



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización funcional de los péptidos EPF1 y EPF2 de *Phaseolus vulgaris* en el desarrollo de estomas y en su respuesta ante el déficit hídrico

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól Rosa Brianda de la Sancha Pérez

Tutora: Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Instituto de Biotecnología
Co-tutor: Dr. Caspar C. C. Chater
Jardines Botánicos Reales, Kew

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Galdys I. Cassab López
Instituto de Biotecnología
Dra. Patricia Coello Coutiño
Facultad de Química

Ciudad de México. Marzo, 2021



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.

Resumen

La mejora de las respuestas a la sequía de los cultivos se puede lograr mejorando la eficiencia de agua (EUA) de las plantas. En México, las pérdidas de rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocadas por la sequía son una gran amenaza para los agricultores rurales y la seguridad alimentaria del país. Los estomas son poros dinámicos en la superficie de las hojas que regulan el intercambio de gases y la pérdida de agua. Cuando se reduce el número y la densidad de los estomas puede resultar en una mayor eficiencia del uso del agua (EUA) de las plantas, y en sus respuestas al déficit de agua. Ejemplos de ello se ha reportado en maíz, arroz, cebada y tomate. En este proyecto se investigaron algunos aspectos de la regulación del desarrollo de los estomas en plantas de frijol, con el fin de en un futuro utilizar este conocimiento como una herramienta para aumentar la EUA y la tolerancia a la sequía. Los factores de patrón epidérmico (EPFs) 1 y 2 son péptidos móviles implicados en la regulación del desarrollo estomático al transducir la señal que inicia el programa de la diferenciación de ciertos tejidos y la identidad celular. En la epidermis en desarrollo de las hojas, los EPFs modulan dónde y cuándo se forman los estomas con la finalidad de optimizar el intercambio gaseoso. EPF1 y EPF2 son reguladores negativos, ya que se ha demostrado que inhiben el desarrollo de estomas en plantas de *Arabidopsis*, especie considerada como un modelo experimental. Esta propiedad también se ha observado para los péptidos EPF de otras especies de plantas terrestres, desde musgos hasta cereales. Tomando esto en consideración, se caracterizó la función de los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 mediante su sobre-expresión en plantas silvestres de *Arabidopsis*, con el objetivo, a largo plazo, de modular las densidades estomáticas en cultivos de frijol y/o de otras leguminosas. A través de un análisis fenotípico y transcripcional, se analizó el efecto de estos péptidos en el patrón de desarrollo estomático. La sobre-expresión de PvEPF1 dio como resultado la disminución en el índice y la densidad de los estomas al comparar estas plantas transgénicas con la línea silvestre, indicando que PvEPF1 es ortólogo a AtEPF1, al actuar como regulador negativo del desarrollo estomático. Al sobre-expresar a PvEPF2, se observó una tendencia a disminuir tanto la densidad como el índice de estomas con respecto a la línea silvestre, sugiriendo que este péptido está involucrado en el desarrollo estomático como regulador negativo, como ocurre en *Arabidopsis*. Los resultados obtenidos han permitido avanzar en el mejor y mayor conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo estomático, al contribuir con información sobre la función de los EPFs de frijol. Estudios subsecuentes permitirán ampliar esta información, así como la correspondiente a otras posibles funciones de estos péptidos en otros procesos de desarrollo. Así mismo, nos da certeza en cuanto a la implementación de su uso en la generación de plantas de frijol o de otras leguminosas con una mayor eficiencia en el uso del agua, contribuyendo así con nuevas herramientas para el mejoramiento de la agricultura mexicana.

Abstract

The improvement of crop drought responses can be achieved by improving plant water use efficiency (WUE). In Mexico, drought-induced yield losses in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) are a major threat to rural farmers and the country's food security. Stomata are dynamic pores on the surface of leaves that regulate gas exchange and water loss. Reducing the number and density of stomata can result in increased WUE, and plant water deficit resilience. This has been shown in cereals such as corn, rice, and barley, as well as tomato. In this project aspects of common bean stomatal development were investigated, in order to use this knowledge as a tool to increase bean WUE and drought tolerance. Epidermal Patterning Factors (EPFs) 1 and 2 are mobile peptides involved in the regulation of stomatal development by transducing signals that negatively regulate programs of tissue differentiation and cell identity. In the developing epidermis of leaves, EPFs modulate where and when stomata form to optimize gas exchange. EPF1 and EPF2 are negative regulators, since they have been shown to inhibit stomatal development in the experimental model plant *Arabidopsis*. This has been observed for EPF1/2 peptides across land plants, from mosses to cereals. Taking this into consideration, the function of the PvEPF1 and PvEPF2 peptides was characterized by over-expression in *Arabidopsis*, with the long-term objective of modulating the stomatal densities in bean crops and / or other legumes. Through a phenotypic and transcriptional analysis, the effect of these peptides on stomatal development patterns was analyzed. The over-expression of *PvEPF1* resulted in a decrease in stomatal index and density in transgenic plants compared to the wildtype, indicating that PvEPF1 is orthologous to AtEPF1, acting as a negative regulator of stomatal development. With *PvEPF2* over-expression, we observed a tendency to decrease both stomatal index and density in the transgenic lines, suggesting that this peptide is also involved in stomatal development as a negative regulator. The results obtained have advanced the knowledge of stomatal development mechanisms in common bean by contributing new information on the function of common bean EPFs. Subsequent studies will allow the expansion of this information, as well as the exploration of other possible functions of these peptides across development processes. Crucially, it provides certainty regarding the implementation of EPF orthologs in the generation of beans or other legume crops with greater water use efficiency, thus contributing new tools for the improvement of sustainable Mexican agriculture.

Reconocimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU: 886378) para realizar mis estudios de Maestría en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Alejandra Covarrubias y el Dr. Caspar Chater.

Al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para la participación en el congreso Plant Morphology, 2019 el cual se llevó a cabo en Heidelberg, Alemania.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSDNA) por su apoyo en la síntesis de los oligonucleótidos utilizados para la realización del proyecto.

A la técnico M. en C. María Beatriz Pérez Morales por el apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto. Betty, gracias por acompañarme durante la pandemia.

A los miembros del comité tutorial por ser fundamentales en el desarrollo del proyecto. Dra. Gladys Casaab y Dra. Patricia Coello, gracias por todos los consejos y el apoyo brindado durante estos años.

Dra. Alejandra Covarrubias y Dr. Caspar Chater, por permitirme ser parte del proyecto, así como por brindarme todas las facilidades posibles para el desarrollo de este.

Agradecimientos

A Mily, Santos y Ximena, por haber estado siempre. Por acompañarme en cada una de las diferentes etapas que viví durante este proyecto. Gracias por ser mi familia.

A mis amigos, gracias por escucharme, aconsejarme, hacernos reír cuando ya no veíamos la luz con las clases, con los experimentos o con la vida. Esta maestría no hubiera sido la misma sin ustedes.

Salta, gracias por el impulso para iniciar esta aventura, por acompañarme.

Ale y Caspar, infinitas gracias por el apoyo y la confianza, no lo hubiera logrado sin su guía. Gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de este grupo de trabajo y dejarme descubrir lo bonitos que son los estomas.

Índice

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
Estrés en plantas ocasionado por el cambio climático	1
Respuesta de las plantas para contender con el estrés hídrico	2
Función de los estomas durante la sequía	3
Desarrollo estomático, déficit hídrico y eficiencia de uso del agua	4
Densidad, índice y tamaño de los estomas en respuesta a la sequía.....	5
Linaje estomático.....	7
Los factores de patrón epidérmico (EPF) 1 y 2.....	10
<i>Phaseolus vulgaris</i>, especie vegetal de interés agronómico	13
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL	16
Objetivos particulares	16
DISEÑO EXPERIMENTAL	17
Determinar la similitud entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de <i>P. vulgaris</i> con respecto a los péptidos AtEPF1 y AtEPF2 de Arabidopsis	17
Determinar el papel de los péptidos EPF1 y EPF2 de <i>P. vulgaris</i> en el control de la densidad e índice de estomas en Arabidopsis	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Determinación de la similitud entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de <i>P. vulgaris</i> con respecto a los péptidos AtEPF1 y AtEPF2 de Arabidopsis.....	19
Construcción de vectores.....	19
Material biológico.....	20
Condiciones de crecimiento	20
Transformación de Arabidopsis por inmersión floral	21
Genotipificación de las plantas transformadas.....	22
Análisis de acumulación relativa de los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 en las plantas transformantes	22
Fenotipificación de las plantas transformantes.....	23

RESULTADOS	25
Similitud entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de P. vulgaris y AtEPF1 y AtEPF2 de Arabidopsis	25
Análisis de las líneas sobre-expresoras de PvEPF1 en las líneas Col0 (WT) de Arabidopsis	29
Análisis de las líneas sobre-expresoras de PvEPF2 de Arabidopsis	38
DISCUSIÓN	45
Conservación de los péptidos EPF1 y EPF2 en especies leguminosas	45
Conservación de la respuesta de la sobre expresión del péptido PvEPF1 en diferentes especies vegetales	46
Sobre expresión del péptido PvEPF2 en la línea silvestre de Arabidopsis	48
CONCLUSIONES	51
LITERATURA CONSULTADA.....	52
ANEXO	65
Anexo 1. Tablas	65
Tabla 1: Lista de oligonucleótidos utilizados durante la construcción de vectores.....	65
Tabla 2: Alineamiento de los EPFs putativos (Secuencia del péptido completo)	67
Tabla 3: Lista comparativa de aminoácidos entre los péptidos AtEPF1-PvEPF1	68
Tabla 4: Lista comparativa de aminoácidos entre los péptidos AtEPF2-PvEPF2.....	68
Anexo 2: Figuras suplementarias	69
Figura suplementaria 1: <i>pMDC32::35S pro::PvEPF1</i>	69
Figura suplementaria 1: Representación del vector pMDC32 utilizado para insertar a PvEPF1	69
Figura suplementaria 2: <i>pMDC32::35Spro::PvEPF2</i>	70
Figura suplementaria 2: Representación del vector pMDC32 utilizado para insertar a PvEPF2	70
Figura suplementaria 3: Análisis fenotípico considerando los datos de la línea AtEPF1OE	71
Figura suplementaria 4: Análisis fenotípico considerando los datos de la línea AtEPF2OE.....	72

Índice de figuras

<i>Figura 1: Imágenes representativas de la morfología de los estomas</i>	8
<i>Figura 2: Descripción del desarrollo estomático en el contexto de la hoja en desarrollo.</i>	9
<i>Figura 3: Modelo de estructura terciaria de los péptidos EPF/EPFL</i>	12
<i>Figura 4: Desarrollo estomático en Arabidopsis.</i>	13
<i>Figura 5: Construcciones para la sobre-expresión de los genes PvEPF</i>	20
<i>Figura 6: Preparación de muestras para fenotipificación</i>	24
<i>Figura 7: Alineamiento de los EPFs putativos (Péptidos maduros).</i>	25
<i>Figura 8: Agrupamiento de EPFs putativos.</i>	26
<i>Figura 9 Alineamiento de los péptidos EPF putativos de frijol</i>	27
<i>Figura 10: Predicción de la estructura terciaria de los péptidos</i>	28
<i>Figura 11: Análisis de acumulación relativa de los transcritos EIF4 y PvEPF1 mediante RT-PCR</i>	31
<i>Figura 12: Análisis comparativo del índice estomático (IE) de las líneas sobre-expresoras de PvEPF1 vs. Col 0 y la línea AtEPF1 OE.</i>	33
<i>Figura 13: Comparación de los promedios de la densidad estomática (DE) de las líneas Col0, AtEPF1 OE, IAM2, IAT6, I²¹ y I²³.</i>	33
<i>Figura 14: Análisis del Índice de Meristemoides (IM) en las líneas sobre-expresoras de PvEPF1</i>	35
<i>Figura 15: Análisis de tamaño de estomas</i>	36
<i>Figura 16: Imágenes de la epidermis de la hoja de Arabidopsis.</i>	37
<i>Figura 17: Acumulación relativa de los transcritos EIF4 y PvEPF2 mediante RT-PCR.</i>	39
<i>Figura 18: Determinación del índice de estomas (IE) en las líneas sobre-expresoras de PvEPF2</i>	41
<i>Figura 19: Determinación de la densidad de estomas (DE) en las líneas sobre-expresoras de PvEPF2</i>	42
<i>Figura 20: Comparación de los promedios del tamaño de los estomas (μm^2) de las líneas Col0, AtEPF2 OE, 2BC, 2BD, 2BK, 2BI y 2BM</i>	43
<i>Figura 21: Imágenes representativas de la epidermis de hojas de plantas sobre-expresoras de PvEPF2.</i>	44

Índice de tablas

<i>Tabla 1: Presencia de transcrito EIF4 (A) y PvEPF1 (B) obtenidos mediante RT-PCR.....</i>	31
<i>Tabla 2: Prueba t-student pareada de las líneas sobre-expresoras de PvEPF1 y Col0.....</i>	35
<i>Tabla 3: Detección de los transcritos EIF4 (A) y PvEPF2 (B) a través de la RT-PCR.</i>	40
<i>Tabla 4: Prueba t-student pareada de las líneas sobre-expresoras de PvEPF2 y Col 0.....</i>	43

Caracterización funcional de los péptidos EPF1 y EPF2 de *Phaseolus vulgaris* en el desarrollo de estomas y en su respuesta ante el déficit hídrico

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Estrés en plantas ocasionado por el cambio climático

Se considera que el calentamiento global y el estrés por altas temperaturas en conjunto con las alteraciones en los patrones de precipitación, inducidos por el aumento en las concentraciones de CO₂, han ocasionado que los eventos de sequía se generalicen y se agraven (Kolodyazhnaya *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2014; Serna y Fenoll *et al.*, 2014), amenazando la producción agrícola y la seguridad alimenticia mundial (Porter *et al.*, 2014; Wheeler y von Braun, 2013; Lobell *et al.*, 2014).

Esta situación climática amenaza aún más a las regiones en donde la agricultura depende de la lluvia y no de sistemas de irrigación, sometiendo a los cultivos a eventos de sequía terminal la cual afecta severamente el rendimiento en la obtención de granos como el frijol, el maíz o la soya, entre muchos otros, por lo que la capacidad para contender ante esta problemática tiene una enorme importancia en la economía.

Los cambios en el clima ya han reducido la producción agrícola mundial entre 1 y 5% por década durante los últimos 30 años y continuarán siendo un desafío para la agricultura en los próximos tiempos (Challinor *et al.*, 2014; Porter *et al.*, 2014). En los últimos 50 años, la producción agrícola mundial ha aumentado en paralelo a los aumentos de población sin que haya ocurrido un incremento significativo en la superficie cultivada. Ante esta situación, el agua empleada para mantener dicha producción abarca entre el 50-80% del agua utilizable. La disponibilidad de agua depende fuertemente de las condiciones climáticas, que se reflejan en la evaporación potencial o demanda atmosférica de agua, parámetro que integra los efectos de los niveles de cantidad de radiación, humedad, temperatura ambiental y velocidad del viento (Medrano *et al.*, 2009).

La resistencia a la sequía, en su contexto fisiológico, se define de acuerdo con Levitt (1972), como la "evasión de la deshidratación" y / o la "tolerancia a la deshidratación". Resulta difícil generalizar en un patrón común la respuesta de las plantas al déficit hídrico, debido a la

variedad en la duración e intensidad de este proceso, a las características morfológicas y fisiológicas intrínsecas de cada una de las especies vegetales, así como el momento en el ciclo de vida de la planta en el cual se presente el estrés (Medrano *et al.*, 2009).

Una planta resistente a la sequía posee mecanismos que le permiten usar el agua del suelo de manera eficiente. Ejemplos de éstos son el establecimiento de un área foliar reducida, la restricción de la apertura estomática, una absorción eficiente de agua por la raíz; así como otros procesos que le permiten conservar el agua en sus tejidos y prevenir los daños que estas condiciones de estrés pueden causar a los constituyentes celulares esenciales para su funcionamiento (Lazaridou *et al.*, 2003; Abbate *et al.*, 2004; Lazaridou y Koutroubas, 2004).

Las plantas están continuamente expuestas a estímulos ambientales que influyen en su desarrollo y crecimiento, y que al mismo tiempo determinan su productividad. En los umbrales específicos de cada especie, tales estímulos se convierten en "factores estresantes" (Levitt, 1972). Específicamente, cualquier condición desfavorable que afecte o bloquee el metabolismo, crecimiento o desarrollo de una planta puede considerarse como estrés (Levitt 1972; Lichtenthaler 1996; Bray *et al.*, 2000). Las tensiones ambientales desencadenan una gran variedad de respuestas en las plantas, que van desde la alteración de su expresión genética y el metabolismo celular hasta cambios en sus programas de desarrollo y en la tasa de crecimiento y productividad (Shao *et al.*, 2008).

Respuesta de las plantas para contender con el estrés hídrico

Para el caso particular de déficit hídrico, éste se considera como un factor de tipo intrínseco a la mayoría de las formas abióticas de estrés, no sólo durante la sequía, sino también durante condiciones de baja temperatura y cuando el suelo contiene una alta concentración de iones (Moreno, 2009). El estrés por déficit hídrico se puede definir como una situación en la que el potencial hídrico de la planta y la turgencia se reducen lo suficiente como para afectar las funciones normales (Chaves *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Hsiao *et al.*, 2006; Jaleel *et al.*, 2006). La percepción de un déficit hídrico en la planta se inicia a medida que la demanda de agua supera a su suministro (Blum, 2011).

Entre los procesos más comunes en diferentes especies vegetales ante el déficit hídrico se encuentra el ajuste osmótico, proceso por el cual se acumulan solutos para mantener la

turgencia en tejidos Los solutos acumulados incluyen cationes inorgánicos, ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos libres. En algunas plantas, el potasio es el catión inorgánico primario que se acumula durante el estrés hídrico y, a menudo, es el soluto más abundante en las hojas (Jones *et al.*, 1980; Ford y Wilson, 1981). Con la limitación continua del agua, el ajuste osmótico retrasa, pero no puede prevenir por completo, la deshidratación (Kramer y Boyer, 1995). Otro mecanismo de respuesta es la reducción del área foliar; de acuerdo con Lonbani y Arzani (2011), el tamaño foliar puede reducirse en condiciones de sequía para lograr un equilibrio entre el estado del agua de los tejidos vegetales y el agua absorbida por las raíces de las plantas (Passioura, 1996). Así mismo, Blum (2005) sugiere que una reducción en el área foliar es beneficiosa bajo estrés por sequía para evitar la deshidratación. Adicionalmente, bajo este ambiente adverso aumenta la abundancia de diferentes proteínas con funciones protectoras como lo son las chaperonas moleculares y las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) (Olvera-Carrilo *et al.*, 2011; Battaglia y Covarrubias, 2013), y otras que contrarrestan el efecto de la acumulación de especies reactivas de oxígeno, como lo son las enzimas y compuestos antioxidantes.

La desecación es una pérdida de agua mucho más severa en la que la escasez de agua en los tejidos es prácticamente total, por lo que puede conducir potencialmente a la interrupción del metabolismo, a daños en la estructura celular y, finalmente, al cese de las reacciones enzimáticas (Smirnoff, 1993; Taiz y Zeiger, 2006; Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008). Una de las respuestas más rápidas que presentan las plantas ante este tipo de estrés es el cierre de los estomas, debido a que los sistemas de transporte de iones y agua a través de las membranas pueden modular los cambios de presión de turgencia en las células guarda estimulando su cierre (Osakabe *et al.*, 2014; Dodd y Ryan, 2016) y limitando el intercambio de gases (Bhagsari *et al.*, 1976; Berry *et al.*, 1988; Bhatt, 1990; Bohnert y Jensen, 1996, Nath *et al.*, 2005). Esta respuesta va acompañada de otros procesos que contribuyen a que la planta tolere este ambiente adverso.

Función de los estomas durante la sequía

Los estomas son poros que constituyen la ruta principal para el intercambio gaseoso a través de la cutícula impermeable que tienen las hojas y los tallos. Como válvulas para el intercambio de gases en las plantas superiores, los estomas vinculan íntimamente tres

características funcionales clave: la absorción de carbono (en forma de CO₂), el control de la pérdida de agua y de la temperatura de las hojas (Franks y Farquhar, 1999; Raven, 2002). Los estomas se abren y cierran para facilitar la entrada de CO₂ al interior de los tejidos y la salida de O₂ hacia el exterior, mientras se controla la pérdida de agua por transpiración; por tanto, estas estructuras ejercen controles importantes sobre los ciclos del agua y el carbono en el planeta (Berry *et al.*, 2010; Simmons y Bergman; 2016; Qu *et al.*, 2017). Es por esto que un mayor y mejor conocimiento de las funciones y de los mecanismos de control de los estomas es fundamental no sólo para conocer más sobre las respuestas de las plantas a los ambientes adversos, sino también para encontrar herramientas que ofrezcan soluciones para reducir el impacto negativo de la escasez en la disponibilidad de agua sobre la productividad de los cultivos (Blatt, 2016).

Los cambios que ocurren a corto plazo en la tasa de intercambio de gases (denominada conductancia estomática) proporcionan un primer nivel por el que la planta controla las demandas entre la absorción de carbono y la pérdida de agua ante las fluctuaciones diarias en la disponibilidad de agua y de luz. Para esto, las dos células guarda que forman los estomas modulan la conductancia modificando su turgencia en respuesta a señales ambientales e internas (Chater *et al.*, 2011; Kinoshita *et al.*, 2011). Los estomas se encargan de optimizar la fijación de carbono por unidad de agua perdida, evitando la deshidratación letal y manteniendo la hidratación de los tejidos vegetativos cuando el suministro de agua del suelo es limitado y/o la demanda de evaporación atmosférica es alta (Raven, 2002).

La reacción inicial de la planta para contender con el déficit hídrico inducido es modificar la conductancia estomática y por ende la tasa de transpiración (Seemann y Critchley, 1985; Chaves *et al.*, 2010; Aphalo y Jarvis, 1991; McAdam *et al.*, 2016) a través de cambios en la turgencia de las células de guarda estomáticas (Comstock, 2002). Se ha reportado que durante el déficit hídrico el ácido abscísico (ABA), un regulador del crecimiento de las plantas, se sintetiza en las hojas de las plantas (McAdam *et al.*, 2016), induciendo el cierre de los estomas; lo cual minimiza la pérdida de agua por transpiración (Schroeder *et al.*, 2001; Dodd, 2003, 2005).

Desarrollo estomático, déficit hídrico y eficiencia de uso del agua

Cuando las plantas se encuentran en condiciones de déficit hídrico activan mecanismos de respuesta que les permitan contender ante dicha adversidad. Entre las respuestas principales se encuentra el incremento en la eficiencia de uso de agua (EUA), función en la que los estomas tienen un papel fundamental. La EUA hace referencia a la proporción de CO₂ asimilado durante la fotosíntesis con respecto a la cantidad de vapor de agua que la planta pierde hacia la atmósfera.

El aumento en la EUA puede mejorar la productividad de la planta y reducir el estrés bajo condiciones ambientales en las que el agua está menos disponible (Slatyer, 1964; Sinclair *et al.*, 1984; Blum, 2009; Sinclair, 2012; Hoekstra *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2013). Aumentar la EUA incrementaría el crecimiento de la planta; cuando el agua es limitada, la productividad de las plantas que utilizan de manera más eficiente un suministro de agua finita, se ve afectada positivamente (Dwivedi, 1996). En el corto plazo, las plantas pueden aumentar el EUA reduciendo la apertura estomática y, por lo tanto, la transpiración. Sin embargo, a menudo, bajo un déficit prolongado de agua, las plantas llegan a generar hojas que presentan una menor conductancia estomática [$g_{w(max)}$], debido a que se reduce la densidad estomática, o a que las hojas son más pequeñas (Gindell, 1969; Franks *et al.*, 2009; Doheny-Adams *et al.*, 2012). Cuando las condiciones promueven una reducción a largo plazo en la conductancia estomática promedio, la producción de hojas nuevas con un valor de $g_{w(max)}$ reducido contribuyen a mantener condiciones mecánicas y energéticas más favorables para el control estomático (Beerling *et al.*, 1993; Woodward *et al.*, 1995; Blum, 2011; Franks *et al.*, 2009; 2012).

Densidad, índice y tamaño de los estomas en respuesta a la sequía

Como se mencionó anteriormente, durante el estrés hídrico, la densidad y el índice de los estomas juegan un papel importante en el incremento de la EUA. La densidad estomática (DE, en inglés *SD: Stomatal density*) está en función del número de estomas y del tamaño de las células epidérmicas, también conocidas como células de pavimento, y se expresa como $DE = \# \text{ estomas} / \text{mm}^2$. Por lo tanto, la densidad estomática se afecta tanto por el desarrollo de los estomas como por la expansión de las células epidérmicas, la cual depende de muchas variables (por ejemplo de la luz, la temperatura, el estado del agua, la posición de la hoja y la posición de la célula dentro de la hoja) (Royer, 2001). Por otra parte, el índice de

estomas (IE, en inglés *SI: Stomatal index*) permite determinar si en la planta realmente disminuyen el número de estomas, ya que toma en cuenta el número total de células en un área determinada y se calcula como $SI = \frac{\# \text{ estomas}}{(\# \text{ estomas} + \# \text{ células de pavimento})} \times 100$ (Serna y Fenoll, 2000).

