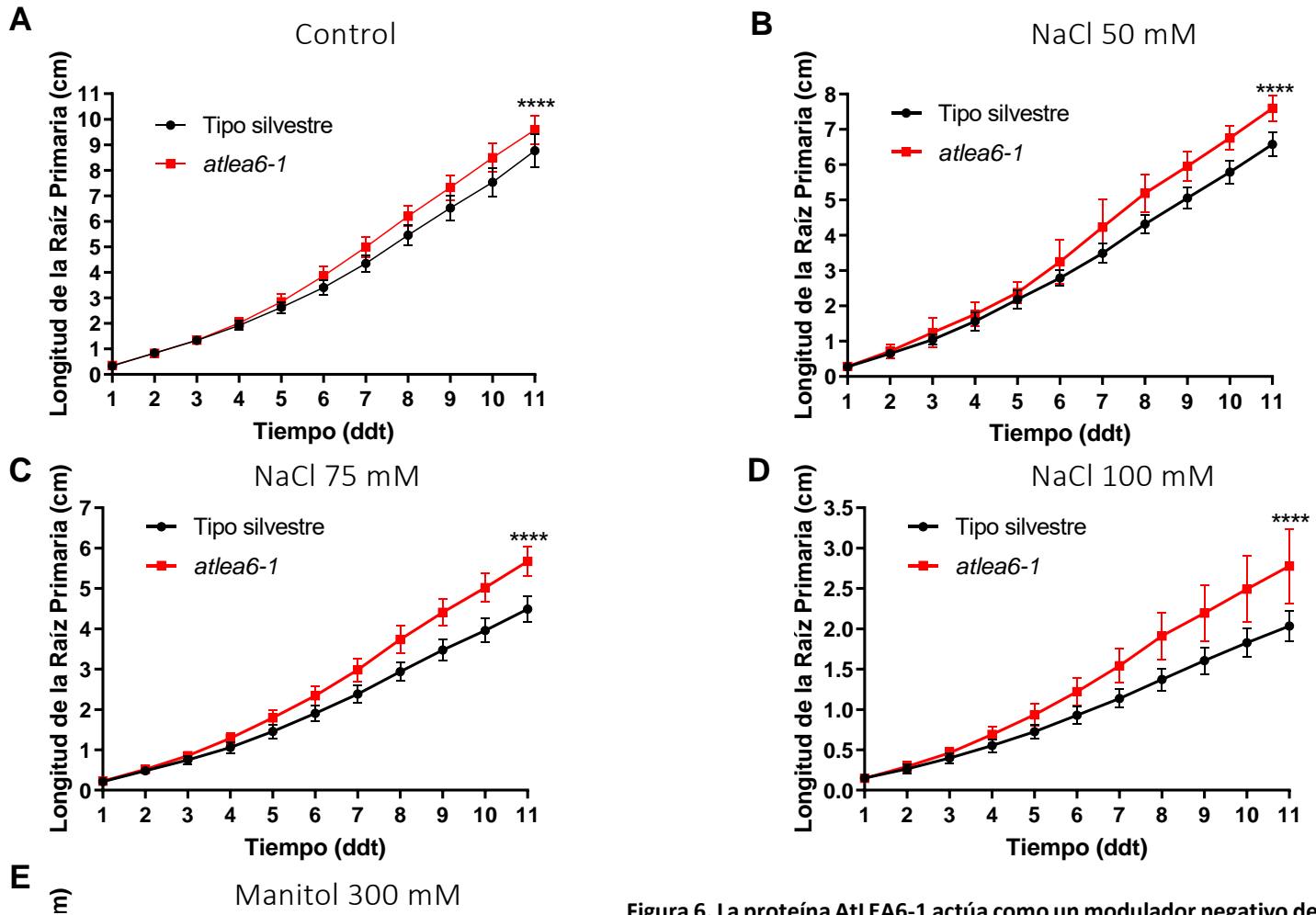


Figura 6. La proteína AtLEA6-1 actúa como un modulador negativo del crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* en condiciones control y de déficit hídrico. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de las líneas de tipo silvestre y *atlea6-1* en medios control (A) y suplementados con NaCl 50 mM (B), NaCl 75 mM (C), NaCl 100 mM (D) y manitol 300 mM (E). A) línea de tipo silvestre $n=27$; *atlea6-1* $n=27$. B) línea de tipo silvestre $n=27$; *atlea6-1* $n=25$. C) línea de tipo silvestre $n=23$; *atlea6-1* $n=27$. D) línea de tipo silvestre $n=27$; *atlea6-1* $n=23$. E) línea de tipo silvestre $n=24$; *atlea6-1* $n=27$. promedio \pm DE, ns= no significativo, **** $P<0.0001$. Resultados representativos de tres experimentos.

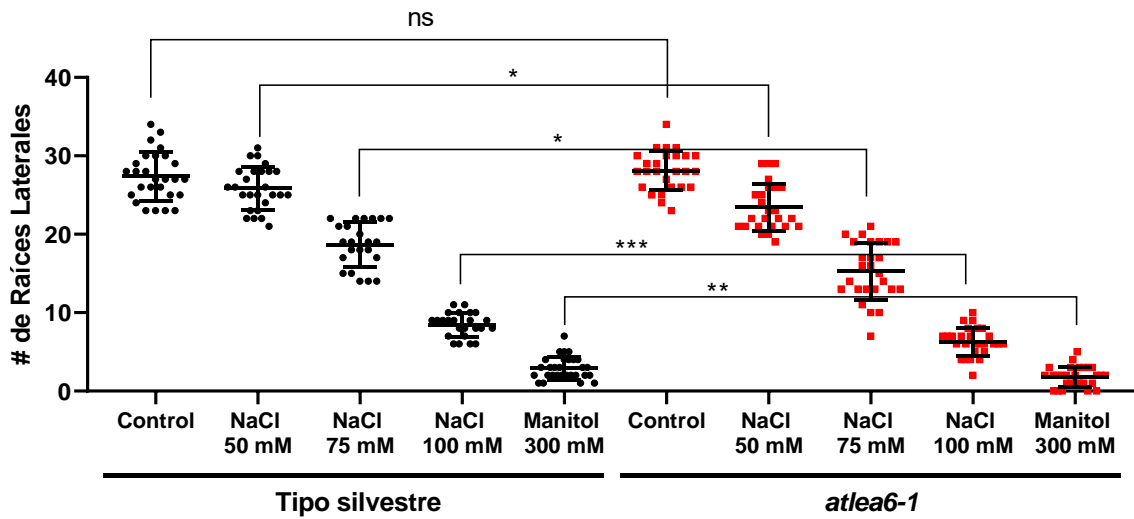


Figura 7. La proteína AtLEA6-1 es un promotor del desarrollo de las raíces laterales de *A. thaliana* en condiciones de déficit hídrico. Número de raíces laterales de las líneas de tipo silvestre y *atlea6-1* en medios control y suplementados con NaCl 50 mM, NaCl 75 mM, NaCl 100 mM y manitol 300 mM. El conteo del número de raíces laterales se hizo en las líneas de tipo silvestre y *atlea6-1* al noveno ddt a los diferentes tratamientos. Control; línea de tipo silvestre $n=27$; *atlea6-1* $n=26$. NaCl 50 mM; línea de tipo silvestre $n=26$; *atlea6-1* $n=25$. NaCl 75 mM; línea de tipo silvestre $n=23$; *atlea6-1* $n=26$. NaCl 100 mM; línea de tipo silvestre $n=24$; *atlea6-1* $n=27$. Manitol 300 mM; línea de tipo silvestre $n=29$; *atlea6-1* $n=28$. Promedio \pm Desviación estándar (DE), ns= no significativo $*P<0.05$, $**P<0.0021$, $***P<0.0002$). Resultados representativos de tres experimentos.

Para confirmar que el fenotipo observado de la línea mutante *atlea6-1* se debe a que la inserción de T-ADN en *AtLEA6-1* genera una mutante de pérdida de función, se utilizaron líneas construidas anteriormente que contenían fusionado el promotor 35S al marco de lectura abierto del gen *AtLEA6-1* en fondo genético *atlea6-1* (Arroyo, no publicado). De las líneas existentes conteniendo esta construcción se seleccionaron aquéllas que mostraron reversión del fenotipo mutante en la germinación durante varias generaciones, tras el análisis de las cinéticas de germinación. Los resultados obtenidos mostraron que solo dos de las líneas analizadas cumplieron con esta característica, además de mostrar una tasa de germinación similar a la de la línea de tipo silvestre tanto en condiciones control, como en medios suplementados con NaCl 200 mM o manitol 350 mM (Arroyo, no publicado). Los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria en estas líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(12)* se realizaron sólo en medios suplementados con

NaCl 75 mM, ya que, en los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria de los experimentos anteriores, los fenotipos observados en estrés salino son más penetrantes que los observados en estrés osmótico (Fig. 6 y 7). Además, NaCl 75 mM demostró ser una concentración de sal que permitía contrastar los fenotipos de la línea de tipo silvestre y mutante.

Las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1 (4 y 12)* presentan una raíz primaria más corta en comparación con la línea mutante y de tipo silvestre en condiciones control (Fig. 8A), siendo la línea *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* la que presenta la raíz primaria más corta, y *atlea6-1* la que presenta una tendencia a tener la raíz primaria más larga. Sin embargo, en estos experimentos no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la línea de tipo silvestre y la línea mutante (Fig. 8A). En condiciones de estrés salino (Fig. 8B), las líneas *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(12)* presentaron la raíz primaria más larga en comparación con las líneas de tipo silvestre y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)*. Estos resultados indican que las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1 (4 y 12)*, en donde el gen *AtLEA6-1* se expresa a partir del promotor 35S, no mostraron el fenotipo de tipo silvestre que se esperaría en caso de que la proteína codificada en las construcciones en cuestión se expresara en los mismos niveles y en los mismos lugares que la proteína de tipo silvestre y, de esa manera, complementara la ausencia de la proteína en la línea mutante.

Adicionalmente, se analizó el fenotipo relacionado con la densidad de las RLs en la zona de ramificación (ZR), que comprende la zona desde la base de la raíz, hasta la raíz lateral más distal (Napsucialy-Mendivil & Dubrovsky, 2018). En la línea de tipo silvestre, *atlea6-1* y en *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)*, se encontró que las condiciones de estrés salino generan un aumento en la densidad de las RLs en comparación con plántulas de su mismo genotipo crecidas en condiciones control (Fig. 8C), en el caso de la línea de tipo silvestre el incremento de la densidad de RLs fue de 1.4 veces con respecto a las condiciones control, mientras que, en la línea *atlea6-1* este incremento fue de 1.1 veces y, en la línea *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* de 1.2 veces. Este incremento en la densidad de RLs no se observó en la línea *p35S: AtLEA6-1 atlea6-1(12)* (Fig. 8C). En las plantas crecidas en condiciones no estresantes, la línea de tipo silvestre presentó una mayor densidad de RLs en comparación con la línea *atlea6-1*, además,

no se detectaron diferencias significativas en la densidad de RL en la ZR entre la línea de tipo silvestre y las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12), sugiriendo que el fenotipo observado en *atlea6-1* se da por una desregulación del gen *AtLEA6-1* (Fig. 8C). Sin embargo, en condiciones de estrés salino las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(12)* tuvieron una densidad de RL en la ZR similar a *atlea6-1* (Fig. 8C), no mostrando la complementación esperada.

Debido a que la líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12) no mostraron el mismo tamaño de la raíz primaria y número de raíces laterales que la línea de tipo silvestre en una o ambas condiciones analizadas (Fig. 8), se decidió hacer RT-PCR de punto final para determinar si *atlea6-1* es una mutante de pérdida de función. Para ello, se analizó la expresión relativa del gen *AtLEA6-1* en raíces de plántulas de ocho dds y de seis ddt a medios control y suplementados con NaCl 75 mM de las líneas de tipo silvestre, *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12). Sorprendentemente, en condiciones control y de estrés salino, se observó una alta acumulación del transcrito de *AtLEA6-1* en las líneas *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12), pero no en la línea de tipo silvestre (Fig. 9B). Puesto que una explicación para este resultado era que el transcrito detectado en *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12) proviniera del T-ADN, primero se determinó la ubicación del T-ADN en el gen *AtLEA6-1*. La secuenciación del fragmento conteniendo la inserción del T-ADN, mostró que ésta se encuentra localizada 17 pares de bases hacia arriba del ATG de *AtLEA6-1*, en la región 5'UTR del gen (Fig. 9C). Posteriormente, con el fin de determinar si el transcrito detectado tenía origen en el T-ADN, se diseñó un oligonucleótido que hibridara con la región del T-ADN adyacente a la región codificante para *AtLEA6-1*, para realizar una reacción de PCR, utilizando como oligonucleótido reverso uno que hibrida en la región correspondiente al marco de lectura abierto para *AtLEA6-1* (Fig. 9C). Con esta reacción de PCR se mostró que el transcrito detectado en las reacciones de RT-PCR utilizando RNA de *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12) en realidad se origina desde el T-ADN, por lo que no corresponde al transcrito de plantas de tipo silvestre sino a un transcrito espurio (falso, no auténtico, Fig. 9). En las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12) no se pudo diferenciar entre la cantidad correspondiente al transcrito de *AtLEA6-1* mutante o silvestre.

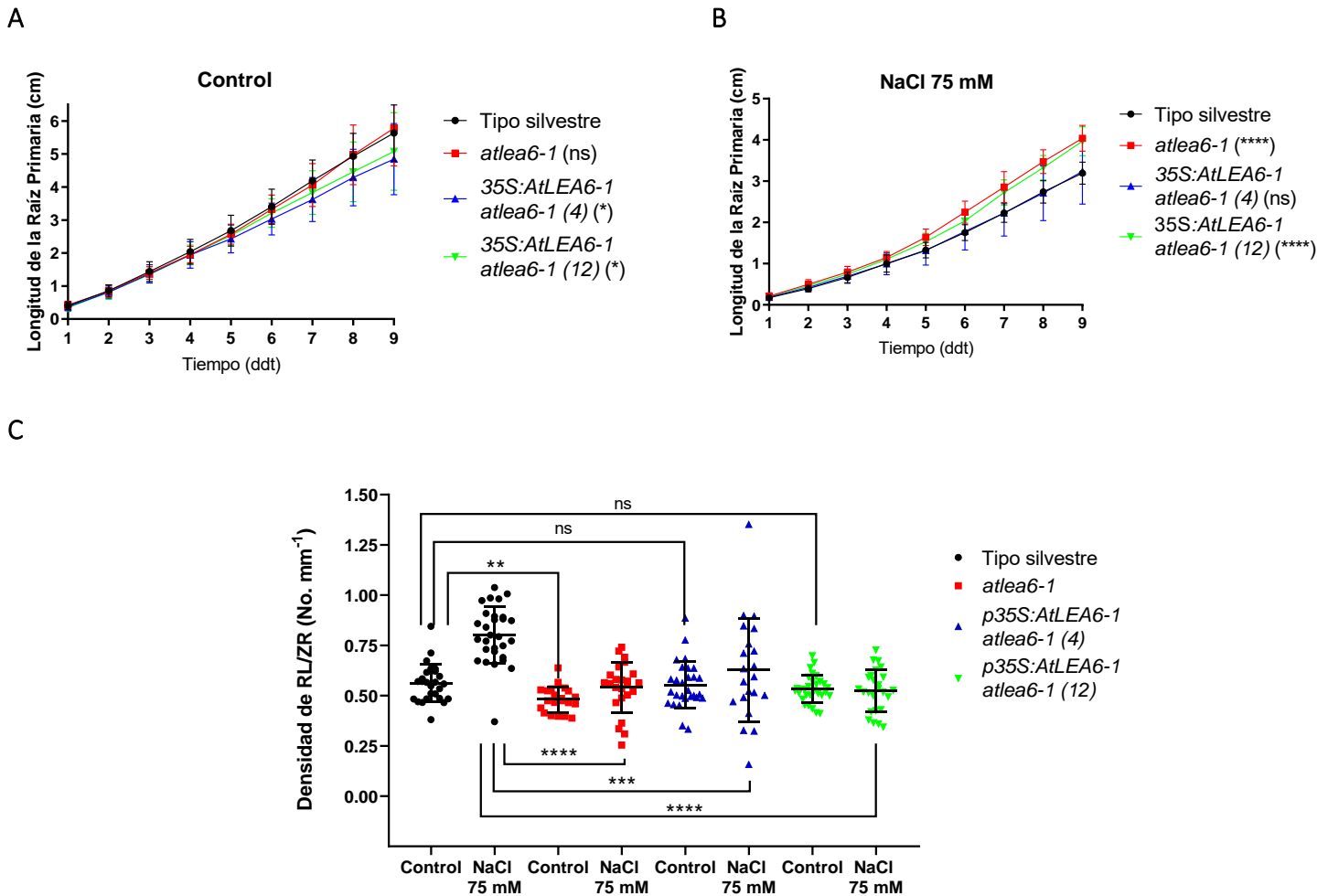


Figura 8. El fenotipo observado en la mutante *atlea6-1* es debido a la inserción de T-ADN en el gen *AtLEA6-1*. Cinética de crecimiento de la raíz primaria de las líneas de tipo silvestre, *atlea6-1*, *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(12)* en medios control (A) y suplementados con NaCl 75mM (B). La diferencia estadísticamente significativa con respecto a la línea tipo silvestre se encuentra en la leyenda del gráfico en paréntesis. Densidad de raíces laterales (RL) en la zona de ramificación (ZR) de las líneas de tipo silvestre, *atlea6-1*, *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(12)* en medios control y suplementados con NaCl 75mM (C). El conteo del número de raíces laterales se hizo 10 días después de trasplantadas las líneas de tipo silvestres y *atlea6-1* a los diferentes tratamientos. A) línea de tipo silvestre $n=30$; *atlea6-1* $n=18$; *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* $n=24$; *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(12)* $n=28$. B) línea de tipo silvestre $n=28$; *atlea6-1* $n=24$; *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* $n=21$; *p35S:AtLEA6-1(12) atlea6-1* $n=25$. C) Control; línea de tipo silvestre $n=27$; *atlea6-1* $n=21$; *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* $n=28$; *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(12)* $n=30$. NaCl 75 mM; línea de tipo silvestre $n=28$; *atlea6-1* $n=24$; *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1(4)* $n=21$; *p35S:AtLEA6-1(12) atlea6-1* $n=25$. A-C) Promedio \pm DE, ns= no significativa, * $P<0.05$, ** $P<0.0021$, *** $P<0.0002$ **** $P<0.0001$. Resultados representativos de tres replicas biológicas.

Adicionalmente, en las RT-PCR de punto final de las plántulas de tipo silvestre, no se encontró expresión de *AtLEA6-1* en condiciones control ni de estrés salino (NaCl 75 mM). Para determinar si *AtLEA6-1* es un gen inducido por sal, se realizó un estudio de la acumulación relativa del transcrito a diferentes concentraciones de NaCl. Para ello, se extrajo ARN de la raíz de plántulas crecidas en medios control y medios suplementados con 50, 100 y 150 mM de NaCl. Se encontró, que en medios control y medios suplementados con NaCl 50 y 100 mM no hay acumulación del transcrito de *AtLEA6-1*, sin embargo, en plántulas crecidas en medios suplementados con NaCl 150 mM si hay acumulación del transcrito del gen (Fig. 9A), demostrando que *AtLEA6-1* es un gen que se induce en condiciones de estrés salino.

Los resultados obtenidos de la expresión relativa de *AtLEA6-1* en condiciones control y de estrés salino (NaCl 75 mM) indican que la mutante *atlea6-1* produce un transcrito que se origina desde la inserción de T-ADN y abarca el marco de lectura abierto de *AtLEA6-1* (Fig. 9), sugiriendo que *atlea6-1* es una mutante de ganancia de función. No obstante, la evidencia fenotípica de la línea *atlea6-1* sugiere que esta es una mutante de pérdida de función (Fig. 8 y Anexo 3). Evidencia adicional que soporta la idea de que *alea6-1* es una mutante de pérdida de función proviene de análisis preliminares de otros dos alelos mutantes en el gen *AtLEA6-1*, los cuales tienen un fenotipo similar al de línea mutante *atlea6-1*; es decir, una raíz primaria más larga y menor número de RLs en comparación con la línea de tipo silvestre en plántulas crecidas en condiciones de estrés salino. Además, estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria de la línea sobre-expresora *pAtLEA6-1:AtLEA6-1 AtLEA6-1* muestran que esta línea posee una raíz primaria más corta que *atlea6-1* en medios control y suplementados con NaCl 75 mM (Anexo 3). Puesto que a la fecha se desconoce si el alelo mutante *atlea6-1* produce o no proteína de tipo silvestre, y debido a que las construcciones que se utilizaron en las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12), el gen *AtLEA6-1* se expresa del promotor 35S, el cual es un promotor fuerte y no regulado por las condiciones de estrés, los fenotipos obtenidos podrían ser consecuencia de la producción alterada (no silvestre) de esta proteína, tanto en condiciones control como de estrés. Por ello, se están analizando más líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* y, se pretende generar líneas complementadas con

construcciones en las que la *AtLEA6-1* se exprese de su propio promotor con el objetivo de brindar evidencia adicional de que *atlea6-1* es una línea mutante de pérdida de función. Finalmente, teniendo en cuenta la evidencia fenotípica de *atlea6-1*, se sugiere que *atlea6-1* es una mutante de pérdida de función.

