



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Aislamiento y caracterización de mutantes de T-DNA en genes que codifican para factores de transcripción activos durante el estrés por inundación en *Brachypodium distachyon*

TESIS

Para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A:

I.B. Teresa Zamora Hernández

Director de Tesis

Dr. Julián Mario Peña Castro

Marzo, 2018.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la asesoría del Dr. Julián Mario Peña Castro y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto SEP-CONACyT para Jóvenes Investigadores Ciencia Básica (152642) asignado al director de la tesis, una beca nacional de maestría (586510) y una beca de Apoyo Complementario para Mujeres Indígenas Becarias CONACyT (2016) asignadas a la autora de la presente.

Agradecimientos

A mi familia y amigos que me estuvieron apoyando y dando consejos durante este proyecto.

A Amy Cartwright por todo su apoyo para el envío de las semillas de *Brachypodium* del Department of Energy's Joint Genome Institute (JGI-DOE).

Al CONACyT por las becas otorgadas.

A mis revisores del comité tutorial la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia y al Dr. Edgar García López por sus aportaciones para este trabajo.

Al jurado de revisión de tesis el Dr. José Abad Zavaleta, Dr. Julian Mario Peña Castro, Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes, Dr. Miguel Peña Rico y a la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia por las comentarios al manuscrito.

Al Dr. José Abad Zavaleta, Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Dra. Sandra del Moral Ventura y a la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por compartir reactivos y equipos usados en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Mario Valera Zaragoza y la Dra. Sandra del Moral Ventura jefes de posgrado por los tramites y su apoyo durante la maestría.

A mi asesor de tesis el Dr. Julián Mario Peña Castro por aceptarme en su equipo de trabajo, sus enseñanzas y consejos además de brindarme su apoyo nuevamente durante todo este proyecto.

Fragmentos del presente trabajo se presentaron en el siguiente congreso:

Teresa Zamora-Hernández, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Julián Mario Peña-Castro. Identificación de mutantes de T-DNA en genes que codifican para factores de transcripción activos durante el estrés por inundación en *Brachypodium distachyon*. Tuxtepec, Oaxaca, 07 de julio de 2016. I encuentro de la Sociedad de Biotecnología y Bioingeniería Delegación Oaxaca. Poster.

Índice

Abstract	1
Resumen	2
1. Introducción.....	3
1.1 México ante el cambio climático y las inundaciones.....	3
1.2 Respuestas de las plantas ante la inundación.....	4
1.2.1 Señalización.....	6
1.3 Biología molecular de la inundación	7
1.4 Factores de transcripción	8
1.5 Familias de FTs asociadas a la respuesta a la inundación	9
1.6 Determinación de la función génica.	14
1.7 Caracterización de genes relevantes en la respuesta a la inundación por mutagenesis.	19
1.8 Plantas modelo.....	25
2. Justificación.....	29
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	30
4.1. Objetivo general.....	30
5. Estrategia Experimental.....	31
6. Materiales y métodos.....	32
6.1 Selección de factores transcripcionales y de mutantes de T-DNA JGI.....	32
6.2 Construcciones de T-DNA.....	32
6.3 Análisis filogenético	33
6.4 Búsqueda de los uORFs.....	34
6.5 Análisis por Integrative Genomics Viewer (IGV).....	35

6.6	Diseño de oligonucleótidos.....	35
6.7	Material vegetal	37
6.7.1	<i>Brachypodium distachyon</i>	37
6.8	Verificación de la inserción de T-DNA.....	37
6.8.1	Recolección de las muestras.....	37
6.1.1	PCR Multiplex (Genotipificación)	38
6.9	Verificación de oligonucleótidos	39
6.9.1	Extracción de gDNA	39
6.9.2	Preparacion y evaluación de la calidad de los oligonucleótidos para PCR y RT-PCR	40
6.10	Establecimiento de las condiciones para probar la inundación.....	42
6.11	Tratamiento de estrés para las líneas de T-DNA.....	42
6.12	Análisis estadístico.....	43
6.13	Extracción de RNA	43
6.14	Síntesis de DNA complementario (cDNA) y control de calidad	44
6.14.1	Verificación de ausencia de gDNA	44
6.14.2	Síntesis de cDNA	45
6.14.3	Verificación del cDNA.....	46
6.15	Análisis mediante RT-PCR de verificación	47
6.16	RT-PCR.....	48
6.17	Mutagénesis con EMS.....	49
6.17.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	49
7.	Resultados y discusión	52
7.2	Selección de genes codificantes para FTs.....	52
7.3	Diseño de oligonucleótidos.....	56

7.4	Verificación de oligonucleótidos para genotipificación	57
7.5	Extracción de RNA y verificación de ausencia de gDNA.....	59
7.6	Análisis de las familias de FTs	61
7.6.1	Caracterización global de la expresión de FTs de la familia ERFs/DREB.	61
7.6.2	Análisis de IGV de la Familia ERFs con líneas de T-DNA disponibles.....	63
7.6.3	Verificación de la inserción de T-DNA de genes de la familia ERF	64
7.6.4	Representación esquemática de las líneas de T-DNA de la familia ERFs	66
7.6.5	Caracterización global de la expresión de FTs de la familia WRKY.....	67
7.6.6	Análisis de IGV de la Familia WRKYs con líneas de T-DNA disponibles.....	71
7.6.7	Verificación de la inserción de T-DNA de genes de la familia WRKY.....	71
7.6.8	Representación esquemática de las líneas de T-DNA de la familia WRKY	73
7.6.9	Análisis global de la expresión de FTs de la familia DNAJ.....	75
7.6.10	Análisis de IGV de la Familia DNAJ con líneas de T-DNA disponibles	75
7.6.11	Verificación de la inserción de T-DNA del DNAJ.....	77
7.6.12	Análisis de IGV de la Familia DNAJ	79
7.6.13	Verificación de la inserción de T-DNA del MYB.....	79
7.6.14	Análisis global de la expresión de FTs de la familia bZIP	80
7.7	Análisis mediante RT-PCR.....	84
7.8	Ensayo de inundación con Bd21-3	86
7.9	Tratamiento de estrés para las líneas de T-DNA	91
7.10	Mutagénesis con EMS en <i>Arabidopsis</i>	96
8.	Conclusiones.....	100
9.	Perspectivas y recomendaciones	101
	Referencias	102
	Anexos.....	118

Anexo A. Familias de FTs.....	118
Anexo B. Secuencias proteicas de la familia DNAJ de <i>Arabidopsis</i>	120
Anexo C. Secuencias de los uORFs de la familia bZIP	122
Anexo D. Secuencias utilizadas para el diseño de oligonucleótidos	122
Anexo E: Preparación de soluciones	129
Anexo F. Ladders	130
Anexo G. Información de oligonucleótidos proporcionada por la compañía OligoT4	131
Anexo H. Sitios de inserción en genes que codifican FTs activos en el estrés por inundación	132
Anexo I. Altura final de las líneas de T-DNA correspondiente al primer ensayo.....	133
Anexo J. Análisis Estadístico de las líneas de T-DNA.....	134

Índice de figuras

Figura 1. Inundaciones en el periodo de 1960 al 2010. Obtenido del Atlas Nacional de Riesgos.	4
Figura 2. Posibles estreses que enfrenta la planta durante la inundación.....	5
Figura 3 Mecanismo de acción de los ERFs-VII durante la normoxia (+O ₂) y el estrés por hipoxia (-O ₂ ; Peña-Castro, 2014).	7
Figura 4. Mecanismo de acción molecular de los FTs (Para <i>et al.</i> , 2014).	9
Figura 5. Las líneas mutantes de T-DNA de los FT ERFs-VII vuelve sensible a las plantas a la inundación de 44 h (Papdi <i>et al.</i> , 2015).....	19
Figura 6. Las líneas mutantes de inserción de T-DNA en el FTs de inundación WRKY22 ocasiona una respuesta disminuida al patógeno <i>Pseudomonas syringae</i> (Hsu <i>et al.</i> , 2013).	20
Figura 7. La sobreexpresión del FT SUB1A (ERFVII) de arroz <i>Arabidopsis</i> tiene consecuencias adversas en el desarrollo de la planta (Peña-Castro <i>et al.</i> , 2011).	21
Figura 8. Modificaciones en la expresión de HRA1 en el crecimiento de las plantas transgénicas comparadas con el tipo silvestre (Giuntoli <i>et al.</i> , 2014).....	22
Figura 9. Fenotipos de las plantas transformadas para POC (Weits <i>et al.</i> , 2013).....	23
Figura 10. Fenotipos de mutantes del ERF-VII RAP2.12 que controla la tolerancia a la inundación en <i>Arabidopsis</i> (Licausi <i>et al.</i> , 2011).....	24
Figura 11. Fenotipo de las plantas silvestre y de las líneas transgénicas sobreexpresante y de T-DNA antes y después del estrés por inmersión.	25
Figura 12. Estrategia experimental del presente trabajo.....	31
Figura 13. Vectores utilizados por JGI-DOE para la generación de las líneas de T-DNA de <i>Brachypodium</i> escrutinadas en el presente trabajo.....	33
Figura 14. Diseño de oligonucleótidos para las líneas mutantes y las plantas silvestres.	36
Figura 15. Estrategia de selección de plantas homocigotas y relaciones de segregación esperadas.....	38
Figura 16. Fenotipos de las plantas de <i>Arabidopsis</i> Col-0 y transformadas genéticamente con el ERF-VII de arroz SUB1A-1 (OxSUB1A-L5; Peña-Castro <i>et al.</i> , 2011).	49
Figura 17. Sitios de inserción en genes que codifican FTs activos en el estrés por inundación con líneas de T-DNA disponibles en JGI-DOE.	55
Figura 18. Gel de agarosa al 1% de gDNA de Bd21-3.....	58

Figura 19. Gel de agarosa al 1.5% para verificación de los oligonucleótidos para PCR utilizando el gDNA de Bd21-3.....	58
Figura 20. Gel de agarosa al 1.5% de PCR en gradiente para evaluar los oligonucleótidos 17961 y 55797.	59
Figura 21. Gel de agarosa al 1 % para el RNA de las líneas de T-DNA y de Bd21-3.	59
Figura 22. Gel de agarosa al 2% para la verificación de ausencia de gDNA en muestras de RNA de las líneas de T-DNA y de Bd21-3.....	60
Figura 23. Gel de agarosa al 2% de verificación del cDNA de las líneas de T-DNA y Bd21-3.	60
Figura 24. Grupos filogenéticos y perfiles de expresión de la subfamilia ERF/DREB de <i>Brachypodium distachyon</i> a 48h de estrés por inundación.	62
Figura 25. Cartogramas de alineamiento de secuencias de expresión de los ERFs que se expresan durante inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.	64
Figura 26. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ28379 del gen Bradi1g17961 de <i>Brachypodium</i>	64
Figura 27. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ22103 del gen Bradi1g17961 de <i>Brachypodium</i>	65
Figura 28. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ13579 del gen Bradi2g27920 de <i>Brachypodium</i>	65
Figura 29. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ22213 del gen Bradi5g08380 de <i>Brachypodium</i>	66
Figura 30. Representación esquemática del sitio de inserción del T-DNA para cada línea de la familia ERF.	68
Figura 31. Grupos filogenéticos y perfiles de expresión de la subfamilia WRKY de <i>Brachypodium distachyon</i> a 48h de estrés por inundación.	70
Figura 32. Cartogramas de alineamiento de secuencias de expresión de los WRKYs que se expresan durante inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.	71
Figura 33. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ28416 del gen Bradi2g16150 de <i>Brachypodium</i>	72

Figura 34. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ20483 del gen Bradi2g54720 de <i>Brachypodium</i>	72
Figura 35. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ19596 del gen Bradi2g22440 de <i>Brachypodium</i>	73
Figura 36. Representación esquemática del sitio de inserción del T-DNA para cada línea de la familia WRKY.....	74
Figura 37 . Perfiles de expresión de la subfamilia DNAJ de <i>Brachypodium distachyon</i> a 48h de estrés por inundación.	76
Figura 38. Cartograma de alineamiento de secuencia de expresión del DNAJ que se expresan durante inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.	77
Figura 39. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ2207 del gen Bradi2g55797 de <i>Brachypodium</i>	78
Figura 40. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ2214 del gen Bradi2g55797 de <i>Brachypodium</i>	78
Figura 41. Cartograma de alineamiento de secuencia de expresión del MYB que se expresan durante inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.	79
Figura 42. Gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ20097 del gen Bradi1g20540 de <i>Brachypodium</i>	79
Figura 43. Grupos filogenéticos y Perfiles de expresión de la subfamilia bZIP de <i>Brachypodium distachyon</i> a 48h de estrés por inundación.	81
Figura 44. Representación de la estructura de los bZIP de <i>Brachypodium</i>	82
Figura 45. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los SIRT-uORF de <i>Brachypodium</i> identificados a partir del bZIP11 de <i>Arabidopsis</i>	83
Figura 46. Alineamiento de consensos de los uORF y del ORF principal de <i>Brachypodium</i> identificados a partir del bZIP11 de <i>Arabidopsis</i>	84
Figura 47. Gel de agarosa al 1.5% para verificación de los oligonucleótidos para RT-PCR utilizando gDNA de Bd21-3.....	85
Figura 48. Análisis de RT-PCR de los niveles de transcripción de las líneas de T-DNA.....	85
Figura 49 Supervivencia de los ecotipos de <i>Brachypodium</i> del primer ensayo de inundación.	87

Figura 50. Porcentaje de hojas sanas de los ecotipos Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek10.	88
Figura 51. LT_{50} de los ecotipos de Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek-10 en estrés por inundación.	89
Figura 52. Supervivencia de los ecotipos de <i>Brachypodium</i> del segundo ensayo de inundación.	90
Figura 53. Porcentaje de hojas sanas de las líneas de T-DNA.	93
Figura 54. Plantas las líneas de T-DNA de <i>Brachypodium</i> sometidas a estrés por inundación.	94
Figura 55. Plantas las líneas de T-DNA de <i>Brachypodium</i> sometidas a estrés por inundación.	95
Figura 56. Resultados posibles de mutagénesis sobre el genotipo 35S: FLAG-SUB1A1-1.	97
Figura 57. Comparación de fenotipos de plantas que presentación una floración adelantada.	98
Figura 58. PCR de selección de mutantes por EMS de <i>Arabidopsis</i> L5.	99

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de transcripción inducidos a las 48h de estrés por inundación en <i>Brachypodium distachyon</i> (Zamora, 2016).....	10
Tabla 2. PCR de genotipificación.....	39
Tabla 3. Programa de PCR MyTaq Plant	39
Tabla 4. Componentes del buffer de extracción.	40
Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR de oligonucleótidos.	41
Tabla 6. Programa de PCR para los oligonucleótidos.	41
Tabla 7. Componentes para la PCR verificación de ausencia de gDNA.....	45
Tabla 8. Programa de PCR para la verificación de ausencia de gDNA.	45
Tabla 9. Componentes de la síntesis de cDNA	46
Tabla 10. Componentes para la PCR de verificación de cDNA.....	46
Tabla 11. Componentes para la reacción de PCR con ubiquitina	47
Tabla 12. Volúmenes finales utilizados para cada muestra de cDNA.....	47
Tabla 13. Programa de PCR.	48
Tabla 14 Componentes de PCR.....	48
Tabla 15. Componentes para PCR con DreamTaq Green MM.....	50

Tabla 16. Programa de PCR para la verificación de mutantes con EMS.	51
Tabla 17. Identificación de los genes que codifican FTs activos durante la inundación. Primer bloque.	53
Tabla 18. Identificación de los genes que codifican FTs activos durante la inundación. Segundo Bloque.....	54
Tabla 19. Oligonucleótidos de PCR para las líneas de T-DNA de <i>Brachypodium</i>	56
Tabla 20. Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR	57
Tabla 21. Semillas obtenidas de plantas homocigotas de las líneas de T-DNA.....	91

Lista de abreviaturas

FTs	Factores de transcripción
ERFs	Ethylene Responsive Factors
NAM	No apical meristem
ZF	Zinc finger
HSFs	Heat shock factors
ARF	Auxin response factors
RNA-seq	Secuenciación del RNA
JGI-DOE	Department of Energy's Joint Genome Institute
PCR	Polymerase chain reaction
ENCC	Estrategia nacional del cambio climático
LGCC	Ley general del cambio climático
PECC	Programa especial de cambio climático
DOF	Diario Oficial de la Federación
INECC	Instituto nacional de ecología y cambio climático
ACBP	Acyl-CoA binding protein
MAP	Methionine aminopeptidase
PCOs	Plant cysteine oxidase
ATE	Arginyl-Transferase
PRT	Proteolysis
GCH	Genes centrales de hipoxia
HRA1	Hypoxia Response Attenuator1
DNA	Acido desoxirribonucleico
RAP	Relativo a AP2
ATAF	Arabidopsis transcription activation factor
Cuc	Cup-shaped cotyledon
AP2	Apetala2
DREB	Dehydration responsive element binding
ABI3	Related to abscisic acid-insensitive3
VP1	Viviparous1
CMV	Dominios conservados
bZIP	Basic leucine zipper
uORF	Upstream Open Reading Frame
EMS	Etil metanosulfonato
GOI	Gene of interest
KO	Knock-out
TILLING	Targeting Induced Local Lesion in Genome
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
TGS	Transcriptional Gene Silencing
PTGS	Post-Transcriptional Gene Silencing
HA	Hemaglutina
CPM	Cuentas por millón
ANR	Atlas Nacional de Riesgos

Abstract

Transcription factors (TF) are proteins from different families that regulate genes expression and developmental processes have been associated to submergence stress, for example, *ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERFs)*, *WRKYs*, *NO APICAL MERISTEM (NAM)*, *ZINC FINGER (ZF)*, *HEAT SHOCK FACTORS (HSFs)* y *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*. Recently, the US Department of Energy released a collection of *Brachypodium* T-DNA lines that are useful for understanding the function of interrupted genes. In this work, it is proposed to study mutants of T-DNA in genes that encode TFs that are active during submergence stress in the grass model *Brachypodium distachyon*.

The RNA-Seq database of *Brachypodium distachyon* Bd21 submerged for 48 h (GSE74222) available at the Plant Biotechnology Laboratory of UNPA, was used to determine those TFs active during submergence stress. Subsequently, *Brachypodium* T-DNA lines were searched in the JGI *Brachypodium* database (JGI-DOE) and the seeds of the identified lines were requested. Bioinformatic analyzes were carried out to design oligonucleotides and follow the genetic segregation of the insertion in the plants.

Once homozygous mutant plants were found, the T-DNA insertion was verified by PCR. Subsequently, plants identified as insertional mutants were grown and characterized phenotypically under conditions of normal growth and flood stress. Flowering time, morphology in general, lethal time 50 (LT₅₀), number of leaves and percentage of survival were measured.

Bd21-3 is the genetic background of T-DNA insertional plants, however, it has not been reported its tolerance level to submergence stress. Here, we observed that it is a tolerant ecotype and was used to observe the mutants survival capacities. T-DNA mutants for Bradi2g54720 (JJ20483-T3W-5, BdWRKY57), Bradi2g22440 (JJ19596-T96W-7, BdWRKY46) y Bradi1g17961 (JJ28379-T9E-3 y JJ22103-T3E-1, ERFs-VII) showed a decrease on plant fitness that could not be statistically tested, however, a lodging phenotype not present in wild-type plants was observed. This indicates that the KO genes are involved in repressing cell-wall softening characteristic of plants expressing an submergence strategy of elongation.

Resumen

Los factores de transcripción (FT) son proteínas que regulan la expresión de genes y procesos durante el desarrollo de las plantas. En el estrés por inundación, se han encontrado FTs de las familias *ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERFs)*, *WRKYs*, *NO APICAL MERISTEM (NAM)*, *ZINC FINGER (ZF)*, *HEAT SHOCK FACTORS (HSFs)* y *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*. Recientemente, el Departamento de Energía de Estados Unidos liberó una colección de líneas de T-DNA de *Brachypodium distachyon* que son útiles para conocer la función de los genes interrumpidos. En este trabajo, se propone estudiar a mutantes de T-DNA en genes que codifican FTs activos durante el estrés por inundación.

A partir de la base de datos de secuenciación [del transcriptoma](#) (RNA-Seq) de *B. distachyon* Bd21 inundado por 48 h (GSE74222) [generada en el](#) Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNPA, se [seleccionaron](#) los FTs activos durante la inundación. Posteriormente, se realizó la búsqueda de las líneas [con inserción de](#) T-DNA de *Brachypodium* en la base de datos JGI-DOE y se solicitaron las semillas. Se realizaron análisis bioinformáticos para diseñar oligonucleótidos y seguir la segregación genética de la inserción. Una vez encontrados mutantes homocigotas, se verificó la inserción de T-DNA mediante PCR.

Posteriormente, las plantas identificadas como mutantes insercionales, se crecieron y caracterizaron fenotípicamente en condiciones de crecimiento normal y estrés por inundación. Se midió el tiempo de floración, morfología en general, tiempo letal 50 (LT₅₀), número de hojas y porcentaje de supervivencia.

El [fondo genético de](#) *Brachypodium* [donde se encuentran las mutantes de](#) T-DNA es Bd21-3, [la tolerancia al estrés por inundación en dicho ecotipo no ha sido evaluada](#), por lo que se probó y se clasificó como un ecotipo tolerante a [dicho](#) estrés y se usó para comparar el desempeño de las mutantes. Las mutantes presentaron un decremento en la integridad menor que el de las [plantas](#) silvestres, pero no logró diferenciarse estadísticamente. Sin embargo, sí se observó que las mutantes para los genes Bradi2g54720 (JJ20483-T3W-5, BdWRKY57), Bradi2g22440 (JJ19596-T96W-7, BdWRKY46) y Bradi1g17961(JJ28379-T9E-3 y JJ22103-T3E-1, ERFs-VII) presentaron un fenotipo de acamamiento lo que indica que estos FTs [están](#) involucrados en [la represión del](#) ablandamiento de [la](#) pared celular característico de las plantas que se elongan durante el estrés por inundación.

1. Introducción

1.1 México ante el cambio climático y las inundaciones

Debido a su ubicación geográfica, México está expuesto a fenómenos hidrometeorológicos como la sequía, los ciclones tropicales y las inundaciones (Conde-Álvarez y Saldaña-Zorrilla, 2007; DOF, 2014; Conde Álvarez *et al.*, 2016). Los más vulnerables durante los fenómenos hidrometeorológicos son los pobladores que se encuentran en las zonas costeras y lugares propensos a las inundaciones, pero en especial aquellos que dependen de la agricultura (Conde-Álvarez y Saldaña-Zorrilla, 2007; Monterroso *et al.*, 2014). Con el cambio del uso del suelo y la explotación de los recursos naturales, se ha generado la degradación del suelo, cambios en las precipitaciones e incremento de la temperatura (Magrin *et al.*, 2007; Magrin, 2015).

Actualmente, se han comenzado a buscar estrategias como el uso de sistemas de alerta temprana, y la observación y monitoreo de los fenómenos hidrometeorológicos (Conde-Álvarez y Saldaña-Zorrilla, 2007; ENCC, 2013). Por ejemplo, en México a partir de octubre de 2012, entró en vigor la Ley General de Cambio Climático (LGCC) con el fin de generar estrategias a mediano y largo plazo a través de la Estrategia Nacional del Cambio Climático ENCC y a corto plazo el Programa Especial de Cambio Climático (PECC; ENCC, 2013; DOF, 2014; PECC, 2014). Sin embargo, hasta ahora sólo se ha integrado la información de algunos municipios de México, lo que ha permitido conocer los datos en las zonas susceptibles y establecer los escenarios donde el cambio climático se ha hecho evidente (DOF, 2014; Conde Álvarez *et al.*, 2016).

De acuerdo a la información consultada en el Atlas Nacional de Riesgos (ANR, 2017), las zonas más afectadas por inundaciones en el periodo de 1960 al 2010 son Baja California Norte y Sur, las costas de Sonora, algunas zonas de Jalisco y el centro del país, las costas de Tamaulipas, Tabasco, Campeche, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo (Figura 1).



Figura 1. Inundaciones en el periodo de 1960 al 2010. Obtenido del Atlas Nacional de Riesgos.
En color azul se indican las zonas inundadas.

La búsqueda de opciones y medidas para reducir los impactos del cambio climático han llevado al uso de genotipos adaptados, bancos de germoplasma, cultivos alternativos, cambio de hábitos en la siembra y moderación en el uso de fertilizantes (Magrin, 2015).

En el 2012, en México se declararon a 421 municipios como afectados por fenómenos hidrometeorológicos debido a que se ubican dentro de las zonas generadoras de ciclones tropicales. El 63.3 % fueron afectados por lluvias e inundaciones, y 32.9 % por ciclones tropicales (Carlotta, Ernesto y Paul). Estos fenómenos generaron un total de 15,265 millones de pesos en daños y pérdidas económicas. En lo que respecta a la agricultura, se afectaron un total de 143,454 ha (CENAPRED, 2014).

A nivel estatal los más afectados fueron Veracruz (Ellis *et al.*, 2012), Oaxaca y Baja California Sur. En Oaxaca, el impacto socioeconómico de los desastres hidrometeorológicos afectó 85,523 ha generando pérdidas por un total de 4,090 millones de pesos en daños lo que se agrava con que Oaxaca posee un 64 % de la población en condiciones de pobreza, el sector que resulta más afectados durante los desastres naturales (CENAPRED, 2014).

1.2 Respuestas de las plantas ante la inundación

La inundación parcial (anegamiento) o total (inmersión) causan un efecto negativo en la mayoría de las plantas pues reduce el crecimiento, retrasa la germinación y la floración, induce

la senescencia, y disminuye la productividad de los cultivos (Peña-Castro, 2014). Las plantas son organismos sésiles y han desarrollado diferentes mecanismos fisiológicos (formación de arenquimas y raíces adventicias) y bioquímicos para enfrentar esta condición adversa. Son capaces de censar las condiciones ambientales de oxígeno (O_2) y desencadenar una serie de señales, que resultan en la activación de genes y síntesis de diversas proteínas relacionadas con el estrés, generalmente asociadas al uso de energía, el ataque a patógenos, respuesta a metales pesados, y salinidad (Figura 2; Miro e Ismail, 2013; Atwell *et al.*, 2014; Bailey-Serres y Colmer, 2014).

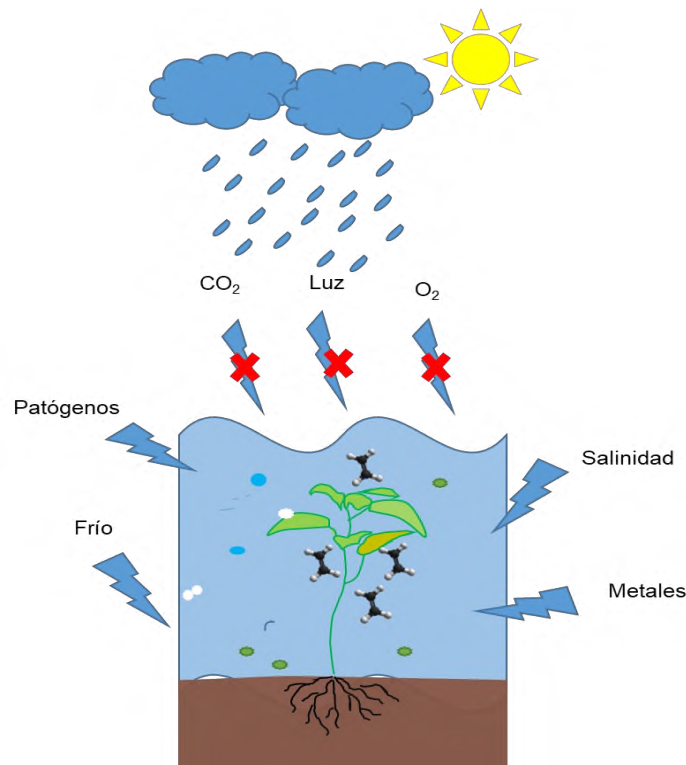


Figura 2. Posibles estreses que enfrenta la planta durante la inundación.

El agua ocasiona la acumulación de etileno (C_2H_4), la solubilización de metales pesados y otros iones, un medio de propagación de patógenos y la disminución de la difusión de gases, principalmente el oxígeno, y de la luz.

Durante la inundación hay una reducción del intercambio de gases entre las plantas y el entorno (CO_2 , O_2 y Etileno) por lo que puede restringirse la respiración aerobia. Adicionalmente, el etileno se acumula en la periferia de la planta y actúa como inductor de la transducción de señales a través de proteínas con identidad de factores de transcripción como los de la familia ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS (ERFs) en especial los de la familia

VII (ERFs-VII) que regulan la expresión relacionada con el desarrollo y la respuesta a estímulos ambientales (Riechmann *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2006; Bailey-Serres y Voeselek, 2008).

La privación del O₂ en las plantas durante la inundación ocasiona la restricción de la síntesis del ATP a través del Ciclo de Krebs (también llamado de los ácidos tricarbóxicos) y la fosforilación oxidativa por lo que hay un cambio del metabolismo aerobio al anaerobio para la obtención de energía (Bailey-Serres y Voeselek, 2010; Voeselek y Bailey-Serres, 2013).

1.2.1 Señalización

La activación transcripcional en respuesta a la hipoxia (deficiencia de O₂) es promovida por los ERFs-VII, estos FTs se encuentran estables durante la hipoxia, sin embargo, en condiciones normales de O₂ (normoxia) se desestabilizan y regulan a través de un mecanismo de proteólisis conocido como la ruta del N-terminal (Gibbs *et al.*, 2011).

En condiciones de normoxia (+O₂) el etileno se produce en bajas concentraciones que se difunden en el aire por lo que la transcripción de los ERFs también es baja; las proteínas ERFs que se producen son atrapadas en la membrana por otras proteínas denominadas ACYL-COA BINDING PROTEIN (ACBP) y el resto se oxidan por la ruta del N-terminal a través de la acción secuencial de las enzimas METHIONINE AMINOPEPTIDASE (MAP) que remueve la metionina-1 del extremo N, de PLANT CYSTEINE OXIDASE (PCOs) que usa oxígeno molecular para convertir a la metionina en sulfocisteína y transformar al ERF en sustrato de una ARGINYL-TRANSFERASE (ATE) que lo marcará para ser ubiquitinado por la enzima ubiquitina-liasa PROTEOLYSIS (PRT) y finalmente, ser degradado por el proteosoma (Figura 3a).

En condiciones bajas de oxígeno, además de la estabilización de las proteínas ERFs-VII, también se aumenta su transcripción debido a la acumulación del etileno alrededor de la planta, esta condición permite que las proteínas estables y recién traducidas cambien su localización al núcleo y promueven la transcripción de los genes centrales de hipoxia (GCH), que en su mayor parte codifican enzimas que cambian el metabolismo vegetal aerobio a uno anaerobio, por ejemplo ALCOHOL DEHYDROGENASE, PYRUVATE DECARBOXYLASE, ALANINE AMINOTRANSFERASE, LACTATE DEHYDROGENASE, entre otras (Figura 3b, Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011).

Este mecanismo le ayuda a la planta a responder a la variabilidad y distribución de la concentración de oxígeno para poder adaptarse y permitir estrategias de supervivencia durante la inundación y otros eventos donde las bajas concentraciones de oxígeno son relevantes, por ejemplo, la germinación, la acumulación de hielo, la penetración radicular en suelo y eventos de contaminación (Peña-Castro, 2014). Sin embargo, la fermentación incontrolada o constitutiva puede ser perjudicial para la planta debido al agotamiento de los carbohidratos necesarios para la planta (Fukao *et al.*, 2006).

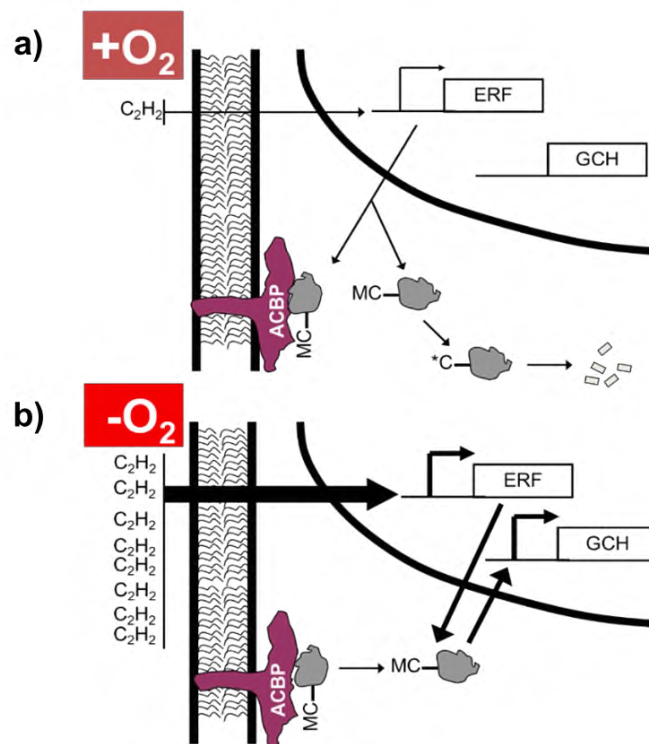


Figura 3 Mecanismo de acción de los ERFs-VII durante la normoxia (+O₂) y el estrés por hipoxia (-O₂; Peña-Castro, 2014).

a) En condiciones normales de oxígeno (+O₂), el etileno se encuentra en bajas condiciones por lo que la transcripción de los FTs ERFs-VII es mínima y las pocas proteínas sintetizadas se oxidan por la ruta del N-terminal.
b) En condiciones bajas de oxígeno (-O₂), el etileno se acumula en la periferia de la planta y promueve la transcripción de los ERFs-VII y se da un cambio en el metabolismo a la ruta fermentativa en la que intervienen los genes centrales de hipoxia (GCH). MC corresponde al motivo del N-terminal: MCGGAI (I/L).

1.3 Biología molecular de la inundación

La regulación de la transcripción durante la hipoxia se controla principalmente a través de los miembros de la familia de FTs ERF-VII que activan al conjunto de genes GCH. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, el ERF-VII *RAP2.12* es suficiente para desencadenar la respuesta transcripcional (Licausi *et al.*, 2011). *RAP2.12* se regula por el O₂ a través de la ruta

del N-terminal, y se ha demostrado que existe un mecanismo de retroalimentación para controlar la actividad de *RAP2.12* en el que interviene el FT *HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR1* (*HRA1*) que a la vez que es uno de los principales blancos transcripcionales de *RAP2.12*, y su principal inhibidor (Giuntoli *et al.*, 2014).

A partir de ensayos de dos híbridos en levadura y fusiones de promotores con luciferasa, se identificó que *HRA1* puede interactuar con *RAP2.12* en regiones del DNA, lo que permite modular la extensión de la respuesta durante la hipoxia fluctuante. Posteriormente, Giuntoli *et al.* (2017a) obtuvieron mutantes con *RAP2.12* sobreestabilizado mediante la delección de los 13 aminoácidos del extremo N-terminal y mutantes de *HRA1* sobreexpresantes que examinaron de manera fenotípica en condiciones normales. Con este experimento demostraron que *HRA1* es el principal modulador *in vivo* del ERF. Este mismo grupo de trabajo también demostró que existe un mecanismo mediado por factores genéticos aún desconocidos que inhibe la acción de los ERFs en la edad adulta de la planta, pues una vez que se alcanza la madurez reproductiva, los ERFs-VII ya no poseen la capacidad de activar a un subconjunto de GCH relacionados con el estrés oxidativo (Giuntoli *et al.*, 2017b).

1.4 Factores de transcripción

Los FT son proteínas que regulan la expresión de muchos genes a través de la unión a elementos *cis* del DNA que se localizan en los promotores, y que se clasifican en diferentes familias de acuerdo a su estructura. Los FTs regulan diversos procesos durante el desarrollo de las plantas (Liu *et al.*, 1999; Riechmann *et al.*, 2000; Nakashima *et al.*, 2009).

Se han realizado estudios para conocer los mecanismos de regulación los FTs a través de las redes reguladoras de señales y se ha concluido que de acuerdo a sus objetivos primarios, los FTs se pueden clasificar en tres clases: los objetivos de la clase I conocidos como “posicionados” (Poised) que se encuentran unido al FT pero no muestran una regulación génica inducida por el FT; la clase II considerados “estables”, que se encuentran ligados y regulados por el FT, y la clase III transitoria o conocida como transcripción “pega y corre” en la que la regulación es a través del FT pero sólo por una unión temporal que activa la transcripción del gen pero el mantenimiento de la actividad corre por cuenta de otro factor secundario, mientras que el primario busca otro objetivo para continuar activándolo (Figura 4; Para *et al.*, 2014).

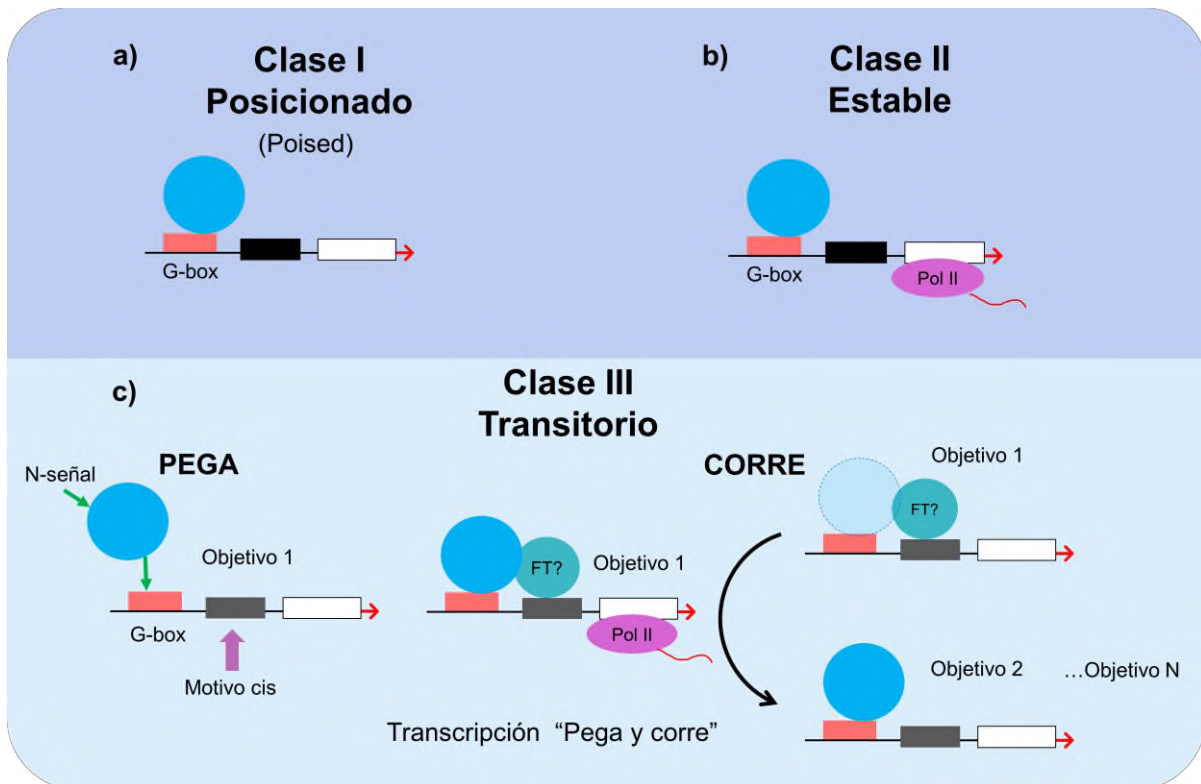


Figura 4. Mecanismo de acción molecular de los FTs (Para *et al.*, 2014).

a) El FT (círculo azul) se une a una secuencia específica en el promotor, pero no tiene consecuencias en la transcripción. b) El FT se une y atrae a la RNA polimerasa (óvalo rosa) para que lleve a cabo la transcripción del gen. c) El FT se une al promotor y se asocia a otro FT (círculo verde) lo que inicia la transcripción y el factor original se traslada a un nuevo promotor.

1.5 Familias de FTs asociadas a la respuesta a la inundación

Entre los factores de transcripción activos en el estrés por inundación, Bailey-Serres y Voesenek (2010) realizaron una revisión de la literatura y reportaron a FTs activos en el estrés por inundación las siguientes familias: *ETHYLENE RESPONSE FACTORS (ERFs)*, *WRKYs*, *NO APICAL MERISTEM (NAM)*, *ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR1-2 (ATAF1-2)* y *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* designados como *NAC*, *ZINC FINGER (ZF, dedos de zinc)*, *HEAT SHOCK FACTORS (HSFs, factores de choque térmico)* y *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*.

En trabajos previos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, se identificaron ecotipos de la planta modelo *B. distachyon* con tolerancia diferencial al estrés por inundación y se estudió su expresión génica diferencial mediante un análisis por secuenciación de RNA (RNA-seq; Rivera-Contreras *et al.*, 2016). En el análisis de

expresión diferencial en estos ecotipos se encontraron factores de transcripción inducidos adicionales a los ERFs-VII a las 48 horas de estrés por inundación (Tabla 1; Zamora, 2016).

Tabla 1. Factores de transcripción inducidos a las 48h de estrés por inundación en *Brachypodium distachyon* (Zamora, 2016). Subrayados y con negrita se destacan los ERFs-VII.

Gen	Identidad
Bradi1g08891	Heat shock transcription factor
Bradi1g17480	NAC transcription factor
<u>Bradi1g17961</u>	PF00847 - AP2 domain
<u>Bradi1g72457</u>	PF00847 - AP2 domain
Bradi2g02710	Putative AP2 domain containing protein RAP2.8 (DREB)
Bradi2g02720	ABI3VP1 transcription factor
Bradi2g05500	WRKY transcription factor
Bradi2g08120	auxin response factor (ARF)
<u>Bradi2g11890</u>	PF00847 - AP2 domain
Bradi2g22440	WRKY transcription factor
Bradi2g24175	PF00847 - AP2 domain
<u>Bradi2g27920</u>	PF00847 - AP2 domain
Bradi2g54720	WRKY transcription factor
Bradi3g09810	WRKY transcription factor
Bradi3g18070	PF00847 - AP2 domain
Bradi3g42130	Heat shock factor protein 7
Bradi4g33000	zf-Dof
Bradi4g35650	PF00847 - AP2 domain
Bradi5g13663	PF00651//PF02135 - BTB/POZ domain //TAZ zinc finger
Bradi5g21983	PF02365 - No apical meristem (NAM) protein

En los datos de *B. distachyon* se hallaron cuatro ERFs-VII inducibles (Bradi1g17960, Bradi1g72457, Bradi2g11890 y Bradi2g27920); cuatro ERFs que no pertenecen al grupo VII (Bradi2g02710, Bradi2g24175, Bradi3g18070, Bradi4g35650), cuatro de la familia WRKY (Bradi2g05500, Bradi2g22440, Bradi2g54720, Bradi3g09810); dos de la familia HSTs (Bradi1g08891, Bradi3g42130); dos de la familia NAC (Bradi1g17480, Bradi5g21983); uno de la familia ARF (Bradi2g08120); dos de la familia ZF (Bradi5g13663, Bradi4g33000) y la familia RAV (ABI3VPI, Bradi2g02720; Tabla 1); en el Anexo A se describen algunas de estas familias).

La revisión de la literatura sobre la función de estas familias de FTs, que a continuación se presentan permite proponer que las plantas no sólo responden a la disminución de oxígeno, pero también están ajustando su desarrollo, preparándose para responder al ataque contra patógenos y respondiendo a otros componentes del estrés como los de la Figura 2.

1.5.1 Familia de factores de respuesta al etileno (ERFs)

Los ERFs son FT y forman parte de la superfamilia *APETALA2 (AP2) /ERF*; poseen un dominio AP2 de unión a DNA que consta de 60-70 aminoácidos (Riechmann *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2006). La familia ERF se encuentra implicada en diferentes procesos biológicos que tienen que ver con el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como la respuesta a diversos estímulos ambientales. A su vez, se pueden clasificar en tres subfamilias: *AP2/ERF*, *AP2/CFB DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING (DREB)* y *RELATED TO ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3 (ABI3) /VIVIPAROUS1 (VPI)* también designada como *RAV* (Nakano *et al.*, 2006).

1.5.1.1 ERFs-VII

Los ERFs-VII son una subfamilia de los ERFs que se caracterizan por poseer un dominio en la región del N-terminal *MCGGAI(I/L)* que, en concentraciones de oxígeno y óxido nítrico bajas, se estabiliza post traduccionalmente y así, tiene la propiedad de regulación génica durante la hipoxia y la inundación (Nakano *et al.*, 2006; Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011). También tienen una región C-terminal variable, así como varios dominios conservados (CMV) que tienen funciones de activación/inactivación transcripcional, y de localización nuclear (Bui *et al.*, 2015). En arroz, el ERF-VII *SUBIA-1* es el factor genético principal de tolerancia a la inundación (Fukao *et al.*, 2006).

Brachypodium cuenta con 57 miembros de esta familia constituida por siete grupos identificados como B1 a B7 (Chen *et al.*, 2016). En trabajos previos de Rivera-Contreras *et al.* y de Zamora (2016) se identificaron 8 ERFs-VII durante el estrés por inundación en *B. distachyon* y se pudieron dividir en dos grupos de acuerdo a su expresión, los constitutivos (Bradi3g60120, Bradi1g46690, Bradi4g31040) y los inducibles (Bradi1g17960, Bradi2g27920,

Bradi1g72457, Bradi2g11890). Esta clasificación se confirmó mediante análisis bioinformático, análisis de expresión por qPCR y RNA-Seq. Con información de *A. thaliana* se ha hipotetizado que los ERFs-VII constitutivos son los principales sensores de oxígeno, mientras que los inducibles son los principales FTs que mantienen la expresión sostenida de los GCH durante el estrés (Licausi *et al.*, 2010).

1.5.2 Los factores transcripcionales Dehydration Responsive Element Binding (DREB)

Los factores de transcripción *DREB* son reguladores clave en la respuesta a estrés biótico y abiótico, reconocen secuencias *cis* C-Repeat (CRT) o *DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT* (*DRE*, elementos de respuesta a deshidratación) localizadas en los promotores de respuesta al estrés abiótico. Se clasifican en los grupos conocidos como *DREB1/CBF* y *DREB2*; *DREB1/CBF* regulan la respuesta al frío mientras que los *DREB2* responden al estrés hídrico o choque térmico (Sakuma *et al.*, 2002; Mizoi *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2015), actualmente *Brachypodium* cuenta con 65 genes identificados por Chen *et al.* (2016) a partir de un análisis bioinformático.

1.5.3 Familia WRKY

Son una familia grande de factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés biótico y abiótico. Se caracterizan por contener una región de 60 aminoácidos en la que se encuentra un motivo altamente conservado WRKYGQK junto con un tipo de motivo ZINC FINGER. Se clasifican en tres grupos dependiendo del número de motivos WRKY y el tipo de motivo ZF contenidos en su secuencia (Grupos I-III; Cai *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014); se unen al DNA mediante su región del C-terminal reconociendo el dominio (T)(T) TGAC(C/T) conocido como caja W; otra característica de este grupo es que cuenta con un intrón en la región que codifica al C-terminal (Eulgem *et al.*, 2000; Tripathi *et al.*, 2012).