Es amplio el conocimiento acerca de la compleja ruta de señalización que controla la diferenciación de las células protodérmicas para convertirse en estomas, a expensas de las células epidérmicas clásicas en la planta modelo *Arabidopsis* (Bergmann y Sack, 2007; Pillitteri y Torii, 2012). Los mutantes en esta vía muestran no sólo patrones de estomas modificados, sino también una alteración en la eficiencia de uso del agua (EUA), que se cuantifica como la capacidad de una planta para fijar carbono mientras minimiza la pérdida de agua o la supervivencia después de la exposición al estrés por sequía (Franks *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2010).

Las funciones de los estomas están ampliamente influidas por características ambientales. Diversos autores han demostrado que el incremento en la concentración de CO₂ atmosférico resulta en una disminución en la densidad de estomas (Woodward, 1987; Lin *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2009). Bajo condiciones de déficit hídrico a corto plazo, las plantas incrementan su EUA mediante la reducción de la apertura estomática que como consecuencia disminuye la transpiración; sin embargo, bajo condiciones de déficit hídrico por un largo plazo, frecuentemente, las plantas generan hojas con una conductancia estomática [$g_{w(max)}$] reducida, resultado de una alteración en la densidad de estomas o en la disminución de su tamaño (Beerling *et al.*, 1993; Woodward *et al.*, 1995; Blum, 2011)

La variación natural de los patrones estomáticos (*i.e.* cierre de estomas o disminución en SD), se ha evaluado en varias especies, mostrando que a menudo se asocian con una mayor eficiencia en el uso del agua y la variación ambiental. En un experimento de jardín convencional, generalmente utilizado para evaluar la señal de adaptación local en rasgos de interés (*i.e.* modulación de la densidad de estomas) (Kawakami *et al.*, 2011), con 19 poblaciones de *Protea repens* (arbustos pertenecientes a la familia Proteaceae), se observó que la densidad de los estomas aumentó con la temperatura media anual y que disminuyó con la lluvia de verano en su ubicación de origen (Carlson *et al.*, 2016). De un complejo de especies de *Mimulus guttatus* (plantas perennes de la familia Phrymaceae), cultivadas en un

jardín común, las poblaciones de las especies que se encontraban en regiones más secas mostraron una menor densidad estomática que a su vez se asoció con un aumento en EUA, en contraste con las poblaciones recolectadas en poblaciones costeras húmedas (Wu *et al.*, 2010). Sin embargo, en *Eucalyptus globulus* (eucalipto blanco), el tamaño y no la densidad de los estomas es lo que se asocia con una mejor EUA. Cuando se cultivaron poblaciones de *E. globulus* en dos sitios con precipitación contrastante, las plantas del sitio más seco mostraron estomas más pequeños, independientemente de su densidad y una mayor EUA (Franks *et al.*, 2009).

Dada la relación que existe entre la EUA y la conductancia estomática $g_{w(max)}$, se ha observado que a través de la manipulación genéticas en la DE se obtiene una mejora EUA y, como consecuencia, una disminución en la conductancia estomática $g_{w(max)}$. Este fenómeno se ha observado en especies de *Arabidopsis* (Masle *et al.*, 2005, Yoo *et al.*, 2010, Franks *et al.*, 2015, Hepworth *et al.*, 2015), álamos (Wang *et al.*, 2016), trigo (Li *et al.*, 2017), cebada (Hughes *et al.*, 2017) y tabaco (Yu *et al.*, 2008).

Linaje estomático

Los estomas están conformados por dos células guarda que rodean el poro estomático, en alguna especies las células guarda se encuentran rodeadas de células subsidiarias, las cuales son morfológicamente diferentes a las células adyacentes de la epidermis (Franks y Farquhar, 2007; Raissig *et al.*, 2017). Las células guarda se caracterizan por presentan dos morfologías, de mancuerna o de riñón (Fig. 1); las células guarda en forma de mancuerna se encuentran típicamente en pastos (incluidas la mayoría de las principales especies de cultivos) y monocotiledóneas, así como en helechos y gimnospermas (Hetherington y Woodward, 2003). Las células guarda en forma de riñón aparecieron por primera vez hace aproximadamente 400 millones de años (Edwards y Axe, 1992) y se encuentran en la mayoría de las eudicotas, así como en algunas monocotiledóneas (*i.e.*, Commelina) (Lawson, 2009).

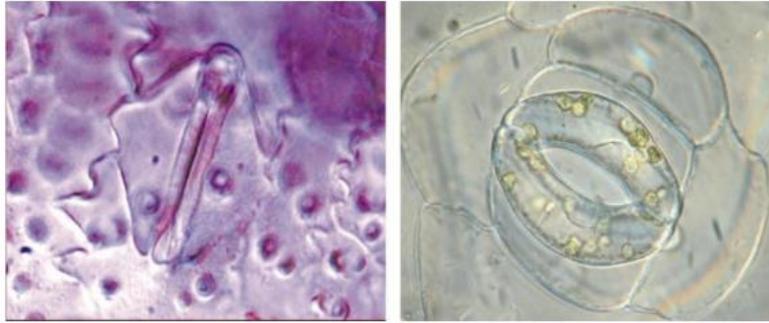


Figura 1: Imágenes representativas de la morfología de los estomas

Estoma con células guarda con forma de mancuerna de una planta de arroz (izquierda). Estoma con células guarda en forma de riñón de una planta de Commelina (derecha). Imágenes tomadas de Hetherington y Woodward, 2003.

En *Arabidopsis*, los tipos celulares pertenecientes al linaje estomático se pueden identificar morfológicamente y mediante la detección de la expresión de marcadores específicos. (Pillitteri *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2011). Estudios de este tipo muestran que, en la epidermis de hojas jóvenes, un subconjunto de células protodermales, conocidas como *células meristemoide madre* (CMM, en inglés *MMC*: “*Meristemoid mother cell*”), se dividen asimétricamente para producir una *célula meristemoide* (CM), generalmente triangular, y una célula hija más grande conocida como *célula basal del linaje estomático* (CBLE, en inglés *SLGC*: “*Stomatal lineage ground cell*”). La CBLE puede diferenciarse directamente en una *célula pavimento* (CP) o dividirse asimétricamente para generar una *célula meristemoide satélite* (CMS). Cada célula meristemoide continúa dividiéndose asimétricamente, antes de que cambie su destino y ocurra una transición morfológica a una *célula madre guarda* (CMG, en inglés *GMC*: “*Guard mother cell*”). Las CMGs constituyen la primera etapa comprometida con el linaje estomático, antes de ello las células meristemoides pueden asumir otros destinos epidérmicos. Las CMGs se dividirán por última vez, simétricamente, para producir las dos *células guarda* (CG, en inglés *GC*: “*Guard cells*”) de un estoma. Las divisiones de las *células meristemoides* (CM) y de las CBLMs se orientan a través de una comunicación célula-célula, lo cual garantiza que dos estomas no queden en contacto directo entre sí (Simmons y Bergman, 2016).

Cada etapa en el linaje estomático requiere un control transcripcional preciso sobre la identidad y el comportamiento de la célula. Cinco factores de transcripción tipo bHLH (“basic Helix Loop Helix”), son los protagonistas de esta regulación (Fig. 2). La iniciación estomática y la posterior auto-renovación del meristemoide requiere del factor

SPEECHLESS (SPCH). El ARN de SPCH se expresa abundantemente en las hojas jóvenes, pero la proteína SPCH está restringida a los meristemoides y permite su división asimétrica continua (Robinson *et al.*, 2009; MacAlister *et al.*, 2007; Horst *et al.*, 2015). Cuando los meristemoides salen de esta etapa ('SPCH'), comienzan a expresar el factor transcripcional MUTE y exhiben cambios sustanciales en la expresión génica global (Pilliteri *et al.*, 2007; Adrian *et al.*, 2015). Cuando se sobre-expresa MUTE las células epidérmicas se convierten en precursores estomáticos (Pilliteri *et al.*, 2007). La expresión de MUTE y FAMA dan lugar a la transición final de CMG a CG a través de una división simétrica (Ohashi-Ito y Bergmann, 2006, Han *et al.*, 2018). FAMA es necesaria para la adquisición de la identidad de GC, pero también para el mantenimiento continuo de esta identidad, esta última función está mediada por FAMA junto con RBR (RETINOBLASTOMA RELACIONADO) (Matos *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). En cada una de estas etapas, SPCH, MUTE y FAMA actúan como heterodímeros obligados, asociándose con uno de los dos grupos más ampliamente expresados, los factores bHLH, -INDUCER OF CBF EXPRESSION (ICE1) / SCREAM (SCRM) o SCRM2. La pérdida de *ICE1* y *SCRM2* elimina el linaje estomático, que se asemeja a la pérdida de *SPCH*, mientras que las mutaciones estabilizadoras (*scrm-D*) convierten a todas las células epidérmicas en CGs de los estomas (Kanaoka *et al.*, 2008).

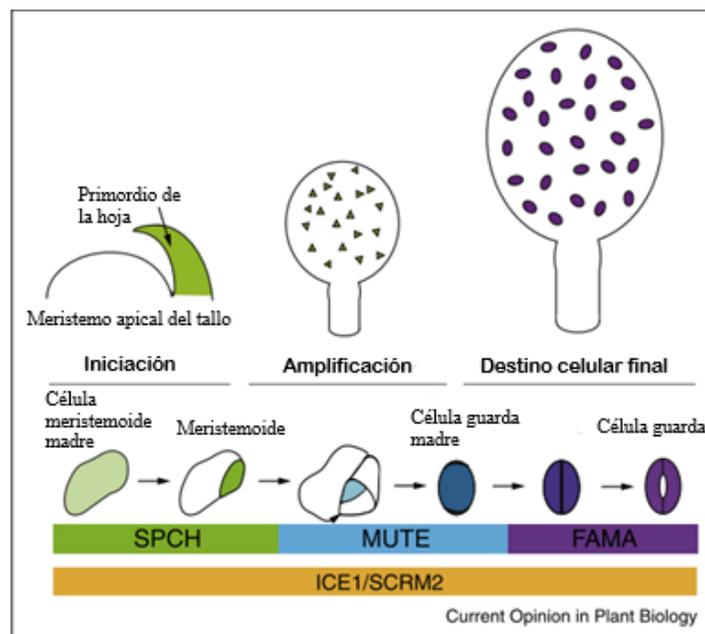


Figura 2: Descripción del desarrollo estomático en el contexto de la hoja en desarrollo.

Los primordios foliares se desarrollan a partir del meristemo apical del brote, en este momento la epidermis ya está especificada. Durante la fase de iniciación, se crean células madre meristemoides

(CMM); en la hoja en desarrollo estas células comenzarán a producir la proteína SPCH y se dividirán asimétricamente para formar meristemoides (verde). La etapa de amplificación está dominada por divisiones celulares de CMMs y meristemoides que generan la epidermis y establecen patrones estomáticos adecuados. En fases posteriores del desarrollo foliar (fase final celular), los meristemoides cambian para dar identidad a las células madre guarda (azul) y posteriormente a las células guarda diferenciadas (violeta), mientras que otras células se expanden para impulsar el aumento en el tamaño de la hoja. Modificado de Simmons y Bergmann, (2016).

La actividad de estos factores transcripcionales (SPCH, MUTE, FAMA, ICE y SCRM), se encuentra bajo control de una vía de transducción de señales de tipo Proteína Activada por Mitógeno de tipo Cinasa (MAPK, por sus siglas en inglés), que incluye MAPPKKK YODA (YDA), MKK4 / 5 y MAPK3 / 6 (Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007); la cual está regulada por factores exógenos (*i.e.* luz y CO₂) y endógenos tales como los péptidos pertenecientes al grupo de Factores de Patrón Epidérmico (EPF: “*EPIDERMAL PATTERNING FACTOR*”, por sus siglas en inglés), EPF1 y EPF2 que actúan como reguladores negativos (Hara *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2009; Hunt y Gray, 2009) y EPFL9/ESTOMÁGENO que ejerce una regulación positiva (Hunt *et al.*, 2010; Sugano *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015). Los EPFs están involucrados en la regulación de densidad de estomas en respuesta a las condiciones ambientales, incluyendo luz y niveles de CO₂ (Doheny-Adams *et al.*, 2012, Engineer *et al.*, 2014, Hronková *et al.*, 2015), lo que sugiere una compleja interacción entre los factores endógenos y exógenos que regulan la diferenciación celular de los estomas (Dunn *et al.*, 2019).

Los factores de patrón epidérmico (EPF) 1 y 2

La investigación sobre las bases moleculares del desarrollo de los estomas en Arabidopsis, especie utilizada como modelo experimental entre las angiospermas, ha proporcionado información significativa sobre los mecanismos que controlan el patrón estomático y su diferenciación (Simmons y Bergmann, 2016). Estos análisis han demostrado que existen señales peptídicas secretadas por ciertas células epidérmicas que ejercen una acción reguladora negativa o positiva para controlar dónde y cuándo se forman los estomas, y para asegurar que los estomas estén separados entre sí, por al menos una célula epidérmica; optimizando así el intercambio de gases foliares; estos péptidos han sido denominados EPF y proteínas similares a EPF (EPFL) (Abrash y Bergmann, 2010; Hara *et al.*, 2007, 2009; Hunt y Gray, 2009, Hunt *et al.*, 2010; Sugano *et al.*, 2010).

Los EPF se agrupan en una familia de péptidos pequeños con secuencias similares entre sí. Estos péptidos se encuentran ampliamente conservados en las plantas terrestres y ausentes en las algas. Árboles filogenéticos muestran que los EPFs se agrupan en cuatro clados: *EPF1-EPF2-EPFL7*, el cual incluye a los reguladores negativos AtEPF1 y AtEPF2, *EPFL9/ESTOMÁGENO*, el cual incluye al regulador positivo AtEPFL9/ESTOMÁGENO, *EPFL1-3* y *EPFL4-6-EPFL8* (Takata *et al.*, 2013). La función reguladora de estos péptidos ha sido descrita con mayor detalle en Arabidopsis.

La estructura de estos péptidos se ha inferido a partir de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), utilizando como referencia a AtEPFL9/ESTOMÁGENO, un regulador positivo del desarrollo estomático. Este péptido está compuesto por dos partes estructurales, un andamio y un bucle. El andamio consta de un par de cadenas β que forman una hoja β antiparalela sostenida por tres enlaces disulfuro con un giro de hélice 3_{10} , la cual es estructuralmente necesaria para la actividad de los péptidos. El bucle que conecta las dos cadenas β contribuye a la especificidad funcional de cada péptido EPF / EPFL durante el desarrollo estomático. En Arabidopsis, tanto para AtEPF1 y AtEPF2, los cuales actúan como reguladores negativos en el desarrollo de los estomas, se forma un enlace disulfuro adicional entre dos residuos de cisteína en la región del bucle (Hara *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2009; Hunt y Gray, 2009) (Fig. 3).

AtEPF2 se acumula en células meristemoides y actúa en células precursoras de las CMGs conocidas como CMs. Por otra parte, AtEPF1 se acumula en las CMGs y en los estomas jóvenes. La ausencia de AtEPF1 da como resultado un incremento en la densidad estomática alterando su distribución en la epidermis de la hoja (Hara *et al.*, 2007). La falta de AtEPF2 produce una mayor densidad de células precursoras y estomáticas; sin embargo, en este caso, la distribución de los estomas es aberrante (Hara *et al.*, 2009, Hunt y Gray, 2009). Por otra parte, la sobre-expresión ectópica de *EPF1* o *EPF2* (*EPF1OE* y *EPF2OE*) ocasiona fenotipos similares que muestran una reducción en el número de estomas (Hara *et al.*, 2009).

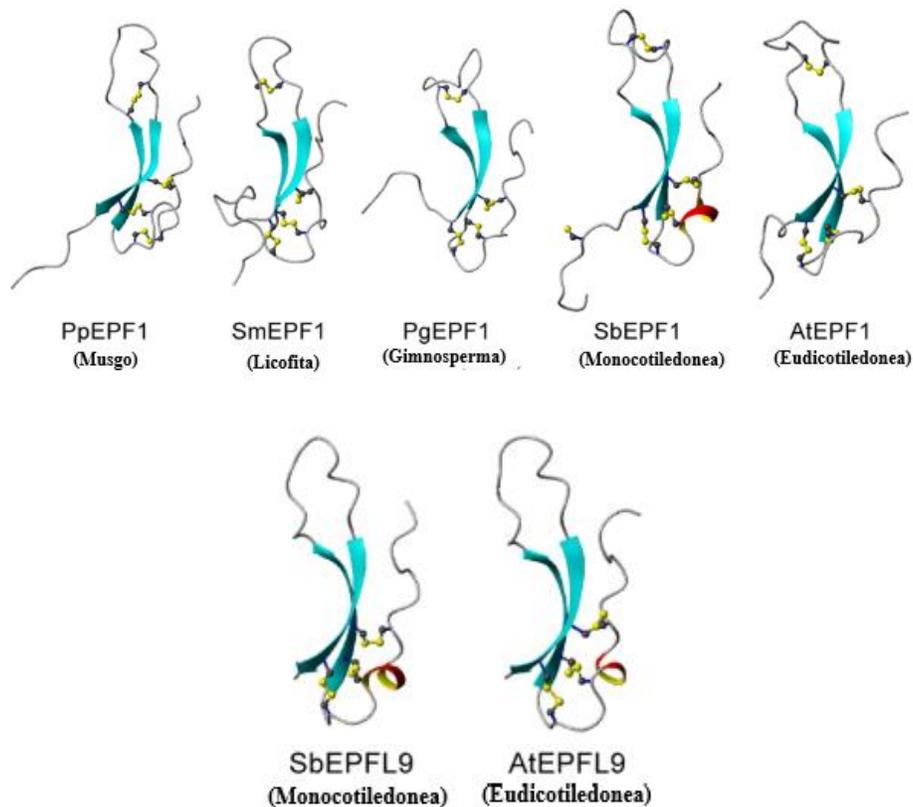


Figura 3: Modelo de estructura terciaria de los péptidos EPF/EPFL

Los modelos estructurales que se muestran se generaron mediante modelos de homología. La estructura de AtEPFL9 / Stomagen determinada por RMN se utilizó como molde para el modelado de homología. Se muestra un modelo de los enlaces disulfuro como una representación de esferas y líneas (enlaces). *Physcomitrella patens* (Pp), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Picea glauca* (Pg), *Sorghum bicolor* (Sb), *Arabidopsis thaliana* (At). Modificado de Takata *et al.* (2013).

La distribución estomática está estrechamente regulada, tanto por mecanismos endógenos que controlan el desarrollo de los estomas y que influyen en su número y patrón en diferentes órganos de la planta, como por la modulación por una serie de factores ambientales exógenos (Chater *et al.*, 2015; Geisler *et al.*, 1998; Hunt y Gray, 2009; MacAlister *et al.*, 2007). Dicha distribución se encuentra regulada por los EPFs, que interactúan con receptores transmembranales, los cuales están codificados por miembros de la familia de genes *ERECTA* (*ERECTA*, *ER*; *ERECTA-LIKE1*, *ERL1* y *ERECTA-LIKE2*, *ERL2*), cuya actividad se modula en células precursoras estomáticas por la proteína similar al receptor TOO MANY MOUTHS (TMM) (Lee *et al.*, 2015, 2012; Shpak *et al.*, 2005; Yang & Sack, 1995; Nadeau y Sack, 2002; Shpak *et al.*, 2005; Bergmann y Sack, 2007; Hara *et al.*, 2007; Hunt & Gray, 2009). La unión de los EPF a sus receptores desencadena una ruta de transducción de señales bien caracterizada que implica una cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos

(MAPKs) que incluye YODA (YDA), MKK4 / 5 y MPK3 / 6, las cuales conducen a eventos celulares de diferenciación estomática (Torii, 2015; Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007) (Fig. 4).

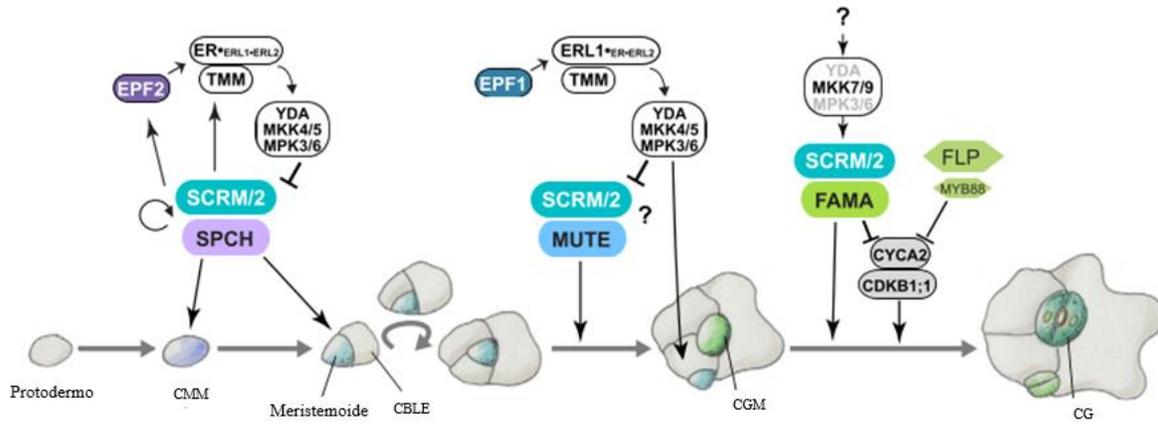


Figura 4: Desarrollo estomático en Arabidopsis.

Se muestran las transiciones celulares y vías reguladoras clave dentro del linaje estomático. En la epidermis en desarrollo de los tejidos fotosintéticos, una célula protodermal indiferenciada adopta una identidad de célula meristemoide madre (CMM, púrpura) y sufre a una división celular asimétrica (DCA), dando lugar a un meristemoide (en azul). Este paso inicial está dirigido por heterodímeros de proteína SPCH-SCRM, que regulan positivamente su propia expresión mientras inducen a EPF2 y TMM, que a su vez actúan como reguladores negativos. La transducción de señales a través de proteínas de la familia ER y MAPKs, a su vez, inhibe SPCH-SCRM, evitando que las células vecinas adopten una identidad estomática. El meristemoide reitera la DCA, renueva y amplifica las células basales del linaje estomático circundante (CBLE, gris). El módulo MUTE-SCRM gestiona una transición de meristemoide a célula madre guarda (CMG, verde claro), que finaliza el estado similar a la célula madre. Los péptidos EPF1, que señalizan a través de ERL1, TMM y la cascada de MAPK, inhiben la diferenciación. El mismo camino impone la orientación de una DCA secundaria de una CLBE, conocida como división de espaciado asimétrica. La transición de CMG a célula guardadora (CG, verde) está especificada por el módulo FAMA-SCRM. La cascada de MAPK también puede inhibir este paso, aunque la señal de flujo ascendente es desconocida. FAMA y dos proteínas MYB parálogas, FOUR LIPS (FLP) y MYB88, restringen la división simétrica de CMGs mediante la represión de reguladores del ciclo celular tales como CDKB1; 1 y CYCA2. Las imágenes están modificadas de Horst *et al.* (2015) y de Han y Torii, (2016).

***Phaseolus vulgaris*, especie vegetal de interés agronómico**

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano más cultivada y consumida como alimento en el mundo, y desempeña un papel especialmente importante en la dieta humana (Gepts, 2001, Broughton *et al.*, 2003; Beebe, 2012, Polania *et al.*, 2016, Khoury *et al.*, 2014). El frijol se cultiva en una amplia gama de sistemas de producción, representados por diferentes climas, suelos, por el uso de cultivares diversos y con diferentes niveles de tecnología (Heinemann, 2017). Dado que la mayoría de las proteínas que consumen las

personas de escasos recursos provienen de fuentes vegetales, los frijoles juegan un papel particularmente importante en la dieta humana al ser altamente proteicos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, 2001). Este alimento básico se considera un alimento casi perfecto, principalmente, por su alto contenido de proteínas y su abundante fibra, carbohidratos complejos y otras necesidades alimenticias diarias (Rosales *et al.*, 2012).

La producción de frijol en el mundo, por lo general, se realiza en condiciones de temporal; de tal forma que cuando la precipitación es insuficiente e impredecible representa el factor principal que limita su producción. El rendimiento promedio global de grano del frijol común es inferior a 900 Kg Ha⁻¹ (Beebe *et al.*, 2010). En alrededor del 60% de las regiones productoras de frijol, incluyendo África y América Latina, la sequía es el principal problema de su cultivo ya que reduce el rendimiento de frijol entre un 50%-70% (Van Schoonhoven y Voyset, 1989; Wortmann *et al.*, 1998; Thung y Rao, 1999; Rao, 2001; Acosta-Díaz *et al.*, 2003; Rao, 2014). El nivel de reducción del rendimiento está determinado por el tipo, la intensidad y la duración del estrés por sequía, siendo la intermitente y la terminal los tipos más severos (Thung y Rao, 1999; Beebe *et al.*, 2010). El rendimiento de los cultivos depende de la eficiencia del uso del agua durante la etapa reproductiva (Merah, 2001; Kato *et al.*, 2008). El rendimiento final de la semilla se ve afectado negativamente por la escasez de agua en las etapas de producción de flores y vainas, y las reducciones en la producción de flores y vainas son factores clave que afectan el rendimiento final de las semillas (Leport *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2010).

Debido a ello se han implementado diferentes técnicas para contrarrestar los efectos de la sequía como son el riego suplementario y algunas prácticas agronómicas. Sin embargo, a la fecha han sido de poca utilidad; ya que, el alto costo de la infraestructura necesaria, la ausencia de agua para riegos y otros rubros asociados, impiden que los agricultores de bajos recursos accedan a estas prácticas. Por tal motivo, el mejoramiento genético tradicional se ha convertido en la mejor opción en términos económicos, ecológicos y de sostenibilidad para incrementar y/o estabilizar la producción de frijol en condiciones de sequía (Rosales-Serna *et al.* 2000, Polania *et al.*, 2016). Dichos programas de mejoramiento seleccionan variedades de frijol en función del rendimiento de producción de grano bajo condiciones de sequía (Rosales *et al.*, 2012).