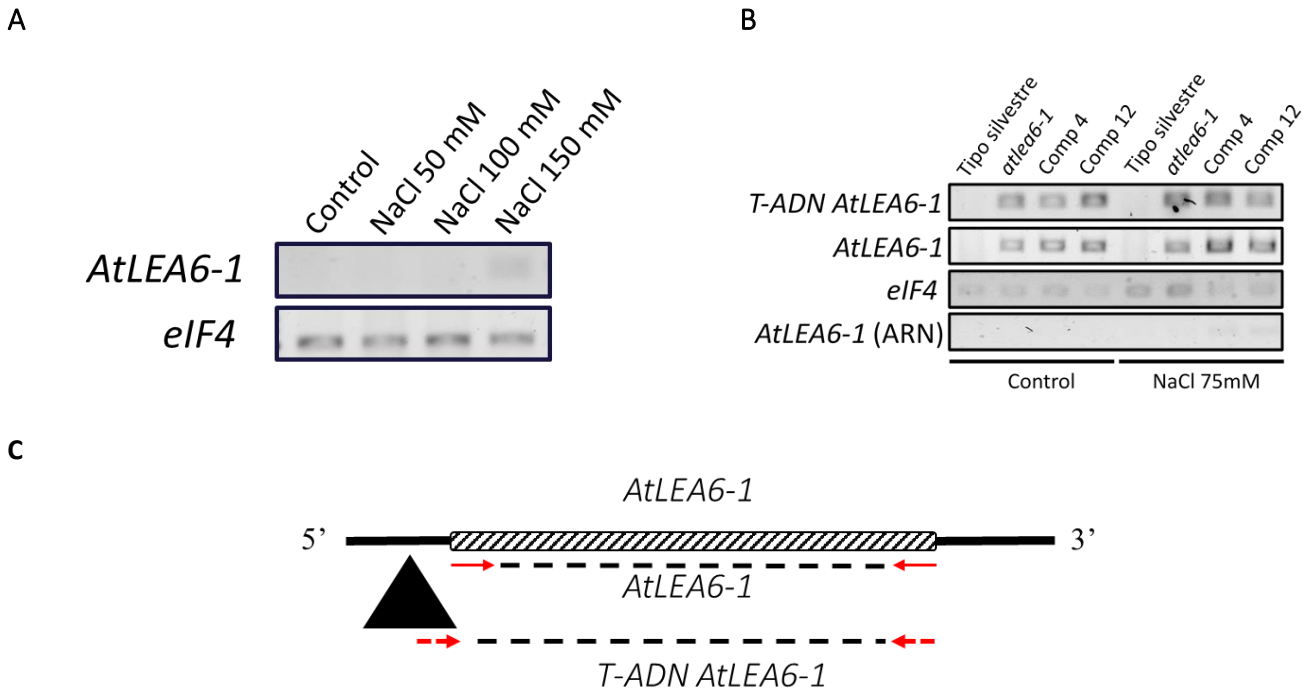


Figura 9. La inserción de T-ADN en la línea mutante *atlea6-1* se encuentra 17 pares de bases arriba del ATG de *AtLEA6-1* y genera un transcrito espurio de *AtLEA6-1*. A) RT-PCR de punto final de *eIF4* y *AtLEA6-1* de plántulas de tipo silvestre trasplantadas al segundo día de sembradas y crecidas durante 7 días en medios con MS 0.2X y suplementados con 50, 100 y 150 mM B) RT-PCR de punto final de *eIF4*, *AtLEA6-1* y *T-ADN AtLEA6-1* en raíces de plántulas trasplantadas al segundo día de sembradas y crecidas durante 6 días en medios con MS 0.2X y suplementados con NaCl 75 mM. C) Representación gráfica del gen *AtLEA6-1*. En él se muestra que el marco de lectura abierto de *AtLEA6-1* se compone de un único exón, además, se ilustran las regiones 5' y 3' UTR. La inserción de T-ADN de la mutante *atlea6-1* se representa con un triángulo negro, la cual se encuentra a 17 pares de bases arriba del ATG. Finalmente, se muestra la localización de los oligonucleótidos (flechas rojas) utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de *AtLEA6-1* y para comprobar que el transcrito obtenido de *AtLEA6-1* en las RT-PCRs de punto final de *atlea6-1* y *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12) provienen del T-ADN (flechas rojas punteadas). Los gels completos de A y B con sus respectivos controles se encuentran en el Anexo 1. Comp4= *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4) y Comp12= *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (12). Resultados representativos de dos experimentos.

5.4. La proteína AtLEA6-1 es importante para el correcto desarrollo de la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* en condiciones control y de estrés salino.

En los estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria (Fig. 6 y 8) y la determinación de la densidad de RL en la ZR (Fig. 8), se observó que la arquitectura de la raíz de la mutante de pérdida de función *atlea6-1* presentó variaciones en comparación a las plántulas de tipo silvestre (Fig. 10). Estas evidencias condujeron a realizar estudios más detallados, considerando la arquitectura de la raíz de la línea de tipo silvestre y de *atlea6-1*, en condiciones control y de estrés salino (NaCl 75 mM).

Para estos análisis de la arquitectura de la raíz se utilizó el software de libre acceso Ez-Rhizo (Armengaud et al., 2009; Shahzad et al., 2018). Este software permitió estimar 14 variables por cada plántula, entre las cuales se encuentra la densidad de raíces laterales en la ZR, la longitud total de la raíz primaria, el número de raíces laterales de primer orden y órdenes superiores y la longitud de las raíces laterales, entre otras (Tabla 2; Armengaud et al., 2009; Shahzad et al., 2018). Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA, del inglés Principal Component Analysis) con ayuda de los programas de libre acceso PAST® y Rstudio®.

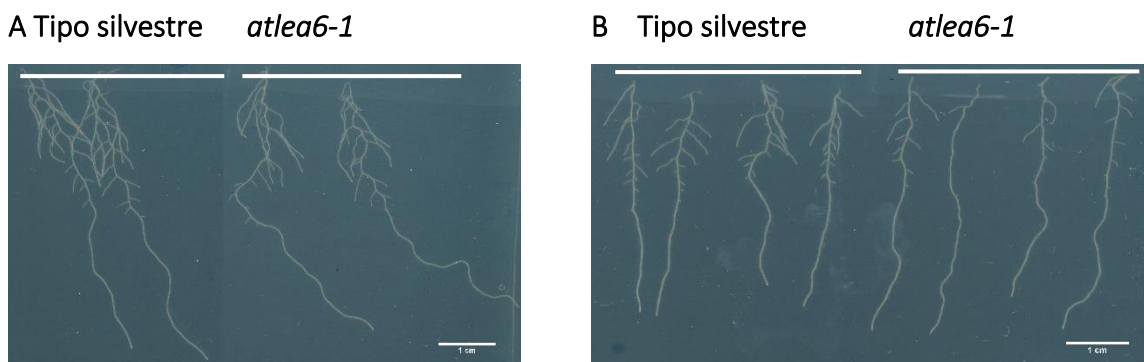


Figura 10. Las plantas de la línea mutante *atlea6-1* presentan una arquitectura de la raíz diferente a las plántulas de la línea tipo silvestre. Plantas de las líneas *atlea6-1* y tipo silvestre en condiciones control (A) y de estrés salino (NaCl 75mM. B). Las fotografías se tomaron a plántulas de nueve días después de germinadas. La barra blanca corresponde a 1 cm.

De acuerdo con el PCA las variables que explican mayoritariamente el componente uno en condiciones control y de estrés salino (NaCl 75 mM) están relacionadas con las raíces laterales, las variables que mayoritariamente explican el componente dos están asociadas

con la raíz primaria en ambas condiciones, en tanto que el componente tres se asocia con las diferentes zonas de la raíz (zona basal, zona de ramificación y zona apical) y con la rectitud y ángulo de crecimiento de la raíz primaria en medios control y suplementados con NaCl 75 mM, respectivamente (Tabla 2).

En las condiciones control, el componente uno explica el 36.2% de la varianza de los datos, el componente dos el 22.5% y el componente tres el 13.0% (Anexo 4A). En cuanto a las condiciones de estrés salino, el componente uno explica el 37.3% de la varianza de los datos, el componente dos el 30.7% y el componente tres el 8.7% (Anexo 4B). Cuando se graficó el componente uno en el eje Y con el componente dos en el eje X, se observó que las plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* se agruparon de manera independiente en ambas condiciones; sin embargo, la agrupación por genotipo es más evidente en condiciones control (Anexo 4C y D). Para tener una visualización más clara de estos resultados, se graficaron los tres primeros componentes del análisis de componentes principales (Fig. 11); el componente uno se representó en el eje X, el componente dos en el eje Y y el componente tres en el eje Z. Este tipo de graficas al incluir un mayor porcentaje de variabilidad de los datos permite observar con más detalle la localización de cada una de las plántulas analizadas en un espacio tridimensional y, evidenciar claramente la separación de las líneas analizadas en grupos diferentes. En este análisis, los primeros tres componentes del PCA en condiciones control explican el 71.7% de la variabilidad total de los datos (Fig. 11A) y el 76.7% en condiciones de estrés salino (Fig. 11B).

En el PCA de tres dimensiones también se incluyó el intervalo de confianza del 95% por cada una de las líneas analizadas, el cual tiene forma de elipse (Fig. 11). Este intervalo de confianza dice que, al tomar una planta al azar, ya sea de tipo silvestre o mutante, habrá el 95% de probabilidad de que, al hacerle las medidas de la arquitectura de la raíz, se agrupe dentro de la elipse que encierra a los individuos de su mismo fenotipo. El PCA muestra que las plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* se agrupan de manera independiente en ambas condiciones analizadas (Fig. 11). Sin embargo, la divergencia entre los grupos es más evidente en las condiciones control (Fig. 11A). También, se nota una mayor variabilidad en la arquitectura de la raíz de las plántulas *atlea6-1*, tanto en condiciones control como de estrés

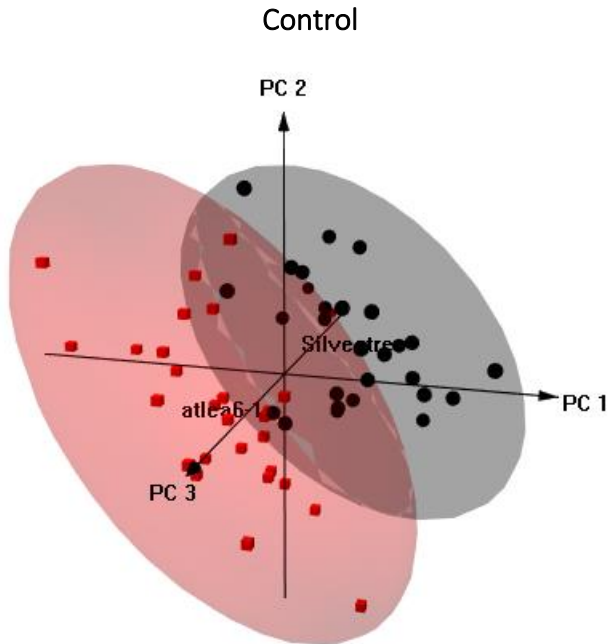
salino (Fig. 11). Este análisis de componentes principales permite concluir que la arquitectura de la raíz de las plántulas de la línea *atlea6-1* es diferente a la arquitectura de la raíz de las plántulas de la línea de tipo silvestre (Fig. 11 y Anexo 4). Además, la alteración más grande en la arquitectura de la raíz ocurre en las raíces laterales, en específico, en el número, densidad y longitud de estas (Tabla 2). Por otra parte, a nivel de la raíz primaria la mayor diferencia se presenta en su longitud, en su longitud vectorial y en la profundidad de esta (Tabla 2).

En los estudios de la arquitectura de la raíz se observa que las mutantes *atlea6-1* presentan un menor número y densidad de raíces laterales en la ZR en condiciones control (Fig. 12A y Anexo 5A). Estos resultados son similares a los obtenidos con las líneas complementadas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12; Fig. 8C). Sin embargo, cabe mencionar que, aunque se había encontrado que en medios control no había una diferencia significativa en el número de raíces laterales entre la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* (Fig. 7), en esos análisis no se determinó la densidad de RL en la ZR sino únicamente el número de RL. La determinación únicamente del número de raíces laterales y no de su densidad puede conducir a falsas interpretaciones (Dubrovsky & Forde, 2012), por lo que de acuerdo al análisis de la arquitectura de la raíz es posible concluir que existen diferencias significativas en la densidad de RLs entre las líneas de tipo silvestre y mutante en condiciones control. Adicionalmente, habría que destacar que en los experimentos iniciales no se utilizó el programa EZ-Rhizo (Armengaud et al., 2009; Shahzad et al., 2018), en el cual se aconseja escanear las cajas en las que crecieron las plántulas a 800 dpi, por lo que tiene la capacidad de detectar raíces laterales que acaban de emerger, generando así un grado de resolución superior al del ojo humano. A pesar de la alta confiabilidad del programa en detectar las raíces laterales recién emergidas, estos datos se confirmaron manualmente analizando las ampliaciones de las imágenes escaneadas. Adicionalmente, se corroboró que en condiciones de estrés salino las plántulas *atlea6-1* tienen un menor número y densidad de raíces laterales en la ZR en comparación con la línea de tipo silvestre (Fig. 12B y Anexo 5B). También, se observó que las plantas *atlea6-1* presentan una menor longitud total de las raíces laterales en ambas condiciones probadas (Anexo 5C y D).

Tabla 2. Contribución de cada variable a los diferentes componentes del PCA. Descripción de la contribución vectorial de cada una de las variables analizadas en cada uno de los diferentes componentes del PCA en condiciones control y de estrés salino (NaCl 75mM). Resultados representativos de dos réplicas.

	Condiciones control													
	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14
Longitud de la raíz primaria (cm)	0.06	0.54	0.05	-0.02	-0.03	0.18	-0.03	0.26	-0.16	-0.11	-0.08	0.25	0.40	-0.57
Longitud vectorial de la raíz primaria (cm)	0.23	0.42	0.10	-0.23	0.12	0.02	0.35	0.14	-0.10	-0.15	-0.10	-0.14	-0.70	0.00
Angulo de la raíz primaria (°)	-0.22	0.26	-0.15	0.33	0.54	-0.04	0.32	0.03	0.23	0.51	0.19	0.05	0.02	0.00
# de raíces laterales	0.40	-0.06	-0.18	0.20	0.04	0.20	0.03	0.37	0.37	-0.10	-0.14	-0.62	0.21	0.00
Rectitud	0.27	-0.21	0.08	-0.32	0.24	-0.26	0.62	-0.22	-0.07	-0.17	-0.06	0.05	0.43	0.00
Profundidad (cm)	0.33	0.07	0.19	-0.44	-0.36	0.03	-0.01	0.04	0.31	0.60	0.24	0.07	0.04	0.00
Zona Basal (cm)	-0.06	-0.13	0.31	-0.28	0.46	0.74	-0.14	-0.09	0.02	-0.02	-0.02	0.03	0.04	0.11
Zona de ramificación (cm)	0.11	0.25	-0.60	-0.23	0.01	0.13	-0.07	0.12	-0.34	0.07	-0.01	0.11	0.18	0.56
Zona apical (cm)	-0.04	0.32	0.56	0.25	-0.13	-0.09	0.06	0.16	0.16	-0.17	-0.07	0.14	0.21	0.59
Densidad RL/RP (raíces/cm)	0.35	-0.27	-0.18	0.19	0.05	0.11	0.06	0.24	0.31	-0.22	0.09	0.68	-0.20	0.00
Densidad RL/ZR (raíces/cm)	0.30	-0.28	0.27	0.34	0.01	0.08	0.09	0.28	-0.66	0.33	0.09	-0.03	-0.02	0.00
Longitud total de las RL (cm)	0.39	0.14	-0.01	0.24	0.04	0.02	-0.16	-0.52	0.02	0.24	-0.63	0.11	-0.04	0.00
# de raíces laterales de 2do orden	0.21	0.01	0.14	-0.21	0.52	-0.52	-0.55	0.23	0.00	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.00
Sistema radical total (cm)	0.37	0.23	0.00	0.22	0.04	0.06	-0.14	-0.47	-0.06	-0.24	0.67	-0.12	0.03	0.00
	Estrés salino (NaCl 75mM)													
Longitud de la raíz primaria (cm)	-0.15	0.45	-0.12	0.03	-0.01	0.02	0.00	0.10	-0.07	0.16	0.30	0.33	0.13	-0.71
Longitud vectorial de la raíz primaria (cm)	-0.13	0.46	0.04	0.05	0.05	-0.06	0.05	0.06	-0.06	0.03	0.16	-0.85	0.00	0.00
Angulo de la raíz primaria (°)	0.17	0.04	0.39	-0.54	0.26	0.60	-0.17	0.22	-0.03	0.00	0.12	-0.01	0.00	0.00
# de raíces laterales	0.37	0.23	-0.04	0.13	-0.11	0.02	0.21	0.27	0.29	-0.75	0.10	0.06	0.00	0.00
Rectitud	0.04	0.08	0.76	0.15	0.32	-0.40	0.19	-0.24	0.00	-0.03	0.15	0.15	0.00	0.00
Profundidad (cm)	-0.11	0.46	0.10	-0.03	0.09	0.01	0.03	0.09	0.07	0.04	-0.85	0.11	0.00	0.00
Zona Basal (cm)	-0.25	-0.04	-0.22	0.32	0.52	0.45	0.54	-0.10	-0.01	-0.01	0.05	0.06	0.02	0.11
Zona de ramificación (cm)	0.17	0.37	-0.10	-0.30	-0.28	-0.07	0.42	-0.06	-0.37	0.18	0.16	0.22	0.08	0.46
Zona apical (cm)	-0.30	0.29	-0.02	0.24	0.12	-0.01	-0.49	0.22	0.25	0.05	0.26	0.25	0.09	0.52
Densidad RL/RP (raíces/cm)	0.43	0.00	0.01	0.12	-0.05	0.02	0.21	0.15	0.62	0.59	0.03	-0.06	0.00	0.00
Densidad RL/ZR (raíces/cm)	0.36	-0.09	0.08	0.49	0.08	0.03	-0.10	0.51	-0.56	0.15	-0.08	-0.01	0.00	0.00
Longitud total de las RL (cm)	0.40	0.10	-0.13	0.10	0.16	0.10	-0.26	-0.47	-0.04	-0.04	-0.07	-0.06	0.68	0.00
# de raíces laterales de 2do orden	0.14	-0.05	-0.38	-0.37	0.62	-0.50	-0.01	0.24	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
Sistema radical total (cm)	0.33	0.26	-0.17	0.11	0.15	0.10	-0.25	-0.42	-0.07	0.02	0.05	0.06	-0.71	0.00

A



B

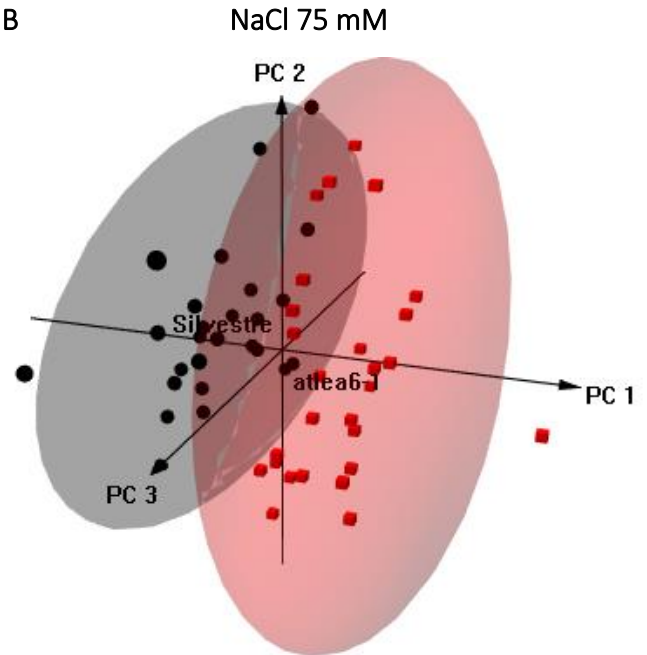


Figura 11. La línea mutante *atlea6-1* presenta una arquitectura de la raíz diferente a la línea de tipo silvestre en *A. thaliana*. Análisis de componentes principales en tres dimensiones de la línea de tipo silvestre (negro) y *atlea6-1* (rojo) en condiciones control (A) y de NaCl 75mM (B). En el eje X se encuentra el componente uno (PC1), en el eje Y el componente dos (PC2) y en el eje Z el componente tres (PC3). El elipsoide denota el intervalo de confianza del 95% para cada genotipo, en el caso de la línea de tipo silvestre en color negro y de la línea mutante en color rojo. A) línea de tipo silvestre $n=28$; línea *atlea6-1* $n=28$. B) línea de tipo silvestre $n=25$; línea *atlea6-1* $n=27$. Resultados representativos de dos replicas.

Por otra parte, el análisis de la arquitectura de la raíz también evidenció que la longitud vectorial (longitud en línea recta desde el RAM hasta el hipocótilo; Armengaud et al., 2009; Shahzad et al., 2018) de la raíz primaria en condiciones control no es diferente entre las líneas de tipo silvestre y *atlea6-1* (Fig. 12C); aunque, la longitud de la raíz primaria de las plántulas mutantes es mayor en estas condiciones (Fig. 6A, 8A y 12A). Esto está indicando que, aunque la raíz primaria de *atlea6-1* es más larga que la raíz de la línea de tipo silvestre, ésta presenta un mayor número de ondulaciones en su crecimiento, es decir, crece más sinuosa (Fig. 12E). En contraste, en condiciones de estrés salino, las plántulas de ambos genotipos crecen con la misma rectitud (Fig. 10B y 12F); por ende, la longitud vectorial de la raíz primaria de *atlea6-1* es mayor a la de la línea de tipo silvestre (Fig. 12D).