Hasta el momento, este tipo de FTs sólo se ha identificado en plantas. En algodón y *Arabidopsis*, los WRKYs están implicados en la regulación fisiológica, la senescencia, defensa y resistencia contra patógenos (Eulgem *et al.*, 2000; Eulgem y Somssich, 2007; Cai *et al.*, 2014). En *Brachypodium*, se realizó un análisis filogenético y estructural de la familia WRKY

encontrando un total de 86 secuencias con la cual se generó una base de datos para poder hacer comparaciones con los factores de transcripción WRKY del trigo (Tripathi *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2014). Algunos miembros de esta familia se han caracterizado durante el estrés por inundación (Sección 1.7)

1.5.4 Familia DNAJ

La familia DNAJ son chaperonas que pertenecen a la familia de proteínas de choque térmico; sin embargo, a pesar de ser una familia de 104 miembros en el arroz (Sakar *et al.*, 2013) y 120 en *Arabidopsis*, sólo las proteínas Hsp70 y DNAJ son las más estudiadas por su abundancia en las plantas, y están involucradas en el desarrollo y en respuesta al estrés (Rajan y D'Silva, 2009). Se caracterizan por contener un tripéptido HPD conservado y se pueden clasificar en tres tipos; el primero contiene un dominio J en el extremo N-terminal seguido de una región G/F, un motivo ZF rico en cisteína y pueden contener una región C-terminal involucrado en la dimerización; los DNAJ tipo II carecen del dominio ZF que es un tripéptido conservado de Asp-Ile/ Val-Phe; los DNAJ tipo III son el grupo más diverso ya que contienen un tripéptido conservado que puede estar presente en cualquier posición de la proteína. También existen los DNAJ del tipo IV que contienen un dominio J, sin embargo, carecen del tripéptido (Rajan y D'Silva, 2009; Sakar *et al.*, 2013).

1.5.5 Familia MYB

Los FT de la familia MYB se caracterizan por la presencia de un dominio conservado de unión al DNA denominado MYB que poseen hasta cuatro secuencias repetidas imperfectas (denominadas R) cerca de la región del N-terminal (de alrededor de 50 aminoácidos). Estas secuencias repetidas pueden formar tres alfa hélices cada una (Jia *et al.*, 2004; Ito, 2005; Du *et al.*, 2009). La familia MYB se clasifica respecto al número de repeticiones y se nombran de acuerdo al prototipo c-MYB como R1, R2 y R3; sin embargo, la mayoría de las proteínas sólo contienen las repeticiones R2 y R3 que comúnmente se nombran como R2R3-MYB (Jia *et al.*, 2004; Ito, 2005).

Los R2R3-MYB son importantes en la regulación del metabolismo secundario; Borevitz *et al.* (2000) identificaron en una planta de *Arabidopsis* transformada mediante *Agrobacterium*

con un T-DNA con la secuencia potenciadora 35S adyacente al factor de transcripción MYB, que presentaba una coloración púrpura en sus órganos durante todo el desarrollo, esta mutación resultó en la activación de genes de la biosíntesis de fenilpropanoides, flavonoides, acumulación de lignina y algunas antocianinas que fueron las responsables del color púrpura. También se ha identificado que la familia MYB está involucrada en el control del ciclo celular (Ito *et al.*, 2001; Araki *et al.*, 2004) y en la resistencia a enfermedades.

1.5.6 Familia bZIP

La familia basic leucine zipper (bZIP) contiene un dominio de aproximadamente 60-80 aminoácidos; posee dos regiones: una básica altamente conservada responsable de la localización nuclear y unión al DNA, y un dominio leucin zipper menos conservado (Wei *et al.*, 2012; Liu y Chu, 2015).

Uno de los miembros más estudiados de la familia bZIP es bZIP11 de *Arabidopsis* que se reprime en respuesta a la sacarosa. Se identificó que la región del 5' de bZIP11 posee cuatro marcos de lectura abiertos río arriba (uORF) del codón de inicio principal; sin embargo, sólo el segundo uORF codifica un péptido señal de 28 residuos que permite el control reprimible por sacarosa (Rahmani *et al.*, 2009; Juntawong *et al.*, 2013). Los bZIP además están involucrados en la respuesta a patógenos (Wei *et al.*, 2012). Debido a que bZIP11 se reprime en respuesta a la sacarosa, se puede hipotetizar que es un punto clave durante el estrés por inundación. Liu y Chu (2015) determinaron que en *Brachypodium* la familia bZIP está constituida por 96 genes a partir de las comparaciones evolutivas con el arroz.

1.6 Determinación de la función génica.

Como se puede observar, el papel de los FTs durante el estrés por hipoxia se conoce de forma desigual entre las diferentes familias, mientras que los ERFs-VII han atraído la atención de la investigación, para el resto de las familias de FTs aún existe muy poca información o se desconoce totalmente su función. De tal forma, es necesario planear estrategias que permitan disectar la función de estos FTs. A continuación, se revisan las diferentes posibilidades que existen para realizar este tipo de investigaciones.

En la naturaleza, las plantas se encuentran expuestas a diversas condiciones ambientales las cuales causan modificaciones en su maquinaria génica de tal forma que existen dos tipos de mutaciones de acuerdo al efecto que pueden causar en las plantas. Las primeras se les conoce como silenciosas, es decir, que no provocan ningún efecto visible; y las segundas, sí causan un efecto detectable como una mayor susceptibilidad a patógenos, diferencias en el tamaño (biomasa), retraso en la floración o algunos casos más severos mutantes letales (no hay germinación). Cuando las plantas presentan un fenotipo anormal pueden ser caracterizadas por medio de la ganancia o pérdida de función e identificar a los genes y las vías de señalización en las que se encuentran involucrados.

Existen varios tipos de mutagénesis, química, biológica y física que permiten obtener material biológico que permita discernir la función de los FTs activos durante el estrés por inundación, en este trabajo se utilizarán dos, la mutagénesis biológica por inserción de T-DNA y la química, utilizando etil metanosulfonato (EMS).

1.6.1 Mutagénesis por inserción de T-DNA

La mutagénesis biológica o por inserción de T-DNA es una herramienta genética que permite [la observación de fenotipos causados por la pérdida de función de los genes](#) (Alonso y Stepanova, 2003). Se basa en la inserción [al azar](#) de [DNA externo, generalmente de *Agrobacterium*](#) en el gen de interés (GOI) que puede inhibir su expresión y facilitar su posterior identificación por pérdida de función (Krysan *et al.*, 1999). La transformación mediada por *Agrobacterium* se ha utilizado ampliamente para obtener mutantes de inserción de T-DNA en sistemas de plantas modelo como *Arabidopsis* y arroz, y que han facilitado muchos estudios (Krysan *et al.*, 1999; Jeon *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2003). [Actualmente, existe una colección de mutantes de *Arabidopsis* denominada SALK la cual se puede tener acceso a través del sitio TAIR](#) (TAIR, [2017](#)). A este tipo de mutagénesis también se le llama *knock-out* (KO) o mutaciones nulas y son importantes debido a que determinan de manera directa la función de un gen.

1.6.2 Mutagénesis con etil metanosulfonato (EMS)

El EMS es un compuesto químico utilizado como agente mutagénico pues induce la **modificación al azar** por cambio de bases ya que promueve alquilación de las guaninas en la secuencia de DNA formando O-6-etilguanina que se puede unir a timina en lugar de la citosina (Kim *et al.*, 2006). Las mutaciones químicas, además de causar pérdida o ganancia de funciones, son útiles para estudiar el papel de los aminoácidos en las funciones de las proteínas. Comúnmente las semillas mutagenizadas tratadas con químicos son llamadas generación M1 (Lightner y Caspar, 1998; Uchida *et al.*, 2011).

Las tecnologías para manipular el DNA mutagenizado han permitido muchos avances, por ejemplo, con el uso de enzimas y la PCR se ha podido aislar genes y fragmentos de estos mediante el sistema TILLING (Till *et al.*, 2007; Serrat *et al.*, 2014), además también se pueden introducir mutaciones en células y organismos modelo de forma dirigida con el sistema CRISPR-Cas9 (Doudna y Charpentier, 2014; Peng *et al.*, 2016).

1.6.3 Silenciamiento génico

El silenciamiento génico ocurre de manera natural en las plantas en respuesta a la infección por virus. El silenciamiento génico puede clasificarse en dos mecanismos: el silenciamiento génico transcripcional (TGS) en el que ocurre la modificación de las histonas y el silenciamiento post transcripcional (PTGS) donde se da la degradación de un determinado mRNA y por lo tanto no ocurre la síntesis de la proteína correspondiente, este mecanismo se descubrió en petunias transgénicas cuando se trataba de mejorar el color de las flores. Estos dos mecanismos se encuentran involucrados en la regulación a estreses bióticos y abióticos en las plantas (Ricaño-Rodriguez *et al.*, 2014). El silenciamiento génico también puede clasificarse de acuerdo al tipo de RNA pequeño: microRNAs, RNA pequeño de interferencia (siRNAs) o RNAs pequeños de virus (viRNAs; Pandey *et al.*, 2015).

El silenciamiento se puede usar para crear mutantes tipo knock-down, en especial el silenciamiento PTGS, donde la expresión de un transcrito se disminuye para observar un fenotipo. Su utilidad es especialmente importante cuando la mutagénesis por T-DNA o EMS crea mutantes que son estériles, de baja germinación, o letales. Esto es posible gracias a que el mecanismo del silenciamiento génico inicia con la presencia de un RNA de doble cadena

(double-strain RNA o dsRNA) que activa una maquinaria conocida como DICER que los reconoce y los transforma en RNAs pequeños (siRNAs) de 21-27 pb de longitud que son conocidos como RNA guía. Posteriormente el siRNA se une a un complejo enzimático llamado RISC (que posee actividad helicasa) el cual separa las dos hebras del siRNA y se queda con la hebra antisentido o guía; RISC está activo y tiene como blanco los mRNA homologos a dicho siRNA; el silenciamiento génico puede generarse a partir de vectores virales (Virus induced gene silencing) o plasmídico (Adjounian *et al.*, 2008). El silenciamiento también se puede hacer condicional (ej. etapas de desarrollo) o inducible (ej. inducción química o por calor) con el uso de promotores diferenciales (Chen *et al.*, 2003; Masclaux *et al.*, 2004; Ghag *et al.*, 2014; Kant *et al.*, 2015).

Para ello hay que a) diseñar una secuencia con homología, b) transformar a las plantas con una construcción tipo hairpin, y c) verificar por métodos de qPCR la disminución de la expresión (Ghag *et al.*, 2014; Jin y Guo, 2015).

1.6.4 TILLING

El método TILLING (Targeting Induced Local Lesion in Genome) tiene como fundamento la mutagénesis química tradicional pero acoplada a selección específica de alelos mutados por medio de PCR y digestión de ADN de doble cadena con defectos en la complementariedad de bases (McCallum *et al.*, 2000; Till *et al.*, 2003; Dalmais *et al.*, 2013). Su principal aplicación es para obtener poblaciones de mutantes por sustituciones y codones de paro prematuros.

Un mutágeno que se usa frecuentemente la azida de sodio pues induce principalmente sustituciones G/A Y C/T similares a los producidos por EMS, y se analiza la generación M2 de individuos para preparar muestras de DNA y realizar la separación de los mutantes. Las muestras de DNA se agrupan y se someten a la PCR específica con oligonucleótidos conocidos. Posteriormente, los productos de la amplificación se incuban con una endonucleasa para distinguir entre el tipo salvaje y el mutante.

Al detectarse una mutación en una agrupación, las muestras de DNA se separan para identificar la planta que posee la mutación. Una desventaja del TILLING es que requiere de

invernaderos grandes e incluso automatizados, así como de equipos de electroforesis y captura de imágenes de alta capacidad.

Actualmente existen proyectos para hacer disponibles poblaciones TILLING de plantas de importancia económica como el trigo, la cebada, sorgo, el arroz y *Medicago* (Perry *et al.*, 2003; Till *et al.*, 2007; Serrat *et al.*, 2014). Dalmais *et al.* (2013) ya reportaron una colección de mutantes inducidos por azida de sodio para la línea Bd21-3.

1.6.5 El sistema de edición del genoma CRISPR-Cas9

Es una herramienta utilizada en la ingeniería genómica para la edición del DNA, se basa en un sistema **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat** (CRISPR-Cas) que proporciona a las bacterias inmunidad a los virus y plásmidos (Bolotin *et al.*, 2005; Doudna y Charpentier, 2014; Bortesi & Fischer, 2015). La proteína Cas9 es una endonucleasa que utiliza una secuencia guía de RNA **complementaria a una** secuencia diana en el DNA, lo que **permite** que Cas9 introduzca una ruptura en el sitio **específico** del DNA que, al ser reparado por la maquinaria de verificación de integridad del organismo, **se generan diversos efectos tal como** inserciones, deleciones o cambios de base (Doudna y Charpentier, 2014; Bortesi y Fischer, 2015; Peng *et al.*, 2016). EL RNA dúplex o RNA guía posee **dos regiones características**: una secuencia en el lado 5' que determina el sitio objetivo **en el DNA** por **complementariedad o apareamiento** de bases y una **secuencia que genera una estructura secundaria en el extremo 3'** que le **permite interactuar con la proteína**. Existen tres tipos de sistemas CRISPR-Cas: **los tipos I y III que utilizan un gran complejo de proteínas Cas, y aunque** el tipo II sólo requiere una sola proteína para el reconocimiento y escisión del DNA guiado por RNA **ha sido el mas estudiado dadas las potenciales aplicaciones biotecnológicas que posee** (Doudna y Charpentier, 2014; Peng *et al.*, 2016).

CRISPR-Cas9 es una nueva tecnología para la manipulación del DNA que permite el análisis de la función de los genes, el estudio de los reordenamientos genómicos y se espera que pueda ser utilizado en la identificación de las mutaciones responsables de trastornos hereditarios (Doudna y Charpentier, 2014).

En años recientes, se han desarrollado plataformas de edición por Cas9 para plantas modelo y de cultivo. Al momento, en *Brachypodium* sólo existe un reporte de investigación en

el que se usó el sistema Cas9 de caña de azúcar para caracterizar la función del gen *BdSCRM2* que se encuentra implicado en la diferenciación de los estomas en *Brachypodium* (Raissig *et al.*, 2016).

1.7 Caracterización de genes relevantes en la respuesta a la inundación por mutagenesis.

La mutagénesis ha sido una alternativa de investigación para asignar funciones a genes o descubrir mecanismos de regulación. Los genes que más se han estudiado por mutagénesis son los ERFs-VII. Por ejemplo, Papdi *et al.* (2015) por medio de la pérdida de función por T-DNAs identificaron que los ERFs-VII *RAP2.2*, *RAP2.3* o *RAP2.12* son necesarios en la respuesta al estrés abiótico. Con los mutantes, realizaron un ensayo de tolerancia a la inundación, en la Figura 5 se puede observar que las plantas KO fueron más sensibles al tratamiento de estrés, ya que mientras el 80 % de las plantas silvestres sobrevivieron a 44 h de inundación, sólo el 50 % de las mutantes individuales y 36 % de la mutante doble se mantuvieron viables.

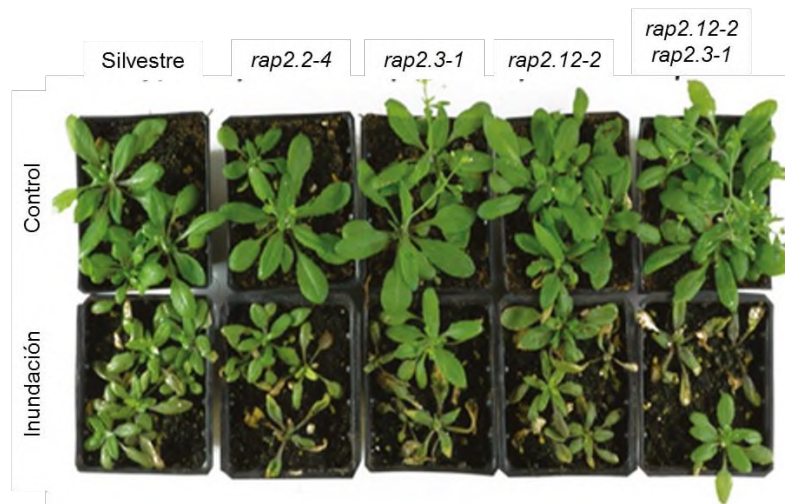


Figura 5. Líneas mutantes de T-DNA de los FT ERFs-VII vuelve sensible a las plantas a la inundación de 44 h (Papdi *et al.*, 2015).

Como control se plantan en condiciones de aire bajo oscuridad. Plantas después de 7 días de recuperación.

Otro caso en el que por medio de mutantes de T-DNA se descubrieron procesos de relevancia para la comprensión de la tolerancia vegetal a la inundación fue la investigación

reportada por Hsu *et al.* (2013) en la que se identificó que WRKY22, un FT inducido durante la inundación, confiere resistencia contra patógenos. WRKY22 se expresó fuertemente durante la primera hora de inundación en conjunto con un grupo de genes marcadores de la inmunidad innata en *Arabidopsis*. Las líneas mutantes de inserción de T-DNA *wrky22-1* y *wrky22-2* que se sometieron a un tratamiento de inundación seguido de la inoculación con el patógeno *Pseudomonas syringae* y observaron que *wrky22-1* y *wrky22-2* desarrollaron más síntomas y poblaciones bacterianas comparado con la planta silvestre Col-0 (Figura 6).



Figura 6. Líneas mutantes con inserción de T-DNA en el FTs WRKY22 la interrupción de la secuencia promotora, ocasiona una respuesta disminuida al patógeno *Pseudomonas syringae* (Hsu *et al.*, 2013).

Un ejemplo de caracterización de mutantes sobreexpresantes es la realizada por Peña-Castro *et al.* (2011) en la que utilizaron plantas que sobreexpresan al gen SUB1A en *Arabidopsis*, originalmente este gen confiere en el arroz tolerancia a la inmersión (Fukao *et al.*, 2006), sin embargo, cuando SUB1A se sobreexpresa en *Arabidopsis*, paradójicamente reduce la supervivencia al estrés por inmersión y a la oscuridad prolongada. No obstante, se pudo descubrir que SUB1A reprime la floración lo que conlleva a la acumulación de almidón (Figura 7).

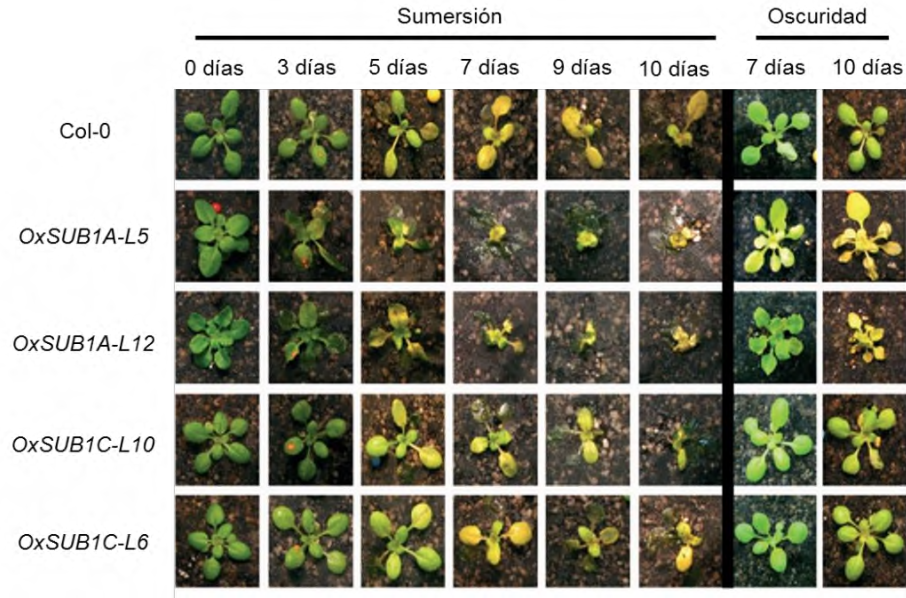


Figura 7. Líneas mutantes de sobreexpresión del FT SUB1A (ERFVII) de arroz *Arabidopsis* tiene consecuencias adversas en el desarrollo de la planta bajo estrés por inundación (Peña-Castro *et al.*, 2011). Al quinto día de estrés pueden ser visible el amarillamiento de las hojas y la menor viabilidad de las plantas comparadas con Col-0.

Con el trabajo realizado por Giuntoli *et al.* (2014) en donde identificaron que *HRA1* es el regulador de *RAP2.12*, también evaluaron de qué manera la alteración de los niveles de expresión de *HRA1* afectan el rendimiento de la planta durante la hipoxia provocada por la inundación. Para ello compararon plantas transgénicas 35:*HRA1*-FLAG (OE-*HRA1* #1 de ganancia de función) y mutantes homocigotas de inserción de T-DNA (*hra1-1*) con las del tipo silvestre. De tal forma, identificaron que tanto la sobreexpresión así como la falta de *HRA1* disminuye la tolerancia de las plantas a la inundación comparado con la planta silvestre hipotetizando que se trata del componente de un bucle autoregulatorio (Figura 8).

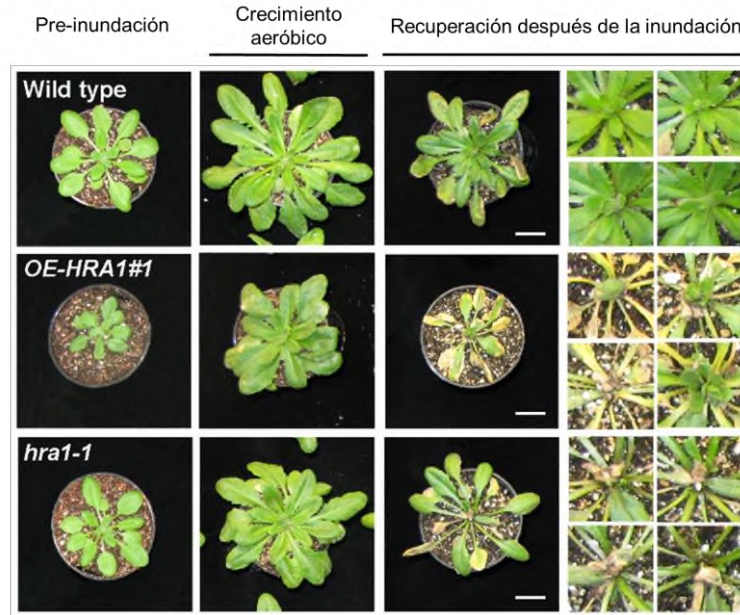


Figura 8. Líneas mutantes con modificaciones en la expresión de HRA1 en el crecimiento de las plantas transgénicas comparadas con el tipo silvestre (Giuntoli *et al.*, 2014). Plantas después de la recuperación de la inmersión por 72 h.

Como se mencionó anteriormente la oxidación de la cisteína por la ruta del N-terminal controla la degradación de las proteínas, en el trabajo desarrollado por Weits *et al.* (2013) identificaron que las enzimas plant cysteine oxidase (PCO) son las que oxidan la penúltima cisteína de los ERFs-VII, y para investigar el efecto de PCO utilizaron plantas que sobreexpresan a PCO (35S:PCO1 y 35S:POC2) y las sometieron a inundación en oscuridad (72 h). Se observó que las plantas que sobreexpresan a PCO mostraron menos tolerancia a la inundación debido a la incapacidad de activar la respuesta molecular a la hipoxia comparada con el tipo salvaje, o con mutantes de la ruta N-terminal como prt6, defectuosa en la ubiquitin-ligase PRT6 (Figura 9).

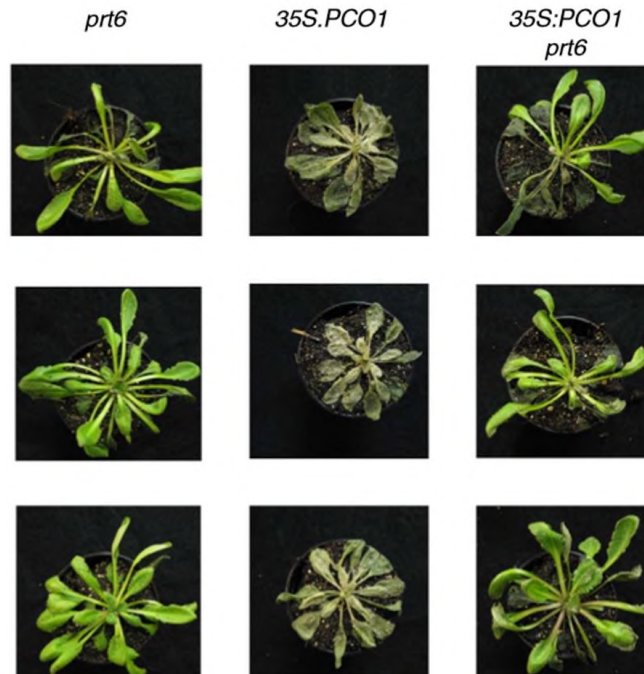


Figura 9. Líneas mutantes sobreexpresantes para PCO (Weits *et al.*, 2013)

La imagen corresponde a plantas después de la recuperación de la inmersión por 72 h.

Se conoce que la tolerancia de las plantas a la inundación y a la baja disponibilidad de oxígeno está regulada por los miembros de la familia ERF-VII y en especial RAP2.12 (van Dongen y Licausi, 2015). Licausi *et al.* (2011) identificaron que existe una secuencia conservada en la región del N-terminal de RAP2.12, ellos evaluaron a plantas que sobreexpresan a RAP2.12 con distintas construcciones: manera constitutiva (35S:RAP2.12), con una etiqueta de hemaglutina (HA) en su extremo N-terminal (35S:HA-RAP2.12) y una versión de RAP2.12 mutagenizada a la que se le eliminaron los primeros 13 residuos de aminoácidos del N-terminal; observaron que la sobreexpresión constitutiva no afectó el crecimiento en condiciones aeróbicas, pero sí aumentó la tolerancia a la inmersión comparada con el tipo silvestre debido a que hay una expresión más fuerte que le ayuda a responder durante la inundación. Sin embargo, identificaron que cuando la sobreexpresión de RAP2.12 bloqueado en su extremo N-terminal o con los 13 primeros aminoácidos removidos, sí afectó el crecimiento de las plantas y la tolerancia durante el estrés (Figura 10).

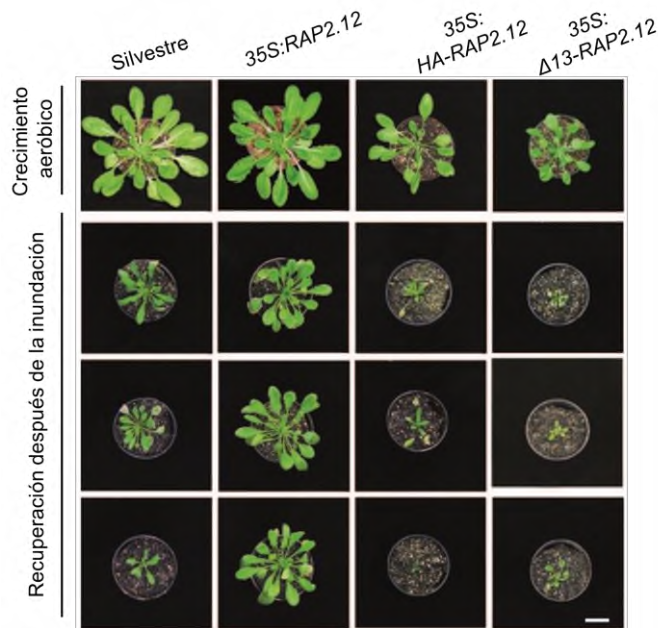


Figura 10. Líneas mutantes del ERF-VII RAP2.12 que controla la tolerancia a la inundación en *Arabidopsis* (Licausi *et al.*, 2011)

En *Arabidopsis* las Acyl-CoA binding protein (ACBP) se encuentran ancladas en la membrana y están implicadas en la **percepción** de oxígeno, pues atrapan a las proteínas ERF-VII bajo condiciones normales de oxígeno. Xie *et al.* (2015) investigaron el papel de las proteínas ACBP en la respuesta a la hipoxia, al comparar plantas del tipo silvestre, líneas transgénicas sobreexpresantes (ACBP3-OE), mutantes de T-DNA (*acbp3*) y de silenciamiento (ACBP3-RNAi) para determinar su tolerancia al estrés por hipoxia. Observaron que no había diferencias en cuanto al crecimiento y desarrollo entre las líneas transgénicas con la silvestre en condiciones normales (Figura 11). Sin embargo, cuando las líneas ACBP-OE-1 y ACBP-OE-2 se sometieron a 2 días bajo inundación en condiciones de oscuridad (DS) o 5 días de inundación con luz (LS), mostraron una mayor sensibilidad a la inundación comparada con el tipo silvestre, mientras que las líneas *acbp3* y las silenciadas, sobrevivieron mejor al estrés que las silvestres, especialmente en condiciones de oscuridad (Figura 11). Los autores hipotetizaron que la liberación de los ERFs-VII del control por ACBP puede mejorar la disponibilidad del factor de transcripción para censar oxígeno.

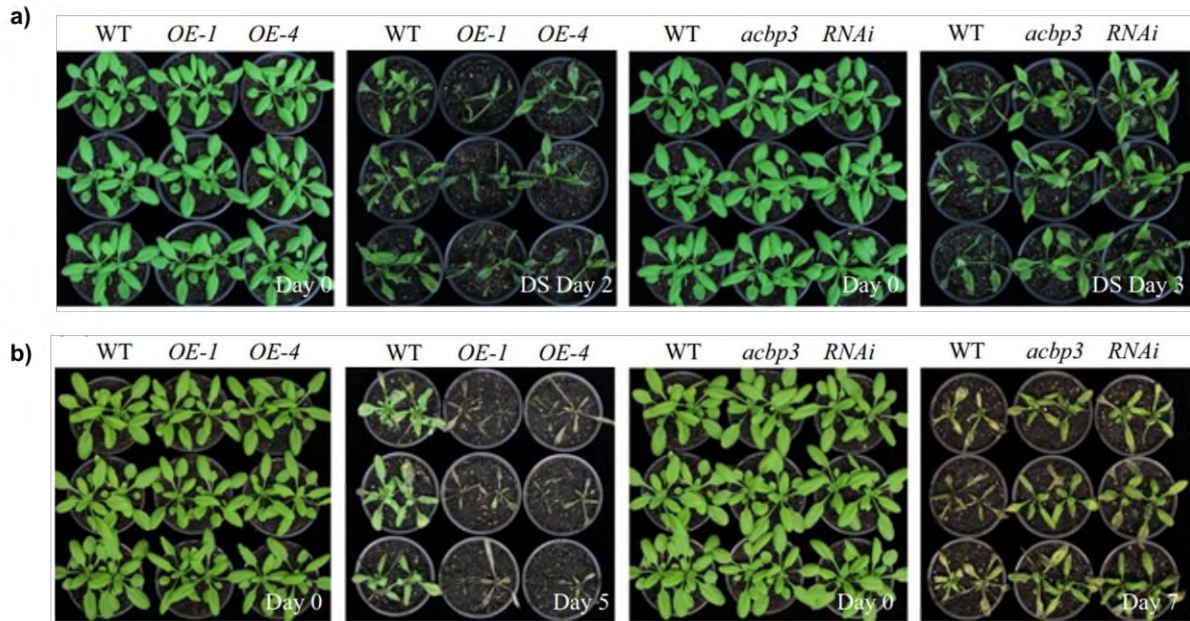


Figura 11. Fenotipo de las plantas silvestre y de las líneas transgénicas sobreexpresante y de T-DNA antes y después del estrés por inmersión.

a) Indican las plantas que fueron sometidas bajo inundación en condiciones de oscuridad (DS) y b) plantas bajo inundación en condiciones de luz (LS).

1.8 Plantas modelo

Las plantas modelo son organismos que se han seleccionado para fines de investigación porque poseen un tamaño pequeño, existen protocolos de transformación, poseen ciclos de vida cortos, abundante progenie, bancos de mutantes, genomas secuenciados y se pueden relacionar genética (sintenia) y fisiológicamente con plantas de importancia agrícola (Chang *et al.*, 2016). En la investigación vegetal existen varias plantas modelo adecuadas para disectar rutas de estrés.

1.8.1 *Brachypodium distachyon*

Brachypodium distachyon es una planta anual de clima templado que pertenece al grupo de las monocotiledóneas, es nativa de Oriente Medio y del sur de Europa (Hands y Drea, 2012) y fue propuesta como planta modelo en el 2001 para el estudio del trigo, cebada, pastos de forraje, e incluso arroz y maíz (Draper *et al.*, 2001).

Brachypodium cuenta con una colección de ecotipos, posee un genoma pequeño de 300 Mpb, 5 cromosomas, y llega a medir aproximadamente 20 cm de altura en la madurez (Draper

et al., 2001). Tiene una densidad de siembra de 1000 plantas/ m² y un tiempo de generación de 8-12 semanas además de que sus requerimientos de crecimiento son simples (Vogel y Bragg, 2009).

Recientemente, el Departamento de Energía de Estados Unidos realizó un proyecto financiado por el Programa de Genómica Alimentaria que cuenta con una colección de líneas de T-DNA de *Brachypodium*; estas líneas mutantes se generaron a partir de los vectores p0L001, pJJH, pJJ2LB, pJJB y pJJB2LB con el fin de proporcionar herramientas para conocer la función de los genes interrumpidos, así como características para los cultivos de interés económico (Bragg *et al.*, 2012).

En cuanto a investigación en inundación, *Brachypodium* se ha utilizado incipientemente para caracterizar la formación de aerénquima en la raíz durante la inundación (Shiono y Yamada, 2014) y para estudiar el transcriptoma de ecotipos con tolerancia diferencial a la inundación (Rivera-Contreras *et al.*, 2016).

1.8.2 *Arabidopsis thaliana*

Es una planta modelo muy utilizada en biología molecular para el estudio de muchos procesos, pertenece a la familia *Brassicaceae* y es nativa de Europa, Asia y África. *Arabidopsis* es una planta anual con un tiempo de generación de 6-8 semanas, posee un genoma de 165 Mpb y cuenta con 5 cromosomas, llega a medir de 15-20 cm de altura (Vogel y Bragg, 2009). Las plantas se desarrollan como rosetas que varían en el tamaño dependiendo las condiciones de crecimiento y además posee varios ecotipos entre los cuales Columbia es el más aceptado para los estudios genéticos y moleculares (Meinke *et al.*, 1998; Page y Grossniklaus, 2002).

Arabidopsis se destaca por su fácil manipulación en el laboratorio para estudios de mutagénesis; *Arabidopsis* puede ser modificada por químicos como el EMS (Jander *et al.*, 2003; Weigel y Glazebrook, 2006) y mediante *Agrobacterium tumefaciens* lo que hace posible introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable (Zhang *et al.*, 2006).

En la inundación, *Arabidopsis* es probablemente la planta que más se ha estudiado. La mayor parte de la información de expresión en condiciones hipóxicas y de inundación se ha obtenido de ella, así como la mayor parte de los mutantes caracterizados (Peña-Castro, 2014; Voesenek y Bailey-Serres, 2015).

En este trabajo, *Arabidopsis* se utilizará como una alternativa de búsqueda de mutantes que reviertan el fenotipo característico (hojas redondeadas, esterilidad y baja tolerancia al estrés por inundación y oscuridad) que ocasiona la sobreexpresión del gen *SUB1A* (Peña-Castro *et al.*, 2011).

1.8.3 *Lotus japonicus*

Lotus japonicus pertenece al grupo de las leguminosas y ha sido ampliamente utilizada como planta modelo, posee un ciclo de vida corto de 2-3 meses y un genoma de 472 Mpb. Se ha identificado a partir análisis comparativos el aumento de los dominios y familias de *L. japonicus* (Ito *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2008), cuenta con diversos procedimientos de transformación mediado por *Agrobacterium* (Lombardi *et al.*, 2003; Imaizumi *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2015) y también se han generado un gran número de mutantes con alteraciones en los fenotipos de *L. japonicus* las cuales ya se han caracterizado de manera molecular (Sato y Tabata, 2006).

Actualmente cuenta con un Atlas de los perfiles de expresión de los órganos de la mayoría de las *L. Japonicus* (Verdier *et al.*, 2013) y además de una colección TILLING de una población mutada por EMS (Perry *et al.*, 2003).

No obstante, existen pocos estudios de *Lotus* e inundación y sólo se ha estudiado por medio de silenciamiento por RNAi la acumulación de alanina durante el estrés (Rocha *et al.*, 2010). Lo anterior a pesar de que es una planta que puede tolerar hasta 28 días de inundación y poseer, al contrario de la mayoría de las plantas terrestres, un hábito de escape a la inundación.

1.8.4 *Medicago truncatula*

Medicago truncatula es una planta anual utilizada como forraje y como planta modelo para el estudio de la simbiosis debido a que forma asociaciones simbióticas con una amplia gama de hongos micorrizos; cuenta con un genoma de 550 Mpb (Ané *et al.*, 2008), al igual que *L. japonicus* cuenta con un Atlas de los perfiles de expresión génica a partir de órganos (MtGEA, 2017; He *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009).

Se han desarrollado poblaciones TILLING con EMS para la generación de mutantes que afecten la simbiosis, así como mutantes de T-DNA (Penmetsa y Cook, 2000; Scholte *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2005; Cosson *et al.*, 2006) y protocolos establecidos para la transformación mediada por *Agrobacterium* (Crane *et al.*, 2006). Sin embargo, no se ha utilizado al momento como modelo de estudio en inundación.

1.8.5 *Oryza sativa*

Es uno de los cultivos más importantes en el mundo y uno de los principales en la economía de la India, a partir de la culminación de la secuenciación de todo el genoma se han podido realizar estudios para la búsqueda de características agronómicas útiles (Agarwal *et al.*, 2016); pertenece a la familia de las gramíneas, posee un genoma de 430 Mpb (Eckardt, 2000; Coudert *et al.*, 2010). *Oryza sativa* es una planta fácil de transformar y se han generado poblaciones TILLING de mutantes con EMS (Till *et al.*, 2007; Serrat *et al.*, 2014) y mutantes insercionales de T-DNA (Jeong *et al.*, 2000).

El arroz tiene la peculiaridad de ser simultáneamente planta modelo y de cultivo y por ello, ha sido utilizada en el estudio de diversas condiciones de estrés entre ellas la inundación de las que se han obtenido variedades tolerantes no transgénicas desarrolladas por el IRRI por medio del descubrimiento con marcadores de amplificación, conocidas como variedades *SUB1*, ya que tienen una productividad superior en condiciones de inundación de hasta 3.8 ton por ha (Septiningsih *et al.*, 2008; Bailey-Serres y Voeselek, 2010) y constituyen el caso comercial más exitoso de la biotecnología vegetal para el aumento de la tolerancia al estrés por inundación.

2. Justificación

La inundación causa un efecto negativo en las plantas y se ve reflejado en la disminución de la productividad vegetal con la consecuencia de grandes pérdidas económicas. No obstante, en México existe una mala regulación de los riesgos y la planeación causado por fenómenos naturales en donde los más afectados, son aquellas poblaciones que utilizan la agricultura de temporal y de auto consumo.

El estudio de los mecanismos de respuesta y tolerancia de las plantas cuando se encuentran en condiciones de inundación puede conducir al desarrollo de variedades vegetales con características de tolerancia mejorada al estrés. De esta forma, se pueden liberar plantas al mercado que permitan una mayor capacidad de amortiguamiento de pérdidas y de planeación económica.

Al estar el estrés por inundación mediado por factores de transcripción (FTs) que se inducen por deficiencia de oxígeno y que pueden ser moduladores de la respuesta en condiciones de hipoxia, es necesario caracterizar las funciones de los FTs que se inducen en el estrés por inundación. En este trabajo, se pretende caracterizar mutantes que presentan inserciones de T-DNA de *Brachypodium* en genes que codifican factores de transcripción activos durante el estrés por inundación y de esta forma conocer qué características de la respuesta controlan. Adicionalmente, también se empleará una estrategia mutagénica química para aislar mutantes que alteren la expresión del gen de inundación SUB1A-1.

3. Hipótesis

Los factores de transcripción regulados positivamente durante el estrés [por inundación en *Brachypodium*](#) controlan el desarrollo y la respuesta al estrés.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Aislar mutantes de T-DNA en genes que codifican factores de transcripción de *Brachypodium distachyon* que se encuentran activos durante el estrés por inundación.

4.1.1. Objetivos específicos

1. [Seleccionar a partir de la base de RNA-Seq GEO GSE74222 genes que codifiquen factores transcripcionales.](#)
2. Aislar mutantes homocigotos [con inserción de](#) T-DNA en los genes que codifican factores de transcripción.
3. Verificar por RT-PCR el *KO* (knock out) de los transcritos.
4. Analizar el fenotipo de las líneas de T-DNA en inundación y en condiciones normales.
5. Emplear la mutagénesis con EMS [en la mutante sobreexpresante de *Arabidopsis thaliana* 35S: -FLAG-SUB1A-1](#) para aislar mutantes que modifiquen la acción del transgén.

5. Estrategia Experimental

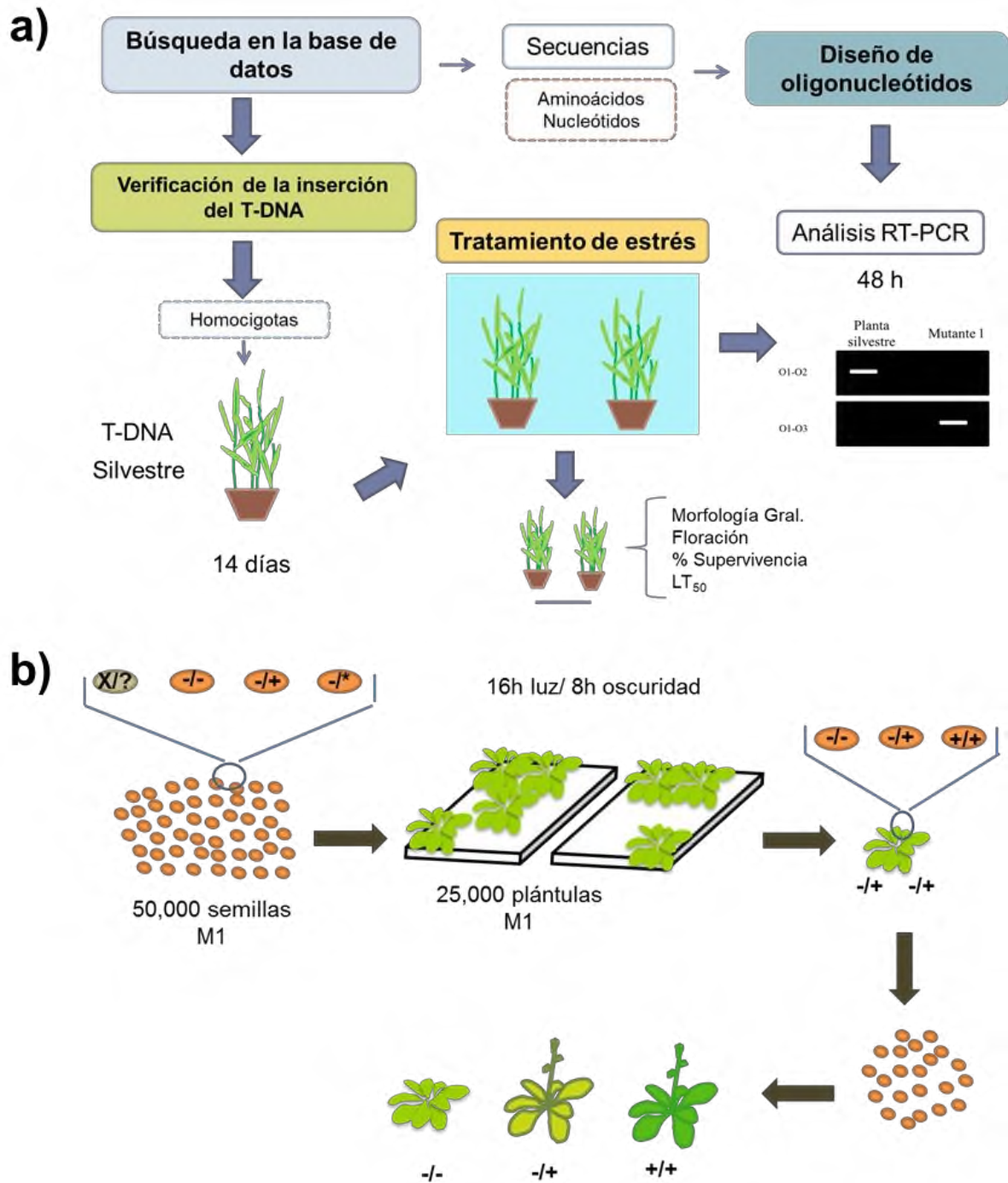


Figura 12. Estrategia experimental del presente trabajo.

a) Escrutinio de líneas mutantes por T-DNA, b) mutagénesis química por EMS.

6. Materiales y métodos

6.1 Selección de factores transcripcionales y de mutantes de T-DNA JGI

A partir de la base de datos de (RNA-Seq) *Brachypodium distachyon* Bd21 inundado por 48 horas, depositada en el Gene Expression Omnibus con el número de acceso GSE74222 (Rivera-Contreras *et al.*, 2016), se seleccionaron por agrupamiento automático GO (sección 0006355) a los FTs que se encuentran activos durante la inundación. También se hizo un filtrado manual usando la descripción genómica “transcription factor”. Posteriormente, se tomó el criterio de expresión $\text{LogFC} \geq 1.5$ y se correlacionaron los datos con las posiciones de las inserciones reportadas en la base de mutantes T-DNA JGI en el fondo genético del ecotipo Bd21-3, con preferencia a las que estuvieran dentro del marco abierto de lectura.

Una vez determinados los candidatos, se solicitaron por sus códigos de línea al Joint Genome Institute del Departamento de Energía en Estados Unidos (JGI-DOE, 2017; Bragg *et al.*, 2012). Se pidieron dos bloques, el primer bloque fue de los candidatos más fuertes de FT, y el segundo bloque incluyó proteínas que son FTs hipotéticos, no obstante, sólo se recibió el primer bloque.

6.2 Construcciones de T-DNA

Las líneas de T-DNA se generaron por el JGI-DOE con los vectores detallados en la Figura 13 (Bragg *et al.*, 2012). La construcción genética pOL001 contiene al gen de selección higromicina fosfotransferasa (HPTII) bajo el control del promotor CaMV 35S y un gen indicador GUS bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz. La construcción pJJB contiene al gen de selección fosfinotricina acetil transferasa (BAR) bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz y pJJ contiene al gen de selección (HPTII). pJJB2L2 y pJJ2LB además cuentan con GUS bajo el control de CaMV35S.

pJJ2LBP y pJJ2LBP2 contienen secuencias de trampas génicas. Estos vectores contienen al gen GUS adyacente al borde izquierdo y al gen GFP en el borde derecho. pJJ2LBA está diseñado para aumentar la transcripción de genes cercanos (Vogel y Hil, 2009; Bragg *et al.*, 2012).