La introducción de nuevas herramientas para el mejoramiento del cultivo de frijol hacia una mayor resistencia a sequía implica el conocer mejor los mecanismos por los cuales esta especie puede sortear diferentes condiciones de limitación de agua. Para ello, se necesitan aplicar técnicas modernas, no sólo de fisiología y bioquímica, sino también de biología molecular. Aunque a la fecha se tiene disponible la secuencia completa del genoma del frijol común, aún se tienen limitaciones como la falta de un procedimiento reproducible para transformarlo; esto con la idea no necesariamente de obtener frijoles transgénicos, sino de poder estudiar con más detalle los procesos que le permiten a esta especie resistir diferentes tipos de sequía.

En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en estudiar diferentes aspectos relacionados con la respuesta de las plantas a condiciones de limitación de agua, particularmente en frijol y otras leguminosas. En este proyecto queremos conocer más sobre el desarrollo de los estomas en el frijol común. Dada la falta de herramientas genéticas fáciles de implementar en estas leguminosas, un primer enfoque será identificar y aislar las secuencias codificantes de los péptidos EPF1 y EPF2 de frijol, elementos determinantes en el desarrollo de los estomas ya identificados en *Arabidopsis* y en otras especies vegetales, debido a la relevancia que éstos juegan en el control del desarrollo estomático que permite modular la densidad y/o el número de estomas en las hojas, como se describió anteriormente.

Así mismo, estos factores son un foco de atención debido a que al controlar la distribución o la cantidad de los estomas sería posible modular la EUA en la especie o cultivo de interés. Inicialmente la funcionalidad de los EPFs de frijol se explorará en plantas de *Arabidopsis*, donde por experimentos de sobre-expresión, utilizando el promotor 35S, se determinará si los fenotipos observados son similares a los fenotipos ya reportados para *Arabidopsis*. Una vez caracterizados, procederíamos a determinar su aplicación para el mejoramiento de la tolerancia a la sequía, a través de la manipulación genética de estos elementos en leguminosas modelo que lo permitan. Por lo tanto, se plantea la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

- La expresión de los péptidos ortólogos EPF1 y EPF2 de *Phaseolus vulgaris* regulan negativamente los mecanismos de desarrollo estomático en *Arabidopsis thaliana* y su sobre-expresión promueve la disminución de la densidad estomática.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el funcionamiento de los péptidos EPF1 y EPF2 de *Phaseolus vulgaris* en la regulación de la densidad de los estomas.

Objetivos particulares

- Determinar la similitud entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de *P. vulgaris* con respecto a los péptidos *AtEPF1* y *AtEPF2* de *A. thaliana*
- Identificar los genes *PvEPF1* y *PvEPF2* de *P. vulgaris* y aislar la región codificante para los péptidos correspondientes
- Determinar el papel de los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de *P. vulgaris* en el desarrollo de los estomas, a través del análisis de la densidad e índice de estomas en plantas de *A. thaliana*

DISEÑO EXPERIMENTAL

Determinar la similitud entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de *P. vulgaris* con respecto a los péptidos AtEPF1 y AtEPF2 de Arabidopsis

Como primera aproximación, se identificaron las secuencias de los genes de interés (*PvEPF1* y *PvEPF2*) a partir de una base de datos. Posteriormente, se obtuvieron las secuencias correspondientes a los péptidos EPF1 y EPF2 provenientes de la traducción a partir de la secuencia de nucleótidos reportada en las bases de datos, en donde se ha vertido la información sobre la secuencia del genoma de la especie y se realizó un alineamiento con secuencias de proteínas EPFs provenientes de otras especies. Con esta información se determinó el grado de similitud entre los péptidos parálogos y los ortólogos en especies leguminosas; así como, sus relaciones filogenéticas. En este análisis se incluyeron las secuencias de los péptidos de Arabidopsis, por ser los más estudiados a la fecha, y los de *Physcomitrella patens* por considerarse, por ahora, la secuencia de EPFs más basal, desde el punto de vista evolutivo.

Determinar el papel de los péptidos EPF1 y EPF2 de *P. vulgaris* en el control de la densidad e índice de estomas en Arabidopsis

Al no poder llevar a cabo una manipulación genética confiable en plantas de *P. vulgaris* debido a la poca eficiencia en su transformación, se usó a Arabidopsis como modelo de estudio con el fin de caracterizar el funcionamiento de los péptidos EPF1 y EPF2 de *P. vulgaris* a partir de sobre-expresar en dicha especie, para determinar si es posible controlar sus niveles de expresión para modificar el patrón de desarrollo de los estomas, y con ellos avanzar en la idea de mejorar la eficiencia del uso de agua en leguminosas ante condiciones de sequía.

Puesto que el funcionamiento de los péptidos EPF1 y EPF2 en la reducción de la densidad estomática se conoce bien en Arabidopsis, se utilizaron plantas de esta especie como un sistema heterólogo que permita determinar si los péptidos EPF de *P. vulgaris* son ortólogos funcionales a los de Arabidopsis. Esto se desarrolló a través de la sobre-expresión de los péptidos EPF de frijol en Arabidopsis y de la caracterización fenotípica de las plantas

resultantes. Para esto último se analizó las epidermis de hojas de las plantas de Arabidopsis en donde se corroboró la sobre-expresión de estos factores de frijol

Las plantas sobre-expresoras de *PvEPF1* o *PvEPF2* se obtuvieron transformando plantas de Arabidopsis con plásmidos conteniendo los marcos abiertos de lectura (ORFs) para *PvEPF1* o *PvEPF2* de *P. vulgaris*, respectivamente, los cuales se ubicaron bajo el control del promotor 35S. Como primer paso, se generaron las construcciones de cada uno de los plásmidos y dado que contábamos con los ORFs de cada uno de los genes de interés (*PvEPF1* o *PvEPF2*) y con el promotor 35S, éstos se introdujeron en vectores de clonación derivados de *pMDC32*. Una vez verificadas las construcciones se utilizaron para transformar plantas de Arabidopsis. Las plantas transgénicas se seleccionaron en un medio con higromicina. La transgénesis se verificó en las plantas resistentes al agente selectivo, por medio de la acumulación de los transcritos de interés por RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos. Aquéllas que mostraron sobre-expresión del transgen se crecieron para generar semillas, para su caracterización fenotípica. Esta caracterización se realizó en líneas homocigotas para las construcciones correspondientes. En el análisis fenotípico se incluyeron (1) plantas silvestres de Arabidopsis (control), (2) plantas de Arabidopsis sobre-expresando sus propios EPFs (*AtEPF1* y *AtEPF2* respectivamente), y (3) varias líneas independientes de las plantas de Arabidopsis sobre-expresoras de los péptidos EPF de frijol. En las plantas control se esperaba observar un fenotipo silvestre en la densidad, índice estomático y la distribución de los estomas en la epidermis de sus hojas; en tanto que, en las plantas sobre-expresoras se esperaban fenotipos alterados en estos parámetros. En las plantas transformadas con los péptidos de interés se esperaba que, si cumplen la misma función que los péptidos de Arabidopsis, se obtuvieran fenotipos en los que la densidad e índice estomático disminuya con respecto al fenotipo silvestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la caracterización funcional de los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 se utilizaron plantas silvestres de *Arabidopsis*, ecotipo Columbia (Col-0), y se comparó el fenotipo de las líneas que sobre-expresan *PvEPF1* y *PvEPF2* con respecto a las líneas sobre-expresoras *AtEPF1* y *AtEPF2* (*AtEPF1OE* y *AtEPF2OE*, respectivamente) y a la línea silvestre.

Determinación de la similitud entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de *P. vulgaris* con respecto a los péptidos AtEPF1 y AtEPF2 de *Arabidopsis*

Con la finalidad de conocer el grado de similitud que existe entre estos péptidos se descargaron las secuencias de aminoácidos utilizando el programa **JGI Phytozome 12** (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>), las cuales se utilizaron para determinar el agrupamiento de los péptidos de acuerdo a su similitud y el grado de conservación entre estos. Para la construcción del agrupamiento por similitud se utilizó el programa Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Para el alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos se utilizó el programa **T-Coffee** (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html> Notredame *et al.*, 2000). Para ambos análisis se incluyeron las secuencias de los péptidos AtEPFL9/ESTOMÁGENO, de *Arabidopsis*; PpEPF1, de *P. patens*; MtEPF1 y MtEPF2, de la leguminosa *Medicago truncatula*, sistema modelo utilizado entre leguminosas; y GmEPF1, GmEPF1A y GmEPF1B, de la leguminosa *Glycine max*, una leguminosa de importancia agronómica y evolutivamente muy cercana al frijol *P. vulgaris*.

Así mismo, se realizó una predicción de la estructura terciaria de los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 con respecto a AtEPF1, reportado por Takata *et al* (2013) y AtEPF2. Para ello se utilizaron las siguientes herramientas. Para la predicción de la estructura de los péptidos se utilizó Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>, Keely *et al.*, 2015) y para la visualización de dichas predicciones se utilizó el programa PyMOL2 (The **PyMOL** Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.)

Construcción de vectores

Para la sobre-expresión de *PvEPF1* y *PvEPF2*, inicialmente se aislaron los fragmentos de ADN con las secuencias para los ORFs correspondientes (ver abajo), que fueron clonados

bajo la regulación del promotor fuerte 35S (del virus del mosaico de la coliflor), que comúnmente es utilizado para este fin, y el terminador NOS del gen para la nopalino sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*, en el vector pMDC32 (Fig. 5). Las construcciones para la sobre-expresión constitutiva fueron realizadas por la M. en C. Coral Martínez (2017), siendo éstas: pMDC32::35SPro::PvEPF1 (1170pb) y pMDC32::35SPro::PvEPF2 (1171 pb).

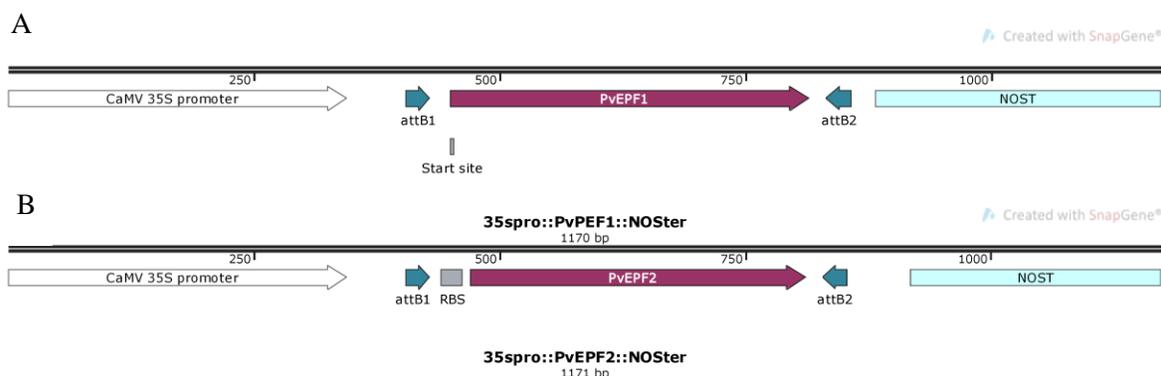


Figura 5: Construcciones para la sobre-expresión de los genes PvEPF
Construcciones utilizadas para transformar las líneas Col0 (WT) de Arabidopsis para la sobre-expresión de PvEPF1. (A) y PvEPF2 (B). Se muestran los sitios clonados por el sistema Gateway, attB1 y attB2; el promotor 35S, CaMV35Spromoter, y el terminador del gen de la nopalino sintasa, NOS.

Material biológico

Para llevar a cabo la transformación de las plantas se utilizaron plantas silvestres de Arabidopsis (WT) ecotipo Columbia (Col0).

Condiciones de crecimiento

Antes de sembrar las semillas de Arabidopsis, estas se desinfectaron con el siguiente protocolo. En primer lugar, las semillas se sumergieron por 2 minutos en etanol, transcurrido el tiempo se retiró el etanol y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 40% y Tritón X-100 al 0.02% durante 15 minutos, agitando constantemente para asegurar una mejor limpieza. Finalmente, se retiró la solución de lavado y se enjuagaron con agua ultra pura estéril cinco veces. Las semillas se estratificaron durante 4 días a 4°C en oscuridad.

Posterior a los cuatro días de estratificación, las semillas se sembraron en macetas con una mezcla de musgo de turbera (Peat-moss) (Sunshine ®, mezcla 3), perlita (Agrolita) y vermiculita (Sunshine) en la siguiente proporción 8L de Peat-moss, 6L de vermiculita y 6L de perlita. Esta mezcla fue complementada con 38 g de fertilizante de liberación controlada

Osmocote plus 15-9-12 (Scotts). Las macetas se colocaron en un cuarto de crecimiento a 22°C con un fotoperiodo de 10/14 hrs (luz/oscuridad).

Transformación de Arabidopsis por inmersión floral

Para llevar a cabo la transformación de las plantas de Arabidopsis se utilizó la técnica de inmersión floral (*floral dip*) siguiendo el protocolo de Zhang *et al.* (2006). Se efectuaron pre-cultivos a partir de colonias de *A. tumefaciens* (Cepa GV2260), portadoras de las construcciones correspondientes, en 5ml de medio LB líquido adicionado con los respectivos antibióticos para su selección y se incubaron por dos días a 28°C. Posteriormente, los pre-cultivos se utilizaron para inocular 500 ml de medio LB líquido, con los antibióticos respectivos, y se incubaron nuevamente a 28°C durante 16 hrs. aproximadamente, hasta que alcanzaron una D.O. de 1-1.2. A continuación, se obtuvo una agrosuspensión de cada uno cultivos; se centrifugaron a 4000 g por 10 min. a 4°C y se resuspendieron en 500 ml de una solución 5% de sacarosa en agua y se le agregó Silwet L-77 (Lehle Seed, #VIS-30) a una concentración de 0.02 % v/v (100 µl por 500 ml de solución).

Para este procedimiento se utilizaron plantas adultas de cinco semanas de edad verificando que presentaran botones florales; la parte aérea se sumergió en la agrosuspensión, preparada como se describe arriba, durante un minuto. Posteriormente, se secó el exceso de suspensión bacteriana en un papel seco y se cubrieron las macetas con plástico adherente. Las plantas se colocaron de forma horizontal sobre una charola y se mantuvieron en obscuridad durante 18 hrs. en el cuarto de crecimiento. Finalmente, se les retiró el plástico adherente y se mantuvieron en riego óptimo durante un mes hasta la colecta de semillas para su selección (T1).

La selección de las plantas heterocigotas (T2) se realizó en cajas de Petri preparadas con 30 ml de medio MS adicionado con 30 µl de Higromicina. Para esta selección se utilizaron 100 semillas de las plantas silvestres Arabidopsis (control) y de las diferentes líneas sobre-expresoras tanto de PvEPF1 como de PvEPF2, respectivamente. Cada set de semillas fue colocado en cajas de Petri diferentes y puesto a germinación a 25°C con un fotoperiodo de 16/8 hrs (luz/oscuridad). Transcurridas tres semanas, se seleccionaron las plantas de mayor tamaño y se trasplantaron en macetas con la mezcla de sustrato descrita previamente. Una vez terminado el periodo de floración se colectaron las semillas. Para seleccionar las plantas

homocigotas (T3) se realizó el mismo procedimiento, las cuales posteriormente fueron utilizadas para el análisis de acumulación relativa y fenotipificación

Genotipificación de las plantas transformadas

Para la genotipificación de las plantas transformadas con la región codificante del gen *PvEPF1* se seleccionaron aquellas que tuvieran la roseta en un máximo de crecimiento (tres a cuatro semanas) y se colectó una hoja de tamaño intermedio a partir de la cual se extrajo ADN genómico, siguiendo el protocolo de CTAB sugerido por el proveedor (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit). Una vez obtenida la muestra de ADN se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar el promotor 35S, el cual no está presente en las plantas silvestres (WT).

En el caso de la genotipificación de las plantas transformadas con el ORF para *PvEPF2*, se seleccionaron plantas que estuvieran en proceso de floración y se cortaron dos flores de cada planta. Una vez obtenido el tejido se siguió el protocolo de la enzima Phire Hot start II DNA Polymerase (F122S, Thermo Fisher) y se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar *PvEPF2*, el cual no está presente en las plantas silvestres (WT) de *Arabidopsis*.

Análisis de acumulación relativa de los péptidos *PvEPF1* y *PvEPF2* en las plantas transformantes

Para el análisis de los niveles de los transcritos para *PvEPF1* y *PvEPF2* en las líneas transformantes seleccionadas se utilizaron hojas de roseta de plantas de máximo tres a cuatro semanas de crecimiento, seleccionando tres hojas por planta de tamaño intermedio (2cm aproximadamente), las cuales se guardaron en microtubos de 1.5 mL, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Por cada muestra se extrajo ARN utilizando el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Una vez obtenido el ARN se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc). Las muestras se trataron con DNasa I (EN0521, Thermo Fisher) siguiendo el protocolo del proveedor; posteriormente, se añadieron las enzimas RevertAid Reverse Transcriptase (EP0441, Thermo Fisher) y RiboLock RNase Inhibitor (EO0382, Thermo Fisher) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Para evaluar la integridad del ADNc sintetizado, se realizó una PCR en la que se utilizó como control positivo el transcrito para *EIF4*, ya que este se expresa de forma

ubicua en *Arabidopsis* (Hernández y Vásquez-Pianzola, 2005). Para la acumulación del transcrito para *PvEPF1* se realizó una RT-PCR en la que se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 150 pb. Este procedimiento se repitió para las plantas con las otras construcciones, utilizando los oligonucleótidos específicos correspondientes.

Fenotipificación de las plantas transformantes

Una vez transformadas y seleccionadas las plantas transformantes con los genes EPF de *P. vulgaris* de *Arabidopsis* homocigotas (T3), se analizó la epidermis de las hojas para determinar el fenotipo y compararlo con los fenotipos de las plantas silvestre (Col0) y sobre-expresoras de los genes EPF endógenos de *Arabidopsis*, AtEPF1OE y AtEPF2OE. Las semillas de estas últimas líneas fueron donadas amablemente por el Dr. Hunt, de la Universidad de Sheffield.

Para llevar a cabo la fenotipificación de las líneas seleccionadas se esperó a que la roseta de la planta tuviera el máximo de crecimiento (tres a cuatro semanas), y se evaluaron tres hojas por planta. Se realizó una impresión de la parte abaxial de cada hoja utilizando la pasta dental Imprint™ II Garant™ 3M ESPE. Una vez seca la pasta dental, se retiró de la hoja y se le aplicó barniz de uñas transparente RENOVA para poder obtener una copia de la zona impresa para posteriormente realizar la observación en el microscopio (Fig. 6). Una vez fotografiada la epidermis de todas las hojas se contabilizaron el número de estomas, el número de células de pavimento y el número de meristemoides, este último parámetro únicamente se consideró para las plantas que sobre-expresaron *PvEPF1*. Una vez contabilizados dichos parámetros, se calculó el IE, la DE, el tamaño de estomas y únicamente para las plantas sobre-expresoras de *PvEPF1*, el índice de meristemoides (IM). Para obtener el tamaño de los estomas se consideró el largo y el ancho de las células guarda. Para dichos análisis se realizó un ANOVA de una cola con comparación múltiple, considerando a Col0 como control, utilizando el programa GraphPad PRISM 6

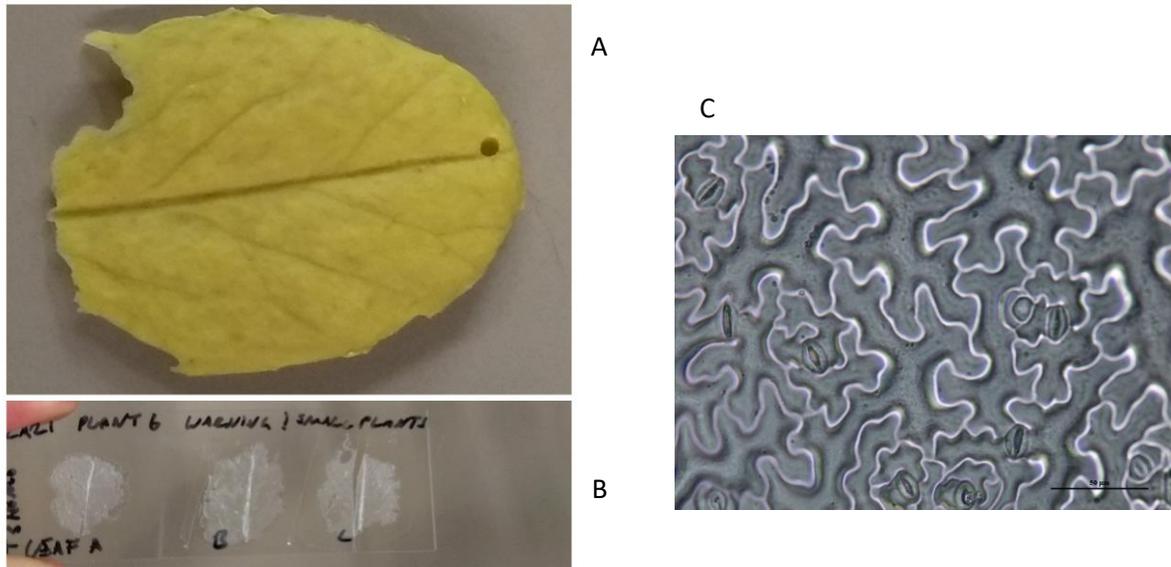


Figura 6: Preparación de muestras para fenotipificación

(A) Impresión de la zona abaxial de la hoja utilizando pasta dental. (B) Impresión de barniz transparente obtenida a partir de la impresión con pasta dental. (C) Micrografía de la epidermis de una hoja de plantas de *Arabidopsis* sobre-expresando *PvEPF1*. Esta imagen se obtuvo a partir de la impresión de barniz transparente (Escala: 50 μm).

RESULTADOS

Similitud entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 de *P. vulgaris* y AtEPF1 y AtEPF2 de *Arabidopsis*

En primera instancia se seleccionaron las secuencias de los EPFs de frijol con mayor similitud a los EPFs de *Arabidopsis*. Para EPF1 se encontró una secuencia similar mientras que para EPF2 se encontraron dos secuencias similares. A continuación se compararon las secuencias de los péptidos PvEPF1, PvEPF2 y PvEPF2.1 con AtEPF1 y AtEPF2, para determinar los siguientes parámetros: el porcentaje de similitud e identidad entre las secuencias y el agrupamiento por similitud de los péptidos, para este último se utilizaron las secuencias de los propéptidos (A1- Fig. sup. 2) y de los péptidos maduros. Para el agrupamiento por similitud se incluyeron las secuencias de los péptidos AtEPFL9/ESTOMÁGENO, de *Arabidopsis*; PpEPF1, de *P. patens*; MtEPF1 y MtEPF2, de *M. truncatula* y EPFs putativos de *G. max.* (Fig. 7).

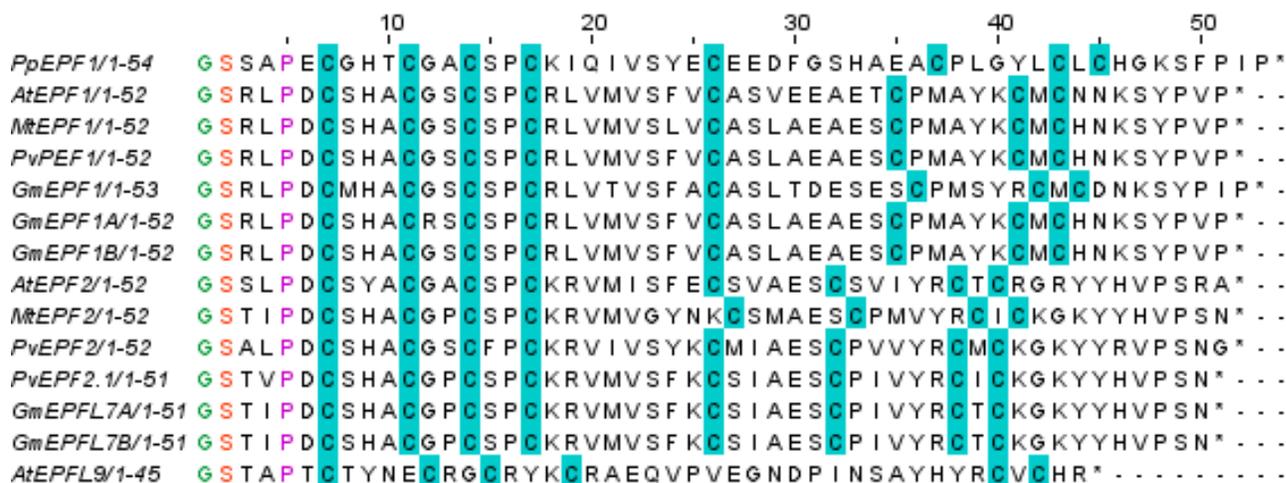


Figura 7: Alineamiento de los EPFs putativos (Péptidos maduros).

En todas las secuencias se puede observar que la región de corte que dará lugar al péptido maduro se encuentra altamente conservada (residuos de aminoácidos marcados en verde, rosa y morado). Así mismo, todos los residuos de cisteína (C) involucrados en la formación de los enlaces disulfuro se encuentran conservados (columnas en azul).

