



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISI3N DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Análisis fenotípico y molecular de mutantes
insercionales en genes sin identidad
regulados positivamente durante el estrés por
inundación en *Brachypodium distachyon*.**

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología**

PRESENTA

Jorge Arturo Martínez Rodríguez

Director de Tesis

Dr. Julián Mario Peña Castro

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México,
2018**



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/087
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 16 de mayo de 2018

C. JORGE ARTURO MARTÍNEZ RODRIGUEZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Presidente
Dr. Julian Mario Peña Castro	UNPA	Vocal
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	Secretario
Dr. Edgar García López	Cátedras CONACyT-UNPA	1er Suplente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.

C.c.p. Dr. Julian Mario Peña Castro – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/049
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 19 de junio de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Jorge Arturo Martínez Rodríguez**, matrícula **15140009**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Análisis fenotípico y molecular de mutantes insercionales en genes sin identidad regulados positivamente durante el estrés por inundación en *Brachypodium distachyon*”** para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Jorge Arturo Martínez Rodríguez
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200. Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

A mi **madre**, mi amor más grande,
mi orgullo más inmenso,
y la mujer de mi vida.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección 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, y una beca nacional de maestría 593422.

Fragmentos del presente trabajo se presentaron en el siguiente congreso:

Jorge Arturo Martínez Rodríguez, Julián Mario Peña-Castro. Análisis fenotípico y molecular de mutantes insercionales en genes sin identidad regulados positivamente 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.

Agradecimientos

A los integrantes del Comité Tutorial que evaluaron desde un principio hasta el final de esta tesis: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Dr. Edgar García López y Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, también por ser parte de mi comité evaluador de esta tesis y por las facilidades otorgadas para el uso de los equipos y espacios a su cargo.

A la Dra. Sandra T. del Moral Ventura por el apoyo otorgado en el proceso administrativo de esta tesis.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa por todo el apoyo en este trabajo y en el posgrado, además de darme siempre los mejores consejos y el tiempo dedicado tanto en lo académico como en lo emocional.

También al personal de la Biblioteca y del Laboratorio de Química por los servicios prestados.

A todos mis compañeros de clases y generación por darme sus mejores deseos y el tiempo convivido con ellos hasta lo último.

Y por último y no menos importante al Dr. Julián Mario Peña Castro, asesor y director de esta tesis, por siempre apoyarme y dedicarme su tiempo y dejarme ser parte de su equipo de trabajo y haber apostado por mí, además de ser uno de los mejores profesores que he tenido y por darme siempre el consejo de ser algo más y seguir adelante.

Dedicatoria

A la señora **Juventina Rodriguez Pacheco**, mi madre, por esa fuerza admirable de siempre sacarme adelante y de darme siempre su apoyo incondicional. En verdad tengo mucho por agradecerle y no me bastara toda mi vida para hacerlo. Usted que ha sido para mí padre y madre a la vez, dándome los mejores consejos; y reconociendo que todos mis logros que he obtenido a lo largo de la vida no solo son míos, si no para usted que siempre ha creído en mí, hasta ahora.

Gracias por todo.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 La inundación y la agricultura	3
1.2 Eventos fisiológicos de las plantas ante el estrés por inundación	4
1.3 Bioquímica de las plantas ante el estrés por inundación	8
1.3 Respuesta molecular de las plantas al estrés por hipoxia	11
1.4 El papel de los iones en la inundación	14
1.5 Biotecnología de la inundación	17
1.6 Genes de función desconocida en la inundación	18
1.7 La mutagénesis como herramienta en el descubrimiento de funciones génicas en plantas	20
1.8 Estudios de mutagénesis en la biología del estrés por inundación	23
2. Justificación	30
3. Hipótesis	31
4. Objetivos	31
4.1 Objetivo General	31
4.2 Objetivos Específicos	31
5. Estrategia Experimental	32
6. Materiales y Métodos	33
6.1 Búsqueda de líneas de mutantes de T-DNA en la base de RNA-Seq	33
6.2 Composición de las construcciones de T-DNA	33
6.3 Análisis filogenético	35
6.4 Análisis del RNAseq por Integrative Genomics Viewer (IGV)	35
6.5 Diseño de oligonucleótidos para genotipificación y RT-PCR	36
6.6. Material Vegetal	38
6.6.1 Obtención y siembra de <i>Brachypodium distachyon</i>	38
6.7 Verificación de las líneas con inserciones de T-DNA	39