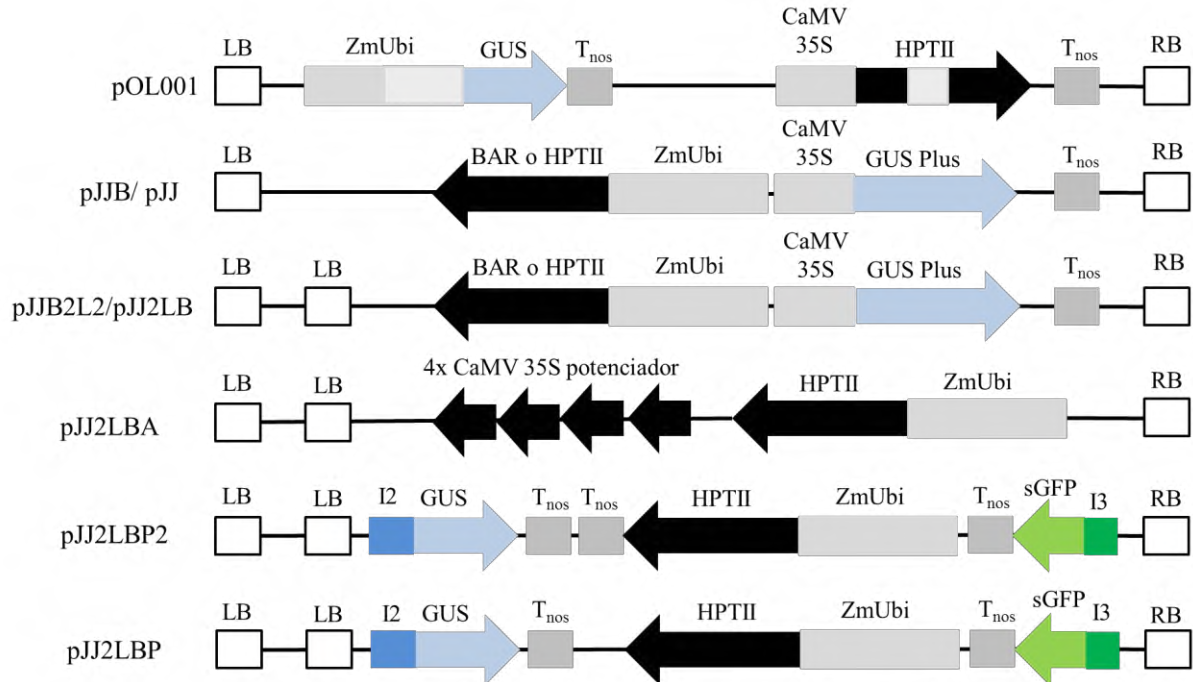


Figura 13. Vectores utilizados por JGI-DOE para la generación de las líneas de T-DNA de *Brachypodium* escrutinadas en el presente trabajo.

pOL001, pJJB y pJJB2L2 son del tipo insercional simple, pJJ2LBA, pJJ2LBP2 y pJJ2LBP son trampa génica. ZmUbi: promotor de Ubiquitina con intrón; CaMV 35S: promotor 35S procedente del virus del mosaico de la coliflor; T_{nos}: secuencia de terminación; BAR o HPTII: gen de selección fosfinotricina acetil transferasa o higromicina fosfotransferasa respectivamente; GUS/GUS Plus: genes indicadores β-glucuronidasas; I2/I3: intrón de tubulina del arroz que contiene donante de empalme y sitios aceptores; sGFP: gen reportero de proteínas; 4x CaMV 35S: secuencias potenciadoras transcripcionales (Bragg *et al.*, 2012).

6.3 Análisis filogenético

La base de datos que se usó para recopilar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los factores de transcripción utilizados fue Phytozome 12 versión genómica de Bd21 V3.1 (Phytozome, 2017). La base NCBI (NCBI, 2017) se utilizó para buscar homólogos en el caso de la familia DNAJ donde no había información filogenética publicada previamente. Todos los análisis filogenéticos se realizaron con la herramienta de alineamiento y construcción de árboles con el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016); las secuencias de las familias ERFs, WRKY y bZIP se alinearon con CLUSTALW.

En el genoma de *Brachypodium* se reportaron como ERFs a 121 por Chen *et al.* (2016) posteriormente se generó un árbol filogenético *Neighbour-Joining* (con 1000 *bootstrap*) por el modelo de *No. of differences* y *complete deletion*. En el caso de la familia WRKY, se utilizaron

76 secuencias reportadas por Wen *et al.* (2014) y se generó un árbol filogenético por el método de *Neighbour-joining* (*Bootstrap*: 1000) y el modelo de *P-distance* con *pairwise deletion*. Para la familia bZIP, se utilizaron las secuencias reportadas por Liu y Chu (2015) y se generó el árbol filogenético con las condiciones como se indica en la familia WRKY.

Para la construcción del árbol filogenético de la familia DNAJ primero se realizó la búsqueda de los miembros de esta familia en *Brachypodium* con ayuda del algoritmo BLASTP en la base de datos de la NCBI; se tomaron como referencias cuatro secuencias de la familia DNAJ de *Arabidopsis*: At3g44110 tipo I; At5g25530 tipo II; At5g06110 tipo III y At5g11500 tipo IV. Posteriormente, se realizó el alineamiento de las secuencias candidatas con MUSCLE y se generó el árbol filogenético *Neighbour-Joining* (con 1000 *bootstrap*) por el modelo de *Poisson* y *Pairwise deletion*.

Finalmente, se extrajeron de la base GSE74222 los niveles de expresión de todos los genes con filogenia expresados en Log₂FC así como las cuentas por millón (CPM). Se usó la herramienta de Excel de Formato Condicional para expresar los datos en una escala de colores.

6.4 Búsqueda de los uORFs

Para analizar si existen marcos de lectura río arriba (*Upstream Open Reading Frame*, uORFs) de los marcos abiertos de los FTs tipo bZIP de *Brachypodium*, se consultó en Liu y Chu (2015) para saber cuál grupo posee mayor homología con los bZIPS reportados para *Arabidopsis* (Anexo B): At3g62420 (bZIP53), At2g18160 (bZIP2), At4g34590 (bZIP11), At1g75390 (bZIP44) y At5g49450 (bZIP1). Una vez detectada la familia IX de *Brachypodium* como la más homóloga a *Arabidopsis*, se identificaron los uORFs de los miembros de la familia bZIP de *Brachypodium* de forma manual navegando en el extremo 5'UTR con el visualizador de secuencias JBrowser (*Brachypodium distachyon* v.3.1) de la base de datos de Phytozome 12. Cuando se encontró algún codón de inicio río arriba, se descargó la secuencia de bases de cada secuencia. Posteriormente con ayuda de la herramienta Translate Tool (ExpASY) se tradujo la región del 5'UTR de cada gen para obtener las proteínas codificadas por los uORF (Anexo C). Posteriormente se realizó un multialineamiento con ClustalW en el programa Mega 7 con las secuencias de *Arabidopsis* y se incluyeron las secuencias de *Brachypodium*.

También se identificaron los consensos de la región AUG normal (principal u optimizado) y de los uORFs (no optimizado) de los genes que presentaron uORFs homólogos al bZIP11, se utilizó la secuencia de nucleótidos; se tomaron 10 pb antes y después del codón AUG como lo reportaron previamente (Cavener 1987; Rahmani *et al.*, 2009). Posteriormente se realizó el multialineamiento de codones utilizando MUSCLE en Mega 7.

6.5 Análisis por Integrative Genomics Viewer (IGV)

Para visualizar la estructura de intrones y exones de los genes de los FT seleccionado, se compararon los datos del mapeo de cuentas de expresión de los mRNAs secuenciados en la base de datos GEO GSE74222 entre condiciones (inundación, control y ecotipo) y replicas con el software IGV (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013). Se usaron los archivos que contiene el genoma de *Brachypodium* v3.1 en formato fasta, las anotaciones en formato gff y los archivos de la secuenciación de las diferentes condiciones en formato tdf: [Bd21](#) y [Bd2-3 control e inundación](#).

6.6 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos para amplificar por PCR las secuencias que flanquean las coordenadas de inserción de T-DNA reportadas por JGI, se descargaron de Phytozome los genes completos y se identificó el sitio de la inserción del T-DNA reportado (JGI-DOE, 2017). Posteriormente se tomaron 1000 pb (500 pb de cada lado del sitio de la inserción) y se mandó hacer el diseño de los oligonucleótidos del gen específico (GSP) al sitio web Primer3 v 0.4.0 (Primer3, 2017; Anexo D).

El diseño de oligonucleótidos de cada secuencia de los factores de transcripción se hizo para detectar las inserciones con diferentes pares de oligonucleótidos y así identificar la presencia de la inserción de T-DNA y el estado de cada alelo y que no se estén expresando los genes (Figura 14).

También se mandó a sintetizar el oligonucleótido del T-DNA que se encuentra 120 pb hacia arriba del 5' del extremo LB (T3 T-DNA LB AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG) como se indica en el protocolo de genotipificación de T-DNA del JGI-DOE (JGI-DOE, 2017). Todos

los oligonucleótidos reportados en este trabajo se sintetizaron como servicio por la compañía OligoT4 ([OligoT4, 2017](#))

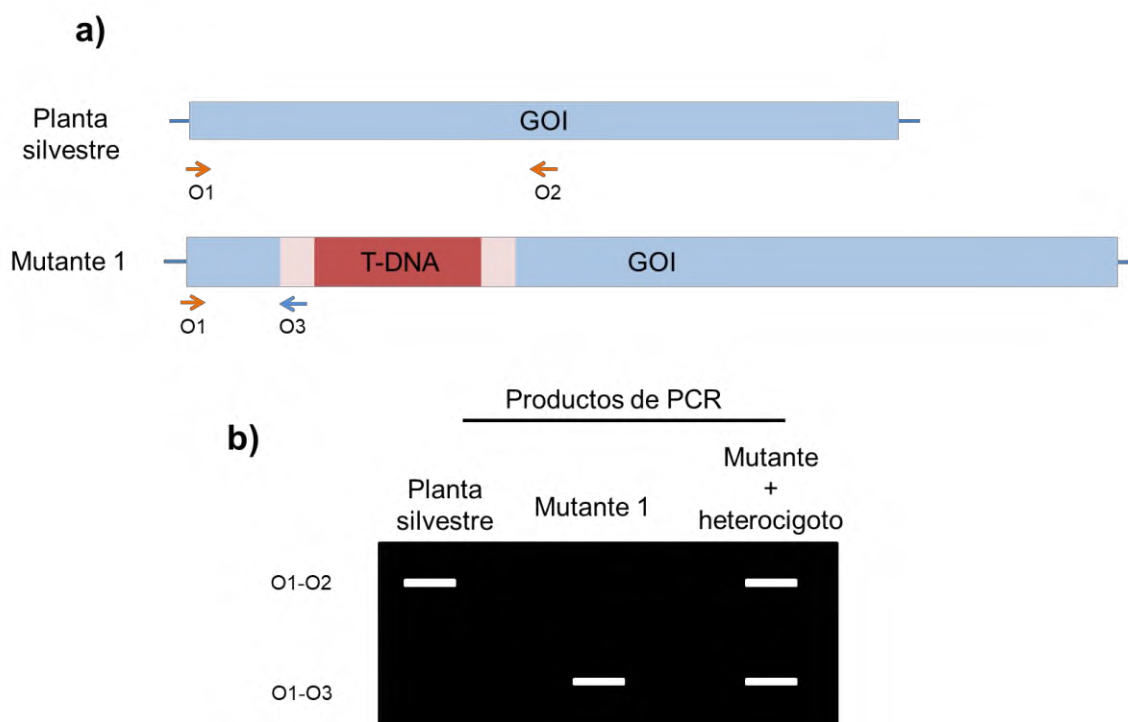


Figura 14. Diseño de oligonucleótidos para las líneas mutantes y las plantas silvestres.

a) Las flechas horizontales indican la zona del diseño del oligonucleótido, las flechas naranjas indican los oligonucleótidos GSP y la flecha azul el oligonucleótido T3 T-DNA LB indica el lugar de la inserción dando lugar a dos alelos mutantes hipotéticos. b) Ejemplo hipotético del resultado de genotipificación con ambos oligonucleótidos GSP + T3 T-DNA LB, donde se observan os diferentes patrones de bandas que indican el estado de homocigosis o ausencia de la inserción. O: oligonucleótido; GOI: gen de interés; recuadros en color rosa más claro bordes LB y RB respectivamente.

Para el diseño de los oligonucleótidos para RT-PCR se descargó la secuencia e transcrito en Phytozome 12 de los genes seleccionados de cada línea de T-DNA (Anexo D); el diseño se realizó cerca de la región 3'UTR con una T_m de 62 °C en IDT DNA ([IDT, 2017](#)).

6.7 Material vegetal

6.7.1 *Brachypodium distachyon*

Se utilizaron semillas de *Brachypodium* de ecotipos naturales (Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek10) y de líneas mutantes de T-DNA (control). Las semillas de los ecotipos Bd21, Bd2-3 y Tek10 se obtuvieron del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNPA y cuya fuente original es el Departamento de Agricultura de Estados Unidos a través del Dr. David Garvin (USDA). Los mutantes de T-DNA y su ecotipo natural Bd21-3 fueron donadas por la colección disponible en JGI *Brachypodium*.

Las semillas se desinfectaron dentro de tubos de 50 mL con 30 mL de hipoclorito 1:1 con agua destilada estéril (concentración final de hipoclorito de 1.6 % w/v); se mantuvieron en agitación 5 min y se enjuagaron con agua destilada tres veces. Posteriormente, se adicionó agua desionizada estéril y se incubó a 4 °C en oscuridad durante 3 días para sincronizar la germinación.

Las semillas se germinaron en una mezcla de sustrato Cosmopeat y perlita (3:1) previamente esterilizado (121 °C durante 15 min a 15 psi) adicionado con 16.6 g de fertilizante por cada 4 L de mezcla (equivalente a 2% w/w). Para su propagación (a partir de las 10 semillas donadas), las plantas se etiquetaron individualmente y se germinaron y crecieron en una cámara de crecimiento controlado (Adaptis, Conviron) con humedad relativa de 60 %, bajo condiciones de día largo (16 h de luz / 8 h de oscuridad), iluminación de luz blanca de 180 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad y 23 °C de temperatura.

6.8 Verificación de la inserción de T-DNA

6.8.1 Recolección de las muestras

Debido a que existía la posibilidad de que las semillas no tuvieran la inserción de T-DNA que se esperaba o que estas líneas de T-DNA fueran hemicigotas, se realizó la selección de las semillas como se ilustra en la Figura 15. Primero se crecieron en condiciones normales y se analizaron por PCR mientras crecían (ver siguiente sección) una vez identificadas, se conservaron las líneas homocigotas y hemicigotas ya que podríamos tener plantas estériles.

Aquellas que dieron genotipo silvestre se eliminaron de la colecta y se esterilizaron. Para análisis posteriores, sólo se usó a la descendencia de primera generación de plantas homocigotas.

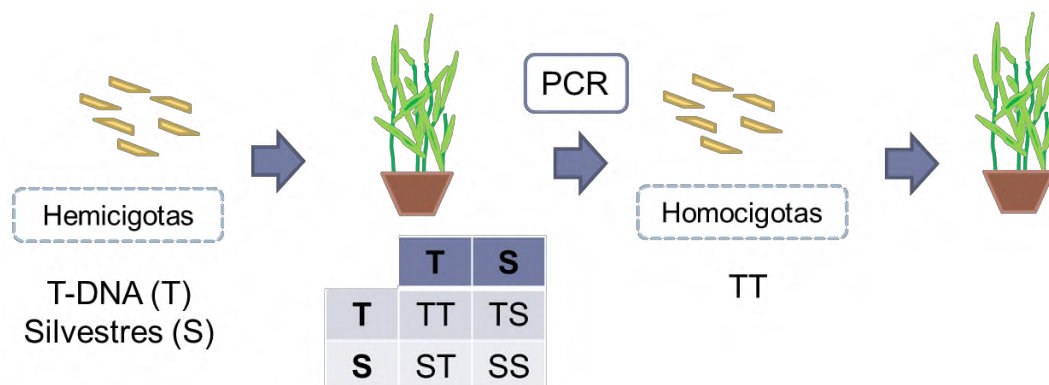


Figura 15. Estrategia de selección de plantas homocigotas y relaciones de segregación esperadas.

Se tomaron muestras de dos hojas de cada línea de T-DNA y del control Bd21-3, se les colocó un código de identificación y el número de planta que le correspondía. Finalmente, se colocaron en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a -80 °C. Las tijeras de colecta se limpiaron con etanol al 70 % en cada corte para evitar contaminación

6.1.1 PCR Multiplex (Genotipificación)

Se realizaron las PCR de cada una de las líneas de T-DNA para identificar los mutantes homocigotos utilizando la enzima MyTaq Plant-PCR Kit (BIO-2505, Bioline) que se usa para amplificar directamente de muestras vegetales sin extraer DNA en solución. Se preparó la mezcla maestra en tubos de PCR de 0.2 mL utilizando los componentes de la Tabla 2 y utilizando los oligonucleótidos del gen específico (GSP) de la Tabla 19 (sección de resultados) y el oligonucleótido T3 T-DNA LB para el análisis de cada línea previamente recolectadas (sección 6.8.1). La muestra fue un disco de hoja de 1.2 mm que se obtuvo por horadación de las hojas con ayuda de pipetas Pasteur estériles, y con alfileres se recuperó la muestra del interior del vidrio y se colocó en el tubo para PCR; como control negativo se utilizó una reacción que solo contenía ddH₂O (Anexo E). Todos los experimentos incluyeron un control silvestre (Bd21-3).

Tabla 2. PCR de genotipificación.

Componente	Cantidad
MyTaq Plant PCR	10 µL
GSP-F	2 µL
GSP-R	2 µL
T3 T-DNA LB	2 µL
ddH ₂ O	4 µL
Disco de hoja de 1.2 mm*	-
Volumen total	20 µL

Se utilizó el programa de ciclado como se muestra en la Tabla 3 en un termocilador (Veriti 96 well, Applied Biosystems).

Tabla 3. Programa de PCR MyTaq Plant

Desnaturalización inicial a 95 °C	3 min	
Desnaturalización a 95 °C	15 s	30 ciclos
Alineamiento a 55 °C	15 s	
Extensión a 72 °C	1 min	
Elongación final a 72 °C	5 min	

Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1.5 % con buffer de corrida TAE 1X (Anexo E) y se visualizaron en un fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene). Se utilizó como marcador de [referencia de longitud](#) a HyperLadder 50 pb (BIO-33054, Bioline; Anexo F).

6.9 Verificación de oligonucleótidos

6.9.1 Extracción de gDNA

Para la extracción de gDNA se tomó una muestra de Bd21-3 que se encontraba almacenada a -80 °C y se molió en nitrógeno con ayuda de un minipistilo estéril. Se añadieron

500 μ L de buffer de extracción (EB, Tabla 4), se dispersó por inversión y se incubó durante 30 min a 65 °C en un termobloque.

Tabla 4. Componentes del buffer de extracción.

Componente	Cantidad
0.5 M EDTA pH.8	1 mL
2.5 M NaCl	2 mL
1 M Tris pH.8	0.5 mL
10% SDS	0.4 mL
H ₂ O desionizada	6.1 mL
Volumen total	10 mL

Posteriormente, se añadieron 500 μ L de cloroformo, se mezcló en vórtex durante 10 s y se centrifugó (Heraeus Pico 21, Thermo Scientific) a máxima velocidad (14,000 x g) durante 10 min; el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 500 μ L de isopropanol, se mezcló vigorosamente y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min y se removió el sobrenadante cuidando de mantener la pastilla de DNA en el tubo. Se lavó con 750 μ L de etanol al 70 % y se mezcló en vortex. Se centrifugó la mezcla a máxima velocidad durante 7 min y se decantó el etanol. El gDNA se diluyó en 50 μ L agua destilada desionizada estéril (ddH₂O) con RNasa A (2 μ L/ mL, EN0531, Thermo Scientific) y se incubó a 37 °C durante 30 min en un termobloque.

El gDNA se observó en un gel de agarosa al 1% con buffer de corrida TAE 1X (Anexo E) y se visualizó en un fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene), se utilizó como marcador de [referencia de longitud](#) a 1 Kb Plus DNA Ladder (10787-018, Invitrogen; Anexo F).

6.9.2 Preparación y evaluación de la calidad de los oligonucleótidos para PCR y RT-PCR

Los oligonucleótidos se resuspendieron [en agua bidestilada y esteril para obtener una solución stock a una concentración de 100 mM](#) (Anexo G). Se realizaron las diluciones 1:10 de cada oligonucleótido (45 μ L de ddH₂O y 5 μ L oligonucleótido).

Posteriormente se realizó la PCR utilizando la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo scientific). Se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 5 y utilizando los oligonucleótidos de las Tablas 19 y 20 (sección de resultados); se utilizó el gDNA de Bd21-3 (sección 6.9.1) en una dilución 1:50 y como control negativo una reacción que sólo contenía ddH₂O.

Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR de oligonucleótidos.

Componente	Cantidad
ddH ₂ O	5 µL
DreamTaq Green MM	10 µL
Oligonucleótido F	2 µL
Oligonucleótido R	2 µL
gDNA 1:50	1 µL
Volumen total	20 µL

Se utilizó el programa de ciclado como se muestra en la Tabla 6 en un termociclador (Veriti 96 well, Applied Biosystems).

Tabla 6. Programa de PCR para los oligonucleótidos.

Desnaturalización inicial a 95 °C	3 min	
Desnaturalización a 95 °C	30 s	35 ciclos
Alineamiento a 55 °C	30 s	
Extensión a 72 °C	1:15 min	
Elongación final a 72 °C	5 min	

Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1.5 % (Anexo E) con buffer de corrida TAE 1X y se visualizaron en un fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene).

6.10 Establecimiento de las condiciones para probar la inundación

Para conocer el nivel de tolerancia a la inundación de Bd21-3, se realizó un ensayo previo de inundación y se comparó con los ecotipos evaluados por Rivera-Contreras *et al.* (2016) que son Bd21 sensible, y Bd2-3 y Tek10 tolerantes.

Se utilizaron plantas de 14 días de edad después de la germinación que se sumergieron en tinas ovaladas de plástico (capacidad de 110 L) que se llenaron con agua a una altura de 24 cm. Se usaron dos controles, los controles de luz de baja intensidad se mantuvieron en tinas sin agua a un lado de las tinas inundadas, y los controles de luz normal, se dejaron en el cuarto de crecimiento. El estrés por inmersión se realizó en el cuarto de crecimiento vegetal de la Universidad del Papaloapan de crecimiento controlado con humedad relativa de 60 %, bajo condiciones de día largo (16 h de luz / 8 h de oscuridad), iluminación de luz blanca de $180 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad y $23 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura (Zamora, 2016). El estrés comenzó tres horas **antes del periodo de oscuridad** y posteriormente se realizó la colecta de las plantas en los siguientes tiempos: 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 y 6 días de inundada. Posteriormente, se mantuvieron en condiciones normales durante 6 días y se registró el número de hojas (antes y después de la inundación) y el porcentaje de sobrevivientes para cuantificar la tolerancia al estrés por inundación (LT_{50}).

Se utilizaron tres macetas hexagonales por cada punto de la colecta con 5 plantas cada una, el experimento se realizó por triplicado.

6.11 Tratamiento de estrés para las líneas de T-DNA

Se sometieron a estrés por inundación las plantas homocigotas de las líneas de T-DNA de *Brachypodium*, siempre usando como control a plantas tratadas idénticamente y en paralelo de Bd21-3. Las plantas tenían 14 días después de la germinación, se etiquetaron y se contó el número de hojas previo a la inundación, posteriormente se sumergieron en tinas ovaladas de plástico que se llenaron a una altura de 24 cm con agua de la llave y otras se tuvieron en condiciones control (sin ser sumergidas y bajo crecimiento normal).

El estrés por inundación se realizó tres horas antes de la noche; se rescataron las plantas en los siguientes tiempos: 3, 3.5 y 4 días de inundación. Se realizó el conteo de las hojas cuatro

días después del estrés por inmersión y se realizó el monitoreo visual de las plantas, se midió el tiempo de floración y altura, morfología en general y tiempo letal 50 (LT₅₀).

6.12 Análisis estadístico

A partir de los datos que se obtuvieron en la sección 6.1.12 se realizó el análisis estadístico en Minitab 16 que consistió en análisis de varianza de una vía con un valor de $P < 0.05$ (ANOVA) y una prueba de Tukey con el 95 % de confianza para observar si existe diferencia entre los ecotipos Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek-10. Para las plantas silvestres y las líneas mutantes de T-DNA también se realizó un análisis de varianza de una vía y se realizó una prueba de Dunnet con los datos de la sección 6.1.13 con Bd213 como grupo control. Se utilizó la herramienta BoxPlotR disponible en la web (BoxPlotR, 2017; Krzywinski y Altman, 2014; Spitzer *et al.*, 2014) para la generación de diagramas de cajas y bigotes.

6.13 Extracción de RNA

Con el fin de verificar que la inserción de T-DNA efectivamente causó el KO del gen de interés, se realizó una colecta del material vegetal 48 h después de la inundación; el tejido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se utilizó el kit Direct-zol RNA MiniPrep (R2050, Zymo Research) para la extracción de RNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregó 1 ml de TRI Reagent por 100 mg de tejido, se homogeneizó en vórtex durante 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 2 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a un microtubo de 2 mL.

Se añadió 1 mL de etanol al 100 % y se mezcló por vórtex. La mezcla se pasó por una columna (Zymo-Spin IIC Column) con el tubo colector proporcionado por el fabricante y se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 30 s a temperatura ambiente. La columna se transfirió a un tubo colector nuevo y se añadieron 400 μL de Direct-zol RNA PreWash a la columna. Se centrifugó (Heraeus Pico 21, Thermo Scientific) a $10,000 \times g$ durante 30 s a temperatura ambiente, y se descartó el flujo que atravesó a la membrana.

Se agregaron 80 μL de DNAsa I Reaction Mix (5 μL de DNase I y 75 μL de DNA Digestion Buffer) directamente en la columna y se incubó a 20-30 °C durante 15 min. Se añadieron 400 μL de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 s y se descartó el flujo que atravesó. Este paso se repitió una vez más.

Se añadieron 700 μL de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 2 min a temperatura ambiente, se descartó el flujo que atravesó y se transfirió la columna a un tubo nuevo. Se añadieron 50 μL de DNase/RNase-Free Water directamente a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 s, el flujo que atravesó se recuperó con ayuda de la pipeta y se colocó de nuevo en la columna. Para eluir, se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min.

La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa al 1% (w/v) con buffer de corrida MOPS 1X (Anexo E) y se visualizó en un fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene). La cuantificación del RNA se llevó a cabo con un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Como blanco, se utilizó el componente en el que se encontraba resuspendida la muestra (agua o buffer de elución) y se verificó que la relación 260/280 y 260/230 sea de 2 o mayor.

6.14 Síntesis de DNA complementario (cDNA) y control de calidad

6.14.1 Verificación de ausencia de gDNA

Para la verificación de la ausencia de gDNA en las muestras de RNA se realizó una PCR utilizando la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo scientific). Se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 7 y se utilizaron los oligonucleótidos de Bradi4g31040 como control de ausencia de intrones (banda de 250 pb Zamora, 2016). Del RNA extraído en la sección 6.13 se realizó una dilución 1:10 (1 μL de RNA y 9 μL de ddH₂O). Como control positivo se emplearon 2 μL de gDNA 1:50 y como control negativo una reacción que contenía sólo ddH₂O en lugar de molde.

Tabla 7. Componentes para la PCR verificación de ausencia de gDNA

Componente	Cantidad
ddH ₂ O	5 µL
DreamTaq Green MM	10 µL
Oligonucleótido F	2 µL
Oligonucleótido R	2 µL
RNA 1:10	1 µL
Volumen total	20 µL

Se utilizó el programa de ciclado como se muestra en la Tabla 8 en un termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems).

Tabla 8. Programa de PCR para la verificación de ausencia de gDNA.

Desnaturalización inicial a 95 °C	3 min	
Desnaturalización a 95 °C	30 s	40 ciclos
Alineamiento a 55 °C	30 s	
Extensión a 72 °C	1 min	
Elongación final a 72 °C	5 min	

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 2 % (Anexo E) con buffer de corrida TAE 1X y se visualizaron en un fotodocumentador. Se utilizó como marcador de peso molecular HypperLadder 50 pb (BIO-33054, Bioline).

6.14.2 Síntesis de cDNA

Se utilizó la enzima retrotranscriptasa del kit SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (BIO-65053, Bioline). Se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 9. Se añadió el volumen necesario para usar 1 µg de RNA y se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 15 µL.

Tabla 9. Componentes de la síntesis de cDNA

Componente	Cantidad
5X TransAmp Buffer	4 μ L
Reverse Transcriptase	1 μ L
RNA	1 μ g
ddH ₂ O	C.B.P.
Volumen total	20 μ L

Se incubaron las muestras en un termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems) a 25 °C durante 10 min seguidos de 42 °C por 15 min, 48 °C 15 min y finalmente, 85 °C por 5 min para terminar la reacción. Posteriormente, se prepararon diluciones 1:10 del cDNA sintetizado (3 μ L de cDNA y 27 μ L de ddH₂O).

6.14.3 Verificación del cDNA

Para la verificación del cDNA se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo scientific), se utilizaron tubos de 0.2 mL y se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 10. Se usó a Bradi4g1040 como control de ausencia de gDNA debido a que contiene un intrón dentro de su amplicón genómico. Se utilizó como control positivo 2 μ L de gDNA 1:50 y como control negativo una reacción que sólo contenía ddH₂O.

Tabla 10. Componentes para la PCR de verificación de cDNA.

Componente	Cantidad
ddH ₂ O	5 μ L
DreamTaq Green MM	10 μ L
Oligonucleótido F	2 μ L
Oligonucleótido R	2 μ L
cDNA 1:10	1 μ L
Volumen total	20 μ L

Se utilizó el programa de ciclado con los pasos como se indica en la Tabla 8 (de la sección 6.14.1). Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 2 % (w/v) con buffer de corrida TAE 1X.

6.15 Análisis mediante RT-PCR de verificación

Se utilizaron las muestras de cDNA 1:10 de las líneas mutantes de T-DNA de 48 h condiciones control y de inundación. Se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo scientific) y como control constitutivo *UBIQUITIN (UBI)*. Se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 11. Se realizaron colectas a los 20, 25 y 30 ciclos de PCR para verificar la zona de amplificación exponencial y evitar las zonas indetectables y saturadas, y determinar la cantidad de cDNA donde UBI se detectará con intensidad similar en los geles (Tabla 12).

Tabla 11. Componentes para la reacción de PCR con ubiquitina

Componente	Cantidad
ddH ₂ O	1 µL
DreamTaq Green MM	10 µL
Oligonucleótido F	2 µL
Oligonucleótido R	2 µL
cDNA 1:10	variable
Volumen total	20 µL

Tabla 12. Volúmenes finales utilizados para cada muestra de cDNA

Línea de T-DNA	T3E 1C	T3E 1I	T9E 3C	T9E 3I	T3W 5C	T3W 5I	T96W 7C	T96W 7I	Bd21 3C	Bd21 3I
cDNA 1:10 (µL)	1.5	4.5	2	1.8	2	2	2	1.5	3	2
H ₂ O (µL)	3.5	0.5	3	3.2	3	3	3	3.5	2	3

Se siguió el programa de PCR como se muestra en la Tabla 13 en un termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems). Los productos de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1 % con buffer de corrida TAE 1X.

Tabla 13. Programa de PCR.

Desnaturalización inicial a 95 °C	3 min	
Desnaturalización a 95 °C	30 s	30 ciclos
Alineamiento a 55 °C	30 s	
Extensión a 72 °C	1 min	
Elongación final a 72 °C	5 min	

6.16 RT-PCR

Para verificar la ausencia del mensajero de las líneas de T-DNA se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo scientific). Se realizaron las mezclas maestras para cada línea de T-DNA con sus respectivos controles de Bd21-3 en condiciones control e inundación como se indica en la Tabla 12 y 14. Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 20 (sección de resultados). Como control negativo para cada línea se utilizó una mezcla que sólo contenía ddH₂O.

Tabla 14 Componentes de PCR

Componente	Cantidad
ddH ₂ O	1 µl
DreamTaq Green MM	10 µl
Oligonucleótido F	2 µl
Oligonucleótido R	2 µl
cDNA 1:10	Tabla 13
Volumen total	20 µl

Se realizaron colectas a los 25, 30 y 35 ciclos de PCR. Se utilizó el programa de ciclado como se indica en la Tabla 13 (sólo se modificó el número de ciclos a 35) en un termociclador (Veriti 96, Applied Biosystems).

Los productos de se verificaron en un gel de agarosa al 2 % (w/v) con buffer de corrida TAE 1X.

6.17 Mutagénesis con EMS

6.17.2 *Arabidopsis thaliana*

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) como control y la línea transgénica L5 (35S: FLAG-SUB1A-1; [Figura 16](#); Peña-Castro *et al.*, 2011). **Un mL de volumen de semillas se colocó en un tubo de 1.5 mL** y se le añadieron 1000 μ L de H₂O destilada, se incubaron a 4 °C durante 4 días antes de proceder a la mutagénesis. La mutagénesis se realizó con base en el protocolo de Weigel y Glazebrook (2006). Se colocó 1 g de semillas (50,000 semillas aproximadamente) en un tubo tipo Falcon de 50 mL, se añadieron 25 mL 0.2 % v/v de EMS (50 μ L de EMS; MO880, Sigma Aldrich); el tubo se colocó en rotación durante 15 h a 25 °C. Se permitió que las semillas sedimentaran en el fondo del tubo y se descartó el EMS, se agregó H₂O destilada estéril hasta completar los 50 mL, se mezcló y después se retiró el H₂O; se repitió este procedimiento ocho veces más. En el último lavado, las semillas se dejaron remojando durante 1 h para dar tiempo a que el EMS se difundiera fuera de las semillas y se incubó a 4 °C durante tres días.

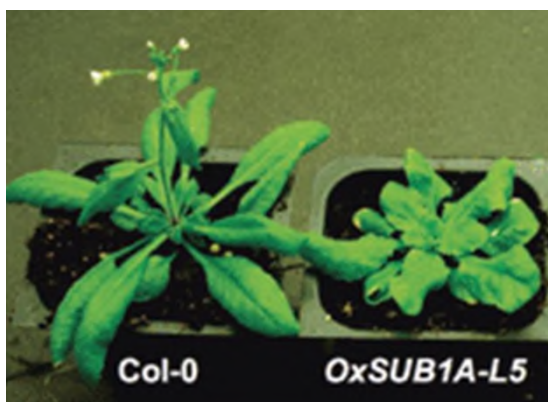


Figura 16. Fenotipos de las plantas de *Arabidopsis* Col-0 y transformadas genéticamente con el ERF-VII de arroz SUB1A-1 (OxSUB1A-L5; Peña-Castro *et al.*, 2011).

Posteriormente, las semillas se suspendieron en 0.1 % de agarosa (0.05 g de agarosa en 50 mL de H₂O) y con ayuda de una pipeta Pasteur se sembraron en la mezcla de sustrato Sunshine No.3 y perlita (como se mencionó anteriormente, ver sección 10.1). Las plantas se crecieron a una densidad de 5000 por 2ft². Se utilizaron 20 charolas de 52.5 de largo x 26 cm de ancho; y con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h de oscuridad.

Después 60 días, se recuperaron semillas y se crecieron nuevamente en la mezcla de sustrato Sunshine No.3 y perlita (M1). Se colectaron todas las semillas cuando las plantas alcanzaron su madurez.

Se observaron los fenotipos y se escogió los que presentaron fenotipos divergentes al ya reportado para 35S: FLAG-SUB1A-1 y se guardaron las semillas.

Para detectar contaminación con Col-0, se realizó una PCR de verificación, para ello se colectó una hoja de las plantas de los fenotipos divergentes, se colocaron en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Posteriormente se realizó la extracción de gDNA. Se realizó la PCR usando la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo scientific). Se preparó una mezcla maestra en tubos para PCR de 0.2 mL con los componentes de la Tabla 15. Se utilizaron los oligonucleótidos Sub1AEcoRI5': TTCGGAATTCATGTGTGGAGGAGAAGTGATC y Sub1AHindIII3': CGTTAAGCTTTCAGGCTTCCCCTGCATATGA. Se usó como controles el gDNA de L5 sin mutagenizar (+) y Col-0 (-) en una dilución 1:10 (45 µL de ddH₂O y 5 µL de gDNA) y una reacción que contenía sólo ddH₂O (-).

Tabla 15. Componentes para PCR con DreamTaq Green MM

Componente	Cantidad
ddH ₂ O	5 µL
DreamTaq Green MM	10 µL
Oligonucleótido F	2 µL
Oligonucleótido R	2 µL
DNA	1 µL
Volumen total	20 µL

Se utilizó el programa de ciclado con los pasos como se indica en la Tabla 16 en un termociclador automático (Veriti 96, Applied Biosystems).

Tabla 16. Programa de PCR para la verificación de mutantes con EMS.

Desnaturalización inicial a 98 °C	1 min	
Desnaturalización a 98 °C	10 s	30 ciclos
Alineamiento a 60 °C	30 s	
Extensión a 72 °C	60 s	
Elongación final a 72 °C	10min	

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 2 % (w/v) con buffer de corrida TAE 1X y se visualizaron en un fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene).

7. Resultados y discusión

7.2 Selección de genes codificantes para FTs

Se encontraron en la base de GSE74222 125 genes expresados diferencialmente que codifican para FTs activos durante la inundación en *Brachypodium*, sin embargo, sólo se encontraron 28 mutantes con inserción de T-DNA. De las anteriores concordancias, 19 genes corresponden al primer bloque con características óptimas ($\text{LogFC} \geq 1.5$) y 9 genes al segundo bloque menos informativo. De ambos bloques, 10 poseen más de una línea (inserción), 9 tienen una inserción en la zona del exón, 5 en el intrón, 8 en la región del 5'UTR, uno en el 3'UTR y 9 de ellos tienen una inserción cercana al gen (Tablas 18 y 19). Las inserciones se verificaron con ayuda del visualizador de la base de datos Phytozome 12. Entre las líneas de T-DNA encontradas se observó que 4 de ellas pueden funcionar como sobre-expresantes porque la repetición de 35Sx4 (Activador) está orientada en dirección con el gen (en rojo, Tabla 18). Se encontraron también FTs que pertenecen a las familias de los ERF, WRKY, LOB, MYB, HSF, bHLH, ARF, Trihelix y ZF (Tablas 17 y 18). Esta diversidad de FTs puede indicar que la planta no sólo responde a la baja concentración de oxígeno, sino que también estaría realizando un ajuste en su desarrollo, contra un posible ataque de patógenos o respondiendo a la disponibilidad deficiente de recursos para la obtención de energía.

Primero se solicitaron al JGI-DOE los genes del primer bloque, sin embargo, sólo tuvieron disponible 10 líneas de T-DNA de *Brachypodium* y que corresponden a las familias ERF (Bradi1g17961: JJ22103 y JJ28379; Bradi2g27920: JJ3579 y Bradi5g08380: JJ22213), WRKY (Bradi2g16150: JJ28416, Bradi2g22440: JJ19596 y Bradi2g54720: JJ20483), DNA J (Bradi2g55797: JJ2207 y JJ2214) y MYB (Bradi1g20540: JJ20097; Tabla 18, Figura17). El segundo bloque ya no se obtuvo debido a que el JGI-DOE solicitaba un tiempo para poder verificar si estaban disponibles las líneas de T-DNA de los genes solicitados. El resultado final del JGI-DOE para estas líneas fue que no contaban con semillas ya que podían ser líneas letales o necesitaban obtener más semillas (Bulk; Tabla 18). En el Anexo H se muestran el resto de las estructuras de los genes con T-DNA que no estaban disponibles en el JGI-DOE. De forma paralela, también se realizó el análisis de la colección TILLING de *Brachypodium* disponible en (urgv.evry.inra.fr/UTILdb) reportada por Dalmais *et al.* (2013), pero no encontramos líneas mutantes de los FTs que se identificaron activos durante la inundación.

Tabla 17. Identificación de los genes que codifican FTs activos durante la inundación. Primer bloque.

En rojo se indican las inserciones que sí actúan por orientación como activadores. En negritas se indican las líneas disponibles en JGI-DOE y que llegaron a la Universidad del Papaloapan

Gen	Identidad	Inserción	Construcción	Tipo de construcción	Línea	Código
Bradi1g17961	AP2 domain (AP2)	Exón	pJJ2LBA	Activador	JJ22103	T9E
Bradi1g17961.1		Exón	pJJ2LBA	Activador	JJ28379	T3E
Bradi2g27920	ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 13	5'UTR	pJJ2LBA	Activador	JJ13579	T79E
Bradi2g54720	WRKY transcription factor	Intrón	pJJ2LBA	Activador	JJ20483	T3W
Bradi3g42130	Heat shock factor protein 7	5'UTR	pJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi1g46690	AP2 domain (AP2)	Exón	PJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi1g20540	MYB transcription factor	5'UTR	pJJ2LBA	Activador	JJ20097	T7M
		Near	PJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi5g08380	Putative AP2/ERF domain-containing transcription factor	Near	pJJ2LBA	Activador	JJ22213	T13E
Bradi1g05480	bZIP transcription factor	Intrón	pJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi2g55797	DNAJ (HSP40) HOMOLOG, SUBFAMILY A, MEMBER 3A	5'UTR	pJJ2LB	Inserción	-	-
		Exón	POL001	Inserción	JJ2214	T4J
		Exón	POL001	Inserción	JJ2207	T7J
Bradi1g63910.1	WRKY transcription factor	Near	pJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi4g33000	zf-Dof	Near	pJJ2LBA	Activador	-	-
			pJJ2LB, pOL001	Inserción	-	-
			pJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi4g16740	LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 40	Near	pJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi5g18680	Heat shock factor protein 4	Exón	PJJ2LB	Inserción	-	-
Bradi2g16150.1	WRKY transcription factor	Exón	pJJ2LBA	Activador	JJ28416	T6W
Bradi2g22440	WRKY transcription factor	Intrón	pJJ2LBA	Activador	JJ19596	T96W
Bradi4g31040	PF00847 - AP2 domain (AP2)	3'UTR	pJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi2g05950	bHLH transcription factor	Intrón	pJJ2LBA	Activador	-	-
Bradi3g49180	MYB transcription factor	Exón	PJJ2LBP2	Trampa génica	-	-
Bradi2g50035	AP2 domain (AP2)	Exón	pJJ2LBA	Activador	-	-

Tabla 18. Identificación de los genes que codifican FTs activos durante la inundación. Segundo Bloque.

Gen	Identidad	Inserción	Construcción	Tipo de construcción
Bradi2g12030	Triple-Helix transcription factor family	Near	pJJ2LBA	Activador
Bradi4g09567	MYB domain transcription factor family	5'UTR	pJJ2LBA	Activador
Bradi3g03407	ARF, Auxin Response Factor family	5'UTR	pJJ2LBA	Activador
			pJJ2LBA	Activador
Bradi2g19270	C3H zinc finger family	Near	POL001	Inserción
Bradi4g05990		5'UTR	pJJ2LBA	Activador
Bradi1g66880	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	5'UTR	pJJ2LBA	Activador
Bradi2g10000	kinase.receptor like cytoplasmatic kinase VII	Near	pJJ2LBA	Activador
Bradi4g32027	D-mannose binding lectin (B_lectin)	Near	pJJ2LBA	Activador
Bradi2g02537	Wall-associated receptor kinase C-terminal (WAK_assoc)	Intron	pJJ2LBA	Activador

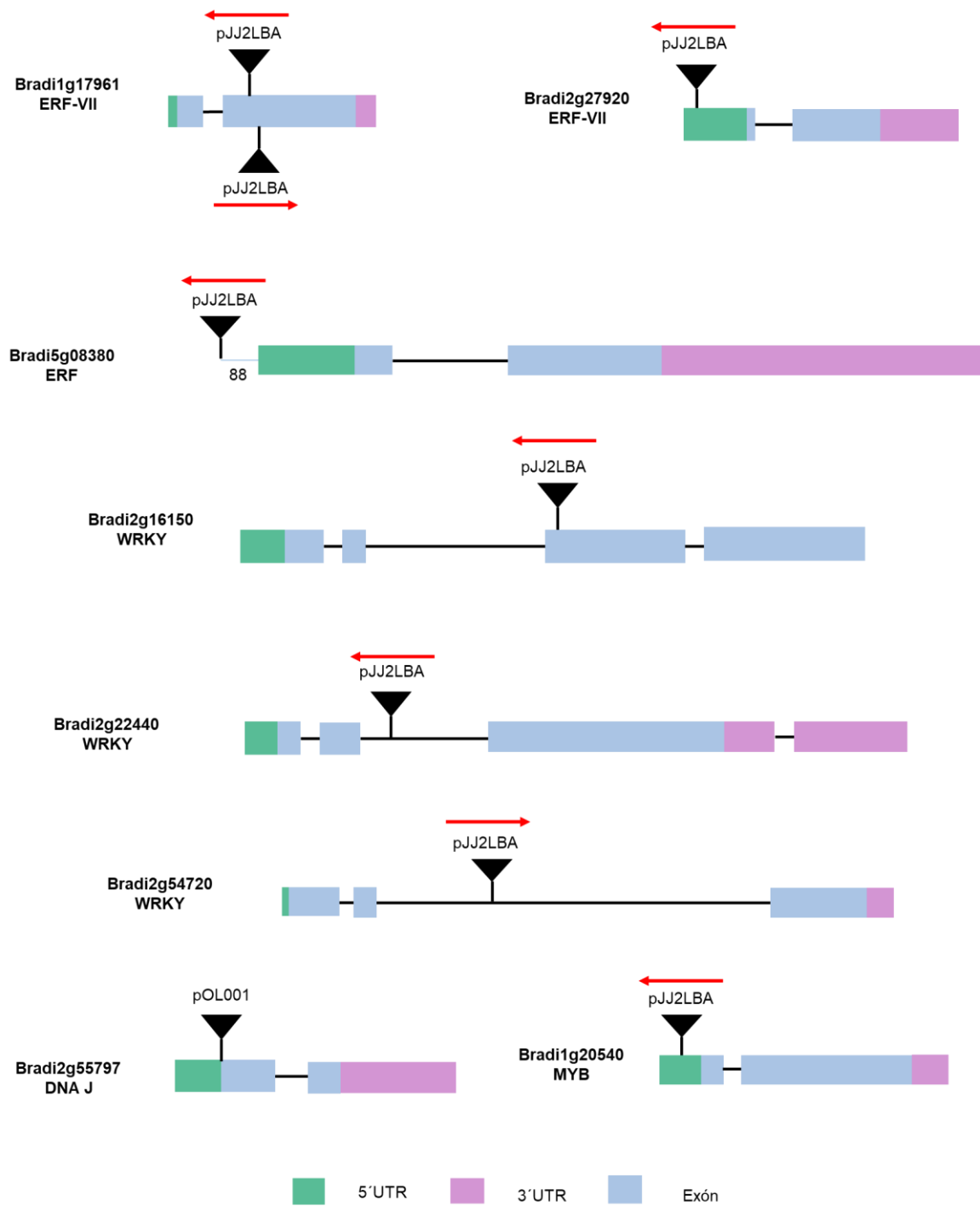


Figura 17. Sitios de inserción en genes que codifican FTs activos en el estrés por inundación con líneas de T-DNA disponibles en JGI-DOE.

Las flechas negras indican el sitio de la inserción, las líneas representan los intrones, el color verde indica la región del 5'UTR, rosa la región del 3'UTR, en azul las zonas de exones y la flecha roja indica la orientación de la repetición 35Sx4 de las construcciones pJJ2LBA.

7.3 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de las plantas homocigotas, hemicigotas y silvestres (WT) se realizó como indica el Protocolo de T-DNA genotyping disponible en JGI-DOE para que las plantas homocigotas se detecten con un sólo producto de amplificación y las hemicigotas con dos, una que corresponde al tipo silvestre y la otra una banda con los tamaños correspondientes en la Tabla 19 para cada gen. Se lograron diseñar oligonucleótidos que abarcaran la inserción a aproximadamente 500 pb a cada lado, para dar un total de 1000 pb como banda homocigota.

