



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Irapuato

**LABORATORIO NACIONAL DE GENÓMICA PARA LA
BIODIVERSIDAD (LANGEBIO)**

**“Reconstruyendo en tejido vegetativo la red transcripcional que
regula la tolerancia a la desecación en semilla de *Arabidopsis
thaliana*”**

Tesis que presenta:

IBQ. Thelma Yerenny Rico Cambrón

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biología de Plantas

Director de tesis:

Dr. Luis Rafael Herrera Estrella

Irapuato, Guanajuato.

Agosto, 2017



Cinvestav
Unidad Irapuato

L A N G E B I O
Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad



El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Fisiología e Ingeniería Metabólica de Plantas perteneciente al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO-CINVESTAV) bajo la dirección del Dr. Luis Rafael Herrera Estrella y la asesoría del Dr. Agustino Martínez Antonio y del Dr. Stefan de Folter.

DEDICATORIA

A mi madre, la Sra. Teresa Cambrón, porque gracias a ella me encuentro donde ahora estoy, a ella le debo todo cuanto tengo y todo cuanto soy.

Gracias, mamá, por dedicar cada día de tus últimos 26 años en sacar adelante a esta familia, por todo el esfuerzo y sacrificio puesto en otorgarnos una formación profesional a mis hermanas y a mí, y por nunca rendirte a pesar de las adversidades. Eres y siempre serás mi ejemplo a seguir y lo más grande que tengo.

A mis hermanas, Yaskara y Rubí, por todos los bellos momentos que hemos compartido a lo largo de nuestras vidas. A pesar de ser menores que yo, desde pequeñas ustedes me enseñaron muchas cosas como la importancia de mantenernos unidas y cuidarnos entre nosotras. Saben que las considero mis amigas.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico brindado a través de la beca 588239, la cual me permitió llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al LANGEBIO y al CINVESTAV por abrirme las puertas de sus instalaciones para realizar mis estudios de posgrado, en sus aulas adquirí conocimiento, experiencias y amistades.

A mi director de tesis, el Dr. Luis Herrera Estrella, por permitirme formar parte de su equipo de investigación, por su apoyo, motivación y consejos, y por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este trabajo.

A mi comité tutorial, el Dr. Agustino Martínez Antonio y el Dr. Stefan de Folter, por sus aportaciones a este proyecto mediante sus comentarios y sugerencias.

A la Dra. Sandra González por todas sus enseñanzas, apoyo y consejos durante mi formación desde licenciatura, por proveer la base fundamental para la formulación de este proyecto, y por su amistad.

A Ana Karen Gervacio, mi primera estudiante de licenciatura, por su trabajo, apoyo, esmero y dedicación durante el desarrollo de este proyecto, y por su amistad.

A la Biól. Araceli Oropeza por sus consejos, por ayudarme a mejorar mis técnicas y por proveerme del material que fue necesario para el desarrollo de este trabajo.

A Rosy Gutiérrez y Brenda Breceda por facilitarme tanto el trabajo en el laboratorio gracias a todo lo que nos preparan, y por la amistad de ambas.

Al M.C. Elohim Bello por su amistad, cariño y apoyo a lo largo de este trayecto, y por su ayuda en la revisión de esta tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Fisiología e Ingeniería Metabólica de Plantas (Lab-5) por sus comentarios y sugerencias, y por compartir experiencias muy agradables conmigo.

A Daisy por ser mi compañía y motivación de todos los días desde mi llegada a Irapuato.

A Dania, Carolina y Felipe por su amistad desde el inicio de esta experiencia, por todos los momentos que compartieron conmigo, y por todos sus consejos y palabras de aliento.

A todos los que formaron parte de esta trayectoria y que con sus palabras, consejos y buenos deseos me ayudaron a la conclusión de esta etapa.

I. ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IV
II. LISTA DE NOMENCLATURA	VI
III. RESUMEN	VII
IV. ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Anhidrobiosis	2
2.2. La tolerancia a la desecación en plantas	3
2.2.1. Origen y Evolución	3
2.2.2. Mecanismos de tolerancia a la desecación vegetativa	6
2.2.2.1. Protección	7
2.2.2.2. Reparación	8
2.3. La tolerancia a la desecación en semillas	10
2.3.1. Desarrollo de la semilla en <i>A. thaliana</i>	10
2.3.2. Mecanismos de tolerancia a la desecación en semillas	14
2.3.2.1. Proteínas LEA	14
2.3.2.2. Proteínas de choque térmico	17
2.3.2.3. Carbohidratos	18
2.3.2.4. Sistema antioxidante	20
2.3.3. Señalización hormonal: ABA	20
2.3.4. Regulación transcripcional	23
2.3.4.1. Reguladores maestros del desarrollo de la semilla	23
2.3.4.2. Regulación específica de la tolerancia a la desecación	23
2.3.4.3. Efecto de la expresión ectópica de los reguladores de la tolerancia a la desecación	28
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo General	31
4.2. Objetivos Específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	32

5.2. Selección y asignación de promotores y terminadores a las secuencias codificantes	32
5.3. Construcción de vectores de expresión	33
5.4. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
5.5. Transformación de <i>A. thaliana</i> y selección de líneas homocigotas con una inserción	40
5.6. Preparación y evaluación de sustratos	40
5.7. Evaluación de tolerancia a estrés por baja disponibilidad de agua	41
5.8. Evaluación de tolerancia a estrés osmótico moderado	41
5.9. Evaluación de tolerancia a estrés por alta salinidad	42
5.10. Análisis estadísticos	42
6. RESULTADOS	43
6.1. Construcción de vectores de expresión	43
6.2. Obtención de líneas sobreexpresantes homocigotas	46
6.3. Selección del sustrato para las evaluaciones de baja disponibilidad de agua	47
6.4. Efecto de la sobreexpresión constitutiva de <i>PLATZ2</i> sobre la tolerancia a baja disponibilidad de agua	51
6.5. Efecto de la sobreexpresión de <i>AGL67</i> , <i>ATAF1</i> , <i>DREB2G</i> , <i>HAP2C</i> , <i>PLATZ1</i> y <i>PLATZ2</i> sobre la tolerancia a baja disponibilidad de agua	53
6.6. Respuesta de plantas sobreexpresantes a estrés osmótico moderado	55
6.7. Respuesta de plantas sobreexpresantes a estrés por alta salinidad	58
7. DISCUSIÓN	60
7.1. La tasa de pérdida de agua del sustrato afecta la sobrevivencia de líneas sobreexpresantes de <i>PLATZ1</i>	60
7.2. La sobreexpresión de factores de transcripción que regulan la tolerancia a la desecación en semilla, confiere mayor tolerancia a baja disponibilidad de agua en tejido vegetativo	62
7.2.1. <i>ATAF1</i>	62
7.2.2. <i>HAP2C</i>	63
7.2.3. <i>PLATZ1</i> y <i>PLATZ2</i>	64
7.2.4. <i>AGL67</i>	65
7.2.5. <i>DREB2G</i>	66

7.3. Reguladores de la tolerancia a la desecación en semilla activan diferentes mecanismos de respuesta a estrés hídrico	67
8. CONCLUSIONES	69
9. PERSPECTIVAS	70
10. BIBLIOGRAFÍA	71
11. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	81

II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Familias de angiospermas que contienen especies con TD en tejido vegetativo.	5
Tabla 2	Fenotipos de las mutantes empleadas en el estudio de González-Morales <i>et al.</i> (2016).	24
Tabla 3	Descripción de factores de transcripción que regulan la TD en semilla.	28
Tabla 4	Promotores y terminadores asignados a cada secuencia codificante.	33
Tabla 5	Componentes de las unidades transcripcionales.	36
Tabla 6	Unidades transcripcionales que componen cada vector de expresión y sus niveles de ensamble.	38
Tabla 7	Avance general en la construcción de vectores de expresión.	43
Tabla 8	Lista de construcciones ensambladas.	44
Tabla 9	Avance general en la obtención de líneas homocigotas con expresión constitutiva e inducible por estrés hídrico de los diferentes FTs.	46
Tabla 10	Duración de las diferentes etapas del experimento de baja disponibilidad de agua con diferentes sustratos.	50
Tabla S1	Secuencias empleadas en este estudio y su método de obtención.	81
Tabla S2	Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las secuencias y comprobación de las construcciones.	82
Figura 1	Filogenia simplificada de la TD vegetativa en las plantas terrestres.	4
Figura 2	Desarrollo de la semilla.	13
Figura 3	Panorama general de los eventos moleculares del ABA en la maduración de la semilla.	22
Figura 4	Perfil global de expresión de genes en semillas de mutantes tolerantes e intolerantes a la desecación.	25
Figura 5	Subred 1 relacionada con estrés abiótico y almacenamiento de nutrientes.	26
Figura 6	Subred 2 relacionada con mecanismos de protección celular.	27

Figura 7	Efecto en semilla de la expresión constitutiva en <i>abi3-5</i> de reguladores de la TD.	29
Figura 8	Efecto en tejido vegetativo de la expresión constitutiva de <i>PLATZ1</i> en Col-0.	30
Figura 9	Comprobación de las construcciones Nivel 2 en <i>A. tumefaciens</i> .	45
Figura 10	Efecto de los sustratos sobre la sobrevivencia y diámetro de roseta bajo condiciones normales de riego.	48
Figura 11	Sobrevivencia de las líneas <i>PLATZ1</i> a la baja disponibilidad de agua en los diferentes sustratos.	49
Figura 12	Evaluación en macetas del efecto de los sustratos sobre la sobrevivencia bajo condiciones normales de riego.	51
Figura 13	Sobrevivencia a baja disponibilidad de agua de <i>PLATZ1</i> y <i>PLATZ2</i> .	52
Figura 14	Sobrevivencia de las líneas sobreexpresantes de cada uno de los FTs a la baja disponibilidad de agua.	54
Figura 15	Desarrollo de líneas <i>AGL67</i> , <i>DREB2D</i> y <i>DREB2G</i> en condiciones <i>in vitro</i> estándar.	56
Figura 16	Desarrollo de líneas <i>AGL67</i> , <i>DREB2D</i> y <i>DREB2G</i> bajo estrés osmótico moderado.	57
Figura 17	Respuesta de las líneas <i>AGL67</i> , <i>DREB2D</i> y <i>DREB2G</i> a estrés salino.	59
Figura 18	Modelo hipotético de las estrategias que cada factor de transcripción activa para conferir mayor tolerancia a baja disponibilidad de agua.	68
Figura S1	Módulos Nivel 0 (partes estándar).	84
Figura S2	Vectores destino del Nivel 1.	85
Figura S3	Ejemplo de clonación de una unidad transcripcional que consta de 3 partes estándar.	86
Figura S4	Vectores destino Nivel 2 y End-Linkers.	87
Figura S5	Ejemplo de clonación de dos genes en un vector Nivel 2.	88

III. LISTA DE NOMENCLATURA

2D	<i>DREB2D</i>
2G	<i>DREB2G</i>
ABA	Ácido abscísico
AG	<i>AGL67</i>
AT	<i>ATAF1</i>
BDA	Baja disponibilidad de agua
cDNA	DNA complementario
DDF	Días después de floración
DDG	Días después de germinación
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FT	Factor de transcripción
GA	Ácido giberélico
HAP	<i>HAP2C</i>
HR	Humedad relativa
HSPs	Heat Shock Proteins
LEA	Late Embryogenesis Abundant
MS	Murashige y Skoog
P1	<i>PLATZ1</i>
P2	<i>PLATZ2</i>
PAV	Peat moss, arena, vermiculita
PVP	Peat moss, vermiculita, perlita
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Riego de recuperación
TBDA	Tolerancia a baja disponibilidad de agua
TD	Tolerancia/tolerante a la desecación
T-DNA	DNA de transferencia
UV	Ultravioleta

IV.RESUMEN

La tolerancia a la desecación (TD) es considerada una característica clave que permitió a las primeras plantas terrestres, provenientes de un origen acuático, adaptarse y sobrevivir en un nuevo ambiente donde el agua se presentaba como un elemento escaso y limitante. Posteriormente, durante la evolución de las plantas vasculares, la TD vegetativa fue confinada a únicamente estructuras reproductivas como las semillas, donde ésta se convirtió en un proceso remarcable que permite al embrión permanecer viable en un estado seco hasta por miles de años. La adquisición de TD en la semilla está orquestada principalmente por dos redes moleculares, cada una de las cuales involucra un grupo de factores de transcripción específicos que fungen como reguladores principales. En el transcurso de la evolución de las angiospermas, se han dado varios eventos independientes de re-activación de la TD en tejidos vegetativos, la cual parece derivar de la ya presente en las estructuras reproductivas. Con el fin de determinar si en *A. thaliana*, las redes que regulan la adquisición de TD en semilla también son capaces de incrementar la tolerancia de la planta a estrés abiótico como la baja disponibilidad de agua, el objetivo de mi tesis fue realizar la sobreexpresión en tejido vegetativo de siete de los principales reguladores de la TD en semilla, para evaluar su efecto en las respuestas de la planta a estrés por carencia de agua. Mis resultados indican que los factores de transcripción seleccionados son capaces de activar diferentes estrategias que confieren a *A. thaliana* una mayor adaptación a condiciones limitantes de agua. A pesar de que en semilla, estos genes activan procesos que protegen al embrión contra la pérdida de agua, en tejido vegetativo mostraron una divergencia en cuanto al tipo de respuesta que desencadenan; mientras que algunos genes siguen manteniendo su rol de protección, otros parecen re-direccionar su función hacia evitar la deshidratación de los tejidos. Además, al someter a las plantas sobreexpresantes a otros tipos de estrés abiótico, se encontró que las respuestas generadas por los factores de transcripción fueron suficientes para incrementar la tolerancia de *A. thaliana* a estrés osmótico moderado y a la alta salinidad.

V. ABSTRACT

Desiccation tolerance (DT) is considered a key feature that allowed the first terrestrial plants, from an aquatic origin, to adapt and survive in a new environment where water was a scarce and limiting element. During the evolution of vascular plants, vegetative DT was confined to reproductive structures such as seeds, where DT became a remarkable process that allows the embryo to remain viable in a dry state for thousands of years. Seed DT acquisition is orchestrated by two major molecular networks involving a group of specific transcription factors that act as main regulators. In the course of the evolution of angiosperms, several independent events of reactivation of DT in vegetative tissues have taken place, and this DT seems to derive from that present in reproductive structures. In order to determine whether in *A. thaliana*, the networks that regulate seed DT acquisition are also capable of increasing the tolerance of the plant to abiotic stress such as low water availability, the objective of my thesis was to overexpress seven of the main regulators of seed DT in vegetative tissues to evaluate their effect on plant responses to water deficit stress. My results show that the selected transcription factors are able to activate different strategies that confer to *A. thaliana* a greater adaptation to water limiting conditions. Although in seed these genes activate processes that protect the embryo against the water loss, in vegetative tissues they showed a divergence in the kind of responses that they trigger; while some genes continue playing their protective role, others seem to redirect their functions to avoid dehydration of tissues. In addition, when overexpressing plants were subjected to other types of abiotic stress, the responses generated by the transcription factors were sufficient to increase the tolerance of *A. thaliana* to moderate osmotic stress and high salinity.

1. INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido que el agua, más que sólo un solvente inerte, es un compuesto sobre el cual depende la vida, ya que es esencial para el mantenimiento de la estructura, estabilidad y dinámica de los componentes base que conforman a las células de los seres vivos: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y membranas (Leprince y Buitink, 2015).

Cuando un organismo sensible a la desecación se seca a una humedad relativa (HR) por debajo del 90%, éste sufre daños en todos sus componentes celulares: las proteínas pierden su correcta conformación llegando a formar agregados tóxicos, el DNA y el RNA sufren fragmentación estructural y las membranas experimentan transiciones de fase que causan su ruptura y fusión. Además, el estrés por pérdida de agua también genera daño oxidativo al ocurrir en presencia de oxígeno en células donde las altas tasas de transporte de electrones son conducentes de generar especies reactivas de oxígeno (EROS) (Leprince y Buitink, 2015).

Debido a lo anterior, uno de los retos más grandes de todos los organismos vivos es crecer y reproducirse en un ecosistema donde existen regiones que frecuentemente enfrentan condiciones muy limitantes de agua. Una pequeña proporción de organismos han generado mecanismos biológicos que les permiten sobrevivir a una completa desecación, la cual resulta en tejidos secos pero viables cuyo contenido de agua se reduce hasta el 0.1% del que presentan en estado hidratado. Una vez que el agua vuelve a estar disponible, éstos se embeben y reasumen su metabolismo (Leprince y Buitink, 2015).

En el reino de las plantas, existen especies que poseen tolerancia a la desecación en sus tejidos vegetativos, pero esta característica es más reconocida por su amplia distribución en las estructuras reproductivas de la mayoría de las plantas. Una de estas estructuras es la semilla, cuya tolerancia a la desecación le permite permanecer viable hasta por miles de años (Shen-Miller *et al.* 2002; Sallon *et al.* 2008). Además, se han reportado eventos independientes de re-activación de esta característica de la semilla en tejido vegetativo (Gaff y Oliver, 2013).

La prevalencia de esta cualidad en semillas, polen y esporas es una razón para creer que el potencial genético para la tolerancia a la desecación vegetativa aún existe en la mayoría las plantas, y que éste puede ser activado en tejidos vegetativos mediante estrategias de ingeniería genética.

2. ANTECEDENTES

2.1. Anhidrobiosis

Existen algunos organismos que tienen la sorprendente capacidad de recuperarse de un estado de deshidratación cuando entran en contacto con agua. Este fenómeno fue descrito en un inicio por Anton van Leeuwenhoek en 1702, llamándolo entonces como *anabiosis* (regreso a la vida) dado que estos organismos, después de estar aparentemente muertos, revivían después de ser rehidratados (Crowe y Crowe, 1992). Años después, Keilin acuñó el término *anhidrobiosis* (vida sin agua) para referirse al estado en el cual un organismo deshidratado no muestra signos de vida pero es capaz de reasumir su funcionamiento normal cuando es rehidratado (Keilin, 1959). En otras palabras, la anhidrobiosis es la capacidad de las células para ser sometidas a una deshidratación extrema sin sufrir daño letal (Crowe y Crowe, 1992). Se ha establecido que ésta es la vertiente más severa del estrés por déficit de agua, ya que la remoción del agua de la célula se impone como un estrés estructural, fisiológico y bioquímico al cual las células deben adaptarse o morir (Billi y Potts, 2002).

La anhidrobiosis está presente en todos los dominios, desde procariotas hasta eucariotas, y los organismos que poseen esta característica son denominados anhidrobiontes (Crowe *et al.*, 1992). En bacterias, la mayoría de las formas anhidrobiontes tienden a ser *Gram* positivas y el caso más estudiado corresponde a *Nostoc commune*, una cianobacteria filamentosa que es encontrada en la piedra caliza expuesta de las regiones kársticas. En hongos, los estudios de este fenómeno se han enfocado principalmente en *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura que se ha vuelto un poderoso modelo de estudio para probar mecanismos de anhidrobiosis *in vivo*. En el reino animal, la anhidrobiosis ocurre en tres filos: nematodos (por ejemplo, *Aphelenchus avena*), rotíferos y tardígrados, aunque también está presente en etapas juveniles de otros dos filos: la etapa embrionaria de algunos crustáceos como *Artemia* sp, y la etapa larvaria del díptero *Polypedilum vanderplanki* (Leprince y Buitink, 2015).

En plantas, el término más empleado para hacer referencia a la anhidrobiosis es *tolerancia a la desecación* (Alpert, 2005). Ésta está presente en las estructuras reproductivas (semillas y polen) de la mayoría de las plantas vasculares, así como en tejidos vegetativos; sin embargo, la tolerancia vegetativa es menos común que la reproductiva, se encuentra más frecuentemente en clados menores como líquenes y briófitas, con un menor

grado de ocurrencia en pteridofitas y angiospermas, y en gimnospermas está ausente (Figura 1) (Gaff y Oliver 2013; Oliver *et al.* 2005).

2.2. La tolerancia a la desecación en plantas

La tolerancia a la desecación (TD) puede ser operacionalmente definida como la habilidad de un organismo para secarse hasta el equilibrio con aire moderadamente seco (HR de 50-70% a 20-30°C) y reasumir su funcionamiento normal cuando es rehidratado; y es conceptualmente definida como la cesación reversible del metabolismo en respuesta a la pérdida de agua. Esto sugiere que los mecanismos de tolerancia a la desecación deben involucrar al menos dos elementos clave: 1) El apagado ordenado del metabolismo durante la desecación para evitar acumulaciones letales de intermediarios y la generación de EROS. La oxidación es el mayor peligro de la desecación, y las ventajas de minimizar la foto-oxidación podrían explicar por qué algunas plantas TD cesan la fotosíntesis a contenidos relativamente altos de agua durante el secado. 2) La preservación de suficiente organización celular, enzimas y ácidos nucleicos funcionales de forma que el metabolismo pueda reasumirse cuando el organismo sea rehidratado. La preservación de una maquinaria base para el metabolismo debe involucrar tanto protección como reparación, es decir, las enzimas y membranas deben ser protegidas de la pérdida de configuración y organización, y se debe reparar el daño acumulado de las reacciones degradantes no metabólicas que ocurren mientras las plantas están inactivas (Alpert y Oliver, 2002).

2.2.1. Origen y Evolución

La TD surgió en el reino vegetal como un mecanismo clave que permitió la colonización del ambiente terrestre por plantas primitivas provenientes de un ambiente acuático (Mishler y Churchill 1985). Se ha postulado que la TD primitiva estuvo presente de manera constitutiva tanto en la etapa vegetativa como en la etapa reproductiva de las briófitas (los clados más basales de las plantas terrestres) (Oliver *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2005), donde esta característica es relativamente común pero no universal (Proctor y Pence, 2002). La mayoría de las especies pertenecientes a esta división pueden sobrevivir niveles moderados de desecación (de -20 a -40 MPa) por periodos cortos, pero existen algunas briófitas que pueden tolerar niveles extremos por periodos prolongados (Proctor y Pence, 2002); tal es el caso de *Tortula caninervis*, que soporta permanecer a -540 MPa hasta por seis años y aun así recupera su actividad normal cuando se rehidrata (Oliver *et al.*, 1993; información no publicada).

A pesar de la ventaja adaptativa y de sobrevivencia que la TD constitutiva confiere, ésta tiene un costo, ya que las tasas metabólicas en plantas tolerantes son mucho más bajas que las de plantas sensibles a la desecación (Oliver *et al.*, 2000); y por lo cual, conforme fue aumentando la complejidad morfológica y estructural de las plantas, y éstas adquirieron sistemas vasculares (traqueófitas) que facilitaron el transporte y conservación del agua interna, la TD fue desactivada en el tejido vegetativo (Figura 1) (Oliver *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2005).

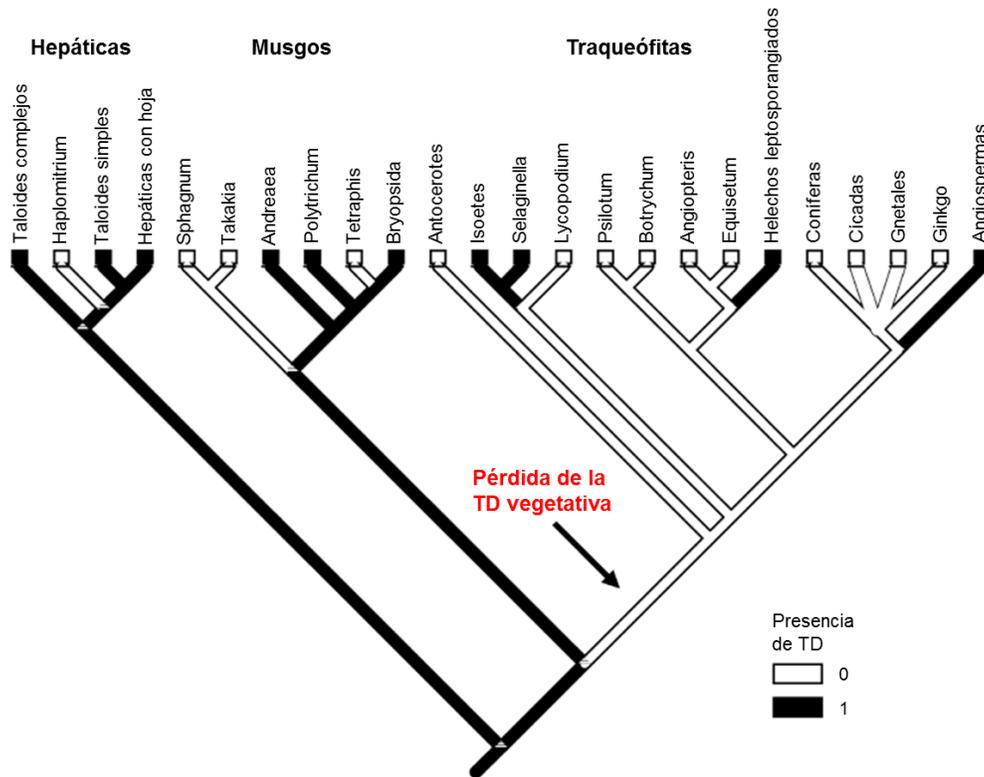


Figura 1. Filogenia simplificada de la TD vegetativa en las plantas terrestres. La presencia de TD se muestra en negro y la no tolerancia en blanco. La flecha indica el punto donde la condición ancestral puede ser inequívocamente reconstruida como no tolerante (Oliver *et al.*, 2005).

La evidencia filogenética muestra que la TD vegetativa se perdió cuando las traqueófitas aparecieron. Los genes relacionados con los mecanismos de la TD fueron entonces reclutados para procesos diferentes, aunque relacionados, tales como respuestas a estrés hídrico y adquisición de la TD en estructuras reproductivas: esporas, polen y semillas. Una vez establecido en estas estructuras, el sistema de DT quedó disponible para su inducción en tejido vegetativo por presiones de selección asociadas con nichos áridos (Oliver *et al.*, 2000).

En este sentido, estudios filogenéticos recientes han revelado que en el curso de la evolución de las traqueófitas, han tenido lugar varios eventos independientes de evolución (o re-evolución) de TD en tejido vegetativo. En el caso de *Selaginella* y helechos, ambos han presentado al menos un evento (Figura 1) (Oliver *et al.*, 2000), mientras que en angiospermas se han reportado 13 eventos de re-evolución de la TD en tejidos vegetativos (Tabla 1) (Gaff y Oliver, 2013). En total, se tiene conocimiento de aproximadamente 400 especies de traqueófitas con TD vegetativa, de las cuales 135 son angiospermas (Tuba y Lichtenthaler, 2011; Gaff y Oliver 2013).

Debido a que las plantas vasculares TD evolucionaron a partir de ancestros no tolerantes, Oliver y Bewley (1997) designaron que poseen una *TD modificada*; pero al ser una característica aparentemente evolucionada de la TD ya presente en propágulos, que a su vez proviene de la estrategia ancestral surgida en briófitas, ésta presenta mecanismos fundamentalmente similares a la TD primitiva, los cuales serán detallados más adelante (Oliver *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2013).

Tabla 1. Familias de angiospermas que contienen especies con TD en tejido vegetativo (Gaff y Oliver 2013).

Familia	Número de géneros con especies TD	Número total de géneros en la familia
<i>Dicotyledoneae</i>		
<i>Cactaceae</i>	1	100
<i>Gesneriaceae</i>	9	133
<i>Lamiaceae</i>	1	212
<i>Myrothamnaceae</i>	1 ^a	1
<i>Ranunculaceae</i>	2	51
<i>Scrophulariaceae</i>	4	292
<i>Stylidiaceae</i>	1	5
<i>Tamaricaceae</i>	1	4
<i>Monocotyledoneae</i>		
<i>Anthericaceae</i>	1	29
<i>Cyperaceae</i>	7	102
<i>Philydraceae</i>	1	3
<i>Poaceae</i>	9	657
<i>Velloziaceae</i>	6 ^b	10

^aLas dos especies en el género y en la familia tienen TD en el follaje.

^bTodas las especies probadas en la familia tienen TD en el follaje.

2.2.2. Mecanismos de tolerancia a la desecación vegetativa

Hasta mediados de los 70s, se consideraba que los mecanismos que conferían TD a las plantas eran de tipo mecánico, tales como paredes celulares flexibles, vacuolas pequeñas y carencia de plasmodesmos (Gaff, 1980; Bewley y Krochko, 1982; Oliver y Bewley, 1984). Sin embargo, en 1979, Bewley estableció la teoría de que la TD está primeramente determinada por las propiedades inherentes de los componentes protoplasmáticos de las células de las plantas. La evidencia que existe hasta la actualidad soporta esta nueva teoría, aunque las características estructurales juegan sin duda un rol importante en la TD (Sherwin y Farrant, 1996; Farrant *et al.*, 1999).

Dentro de esa misma teoría, Bewley también define tres características críticas para la adquisición de TD: 1) limitación del daño a un nivel reparable, 2) mantenimiento de la integridad fisiológica en el estado deshidratado, y 3) movilización de mecanismos de reparación una vez que la planta es rehidratada. Una interpretación de estos criterios conlleva a la conclusión de que los mecanismos de TD se basan en la *protección* de la integridad celular y/o en la *reparación* del daño ocasionado por la desecación y por la misma rehidratación (Bewley y Oliver, 1992).

Varias posibles estrategias de TD pueden ser propuestas basadas en los dos procesos básicos de protección y reparación celular. Las plantas pueden mantener constantemente activos los procesos de protección celular, haciendo de la TD una característica constitutiva como el caso de las briófitas, o éstos pueden ser inducidos cuando la planta se enfrenta a condiciones deshidratantes, tal como en las angiospermas. De igual forma, los procesos y actividades asociados con la reparación celular pueden ser constitutivos o inducidos por la rehidratación (Oliver *et al.*, 2005).

Ambos procesos, tanto los de protección como los de reparación, son esenciales para cualquier mecanismo de TD; sin embargo, es muy probable que las estrategias adoptadas por las diferentes especies mantengan mayor énfasis en uno u otro de estos procesos (Oliver *et al.*, 2005). Esto ha sido relacionado con la velocidad de pérdida de agua que una planta TD puede soportar. La información que se tiene a la fecha indica que las plantas que son capaces de tolerar la desecación cuando su contenido de agua disminuye rápidamente, utilizan un mecanismo que depende en gran medida de la reparación celular; mientras que las plantas que pueden sobrevivir a la desecación sólo si la pérdida de agua ocurre de

manera gradual, basan su estrategia de TD predominantemente en la protección celular (Oliver y Bewley, 1997).

2.2.2.1. Protección

La inducción de mecanismos de protección necesita ser coordinada antes y/o durante la deshidratación para permitir la sobrevivencia en el estado seco. Esta coordinación es evidenciada por la necesidad de activar varios mecanismos de pre-acondicionamiento para poder alcanzar la TD, por ejemplo, estrés osmótico previo al secado, deshidratación lenta y control del desarrollo cuando la TD está restringida a ciertas fases del ciclo de vida (Leprince y Buitink, 2015).