6.7.1 Selección de semillas líneas de T-DNA	39
6.7.2 Genotipificación (PCR Multiplex).....	39
6.8 Verificación de oligonucleótidos	41
6.8.1 Extracción de gDNA.....	41
6.8.2 Verificación de diseño de oligonucleótidos de PCR y RT-PCR	42
6.9 Ensayo de estrés por inundación de Bd21-3.....	43
6.10 Ensayo de estrés por inundación para las líneas de T-DNA.....	44
6.11 Análisis estadístico.....	44
6.12 Extracción de RNA.....	44
6.13 Control y calidad de la síntesis del DNA complementario (cDNA)	46
6.13.1 Control de calidad de la ausencia de gDNA en el RNA.....	46
6.13.2 Síntesis del cDNA	47
6.13.3 Control de calidad del cDNA.....	47
6.14 RT-PCR de los transcritos seleccionados.....	48
6.15 RT-PCR	50
6.16 Mutagénesis química por EMS.....	51
6.16.1 Mutación por EMS en <i>Brachypodium distachyon</i>	51
7. Resultados y Discusión	52
7.1 Comparación de base de datos RNAseq y DOE	52
7.2 Genotipificación de líneas de T-DNA de <i>Brachypodium distachyon</i>	56
7.3 Análisis de la expresión	58
7.4 Caracterización genotípica de líneas de T-DNA y análisis bioinformático de los genes de interés	60
7.5 Gen Bradi1g22010	61
7.5.1 Filogenia y expresión del gen Bradi1g22010 relacionada a la cadena transportadora de electrones.....	61
7.5.2 Análisis de dominios con MEME Suite	62

7.5.3	Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER	65
7.5.4	Visualización genómica con IGV	66
7.5.5	Verificación del inserto de T-DNA en Bradi1g22010	67
7.5.6	Modelo hipotético de la posible función de bradi1g22010	67
7.6	Gen Bradi1g00210	68
7.6.1	Filogenia y expresión del gen Bradi1g00210 relacionada a las proteínas WD40	68
7.6.2	Análisis de dominios con MEME Suite	71
7.6.3	Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER	71
7.6.4	Visualización genómica con IGV	71
7.6.5	Verificación del inserto de T-DNA en Bradi1g00210	74
7.6.6	Modelo hipotético de la posible función de bradi1g00210	74
7.7	Gen Bradi5g02420	75
7.7.1	Filogenia y expresión del gen Bradi5g02420 relacionada a una retro transcriptasa	75
7.7.2	Análisis de dominios con MEME Suite	78
7.7.3	Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER	78
7.7.4	Visualización genómica con IGV	78
7.7.5	Verificación del inserto de T-DNA en Bradi5g02420	81
7.7.6	Modelo hipotético de la posible función de Bradi5g02420	81
7.8	Gen Bradi2g33110	83
7.8.1	Filogenia y expresión del gen Bradi2g33110 relacionada a una familia transportadora de metales	83
7.8.2	Análisis de dominios con MEME Suite	86
7.8.3	Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER	86
7.8.4	Visualización genómica con IGV	89
7.8.5	Verificación del inserto de T-DNA en Bradi2g33110	90
7.8.6	Modelo hipotético de la posible función de Bradi2g33110	91

7.9 Gen Bradi3g27550	93
7.9.1 Filogenia y expresión del gen Bradi3g27550 asociado al transporte del ion cobre	93
7.9.2 Análisis de dominios con MEME Suite	96
7.9.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER	96
7.9.4 Visualización genómica con IGV	99
7.9.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi3g27550	100
7.9.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi3g27550	100
7.10 Gen Bradi1g34140	102
7.10.1 Filogenia y expresión del gen Bradi1g34140 relacionada a las ATPasas de metales.	102
7.10.2 Análisis de dominios con MEME Suite	105
7.10.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER	105
7.10.4 Visualización genómica con IGV.....	108
7.10.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi1g34140.....	108
7.10.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi1g34140	109
7.11 Gen Bradi4g01540	110
7.11.1 Filogenia y expresión del gen Bradi4g01540 asociado al transporte de potasio.	110
7.11.2 Análisis de dominios con MEME Suite	112
7.11.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER	112
7.11.4 Visualización genómica con IGV.....	115
7.11.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi4g01540.....	116
7.11.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi4g01540	116
7.12 Análisis por RT-PCR.....	118
7.13 Ensayo de tolerancia en inundación con Bd21-3.....	119
7.14 Tolerancia por estrés para las líneas de T-DNA	125