El análisis de agrupamiento de los péptidos, generado por la similitud de la secuencia de los aminoácidos, mostró que los péptidos AtEPF2, MtEPF2 y PvEPF2 se encuentran en un mismo subgrupo, el cual tiene una mayor similitud al péptido PpEPF1. El siguiente subgrupo

se conformó por los péptidos pertenecientes al grupo de los EPF1, siendo AtEPF1 y GmEPF1 más similares entre sí con respecto a PvEPF1, GmEPF1A y GmEPF1B. AtEPFL9/ESTOMÁGENO se mantuvo como grupo externo (Fig. 8). La agrupación obtenida por la similitud de las secuencias de los péptidos es similar a la agrupación filogenética reportada por Takata *et al.* (2013), Caine *et al.* (2016) y Chater *et al.* (2017).

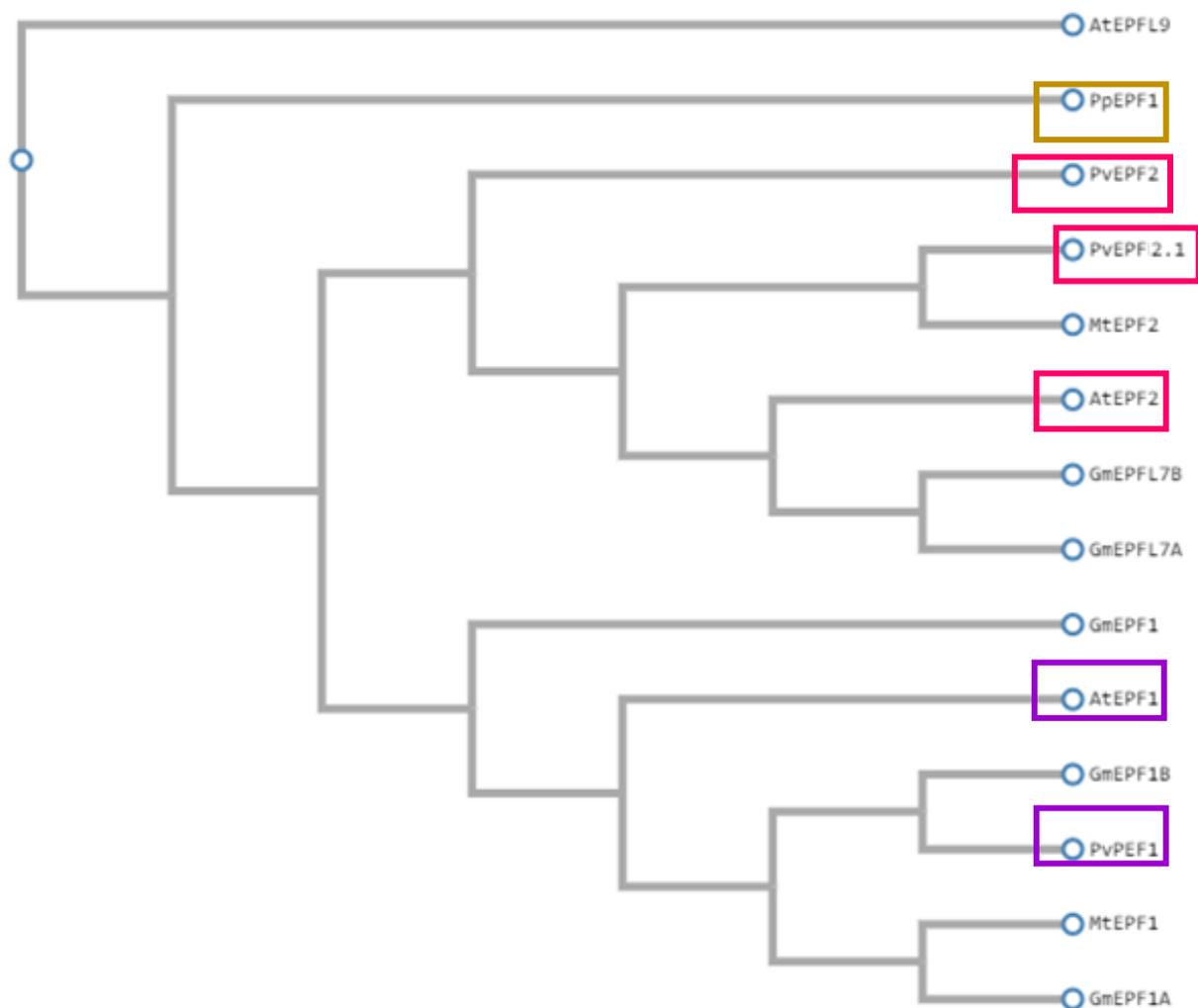
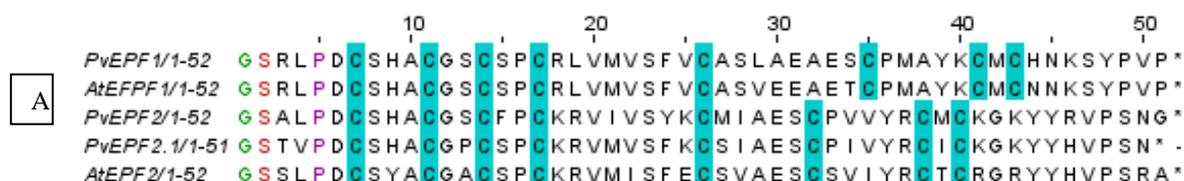


Figura 8: Agrupamiento de EPFs putativos.

El péptido AtEPFL9/ESTOMÁGENO se utilizó como grupo externo y se mantiene externo a la clasificación de los subgrupos EPF1 y EPF2. El péptido PpEPF1 (Rectángulo amarillo) también se mantiene como grupo externo. Los péptidos pertenecientes al grupo EPF2 y EPFL7 son más cercanos entre sí que los péptidos pertenecientes al grupo EPF1. Así mismo, podemos observar que PvEPF1 y AtEPF1 (Rectángulo morado) se encuentran agrupados en la misma región del árbol. Los péptidos AtEPF2, PvEPF2 y PvEPF2.1 (Rectángulo rosa) se encuentran en la misma sección del árbol, siendo PvEPF2.1 el más cercano a AtEPF2.

Para determinar el porcentaje de similitud e identidad entre AtEPF1, AtEPF2, PvEPF1, PvEPF2 y PvEPF2.1 (Fig. 9A). La comparación entre AtEPF1 y PvEPF1 mostró que ambos péptidos comparten una similitud del 96.07% y una identidad del 92.15% (Fig. 9B). En dicha comparación se encontraron diferencias en tres pares de residuos de aminoácidos, en los tres casos los cambios fueron entre residuos de aminoácidos equivalentes (Tabla sup. 3).

Al comparar la secuencia de los péptidos AtEPF2, PvEPF2 y PvEPF2.1 se encontró lo siguiente. Entre AtEPF2 y PvEPF2 se observó una similitud es del 78.43%, mientras que la identidad fue del 64.7% (Fig. 9C). Entre ambas secuencias se encontraron cambios en 15 pares de residuos de aminoácidos. Nueve de los cambios fueron entre residuos de aminoácidos equivalentes, mientras que en ocho de los casos los cambios fueron entre aminoácidos no equivalentes (Tabla sup. 4). Por otra parte, al comparar AtEPF2 con PvEPF2.1 se encontró un 88.1% de similitud y un 72% de identidad. En este caso, es necesario resaltar que la secuencia utilizada fue PvEPF2 dado que cuando se realizó la construcción del vector se había observado una mayor similitud con PvEPF2 y no con PvEPF2.1. Sin embargo, se puede observar que en todas las secuencias analizadas se conservan los residuos de aminoácidos involucrados en el sitio de corte para la formación del péptido maduro, y los residuos de cisteínas (C), involucrados en la formación de los enlaces disulfuro intramoleculares (Fig. 10) (Ohki et al., 2011; Takata *et al.*, 2013).



		Porcentaje de similitud		Porcentaje de identidad	
		AtEPF1		AtEPF1	
B	PvEPF1	96.07%	PvEPF1	92.15%	

		Porcentaje de similitud		Porcentaje de identidad	
		AtEPF2		AtEPF2	
C	PvEPF2	78.43%	PvEPF2	64.70%	
	PvEPF2.1	88.00%	PvEPF2.1	72%	

Figura 9 Alineamiento de los péptidos EPF putativos de frijol

A) Alineamientos de los péptidos EPF1 putativos de frijol (*P. vulgaris*). Se muestra el alineamiento de los EPF1 putativos de frijol de acuerdo con su similitud con el EPF1 de Arabidopsis. B) Tabla de porcentaje de similitud e identidad de AtEPF1 y PvEPF1: Se comparó la secuencia del EPF1 putativo de frijol con

respecto a Arabidopsis y se encontró que PHAVU_005G105600g_5 (PvEPF1) presenta un 96.07% de similitud y un 92.15% de identidad. C) Tabla de porcentaje de similitud e identidad de AtEPF2 y PvEPF2: Se compararon las secuencias de los EPF2 putativos de frijol con respecto al EPF2 de Arabidopsis y PHAVU_005G060200 (PvEPF2.1) obtuvo el mayor porcentaje de similitud (88%) e identidad (72%), mientras que PHAVU_011G174100 (PvEPF2) presenta un 78.43% de similitud y un 64.7% de identidad.

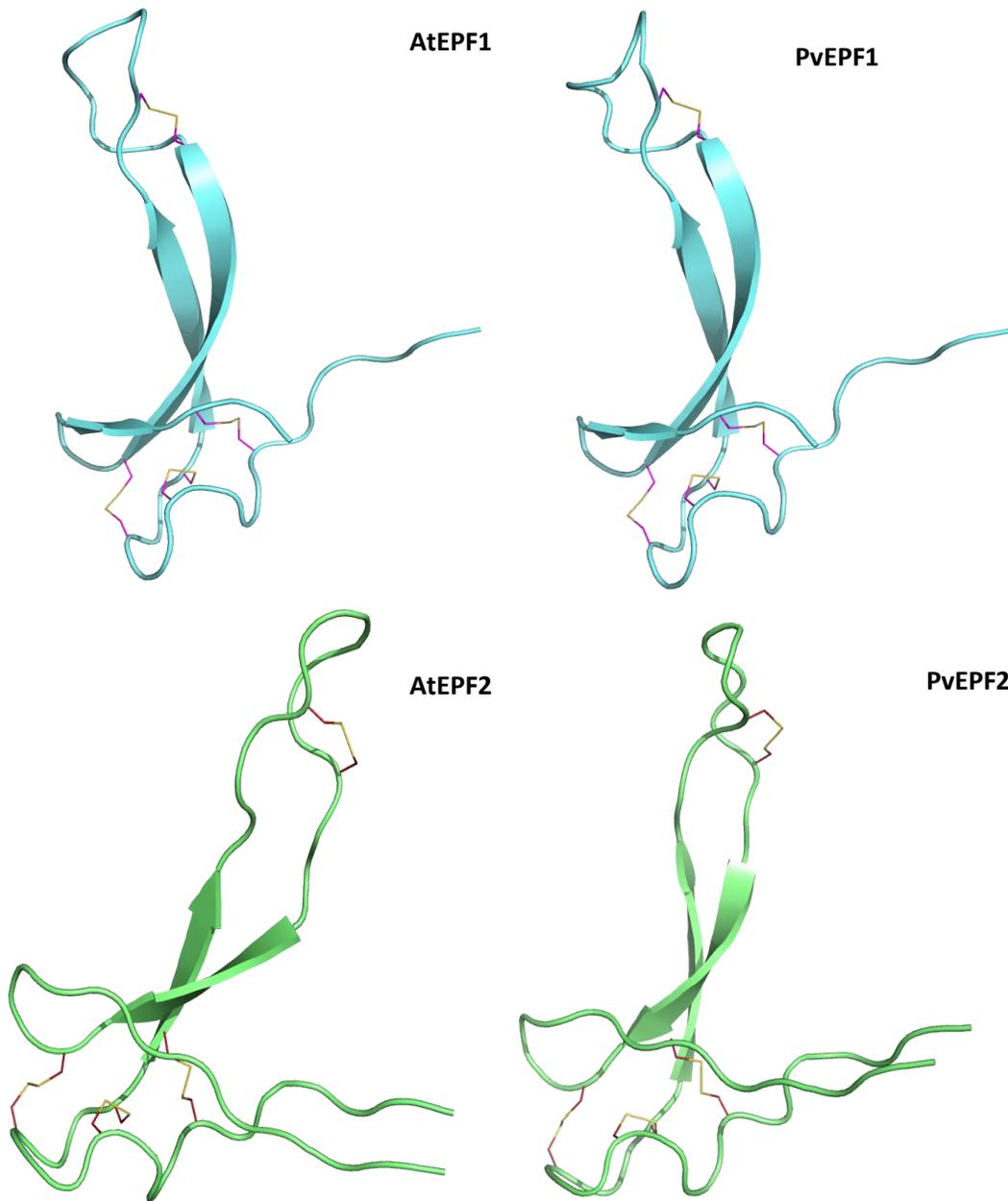


Figura 10: Predicción de la estructura terciaria de los péptidos

En los cuatro péptidos se mantiene la estructura de andamio y bucle. Así mismo conserva los cuatro puentes disulfuro (rosa con amarillo), formados por los residuos de Cisteínas, característicos de péptidos pertenecientes tanto al grupo EPF1 (azul) como al EPF2 (verde). Predicciones visualizadas con PyMol.

Estos resultados en conjunto sugieren que, dada la importancia evolutiva del desarrollo estomático, los péptidos PvEPF1, PvEPF2 y PvEPF2.1 se encuentran altamente conservados, patrón que se mantiene tanto en *P. patens*, representante de las Briofitas, como *Arabidopsis*, representante de las brassicáceas y modelo experimental para angiospermas y *M. truncatula*, una leguminosa. Lo anterior sugiere que los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 son ortólogos de los péptidos EPF que se utilizaron en el análisis.

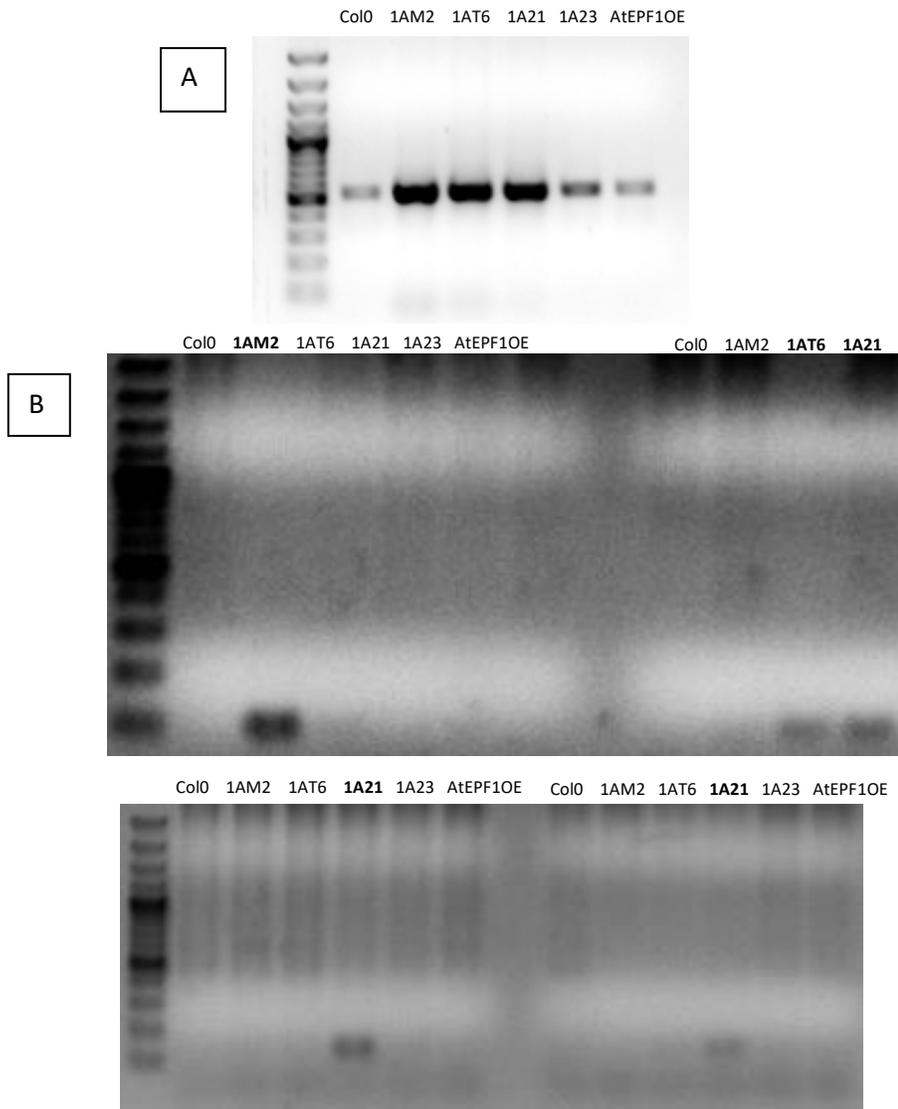
Análisis de las líneas sobre-expresoras de PvEPF1 en las líneas Col0 (WT) de Arabidopsis

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de *PvEPF1* en las plantas de *Arabidopsis* se realizó la transformación de plantas silvestres Col0 (WT) con la construcción *pMDC32::35SPro::PvEPF1* y, una vez obtenidas las plantas homocigotas (T3), se seleccionaron cuatro líneas (1AT6, 1AM2, 1A21 y 1A23), resistentes a higromicina. Así mismo, se seleccionaron plantas homocigotas (T3), sobre-expresoras de *AtEPF1* (línea AtEPF1 OE), resistentes a BASTA. Con estas líneas se realizó un análisis de expresión relativa de los genes *EIF4* y *PvEPF1* mediante la técnica de RT-PCR (n=5 plantas por línea) y un análisis de fenotipificación (n= 6 plantas por línea).

Para confirmar la expresión de los genes se llevó a cabo el análisis de acumulación relativa de los transcritos de los genes *EIF4* y *PvEPF1* mediante RT-PCR para cada una de las siguientes líneas 1AT6, 1AM2, 1A21, 1A23, AtEPF1 OE y Col0 (WT), las dos últimas líneas se usaron como control. Estos análisis fueron efectuados utilizando cinco plantas por línea.

Utilizando oligonucleótidos específicos se evaluó la acumulación del transcrito del gen *EIF4*, el cual presenta una expresión constitutiva en *Arabidopsis*. En todas las líneas se observó la acumulación del transcrito *EIF4* (Tabla 2A), evidenciado por la amplificación de un fragmento de 500 pb, de acuerdo con el tamaño esperado (Fig. 11A). La expresión del transcrito de *PvEPF1* se evaluó utilizando oligonucleótidos específicos para *EPF1* de frijol, que permitieron la amplificación de un fragmento de 200 pb, acorde a lo esperado; sin embargo, la amplificación del transcrito *PvEPF1* no se presentó en todas las líneas (Tabla 2B). Al corroborar la integridad el ARN, se detectó que la calidad de las muestras no fue la óptima, lo que repercutió en la síntesis del ADNc. Esto se evidenció en los resultados del RT-PCR, en donde a pesar de haber amplificado el transcrito de *EIF4*, el correspondiente a

PvEPF1 mostró amplificación sólo en algunas muestras; posiblemente debido a la abundancia relativa entre ambos transcritos (i. e.: *EIF4* es más abundante que *PvEPF1*). Tomando esto en consideración, es necesario obtener ARN de mejor calidad que permita una detección más homogénea de los transcritos de interés. A pesar de ello, el hecho de haber detectado el transcrito de *PvEPF1* en algunas de las plantas de las líneas independientes obtenidas, es indicativo de la presencia de ese transcrito en, al menos, tres de las cuatro líneas probadas. Apoyando esta inferencia está la observación de que todas las líneas transgénicas (incluyendo en las que no fue posible determinar la expresión del transgén), presentaron un fenotipo diferente a Col0 (WT) y similar al de la línea AtEPF1OE, a su vez, similar este último al ya reportado para esta línea (Fig.11B).



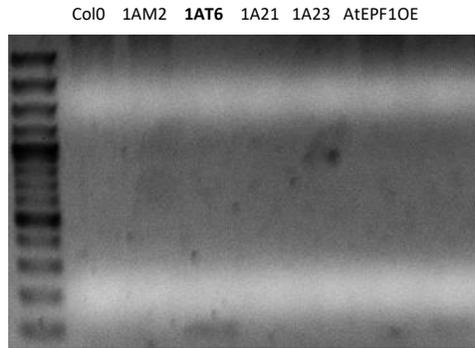


Figura 11: Análisis de acumulación relativa de los transcritos EIF4 y PvEPF1 mediante RT-PCR
 Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, el marcador de peso molecular corresponde a 100 pb Plus. (A) Amplificación del gen EIF4: Se utilizaron los oligonucleótidos específicos (Fw: EIF4 y Rv: EIF4) con un tamaño esperado de 500 pb; en todas las líneas se observó la amplificación del transcrito de EIF4. (B) Amplificación del transcrito del gen PvEPF1: Se utilizaron oligonucleótidos específicos (Fw: PvEPF1 Y Rv PvEPF1), que permiten la amplificación de un fragmento de 200 pb. Como control negativo se utilizaron las líneas Col0 y AtEPF1OE. Las líneas 1A21, 1AM2 y 1AT6 mostraron amplificación del transgén PvEPF1.

A Presencia del transcrito EIF4						B Presencia del transcrito PvEPF1					
Línea	# Planta					Línea	# Planta				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
Col0	+	+	+	+	+	Col0	ND	ND	ND	ND	ND
1AM2	+	+	+	+	+	1AM2	-	-	+	-	-
1AT6	+	+	+	+	+	1AT6	-	-	-	+	+
1A21	+	+	+	+	+	1A21	+	+	-	+	-
1A23	+	+	+	+	+	1A23	-	-	-	-	-
AtEPF1 OE	+	+	+	+	+	AtEPF1 OE	ND	ND	ND	ND	ND

Tabla 1: Presencia de transcrito EIF4 (A) y PvEPF1 (B) obtenidos mediante RT-PCR.
 El signo “+” indica presencia del transcrito, el signo “-” no detectado y “ND” ausente en los controles.

Caracterización fenotípica de las líneas de Arabidopsis sobre-expresoras de PvEPF1

Los parámetros que se utilizaron para la fenotipificación de las líneas obtenida fueron el IE, la DE, el IM y el tamaño de los estomas lo que nos permitió determinar la cantidad y la distribución de los estomas en las hojas. Los resultados obtenidos en los cuatro parámetros se compararon con los obtenidos a partir de las plantas de las líneas Col0 (WT). Cabe resaltar que las plantas de la línea AtEPF1OE no presentaron un fenotipo similar a lo previamente reportado, esto pudo deberse a un silenciamiento de la expresión de este péptido. En algunas plantas se observó un fenotipo parecido a la línea silvestre, mientras que otras plantas mostraron un fenotipo similar al previamente reportado por Hara *et al.* (2007). Tomando esto en consideración, todos los análisis se hicieron dos veces, en el primero se incluyeron los

datos tanto de Col0 como AtEPF1OE (Fig. sup. 3) y, en el segundo, únicamente se incluyeron los datos de Col0.

Para el caso del IE se encontró que tanto las líneas sobre-expresoras de *PvEPF1* como la línea AtEPF1OE presentaron una reducción significativa en el número de estomas. El IE promedio fue de 16% aproximadamente para todas las líneas sobre-expresoras de *PvEPF1*, mientras que para la línea Col0 el IE fue de 21% aproximadamente. Cuando se realiza la comparación del IE sin considerar a AtEPF1OE también se observa que las todas las líneas presentan diferencias significativas con respecto a Col0 (Fig. 12).

Al evaluar la DE promedio de las plantas se observó que las líneas 1AT6 y 1^a21 presentaron diferencias significativas con respecto a Col0; en dichas líneas se encontró una menor cantidad de estomas por mm² con respecto a la línea silvestre. Las líneas 1AM2, 1^a23 y AtEPF1OE. A pesar de presentar una disminución en la DE, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa en relación con la línea Col0. Sin embargo, cuando no se considera a la línea AtEPF1OE podemos observar que las líneas 1AM2, 1AT6 y 1^a21 sí presentan diferencias significativas con respecto a Col0; mientras que la línea 1^a23 no presenta diferencias significativas (Fig. 13).

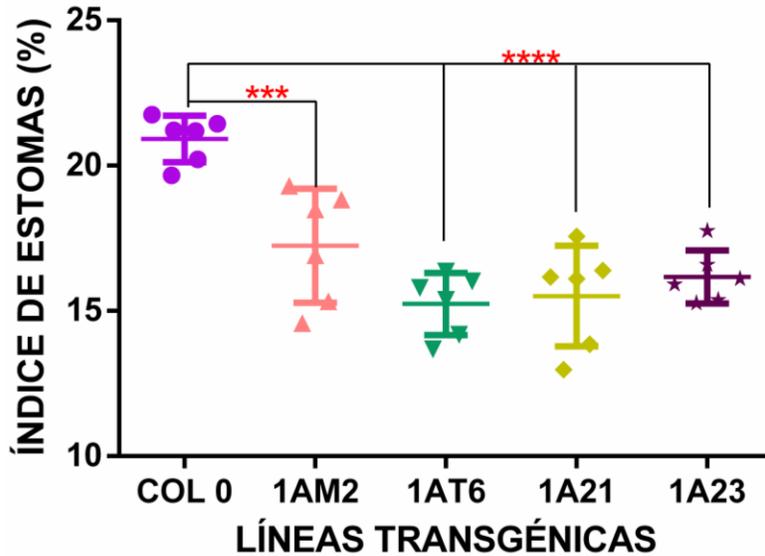


Figura 12: Análisis comparativo del índice estomático (IE) de las líneas sobre-expresoras de PvEPF1 vs. Col 0 y la línea AtEPF1 OE.