Tabla 19. Oligonucleótidos de PCR para las líneas de T-DNA de *Brachypodium*

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Amplión		
				WT	Homocigoto	Hemicigoto
Bradi1g17961 (JJ28379, JJ22103)	17961-F	GCCTCGTTTACTATCAGCAC	55.15	978	478	978/478
	17961-R	AACCGTGAAGCACTACAAAT	54.9		500	978/500
Bradi2g27920 (JJ13579)	13579-F	GTATTACTTACAAATTTGCCATTT	55.22	980	481	980/481
	13579-R	AAGTTGATTATATAAAATGGAATCG	55.1			
Bradi2g55797 (JJ2207, JJ2214)	55797-F	CCATGACCAGAGCTTCA	58	990	488	990/488
	55797-R	GAGAGAGACAGAGAGGATTT	58			
Bradi2g16150 (JJ28416)	28416-F	TCATTTGTATTTCCATAAAATTTGC	58.49	900	500	900/500
	28416-R	GGAGGAATTTGGGGACCT	58.71			
Bradi2g22440 (JJ19596)	19596-F	CTCCTAACCCCCAGTGTA	55.07	970	479	970/479
	19596-R	GACATTGTTTCCGAGCAT	54.31			
Bradi2g54720 (JJ20483)	20483-F	GTCCTGCCTGTGAATATGAT	54.97	999	367	999/367
	20483-R	TTCTTTGGATCACTCGAACT	54.9			
Bradi1g20540 (JJ20097)	20097-F	CAAAATGGCGTTCAAAAG	55.28	990	667	990/667
	20097-R	CATGCGTGAAATAACAAGAA	54.88			
Bradi5g08380 (JJ22213)	22213-F	CGAAATAGCTCCAATATATTCTT	53.97	998	520	998/520
	22213-R	CGCGCCGAGTAGTAGTAG	54.81			

Para el caso del diseño de los oligonucleótidos para RT-PCR el diseño se realizó hacia el extremo 3'UTR de la inserción del T-DNA de cada línea, para asegurar que hay ausencia del transcrito (Tabla 20). Se ha reportado en la literatura, que en ocasiones el T-DNA sólo silencia la parte del 3' posterior a la inserción, mientras que el 5' continúa presente (Ishizaki *et al.*, 2005; Liwanag *et al.*, 2012).

Tabla 20. Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR

Gen	Nombre	Secuencia	Tm °C	Amplicón
Bradi1g17961	Bradi960F	ATCAGCAGCAACAGGAGG	61.6	82
	Bradi960R	ACCACTAATTACATAGACACGGC	62.2	
Bradi2g54720	Bradi720F	GAGGAAGCAGCAAGCTACA	62	180
	Bradi720R	CGGCAAGTCGAGGCAATA	62	
Bradi2g22440	Bradi440F	ACGATTAGTGACATCGACATCC	62	200
	Bradi440R	ACGTCGTGGTTGTGCTT	62	
Bradi5g08380	Bradi380F	CTGCACCATCAACAACACTAC	61	181
	Bradi380R	CGCCACCATCATCATCT	61	
Bradi4g31040	Bradi040F	GGCAAGTAATGTGGATGTCTG	61	250 gDNA / 150 cDNA
	Bradi040R	AACCATAGCGGATATAACCTGC	62.1	
Bradi1g32860.1	UBI-860F	ACTTGCTTCTGTCTGGGTTTC	62	203
	UBI-860R	GTAGAATTACACACGGGCTCA	62	

7.4 Verificación de oligonucleótidos para genotipificación

Para comprobar que el diseño de los oligonucleótidos se realizó de manera correcta se siguieron una serie de pasos de verificación. Primero se extrajo gDNA de Bd21-3 que se observó como una banda de alto peso molecular en la parte superior del gel (Figura 18).

Posteriormente, se realizó una PCR con la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo scientific) con los oligonucleótidos diseñados de las Tabla 19 usando el gDNA de Bd21-3, y se verificó que se obtuvieran las bandas de alrededor de los 1000 y 900 pb en un gel de agarosa al 2 % para el caso de los oligonucleótidos de PCR (Figura 19).

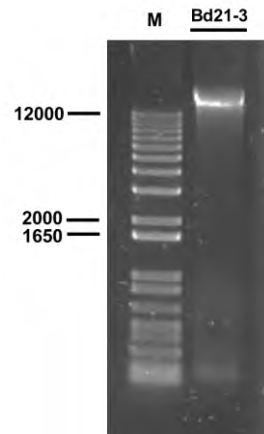


Figura 18. Gel de agarosa al 1 % de gDNA de Bd21-3.

M: marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 10787-018).

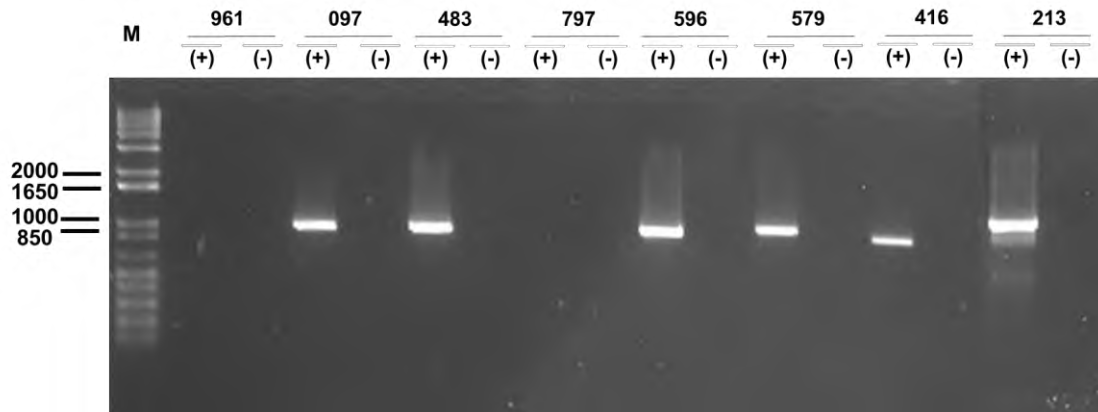


Figura 19. Gel de agarosa al 1.5 % para verificación de los oligonucleótidos para PCR utilizando el gDNA de Bd21-3.

Como control negativo (-) se utilizó ddH₂O; las bandas que se observan corresponden al tamaño esperado para cada oligonucleótido. Los números de la parte superior corresponden a los tres últimos dígitos del nombre del oligonucleótido empleado como se muestra en la Tabla 20, M: marcador de [referencia de longitud](#) 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 10787-018).

La verificación en gDNA de los oligonucleótidos indicó que 961 y 797 no presentaron una banda por lo que se realizó una PCR en gradiente utilizando las temperaturas 53, 55 y 58 °C. En la Figura 20, se puede observar que las temperaturas para 961 fueron de 53 y 58 °C mientras que en el oligonucleótido 797, no se obtuvo una banda del tamaño esperado, sin embargo, en análisis posteriores y utilizando la enzima MyTaq Plant-PCR Kit (BIO-2505, Bioline) sí se logró obtener las bandas correspondientes de alrededor de 900-1000 pb (Figura 26). Esta última enzima fue la que se usó para todos los análisis posteriores de genotipificación.

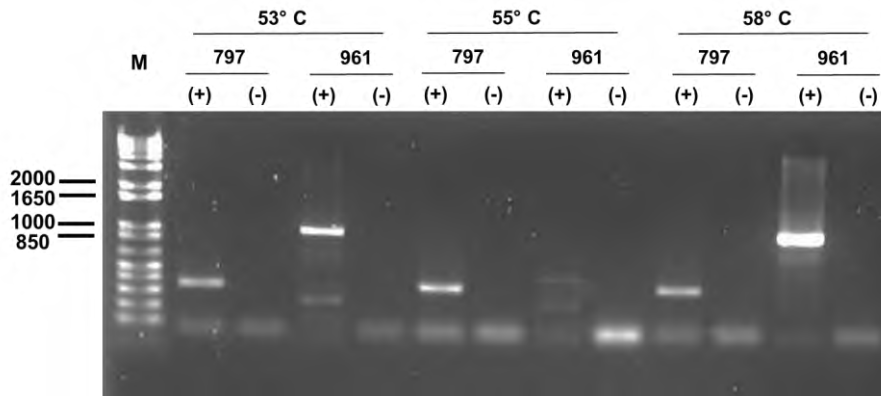


Figura 20. Gel de agarosa al 1.5 % de PCR en gradiente para evaluar los oligonucleótidos 17961 y 55797. Como control negativo (-) se utilizó ddH₂O, M: marcador de [referencia de longitud 1 Kb Plus DNA Ladder](#) (Invitrogen, 10787-018).

7.5 Extracción de RNA y verificación de ausencia de gDNA

Se realizó la extracción del RNA de una muestra de 48 h de inundación, así como de sus respectivos controles de cada una de las líneas de T-DNA y de Bd21-3 silvestre. La verificación de la integridad del RNA se muestra en un gel de agarosa al 1 %, se puede observar que no hubo degradación del RNA ya que no hay un barrido y se obtuvieron dos bandas correspondientes a las subunidades del RNA ribosomal (Figura 21).

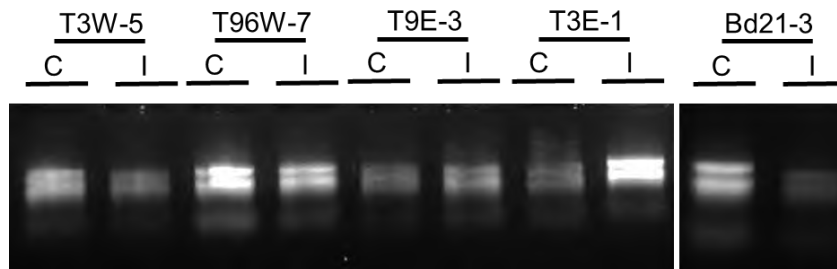


Figura 21. Gel de agarosa al 1 % para el RNA de las líneas de T-DNA y de Bd21-3.

C: control, I: plantas cometidas a inundación. Los códigos en la parte superior corresponden al nombre del gen como lo indica la Tabla 17.

Posteriormente con [el RNA que se extrajo](#), se realizó una PCR [para verificar la ausencia](#) de gDNA. Se utilizó como control constitutivo al gen Bradi4g31040. [De todas las muestras de RNA probadas, se observó que sólo T96W-7 presentó](#) una banda de alrededor de 250 pb en el carril (C) lo que indica que existe contaminación con gDNA [similar al control donde se colocó gDNA](#) de

Bd21-3 (banda de 250 pb; Figura 22). No obstante, lo anterior, debido a que en las mutantes se esperaba la ausencia de banda, se decidió continuar con esta muestra.

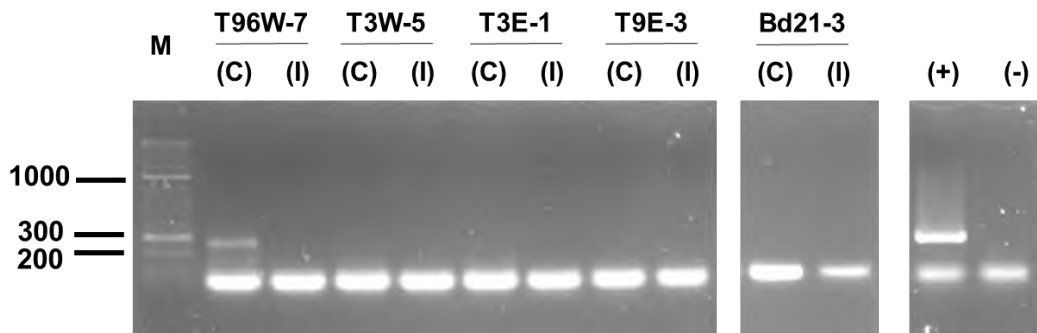


Figura 22. Gel de agarosa al 2 % para la verificación de ausencia de gDNA en muestras de RNA de las líneas de T-DNA y de Bd21-3.

Se utilizó como control Bradi040; M: Marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb (BIO-33054, Bioline). C: control, I: plantas sometidas a inundación, control positivo (+): gDNA de Bd21-3 1:50, control negativo (-): reacción sólo con H₂O.

Una vez que se verificó la ausencia de gDNA en el RNA, se sintetizó el cDNA y se verificó nuevamente con la amplificación de gen Bradi4g31040. En la Figura 23 se puede observar una banda de 150 pb en las muestras de cDNA de control e inundación de las líneas de T-DNA y Bd21-3, en el caso del control positivo se puede observar una banda de 250 pb que corresponde al amplicon genómico con intrón (100 pb). Respecto a la muestra contaminada detectada en la Figura 22, se observó que el tratamiento térmico de la síntesis de cDNA eliminó las trazas de gDNA pues esta muestra (T96W-7) ya no presentó una amplificación correspondiente a gDNA.

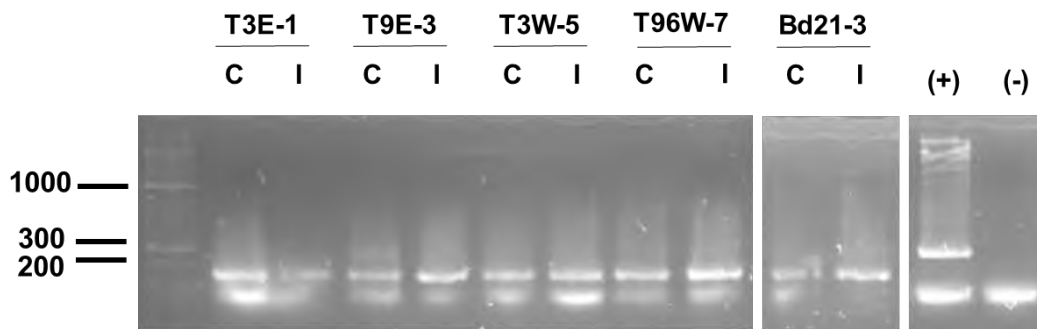


Figura 23. Gel de agarosa al 2 % de verificación del cDNA de las líneas de T-DNA y Bd21-3.

Se utilizó como control a Bradi4g31040; M: marcador de [referencia de longitud](#); C: control, I: plantas sometidas a inundación, control positivo (+): gDNA de Bd21-3 1:50, como control negativo (-): reacción sólo con H₂O.

7.6 Análisis de las familias de FTs

7.6.1 Caracterización global de la expresión de FTs de la familia ERFs/DREB.

De esta familia, llegaron semillas de mutantes de T-DNA para los genes Bradi1g17961 (JJ28379 y JJ 22103), Bradi2g27920 (JJ13579) y Bradi5g08380 (JJ22213). De tal forma, con base en el reporte de Chen *et al.* (2016) se realizó un árbol filogenético con todos los miembros de la familia ERF/DREB (122 genes; 65 DREB/CBF y 57 ERF). En la Figura 24a, se observan las dos grandes divisiones de esta familia, los ERF (designados con la letra B) y los DREB/CBF (letra A). El grupo con más miembros activos durante la inundación a 48 h es la familia ERF con 13 genes regulados positivamente. Después, la familia DREB con sólo 3.

De los 13 ERFs, 4 pertenecieron a la familia B2 que se caracteriza por agrupar a los ERFs-VII que se destacan por participar en los procesos de respuesta a bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia) y que al igual que en *Arabidopsis*, se pueden clasificar en dos grandes grupos: los constitutivos (Bradi4g31040, Bradi3g60120, Bradi1g46690) y los inducibles por hipoxia (Bradi1g72457, Bradi2g27920, Bradi1g17961, Bradi2g11890; Rivera-Contreras *et al.*, 2016; Zamora, 2016). El grupo B4 contiene a 4 ERFs activos en el estrés por inundación (Bradi2g56145, Bradi2g24175, Bradi4g41616 y Bradi5g08380; Figura 24b) con CPM de 50-150. Chen *et al.* (2016) reportaron que estos genes también responden al estrés salino y a la sequía. Se ha reportado que el gen de *Arabidopsis* RAP2.6 es un gen que responde al ácido abscísico, sal y estrés osmótico- es ortólogo de este grupo apoyando esta actividad (Sharoni *et al.*, 2011).

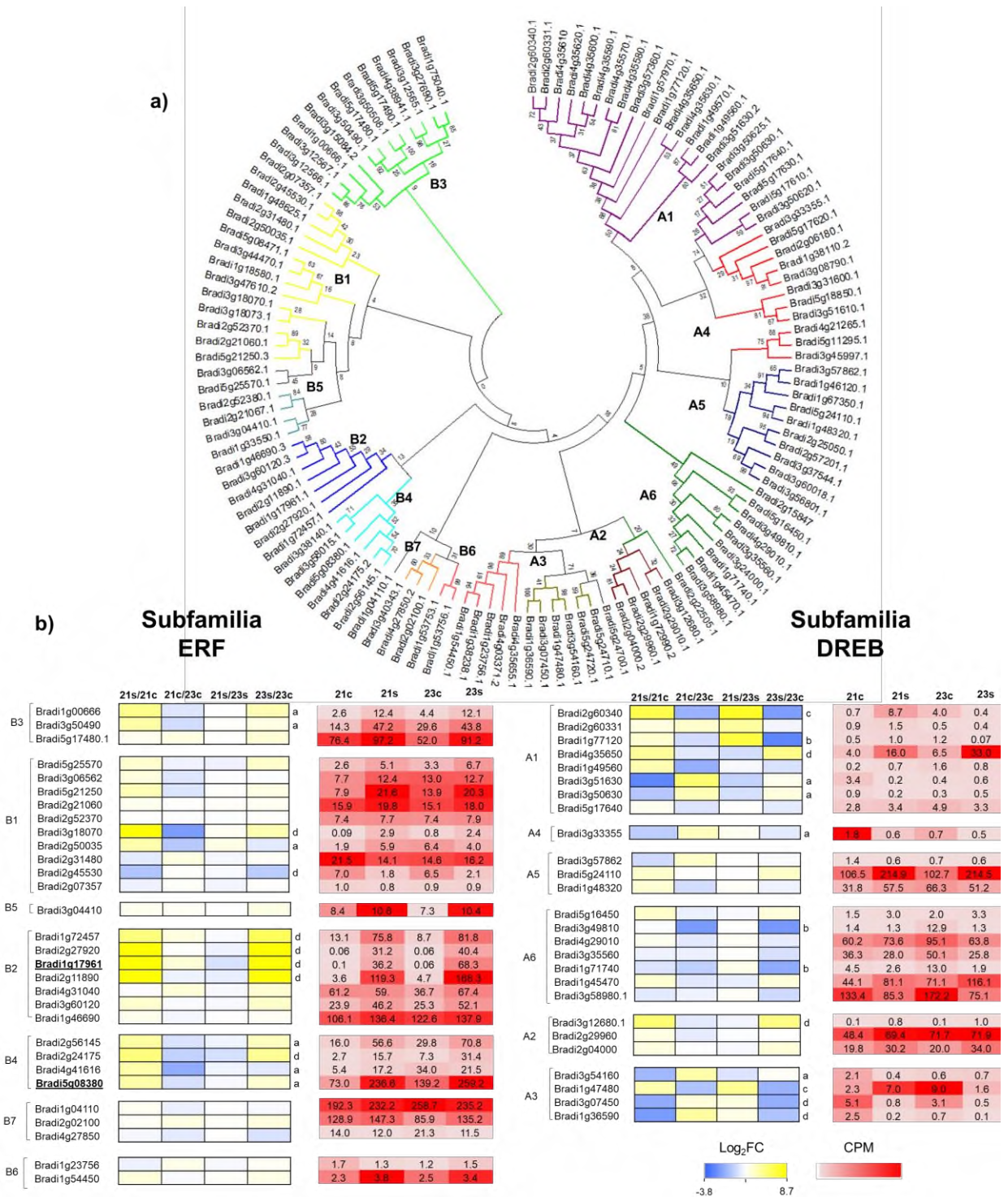


Figura 24. Grupos filogenéticos y perfiles de expresión de la subfamilia ERF/DREB de *Brachypodium distachyon* a 48h de estrés por inundación.

Las letras mayúsculas (A, B) y la numeración (1 al 6) corresponden a la clasificación reportada en (Chen *et al.*, 2016). Las letras minúsculas indican diferencia significativa: a y b regulados positiva o negativamente en Bd21 y Bd2-3, respectivamente; c inversamente regulado entre Bd21 y Bd2-3 y d ambos están regulados positiva o negativamente en ambos ecotipos (FDR < 0.05 × 10⁻⁵; Log₂FC ≥ 1.5 o ≤ -1.5). El color rojo y amarillo indican los valores de Log₂FC

y CPM respectivamente. En negritas y subrayado se indican las líneas disponibles en JGI-DOE y que se probaron en el trabajo.

Otros grupos donde hay ERFs con actividad en inundación son A1, B1 y B3. Se ha visto que el grupo A1 está relacionado con la respuesta al frío (Chen *et al.*, 2016). Sin embargo, en inundación sólo 2 miembros se encuentran activos (Bradi2g60340 y Bradi4g35650) en el ecotipo Bd21 y 2 de ellos apagan su expresión (Bradi3g51630 y Bradi3g50630; Figura 24b), aunque su expresión no sobrepasa 30 CPM a diferencia de los ERFs-VII (B2). Los grupos B1 y B3 cuentan con 3 (Bradi5g21250, Bradi3g18070 y Bradi2g50035) y 2 miembros activos respectivamente (Bradi1g00666 y Bradi3g50490) sin embargo sus valores de abundancia (CPM) no son elevados (13.0, 2.9, 5.9, 12.5 y 47.4 respectivamente) comparados con los del gen Bradi5g08380 (grupo B4) que tiene 237.8 CPM en inundación (Bd21S) por lo que se le considera unos grupos insensibles al estrés (Figura 24b). Hay transcritos que se apagan o prenden, pero su abundancia es muy pequeña haciéndolos de importancia baja o específica de algún tejido.

7.6.2 Análisis de IGV de la Familia ERFs con líneas de T-DNA disponibles

Para observar fenómenos de splicing alternativo e isoformas de mRNA, se analizaron los perfiles de expresión depositados en la base GSE74222 del gen Bradi1g17961 y Bradi2g27920. En la Figura 25 se puede observar que para ambos ecotipos durante el estrés por inundación (Bd21S y Bd23S) estos dos ERFs-VII poseen transcritos expresados que mapean en un intrón, especialmente en Bradi2g27920, lo que indica que puede existir otra versión del gen además de la reportada por Phytozome 12. En el caso del gen Bradi5g08380, que es un ERF del grupo B4, se presenta una estructura exón-intrón idéntica a la que se encuentra en la base de datos Phytozome 12 donde el intrón no posee señales de expresión y se observa como un valle.

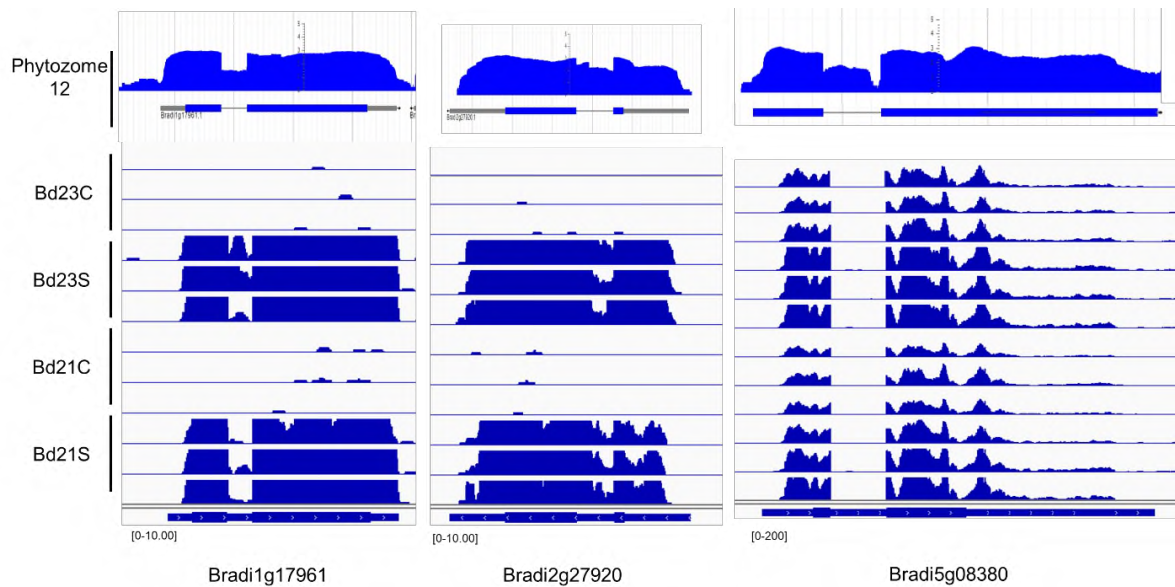


Figura 25. Cartogramas de alineamiento de secuencias de expresión de los ERFs que se expresan durante inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.

7.6.3 Verificación de la inserción de T-DNA de genes de la familia ERF

Se realizó una PCR con los oligonucleótidos de la Tabla 19 para realizar la identificación de las plantas homocigotas (T/T), hemicigotas (T/W) y silvestres (W/W) de cada línea de T-DNA. La línea JJ28379 (Bradi1g17961/ERF-VII) tuvo 10 individuos que germinaron, de los cuales, cuatro fueron homocigotos (3, 6, 7 y 8) ya que presentaron una banda de 469 pb, cuatro fueron hemicigotos (1, 5, 9 y 10) porque presentaron bandas de 978 y 469 pb, y finalmente, dos WT que pueden observarse con una banda de 978 pb idéntica al control positivo (Figura 26).

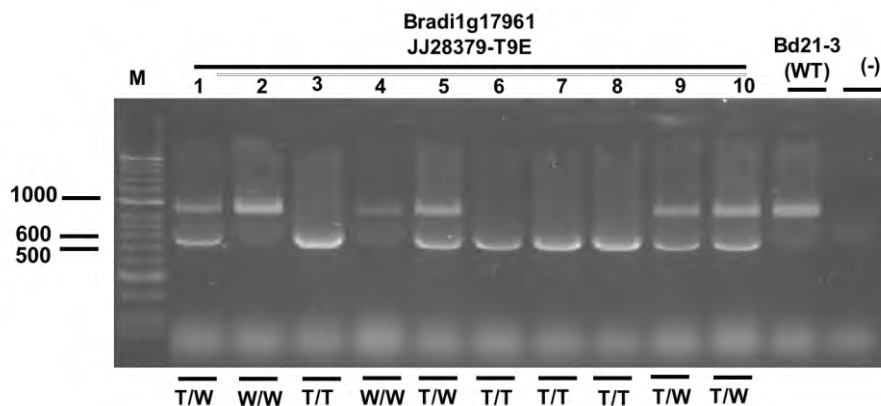


Figura 26. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ28379 del gen Bradi1g17961 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 10 corresponden al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

La línea JJ22103 (Bradi17961/ERF-VII) tuvo 5 individuos, tres homocigotos (1, 3 y 4) que presentaron una banda de alrededor de 478 pb, uno hemicigoto (2) que presentó bandas de 978 y 478 pb, y un WT con una banda de 978 pb (Figura 27).

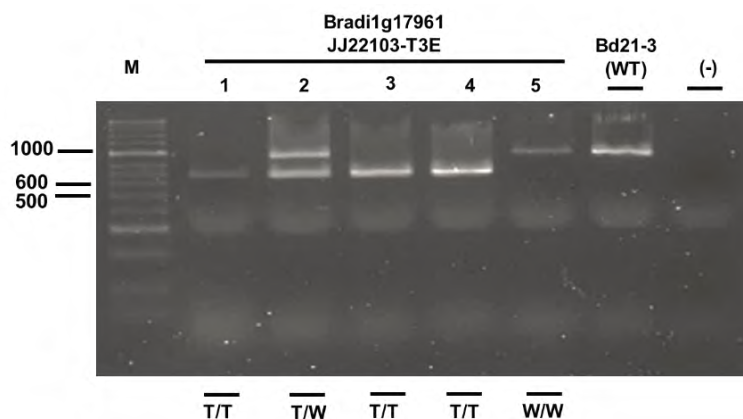


Figura 27. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ22103 del gen Bradi1g17961 de *Brachypodium*

Los números del 1 al 5 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

La línea JJ13579 (Bradi2g27920/ERF-VII) tuvo un total de ocho plantas, tres fueron hemicigotas (4, 5 y 7) debido a que presentaron bandas una de 980 y 481 pb y cinco WT que presentaron una banda de 980 pb (Figura 28).

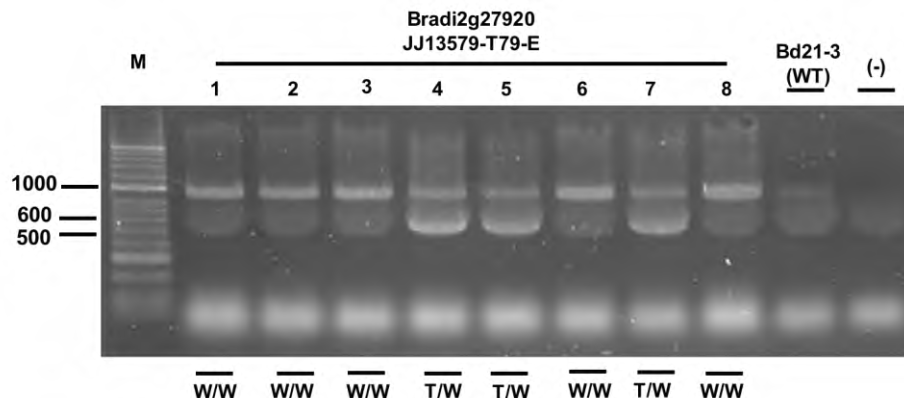


Figura 28. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ13579 del gen Bradi2g27920 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 8 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

La línea JJ2213 (Bradi5g08380/ERF-B4) tuvo 10 plantas, dos homocigotas (3 y 10) con una banda correspondiente a 520 pb, cuatro fueron hemicigotas (1, 2, 4 y 9) con bandas de 998 y 520 pb, y cuatro de tipo WT (5, 6,7, y 8) en donde sólo se observa una banda de 998 pb (Figura 29).

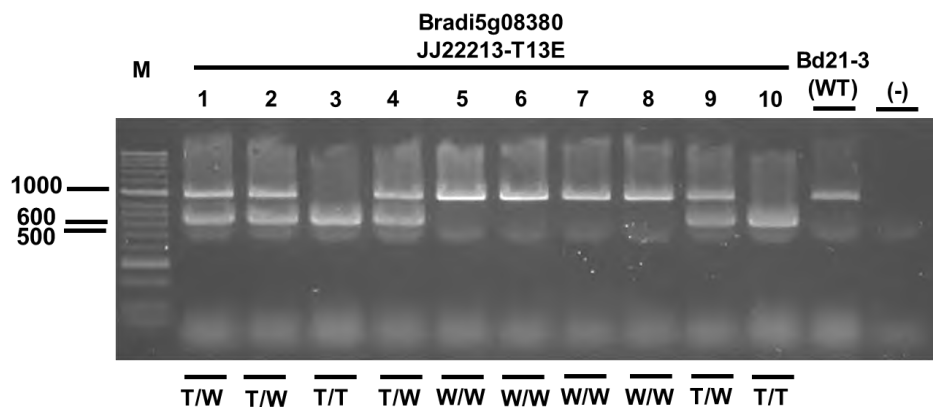


Figura 29. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ22213 del gen Bradi5g08380 de *Brachypodium*

Los números del 1 al 10 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

Posteriormente del análisis por PCR sólo se contó con tres líneas homocigotas de T-DNA de la familia ERF, JJ28379 y JJ22103, ambas con T-DNA en el gen Bradi1g17961 (ERF-VII). Al llegar a madurez, sí se obtuvieron semillas para realizar los experimentos posteriores. Al contrario, para la línea JJ22213 del gen Bradi5g08380 (ERF-B4) no se obtuvieron semillas suficientes de las planas homocigotas (1 planta estéril, y la otra sólo tuvo 10 semillas) para realizar los ensayos.

7.6.4 Representación esquemática de las líneas de T-DNA de la familia ERFs

En la Figura 30 se muestran esquemáticamente las regiones de los intrones /exones de cada línea de T-DNA, así como las regiones en donde se realizó el diseño de oligonucleótidos para PCR y RT-PCR; también se representa la estructura de dominios de la proteína. Para el gen Bradi1g17961, la inserción de ambas líneas se encuentra en el segundo exón y por lo tanto estarían

interrumpiendo al dominio AP2 que tiene la función de unión a DNA por lo que se espera que actúe como una verdadera pérdida de función. Como se puede observar, la inserción para el gen Bradi5g08380 se encuentra en una zona intergénica a 88 pb del inicio del 5'UTR por lo que se esperaría que estaría bloqueando la síntesis del mRNA en una etapa temprana de la transcripción.

7.6.5 Caracterización global de la expresión de FTs de la familia WRKY

De esta familia, llegaron semillas mutantes de T-DNA para los genes Bradi2g16150 (JJ28416), Bradi2g54720 (JJ20483) y Bradi2g22440 (JJ19596). La familia WRKY consta de 86 miembros y se pueden apreciar 7 subgrupos de esta familia de FTs (Figura 31a). Cuenta con 12 miembros activos durante estrés por inundación en el ecotipo Bd21 que pertenecen a los grupos IIa, IIb, IN, IIc, IId, y III, sin embargo los valores de CPM que presentan estos genes son muy bajos (Bradi1g30870: 25.2; Bradi1g52030: 2.8; Bradi2g05500: 4.9; Bradi2g16150: 2.4; Bradi2g53760: 32.3; Bradi2g22440: 5.6; Bradi2g33540: 14.1; Bradi2g54720: 21.5; Bradi2g15877: 25.7; Bradi1g63910: 35.9; Bradi3g09810: 11.3 y Bradi2g44035: 39), con excepción del gen Bradi4g01950 que tiene un valor de 487.6 CPM (Bd21S; constitutivo). De los WRKYs que cambian su expresión, la mayor parte tienden a aumentarla en estrés pro inundación, excepto Bradi3g34567 en el grupo IId que baja su expresión. El resto de los grupos, la mayor parte de los transcritos se mantiene insensible, aunque como ya se mencionó, los grupos tienen a algún miembro que aumenta su transcripción (Figura 31b).

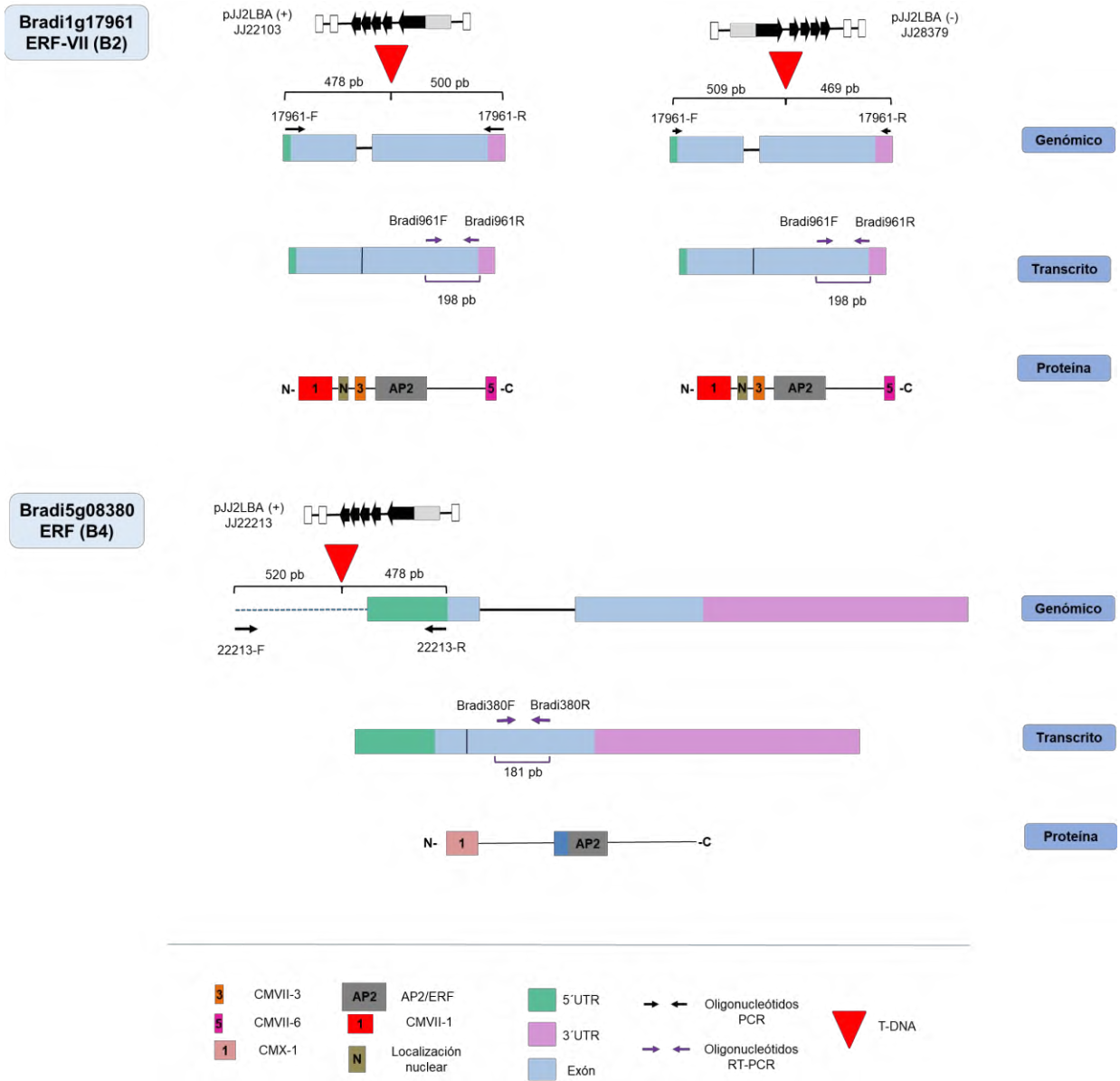


Figura 30. Representación esquemática del sitio de inserción del T-DNA para cada línea de la familia ERF.

Los triángulos rojos indican el sitio de inserción y arriba la representación del T-DNA que corresponde al pJJ2LBA y su orientación. La línea continua representa el intrón en la estructura génica, la línea punteada en color azul indica la región intergénica, en verde se indica la región 5'UTR, en rosa la región 3'UTR y en azul el exón. Las flechas indican la zona del diseño de los oligonucleótidos para PCR y RT-PCR, así como su código (Tablas 14 y 15). Se indican con corchetes las distancias que hay entre los oligonucleótidos y el T-DNA. Los cuadros de colores numerados indican los dominios conservados de las estructuras proteicas.

En otras condiciones reportadas en la literatura para *Brachypodium*, se ha visto que varios WRKY están involucrados en procesos del crecimiento y desarrollo de órganos o tejidos ya que

presentaron su mayor expresión en raíz y tallo: Bradi2g49020 (IIc), Bradi1g14300 (IId), Bradi3g19640, Bradi4g06690, Bradi1g23340 y Bradi4g01950 (IN) este último se encuentra muy activo durante la inundación. Los WRKYs también se expresan en la respuesta temprana a fitopatógenos como *Fusarium graminearum* y *Magnaporthe grisea* (Bradi2g16150, IIb), el primer hongo afecta a la cebada en los periodos de lluvia y causa pudrición de la raíz y la muerte de las plantas, el segundo hongo causa daño en el tejido aéreo y las raíces de varios cereales de importancia agrícola. Otras condiciones de estrés en las que están involucrados los WRKYs son la respuesta al frío y calor (Bradi2g22440, IN) y la sal. Tanto Bradi2g16150 (2.4 CPM) como Bradi2g22440 (5.5 CPM) también se expresan en *Brachypodium* ante inundación, lo que indicaría que la planta está respondiendo a fitopatógenos y a señales de estrés cruzadas Wen *et al.* (2014).

Para el caso de Bradi2g54720, no se encontró su registro en la literatura como un gen relevante en respuesta a estrés biótico o abiótico, No obstante, en el caso del estrés por inundación, tuvo expresión diferencial estadísticamente significativa (Figura 31b). Para Bradi2g54720, Bradi2g22440 y Bradi2g16150 se obtuvieron mutantes de T-DNA, pero sólo para Bradi2g22440 y Bradi2g54720 se obtuvieron homocigotos.

Log₂FC ≥ 1.5 o ≤ - 1.5). El color rojo y amarillo indican los valores de Log₂FC y CPM respectivamente. En negritas y subrayado se indican las líneas disponibles en JGI-DOE y que se probaron en el trabajo.

7.6.6 Análisis de IGV de la Familia WRKYs con líneas de T-DNA disponibles

En el análisis del IGV los genes WRKYs Bradi2g16150 y Bradi2g22440 en todas las condiciones se observa el mismo patrón en las regiones de los exones e intrones de acuerdo a la estructura reportada por Phytozome 12. Sin embargo, para el gen Bradi2g54720 se puede observar una región de expresión en la zona entre el primer y segundo exón, lo que podría indicar una variante de este gen adicional a las reportadas por Phytozome 12, que también presenta expresión en el intrón, aunque en sus condiciones se presentó de baja expresión. (Figura 32).

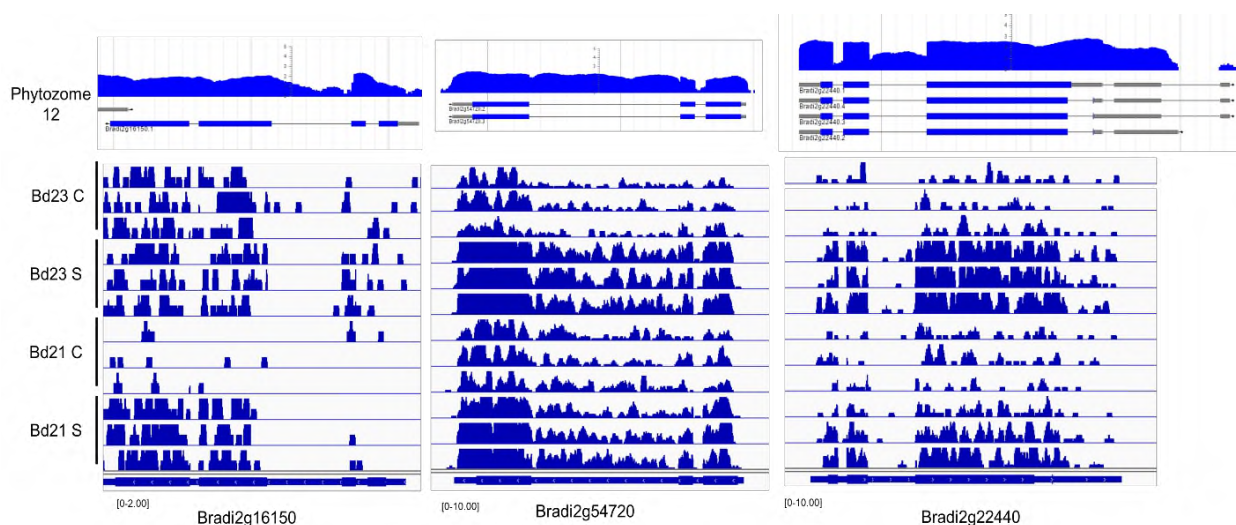


Figura 32. Cartogramas de alineamiento de secuencias de expresión de los WRKYs que se expresan durante inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.

7.6.7 Verificación de la inserción de T-DNA de genes de la familia WRKY

El análisis de PCR para la línea JJ28416 (Bradi2g16150) contó con 10 plantas de las cuales dos fueron del tipo silvestre (2 y 3) ya que solo presentaron una banda de 900 pb y el resto fueron hemocigotos (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) en las que se pudo observar las dos bandas, una correspondiente a los 900 pb y la segunda de alrededor de 500 pb (Figura 33).

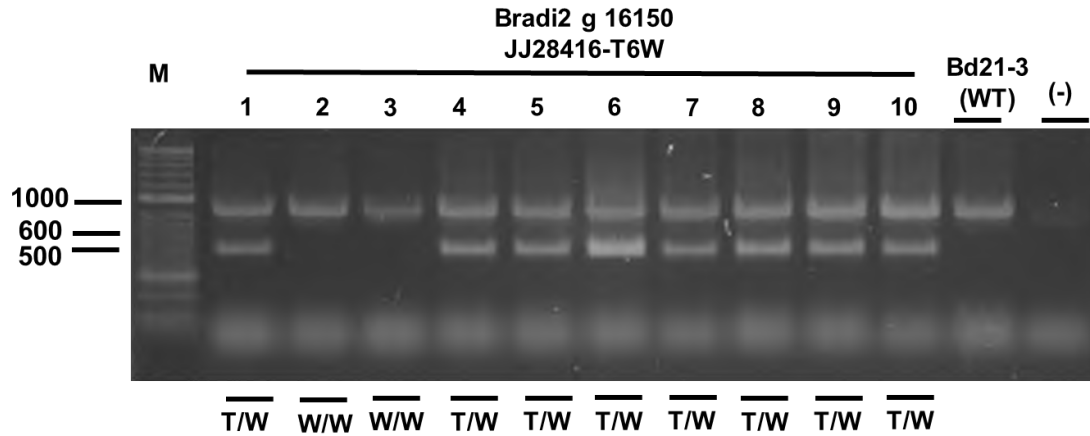


Figura 33. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ28416 del gen Bradi2g16150 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 10 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

La línea JJ20483 (Bradi2g54720) tuvo 9 plantas, cinco homocigotas (1, 2, 5, 7 y 9) que presentaron una banda de 363 pb, y cuatro del tipo silvestre (3, 4, 6, y 8) que sólo presentaron una banda de 999 pb (Figura 34).

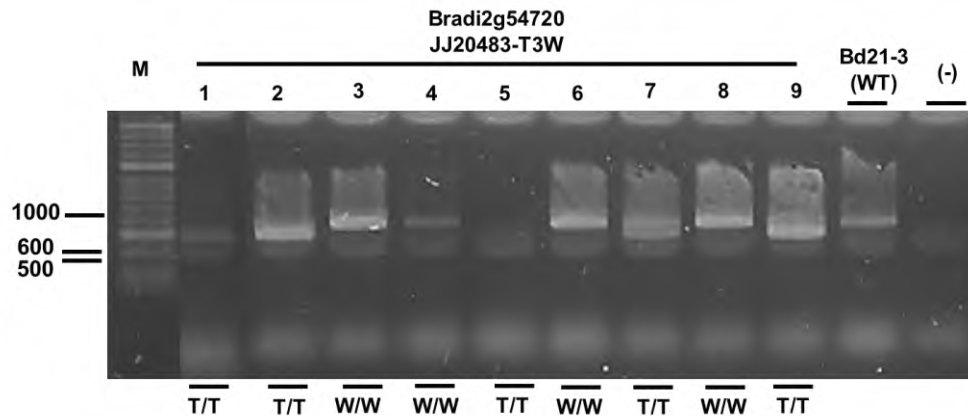


Figura 34. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ20483 del gen Bradi2g54720 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 9 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

De la línea JJ19596 (Bradi2g22440) se obtuvieron ocho plantas, dos homocigotas (6 y 7) que presentaron una banda que corresponde a 479 pb, cinco hemicigotas (1 al 5) que presentaron

bandas, una que corresponde a 970 y otra de 479 pb, una del tipo silvestre con una banda de 970 pb (Figura 35).