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes tipos de estrés que puede afrontar la planta durante el estrés por inundación.	7
Figura 2. Ruta bioquímica de la fermentación alcohólica.	9
Figura 3. Genes de Arabidopsis inducidos por bajo oxígeno: expresión a través de experimentos, tipos de células y ortólogos en otros organismos.	18
Figura 4. Fenotipos de las plantas mutantes de OxPDC1, ADH- y silvestre C24.	24
Figura 5. Supervivencia ante la inundación de las plantas silvestres vs transgénicas ante la modificación en la expresión de HRA1.	25
Figura 6. Fenotipos de tipo silvestre, 35S: PCO1 y 35S: PCO1 en plantas prt6.	26
Figura 7. Fenotipos de las plantas mutantes por T-DNA de pdc1 y pdc2 con su control silvestre.	27
Figura 8. Fenotipos de las plantas mutantes del ERF-VII RAP2.12 que regula la tolerancia a la hipoxia.	28
Figura 9. Estrategias utilizadas de mutagénesis del presente trabajo.	32
Figura 10. Construcciones realizadas y utilizadas por JGI-DOE para la generación de líneas mutantes de T-DNA en <i>Brachypodium distachyon</i>	34
Figura 11. Diseño de oligonucleótidos para las líneas mutantes y el oligonucleótido T3.	37
Figura 12. Estrategia en la selección de las plantas homocigotas y el tipo de segregación esperada.	39
Figura 13. Genes candidatos seleccionados presentes en el estrés por inundación con sus respectivos sitios de inserción por T-DNA disponibles en JGI-DOE.	55
Figura 14. Gel de agarosa al 1.5% para la verificación de los oligonucleótidos para la PCR utilizando gDNA de Bd21-3.	56
Figura 15. Gel de agarosa al 1% para el RNA de las líneas mutantes de T-DNA y Bd21-3.	58
Figura 16. 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.	59
Figura 17. Gel de agarosa al 2% de verificación del cDNA de las líneas de T-DNA y Bd21-3.	60
Figura 18. Árbol filogenético del gen Bradi1g22010 con sus respectivos perfiles de expresión en <i>Brachypodium distachyon</i> de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.	63
Figura 19. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.	64

Figura 20. Proteoformas de Bradi1g22010 generada por Protter.	65
Figura 21. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi1g22010 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.	66
Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ7792 del gen Bradi1g22010 de <i>Brachypodium</i>	67
Figura 23. Árbol filogenético del gen Bradi1g00210 con sus respectivos perfiles de expresión en <i>Brachypodium distachyon</i> de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.	70
Figura 24. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.	72
Figura 25. Modelo generado por el servidor Protter.	73
Figura 26. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi1g00210 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.	73
Figura 27. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ9855 del gen Bradi1g00210 de <i>Brachypodium</i>	74
Figura 28. Árbol filogenético del gen Bradi5g02420 con sus respectivos perfiles de expresión en <i>Brachypodium distachyon</i> de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.	77
Figura 29. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.	79
Figura 30. Modelo generado por el servidor Protter.	80
Figura 31. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi5g02420 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.	80
Figura 32. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ16414 del gen Bradi5g02420 de <i>Brachypodium</i>	81
Figura 33. Modelo hipotético del papel de retrotranscriptasa Bradi5g02420 (LTR) en inundación.	82
Figura 34. Árbol filogenético del gen Bradi2g33110 con sus respectivos perfiles de expresión en <i>Brachypodium distachyon</i> de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.	85
Figura 35. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.	87

Figura 36. Modelo generado por el servidor Protter y su alineamiento realizado por T-Coffee.	88
Figura 37. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi2g33110 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.	89
Figura 38. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ20631 del gen Bradi2g33110 de <i>Brachypodium</i>	90
Figura 39. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ20631 del gen Bradi2g33110 de <i>Brachypodium</i>	91
Figura 40. Modelo hipotético de la ubicación del transporta de zinc de Bradi2g33110.	92
Figura 41. Árbol filogenético del gen Bradi3g27550 con sus respectivos perfiles de expresión en <i>Brachypodium distachyon</i> de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.	95
Figura 42. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.	97
Figura 43. Modelo generado por el servidor Protter y su alineamiento realizado por T-Coffee.	98
Figura 44. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi3g27550 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.	99
Figura 45. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ10258 del gen Bradi3g27550 de <i>Brachypodium</i>	100
Figura 46. Modelo hipotético de la ubicación del transportador de cobre para Bradi3g27550 con base en ATX1.	101
Figura 47. Árbol filogenético del gen Bradi1g34140 con sus respectivos perfiles de expresión en <i>Brachypodium distachyon</i> de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.	104
Figura 48. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.	106
Figura 49. Modelo generado por el servidor Protter y al lado el alineamiento de las regiones variable.	107
Figura 50. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi1g34140 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.	108
Figura 51. Modelo hipotético de la ubicación del transportador de zinc de Bradi1g34140.	109