Se muestra el IE para cada una de las líneas transgénicas analizadas. Las plantas de todas las líneas presentaron diferencias significativas con respecto al control. Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó un ANOVA de una cola y una comparación múltiple, tomando como referencia la línea Col-0 (WT). Las plantas de las líneas AtEPF1 OE, 1AT6, 1^a21 y 1^a23 presentaron una diferencia significativa con un valor de $P < 0.0001$ (****) en la reducción de IE con respecto a Col-0. Las plantas de la línea 2AM2 también mostraron una diferencia significativa en la reducción de IE con respecto a Col-0, pero con un valor de $P < 0.001$ (***) ($n=6$ por cada línea).

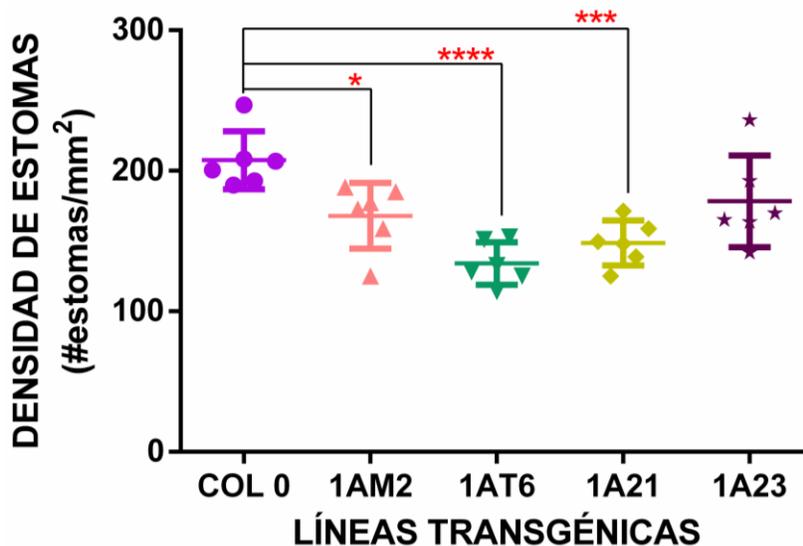


Figura 13: Comparación de los promedios de la densidad estomática (DE) de las líneas Col0, AtEPF1 OE, 1AM2, 1AT6, 1^a21 y 1^a23.

Para el análisis de los resultados obtenidos, se realizó un ANOVA de una cola y una comparación múltiple, tomando como control a Col0. Las plantas de la línea 1AT6 y 1^a21 mostraron una diferencia significativa con un valor de $P < 0.001$ (***). La línea 1AM2 presentó una diferencia significativa con un

valor de $P \leq 0.05$. La línea 1^{A23}, a pesar tener una reducción en la densidad estomática, no mostró diferencias significativas con respecto a Col0 (n=6 por cada línea).

Al analizar los fenotipos, encontramos que únicamente las líneas 1AM2, 1AT6 y 1A21 presentaron diferencias significativas, tanto en IE como en DE, con respecto a Col0. La línea 1A23 únicamente presentó diferencias significativas en el IE con respecto a Col0 pero no en la DE, aunque mostró una tendencia en el mismo sentido.

Tomando esto en consideración, se procedió a contabilizar el número de meristemoides arrestados, se consideró como meristemoide al conjunto de células que presentaban divisiones asimétricas y formaciones de satélites, utilizando como referencias los trabajos de Simmons y Bergmann (2016) y de Han y Torii (2016) (Fig. 16). A este parámetro se le llamó Índice de Meristemoides (IM), para este análisis encontramos que, a pesar de haber un incremento en la acumulación de células arrestadas en ambas líneas, únicamente la línea 1A23 presentó diferencias significativas con respecto a Col0; sin embargo, es posible apreciar una tendencia a incrementar el IM en todas las líneas (Fig. 14). Para este parámetro se realizó una prueba t-student pareada ya que algunas de las líneas transformadas presentaban una tendencia a incrementar su IM. Al realizar este análisis se encontró que las líneas 1AT6, 1A21 y 1A23 presentan diferencias significativas con respecto a Col 0 (Tabla 2).

Finalmente, en la comparación del tamaño de estomas no se encontraron diferencias significativas entre las líneas, lo que podría sugerir que a pesar de haber una disminución en los valores de DE e IE en las líneas transgénicas, la planta podría estar compensando dicha disminución con una distribución más eficiente de los estomas maduros que logran llegar a la fase final de diferenciación (Fig. 15).

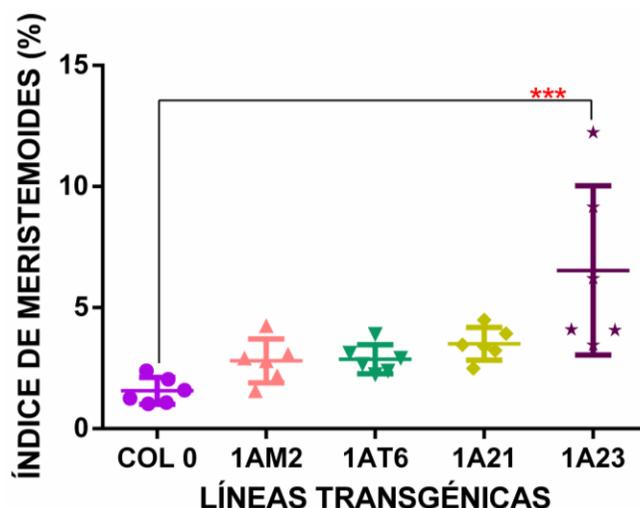


Figura 14: Análisis del Índice de Meristemoides (IM) en las líneas sobre-expresoras de PvEPF1
 Para el análisis estadístico, se realizó un ANOVA de una cola y una comparación múltiple, tomando como control a Col0. Únicamente la línea 1ª23 mostró diferencia significativa con un valor de $P < 0.001$ (***). El resto de las líneas presentaron un incremento en el IE; sin embargo, no tuvieron diferencias significativas con respecto a Col0 ($n=6$ por cada línea).

Col0 vs	1AM2	1AT6	1A21	1A23
Prueba t-student pareada	0.017329	0.0030133	0.00028192	0.0079209

Tabla 2: Prueba t-student pareada de las líneas sobre-expresoras de PvEPF1 y Col0
 La tabla muestra los valores P de la prueba t pareada entre todas las líneas sobre-expresoras y Col 0. El valor de significancia ($\alpha = 0.05$) fue corregido para comparaciones múltiples con Bonferroni (α_c). Las líneas 1AT6, 1A21 y 1A23 presentan diferencias significativas con respecto a Col 0. La línea 1AM2 presentó una fuerte tendencia a incrementar su IM; sin embargo, de acuerdo con los valores del α_c no hay diferencia significativa con respecto a Col 0.

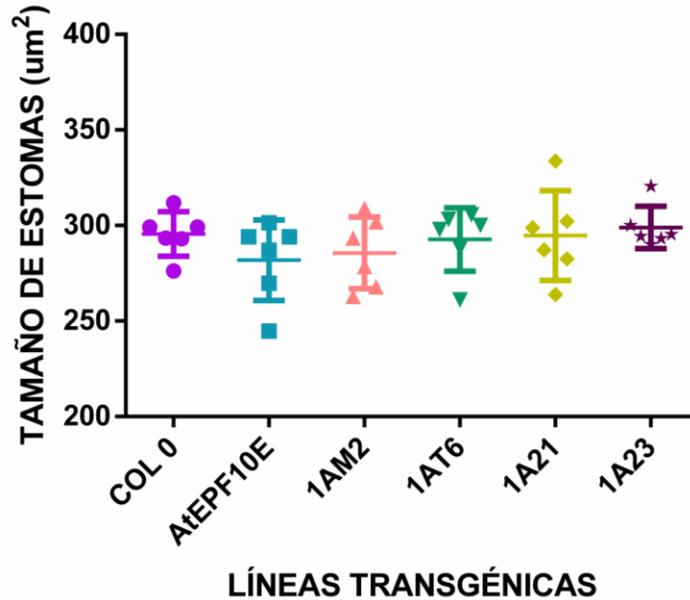


Figura 15: Análisis de tamaño de estomas

Para el análisis estadístico, se realizó un ANOVA de una cola con comparación múltiple, tomando como control a Col0. No se obtuvieron diferencias significativas entre las líneas transgénicas con respecto a Col0. $P < 0.0001$ ($n=10$ por cada línea).

En resumen, a partir del análisis fenotípico realizado sobre la zona abaxial de la epidermis de la hoja pudimos observar que, a pesar de llevarse a cabo el proceso de diferenciación celular para dar lugar a los estomas y a las células de pavimento, al sobre-expresar el transcrito que codifica para el péptido PvEPF1, el desarrollo de los estomas se ve alterado negativamente, ya que las células, en la mayoría tres de las cuatro líneas independientes, no alcanzan la etapa final de diferenciación y se quedan arrestadas durante la fase de amplificación (Fig. 16). En conjunto estos resultados nos indican que en las líneas 1AM1, 1AT6 y 1A21 el péptido PvEPF1 desarrolla un papel similar al péptido AtEPF1 de Arabidopsis al actuar durante la fase de “amplificación” inhibiendo la formación de las CGM, en concordancia con lo propuesto por Simmons y Bergmann (2016).

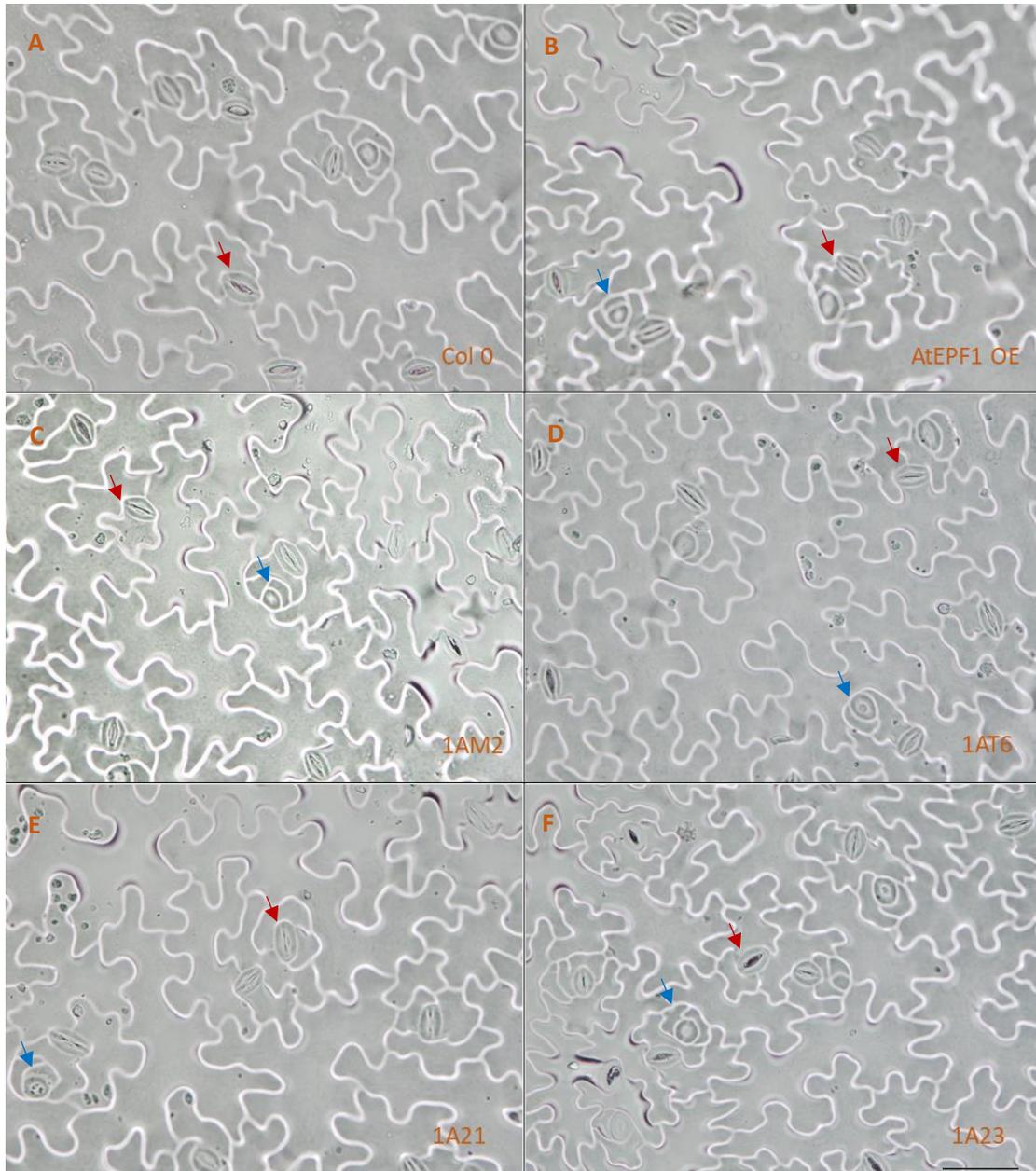


Figura 16: Imágenes de la epidermis de la hoja de Arabidopsis.

(A) Col0 grupo control (B) AtEPF1 OE 35S::AtEPF1 (C) –(F) 35S::PvEPF1 Todas las imágenes corresponden a un aumento 40X por microscopía óptica. Las flechas azules resaltan al grupo de células que presentan arresto durante el proceso de diferenciación celular. Las flechas rojas resaltan a los estomas maduros. La barra de escala representa 20μm para todas las fotos.

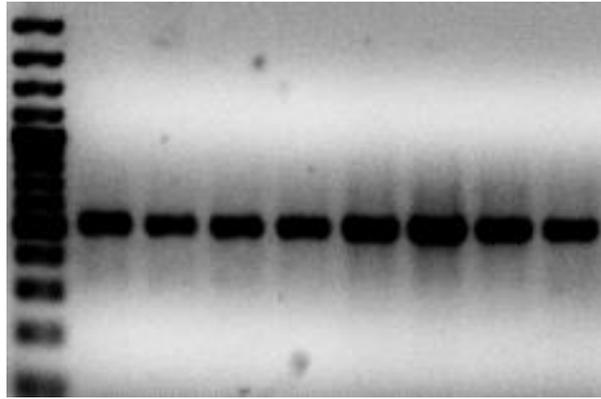
Análisis de las líneas sobre-expresoras de PvEPF2 de Arabidopsis

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de *PvEPF2* en las plantas de Arabidopsis se realizó la transformación de la línea Col0 (fondo silvestre) con la construcción *pMDC32::35SPro::PvEPF2*, una vez obtenidas las plantas homocigotas (T3) se seleccionaron cinco líneas (2BC, 2BD, 2BI, 2BK, 2BM), resistentes a higromicina. Así mismo, se seleccionaron plantas homocigotas (T3) de la línea AtEPF2OE. En estas plantas se determinó la acumulación relativa de los transcritos (n= 5 plantas por línea) y la fenotipificación (n= 6 plantas por línea) correspondiente.

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de expresión de los transcritos de *EIF4* y *PvEPF2* mediante la técnica de RT-PCR. Utilizando oligonucleótidos específicos se evaluó la acumulación del transcrito de *EIF4* (Tabla 3^a), expresado constitutivamente en Arabidopsis; en todas las líneas se amplificó el transcrito de interés, aunque no en los mismos niveles. El tamaño del fragmento correspondió al esperado de 500 pb (Fig. 17A). Posteriormente, se evaluó la expresión del transcrito *PvEPF2* utilizando los oligonucleótidos específicos correspondientes, que permitieron la amplificación de un fragmento de 500 pb. La amplificación del fragmento específico a partir de *PvEPF2* resultó positivo en algunas plantas de las líneas 2BC, 2BD, 2BI y 2BM (Tabla 3B). La obtención de estos resultados sugiere que, debido a una baja calidad del ARN, la síntesis del ADNc se vio comprometida lo que derivó en la no detección de este último transcrito (Fig. 17B).

A

2BC 2BK 2BI 2BM 2BD 2BC 2BK AtEPF2OE

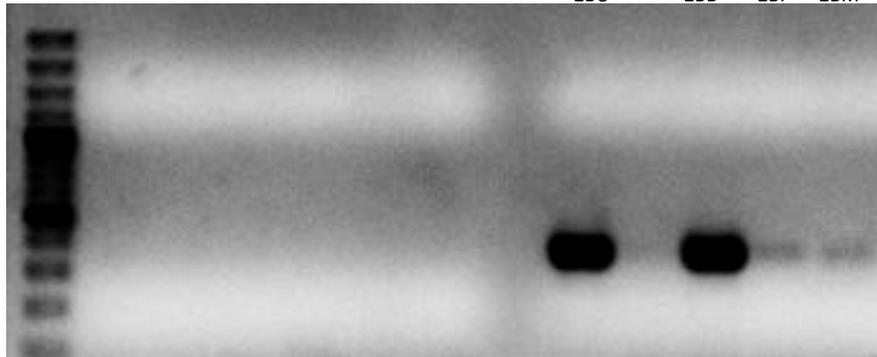


B

2BC 2BK 2BI 2BM 2BD 2BC 2BK AtEPF2OE 2BI 2BM



2BC 2BK 2BI 2BM 2BD 2BC 2BK AtEPF2OE 2BC 2BD 2BI 2BM



2BC 2BD 2BI 2BK 2BM 2BD AtEPF2OE

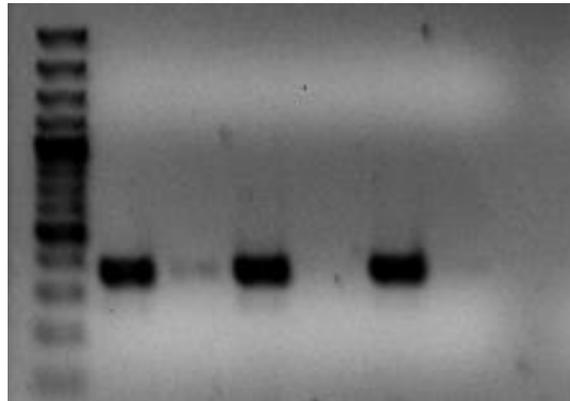


Figura 17: Acumulación relativa de los transcritos *EIF4* y *PvEPF2* mediante RT-PCR.

Las muestras obtenidas mediante RT-PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5%. Para todos los casos el marcador de peso molecular utilizado fue de 100pb Plus. (A) Fragmentos resultantes de la amplificación del transcrito para *EIF4* utilizando oligonucleótidos específicos (Fw: *EIF4* y Rv: *EIF4*)

generaron un fragmento con un tamaño esperado de 500 pb; en todas las plantas de las líneas se amplificó el transcrito de interés. (B) Amplificación del transcrito *PvEPF2*. Se utilizaron oligonucleótidos específicos Fw: *PvEPF2* y Rv *PvEPF2*, que permiten la amplificación de un fragmento con un tamaño de 500 pb. Como control negativo se utilizaron plantas silvestres Col0 y de la línea *AtEPF2OE*. En este caso, las únicas muestras en donde no se detectó el transcrito de interés son las correspondientes a la línea 2BK.

Línea	Presencia del transcrito <i>PvEPF2</i>					Línea	Presencia del transcrito <i>EIF4</i>				
	# Planta						# Planta				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
Col0	ND	ND	ND	ND	ND	Col0	+	+	+	+	+
2BC				+	+	2BC	+	+	+	+	+
2BD				+	+	2BD	+	+	+	+	+
2BI		+		+	+	2BI	+	+	+	+	+
2BK						2BK	+	+	+	+	+
2BM		+		+	+	2BM	+	+	+	+	+
<i>AtEPF2 OE</i>	ND	ND	ND	ND	ND	<i>AtEPF2 OE</i>	+	+	+	+	+

Tabla 3: Detección de los transcritos *EIF4* (A) y *PvEPF2* (B) a través de la RT-PCR.

El signo “+” representa presencia, el signo “-” representa no detectado y “ND” ausente en los controles.

Caracterización fenotípica de las líneas de Arabidopsis sobre-expresoras de PvEPF2

Para realizar el análisis de fenotipificación de las líneas transformantes se consideraron los siguientes parámetros, IE, DE y el tamaño de estomas. En estas líneas no se consideró el IM. Los datos obtenidos a partir de la medición de estos parámetros en las líneas sobre-expresoras de *PvEPF2*, se compararon con los obtenidos a partir del análisis de plantas silvestres Col0 y de la línea *AtEPF2OE*. Es importante mencionar que las plantas de la línea *AtEPF2OE* presentaron dos fenotipos diferentes, lo que pudo deberse a un silenciamiento de la expresión de este gen. Algunas plantas presentaron un fenotipo similar a la línea mutante *epf2* (que muestra una distribución aberrante de estomas) mientras que el resto presentó el fenotipo previamente reportado por Hunt *et al.* (2009). Considerando esta observación, los análisis cuantitativos se realizaron dos veces, en el primero se incluyeron los datos tanto de Col0 como *AtEPF2OE* (Fig. sup. 4) y en el segundo, únicamente se utilizaron los datos de Col0.

Al analizar el IE se encontró que, al comparar las líneas sobre-expresoras de *PvEPF2*, 2BC, 2BD, 2BI, 2BK, 2BM y *AtEPF2OE* con respecto a Col0, no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, se detectó una tendencia a reducir la proporción de estomas. Por otra parte, cuando se compara el IE de Col0 con respecto al que presentaron las

líneas 2BC, 2BD, 2BI, 2BK y 2BM los resultados mostraron diferencias significativas, siendo éstas más evidentes en la línea 2BI ($P < 0.0001$) y 2BK ($P < 0.001$), con una reducción del IE de aproximadamente el 8% y 6% respectivamente (Fig. 18).

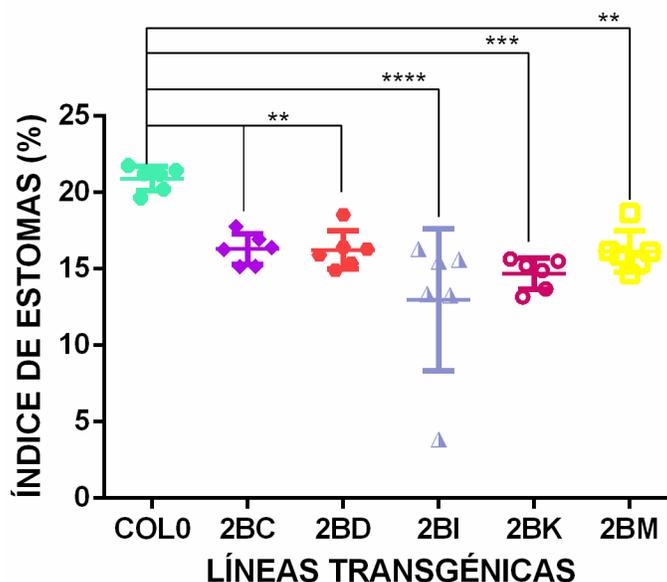


Figura 18: Determinación del índice de estomas (IE) en las líneas sobre-expresoras de PvEPF2
 Comparación del IE en plantas de las líneas sobreexpresoras de PvEPF2 (2BC, 2BD, 2BI, 2BK y 2BM) vs. Col 0, se realizó un ANOVA de una cola y una comparación múltiple, tomando como control a Col-0. La línea 2BI presentó la mayor reducción del IE con respecto a Col-0 con un valor de $P < 0.0001$ (****), seguido por la línea 2BK con un valor de $P < 0.001$ (***) y finalmente las líneas 2BC, 2BD y 2BM con un valor de $P < 0.01$ (**) ($n=6$ por cada línea).

Para el análisis de DE se llevó a cabo el mismo procedimiento que para la evaluación del IE. Primero se compararon todas las líneas transformadas, incluyendo a AtEPF2OE y las que sobre-expresan PvEFP2 con respecto a Col 0. En este caso, al comparar los datos de DE de las plantas de las líneas sobre-expresoras de PvEFP2 (2BC, 2BD, 2BI, 2BK y 2BM) y AtEPF2OE con los de Col 0, no se encontraron diferencias significativas. Como en el caso anterior, esto pudo deberse a que las plantas de la línea AtEPF2OE presentaron dos patrones fenotípicos, en un caso la mitad de las plantas presentaron valores de DE considerablemente inferiores a Col 0; en tanto que, la otra mitad presentó valores notablemente superiores respecto a Col 0. Sin embargo, al realizar la comparación de Col 0 con respecto a las líneas sobre-expresoras PvEPF2 (sin considerar a AtEPF2OE), se aprecia que, aunque todas las líneas muestran una tendencia hacia una menor DE, con una reducción del 20 al 30%, sólo la línea 2BI presentó una diferencia significativa ($P < 0.01$), con una disminución de aproximadamente 40% (Fig. 19). Únicamente para este parámetro se realizó una prueba de

t-pareada entre las líneas transformadas y Col 0, esto debido a la tendencia que presentaban a disminuir la DE. En este análisis encontramos que la línea 2BD y 2BI, presentan diferencias significativas con respecto a Col 0 (Tabla 4).