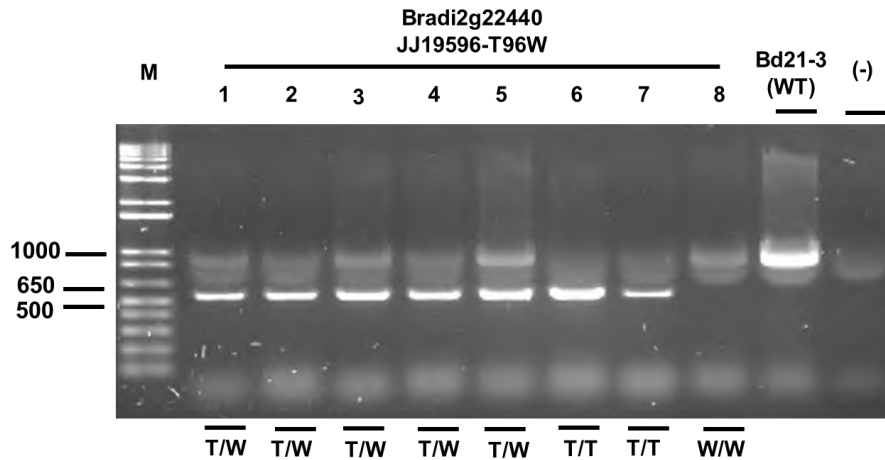


Figura 35. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ19596 del gen Bradi2g22440 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 8 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

7.6.8 Representación esquemática de las líneas de T-DNA de la familia WRKY

De la familia WRKY solo dos líneas presentaron plantas homocigotas, JJ19596 del gen Bradi2g22440 y JJ20483 del gen Bradi5g54720. En la figura 36 se muestran [esquemas representativos de las secuencias de los genes y representación de dominios de las proteínas](#), así como las regiones en las que se diseñaron los oligonucleótidos de PCR y RT-PCR. Como se observa en Bradi2g22440 y Bradi2g54720, la inserción de T-DNA se encuentra en el segundo intrón que estaría modificando al dominio WRKY en ambas proteínas (dominios 1 y 3), este dominio tiene la función de unión a DNA.

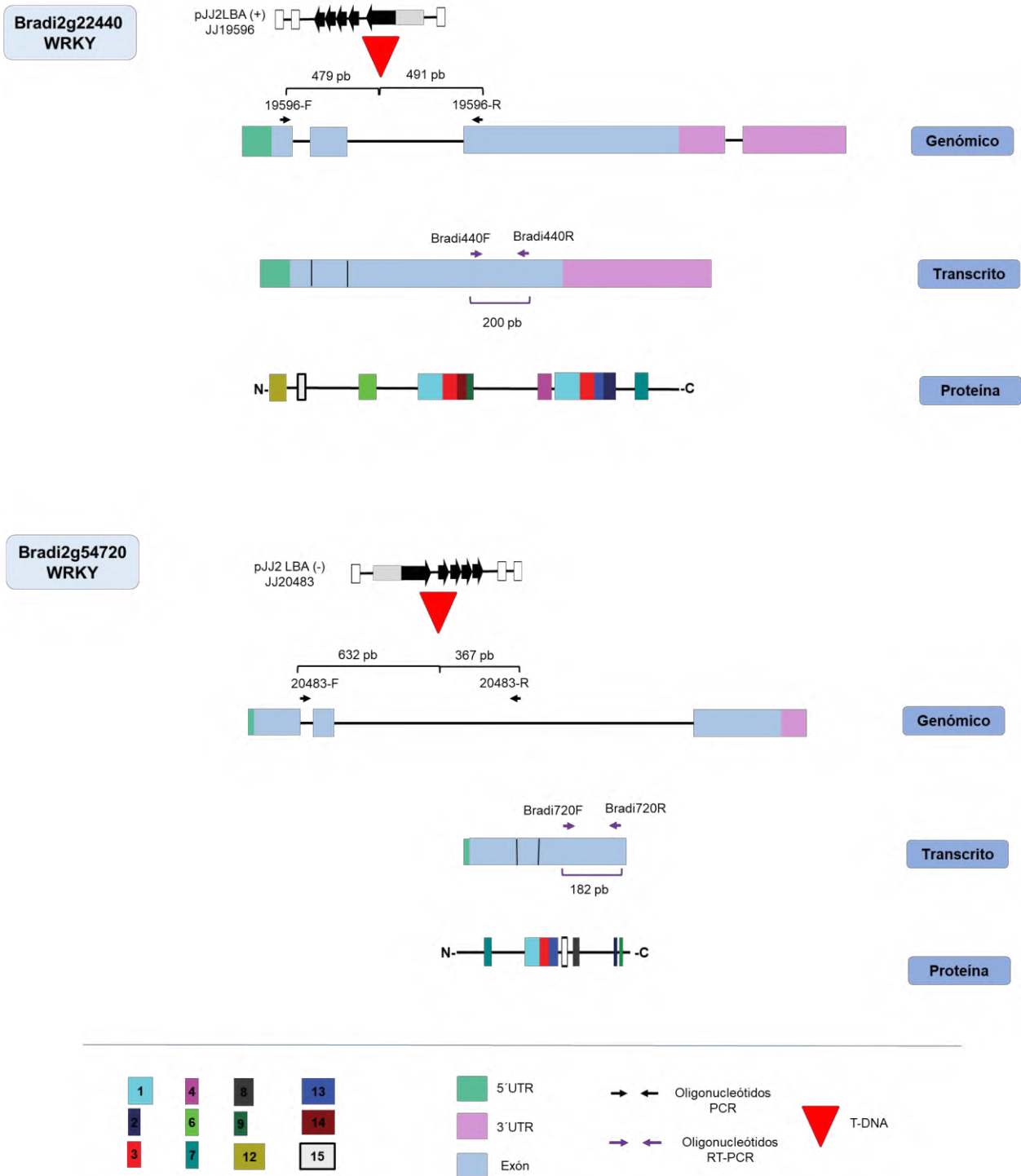


Figura 36. Representación esquemática del sitio de inserción del T-DNA para cada línea de la familia WRKY. Los triángulos rojos indican el sitio de inserción y arriba la representación del T-DNA que corresponde al pJJ2LBA y su orientación. La línea continua representa el intrón en la estructura génica, en verde indica la región 5'UTR, en rosa la región 3'UTR y en azul el exón. Las flechas indican la zona del diseño de los oligonucleótidos para PCR y RT-PCR, así como su código (Tablas 19 y 20). Se indican con corchetes las distancias que hay entre los oligonucleótidos y el T-DNA. Los cuadros de colores y con números indican los dominios conservados de las estructuras proteicas

7.6.9 Análisis global de la expresión de FTs de la familia DNAJ

De esta familia llegaron semillas de líneas de mutantes de T-DNA para el gen Bradi2g55797 (JJ2214 y JJ2207), que está regulado positivamente en inundación y posee 19 CPM, sin embargo no hubo plantas homocigotas, pero sí se realizaron estudios bioinformáticos.

Debido a que no hay reportado un árbol filogenético de la familia DNAJ para *Brachypodium* se realizó la identificación de los miembros de esta familia tomando como referencia cuatro secuencias de la familia DNAJ de *Arabidopsis*: At3g44110, At5g25530, At5g06110 y At5g11500. Las búsquedas se realizaron en la base de datos de la NCBI con la herramienta BLASTP. De las comparaciones realizadas con cada una de las secuencias de referencia, se obtuvo un listado de 136 candidatos, posteriormente se verificaron en la base de datos de Phytozome 12 y se excluyeron aquellas que estaban repetidas dando un total de 119 secuencias. Se realizó como referencia un árbol filogenético donde se incluyó las secuencias de la familia DNAJ de *Arabidopsis* reportadas por Rajan y D'Silva (2009). Posteriormente se realizó el árbol filogenético con sólo las 119 secuencias de *Brachypodium* (Figura 37a) y ambos árboles filogenéticos se compararon con el reportado por Sarkar *et al.* (2013) para arroz. Se clasificó a la familia DNAJ de *Brachypodium* en tres grupos (Tipo I a III). De acuerdo a estos análisis se puede observar que Bradi2g55797 pertenece a un DNAJ del tipo III (Figura 37a).

La familia DNAJ de *Brachypodium* cuenta con seis miembros regulados positivamente durante la inundación (Figura 37b), Bradi2g55797, Bradi2g19010, Bradi1g63810, Bradi3g42400, Bradi4g28980, Bradi1g06980; y dos que apagan su expresión, Bradi2g43040 y Bradi1g43090 que pertenecen al tipo III. También se pudo identificar que el gen más abundante de esta familia es Bradi1g13640 del tipo II con 860 CPM (Bd21S, que mantiene su expresión). El resto de los genes se mantiene insensible al estrés o ser específicos de algún tejido.

7.6.10 Análisis de IGV de la Familia DNAJ con líneas de T-DNA disponibles

Para el análisis del gen Bradi2g55797 de la familia DNAJ se puede observar que existe una región con valores de expresión en todas las condiciones (Bd21C, Bd21S, Bd23C y Bd23S) en la zona entre el primer y segundo exón lo que podría indicar una variante del gen que no se encuentra reportada en Phytozome 12 lo que correspondería a un exón en la región que está indicada como intrón (Figura 38).

respectivamente; c inversamente regulado entre Bd21 y Bd2-3 y d ambos están regulados positiva o negativamente en ambos ecotipos ($FDR < 0.05 \times 10^{-5}$; $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$ o ≤ -1.5). El color rojo y amarillo indican los valores de Log_2FC y CPM respectivamente. En negritas se indican las líneas disponibles en JGI-DOE.

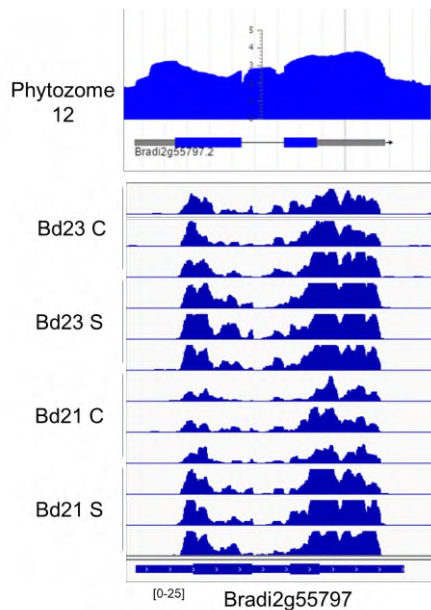


Figura 38. Cartograma de alineamiento de secuencia de expresión del DNAJ que se expresan durante inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.

7.6.11 Verificación de la inserción de T-DNA del DNAJ

El gen Bradi2g55797 de la familia DNAJ cuenta con dos líneas de T-DNA: JJ2207 y JJ2214. Para la línea JJ2207 todos los individuos fueron del tipo silvestre ya que presentaron una banda de 982 pb (Figura 39). Puede ser que la transformación de esta línea en JGI-DOE no haya sido exitosa, que está mal mapeada o que indique que la delección del gen es letal.

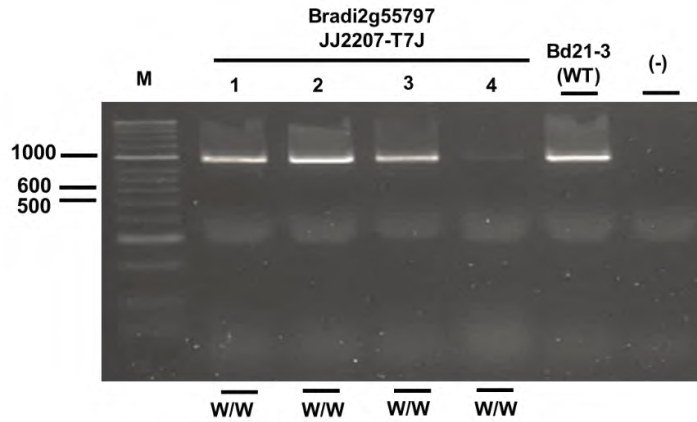


Figura 39. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ2207 del gen Bradi2g55797 de *Brachypodium*

Los números del 1 al 4 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

Para la línea JJ2214 al igual que la anterior todas las plantas fueron del tipo silvestre ya que sólo presentaron la banda de los 982 pb, lo que indica que no poseen un T-DNA en el gen Bradi2g55797 (Figura 40).

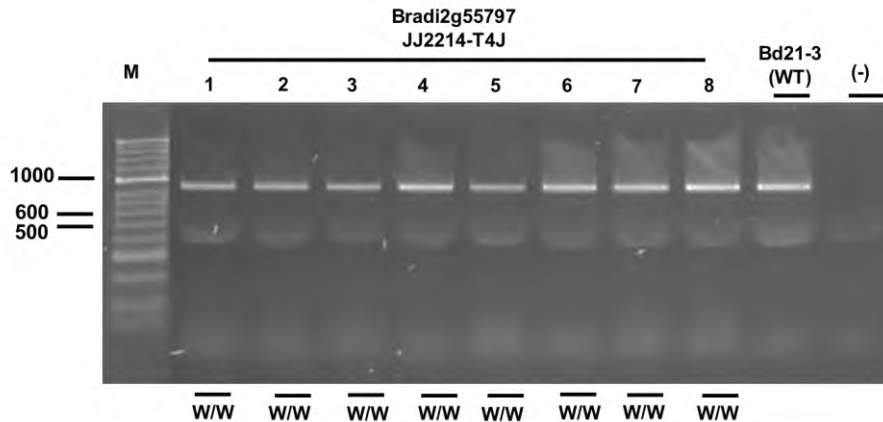


Figura 40. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ2214 del gen Bradi2g55797 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 8 corresponde al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

7.6.12 Análisis de IGV de la Familia DNAJ

En el caso del gen Bradi1g20450 de la familia MYB (de la que llegaron semillas de mutantes de T-DNA JJ20097) se puede observar que su estructura predicha por Phytozome 12 es la misma que se puede visualizar en el transcriptoma en inundación de *Brachypodium* con un intrón bien definido (Figura 41).

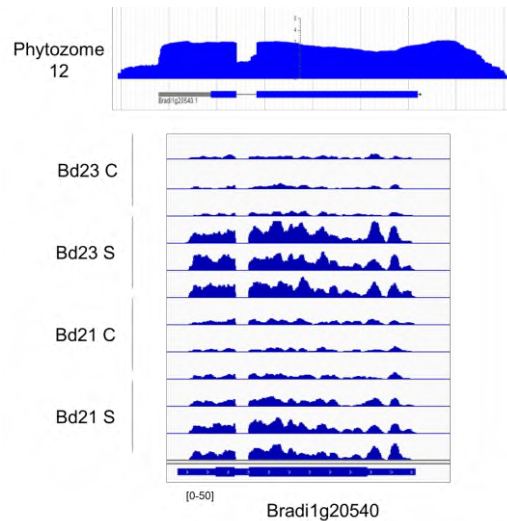


Figura 41. Cartograma de alineamiento de secuencia de expresión del MYB que se expresan durante inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21, Bd2-3) visualizados en IGV.

7.6.13 Verificación de la inserción de T-DNA del MYB

El gen Bradi1g20540 sólo contó con una línea de T-DNA, JJ20097 que tuvo todas las plantas del tipo silvestre ya que se observó la banda de los 990 pb (Figura 42).

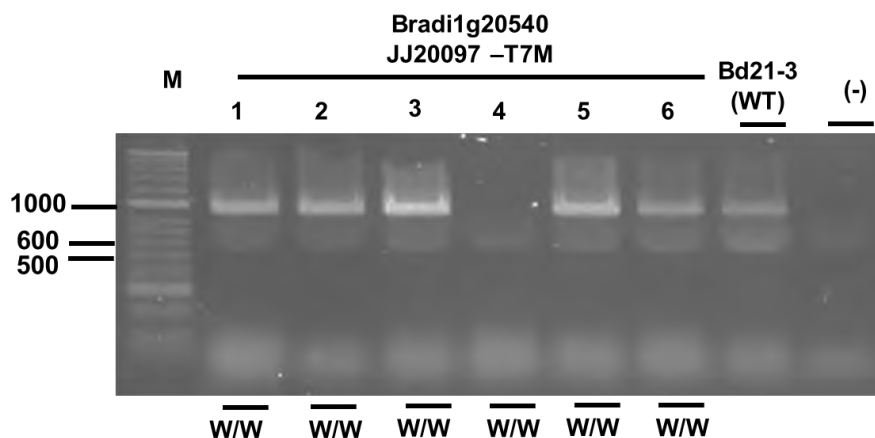


Figura 42. Gel de agarosa al 1.5 % de productos de PCR para genotipificación de la línea JJ20097 del gen Bradi1g20540 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 6 corresponden al total de individuos; M: corresponde al marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb, se utilizó como control negativo (-) ddH₂O y Bd21-3 control silvestre (WT). En la parte inferior se indica el resultado obtenido, los cuales corresponden a T/W: hemicigoto, T/T: homocigoto; W/W: silvestre.

7.6.14 Análisis global de la expresión de FTs de la familia bZIP

A pesar de que para la familia bZIP no llegaron líneas de T-DNA, también se realizó el análisis bioinformático de los homólogos en *Arabidopsis* que están involucrados en el control de sacarosa como bZIP1, bZIP2, bZIP11, bZIP44 y bZIP53. De especial interés es que en *Arabidopsis* poseen uORFs que codifican un péptido de 28 residuos que permite el control reprimible por sacarosa y que también se ha visto altera la traducción eficiente del mRNA durante la hipoxia (Rahmani *et al.*, 2009; Juntawong *et al.*, 2013). Por lo que son un punto clave en la red de regulación en la activación de genes en respuesta al estrés o al hambre (Rahmani *et al.*, 2009).

De acuerdo a lo reportado por Liu y Chu (2015) la familia bZIP de *Brachypodium* se conforma por 96 genes que a su vez se dividen en nueve grupos (Figura 43a). Los bZIPs tienen tres miembros prominentemente activos durante la inundación: Bradi2g38380 (IX), Brad3g60870 (VI) y Bradi3g02730 (VIII) y un gen negativamente sensible a la inundación, Bradi4g27720 (IX). Adicionalmente, hay seis genes que apagan su expresión: Bradi3g22040 (IX), Bradi4g27720 (IX), Bradi4g32920 (IX), Bradi4g02570 (VII), Bradi2g50220 (II) y Bradi5g23340 (III). En la Figura 43b se puede observar que el gen más abundante es Bradi2g38380 con 445 CPM (Bd21S) del grupo IX.

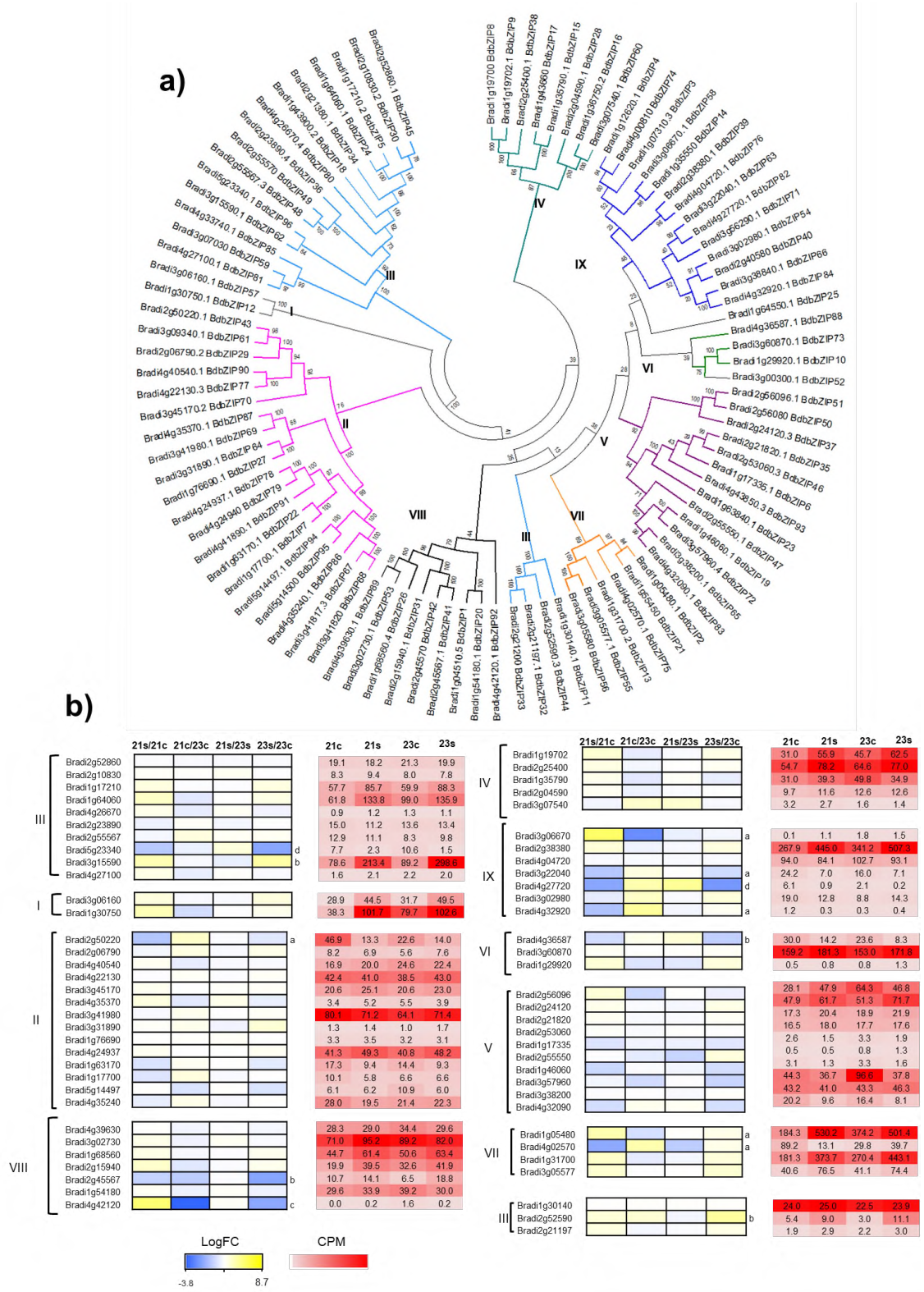


Figura 43. Grupos filogenéticos y Perfiles de expresión de la subfamilia bZIP de *Brachypodium distachyon* a 48h de estrés por inundación.

Los números romanos corresponden a la clasificación reportada por Liu y Chu (2013). Las letras minúsculas indican diferencia significativa: a y b regulados positiva o negativamente en Bd21 y Bd2-3, respectivamente; c inversamente

regulado entre Bd21 y Bd2-3 y d ambos están regulados positiva o negativamente en ambos ecotipos ($FDR < 0.05 \times 10^{-5}$; $\text{Log}_2FC \geq 1.5$ o ≤ -1.5). El color rojo y amarillo indican los valores de Log_2FC y CPM respectivamente.

7.6.15 Búsqueda de los uORF en los miembros de la familia bZIP de *Brachypodium*

Se analizaron todos los miembros de la familia bZIP en especial el grupo IX que fue el que presentó mayor homología con el bZIP11 de *Arabidopsis*. En *Brachypodium* este grupo está formado por catorce miembros de los cuales seis no registran expresión detectable, y siete presentaron uORFs en la región 5' y son: Bradi3g06670, Bradi2g38380, Bradi4g04720, Bradi3g22040, Bradi4g27720, Bradi3g02980 y Bradi4g32920. Sin embargo, sólo cinco de ellos presentaron un SIRT-uORF similar al de bZIP11 de *Arabidopsis* y poseen características de expresión cambiante ante la inundación, mientras Bradi2g38380 (445 CPM en 21S) es constitutivo y altamente expresado, Bradi4g27720 y Bradi3g22040 se apagan significativamente. En el caso de Bradi3g06670, se puede observar que presenta un uORF, pero no es del tipo SIRT-uORF; en la Figura 44 se puede observar la estructura génica de cada uno de ellos y la localización de los uORF en la región del 5'UTR. Las distancias del codón de parada del uORF al codón de inicio del marco de lectura abierto principal (AUG) del bZIP están en el rango de 113 a 255 nucleótidos, que son similares a las reportadas para los bZIP de *Arabidopsis* (71 a 255 aminoácidos) y que son importantes para el mecanismo de regulación SIRT (Rahmani *et al.*, 2009).

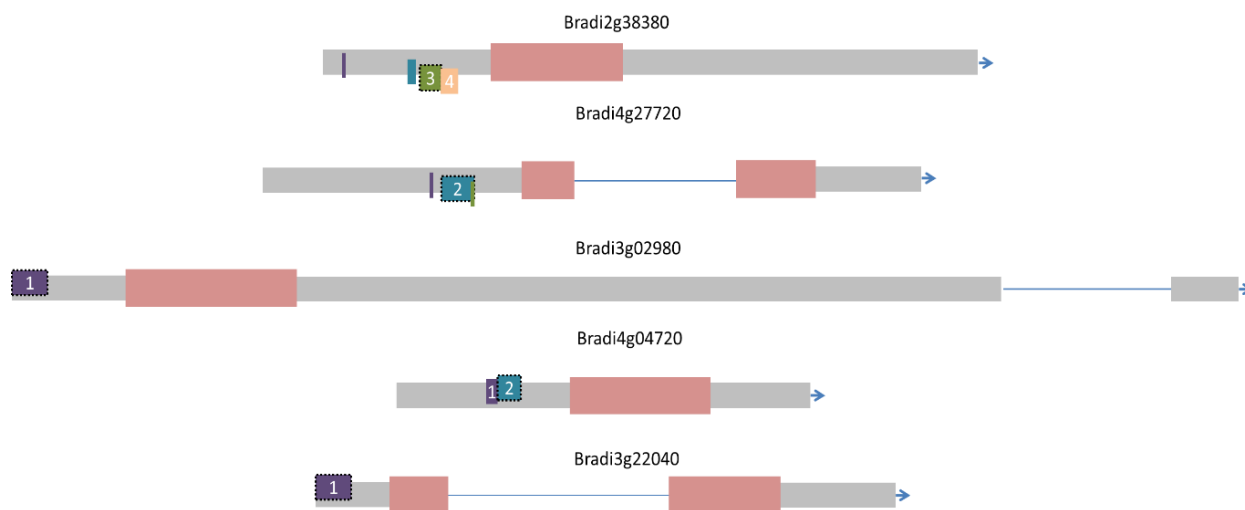


Figura 44. Representación de la estructura génica de los bZIP de *Brachypodium*.

Los uORFs están numerados y los cuadros de colores indican la posición del uORF: morado 1, azul 2, verde 3 y rosa claro 4. El contorno punteado indica la posición del SIRT-uORF; cada estructura génica va del 5' al 3'UTR, la línea azul indica la zona de los intrones.

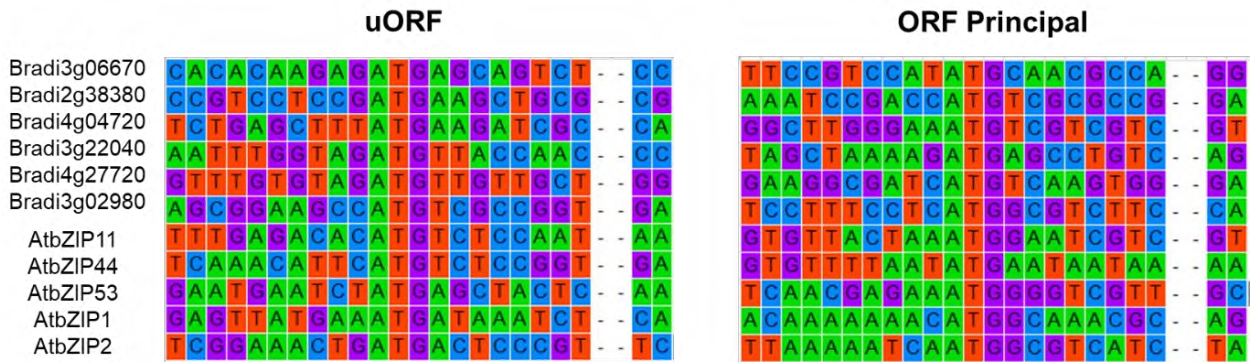


Figura 46. Alineamiento de consensos de los uORF y del ORF principal de *Brachypodium* identificados a partir del bZIP11 de *Arabidopsis*.

En el análisis se incluyeron los bZIP de *Arabidopsis*. Del lado izquierdo las secuencias corresponden a los codones que rodean al codón del uORF y del lado izquierdo al ORF principal de los bZIP.

La importancia biotecnológica de estos bZIPs y sus uORFs, se destacó por Sagor *et al.* (2015) quienes identificaron dos homólogos del bZIP11 de *Arabidopsis* en el Tomate, *SlbZIP1* y *SlbZIP2*, y posteriormente desarrollaron a partir de la eliminación transgénica del mecanismo de represión por sacarosa a plantas transgénicas de tomate más dulces al mejorar hasta 1.5 veces, el contenido de azúcar comparado con las silvestres. Por lo que en *Brachypodium* podría estudiarse más a fondo este mecanismo de represión para la conservación del carbono y aumento de la calidad de frutales.

7.7 Análisis mediante RT-PCR

Como primer paso, se verificó que los oligonucleótidos de RT-PCR tuvieran el tamaño del amplicón esperado (Figura 47) excepto para el caso del oligonucleótido del gen Bradi1g17961 que se utilizaron los oligonucleótidos diseñados en un trabajo anterior (Zamora, 2016), y una vez que se pudo confirmar su utilidad, se pasó verificar la ausencia del transcrito por efecto de la inserción de T-DNA mediante RT-PCR en muestras que se colectaron a 48 h de las líneas de T-DNA homocigotas en condiciones control y de inundación, así como también las muestras de Bd21-3.

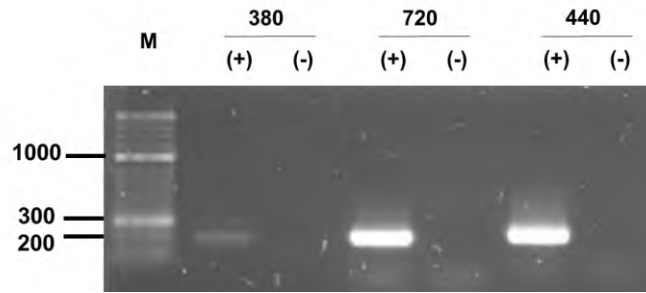


Figura 47. Gel de agarosa al 1.5 % para verificación de los oligonucleótidos para RT-PCR utilizando gDNA de Bd21-3.

Se utilizó como control negativo (-) ddH₂O; en el gel se pueden observar bandas de alrededor de 200 pb. Los números en la parte superior corresponden a los tres últimos dígitos del nombre del oligonucleótido empleado como se muestra en la Tabla 21, M: marcador de [referencia de longitud](#) HyperLadder 50 pb (BIO-33054, Bioline).

El análisis por RT-PCR (Figura 48a, b) reveló que como se esperaba, las líneas T3E-1 (JJ22103, Bradi1g17961, ERF-VII) y T3W-5 (JJ20483, Bradi2g54720, BdWRKY57) no presentaron un transcrito detectable para sus respectivos genes, siendo líneas KO verdaderas. En el caso de las líneas T9E-3 (JJ28379, Bradi1g17961, ERF-VII) y T96W-7 (JJ19596, Bradi2g22440, BdWRKY46) en la condición control, se pudo observar una banda ligera, lo que podría indicar que se trata de una mutante KO "*leaky*" (Figura 48c, d). Para el caso de las plantas silvestres, se pudo confirmar en todos los casos que se seleccionaron genes inducibles por estrés por inundación.

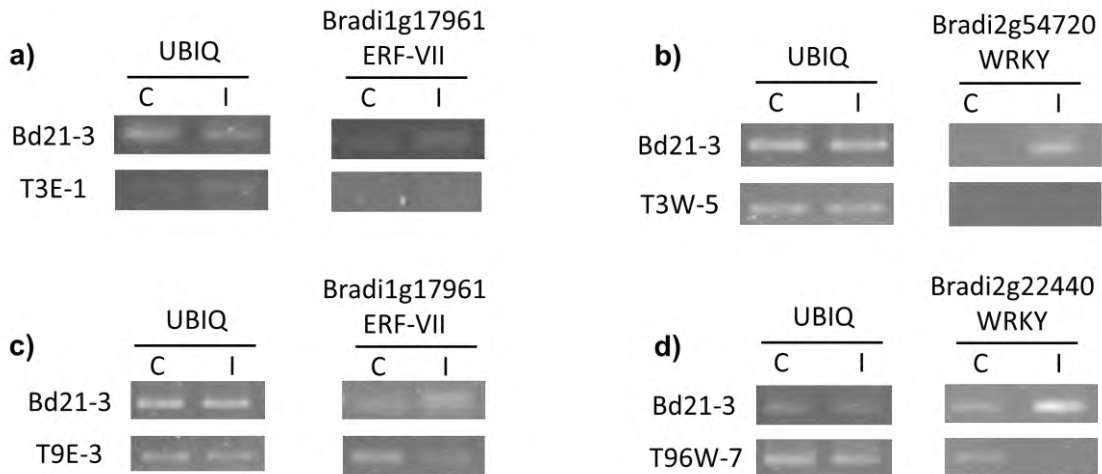


Figura 48. Análisis de RT-PCR de los niveles de transcripción de las líneas de T-DNA.

El RNA se extrajo de la parte aérea de las plantas homocigotas y plantas silvestres (Bd21-3) sometidas a 48 h de estrés.

7.8 Ensayo de inundación con Bd21-3

Dado que en un reporte anterior (Rivera-Contreras *et al.*,2016) se reportó que Bd21 es un ecotipo sensible a la inundación, pero no se incluyó al fondo genético Bd21-3 de las mutantes empleadas en el presente trabajo, surgió la necesidad de determinar su tolerancia relativa. Así, se realizaron 3 ensayos de inundación con los ecotipos Bd21 (sensible), Bd2-3 y Tek-10 (tolerantes) e incluyendo a Bd21-3 durante la inundación y así poder comparar el comportamiento en estrés de las líneas de T-DNA.

El primer ensayo de inundación se realizó con los cuatro ecotipos y con los tiempos 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4,5 y 6 días de inmersión. El ensayo confirmó lo reportado anteriormente y Bd21 se observó como el ecotipo más sensible, mientras que Bd21-3 presentó visualmente una tolerancia incluso superior a los ecotipos reportados anteriormente como tolerantes (Figura 49). Al cuantificar la respuesta al estrés como porcentaje de hojas sanas, se puede observar que, entre los individuos rescatados al tercer día de inundación, Bd21 presenta la mayor dispersión de datos y Bd21-3 la menor, aunque todavía no hay diferencia entre estos ecotipos. Para el día 4 ya se observa que Bd21-3 es más tolerante a la inundación con la mayor parte de las hojas sanas, y a el 100 % de sus individuos que lograron recuperarse del estrés (Figura 49 y 50a). No se graficó el día 5 y 6 de inmersión pues, como se puede observar en la Figura 51 que cuantifica letalidad, el 100 % de los individuos están muertos en todos los ecotipos (Figura 49).

En el segundo y tercer ensayo sólo se sometieron al estrés los ecotipos Bd21, Bd2-3 y Bd21-3, pues las semillas de Tek10 fueron insuficientes. Aunque la intensidad del estrés cambió, las tendencias se mantuvieron similares con Bd21-3 como el ecotipo más tolerante. Sólo se realizaron hasta el 4 día de inundación, tomando en cuenta del ensayo anterior las plantas no logran sobrevivir al 5 día. En la Figura 50b se puede observar para el segundo ensayo que en el día 3 ya hay diferencia significativa entre los tres ecotipos siendo Bd21 el más afectado ya que todas las plantas estaban muertas. Para el día 4 podemos observar que ya no existe diferencia entre Bd21-3 y Bd2-3 ya que alrededor del 60 % de las plantas poseen hojas sanas. En la Figura 50 podemos observar que Bd21 no logró recuperarse del estrés comparada con los ecotipos Bd2-3 y Bd21-3. Para el tercer ensayo podemos observar que no existe diferencia entre los tres ecotipos en el día 3 de inundación, pero la dispersión en Bd21 es muy grande y para el día 4 se vuelve a revelar como el ecotipo más sensible, ya que Bd2-3 y Bd21-3 tienen al menos más del 60 % de la población con hojas sanas, en

el día 4 podemos observar que Bd21 no soportó la inundación y que al igual que en el ensayo dos, Bd2-3 y Bd21-3 son iguales significativamente (Figura 50c).



Figura 49 Supervivencia de los ecotipos de *Brachypodium* del primer ensayo de inundación. Ecotipos: Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek-10 con 24 días de edad, después de cuatro días de recuperación.

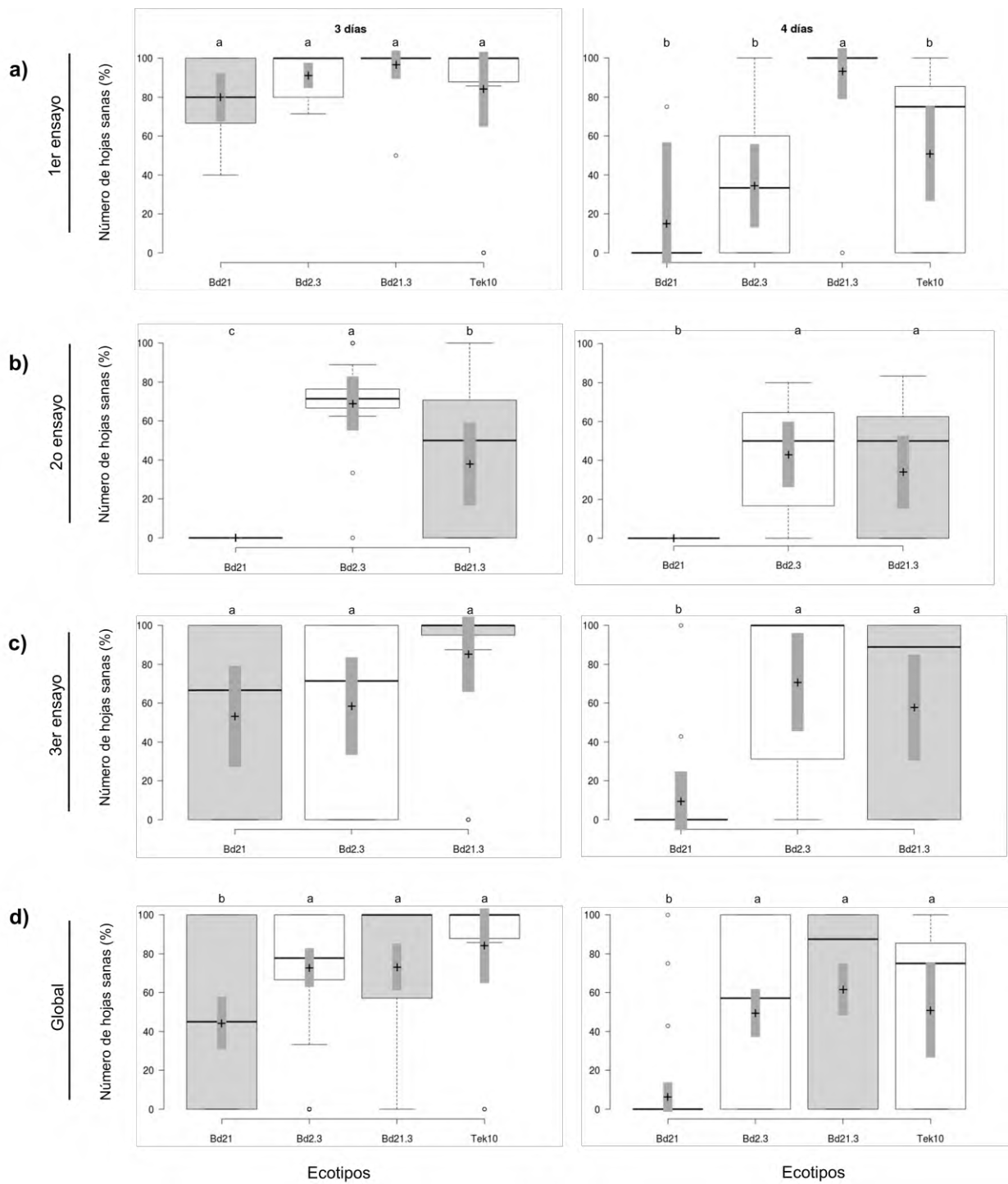


Figura 50. Porcentaje de hojas sanas de los ecotipos Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek10.

Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de caja indican los percentiles 25 y 75 según lo determinado por el software R; los bigotes se extienden 1,5 veces el intervalo intercuartílico de los percentiles 25 y 75, los outliers están representados por puntos; las cruces representan las medias de la muestra. Las barras indican intervalos de confianza del 95 % de los medios. $n = 15 - 45$ puntos de muestreo. Las letras indican la agrupación obtenida de acuerdo al análisis con la prueba Tukey.

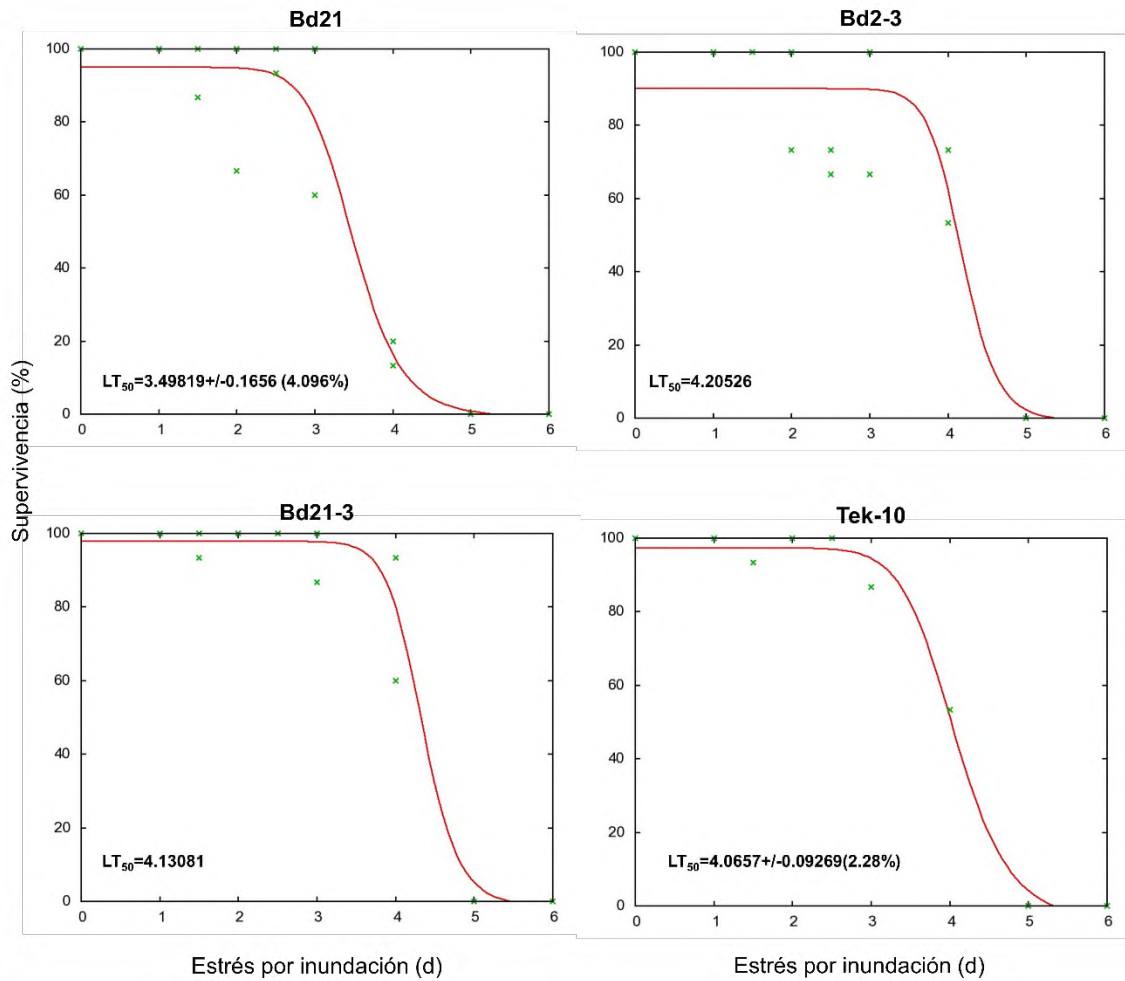


Figura 51. LT_{50} de los ecotipos de Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek-10 en estrés por inundación.
 Se muestran los resultados de dos experimentos independientes para los ecotipos Bd21, Bd2-3 y Bd21-3.

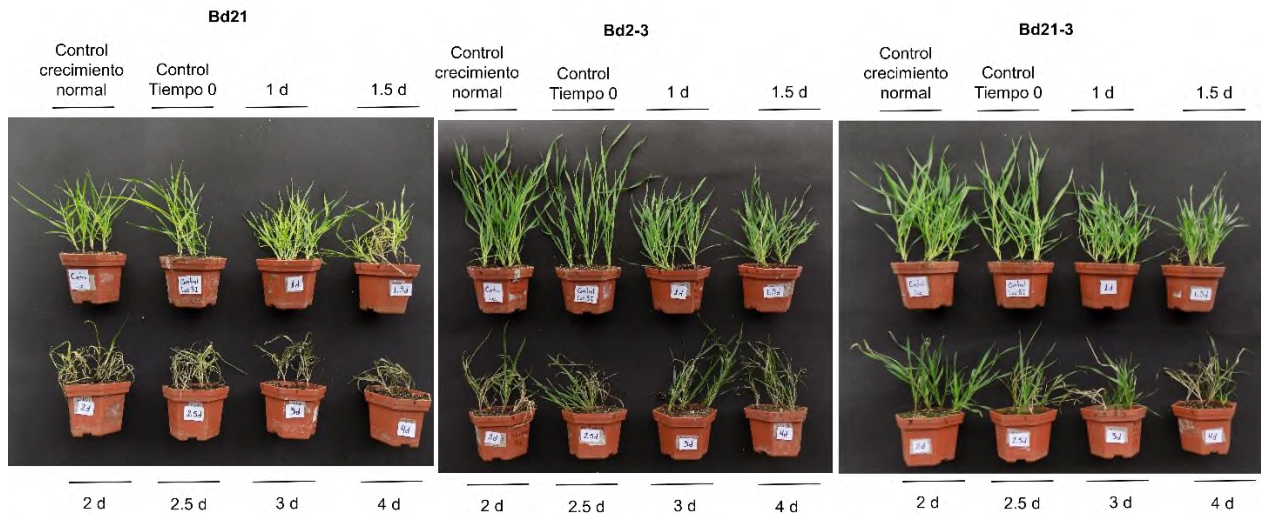


Figura 52. Supervivencia de los ecotipos de *Brachypodium* del segundo ensayo de inundación.
 Ecotipos: Bd21, Bd21-3 y Bd21-3 con 23 días de edad, después de cinco días de recuperación

A partir de estos tres ensayos de inundación con los ecotipos Bd21 (sensible), Bd2-3 (tolerante) y tomando como referencia Tek10, se realizó un análisis global incorporando los tres ensayos a un sólo análisis estadístico (Figura 50 d). En el que se pudo determinar que Bd21-3 es un ecotipo que se debe clasificar como tolerante el estrés por inundación debido a que soporta 4 días bajo inmersión total (Figura 50 y 51). Como se puede observar en Figura 50c las plantas de Bd21 después de la inmersión durante 3 días tuvieron un rango de hojas sanas que va desde el 100% hasta las que poseen todas las hojas afectadas, sin embargo, ya para el día 4 todas menos dos plantas de la población han muerto. De acuerdo al análisis estadístico, Bd21-3 es estadísticamente igual a Bd2-3 y Tek-10 ya que pueden tolerar hasta 4 días de inundación al presentar más del 50 % del número de hojas sanas, e incluso, sus parámetros de dispersión son superiores y visualmente es una planta más robusta después de la inundación (Figura 50). A partir de estos ensayos, se estableció el tiempo de inmersión para las líneas de T-DNA en donde se predijo que serían menos tolerantes a la inundación por la ausencia de los FTs que normalmente estarían expresados, y se decidió usar 3 días de inundación como el primer tiempo de análisis y utilizar eficientemente las semillas mutantes.