Estudios metabólicos y transcriptómicos sugieren que el metabolismo es remodelado mediante la incorporación de C, N y S en la síntesis de compuestos importantes para la protección celular, dentro de los cuales destacan la síntesis y acumulación de proteínas de tipo LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant) y de choque térmico, azúcares solubles protectores como sacarosa y trehalosa, y antioxidantes como las tiorredoxinas. Por otro lado, al tiempo que las células sintetizan compuestos de protección, los sistemas de transporte de electrones son desactivados o desmantelados con el fin de evitar el riesgo de estrés oxidativo (Avelange-Macherel *et al.*, 2006; Erkut y Kurzchalia, 2015). El costo de estos cambios se ve reflejado en la reducción de la división y crecimiento celular; incluso, en un estudio en levadura se encontró que la TD puede ser inducida al reducir la tasa de crecimiento usando deficiencia de nutrientes o fuentes de C no fermentables (Welch *et al.*, 2013).

A diferencia de las angiospermas TD, que inducen sus mecanismos de tolerancia una vez que se enfrentan al estrés por carencia de agua, en la mayoría de las briófitas éstos parecen estar activos de manera constitutiva. La diferencia en los mecanismos de tolerancia entre estos sistemas se ve reflejada en su biología. Las angiospermas TD manifiestan adaptaciones morfológicas y fisiológicas que pueden retardar la pérdida de agua, lo cual les da tiempo suficiente para establecer las medidas de protección necesarias para sobrevivir a un evento de desecación. Si la pérdida de agua es muy rápida (menos de 12 horas), estas plantas sucumben ante el daño ocasionado por la deshidratación y mueren (Gaff, 1989; Bewley y Oliver, 1992; Oliver y Bewley, 1997; Oliver *et al.*, 2005) Las briófitas, por otro lado, carecen de adaptaciones para retener el agua dentro de la planta, dando como resultado el rápido equilibrio del contenido interno de agua con el potencia hídrico del

ambiente (Proctor *et al.*, 1998). Como consecuencia, muchas briófitas experimentan tasas de pérdida de agua tan rápidas que son insuficientes para activar medidas de protección y, por lo cual, evolucionaron un mecanismo de protección constitutivo. Esta conclusión es soportada por estudios que demuestran que en las briófitas los niveles de sacarosa y proteínas LEA son mantenidos a niveles constantes durante la desecación así como en la rehidratación. Las briófitas emplean sus mecanismos de protección constitutivos primordialmente para prevenir el daño al aparato fotosintético, lo cual culmina en una rápida recuperación de la actividad del fotosistema II durante la rehidratación (Tuba *et al.*, 1996; Csintalan *et al.*, 1999; Proctor y Smirnof, 2001).

Dado que uno de los modelos de estudio más empleados para estudiar este aspecto son las semillas, en un apartado más adelante se profundizará más en este tema.

2.2.2.2. Reparación

Los mecanismos de reparación pueden ser activados antes de la deshidratación y/o durante la rehidratación. Los modelos más empleados hasta ahora para caracterizar estos mecanismos han sido briófitas altamente TD, donde la estrategia primaria es reparar durante la rehidratación, el daño inducido por la desecación. Sin embargo, los mecanismos de reparación permanecen pobremente estudiados en otro tipo de plantas como las angiospermas TD dado que, como ya se mencionó en el apartado anterior, éstas enfocan más su estrategia de tolerancia hacia la protección celular (Alpert y Oliver, 2002; Leprince y Buitink, 2015).

El nivel de protección que las briófitas son capaces de alcanzar de manera constitutiva es insuficiente para prevenir el daño durante la rehidratación, especialmente a las membranas, conllevando a que la TD en estas plantas dependa fuertemente de mecanismos de reparación inducidos durante las fases iniciales de la hidratación. Mucho de lo que se ha determinado acerca de la reparación en briófitas ha sido inferido a partir de respuestas fisiológicas, bioquímicas y genéticas que han sido monitoreadas durante las fases iniciales de la recuperación seguida a la rehidratación.

En *Tortula ruralis* y otros musgos se estableció que su capacidad para recuperar rápidamente su metabolismo sintético cuando son rehidratados es gracias al eficiente secuestro de los componentes de síntesis de proteínas durante el secado, excepto algunos factores de iniciación de la traducción (Gwozdz *et al.*, 1974; Oliver y Bewley, 1997). Durante las primeras dos horas de rehidratación hay alteraciones extensivas en los patrones de

expresión de genes. Mediante análisis de geles 2D fue posible detectar la terminación o decremento en la síntesis de 25 proteínas, las cuales fueron denominadas *hidrinas*, así como el comienzo o el incremento sustancial en la síntesis de 74 proteínas que fueron llamadas *rehidrinas*. En este mismo estudio también se demostró que los cambios en la síntesis de proteínas ocurren en un escenario de poblaciones de transcritos cualitativamente inalteradas, lo que indica que los cambios en la expresión de genes producto de la rehidratación son ocasionados por controles post-transcripcionales (Oliver, 1991). Este caso es contrastante al de las angiospermas TD, las cuales utilizan un cambio en el control transcripcional inducido por la desecación para comenzar la síntesis de proteínas requeridas para la adquisición de TD (Ingram y Bartels, 1996; Phillips *et al.*, 2002). El control de la traducción en *T. ruralis* está determinado por la tasa de desecación a la cual el musgo fue sometido; si la deshidratación fue rápida, los transcritos de rehidrinas se acumulan durante la primera hora de la rehidratación, mientras que si la deshidratación fue lenta, se acumulan durante la fase de secado (Oliver y Wood, 1997; Wood y Oliver, 1999). Estos transcritos no se acumulan como producto de la transcripción, si no que están selectivamente secuestrados en partículas de ribonucleoproteínas mensajeras (mRNP) y son rápidamente liberados sobre la rehidratación (Wood y Oliver, 1999), indicando que los mecanismos de reparación en plantas rehidratadas que experimentaron una deshidratación lenta, es más bien activada en lugar de inducida, ya que ésta última modalidad involucra la síntesis *de novo* de todos los componentes necesarios. Por su parte, el mecanismo de reparación de las plantas que tuvieron una deshidratación rápida tendría que basarse en lo poco que se ha ensamblado hasta que se puedan sintetizar nuevos componentes y por lo cual estas plantas muestran un tiempo de recuperación más lento y el daño ocasionado por la rehidratación es mayor (Oliver *et al.*, 2005).

Una de las principales habilidades que la planta debe recuperar al ser rehidratada es la fotosíntesis. La recuperación de la función de los cloroplastos ha sido estudiada en varios musgos y se ha observado que es extremadamente rápida (de 10 a 20 min) y no es afectada por inhibidores de la síntesis de proteínas en la oscuridad (Proctor y Smirnoff, 2001). Sin embargo, si la rehidratación ocurre en presencia de luz, la síntesis de proteínas se hace necesaria para la reparación del daño foto-oxidativo y para poder iniciar la toma y asimilación de CO₂.

2.3. La tolerancia a la desecación en semillas

La TD en semillas puede variar ampliamente entre especies y aún dentro de éstas. Las semillas que pueden tolerar la desecación y ser almacenadas en estado seco durante largos periodos son llamadas *ortodoxas*, mientras que aquéllas que se deterioran al ser deshidratadas y que, por tanto, no pueden ser almacenadas por lapsos muy prolongados, son llamadas *recalcitrantes* (Roberts, 1973).

La mayoría de las plantas angiospermas (~95% de las especies) poseen semillas ortodoxas (Gaff y Oliver, 2013); y dentro de éstas especies, podemos encontrar cultivos importantes como arroz, trigo, maíz, cebada y soya (Kermode y Finch-Savage, 2002). Inclusive, se han documentado especies en las cuales la TD ha permitido a sus semillas permanecer viables hasta por miles de años; por ejemplo, en 2002 se reportó la germinación de semillas de *Nelumbo nucifera* con una antigüedad de 1,300 años (Shen-Miller *et al.* 2002) y en 2008 se dio a conocer la germinación de semillas de *Phoenix dactilifera* L. de hace 1900 años (Sallon *et al.* 2008).

Aproximadamente el 4% de las angiospermas poseen semillas recalcitrantes, y el 1% restante son valoradas con una TD intermedia (Gaff y Oliver, 2013). Dentro de las especies recalcitrantes se encuentran cultivos que son muy importantes económicamente, como el aguacate, cacao, plátano, mango y café, y cuya conservación permanece siendo un desafío hasta nuestros días (Kermode y Finch-Savage, 2002).

2.3.1. Desarrollo de la semilla en *A. thaliana*

En plantas superiores (espermatofitas), el desarrollo de la semilla inicia una vez que se da la doble fertilización del óvulo en el saco embrionario, y se divide en dos principales fases: embriogénesis y maduración. Durante la embriogénesis, el embrión adquiere la arquitectura básica de la planta a través de una serie ordenada de divisiones celulares; mientras que en la maduración, la cual se puede dividir en temprana y tardía, las células del embrión entran en un periodo de expansión celular y diferenciación que se acompaña de la acumulación de productos de almacenamiento, para culminar con la entrada en un grado metabólicamente quiescente y la adquisición de TD (Mansfield y Briarty, 1993).

El desarrollo de la semilla ha sido extensamente estudiado en *Arabidopsis thaliana*, donde el desarrollo completo de la semilla toma aproximadamente 20 días (Figura 2). La embriogénesis abarca los primeros 7 días después de la floración (DDF). A los 3 DDF, los núcleos libres del endospermo en desarrollo se depositan en la periferia del saco

embrionario, pero el embrión aún no es visible sino hasta los 4 DDF, una vez que se encuentra en la etapa globular, y se mantiene unido al tejido materno del micrópilo por las células del suspensor. La etapa triangular (5 DDF), una etapa transitoria entre la organización radial y bilateral, da lugar a la etapa corazón (5 a 6 DDF), que se caracteriza por el inicio de la formación de los cotiledones. Hasta este punto, el contenido total de lípidos es bajo en contraste con el contenido de azúcares solubles y almidón. El embrión alcanza la etapa torpedo a los 7 DDF, finalizando así la fase de embriogénesis (Figura 2A) (Baud *et al.*, 2002).

Una vez que la embriogénesis se ha completado, el desarrollo de la semilla pasa a la fase de maduración, la cual trae consigo notables cambios tanto metabólicos como transcriptómicos. La etapa temprana de la fase de maduración se lleva a cabo de los 7 a los 16 DDF, durante los cuales el peso seco de la semilla incrementa drásticamente hasta alcanzar su punto máximo a los 16 DDF, al tiempo que ocurre una pérdida regular de agua. Comienza con la degeneración del suspensor y entonces los cotiledones comienzan a curvarse a los 8 DDF. Entre 7 y 10 DDF, el endospermo, que ocupaba más de la mitad del volumen de la semilla a los 6 DDF, es casi completamente reabsorbido y reemplazado por el embrión en crecimiento. A los 10 DDF, el embrión ocupa todo el espacio libre entre los integumentos y la composición global de la semilla es similar a la de una semilla madura (Figura 2A) (Baud *et al.* 2002).

En cuanto al metabolismo de la semilla, la maduración temprana comprende la síntesis de compuestos nitrogenados (proteínas) y carbonados (lípidos y carbohidratos) (Figura 2C) (Baud *et al.* 2002). Las proteínas son almacenadas en vacuolas y los lípidos en cuerpos lipídicos; ambos cumplen la función de llenar las células y ofrecer resistencia contra el colapso celular al secarse (Angelovici *et al.*, 2010). Esta etapa puede ser, a su vez, dividida en dos periodos. Entre los 7 y 12 DDF, las concentraciones de almidón disminuyen marcadamente y comienza la síntesis de compuestos de reserva, triacilgliceroles y proteínas. El segundo periodo de la maduración temprana abarca de los 12 a los 16 DDF y está caracterizado por el inicio del almacenamiento de sacarosa. Después de una fase estacionaria corta, la síntesis de compuestos de reserva continúa, pero la composición global de la semilla no cambia notablemente, las proporciones de aceite y proteínas se mantienen iguales y sin modificarse (aproximadamente 40% de cada compuesto), y la composición de ácidos grasos es estable (Baud *et al.* 2002).

La tercera y última etapa del desarrollo, la maduración tardía, tiene lugar de los 17 a los 20 DDF y es en ésta donde la semilla adquiere la TD y entra en un estado de dormancia. En esta etapa, el contenido de agua de la semilla declina pronunciadamente desde el 32% hasta menos del 10% (Figura 2C). Esta drástica pérdida de agua conlleva a la ruptura de las relaciones tróficas que hasta este punto había entre la planta y las semillas. La síntesis de carbohidratos continúa con la acumulación específica de rafinosa y estaquiosa. A pesar de la severa deshidratación a la cual la semilla está siendo sometida, las actividades metabólicas persisten en el embrión (Baud *et al.* 2002).

Aun cuando el término desecación implica un proceso fisiológico de deshidratación, la transición del periodo de acumulación de reservas a la desecación de la semilla está asociada con cambios masivos en la expresión de genes, lo cual indica que esta etapa también es muy activa en lo que respecta a la transcripción. Análisis del perfil transcriptómico del desarrollo de la semilla de *A. thaliana* en la etapa de desecación, indican que aproximadamente la tercera parte de su genoma (6963 genes) cambia significativamente en este lapso (Angelovici *et al.*, 2010). Una gran cantidad de genes, cuya transcripción es activada durante la maduración de la semilla, están involucrados en procesos que son requeridos para que la semilla pueda sobrevivir en estado seco, procesos tales como la síntesis de proteínas LEA (Manfre *et al.*, 2009; Delahaie *et al.*, 2013) y de choque térmico (Wehmeyer y Vierling, 2000; Prieto-Dapena *et al.*, 2008), así como de oligosacáridos (Baud *et al.*, 2002; Verdier *et al.*, 2013) y enzimas que participan en la eliminación de EROS como catalasas y superóxido dismutasas (Bailly, 2004). Es interesante que una cantidad significativa de los genes, cuya expresión declinó durante la desecación, están asociados con procesos que son estimulados durante la germinación, por ejemplo, glucólisis y ciclo de Krebs. De estas observaciones se ha concluido que estos procesos metabólicos podrían actuar de manera antagónica a la TD de estar activos en esta etapa. Por otro lado, también es intrigante que parte de los genes que son inducidos durante la desecación, no están vinculados con las funciones de la desecación *per se*, sino que, contrario al caso anterior, parecen ser esenciales para la germinación, ya que codifican para componentes de la maquinaria traduccional, proteínas relacionadas con el proteasoma y proteínas asociadas con la reparación de DNA, entre otros. Lo anterior indica que durante la desecación, se preparan algunos procesos para la germinación de la semilla (Angelovici *et al.*, 2010).

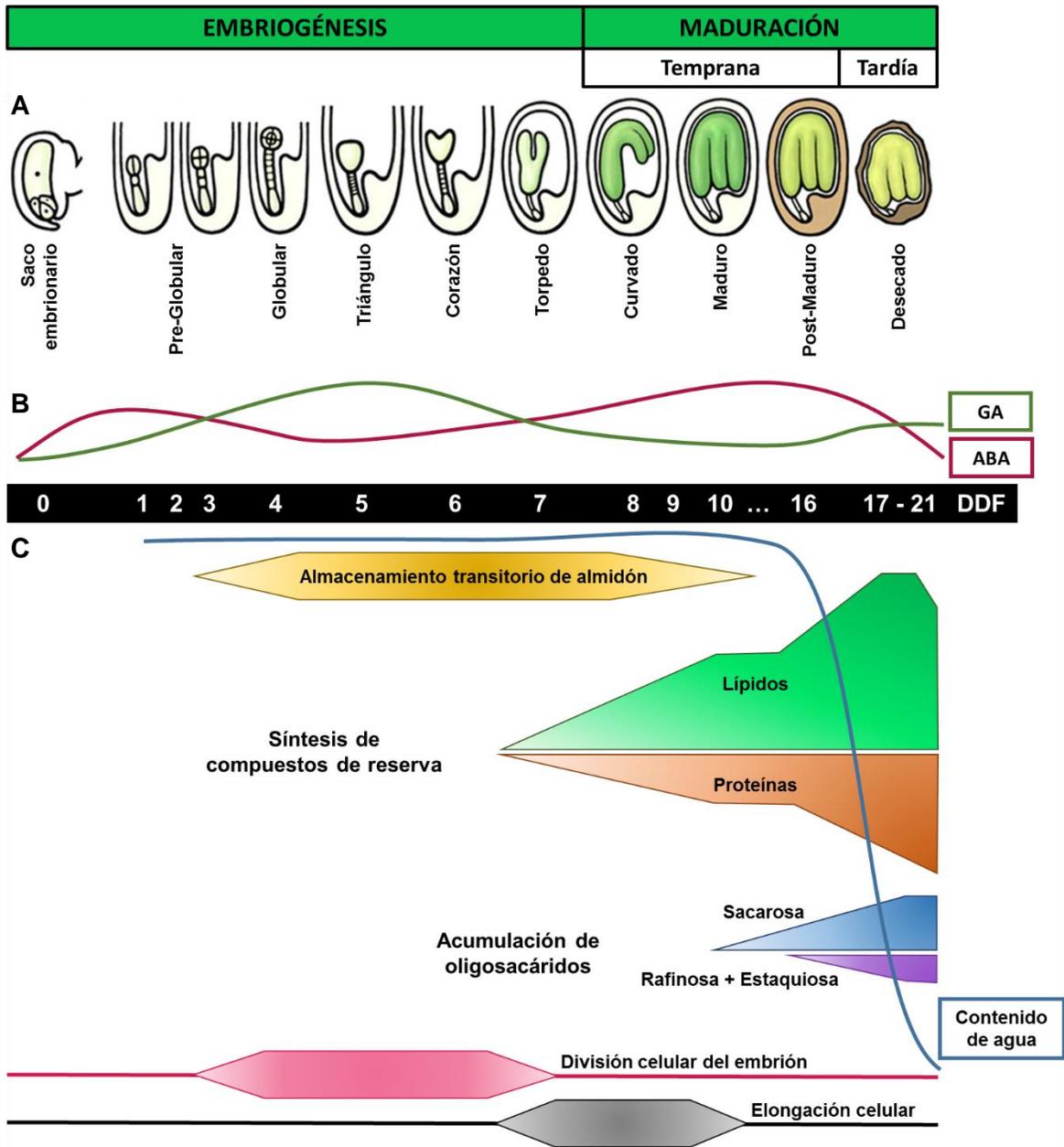


Figura 2: Desarrollo de la semilla. A) Representación esquemática del desarrollo de la semilla de *A. thaliana*. Las imágenes fueron adaptadas de Le *et al.*, 2010, y no están representadas a escala. B) Balance en la relación ABA/GA durante el desarrollo de la semilla. C) Principales reservas sintetizadas y acumuladas durante la fase de maduración. La línea azul representa el contenido de agua (Modificada de Baud *et al.*, 2002).

2.3.2. Mecanismos de tolerancia a la desecación en semillas

Los mecanismos que son requeridos para que las semillas de *A. thaliana* toleren la desecación, han sido ampliamente detallados. Los principales componentes de dichos mecanismos son: la acumulación de proteínas de tipo LEA, de proteínas de choque térmico, de oligosacáridos y de antioxidantes. En los siguientes apartados se describe a profundidad el papel que cada uno de estos componentes juega en la TD de la semilla.

2.3.2.1. Proteínas LEA

Las proteínas LEA son un grupo de proteínas altamente hidrofílicas que han sido vinculadas en gran medida con las respuestas de las plantas al estrés hídrico (Battaglia *et al.*, 2008). Éstas se acumulan en altas cantidades en la última etapa de la maduración de la semilla, cuando el embrión adquiere la TD (Dure y Chlan, 1981; Dure *et al.*, 1981; Galau *et al.*, 1986; Cuming, 1999; Hundertmark e Hinch, 2008); pero también se han encontrado en tejidos vegetativos de plantas que enfrentan condiciones de déficit de agua, tales como sequía, salinidad y congelación (Dure, 1993b; Bray, 1997; Garay-Arroyo *et al.*, 2000). De igual forma, también se acumulan en plantas de resurrección, como *Craterostigma plantagineum* y *Xerophyta viscosa*, al momento de ser deshidratadas (Piatkowski *et al.*, 1990; Ingram y Bartels, 1996; Mundree y Farrant, 2000).

Se ha propuesto que las proteínas LEA cumplen con la función de proteger las estructuras subcelulares del daño ocasionado por la pérdida de agua, ya sea actuando como buffer de hidratación, secuestrando iones, protegiendo membranas y a otras proteínas, o re-naturalizando proteínas con estructura desordenada (Bray, 1991). De acuerdo a su identidad, las proteínas LEA pueden ser localizadas principalmente en el citoplasma y en el núcleo, pero también pueden ser encontradas en las mitocondrias, las vacuolas, en la proximidad de la membrana celular y en los amiloplastos (Roberts, 1993; Houde *et al.*, 1995, Egerton-Warburton *et al.*, 1997; Danyluk *et al.*, 1998; Rinne *et al.*, 1999). Dependiendo del compartimento celular donde una proteína LEA se ubique, podrá cumplir con la función de protección o regulación de procesos bioquímicos esenciales (Kalemba y Pukacka, 2007).

Inicialmente las proteínas LEA fueron clasificadas en seis grupos con base en la presencia de dominios específicos conservados a través de las especies y que son únicos para cada familia (Dure *et al.*, 1989). Con el incremento en la información disponible acerca de nuevas proteínas LEA, diferencias en sus perfiles de expresión, su descripción en

organismos distintos a las plantas y con las nuevas herramientas bioinformáticas, una modificación a la clasificación hecha por el grupo de Dure categorizó a las proteínas LEA en 7 grupos (Battaglia *et al.*, 2008).

El Grupo 1 contiene un motivo de 20 aminoácidos (TRKEQ [L/M] G [T/E] EGY [Q/K] EMGRKGG [L/E]) que puede estar presente en varias copias arregladas en tándem; en plantas hay entre una y cuatro copias, mientras que en otros organismos pueden haber hasta ocho copias (Galau *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1995; Battaglia *et al.*, 2008). Las proteínas de este grupo juegan un rol importante en el correcto desarrollo de la semilla y la adquisición de TD de ésta (Manfre *et al.* 2006; Manfre *et al.* 2009), así como en la protección osmótica de órganos vegetativos en plantas superiores (Swire-Clark y Marcotte, 1999).

El Grupo 2 de las proteínas LEA también es conocido como *dehidrinas* y está presente únicamente en plantas (Battaglia *et al.*, 2008). Es distinguido por un motivo conservado rico en Lys de 15 residuos (EKKGIMDKIKEKLPK), llamado segmento K, que puede ser encontrado desde una hasta once copias en un sólo polipéptido (Close *et al.*, 1989, 1993; Battaglia *et al.*, 2008). Varios enfoques han sido empleados para determinar la función de las dehidrinas; no obstante, debido al gran número de proteínas que componen este grupo (10 miembros en *Arabidopsis*), sólo se ha reportado de función de algunas de ellas. Tal es el caso de las dehidrinas de *A. thaliana* COR47, LTI29, ERD14, LTI30 y RAB18, las cuales se acumulan durante el desarrollo de la semilla y en tejido vegetativo en respuesta a estrés por sequía, bajas temperaturas y salinidad (Nylander *et al.*, 2001; The *Arabidopsis* Information Resource).

Las proteínas LEA del Grupo 3 son caracterizadas por repeticiones de un motivo de 11 aminoácidos (TAQ [A/S] AK [D/E] KT [S/Q] [E/Q]) (Dure, 1993a) y están ampliamente distribuidas en el reino de las plantas. Se acumulan en semillas maduras y en respuesta a deshidratación, salinidad o bajas temperaturas (Harada *et al.*, 1989; Cattivelli y Bartels, 1990; Hsing *et al.*, 1995; Romo *et al.*, 2001; Hundertmark e Hinch, 2008). Es interesante que las proteínas de otros organismos similares a las LEA del Grupo 3 de plantas se acumulan en respuesta a la deshidratación (Battista *et al.*, 2001; Dure, 2001; Gal *et al.*, 2004), y en el estado desecado de organismos anhidrobiontes como el nemátodo *Steinernema feltiae* y el rotífero *Philodina roseola* (Solomon *et al.*, 2000; Tunnacliffe *et al.*, 2005).

El Grupo 4 de las proteínas LEA poseen un motivo de 25 aminoácidos con la secuencia consenso AQEKAEKMTA [R/H] DPXKEMAHK [E/K] [A/E] [K/R], y tienen la porción N-terminal conservada, donde entre 70 y 80 residuos forman α -hélices anfipáticas (Dure, 1993b; Battaglia *et al.*, 2008). Estas proteínas fueron originalmente encontradas en embriones secos; posteriormente, se detectó que su acumulación también sucede en tejidos vegetativos que enfrentan déficit de agua (Roberts *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1991).

El Grupo 5 está representado por proteínas LEA hidrofóbicas o atípicas que contienen una proporción significativamente mayor de aminoácidos hidrofóbicos en comparación con el resto de las LEA (Battaglia *et al.*, 2008). Dadas sus propiedades fisicoquímicas, estas proteínas no son solubles después de ser sometidas a altas temperaturas debido a que adoptan una conformación globular (Baker *et al.*, 1988; Galau *et al.*, 1993; Cuming, 1999; Singh *et al.*, 2005). De la escasa información que existe acerca de este grupo, se ha concluido que las proteínas pertenecientes a éste se acumulan principalmente durante la etapa tardía del desarrollo de la semilla y en respuesta a condiciones de estrés, tales como sequía, salinidad, luz UV, frío y estrés mecánico (Kiyosue *et al.*, 1992; Maitra y Cushman, 1994; Zegzouti *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

El Grupo 6 está constituido por 36 proteínas caracterizadas por su pequeño tamaño (7-14 kDa) y alta conservación (Battaglia *et al.*, 2008). Una característica distintiva de estas LEA es su acumulación en la zona de elongación de hipocótilos de frijol, la cual presenta un potencial hídrico menor que las zonas que no están en crecimiento (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). No existe evidencia directa de la función de este grupo de proteínas; sin embargo, a diferencia de las LEA de otros grupos, algunos estudios muestran que estas proteínas son incapaces de prevenir la inactivación por deshidratación de enzimas reporteras (Reyes *et al.*, 2005), lo que indica que su hidrofobicidad no es la única característica relevante para ejercer una función protectora ante condiciones deficientes de agua (Battaglia *et al.*, 2008).

El Grupo 7 está conformado por las proteínas ASR, las cuales son consideradas como proteínas LEA, y son pequeñas, estables al calor e intrínsecamente inestructuradas (Silhavy *et al.*, 1995). Las ASR no sólo comparten características fisicoquímicas con las LEA, además también se acumulan durante la embriogénesis tardía de la semilla y en respuesta a estrés hídrico (Maskin *et al.*, 2008). Los genes que codifican para estas proteínas han sido identificados en diversas especies dicotiledóneas y monocotiledóneas, así como en

gimnospermas, pero ninguno está presente en *Arabidopsis* (Silhavy *et al.*, 1995; Padmanabhan *et al.*, 1997; Battaglia *et al.*, 2008).

2.3.2.2. Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (HSPs, del inglés Heat Shock Proteins) son proteínas ubicuas encontradas en células de plantas y animales (Park y Seo, 2015). Originalmente fueron descritas por su relación con las respuestas de *Drosophila melanogaster* al choque térmico (Ritossa, 1962) pero hoy se sabe que su expresión es inducida por una amplia variedad de agobios ambientales como son el estrés osmótico, el oxidativo, la salinidad, la alta intensidad de luz UV, la presencia de metales pesados, entre otros (Swindell *et al.*, 2007).

Las HSPs han adquirido gran relevancia por su contribución a la homeostasis celular bajo condiciones de crecimiento tanto óptimas como perjudiciales. Es bien conocido que son responsables del plegamiento, ensamble, translocación y degradación de proteínas durante el desarrollo celular, y también asisten el repliegue y estabilización de proteínas bajo condiciones de estrés (Lindquist y Craig, 1988; Lindquist, 1986; Wang *et al.*, 2004).

De acuerdo a su peso molecular, homología en secuencia de aminoácidos y función, las HSPs han sido clasificadas en seis familias: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 (o chaperoninas), HSPs pequeñas o sHSPs (~17-30 kDa) y ubiquitina (8.5 kDa) (Waters *et al.*, 1996; Vierling, 1997, Gupta *et al.*, 2010).

Las proteínas de la familia HSP90 difieren de otras chaperonas moleculares en que la mayoría de sus sustratos son proteínas que participan en la transducción de señales (Young *et al.*, 2001). El rol principal de esta familia es manejar el plegamiento de proteínas, pero también cumplen funciones importantes en la transducción de señales, control del ciclo celular, tráfico y degradación de proteínas y adaptación al estrés (Richter y Buchner, 2001, Young *et al.*, 2001).

La familia HSP70, junto con otras co-chaperonas, forman un conjunto de máquinas celulares prominentes que asisten en un gran cantidad de procesos de plegamiento de proteínas (Wang *et al.*, 2004). Las principales funciones de las HSP70 son prevenir la formación de agregados y asistir el repliegue de proteínas no nativas bajo condiciones normales y de estrés (Hartl, 1996; Frydman, 2001).

La familia HSP60 o chaperoninas son una clase de chaperonas moleculares que se encuentran en procariotas y en la mitocondria y plástidos de eucariotas (Hartl, 1996). Su papel principal es asistir a proteínas recién formadas y translocadas para que adquieran su forma nativa (Bukau y Horwich, 1998; Frydman, 2001).

En lo que respecta a la familia HSP100, a diferencia de la función regular de las otras familias de mantener el correcto plegamiento de las proteínas, las HSP100 funcionan en la disgregación y/o degradación de proteínas. La remoción de polipéptidos no funcionales pero potencialmente peligrosos producto del despliegue, desnaturalización o agregación es importante para el mantenimiento de la homeostasis celular (Wang *et al.*, 2004).

Por su parte, la familia sHSPs es la que mayor estudio ha recibido y la de mayor prevalencia en plantas (Vierling, 1991). Se sintetizan de manera ubicua en respuesta a alta temperatura y otros tipos de estrés, y algunas de ellas se expresan durante etapas específicas del desarrollo de la planta (Waters *et al.*, 1996). El ejemplo más caracterizado de expresión de sHSPs no inducida por estrés es su acumulación durante la maduración y deshidratación de la semilla (Wehmeyer *et al.* 1996). Un ensayo de transcripción en *A. thaliana* mostró que la expresión de las sHSPs no es específica de algunos tejidos, por el contrario, prácticamente todas las células del embrión mostraron expresión antes de que éste quedara completamente seco, mientras que la expresión se vio fuertemente reducida en mutantes que cuya semilla carece de TD, lo cual sugiere que las sHSPs tienen una función de protección durante la deshidratación de la semilla (Wehmeyer y Vierling 2000).

A diferencia de otras HSPs, las sHSPs no tienen la capacidad por sí mismas de plegar proteínas no nativas, más bien, tienen la capacidad de unirse a éstas mediante interacciones hidrofóbicas y estabilizarlas para que chaperonas dependientes de ATP realicen la función de plegarlas nuevamente (Lee y Vierling, 2000).