Finalmente, al comparar el tamaño de los estomas de las líneas transgénicas sobre-expresoras de *PvEPF2* con respecto a Col 0, a pesar de observar una tendencia a un aumento en el tamaño de los estomas, no se encontraron diferencias significativas en relación a la línea silvestre. Esto indica que, al igual que en el caso de las líneas sobre-expresoras de *PvEPF1*, las plantas transformadas podrían estar distribuyendo de forma más eficiente los estomas maduros sin alterar el tamaño de estos (Fig. 20). Al comparar el fenotipo de las líneas sobre-expresoras de *PvEPF2* con respecto a Col0, pudimos observar que en todas las líneas sobre-expresoras hay una tendencia a disminuir tanto el IE como la DE dando como resultado un fenotipo similar (Fig. 21). Estos resultados muestran que el péptido *PvEPF2* actúa de forma similar a *AtEPF2* en las líneas 2BD y 2BI, reduciendo tanto la DE como el IE, actuando como regulador negativo en el desarrollo estomático. En el resto de las líneas transgénicas únicamente se observó un efecto significativo en el IE, reduciendo significativamente con respecto a Col0. Por otra parte, en las líneas 2BK y 2BM observamos una tendencia a disminuir la DE. Esto nos permite sugerir que el péptido *PvEPF2* podría estar actuando de forma similar a *AtEPF2*, regulando negativamente el desarrollo estomático.

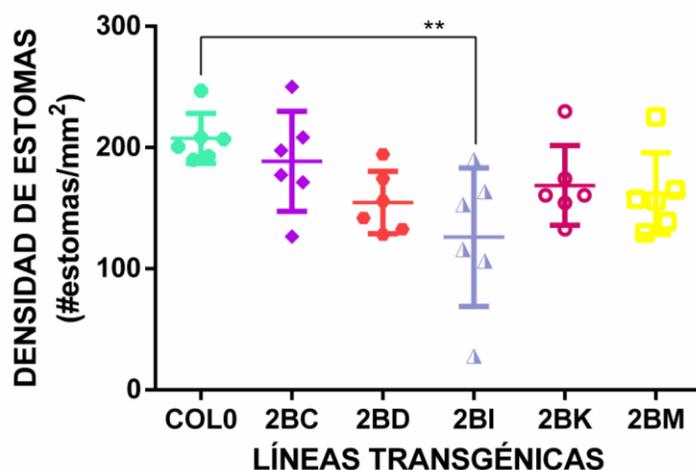


Figura 19: Determinación de la densidad de estomas (DE) en las líneas sobre-expresoras de *PvEPF2*
Para el análisis estadístico de los resultados, se realizó un ANOVA de una cola y una comparación múltiple, tomando como control a Col0. La línea 2BI mostró diferencias significativas con un valor de $P < 0.01$ (**); el resto de las líneas no presentan diferencias significativas, aunque muestran una tendencia hacia una menor DE (n=6 por cada línea).

<i>Col0</i> vs	<i>2BC</i>	<i>2BD</i>	<i>2BI</i>	<i>2BK</i>	<i>2BM</i>
<i>Prueba</i>					
<i>t-student</i>	0.3360	0.0028	0.0081	0.0343	0.0179
<i>pareada</i>					

Tabla 4: Prueba t-student pareada de las líneas sobre-expresoras de PvEPF2 y Col 0

La tabla muestra los valores P de la prueba t pareada entre todas las líneas sobre-expresoras y Col 0. El valor de significancia ($\alpha = 0.05$) fue corregido para comparaciones múltiples con Bonferroni (α_c). Las líneas 2BD y 2BI presentan diferencias significativas con respecto a Col 0. La línea 2BM, presentó una fuerte tendencia a disminuir su DE sin embargo de acuerdo con los valores de α_c no hay diferencia significativa con respecto a Col 0.

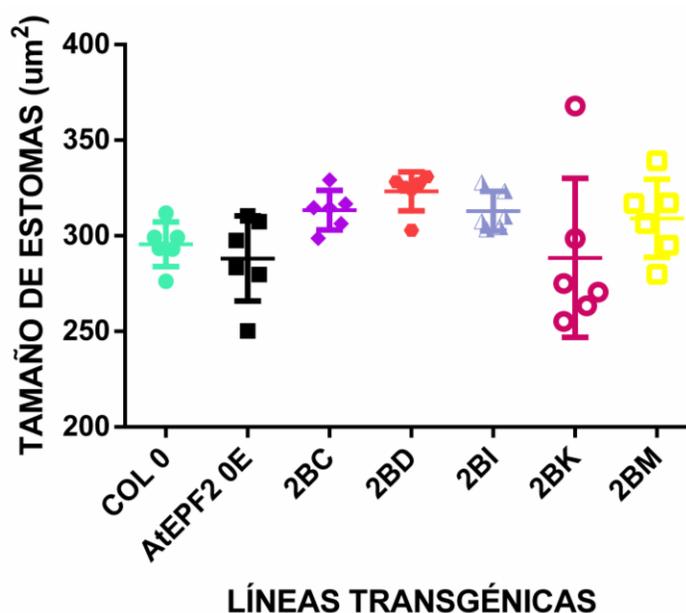


Figura 20: Comparación de los promedios del tamaño de los estomas (μm^2) de las líneas Col0, AtEPF2 OE, 2BC, 2BD, 2BK, 2BI y 2BM

Para el análisis estadístico de los resultados, se realizó un ANOVA de una cola con comparación múltiple, tomando como control a Col0. Los resultados obtenidos para este parámetro no mostraron diferencias significativas entre las líneas transgénicas con respecto a Col0. $P < 0.0001$ ($n = 10$ por cada línea).

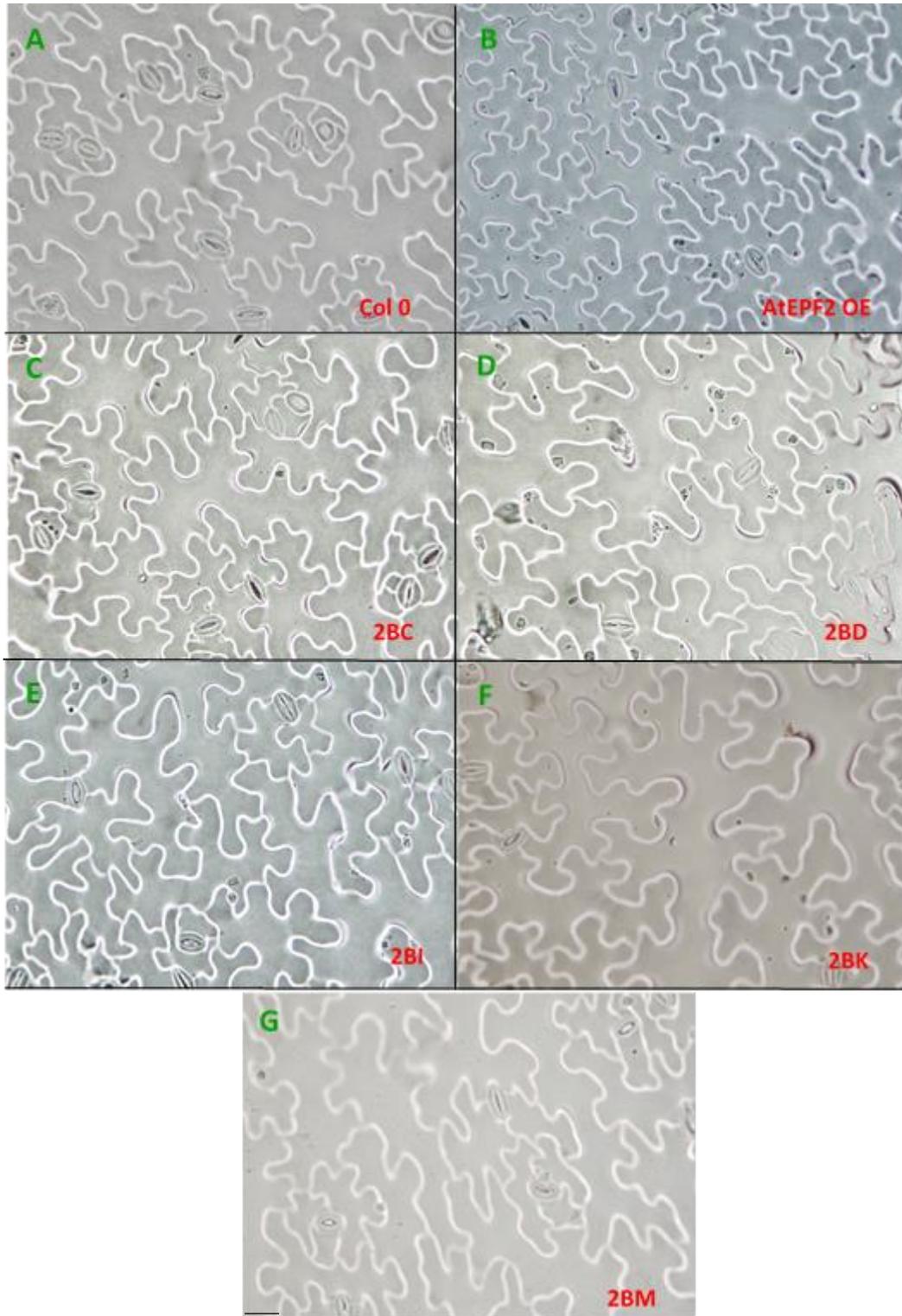


Figura 21: Imágenes representativas de la epidermis de hojas de plantas sobre-expresoras de PvEPF2. (A) Col-0, silvestre, grupo control; (B) AtEPF2OE, 35SPro::AtEPF2; (C)-(G) Líneas transformadas 35S::PvEPF2. Las imágenes corresponden a imágenes captadas a 40X, por microscopía óptica. La barra de escala representa 20µm para todas las fotos.

DISCUSIÓN

Conservación de los péptidos EPF1 y EPF2 en especies leguminosas

Se ha demostrado que la evolución de los estomas ha sido un paso esencial en el éxito y diversificación de las plantas terrestres en los últimos 400 millones de años (Beerling, 2007). Particularmente, la presencia de los estomas acoplada con los tejidos vasculares y el sistema de raíces, han permitido a las plantas terrestres mantener su hidratación mediante la regulación del flujo del agua en la ruta planta-suelo-atmósfera en un ambiente fluctuante (Raven, 2002; Berry *et al.*, 2010; Vatén y Bergmann, 2012).

Los estomas se encuentran en las briofitas, musgos y cola de caballo; y en plantas vasculares, incluyendo licofitas, helechos, gimnospermas y angiospermas (Vatén y Bergmann, 2012; Chater *et al.*, 2017). El desarrollo de los estomas se encuentra modulado por pequeños péptidos de secreción, los péptidos EPF1, EPF2 y EPFL9, que se encuentran en las hojas. La familia de péptidos EPF/EPFL están conservados en las plantas terrestres, sin embargo no se presentan en las algas tales como *Chlamydomonas*, *Ostreococcus* y *Cyanidioschyzon* (Takata *et al.*, 2013). Estos péptidos interactúan con receptores de membrana pertenecientes a la familia ERECTA y TMM, implicados en la activación de cascadas de señalización de tipo MAPKKK, modulando la presencia de los factores transcripcionales de tipo bHLH ICE/SCRM, FAMA y MUTE, que participan en la regulación del desarrollo estomático (Simmons y Bergmann, 2016).

Cuando se comparó la secuencia de los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 con los péptidos AtEPF1 y AtEPF2 respectivamente, se observó que en dichas secuencias todos los residuos de cisteína se mantienen conservados, así como los residuos de aminoácidos localizados en la región del sitio corte que da lugar al péptido maduro. Al analizar la secuencia de los péptidos AtEPF1 y PvEPF1 encontramos que, si bien, en algunos casos no eran los mismos residuos de aminoácidos, estos eran equivalentes entre sí; es decir, pertenecían al mismo grupo. Al analizar la secuencia de los péptidos AtEPF2 y PvEPF2, observamos que las diferencias en los residuos de aminoácidos se daban entre grupos equivalentes y no equivalentes, lo que podría estar alterando las características de los péptidos. Al realizar el agrupamiento por similitud de secuencia de los péptidos se observó la formación de dos grupos, uno que incluye a las secuencias de péptidos correspondientes a los EPF1 y otro que agrupa a los péptidos

correspondientes al EPF2. Este mismo tipo de agrupamiento se encontró en los análisis filogenéticos reportados por Takata *et al.* (2013), Chater *et al.* (2016) y Caine *et al.* (2017), en donde se observó que, tanto los péptidos pertenecientes al grupo EPF1 como EPF2, a pesar de pertenecer al mismo clado, estos se encuentran separados entre sí, colocando al péptido PpEPF1 como un grupo externo. Cabe resaltar que los factores transcripcionales SPCH, MUTE, FAMA e ICE/SCRM, que modulan el proceso de diferenciación celular durante la formación de los estomas, también muestran una alta conservación entre especies (Chater *et al.*, 2016; Caine *et al.*, 2017). En conjunto, estos resultados muestran que existe un alto nivel de conservación entre los péptidos PvEPF1 y PvEPF2 y los péptidos AtEPF1 y AtEPF2, respectivamente, por lo que se puede sugerir que dichos péptidos desarrollan funciones similares en la modulación del desarrollo estomático.

Conservación de la respuesta de la sobre expresión del péptido PvEPF1 en diferentes especies vegetales

Mediante el uso de la manipulación genética, por sobre-expresión o mutación de los genes de estos péptidos, es posible disminuir la densidad estomática. Se ha demostrado que este efecto da como resultado un incremento en la eficiencia de uso de agua. Esta mejora se ha observado en *Arabidopsis* (Masle *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2010; Franks *et al.*, 2015; Hepworth *et al.*, 2015), álamo (Wang *et al.*, 2016; Sha *et al.*, 2019), trigo (Ly *et al.*, 2017), cebada (Hughes *et al.*, 2017) y tabaco (Yu *et al.*, 2008). Cabe resaltar que la mayoría de los trabajos realizados en estomas han sido realizados en pastos y cereales, mientras que el presente trabajo aborda la caracterización de la función de los EPFs de frijol, perteneciente al grupo de las leguminosas con lo que se enriquece la información previa. Otro aspecto que es importante de resaltar es la diferencia en la hoja de las monocotiledóneas con respecto a las dicotiledóneas, propiciando que el desarrollo de estomas sea diferente entre ellas.

El objetivo de esta tesis fue determinar si la función de los péptidos EPF1 y EPF2 del frijol es similar a la descrita para los mismos péptidos de *Arabidopsis*, dado el alto nivel de similitud entre ellos. Para ello se decidió seguir una estrategia genética, utilizando las líneas sobre-expresoras de los péptidos de interés, un estudio común que ha funcionado para el análisis funcional de los EPFs de otras especies vegetales. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que al sobre-expresar el transcrito que codifica para el péptido PvEPF1 en

la línea Col0 de Arabidopsis se obtuvo una disminución en el índice y la densidad estomática en las líneas independientes 1AM1, 1AT6 y 1A21. No obstante, estas diferencias no fueron significativas para la AtEPF1OE con respecto a la línea silvestre. Sin embargo, cuando se comparó el fenotipo observado en las líneas sobre-expresoras de *PvEPF1* con el fenotipo previamente reportado para la sobre-expresión de *AtEPF1* se pudo apreciar una gran similitud entre ellos. En caso del IM se observaron diferencias significativas con respecto a Col0 en las líneas 1AT6, 1A21 y 1A23; mientras que la línea 1AM2 presentó una fuerte tendencia a incrementar el IM. Diversos autores han reportado que la sobre-expresión de *AtEPF1* inhibe la maduración de los estomas, generando un incremento de meristemoides arrestados (Hara *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2017). Nuestros datos muestran que en las líneas independientes 1AM1, 1AT6 y 1A21 el péptido PvEPF1 actúa de forma similar al péptido AtEPF1, regulando negativamente el desarrollo de los estomas, en el proceso de amplificación y suprimiendo la transición de meristemoide a CMG, resultando en una transdiferenciación del meristemoide en células de pavimento (Hara *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012).

La disminución en la DE y/o en el IE es un resultado característico que se obtiene a partir de la sobre-expresión de *EPF1*. Esto se ha reportado en diferentes especies vegetales, como álamo, cebada, trigo y arroz, entre otras (Wang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Hughes *et al.*, 2017; Dunn *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2019). En el caso del álamo, a partir de la sobre-expresión de *PdEPF1* en plantas de álamo, se encontró que las líneas sobre-expresoras mostraron una disminución en la DE con respecto a la línea silvestre; además, se observó un incremento en el tamaño de los estomas en estas líneas (Wang *et al.*, 2016). Así mismo, Liu *et al.* (2019), reportaron que una sobre-expresión ectópica de *PdEPF3*, el cual actúa de forma similar a *PdEPF1*, en plantas de la línea Col0 de Arabidopsis dio lugar a una disminución de la DE entre un 20-24% ,con respecto a línea silvestre. La DE de las líneas sobre-expresoras con respecto a la línea mutante *epf1-1* mostró una disminución de aproximadamente el 50%. Estos datos en conjunto indican que tanto PdEPF1 como PdEPF3 actúan de forma similar a AtEPF1, lo que los llevó a proponer que dichos péptidos presentan una redundancia funcional en plantas de álamo. Resultados similares se obtuvieron tras la sobre-expresión de los *EPF1* de cebada (*HvEPF1*) y de trigo (*TaEPF1*), tanto en Arabidopsis como en cebada o trigo, respectivamente (Hughes *et al.*, 2017; Dunn *et al.*, 2019). Cabe hacer notar que en el caso

del *TaEPF1*, la reducción en la DE fue más severa en las plantas transgénicas de trigo que en las de Arabidopsis. La sobre-expresión ectópica del *EPF1* de arroz (*OsEPF1*), en Arabidopsis y en arroz, también dio lugar a un aumento en el número de meristemoides arrestados, sugiriendo que los altos niveles del *OsEPF1* provocó una inhibición en el proceso de diferenciación que lleva a la formación de un estoma maduro, y provocando entonces menores niveles en el IE y la DE (Lu *et al.*, 2019).

Los datos obtenidos en el presente trabajo para el péptido PvEPF1 se suman a los descritos previamente para el álamo, la cebada, el trigo y el arroz, mostrando que la alta similitud en la secuencia de los EPF1 de diferentes especies vegetales correlaciona con la conservación de sus efectos en el desarrollo de los estomas cuando éstos se sobre-expresan. Así mismo, los resultados obtenidos para PvEPF1 indican que, como el resto de los EPF1, éste actúa como un regulador negativo en el desarrollo estomático. De tal manera que, en su conjunto, los datos sugieren fuertemente que los EPFs de arroz, trigo, frijol y Arabidopsis son péptidos ortólogos entre sí.

Sobre expresión del péptido PvEPF2 en la línea silvestre de Arabidopsis

La determinación de la función del péptido EPF2 de frijol en plantas silvestres de Arabidopsis realizada en esta tesis demostró que la sobre-expresión del gen *PvEPF2* provocó una disminución en la formación de estomas, como lo revelaron los fenotipos mostrados por las líneas transgénicas analizadas (2BC, 2BD, 2BI, 2BK y 2BM), presentando un menor IE que la línea silvestre, permitiendo inferir que PvEPF2 participa como regulador negativo del desarrollo estomático. De acuerdo con la participación de EPF2 en una etapa más temprana del desarrollo de los estomas que el EPF1 en Arabidopsis (Hunt y Gray, 2009), las plantas de Arabidopsis sobre-expresando *PvEPF2* mostraron ausencia de células arrestadas durante el proceso de diferenciación, al igual que la sobre-expresión de *AtEPF2* (Hunt y Gray, 2009).

Resultados similares se han obtenido con los péptidos EPF2 de arroz (*OsEPF2*) (Lu *et al.* 2019) y de trigo (*TaEPF2*) (Dunn *et al.*, 2019). Sin embargo, en el caso del *TaEPF2* la reducción en la DE no ocurre a los niveles como al sobre-expresar el péptido endógeno *AtEPF2* (Dunn *et al.*, 2019). Este último patrón también se obtuvo con la sobre-expresión del *PvEPF2* que, aunque causa una disminución en la DE, ésta no disminuye al mismo nivel que con el *AtEPF2*.

En los resultados obtenidos encontramos que únicamente las líneas 2BD y 2BI muestra una disminución significativa tanto en IE como en DE, presentando un fenotipo similar al reportado previamente para Arabidopsis. Para el resto de las líneas, únicamente en el IE se observan diferencias significativas con respecto a Col0, mientras que en caso de la DE no hay diferencias significativas. Estos resultados podrían deberse al bajo porcentaje de similitud e identidad que hay entre los péptidos PvEPF2 y AtEPF2; dado que estos péptido interactúan con los receptores de membrana ER y TMM, la diferencia entre ambos péptidos podría disminuir el reconocimiento con los receptores de membrana y por lo tanto repercuta en la activación de la cascada de señalización que inhibe la entrada al linaje estomático. Cabe mencionar que una demostración rigurosa de esta afirmación sería la complementación de la mutante con el péptido heterólogo correspondiente, expresado a partir del promotor nativo para cada uno de ellos.

Como se mencionó anteriormente, la sobre-expresión de estos péptidos en diferentes especies vegetales ha tenido como consecuencia una mejora en la eficiencia de uso del agua (EUA) (Franks *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Dunn *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019), sugiriendo que estas plantas modificadas siguen incorporando la misma cantidad de carbono, a pesar de contar con menos estomas. A esta observación se suma el dato de que la capacidad fotosintética en estas plantas no se ve alterada (Franks *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). Estas observaciones generan una aparente paradoja, la cual, a la fecha no se ha resuelto. Por tanto, cabe preguntarse si existe algún mecanismo compensatorio que le permite a la planta utilizar más eficientemente la menor cantidad de carbono que entra en forma de CO₂ o bien, la planta utiliza menos CO₂ que el que llega a ingresar a las células fotosintéticas de las hojas.

Los datos reportados a la fecha en relación a los efectos de la sobre-expresión de los *EPFs* sobre el uso del agua en cultivos de interés agronómico han sido solamente en gramíneas (monocotiledóneas), y no han abordado su estudio, a excepción de Arabidopsis, en especies dicotiledóneas. Por tanto, el determinar si estos péptidos tienen efectos similares en otros cultivos como leguminosas que son dicotiledóneas de importancia económica (e.g. frijol y soya) resulta de interés por su posible impacto en su producción, en particular, bajo

condiciones de baja disponibilidad de agua, una condición ambiental que resalta como un riesgo cada vez mayor para la agricultura mundial.

Uno de nuestros intereses principales es tratar de mejorar el desempeño del cultivo de frijol bajo condiciones de sequía, sobre todo porque dentro de las leguminosas de consumo humano más importante se encuentra el frijol (Gepts, 2001, Broughton *et al.*, 2003; Beebe, 2012, Polania *et al.*, 2016, Khoury *et al.*, 2014). Este grano generalmente se cultiva bajo condiciones de temporal y su producción cada vez se ve más afectada debido a los constantes e impredecibles períodos de sequía. Sin embargo, una de las limitantes para aplicar la misma estrategia que la realizada para los cultivos descritos, es que el frijol es una especie difícil de transformar; de ahí que, el análisis funcional de los PvEPFs no se haya realizado en un sistema homólogo. Por tanto, la prueba de concepto para estos factores en especies de leguminosas se tendrá que llevar a cabo, por ahora, en especies alternativas, como podría ser soya (*G. max*), la cual es posible transformar reproduciblemente, o en alguna leguminosa modelo como *Medicago truncatula*.

Los resultados obtenidos en esta tesis han permiten avanzar en la caracterización funcional de los EPF de frijol, demostrando que su sobre-expresión en *Arabidopsis* tuvo efectos similares a los obtenidos para EPFs de otras especies en donde se han utilizado para mejorar la eficiencia de uso del agua, a través de generar plantas que los sobre-expresan ectópicamente. Con base en estos resultados, estos resultados permiten sugerir que su funcionamiento durante el desarrollo de los estomas en las hojas de frijol es similar al que se ha demostrado en *Arabidopsis*, lo cual representa una contribución al conocimiento fundamental de este proceso en leguminosas.

CONCLUSIONES

Dado que la aparición de los estomas, en conjunto con el sistema radicular, han sido un factor fundamental en la evolución de las plantas para la colonización del medio terrestre es de esperarse que exista un alto grado de conservación en los mecanismos involucrados en el desarrollo funcional de los estomas. A partir del análisis de las secuencias de los péptidos correspondientes a EPF1 y EPF2, respectivamente, se evidenció que guarda un alto un alto grado de conservación con todas las secuencias incluidas en este estudio, aunque existe una clara separación entre los péptidos pertenecientes al grupo EPF1 y EPF2. Los EPFs muestran la conservación de regiones específicas que incluyen al sitio de corte, para la formación del péptido maduro, y los residuos de cisteína, que forman los enlaces disulfuro intramoleculares que darán la conformación al péptido maduro. Tomando en cuenta el alto grado de conservación que hay entre los péptidos EPF1 y EPF2 de diversas especies podemos sugerir fuertemente que su función también se encuentra altamente conservada.

Particularmente, al sobre-expresar a *PvEPF1* se observó una disminución en el índice y la densidad de estomas en las líneas 1AM1, 1AT6 y 1A21 con respecto a Col0. En caso de la línea 1A23, hay diferencias significativas en la DE mas no en el IE. Se evidenció que el fenotipo de las líneas 1AM1, 1AT6 y 1A21 es similar al reportado previamente para *Arabidopsis*. Para el IM las líneas 1AT6,1A21 y 1A23 hubo diferencias significativas con respecto a Col 0, la línea 1AM2 presentó una fuerte tendencia a incrementar su IM. A partir de las observaciones realizadas en el índice y densidad estomático e índice de meristemoides se puede sugerir fuertemente que el péptido *PvEPF1* realiza la misma función de su ortólogo *AtEPF1*, actuando como regulador negativo en el desarrollo estomático.