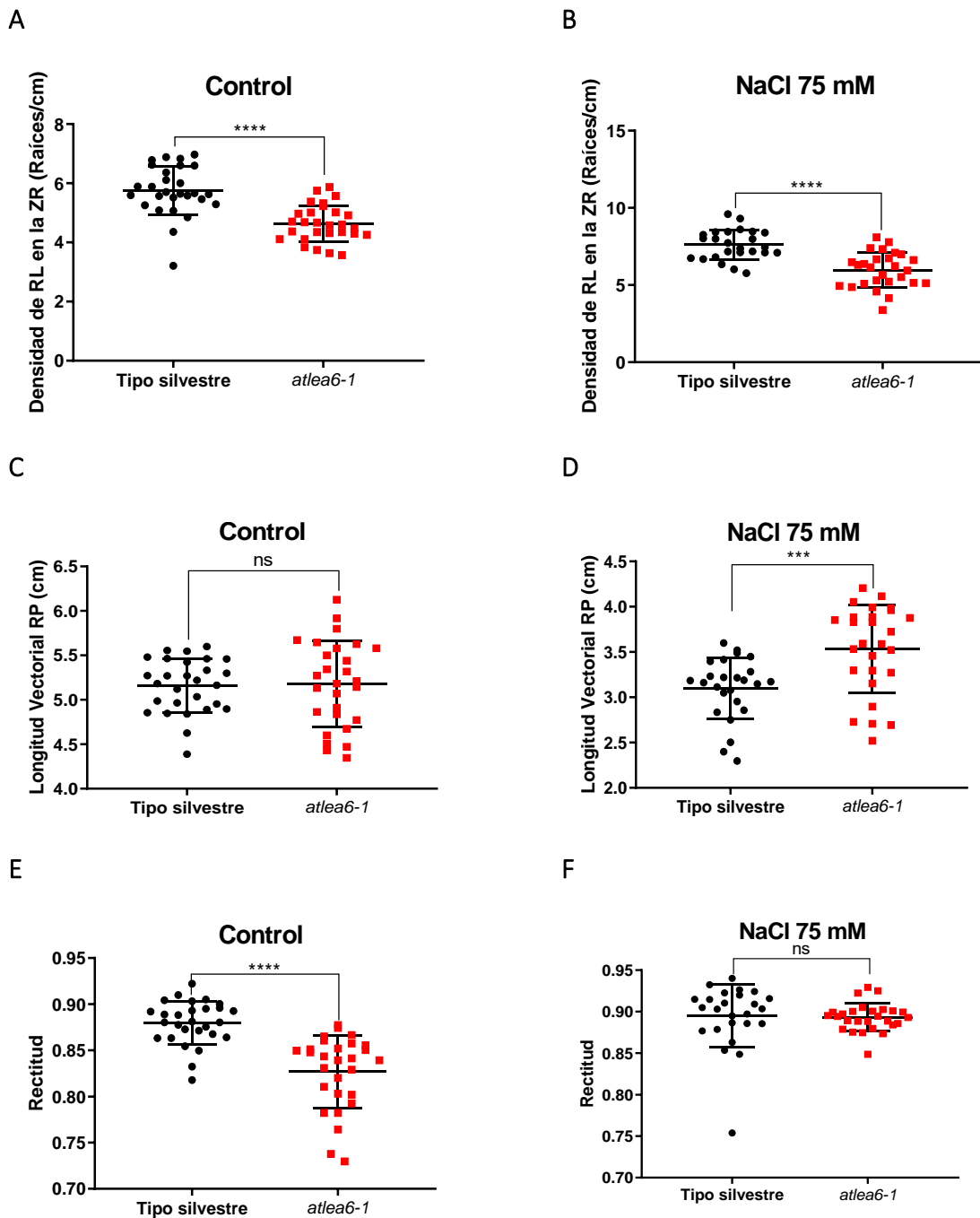


Figura 12. Densidad de las raíces laterales en la ZR, longitud vectorial y rectitud de la raíz primaria en la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones control y de estrés salino. Densidad de las raíces laterales en la ZR determinadas con ayuda del programa Ez-Rhizo en condiciones control (A) y de estrés salino (NaCl 75mM; B). Longitud vectorial de la raíz primaria de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones control (C) y de estrés salino (NaCl 75mM; D). Rectitud de la raíz primaria de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones control (E) y de estrés salino (NaCl 75mM; F). A, C y E) línea de tipo silvestre $n=28$; línea *atlea6-1* $n=28$. B, E y E) línea de tipo silvestre $n=25$; línea *atlea6-1* $n=27$. Promedio \pm DE, ns= no significativo, *** $P<0.0002$, **** $P<0.0001$. Resultados representativos de dos experimentos.

El PCA mostró que los efectos más severos en el fenotipo radical de la mutante *atle6-1* se encuentran en el desarrollo de las raíces laterales, seguido del desarrollo de la raíz primaria. De estos análisis es posible concluir que la proteína AtLEA6-1 se requiere para la determinación de la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* en condiciones control y de estrés salino.

5.5. La proteína AtLEA6-1 regula el crecimiento de la raíz primaria a través de la modulación de la proliferación y elongación celular.

En experimentos anteriores, se encontró que la raíz primaria de la línea *atlea6-1* es más larga que la raíz primaria de plántulas de la línea de tipo silvestre crecidas en condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM). Para determinar si el fenotipo de la raíz primaria de *atlea6-1* se debía a una alteración en los procesos de proliferación, transición o elongación celular, se hicieron análisis cuantitativos del meristemo apical de la raíz (RAM). Para este fin, se realizaron mediciones y conteos celulares de 10 plántulas de tipo silvestres y de *atlea6-1* en condiciones de estrés salino. Se decidió hacer los conteos celulares en medios suplementados con NaCl 75 mM (Tabla 3), ya que en estas condiciones se observó una diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de la raíz primaria entre ambos genotipos (Fig. 6 y 8). La determinación de los parámetros celulares se realizó midiendo la longitud de las células corticales desde el centro quiescente (CQ) hasta 20 células después de la aparición del primer pelo radical (Fig. 14). Posteriormente, la medida de todas las células corticales se introdujo en el algoritmo de Pacheco-Escobedo et al. (2016) para determinar los parámetros celulares de la raíz primaria de las plántulas de tipo silvestre y mutante (Tabla 3). Para corroborar los resultados obtenidos mediante el algoritmo de Pacheco-Escobedo et al. (2016), se realizó el conteo del número de células en el RAM de manera manual; los resultados obtenidos por ambas metodologías son similares (Tabla 3), sugiriendo que en condiciones de estrés salino el algoritmo funciona correctamente para determinar los parámetros celulares estimados con un punto de inflexión; sin embargo, el análisis de los parámetros celulares del RAM de plántulas de tipo silvestre y *atlea6-1* con dos puntos de inflexión, dio como resultado que la zona de elongación celular era de 1.5 y 1.9 mm de larga, respectivamente, lo cual es poco

probable, indicando que el algoritmo con dos puntos de inflexión no funciona correctamente en plántulas sometidas a condiciones de estrés salino (Dubrovsky, comunicación personal).

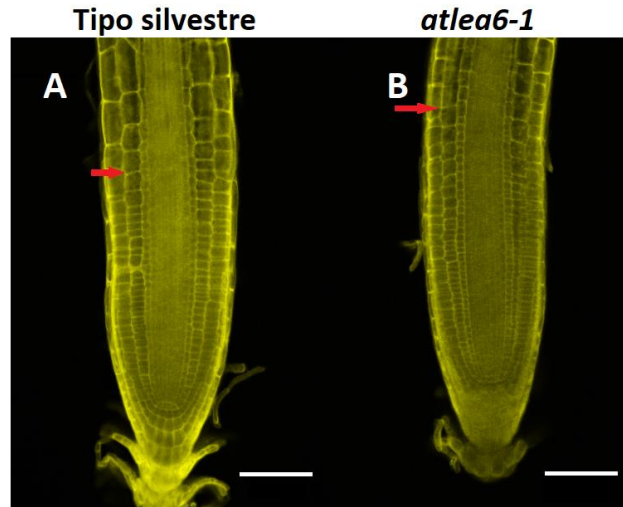


Figura 13. Meristemo apical de la raíz de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1*. Meristemo apical de la raíz de plántulas de 7 días después de germinadas teñidas con el método de Pseudo-Schiff (Truernit *et al.*, 2008) de la línea de tipo silvestre (A) y *atlea6-1* (B) crecidas en medios suplementados con NaCl 75mM. Con la flecha roja se señala el tamaño del RAM. Las imágenes son representativas de dos replicas. La barra blanca corresponde a 75 μ m.

En este estudio, se encontró que las plántulas de la línea *atlea6-1* presentan un mayor número de células en el DP, en el DT y, en el RAM, en comparación a las plántulas de tipo silvestre (Tabla 3, Fig. 14). Sin embargo, el mayor número de células en estos dominios y el RAM no generó un aumento del tamaño del meristemo apical de la raíz de *atlea6-1* (Fig. 13 y Tabla 3). El tamaño del RAM es asociado con la velocidad de transición de las células del RAM a la zona de elongación, aumentando o disminuyendo su tamaño si las células transitan lenta o rápidamente, respectivamente (Dello loio *et al.*, 2008; Napsucialy-Mendivil *et al.*, 2014). Para determinar si la similitud en el tamaño del RAM entre *atlea6-1* y la línea de tipo silvestre estaba relacionada con una mayor transición de células del DP a la zona de elongación, se estimó el número de células que abandonan el DP en un periodo de tiempo de 24 horas. Se encontró que el número de células que abandonan el DP es 1.4 veces mayor en *atlea6-1*, explicando porque el tamaño del meristemo en ambas líneas es similar y, además, sugiriendo que AtLEA6-1 está involucrada en los procesos de transición de las células del DP a la zona de elongación.

Tabla 3. Parámetros celulares de la región apical de la raíz de plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM). Parámetros celulares de la región apical de la raíz determinados en plántulas de 7 días después de germinadas con el logaritmo de Pacheco-Escobedo et al. (2016) para la línea de tipo silvestre y *atlea6-1*. En la tabla, se muestra el porcentaje del valor homólogo del parámetro de tipo silvestre entre el genotipo de tipo silvestre y *atlea6-1*. La longitud de las células totalmente elongadas, la tasa de crecimiento de la raíz primaria y la tasa de producción celular se determinaron manualmente. La duración del ciclo celular se determinó según la metodología de Ivanov & Dubrovsky (1997) y López-Bucio et al. (2014). Tipo silvestre *n*=10; *atlea6-1* *n*=10. Promedio \pm EE, ns= no significativa, * *P*<0.05, ***P*<0.0021, ****P*<0.0002 *****P*<0.0001. DP: Dominio de proliferación. RAM: Meristemo Apical de la Raíz. Resultados representativos de dos experimentos.

	Tipo silvestre	<i>atlea6-1</i>	Aumento de veces de cambio del valor homólogo del parámetro de tipo silvestre
Número de células en el dominio de proliferación (DP)	29 \pm 1	35 \pm 1**	1.2
Número de células en el dominio de transición (DT)	7 \pm 1	8 \pm 1*	1.3
Número de células en el meristemo apical de la raíz (RAM)	36 \pm 1	43 \pm 1***	1.2
Número de células en el meristemo apical de la raíz (RAM) determinado manualmente	36 \pm 1	44 \pm 1***	1.2
Tamaño del dominio de proliferación (μ m)	109.2 \pm 5.3	119.0 \pm 5.4ns	1.1
Tamaño del dominio de transición (μ m)	130.2 \pm 24.8	160.8 \pm 23.7ns	1.2
Tamaño del RAM (μ m)	239.5 \pm 28.3	279.7 \pm 26.5ns	1.2
Longitud de las células elongadas (μ m)	75.6 \pm 2.3	82.0 \pm 1.6*	1.1
Tasa de crecimiento de la raíz primaria durante las últimas 24 horas (μ m h ⁻¹)	115.9 \pm 5.6	171.9 \pm 6.3***	1.5
Tasa de producción celular (células h ⁻¹)	1.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1****	1.4
Duración del ciclo celular (h) ⁺	13.4 \pm 0.6	11.5 \pm 0.4*	0.9
Número de células que abandonan el dominio de proliferación durante 24 horas ⁺⁺	37 \pm 1	51 \pm 2	1.4

⁺Determinado según la metodología de Ivanov & Dubrovsky (1997) y López-Bucio et al. (2014).

⁺⁺Determinado según la metodología de Napsucialy-Mendivil (2014).

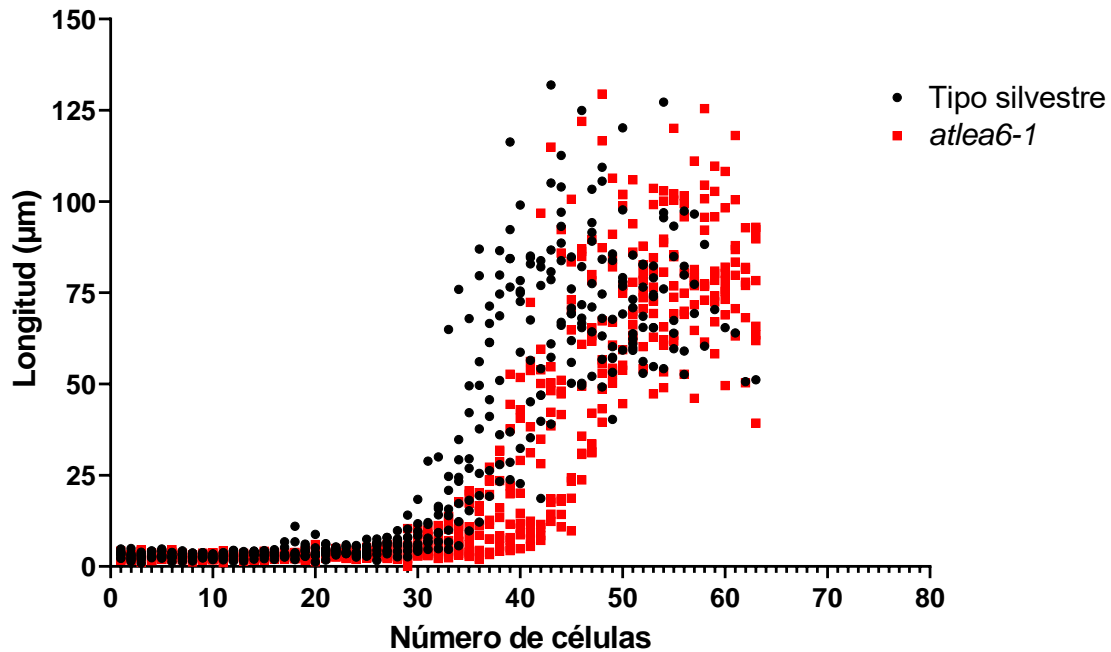


Figura 14. *atlea6-1* tiene un mayor número de células en el meristemo apical de la raíz en comparación con la línea de tipo silvestre en condiciones de estrés salino. *atlea6-1* presenta un mayor número de células en el RAM en comparación con la línea de tipo silvestre. Además, no hay diferencia en el tamaño de las células del RAM entre ambos genotipos. Estos análisis se realizaron en plántulas de 7 días después de germinadas sometidas a condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM). Tipo silvestre $n=10$; *atlea6-1* $n=10$. Resultado representativo de dos experimentos.

Por otra parte, las células completamente elongadas en la línea *atlea6-1* son 1.1 veces más grandes que las células completamente elongadas de las plántulas de tipo silvestre (Tabla 3). Esto denota que el fenotipo que presentan las plántulas mutantes *atlea6-1* en el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* se debe al efecto sumatorio de un mayor número de células en el DP y al mayor tamaño de las células elongadas.

Con el propósito de determinar si el mayor número de células presentes en el DP de las raíces en *atlea6-1* se debió a una mayor tasa de división celular, se estableció la duración del ciclo celular en este dominio. Para determinar la duración del ciclo celular se requiere conocer el número de células en el DP, la longitud de las células completamente elongadas, la tasa de crecimiento de la raíz primaria y la tasa de producción celular, para más

información sobre la estimación de la duración del ciclo celular remitirse a Ivanov & Dubrovsky (1997) y López-Bucio et al. (2014).

La tasa de crecimiento de la raíz primaria de *atlea6-1* en condiciones de estrés salino es de $171.9 \mu\text{m h}^{-1}$, 1.5 veces mayor que la de la línea de tipo silvestre (Tabla 3). El incremento en la tasa de crecimiento de la raíz primaria en *atlea6-1* se debe en parte a una mayor tasa de producción celular, que para este caso fue de $2.1 \text{ células h}^{-1}$, lo cual es un 1.4 veces superior que en la línea de tipo silvestre ($1.5 \text{ células h}^{-1}$; Tabla 3). Al mismo tiempo, la tasa de producción celular está altamente relacionada al ciclo celular; es decir, si el ciclo celular es corto, la tasa de producción celular será alta y viceversa (Ivanov & Dubrovsky, 1997). La estimación del ciclo celular se realizó con la metodología de Ivanov & Dubrovsky (1997) (López-Bucio et al., 2014). Según esta metodología, la duración del ciclo celular en el DP de *atlea6-1* es de 11.5 horas, lo que equivale a 0.9 veces la duración en la línea de tipo silvestre (13.4 horas; Tabla 3). La estimación del tiempo del ciclo celular en esta metodología se basa en un modelo de crecimiento estacionario de la raíz primaria que supone las siguientes premisas: 1) la duración del ciclo celular es el mismo para todas las células meristemáticas, 2) todas las células en el meristemo se dividen, 3) el número de células en el meristemo es constante y 4) el flujo de células que entran y salen de la zona de elongación es el mismo (Ivanov & Dubrovsky, 1997). Debido a que se desconoce si estas suposiciones se cumplen en el RAM de plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* crecidas en condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM), la duración del ciclo celular y sus parámetros derivados (número de células que abandonan el DP a la zona de elongación) determinados mediante esta metodología se deben tomar con cautela.

El resultado de estos análisis mostró que la proteína AtLEA6-1 modula parcialmente el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* a través de la elongación celular, y posiblemente también a través de la regulación del ciclo celular, influenciando la tasa de producción celular y por ende el número de células en proliferación. Además, los resultados de este análisis sugieren que AtLEA6-1 está involucrada en los procesos de transición celular del RAM hacia la zona de elongación.

5.6. AtLEA6-1 promueve la emergencia de las raíces laterales en *A. thaliana*.

Los análisis de la arquitectura de la raíz mostraron que la mutante *atlea6-1* presenta una menor densidad de RL en la ZR en comparación a la línea de tipo silvestre en medios control y suplementados con NaCl 75 mM (Fig. 8 y 12). También mostraron que los cambios más drásticos a nivel fenotípico de la línea mutante en ambas condiciones analizadas se dan en el desarrollo de las raíces laterales. Por ese motivo, se decidió determinar cuáles procesos del desarrollo de las raíces laterales están afectados en las plántulas *atlea6-1*. Para ello, se analizó el desarrollo de las raíces laterales en condiciones de estrés salino, ya que en estas condiciones se encontró una mayor diferencia en la densidad de raíces laterales entre las líneas *atlea6-1* y de tipo silvestre (Fig. 8 y 12).

La caracterización fenotípica del desarrollo de las raíces laterales de ambas líneas se realizó siguiendo la metodología y clasificación de Malamy & Benfey (1997) para los estadios de desarrollo de los primordios de las raíces laterales (PRL), y atendiendo las indicaciones y categorización de las diferentes zonas de la raíz definidos en Napsucialy-Mendivil & Dubrovsky (2018). Es decir, se consideraron la ZR y la zona de formación de raíces laterales (fracción que abarca desde el primer PRL hasta la primera raíz lateral emergida; Napsucialy-Mendivil & Dubrovsky, 2018).

En el análisis y conteo de las raíces laterales y PRL se corroboraron los resultados obtenidos anteriormente. No se encontraron diferencias entre el número de raíces laterales entre las plantas de ambos genotipos (Fig. 7 y 15A), pero sí en la densidad y porcentaje de raíces laterales en la ZR (Fig. 8, 15B y C). La mutante *atlea6-1* presentó una menor densidad y porcentaje de RL en la ZR, al mismo tiempo, una mayor densidad y porcentaje de PRL en la ZR (Fig. 15B y C). Al hacer la sumatoria de los PRL y RL en la ZR, se observó que no hay diferencias en la densidad de los eventos de iniciación de las RL en la ZR (Fig. 15B), lo que sugiere que en *atlea6-1* el proceso de emergencia de las RLs presenta defectos. Esta observación se apoya por el hecho de que *atlea6-1* tiene un menor porcentaje de RLs y un mayor porcentaje de PRL de todos los eventos de iniciación de las RLs (Fig. 15D).

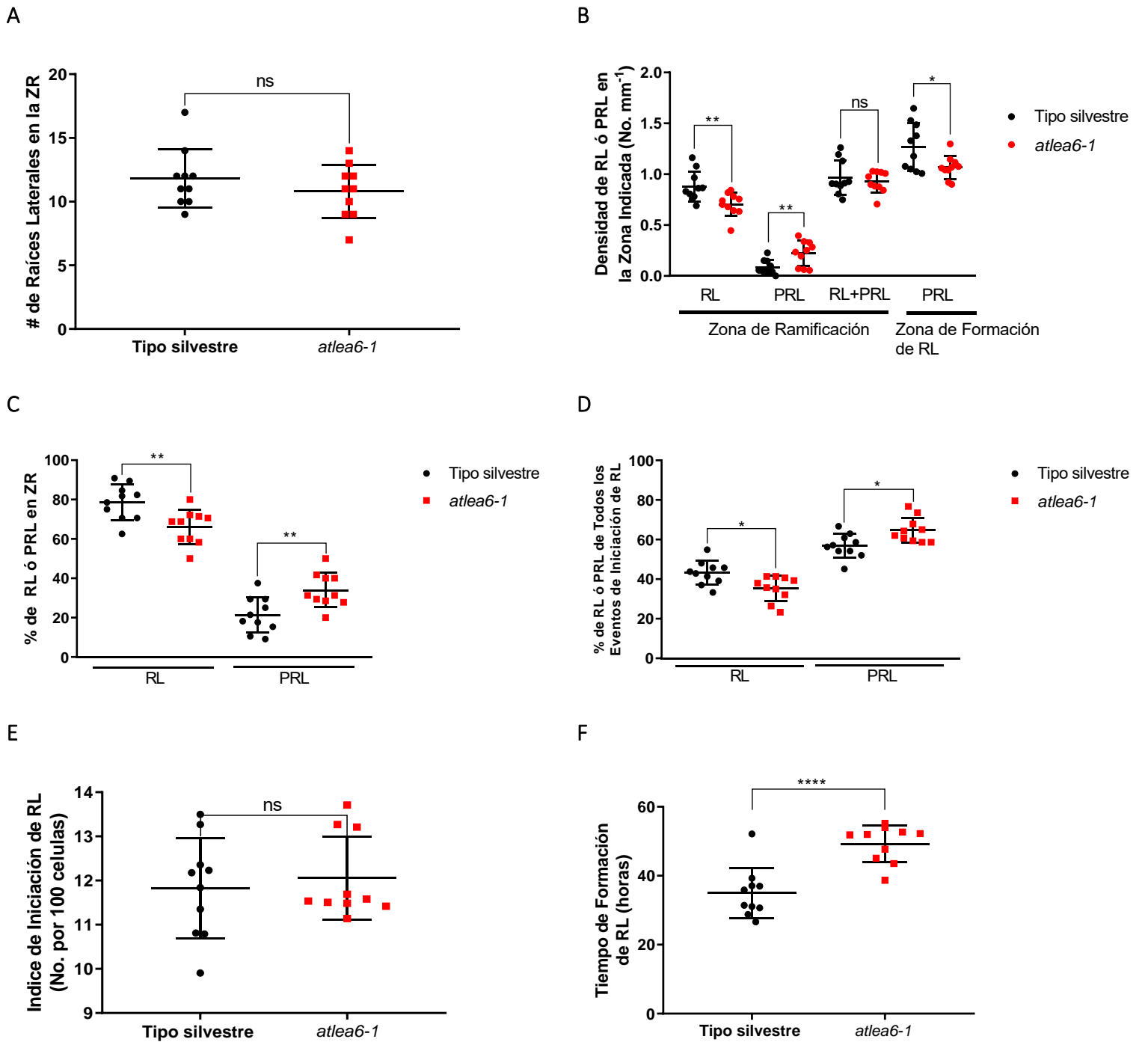


Figura 15. Los procesos de emergencia de las raíces laterales se encuentran alterados en plántulas de *atlea6-1* crecidas en condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM). A) Número de raíces laterales en la ZR de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1*. B) Densidad de raíces laterales o primordios de las raíces laterales en la zona de ramificación o zona de formación de las raíces laterales. C) Porcentaje de raíces laterales o primordios de las raíces laterales en la zona de ramificación. D) Porcentaje de raíces laterales o primordios de las raíces laterales de todos los eventos de iniciación, es decir, la sumatoria de las raíces laterales y los primordios. E) Índice de iniciación de las raíces laterales de la línea *atlea6-1* y de tipo silvestre. F) Tiempo de formación de las raíces laterales en la línea de tipo silvestre y *atlea6-1*. Estos análisis se realizaron en plántulas de 8 ddt a medios suplementados con NaCl 75 mM. A-F) promedio \pm DE, ns= no significativa, * $P < 0.05$, ** $P < 0.0021$, **** $P < 0.0001$. A-F) Línea de tipo silvestre $n=10$; línea *atlea6-1* $n=10$. Resultados representativos de dos replicas biológicas.