Figura 52. Árbol filogenético del gen Bradi4g01540 con sus respectivos perfiles de expresión en <i>Brachypodium distachyon</i> de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.....	111
Figura 53. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.....	113
Figura 54. Modelo generado por el servidor Protter y su alineamiento realizado por T-Coffee.	114
Figura 55. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi4g01540 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.	115
Figura 56. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ6903 del gen Bradi4g01540 de <i>Brachypodium</i>	116
Figura 57. Modelo hipotético de la ubicación del transportador de zinc de Bradi2g33110....	117
Figura 58. Gel de agarosa al 1.5% para la verificación de la amplificación por los oligonucleótidos para la RT-PCR usando gDNA de Bd21-3 silvestre.....	118
Figura 59. Análisis de RT-PCR de los niveles de transcripción de las líneas mutantes por T-DNA.....	119
Figura 60. Supervivencia de los ecotipos utilizados de <i>Brachypodium</i> del segundo ensayo de inundación.	121
Figura 61. Supervivencia de los diferentes ecotipos de <i>Brachypodium</i> utilizados en el primer ensayo.	122
Figura 62. LT_{50} de los ecotipos utilizados Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek 10.	123
Figura 63. LT_{50} de los ecotipos utilizados Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek 10.	124
Figura 64. Plantas silvestres y de T-DNA de <i>Brachypodium</i> sometidas a estrés por inundación.	126
Figura 65. Porcentaje de hojas sanas de las líneas de T-DNA.	127
Figura 66. Plantas silvestres y de T-DNA de <i>Brachypodium</i> sometidas a estrés por inundación.	128
Figura 67. Germinación de <i>Brachypodium distachyon</i> del ecotipo Bd21 en su primera semana.	129
Figura 68. Aspectos fenotípicos encontrados durante el desarrollo de Bd-21 con el mutágeno EMS.....	130

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR.....	37
Tabla 2. Mezcla de PCR para la genotipificación.....	40
Tabla 3. Programa de la PCR.....	40
Tabla 4. Componentes del buffer de extracción.....	41
Tabla 5. Mezcla de la reacción de PCR.....	42
Tabla 6. Programa para la PCR.....	43
Tabla 7. Mezcla para la PCR.....	46
Tabla 8. Programa para PCR.....	46
Tabla 9. Mezcla para la síntesis de cDNA.....	47
Tabla 10. Mezcla para la PCR.....	48
Tabla 11. Mezcla para la PCR.....	49
Tabla 12. Volúmenes finales utilizados para cada muestra de cDNA.....	49
Tabla 13. Programa para la PCR.....	49
Tabla 14. Componentes de la PCR.....	50
Tabla 15. Identificación de los genes candidatos regulados positivamente durante la inundación.....	54
Tabla 16. Oligonucleótidos de ADN diseñados para genotipificación.....	57
Tabla 17. Semillas obtenidas de plantas homocigotas de las líneas de T-DNA.....	125

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
COX	Citocromo Oxidasa
CPM	Cuentas Por Millón
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
EMS	Etil Metanosulfonato
ERFs	Ethylene Responsive Factor
GCH	Genes Centrales de Hipoxia
HA	Hemaglutinina
HKT1	High Affinity K Transporter
HRA1	Hypoxia Response Attenuator 1
HUP	Hypoxia Unknown Proteins
IGV	Integrative Genomics Viewer
JGI	Joint Genome Institute
KO	Knock-Out
NO	Oxido Nitrico
PCO	Plant Cysteine Oxidase
PDC	Piruvato Descarboxilasa
PUF	Protein Unknown Function
SK1/SK2	Snorkel 1 y 2
SUB1	Submergence 1
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	Transfer DNA
TILLING	Targeting Induced Local Lesion in Genome
UBI	Ubiquitin
WT	Wild Type

Resumen

Las inundaciones son eventos comunes y perjudiciales para las plantas y su impacto más notable es sobre los cultivos y actividades agrícolas, dejando pérdidas millonarias. En las plantas, la inundación interfiere en su crecimiento y para poder afrontarlo, han desarrollado muchos tipos de adaptaciones morfológicas y metabólicas para su supervivencia. Una de las principales es elongar sus órganos aéreos o conservar las reservas energéticas.