La sobre-expresión de *PvEPF2* en plantas de *Arabidopsis* no generó un fenotipo penetrante en todas las líneas transformadas; únicamente las líneas 2BD y 2BI presentó diferencias significativas en DE e IE. El resto de las líneas, a pesar de mostrar una tendencia disminuir la cantidad de estomas no hay diferencias significativas con respecto a Col0. El fenotipo de la línea 2BI fue similar al reportado previamente en *Arabidopsis*, sugiriendo que en esta línea el péptido *PvEPF2* está actuando de forma similar a *AtEPF2* al regular negativamente el desarrollo estomático.

LITERATURA CONSULTADA

- Abbate**, P. E., Dardanelli, J. L., Cantarero, M. G., Maturano, M., Melchiori, R. J. M., & Suero, E. E. (2004). Climatic and water availability effects on water-use efficiency in wheat. *Crop Science*, *44*(2), 474-483.
- Abrash**, E. B., & Bergmann, D. C. (2010). Regional specification of stomatal production by the putative ligand Challah. *Development*, *137*(3), 447-455.
- Acosta-Díaz**, E., Trejo-López, C., del Mar Ruiz-Posadas, L., Padilla-Ramírez, J. S., & Acosta-Gallegos, J. A. (2004). Adaptación del frijol a sequía en la etapa reproductiva. *Terra Latinoamericana*, *22*(1), 49-58.
- Adrian**, J., Chang, J., Ballenger, C. E., Bargmann, B. O., Alassimone, J., Davies, K. A., ... & Bergmann, D. C. (2015). Transcriptome dynamics of the stomatal lineage: birth, amplification, and termination of a self-renewing population. *Developmental Cell*, *33*(1), 107-118.
- Aphalo**, P. J., & Jarvis, P. G. (1991). Do stomata respond to relative humidity?. *Plant, Cell & Environment*, *14*(1), 127-132.
- Agüera**, F., Villalobos, F. J., & Orgaz, F. (1997). Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus*, L.) genotypes differing in early vigour using a simulation model. In *Developments In Crop Science* (Vol. 25, pp. 145-154). Elsevier.
- Battaglia**, M., & Covarrubias, A. A. (2013). Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers In Plant Science*, *4*, 190.
- Beebe**, S.E., Rao, I.M., Blair, M. y Acosta-Gallegos, J.A. (2010) Phenotyping common beans for adaptation to drought. In: Ribaut, J.M., Monneveux, P. (Eds.), Drought Phenotyping in Crops: From Theory to Practice. Generation Challenge Program Special Issue on Phenotyping. *Generation Challenge Program Of Cgiar*, Mexico City, Mexico, pp. 311–334
- Beebe**, S. (2012). 5 Common Bean Breeding in the Tropics. *Plant Breeding Reviews*, *36*(36), 357-426.
- Bergmann**, D. C., Lukowitz, W., & Somerville, C. R. (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, *304*(5676), 1494-1497.
- Bergmann**, D. C., & Sack, F. D. (2007). Stomatal development. *Annual Review Of Plant Biology*, *58*, 163-181.
- Berry**, S. K., Kalra, C. L., Sehgal, R. C., Kulkarni, S. G., Sukhvir, K., Arora, S. K., & Sharma, B. R. (1988). Quality characteristics of seeds of five okra (*Abelmoschus esculentus* L.) cultivars. *Journal Of Food Science And Technology*, *25*(5), 303-305.

- Berry, J. A., Beerling, D. J., & Franks, P. J. (2010).** Stomata: key players in the earth system, past and present. *Current Opinion In Plant Biology*, 13(3), 232-239.
- Bhagsari, A. S., Brown, R. H., & Schepers, J. S. (1976).** Effect of Moisture Stress on Photosynthesis and Some Related Physiological Characteristics in Peanut 1. *Crop Science*, 16(5), 712-715.
- Bhatt, R. K. (1990).** Seasonal variation in light absorption and transpiration in Prunus, Celtis and Grewia. *Indian Journal Of Forestry*, 13(2), 118-121.
- Blatt, M. R. (2016).** Plant physiology: redefining the enigma of metabolism in stomatal movement. *Current Biology*, 26(3), R107-R109.
- Blum, A. (2005).** Mitigation of drought stress by crop management.
- Blum, A. (2009).** Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*, 112(2-3), 119-123.
- Blum, A. (2011).** Drought resistance—is it really a complex trait?. *Functional Plant Biology*, 38(10), 753-757.
- Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1996).** Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends In Biotechnology*, 14(3), 89-97.
- Bray, E. A. (1993).** Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103(4), 1035.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E. (2000).** Responses to abiotic stresses. In 'Biochemistry and molecular biology of plants'. (Eds BB Buchanan, W Gruissem and RL Jones) pp. 1158–1203. (American Society Of Plant Physiologists: Rockville, MD)
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003).** Beans (Phaseolus spp.)—model food legumes. *Plant And Soil*, 252(1), 55-128.
- Carlson, J. E., Adams, C. A., & Holsinger, K. E. (2016).** Intraspecific variation in stomatal traits, leaf traits and physiology reflects adaptation along aridity gradients in a South African shrub. *Annals Of Botany*, 117(1), 195-207.
- Challinor, A. J., Koehler, A. K., Ramirez-Villegas, J., Whitfield, S., & Das, B. (2016).** Current warming will reduce yields unless maize breeding and seed systems adapt immediately. *Nature Climate Change*, 6(10), 954-958.
- Chater, C., Kamisugi, Y., Movahedi, M., Fleming, A., Cuming, A. C., Gray, J. E., & Beerling, D. J. (2011).** Regulatory mechanism controlling stomatal behavior conserved across 400 million years of land plant evolution. *Current Biology*, 21(12), 1025-1029.

- Chater**, C., Peng, K., Movahedi, M., Dunn, J. A., Walker, H. J., Liang, Y. K., ... & Hetherington, A. M. (2015). Elevated CO₂-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Current Biology*, 25(20), 2709-2716.
- Chater**, C. C., Caine, R. S., Fleming, A. J., & Gray, J. E. (2017). Origins and evolution of stomatal development. *Plant Physiology*, 174(2), 624-638.
- Chaves**, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., ... & Pinheiro, C. (2002). How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals Of Botany*, 89(7), 907-916.
- Chaves**, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239-264.
- Chaves**, M. M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J. M., Santos, T., Regalado, A. P., ... & Lopes, C. M. (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals Of Botany*, 105(5), 661-676.
- Cook**, B. I., Seager, R., & Smerdon, J. E. (2014). The worst North American drought year of the last millennium: 1934. *Geophysical Research Letters*, 41(20), 7298-7305.
- Comstock**, J. P. (2002). Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal Of Experimental Botany*, 53(367), 195-200.
- Condon**, A. G., Richards, R. A., Rebetzke, G. J., & Farquhar, G. D. (2004). Breeding for high water-use efficiency. *Journal Of Experimental Botany*, 55(407), 2447-2460.
- Doheny-Adams**, T., Hunt, L., Franks, P. J., Beerling, D. J., & Gray, J. E. (2012). Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1588), 547-555.
- Dodd**, I. C. (2003). Hormonal interactions and stomatal responses. *Journal Of Plant Growth Regulation*, 22(1), 32-46.
- Dodd**, I. C. (2005). Root-to-shoot signalling: assessing the roles of 'up' in the up and down world of long-distance signalling in planta. *Plant And Soil*, 274(1), 251-270.
- Dodd**, I. C., & Ryan, A. C. (2016). Whole-Plant Physiological Responses to Water-Deficit Stress. *ELS*, 1-9.
- Dunn**, J., Hunt, L., Afsharinagar, M., Meselmani, M. A., Mitchell, A., Howells, R., ... & Gray, J. E. (2019). Reduced stomatal density in bread wheat leads to increased water-use efficiency. *Journal Of Experimental Botany*, 70(18), 4737-4748.

- Dwivedi**, S. L., Nigam, S. N., Rao, R. N., Singh, U., & Rao, K. V. S. (1996). Effect of drought on oil, fatty acids and protein contents of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *Field Crops Research*, 48(2-3), 125-133.
- Engineer**, C. B., Ghassemian, M., Anderson, J. C., Peck, S. C., Hu, H., & Schroeder, J. I. (2014). Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development. *Nature*, 513(7517), 246-250.
- Edwards**, D., & Axe, L. (1992). Stomata and mechanics of stomatal functioning in some early land plants. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, (147), 59-73.
- Fang**, X., Turner, N. C., Yan, G., Li, F., & Siddique, K. H. (2010). Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. *Journal Of Experimental Botany*, 61(2), 335-345.
- FAO**, M. (2001). Perfiles Nutricionales por Países-Nicaragua. FAO, Seguridad Alimentaria y Nutricional-Conceptos Básicos para Uso del Personal Agropecuario de Nicaragua, Nicaragua. *OPS/OMS*.
- Franks**, P. J., & Farquhar, G. D. (1999). A relationship between humidity response, growth form and photosynthetic operating point in C3 plants. *Plant, Cell & Environment*, 22(11), 1337-1349.
- Franks**, P. J., & Farquhar, G. D. (2007). The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiology*, 143(1), 78-87.
- Franks**, P. J., Drake, P. L., & Beerling, D. J. (2009). Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: an analysis using *Eucalyptus globulus*. *Plant, Cell & Environment*, 32(12), 1737-1748.
- Franks**, P. J., Leitch, I. J., Ruzsala, E. M., Hetherington, A. M., & Beerling, D. J. (2012). Physiological framework for adaptation of stomata to CO₂ from glacial to future concentrations. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1588), 537-546.
- Franks**, P. J., W. Doheny-Adams, T., Britton-Harper, Z. J., & Gray, J. E. (2015). Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, 207(1), 188-195.
- Frederick**, J. R., Camp, C. R., & Bauer, P. J. (2001). Drought-stress effects on branch and mainstem seed yield and yield components of determinate soybean. *Crop Science*, 41(3), 759-763.
- Ford**, C. W., & Wilson, J. R. (1981). Changes in levels of solutes during osmotic adjustment to water stress in leaves of four tropical pasture species. *Functional Plant Biology*, 8(1), 77-91.

- Geisler**, M., Yang, M., & Sack, F. D. (1998). Divergent regulation of stomatal initiation and patterning in organ and suborgan regions of the Arabidopsis mutants too many mouths and four lips. *Planta*, 205(4), 522-530.
- Gepts**, P (2001) Phaseolus vulgaris (Beans). In: Encyclopedia of Genetics. Academic Press, pp 1444–1445.
- Gindel**, I. (1969). Stomatal number and size as related to soil moisture in tree xerophytes in Israel. *Ecology*, 50(2), 263-267.
- Han**, X., Tang, S., An, Y., Zheng, D. C., Xia, X. L., & Yin, W. L. (2013). Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in Arabidopsis. *Journal Of Experimental Botany*, 64(14), 4589-4601.
- Han**, S. K., Qi, X., Sugihara, K., Dang, J. H., Endo, T. A., Miller, K. L., ... & Torii, K. U. (2018) MUTE directly orchestrates cell-state switch and the single symmetric division to create stomata. *Developmental Cell*, 45(3), 303-315.
- Hara**, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C., & Kakimoto, T. (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, 21(14), 1720-1725.
- Hara**, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K. M., ... & Kakimoto, T. (2009). Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis leaves. *Plant And Cell Physiology*, 50(6), 1019-1031.
- Heinemann**, A. B., Ramirez-Villegas, J., Stone, L. F., & Didonet, A. D. (2017). Climate change determined drought stress profiles in rainfed common bean production systems in Brazil. *Agricultural And Forest Meteorology*, 246, 64-77.
- Hepworth**, C., Doheny-Adams, T., Hunt, L., Cameron, D. D., & Gray, J. E. (2015). Manipulating stomatal density enhances drought tolerance without deleterious effect on nutrient uptake. *New Phytologist*, 208(2), 336-341.
- Hetherington**, A. M., & Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424(6951), 901-908.
- Hoekstra**, A. Y., & Mekonnen, M. M. (2012). The water footprint of humanity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(9), 3232-3237.
- Horst**, R. J., Fujita, H., Lee, J. S., Rychel, A. L., Garrick, J. M., Kawaguchi, M., ... & Torii, K. U. (2015). Molecular framework of a regulatory circuit initiating two-dimensional spatial patterning of stomatal lineage. *PLoS Genet*, 11(7), e1005374.

- Hronková, M., Wiesnerová, D., Šimková, M., Skůpa, P., Dewitte, W., Vráblová, M., ... & Šantrůček, J.** (2015). Light-induced STOMAGEN-mediated stomatal development in *Arabidopsis* leaves. *Journal Of Experimental Botany*, *66*(15), 4621-4630.
- Hsiao, T. C.** (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review Of Plant Physiology*, *24*(1), 519-570.
- Hu, Y. C., Shao, H. B., Chu, L. Y., & Gang, W.** (2006). Relationship between water use efficiency (WUE) and production of different wheat genotypes at soil water deficit. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *53*(2), 271-277.
- Hughes, J., Hepworth, C., Dutton, C., Dunn, J. A., Hunt, L., Stephens, J., ... & Gray, J. E.** (2017). Reducing stomatal density in barley improves drought tolerance without impacting on yield. *Plant Physiology*, *174*(2), 776-787.
- Hunt, L., & Gray, J. E.** (2009). The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Current Biology*, *19*(10), 864-869.
- Hunt, L., Bailey, K. J., & Gray, J. E.** (2010). The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytologist*, *186*(3), 609-614.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., & Panneerselvam, R.** (2006). Paclobutrazol influences on vegetative growth and floral characteristics of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Indian Journal of Applied and Pure Biology*, *21*, 369-372.
- Jones, M. M., Osmond, C. B., & Turner, N. C.** (1980). Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Functional Plant Biology*, *7*(2), 193-205.
- Kawakami, T., Morgan, T. J., Nippert, J. B., Ocheltree, T. W., Keith, R., Dhakal, P., & Ungerer, M. C.** (2011). Natural selection drives clinal life history patterns in the perennial sunflower species, *Helianthus maximiliani*. *Molecular Ecology*, *20*(11), 2318-2328.
- Kanaoka, M. M., Pillitteri, L. J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N. L., Takabayashi, J., ... & Torii, K. U.** (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *The Plant Cell*, *20*(7), 1775-1785.
- Kato, Y., Kamoshita, A., & Yamagishi, J.** (2008). Preflowering abortion reduces spikelet number in upland rice (*Oryza sativa* L.) under water stress. *Crop Science*, *48*(6), 2389-2395.
- Kavar, T., Maras, M., Kidrič, M., Šuštar-Vozlič, J., & Meglič, V.** (2008). Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding*, *21*(2), 159-172.

- Kelley**, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845-858.
- Khoury**, C. K., Bjorkman, A. D., Dempewolf, H., Ramirez-Villegas, J., Guarino, L., Jarvis, A., ... & Struik, P. C. (2014). Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(11), 4001-4006.
- Kinoshita**, T., Ono, N., Hayashi, Y., Morimoto, S., Nakamura, S., Soda, M., ... & Shimazaki, K. I. (2011). FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening. *Current Biology*, *21*(14), 1232-1238.
- Kramer**, P. J., & Boyer, J. S. (1995). *Water Relations Of Plants And Soils*. Academic press.
- Lawson**, T. (2009). Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist*, *181*(1), 13-34.
- Lazaridou**, M., & Noitsakis, B. (2003). The effect of water deficit on yield and water use efficiency of lucerne. In *Optimal forage systems for animal production and the environment. Proceedings of the 12th Symposium of the European Grassland Federation, Pleven, Bulgaria, 26-28 May 2003* (pp. 344-347). Bulgarian Association for Grassland and Forage Production (BAGFP).
- Lazaridou**, M., & Koutroubas, S. D. (2004, September). Drought effect on water use efficiency of berseem clover at various growth stages. In *New directions for a diverse planet: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia* (Vol. 26, pp. 467-475).
- Lee**, E., Lucas, J. R., Goodrich, J., & Sack, F. D. (2014). Arabidopsis guard cell integrity involves the epigenetic stabilization of the FLP and FAMA transcription factor genes. *The Plant Journal*, *78*(4), 566-577.
- Lee**, J. S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayevich, D., Kanaoka, M. M., McAbee, J. M., ... & Torii, K. U. (2012). Direct interaction of ligand–receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes & Development*, *26*(2), 126-136.
- Lee**, J. S., Hnilova, M., Maes, M., Lin, Y. C. L., Putarjunan, A., Han, S. K., ... & Torii, K. U. (2015). Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature*, *522*(7557), 439-443.
- Leport**, L., Turner, N. C., Davies, S. L., & Siddique, K. H. M. (2006). Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars under terminal drought. *European Journal of Agronomy*, *24*(3), 236-246.
- Levitt**, J. (1972) Responses of Plants to Environmental Stresses, *Academic Press*

- Li, Y., Li, H., Li, Y., & Zhang, S. (2017)** Improving water-use efficiency by decreasing stomatal conductance and transpiration rate to maintain higher ear photosynthetic rate in drought-resistant wheat. *The Crop Journal*, 5(3), 231-239.
- Lichtenthaler, H. K. (1996).** Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal Of Plant Physiology*, 148(1-2), 4-14.
- Liu, S., Jia, F., Jiao, Z., Wang, J., Xia, X., & Yin, W. (2019).** Ectopic expression of secretory peptide PdEPF3 in Arabidopsis confers drought tolerance with reduced stomatal density. *History*, 88(2), 3627.
- Liu, Y., Qin, L., Han, L., Xiang, Y., & Zhao, D. (2015).** Overexpression of maize SDD1 (ZmSDD1) improves drought resistance in *Zea mays* L. by reducing stomatal density. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(1), 147-159.
- Lonbani, M., & Arzani, A. (2011).** Morpho-physiological traits associated with terminal drought-stress tolerance in triticale and wheat. *Agronomy Research*, 9(1-2), 315-329.
- Lobell, D. B., Roberts, M. J., Schlenker, W., Braun, N., Little, B. B., Rejesus, R. M., & Hammer, G. L. (2014).** Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the US Midwest. *Science*, 344(6183), 516-519.
- Lu, J., He, J., Zhou, X., Zhong, J., Li, J., & Liang, Y. K. (2019).** Homologous genes of epidermal *patterning factor regulate stomatal development in rice*. *Journal Of Plant Physiology*, 234, 18-27.
- MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C. (2007).** Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 445(7127), 537-540.
- Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Phan Tran, L. S., & Nguyen, H. T. (2009).** Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant And Cell Physiology*, 50(7), 1260-1276.
- Masle, J., Gilmore, S. R., & Farquhar, G. D. (2005).** The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. *Nature*, 436(7052), 866-870.
- Matos, J. L., Lau, O. S., Hachez, C., Cruz-Ramírez, A., Scheres, B., & Bergmann, D. C. (2014).** Irreversible fate commitment in the Arabidopsis stomatal lineage requires a FAMA and RETINOBLASTOMA-RELATED module. *Elife*, 3, e03271.
- McAdam, S. A., Manzi, M., Ross, J. J., Brodrigg, T. J., & Gómez-Cadenas, A. (2016).** Uprooting an abscisic acid paradigm: Shoots are the primary source. *Plant Signaling & Behavior*, 11(6), 652-659.
- Medrano, H., Flexas, J., & Galmés, J. (2009).** Variability in water use efficiency at the leaf level among Mediterranean plants with different growth forms. *Plant and Soil*, 317(1), 17-29.

- Merah, O.** (2001). Potential importance of water status traits for durum wheat improvement under Mediterranean conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 137(2), 139-145.
- Nadeau, J. A., & Sack, F. D.** (2002). Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science*, 296(5573), 1697-1700.
- Nath, A. K., Kumari, S. U. M. A. N., & Sharma, D. R.** (2005). In vitro selection and characterization of water stress tolerant cultures of bell pepper. *Indian Journal of Plant Physiology*, 10(1), 14.
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J.** (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal Of Molecular Biology*, 302(1), 205-217.
- Ohashi-Ito, K., & Bergmann, D. C.** (2006). Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell*, 18(10), 2493-2505.
- Ohki, S., Takeuchi, M., & Mori, M.** (2011). The NMR structure of stomagen reveals the basis of stomatal density regulation by plant peptide hormones. *Nature Communications*, 2(1), 1-7.
- 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.
- Painuli, D. K., Tomar, S. S., Tembe, G. P., & Sharma, S. K.** (2002). *Raised-Sunken Bed Technology For Rainfed Vertisols Of High Rainfall Areas* (No. REP-9288. CIMMYT.).
- Passioura, J. B.** (1996). Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation*, 20(2), 79-83.
- Polania, J. A., Poschenrieder, C., Beebe, S., & Rao, I. M.** (2016). Effective use of water and increased dry matter partitioned to grain contribute to yield of common bean improved for drought resistance. *Frontiers In Plant Science*, 7, 660.
- Porter, J. R., Xie, L., Challinor, A. J., Cochrane, K., Howden, S. M., Iqbal, M. M., ... & Travasso, M. I.** (2014). Food security and food production systems. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability PartA: Global and Sectoral Aspects Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L., & Torii, K. U.** (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, 445(7127), 501-505.
- Pillitteri, L. J., Peterson, K. M., Horst, R. J., & Torii, K. U.** (2011). Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and commonalities among stem cell populations in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(9), 3260-3275.

- Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2012). Mechanisms of stomatal development. *Annual Review Of Plant Biology*, 63, 591-614.
- Potters**, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J., & Jansen, M. A. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends In Plant Science*, 12(3), 98-105.
- Qu**, X., Peterson, K. M., & Torii, K. U. (2017). Stomatal development in time: the past and the future. *Current Opinion In Genetics & Development*, 45, 1-9.
- Raissig**, M. T., Matos, J. L., Gil, M. X. A., Kornfeld, A., Bettadapur, A., Abrash, E., ... & Bergmann, D. C. (2017). Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science*, 355(6330), 1215-1218.
- Raven**, J. A. (2002). Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist*, 153(3), 371-386.
- Rao**, I. M. (2001). Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. *Handbook Of Plant And Crop Physiology*, 583-613.
- Rao**, I. M. (2014). Advances in improving adaptation of common bean and Brachiaria forage grasses to abiotic stress in the tropics. CRC Press.
- Robinson**, S., de Reuille, P. B., Chan, J., Bergmann, D., Prusinkiewicz, P., & Coen, E. (2011). Generation of spatial patterns through cell polarity switching. *Science*, 333(6048), 1436-1440.
- Rosales-Serna**, R., Ramirez-Vallejo, P., Acosta-Gallegos, J. A., Castillo-González, F., & Kelly, J. D. (2000). Grain yield and drought tolerance of common bean under field conditions. *Agrociencia*, 34(2), 153-165.
- Rosales**, M. A., Ocampo, E., Rodríguez-Valentín, R., Olvera-Carrillo, Y., Acosta-Gallegos, J., & Covarrubias, A. A. (2012). Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiology And Biochemistry*, 56, 24-34.
- Rosales**, M. A., Cuellar-Ortiz, S. M., de la Paz Arrieta-Montiel, M., Acosta-Gallegos, J., & Covarrubias, A. A. (2013). Physiological traits related to terminal drought resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 324-331.
- Royer**, D. L. (2001). Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 114(1-2), 1-28.
- Sadeghipour**, O., & Abbasi, S. (2012). Soybean response to drought and seed inoculation. *World Applied Sciences Journal*, 17, 55-60.

- Schewe, J.,** Heinke, J., Gerten, D., Haddeland, I., Arnell, N. W., Clark, D. B., ... & Kabat, P. (2014). Multimodel assessment of water scarcity under climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(9), 3245-3250.
- Schroeder, J. I.,** Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). Guard cell signal transduction. *Annual Review Of Plant Biology*, *52*(1), 627-658.
- Seemann, J. R.,** & Critchley, C. (1985). Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, *164*(2), 151-162.
- Serna, L.,** & Fenoll, C. (2000). Stomatal development in Arabidopsis: how to make a functional pattern. *Trends In Plant Science*, *5*(11), 458-460.
- HongBo, S.,** ZongSuo, L., MingAn, S., ShiMeng, S., & ZanMin, H. (2005). Investigation on dynamic changes of photosynthetic characteristics of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes during two vegetative-growth stages at water deficits. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, *43*(3-4), 221-227.
- HongBo, S.,** ZongSuo, L., & MingAn, S. (2006). Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, *47*(2), 132-139.
- Shao, H. B.,** Chu, L. Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C. X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, *331*(3), 215-225.
- Shao, H. B.,** Chu, L. Y., Lu, Z. H., & Kang, C. M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, *4*(1), 8.
- Shpak, E. D.,** McAbee, J. M., Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2005). Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science*, *309*(5732), 290-293.
- Simmons, A. R.,** & Bergmann, D. C. (2016). Transcriptional control of cell fate in the stomatal lineage. *Current Opinion in Plant Biology*, *29*, 1-8.
- Sinclair, T. R.,** Tanner, C. B., & Bennett, J. M. (1984). Water-use efficiency in crop production. *Bioscience*, *34*(1), 36-40.
- Sinclair, T. R.** (2012). Is transpiration efficiency a viable plant trait in breeding for crop improvement?. *Functional Plant Biology*, *39*(5), 359-365.
- Slatyer, R. O.** (1964). *Efficiency of water utilization by arid zone vegetation*. CSIRO-Commonwealth Scientific & Industrial Research Organization.
- Smirnov, N.** (1993). Tansley Review No. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 27-58.