2.3.2.3. Carbohidratos

El perfil de carbohidratos de una semilla en desarrollo está en constante cambio. La semilla inicia con la acumulación transitoria de altas cantidades de almidón, y exhibe altos niveles de hexosas (glucosa y fructosa). Conforme avanza la maduración de la semilla, tanto el contenido de almidón como el de hexosas decrecientan al tiempo que el contenido de sacarosa aumenta notablemente. Los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa también registran un aumento en su concentración dentro de la semilla, aunque menos prominente y poco tiempo después que el de la sacarosa (Baud *et al.*, 2002). Se ha planteado que la

aparición de azúcares no reductores como sacarosa, rafinosa y estaquiosa podría tener un papel clave en la adquisición de TD en la semilla (Leprince *et al.*, 1990) y se han propuesto algunas hipótesis que explican la manera en que los azúcares contribuyen con esta característica. La estructura de la membrana es considerada como el sitio principal que puede sufrir daño por desecación. La sacarosa podría estar fungiendo como agente protector en la “hipótesis de reemplazo del agua”. Esta teoría propone que los grupos hidroxilo de la sacarosa podrían actuar como sustitutos del agua y proveer las interacciones hidrofílicas que las membranas y proteínas necesitan para mantenerse estables (Vertucci y Farrant, 1997). Sin embargo, parece que la sacarosa por sí sola es incapaz de conferir TD, requiere de la presencia de oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa para evitar o prevenir la cristalización del disacárido (Caffrey *et al.*, 1988).

Otra hipótesis es la “formación de cristal”, que establece que un cristal es un estado sólido termodinámicamente inestable con una viscosidad muy alta, caracterizado por una temperatura de transición de sólido a líquido que depende del contenido de agua, temperatura y composición química (Buitink *et al.* 2000). La formación de estos cristales se denomina vitrificación y la viscosidad del producto resultante restringe la movilidad de los componentes dentro de ellos previniendo así reacciones químicas peligrosas, como la reacción de Maillard, y lo cual ha sido definido como indispensable para la TD (Crowe, 2002; Buitink y Leprince, 2008). Oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa podrían contribuir a la estabilización de cristales intracelulares mediante el incremento de la viscosidad y de la temperatura de transición (Buitink *et al.* 2000).

Una tercera hipótesis que intenta explicar cómo los azúcares protegen a las estructuras celulares de la desecación es la “hipótesis del atrapamiento del agua”. Esta teoría establece que los azúcares atrapan a las moléculas residuales de agua que están cercanas a las superficies de las biomoléculas, logrando preservar la solvatación y propiedades nativas de éstas (Belton y Gil, 1994).

Las hipótesis de reemplazo y atrapamiento del agua no son mutuamente exclusivas. Mientras la primera es más adecuada para explicar interacciones azúcar-membrana, la segunda es apropiada para describir interacciones azúcar-proteína (Cordone *et al.*, 2007).

2.3.2.4. Sistema antioxidante

Durante el almacenamiento de semillas secas, éstas están expuestas a alteraciones progresivas de sus componentes celulares por procesos de auto-oxidación, tales como las reacciones de Amadori y Maillard, peroxidación de lípidos o carbonilación de proteínas (Wilson y McDonald, 1986). Si la semilla es almacenada por mucho tiempo o bajo condiciones no propicias, como alta temperatura o HR elevada, la acumulación de daño oxidativo paulatinamente irá conduciendo a la muerte irreversible del embrión. Por lo tanto, las semillas requieren de sistemas antioxidantes eficientes para promover su longevidad en estado seco, y también para la adquisición de TD en sí (Sano *et al.*, 2016).

Dentro de los mecanismos que las semillas emplean para protegerse del daño oxidativo, se pueden distinguir dos vertientes: 1) mecanismos pasivos, los cuales incluyen sistemas no enzimáticos de remoción de EROS; y 2) mecanismos activos, que comprenden la desintoxicación enzimática de EROS (Sano *et al.*, 2016).

En cuanto a los mecanismos pasivos, la cantidad de sistemas no enzimáticos de remoción de EROS es controlada durante el desarrollo y maduración de la semilla, y puede ser influenciada por factores ambientales que estén afectando a la planta madre. Estos mecanismos pasivos incluyen proteínas de almacenamiento y antioxidantes de bajo peso molecular como tocoferoles, flavonoides, ascorbato y glutatión (Sano *et al.*, 2016).

Por su parte, en lo que respecta a los mecanismos activos, las semillas emplean un conjunto de enzimas antioxidantes con el fin de remover el exceso de EROS y controlar la sobreproducción de radicales libres. Tales enzimas pueden ser superóxido dismutasas, catalasas, glutatión y ascorbato peroxidasas, y glutatión reductasas, entre otras (Bailly, 2004).

2.3.3. Señalización hormonal: ABA

El ácido abscísico (ABA) es la hormona clave requerida a través del proceso de maduración de la semilla (Nambara y Marion-Poll, 2003). Su importancia ha sido demostrada mediante experimentos de inmunomodulación, en los cuales una reducción en la actividad de ABA ha dado como resultado la transición del programa de maduración al programa de germinación de la semilla (Phillips *et al.*, 1997). En *A. thaliana*, el ABA no sólo regula el desarrollo de la semilla, sino también el crecimiento post-germinación y la apertura estomática (Gutierrez *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo de la semilla, el ABA está íntimamente ligado a cuatro reguladores maestros: *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)*, *FUSCA3 (FUS3)*, *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)* y *LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2)* (Finkelstein *et al.*, 2002); en el siguiente apartado se hablará con más detalle de estos genes. El ABA se produce primero en los tejidos maternos y subsecuentemente en el embrión, donde su pico máximo se da en la maduración (Frey *et al.*, 2004). En la última fase de la maduración de la semilla, la inducción de la dormancia es fuertemente dependiente de ABA, y es regulada principalmente por un balance entre biosíntesis y degradación de esta hormona (Figura 2B) (Cadman *et al.*, 2006).

Dado que el ABA ha mostrado desempeñar papeles muy importantes en diversos procesos de las plantas, se ha puesto gran énfasis en el estudio de su modo de acción. Estudios de microinyección y tratamientos con análogos de ABA no permeables mostraron que el ABA tiene sitios de percepción tanto intra como extracelulares (Schwartz *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1994) y, efectivamente, se han identificado varias proteínas con propiedades de receptor intracelular o de membrana que participan en la cascada de señalización por esta molécula. ChlH (en *Arabidopsis* llamada ABAR, del inglés ABA receptor) es un componente del Mg-quelataasa, complejo que participa en la producción de Mg-protoporfirina IX (Mg-proto). Mg-proto es un precursor de clorofila y ha sido sugerido que funciona como una señal que coordina la expresión de genes en el núcleo y en el cloroplasto (Miyazono *et al.*, 2009; Strand *et al.*, 2003). En cuanto a receptores de membrana, se han identificado receptores acoplados a proteína G (GPCR) que controlan la señalización por ABA e interactúan directamente con la subunidad α del complejo G (GPA1), la cual inactiva al receptor (Johnston *et al.* 2007). Y por último tenemos al complejo que percibe al ABA en el citoplasma, el PYR/PYL/RCAR, el cual forma parte de un núcleo de señalización que incluye otras dos familias de proteínas: PP2Cs (TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASES) como ABI1 y ABI2, y SnRK2s (SUCROSE-NON-FERMENTING KINASE1- RELATED PROTEIN KINASE2). En ausencia de ABA, las PP2Cs inactivan a las SnRK2s por desfosforilación; y cuando hay ABA presente, éste se une a los receptores PYR/PYL/RCAR creando un complejo que, al interactuar con las PP2Cs, inhibe la desfosforilación de las SnRK2s permitiendo que activen a otras proteínas de respuesta a ABA, como ABI3, ABI4 y ABI5 (Figura 3) (Cutler *et al.*, 2010).

Los elementos de respuesta a ABA (ABRE, por sus siglas en inglés) y las secuencias RY/Sph son elementos de regulación en *cis* requeridos para la expresión específica de genes durante el desarrollo de la semilla. Un típico ABRE contiene el motivo núcleo ACGT

que es reconocido por factores de transcripción (FTs) bZIP. Es intrigante que ninguno de los reguladores maestros interactúa con las cajas ABRE; sin embargo, los cuatro poseen el dominio B3, el cual se une al elemento RY que, en combinación con los ABRE, actúa como un potenciador de la transcripción específica de semilla. En *Arabidopsis*, el FT bZIP ABI5 se une a los ABRE, mientras que ABI3 interactúa tanto con RY como con ABI5, y de esta forma activan la transcripción de genes mediada por ABA en la semilla. Algunos de los genes que son activados en respuesta al ABA codifican para proteínas LEA y de choque térmico (Holdsworth *et al.*, 2008).

Aparte del ABA, hay otras hormonas involucradas en los procesos de desarrollo de la semilla. El ácido indolacético (IAA) participa durante la morfogénesis y además afecta la sensibilidad de la semilla a ABA durante la germinación. El ácido giberélico (GA), por su parte, es requerido para inducir la germinación, por lo que su biosíntesis es regulada negativamente por ABA en semillas en desarrollo y para el mantenimiento de la dormancia (Figura 2B) (Locascio *et al.*, 2014).

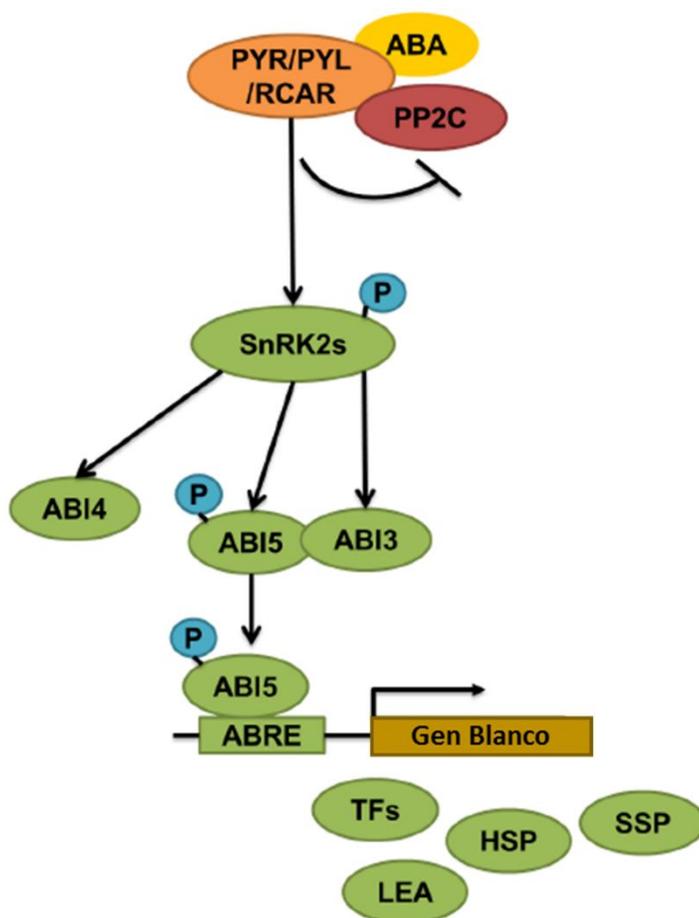


Figura 3: Panorama general de los eventos moleculares del ABA en la maduración de la semilla. La acumulación de ABA activa a los receptores PYR/PYL/RCAR para inhibir a las PP2Cs. Esta inhibición permite la activación de las SnRK2s a través de autofosforilación. Las SnRK2s activas median la respuesta a ABA mediante fosforilaciones de blancos río abajo. En semillas, la fosforilación de ABI5 activa la transcripción de genes blanco tales como genes codificantes para LEAs y factores de transcripción involucrados en la maduración. Los reguladores positivos de la señalización por ABA se muestran en verde, mientras que los reguladores negativos se muestran en rojo (Modificada de González-Morales, 2016).

2.3.4. Regulación transcripcional

2.3.4.1. Reguladores maestros del desarrollo de la semilla

En *A. thaliana*, el desarrollo del embrión y la maduración de la semilla, incluyendo la adquisición de TD, son estructurados a nivel global por un grupo de cuatro reguladores maestros: LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1), un factor de unión a la caja CCAAT, y ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3), FUSCA 3 (FUS3) y LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2), factores con dominio B3. Además de controlar el desarrollo de la semilla, estos reguladores maestros también reprimen la expresión de genes involucrados con la transición de embrión a tejido vegetativo (Nambara *et al.*, 1992; Lotan *et al.*, 1998; Luerßen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2001).

Aunque el papel de los reguladores maestros durante el desarrollo de la semilla es globalmente similar, éstos cumplen algunas funciones que son específicas de cada uno. Un claro ejemplo de esto se observa en el comportamiento de sus respectivas líneas mutantes en cuanto a la TD de la semilla, mientras que *lec1-1*, *abi3-5* y *fus3-3* presentan una TD drásticamente afectada, en *lec2-1* no se observa este fenómeno. La expresión ectópica de LEC1, ABI3 o FUS3 en mutantes sencillas o dobles de los otros dos reguladores activó algunos procesos de la maduración de la semilla pero no logró recuperar el fenotipo TD, indicando que los tres reguladores son requeridos para activar todas las características en la semilla (Keith *et al.*, 1994; Meinke *et al.*, 1994; To *et al.*, 2006).

2.3.4.2. Regulación específica de la tolerancia a la desecación

En el apartado anterior se habló de los cuatro reguladores maestros que coordinan el desarrollo global de la semilla; sin embargo, hasta hace pocos años se desconocía qué factor o factores podrían estar regulando específicamente la adquisición de la TD. Al ser una característica que ha sido varias veces reactivada de manera independiente durante la evolución, se ha conjeturado que la TD debe estar regulada por una o por pocas redes regulatorias coordinadas por un número discreto de FTs. En un intento por dilucidar esta cuestión, González-Morales y colaboradores (2016) diseñaron un enfoque comparativo entre una serie de líneas mutantes de *Arabidopsis* con fenotipo contrastante en cuanto a su TD de semilla; se emplearon las líneas tolerantes *lec2-1* y *abi3-1*, y las líneas intolerantes *lec1-1*, *abi3-5* y *fus3-3*. En la Tabla 2 se muestran las características generales de cada una de estas líneas.

Tabla 2: Fenotipos de las mutantes empleadas en el estudio de González-Morales *et al* (2016).

Fenotipo	WT	<i>fus3-3</i>	<i>lec1-1</i>	<i>lec2-1</i>	<i>abi3-5</i>	<i>abi3-1</i>
Acumulación de clorofila en semilla seca	NO	NO	SI	SI	SI	NO
Antocianinas en cotiledones	NO	SI	SI	SI	NO	NO
Expresión de proteínas de almacenamiento	Normal	Reducida	Reducida	Reducida	Reducida	Normal
Tricomas en cotiledones	NO	SI	SI	SI	NO	NO
Sensibilidad a ABA en la semilla	Normal	Normal	Normal	Normal	Reducida	Reducida
Semillas tolerantes a la desecación	SI	NO	NO	SI	NO	SI

Partiendo de la hipótesis de que hay un grupo de genes esenciales para la adquisición de TD en la semilla que falla en ser activado en las mutantes intolerantes, se realizó un análisis transcriptómico comparativo entre librerías RNA-seq de semilla de las líneas tolerantes e intolerantes. El incluir líneas con fenotipos muy similares pero que difieren en la TD de su semilla, como es el caso de *lec1-1* vs *lec2-1* y *abi3-5* vs *abi3-1*, permitió discernir entre genes diferencialmente expresados que pudieran ser de interés y aquéllos involucrados con otras características de las mutantes. En la Figura 4 se muestra un mapa de calor de los genes diferencialmente expresados en las mutantes; con recuadros amarillos se resaltan dos conjuntos de genes que están fuertemente reprimidos en todas las líneas intolerantes. Al realizar una revisión de las categorías ontológicas de estos grupos, se encontró que efectivamente participan en procesos que han sido descritos como importantes para la adquisición de TD en la semilla, como la síntesis de proteínas LEA, acumulación de disacáridos y oligosacáridos, y activación de defensas antioxidantes (González-Morales *et al.*, 2016).

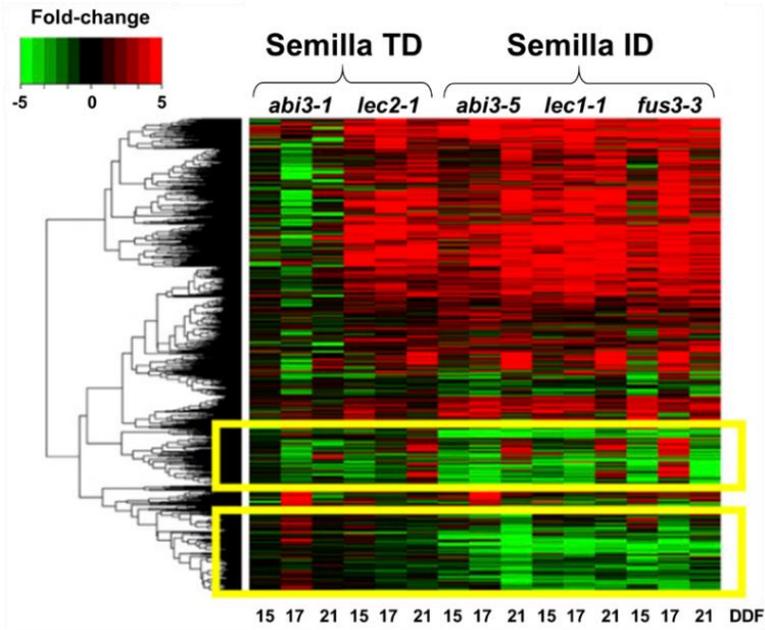


Figura 4. Perfil global de expresión de genes en semillas de mutantes tolerantes e intolerantes a la desecación. Mapa de calor de genes expresados diferencialmente. Cada mutante fue comparada con su fondo silvestre correspondiente (*lec1-1* y *lec2-1* vs *Ws*, *abi3-1* y *abi3-5* vs *Ler*, y *fus3-3* vs *Col-0*) en tres etapas del desarrollo: 15, 17 y 21 DDF. Verde indica valores de represión, rojo indica valores de inducción y negro indica valores sin cambio. Los rectángulos amarillos señalan genes reprimidos en todas las mutantes intolerantes. TD, tolerante a la desecación; ID, intolerante a la desecación (González-Morales *et al.*, 2016).

Sin embargo, este análisis no revela nada acerca la arquitectura de regulación que gobierna a los procesos mencionados. Para identificar estas redes de regulación, se realizó un análisis de co-expresión empleando los FTs que se encontraron reprimidos en las mutantes intolerantes y las bases de datos de 24 microarreglos de Affymetrix ATH1. El resultado arrojó una red de regulación global en la que, al mapear los FTs cuya expresión no es activada en las mutantes intolerantes, éstos se encontraban formando dos subredes. Al estudiar las características de los genes con que estos factores mantienen interacciones, se determinó que la subred 1 participa en respuestas a estrés abiótico y almacenamiento de nutrientes, mientras que la subred 2 está involucrada con mecanismos de protección celular (Figuras 5 y 6) (González-Morales *et al.*, 2016).

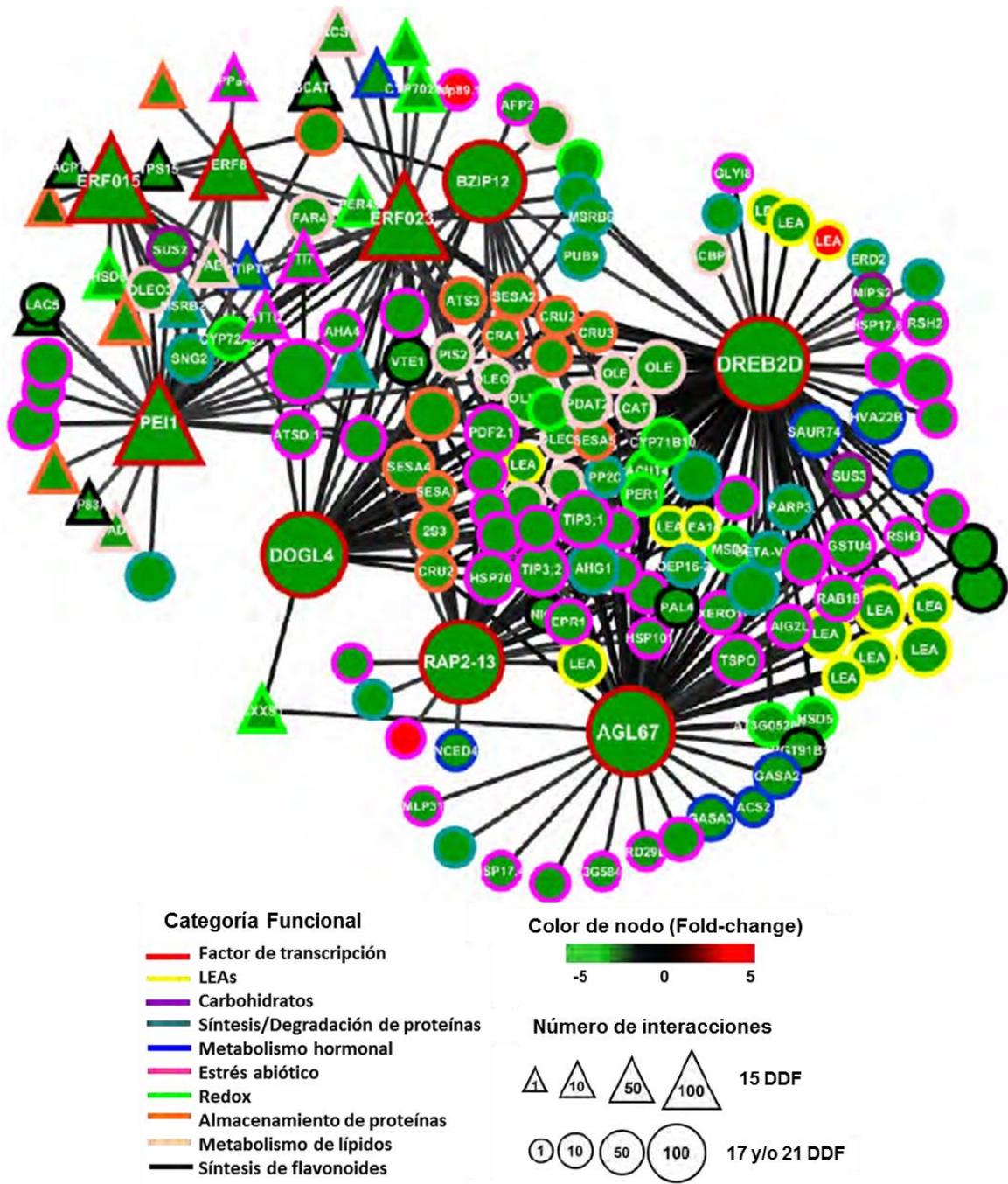


Figura 5: Subred 1 relacionada con estrés abiótico y almacenamiento de nutrientes. Los genes están representados como nodos y las interacciones inferidas como líneas. Nodos triangulares representan genes expresados exclusivamente a los 15 DDF y nodos circulares representan genes expresados en más de un punto en el tiempo. El color del borde de los nodos representa la categoría funcional del gen (González-Morales *et al.*, 2016).

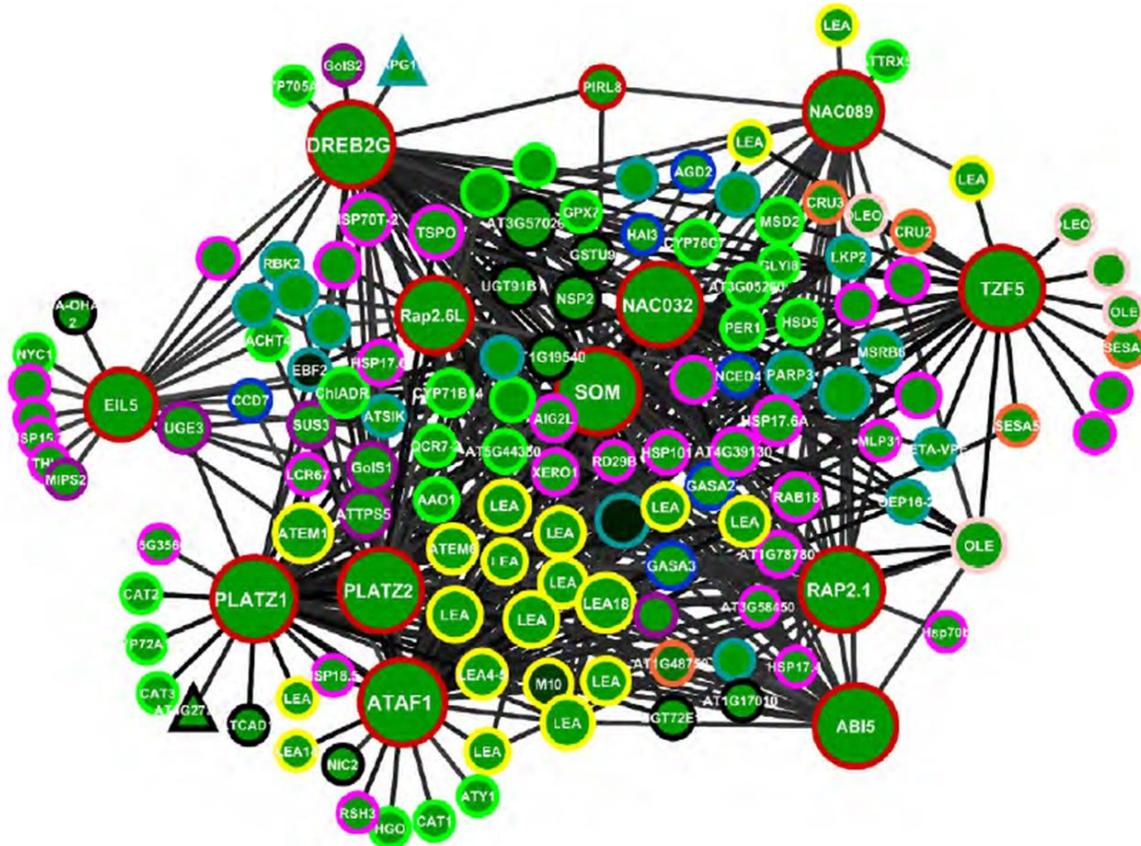


Figura 6. Subred 2 relacionada con mecanismos de protección celular. Los genes están representados como nodos y las interacciones inferidas como líneas. Los atributos de la red corresponden a los descritos en la caja de información de la Figura 5 (González-Morales *et al.*, 2016).

Tanto en la subred 1 como en la subred 2 se pueden apreciar claramente unos cuantos FTs que parecen actuar como nodos principales, es decir, estos factores podrían ser los principales reguladores específicos de la adquisición de la TD en la semilla. Para validar esta conjetura, este mismo grupo de investigación ha estado estudiando individualmente algunos de los factores que corresponden a nodos principales. En la Tabla 3 se muestra la descripción de los genes evaluados hasta ahora, y se incluye a *HAP2C*, la subunidad A3 del factor nuclear Y (NF-Y), dado que estudios han obtenido resultados muy favorables de su participación en la respuesta a estrés abiótico de *Arabidopsis* (Leyva-González *et al.*, 2012); además, un análisis de interacción proteína-proteína con el sistema de dos híbridos mostró que *HAP2C* podría mantener interacción física con *PLATZ1* y *DREB2G*, dos de los principales nodos de la subred 2 (Información no reportada).

Tabla 3: Descripción de factores de transcripción que regulan la TD en semilla (TAIR).

Subred	Nombre	Locus	Descripción
Estrés abiótico y almacenamiento de nutrientes	AGL67	AT1G77950	Factor de transcripción de tipo MADS-box.
	DREB2D	AT1G75490	Miembros de la subfamilia de DREB de la familia de FT's ERF/AP2. Hay 8 miembros en esta subfamilia incluyendo DREB2A y DREB2B, los cuales están involucrados en la respuesta a sequía.
Mecanismos de protección celular	DREB2G	AT5G18450	
	ATAF1	AT1G01720	Pertenece a la familia de putativos activadores transcripcionales con dominio NAC. ATAF1 atenúa la síntesis y señalización de ABA. Mutantes presentan baja sensibilidad a ABA.
	HAP2C	AT1G72830	Subunidad A3 de NF-Y, un complejo de unión al motivo CCAAT presente en algunas secuencias promotoras de plantas. Es expresada en tejido vegetativo y reproductivo.
	PLATZ1	AT1G21000	Factores de transcripción de la familia PLATZ (Plant AT-rich sequence and zinc binding protein).
	PLATZ2	AT1G76590	

2.3.4.3. Efecto de la expresión constitutiva de reguladores de la tolerancia a la desecación de semilla

Con base en la suposición de que los nodos principales de las subredes 1 y 2 corresponden a TFs que actúan río debajo de *ABI3*, *FUS3* y *LEC1* para activar a los genes efectores involucrados con la TD, los nodos *AGL67* y *DREB2D* de la subred 1, y *PLATZ1* de la subred 2 fueron expresados constitutivamente en la línea mutante *abi3-5* para evaluar la capacidad de cada uno de ellos para revertir el fenotipo intolerante a la desecación de la semilla de esta línea. En la Figura 7 se puede apreciar que, efectivamente, los tres FTs fueron capaces de rescatar, al menos parcialmente, la TD de las semillas de *abi3-5* (González-Morales *et al.*, 2016).