Durante este tipo de estrés abiótico, suelen desencadenarse rutas de señalización para la activación de genes que son necesarios para responder ante la inundación. De estos genes, sólo se conoce la función de unos cuantos (fermentación, percepción de oxígeno, manejo de estrés oxidativo) y aún quedan muchos genes de los que no se tienen datos funcionales.

Se ha visto la necesidad de buscar alternativas de estudio para los genes con función desconocida y existe la opción de su análisis por mutación para así, observar su funcionamiento. Actualmente, los métodos para el estudio de mutagénesis en plantas son diversos y dependerá de la planta modelo o la técnica de mutación posible. Las más reportadas son la mutagénesis por T-DNA y el uso de agentes químicos como EMS.

En este trabajo, se utilizó a la planta *Brachypodium distachyon* como modelo monocotiledóneo de estudio para encontrar posibles funciones a genes sin identidad regulados positivamente durante el estrés por inundación. Para ello, se analizaron bases de datos y líneas de T-DNA para 7 genes, de los cuales, se pudieron aislar plantas homocigotas para los genes Bradi2g33110 (transportador probable de Zn) y Bradi5g02420 (retrotransposón LTR). En el caso de Bradi2g33110 no se pudo observar un fenotipo relacionado con la tolerancia a la inundación indicando que la redundancia funcional de su familia génica puede actuar durante el estrés. Para el caso de Bradi5g02420, se observó un fenotipo intolerante fuerte y que causó esterilidad en las plantas, con base en la literatura y estas observaciones, se propone que el retrotransposón puede funcionar como un mecanismo de "esponja" de miRNAs que es relevante para sobrevivir al estrés por inundación.

Abstract

Flooding is a common and damaging event for plants, especially on crops and agricultural activities, causing millions of dollars in losses. In plants, flooding interferes with their growth and to cope with this stress, they have developed different types of morphological and metabolic adaptations for survival. Notably, to lengthen their air organs or conserve energy reserves.

During this type of abiotic stress, signaling routes trigger the activation of genes that are necessary to respond. Only the function of a few genes is known (fermentation, oxygen perception, oxidative stress management) and there are still many genes that do not have functional data.

In the need to determine the role of genes with unknown functions, there is the option of mutagenesis methods to obtain clues about their activity. Currently, mutagenesis methods are diverse and will depend on the model plant resources or the possible mutation technique. The most reported approaches are mutagenesis by T-DNA and the use of chemical agents such as EMS.

In this work, *Brachypodium distachyon* was used as a monocotyledonous study model to find possible functions for genes without identity regulated positively during submergence stress. Expression databases and T-DNA mutant databases were compared and 7 T-DNA lines were analyzed, from two of them homozygous plants were obtained for Bradi2g33110 (probable Zn transporter) and Bradi5g02420 (LTR-transposon). For Bradi2g33110, there was no phenotype related to submergence tolerance indicating that functional redundancy of this family may act under stress. For Bradi5g02420, a strong submergence intolerant phenotype and plant sterility were observed indicating, together with the information available in the literature, that retrotransposon expression under stress may function as a miRNA "sponge" that is relevant for submergence survival.

1. Introducción

1.1 La inundación y la agricultura

Los eventos climáticos actuales provocan cada vez más víctimas humanas y daños materiales, principalmente por las lluvias, el crecimiento de ríos, vientos fuertes y sequías prolongadas. Actualmente los desastres naturales son cada vez más frecuentes (Manson y Jardel *et al.*, 2009). Por su geografía, México se encuentra en una zona intertropical rodeado por dos océanos, el Pacífico y el Atlántico, por lo que la presencia de ciclones tropicales es anual y dicta la temporada de lluvias (Cenapred, 2016). Sin embargo, las lluvias que traen los ciclones también pueden causar inundaciones cuando la cantidad de agua es mayor que la capacidad de absorción y evacuación de agua del suelo y se comienza a acumular sobre él.

Las inundaciones son eventos hidrometeorológicos con mayor repercusión en la socioeconomía a nivel mundial (ONU, 2003). Como consecuencia del cambio climático hay un aumento en la frecuencia e intensidad de las precipitaciones en el territorio mexicano (Semarnat-INE 2006) lo que causan daños con un costo calculado en más de 1900 millones de dólares en pérdidas de infraestructura durante los últimos 20 años (Manson y Jardel *et al.* 2009).

En México durante el periodo de 1980-2013, más del 80% de los daños que afectaron al sector agrícola en México estuvieron relacionados con eventos del clima. Esto es de especial importancia en el sector más vulnerable de la sociedad ya que el sector agropecuario es el sustento de casi el 20% de la población del país (Saldaña-Zorrilla, 2015).