Adicionalmente, se encontró que la densidad de PRL en la ZF de RL era menor en *atlea6-1* en comparación con la raíz de tipo silvestre (Fig. 15B), sugiriendo que la línea mutante presenta alteraciones en los procesos de iniciación de las RLs.

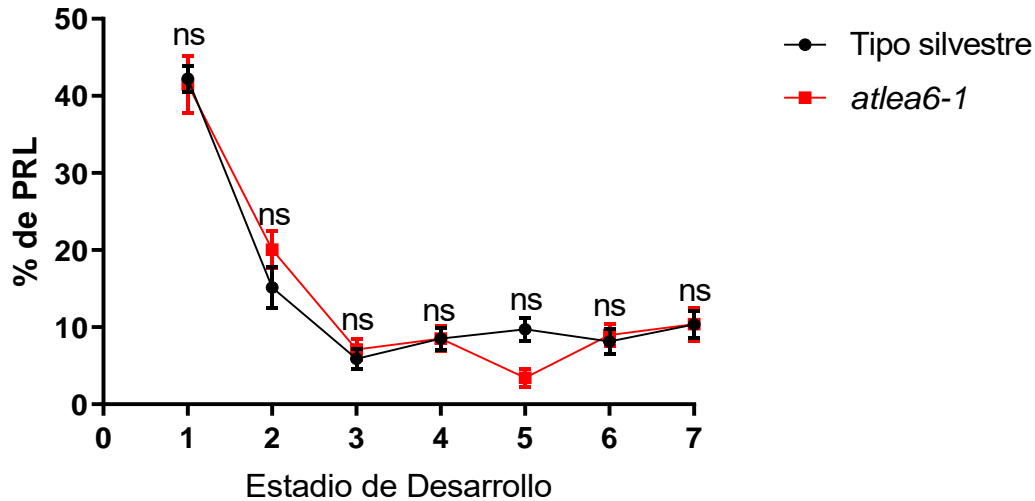


Figura 16. En la línea *atlea6-1* no se arresta el desarrollo de los primordios de las raíces laterales en la zona de formación de raíces laterales. Porcentaje de PRL según su estadio de desarrollo en la ZF de raíces laterales en plántulas de 8ddt a medios suplementados con NaCl 75 mM. promedio \pm EE, ns= no significativo. Línea de tipo silvestre $n=10$; línea *atlea6-1* $n=10$. Resultados representativos de dos replicas biológicas.

Posteriormente, para determinar si *atlea6-1* presenta defectos en la iniciación de los PRL, se midieron 20 células elongadas de la ZF de raíces laterales y la ZR por planta y, se determinó el índice de iniciación de raíces laterales (I_{LRI}). Este parámetro permite evaluar la iniciación de las raíces laterales en un contexto celular y estima el número de eventos de iniciación de las raíces laterales en una porción de 100 células (Dubrovsky et al., 2009). Se encontró, que las células elongadas de *atlea6-1* son más largas, lo cual confirma los resultados anteriormente obtenidos (Anexo 6 y Tabla 3). Por otra parte, el I_{LRI} no presentó diferencias estadísticamente significativas entre la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* (Fig. 15E), evidenciando que los procesos de iniciación de las raíces laterales no se alteran en *atlea6-1*, sino que la variación observada en la densidad de PRL en la ZF se debe a que las células corticales de la raíz primaria son más largas en la línea mutante.

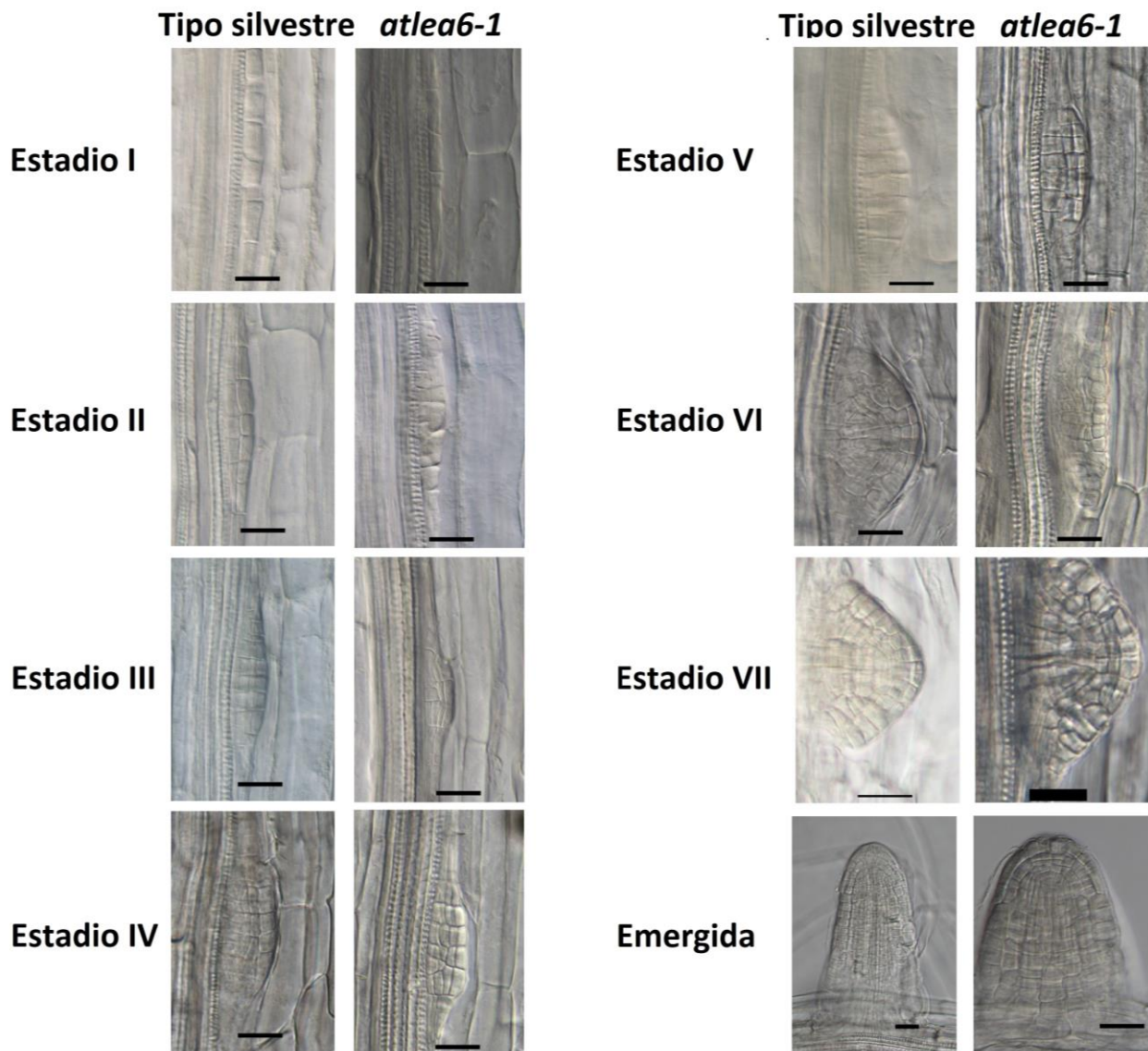


Figura 17. Algunos primordios de la raíz lateral de *atlea6-1* presentan anomalías en su morfología. Fotografías representativas de los diferentes estadios de desarrollo de los PRL de plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM). Los PRL de *atlea6-1* desde el estadio uno hasta el estadio seis presentan alteraciones en su morfología en comparación a los PRL de la línea de tipo silvestre. Línea de tipo silvestre $n=10$; línea *atlea6-1* $n=10$. La barra negra corresponde a 15 μm . Imágenes representativas de dos replicas.

En cuanto a la emergencia de las raíces laterales, el fenotipo de *atlea6-1* podía ser resultado de que algunos PRL no se desarrollaban completamente y se arrestaban en un estado del desarrollo específico ocasionando que no emergieran o, que los PRL tardaban más

tiempo en emerger. Por una parte, no se encontró un arresto del desarrollo de los PRL en estadios específicos en la ZF de RL, sugiriendo que, una vez se ha formado el PRL en estadio 1, este continúa su desarrollo hasta alcanzar el estadio 7 (Fig. 16). Por otra parte, encontramos que el tiempo de formación de las RLs es mayor en *atlea6-1* (Fig. 15F). El tiempo de formación de las RL es el tiempo que abarca desde la iniciación del PRL hasta la emergencia de este (Napsucialy-Mendivil et al., 2014).

Así mismo, la línea mutante *atlea6-1* presenta anomalías en el desarrollo de los PRL en plántulas crecidas en condiciones de estrés salino (NaCl 75 mM; Fig. 17). Estas anomalías se presentan como alteraciones en las divisiones celulares y una morfología aplanada de primordios en el estadio uno, hasta el estadio seis de desarrollo, siendo más evidente en estadios avanzados (Fig. 17). El porcentaje de PRL anormales en la línea *atlea6-1* es del 22.4% ($n=45$ de 143), mientras que en la línea de tipo silvestre solo se encontró un primordio anormal que es equivalente al 0.5% de 122 PRL analizados en esta línea (Fig. 18).

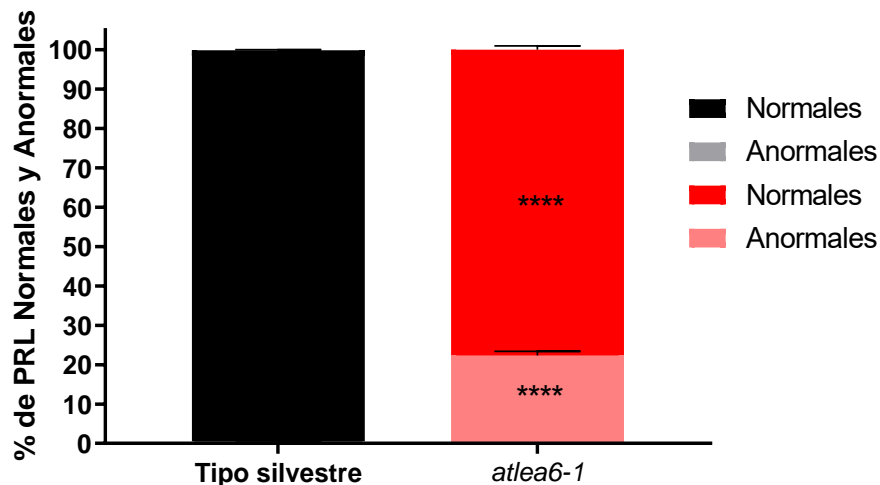


Figura 18. *atlea6-1* presenta el 22.4 por ciento de los primordios de la raíz lateral con una morfología anormal. Porcentaje de PRL anormales presentes en las plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones de estrés salino (NaCl 75mM). Se analizaron 10 raíces de cada línea de plántulas de 8 ddt y se calculó el porcentaje de primordios que presentaban una morfología anormal. En la línea de tipo silvestre se encontraron 122 PRL, de los cuales solo uno es anormal; en la línea *atlea6-1* se encontraron 143 primordios de los cuales 45 presentaron una morfología anormal. Promedio \pm EE, **** $P < 0.0001$. Resultados representativos de dos replicas independientes.

5.7. El promotor de *AtLEA6-1* muestra una alta actividad en el cilindro vascular de la raíz de *A. thaliana* desde la zona de elongación celular.

El análisis fenotípico de la mutante *atlea6-1* mostró que la proteína AtLEA6-1 participa en los procesos de emergencia de las RLs y, en la proliferación, transición y elongación celular en la zona apical de la raíz primaria de *A. thaliana*. Con el objetivo de determinar una posible correlación entre las zonas de transcripción de *AtLEA6-1* y los fenotipos observados en la línea mutante *atlea6-1*, se generaron construcciones en las que se fusionó 1 kb de la región 5' hacia arriba del ATG de la región codificante para *AtLEA6-1* a los marcos de lectura abierto para los genes reporteros *GUS* y *GFP*. La región de 1 kb seleccionada comprende toda la zona intergénica entre el 5' del gen *AtLEA6-1* y el gen adyacente, y se seleccionó considerando que contendría la región promotora y reguladora del gen *AtLEA6-1*. Posteriormente, las construcciones genéticas *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1* y *pAtLEA6-1:GFP AtLEA6-1* se introdujeron en plantas de tipo silvestre ecotipo Ws y se seleccionaron las plantas transgénicas en medios MS 0.5X suplementados con higromicina.

Para la determinación de los sitios de actividad del promotor de *AtLEA6-1*, las plantas conteniendo las construcciones genéticas *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1* y *pAtLEA6-1:GFP AtLEA6-1* se crecieron en medios control o suplementados con NaCl 75 mM. En total, se analizaron siete líneas transgénicas independientes en la T2 o T3 de *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1* y cinco líneas independientes en la T2 o T3 de *pAtLEA6-1:GFP AtLEA6-1*. En 11 de las 12 líneas analizadas se encontró una alta actividad del promotor de *AtLEA6-1* en el cilindro vascular de las raíces de *A. thaliana*, crecidas en ambas condiciones (Fig. 19 y Anexo 9, 10 y 11). En la única línea en la que no se observó este patrón, no se detectó señal de GFP en ninguna región de la raíz (Anexo 10C, 10D, 11C y 11D).

La actividad del promotor de *AtLEA6-1* solo se evidenció en el cilindro vascular de la raíz, a partir de la zona de elongación, de plántulas crecidas en medios control y suplementados con NaCl 75 mM (Fig. 19A y B; Anexo 7, 8, 9, 10 y 11). En medios control se observó muy poca actividad del promotor de *AtLEA6-1* en las células del córtex y la epidermis

(Fig. 19B y Anexo 7, 8 y 9). En contraste, en dos de las siete líneas analizadas se detectó un ligero aumento de la actividad de *GUS* en córtex y epidermis en condiciones de estrés salino (Fig. 19), al igual que en los pelos radicales (Fig. 19F Anexo 7, 8 y 9); sin embargo, este aumento en la actividad del promotor de *AtLEA6-1* en medios suplementados con NaCl 75 mM no es concluyente debido a la poca reproducibilidad de los resultados obtenidos en las diferentes líneas analizadas. Curiosamente, en las raíces laterales se encontró la presencia de *GUS* después de la zona de elongación al igual que en la raíz primaria, pero, también en la cofia (Anexo 7A y 8A).

Por otra parte, se observó actividad de *GUS* en los PRL en estadio uno en ambas condiciones analizadas (Fig. 19C y D), no obstante, en primordios del estadio dos la actividad del gen reportero se encontró mayoritariamente confinada a la capa celular interna del PRL (Anexo 7C y 8C). Así mismo, en estadios posteriores del desarrollo de los PRL no se detectó actividad de *GUS* ni de *GFP* (Fig. 19E y F, Anexo 7, 8 y 9F), sugiriendo que el gen *AtLEA6-1* no se expresa durante el desarrollo de los PRL.

Estos resultados indican que la región utilizada para el análisis de expresión del gen *AtLEA6-1* en las líneas *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1* y *pAtLEA6-1:GFP AtLEA6-1* permite la expresión de las proteínas reporteras mayoritariamente en el cilindro vascular (a partir de la zona de elongación), seguida de córtex y epidermis. En las raíces laterales se observó actividad del promotor en la columela. Además, no se detectó actividad en el RAM de la raíz primaria ni en los primordios de las raíces laterales de *A. thaliana*. Llamó la atención el hecho de que no se detectara un aumento en la actividad del promotor en plántulas crecidas en condiciones de estrés salino al compararla con la generada en condiciones control (Fig. 19 y Anexo 9, 10 y 11).

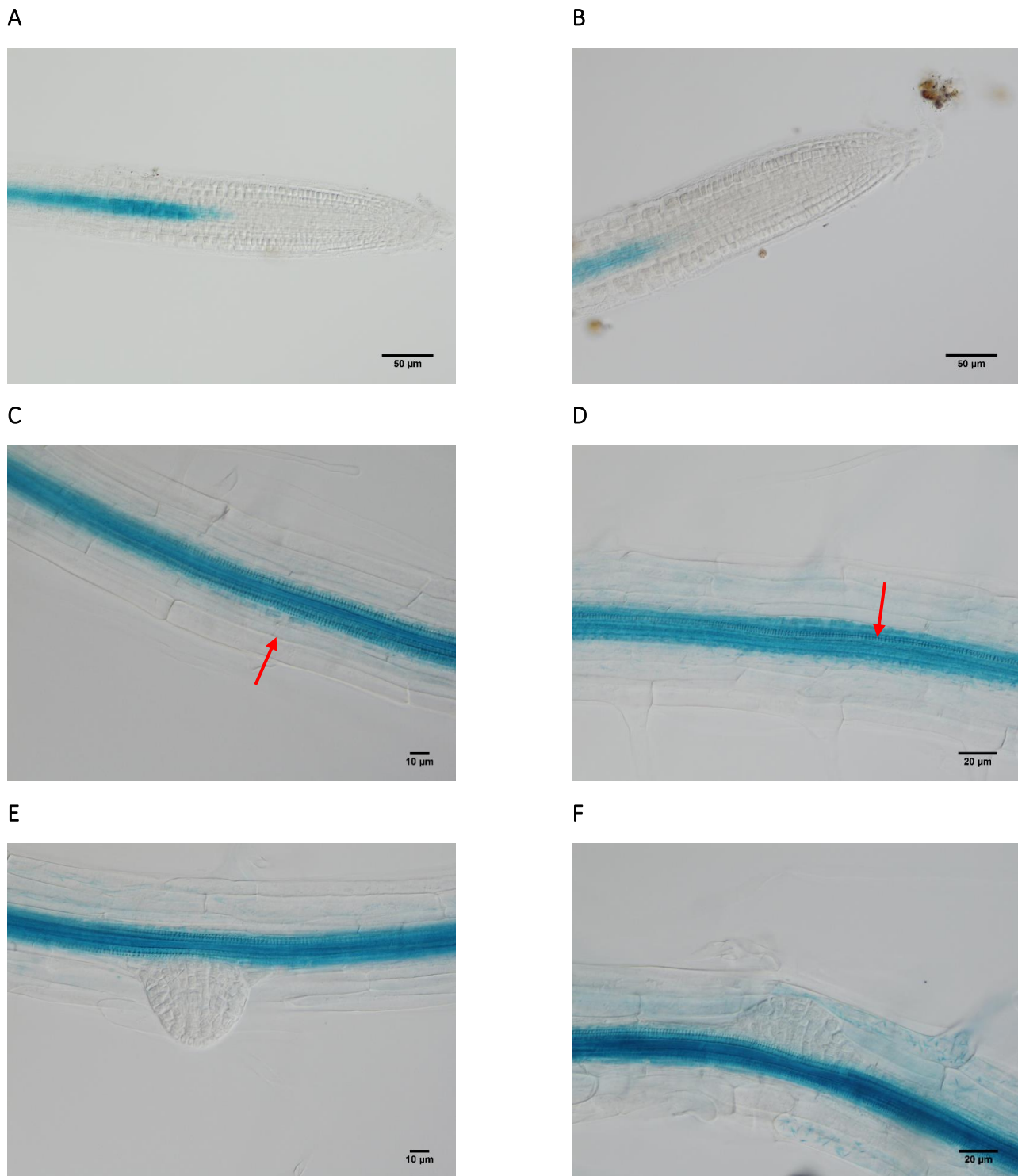


Figura 19. Actividad del promotor de *AtLEA6-1* en la raíz de *A. thaliana* de la línea reportera *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1(2)*. Actividad del promotor de *AtLEA6-1* en condiciones control (A, C y E) y de estrés salino (NaCl 75 mM; B, D y F) en la región apical de la raíz (A y B), zona de formación de las raíces laterales con un PRL en estadio uno (C y D), en una raíz recién emergida (E) y en un PRL en estadio siete (F) de plántulas de 9 ddg. Con flechas rojas se marcan primordios de la raíz lateral en estadio I.

6. DISCUSIÓN

En este estudio, el análisis de la línea mutante *atlea6-1* mostró que el gen *AtLEA6-1* participa en los procesos de desarrollo de la raíz de *A. thaliana* en condiciones de crecimiento óptimas y de déficit hídrico. Los resultados de esta tesis indican que *AtLEA6-1* tiene un papel dual en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*, ya que podría funcionar como un modulador negativo del crecimiento de la raíz primaria y como un modulador positivo de la emergencia de las raíces laterales, además, de estar involucrado en el desarrollo correcto de la arquitectura radical en condiciones control y de déficit hídrico.

Anteriormente, la inmunodetección de la proteína codificada por el gen ortólogo de *AtLEA6-1* de *Phaseolus vulgaris* (*PvLEA6*) mostró que esta proteína se acumulaba altamente en la raíz de plántulas de frijol que crecieron en condiciones óptimas de irrigación (Colmenero-Flores, Moreno, Smith, & Covarrubias, 1999), por lo cual se sugirió que podía tener un papel en el desarrollo de la raíz de las plantas. Además, plantas transgénicas de *A. thaliana* que tenían en su genoma una construcción genética en la que el promotor del gen *PvLEA6* se fusionó al gen reportero *GUS* mostraron una alta actividad del promotor en la raíz e interesadamente en el periciclo, un tipo celular involucrado en el desarrollo de las raíces laterales (Moreno-Fonseca *et al.*, 2001).