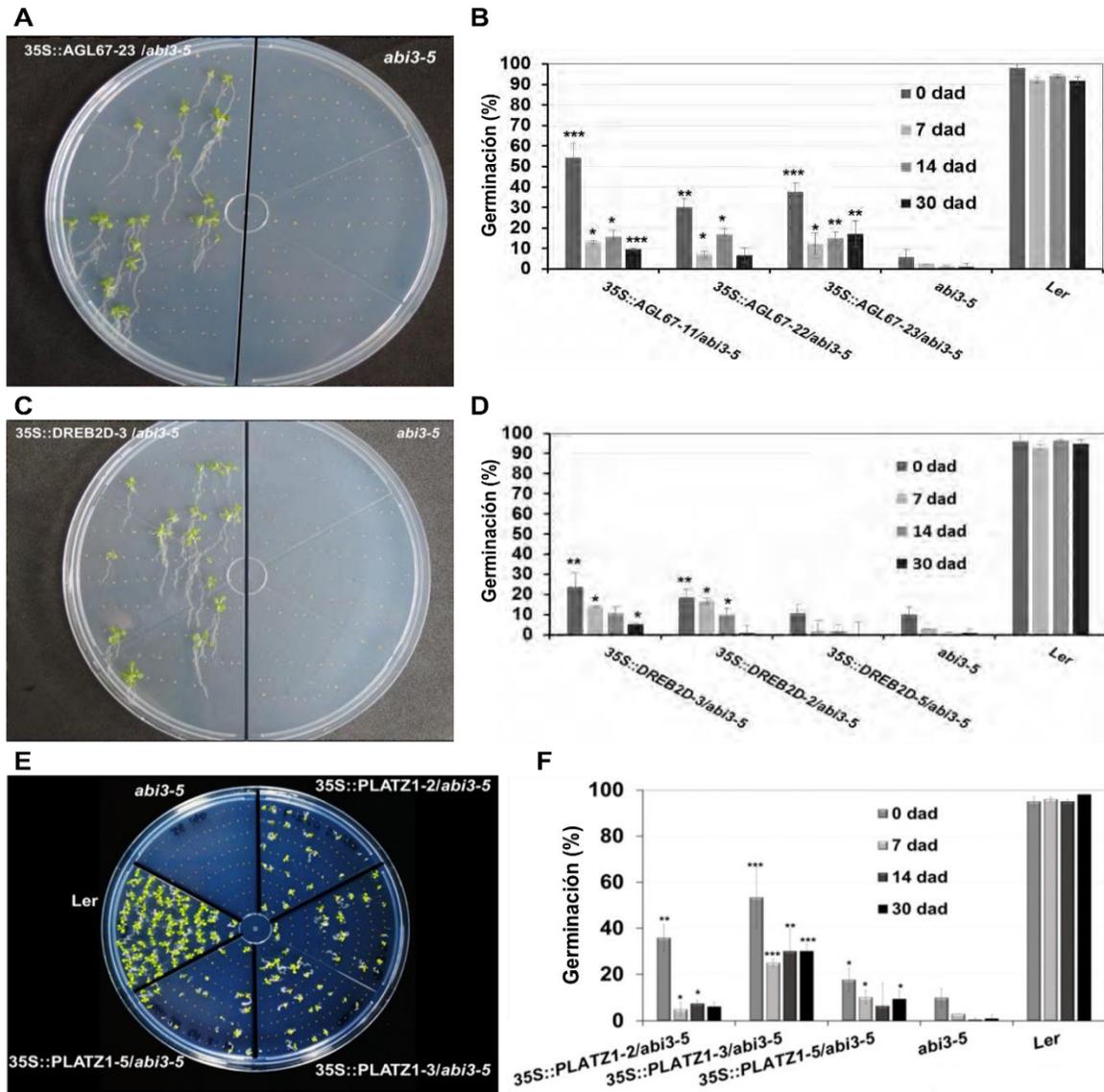
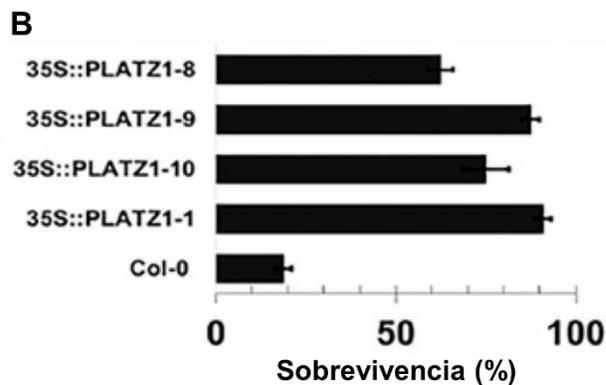


Figura 7. Efecto en semilla de la expresión constitutiva en *abi3-5* de reguladores de la TD. A), C), E) Semillas secas con expresión constitutiva de *AGL67*, *DREB2D* y *PLATZ1*, así como del control silvestre *Ler* y del control mutante *abi3-5*, fueron sembradas sobre placas con medio MS y evaluadas 10 días después. B), D), F) Porcentaje de germinación de las líneas mencionadas (González-Morales *et al.*, 2016).

Con el fin de evaluar si *PLATZ1*, así como fue capaz de conferir cierto grado de TD a las semillas de *abi3-5*, también pudiera mejorar la respuesta de los tejidos vegetativos de *Arabidopsis* a estrés por baja disponibilidad de agua, este gen fue expresado de manera constitutiva en el fondo silvestre Col-0. Al someter plantas de las líneas transgénicas generadas (35S::*PLATZ1*) a un tratamiento de baja disponibilidad de agua, se observó que éstas tuvieron mayor capacidad que el control silvestre para recobrase del estrés tras un riego de recuperación (Figura 8) (González-Morales *et al.*, 2016).



Figura 8. Efecto en tejido vegetativo de la expresión constitutiva de *PLATZ1* en Col-0. A) Plantas sobreexpresantes de *PLATZ1* fueron sometidas a un periodo de baja disponibilidad de agua que consistió de 15 días sin irrigación (arriba). 5 días después de recibir un riego de recuperación, se evaluó la sobrevivencia (abajo). B) Porcentaje de plantas sobrevivientes 5 días después del riego de recuperación (González-Morales *et al.*, 2016).



3. HIPÓTESIS

La expresión en tejido vegetativo de FTs identificados como reguladores clave de la TD en semilla, podría conferir a *A. thaliana* mayor tolerancia a baja disponibilidad de agua.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto en tejido vegetativo de la expresión tanto constitutiva como inducible de siete FTs involucrados con la TD de semilla en *A. thaliana*.

4.2. Objetivos Específicos

- Realizar la construcción de vectores de expresión mediante el sistema de clonación Golden Gate Modular Cloning.
- Obtener líneas homocigotas de *A. thaliana* con expresión o sobreexpresión en tejido vegetativo desde 1 hasta 7 genes de interés.
- Establecer un sistema de evaluación de estrés por baja disponibilidad de agua en invernadero y en cámara de crecimiento.
- Evaluar la tolerancia a baja disponibilidad de agua de las líneas transgénicas.
- Evaluar los niveles de tolerancia a estrés abiótico (osmótico y salino) en condiciones *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este trabajo se empleó como modelo de estudio a *Arabidopsis thaliana*, tomando como control silvestre al ecotipo Columbia-0 (Col-0). Dentro del estudio fueron incluidas las líneas transgénicas con fondo Col-0 p35S::AGL67, p35S::DREB2D, p35S::DREB2G, p35S::PLATZ1 y p35S::PLATZ2 (González-Morales *et al.*, 2016). Las semillas de todas las líneas y para todos los experimentos fueron esterilizadas superficialmente por inmersión consecutiva en los siguientes tratamientos: etanol absoluto (100%) por 8 min, cloro 20% por 7 min y 3 lavados con agua destilada estéril por 5 min cada uno. Las semillas esterilizadas fueron puestas en vernalización a 4°C por un mínimo de 48 horas y, posteriormente, fueron germinadas en cajas Petri con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) 0.1X, pH 5.7, suplementado con 5% de sacarosa y 1% (p/v) de agar (Plant TC), dentro de una cámara de crecimiento (Percival) a 22°C con un fotoperiodo de 16 h de luz fluorescente a 5.47 KLux y 8 h de oscuridad, donde se dejaron crecer por 14 días. Las plántulas fueron transferidas a sustrato para *Arabidopsis* (peat moss, vermiculita y perlita) y puestas en invernadero o en una cámara de crecimiento (Percival, 22°C, 16 h de luz a 6.84 kLux) para la producción de semillas o para los experimentos de baja disponibilidad de agua.

5.2. Selección y asignación de promotores y terminadores a las secuencias codificantes

En este estudio se utilizaron dos tipos de promotores: constitutivos e inducibles por estrés hídrico. Para la selección de los promotores constitutivos se tomó como referencia pCaMV35S (100%). A partir de éste, los promotores fueron asignados de acuerdo al orden de expresión que presentan los genes en la semilla durante la etapa de desecación (17 DDF), con excepción de *ATAF1*, que fue incluido a este estudio en una etapa posterior a la asignación de promotores al resto de los genes (Tabla 4).

Para la selección de los promotores inducibles por estrés hídrico, se tomó en cuenta el tiempo y tejidos de respuesta al estrés. Su asignación fue al azar debido a que, por el tipo de experimentos con los que fueron caracterizados, no fue posible realizar una comparativa entre ellos en cuanto a sus niveles de expresión.

Por otro lado, todos los terminadores se seleccionaron de los provenientes en el kit MoClo Plant Parts, y dado que se reportó que no hay diferencias significativas en su efecto en la expresión de genes (Weber *et al.*, 2014), fueron asignados aleatoriamente.

Tabla 4: Promotores y terminadores asignados a cada secuencia codificante.

Gen	Cpm ^a	Constitutivo		Inducible	Terminador
		Promotor	Exp. Rel. ^b		
<i>DREB2D</i>	419.7	pCaMV35S	100%	pRD29A	TerCaMV35S
<i>PLATZ1</i>	399.0	pCsVMV	100%	pRD29B	TerAtug7
<i>DREB2G</i>	219.8	pEF1B-1l	100%	pRD22	TerAtuMAS
<i>PLATZ2</i>	179.8	pACT2-1l	ND	pRD20	TerACT2
<i>ATAF1</i>	904.2	pTCTP	55%	pDREB2A	TerAtuOCS
<i>AGL67</i>	42.1	pAtuMAS	40%	pCOR15A	TerAtuMAS
<i>HAP2C</i>	14.2	pSIRbcS2	38%	pKIN2	TerSIRbcS3C

^aNivel de expresión en semilla de Col-0 a los 17 DDF (Cpm = Cuentas por millón normalizadas)

^bExpresión relativa respecto al promotor de CaMV35S.

ND=No determinado

5.3. Construcción de vectores de expresión

El sistema de clonación que se eligió para la construcción de los vectores de expresión en plantas fue Modular Cloning[®] (MoClo) (Weber *et al.*, 2011) Este sistema se basa en la tecnología de clonación Golden Gate, la cual permite el ensamble direccional de múltiples fragmentos de DNA en una sola reacción, ya que utiliza la habilidad de las enzimas de restricción de tipo IIS para cortar en un punto diferente (sitio de fusión) a su sitio de reconocimiento (Engler *et al.* 2008).

Para el desarrollo del ensamble de las diferentes construcciones, se adquirieron los dos kits de plásmidos reportados por Weber *et al.* (2011): MoClo Plant Tool Kit, el cual consta de 95 módulos genéticos estandarizados para clonación Golden Gate; y MoClo Plant Parts Kit, que contiene 95 partes estándar para plantas (promotores, marcadores moleculares y terminadores, entre otros) en módulos Nivel 0. Cabe mencionar que la adquisición de este último kit ofreció la ventaja de tener varios de los componentes necesarios en este estudio ya domesticados, es decir, con sus secuencias nucleotídicas libres de sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción requeridas por el sistema de clonación MoClo: Bpil (GAAGAC), Bsal (GGTCTC) y BsmBI (CGTCTC).

El ensamble de vectores se realizó en 3 niveles de clonación como se describe por Marillonnet y Werner (2015):

Nivel 0: Este nivel permite la introducción de las partes estándar que conformarán las unidades transcripcionales, en los vectores de clonación Nivel 0 correspondientes vía Bpil. Para llevar a cabo este paso, fue necesario añadir a cada secuencia en ambos extremos un sitio de reconocimiento para Bpil y un sitio de fusión dictado por los vectores destino diseñados para cada módulo (Figura S1)

El total de las partes estándar que fueron empleadas en este proyecto, entre promotores, intrones, secuencias codificantes y terminadores, fueron obtenidas de 3 fuentes: amplificación por PCR de alta fidelidad (Taq polimerasa Phusion, Invitrogen), síntesis en GenScript® o en el kit MoClo Plant Parts (Tabla S1). Para determinar la procedencia de cada parte, se hizo un análisis de secuencia para verificar la ausencia de sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción a utilizar durante todo el proceso de clonación.

En el caso de las secuencias codificantes que fueron amplificadas por PCR (*AGL67*, *ATAF1* y *HAP2C*), esto se hizo usando como molde cDNA transcrito a partir de RNA extraído de semillas de Col-0 de 17 DDF. La lista de oligonucleótidos empleados se muestra en la Tabla S2. Los promotores se amplificaron de DNA extraído de plantas de Col-0.

El protocolo a seguir para la introducción de partes estándar en vectores Nivel 0 fue el siguiente:

1. Pipetear en un tubo de PCR 20 fmol de la parte estándar a clonar (producto de PCR o vector) y del vector destino, 2 µl de buffer de ligación 10x, 5 U de Bpil (Thermo Scientific), 4 U de HC T4 ligasa (Promega), y agua hasta un volumen final de 20 µl.
2. Incubar las reacciones a 37°C por una noche seguido de 4 hrs a temperatura ambiente.
3. Inactivar las reacciones a 80°C por 10 min.
4. Precipitar el DNA de la reacción agregando 2 volúmenes de etanol absoluto y dejando a 80°C por 20 minutos. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos y decantar el sobrenadante. Hacer un lavado con etanol 70% y resuspender el pellet en 10 µl de agua.
5. Transformar el producto de la reacción en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α por electroporación a 2.5 kV (Bio-Rad MicroPulser) e inmediatamente transferirlas a

250 µl de medio SOC para ponerlas en recuperación a 37°C por 1 hr a 1100 rpm (Bio-Rad Termomixer).

6. Plaquear 100 µl de la transformación sobre medio sólido LB con 100 µg/ml de espectinomicina (Sigma-Aldrich), 40 µg/ml de X-gal (Research Ultraorganics) y 200 µM de IPTG (Gibco BRL).
7. Seleccionar dos colonias positivas (blancas) y transferirlas a medio LB líquido con 100 µg/ml de espectinomicina.
8. Comprobar las colonias mediante PCR en colonia y con DNA plasmídico. En este paso se utilizaron un par de oligonucleótidos universales Nivel 0 (pICH_Sequencing, T_m 58°C) (Tabla S2), que flanqueaban al sitio de inserción en todos los vectores de este nivel, para amplificar secuencias con un tamaño mayor a 900 pb. Para secuencias con un tamaño menor al mencionado, se utilizaron oligonucleótidos específicos para evitar confundir el fragmento de interés con LacZα (644 pb).

Nivel 1: Este nivel consiste en el ensamblado de unidades transcripcionales (genes) en una de las siete posiciones que proveen los vectores Nivel 1 vía Bsal (Figuras S2 y S3A). Una vez que se tuvieron todas las secuencias necesarias clonadas en vectores Nivel 0, se procedió a armar las unidades transcripcionales, tanto de genes de interés como de marcadores moleculares, en vectores Nivel 1 en todas las posiciones requeridas para el Nivel 2. En la Tabla 5 se indican los componentes de cada unidad transcripcional y sus respectivas posiciones.

El ensamble de unidades transcripcionales en vectores Nivel 1 se realizó mediante los siguientes pasos:

1. Pipetear en un tubo de PCR 20 fmol de cada módulo Nivel 0 y del vector Nivel 1, 2 µl de buffer de ligación 10x, 10 U de Bsal (NEB), 6 U de HC T4 ligasa, y agua hasta un volumen final de 20 µl.
2. El proceso de incubación, inactivación, precipitación y transformación fue el mismo que en el nivel anterior.
3. Plaquear 100 µl de la transformación sobre medio sólido LB con 60 µg/ml de carbenicilina (Geopen), 40 µg/ml de X-gal y 200 µM de IPTG.
4. Seleccionar dos colonias positivas (blancas) y transferirlas a medio LB líquido con 60 µg/ml de carbenicilina.
5. Comprobar las colonias mediante PCR en colonia con oligonucleótidos universales Nivel 1 (Vector L1, T_m 61°C) (Tabla S2), y PCR con DNA plasmídico y combinaciones

de oligonucleótidos específicos como se ilustra en la Figura S3B para verificar el correcto ensamble de las unidades transcripcionales.

Tabla 5: Componentes de las unidades transcripcionales.

Unidad Transcripcional		Componentes				Posiciones						
Nombre	Tipo	Pro	5U	CDS	Ter	1	2	3	4	5	6	7
AGL67	Const.	pAtuMas	-	AGL67	tAtuMas	X						
	Ind.	pCOR15A	-			X	X					
ATAF1	Const.	pTCTP	-	ATAF1	tAtuOcs	X	X					X
	Ind.	pDREB2A	-			X	X					
DREB2D	Const.	pCaMV35S	-	DREB2D	tCaMV35S		X					
	Ind.	pRD29A	-			X						
DREB2G	Ind.	pRD22	-	DREB2G	tAtuMas	X	X		X			
HAP2C	Const.	pSIRbcS2	-	HAP2C	tSIRbcS3C	X		X		X		
	Ind.	pKIN2	-			X		X		X		
PLATZ1	Const.	pCsVMV	-	PLATZ1	tAtug7	X						X
	Ind.	pRD29B	-			X						
PLATZ2	Const.	pACT2	ACT-1I	PLATZ2	tACT2	X	X	X				
	Ind.	pRD20	-			X	X	X				
Basta^R		pAtuNos - <i>bar</i> - tAtuNos					X	X				
Kan^R		pAtuNos - <i>nptII</i> - tAtuOcs					X	X	X	X	X	
Ole-RFP		pOLE1 - OLE1 - tagRFP - tOLE1					X					
Phi (Fosfito)		pLHB1B1	-	<i>ptxD</i>	tAtuOcs		X					
Gent^R		pAtuNos	-	<i>aacC1</i>	tAtuNos		X					

Nivel 2: En este nivel se pueden clonar hasta 6 módulos Nivel 1 (genes) en un vector Nivel 2 vía Bpil en una sola reacción, donde los genes sustituyen al operón sintético conformado de genes de *Pantoea ananatis* y *Agrobacterium aurantiacum* para la biosíntesis de cantaxantina (color rojo), permitiendo así la selección de clonas positivas por color (Figuras S4 y S5A). El último gene es fusionado al vector mediante un enlazador (*End-Linker*) compatible que puede ser de dos tipos. El primer tipo da como resultado construcciones cerradas a las cuales ya no se les puede agregar más genes (pELE-1 a pELE-7 en Figura S4). Los enlazadores del segundo tipo contienen sitios de reconocimiento adicionales para

enzimas tipo IIS, lo cual da como resultado construcciones abiertas a las cuales se les puede agregar más genes en pasos posteriores de clonación Nivel 2 (series pELB y pELP en Figura S4). Hay dos tipos de enlazadores abiertos para permitir la selección de colonias positivas entre cada paso de clonación por cambio de color, mientras que LacZ α (flanqueado por Bsal) dará origen a colonias azules, Vio (operón sintético ensamblado de genes de *Janthinobacterium violaceum* para la biosíntesis de desoxiviolaceína, flanqueado por BsmBI) generará colonias de color morado.

El primer ensamble de unidades transcripcionales en vectores Nivel 2 (Nivel 2-1) se realizó de la siguiente manera:

1. Pipeteo en un tubo de PCR de 20 fmol de cada módulo Nivel 1, del end-linker (LacZ α) y del vector Nivel 2, 2 μ l de buffer de ligación 10x, 5-10 U de Bpil, 6-16 U de HC T4 ligasa (la cantidad de enzima depende del número de genes a ensamblar), y agua hasta un volumen final de 20 μ l.
2. Incubación de las reacciones en un termociclador (Veriti) con el siguiente programa: 15 min a 37°C, 50 ciclos compuestos de 2 min a 37°C y 3 min a 16°C, y 10 min adicionales a 16°C. Para permitir que se completara la ligación, las reacciones se dejaron a 4°C por una noche (la ligasa T4 trabaja mejor a temperaturas bajas).
3. Los pasos de inactivación, precipitación y transformación se realizaron de la misma manera que en los niveles anteriores.
4. Plaqueo de 100 μ l de la transformación sobre medio sólido LB con 50 μ g/ml de kanamicina (Affymetrix), 40 μ g/ml de X-gal y 200 μ M de IPTG.
5. Selección de 3 colonias positivas (azules) y transferencia a medio LB líquido con 50 μ g/ml de kanamicina.
6. Comprobación de las colonias seleccionadas mediante la amplificación de uno de sus genes por PCR en colonia y con la amplificación de todos los genes de interés por PCR con DNA plasmídico (Fig. S5B).

El ensamble Nivel 2-n fue muy similar al anterior, con las siguientes diferencias:

1. Pipeteo en un tubo de PCR de 20 fmol de cada módulo Nivel 1, del end-linker (Vio o LacZ α) y del vector Nivel 2-n, 3 μ l de buffer de ligación 10x, 8-10 U de Bpil, 6-8 U de Bsal o 5 U de BsmBI (en el caso de esta última, realizar el paso previo de incubación mencionado en el siguiente número antes de agregar la Bpil y la ligasa), 6-20 U de HC

ligasa (la cantidad de enzima depende del número de genes a ensamblar), y agua hasta un volumen final de 30 μ l.

2. Si la enzima para retirar el end-linker es Bsal, realizar la incubación como en el Nivel 2-1. Si la enzima es BsmBI, agregar ésta y colocar la reacción a 55°C por 20 min antes de añadir las enzimas restantes. Una vez finalizado este paso y ya habiendo agregado las enzimas correspondientes, proceder a la incubación mencionada en el nivel anterior.
3. Los pasos de inactivación, precipitación, transformación y comprobación se realizarán como se señaló en el nivel 2-1, sólo que en la selección, se va alternando entre colonias azules y moradas (o blancas si se decidiera cerrar las construcciones, que no fue el caso de este trabajo) dependiendo del end-linker empleado.

En la Tabla 6 se muestran los pasos de ensamblado Nivel 2 con que cada construcción de este trabajo fue hecha.

Tabla 6: Unidades transcripcionales que componen cada vector de expresión y sus niveles de ensamble.

Construcción Nivel 2	Nivel 2-1 (LacZα)	Nivel 2-2 (Vio)	Nivel 2-3 (LacZα)
ATAF1	ATAF1 + Basta ^R	-	-
HAP2C	HAP2C + Gent ^R	-	-
AG-2D	AGL67 + DREB2D + Basta ^R	-	-
P1-AT	PLATZ1 + ATAF1 + Basta ^R	-	-
P1-P2	PLATZ1 + PLATZ2 + Basta ^R	-	-
P2-AT	PLATZ2 + ATAF1 + Basta ^R	-	-
P1-AT-P2	PLATZ1 + ATAF1 + PLATZ2 + Kan ^R	-	-
AGL67 Ind.	AGL67 Ind + Ole-RFP	-	-
ATAF1 Ind.	ATAF1 Ind + Basta ^R	-	-
DREB2D Ind.	DREB2D Ind. + Ole-RFP	-	-
DREB2G Ind.	DREB2G Ind. + Phi	-	-
HAP2C Ind.	HAP2C Ind + Gent ^R	-	-
PLATZ1 Ind.	PLATZ1 Ind. + Basta ^R	-	-
PLATZ2 Ind.	PLATZ2 Ind. + Kan ^R	-	-

Tabla 6 (Continuación): Unidades transcripcionales que componen cada vector de expresión y sus niveles de ensamble.

Construcción Nivel 2	Nivel 2-1 (LacZα)	Nivel 2-2 (Vio)	Nivel 2-3 (LacZα)
2D-AG Ind.	DREB2D Ind. + AGL67 Ind. + Basta ^R	-	-
P1-2G Ind.	PLATZ1 Ind. + DREB2G Ind. + Kan ^R	-	-
P1-AT Ind.	PLATZ1 Ind. + ATAF1 Ind. + Basta ^R	-	-
P1-P2 Ind.	PLATZ1 Ind. + PLATZ2 Ind. + Basta ^R	-	-
P2-AT Ind.	PLATZ2 Ind. + ATAF1 Ind. + Basta ^R	-	-
P1-AT-P2 Ind.	PLATZ1 Ind. + ATAF1 Ind. + PLATZ2 Ind. + Kan ^R	-	-
P1 2G-HAP Ind.	PLATZ1 Ind. + Basta ^R	DREB2G Ind. + HAP2C Ind.	-
P1-AT-P2 2G Ind.	PLATZ1 Ind. + ATAF1 Ind. + PLATZ2 Ind.	DREB2G Ind. + Kan ^R	-
P1-AT-P2 2G-HAP Ind.	PLATZ1 Ind. + ATAF1 Ind. + PLATZ2 Ind.	DREB2G Ind. + HAP2C Ind. + Kan ^R	-
2D-AG 2G-HAP- P1 AT-P2 Ind.	DREB2D Ind.+ AGL67 Ind. + Basta ^R	DREB2G Ind. + HAP2C Ind. + PLATZ1 Ind.	ATAF1 Ind. + PLATZ2 Ind.

5.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GPV2260 fueron transformadas con cada uno de los vectores por medio de electroporación a 2.5 kV e inmediatamente transferidas a 250 μ l de medio SOC para ser puestas en recuperación a 28°C por 2 h con una agitación de 1100 rpm. Transcurrido este tiempo, se extendieron 100 μ l de células sobre placas con medio YEB sólido suplementado con 100 μ g/ml de

carbenicilina, 100 µg/ml de rifampicina (Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de kanamicina. El periodo de crecimiento de colonias fue muy variable dependiendo del tamaño de la construcción, pudiendo ser éste desde 3 hasta 30 días.

Una vez que se tuvieron las colonias, se seleccionaron dos para transferirlas a medio YEB líquido suplementado con los mismos antibióticos que el medio sólido y se les hizo un PCR en colonia para la seleccionar una sola colonia a la cual comprobar mediante la amplificación de todos los genes que componían la construcción por PCR con DNA plasmídico.

5.5. Transformación de *A. thaliana* y selección de líneas homocigotas con una inserción

La transformación de las construcciones en plantas de *A. thaliana* se realizó por el método de agroinfiltración por floral dip reportado por Martínez-Trujillo en 2004, con la diferencia de que las inoculaciones fueron aplicadas dos veces por semana hasta el agotamiento del botón floral.

Para la selección de plantas transformadas (T_0), se analizó aproximadamente el 25% del total de semillas colectadas de 5 plantas tratadas por agroinfiltración, y se sembraron sobre 3 o 4 cajas Petri de 20 cm de diámetro con medio MS conteniente del reactivo correspondiente a cada marcador: 20 µg/ml de glufosinato de amonio (Sigma-Aldrich) (Basta^R), 40 µg/ml de kanamicina (Kan^R), 20 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich) (Gent^R) o 1mM de H₂KO₃P (Wanjie International) (Phi). Para el caso de selección por Ole-RFP, las semillas se seleccionaron bajo microscopía Lumar (Zeiss).

Las plantas seleccionadas (mínimo 20 por construcción) fueron autopolinizadas para obtener la generación T_1 de semillas, en la cual se seleccionaron 5 líneas que presentaron segregación Mendeliana para 1 característica dominante (75% \pm 5 de fenotipo positivo para el respectivo marcador) para asegurar la presencia de una sola inserción. Mediante otro ciclo de autopolinización se obtuvo la generación T_2 , que sirvió para seleccionar al menos tres familias de semillas homocigotas por línea para su posterior análisis.

5.6. Preparación y evaluación de sustratos

Para los experimentos de baja disponibilidad de agua se pusieron a prueba dos sustratos. El primero de ellos se preparó mediante la mezcla de peat moss, vermiculita y perlita (PVP) en una proporción 3:1:1. Una vez homogénea la mezcla, se le adicionó agua

hasta el punto de saturación (160 ml de agua / litro de sustrato). A charolas de 27.30 cm X 54.01 cm X 6.08 cm (T.O. Plastics®, No. Catálogo 790920C) se les adicionó 3 kg del sustrato húmedo, a macetas de 10 cm de diámetro 125 gr y a macetas de 8.40 cm x 8.40 cm x 8.89 cm (T.O. Plastics®, No. Catálogo 700022C) 135 gr.

El segundo sustrato consistió en una mezcla de peat moss, arena y vermiculita (PAV) en partes iguales. Una vez homogénea la mezcla, se le adicionó agua hasta el punto de saturación (211 ml de agua / litro de sustrato). A charolas de 27.30 cm X 54.01 cm X 6.08 cm se les adicionó 7.2 kg del sustrato húmedo y a macetas de 10 cm de diámetro 300 gr.

En las charolas se sembraron 10 plántulas de 14 DDG de 5 líneas (4 líneas transgénicas y Col-0) dando un total de 50 plántulas por charola y se manejaron 3 réplicas (n=30 por línea). En macetas se sembraron 5 plántulas en cada una y se hicieron 4 réplicas (n=20 por línea).

5.7. Evaluación de tolerancia a estrés por baja disponibilidad de agua

Para la evaluación de la tolerancia de las diferentes líneas a estrés por baja disponibilidad de agua, se pasaron plántulas de 14 DDG a macetas cuadradas de 8.40 cm con 135 gr de sustrato PVP. Dependiendo del experimento, fueron colocadas en invernadero o en cámara de crecimiento (Percival, 22°C, 16 h de luz fluorescente a 6.84 KLux y 8 h de oscuridad). En invernadero, las plantas fueron mantenidas con irrigación por 27 días, en cámara fue por 14 días. El riego fue suspendido por 15 días en invernadero y por 21 días en cámara, tras los cuales se hizo un riego de recuperación. La tasa de sobrevivencia (Número de plantas sobrevivientes / Número total de plantas) fue evaluada 5 días (invernadero) o 7 días (cámara) después del riego de recuperación. Los resultados muestran la mediana de aproximadamente 20 individuos divididos en 4 réplicas.

5.8. Evaluación de tolerancia a estrés osmótico moderado

Para evaluar la tolerancia de las diferentes líneas a estrés osmótico moderado, se adicionó por difusión 10% de polietilenglicol (PEG 8000, Sigma Aldrich) a placas con medio sólido MS 0.1X de acuerdo al protocolo reportado por Van der Weele *et al.* (2000). En media placa se sembraron dos filas con 10 semillas de la línea transgénica cada una, en la otra mitad se hizo lo mismo con Col-0. Las placas fueron colocadas en una cámara de crecimiento (22°C, 16 h de luz fluorescente a 5.47 KLux y 8 h de oscuridad). La tasa de germinación (Número de semillas germinadas / Total de semillas sembradas) fue evaluada cada dos días durante dos semanas y, al finalizar este periodo, se cuantificó la longitud de

la raíz principal en centímetros. En ambos casos, los datos fueron normalizados respecto los datos obtenidos en medio MS. Los resultados mostrados representan la mediana de aproximadamente 60 individuos (en el caso de la longitud de la raíz principal, el valor real dependió de la tasa de germinación de cada línea) divididos en 3 réplicas.

5.9. Evaluación de tolerancia a estrés por alta salinidad

Con el fin de evaluar la tolerancia de las diferentes líneas a estrés por alta salinidad, medio sólido MS 0.1X fue suplementado con 100 mM de cloruro de sodio (NaCl, KEM). Las placas fueron sembradas con la misma distribución que en el tratamiento osmótico y colocadas en una cámara de crecimiento con las condiciones arriba mencionadas. La tasa de germinación (Número de semillas germinadas / Total de semillas sembradas) fue evaluada cada dos días durante dos semanas y, finalizado este periodo, se cuantificó el porcentaje de sobrevivencia (Plántulas con clorofila / Semillas germinadas). En ambos casos, los datos fueron normalizados respecto los datos obtenidos en medio MS. Los resultados mostrados representan la mediana de aproximadamente 60 individuos (para el porcentaje de sobrevivencia, el valor real dependió de la tasa de germinación de cada línea) divididos en 3 réplicas.