No obstante, los problemas no solo se limitan a las pérdidas económicas. Se han probado modelos de emigración en regiones donde se han presentado los desastres naturales actuales, combinados con la falta de apoyos en créditos y bajos niveles en los ingresos, como detonadores de la emigración de México. Así, el efecto migratorio no solo implica la pobreza, sino que también se debe a una mezcla multifactorial, que va directo a las expectativas de los ingresos (Saldaña-Zorrilla *et al.*, 2009).

Los aumentos en las precipitaciones debido al cambio climático han hecho que las inundaciones sean una amenaza importante para el desarrollo y producción de cultivos en el mundo. Por ejemplo, en Estados Unidos entre 2001 y 2011, la sequía y la inundación causaron en proporciones similares más del 70% de pérdidas en sus cosechas con un valor anual de \$25 mil millones de dólares. En Pakistán se perdieron \$4.45 millones de dólares en daños por inundación al trigo, algodón y arroz. Actualmente, el 35% de la superficie cultivada de arroz en el mundo, es propensa a inundaciones (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

Los efectos negativos de las inundaciones en la economía agrícola se deben a que el exceso de agua disminuye el crecimiento, el rendimiento, e incluso ocasiona la muerte de la planta (Jackson, 2009). La inundación en la naturaleza es un tipo de estrés abiótico normal en ecosistemas en todo el mundo, por ejemplo, los ríos y los manglares, donde viven plantas adaptadas evolutivamente para sobrevivir (Colmer y Voeselek, 2009). Sin embargo, la mayor parte de las plantas de cultivo no poseen adaptaciones de tolerancia naturales a la inundación, por lo que es urgente el entendimiento de las respuestas y mecanismos de tolerancia ante la inundación en plantas.

1.2 Eventos fisiológicos de las plantas ante el estrés por inundación

La inundación es un fenómeno catastrófico para la gran mayoría de las plantas pues en el periodo de anegamiento e inundación, se disminuye la difusión de los gases hacia adentro y afuera de las células vegetales (Lee *et al.*, 2011). Por ejemplo, el O₂ se distribuye muy lento en el agua lo que ocasiona un estrés por hipoxia, que se puede convertir en anoxia, ocasionando un estrés metabólico ya que el O₂ es el receptor final de electrones durante el metabolismo aerobio (Bailey-Serres y Voeselek, 2008). Otros gases también tienen una difusión disminuida, son el CO₂ y el etileno, el primero como principal fuente de carbono de las plantas y el segundo como una fitohormona que, al acumularse alrededor de la planta, actúa como una señal crucial del estrés.

Voeselek y Bailey-Serres (2015) describieron los mecanismos más conocidos en el desarrollo y la modulación metabólica sobre las respuestas de adaptabilidad y

aclimatación durante el anegamiento de las raíces he inundación de las partes aéreas. Entre estas respuestas están las de tipo bioquímico que son de gran importancia e incluyen a las especies reactivas del oxígeno molecular (O_2) que representan puntos cruciales en la señalización, desarrollo y respuestas ante en el ambiente (Sasidharan *et al.*, 2017). Aun con los avances en la resolución y comprensión de como las plantas responden a los cambios de concentración de O_2 (van Dongen y Licausi, 2015), todavía no se han explorado todas de condiciones experimentales que pueden repercutir en una mayor tolerancia al estrés.

Durante las inundaciones, el órgano expuesto primariamente son las raíces, que ve comprometido su funcionamiento, desencadenando nuevas respuestas adaptativas ante el estrés (Sauter, 2013; Steffens y Rasmussen, 2016). Tanto las raíces como los microorganismos del suelo aumentan el consumo de oxígeno en el anegamiento, lo que ocasiona el cambio a un metabolismo fermentativo anaeróbico para la producción de ATP. Como resultado final del anegamiento y de la inundación, se presenta el agotamiento de los carbohidratos de reserva disponibles, así como la alteración de las membranas con la entrada de elementos fitotóxicos (metales, microorganismos, toxinas, sulfuros) del suelo anegado (Pardos, 2004), comprometiendo gravemente la función de la raíz y llevándola a un estado de marchitamiento, senescencia y muerte.

Pero también se presentan elementos de adaptación para la disminución de la anoxia en la raíz y mantener su función durante el anegamiento y la inundación. Estas características son la formación de una barrera suberina interior y una exterior de lignina en la raíz que evitan la perdida radial del oxígeno y mejora la distribución hasta la punta de la raíz (Shiono *et al.*, 2011). Otra adaptación es el aumento de aerénquimas, que son espacios de aire que aumentan la porosidad de órganos y aireación de raíces sumergidas (Takahashi *et al.*, 2013), además de la formación de raíces adventicias ricas en aerénquimas (Voesenek *et al.*, 2006). No obstante, no todas las plantas tienen la misma capacidad de desarrollar estos cambios. El desarrollo de aerénquimas va a depender del tipo de planta y las condiciones del ambiente (Colmer, 2003).