En el presente trabajo se profundizó en el análisis de la posible función del gen *AtLEA6-1* en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*. *AtLEA6-1* es un gen inducible por estrés salino que se expresa en el cilindro vascular a partir de la zona de elongación de las raíces de *A. thaliana* en condiciones óptimas de crecimiento y de estrés salino. En este estudio, se determinó los sitios de transcripción de *AtLEA6-1* en la raíz mediante el uso de líneas reporteras *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1* y *pAtLEA6-1:GFP AtLEA6-1*. En las líneas transgénicas *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1* no se encontró que el promotor de *AtLEA6-1* presentara más actividad en condiciones de estrés salino (Fig. 19), en contraste con los resultados obtenidos en las RT-PCRs de punto final, en las cuales se observó que *AtLEA6-1* es un gen cuyo transcrito se acumula en respuesta a sal y que se encuentra en muy bajos niveles cuando las plántulas se crecen en condiciones control (Fig. 9A). Una posible explicación a esta observación es que la región de 1 kb seleccionada como la zona que contendría el promotor y la región

reguladora del gen *AtLEA6-1*, en realidad no incluía todos los elementos regulatorios necesarios para mostrar la actividad del promotor de tipo silvestre en condiciones control. Cabe mencionar que en el caso del gen *PvLEA6*, su expresión está controlada, no sólo por su región 5', sino también por la región 3'UTR, la cual actúa como un potenciador de la expresión de este gen en condiciones de deshidratación y tratamientos con ABA (Moreno-Fonseca & Covarrubias, 2001). Para este gen, también se evidenció que su región regulatoria 5' contiene una región que ejerce un control negativo sobre la expresión de este, entre 1.1 kb y 2.1 kb hacia arriba del ATG (Moreno-Fonseca, 2000). Estas observaciones llevan a considerar la posibilidad de que la región seleccionada para realizar el análisis de la actividad del promotor y región de control del gen *AtLEA6-1* no contuviera todos los elementos necesarios para mostrar una actividad como la del gen de tipo silvestre. No obstante, a pesar de que aparentemente no se encontró la regulación de la actividad del promotor de *AtLEA6-1* de tipo silvestre en medios control y suplementados con NaCl 75 mM, las zonas de actividad del promotor dentro de la raíz en las líneas transgénicas *pAtLEA6-1:GUS AtLEA6-1* y *pAtLEA6-1:GFP AtLEA6-1* concuerdan con las secuenciaciones de ARN disponibles en TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), validando los resultados obtenidos en este proyecto en condiciones control y de estrés salino.

En la raíz primaria, *AtLEA6-1* funciona como un modulador de los procesos de proliferación, transición celular del DP a la ZE y, la elongación celular. Los análisis fenotípicos mostraron que *atlea6-1* presenta una raíz primaria más larga, en contraste con la línea de tipo silvestre, en medios suplementados con NaCl 75 mM. El análisis realizado mostró que el aumento en la tasa de crecimiento de la raíz primaria de *atlea6-1* se debe a que la línea mutante presenta unas células elongadas más largas y, un mayor número de células en el DP, DT y RAM. Estimaciones de la duración del ciclo celular mostraron que el aumento en el número de células en el DP, DT y RAM de *atlea6-1* es consecuencia de que el ciclo celular en la línea mutantes es más corto que en la línea de tipo silvestre (11.5 y 13.4 horas, respectivamente). Anteriormente, se encontró que la duración del ciclo celular en el RAM de plántulas de *A. thaliana* accesión WS crecidas en condiciones control es de 20.8 horas (Napsuacaly-Mendivil et al., 2014). También, se demostró que la duración del ciclo celular

aumenta cuando las plantas se someten a condiciones de estrés salino (West et al., 2004). Teniendo en cuenta la duración del ciclo celular reportada por Napsucialy-Mendivil et al. (2014), se esperaba que la duración del ciclo celular determinada en este estudio para las plántulas de tipo silvestre fuera mayor a 20 horas. No obstante, se encontró que la duración del ciclo celular no es mayor sino menor a 20 horas (13.4 horas). La diferencia entre los resultados de ambos estudios puede ser una consecuencia de que las condiciones de crecimiento utilizadas no fueron las mismas. En los estudios de Napsucialy-Mendivil et al. (2014), la duración del ciclo celular se estimó en plántulas de 8 ddg crecidas a una temperatura de 21°C, mientras que en este estudio el análisis se realizó en plántulas de 7 ddg crecidas en una temperatura de 22°C. La temperatura es un factor importante en la duración del ciclo celular; a mayor temperatura, menor la duración de éste (Yang et al., 2017). Además, en otras accesiones de *A. thaliana* como Col-0, la duración del ciclo celular puede variar entre 10 hasta 16.6 horas, en plántulas crecidas en medios control a una temperatura de 22°C (Campilho et al., 2006; Tapia-López et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013; Filin, 2015), demostrando la alta variabilidad de resultados obtenidos. Sin embargo, todas estas determinaciones no se hicieron con la misma metodología. Adicionalmente, en este estudio no se puede concluir que la duración del ciclo celular se encuentra alterada en *atlea6-1* porque no se comprobó que se cumplieran los supuestos del modelo de Ivanov & Dubrovsky (1997), por lo cual, los resultados obtenidos solo sugieren que el ciclo celular en la línea mutante pudiera estar afectado. Es por ello, que para conocer si la duración del ciclo celular en *atlea6-1* en realidad se encuentra afectada, se requieren hacer estudios con otras metodologías, como lo serían hacer ‘time-lapse’ de las células del RAM o tinciones con EdU.

Las citoquininas son hormonas vegetales que están relacionadas con los procesos de diferenciación celular en la raíz de *A. thaliana*. Dentro de los procesos de biosíntesis de las citoquininas se encuentran unas enzimas conocidas como las ATP/ADP isopentenil-transferasas (IPT), las cuales, catalizan el paso limitante en la síntesis de esta hormona vegetal (Miyawaki et al., 2004). Cada uno de los genes que codifican para estas enzimas presenta un patrón único de expresión espacial; sin embargo, *AtIPT3*, *AtIPT5* y *AtIPT7* se expresan en el tejido vascular de las zonas de elongación y de diferenciación de la raíz

(Miyawaki et al., 2004). La línea triple mutante para estos genes *ipt3, ipt5, ipt7* de *A. thaliana* posee un mayor número de células en el RAM, lo cual correlaciona con una raíz primaria más larga (Dello Iorio et al., 2007). El fenotipo de esta triple mutante se revierte con la aplicación de citoquininas, demostrando que el fenotipo es debido a la falta de estas fito-hormonas (Dello Iorio et al., 2007). Por otra parte, mutantes simples de genes involucrados en la cascada de señalización por citoquininas como *AHK3* (*Arabidopsis Histidine kinase*), *ARR1* y *ARR12* (*Arabidopsis Response Regulator*), presentan un fenotipo similar al de la triple mutante *ipt3, ipt5, ipt7*; es decir, una raíz primaria más larga y mayor número de células en el meristemo (Dello Iorio et al., 2007). La mutante simple *arr12* y la mutante doble *arr1, 12* se caracterizan por poseer células completamente elongadas más largas (Street et al., 2016a).

Los fenotipos de las líneas mutantes en la biosíntesis y señalización por citoquininas se explican en parte porque esta fitohormona trabaja en conjunción con otras hormonas, como las auxinas y el etileno, para regular el crecimiento de la raíz. La relación entre las auxinas y citoquininas es esencial para el establecimiento del DT, encontrándose una mayor cantidad de auxinas en regiones asociadas con la proliferación celular de la raíz (DP), y una mayor concentración de citoquininas en el DT (Street et al., 2016). Por otra parte, se ha demostrado que las citoquininas promueven la síntesis del etileno, una hormona relacionada con la inhibición de la elongación celular (Hansen, Chae, & Kieber, 2009).

Los estudios realizados con las citoquininas y la similitud en los fenotipos de las líneas mutantes para esta fitohormona, ya sea en su síntesis o percepción, con la línea mutante *atlea6-1* sugieren que *AtLEA6-1* actúa a partir del DT y la zona de elongación celular. Los fenotipos que presenta la mutante *atlea6-1*: un mayor número de células en el RAM, un mayor número de células que abandonan el DP durante 24 horas, células completamente elongadas más largas y una elevada actividad del promotor de *AtLEA6-1* en el cilindro vascular a partir de la ZE y DT de la raíz de *A. thaliana* (Fig. 19), también los presentan las mutantes que afectan los niveles o percepción de las citoquininas.

En este punto, es importante resaltar que se desconoce si el fenotipo en la raíz primaria de *atlea6-1* proviene desde el desarrollo embrionario o es un efecto del estrés

salino. En el caso de que *AtLEA6-1* esté implicado en el desarrollo del embrión, es posible que el fenotipo observado en la raíz primaria de *atlea6-1* no sea exclusivo del estrés per se, si no que esté determinado embriónicamente. Un ejemplo de esto, son las mutantes de *mpk6*. *MPK6* (del inglés: Mitogen-activated protein kinase 6) es una proteína quinasa involucrada en la transducción de señales de respuesta a estrés y desarrollo (Colcombet & Hirt, 2008; López-Bucio et al., 2014). Las mutantes de *mpk6* presentan alteraciones en el desarrollo embrionario, las cuales dan como origen a tres fenotipos de semillas diferentes que están relacionados post-embriónicamente con tres fenotipos diferentes en la arquitectura de la raíz (López-Bucio et al., 2014). No obstante, si el fenotipo de *atlea6-1* estuviera determinado desde el desarrollo embrionario, este se haría más evidente en condiciones de estrés salino, demostrando la importancia de *AtLEA6-1* en el desarrollo de la raíz primaria de *A. thaliana* post-embriónicamente en condiciones de estrés.

En cuanto al desarrollo de las raíces laterales, se encontró que *atlea6-1* tiene afectados los procesos de emergencia y desarrollo de las raíces laterales, pero no los procesos de iniciación. La caracterización fenotípica de la mutante *atlea6-1* mostró que tanto en condiciones control como en condiciones de déficit hídrico, la línea mutante *atlea6-1* tenía una menor densidad de RL en la ZR en comparación con la línea de tipo silvestre. Curiosamente, se encontró que las plántulas que crecieron en medios suplementados con NaCl 75 mM presentaron una mayor densidad de RLs en comparación con las plántulas de su mismo genotipo crecidas en medios control; sin embargo, el aumento en la densidad de RLs en condiciones de estrés salino es menor en la línea *atlea6-1* y *35S:AtLEA6-1 atlea6-1* en comparación con la línea de tipo silvestre, evidenciando que las plántulas de la línea mutante son más susceptibles al estrés salino que las plántulas de tipo silvestre. Anteriormente, ya se había reportado que el estrés osmótico inhibía la formación de RLs, mientras que, condiciones equiosmolares (misma concentración de osmolitos en el medio) de estrés salino estimulaban la emergencia y formación de RLs, en un proceso en el que está involucrado el antiporter de Na^+/H^+ SOS3 (del inglés: Salt Overly Sensitive 3; Zhao et al., 2011).

En condiciones de estrés salino, el índice de iniciación de las raíces laterales en la mutante *atlea6-1* no es diferente al de la línea de tipo silvestre, indicando que la iniciación

de los PRL no se afecta; sin embargo, la densidad de raíces laterales en la zona de ramificación es menor y, el tiempo de formación de las RLs era 1.4 veces más largo en la mutante. Dentro de la zona de ramificación de la raíz primaria también se encontró que había un mayor porcentaje de PRL en *atlea6-1*. Además, el índice de todos los eventos de iniciación de las raíces laterales en la ZR de la mutante no es diferente al de las plántulas de tipo silvestre. Adicionalmente, en la línea mutante *atlea6-1* se detectó un alto grado de PRL con desarrollo anormal. Los PRL anormales se distinguieron porque tienen una morfología aplanada y una apariencia de amontonamiento de células dentro de estos.

En la literatura se han reportado varias mutantes con defectos en los procesos de emergencia de las raíces laterales, una de esas mutantes es *lax3*. *LAX3* (del inglés: Like AUX1 3) es un transportador de flujo de auxinas que se expresa en células que rodean a los PRL y su actividad está asociada a la expresión de enzimas encargadas en la remodelación de la pared celular (Swarup et al., 2008). Un PRL en desarrollo atraviesa varias capas celulares de la raíz para emerger. En el paso del PRL, éste tiene que atravesar la endodermis, el córtex y la epidermis; a su paso, las células se separan y permiten que el PRL transite a través de ellas; sin embargo, cuando hay una baja expresión de alguna de las enzimas remodeladoras de la pared celular, el tránsito del primordio en la raíz se afecta (Swarup et al., 2008). Además, en otros estudios se ha sugerido que el aumento de la expresión de genes remodeladores de la pared celular alrededor de los PRL se correlaciona con un mejor tránsito del PRL entre las diferentes capas celulares (González-Carranza et al., 2007; Laskowski et al., 2006; Neuteboom et al., 1999). Nuestros resultados demuestran que la emergencia es el proceso que se encuentra afectado en el desarrollo de los PRL en *atlea6-1*. La morfología aplanada de los PRL y el tiempo de formación de las RL en *atlea6-1* indican que los primordios no están atravesando con facilidad las diferentes capas celulares de la raíz, por lo que sería posible pensar que existe una relación funcional entre proteínas remodeladoras de la pared celular y la proteína AtLEA6-1.

Se ha propuesto que las LEAs pueden funcionar como biomoléculas protectoras de otras proteínas y de esta manera evitar su desnaturalización en situaciones de déficit hídrico (Olvera-Carrillo et al. 2011). Esta hipótesis está soportada en evidencia *in vitro* de varias

proteínas LEA que muestran que, en condiciones de baja disponibilidad de agua, amontonamiento molecular y temperaturas extremas, adquieren estructuras secundarias y son capaces de mantener la actividad de algunas enzimas reporteras como la MDH y LDH. Además, recientemente se descubrió que *AtLEA6-1* es capaz de proteger la LDH en condiciones de congelamiento-descongelamiento (Arroyo, no publicado), lo cual sugiere, que esta proteína puede tener la misma función *in vivo*, sin embargo, se requieren más estudios para poder comprobar esta hipótesis y para conocer las proteínas con las cuales *AtLEA6-1* está interactuando en el desarrollo de la raíz, para así determinar con mayor exactitud en que parte del proceso del desarrollo de la raíz primaria y la emergencia de las raíces laterales se requiere a la proteína. Además, la característica desordenada de *AtLEA6-1* le confiere a esta proteína la capacidad de interactuar con varias moléculas, que pueden estar involucradas en la señalización, regulación y respuesta a varias señales ambientales y de desarrollo. Por lo cual, se sugiere que la función dual de *AtLEA6-1* en la raíz primaria y raíces laterales de *A. thaliana* se debe a las proteínas o moléculas con las cuales *AtLEA6-1* pudiera interactuar en estos diferentes contextos celulares.

Con la idea de obtener posibles interactores de *AtLEA6-1* se llevó a cabo un análisis de cotranscripción del gen *AtLEA6-1* con otros genes. Para realizar esto, se utilizó el programa Expression Angler (Toufighi *et al.*, 2005). Este programa toma como base de datos secuenciaciones de ARN extraído de raíces crecidas en diferentes condiciones y analiza los patrones de expresión tejido específico de manera comparativa con un gen de interés, en este caso *AtLEA6-1*. El análisis de cotranscripción mostró que *AtLEA6-1* se coexpresa con 24 genes diferentes (Anexo 11). Dentro de estos genes se encuentran una fosfatasa (*AT1G51810*), un factor transcripcional (*AtWRKY42*), genes involucrados en el desarrollo (*UFO*, *AKRP*, *CYP78A5*, *AT3G14900*), un transportador de membrana (*AT1G15150*), entre otros. Los resultados de este análisis es una guía para futuras investigaciones que tengan como objetivo evaluar posibles interactores de *AtLEA6-1*; sin embargo, este análisis es a nivel transcripcional y no a nivel proteico, por lo cual, la coexpresión de un gen con *AtLEA6-1* puede deberse a un efecto indirecto de la interacción de esta proteína con otras.

Otro aspecto que vale la pena abordar en esta sección es en relación con las características de la mutante *atlea6-1*, la cual presenta una inserción de T-ADN en la región 5'UTR del gen *AtLEA6-1*. De acuerdo con el análisis que se realizó, esta línea mutante produce un transcrito anormal que a pesar de que inicia en el mismo T-ADN, también comprende la región codificante del gen *AtLEA6-1* (Fig. 9B). Desafortunadamente, hasta el momento no se ha podido determinar si en la mutante se produce o no la proteína *AtLEA6-1* nativa. Experimentos en los que se utilizaron anticuerpos contra *AtLEA6-1* para determinar presencia de la proteína, fueron fallidos; ya que los anticuerpos, producidos por la compañía AGRISERA, no tuvieron la sensibilidad necesaria para detectar a la proteína en extractos totales. A pesar de la incertidumbre que genera esta mutante, la evidencia fenotípica sugiere fuertemente que *atlea6-1* es una mutante de pérdida de función. Los datos obtenidos con las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12) mostraron una recuperación parcial del fenotipo de tipo silvestre en medios control y de estrés salino, en especial de la línea *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4). Sin embargo, una complementación completa se observó en el caso del fenotipo de germinación (Arroyo, datos no publicados). La razón por la cual en las líneas *p35S:AtLEA6-1 atlea6-1* (4 y 12) no hay una recuperación completa de *atlea6-1* al fenotipo de tipo silvestre es que el transcrito que codifica *AtLEA6-1* silvestre en estas líneas se expresa a partir del promotor 35S, un promotor fuerte y constitutivo, y dado que esta función en el desarrollo pudiera requerir cantidades particulares de esta proteína, así como, sitios específicos para su síntesis, el fenotipo no muestra las características de tipo silvestre. Hay reportes de líneas complementadas con el promotor 35S y no el promotor endógeno de un gen, en las cuales no se revierte completamente el fenotipo de la línea mutante, como es el caso de la línea complementada *35S:Myc-HLS1 hls1-1* (Lyu et al., 2019). Además, el promotor 35S no tiene la capacidad de percibir las condiciones ambientales impuestas por el estrés salino en las raíces de *A. thaliana*. El promotor endógeno de *AtLEA6-1* contiene varios elementos regulatorios en *cis* que intervienen en la respuesta a condiciones de déficit hídrico, como son los elementos ABRE, DRE, MYC y MYB (Battaglia, 2008). Estos elementos son importantes en la regulación transcripcional de *AtLEA6-1*, en especial en la respuesta por parte de la planta a las situaciones de estrés impuestas por la baja disponibilidad de agua. Adicionalmente,

análisis preliminares de la longitud de la raíz primaria y densidad de RLs en la ZR de dos alelos mutantes adicionales de *AtLEA6-1*, muestran el mismo fenotipo de *atlea6-1*, igualmente, estudios de la cinética de crecimiento de la raíz primaria de una línea sobre-expresora *pAtLEA6-1:AtLEA6-1 AtLEA6-1* en condiciones control y de estrés salino, arrojaron que esta línea sobre-expresora presenta un fenotipo opuesto al de *atlea6-1* (Anexo 3), brindando más evidencias de que *atlea6-1* es una mutante de pérdida de función.

Finalmente, cabe mencionar que resulta interesante encontrar que un gen relacionado en la respuesta a estrés como *AtLEA6-1* esté involucrado en los procesos de desarrollo de la raíz en condiciones de crecimiento óptimo y de estrés salino. Estos resultados están de acuerdo con la idea de que en las plantas se han seleccionado mecanismos para ajustar su desarrollo y crecimiento a las condiciones cambiantes del ambiente y, siendo las proteínas LEA, proteínas cuyo aumento en abundancia se encuentra íntimamente asociado a condiciones ambientales adversas, pudiendo funcionar como un elemento 'ajustador' entre el desarrollo y el estrés. Este es el primer reporte que se tiene de una proteína LEA típica cuya función está asociada a la modulación del desarrollo de la raíz, lo cual amplía el campo del conocimiento que se tiene acerca de las proteínas LEA y enriquece el conocimiento e importancia de las proteínas intrínsecamente desordenadas en el desarrollo de los organismos.

7. CONCLUSIONES

- La proteína *AtLEA6-1* funciona como un modulador negativo del crecimiento de la raíz primaria y, como un modulador positivo de la emergencia de las raíces laterales en plántulas de *A. thaliana* sometidas a condiciones de estrés salino.
- En la zona de elongación de la raíz primaria, *AtLEA6-1* actúa como un modulador negativo del proceso de elongación celular. Además, algunos datos sugieren que *AtLEA6-1* también está involucrada en los procesos de proliferación celular en el RAM y en la transición de células del DP a ZE en condiciones de estrés salino.
- *AtLEA6-1* no participa en los procesos de iniciación de los primordios de la raíz lateral; sin embargo, esta proteína se encuentra involucrada en la morfogénesis de los

primordios en plántulas de *A. thaliana* sometidas a condiciones de estrés salino y, por lo tanto, también tiene un rol en aspectos temporales del desarrollo de los primordios de las RLs.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-maspons, A., González-Lemes, I., & Covarrubias, A. A. (2019). RNA from different organs of *Phaseolus vulgaris* L. *BioTechniques*, *66*, 96–98. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0129>.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing ARN quality. *Electrophoresis*, *33*(2), 366-369.
- Armengaud, P., Zambaux, K., Hills, A., Sulpice, R., Pattison, R. J., Blatt, M. R., & Amtmann, A. (2009). EZ-Rhizo: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture. *The Plant Journal*, *57*(5), 945-956.
- Arroyo, I. A. (2012). Caracterización fenotípica en mutantes de genes para proteínas LEA de la familia 6 en respuesta a déficit hídrico en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Arroyo, I. A. (2015). Estudio de la relación estructura-función de la familia 6 de proteínas LEA. Tesis de maestría. UNAM. Pag: 41-60.
- Battaglia, M. (2008). Análisis de la región 3' no traducida del gen *PvLEA-18* en la regulación de su expresión en respuesta a déficit hídrico. Tesis de doctorado. UNAM.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology*, *148*(1), 6-24.
- Baker, J., Van dennSteele, C., & Dure, L. (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, *11*(3), 277-291.
- Barberon, M., Vermeer, J. E. M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T. G., ... & Geldner, N. (2016). Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation. *Cell*, *164*(3), 447-459.
- Beemster, G. T. S., & Baskin, T. I. (2000). Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *124*(4), 1718–1727. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1718>

- Begcy, K., Mariano, E. D., Mattiello, L., Nunes, A. V., Mazzafera, P., Maia, I. G., & Menossi, M. (2011). An Arabidopsis mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *PLoS One*, 6(8), e23776.
- Bies-Etheve, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., ... & Delseny, M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, 67(1-2), 107-124.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, 2(2), 48-54.
- Çakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., & Atanassova, R. (2003). A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(9), 2165-2180.
- Campilho, A., Garcia, B., Toorn, H. V.D., Wijk, H. V., Campilho, A., & Scheres, B. (2006). Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the Arabidopsis thaliana root meristem. *Plant Journal*, 48(4), 619–627. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02892>.
- Carenas, M. B., Giner, J. L., Gonzáles, J. & Pozo, M. (2014). Geología. 1st. *Paraninfo*.
- Chang, R. (2002). Química. *Mc. Graw Hill, Interamericana Editores, SA de CV 7ma. Edición. México. Cap, 11, 602-611.*
- Chaumont, F., & Tyerman, S. D. (2014). Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant physiology*, 164(4), 1600-1618.
- Chaplin, M. (2006). Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 861.
- Chen, W.Q. et al. (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14, 559–574
- Chen, Y. S., Lo, S. F., Sun, P. K., Lu, C. A., Ho, T. H. D., & Yu, S. M. (2015). A late embryogenesis abundant protein HVA1 regulated by an inducible promoter enhances root growth and abiotic stress tolerance in rice without yield penalty. *Plant biotechnology journal*, 13(1), 105-116.