5.10. Análisis estadísticos

Los datos cuantitativos de todos los experimentos fueron analizados estadísticamente empleando el programa R (<http://www.R-project.org>). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA, $P < 0.05$) de una vía con base en el diseño de cada experimento. Las comparaciones múltiples entre diferentes grupos fueron realizadas mediante la prueba HSD de Tukey ($P < 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1. Construcción de vectores de expresión

Para realizar el ensamble de unidades transcripcionales y la inserción de éstas en vectores para su expresión en *A. thaliana*, se utilizó el sistema de clonación MoClo[®], el cual se divide de tres niveles de clonación. El Nivel 0 (N0) consistió en la inserción de las diferentes partes que conformarían las unidades transcripcionales en vectores específicos. Entre promotores, intrones y secuencias codificantes, fue necesario ensamblar 22 vectores N0, el resto de las partes fueron adquiridas en el kit MoClo Plant Parts. Una vez completo el grupo N0, se continuó con el ensamblaje de 14 unidades transcripcionales en las diferentes posiciones Nivel 1 (N1) requeridas para el Nivel 2 (N2). De las 46 construcciones N1 contempladas, se lograron ensamblar 45. Debido a ello, en el N2 sólo se completaron 24 de las 29 construcciones planeadas (Tabla 7). En la Tabla 8 se detalla las construcciones N2 que se tienen ensambladas hasta el momento.

Para validar que las construcciones N2 tuvieran todos los genes correspondientes, cada una de ellas fue comprobada mediante la amplificación por PCR de todos sus módulos incluyendo el gen del marcador molecular (Figura S5B); este paso se realizó con DNA plasmídico tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens* (Figura 9).

Tabla 7: Avance general en la construcción de vectores de expresión.

Construcciones	Total	Avance	
Nivel 0	22	22	100 %
Nivel 1	46	45	98 %
Nivel 2	29	24	83 %
<i>A. tumefaciens</i>	29	24	83 %

Tabla 8: Lista de construcciones ensambladas.

Construcción Nivel 2	Constitutiva	Inducible
AGL67	--	Sí
ATAF1	Sí	Sí
DREB2D	--	Sí
DREB2G	--	Sí
HAP2C	Sí	Sí
PLATZ1	--	Sí
PLATZ2	--	Sí
2D-AG	No	Sí
P1-2G	Sí	Sí
P1-AT	Sí	Sí
P1-P2	Sí	Sí
P2-AT	Sí	Sí
P1-AT-P2	Sí	Sí
P1 2G-HAP	No	Sí
P1-AT-P2 2G	No	Sí
P1-AT-P2 2G-HAP	No	Sí
2D-AG 2G-HAP-P1 AT-P2	No	Sí
Total	12	17
Realizadas	7	17
Avance	58.3%	100%

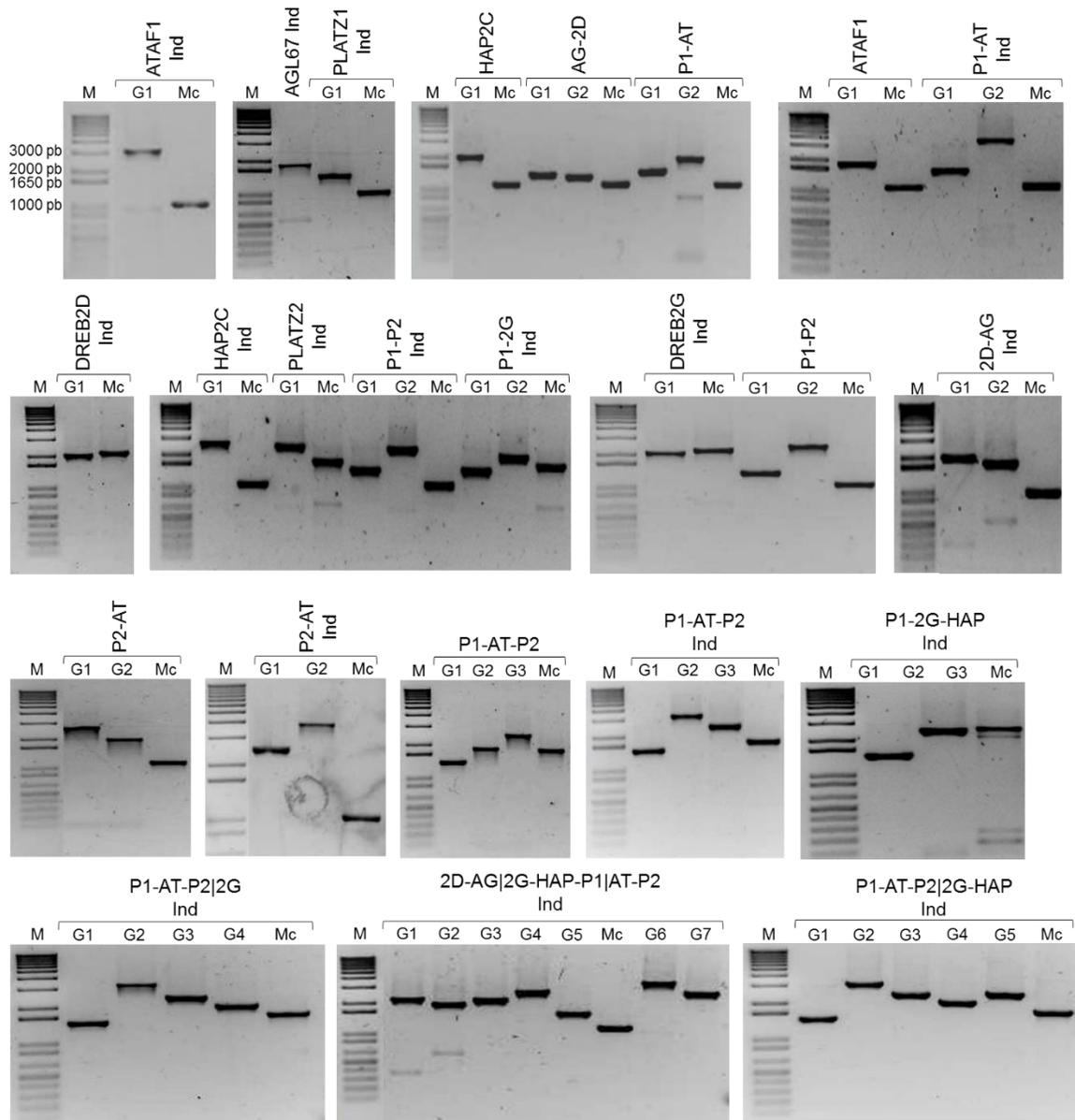


Figura 9: Comprobación de las construcciones Nivel 2 en *A. tumefaciens*. Cada una de las construcciones finales fue verificada mediante la amplificación de todos los genes (G) de interés y su respectivo marcador molecular (Mc). En la imagen se muestran los geles de electroforesis de PCRs hechos a partir de DNA plasmídico extraído de *A. tumefaciens*.

6.2. Obtención de líneas sobreexpresantes homocigotas

Los diferentes vectores fueron transformados en *A. thaliana* mediante agroinfiltración por floral dip. Una vez que se obtuvieron plantas transformadas (T_0), se procedió al análisis de segregación Mendeliana en la generación T_1 para seleccionar líneas con una inserción de T-DNA y, posteriormente, en la generación T_2 se buscaron líneas homocigotas (HM). En la Tabla 9 se muestra el avance que se ha tenido en este proceso con cada una de las construcciones.

Tabla 9: Avance general en la obtención de líneas homocigotas con expresión constitutiva e inducible por estrés hídrico de los diferentes FTs.

Construcción	Transformantes (T_0)	Líneas segregantes (T_1)	Líneas HM (T_2)
ATAF1	32	5	4
HAP2C	22	5	--
2D-AG	33	5	--
P1-AT	30	5	--
P1-P2	32	5	--
P2-AT	32	5	--
P1-AT-P2	30	5	--
AGL67 Ind	36	5	4
ATAF1 Ind	31	5	5
DREB2D Ind	17	--	--
DREB2G Ind	29	5	3
HAP2C Ind	13	5	--
PLATZ1 Ind	29	5	4
PLATZ2 Ind	35	5	4
2D-AG Ind	29	5	--
P1-2G Ind	30	5	--
P1-AT Ind	31	5	--
P1-P2 Ind	27	5	--
P2-AT Ind	30	5	--
P1-AT-P2 Ind	20	5	--
P1 2G-HAP Ind	23	5	--
P1-AT-P2 2G Ind	En Proceso	--	--
P1-AT-P2 2G-HAP Ind	En Proceso	--	--
2D-AG 2G-HAP-P1 P2-AT Ind	En Proceso	--	--

6.3. Selección del sustrato para las evaluaciones de baja disponibilidad de agua

Con el fin de seleccionar un sustrato apropiado para optimizar la duración de los experimentos de baja disponibilidad de agua (BDA), lo cual involucra un equilibrio entre el desarrollo adecuado de las plantas bajo condiciones normales de riego y la baja retención de humedad en el sustrato, en primera instancia se evaluaron dos sustratos en charolas T.O. Plastics®. El primero de ellos corresponde al sustrato generalmente utilizado para *A. thaliana* (PVP) y el segundo fue una mezcla que contenía arena para acelerar la pérdida de agua (PAV). Estas pruebas de sustratos se realizaron en invernadero empleando como control positivo dos generaciones de las líneas PLATZ1-1 y PLATZ1-9, reportadas por González-Morales *et al.* (2016) como tolerantes a BDA (TBDA), y como control negativo Col-0.

En la primera prueba, la cual se realizó durante el periodo Diciembre-Enero, el sustrato PVP se mantuvo con irrigación normal por 27 días; no obstante, al percibir que en PAV las plantas presentaban un retraso en su crecimiento, se decidió agregar 6 días más de riego a este sustrato con el fin de obtener un tamaño de roseta adecuado para el siguiente paso (Tabla 8). Posteriormente, se cuantificó tanto el porcentaje de sobrevivencia como el diámetro de roseta de las plantas a los 34 días de haber sido transferidas a suelo. En la Figura 10A,C se aprecia que en PAV, las líneas PLATZ1-1 tuvieron una disminución de aproximadamente 35% en su sobrevivencia, mientras que en el resto de las líneas no se observó cambio alguno. Por otro lado, en este mismo sustrato todas las líneas presentaron una disminución en el tamaño de su roseta que varió desde el 10 hasta el 40% (Figura 10B,C), siendo una vez más las líneas PLATZ1-1 las que mostraron una mayor afectación. Cabe recalcar que la disminución mencionada se dio a pesar del aumento en la duración del periodo de riego a este sustrato.

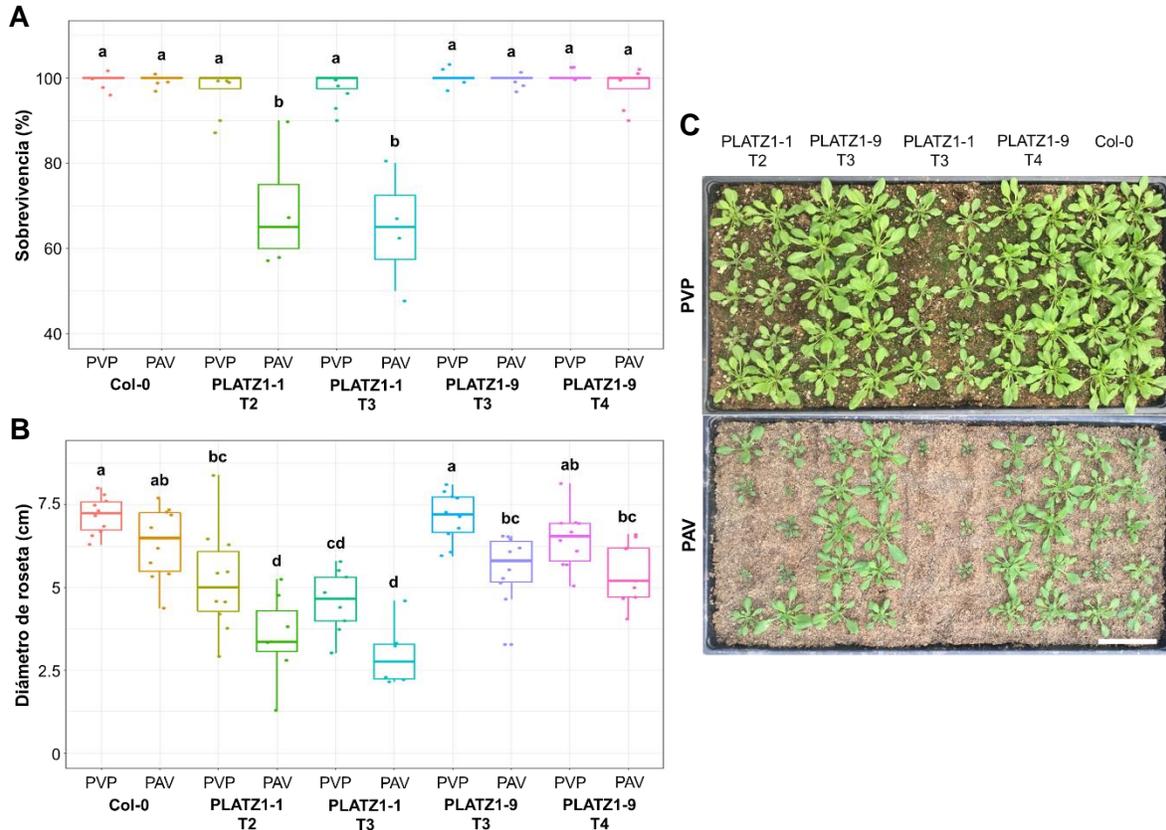


Figura 10: Efecto de los sustratos sobre la sobrevivencia y diámetro de roseta bajo condiciones normales de riego. A) Porcentaje de sobrevivencia de las líneas PLATZ1 y Col-0 después de 34 días en los diferentes sustratos. B) Evaluación de diámetro de roseta. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de tres repeticiones (n=30). Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P < 0.05$). C) Plantas de las diferentes líneas crecidas en charolas con PVP (arriba) o PAV (abajo). Escala=7 cm.

Una vez finalizado el periodo de irrigación, se procedió a suspender el suministro de agua hasta un punto donde la apariencia de las plantas Col-0 indicara que su recuperación sería menor a la de los controles positivos. El riego de recuperación en PVP se hizo 18 días después de la última adición de agua, y en PAV se hizo a los 13 días. Se permitió que las plantas se recuperaran por 5 días antes de evaluar el porcentaje de sobrevivencia de cada una de las líneas en los diferentes sustratos. En PVP no hubo diferencia significativa en la sobrevivencia entre las líneas PLATZ1 y Col-0 (Figura 11A,C), lo cual indica que el tiempo en estrés fue excesivo. Por su parte, en PAV se pudo apreciar que Col-0 presentó un porcentaje de sobrevivencia del 20%, mientras que las líneas sobreexpresantes de *PLATZ1* tuvieron una mejor sobrevivencia superior al 78%, salvo la línea PLATZ1-1 T3 que no mostró una diferencia significativa respecto a Col-0 (Figura 11B,D).

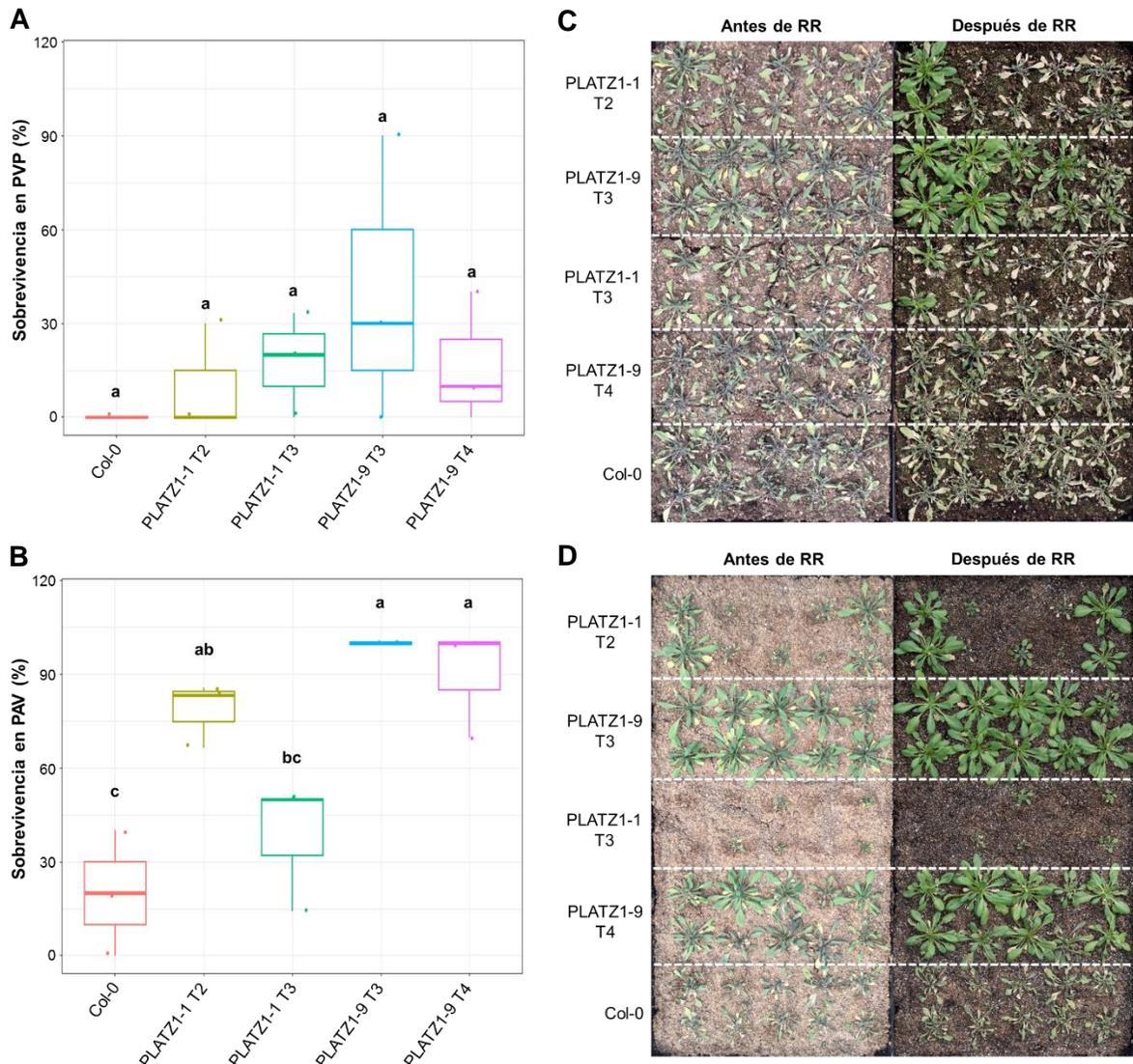


Figura 11: Sobrevivencia de las líneas PLATZ1 a la baja disponibilidad de agua en los diferentes sustratos. A) Porcentaje de sobrevivencia en PVP después de 18 días sin irrigación. B) Porcentaje de sobrevivencia en PAV después de 13 días sin irrigación. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de tres repeticiones (el número de individuos varió de acuerdo a la sobrevivencia antes de la suspensión del riego). Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P < 0.05$). C) y D) A la izquierda se muestran plantas en PVP (arriba) o PAV (abajo) sujetas a 18 y 13 días sin irrigación, respectivamente. A la derecha se observan las mismas plantas 5 días después del riego de recuperación (RR)

Al evaluar la duración total del experimento de BDA en ambos sustratos, se encontró que, contrario a lo que se esperaba, PAV no disminuyó la duración del experimento. Esto debido a que, aunque PAV presentó una tasa de pérdida de agua mayor que PVP, se tuvo que mantener con irrigación por un periodo mayor (Tabla 9).

Tabla 10: Duración de las diferentes etapas del experimento de baja disponibilidad de agua con diferentes sustratos.

Sustrato	Periodo de irrigación	Periodo sin riego	Tiempo en recuperación	Evaluación de período sin riego	Duración total
PVP	27 días	18 días	5 días	Tiempo excedido	50 días
PAV	33 días	13 días	5 días	Tiempo adecuado	51 días

Por último, al valorar cualitativamente el desempeño del experimento de BDA con diferentes sustratos, se observó que las plantas sobrevivientes se agrupaban en algunas zonas específicas de las charolas aun siendo de diferentes líneas (Figura 11C), sugiriendo una variación en la tasa de pérdida de agua en diferentes puntos de la charola. Con el fin de disminuir este efecto, se planteó el uso de macetas en las siguientes pruebas.

En una segunda prueba, realizada durante el periodo Marzo-Abril y que consideró los cambios arriba mencionados, se pudo apreciar que la sobrevivencia en PAV se vio significativamente afectada en todas las líneas (Figura 12). Al igual que en el ensayo anterior, PLATZ1-1 presentó la mayor disminución en su porcentaje de sobrevivencia en PAV, sin embargo, en esta ocasión fue del 75%. En cambio, aunque PLATZ1-9 y Col-0 no se habían visto afectadas en su sobrevivencia en dicho sustrato, en este ensayo presentaron una disminución del 40 y 25%, respectivamente.

Con base en los experimentos anteriores, se estableció que las evaluaciones de BDA se realizarían en macetas con sustrato PVP. El sustrato PVP fue seleccionado con la finalidad de mantener el óptimo desarrollo de las plantas de *A. thaliana*, y como ya se mencionó, se eligió un sistema en macetas para disminuir el efecto causado por variaciones en la tasa de pérdida de agua.

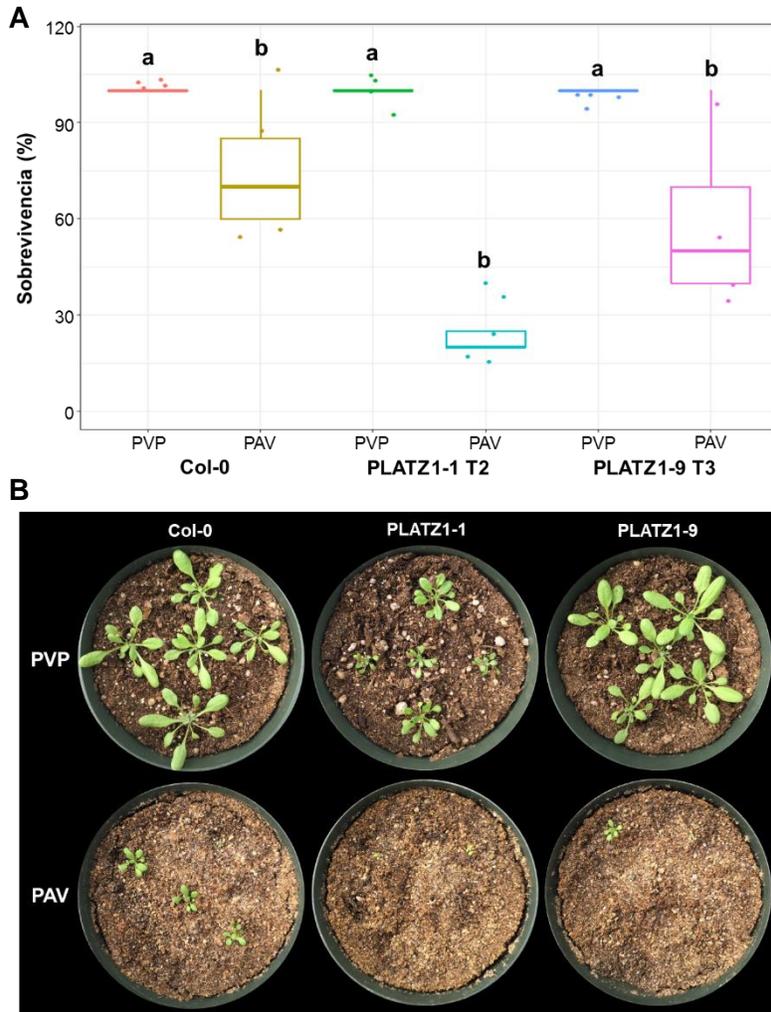


Figura 12: Evaluación en macetas del efecto de los sustratos sobre la sobrevivencia bajo condiciones normales de riego. A) Porcentaje de sobrevivencia de las líneas PLATZ1 y Col-0 en macetas con PVP o PAV. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de cuatro repeticiones (n=20). Las letras representan diferencias estadísticamente significativas entre la misma línea en diferente sustrato (Tukey, $P < 0.05$). B) Apariencia de las plantas de las diferentes líneas crecidas en macetas con PVP (arriba) o PAV (abajo).

6.4. Efecto de la sobreexpresión constitutiva de *PLATZ2* sobre la tolerancia a baja disponibilidad de agua

Una vez seleccionado un sistema en macetas con sustrato PVP, se procedió a evaluar la tolerancia a baja disponibilidad de agua (TBDA) de las líneas PLATZ2 en invernadero. Para ello se determinó que el periodo sin irrigación sería de 15 días, dado que en la prueba de sustratos 18 días resultó ser un periodo excesivo. Tras 5 días después del riego de recuperación, todas las líneas PLATZ1 y PLATZ2 presentaron aproximadamente el 100% de sobrevivencia; en cambio, la sobrevivencia de Col-0 disminuyó al 40% (Figura 13).

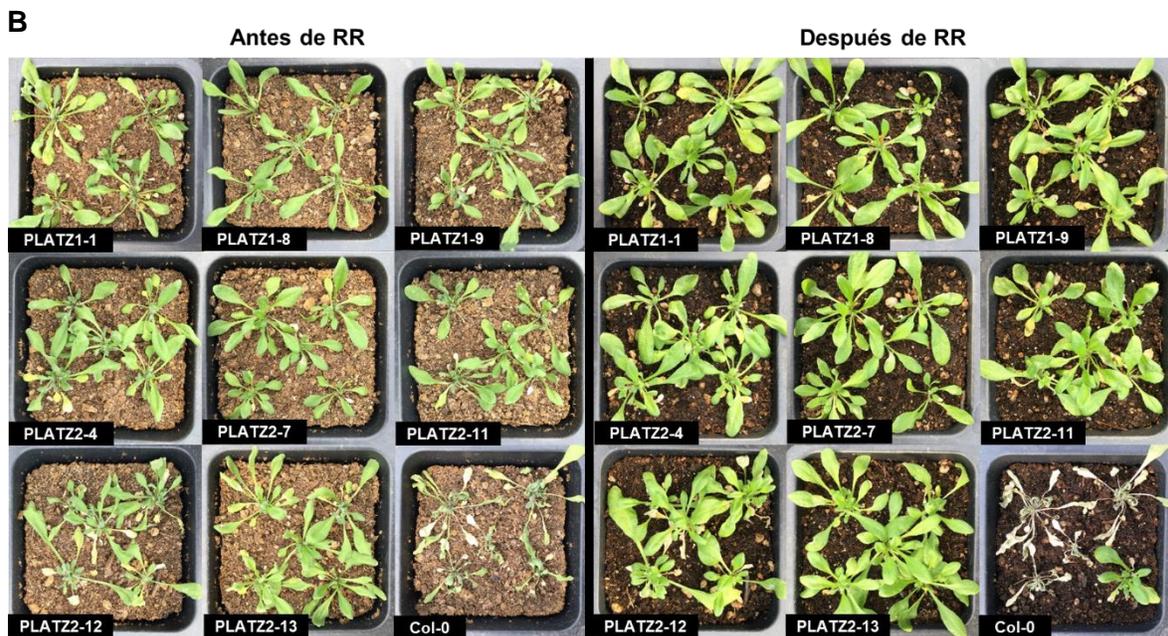
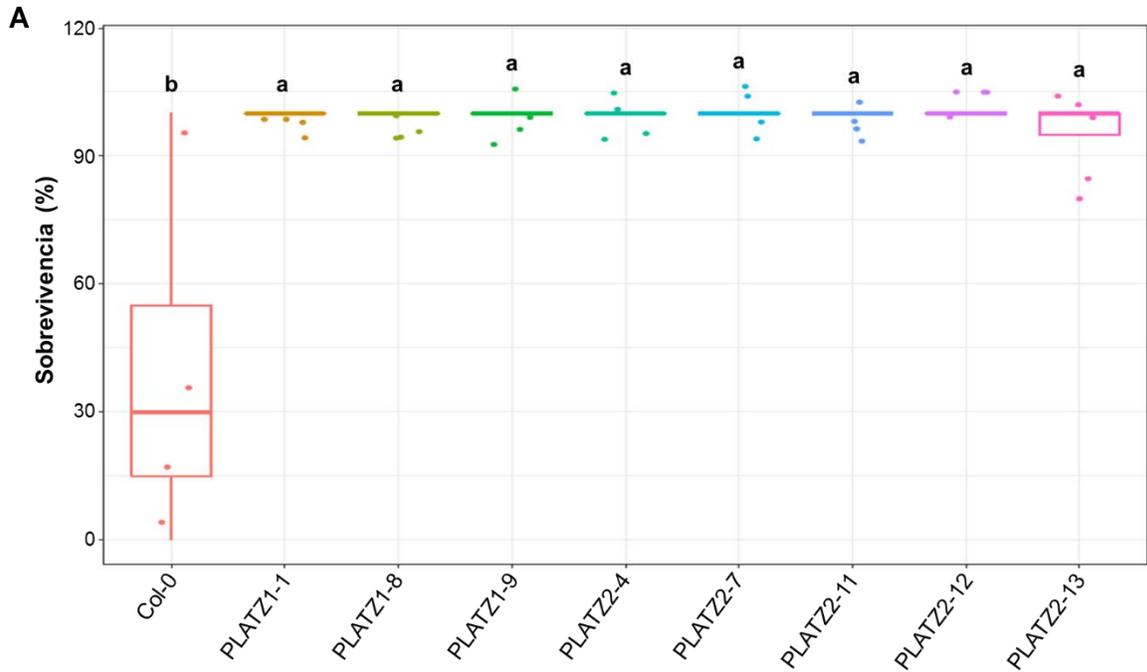


Figura 13: Supervivencia a baja disponibilidad de agua de PLATZ1 y PLATZ2. A) Porcentaje de supervivencia de las líneas después de un periodo de 15 días sin irrigación más 5 días de recuperación. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de cuatro repeticiones (n=20). Las letras representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P < 0.05$). B) Plantas expuestas a estrés por baja disponibilidad de agua (izquierda) y 5 días después de recibir un riego de recuperación (RR, derecha).

Esta evaluación fue el último experimento viable que se pudo realizar en el invernadero; posterior es esto, la tasa de sobrevivencia de las plantas bajo condiciones normales de riego comenzó a disminuir drásticamente aún en el sustrato PVP, ello debido al aumento en la temperatura del ambiente. Por esta razón, y para mantener condiciones más controladas, se decidió realizar los siguientes experimentos en cámaras de crecimiento.

6.5. Efecto de la sobreexpresión de *AGL67*, *ATAF1*, *DREB2G*, *HAP2C*, *PLATZ1* y *PLATZ2* sobre la tolerancia a baja disponibilidad de agua

A continuación, las líneas sobreexpresantes de un solo gen generadas en este estudio, fueron sometidas a la evaluación de TBDA en cámara de crecimiento. Con este fin, se seleccionaron plantas transformantes de dos líneas independientes de cada gen aún en estado de segregación (generación T1). A diferencia de las condiciones en invernadero, los experimentos en cámara requirieron sólo 14 días con irrigación para que las plantas mostraran un buen desarrollo para continuar con la fase de BDA. Mis resultados muestran que la mayoría de las líneas transgénicas, después de ser sometidas a BDA, presentaron una sobrevivencia significativamente mayor a Col-0 (Figura 14), siendo las líneas HAP2C en ambas formas de expresión (constitutiva o inducible) las que exhibieron los porcentajes más elevados de sobrevivencia (>90%). Es interesante observar que las líneas PLATZ1 y PLATZ2 en su versión inducible fueron las líneas transgénicas que mostraron las menores proporciones de sobrevivencia, las cuales se mantuvieron entre el 30 y 45% y no difirieron significativamente de Col-0. Cabe destacar que las dos líneas independientes de cada construcción rindieron un comportamiento similar entre ellas, por lo que en la Figura 14B únicamente se muestran imágenes de una de las dos líneas de cada gen.