7.9 Tratamiento de estrés para las líneas de T-DNA

Se realizaron sólo dos ensayos de inundación con las líneas de T-DNA homocigotas: JJ19596 (Bradi2g22440, T96W-7) y JJ20483 (Bradi2g54720, T3W, JJ28379) de la familia WRKY, y (Bradi1g17961, T9E) y JJ22103 (Bradi1g17961, T3E) de la ERF-VII, debido a que la cantidad de semillas que se obtuvieron para cada línea no era suficiente para realizar triplicado (Tabla 21).

Tabla 21. Semillas obtenidas de plantas homocigotas de las líneas de T-DNA (112 días después de la germinación)

Gen	Línea	Código	Total de semillas
Bradi2g22440	JJ19596	T96W-7	158
Bradi2g54720	JJ20483	T3W-5	220
Bradi1g17961	JJ28379	T9E-3	260
	JJ22103	T3E-1	67
Bradi5g08380	JJ22213	T13E-10	10

Para los ensayos de estrés, se recuperaron las plantas en los tiempos de 3, 3.5 y 4 d de inmersión y se tomaron datos del porcentaje de hojas sanas después de 6 días de recuperación. En el primer ensayo, se puede observar que no existe diferencia entre las líneas de T-DNA con respecto al control en el día 3 y 3.5 de estrés, sin embargo, en el día 4 se puede observar que la línea T3W-5 es significativamente diferente con respecto al control Bd21-3, tanto en número de hojas sanas, como visualmente (Figuras 53a y 54). En el segundo ensayo de inundación, no se pudieron registrar diferencias estadísticas entre las líneas de T-DNA con respecto al control, a pesar de que la dispersión de los datos indicó en el día 3.5 una disminución generalizada de la integridad de los mutantes con respecto al control (53b). Posteriormente, se realizó el análisis de manera global con los datos de los dos ensayos y se puede observar que, aunque no hubo diferencias entre las líneas de T-DNA con la silvestre, sí se nota una disminución de la integridad de las mutantes, en especial para T3W-5 de la familia WRKY. La falta de una diferencia estadística detectable por métodos convencionales para Bradi2g22440 (JJ19596-T96W-7, BdWRKY46) y Bradi1g17961 (JJ28379-T9E-3, ERF-VII) se pudo deber a que el análisis de RT-PCR indicó que son mutantes "leaky" que aún pueden tener expresión y para las otras, es que el transcrito no tiene un efecto sólido sobre la integridad de las hojas, que fue el parámetro de medición.

No obstante, lo anterior, un fenotipo notorio y homogéneo fue el acamamiento, que se define como el crecimiento de los pastos al ras del suelo y no de forma erecta como lo hacen normalmente. El acamamiento es un fenotipo de interés agrícola pues se puede presentar como producto del estrés por inundación o del exceso de nitrógeno y puede causar pérdidas agrícolas (Rueda *et al.*, 2016). Como se puede observar en la Figura 54 y 55 la principal diferencia entre las plantas fueron el acamamiento de las líneas de T-DNA después de 4 días de recuperación comparado con el ecotipo silvestre Bd21-3. En los trabajos de transcriptómica del estrés se reporta frecuentemente la presencia de enzimas de modificación de pared celular y se ha hipotetizado que en las plantas que expresan la estrategia de elongación están expresados para ablandar la pared celular y permitir su crecimiento (van Veen *et al.*, 2013), de forma contraria, en especies quiescentes, estos transcritos están reprimidos para evitar modificaciones en la pared celular (Fukao *et al.*, 2011). De tal forma, se propone que uno de los papeles principales de los FTs analizados en este trabajo es evitar el ablandamiento de las paredes celulares durante la inundación y no expresar un fenotipo de acamamiento no propio de *Brachypodium*. En el Anexo I se muestra la altura final de las líneas de T-DNA correspondiente al primer ensayo y en el Anexo J las gráficas de las alturas correspondientes para cada experimento.

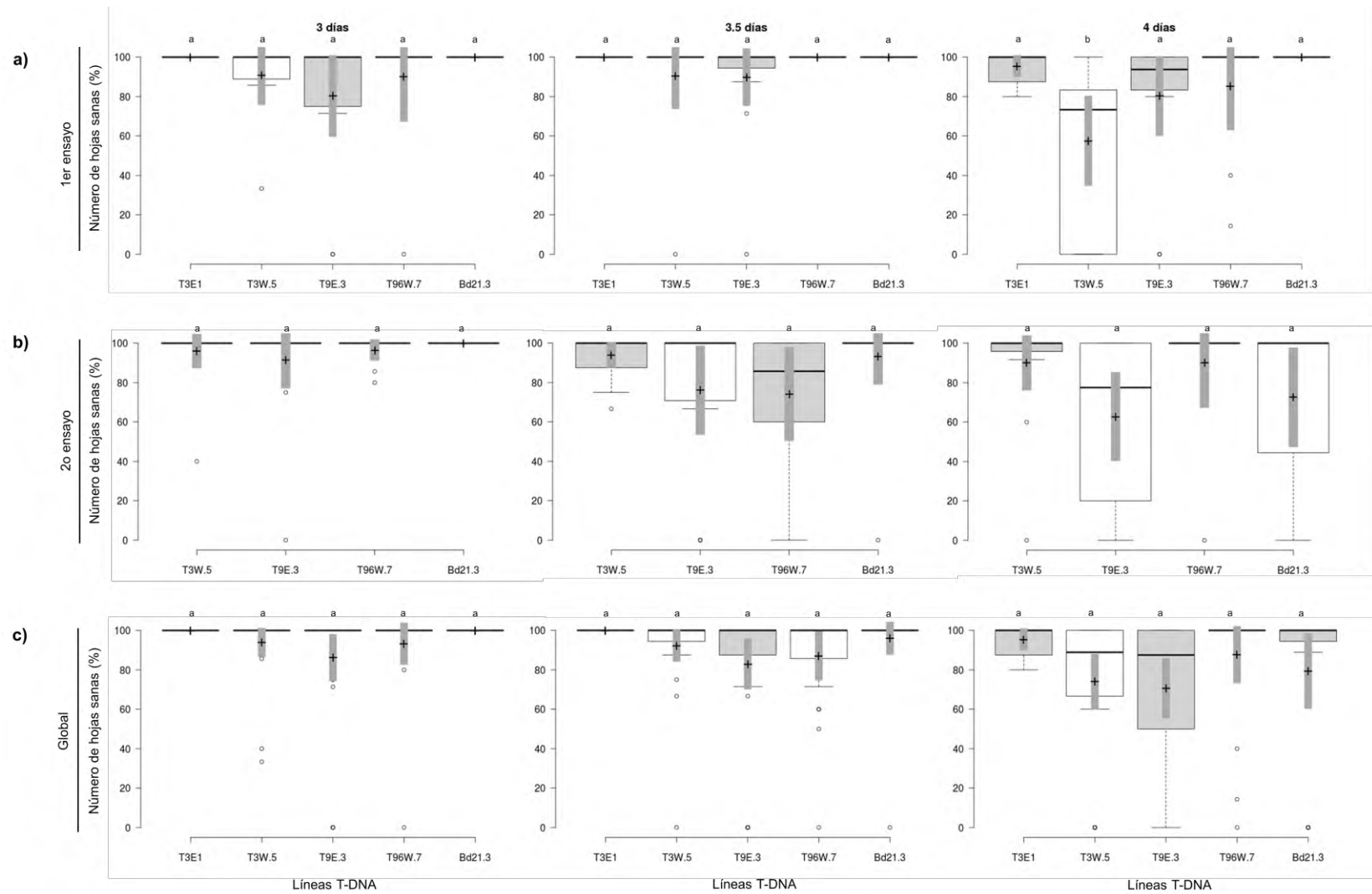


Figura 53. Porcentaje de hojas sanas de las líneas de T-DNA.

Las líneas centrales muestran las medianas; los límites de caja indican los percentiles 25 y 75 según lo determinado por el software R; los bigotes se extienden 1,5 veces el intervalo intercuartílico de los percentiles 25 y 75, los outliers están representados por puntos; los cruces representan medios muestrales; Las barras indican intervalos de confianza del 95 % de los medios. n = 15-45 puntos de muestreo. Las medias que no están etiquetadas con la misma letra son significativamente diferentes de la media del control (Bd21-3) de acuerdo al Método de Dunnett

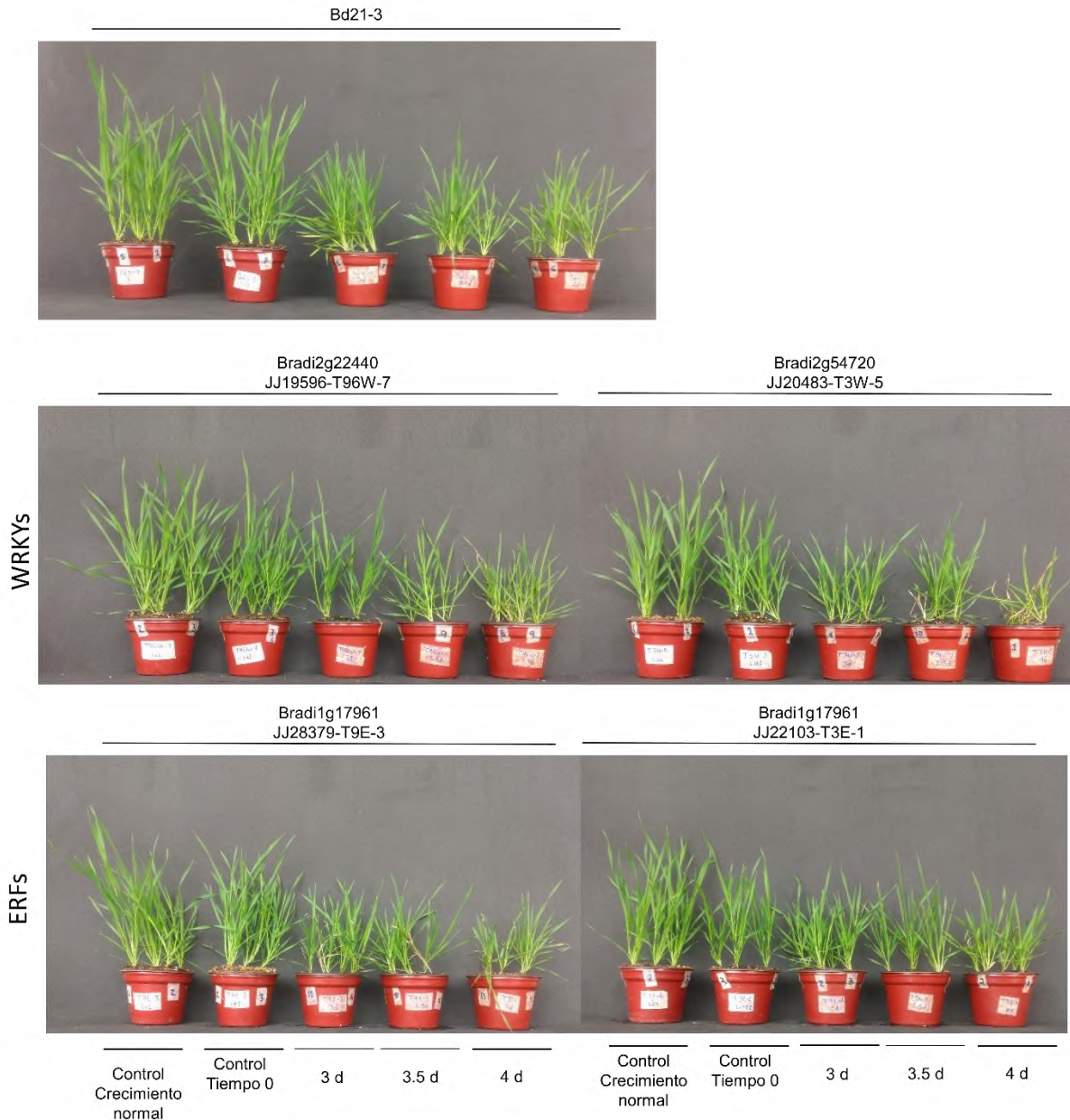


Figura 54. Plantas las líneas de T-DNA de *Brachypodium* sometidas a estrés por inundación.
 Las plantas se inundaron a los 14 d después de la germinación por el tiempo indicado. Las fotografías se tomaron a los 31 d después de la germinación.

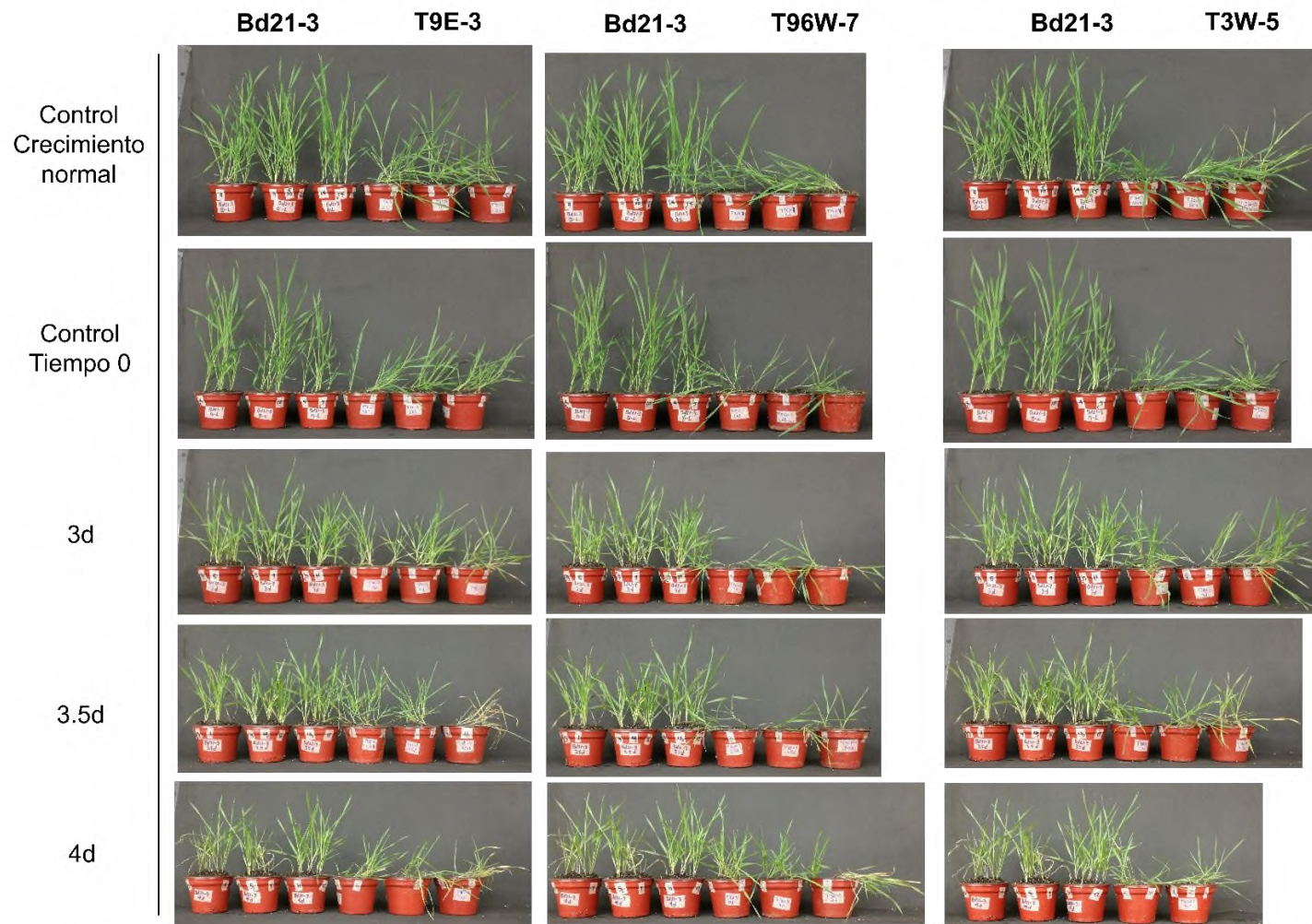


Figura 55. Plantas las líneas de T-DNA de *Brachypodium* sometidas a estrés por inundación.
Las plantas corresponden al segundo ensayo de estrés; 26 días de edad después de la germinación.

El análisis visual de estas mutantes no permitió observar otros cambios en la morfología de las plantas con respecto al control. Esto se puede deber a que los FTs están estructurado en familias y que, al ser afectado un gen, otro miembro puede sustituir la función o hacer que sea menos severo el efecto que en la planta. Tal es el caso de la familia ERF-VII que está clasificada en dos grupos, los genes constitutivos y los inducibles; los constitutivos deben estar presentes debido a que la planta debe estar alerta ante cualquier baja de oxígeno y poder activar a los genes inducibles (Licausi *et al.*, 2011). Cuando esta familia se ha mutagenizado, se han podido ver efectos en mutantes simples, por ejemplo, la pérdida de función de los ERFs-VII inducibles HRE1 y HRE2 tiene un efecto ligeramente detectable pero que se hace estadísticamente significativo hasta que se obtiene la doble mutante (Licausi *et al.*, 2010).

Los miembros de la familia WRKY pueden estar involucrados en la inmunidad innata al ataque de patógenos después de haber sido sometidas a inundación (Hsu *et al.*, 2013), por lo que en un futuro podrían ser evaluadas estas líneas frente al ataque de patógenos y notar cambios más notorios o alguna afectación por la ausencia de estos genes. También sería recomendable realizar experimentos con dobles o triples mutantes.

7.10 Mutagénesis con EMS en *Arabidopsis*.

Como una alternativa paralela de generación de diversidad para elucidar la función de FTs de interés en la inundación, se realizó la mutagénesis química inducida con EMS sobre el genotipo sobreexpresante de SUB1A-1 y poder encontrar mutantes que supriman su fenotipo de floración tardía y hojas deformadas (Figura 56).

Se utilizaron semillas de la planta transgénica L5 (35S: FLAG-SUB1A1-1; Peña-Castro *et al.*, 2011) las cuales se mutagenizaron con 0.2 % de EMS (Weigel y Glazebrook, 2006) y posteriormente se mantuvieron en condiciones de crecimiento controlado.

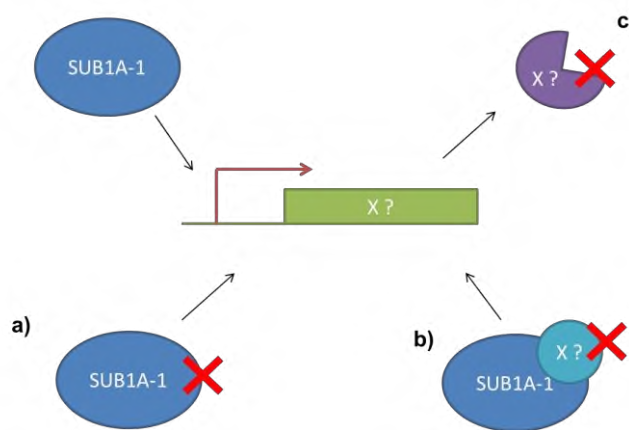


Figura 56. Resultados posibles de mutagénesis sobre el genotipo 35S: FLAG-SUB1A1-1.

a) La mutación puede ocurrir dentro de la secuencia de SUB1-A, b) Puede estar en un factor que active a SUB1-A o c) en un gen regulado por SUB1-A.

Se seleccionaron un total de 16 plantas que presentaron una floración temprana similar al control Col-0 (alrededor de los 22 días), y se realizó la clasificación de acuerdo a su fenotipo como plantas tipo A parecidas a Col-0 y tipo B cuyo fenotipo era más similar a la línea transgénica L5, pero aún diferente (Figura 57).

Para verificar que se trataba de plantas L5 mutagenizadas y evitar una contaminación con Col-0 debido al alto número de semillas que se sembraron, se realizó la extracción de gDNA de las plantas seleccionadas, seis del tipo A y diez del tipo B, así como de los controles Col-0 y L5 sin mutagenizar.

Posteriormente se realizó una PCR de la amplificación del gen SUB1A-1 y se utilizaron oligonucleótidos específicos de SUB1A-1. En las muestras evaluadas de tipo A no se pudo amplificar el transgen SUB1A por lo que se consideraron contaminaciones silvestres. Para el caso de las muestras tipo B, sólo ocho presentaron la amplificación esperada de 896 pb que corresponde al transgen SUB1A (Figura 58). Por otra parte, las muestras A-1 a A-6 parece ser contaminación de Col-0 ya que no presentaron el producto de amplificación esperado.

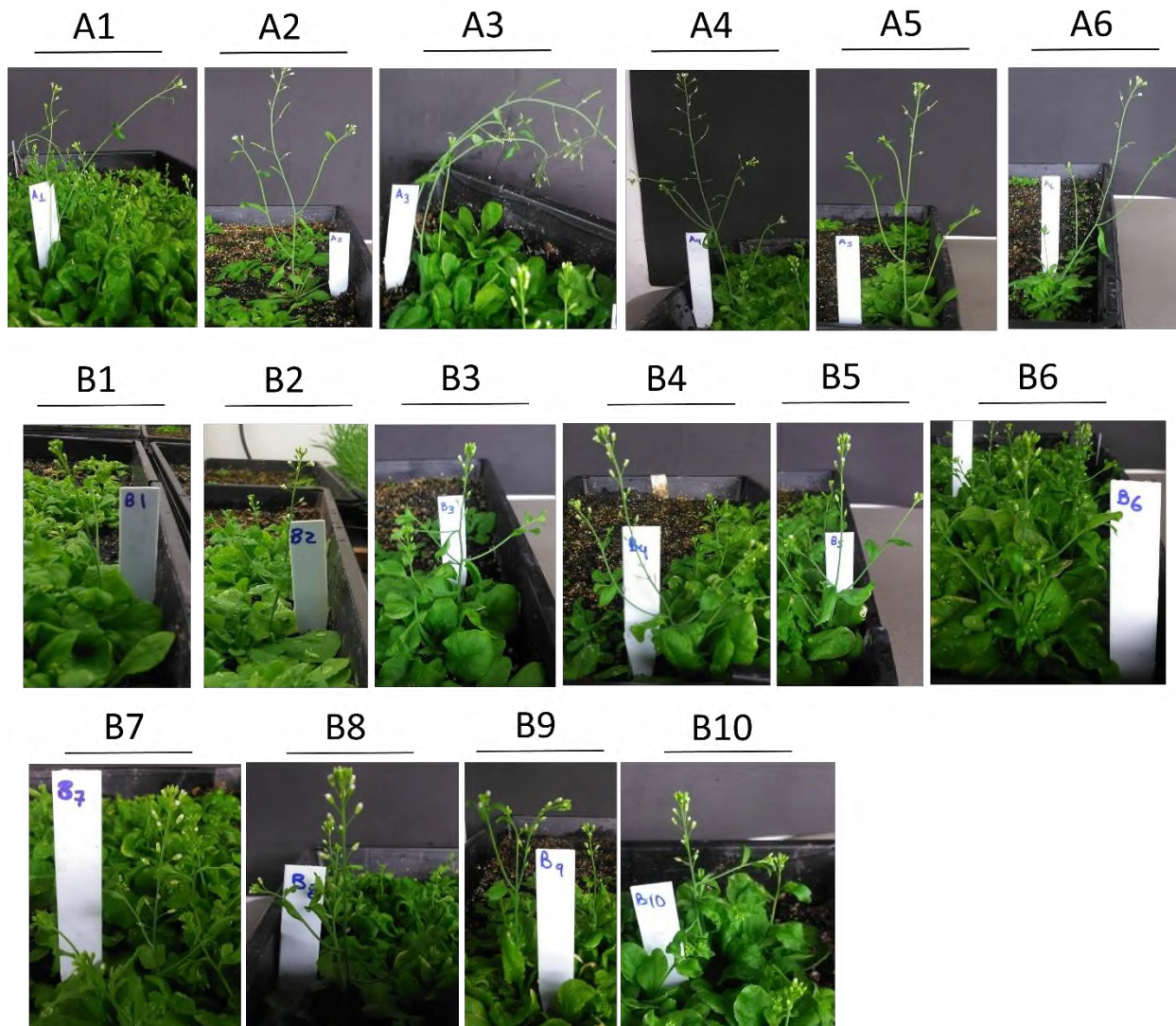


Figura 57. Comparación de fenotipos de plantas que presentación una floración adelantada.
 La letra A corresponde al fenotipo similar a Col-0 y B al fenotipo similar a L5.

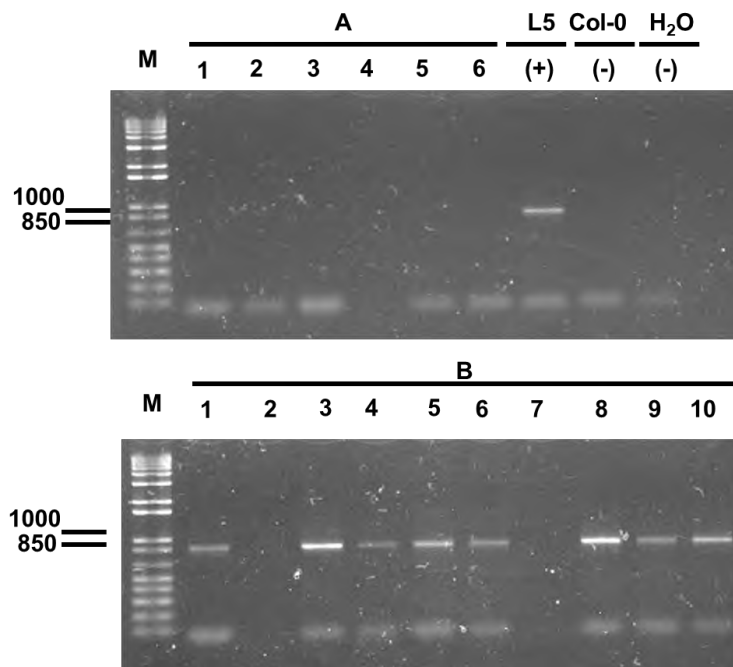


Figura 58. PCR de selección de mutantes por EMS de *Arabidopsis* L5.

Se utilizaron como control positivo (+) L5 y dos controles negativos (-) Col-0 y H₂O. En el gel se puede observar la banda correspondiente a 896 pb. Las letras indican A) Fenotipo similar a Col-0 y B) parecido a L5.

Las plantas clasificadas como B que tuvieron amplificación del transgen, se llevaron a madurez y se sembró su progenie para poder analizar si existía segregación del fenotipo de floración temprana. No se detectó una floración diferente a los testigos transgénicos que se crecieron juntos. Por lo que se concluyó que el fenotipo de floración temprana se debió a algún efecto ambiental local que hizo que esas plantas en particular florecieran antes que el resto de las plantas transgénicas. De tal manera, de la mutagénesis con EMS no se pudieron obtener mutantes que alteraran el fenotipo ocasionado por el transgen SUB1A. Lo anterior se pudo deber a que se requeriría una población mutagenizada mayor o a que SUB1A ejerce su efecto sobre múltiples genes con pequeños efectos. Respecto a esto último, Peña-Castro *et al.* (2011) reportaron que el transcriptoma de *Arabidopsis* se modifica en la expresión modificada de 182 y 92 transcritos, positiva y negativamente, respectivamente, cuando se comparó con el ecotipo silvestre.

8. Conclusiones

Con la base de datos de T-DNA y GEO GSE7422 de 48 h de *Brachypodium* bajo estrés por inundación se encontraron 28 genes que poseen al menos una línea de T-DNA de *Brachypodium* en la colección JGI-DOE. Sin embargo, sólo 10 líneas de 8 genes se encontraron disponibles de las cuales, dos tuvieron plantas hemicigotas (WRKY: Bradi2g16150 y ERF-VII: Bradi2g27920), cuatro homocigotas (WRKY: Bradi2g22440, Bradi2g54720 y ERFs: Bradi1g17961, Bradi5g08380) y dos sólo WT (MYB: Bradi1g20540 y DNAJ: Bradi2g55797).

Con los análisis filogenéticos se identificó que la familia con más genes activos durante 48 h de estrés por inundación es la ERF (13) seguida de la WRKY (12) y DNAJ (6) mientras que las familias con menos miembros activos son la DREB (3) y bZIP (3). También se identificó en la literatura que estos FTs se encuentran activos bajo otros estreses por lo que se puede concluir que, en la inundación, la planta no sólo se encuentra limitada de oxígeno, sino que hay otras fuentes de estrés como pueden ser sustancias del suelo que se vuelven solubles en el agua (sales y metales), patógenos que pueden acceder más fácilmente a la planta, o que afectan su desarrollo y el consumo de energía.

La inclusión de Bd21-3, el fondo silvestre de la colección JGI-DOE, en ensayos de inundación permitió identificarlo como tolerante a la inundación, e incluso superior a los ecotipos previamente detectados en el grupo de investigación (Bd2-3 y Tek10).

Cuando las líneas de T-DNA homocigotas se sometieron a ensayos de inundación, se detectó una baja de la estabilidad de la tolerancia con respecto a la planta silvestre, que aunque no fue estadísticamente diferente en cuanto a supervivencia, sí causó el efecto de acamamiento en *Brachypodium* lo que indica que los FTs Bradi2g54720 (JJ20483-T3W-5, BdWRKY57), Bradi2g22440 (JJ19596-T96W-7, BdWRKY46) y Bradi1g17961 (JJ28379-T9E-3 y JJ22103-T3E-1, ERFs-VII) están involucrados en el mantenimiento de la respuesta quiescente y en evitar el ablandamiento de la pared celular del tallo característica de la respuesta de elongación.

A partir de mutagénesis de *Arabidopsis* de la línea transgénica OxSUB1A-L5 no se pudieron obtener mutantes que alteraran al fenotipo que ocasiona la sobreexpresión del FT tipo ERFs-VII SUB1A-1.

9. Perspectivas y recomendaciones

Debido a que no se pudo observar un fenotipo con incidencia estadística en la supervivencia con las líneas de T-DNA, se podrían buscar estrategias de mutagénesis (ej. CRISPR-Cas9) que permitan obtener mutantes de los miembros de estas familias más activos en inundación que aquí se reportan, y buscar mutantes múltiples para incrementar la certeza estadística de la disminución de la fortaleza que causó su ausencia en mutantes individuales.

Se propone realizar experimentos de estrés más específicos para cada familia de genes, por ejemplo, en el caso de la familia WRKY sería someterlos a estrés por patógenos y observar si existe la inmunidad innata a una serie de patógenos comunes.

La limitación de no poder encontrar mutantes en familias de interés, como los FTs bZIP para los que se pudo realizar un análisis bioinformático completo en esta tesis, se puede abordar con edición génica y transformación con transgenes libres de los uORFs de control por sacarosa, y que pueden ser útiles para la acumulación de carbono no convencional en plantas.

Debido a la importancia que demostraron los FTs WRKYs y ERFs en el mantenimiento del fenotipo erguido en *Brachypodium* después de la inundación, se propone explorar con estrategias de secuenciación combinada con inmunoprecipitación de cromatina los conjuntos de genes que controlan bajo un modelo "hit and run".

Referencias

1. Adjounian, C. M., a, Adjounian, H., & Adjounian, S. H. (2008). Silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia. Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 27: 22-25.
2. Alonso, J., & Stepanova, A. (2003). T-DNA mutagenesis in *Arabidopsis*. En P. f. protocols, *Methods in molecular biology* Vol.236 (págs. 177-187). Totowa, N J: Humana Press, Inc.
3. Alonso, J., Stepanova, A., Leisee, T., Kim, C., Chen, H., Shinn, P., . . . & Ecker, J. (2003). Genome-wide insertion mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
4. Ané, J., Zhu, H., & Frugoli, J. (2008). Recent advances in *Medicago truncatula* genomics. *International Journal of Plant Genomics* 2008: 11.
5. Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R., & Machida , Y. (2004). Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in *Tobacco*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 32979-32988.
6. Argarwal, P., Parida, S., Raghuvanshi, S., Kapoor, S., Khurana, P., Khurana, J., & Tyagi, A. (2016). Rice improvement through genome-based functional analysis and molecular breeding in india. *Rice* 9: 1-17.
7. Atlas Nacional de Riesgos (2017). Base de datos. Recuperado de: www.atlasnacionalderiesgos.gob.mx
8. Atwell, B. J., Greenway, H., & Colmer, T. D. (2014). Efficient use of energy in anoxia-tolerant plantswith focus on germinating rice seedlings. *New Phytologist* 206: 36-56.
9. Bailey-Serres, J., & Colmer, T. D. (2014). Plant tolerance of flooding stress – recent advances. *Plant, Cell & Environment* 37: 2211-2215.
10. Bailey-Serres, J., & Voesenek, L. (2008). Flooding Stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* 59: 313-339.
11. Bailey-Serres, J., & Voesenek, L. A. (2010). Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 1-6.
12. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Erhlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151: 2551-2561.

13. Borevitz, J., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R., & Lamb, C. (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 12: 2383-2393.
14. Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* 33: 41-52.
15. BoxPlotR (2017) Recuperado de: shiny.chemgrid.org/boxplotr/.
16. Bragg, J., Wu, J., Gordon, S., Guttman, M., Thilmony, R., Lazo, G., . . . & Vogel, J. (2012). Generation and characterization of the western regional research center *Brachypodium* T-DNA insertional mutant collection. *Public Library of Science One* 9: 1-14.
17. Bui, L., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., & Licausi, F. (2015). Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 236: 37-46.
18. Cai, C., Niu, E., Du, L., Zhao, L., Feng, Y., & Guo, W. (2014). Genome-wide analysis of the WRKY transcription factor gene family in *Gossypium raimondii* and the expression of orthologs in cultivated tetraploid cotton. *The Crop Journal* 2: 87-101.
19. Cao, P., Azar, S., SanClemente, H., Mounet, F., Dunand, C., Marque, G., . . . Teulières, C. (2015). Genome-wide analysis of the AP2/ERF family in *Eucalyptus grandis*: an intriguing over-representation of stress-responsive DREB1/CBF genes. *Public Library of Science One* 10: 1-22.
20. Cavener, D. R. (1987). Comparison of consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acid Research* 15: 1353-1361.
21. CENAPRED. (2014). Características e impacto socioeconómico de los principales desastres ocurridos en la República Mexicana en el año 2012. México, DF.
22. Chang, C., Bowman, J., & Meyerowitz, E. (2016). Field guide to plant model systems. *Cell* 167: 325-339.
23. Chen, L., Han, J., Deng, X., Tan, S., Li, L., Li, L., . . . & Zhang, W. (2016). Expansion and stress response of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium distachyon*. *Scientific Reports* 6: 21623.

24. Chen, S., Hofius, D., Sonnewald, U., & Bornke, F. (2003). Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *The Plant Journal* 36: 731-740.
25. Conde Álvarez, A. C., Enríquez Hernández, G., Esquivel Esquivel, N., López Blanco, J., López Díaz, F., Montes Rojas, R., . . . Ruiz Bedolla, K. (2016). Variabilidad Climática y escenarios de cambio climático. Herramientas para los estudios de impactos potenciales y vulnerabilidad actual y futura. Ejemplos para México, Centroamérica y el Caribe. En C. Conde Álvarez, & J. López Blanco, *Variabilidad y cambio climático. Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático en América Latina y el Caribe* (págs. 25-72). México.
26. Conde-Álvarez, C., & Saldaña-Zorrilla, S. O. (2007). Cambio climático en América Latina y el Caribe: Impactos, vulnerabilidad y adaptación. *Ambiente y Desarrollo* 23: 23-30.
27. Cosson, V., Durand, P., d'Erfurth, I., Kondorosi, A., & Ratet, P. (2006). *Medicago truncatula* Transformation using leaf explants. En K. Wang, *Agrobacterium* protocols. *Methods in Molecular Biology* 343 (págs. 115-128). Humana Press.
28. Courdet, Y., Christophe, P., Brigitte, C., & Pascal, G. (2010). Mejora del arroz. *Investigación y Ciencia*, 1-10.
29. Crane, C., Wright, E., Dixon, R., & Wang, Z. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223: 1344-1354.
30. Dalmais, M., Antelme, S., Kuang, S., Wang, Y., Darracq, O., d'Yvoire, M., . . . & Sibout, R. (2013). A TILLING platform for functional genomics in *Brachypodium distachyon*. *Public Library of Science One* 8: e65503.
31. Diario Oficial de la Federación (2014) Recuperado de: dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5342492&fecha=28/04/2014
32. Doudna, J., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096-9.
33. Draper, J., Mur, L., Jenkis, G., Ghosh-Biswas, G., Bablak, P., Hasterok, R., & Routledge, A. (2001). *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology* 127: 1539-1555.

34. Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X., Yang, W., Wu, Y., . . . & Tang, Y. (2009). Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry* 74: 1-11.
35. Eckardt, N. (2000). Sequencing the rice genome. *Plant Cell* 12: 2011-2018.
36. Ellis, E., Romero, J. A., Hernández, I. U., Gallo, C. A., & Alanís, J. L. (2012). Evaluación geográfica de áreas susceptibles a la inundación en la cuenca del río Tuxpan, Veracruz. *Avances en Investigación Agropecuaria* 16: 7-28.
37. ENCC. (2013). Centro de Estudio de las Finanzas Públicas. Recuperado de: www.cefp.gob.mx/indicadores/gaceta/2013/iescefp0252013.pdf
38. Eulgem, T., & Somssich, I. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 366-371.
39. Eulgem, T., Rushton, P., Robatzek, S., & Somssich, I. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Science* 5: 1360-1385.
40. Fowler, S., & Thomashow, M. (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell* 14: 1675-1690.
41. Fukao, T., Xu, K., Ronald, P. C., & Bailey-Serres, J. (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell* 18: 2021-2034.
42. Fukao, T., Yeung, E., & Bailey-Serres, J. (2011). The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *The Plant Cell* 23: 412-427.
43. Ghag, S. B., Shekhawat, U. K., & Ganapathi, T. R. (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal* 12: 541-553.
44. Gibbs, D., Lee, S., Isa, N. M., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G., . . . & Holdsworth, M. J. (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule. *Nature* 479: 415-418.

45. Giuntoli, B., Lee, S., Licausi, F., Kosmacz, M., Oosumi, T., van Dongen, J., . . . Perata, P. (2014). A Trihelix DNA binding protein counter balances hypoxia-responsive transcriptional activation in *Arabidopsis*. *Public Library of Science Biology* 12: e1001950.
46. Giuntoli, B., Licausi, F., Van Veen, H., & Perata, P. (2017a). Functional balancing of the hypoxia regulators RAP2.12 and HRA takes place in vivo in *Arabidopsis thaliana* plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 591.
47. Giuntoli, B., Shukla, V., Maggiorelli, F., Giorgi, F., Lombardi, L., Perata, P., & Licausi, F. (2017b). Age-dependent regulation of ERF-VII transcription factor activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment* 40: 2333-2346.
48. Guilfoyle T. J., Hagen, G. (2007) Auxin response factors. *Current Opinión in Plant Biology* 10: 453-460.
49. Guo M., Lu, J. P., Zhai, Y. F., Chai, W. G., Gong, Z. H., Lu, M. H, (2015) Genome-wide analysis, expression profile of heat shock factor gene family (CaHsfs) and characterisation of CaHsfA2 in pepper (*Capsicum annuum L*). *BioMed Central Plant Biology* 151: 20.
50. Guo, Y., & Qiu, L. (2013). Genome-wide analysis of the Dof transcription factor gene family reveals soybean-specific duplicable and functional characteristics. *Public Library of Science One* 9: 1-14.
51. Hands, P., & Drea, S. (2012). A comparative view of grain development in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Cereal Science* 56: 2-8.
52. He, J., Benedicto, V. A., Wang, M., Murray, J., Zhao, P., & Tang, M. U. (2009). The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BioMed Central Bioinformatics* 10:441.
53. Hong, Y., Zhang, H., Huang, L., Li, D., & Song, F. (2016). Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene ONAC022 improve drought and salt tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science* 7: 1-19.
54. Hsu, F., Chou, M., Chou, S., Li, Y., Peng, H., & Shih, M. (2013). Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25: 2699-2713.

55. Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., & Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Science* 35: 12987-12992.
56. Imaizumi, R., Sato, S., Kameya, N., Nakamura, I., Nakamura, Y., Tabata, S., . . . & Aoki, T. (2005). Activation tagging approach in a model legume, *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research* 118: 391-399.
57. Integrated DNA Technologies (2017) Recuperado de: www.idtdna.com.
58. Ishizaki, K., Larson, T. R., Schauer, N., Fernie, A. R., & Graham, I. A. (2005). The critical role of *Arabidopsis* electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *The Plant Cell* 17: 2587-2600.
59. Ito, M. (2005). Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *Journal of Plant Research* 118: 61-69.
60. Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., . . . & Watanabe, A. (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *The Plant Cell* 13: 1891-1905.
61. Ito, M., Miyamoto, J., Mori, Y., Fujimoto, S., Uchiumi, T., Abe, M., . . . & Fukui, K. (2000). Genome and chromosome dimensions of *Lotus japonicus*. *Journal Plant Research* 113: 435-442.
62. Jander, G., Baerson, S., Hudak, J., Gonzalez, K., Gruys, K., & Last, R. (2003). Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology* 131: 139-146.
63. Jeon, J. S., Lee, S., Jung, K. H., Jun, S. H., Jeong, D. H., Lee, J., . . . & An, G. (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal* 22: 561-570.
64. Jia, L., Clegg, M., & Jiang, T. (2004). Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from Rice subspecies indica and japonica genomes. *Plant Physiology* 134: 575-585.
65. Jiang, Y., Duan, Y., Yin, J., Ye, S., Zhu, J., . . . & Luo, K. (2014). Genome-wide identification and characterization of the *Populus* WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses. *Journal of*

- Experimental Botany 22: 6629-6644. Jin, Y., & Guo, H. S. (2015). Transgene-induced gene silencing in plants. En K. Mysore, & M. Senthil-Kumar, Plant Gene Silencing. Methods and Protocols (págs. 105-118). Humana Press.
66. Joint Genome Institute (2017) Base de datos. Recuperado de: jgi.doe.gov/our-science/science-programs/plant-genomics/brachypodium/brachypodium-t-dna-collection/
67. Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., & Bailey-Serres, J. (2013). Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 111: E203–E212.
68. Kagaya, Y., & Hattori, T. (2009). *Arabidopsis* transcription factors, RAV1 and RAV2, are regulated by touch-related. Genes Genetics Systems 84: 95-99.
69. Kagaya, Y., Ohmiya, K., & Hattori, T. (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. Nucleid Acid Research 27: 470-478.
70. Kant, R., Sharma, S., & Dasgupta, I. (2015). Virus-induced gene silencing (VIGS) for functional genomics in rice using rice tungro bacilliform virus (RTBV) as a vector. En K. S. Mysore, & M. Senthil-Kumar, Plant Gene Silencing. Methods and Protocols (págs. 201-208). Humana Press.
71. Kim, Y., Schumaker, K., & Zhu, J. (2006). EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. En M. I. 323, *Arabidopsis* Protocols, second Edition (págs. 101-103). Totowa, N J: Humana Press.
72. Kimura, M., Cutler, S., & Isobe, S. (2015). A novel phenolic compound, chloroxynil, improves *Agrobacterium*-mediated transient transformation in *Lotus japonicus*. Public Library of Science One 10: e0131626.
73. Krysan, P., Young, J., & Sussman, M. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. The Plant Cell 11: 2283-2290.
74. Krzywinski, M., & Altman, N. (2014). Visualizing samples with box plot. Nature methods 2: 119-120.
75. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.
76. Li, D., Su, Z., Dong, J., & Wang, T. (2009). An expression database for roots of the model legume *Medicago truncatula* under salt stress. BioMed Central Genomics 10: 517.

77. Li, W., He, M., Wang, J., & Wang, Y. (2013). Zinc finger protein (ZFP) in plants -A review. *Plant Omics Journal* 6: 474-480.
78. Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D. A., Giuntoli, B., Giorgi, F. M., Voosenek, L. A., . . . & van Dongen, J. T. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479: 419-422.
79. Licausi, F., van Dongen, J., Giuntoli, B., Novi, G., Santaniello, A., Geigenberger, P., & Perata, P. (2010). HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 62: 320-315.
80. Lightner, J., & Caspar, T. (1998). Seed mutagenesis of *Arabidopsis*. En M. I. Vol.82, *Arabidopsis protocols* (págs. 91-102). Totowa, N J: Humana Press.
81. Lijavetzky, D., Carbonero, P., & Vicente-Carbajosa, J. (2003). Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene family. *BioMed Central Evolutionary Biology* 17: 1-11.
82. Liu, L., White, M. J., & MacRae, T. H. (1999). Transcription factors and their genes in higher plants functionals domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry* 262: 247-257.
83. Liu, Q., Wang, Z., Xu, X., Zhang, H., & Li, C. (2015). Genome-wide analysis of C2H2 zinc-finger family transcription factors and teir responses to abiotic stress en Poplar (*Populus trichocarpa*). *Public Library of Science One* 10: 25.
84. Liu, X., & Chu, Z. (2015). Genome-wide evolutionary characterization and analysis of bZIP transcription factors and their expression profiles in response to multiple abiotic stresses in *Brachypodium distachyon*. *BioMed Central Genomics* 16: 227.
85. Liwanag, A., Ebert, B., Verhertbruggen, Y., Rennie, E., Rautengarten, C., Oikawa, A., . . . & Scheller, H. (2012). Pectin biosynthesis: GAL51 in *Arabidopsis thaliana* is a β -1,4-Galactan β -1,4-galactosyltransferase. *The Plant Cell* 24: 5024-5036.
86. Lombardi, P., Ercolano, E., Alai, H., & Chiurazzi, M. (2003). A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cells susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports* 21: 771-777.

87. Magrin, G. (2015). Cambios observados y proyectados, impactos, vulnerabilidad. En G. Magrin, *Adaptación al cambio climático en América Latina y el Caribe*. (págs. 15-23). Santiago de Chile: Cepal.
88. Magrin, G., Gay García, C., Cruz Choque, D., Giménez, J. C., Moreno, A. R., Nagy, G. J., . . . Villamizar, A. (2007). Latin America. En G. Magrin, & C. Gay García, *Latin America. Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and vulnerability*. (págs. 581-615). UK: Cambridge University Press.
89. Masclaux, F., Charpentreau, M., Takahashi, T., Pont-Leizca, R., & Galaud, J. (2004). Gene silencing using a heat-inducible RNAi system in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 321: 364-369.
90. McCallum, C., Comai, L., Greene, E. A., & Henikoff, S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* 18: 455-457.
91. Meinke, D., Cherry, J., Dean, C., Rounsley, S., & Koornneerf, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682.
92. Miro, B., & Ismail, A. M. (2013). Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oryza sativa L.*). *Frontiers in Plant Science* 4: 1-17.
93. Mittal, D., Chakrabarti, S., Sarkar, A., Singh, A., Grover, A. (2009) Heat shock factors gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperatura, low temperatura and oxidative stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 785-795.
94. Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819: 86-96.
95. Monterroso, A., Conde, C., Gay, C., Gómez, D., & López, J. (2014). Two methods to assess vulnerability to climate change in the Mexican agricultural sector. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 19: 445-461.
96. Moreno-Risueno, M., Martínez, M., Vicente-Carbajosa, J., & Carbonero, P. (2007). The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Molecular Genetics and Genomics* 227: 379-390.

97. Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family. *Plant Physiology* 140: 411-432.
98. Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* 149: 88-95.
99. National Center for Biotechnology Information (2017) Base de datos. Recuperado de: www.ncbi.nlm.nih.gov/.
100. Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A., Scharf, K. D. (2001) *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress and Chaperones* 3: 177-189.
101. Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., & Kikuchi, S. (2010). Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465: 30-40.
102. Okushima Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., ... & Theologis, A. (2005) Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell* 17: 444-463
103. OligoT4 (2017) Recuperado de: t4oligo.com/home/.
104. Page, D., & Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Review Genetics* 3: 124-136.
105. Pandey, P., Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2015). Advances un plant genome silencing methods. En K. Mysore, & M. Senthil-Kumar, *Plant gene silencing. Methods and Protocols* (págs. 3-24). Humana Press.
106. Papdi, C., Pérez-Salamó, I., Joseph, M., Giuntoli, B., Bögre, L., Koncz, C., & Szabados, L. (2015). The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the ethylene response factor VII genes RAP2.12, RAP2.2 and RAP2.3. *The Plant Journal* 82: 772-784.
107. Para, A., Li, Y., Marshall-Colón, A., Varala, K., Francoeur, N., Moran, T., . . . & McCombie, W. (2014). Hit-and-run transcriptional control by bZIP1 mediates rapid

- nutrient signaling in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 28:10371-10376.
108. PECC. (2014). Versión de difusión del Programa Especial de Cambio Climático 2014-2018. Recuperado de: [www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Programa%20Especial%20de%20Cambio%20Clim%C3%A1tico%202014-2018%20\(PECC\)/Documents/Programa%20Especial%20de%20Cambio%20Clim%C3%A1tico%202014-2018_Versi%C3%B3n%20de%20Difusi%C3%B3n_.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Programa%20Especial%20de%20Cambio%20Clim%C3%A1tico%202014-2018%20(PECC)/Documents/Programa%20Especial%20de%20Cambio%20Clim%C3%A1tico%202014-2018_Versi%C3%B3n%20de%20Difusi%C3%B3n_.pdf)
109. Peng, R., Lin, G., & Li, J. (2016). Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Federation of European Biochemical Societies Journal 283: 1218-1231.
110. Penmetsa, R. V., & Cook, D. (2000). Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. Plant Physiology 123: 1387-1397.
111. Peña-Castro, J. M. (2014). Respuesta molecular de la plantas ante el estrés por inundación: Lecciones aprendidas del gen SUB1A. Fitotecnia Mexicana 37: 325-337.
112. Peña-Castro, J. M., van-Zanten, M., Lee, S. C., Patel, M. R., Voesenek, L. A., Fukao, T., & Bailey-Serres, J. (2011). Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. The Plant Journal 67: 434-446.
113. Perry, J., Wang, T., Welham, T., Gardner, S., Pike, J., Yoshida, S., & Parniske, M. (2003). A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. Plant Physiology 131: 886-871.
114. Phytozome (2017) Base de datos. Recuperado de: phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#.
115. Plesch, G., Ehrhardt, T., & Muller-Roeber, B. (2001). Involvement of TAAAG elements suggest a role for Dof transcription factors in guard cell-specific genes expression. The Plant Journal 28: 455-464.
116. Primer3 (2017) Recuperado de: bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/.
117. Rahmani, F., Hummel, M., Schuurmans, J., Weise-Klinkenberg, A., Smmeekens, S., & Hanson, J. (2009). Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide. Plant Physiology 150: 1356-1367.

118. Raissig, M., Abrash, E., Bettadapur, A., Vogel, J., & Bergmann, D. (2016). Grasses use an alternatively wired bHLH transcription factor network to establish stomatal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 8326-31.
119. Rajan, V., & D'Silva, P. (2009). *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensor. *Functional & Integrative Genomics* 9: 433-446.
120. Ricaño-Rodríguez, J., Zavala-González, E., & Ramírez-Lepe, M. (2014). Silenciamiento génico en plantas: mecanismos moleculares del ARN de interferencia y aplicaciones biotecnológicas. *Fitotecnia Mexicana* 37: 339-350.
121. Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., . . . & Yu, G. L. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105–2110.
122. Rivera-Contreras, I. K., Zamora-Hernández, T., Huerta-Heredia, A. A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2016). Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Scientific Reports* 6: 27686.
123. Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A., & van Dongen, J. (2010). Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 152: 1501-1513.
124. Rueda, J., Ortega-Jiménez, E., Hernández-Garay, A., Enríquez-Quiroz, J., Guerrero-Rodríguez, J., & Quero-Carrillo, A. (2016). Growth, yield, fiber content and lodging resistance in eight varieties of *Cenchrus purpureus* (Schumach.) morrone intended as energy crop. *Biomass and Bioenergy* 88: 59-65.
125. Sagor, G., Berbirich, T., Tanaka, S., Nashiyama, M., Kanayama, Y., Kojima, S., . . . & Tomonobu, K. (2016). A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single bZIP transcription factor gene. *Plant Biotechnology Journal* 14: 1116-1126.
126. Sakamoto, H., Maruyama, K., Sakuma, Y., Meshi, T., Iwabuchi, M., Shinosaki, K., & Yamaguchi-Shinosaki, K. (2004). *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins

- function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress condition. *Plant Physiology* 136: 2734-2746.
127. Sakar, N., Thapar, U., Kundnani, P., Panwar, P., & Grover, A. (2013). Functional relevance of J-protein family of rice (*Oryza sativa*). *Cell Stress and Chaperones* 18: 321-331.
 128. Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 998-1009.
 129. Sato, S., & Tabata, S. (2006). *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 128-132.
 130. Sato, S., Nakamura, Y., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., . . . & Tabata, S. (2008). Genome structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* 15: 227-239.
 131. Scharf K. D., Berberich, T., Ebersberger, I., Nover, L. (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819: 104-119.
 132. Scholte, M., d'Erfurth, I., Rippa, S., Mondy, S., Cosson, V., Durand, P., . . . Ratet, P. (2002). T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Molecular breeding* 10, 203-215.
 133. Septiningsih, E., Pamplona, A., Sanchez, D., Neeraja, C. N., Vergara, G., Heuer, S., . . . & Mackill, D. (2009). Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond. *Annals of Botany* 103: 151-160.
 134. Serrat, X., Esteban, R., Guibourt, N., Moysset, L., Nogués, S., & Lalanne, E. (2014). EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. *Plant Methods* 10: 5.
 135. Sharoni, A. M., Nuruzzaman, M., Satoh, K., Shimizu, T., Kondoh, H., Sasaya, T., . . . Kikuchi, S. (2011). Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in Rice. *Plant & Cell Physiology* 52: 344-360.
 136. Shiono, K., & Yamada, S. (2014). Waterlogging tolerance and capacity for oxygen transport in *Brachypodium distachyon* (Bd21). *Plant Root* 8: 5-12.

137. Sonh, K., Lee, S., Jung, H., Hong, J., & Hwang, B. (2006). Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought salt stress tolerance. *Plant Molecular Biology* 61: 897.
138. Spitzer, M., Wildenhain, J., Rappsilber, J., & Tyers, M. (2014). BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. *Nature Methods* 2: 121-122.
139. Takatsuji, H. (1999). Zinc-finger proteins: the classical zinc finger emerges in the contemporary plant science. *Plant Molecular Biology* 39: 1073-1078.
140. The *Arabidopsis* Information Resource (2017) Base de datos. Recuperado de: www.arabidopsis.org/portals/mutants/index.jsp
141. The *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (2017) Base de datos. Recuperado de: mtgea.noble.org/v3/
142. Thorvaldsson, H., Robinson, J., & Mesirov, J. (2013). Integrative genomics viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* 14: 178-192.
143. Till, B. J., Teynolds, S., Greene, E., Codomo, C., Enns, L., Johnson, J., . . . & Henikoff, S. (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Research* 13: 524-530.
144. Till, B., Cooper, J., Tai, T., Colowit, P., Greene, E., Henikoff, S., & Comai, L. (2007). Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BioMed Central Plant Biology* 7: 19.
145. Tiwari S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. (2003) The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *The Plant Cell* 15: 533-543.
146. Tripathi, P., Rabara, R., Langum, T., Boken, A., Rushton, D., Boomsma, D., . . . & Rushton, P. (2012). The WRKY transcription factor family in *Brachypodium distachyon*. *Biomedical Central Genomics* 13: 270.
147. Uchida, N., Sakamoto, T., Kurata, T., & Tasaka, M. (2011). Identification of EMS-induced causal mutations in a non-reference *Arabidopsis thaliana* accession by whole genome sequencing. *Plant & Cell Physiology* 52: 716-722.
148. van Dogen, J. T., & Licausi, F. (2015) Oxygen sensing and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 66:345-67.

149. van Veen, H., Muströh, A., Barding, G., Vergeer-van Eijk, M., Welschen-Evertman, R., Pedersen, O., . . . & Sasidharan, R. (2013). Two rumex species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *The Plant Cell* 25: 4691-4707.
150. Verdier, J., Torres-Jerez, I., Wang, M., Andriankaja, A., Allen, S., He, J., . . . & Udvardi, M. (2013). Establishment of the *Lotus japonicus* gene expression atlas (LjGEA) and its use to explore legume seed maturation. *The Plant Journal* 74: 351-362.
151. Voeselek, L. A., & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptative traits and processes: an overview. *New Phytologist* 206: 57-73.
152. Voeselek, L., & Bailey-Serres, J. (2013). Flooding tolerance: O₂ sensing and survival strategies. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 647-653.
153. Vogel, J., & Bragg, J. (2009). Chapter 16. *Brachypodium distachyon*, a new model for the Triticeae. En C. Feuillet, & G. Muehbauer, Genetics and genomics of the Triticeae, Plant genetics and genomics: Crops and models 7 (págs. 427-449). Springer Science.
154. Vogel, J., & Hill, T. (2008). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Reports* 27: 471-478.
155. Wang D., Pei, K., Fu, Y., Sun, Z., Li, S., Liu, H., Tang, K., Han, B., Tao, Y. (2007) Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene* 394:13-24.
156. Wang, D., Guo, Y., Wu, C., Yang, G., Li, Y., & Zheng, C. (2008). Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice. *BioMed Central genomics* 44, 20.
157. Wang, Z., & Dane, F. (2013). NAC (NAM/ATAF/ CUC) transcription factors in different estress and their signaling phatway. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 1397-1408.
158. Wei, K., Chen, J., Wang, Y., Chen, Y., Chen, S., Lin, Y., . . . & Xie, D. (2012). Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in Maize. *DNA Reseach* 19: 463-476.
159. Weigel, D., & Glazebrook, J. (2006). EMS mutagenesis of *Arabidopsis* seeds. *Cold Spring Harbo Protocol* 5.
160. Weits, D. A., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., Hubberten, H., Reigler, H., . . . & Licausi, F. (2013). Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Communications* 5: 3425.

161. Wen, F., Zhu, H., Li, P., Jiang, M., Mao, W., Ong, C., & Chu, Z. (2014). Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of WRKY family genes in *Brachypodium distachyon*. *DNA Research* 21: 327-339.
162. Xie, L., Yu, L., Chen, Q., Wang, F., Huang, L., Xia, F., . . . & Xiao, S. (2015). *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein ACBP3 participates in plant response to hypoxia by modulating very-long-chain fatty acid metabolism. *The Plant Journal* 81: 53-67.
163. Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., & Chua, N. (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes and development* 14, 3024-3036.
164. Yamasaki, K., Kigawa, T., Teteno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., . . . & Yokoyama, S. (2004). Solution structure of the B3 DNA binding domain of the *Arabidopsis* cold-responsive transcription factors RAV1. *The plant cell* 16, 3448-3459.
165. Yanagisawa, S. (2002). The Dof family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 12: 555-560.
166. Young, N., Cannon, S., Sato, S., Kim, D., Cook, D., Twon, C., . . . & Tabata, S. (2005). Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 137: 1174-1181.
167. Zamora Hernández, T. (2016). Identificación y estudio de la expresión de los Factores de Respuesta al Etileno del Grupo VII en *Brachypodium distachyon* que participan en la respuesta al estrés por inundación. Tesis. Universidad del Papaloapan.
168. Zhang, X., Henriques, R., Lin, S., Niu, Q., & Chua, N. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 1: 641-646.

Anexos

Anexo A. Familias de Fts

RAV

La familia RAV contiene dos dominios de unión al DNA, el dominio AP2 en la región del N-terminal y en la región del C-terminal posee una región B3 (*VPI/ABI3*) que reconoce la secuencia CACCTG (PF00847; Yamasaki *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2006). A partir de ensayos utilizando la proteína de fusión recombinante glutatión S-transferasa se identificó que RAV1 se une específicamente a secuencias de reconocimiento bipartitas compuestas por dos motivos no relacionados, CAACA y CACCTG, que se encuentran separados en dos orientaciones diferentes (Kagaya *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2004). Con el análisis de la expresión en *Arabidopsis* se encontró que *RAV1* se induce rápidamente de manera paralela a *CBF2* en respuesta a bajas temperaturas (Fowler y Thomashow, 2002). También se ha reportado que la transcripción de *RAV1* puede ser estimulada por heridas, el tacto, la sequía, el estrés salino y por patógenos (Kagaya y Hattori, 2009; Sonh *et al.*, 2006).

Familia NAC

La familia NAC deriva su nombre de los tres factores de transcripción: *NAM*, *ATAF1-2* y *CUC* (Nuruzzaman *et al.*, 2010; Wang y Dane, 2013); se caracterizan por tener un dominio N-terminal altamente conservado de unión a DNA y una región C-terminal variable que tiene la función de activación y represión de la transcripción (Hu *et al.*, 2006). Están involucrados en los procesos de desarrollo, formación de órganos florales, el control hormonal, defensa al ataque de patógenos y en respuesta a las heridas. En *Arabidopsis*, NAC controla la división celular además de que se induce por auxinas para la formación de raíces laterales (Xie *et al.*, 2000). En arroz, la sobreexpresión del gen *STRESS-RESPONSIVE NAC1 (SNAC1)* aumentó la producción de semilla en 24% más comparada con el control (Hu *et al.*, 2006). Recientemente, Hong *et al.* (2016) reportaron en plantas transformadas de arroz con el factor de transcripción NAC, *ONAC022*, un aumento en la tolerancia a la salinidad, al ácido abscísico y al frío.

Familia ZF (Dedos de Zinc)

El término *ZINC FINGER (ZF)* se refiere a un dominio en el que un ion de zinc está rodeado por cisteínas (Cys) y/o histidinas (His); su estructura tridimensional está constituida por dos láminas β -antiparalelas y un α -hélice, la familia ZF se divide en diferentes tipos dependiendo del número y la

ubicación de los aminoácidos Cys (C) e His (H): C2H2, C2HC, C2HC5, C2C2, CCCH, C3HC4, C4, C4HC3, C6 y C8 (Takatsuji, 1999; Wang *et al.*, 2008). Los dominios ZF poseen dos características principales, se separan mediante espaciadores largos que varían en longitud y secuencia, además de contener la secuencia conservada QALGGH dentro de las hélices de los ZF (Liu *et al.*, 2015). Están involucrados en el crecimiento y desarrollo de la planta, en respuesta a estrés ambiental y por fitohormonas (Li *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, se observó mediante análisis de expresión que los genes *AZF2* y *STZ* del tipo ZF C2H2 se inducen en condiciones de sequía, frío, alta salinidad y por ácido abscísico (Sakamoto *et al.*, 2004).

ZF-DOF

Los factores de transcripción *DNA BINDING WITH ONE FINGER (DOF)* se encuentran involucrados en una variedad de procesos biológicos como la fotosíntesis, el crecimiento y la respuesta al estrés (Moreno-Risueno *et al.*, 2007). Se caracterizan por contener un dominio conservado de 50-52 aminoácidos estructurado como un ZF C2C2 que reconocen la secuencia (T/A) AAAG (Plesch *et al.*, 2001). Este dominio es bifuncional ya que media la unión DNA-proteína y la unión proteína-proteína (Guo y Qiu, 2013).

La primera proteína DOF se encontró en el maíz como una proteína de unión a DNA (Yanagisawa, 2002) y se han identificado tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Mediante un análisis bioinformático en el arroz, se identificaron 30 genes DOF y se realizó un análisis filogenético en el que se clasificaron en cuatro grupos (Lijavetzky *et al.*, 2003).

Familia HSFs

Son importantes contra el estrés por el daño causado por las altas temperaturas y en otros procesos biológicos de las plantas; reconocen dominios de unión palíndromos AGAAnnTTCT llamados Heat Stress Elements (HSEs, elementos de estrés por calor). Contienen un dominio de unión al DNA en la región del N-terminal que se caracteriza por un motivo hélice-giro-hélice central (HTH), un dominio adyacente con una repetición hepta hidrófobo (HR-A/B) implicado en la oligomerización, un motivo corto de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES) además de una región C-terminal de activación (HAH; Nover *et al.*, 2001; Mittal *et al.*, 2009; Scharf *et al.*, 2012). En *Capsicum annuum L* se identificaron 25 miembros de HSFs mediante análisis bioinformático y expresión por qPCR en diferentes etapas de su desarrollo; se observó que se encontraban expresados de manera constitutiva a niveles relativamente altos durante todas las etapas del desarrollo bajo condiciones normales (Guo *et al.*, 2015).

Familia ARF

Los *ARFs* son factores de transcripción que se unen a elementos TGTCTC de respuesta a la hormona vegetal auxina (AuxRE). Los ARFs se transcriben en una gran variedad de órganos y tejidos y están implicados en varias etapas del desarrollo de la planta. En *Arabidopsis* y arroz se clasifican a los ARFs en tres grupos. Todos tienen un dominio de unión al DNA en la región del N-terminal, una región media que funciona como un dominio activador o represor de la transcripción y un dominio de interacción proteína-proteína en la región del C-terminal de dimerización (CTD; Tiwari *et al.*, 2003; Guilfoyle y Hagen, 2007; Wang *et al.*, 2007). Okushima *et al.* (2005) identificaron líneas de inserción de T-DNA de la familia ARF en *Arabidopsis*, encontraron que la mayoría de las líneas mutantes no presentaron un fenotipo; generaron mutantes dobles ARF19 y ARF7 donde observaron que había afectación en la formación de raíces laterales.

Anexo B. Secuencias proteicas de la familia DNAJ de *Arabidopsis*

>At3g44110 tipo I

MFGRGPSKSDNTKIFYEILGVPKSASPEDLKKAYKKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAQAAYEVLSDPEKRE
IYDQYGEDALKEGMGGGGGGHDPFDIFSSFFGGGPFGGNTSRQRRQRRGEDVVHPLKVSLEDVYLGTMK
KLSLSRNALCSKCNKGKSGASLKCQGGCQSGMKVSI RQLGPGMIQQMQHACNECKGTGETINDRDRC
PQCKGDKVIPEKKVLEVNVEKGMQHSQKITFEGQADEAPDVTGDIVFVLQQKEHPKFKRKGEDLFVEH
TSLSTEALCGFQFVLTHLDGRSLLIKSNPGEVVKPDSYKAISDEGMPIYQRPFMKGKLYIHFTVEFPDS
LSPDQTKALEAVLPKPSTAQLSDMEIDECEETTLHDVNI EDEMRRKAQAQREAYDDDDDDDDHPGGAQR
VQCAQQ

>At5g25530 tipo II

MGLDYYDILKVN RNATEDDLKKS YRKLAMKWH PDKNPNTKTEAEAKFKQISEAYEAKYEV MFQVLSDPQ
KRAVYDQYGE EGLSDMPPPGSTGNNGRAGGFNPRNAEDI FAEFFGSSPF GFGSAGGPGRSMRFQSDGGG
GMFGGFGGNGSEN NIFRTYSEGTPAPKKPPPVESKLPCSLEELYSGSTRKMKISRSIVDANGRQAQE
TEILTIVVKPGWKKGT KIKFPDKGNEQVNQLPADLVFVIDEKPHDLFTRDGNDLITSRRVTLAE AIGGT
TVNINTLDGRNLPVGV AEIVSPGYEFVVPGE GMPIAKEPRNKGDLKIKFDVQFPARLTTEQKSALKRVL
AG

>At5g06110 tipo III

MQSWGINS AIKLLTYSSELKDGQALYASSNCHPVKALNREPAGHAFHSAALKLRGCAKEATSKNEDTDK
KVPKEKDGEYIPSYDSHNIKGKKKSGKLQHDHYALLGLGNLRYLATDDQIRKSYRDAALKHHPDKLATL

LLLEETEEAKQAKKDEIESHFKLIQEAYEVLMDSTKRRIFDSTDEFDDKVPTDCAPQDFFKVF'GPAFKR
NARWSNSPLPDLGDENTPLKEVDRFYSTWYTFKSWREFPEEEEHDI EQAESREEKRWMERENARKTQKA
RKEEYARIRTLVDNAYKKDIRIQKRKDEKAKKLQKKEAKVMAKRQQEEAAAAAIEEEKRRKEEEAKRA
AEAAQLHKRAKEREKLLRKERSRLRVLSAPVLSQRLLGISDEHVEDLCMSLNTEQLRKLCDKMNKEG
MALAKVIKNGSNIDDDKIEIEEEEVQVAVKQNGHIEANGHVEANGHVEAKVDTATHEKKEKPWSKEEID
MLRKGTTKFPKGTSQRWEVISEYIGTGRSVEEILKATKTVLLQKPDSAKAFDSFLENRKPAASINSPLS
TREELGEP I I PTKAHEDNNSTKTETAEQNGKTKENNNNSNGNSEPAAASGSDPDGWSAVQERALVQALKT
FPKETNQRWERVATAVPGKTMNQCKKKFADLKDVI RTKKPTA

>At5g11500 tipo IV

MVFYFKARPDAGDYTI FMGLDKFENEELIKYGFTEDVWFHVDKMSSAHVYLRRLHRGQSFDDISEGVLED
CAQLVKANSIQGNKVNNVDVVYTPWSNLKKTASMDVGQVGFHNSKMVRTIRVEKRVNEIVNRLNKT'KVE
RTPDLRAEREAVNAAERAERKQHLREKKKREEIDRLEKERQSEMRSYKGLMVTDKMTSNKDIASSNKSL
QELEDDFM

Anexo C. Secuencias de los uORFs de la familia bZIP

Letras en color **azul** indican la zona de los uORFs
Letras en color **rojo** codón de inicio principal

<i>Arabidopsis</i>			
Gen	Consensos		Secuencia de aminoácidos
	uORF	ATG opt.	
AtbZIP11 (AT4G34590)	TTTGAGACAC ATG TC TCCAATAA	GTGTTACTAA ATG GA ATCGTCGT	MSP I I L S E I F L S G F M L N S T I R R R T H L V Q S F S V V F L Y W L Y Y V
AtbZIP44 (AT1G75390)	TCAAACATTC ATG TC TCCGGTGA	GTGTTTTAAT ATG AA TAATAAAA	M S P V I S E I L R S G L T I D S S L R R R H L V Q S F S V V F L Y W F Y V F S
ATBZIP53 (AT3G6242)	GAATGAATCT ATG AG CTACTCAA	TCAACGAGAA ATG GG GTCGTTGC	M S Y S I L F R R I R I L H S F S V V Y L Y Y T Y V F S
AtbZIP1 (AT5G49450)	GAGTTATGAA ATG AT AAATCTCA	ACAAAAAAAC ATG GC AAACGCAG	M I N I N Q F L V Y H S I S V V I L H W F Y V I S
AtbZIP2 (AT2G18160)	TCGGAAACTG ATG AC TCCCGTTC	TTAAAAATCA ATG GC GTCATCTA	M T P V L C E I L L S G L T V K S A L C R R T H L V Q S F S V V F L Y W F Y N V S
AtbZIP2 (AT2G18160)	TCGGAAACTG ATG AC TCCCGTTC	TTAAAAATCA ATG GC GTCATCTA	M T P V L C E I L L S G L T V K S A L C R R T H L V Q S F S V V F L Y W F Y N V S
<i>Brachypodium distachyon</i>			
Bradi3g06670	CACACAAGAG ATG AG CAGTCTCC	TTCCGTCCAT ATG CA ACGCCAGG	M S S L R S F R L E A A L L C F P S D L
Bradi2g38380	CCGTCCTCCG ATG AA GCTGCGCG	AAATCCGACC ATG TC GCGCCGGA	M K L R V R C R S H S F S V A F L Y W F Y D F S
Bradi4g04720	TCTGAGCTTT ATG AA GATCGCCA	GGCTTGGGAA ATG TC GTCGTCGT	M K I A T H L R R S C F L Q S F S V V F L Y Y F Y V I S
Bradi3g22040	AATTTGGTAG ATG TT ACCAACCC	TAGCTAAAAG ATG AG CCTGTCAG	M L P T L S E V N L S E F M I S S T L R R G S H L V L S F S V V F L Y W F Y V F E S
Bradi4g27720	GTTTGTGTAG ATG TT GTTGCTGG	GAAGGCGATC ATG TC AAGTGGGA	M L L L V L W E H F L S G F M V G S A I T R L V Q S F S V V F L Y W F Y V F S V S S L
Bradi3g02980	AGCGGAAGCC ATG TC GCCGGTGA	TCCTTTCCTC ATG GC GTCTTCCA	M S P V I S E I L L S G F M I N S T L R R R T H L V Q S F S V V F L Y W F Y V F S

Anexo D. Secuencias utilizadas para el diseño de oligonucleótidos

En letras negritas se indica la zona donde se diseñaron los oligonucleótidos para PCR y en rojo para RT-PCR. Código de colores:

5'UTR



3'UTR



EXON



>Bradi1g17961

ACAACACCCACCTTT**CGGCCCTCGTTTACTATCAGCACCGCAGCAAGATTGCATAGATCTTTTCTCAAAAAAGAGA**
AAAGAAAGATTGCATAGATTATTACCAGCAATGTGTGGCGGTGCGATCATCCCCACTGCATCCCGGAGCACGAC
CACCACCGCACAGCCGACTTCTGGCCGCTCGCCTCGGACGCCGGGCACGAGCTCTACCCGGCTGGCCTGAGCCTG
ACCGGCGCGTGCAAGTTCCACACTACCAAGGTACGTGCTAGTAGTATGCCATCTTTCTCACACGCTAATTAGT

TGTAATTCGTATCGACCTTCTGCCTGTACCGGGAACACGGATGAGAGCTTGGGTTTCTTCCGCAGAGCCCCGCGGA
GCCGAGCAGGAGGCGGGAGGGCAGTAACAACAAGCGGGAGAGGAAGACGGCGTACCGCGGCATCCGGCGCCGGCC
GTGGGGGAAATGGGCGGCGGAGATCCGGGACCCCCGGCAAGGGCGC

T-DNA JJ22103

GCGGGTGTGGCTCGGCACCTTCGCCGACGCCGAGGCTGCCGCAAGGGCCTATGACCGCGCCGCGCGCCGTATCCG
GGGGCCAAGGCCAAGGTCAACTTCCCCAACGAGGACCCGCCCGCGGACGAGGTCCCCGTCCACCGCGGCAC
GGCGATGGCACCCCTTGCCCTGGTACTACGACGACGGTACGGTGTGTGCGGGCCTCTGCCGCCATCCATATGACGT
CGCCGGCAACGACGTTCGTACGGCGGATGAGGGGCGCGGCGGGCGGCTGCCTACGTGCACCACCAGATGCCGCC
ACAGC**ATCAGCAGCAACAGGAGG**CTGGGTTGGAGCTCTGGAGCTTCGATGACAACATCAACATG**GCCGTGTCTAT**
GTAATTAGTGGTGAAATGATCGACTTGAAGATGTCTTTCCATATGGTTTTGGTTTTTGTAAAGACCCTCGAAGTTC
TTTTTTCGAAGATGAATACCCAATAAATAA**ATTTGTAGTGCTTCACGGTTGC**

>Bradi1g17961

ACAACACCCACCTTTTCGGCTCGTTTACTATCAGCACCGCAGCAAGATTGCATAGATCTTTTTCTCAAAAAAGAGA
AAAGAAAGATTGCATAGATTATTACCAGCAATGTGTGGCGGTGCGATCATCCCCGACTGCATCCCGGAGCACGAC
CACCACCGCACAGCCGACTTCTGGCCGCTCGCCTCGGACCGCGGGCACGAGCTCTACCCGGCTGGCCTGAGCCTG
ACCGGCGCGTGCAAGTTCCCACACTACCAAGGTACGTGCTAGTAGTATGCCATCTTTCCTCACACGCTAATTAGT
TGTAATTCGTATCGACCTTCTGCCTGTACCGGGAACACGGATGAGAGCTTGGGTTTCTTCCGCAGAGCCCCGCGGA
GCCGAGCAGGAGGCGGGAGGGCAGTAACAACAAGCGGGAGAGGAAGACGGCGTACCGCGGCATCCGGCGCCGGCC
GTGGGGGAAATGGGCGGCGGAGATCCGGGACCCCCGGCAAGGGCGCGCGGGTGTGGCTCGGCACCTTCGCCGACGC
C

T-DNA JJ28379

GAGGCTGCCGCAAGGGCCTATGACCGCGCCGCGCGCCGTATCCGGGGGGCCAAGGCCAAGGTCAACTTCCCCAAC
GAGGACCCGCCCGCGGACGAGGTCCCCGTCCACCGCGGCACGGCGATGGCACCCCTTGCCCTGGTACTACGAC
GACGGTACGGTGTGTGCGGGCCTTGCCGCCATCCATATGACGTGCGCGGCAACGACGTTCGTACGGCGGATGAG
GGGCCGGCGGCGGGCTGCCTACGTGCACCACCAGATGCCGCCACAGC**ATCAGCAGCAACAGGAGG**CTGGGTTG
GAGCTCTGGAGCTTCGATGACAACATCAACATG**GCCGTGTCTATGTAATTAGTGGT**GAAATGATCGACTTGAAGA
TGTCTTTCCATATGGTTTTGGTTTTTGTAAAGACCCTCGAAGTTCTTTTTTCGAAGATGAATACCCAATAAATAA
TTTGTAGTGCTTCACGGTTGC

>Bradi2g27920

TAAGACAATTTAAGTAGGGGTATTACTTACAAATTTTGCCATTTTCTTCTCATCGTTTCGTTGGTACATTGTCCGA
TAGTCAGAAAAGGCAGCATTTCCTTACTTATTTTTACGAATGGCAAAATTATGTGTTCTTTGTTTACAAAGAA
GCGAGCGATTTTTCTCCCTTTTATAAACTCTAGTCAGCATGTACGTTTCAGATTTTCAGATACTCTACCAGAAAAAA
AATCTCGCTACCCAAAGAAGCCAACATATACTGTTGTTTTGGAGGGAGCATTGGAGTTTGGCCCTTCGCCGTGCA
AACCGTGTGCTAGTTTATTGTTTTGAACCCACGGTTTTTCCGTCAAACCGACGGCAGAAACAGGCGGAATTCTGTT
GGCGGATCTTGCTTTTCCCGTCTTTTCTTGAATCGCGCGCTGACCTGTTGAACGCGTGTCCCAACATGGAG
ACCCGACTT**GCGTGTTAAAGCCGAGGCTTGCGGCGCGCAACAGGTGTGCT**

T-DNA JJ13579

CTCGTCTTCTTTCTACTCAAGGTACGGGGTGCACGGCTCCGCACCCCTACCGGCCTCTTTGTCCAACGCTGCGCC
CTCTCAATCGCTTTCCACAGCTTTCTCCAGTATCATCACGGTATCAGTCTATATGTCAGCCCGCAGCATTGTACA
GTACAGTACCACGGACATCGACTAGTCATAACCCAGTACTTGTGCCACTGTGCTCCTCTGCACGCTCCACTCCTC
TCTTTAGTCAGTTCTTCAAGCTCGTGTATATATAAAGGAGCAAAGTGGGTGTTCTAAAACGAAGCAAATAAC
TAGCAATTGCTTTAGCCTCCTGTATCTCGCGTTAGTTGTCAAAGCGAATAAGTTGAGAAACGACACAATGTGCGG
AGGAGCGGTATCGCCGGCTTCGTCCCCGAGGGATCCTCCTCATCGAGCCTCACCGGTAAATACTACACTAGCCA
CTTAGCCAGGCCGACTTGATGCGGG**CGATTCCATTTTATATAATCAACTT**GTACAGTACAAACTTGCAGGCCTCAGT
ACTTAATGCTAGTCCTATCTCATATATATGCAACTTGTCTGGTCTTATTTTCTGCAGATGATTCTTATCAAAAT
CTATAAGCATGGTTACAGTGGACCGATGGCAGTTAATATGTGCTGCTGGTTTTATGTGTCAGGGGAGGAGTTGACA

ACGGAGAAGCCGCGGGCGCCTGGGCGGAAGACGGCGTACCGCGGGATCCGGCGCCGGCCATGGGGCCGCTGGGCA
GCGGAGATCCGCGACCCGAGGAAGGGGACGCGCGTCTGGCTGGGCACCTACGCCACCGCCGAGGAGGCCGCGCTA
GCCTACGACGTGGCGGGCGCGGACATCCGCGGGGCCAAGGCCAAGCTCAACTTCCCTCCGGCGGTTCGACCACGCG
GCCGTGGAGGAGGCAAAGAAGCGCAGGACGAAGGCCGCGGCCGTGGAGAGCTCGTGCTCTTCGTCTCCCTTCCG
GCAACGTCTACGGGCGGGCGGGCGGGCGGAGCTGAAAGGCTTCGGGAGTGCATGTCCGGGCTGGAGGCGTTCCCTG
GAGCTGGAGAACCCCGCTGGAGTCGGCGAAGATGTTCGACCTCATGTTTCGAGTAGACTGTAGACGCTTCCATTGGA
CCGGTAGTCTCTGGAATTTCCGTAGTCTCTTGTAGCCTTGACTGTTCGGGAGTCTCAAGTCTGCAGTTCAGCCCC
TGGTGTCTACTGCTAGCGTGAGGCTGGCTAAATAAACAGATTTCAGGACCCCTCTGATCCAAAATAAATGGATAA
ACAGATTTCAGGGATGTCTACAAATAGACTGTCTGTAGATTGTATTACTGTCTCTGATCCAAAGTGTCCGGACTGA
ATTTTCTTTTAAATAAAAATATATAAAAATAATTTTGCCTGTAATCTTGATTTTAGGGTTTTATATTTAATAAAA
TAATATTTTTCAACTTCAAA

>Bradi2g55797

TTGATCATCTCATCATGATCACGCACGTCAAGACAAAACCAGACGTTTCTCATCCGAAACAAAAGGAGGAAAATC
CAGCGGAAGCAAATCCGTTCCCGGCTTCCCTATATTCCCTGCACGGCACTCGGCCGACCTCTGTTTCCCTTTTACCG
CCGTGGGTTCGGCTCCAGCACACACGCGTCCGGTGCGCCGCCCGCGCCGATGCTCCCCGCCCGAGTGCGCCTGCA
CGCCAAAACGTGTGCCCGCTGCCGAATAAAACGCCCCACGGGATTCCAGATTCCGGTTCCATCGCCAGAGTTC
CCGAGCACACGGGTGAACCCACGCCCCACACCAATATATACAAATCCGATTTCCACGAGGAGCAACGAAACCA
CCGAGCCAAAGCGACACACGGCGCCGCCGCCAACCATCCGTCCCGTCCACCACGGGCACACGCAAACGCAAGC
GCCCTTTTCTTTTCCAGCCGATTGACGCGGCGCGCACTTGGCACACACCGAGATCGTTTTCCGTGGC

T-DNA JJ2207

CATGGATTCTTCCCTACTACTGCTCCAACCTACCAGGCAGCGGCAGCGGCCGCCCGCCGCTGGAGTCGGCCGTGGAG
CAAGGCGGAGGACAAGGCGTTTCGAGAACGCGCTGGTGTGTGCCCGGAGCACGCGCCCGGCCGCTGGGAGCGCGT
CGCGGCGCACGTCCCCGGCCGACGCCCGGGAGGCTGGGAGCACTACCAGGCGCTCGTTCGCCGACGTCGACCT
CATCGAGCGCGGCCGCGCTCGACGTCCCCGCTTGTGGAACCACGACGAAGACGGCGACGACGACGGCACGCGCGC
CCGCCGCGCCGCAAGGCCCGCGGGCAGGAGCGCCGCCCGCGGCATACCCTGGTCCGAGGAAGAACAACAAATACGG
AATAAAACGACTCAAATCCTCTCTGTCTCTCTCCCTTTCTGTTTCCCTCGCTGTTTCGTGGAGGTTTCGAGATTCTTCC
GCATTGGTTTTGTTTCAGCGGAGAAGCCAACCTAAGTCTACAATGTCTCCAGCTGGCCCGTGGGCCCTC
CCTGCCAGAGACCCAACCGCAGCCGCTTTTCCCTCCAAATTGACTCTTCTTTGTTGTTGCCGATCGCGTGTCTTG
CGCAGGCTGTTTTCTCGACGGGCTGGAGAAGTACGGGCGAGGCGACTGGAGGAACATCTCGAGGTTTCGCGGTGAGG
ACCCGGACGCCGACGCGAGGTGGCCAGCCACGCGCAGAAGTACTTCATCCGCCAGGCCAACGCCGCCACGCGCGAC
TCCAAGCGCAAGAGCATCCACGACATCACAAACCCCTTGACCGCAAGCGCTGGCGGGATCATCGCGCACGGCGAC
CGACAGCTACTCCCCTTCTTTAATCGCCACTACTCGATCTAGTGCCACTATGCTTCTTATCTTAGTTAACCAACG
ACGTGTACATTCTATATCCTAGTAGTACTACTGTCTTAGTTAGCTCAAGACCTCTGCTCTAGATTTTCGTAGCGT
TTATTAGGGTGAAGGAACCTAATGGAGATCGACGTGGTTAAAACAAAAGATGGTGTCTAGGTTAGGTTGATGCA
GATGTACGGTTTTACTACGGCTTAGTCATGATTTTGTAAACCTGCTGTGCAAGCTGTACTGGATAATCTTGTAC
GGCGATGTGTCCCAAGTATGAAAGGCATGTGTTGGAGAGACATGTTGCGAGCTGCTCCCGTTCTGCGACACGTG
TTTGGACTTTTCCGGGCGACTCCGTGTGACAGTGTGAGAGATGGCAGGTTCCAGTGGCGCGTGTTTAACAGGTGTG
CGCACTTGTCTAGTGTCCGATCTCAGGACTCCTCTTCTGTC

>Bradi2g55797

TTGATCATCTCATCATGATCACGCACGTCAAGACAAAACCAGACGTTTCTCATCCGAAACAAAAGGAGGAAAATC
CAGCGGAAGCAAATCCGTTCCCGGCTTCCCTATATTCCCTGCACGGCACTCGGCCGACCTCTGTTTCCCTTTTACCG
CCGTGGGTTCGGCTCCAGCACACACGCGTCCGGTGCGCCGCCCGCGCCGATGCTCCCCGCCCGAGTGCGCCTGCA
CGCCAAAACGTGTGCCCGCTGCCGAATAAAACGCCCCACGGGATTCCAGATTCCGGTTCCATCGCCAGAGTTC
CCGAGCACACGGGTGAACCCACGCCCCACACCAATATATACAAATCCGATTTCCACGAGGAGCAACGAAACCA
CCGAGCCAAAGCGACACACGGCGCCGCCGCCAACCATCCGTCCCGTCCACCACGGGCACACGCAAACGCAAGC
GCCCTTTTCTTTTCCAGCCGATTGACGCGGCGCGCACTTGGCACACACCGAGATCGTTTTCCGTGGCC

T-DNA JJ2214

ATGGATTCTTCTACTACTGCTCCAACCTACCAGGCAGCGGCAGCGGGCGGCCGCGCCGTGGAGTCGGCCCGTGGAGC
AAGGCGGAGGACAAGGCGTTTCGAGAACCGCGCTGGTGCTGTGCCCCGAGCACGCGCCCCGGCCGCTGGGAGCGCGTC
GCGGCGCACGTCCCCGGCCGAGCCCCGGGAGGCCTGGGAGCACTACCAGGCGCTCGTCGCCGACGTTCGACCTC
ATCGAGCGCGGCCGCGTTCGACGTCCCCGCTTGCTGGAACCACGACGAAGACGGCGACGACGACGGCACGGCGGCC
CGCCGCGCCGCAAGGCCCGCGGCGAGGAGCGCCGCCGCGGCATACCCTGGTCCGAGGAAGAACAACAA GTACGGA
ATAAAACGACTCAAATCCTCTCTGTCTCTCTCCCTTTCTGTTCCCTCGCTGTTTCGTGGAGGTTTCGAGATTCTTCCG
CATTGGTTTTGTTTCAGCGGAGAAGCCAACCTAACCAACTAGTCTACAATGTCTCCAGCTGGCCCGTGGGCCCTCC
CTGCCAGAGACCCAACCGCAGCCGCTTTTCCCTCCAAATTGACTCTTCTTTGTTGTTGCCGATCGCGTGCTTGC
GCAGGCTGTTTTCTCGACGGGCTGGAGAAGTACGGGCGAGGCGACTGGAGGAACATCTCGAGGTTTCGCGGTGAGGA
CCCCGACGCCGACGCGAGGTGGCCAGCCACGCGCAGAAGTACTTCATCCGCCAGGCCAACGCCGCCACGCGCGACT
CCAAGCGCAAGAGCATCCACGACATCACAACCCCTTGACCGGCAAGCGCTGGCGGGATCATCGGCGACGGCGACC
GACAGCTACTCCCTTCTTTAATCGCCACTACTCGATCTAGTGCCACTATGCTTCTTATCTTAGTTAACCAACGA
CGTGTACATTCTATATCCTAGTAGTACTACTGTCTTAGTTAGCTCAAGACCTCTGCTCTAGATTTTTCGTAGCGTT
TATTAGGGTGAAGGAACATAATGGAGATCGACGTGGTTAAAAAATAAAGATGGTGTCTAGGTTAGGTTGATGCAG
ATGTCACGGTTTTACTACGGCTTAGTCATGATTTTTGTAAACCTGCTGTGGAAGCTGTACTGGATAATCTTGTACG
GCGATGTGTCCCAAGTGATGAAAGGCATGTGTTGGAGAGACATGTTGCGAGCTGCTCCCGTTCTGCGACACGTGT
TTGGACTTTTTCGGGCGACTCCGTGTGACAGTGTGAGAGATGGCAGGTTCCAGTGGCGCGTGTTTAACAGGTGTGC
GGCACTTGTGAGTGTCCGATCTCAGGACTCCTCTTCTGTG

>Bradi2g16150

CCAGCATGCACTGCTGCCTATTATAATGGCGGTGGACTCCAGATCCGTTCGCCACGCGTCTCCCCCGCCACCTTC
TTATAACCACGCTCCACTCCCATCCATCCATCCATCGATGGAGTCTCCTCCATCGCCGCCGGCCATCTGTTGAT
TAATTGATTCTTGATTCTTTGAATCTCGTGCGTCCGTTCGTTCGATGGAGTCGCGGCCGTCGTTCGGGCTTCGTTCGCG
GGCGTGAAGCGCGGCAGCGTTCGGCGAGATGGACTTCTTCGAGACGGAGATGCGCAAGGAGAAGCGCGACAGGAAG
GAGCTTGCCGGCGCCGGGGACGACGACGGTCTCGGCATCAAGAATGGGGACGACCTCACAATCGACGTACGTGAT
ATTGAATTTTTGTCTAATTTTGCATCACATTGCATTGATTTGAGGTGATTTGATCTCATGAGCGAATTGTGGGAT
CGGATTTGGTTGTGTTTGTGTTGTTGATTGCAGATGGGGCTGCACGTGGGGAGGAGGACGCGGTGAGGAGGAA
CAGCGGCAGCGAGGAGTCCACCGTCGACGACGGCGGCGTCTCCTCCAACGACGAACCTTGATCATCATCACTACAT
GGAGGCCAAAGCCGAGGTACGTTACGTGAGAAATGAGGAACTCCCTTCGAGATAAAATCTACATTTTTGTGACAAAT
AGTAAGACAGATGGAACCAACACAACAATGTTGACTTGGTTCTCGTTCATTGTTTCGTCTCTGATCTCAGTGCTA
CTTAATTTTTCTCCCAATTCACGTTTCACGGTTCGTTCGTTGCCGTTAGATAAATTTCTTTTAAACGATTCAGACCAC
TTATCTCCTATGTGCTTATTAGATAGGAAAATAAATAAATAAATCAACTTTTGAACGTTGGTTAAGGAAATTG
ACACTATCTCATTTACAAATTACAGCTGTTTATTTATCAGTCAACAATCATAGGCGCTCGATTAACATTTTTCTCA
TCATTTGTATTTCCATAAAAATTTGCACGAACCTCAATAATTGGATGAAACGGTTGTTAGAATCGACTTAAAAATA
GTAGAAATAGCAAAACCACCAGAGAAAAACATGTGACTACACTAATTAATGTCGAGGTTGTCTAGTTGACTAATT
TTTTTTGTAAACCACATTTCTTAGTCTATGCACATCAACATTCACACATTTCCCGTGATATCCCATCTCAAATTT
AAGTCAACCCATTTGACAAACAATATTACCCTCTTTAAAAAACATCTTTTATAGATGATTGGGATTTTTTTTAA
TCGTGCAACCAGAAAACACTACTAGCAAAAGCGAATACTGAATGAAGTCTATTTTTTCGAGCAGTTGGCAGCGA
CGAAATCGGAGCTTGCGCGGGTGAGAGAGGAGAACAAGCGACTGAAGAGCATGCTGAGCAGCGCCAACAGCAAGT
GCAACTCCCTCCACATGCACCTCACCCACCTCCAGCAGCAGCAGAGG

T-DNA JJ28416

TCCAGCAGCAGCCATGGCGGCCACAGGGTTCACGAGCTACTCGACCCGGACAAGCACCACCACCTGGATCAGCTG
CCGCTGCCGACGACCACGGCCCTTAACATGCCGCGGAGTTCATCAGCCTCGGCTCCGCGCCCGACGAGCCACCG
CCGCTGCCAGCCAGGGCCAGCAATGGCAGCCTCGACTGTGCGCCGTCGTCCAGCAATCCAGTCGGAGTTGATGGC
ATGGTCATCGGCAGCAAGGCGGCCGATCTCGTGCCCGTGGCGCCGGCTTTTCGATTACCACCACCACCACGGCGGC
GGCGGCCATGACAGCAGGGCAGCCGCCGCGCAGGTGGGAGCAGCGACCCGGAGCAGCAGAGCTGCTGGCTCCCC
GGCGGCAAGGTCCCCAAATTCCTCCCCCTGGAATCAAGGGCGTCCCCGAGCCCGCGGCCAACGGTGCAGCAG