- Close, T. J., & Bray, E. A. (1993). Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. In *Riverside Symposium in Plant Physiology 1993: University of California, Riverside*. American Society of Plant Physiologists.
- Close, T. J., Kortt, A. A., & Chandler, P. M. (1989). A cADN-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant molecular biology*, *13*(1), 95-108.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, *16*(6), 735-743.
- Colmenero-Flores, J. M., Campos, F., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cADN clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant molecular biology*, *35*(4), 393-405.
- Colmenero-Flores, J. M., Moreno, L. P., Smith, C. E., & Covarrubias, A. A. (1999). Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiology*, *120*(1), 93-104.
- Colcombet, J., & Hirt, H. (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, *413*(2), 217-226.
- Cox, M. M., & Nelson, D. L. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*. 7th. WH Freeman.
- Cuevas-Velazquez, C. L., Saab-Rincón, 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. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(20), 10893-10903.
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., & Sabatini, S. (2007). Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology*, *17*(8), 678-682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., ...

- Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322(5906), 1380–1384. <https://doi.org/10.1126/science.1164147>
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in plant science*, 19(6), 371-379.
 - Dodd, I. C., & Ryan, A. C. (2016). Whole-Plant Physiological Responses to Water-Deficit Stress. *eLS*, 1-9.
 - Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development*, 119(1), 71–84.
 - Dominguez, P. G., Frankel, N., Mazuch, J., Balbo, I., Iusem, N., Fernie, A. R., & Carrari, F. (2013). ASR1 mediates glucose-hormone cross talk by affecting sugar trafficking in tobacco plants. *Plant physiology*, 161(3), 1486-1500
 - Dubrovsky, J. G., & Fordeb, B. G. (2012). Quantitative analysis of lateral root development: Pitfalls and how to avoid them. *Plant Cell*, 24(1), 4–14. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089698>
 - Dubrovsky, J. G., Soukup, A., Napsucially-mendivil, S., Jeknic, J., & Ivanchenko, M. G. (2009). *The lateral root initiation index : an integrative measure of primordium formation*. 103, 807–817. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn267>
 - Dure, L. I. I. I. (1993). Structural motifs in Lea proteins. *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress.*, 91-104.
 - Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T. H. D., Mundy, J., Quatrano, R., ... & Sung, Z. R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant molecular biology*, 12(5), 475-486.
 - El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., ... & Sonnhammer, E. L. L. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D427-D432
 - Elliott, J., Deryng, D., Müller, C., Frieler, K., Konzmann, M., Gerten, D., ... & Eisner, S. (2014). Constraints and potentials of future irrigation water availability on agricultural

- production under climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3239-3244.
- FAO. (2015). Contribución del agua a la seguridad alimentaria y la nutrición. *HLPE*. Informe 9.
 - Filin, A. (2015). Cellular analysis of root growth of some *Arabidopsis thaliana* mutants. *Vestnik Moskovskogo Gosudarstvennogo Oblastnogo Universiteta. Seria: Estestvennyye Nauki (Proceedings of the Moscow District State University: Natural Sciences)*, No 4: 37-45, *en ruso*.
 - Flowers, T. J., & Yeo, A. R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Functional Plant Biology*, 22(6), 875-88.
 - Galvan-Ampudia, C. S., & Testerink, C. (2011). Salt stress signals shape the plant root. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 296-302.
 - García-Gómez, M. L., Azpeitia, E., & Álvarez-Buylla, E. R. (2017). A dynamic genetic-hormonal regulatory network model explains multiple cellular behaviors of the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Computational Biology*, 13(4), 1–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005488>
 - Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *JouARNI of Biological Chemistry*, 275(8), 5668-5674.
 - Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., ... & Dubrovsky, J. G. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *The EMBO journal*, 32(21), 2884-2895.
 - González-Carranza, Z. H., Elliott, K. A., & Roberts, J. A. (2007). Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58(13), 3719–3730. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm222>
 - Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J., & Tunnacliffe, A. (2003). Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an

- anhydrobiotic nematode protein. *JouARNI of Biological Chemistry*, 278(15), 12977-12984.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in plant science*, 5, 151.
 - Hammer, Ø. (2019). *Reference manual*. (1999).
 - Hansen, M., Chae, H. S., & Kieber, J. J. (2009). Regulation of ACS protein stability by cytokinin and brassinosteroid. *Plant Journal*, 57(4), 606–614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03711.x>
 - Hasanuzzaman, M., Anee, T. I., Bhuiyan, T. F., Nahar, K., & Fujita, M. (2019). Emerging role of osmolytes in enhancing abiotic stress tolerance in rice. In *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance* (pp. 677-708). Woodhead Publishing.
 - Hayashi, K., Hasegawa, J., & Matsunaga, S. (2013). The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: Endoreduplication precedes rapid cell expansion. *Scientific Reports*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep02723>
 - Hink, M. A., Griep, R. A., Borst, J. W., van Hoek, A., Eppink, M. H., Schots, A., & Visser, A. J. (2000). Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *JouARNI of Biological Chemistry*, 275(23), 17556-17560.
 - Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in plant science*, 12(8), 343-351.
 - Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant JouARNI*, 61(6), 1041-1052.
 - Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431-438.
 - Hopkins, W. G. (1999). *Introduction to plant physiology* (No. Ed. 2). John Wiley and Sons.
 - Hundertmark, M., & Hinch, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 9(1), 118.
 - Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. (2019). Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in plant science*, 10.

- Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (1997). A MODEL OF LINKAGE MERISTEM : IN THE ROOT APICAL DURATION OF THE CELL-CYCLE ESTIMATION AND RATE OF ROOT GROWTH ' RATE PRODUCTION , BETWEEN CELL-CYCLE OF CELL. *158*(6), 757–763.
- Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: Conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, *18*(5), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.002>
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, *6*(13), 3901-3907.
- Kong, X., Liu, G., Liu, J., & Ding, Z. (2018). The Root Transition Zone: A Hot Spot for Signal Crosstalk. *Trends in Plant Science*, *23*(5), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.004>
- Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T., & Prusty, R. (2006). Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: Toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant and Cell Physiology*, *47*(6), 788–792. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj043>
- Liang, W., Ma, X., Wan, P., & Liu, L. (2018). Plant salt-tolerance mechanism: a review. *Biochemical and biophysical research communications*, *495*(1), 286-291.
- López-Bucio, J. S., Dubrovsky, J. G., Raya-González, J., Ugartechea-Chirino, Y., López-Bucio, J., De Luna-Valdez, L. A., ... Guevara-García, A. A. (2014). Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany*, *65*(1), 169–183. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert368>
- Lyu, M., Shi, H., Li, Y., Kuang, K., Yang, Z., Li, J., ... Zhong, S. (2019). Oligomerization and Photo-Deoligomerization of HOOKLESS1 Controls Plant Differential Cell Growth. *Developmental Cell*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.08.007>
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)*, *124*(1), 33–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006065>

- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., ... Benková, E. (2011). Cytokinin Modulates Endocytic Trafficking of PIN1 Auxin Efflux Carrier to Control Plant Organogenesis. *Developmental Cell*, 21(4), 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.014>
- Magwanga, R. O., Lu, P., Kirungu, J. N., Dong, Q., Hu, Y., Zhou, Z., ... & Liu, F. (2018). Cotton Late Embryogenesis Abundant (LEA2) Genes Promote Root Growth and Confer Drought Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis thaliana. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(8), 2781-2803.
- Maskin, L., Frankel, N., Gudesblat, G., Demergasso, M. J., Pietrasanta, L. I., & Iusem, N. D. (2007). Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(4), 831-835.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 525-532.
- Mizan, T. I., Savage, P. E., & Ziff, R. M. (1996). Temperature dependence of hydrogen bonding in supercritical water. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(1), 403-408.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., & Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37(1), 128–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01945>.
- McElrone, A. J., Choat, B., Gambetta, G. A. & Brodersen, C. R. (2013) Water Uptake and Transport in Vascular Plants. *Nature Education Knowledge* 4(5):6.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.
- Moreno-Fonseca, L. P. (2000). Analisis de la expresión de un gen que codifica para una proteína LEA de frijol. Tesis de doctorado. UNAM.

- Moreno-Fonseca, L. P., & Covarrubias, A. A. (2001). Downstream ADN sequences are required to modulate Pvlea-18 gene expression in response to dehydration. *Plant molecular biology*, 45(5), 501-515.
- Motulsky, H. J., & Brown, R. E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression—a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC bioinformatics*, 7(1), 123.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapierre, C., Franke, R., Nawrath, C., & Geldner, N. (2012). Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 10101-10106
- Napsucialy-Mendivil, S., Alvarez-Venegas, R., Shishkova, S., & Dubrovsky, J. G. (2014). Arabidopsis homolog of trithorax1 (ATX1) is required for cell production, patterning, and morphogenesis in root development. *JouARNI of experimental botany*, 65(22), 6373-6384.
- Napsucialy-Mendivil, S. & Dubrovsky J. G. (2018). Genetic and Phenotypic Analysis of Lateral Root Development in Arabidopsis thaliana. Chapter 4. *Root Development: Methods and Protocols* (Vol. 1761). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7747-5>
- Nelson, D. L., & Cox M. M. (2017). Lehninger principles of biochemistry. 7th. *Macmillan*.
- Neuteboom, L. W., Veth-Tello, L. M., Clijdesdale, O. R., Hooykaas, P. J. J., & Van Der Zaal, B. J. (1999). A novel subtilisin-like protease gene from Arabidopsis thaliana is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Research*, 6(1), 13–19. <https://doi.org/10.1093/dnares/6.1.13>
- Qadir, M., Quill rou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R. J., ... & Noble, A. D. (2014). Economics of salt-induced land degradation and restoration. In *Natural Resources Forum* (Vol. 38, No. 4, pp. 282-295).
- Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2014). Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annual review of biochemistry*, 83, 553-584.
- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Reyes, J. L., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (2010). Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their

relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(1), 373-390.

- Olvera-Carrillo, Y., Luis Reyes, J., & Covarrubias, A. A. (2011). Late embryogenesis abundant proteins: versatile players in the plant adaptation to water limiting environments. *Plant signaling & behavior*, 6(4), 586-589.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytologist*, 202(1), 35-49.
- Pacheco-Escobedo, M. A., Ivanov, V. B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I. A., ... & Álvarez-Buylla, E. R. (2016). Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Annals of botany*, 118(4), 763-776.
- Porco, S., Larrieu, A., Du, Y., Gaudinier, A., Goh, T., Swarup, K., ... & Casimiro, I. (2016). Lateral root emergence in Arabidopsis is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. *Development*, 143(18), 3340-3349
- Reyes, J. L., Campos, F., Wei, H. U. I., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D. T., & Covarrubias, A. A. (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, cell & environment*, 31(12), 1781-1790.
- Reyes, J. L., Rodrigo, M. J., Colmenero-Flores, J. M., Gil, J. V., Garay-Arroyo, A., Campos, F., ... & Covarrubias, A. A. (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment*, 28(6), 709-718.
- Reyes-hernández, B. J., Shishkova, S., Amir, R., Quintana-arms, A. X., Napsucialy-mendivil, S., Cervantes-gamez, R. G., & Torres-martínez, H. H. (2019). *Root stem cell niche maintenance and apical meristem activity critically depend on THREONINE SYNTHASE1*. (April). <https://doi.org/10.1093/jxb/erz165>
- Ristova, D. (2018). *Root Development: Methods and Protocols* (Vol. 1761).

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7747-5>

- Rivera-Najera, L. Y., Saab-Rincón, G., Battaglia, M., Amero, C., Pulido, N. O., García-Hernández, E., ... & Covarrubias, A. A. (2014). A group 6 late embryogenesis abundant protein from common bean is a disordered protein with extended helical structure and oligomer-forming properties. *JouARNI of Biological Chemistry*, 289(46), 31995-32009.
- Rodríguez-Salazar, J., Moreno, S., & Espín, G. (2017). LEA proteins are involved in cyst desiccation resistance and other abiotic stresses in *Azotobacter vinelandii*. *Cell Stress and Chaperones*, 22(3), 397-408.
- Rodríguez-Valentín, R., Campos, F., Battaglia, M., Solórzano, R. M., Rosales, M. A., & Covarrubias, A. A. (2014). Group 6 Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Monocotyledonous Plants: Genomic Organization and Transcript Accumulation Patterns in Response to Stress in *Oryza sativa*. *Plant molecular biology reporter*, 32(1), 198-208.
- Salleh, F. M., Evans, K., Goodall, B., Machin, H., Mowla, S. B., Mur, L. A., ... & Rogers, H. J. (2012). A novel function for a redox-related LEA protein (SAG21/AtLEA5) in root development and biotic stress responses. *Plant, cell & environment*, 35(2), 418-429.
- Serraj, R., & Sinclair, T. R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant, cell & environment*, 25(2), 333-341.
- Shahzad, Z., Kellermeier, F., Armstrong, E. M., Rogers, S., Lobet, G., Amtmann, A., & Hills, A. (2018). EZ-Root-VIS: A Software Pipeline for the Rapid Analysis and Visual Reconstruction of Root System Architecture. *Plant physiology*, 177(4), 1368-1381.
- Shahzad, B., Fahad, S., Tanveer, M., Saud, S., & Khan, I. A. (2019). Plant responses and tolerance to salt stress. *Approaches for enhancing abiotic stress tolerance in plants*. Taylor & Francis, 61-77.
- Shiklomanov, I. A. (1998). World water resources. *A new appraisal and assessment for the 21st century*.
- Singh, S., Cornilescu, C. C., Tyler, R. C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M. S., & Markley, J. L. (2005). Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Science*, 14(10), 2601-2609.
- Street, I. H., Mathews, D. E., Yamburkenko, M. V., Sorooshzadeh, A., John, R. T., Swarup,

- R., ... Schaller, G. E. (2016a). Cytokinin acts through the auxin influx carrier AUX1 to regulate cell elongation in the root. *Development (Cambridge)*, *143*(21), 3982–3993. <https://doi.org/10.1242/dev.132035>
- Sun, X., Rikkerink, E. H., Jones, W. T., & Uversky, V. N. (2013). Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *The Plant Cell*, *25*(1), 38–55.
 - Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., ... Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, *10*(8), 946–954. <https://doi.org/10.1038/ncb1754>
 - Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology*. 4th. Ed. Pub. Sinauer.
 - Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V., Kim, S. H., ... & Alvarez-Buylla, E. R. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant physiology*, *146*(3), 1182–1192.
 - Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of botany*, *91*(5), 503–527.
 - Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthélémy, J., & Palauqui, J. C. (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *20*(6), 1494–1503.
 - Toufighi, K., Brady, S. M., Austin, R., Ly, E., & Provart, N. J. (2005). The botany array resource: e-northern, expression angling, and promoter analyses. *The Plant Journal*, *43*(1), 153–163.
 - Tunnacliffe, A., & Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, *94*(10), 791–812.
 - van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., & Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature*, *390*(6657), 287–289.

- Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J., & Vieira, L. G. E. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *JouARNI of plant physiology*, *164*(10), 1367-1376.
- Vilardell, J., Goday, A., Freire, M. A., Torrent, M., Martínez, M. C., Torne, J. M., & Pagès, M. (1990). Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant molecular biology*, *14*(3), 423-432.
- Wang, H. J., Hsu, C. M., Jauh, G. Y., & Wang, C. S. (2005). A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiologia plantarum*, *123*(3), 314-320.
- Wang, H. J., Jauh, G. Y., Hsu, Y. H., & Wang, C. S. (2003). The nuclear localization signal of a pollen-specific, desiccation-associated protein of lily is necessary and sufficient for nuclear targeting. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, *44*.
- Wang, W., Meng, B., Chen, W., Ge, X., Liu, S., & Yu, J. (2007). A proteomic study on postdiapaused embryonic development of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Proteomics*, *7*(19), 3580-3591.
- West, G., Inzé, D., & Beemster, G. (2004). Cell Cycle Modulation in the Response of the Primary Root of Arabidopsis to Salt Stress. *Plant Physiology*, *135*(2), 1050–1058. <https://doi.org/10.1104/pp.104.040022>
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one*, *2*(8), e718.
- Wise, M. J., & Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do?. *Trends in plant science*, *9*(1), 13-17.
- Yoshida, T., Mogami, J., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current opinion in plant biology*, *21*, 133-139.
- Zamora-Briseño, J. A., & de Jiménez, E. S. (2016). A LEA 4 protein up-regulated by ABA is involved in drought response in maize roots. *Molecular biology reports*, *43*(4), 221-228.
- Zhang, W., To, J. P. C., Cheng, C. Y., Eric Schaller, G., & Kieber, J. J. (2011). Type-A response

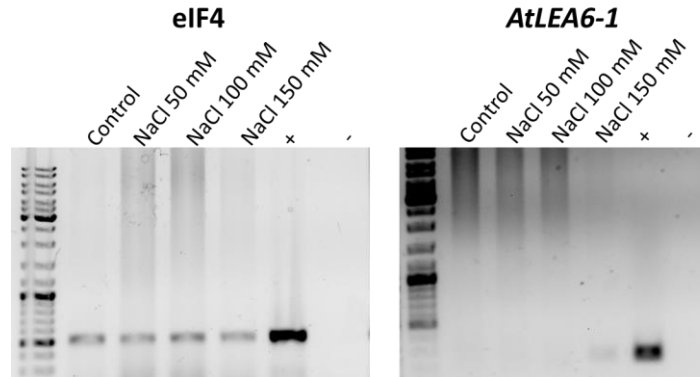
regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of PIN auxin efflux carriers. *Plant Journal*, 68(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04668.x>

- Zhao, Y., Wang, T., Zhang, W., & Li, X. (2011). SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 189(4), 1122-1134.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.
- Zhu, J. K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., & Bohnert, H. J. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(3), 253-277.

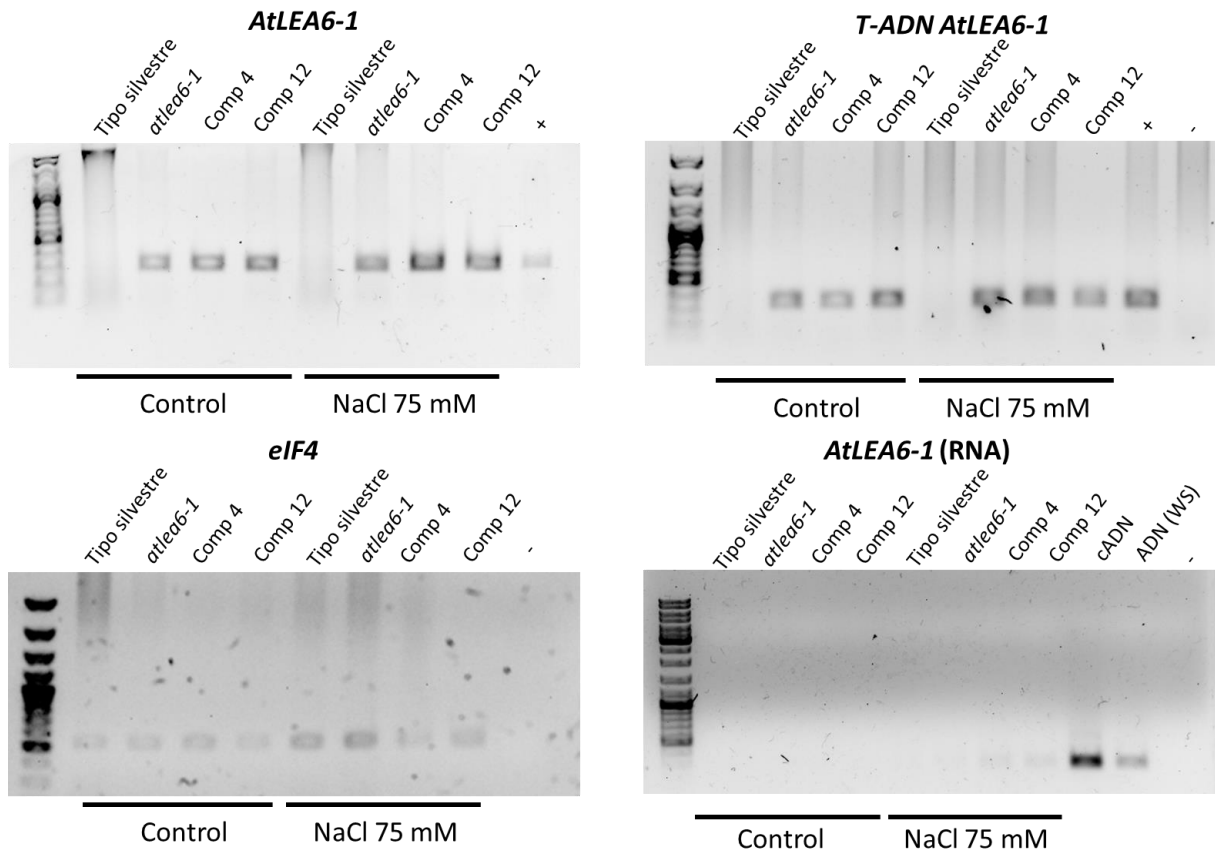
9. ANEXOS

Anexo 1. Geles completos de las RT-PCR de punto final de *eIF4* y *AtLEA6-1* de plántulas de tipo silvestre trasplantadas al segundo día de sembradas y crecidas durante 7 días en medios con MS 0.2X y suplementados con 50, 100 y 200 mM (A) y, de *eIF4*, *AtLEA6-1* y *T-ADN AtLEA6-1* en raíces de plántulas trasplantadas al segundo día de sembradas y crecidas durante 6 días en medios con MS 0.2X y suplementados con NaCl 75 mM.