Ante la presencia de un estrés como la inundación, las plantas controlan su elongación de dos maneras, con la estrategia de escape o la de quiescencia (Bailey-

Serres y Voeselek, 2008; Banti y Giuntoli, 2013). La estrategia de escape se caracteriza por un crecimiento y elongación rápida de los órganos aéreos para permitirle al tejido fotosintético elevarse por encima del nivel de agua. Por otra parte, la quiescencia en la planta se manifiesta con la conservación de reservas energéticas y la restricción de la elongación bajo el agua. El primer paso es factible para situaciones de inundación prolongada de poca profundidad y el segundo facilita la supervivencia en estancias de inundación severa a corto plazo (Lee *et al.*, 2011). Al igual que otras características fisiológicas, la capacidad de escape presenta variabilidad genética, por ejemplo, en el arroz se han detectado cultivares con ambas estrategias.

Cuando la planta entra en una inundación completa resulta perjudicial, limitando todo contacto con el aire y repercutiendo en la bioquímica de la fotosíntesis (Voeselek y Bailey-Serres, 2015). La baja disponibilidad de luz para las plantas se ve disminuida cuando están inundadas y son turbias (Voeselek *et al.*, 2006). La fotosíntesis se ve limitada, pero las reacciones que implican el consumo de sustratos como los es la respiración o la fermentación, hacen que las reservas de carbono se agoten cuando las plantas estas sumergidas, teniendo como resultado un daño o la muerte de la planta (Bailey-Serres y Voeselek 2008).

Al estar las plantas completamente sumergida, aparece una condición de niveles bajos de luz debido a la turbidez de las aguas en la inundación, que aunado a la baja disposición del CO₂, interfiere con la fotosíntesis (Colmer y Voeselek, 2009). Aunque la relevancia de la conservación de los hidratos de carbono durante un evento de inundación es alta (Bailey-Serres y Voeselek, 2008; Voeselek *et al.*, 2006), las plantas de humedales pueden continuar teniendo una fuente de carbohidratos mediante la fotosíntesis subacuática (Colmer *et al.*, 2011). Un ejemplo es el arroz que posee una superficie hidrofóbica en sus hojas para retener a una película fina de gas cuando está en inundada, mejorando así el intercambio de gas entre la hoja y el agua, de modo que la fotosíntesis es mayor con las películas de gas presentes en las hojas (Pedersen *et al.*, 2009).

Las nuevas investigaciones van encaminadas a encontrar los determinantes genéticos de estas respuestas fisiológicas y así, descubrir los mecanismos de supervivencia genéticos y metabólicos ante las inundaciones (Fig. 1). Actualmente, la

mayor parte de las investigaciones usan a ecotipos y cultivares del arroz y *Arabidopsis* como plantas modelo de la familia monocotiledónea y dicotiledónea, respectivamente (Lee *et al.*, 2011; Niroula *et al.*, 2012).