- Sugano**, S. S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., & Hara-Nishimura, I. (2010). Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*, 463(7278), 241-244.
- Taiz**, L. y E. Zeiger. 2006. Plant Physiology. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Torii**, K. U. (2015). Stomatal differentiation: the beginning and the end. *Current Opinion In Plant Biology*, 28, 16-22.
- Thung**, M., & Rao, I. M. (1999). Integrated management of abiotic stresses. In *Common Bean Improvement In The Twenty-First Century* (pp. 331-370). Springer, Dordrecht.
- Turner**, N. C., Wright, G. C., & Siddique, K. H. M. (2001). Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments.
- Schoonhoven**, A. V., Voysest, O., & CIAT. (1989). Common bean in Latin America an their constraints. *Bean Production Problems In The Tropics*.
- Vatén**, A., & Bergmann, D. C. (2012). Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view. *EvoDevo*, 3(1), 1-9.
- Wang**, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J. C., & Zhang, S. (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(1), 63-73.
- Wang**, C., Liu, S., Dong, Y., Zhao, Y., Geng, A., Xia, X., & Yin, W. (2016). Pd EPF 1 regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density in poplar. *Plant Biotechnology Journal*, 14(3), 849-860.
- Waterhouse**, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.
- Wortmann**, C. S. (1998). *Atlas Of Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) Production In Africa* (No. 297). CIAT..
- Wu**, C. A., Lowry, D. B., Nutter, L. I., & Willis, J. H. (2010). Natural variation for drought-response traits in the Mimulus guttatus species complex. *Oecologia*, 162(1), 23-33.
- Yang**, M., & Sack, F. D. (1995). The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 7(12), 2227-2239.
- Yoo**, C. Y., Pence, H. E., Jin, J. B., Miura, K., Gosney, M. J., Hasegawa, P. M., & Mickelbart, M. V. (2010). The Arabidopsis GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. *The Plant Cell*, 22(12), 4128-4141.

Yu, H., Chen, X., Hong, Y. Y., Wang, Y., Xu, P., Ke, S. D., ... & Xiang, C. B. (2008). Activated expression of an Arabidopsis HD-START protein confers drought tolerance with improved root system and reduced stomatal density. *The Plant Cell*, 20(4), 1134-1151.

ANEXO

Anexo 1. Tablas

Tabla 1: Lista de oligonucleótidos utilizados durante la construcción de vectores

AÑO	No.	Nombre	TM	Secuencia (5'→ 3')
2019	3599	PVEPF2AQP CR FW	60	GTG GAT CTT GTT CGC CAT GC
	3600	PVEPF2AQP CR RV	60	GGC ACA TGC ACT TGT AAG CC
	513	PvEPF2B PacI Rv	73	CGC GTT AAT TAA ATT CCC GAT CTA GTA ACA TAG ATG ACA CCG CGC
	514	PvEPF2B ApaI FW	72	TAG GGC CCA TGA GCA TTT TGT CAT TTG AGG CC
2018	6976	PvEPF2A NcoI RV	62	CGGCCGCCATGGTCATGGAACAGGGT AGGACTTG
	6977	PvEPF2B NcoI RV	62	CGGCCGCCATGGTCAACCATTGGATG GTACACGG
	1568	PvEPF2A AscI FW V2	62	GGGGGCGCGCCATGAGGAGGACTTCT CTCTATGCTGCTG
	1462	PvEPF2B AscI FW	62	AGGCGCGCCATGAGCATTGTCATTT GAGG
	-	PvEPF2A FW	67.8	ATGAGGAGGACTTCTCTCTATGCTGC
	-	PvEPF2A RV	66.3	TCATGGAACAGGGTAGGACTTGTTA
	-	PvEPF2B FW	62.7	ATGAGCATTGTCATTTGAGG
	-	PvEPF2B RV	68.6	TCAACCATTGGATGGTACACGG
	361	AscI_GmEPF 2A_F	75.11	AGGCGCGCCATGAGCACTTTCTCCCTT GGAACT

	957	GmEPF2A FW	64.75	ATGAGCACTTTCTCCCTTGG
	9759	GmEPF2A_p reSTOP RV	67.98	ATTGGAGGGTACATGGTAGTATTTCCC
	364	GmEPF2A RV stop	65.38	TCAATTGGAGGGTACATGGTAGTATT
	1021	int_AtEPF1pr o FW	66.45	GCACTCACCAAAGCAGCAC
	1022	int_AtEPF2pr o FW	66.45	CCTCTGCCTCAACCAGAAAG

Tabla 2: Alineamiento de los EPFs putativos (Secuencia del péptido completo)

		10	20	30	40	50				
<i>PvEPF1/1-121</i>	1	MRRTSLY	-----	-----	AAAFF	ILFLLCVP	..VIISARHINLSPS	RDGGE	38	
<i>PvEPF2.1/1-115</i>	1	MTTSLG	-----	-----	THKCF	LILIFFTVVSM	TWSLRVIPNHSG	LAS	39	
<i>PvEPF2/1-113</i>	1	MSILSFE	-----	-----	AFKFF	LFLSFFLLLS	NGWSLGMIP	THVK	39	
<i>PpEPF1/1-138</i>	1	MALLTWL	-----	-----	LLLLL	LPLLFHVD	TANATSRVIL	LGTEA	39	
<i>AtEPF1/1-104</i>	1	MKSLLL	-----	-----	LAF	FLSFFFG	S..L..LARHL	PTSSH	33	
<i>AtEPF2/1-120</i>	1	MTKFVRK	-----	-----	Y	MFC	LVLVFAACSL	VVNSIRTP	38	
<i>GmEPFL7/1-116</i>	1	MSTFSLG	-----	-----	TPK	FL	IVVFFMVVS	ISWSLR	38	
<i>MtEPFL7/1-116</i>	1	MSTYSLR	-----	-----	AHKS	FLVVIF	FTVFSIGW	CLRVIP	39	
<i>MtEPF1/1-123</i>	1	MMKRSLV	-----	-----	YAAAF	VL	ILLYVP	..IIASSR	37	
<i>AtEPFL7/1-172</i>	1	MDHVNPTL	FHLKSL	SIFTLTLLY	ISSPH	FL	FKTLSMYEN	LRI	58	
<i>AtEPFL9/1-102</i>	1	MKHEMMN	-----	-----	IKPRC	ITIF	FL	FLLFALLL	37	
		60	70	80	90	100	110			
<i>PvEPF1/1-121</i>	39	ENRKD	-----	GIRMSK	VRRE	..RLHW	EGRMGRK	67	
<i>PvEPF2.1/1-115</i>	40	QEEKTTIK	DKKEE	-----	VKE	ENMG	MEL	62	
<i>PvEPF2/1-113</i>	40	QQQKAATE	..EN	-----	GAK	KDMR	MEL	59	
<i>PpEPF1/1-138</i>	40	ESRLPATDY	TDID	QSLFIS	SKNSKI	ETEG	ISPV	KAPKPS	82	
<i>AtEPF1/1-104</i>	34	VGMTGALKRQ	-----	RRR	PDTV	-----	50	
<i>AtEPF2/1-120</i>	39	EKKNAD	IEQAQ	THHKEI	-----	SKN	GGVE	MEM	66	
<i>GmEPFL7/1-116</i>	41	QKEKPTIR	DKKEE	-----	VKE	DNMG	MEL	63	
<i>MtEPFL7/1-116</i>	40	QEERTTI	DKKEG	-----	ARE	GSNV	MEL	62	
<i>MtEPF1/1-123</i>	38	FVGNKID	ESKGANQ	..NLHW	KGR	..SKH	TRRP	69	
<i>AtEPFL7/1-172</i>	59	SLIA	ILLHLF	-----	VSS	DTF	LDL	94	
<i>AtEPFL9/1-102</i>	38	ENTVSLLP	QVH	-----	LLN	SR	RR	55	
		120	130	140	150	160	170			
<i>PvEPF1/1-121</i>	68	-----	-----	-----	EIAG	SRLPDCSH	ACGS	CS	PCRL	121
<i>PvEPF2.1/1-115</i>	63	-----	-----	-----	YPTG	STVPDCSH	ACGP	PCS	PCKR	115
<i>PvEPF2/1-113</i>	60	-----	-----	-----	YPTG	SALPDCSH	ACGS	CF	PCKR	113
<i>PpEPF1/1-138</i>	83	-----	-----	-----	LLIG	SAP	EGH	TCG	ACS	138
<i>AtEPF1/1-104</i>	51	-----	-----	-----	QVAG	SRLPDCSH	ACGS	CS	PCRL	81
<i>AtEPF2/1-120</i>	67	-----	-----	-----	YPTG	S	LPDCSY	ACG	ACS	120
<i>GmEPFL7/1-116</i>	64	-----	-----	-----	YPTG	STIPDCSH	ACGP	PCS	PCKR	116
<i>MtEPFL7/1-116</i>	63	-----	-----	-----	YPTG	STIPDCSH	ACGP	PCS	PCKR	116
<i>MtEPF1/1-123</i>	70	-----	-----	-----	QVAG	SRLPDCSH	ACGS	CS	PCRL	123
<i>AtEPFL7/1-172</i>	95	DNECVI	YILVGS	FICCVI	CEVVD	KASG	SSIPDCSN	ACGP	PK	172
<i>AtEPFL9/1-102</i>	56	-----	-----	-----	HMI	G	STAPTCTYNE	CRG	CRYK	102
		180	190	200						
<i>PvEPF1/1-121</i>	99	LAE	AESCP	MAYK	CMCH	NKSY	PVP	---	121	
<i>PvEPF2.1/1-115</i>	93	---	IAESCP	I	VYRC	IGK	KYYH	VPSN	115	
<i>PvEPF2/1-113</i>	90	---	IAESCP	V	VYRC	MCKG	KYYR	RVPSN	113	
<i>PpEPF1/1-138</i>	115	FGSH	AACP	LG	YLGL	GHG	KSF	PI	138	
<i>AtEPF1/1-104</i>	82	VEE	AETCP	MAYK	CMCH	NKSY	PVP	---	104	
<i>AtEPF2/1-120</i>	97	---	VAESCP	S	IYRC	TGR	GRYY	HVPSRA	120	
<i>GmEPFL7/1-116</i>	94	---	IAESCP	I	VYRC	IGK	KYYH	VPSN	116	
<i>MtEPFL7/1-116</i>	94	---	MAESCP	M	VYRC	IGK	KYYH	VPSN	116	
<i>MtEPF1/1-123</i>	101	LAE	AESCP	MAYK	CMCH	NKSY	PVP	---	123	
<i>AtEPFL7/1-172</i>	149	---	ASE	ACRL	VYKGL	CKG	KYYH	VPSLT	172	
<i>AtEPFL9/1-102</i>	88	---	DP	INSAY	H	R	GV	CHR	102	

En el alineamiento del propéptido se muestra el porcentaje de identidad que hay entre las secuencias. Podemos observar que la mayor identidad se encuentra conservada en la región del péptido maduro. A menor intensidad de color menor porcentaje de identidad; mientras que a mayor intensidad de color mayor porcentaje de identidad.

Alineamiento realizado utilizando el software T-COFFEE. La imagen fue generada utilizando Jalview Version2

Tabla 3: Lista comparativa de aminoácidos entre los péptidos AtEPF1-PvEPF1

Posición	PÉPTIDOS		GRUPO
	AtEPF1	PvEPF1	
29	V	L	No polar
34	T	S2	Polar sin carga
44	N	H	Cargados positivamente

Tabla 4: Lista comparativa de aminoácidos entre los péptidos AtEPF2-PvEPF2

Posición	PÉPTIDOS		GRUPO
	AtEPF2	PvEPF2	
3	S ¹	A ²	¹ Polar sin carga ² No polar
8	Y ¹	H ²	¹ Aromáticos ² Cargados positivamente
13	A ¹	S ²	¹ No polar ² Polar sin carga
15	S ¹	F ²	¹ Polar sin carga ² Aromático
21	M	I	No polares
22	I	V	No polares
24	F	Y	Aromáticos
25	E ¹	K ²	¹ Cargados negativamente ² Cargados positivamente
27	S ¹	M ²	¹ Polar sin carga ² No polar
28	V	I	No polares
33	S ¹	P ²	¹ Polar sin carga ² No polar
35	I	V	No polares
41	R	K	Cargados positivamente
43	R	K	Cargados positivamente
46	H	R	Cargados positivamente
50	R ¹	N ²	¹ Cargados positivamente ² Polar sin carga
50	A	G	No polares

¹ y ² Indican al grupo al que pertenece cada residuo de aminoácido.

Anexo 2: Figuras suplementarias

Figura suplementaria 1: *pMDC32::35S pro::PvEPF1*

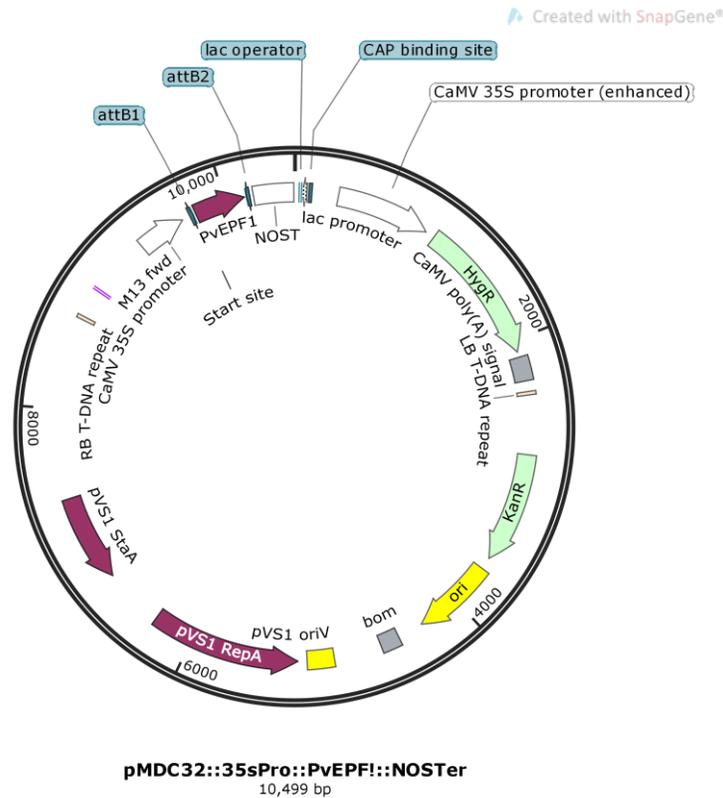


Figura suplementaria 1: Representación del vector pMDC32 utilizado para insertar a PvEPF1

El vector *pMDC32* fue utilizado para transformar plantas silvestres Col0 de *Arabidopsis* con la región codificante del gen *PvEPF1*. El vector contiene dos genes que confieren resistencia a agentes selectivos, uno para resistencia a Kanamicina (KanR), para seleccionar las colonias de bacterias transformadas; el segundo para la resistencia a Higromicina (HygR), para seleccionar las plantas transformadas.

Figura suplementaria 2: *pMDC32::35Spro::PvEPF2*

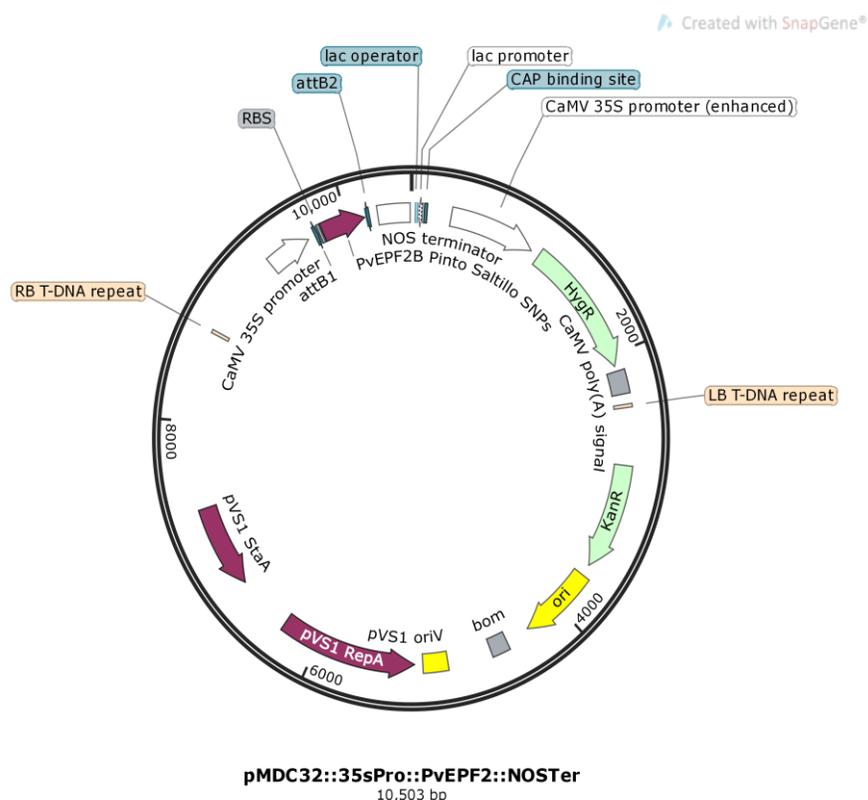
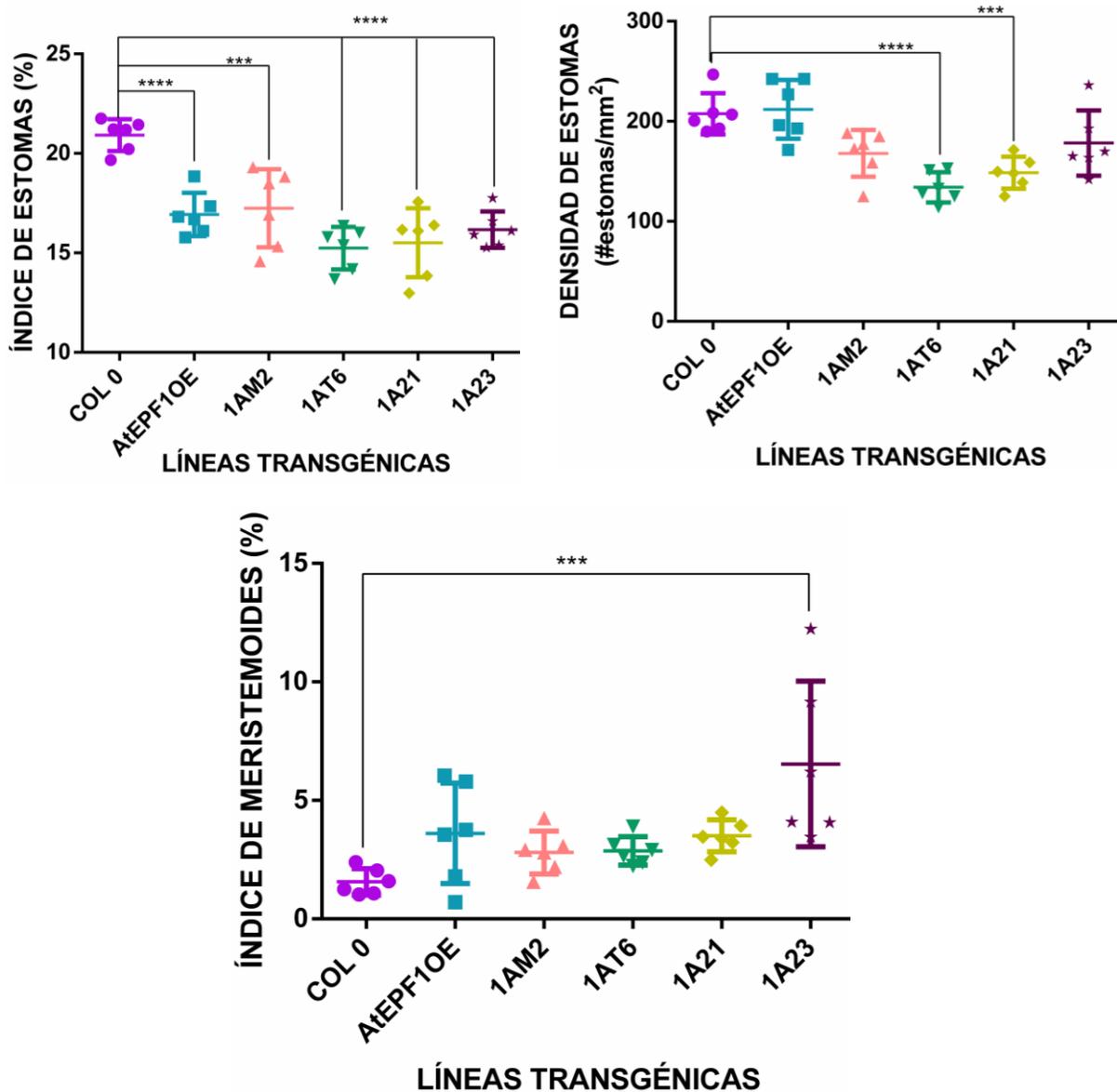


Figura suplementaria 2: Representación del vector *pMDC32* utilizado para insertar a *PvEPF2*

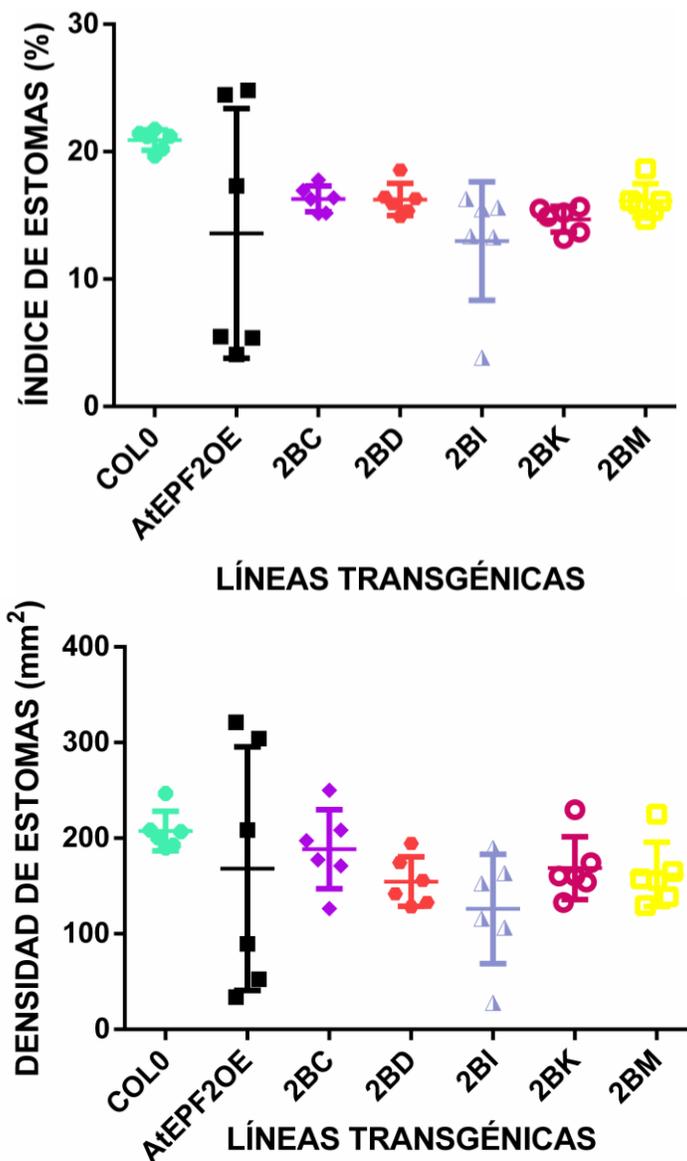
El vector *pMDC32* fue utilizado para transformar plantas silvestres de *Arabidopsis Col0* para insertar la región codificante del gen *PvEPF2*. El vector se porta dos genes que confieren resistencia a agentes selectivos, uno a Kanamicina (KanR), para seleccionar las colonias de bacterias transformadas; el segundo a Higromicina (HygR), para seleccionar las plantas transformadas.

Figura suplementaria 3: Análisis fenotípico considerando los datos de la línea AtEPF1OE



Al analizar los resultados obtenidos para los parámetros de IE, DE e IM se encontraron los siguientes resultados. Todas las líneas presentan diferencias significativas en el IE, esto quiere decir que en todas las líneas transformadas hay una reducción de estomas con respecto a Col 0. Cuando analizamos los resultados obtenidos en la DE se observó que únicamente las líneas 1AT6 y 1A21 presentan diferencias significativas con respecto a Col 0, la línea 1AM2 presenta una tendencia a reducir la DE pero no es significativa. La línea AtEPF1OE y 1A23 no presentan diferencias significativas. Finalmente, cuando se analizó el IM se encontró que únicamente la línea 1A23 presenta diferencias significativas con respecto a Col 0. En todos los análisis se realizó un ANOVA de una cola con comparación múltiple y se consideraron los siguientes valores de P (****) = 0.0001; (***) = 0.001 (n= 6 plantas por línea).

Figura suplementaria 4: Análisis fenotípico considerando los datos de la línea AtEPF2OE



Para los parámetros IE y DE se encontraron los siguientes resultados. Al comparar las líneas transformadas con respecto a Col 0 se observó que las líneas 2BC, 2BD, 2BI, 2BK y 2BM hay una tendencia a disminuir la proporción de estomas pero no hay diferencias significativas con respecto a Col0. En la línea AtEPF2OE se puede observar que hay una gran heterogeneidad en la distribución de los datos y no hay diferencias significativas con respecto a Col 0. Cuando se comparan los resultados obtenidos para la DE no se observan diferencias significativas con respecto a Col 0; sin embargo, se puede observar que las líneas 2BD y 2BI presentan una tendencia a disminuir la DE. En todos los análisis se realizó un ANOVA de una cola con comparación múltiple. (n= 6 plantas por línea).