CAGCCGCCCGAGGCTGCCGCCGCCACCATGCGCAAGGCCCGCTCTCAGTCCGTGCTCGCTCCGAAGCCGCC
ATGATAAATCAAGCAACGCCCTCCTCCTCGTCTTTCCAACAAACCAATCGAATCAAGAAGCTGTGAGATGATGTT
TATTTGATTATGCAGATCAGCGATGGGTGCCAATGGAGGAAGTACGGGCAGAAGATGGCGAAGGGGAACCCGTGC
CCGCGGGCATACTACCGGTGCACGATGGCGGGGGGTGCCCGGTGCGGAAGCAGGTGCAGAGGTGCGCCGAAGAC
AGGACGGTGCTCATCACGACGTACGAAGGGAACCACAACCACCCCGCTGCCCGCCCGCCATGGCTATGGCTACC
ACCACGGCCGCTGCCGCCACCATGCTGCTCTCCGGATCCATGCCAGCGCCGACGCCGCCGGGGGATCATGGCA
GGGTCCAACCTCATGGCACGCGCGTGTGCCCTGCTCGCCCTCCAGCGTCGCCACCATCTCCGCTCTGCGCCA
TTCCCCACCGTCACGCTCGACCTCACGGCGCTCCACCGCTCAAGGAGGCGCTGGCGGAGGCGGGCGGAGGCCA
GTGGTGCTGCCACAGCTGTTCCGGGCAGAAGCTCTACGATCAGGCAAAGCTCTCCGCCGTACAGGCCGTGGCCGGC
ACCAATGGCAAGGCAACGGTGGATGGCGGGCGCGCAGCTCGCTGACACGGTGAGTGCAGCCTCGGCCGTGATC
GCGTCCGACCCACAGTTACCAGGGTGCTCGCGGCCGCCATCACGTCTACATCGGCAACAGCAGCGGGAGCACC
GGCACGGCGCAGCCATGGCGAGCGGAGGCGGTGATAGCTGTAGTAGAGACGACGAGTAG

>Bradi2g22440

CGGATTCTGCCTTCATATTCTGCCTGCGCGCGCTCCCTAGCCTTCTCAACTCCGGTGTCCGGTGACCGCAAGC
TGGCTGGCCAACTCAGGATCCGTGCGCTCGCTTCGAGAACCCTGTTCCACGGTCTGCTGGATTTAGAAGCAG
AGGAAGGACCGGGCTGTCTCGTTGGAGTTATGGCCATGACGCCCGCTCCTCCCTCCCGCCCGCTCGCCGTC
GTCATACTTCAACATGTCCGCCGGCTTCTCGACTCGCCGGTCTCCTTAACCCCAAGTGTAAACACAGAGATCCA
TGATCGCTTATGCGTGTGCGTTATCATCATCTCGAAAGTGAAGCTGACAGAAGTGTGTGTGTTTTCAGTTAT
TCCCATCGCCGACGACGGGCGCATTCCCCTCGCAGCCGTTCAACTGGATGGGGACGCAGGAGAACGACAACAGCG
GCCTGCAGGGAAGCGTCAAGCAGGACGACCAGCAGCGTACTCTGGGTTACGTTCCAGACGACGGCGCCGATGT
CCGGAACCACGTGACGGCGCCGGCTCCTTCTTTCAGTCCGATGCCGATGGCTCAACTGGTGAGATTAATTT
ATCTGTTGGATTTATGTGCATGCAAAGCTTAAGAGAACGACGTGTGTGCAAACGAGATAGACCGGGCTACTCTGG
CTTTGATTATAGAGGGCCCACTTACCAGTGGTACCCCGATAGTTGCAGTTCAACGACGTCTATGCATGCAT

T-DNA JJ19596

TGTTTTTCTTTCTCTGAGGTCATACTGGCTTGATCGGTACGATTTCGTGACTTTGTCTTACATGCATTTATGCC
AACAACAATCGTACATAAAGCATATCCATATCTCACAAGCCATCTCTTTTTATAATTGTTTGAACGTTTCTCAT
GACACCTTTGATGCTGACCTTAATAATGGCCCAAAAAAGCATGTACCACCGCCATACAAATTAAGCACCATAGTC
AACGCTCCCCAACTCTAAGCCTGAGTCAAAACCATTCGTTTGGACCAATCGTACATTTGGATGTCTAAATATGCTA
ACATTATAACTTTGCTATTGTAGGGAGGAGTCTATAACAGGGAGCAGCAGCAGCCACAGCAACAACAGCAGC
CATGGAGCTACCAATCAGACACGGTGAACGATGACGACGACGAGGCGGGGACTTACCCACGCCATTTCG
ACTTCGAGGCAGCACCTGACAACATGCTCGGAAACAATGTCGCCAGCGGGGCTACAGCACAGCGCCTGCGGGCA
CCGGAGTCCGTGCGCAGAGCGGGCGTCCGTCATCGGACGATGGGTACAACCTGGCGCAAGTACGGGCAGAAGCAGA
TGAAGGGGAGCGAGAACCCTCGGAGCTACTACAAGTGTCTCGGCCCGGCTGCCCCACGAAGAAGAAGGTGGAGC
AGGCGCCCGACGGCCACGTACGGAGATCGTGTACAAGGGCACCCACAACCACCCCAAGCCGCTCCAGAACGCGC
GCCGGGGCTCTAGCTCCGGCTCCGGCGCCTTGTGCTGCTACGCGATGCAAGGAGCAGGAGGAGCTAGCATGAACA
ACGAGGTGCCAGCGGGACGCGCTCTCTGGCACGCCGAGAACTCGTCCGCGTCTGACGGGGACGACGATGCCA
ACGTCAATGGTGGCGAAGAGTTCGAGGTGGACGAGCCGGAGTCCAAGAGATGGAGGGGCGGGCGAGGGAGCGA
TGGCGATTTGCGGGAACCGGACGGTGAAGGAGCCGAGGGTGTGGTGCAGACGATTAGTGACATCGACATCTTGG
ACGACGGCTACCGCTGGCGCAAGTACGGGCAGAAGGTGGTGAAGGGGAACCCCAACCCGAGGAGCTACTATAAGT
GTACCATGGCCGGGTGCCCGTGGCGAAGCAGTGGAGCGCGCTCCAGGACCTCCGCGCCGTCTGACACCCT
ACGAGGGCAAGCACAACCACGACGTGCCCGCCCGCGGCGAGCGCCGAGCAGCGCGCTACCGTGCCGCCATGC
CGATGCCGATGCCGATGCCGAGGCGCGAGCGGATACTGCAGCAGGGCCATTTCGAGCCTTCGTCCCGACGGGT
TTGGCGCCCGCGCCTACGACGAGCAACCGGATGGGTGACGTCGTCGTTTCGCGCTTTCCGGGTTCCGGCAACG
CGCCCGCTCCTACTTCAACTACGGGAACGACGCCATGTACTACGCGCCGCCAAGGACGAGCCGAGAGACGACG
ACAGGTTCTTCTCGGGAACCTCGTCTATGTTCTGACCGAATTACTACATGAGTTTAACTTCAACTTCAACCAACG
CCGGTCAAATCGAAATCGAGTGCCGAGAAAATGGGTACAAAATGTAGGATTAATTGATTTCGCTTAATTTGGCC
CTCGTGGCCGTGTGGATATATAGGTCTGGTTCGATTTGATCATAGCAACTTTTTTTGGAGGTCCAGCTAGTGAAA
AATGGCAGCGCCCTTCGTATGACACCTTGAAGAGGAAGGAACGTAGGAAGGAATAGTGTAGGAAATAAGGCAAG
ATTTTTCCGCAGTTTACTGCGTTTTTATTCTCTTTTTTTTTTCAAGTGAAAAGTTGTTGTAATGTATTTTAAACA

GAAGAATTTGACCATTTCAGCCGATGTATGCGCGTTACGGAAGAGTCAAACGTTTGGCACCTGGCACATTTGGCTT
CTTGGCACATGCAGGAAGGAAGAAGGGGCTCGTGACACTGACAACCTGGGCCACTTTGGCCAGGCATCAGCACGGT
CGGGCTTCAGTGAGACAAGCTTAAGCTAGTCGTGGATTTTCGTTTCGGATCCGCTGCTCGCTGCTCACCGTTCGCGC
GGCGCCGTGCTCTCCTCAGAACAGATTTTGACCTGTGGATTTCGTTTGACCGAAATGAGGCGCTAATTGCTCCGTG
GTTATATTTGCAAATCTGGTGCAGTGAACATCGTCTCCGAGCAGAATCCTTTTGGCGTGTGGGACCGCTTGGCAA
TCAAATTTCTTCTCTGATAAAACCATCAAGCTCTGTAAGTCTAGAACATGCCTGTAATTCACCATCCAAAAT
GTCACGACCCTTTTTTTAAACAACACTGATAACTGTATGCGTGTAAACAGACATCTTTCACAATATATGTTACATGT
AAAATACTCAATTTTTTCTGAAAAGTCTCAA

>Bradi2g54720

GCTGAGCCGTGGGTTATATGGCCCCCCCCTTCACAAGCAACGACGATCCAGAACAGCTGATAGATGGGAGACGTG
CTGCAAGCTGAGGCCGTGGCACCCGCCGCCGACGAGGCGGGAATCTGGCCCGGCGAGCTCGACGAGCAGCTGATC
AGTGACCTCCTCAGCGACGACAGCCTCCTCGCCCCCGTGGTCGACCCGGCCGACGATTCGGAGCAGCACTACTGC
CCGCGCGACAATACAGGATCAGGCGCAGCCACCGCTGCGGTGCCGCCGGCGAGGCGGGCAGGTCCCTTTGCTCG
GTGTACTCCGGCCCCACGATCACGGACATCCAGAAGGCGCTGTGCTCCCGCCGACCCGCCCCGATACGGCCGC
CGCTACAGCTCGCTGTATTTGTAGGTGCACGCGTGCATGTCCTGCCTGTGAATATGATGAATCACTGGTGACTTG
GTGAGTAAATTGTAGTAATCCGTGTATGGTTTTGCTGAAAAGCCGCAGGTACGGGGCGGCGAGCGCGGCCCGG
AGAGCAGGCGCACGGCCACGGTGTAGGAGCTGCGGCGCAAGATGCCGACGGACGGGTACAAGTGGCGCAAGTACG
GGCAGAAGTCCATCAAGAACAACCCCCACCCGAGGTGCGGTTCTCCGTTCTCCTCGATCGCTGTCTCCTCCTC
GTTGTTGTTGCAACTTTGGCATTCTTGCATGGTGCATAGCTGGGCTTGGGAGTTGGGACCATGCATGCACCGGGC
AGGATCGGCCTGCGCAGGTGCGCTCGCCGTATGTCAGAGTTCAATAAAATTTTCGTTTGTGGGTGTGGTAGGGCTA
GTTAGCTAGTTAAGTTTCCGACTAATTAAGAGCTTATGTACGCTTGGTAATTAAGACCAGCTAGACAAGGTGATC
GATGCATGTGCAGTTTCGACAGTGCCTGAGTGCATCAGCGAAGATTGGCATGTAGAGTAGTGTACTGGCTACTACG
GAGTACTAGCTGAGCACAAGAAACAAATATACGTGTGCGGTGTTTTGGTCTAATCGGTGGCCCCCGGCCGGC

T-DNA JJ2048

GCCACGCATGCAAGGTCCCATTCGTGCTACCGGCCGCAAGCGACTGCTGGGGTGGTTAGCGGTTGGCGGAGAGCA
AAATTTCCCAAGCGCAGTTCATGGACTAGCCGGGCCACGCCGCGCCTTGTGCGCGATGCCGTGGGTTTTGCTTGTA
CGTGTATGCGCGTACGTGTAGTTCCTTGTAGCATTGCACATGCATGTATAGAAGTAAGTACGTCCGTGCTTTGG
CCTTTCCCTAGATCGAGATCGGGATAATCAATTTGCACATGTAGAGTTACGTATTGCACTTGCGAACCTTCTGTGT
TTTAAGATCATGCAGGAGTATTATATAGATCCATTTTTTCGTTTTCTAGTTTCGAGTGATCCAAAGAACTAACC
CGGGTGTTCGCAATTTGGAAAACAGCCAGCCGACAGCCAAAATTGCAAACCTCCACGAGCTTTAAGCAGCTGGCA
GTCGAACTAACAAGATACTTATATTAGGGTCCACAGTAGCAAGGACGAAATTTGAAAATGGCCCACCATTTCTCAAT
CACCAGGAATTCAGGATAGCACAGAGCATCGATCCTCCTGTTCTTCGTCAACACTTCGCGTAACGACTTTTTCATC
AGACTCTGGCCCTTGGGGGGGCCGCACTGACGGACTGACTTGACATGCATGTATACACATCACACATGCAGCAGA
TGCACGCACTTAACCTGCATCTGGCTCGATCATAATAGATAACGCGCTGGCGCCACCTGAGCAGTCCATCAGA
TAACCAGTCCAACTCGATCATCACCTGACCCATTAGCCATTACCTCCACGCATGATGGGCTGAACTTTCCGTTG
AGCAGCGAACCTCCTTTAAGTTCTGAACAACGACACGCTAGTAGATCAACCCGAGGTTGCACTGCACACTTGCAT
TCATCGAACTATTGACAGGAAGTGCACGAAGGAACGCCGATCATATATATATATATCCGCGAGCGACTAACCACA
TGCATGTTTACTTTTACATGCATGCATGCATGCAGGAGCTACTACAAGTGCACCAGCTCCCGGTGCAGCGCCAA
GAAGCACGTGGAGAAGTCCACCCACGACCCGGAGATGTTACCGTACGACGAGGGGTTGCACCTCCACGGCCC
GCAGCCGCTCTCCCGTCACTCCAGCCCCCGCCGGGGCCGACGACGACGGATGTGGCCGTGGTGAACAAGAAGGC
CAGGCTCTCGCCAACTCCGACGACAACCACGGGGACGACGACTCCGGCGCCGGCATTTGGCTGCGGCGCACGGTG
GCCATCAAAAGAAACGTGCGGCGTAGACGATGACGACGACGTAGGAGGAGGAGGAAGCAGCAAGCTACAGGGGCG
TCAGAAGGGGGCGCGCCATGACGCTGTAATAGCCGTGGATTTCGTCGACGCGCCGGTGGTGGCGGCCTCTTCCGT
GCCGATGCTGATGATGCCGCCGCGGCCGTGTTTTCTTCTGACCCGCCCGCCGGCTGCCAACTGGTATTGCCTCGA
CTTGGCGTGGTCCCCGGAAGGTCACTTCCCGTGGACGATCTGATCTGACCGGCCCTGTGAGTTGATTAGGGGAGAG
ACTGTCTCACAGGATACGTGCAATCTACAACCTGCCAAGGTGTAATTAGAATATTAGATAGTGTACTGCGTAGA
GATCAAAAGATCTGATACTGGTGTACCAGAAAGAACTAGCGGGGTAGCCCGCGCAATCTGCGAGGCTAGACTTAA
TGAAATGATGTTTTTATATTTTTGTTTTTATTAGATT

>Bradi5g08380

AAACAGGTCATCCAAAAACATGAAGTTCAACAAAATAACGAAATAGCTCCAATATATTCTTTGTTTTCTAGTGAT
GATTTTTCCATGGTGTGTTGATTTTTCTCTAAATTTAAGGTTTAGATTCTTTTTCTTTTTACGCATTCACTTTTTCT
TAGTTAAATAGTTTTATTTCATCACATATGCTGGATGGGTTGCCTCATGGGCGAAAAACAAAGTGTGAGCCAAAACCT
TCTTACGATTCGCTAGAAATATCTTTTAAGGACTATTTACTAGAAATATGGATACCAGAAAACCCGAGTACCCCA
TAGCTAGAAAAACCTTTTGTATTATAACTTCGATAAAAGGAAAAACAACGGTTTTGCTATTTCTTAAACGACCGA
GAAATAATTATTTGTAAGTCGATGACAACAACCTGATTGATTCAATCGTTGAGATTCCCTGCAATTGATGTAAGTCC
GATGGATAAAAAAGTCTCCGTCAAGTGGCTATGATTAAGACCGAGAAATAACTATTTTCAAATCAAGAAATAGA
CCGTCGTGAGAAAAAATTGCACATCCAAAGTGC

T-DNA JJ22213

AGGAACTGAACTCTACGTCTGTCTGTCCGCCTAGGCAAGAGCCCTGCACCTCATCTTTCTTTCTTTATTTTTTCAT
TTCTGTACTTCTCCTTTGCTATCATAAAGCCGCTCAGCCGAGCACTTCAGCTCATCCTCTCTCTCTGTCTCCGCG
TTCTTATCAGTACGGGTGTCTCGCCTCATCACCCAGTCCCCAAAGTCCCAAAGCTACCGCCATAGGTGATCT
CGATCCCCGGCGGGCTCAAAGCAAACAAGCGGGCGGCCGGGAGAACTCGATCGACGACTAAGGTGGATCCAC
GGAGGCATGGGAAGAGGCCCTACCCGCGGACGAGGAGGAGGACCAGCCGCCACCGCCGCCATCAGCAGCGA
AACACGAGCAGGAAGAGGACGAGGAGCACTATCACCATCAAGGAGGAGCTACCGCGGAAGCCCGGGCCCGGAGG
CGTACGCGGACTACTACTACTCGGGCGCGCCGACACGACGCTCCGCCATGGTCTCCGCCCTGGAGCACGTCA
TCCGCGCGCCCCCTGGCCCTGACCAGCAGCAGCAAGGATTCTATCCCGCTACGGCTGTGTCCCGGGGAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGATCGGGCTCGCCGCGCGCCGCGCGCTGAGGAGCAAGGTAAATTACTCGGTATCGCTG
GCATCGATCGATCGAAACATGGTGGTCTTTTGTCCGCGTGCACGTAGGATGGCTTAGGATGGCGAGAGCATGGCA
CGCGCGGCTTCCGCTCGATTGCAGCCGTTTTGGAGGCTTCGCATCGGCCAAACGCATCGATCTGATTCCCCTGC
TACTTTCTTTGTTTTGTTTCATCCTTCCGTAGTTAATCTCAGCTGGGCTTGCCTGGCTCACTGGTAACGAAAAT
GTAAAAAATCTGTGACAAAAGTACTCCGGTGTTTTTGCTGTTCATGCACGAAGATACGGGCTAGCTAGCTGT
TTAATTCAACTCCTCAACCAATTCAATCGTGCACGAATATTTTATGCGCGTACGTGTACAAAGTGTGTTACGTTA
GCTCTGACGATCGATCGAAACGTAATTGTAATAAGTATAGTATAAGTTGATTAATTATCAAAACTAATGGCGT
GTGTGCATGTGGCGGATGGGCAGGGAGGAAGCGGCACTACAGAGGTGTGAGGCAGCGGCCGTGGGGGAAGTGGGC
GGCGGAGATCCGTGACCCGAAGAAGGCGGCCCGCGTGTGGCTGGGCACCTTCGACACGGCGGAGGACGCCGCCAT
CGCCTACGACGAGGCGGCGCTCCGGTTCAAGGGCACCAAGGCCAAGCTCAACTTCCCGGAGCGCGTCCAGGGCCG
CACCGACCTCGGGTTTCGTCTGTCACCCGCGGCATCCCCGACAGATCATCTCTGCAACATCAACAACACTAC
CAGCACGGCAATGCGGCCCTCCGCGAGCAGCAGCAGACAGTCTGTCGCTACCCTGACCTCATGCGGTACGCGCAGCT
GCTGCAGGGCGCCGGCGGCGCCCTTCGGGATCAGGAGCCGATGCCGACGACGAGCAGCGCGCCAGATGATGATGGT
GGGCGCCGCCGGGAGCGGCGTGATGAACCTGCCGTTTTGGCCCCATGTGCGCCCTCTTCCACGATGACCTCGTCTGTC
GTCTCTGTCGCCGAGATACTCGACTTCACCACGACGAGCTCATCCGCGCGGGCCCGCGGCCCTCGTCTGCCCGC
GGCCGCGGGCGCAATGTGACGCGGCTCGGGCGGAGCCGCGACGTCTGTCGTCACGACCAGGCGTCCCGCGGCC
GGCCAGTGCATGGCCGTACGGCGCGGAGCAGCACAGGAGTAATAAAGACTAGTTTGTCTAGAGGTCAATGGATT
ATCGATGCATGCAAGTGGGCTGCTACCACACGGGAATTCACCTACCACGTACGTACTGTGATTTCATCGATCGGG
GCAAAAATGTATTAGCGGCGTGTCCATCATGCAATATGGGGTAAGTGTGTTGGTCATTAAGTTTTGCTGGTGAA
CAATTTTTCTTCTTCTCATCTTCTAGCTAATTTGTTTTTCTACAACCTCATAGTTTTGTTGATTCTTAGCTAGTT
TCATTGATGAACTTAACCAGCTAGAGGTAGCTATCTAGTATGTACCTTGTCTAATTGCTTGTCAATTTCTCCCCTA
CTTTTCCAAAGCGTACTGAACTAATTCTGAAATTTAATTAGTCCAAAGGAATAAGAGAGGAATCCACTTTTTTTTT
AATGTTAAACCACAGGCGGCATGTTTGTCTTCTTGAACAATGGGCATTTCTTTGTTGATTTTTGGAGGTTTG
GAAAGATTGTCCAATTAGCTGGACGGTACTGATAATCTCTGTCTTTGAGTGAGACTTTATTATGATCGAACATT
GTGCCTCAAGACAAGGTATCGATAAAATTAGTACATCGCAATTCGCAAGGGAAAAAATCTTCTTAAATTTCTCTC
TCGTGATTTAGAAGATTTTACTTTTTCTACAGGTTATTCTTTTATGTCATATTGCATTACGATTTTTTTCTGTCT
AATTTGTCAGTTAATTTCCCTACGTCTTGTGAGTCTAAATATATCAACCATGAATGTGCCATAGTGTCTTCTG
ATGCCTTTGGATCATTTTTGAACTCCAAGCATATGCCTTGAACGTACATAAGTAATAAAAAGCAAGAACCCTAA
GAATAAAAATAATGTAGAGAAAACCCCTGAAAGCTAGCTGTTAATTAGGTGAAGGCATTTTTTTAGTAACCAAGAT
ACTGCTGAAGTCATGCATTTTCTTTAATCACAGATGCTTGCCTACCATGAATGAATCCATGATGTTCTTAAACG
ACACGAACATGCGTCTGACACATCGATCTCTTAAAGTTTCTACGTACGTAGTTTAGTGTTCATTTGGTAGAATATT
CGGGTTTATGATTTCTGTATCTGTGTGAGATTTATTTCGACCAACTTGTGCGGACATAATGTGAAGATACGACGA

TCGAAGGTATGGAGAAACCTAGCATATATATATCATCCCCATCCCTGCTTCTAGAAAGACTATGGTCGATACTGTATC
CACTAATGCATGCCGAACCATATGCATGCATTCAACTGTACATTTTCTATTGGAGTATATATATTAGTAGTGTCC
AAGGCTCCAAGCTACTGTATATGAATGAAAATGTAATCAATTATTTGTCTTCATCTAACAAGAAACCGACCACAC
CCCTACTGTTTACACTTAATTATTCCTTCCTTTTTAAATTAGCATGAACTAATTTGCGGCATCCATTCATTGTTT
TTTAGTTGTCCATTTATTTGTTTCATTGTGGTCATGGATAGCATGTTGTGGTGTTCATCTTTCTCTTTGCTTTTCAT
GATGGGTCCAAGTATCAAAATTTGACACGCACGTTTCTTTTGGCGTTGGGTTCATGCTACCTGGCAGCTAGCCGGA
ACATGAAAAGGGCTAGCTTTTCGGGGTTAGGCATGAGTCATATGTAGATGGGCGTACGTTCTGAT

Anexo E: Preparación de soluciones

❖ TAE 50X

Se disuelven 242 g de Tris, 100 ml de EDTA 0.5 M y 57.1 ml de ácido acético en agua desionizada, se afora a 1 L y se verifica el pH a 8.0. Para preparar 100 ml de TAE 1X se toman 2 ml de TAE 50 X y se mezclan con 92 ml de agua desionizada.

❖ Gel de agarosa 1%

En un matraz de 250 ml de añaden 50 ml de TAE 1X y 1g de agarosa, la mezcla se calentó en el microondas durante varios segundos hasta que se observara transparente (se utilizaron guantes para evitar quemarse con el matraz caliente).

❖ Gel de agarosa al 1.5%

En un matraz de 250 ml de añaden 50 ml de TAE 1X y 1.5g de agarosa, la mezcla se calentó en el microondas durante varios segundos hasta que se observara transparente (se utilizaron guantes para evitar quemarse con el matraz caliente).

❖ Gel de agarosa 2 %

En un matraz de 250 ml de añaden 50 ml de TAE 1X y 2g de agarosa, la mezcla se calentó en el microondas durante varios segundos hasta que se observara transparente (se utilizaron guantes para evitar quemarse con el matraz caliente).

❖ Gel de agarosa para RNA al 1% y preparación de las muestras

Se pesó 1 g de agarosa y se disolvió en 72 ml de H₂O DEPC, la mezcla se calentó en un microondas durante varios segundos, se dejó atemperar por un momento; se adicionan 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehido (este paso se realizó en una campana extractora de humos).

Para la preparación de las muestras de RNA, en tubos de 1.5 ml se agregan 2 µl de H₂O DEPC, 1 µl de buffer de carga 5X (contiene Bromuro de etidio y formaldehído) 2µl de muestra de RNA, se homogeniza por vórtex y se centrifugo durante algunos segundos a 4 °C, posteriormente se incubo a 65°C durante 5 min (se utilizó un bloque de calentamiento) y después se colocaron rápidamente en hielo durante 5 min, se centrifugo durante unos segundos a 4°C.

❖ ddH₂O

Se utilizó agua destilada, que posteriormente se desionizo y se esterilizo a 121 °C durante 15 min a 15 psi; se pasó por filtros de 0.20µm y se trató con luz UV durante 10 min.

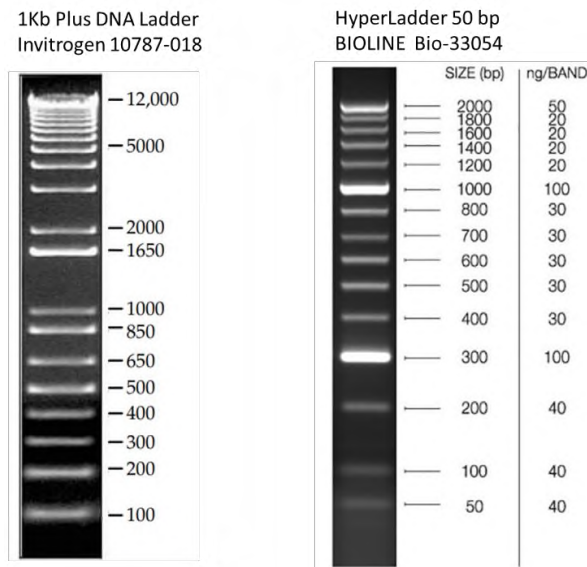
❖ H₂O DEPC

Se adiciona 1 ml de DEPC a 1000 ml de H₂O desionizada y se mantiene en agitación durante 24 h, posteriormente se esteriliza a 121 °C durante 15 min a 15 psi para inactivar el DEPC.

❖ MOPS 10X pH. 7

Se disuelven 5.44 g de acetato de sodio en 370 ml de H₂O DEPC, posteriormente se adicionan 20.60 g de MOPS y se homogeniza con ayuda de un magneto, se agregan 10 ml de EDTA 10.5 M pH. 8; se ajusta el pH. A 7.0 con NaOH 2 N y se afora a 50 ml con H₂O DEPC. Para preparar MOPS 1X se toman 25 ml de MOPS 10X y se mezclan con 225 ml de H₂O DEPC.

Anexo F. Ladders



Anexo G. Información de oligonucleótidos proporcionada por la compañía OligoT4



CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 39_UPCT_JMPC

Fecha de síntesis :09/09/2017

Usuario: Julian Mario Peña Castro

Institución: Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec

Nombre del oligo: Bradi720F

ID: 18719

Modificaciones: 0

Escala: 25 nM

Purificación: DST

Secuencia: GAGGAAGCAGCAAGCTACA

de bases: 19

µg/OD: 29.5

Tm: 61.4

PM: 5879.9

Nanomoles finales: 25.34

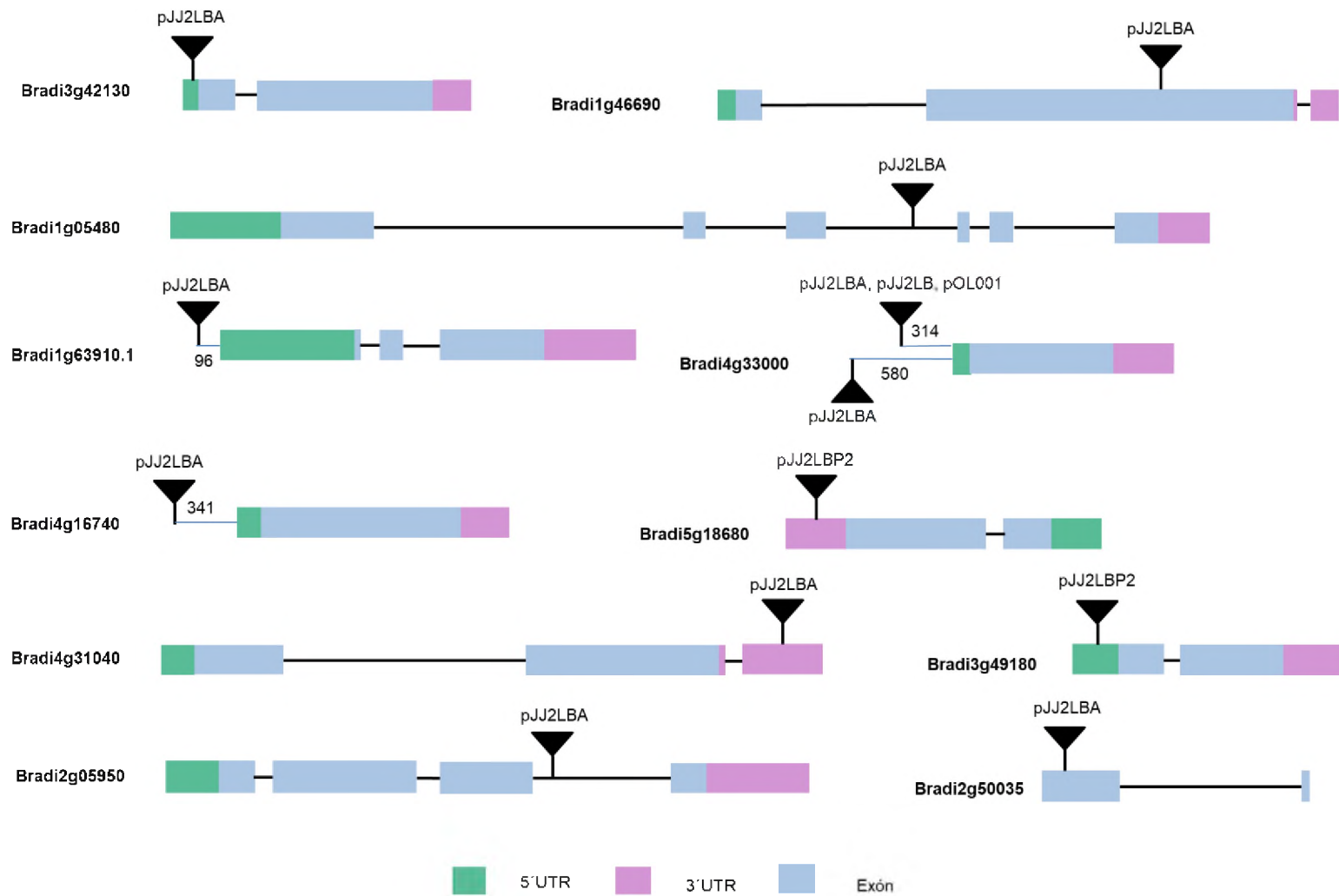
µg de Oligo : 149

253.4µl de agua para una concentración de 100µM

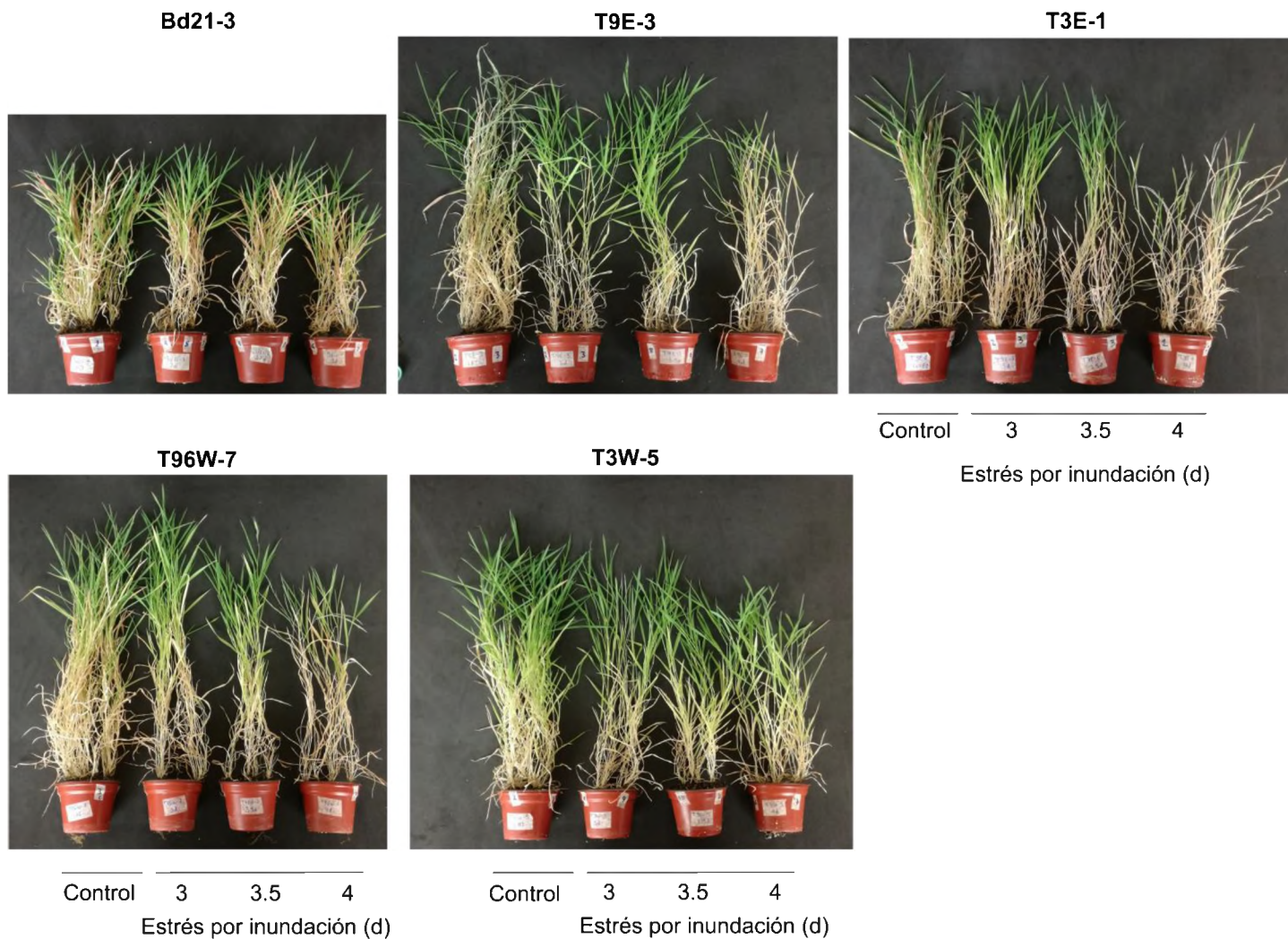
La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

I. Q. Gabriela Castillo.

Anexo H. Sitios de inserción en genes que codifican FTs activos en el estrés por inundación

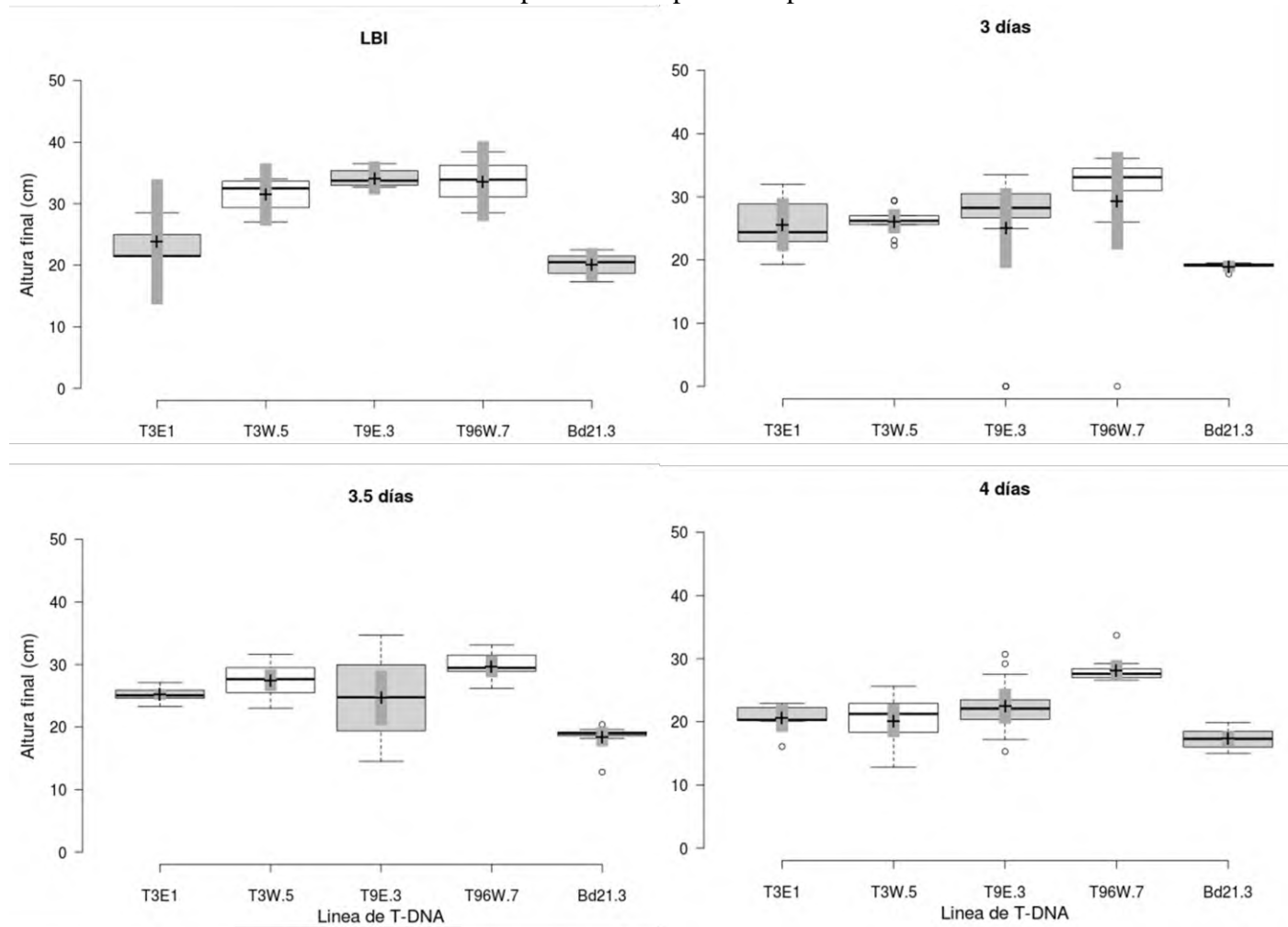


Anexo I. Altura final de las líneas de T-DNA correspondiente al primer ensayo

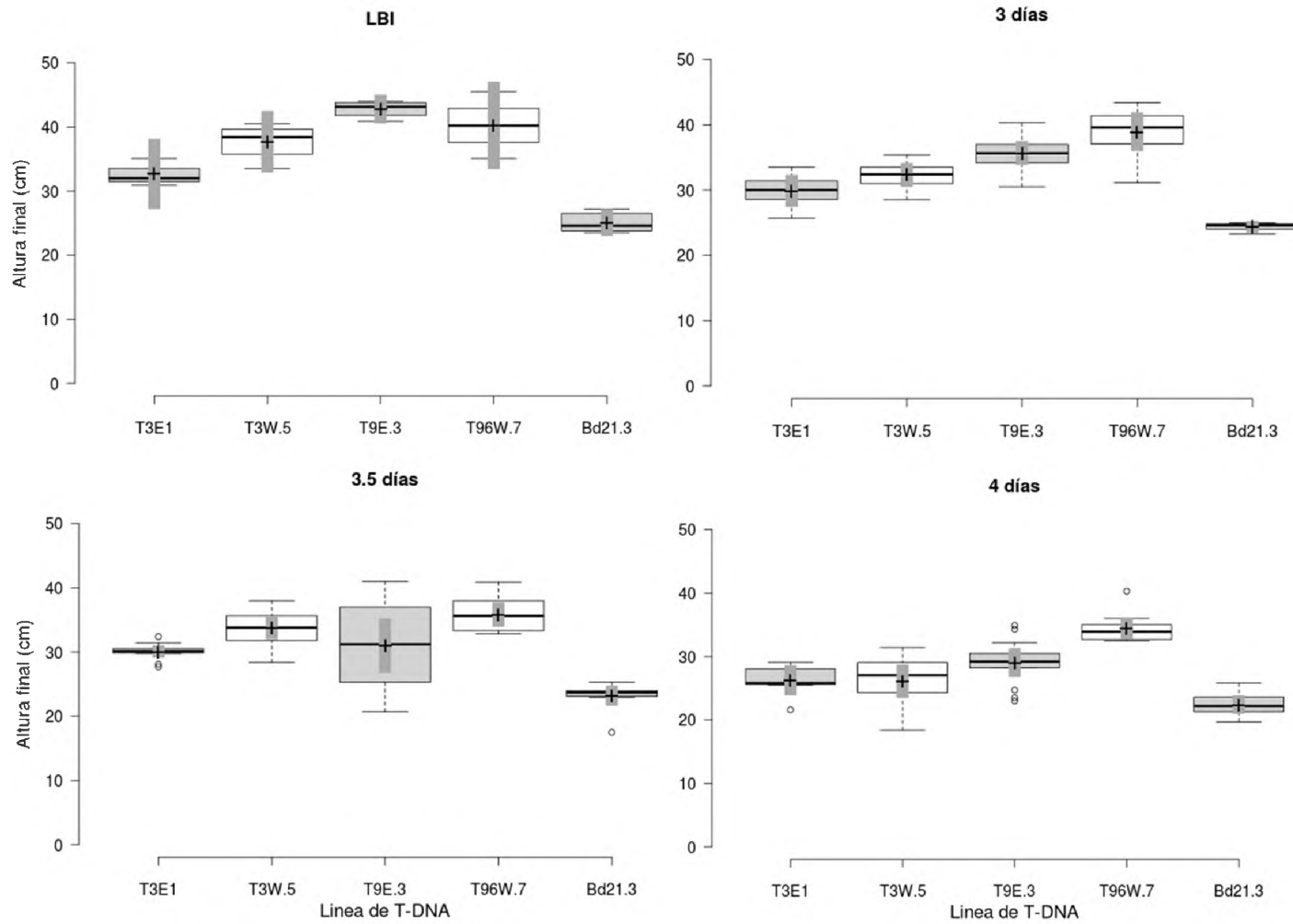


Anexo J. Análisis Estadístico de las líneas de T-DNA

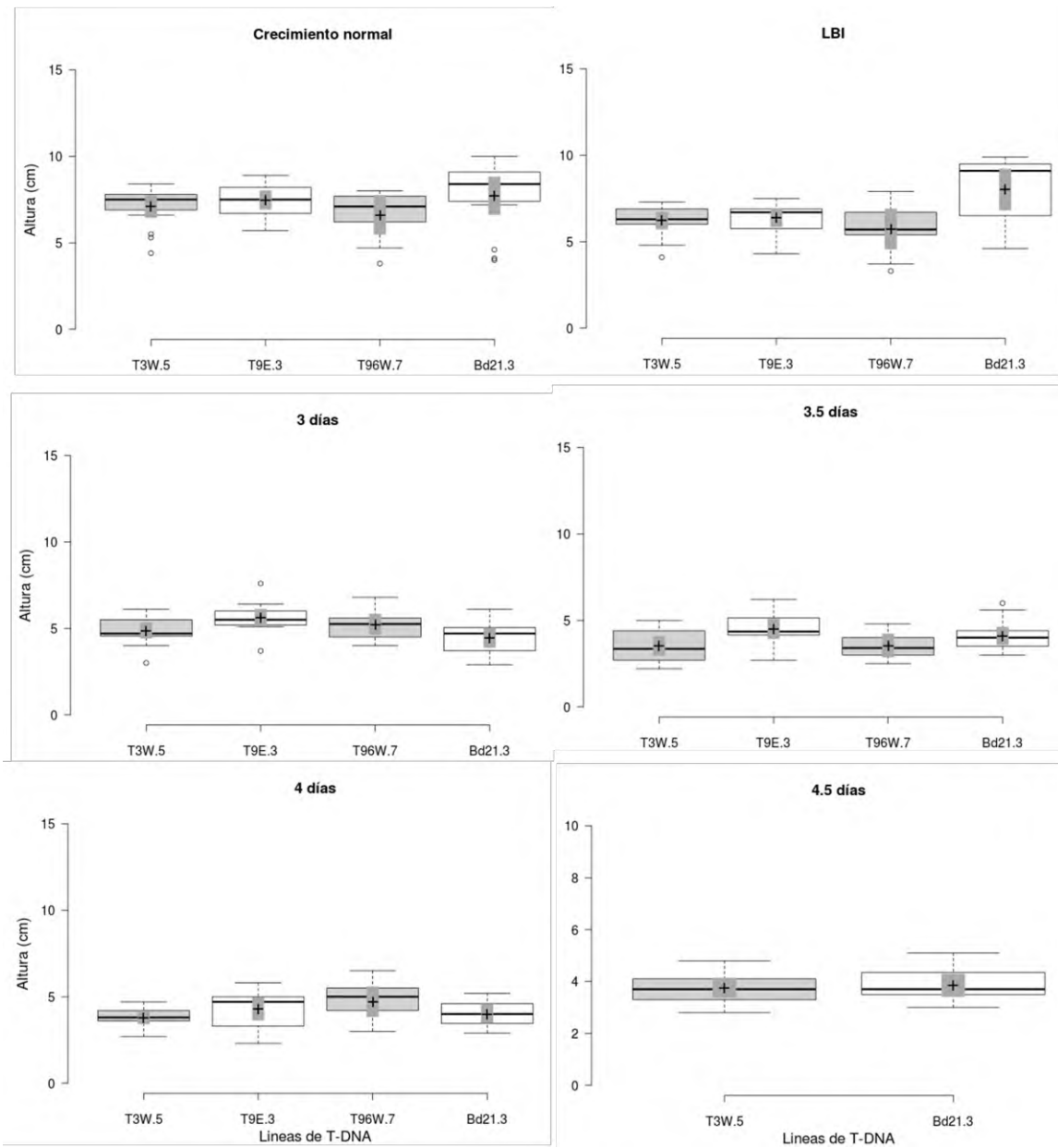
Altura final al meristemo de las líneas de T-DNA correspondiente al primer experimento



Altura final a la hoja más alta de las líneas de T-DNA del primer experimento



Segundo experimento de las líneas de T-DNA altura des pues de la inundación hasta el meristemo



Segundo experimento de las líneas de T-DNA altura des pues de la inundación hasta hoja