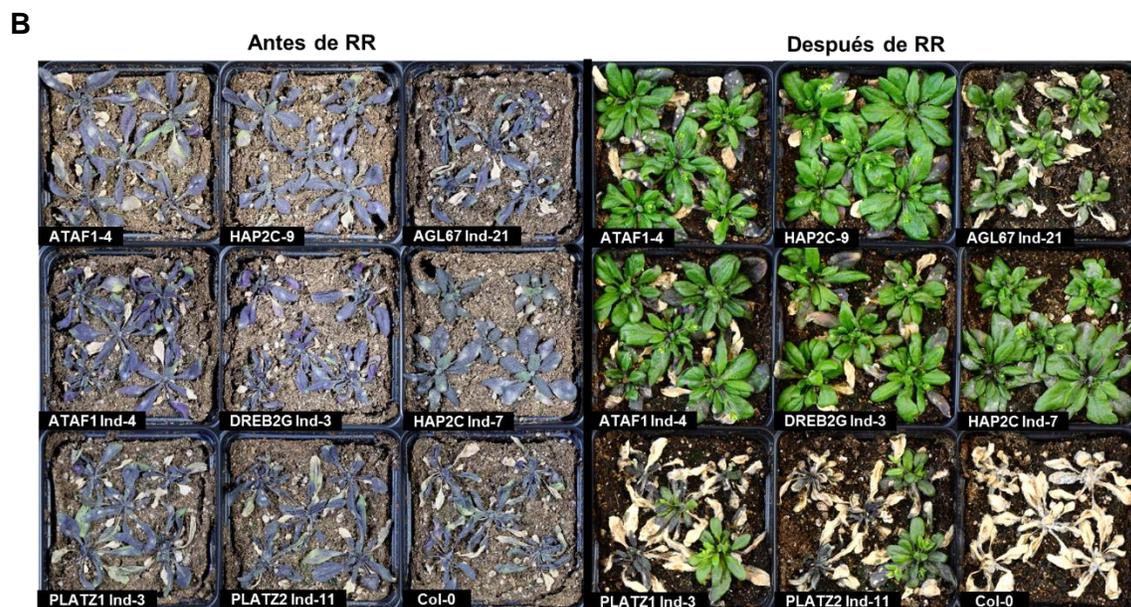
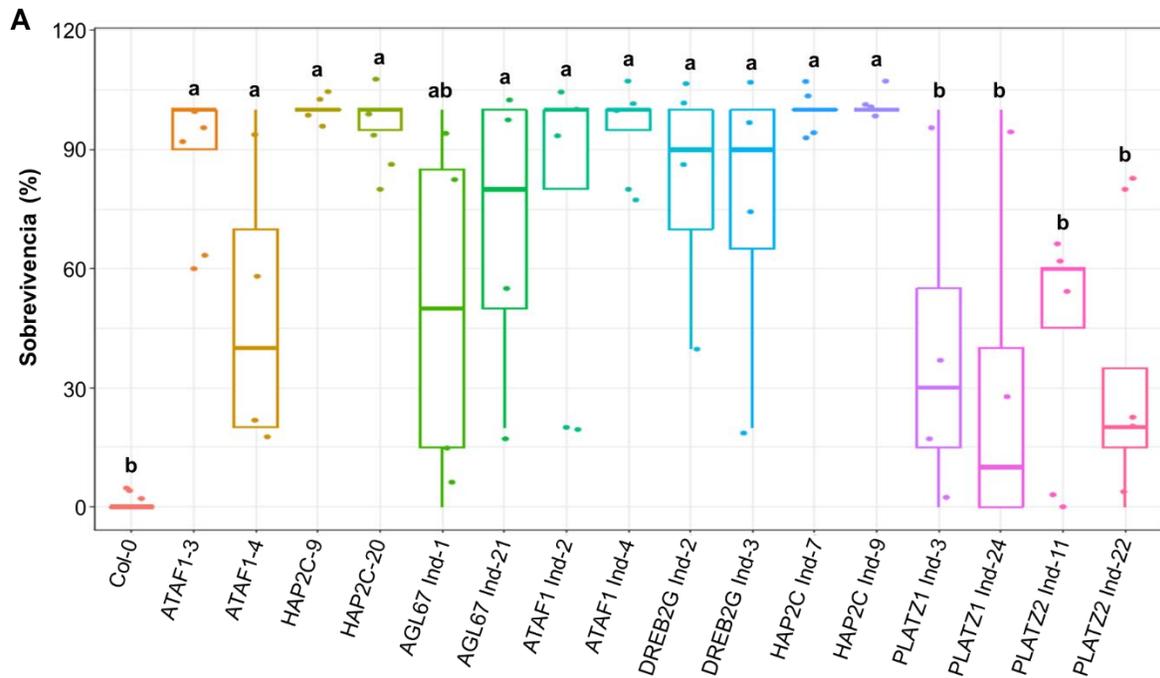


Figura 14: Sobrevivencia de las líneas sobreexpresantes de cada uno de los FT a la baja disponibilidad de agua. A) Porcentaje de supervivencia después de un periodo de 21 días sin irrigación más 7 días de recuperación. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de cuatro repeticiones (n=20). Las letras representan diferencias estadísticamente significativas entre líneas de una misma construcción y Col-0 (Tukey, $P < 0.05$). B) Plantas expuestas a estrés por baja disponibilidad de agua (izquierda) y 7 días después de recibir un riego de recuperación (RR, derecha).

6.6. Respuesta de plantas sobreexpresantes a estrés osmótico moderado

Con el objetivo de evaluar si los FTs seleccionados para este trabajo, también son capaces de activar respuestas a otros tipos de estrés abiótico, algunas líneas generadas por González-Morales fueron sometidas a estrés osmótico moderado (PEG 10%) en un sistema *in vitro*. En este experimento se incluyeron dos líneas AGL67, cuatro líneas DREB2D y dos líneas DREB2G, todas con expresión constitutiva de sus respectivos FTs.

Primeramente, se evaluaron todas las líneas bajo las condiciones de crecimiento estándar para *A. thaliana* (medio MS) con el fin de determinar diferencias en germinación, sobrevivencia y longitud de la raíz principal entre las líneas respecto a Col-0. Como se observa en la Figura 15A, a los dos días después de germinación (DDG), AGL67-6, DREB2D-8 y DREB2G-5 presentaron un retraso en su germinación de aproximadamente el 40%. Sin embargo, a los 4 DDG la mayoría de las líneas equipararon el nivel de germinación de Col-0, siendo DREB2G-5 la única que mantuvo una baja tasa de germinación (68% a los 14 DDG). En cuanto a la longitud de la raíz principal, no hubo diferencia significativa entre las líneas y Col-0, salvo DREB2G-5 que exhibió una elongación mayor de aproximadamente 0.8 cm, y DREB2D-8, que mostró casi 0.5 cm menos que el control silvestre (Figura 15B,C). La sobrevivencia de todas las líneas en este medio fue del 100%.

Para evaluar el efecto del estrés osmótico inducido por la adición de PEG al medio MS, se cuantificó la tasa de germinación y la longitud de la raíz principal. Los datos obtenidos de este experimento fueron normalizados con base en los obtenidos en medio MS. Mientras que Col-0 presentó únicamente el 3% de la germinación exhibida en MS a los 2 DDG, las líneas AGL67-6, DREB2D-1, DREB2D-9 y DREB2G-5 alcanzaron el 100, 30, 60 y 70%, respectivamente. A los 4 DDG, casi todas las líneas presentaron arriba del 70% de la germinación de referencia, con excepción de DREB2D-8, que al final de los 14 DDG sólo consiguió el 50% de germinación. Interesantemente, DREB2G-5 mostró un aumento del 20% en su germinación respecto a MS (Figura 16A). Por otro lado, al medir la longitud de la raíz principal de las plántulas, se encontró que las plántulas de Col-0 presentaron una elongación de su raíz 15% mayor que en MS; en tanto que la mayoría de las líneas transgénicas mantuvieron promedios de elongación similares a su control, con la excepción de las líneas DREB2D-8, DREB2G-5 y DREB2G-11, las cuales mostraron una reducción del 26, 23 y 28%, respectivamente (Figura 16B,C).

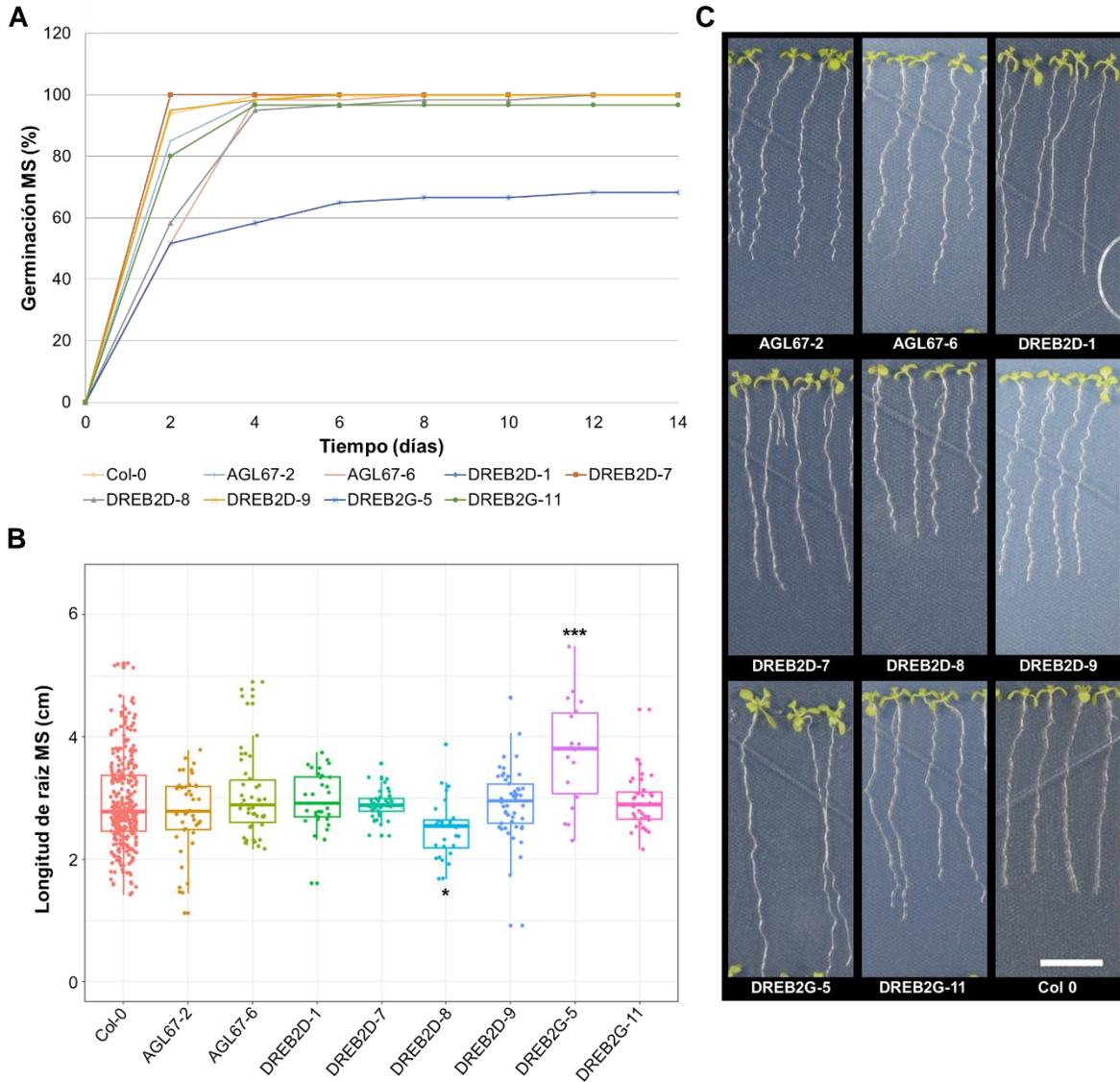


Figura 15: Desarrollo de líneas AGL67, DREB2D y DREB2G en condiciones *in vitro* estándar. A) Porcentaje de germinación. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones. B) Longitud de la raíz principal a los 14 DDG. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de tres repeticiones (n=60). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas respecto a Col-0 (ANOVA, $P < 0.01$ (*), $P = 0$ (***)). C) Plántulas crecidas sobre medio MS por 14 DDG. Escala = 1 cm.

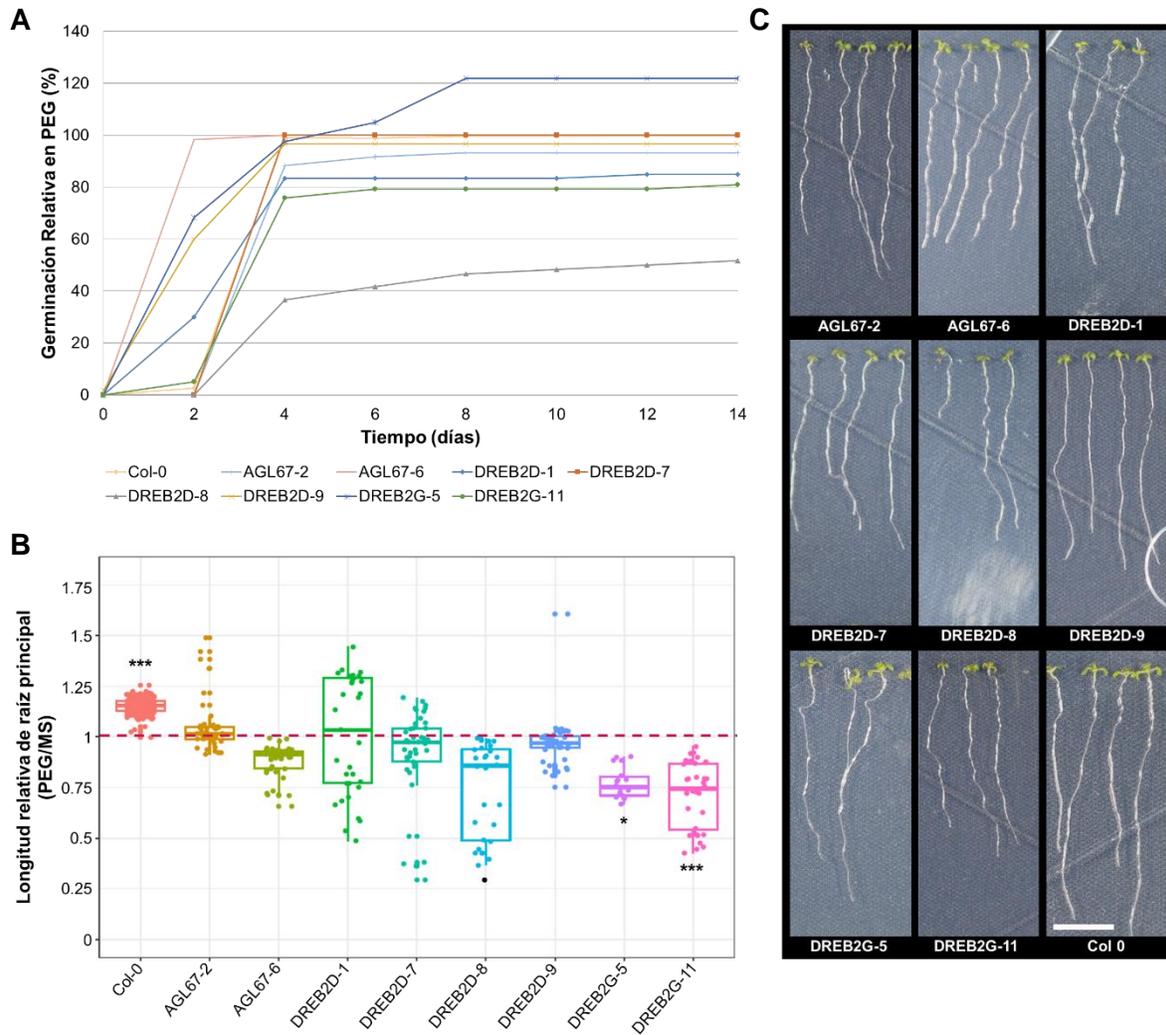


Figura 16: Desarrollo de líneas AGL67, DREB2D y DREB2G bajo estrés osmótico moderado. A) Porcentaje de germinación relativa a MS. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones. B) Longitud relativa de la raíz principal a los 14 DDG. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de tres repeticiones (n=60). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas con respecto a su control MS (ANOVA, $P < 0.05$ (●), $P < 0.01$ (*), $P = 0$ (***)). C) Plántulas crecidas por 14 días sobre medio MS suplementado con PEG al 10%. Escala = 1 cm.

6.7. Respuesta de plantas sobreexpresantes a estrés por alta salinidad

De igual forma que en el apartado anterior, también se evaluó si los genes de interés evaluados en este proyecto mejoran la respuesta de *A. thaliana* al estrés por alta salinidad (NaCl 100 mM). Así también, las mismas líneas sometidas a estrés osmótico moderado fueron las que conformaron este experimento.

Los resultados de este experimento muestran que la mayoría de las líneas tuvieron patrones de germinación similares a Col-0; sin embargo, tal como se observó en estrés osmótico, DREB2D-8 mostró un retraso en su tasa de germinación, alcanzando un 83% de su germinación respecto a MS, mientras que DREB2G-5 superó su germinación en un 40% (Figura 17A).

Por otro lado, Col-0 presentó un porcentaje de sobrevivencia del 38% y, tomando esto como punto de comparación, se observó que entre las líneas transgénicas se exhibieron resultados contrastantes; en tanto que AGL67-2 y DREB2D-9 presentaron una sobrevivencia significativamente mayor (73 y 71%, respectivamente), DRED2D-7 y DREB2G-5 se vieron fuertemente afectadas mostrando un bajo porcentaje de sobrevivencia (7 y 0%, respectivamente) (Figura 17B,C).

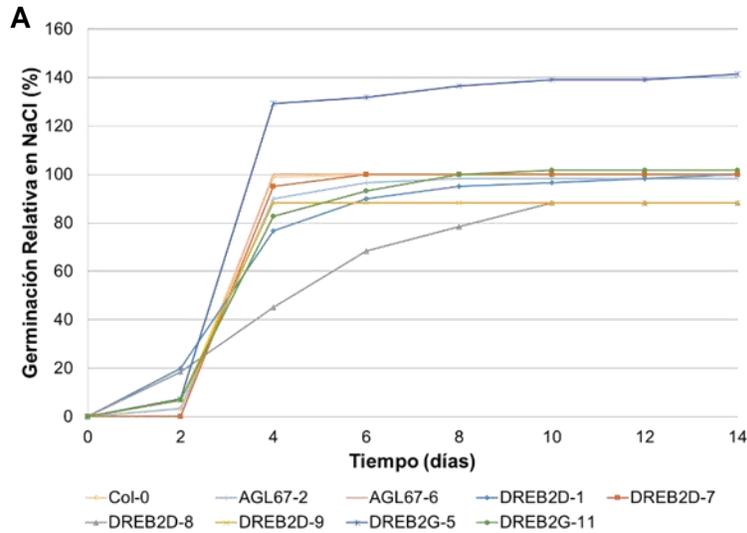
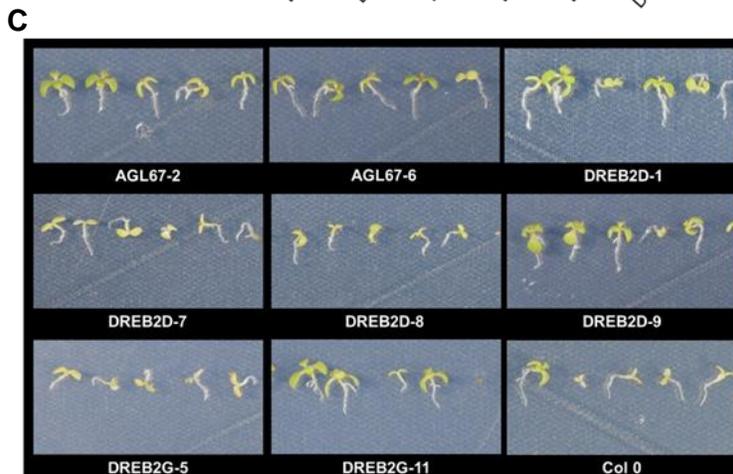
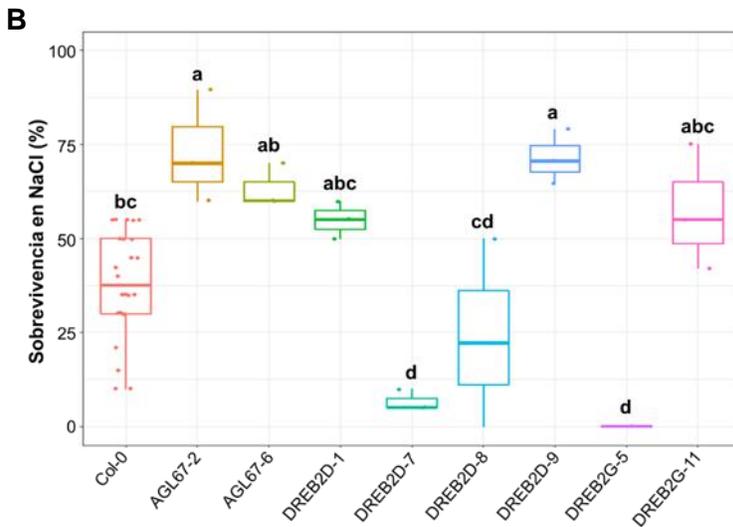


Figura 17: Respuesta de las líneas AGL67, DREB2D y DREB2G a estrés salino. A) Porcentaje de germinación relativa a MS. Los valores muestran el promedio de tres repeticiones. B) Porcentaje de sobrevivencia a los 14 DDG. Los valores muestran la mediana y la desviación estándar de tres repeticiones (n=60). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $P < 0.05$). C) Fenotipo de plántulas crecidas durante 14 días en medio MS suplementado con NaCl 100 mM.



7. DISCUSIÓN

La tolerancia a la desecación es considerada una de las características clave que permitió a las plantas primitivas, provenientes de un origen acuático, colonizar el ambiente terrestre (Mishler y Churchill 1985); sin embargo, al estar presente de manera constitutiva, ésta representaba un gran costo energético para el metabolismo vegetal (Oliver *et al.*, 2000). Conforme las plantas fueron adquiriendo un sistema vascular que facilitaba el transporte y mantenimiento del agua dentro de ellas, la TD fue confinada únicamente a estructuras reproductivas (esporas, semillas y polen). La TD en semilla es un rasgo que hizo posible que las plantas conquistaran ecosistemas con periodos prolongados de escasez de agua, ya que mantiene viable al embrión hasta que se presenten las condiciones propicias para promover la germinación (Illing *et al.*, 2005).

En el transcurso de la evolución de las plantas con semillas, específicamente en angiospermas, surgieron varios eventos independientes de re-activación de la TD vegetativa, la cual se especula que derivó de la TD ya presente en la semilla (Gaff y Melvin, 2013). Esto sugiere que la TD es un proceso regulado por un número relativamente discreto de genes, lo que a su vez genera una hipótesis sobre la posibilidad de reactivar mecanismos de TD de semilla en tejido vegetativo mediante estrategias de ingeniería metabólica.

En este sentido, algunos estudios se han enfocado en dilucidar el mecanismo que regula la adquisición de TD en semilla; tal es el caso de González-Morales *et al.* (2016), quienes mostraron que en *A. thaliana*, esta característica está controlada por una red de regulación molecular que involucra la actividad de FTs específicos como reguladores principales. En este estudio se resalta la importancia de dos subredes de regulación: la subred 1 está relacionada con una transición de la etapa de almacenamiento de nutrientes a la preparación del embrión para enfrentar la pérdida de agua, y la subred 2 se enfoca en mecanismos de protección celular. Basados en los resultados de la investigación anterior, se planteó evaluar el efecto de la expresión tanto constitutiva como inducible de siete de los principales reguladores de ambas subredes en tejido vegetativo de *A. thaliana*.

7.1. La tasa de pérdida de agua del sustrato afecta la sobrevivencia de líneas sobreexpresantes de *PLATZ1*

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de los diferentes FTs confiere a *A. thaliana* mayor TBDA, se planteó establecer un sistema de evaluación de dicho estrés en invernadero. Anteriormente ya se habían realizado experimentos de este tipo utilizando

como sustrato una mezcla de peat moss, vermiculita y perlita en una proporción 3:1:1 (PVP) (González-Morales *et al.*, 2016), el cual, aunque rindió resultados reproducibles, el tiempo que requiere para perder su humedad extiende la duración de las evaluaciones. En un intento por disminuir la duración de los ensayos, se puso a prueba una mezcla de peat moss, arena y vermiculita en una proporción 1:1:1 (PAV).

En un primer ensayo, se valoró el efecto del sustrato PAV sobre la sobrevivencia y desarrollo de las líneas TD PLATZ1 y de Col-0 bajo condiciones normales de riego. Se encontró que la línea más afectada en su sobrevivencia en PAV fue PLATZ1-1, la cual cabe mencionar que es una línea que se mantiene en segregación debido a que las plantas homocigotas no producen semilla. Además, estas plantas homocigotas presentan un tamaño de roseta menor al de las plantas heterocigotas, por lo cual el promedio de diámetro de roseta de esta línea se mantuvo menor al resto de las líneas aún en PVP. Debido a esto, se especula que la reducción en su tamaño, hace a las plantas PLATZ1-1 homocigotas más susceptibles a las altas tasas de deshidratación que PAV presenta en su superficie. En cuanto al diámetro de roseta, todas las líneas mostraron una reducción en PAV (Figura 10), por lo que se consideró necesario mantener con riego a este sustrato por un periodo mayor al riego de PVP.

En cuanto a la etapa de BDA se refiere, se pudo observar que las plantas crecidas en PAV mostraron síntomas de estrés hídrico en un tiempo menor que las crecidas en PVP, sugiriendo que el sustrato con arena efectivamente presenta una tasa de pérdida de agua mayor. Una vez realizado el riego de recuperación a PAV, las líneas PLATZ1 mostraron altos porcentajes de sobrevivencia en comparación con Col-0, resultados que reproducen a los reportados por González-Morales *et al.* (2016). A pesar de lo anterior, PAV no redujo la duración total del experimento debido al tiempo de irrigación adicional requerido para alcanzar un tamaño de roseta adecuado.

Por otro lado, en algunas de las charolas que se utilizaron en este primer experimento se observaron zonas específicas de recuperación que indicaban que la deshidratación del sustrato en este sistema no había sido uniforme. Con base en esta observación, se procedió a evaluar nuevamente ambos sustratos pero esta vez en macetas. Sin embargo, en esta ocasión, los porcentajes de sobrevivencia de todas las líneas mostraron un pronunciado declive en PAV en etapas tempranas del experimento. La diferencia presentada entre un experimento y otro podría ser explicada por el periodo en que ambos fueron realizados; en tanto que el primero se hizo durante Diciembre-Enero, un periodo donde las temperaturas

del ambiente se mantienen relativamente bajas, el segundo se realizó durante Marzo-Abril, un periodo más cálido. Temperaturas elevadas disminuyen la HR del aire, lo que probablemente conllevó a aumentar aún más la tasa de pérdida de agua en la superficie de PAV. Al presentar tamaños de roseta reducidos, las plantas probablemente fueron más susceptibles a la deshidratación.

Lo más interesante de las observaciones anteriores fue que aún las plantas sobreexpresantes de PLATZ1, las cuales poseen mayor TBDA, resultaron afectadas por el aumento en la tasa de pérdida de agua del sustrato. De acuerdo a lo estipulado por Oliver y Bewley (1997), la velocidad con que una planta pierde su contenido de agua determina la medida en que ésta puede activar mecanismos de protección celular que le permitan no sucumbir ante la deshidratación. Tomando en cuenta esta afirmación y los resultados anteriores, se eligió el sustrato PVP para las futuras evaluaciones de BDA.

7.2. La sobreexpresión de factores de transcripción que regulan la tolerancia a la desecación en semilla, confiere mayor tolerancia a baja disponibilidad de agua en tejido vegetativo

La mayoría de las líneas evaluadas durante el desarrollo de este proyecto, presentaron un incremento en su TBDA. Además, líneas independientes sobreexpresantes de una misma construcción exhibieron un comportamiento similar, con excepción de las líneas AGL67 Ind que estadísticamente presentaron diferencias en sus porcentajes de sobrevivencia a BDA. De igual forma, al comparar líneas sobreexpresantes del mismo gen, pero en su versión constitutiva e inducible, se encontró que, mientras las líneas ATAF1 y HAP2C mantuvieron altos niveles de tolerancia bajo ambos tipos de expresión, PLATZ1 y PLATZ2 mostraron resultados muy contrastantes. Por otro lado, las únicas líneas que hasta el momento no han sido evaluadas en cuanto a su TBDA son las sobreexpresantes de *DREB2D* en sus dos formas de expresión, es por esto que aún no es posible obtener una conclusión acerca de su participación en la respuesta a este tipo de estrés.

7.2.1. ATAF1

ATAF1 (AT1g01720) codifica para una proteína tipo NAC que ha sido previamente descrita en cuanto a su relación con las respuestas a estrés abiótico de *A. thaliana* (Wu *et al.* 2009). Como ya se mencionó, la sobreexpresión tanto constitutiva como inducible de este gen mejoró considerablemente la TBDA en tejido vegetativo. Estos resultados concuerdan con las observaciones reportadas por Wu *et al.* (2009), quienes analizaron el

efecto de la expresión de *ATAF1* bajo el promotor CaMV35S y encontraron que dicha tolerancia está asociada con la regulación del cierre estomático mediado por ABA. En comparación con el estudio mencionado, mis resultados muestran que, aun cuando *ATAF1* es puesto bajo un promotor constitutivo (*AtTCTP*) que presenta una actividad del 55% respecto a pCaMV35S (Han *et al.*, 2015), las plantas sobreexpresantes de este FT presentan altos niveles de TBDA. Para validar esta conclusión, será necesario realizar un análisis de niveles de expresión. *ATAF1* también fue puesto bajo el efecto del promotor de *AtDREB2A*, el cual ha sido caracterizado por mantener una fuerte inducción por estrés hídrico (Sakuma *et al.*, 2006). Las líneas inducibles también mantuvieron altos niveles de tolerancia, sugiriendo que la actividad de este gen no requiere estar presente antes de la manifestación del estrés hídrico.