A

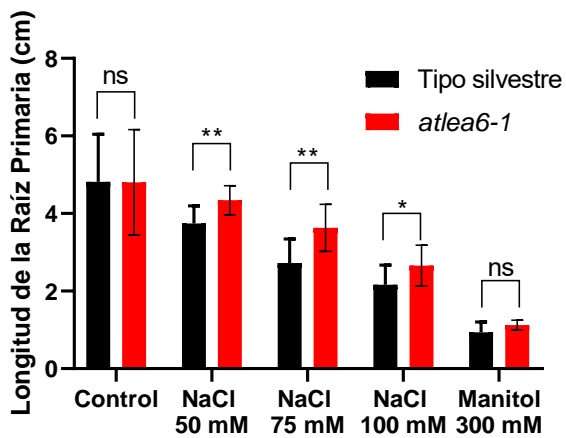


B

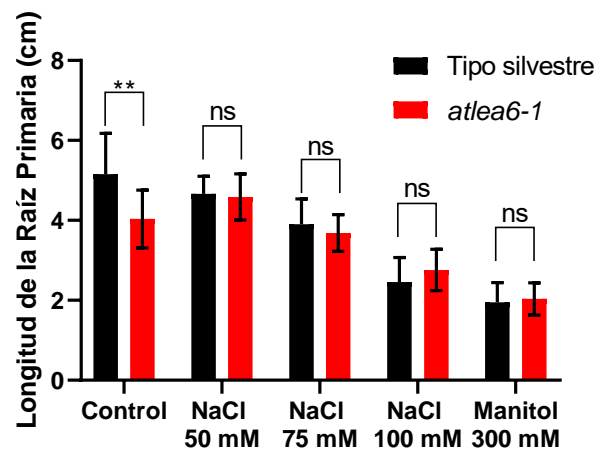


Anexo 2. Longitud de la raíz primaria de plántulas de 12 días después de germinadas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1*. A) semillas sembradas en medio MS 1X y las plántulas correspondientes se transfirieron al sexto día después de siembra (dds) a medios control (MS 1X) o a medios adicionados con NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM. B) semillas sembradas sobre celofán dulce en medio MS 1X y las plántulas se trasplantaron en el segundo dds a medios control (MS1X) y, suplementados con NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM. C) semillas sembradas en medio MS 0.2X y al sexto día se trasplantaron las plántulas a medios control (MS 0.2X) y, suplementados con NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM. D) semillas sembradas sobre celofán dulce en medio MS 0.2X, cuyas plántulas se trasplantaron en el segundo dds a condiciones control (MS0.2X), NaCl 50 mM, 75 mM o 100 mM, o manitol 300 mM. A-D) Tipo silvestre $n=10$; *atlea6-1* $n=10$. Promedio \pm Desviación estándar (DE). ns= no significativo * $P<0.05$, ** $P<0.0021$, *** $P<0.0002$, **** $P<0.0001$.

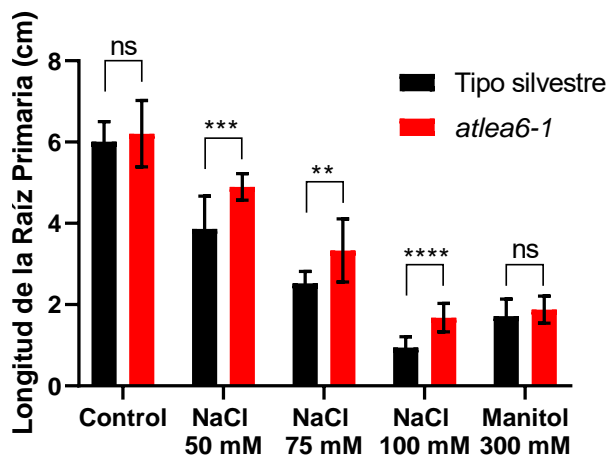
A



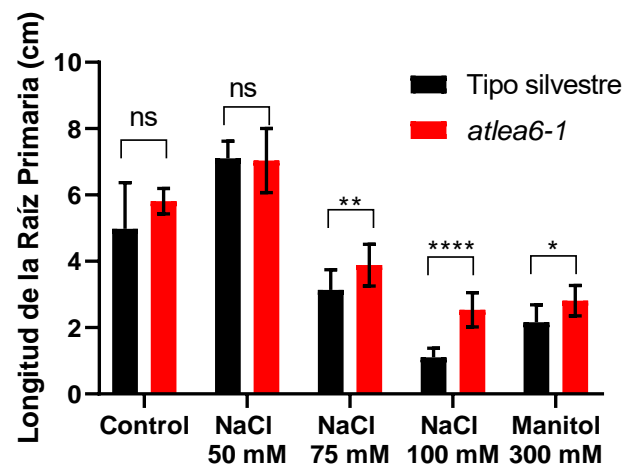
B



C

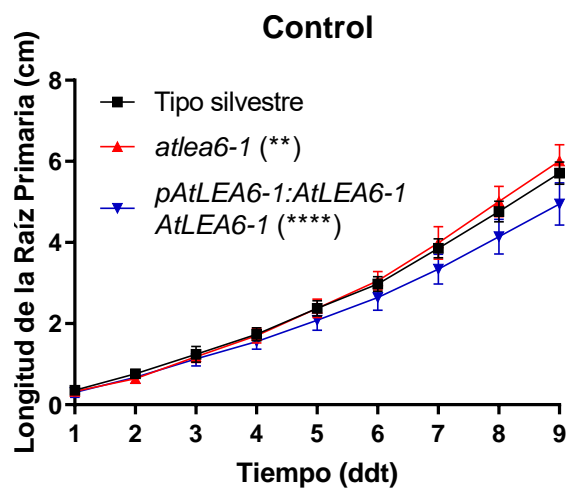


D

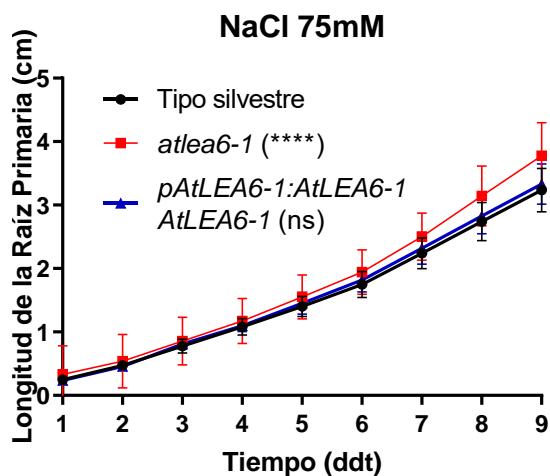


Anexo 3. Cinéticas de crecimiento de la raíz primaria de plántulas de 9 ddt de la línea de tipo silvestre, *atlea6-1* y *pAtLEA6-1:AtLEA6-1* *AtLEA6-1* en condiciones control (A) y de estrés salino (NaCl 75 mM). La diferencia estadísticamente significativa con respecto a la línea tipo silvestre se encuentra en la leyenda del gráfico en paréntesis. A) línea de tipo silvestre $n=30$; *atlea6-1* $n=28$; *pAtLEA6-1:AtLEA6-1* *AtLEA6-1* $n=29$ B) línea de tipo silvestre $n=27$; *atlea6-1* $n=30$; *pAtLEA6-1:AtLEA6-1* *AtLEA6-1* $n=27$. A y B) Promedio \pm DE, ns= no significativa, ** $P < 0.0021$, **** $P < 0.0001$. Resultados representativos de tres replicas biológicas.

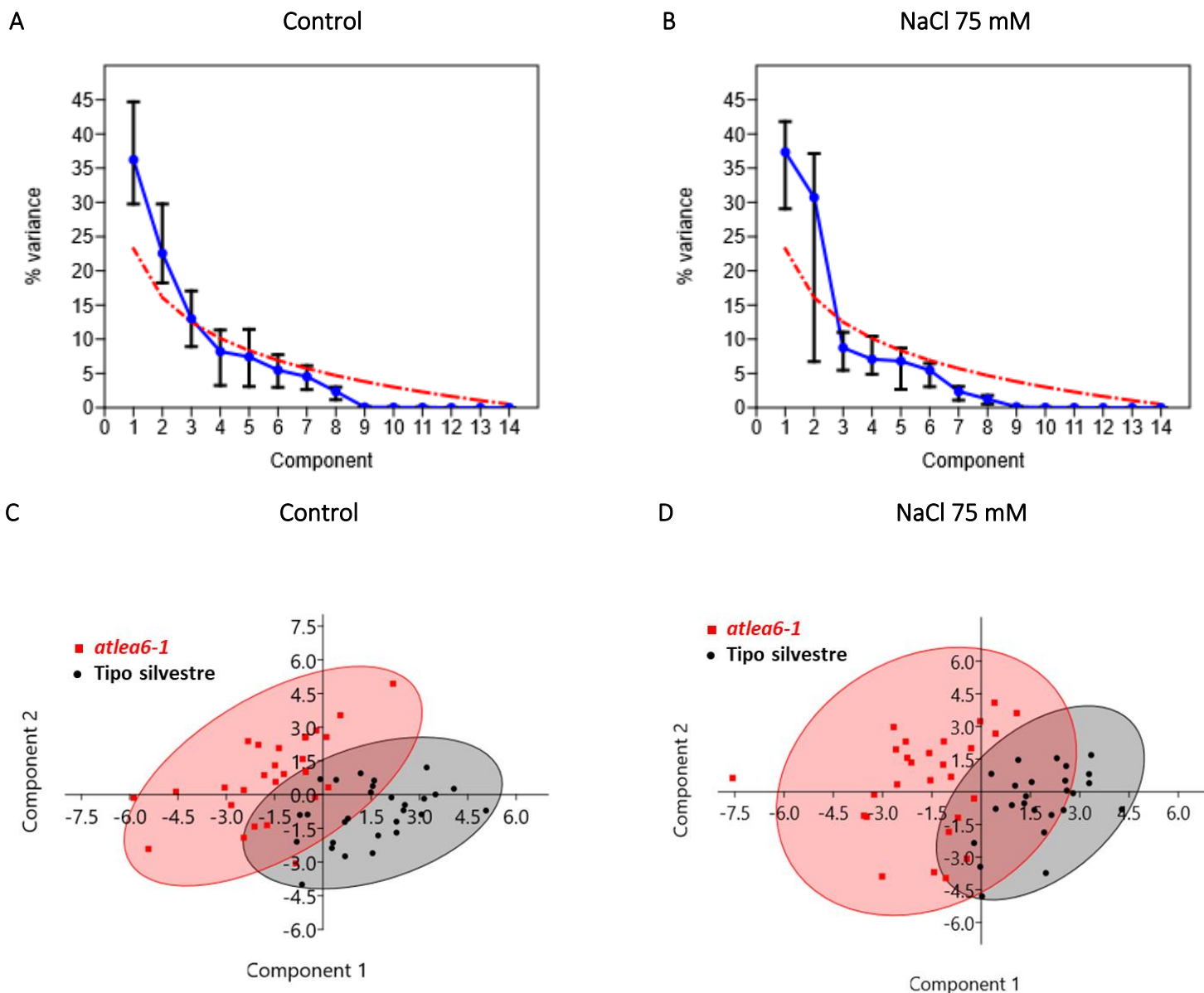
A



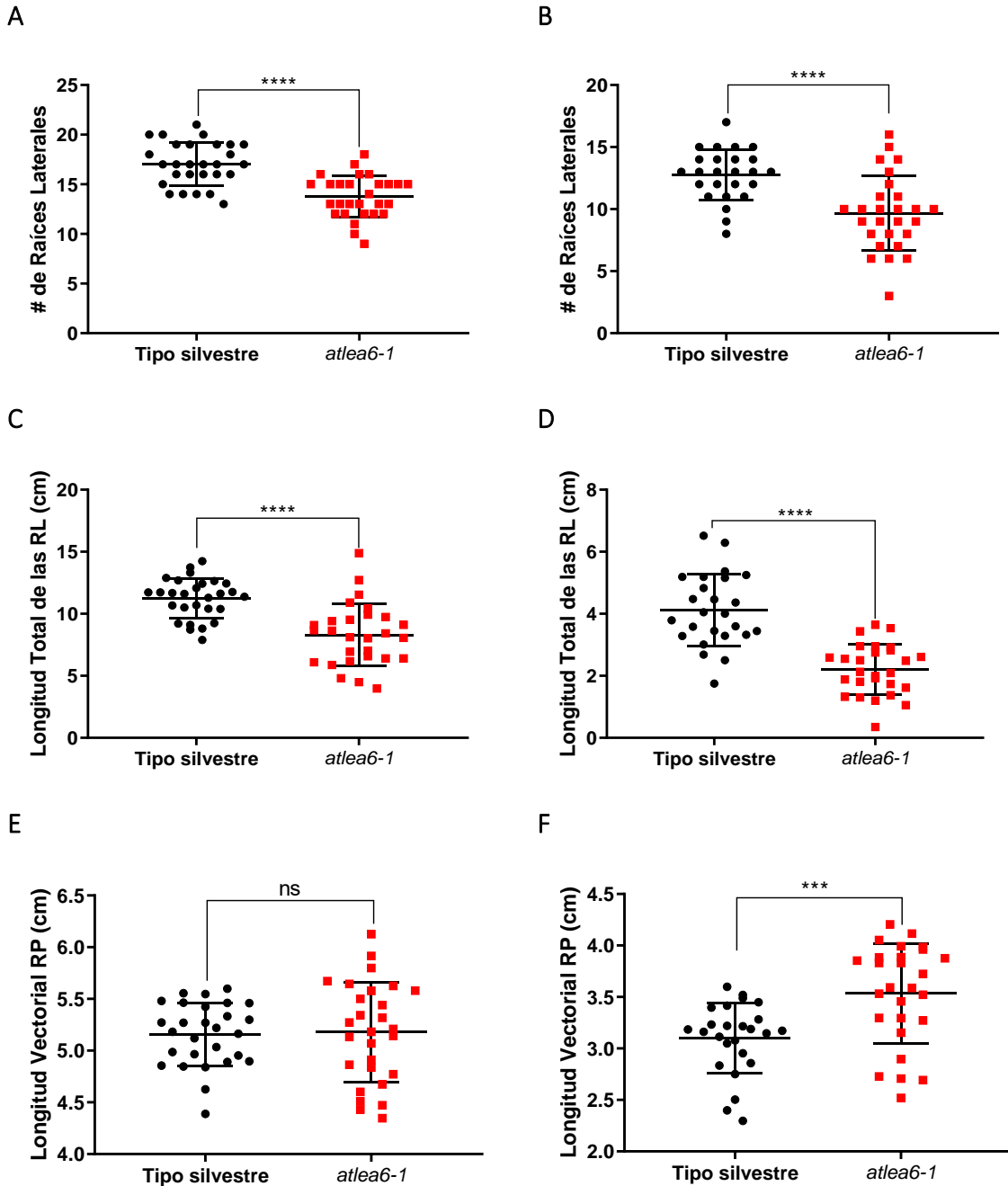
B



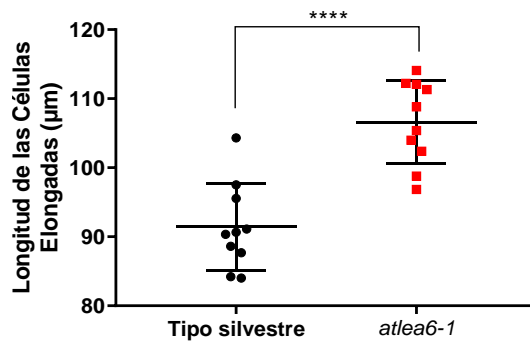
Anexo 4. Contribución de cada uno de los componentes en el análisis de componentes principales para explicar la variabilidad de los datos en condiciones control (A) y de estrés salino (NaCl 75mM; B). Visualización del análisis de componentes principales en dos dimensiones en medios control (C) y medios suplementados con NaCl 75mM (D). A y C) línea de tipo silvestre $n=28$; línea *atlea6-1* $n=28$. B y D) línea de tipo silvestre $n=25$; línea *atlea6-1* $n=27$. A y B) Promedio \pm DE. Resultados representativos de dos replicas.



Anexo 5. Número de raíces laterales en plántulas de 11 dds y 9 ddt de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en condiciones control (A) y de estrés salino (NaCl 75mM; B). Longitud total de las raíces laterales de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* en medios control (C) y medios suplementados con NaCl 75mM (D). Longitud vectorial de la raíz primaria de plántulas de la línea de tipo silvestre y *atlea6-1* crecidas en condiciones control (E) y de estrés salino (NaCl 75 mM; F). A, C y E) línea de tipo silvestre $n=28$; línea *atlea6-1* $n=28$. B, D y F) línea de tipo silvestre $n=25$; línea *atlea6-1* $n=27$. Promedio \pm DE, ns= no significativo, *** $P<0.0002$, **** $P<0.0001$. Resultados representativos de dos replicas.



Anexo 6. Longitud de las células completamente elongadas determinada en los experimentos de desarrollo de las raíces laterales en plántulas de 8ddt a medios suplementados con NaCl 75 mM. Línea de tipo silvestre $n=10$; línea *atlea6-1* $n=10$. Promedio \pm DE, **** $P<0.0001$. Resultados representativos de dos experimentos.

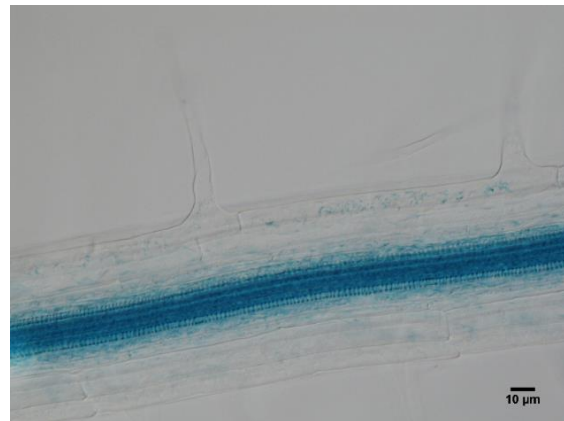


Anexo 7. Actividad del promotor de la línea reportera *pAtLEA6-1:GUS;AtLEA6-1(2)* en el RAM de una raíz lateral (A), el córtex y epidermis (B), PRL en estadio dos (C) y PRL en estadio seis (D) de plántulas de 9ddg crecidas en medios control.

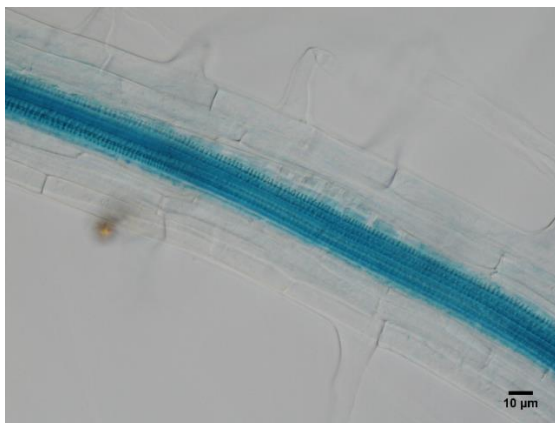
A



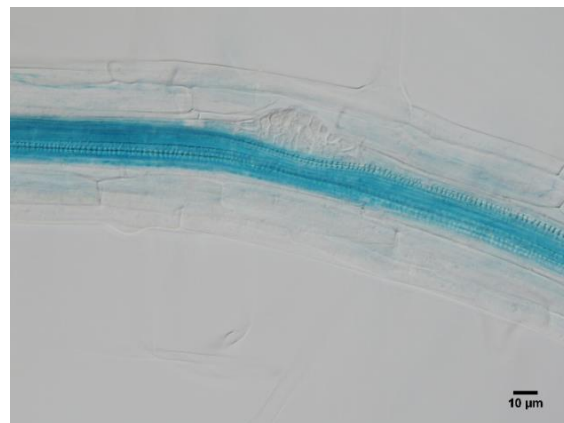
B



C

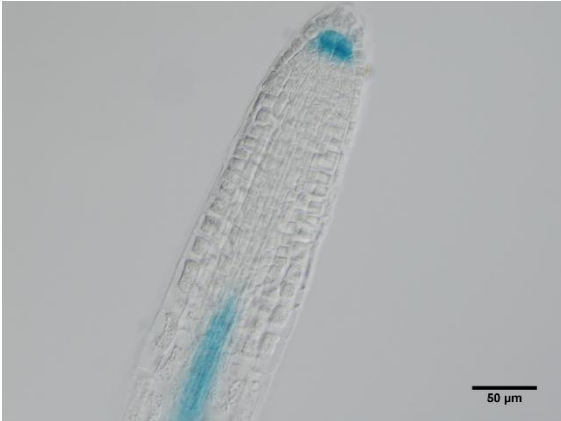


D

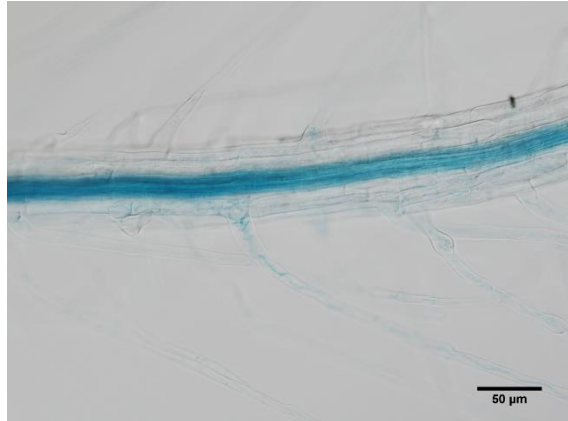


Anexo 8. Actividad del promotor de la línea reportera *pAtLEA6-1:GUS;AtLEA6-1(2)* en el RAM de una raíz lateral (A), el córtex y epidermis (B), PRL en estadio dos (C) y raíz lateral recién emergida (D) de plantas de 9ddg crecidas en medios suplementados con NaCl 75mM.