7.2.2. HAP2C

HAP2C codifica para la subunidad A3 del Factor Nuclear Y (NF-YA3), el cual regula diversos procesos en las plantas, desde el desarrollo de la semilla donde NF-YB9 (LEC1) funge como regulador maestro (Meinke *et al.*, 1994), hasta respuestas a estrés abiótico (Leyva-González, *et al.*, 2012). En los experimentos del presente proyecto, *HAP2C* fue sobreexpresado en *A. thaliana* bajo la actividad del promotor constitutivo pSIRbcS3 (con una actividad del 38% con relación a p35S) (Engler *et al.*, 2014) y del promotor inducible por estrés hídrico pKIN2. Las líneas HAP2C con ambos tipos de expresión mostraron los porcentajes más altos de sobrevivencia tras un periodo de carencia severa de agua. Resultados similares fueron obtenidos por Leyva-González *et al.* (2012) al evaluar la sobreexpresión de *HAP2C* bajo la regulación del promotor pCaMV35S, lo cual sugiere que al igual que el caso anterior de *ATAF1*, niveles de expresión menores a los conferidos por pCaMV35S son suficientes para incrementar la TBDA en las plantas que sobreexpresan a *HAP2C*. Cabe mencionar que en los experimentos donde fueron evaluadas las líneas HAP2C y HAP2C Ind, éstas requirieron un mayor tiempo para mostrar fenotipos de estrés en relación a las otras líneas y al control silvestre (Figura 14B). Este mismo fenotipo fue observado en las plantas de *A. thaliana* y *Zea mays* sobreexpresantes de NF-YB1 reportadas como tolerantes a sequía por Nelson *et al.* (2007). De acuerdo al modelo de “evitación/tolerancia del estrés hídrico” propuesto por Verslues *et al.* (2006), HAP2C y NF-YB1 podrían estar involucrados con la activación de mecanismos para evitar la deshidratación, tales como el cierre de estomas y la acumulación de solutos, entre otros, lo cual confiere una mayor adaptación a la BDA.

7.2.3. *PLATZ1* y *PLATZ2*

PLATZ1 y *PLATZ2* son miembros de la familia de FTs PLATZ (Plant AT-rich sequence and zinc binding protein), y participan en la adquisición de TD en la semilla de *A. thaliana* mediante la activación de mecanismos de protección celular (González-Morales *et al.*, 2016). La sobreexpresión de *PLATZ1* y *PLATZ2* también fue analizada en su versión constitutiva e inducible; sin embargo, a diferencia de *ATAF1* y *HAP2C*, estas líneas mostraron resultados contrastantes. La expresión constitutiva de *PLATZ2* fue evaluada en un experimento donde líneas *PLATZ1*, cuya tolerancia a BDA ha sido reportada y probada en diversos experimentos (González-Morales *et al.*, 2016), fungieron como control positivo. En dicho experimento, *PLATZ2* rindió un nivel de tolerancia equiparable al de *PLATZ1* con porcentajes de sobrevivencia cercanos al 100% en todas sus líneas. Por su parte, las versiones inducibles de ambos genes no mostraron tener un grado de tolerancia significativamente mayor al de Col-0.

En el análisis de las líneas constitutivas, tanto *PLATZ1* como *PLATZ2* mostraron el fenotipo descrito para *HAP2C*, es decir, las plantas transgénicas requirieron un mayor tiempo que el control silvestre para mostrar fenotipos de estrés (Figura 13B). Caso contrario, las líneas inducibles se vieron afectadas al mismo nivel que el control silvestre y, en general, fueron las líneas transgénicas más afectadas al final del periodo sin irrigación. En este sentido, el periodo de recuperación de este ensayo se extendió a siete días, ya que se observó que la mayor proporción de las plantas de las líneas *PLATZ1* y *PLATZ2* que mostraron signos de recuperación, lo hicieron durante estos dos días adicionales; además, cabe resaltar que lograron recuperarse de un estado de deshidratación más severo que el resto de las líneas. Aún al final del periodo de recuperación, las plantas *PLATZ1* y *PLATZ2* que no fueron clasificadas como recuperadas, no mostraban 100% de senescencia como el control silvestre (Figura 14B).

La disparidad entre el tipo de respuesta expuesto por líneas constitutivas e inducibles, podría estar sugiriendo que los genes *PLATZ1* y *PLATZ2* regulan dos tipos de respuesta en el modelo de Verslues *et al.* (2006); al estar presentes de manera constitutiva, mantienen activo en la planta un mecanismo para evitar la pérdida de agua, pero también tienen la capacidad de activar en menor medida un mecanismo de protección contra la deshidratación. Análisis de expresión son requeridos para descartar que las diferencias mencionadas entre líneas constitutivas e inducibles sobreexpresantes de un mismo gen, sean producto del nivel de expresión.

7.2.4. *AGL67*

AGL67 pertenece a la familia de FTs MADS-box, la cual se caracteriza por regular varios tipos de procesos de transición; por ejemplo, *AGL67* fue detectado como uno de los nodos principales de la red molecular que regula la transición de la semilla desde un estado dormante hacia la germinación, y en la cual, este FT aparece como un represor de ésta última (Bassel *et al.*, 2011). Interesantemente, en este mismo estudio también se reporta que la mayoría de los genes pertenecientes a la región de la red que está más vinculada con la dormancia, también están relacionados con la activación de respuestas a estrés abiótico en tejido vegetativo. En cuanto al desarrollo de la semilla, *AGL67* también ha sido involucrado con la regulación de la transición desde la etapa de reserva de nutrientes hacia la activación de mecanismos de protección celular contra la pérdida de agua (González-Morales *et al.*, 2016).

En el presente trabajo, dos líneas con expresión inducible de este factor fueron evaluadas en cuanto a su TBDA. A pesar de que ambas líneas presentaron un promedio de sobrevivencia mayor al de Col-0, sólo el promedio de *AGL67* Ind-21 fue significativamente diferente. Al igual que en el caso de la expresión inducible de *PLATZ1* y *PLATZ2*, las líneas *AGL67* Ind mostraron niveles de deshidratación similares a los del control silvestre; no obstante, un elevado porcentaje de las plantas lograron recuperarse, denotando una gran capacidad para proteger a los componentes celulares contra la deshidratación, más que una habilidad para evitarla.

Del mismo modo, dos líneas con expresión constitutiva de *AGL67*, fueron sometidas a estrés osmótico moderado y salino. Mientras que en estrés osmótico moderado, el ecotipo silvestre presentó un ligero incremento en la longitud de su raíz, tal como se ha reportado (Van der Weele *et al.*, 2000), las líneas *AGL67* mantuvieron una tasa de elongación similar a la que presentan en ausencia del estrés. La explicación adaptativa que se ha dado al incremento en la longitud del sistema radicular que las plantas presentan cuando enfrentan condiciones de estrés osmótico y/o hídrico moderado, es que la raíz se internaliza en los estratos del suelo en busca de una fuente de agua, lo que a su vez aumenta el área de contacto para la toma del agua disponible a su paso (Van der Weele *et al.*, 2000); es decir, se trata de una modificación morfológica que busca evitar el estrés hídrico interno (Verslues *et al.*, 2006). Concordante con lo que ya se discutió, el resultado presentado por las líneas *AGL67* bajo estrés osmótico, sugiere un cambio en la estrategia de evitación normal en *A. thaliana* hacia una respuesta de protección.

Al someter a las líneas AGL67 a estrés salino, éstas presentaron porcentajes de sobrevivencia mayores que el control silvestre, sin dejar de mostrar los signos característicos de este tipo de estrés. Esto indica que los mecanismos de protección activados por AGL67 cubren parcialmente las respuestas que la planta necesita para combatir el estrés impartido por alto contenido de sales.

Conjuntando los resultados de estos tres experimentos, y retomando los datos reportados por Bassel *et al.* (2011), se demuestra que AGL67 también es capaz de activar mecanismos de protección celular contra estrés abiótico en tejido vegetativo de *A. thaliana*, cumpliendo con la dualidad reportada para los genes reguladores de la dormancia.

7.2.5. DREB2G

DREB2G codifica para un elemento de la subfamilia DREB (Drought Responsive Element Binding), la cual se distingue por poseer miembros involucrados en las respuestas a sequía, tales como DREB2A y DREB2B (The Arabidopsis Information Resource). *DREB2G* es uno de los FT DREB con mayor contenido de motivos de respuesta a estrés abiótico en su promotor, dentro de los cuales destacan ABRE, ERE, MeJa y TC-rich (Sazegari *et al.*, 2015); además, es un gen que se encuentra conservado en briófitas y plantas vasculares TD como *Amborella trichopoda*, lo que supone que *DREB2G* ha cumplido un papel fundamental en las respuestas a estrés hídrico de las plantas a través de la evolución. Cabe recalcar que en *Arabidopsis*, *DREB2G* está involucrado con mecanismos que protegen al embrión contra la desecación (González-Morales *et al.*, 2016).

Al evaluar el efecto de la expresión inducible de este FT en la respuesta de *A. thaliana* a BDA, las dos líneas analizadas mantuvieron un porcentaje de sobrevivencia significativamente mayor al de Col-0, aunque el grado de deshidratación de sus tejidos no pareció diferir considerablemente del control. Esto sugiere que al incrementar el nivel de expresión de *DREB2G* en tejido vegetativo, éste activa respuestas que, así como al embrión, también protegen a la planta contra la pérdida de agua.

Sin embargo, líneas con expresión constitutiva de *DREB2G* sometidas a estrés abiótico *in vitro* no presentaron resultados contundentes. Ambas mostraron una disminución significativa de la longitud de su raíz principal bajo estrés osmótico moderado, pero el tamaño del brote de *DREB2G*-11 también se vio seriamente reducido. Por su parte, aunque el porcentaje de germinación de *DREB2G*-5 fue mayor en estrés osmótico y salino, en éste último exhibió 0% de sobrevivencia.

7.3. Reguladores de la tolerancia a la desecación en semilla activan diferentes mecanismos de respuesta a estrés hídrico

El modelo de “evitación/tolerancia del estrés hídrico” propuesto por Verslues *et al.* (2006) establece que las estrategias empleadas por las plantas para enfrentar condiciones limitantes de agua se dividen en dos grupos. El primer grupo consiste de estrategias enfocadas en evitar la disminución del potencial hídrico dentro de los tejidos de la planta a través de mecanismos que mantienen el balance entre la toma y la pérdida de agua, tales como regulación del cierre estomático e incremento del crecimiento radicular. El segundo grupo consta de estrategias que son activadas cuando dicho balance ya no puede ser mantenido. Una vez que esto sucede, la planta activa mecanismos para disminuir su potencial hídrico interno con el fin de evitar la deshidratación, siendo los principales la acumulación de solutos y el fortalecimiento de la pared celular. Cuando el estrés se hace más severo y no es posible para la planta evitar la pérdida de su contenido de agua, entonces se activan mecanismos de protección como síntesis de proteínas LEA y de choque térmico, de oligosacáridos no reductores, y de enzimas para la desintoxicación por EROS.

Dentro de este contexto, al reunir todos los resultados de este estudio se observa que, mientras que en semilla los siete FTs de interés trabajan en conjunto para proteger al embrión contra la pérdida de agua, al ser expresados en tejido vegetativo activan tipos de respuesta a estrés hídrico que varían entre evitar el estrés y la deshidratación (*ATAF1* y *HAP2C*), proteger las estructuras celulares una vez que ésta es inevitable (*AGL67* y *DREB2G*), o ambas (*PLATZ1* y *PLATZ2*). Esto podría ser debido a que en tejido vegetativo interactúan con genes diferentes que les permiten participar en nuevas redes de regulación. Si esta conjetura es verdadera, la sobreexpresión simultánea de varios de estos FTs presentaría un efecto sinérgico entre ellos que permitiría a la planta incrementar sus niveles de tolerancia a BDA quizá hasta un punto cercano a la desecación, lo cual resultaría en un gran avance científico con potencial para su aplicación biotecnológica.

En la Figura 18 se ilustra un modelo hipotético del tipo de estrategia que cada factor podría estar desencadenando para conferir mayor TBDA a *A. thaliana*. Gran cantidad de estudios adicionales son necesarios para confirmar el rol que teóricamente se está asignando a cada FT.

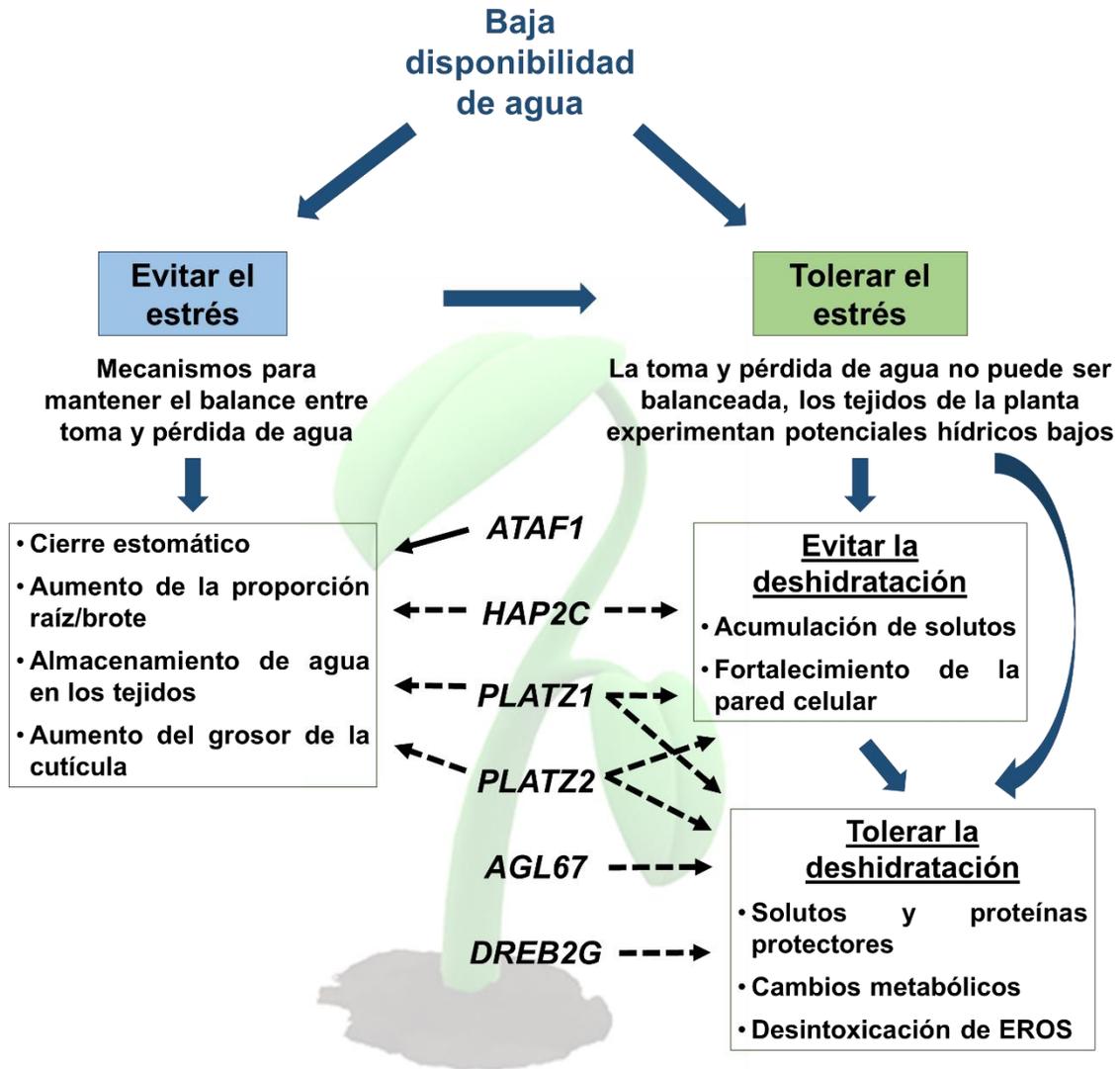


Figura 18: Modelo hipotético de las estrategias que cada factor de transcripción activa para conferir mayor tolerancia a baja disponibilidad de agua. Al centro se muestran los factores de transcripción analizados y con flechas se indica el tipo de respuestas con que mantienen interacción. Líneas continuas indican interacción ya documentada, líneas punteadas indican interacción inferida a partir de este estudio.

8. CONCLUSIONES

El análisis del efecto de la sobreexpresión en tejido vegetativo de *A. thaliana*, tanto constitutiva como inducible, de genes identificados como reguladores clave de la adquisición de TD en semilla, nos permitió concluir los siguientes puntos:

- Altas tasas de pérdida de agua en el sustrato afectan el desarrollo y la sobrevivencia aún de plantas con mayor adaptación a la baja disponibilidad de agua.
- Factores de transcripción que regulan la adquisición de TD en semilla, también son capaces de activar respuestas en tejido vegetativo que confieren mayor tolerancia a baja disponibilidad de agua.
- Aun cuando en la semilla dichos factores de transcripción se enfocan en activar mecanismos de protección contra la desecación, en tejido vegetativo pueden activar otro tipo de respuestas al estrés hídrico como el evitar la pérdida de agua.
- Los reguladores de la TD en semilla son capaces de activar mecanismos que protegen parcialmente a la planta contra estrés osmótico y salino.

9. PERSPECTIVAS

El panorama general del presente proyecto aborda un enfoque novedoso para demostrar que la red molecular que regula un proceso de interés en una parte específica de la planta, como lo es la TD en semilla, puede ser reconectada en la planta completa para conferirle una ventaja adaptativa, en este caso, una mayor tolerancia a baja disponibilidad de agua.

Se comenzó con analizar el efecto de un solo FT sobre la TBDA de *A. thaliana*. A pesar de haber obtenido resultados favorables, evaluaciones adicionales son necesarias para validar y sustentar los datos obtenidos, tales como:

- Completar la evaluación de tolerancia a BDA y estrés abiótico de todo el set de líneas constitutivas e inducibles.
- Determinar el nivel de expresión de los FTs en tejido vegetativo.
- Evaluación de la TBDA de las líneas generadas en un sistema que permita mantener un correcto control y monitoreo de parámetros como el potencial hídrico del suelo y de la planta, contenido de clorofila, tasa de transpiración y cierre estomático.
- Realizar un análisis transcriptómico de las líneas sobreexpresantes para obtener un panorama general de las respuestas que los FTs están induciendo.
- Analizar cambios en la acumulación de compuestos importantes para las respuestas a estrés abiótico como sacarosa, trehalosa y prolina, así como la actividad de enzimas de desintoxicación como superóxido dismutasas.

Dentro de este proyecto, se realizó la transformación de *A. thaliana* con vectores de expresión que contenían combinaciones entre los diferentes FTs. El siguiente paso es determinar si la expresión simultánea de dos o más FTs ejerce un efecto sinérgico que incremente el grado de TBDA en tejido vegetativo.

10. REFERENCIAS

- Alpert P** (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* 45:685-695.
- Alpert P, Oliver MJ** (2002) Drying without dying. In Black M, Pritchard HW (eds.) *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, pp. 4-43.
- Anderson BE, Ward JM, Schroeder JI** (1994) Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in commelina guard cells. *Plant Physiology* 104:1177-1183.
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* 15 (4):211-218.
- Avelange-Macherel MH, Ly-Vu B, Delauna Y, Richomme P, Leprince O** (2006) NMR metabolite profiling analysis reveals changes in phospholipid metabolism associated with the re-establishment of desiccation tolerance upon osmotic stress in germinated radicles of cucumber. *Plant Cell and Environment* 29:471-482.
- Bailly C** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14 (2):93-107.
- Baker EH, Bradford KJ, Bryant JA, Rost TL** (1995) A comparison of desiccation-related proteins (dehydrin and QP47) in pea (*Pisum sativum*). *Seed Science Research* 5:185-193.
- Baker J, Steele C, Dure L** (1988) Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11:277-291.
- Bassel GW, Lan H, Glaab E, Gibbs DJ, Gerjets T, Krasnogor N, Bonner AJ, Holdsworth MJ, Provart NJ** (2011) Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23):9709-9714.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, and Covarrubias AA** (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 148:6-24.
- Battista JR, Park MJ, McLemore AE** (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology* 43:133-139.
- Baud S, Boutin J, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C** (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40 (2):151-160.
- Belton PS, Gil AM.** (1994) IR and Raman-spectroscopic studies of the interaction of trehalosa with hen egg-white lysozyme. *Biopolymers* 34:957-961.
- Bewley JD** (1979) Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* 30:195-238.
- Bewley JD, Krochko JE** (1982) Desiccation tolerance. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds.) *Encyclopedia of plant physiology*. Vol 12B, *Physiological Ecology II*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 325-378.
- Bewley JD, Oliver MJ** (1992) Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: Protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms. In: Osmond CB, Somero G (eds.) *Water and life: A comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 141-160.

- Billi D, Potts M** (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology* 153:7-12.
- Bray EA** (1991) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103:1035-1040.
- Bray EA** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48-54.
- Buitink J, Hemminga MA, Hoekstra FA** (2000) Is There a Role for Oligosaccharides in Seed Longevity? An Assessment of Intracellular Glass Stability. *Plant Physiology* 122 (4):1217-1224.
- Buitink J, Leprince O** (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies* 331:788-95.
- Bukau B, Horwich AL** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366.
- Cadman CS, Toorop PE, Hilhorst HW, Finch-Savage WE** (2006) Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant Journal* 46:805-82.
- Caffrey M, Fonseca V, Leopold AC** (1988) Lipid-sugar interactions, relevance to anhydrous biology, *Plant Physiology* 86:754-758.
- Cattivelli L, Bartels D** (1990) Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley. *Plant Physiology* 93:1504-1510.
- Chaplin MF** (2001) Water: its importance to life. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29 (2):54-59.
- Close TJ, Fenton RD, Yang A, Asghar R, DeMason DA, Crione D, Meyer NC, Moonan F** (1993) Dehydrin: the protein. In TJ Close, EA Bray, eds, *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 104-118.
- Close TJ, Kortt AA, Chandler PM** (1989) A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology* 13:95-108.
- Cohen A, Plant AL, Moses MS, Bray EA** (1991) Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato: nucleotide sequence and analysis of the corresponding cDNAs. *Plant Physiology* 97:1367-1374.
- Colmenero-Flores JMC, Garcarrubio F, Covarrubias AA** (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA Clones Responsive to Water Deficit: Identification of a Novel Late Embryogenesis Abundant-Like Protein. *Plant Molecular Biology* 35:393-405.
- Cordone L, Cottone G, Giuffrida S.** (2007) Role of residual water hydrogen bonding in sugar/water/biomolecule systems: a possible explanation for trehalose peculiarity. *Journal of Physics: Condensed Matter* 19 (20):1-16.
- Crowe LM** (2002) Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131:505-513.
- Crowe LM, Crowe JH** (1992) Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Advances in Space Research* 12:239-247.
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM** (1992) Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54:579-599.
- Csintalan Z, Proctor MCF, Tuba Z** (1999) Chlorophyll fluorescence during drying and rehydration in the mosses *Rhytidiadelphus loreus* (Hedw.) Warnst., *Anomodon viticulosus* (Hedw.) Hook. and Tayl. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Annals of Botany* 84:235-244.

Cuevas-Velazquez CL, Rendón-Luna DF, Covarrubias AA (2014) Dissecting the cryoprotection mechanisms for dehydrins. *Frontiers in Plant Science* 5:583.

Cuming AC (1999) LEA proteins. In: Shewry PR, Casey R (eds.) *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers, pp. 753-780.

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* 61 (1):651-679.

Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10:623-638.

Dure L (1993a) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant Journal* 3:363-369.

Dure L (1993b) Structural motifs in LEA proteins. In TJ Close, EA Bray (eds.) *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 91-103.

Dure L (2001) Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequence motif in diverse organisms. *Protein & Peptide Letters* 8:115-122.

Dure L, Chlan C (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XII. Purification and properties of principal storage proteins. *Plant Physiology* 68:180-186.

Dure L, Crouch M, Harada J, Ho TH, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung Z (1989) Common Amino Acid Sequence Domains among the LEA Proteins of Higher Plants. *Plant Molecular Biology* 12:475-486.

Dure L, Greenway S, Galau G (1981) Developmental Biochemistry of Cotton Seed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations as Shown by in Vitro and in Vivo Protein Synthesis. *Biochemistry* 20:4162-4168.

Egerton-Warburton LM, Balsamo RA, Close TJ (1997) Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 101:545-555.

Engler C, Kandzia R, Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLOS ONE* 3:e347.

Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert TM, Werner S (2014) A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. *ACS Synthetic Biology* 3:839-843.

Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 (Suppl.):S15-S45.

Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218:958-964.

Frydman J (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry* 70:603-647.

Gaff DF (1989) Responses of desiccation-tolerant 'resurrection' plants to water stress. In: Krebb KH, Richter H, Hinkley TM (eds.) *Structural and functional responses to environmental stresses*. SPB Academic Publishers, The Hague, The Netherlands, pp. 255-268.

Gaff DF, Oliver MJ (2013) The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Functional Plant Biology* 40:315-328.

Gal TZ, Glazer I, Koltai H (2004) An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Letters* 577:21-26.

Galau GA, Hughes DW, Dure L (1986) Abscisic Acid Induction of Cloned Cotton Late Embryogenesis-Abundant (LEA) mRNAs. *Plant Molecular Biology* 7:155-170.

Galau GA, Wang HY, Hughes DW (1992) Cotton *Lea4* (D19) and *LeaA2* (D132) group 1 *Lea* genes encoding water stress-related proteins containing a 20-amino acid motif. *Plant Physiology* 99:783-788.

Galau GA, Wang HY, Hughes DW (1993) Cotton *Lea5* and *Lea74* encode atypical Late Embryogenesis-Abundant proteins. *Plant Physiology* 101:695-696.

Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* 275:5668-5674.

González-Morales SI (2016) Molecular analysis of desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana* seeds. (Doctorado) Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

González-Morales SI, Chávez-Montes RA, Hayano-Kanashiro C, Alejo-Jacuinde G, Rico-Cambren TY, de Folter S, Herrera-Estrella L (2016) Regulatory network analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:E5232-E5241.

Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra R, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences* 86:377-384.

Gutierrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* 12 (7):294-300.

Gwozdz EA, Bewley JD, Tucker EB (1974) Studies on protein synthesis in *Tortula ruralis*: polyribosome reformation following desiccation. *Journal of Experimental Botany* 25:599-608.

Han YJ, Kim YM, Hwang OJ (2015) Characterization of a small constitutive promoter from *Arabidopsis* translationally controlled tumor protein (*AtTCTP*) gene for plant transformation. *Plant Cell Reports* 34:265-275.

Hara M (2010) The multifunctionality of dehydrins: an overview. *Plant Signaling & Behavior* 5:503-508.

Harada JJ, DeLisle A, Baden C, Crouch M (1989) Unusual sequence of an abscisic acid inducible mRNA which accumulates late in *Brassica napus* seed development. *Plant Molecular Biology* 12: 395-401.

Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-580.

Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *The New Phytologist* 179 (1):33-54.

Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte S, Sarhan F (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant Journal* 8:583-593.

Hsing YC, Chen ZY, Shih MD, Hsieh JS, Chow TY (1995) Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation or drying in soybean seeds. *Plant Molecular Biology* 29:863-868.

Hundertmark M, Hinch DK (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) Proteins and Their Encoding Genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9:118.

Illing N, Denby KJ, Collett H, Shen A, Farrant JM (2005) The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues. *Integrative and Comparative Biology* 45 (5):771-787.

Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:377-403.

Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999) Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13566-13570

Johnston CA, Taylor JP, Gao Y, Kimple AJ, Grigston JC (2007) GTPase acceleration as the rate limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:17317-17322.

Kalemba EM, Pukacka S (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biological Letters* 44(1):3-16.

Keilin D (1959) The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 150:149-91.

Keith K, Kraml M, Dengler NG, McCourt P (1994) *fusca3*: A Heterochronic Mutation Affecting Late Embryo Development in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 6 (5):589-600.

Kermode AR, Finch-Savage BE (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: Black M, Pritchard HW (eds.) *Desiccation and survival in plants: drying without dying*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, pp. 149-184.

Kim HS, Lee JH, Kim JJ, Kim CH, Jun SS, Hong YN (2005) Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. *Gene* 344:115-123.

Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Higashi K, Satoh S, Kamada H, Harada H (1992) Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Molecular Biology* 19:239-249.

Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews GN, Fischer RL, Okamoto JK, Harada JJ, Goldberg RB (2010) Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (18):8063-8070.

Lee GJ, Vierling E (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology* 122:189-198.

Leprince O, Bronchart R, Deltour R (1990) Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant, Cell & Environment* 13:539-546.

Leprince O, Buitink J (2015) Introduction to desiccation biology: from old borders to new frontiers. *Planta* 242 (2):369-378.

- Leyva-González MA, Ibarra-Laclette E, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2012) Functional and Transcriptome Analysis Reveals an Acclimatization Strategy for Abiotic Stress Tolerance Mediated by *Arabidopsis* NF-YA Family Members. *PLOS ONE* 7(10):e48138.
- Lindquist S** (1986) The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55:1151-1191.
- Lindquist S, Craig EA** (1988) The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* 22:631-677.
- Locascio A, Roig-Villanova I, Bernardi J, Varotto S** (2014) Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: a focus on auxin. *Frontiers in Plant Science* 5:412.
- Maitra N, Cushman JC** (1994) Isolation and characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a D95 family late-embryogenesis-abundant protein. *Plant Physiology* 106:805-806.
- Manfre AJ, LaHatte GA, Climer CR, Marcotte WR Jr** (2009) Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant & cell Physiology* 50 (2):243-253.
- Manfre AJ, Lanni LM, Marcotte WR Jr** (2006) The *Arabidopsis* Group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT Protein ATEM6 Is Required for Normal Seed Development. *Plant Physiology* 140 (1):140-149.
- Mansfield SG, Briarty LG** (1993) Endosperm development. In: Bowman J (Ed.) *Arabidopsis*, an Atlas of Morphology and Development: Springer-Verlag, Berlin, pp. 385-397.
- Marillonnet S, Weber S** (2015) Assembly of Multigene Constructs Using Golden Gate Cloning. In Castilho A (ed.) *Glyco-Engineering: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology* (1321), Springer Protocols, New York, pp. 269-284.
- Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce J, Herrera-Estrella L** (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter* 22 (1):63-70.
- Maskin L, Maldonado S, Iusem ND** (2008) Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 35 (4):501-505.
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC** (1994) Leafy Cotyledon Mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 6 (8):1049-1064.
- Mishler BD, Churchill SP** (1985) Transition to a land flora: Phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *Cladistics* 1 (4):305-328.
- Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang HJ** (2009) Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462:609-14.
- Morrison-Baird LAM, Leopold AC, Bramlage WJ, Webster BD** (1979) Ultrastructural modifications associated with imbibition of the soybean radicle. *Botanical Gazette* 140:371-377.
- Mundree SG, Farrant JM** (2000) Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. In Cherry J (ed.) *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of genetic engineering*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 201-222.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sciences* 8:213-217.

Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG, Hinchey BS, Kumimoto RW, Maszle DR, Canales RD, Krolkowski KA, Dotson SB, Gutterson N, Ratcliffe OJ, Heard JE (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(42):16450-16455.

Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 45:263-279.

Oliver MJ (1991) Influence of protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*: Ramifications for a repair-based mechanism of desiccation tolerance. *Plant Physiology* 97:1501-1511.

Oliver MJ, Bewley JD (1984) Desiccation and ultrastructure in bryophytes. *Adv. Bryol.* 2:91-131.

Oliver MJ, Bewley JD (1997) Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. *Horticultural Reviews* 18:171-214.

Oliver MJ, Mishler BD, Quisenberry JE (1993) Comparative measures of desiccation tolerance in the *Tortula ruralis* complex. I. Variation in damage control and repair. *American Journal of Botany* 80:127-136.

Oliver MJ, Wood AJ (1997) Desiccation tolerance in mosses. In Koval TM (ed.) *Stress induced processes in higher eukaryotic cells*. Plenum, New York, pp. 1-26.

Padmanabhan V, Dias DM, Newton RJ (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology* 35:801-807.

Park CJ, Seo YS (2015) Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathology Journal* 31(4):323-333.

Park JA, Cho SK, Kim JE, Chung HS, Hong JP, Hwang B, Hong CB, Kim WT (2003) Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the Ca-LEAL1 gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Plant Science* 165: 471-481.

Phillips J, Artsaenko O, Fiedler U, Horstmann C, Mock HP, Müntz K, Conrad U (1997) Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *The EMBO Journal* 16:4489-4496.

Phillips JR, Oliver MJ, Bartels D (2002) Molecular genetics of desiccation-tolerant systems. In Black M, Pritchard HW (eds.) *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, pp. 319-341.

Piatkowski D, Schneider K, Salamini F, Bartels D (1990) Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water stress genes. *Plant Physiology* 94:1682-1688.

Porembski S, Barthlott W (2000) Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as center of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151:19-28.

Proctor MCF, Nagy Z, Csintalan Z, Takács Z (1998) Water content components in bryophytes: analysis of pressure-volume relationships. *Journal of Experimental Botany* 49:1845-1854.

- Proctor MCF, Pence VC** (2002) Vegetative Tissues: Bryophytes, vascular resurrection plants, and vegetative propagules. In Black M, Pritchard HW (eds.) Desiccation and survival in plants: Drying without dying. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, pp. 207-237.
- Proctor MCF, Smirnov N** (2001) Rapid recovery of photosystems on rewetting desiccation-tolerant mosses: Chlorophyll fluorescence and inhibitor experiments. *Journal of Experimental Botany* 51:1695-1704.
- Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA** (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell & Environment* 28:709-718.
- Richter K, Buchner J** (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *Journal of Cellular Physiology* 188:281-290.
- Rinne PL, Kaikuranta PL, Van der Plas LH, Van der Schoot C** (1999) Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta* 209:377-388.
- Ritossa F** (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
- Roberts EH** (1973) Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- Roberts JK, DeSimone NA, Lingle WL, Dure L III** (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5:769-780
- Romo S, Labrador E, Dopico B** (2001) Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:1017-1026.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Functional Analysis of an *Arabidopsis* Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell* 18:1292-1309.
- Sallon S, Solowey E, Cohen Y, Korchinsky R, Egli M, Woodhatch I, Simchoni O, Kislev M** (2008) Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 320(5882):1464.
- Sano N, Rajjou L, North HM, Debeaujon I, Marion-Poll A, Seo M** (2016) Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity. *Plant and Cell Physiology* 57 (4):660-674.
- Sazegari S, Niazi A, Ahmadi FS** (2015) A study on the regulatory network with promoter analysis for *Arabidopsis* DREB-genes. *Bioinformatics* 11(2):101.
- Schwartz A, Wu WH, Tucker EB, Assmann SM** (1994) Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:4019-4023.
- Shen-Miller J, Schopf JW, Harbottle G, Cao RJ, Ouyang S, Zhou KS, Southon JR, Liu GH** (2002) Long-living lotus: germination and soil {gamma}-irradiation of centuries-old fruits, and cultivation, growth, and phenotypic abnormalities of offspring. *American Journal of Botany* 89 (2):236-247.
- Silhavy D, Hutvagner G, Barta E, Bánfalvi Z** (1995) Isolation and Characterization of a Water-Stress-Inducible cDNA Clone from *Solanum chacoense*. *Plant Molecular Biology* 27:587-595.
- Simon EW** (1978) Membranes in dry and imbibing seeds. In: Crowe JH, Clegg JS (eds.) *Dry Biological Systems*. Academic Press, New York. pp. 205-24.

- Singh S, Cornilescu CC, Tyler RC, Cornilescu G, Tonelli M, Lee MS, Markley JL** (2005) Solution structure of a Late Embryogenesis Abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Science* 14:2601-2609.
- Solomon A, Salomon R, Paperna I, Glazer I** (2000) Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein. *Parasitology* 121:409-416.
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J** (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* 421:79-83.
- Swindell WR, Huebner M, Weber AP** (2007) Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* 8 (125):1-15.
- Swire-Clark GA, Marcotte WR Jr** (1999) The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology* 39:117-128.
- Tanford C** (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200:1012-18.
- To A, Valon C, Savino G, Guillemint J, Devic M, Giraudat J, Parcy F** (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *The Plant Cell* 18 (7):1642-1651.
- Tuba Z, Csintalan Z, Proctor MCF** (1996) Photosynthetic responses of a moss, *Tortula ruralis*, ssp. *ruralis*, and the lichens *Cladonia convoluta* and *C. furcata* to water deficit and short periods of desiccation, and their ecophysiological significance: A baseline study at present-day CO₂ concentration. *New Phytologist* 133:353-361.
- Tuba Z, Lichtenthaler HK** (2011) Ecophysiology and homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation-tolerant plants and vegetations. In Lüttge U, Beck E, Bartels D (eds.) *Plant Desiccation Tolerance*. Springer-Verlag, Berlin, pp 157-179.
- Tuba Z, Lichtenthaler HK, Csintalan Z, Nagy Z, Szente K** (1996) Loss of chlorophylls, cessation of photosynthetic CO₂ assimilation and respiration in the poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabrida* during desiccation. *Physiologia Plantarum* 96:383-388.
- Tunnacliffe A, Lapinski J, McGee B** (2005) A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* 546:315-321.
- Van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI** (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* 51:1555-1562.
- Verdaguer B, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet C** (1996) Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the Cassava Vein Mosaic Virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology* 31:1129-1139.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK** (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* 45:523-539.
- Vertucci CW, Farrant JM** (1997) Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel J, Galili G (Eds.) *Seed Development and Germination*. Dekker, New York, pp. 237-271.
- Vierling E** (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42:579-620.

- Vierling E** (1997) The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiologiae Plantarum* 19(4):539-547.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9:244-252.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E** (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47(296):325-338.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S** (2011) A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLOS ONE* 6(2):e16765.
- Webster BD, Leopold AC** (1977) The ultrastructure of dry and imbibed cotyledons of soybean. *American Journal of Botany* 64:1286-1293.
- Welch AZ, Gibney PA, Botstein D, Koshland DE** (2013) TOR and RAS pathways regulate desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 24:115-128.
- Wilson DO, McDonald MB** (1986) The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Science and Technology* 14:269-300.
- Wood AJ, Oliver MJ** (1999) Translational control in plant stress: The formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Tortula ruralis* gametophytes. *The Plant Journal* 18:359-370.
- Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, Xie Q** (2009) Dual function of *Arabidopsis* ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Research* 19:1279-1290.
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU** (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology* 154:267-273.
- Zegzouti H, Jones B, Marty C, Lelievre JM, Latche A, Pech JC, Bouzayen M** (1997) ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEAlike protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Molecular Biology* 35:847-854.

11. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla S1: Secuencias empleadas en este estudio y su método de obtención. Las secuencias fueron obtenidas de tres fuentes: kit MoClo Plant Parts (MPP), amplificación por PCR o síntesis en GenScript®.

Tipo de secuencia	Nombre	Método
Promotor Constitutivo	pACT2	MPP
	PAtuMAS	MPP
	PAtuNOS	MPP
	pCaMV35S	MPP
	PCsVMV	MPP
	pLHB1B1	MPP
	pSIRbcS2	MPP
	pTCTP	PCR
Promotor Inducible	pCOR15A	PCR
	pDREB2A	GenScript
	pKIN2	PCR
	pRD20	GenScript
	pRD22	PCR
	pRD29A	GenScript
	pRD29B	GenScript
Intrón	ACT2-1I	PCR
Secuencia Codificante	<i>aacC1</i>	PCR
	AGL67	PCR
	ATAF1	PCR
	DREB2D	GenScript
	DREB2G	GenScript
	HAP2C	PCR
	PLATZ1	GenScript
	PLATZ2	GenScript
	<i>ptxD</i>	PCR
Terminadores	TerACT2	MPP
	TerAtug7	MPP
	TerAtuMAS	MPP
	TerAtuNOS	MPP
	TerAtuOCS	MPP
	TerCaMV35S	MPP
	TerSIRbcS3C	MPP
Gen Marcador de Selección	pAtuNos - <i>bar</i> - tAtuNos	MPP
	pAtuNos - <i>nptII</i> - tAtuOcs	MPP
	pOLE1 - OLE1 - tagRFP - tOLE1	MPP

Tabla S2: Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las secuencias y comprobación de las construcciones.

Secuencia	Oligonucleótidos
35S-Ter Rv	AGCGATCTGGATTTTAGTACTG
ACT2-Ter Rv	AGCGAAATGGTGCATCTTAAA
AGL67 Rv	TCATTTTGGATTTTGGTTTCCGAAC
Atug7-Ter Rv	AGCGATCTTGAAAGAAATATAGTTT
Bpil-ACT2-Intron Fw	ttgaagacaatactGACTAAGAGAGAAAGTAAGAGATAATCC
Bpil-ACT2-Intron Rv	ttgaagacaacattTTTATGAGCTGCAAACACACA
Bpil-AGL67 Fw	ttgaagacaaaATGGGTCGGGTAAATTGGAG
Bpil-AGL67 Rv	ttgaagacaaaagcTCATTTTGGATTTTGGTTTCCGAAC
Bpil-ATAF1 Fw	ttgaagacaaaATGTCAGAATTATTACAGTTGCCTC
Bpil-ATAF1 Rv	ttgaagacaaaagcCTAGTAAGGCTTCTGCATGTACA
Bpil-EF1B-Intron Fw	ttgaagacaatactGTTAGAATCTGTTTTCTAAGGGC
Bpil-EF1B-Intron Rv	ttgaagacaacattCTATAAACATACATACATAGAGAGACAG
Bpil-Gentam Fw	ttgaagacaaaATGTTACGCAGCAGCAACGA
Bpil-Gentam Rv	ttgaagacaaaagcTTAGGTGGCGGTAAGTTGGGT
Bpil-HAP2C Fw	ttgaagacaaaATGATGCATCAGATGTTGAATAAGA
Bpil-HAP2C Rv	ttgaagacaaaagcTCAGATATGGACAGAGAAATGGT
Bpil-pCOR15A Fw	ttgaagacaaggagTAAGCACGCTCCATAATCTACC
Bpil-pCOR15A Rv	ttgaagacaacattATGAAAGGAGGAGTTTTTAGATGAAC
Bpil-pEF1B Fw	ttgaagacaaggagACGTCGTCGCCTTTATACTT
Bpil-pEF1B Rv	ttgaagacaagtaTGTTTCTAAAGCTCGAAACTTTTTTC
Bpil-pKIN2 Fw	ttgaagacaaggagTTATTAGACGAGCCAACTTATATTCA
Bpil-pKIN2 Rv	ttgaagacaacattTTCAGATATTTTTTTCTTGTAATAATCGT
Bpil-pRD22 Fw	ttgaagacaaggagGAATTCTCTAAGCTTCACAAGGGG
Bpil-pRD22 Rv	ttgaagacaacattTTTTGGGAGTTGGAATAGAAATGGG
Bpil-pTCTP Fw	ttgaagacaaggagCCAACACTCGAATCCCCAC
Bpil-pTCTP Rv	ttgaagacaacattGGTCGCTTATTGATTGTTTTCTCT
Bpil-ptxD Fw	ttgaagacaaaATGCTGCCGAAACTCGTTATAAC
Bpil-ptxD Rv	ttgaagacaaaagcTCAACATGCGGCAGGCTC
DREB2D_Opt Fw	ATGTCCAGTATTGAACCAAAGGT
DREB2D_Opt Rv	TCACAAAGGAGAATGGAAAGAATCC
DREB2G_Opt Fw	ATGGAAGAGGAACAGCCTCC
DREB2G_Opt Rv	TCAGAACCAGTTCCATGGATGT
HAP2C Rv	TCAGATATGGACAGAGAAATGGT
Mas-Ter Rv	AGCGGATAATTTATTTGAAAATTCATA
NosTer Rv	AGCGTCGATCTAGTAACATAGATG
Ocs-Ter Rv	TGCTGAGCCTCGACATGTTG
p35Sshort Fw	GGAGGTCAACATGGTGGA
pACT2 Fw	GGAGTCGACAAAATTTAGAACG

Tabla S2 (Continuación): Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las secuencias y comprobación de las construcciones.

Secuencia	Oligonucleótidos
pCassava Fw	GGAGCCAGAAGGTAATTATCCA
pDREB2A_Opt Fw	TCATAGCCACGCGAATAACC
pDREB2A_Opt Rv	CGTGTTTAGTCATCTTGCTCGT
pH4 Fw	GCCTTGTCATAGCGAGTACA
pICH_Sequencing Fw	TTCATTAATCACTCTGTGGTCTCA
pICH_Sequencing Rv	AGCCACTTCGTGGTCTCA
PLATZ1_Opt Fw	ATGGGACCTATGATTAGAAGTGAAG
PLATZ1_Opt Rv	TCAGAATGGAGCTCTATGAGGAAC
PLATZ2_Opt Fw	ATGGGACCAATGATGATGAGAG
PLATZ2_Opt Rv	TCAGAAAGGAGCTCTATGTGGAA
pLHB1B1 Fw	GGAGATATGACTGGTAAGTTTTTC
pMAS Fw	GGAGATTTTTCAAATCAGTGCG
pNOS Fw	GGAGAGCGGAGAATTAAGGGA
pOCS Fw	GGAGCTGAAAGCGACGTT
pRD20_Opt Fw	ACGTAAAGGAGTTTGTGAAGGT
pRD20_Opt Rv	ACAATCTCGCTGTCTTGTGT
pRD29A_Opt Fw	TTGTGTGAAAAAGAGATTGGGT
pRD29A_Opt Rv	CAAACCCTTTATTCCTGATGATTGT
pRD29B_Opt Fw	TCTTGGGAGCTCAGACTGTATC
pRD29B_Opt Rv	TTCAAGTGAATCAATCAAACCCTCT
pSIRbcS2 Fw	GGAGAATTCATGGGGCATTACA
SIRbcS3C_Ter Rv	AGCGTTATATAGCAGCCACAAG
Vector L1 Fw	AAACCACTTCGTGCAGAAGACA
Vector L1 Rv	TGGGGTGGATGCAGTGGG

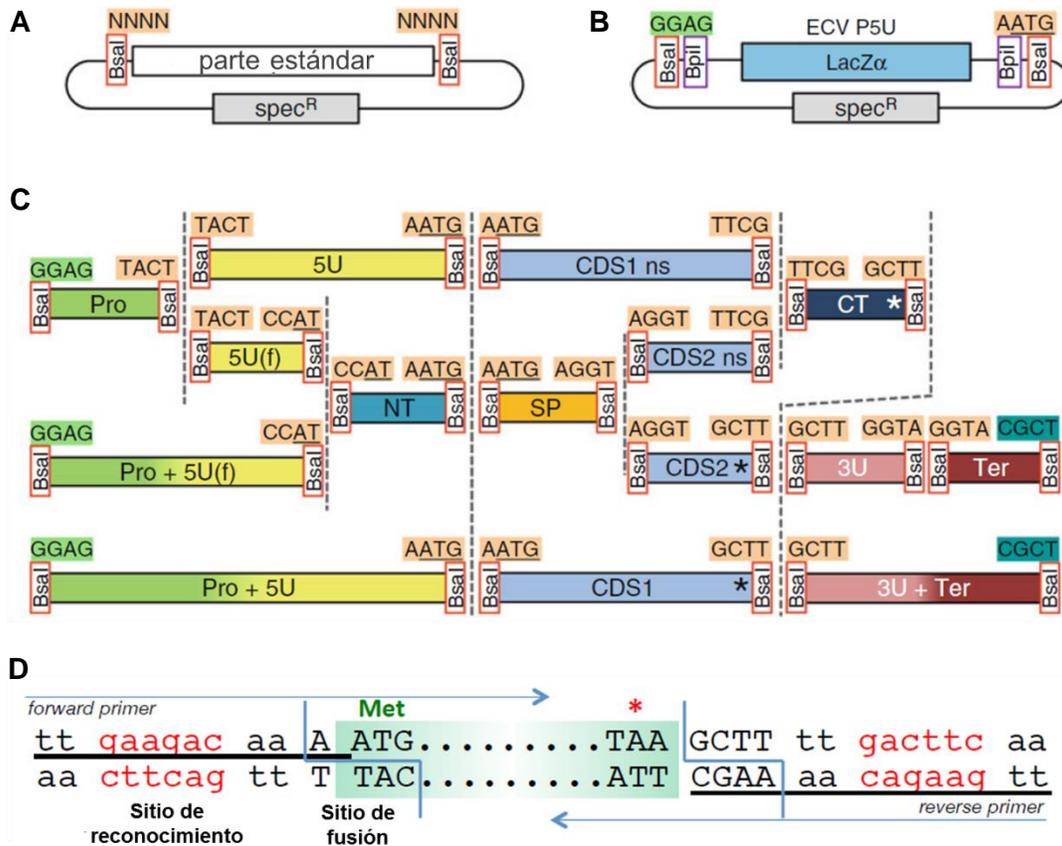


Figura S1: Módulos Nivel 0 (partes estándar). A) Estructura general de un plásmido Nivel 0. El módulo Nivel 0 está flanqueado por dos sitios Bsal invertidos. B) Vector de clonación Nivel 0 receptor de Pro+5U. Los vectores receptores Nivel 0 están flanqueados por dos sitios Bpil invertidos para la introducción de la parte estándar correspondiente. C) Diferentes tipos de partes estándar con sus correspondientes sitios de fusión. Promotor (Pro), 5'- y 3'-UTR (5U, 3U), etiquetas N- y C-terminal (NT y CT), péptido señal (SP), secuencia codificante (CDS) con codón de paro (*) o sin codón de paro (ns), terminador (Ter) (Modificada de Marillonnet y Werner, 2015). D) Fragmentos a añadir a los extremos 5' de los oligonucleótidos diseñados para amplificar una secuencia codificante con codón de paro, los cuales contienen un sitio de reconocimiento para Bpil y un sitio de fusión (Modificado de Engler *et al.*, 2014).

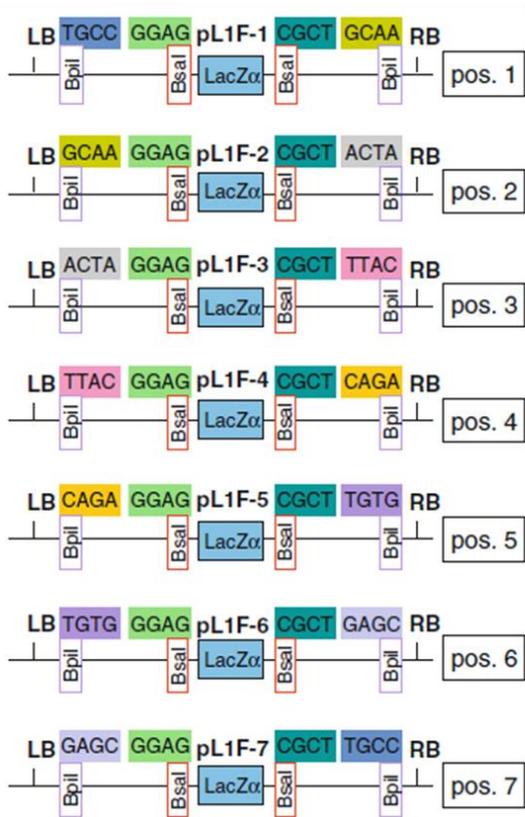


Figura S2: Vectores destino del Nivel 1. Los genes pueden ser clonados en una de siete posiciones. Todos los vectores contienen bordes de T-DNA (LB y RB) para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* (Marillonnet y Werner, 2015).

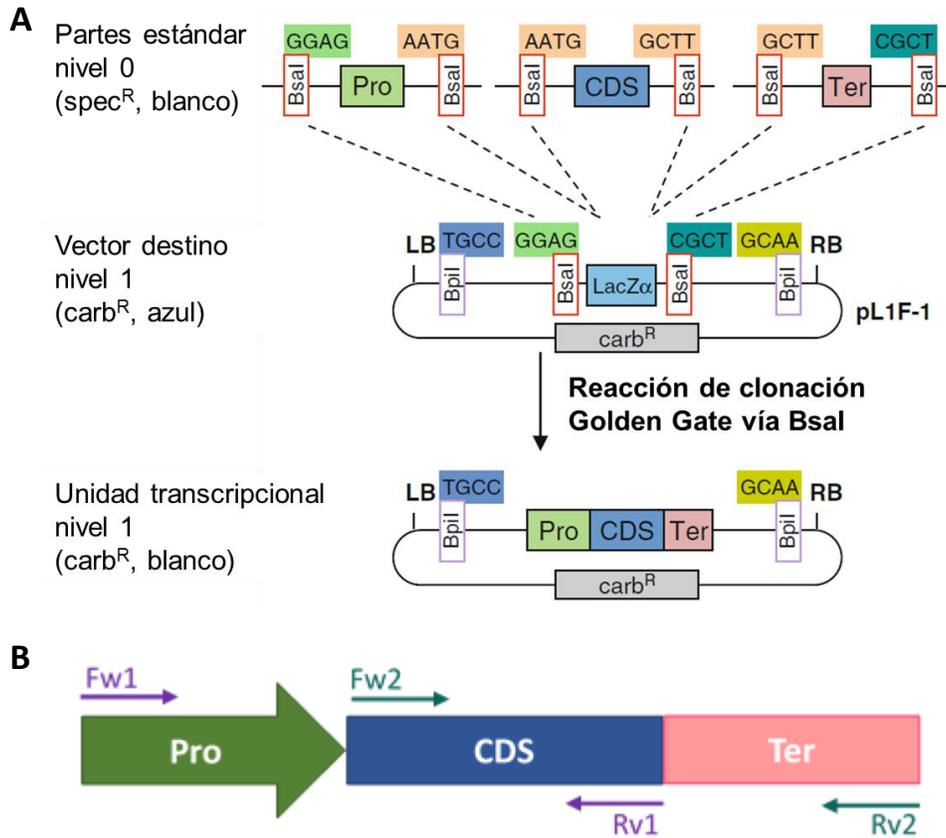


Figura S3: Ejemplo de clonación de una unidad transcripcional que consta de 3 partes estándar. A) Las clonas correctas son identificadas por el marcador de resistencia a antibiótico (carb^R) y el color de las colonias sobre placas con X-gal (blancas) (Modificada de Marillonnet y Werner, 2015). B) La comprobación del ensamble jerárquico de las partes estándar se realizó mediante amplificaciones interpuestas de dos fragmentos consecutivos.

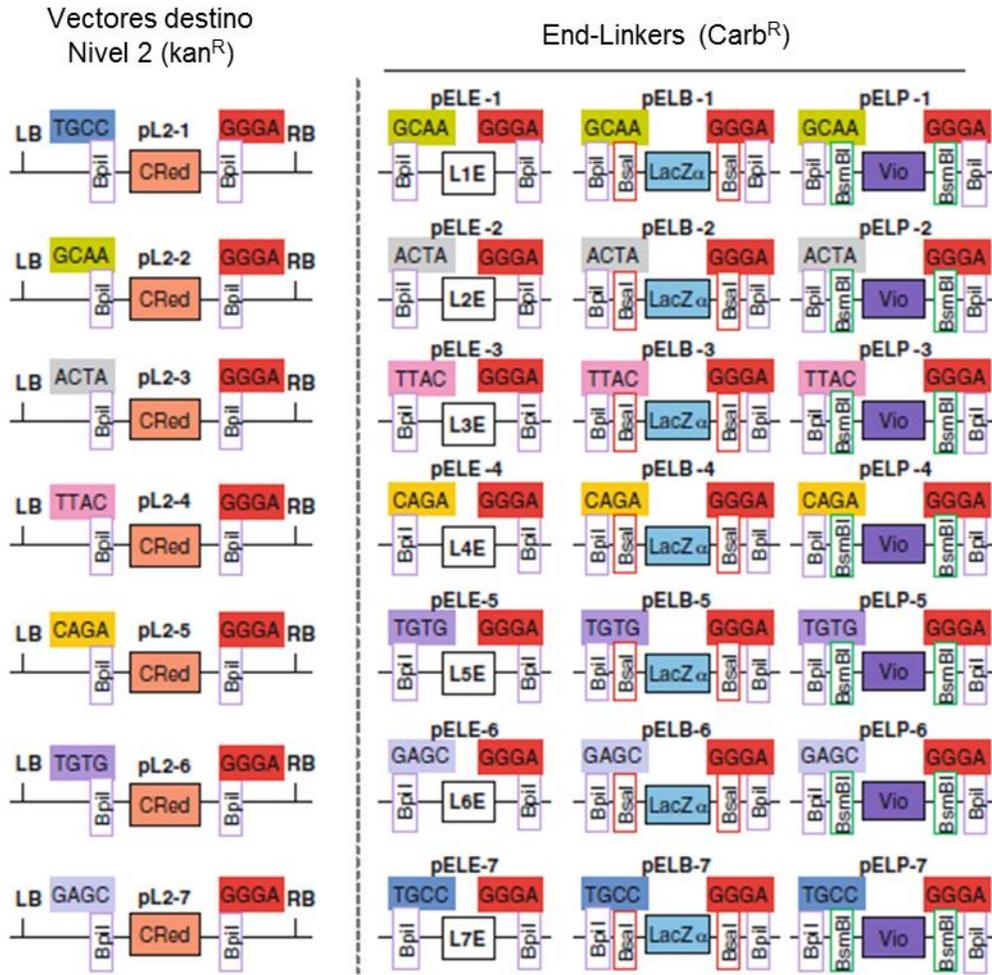


Figura S4: Vectores destino Nivel 2 y End-Linkers. Los vectores destino de este nivel contienen bordes de T-DNA (LB y RB) para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*. Los vectores nivel 2 generan colonias de color rojo (CRed), mientras los end-linkers generan colonias de color blanco (pELE), azul (pELB) o morado (pELP) (Marillonnet y Werner, 2015).

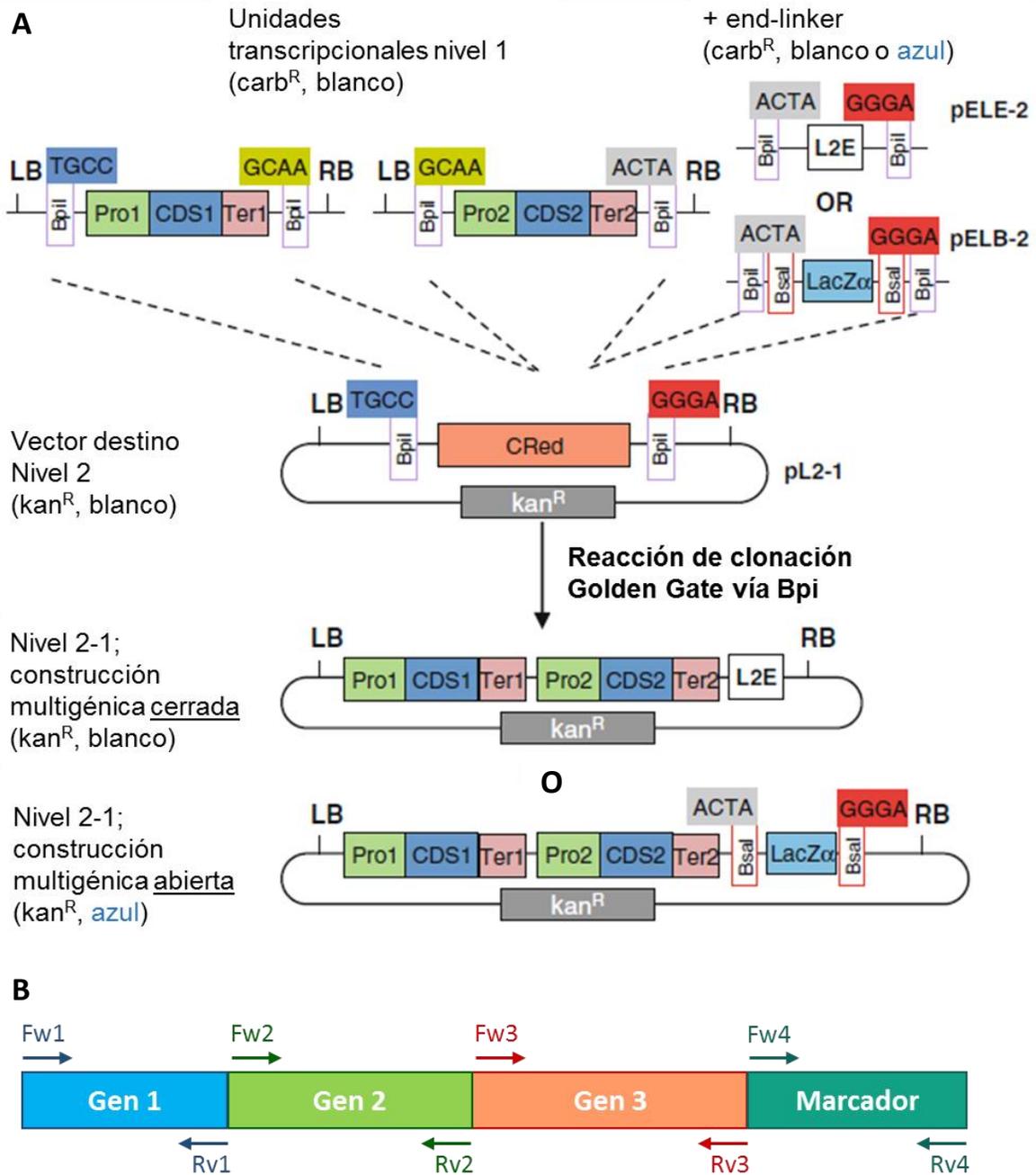


Figura S5: Ejemplo de clonación de dos genes en un vector Nivel 2. A) La construcción Nivel 2-1 resultante puede ser cerrada o abierta dependiendo del end-linker seleccionado. Las construcciones abiertas pueden ser utilizadas para la adición de más genes. Las clonas correctas son identificadas por el marcador de resistencia a antibiótico (kan^R) y el color de las colonias sobre placas con X-gal (blancas o azules dependiendo del end-linker) (Modificada de Marillonnet y Werner, 2015). B) La comprobación del correcto ensamblaje de las construcciones Nivel 2 se hizo mediante la amplificación por PCR de cada uno de los genes correspondientes.