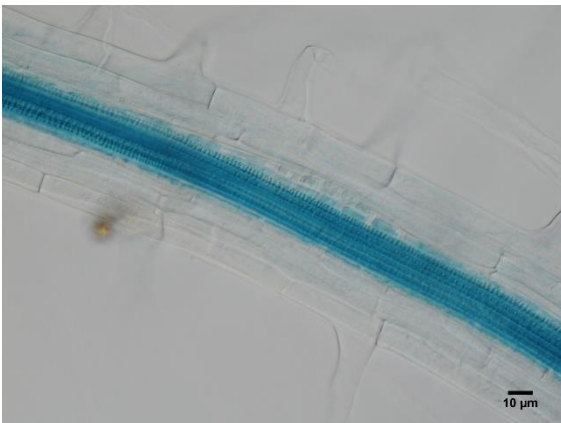
A



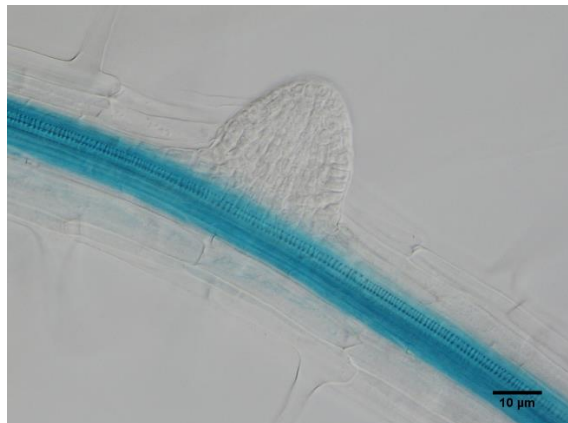
B



C

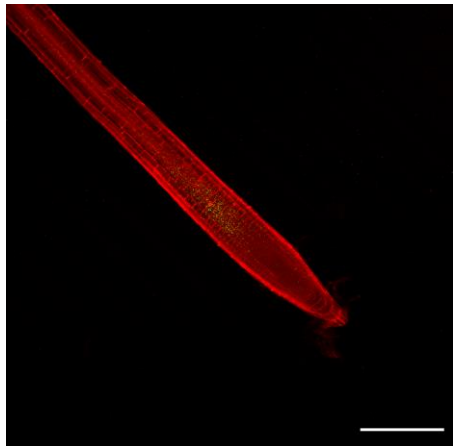


D

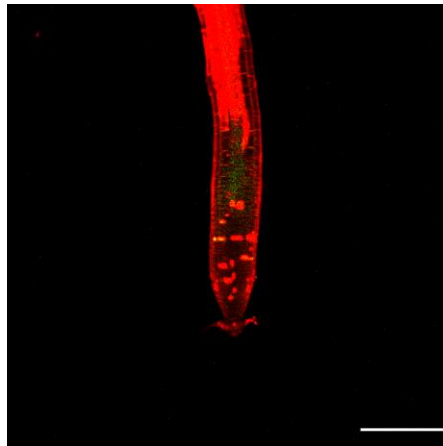


Anexo 9. Actividad del promotor en raíces de plántulas de 9 ddg de la línea transgénica *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (2)* crecidas en medios control (A y B) y suplementados con NaCl 75mM (B, D y E), en el RAM (A y B), el córtex (C y D), pelos radicales y PRL (E). Tinción realizada con yoduro de Propidio. La barra blanca corresponde a 40 μ m.

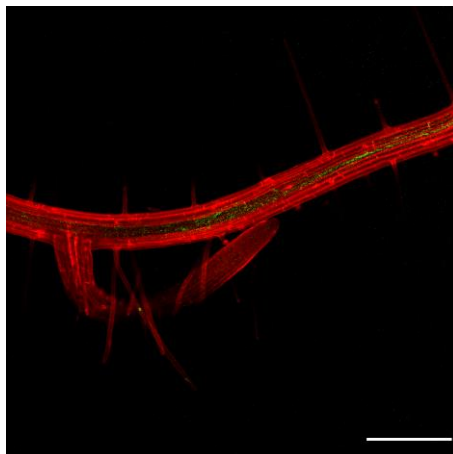
A



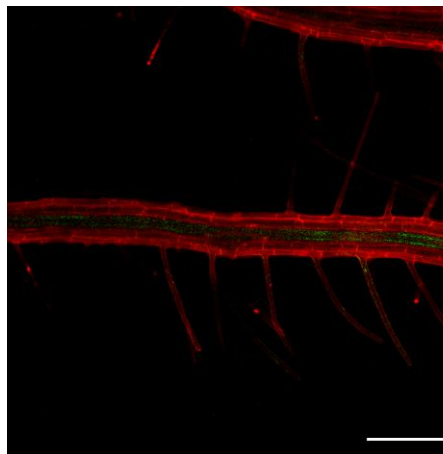
B



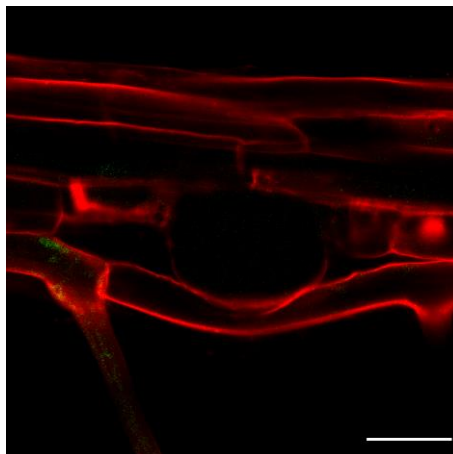
C



D



E

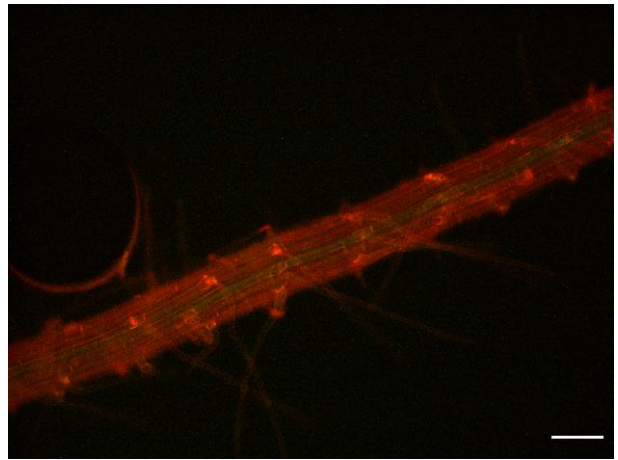


Anexo 10. Actividad del promotor en raíces de plántulas DE 9 ddg crecidas en medios control de la línea transgénica *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (1)* (A y B), *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (3)* (C y D), *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (4)* (E y F) *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (7)* (G y H) en el RAM (A, C, E y G) y córtex (B, D, F y H) I (A y B). Tinción con yoduro de Propidio. La barra blanca corresponde a 75 μ m.

A



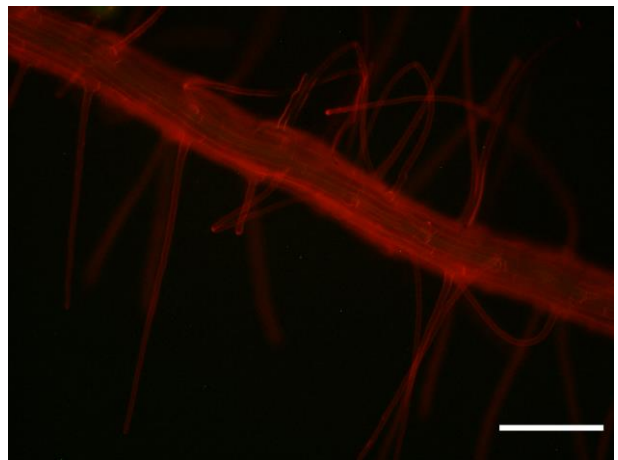
B



C



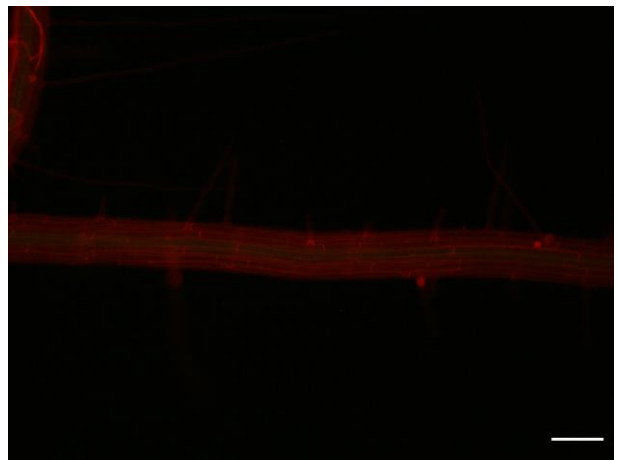
D

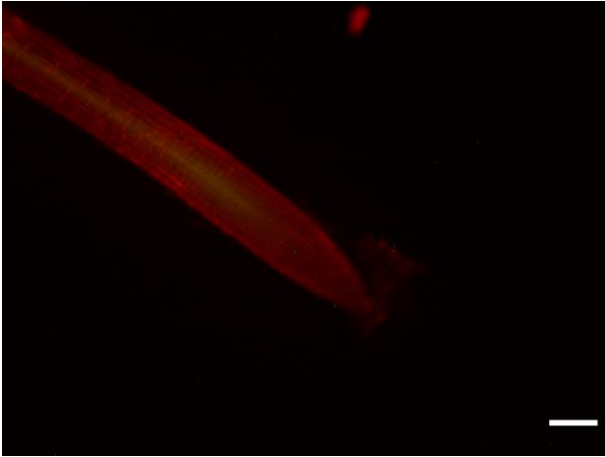
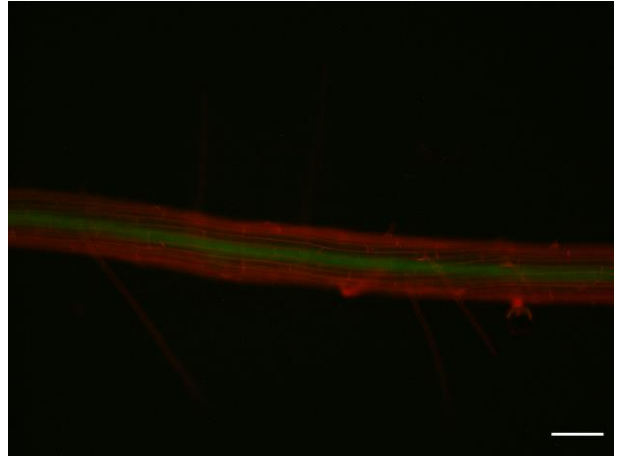


E

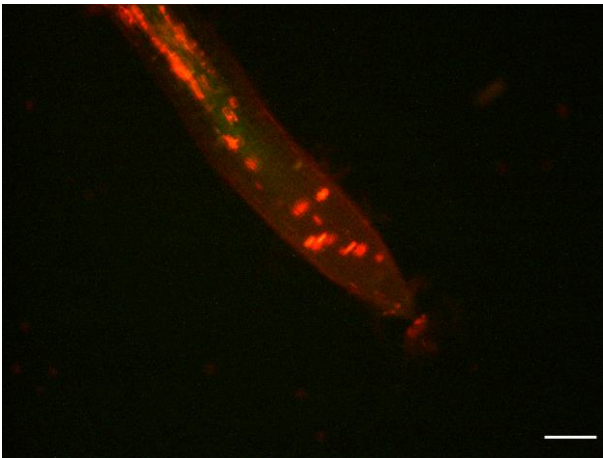
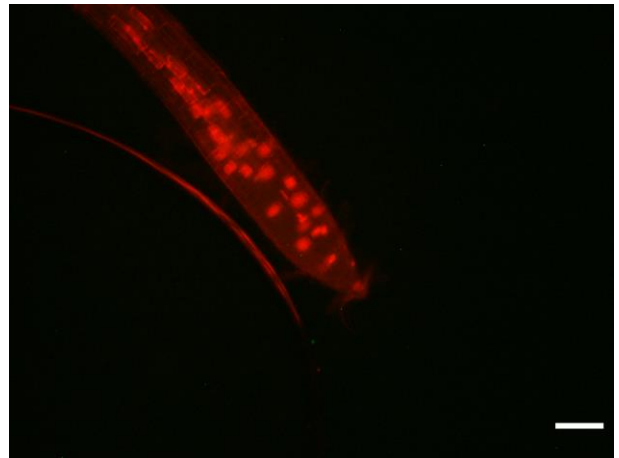


F

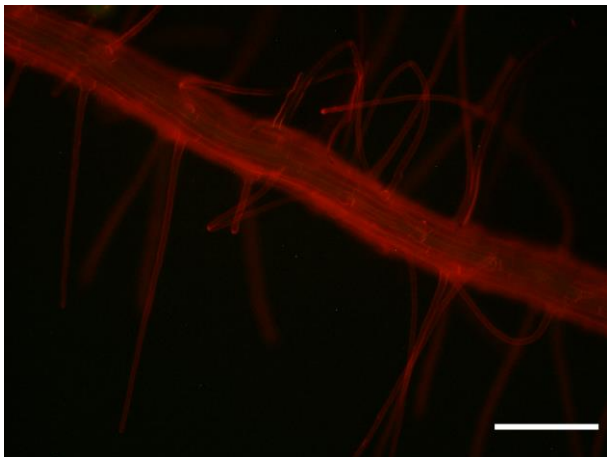


G**H**

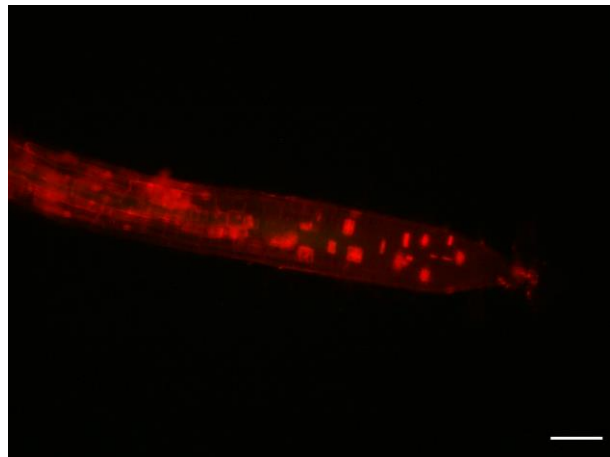
Anexo 11. Actividad del promotor en raíces de plántulas de 9 ddg crecidas en medios suplementados con NaCl 75mM de la línea transgénica *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (1)* (A), *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (3)* (B y C), *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (4)* (D y E) *pAtLEA6-1:GFP;AtLEA6-1 (7)* (F y G) en el RAM (A, B, D y F) y córtex (C, E, y G). Tinción con yoduro de Propidio. La barra blanca equivale a 75 μ m.

A**B**

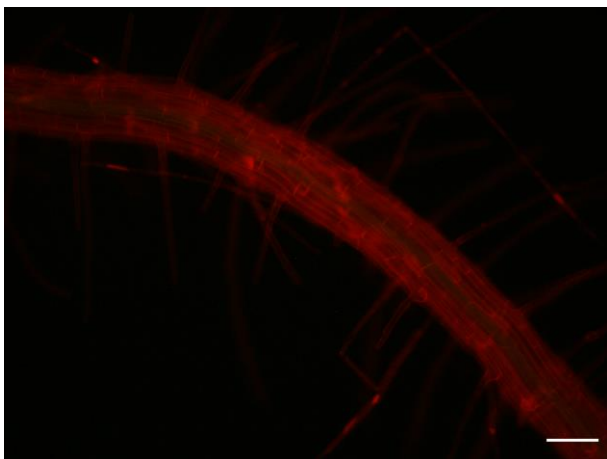
C



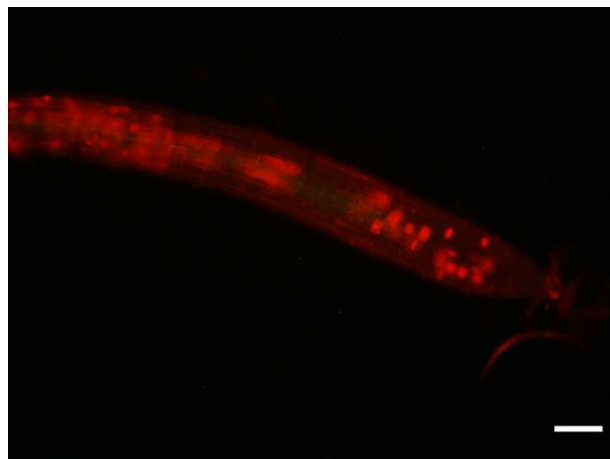
D



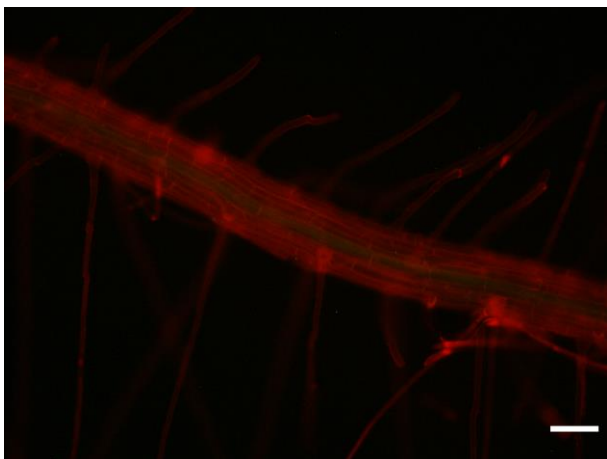
E



F



G



Anexo 12. Genes coexpresados con *AtLEA6-1* en los transcriptomas de la raíz de *Arabidopsis thaliana* publicados hasta la fecha.

Locus	Término del Gene Ontology	Categoría
AT1G31670	Actividad de amina oxidasa primaria	Función molecular
	Región extracelular	Componente celular
	Procesos metabólicos de las aminas	Proceso biológico
	Unión a iones de cobre	Función molecular
AT5G10660	núcleo	Componente celular
	Función molecular desconocida	Función molecular
	núcleo	Componente celular
	Proceso biológico desconocido	Proceso biológico
AT5G27340	Mitocondria	Componente celular
	Función molecular desconocida	Función molecular
	Proceso biológico desconocido	Proceso biológico
AT5G58790	Proceso biológico desconocido	Proceso biológico
	Función molecular desconocida	Función molecular
	Cloroplasto	Componente celular
AT1G36600		
AT2G27390	Proceso biológico desconocido	Proceso biológico
	Componente celular desconocido	Componente celular
AT1G71420	Modificación del ARN	Proceso biológico
	Organelo intracelular ligado a la membrana	Componente celular
	Mitocondria	Componente celular
	Unión de iones de Zinc	Función molecular
AT1G51810	Unión a proteínas	Función molecular
	Componente integral de la membrana	Componente celular
	Proteína con actividad serina/treonina quinasa	Función molecular
	Unión de ATP	Función molecular
	Fosforilación proteica	Proceso biológico
	núcleo	Componente celular
	Fosforilación	Proceso biológico
AT3G62550	Vacuola	Componente celular
	núcleo	Componente celular
	Actividad hidrolasa	Función molecular
AT3G50980 (<i>XERO1</i>)	Aclimatación al frío	Proceso biológico
	Respuesta a ABA	Proceso biológico
	Función molecular desconocida	Función molecular
	Citoplasma	Componente celular
	Respuesta a déficit hídrico	Proceso biológico
	Citosol	Componente celular
AT1G30950 (<i>UFO</i>)	Unión a proteínas	Función molecular
	Organización estructural del meristemo	Proceso biológico

	Complejo ubiquitina ligasa	Componente celular
	Regulación de la transcripción, templado de ADN	Proceso biológico
	Desarrollo de la flor	Proceso biológico
	Unión a factores transcripcionales	Función molecular
	Ubiquitinación de proteínas	Proceso biológico
AT1G15150	Membrana plasmática	Componente celular
	membrana	Componente celular
	Actividad de transportador transmembrana	Función molecular
	Transporte transmembrana	Proceso biológico
AT5G66055 (AKRP)	Unión a proteínas	Función molecular
	Desarrollo del embrión en la etapa tardía de la dormancia	Proceso biológico
	Cloroplasto	Componente celular
	núcleo	Componente celular
AT5G38450 (CYP735A1)	Proceso biosintético de la trans-zeatina	Proceso biológico
	Actividad de mono-oxigenasa	Función molecular
	Proceso de oxido-reducción	Proceso biológico
	Componente integral de la membrana	Componente celular
	vesícula de secreción	Componente celular
AT4G04450 (AtWRKY42)	Unión a proteínas	Función molecular
	Unión a región regulatoria de ADN	Función molecular
	Actividad de factor de transcripción de unión al ADN	Función molecular
	núcleo	Componente celular
	Regulación negativa de la transcripción	Proceso biológico
AT5G51210 (OLEO3)	Función molecular desconocida	Función molecular
	Almacenamiento de lípidos	Proceso biológico
	Región extracelular	Componente celular
	Reproducción sexual	Proceso biológico
	Citoplasma	Componente celular
AT3G14900	Desarrollo del embrión	Proceso biológico
	Cloroplasto	Componente celular
	Función molecular desconocida	Función molecular
	Cloroplasto	Componente celular
AT2G02140 (LCR72)	Región extracelular	Componente celular
	Matanza de células de otros organismos	Proceso biológico
	Respuesta de defensa contra hongos	Proceso biológico
	Región extracelular	Componente celular
AT5G12000	Actividad proteína quinasa	Función molecular
	Unión de ATP	Función molecular
	Actividad hidrolasa	Función molecular
	Fosforilación proteica	Proceso biológico
	núcleo	Componente celular
AT1G63880	Cloroplasto	Componente celular

	Transducción de señales	Proceso biológico
	Respuesta de defensa contra hongos	Proceso biológico
	Unión de ATP	Función molecular
	Unión a ADP	Función molecular
AT1G13710 (CYP78A5)	membrana	Componente celular
	Regulación del crecimiento del meristemo	Proceso biológico
	Regulación de la tasa de crecimiento	Proceso biológico
	Proceso de oxido-reducción	Proceso biológico
	retículo endoplasmático	Componente celular
	Formación de la hoja	Proceso biológico
	Cloroplasto	Componente celular
	Desarrollo del órgano floral	Proceso biológico
	Regulación positiva del crecimiento de los órganos	Proceso biológico
AT5G18540	Proceso biológico desconocido	Proceso biológico
	núcleo	Componente celular
	núcleo	Componente celular
	Actividad de ligasa	Función molecular
	núcleo	Componente celular
AT3G43770		