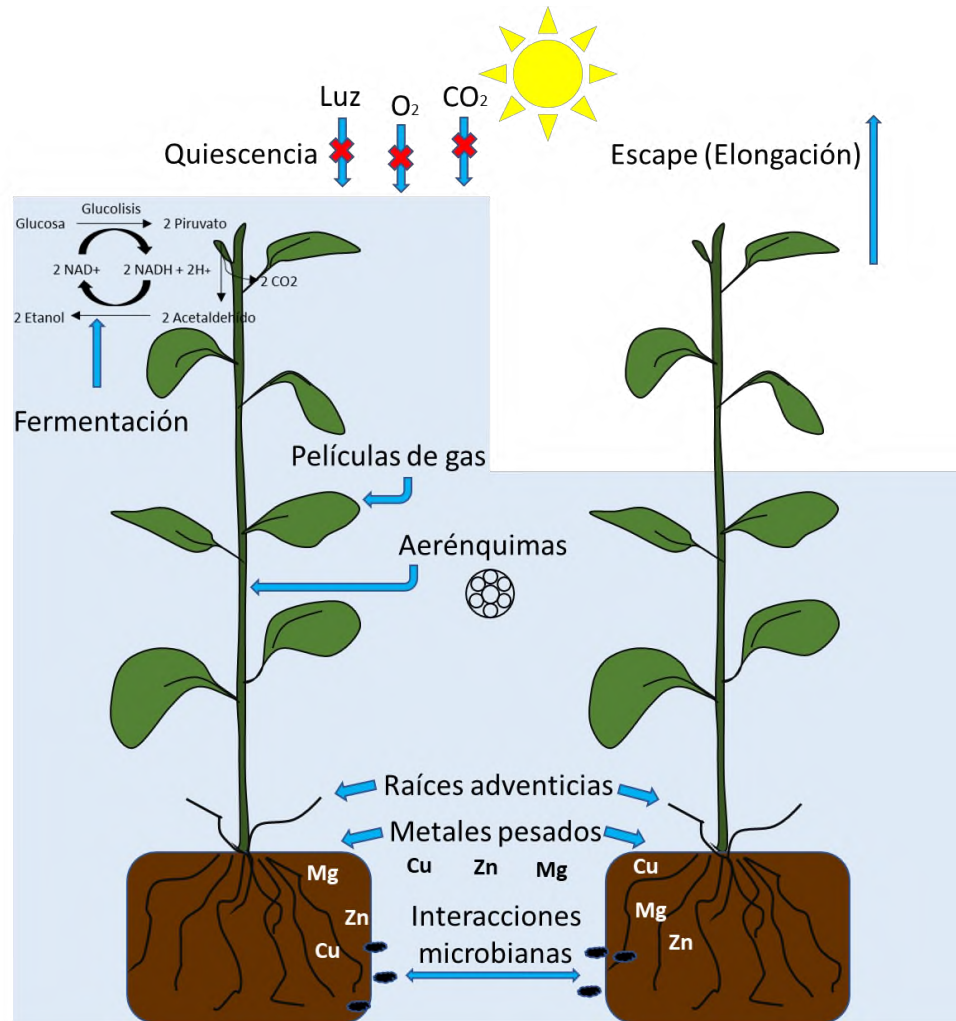


Figura 1. Diferentes tipos de estrés que puede afrontar la planta durante el estrés por inundación.

Múltiples mecanismos de estrés aparecen de acuerdo al tipo de inundación, ya sea total o parcial.

1.3 Bioquímica de las plantas ante el estrés por inundación

Durante su ciclo de vida, las plantas enfrentan diferentes concentraciones de O₂ que pueden oscilar entre los estados aeróbico (21% V/V, normoxia), estados intermedios de deficiencia (hipoxia), o incluso hasta llegar a su ausencia total (anoxia); (Banti *et al.*, 2013).

La exposición de las plantas a condiciones hipóxicas desencadena una transición de la respiración mitocondrial aeróbica a la vía fermentativa para obtener energía (Fukao *et al.*, 2006). En ausencia de oxígeno, tanto el ciclo de Krebs como la fosforilación oxidativa se vuelven ineficientes o generan radicales libres en exceso al no tener un receptor final de electrones. Lo anterior da como resultado el paro de la glucólisis por la limitación del NAD⁺, y una vez agotado el NAD⁺, se detiene el metabolismo. Como alternativa, la planta metaboliza el piruvato producto de la glucólisis por la vía de la fermentación clásica para obtener NAD⁺ (Taiz y Zeiger, 2010) (Fig. 2).

Las rutas de fermentación más estudiadas son la alcohólica y láctica, ambas vías tienen como substrato común el piruvato (Kulichikhin, *et al.*, 2008). En la fermentación alcohólica, la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) emplea al NADH para la reducción del acetaldehído a etanol y regenerar NAD⁺ para la glucólisis. En la fermentación del ácido láctico, la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) usa NADH para la reducción del piruvato a lactato y también regenerar NAD⁺. Sin embargo, el aumento del lactato en el citoplasma produce su acidificación (Kato-Noguchi, 2000) lo que, a su vez, cesa la síntesis de proteínas, detiene la glucólisis y aparece una deficiencia extrema de energía en la planta (Kulichikhin *et al.* 2008).

La fermentación depende de la energía almacenada en carbohidratos, especialmente en la sacarosa y el almidón. Sin embargo, en los enlaces no rotos del lactato y el etanol, que se difunden al medio, se conserva aún electrones y protones, ocasionando así una baja eficiencia en la obtención de energía. Para compensar este fenómeno, se aumenta la producción de ATP de la glucólisis también conocido como Fenómeno Pasteur (Taiz y Zeiger, 2010). Si la planta no tiene una buena administración de los suministros de azúcares fermentables, el almacenamiento de

carbohidratos simples y de almidón, se agota rápidamente y limitará y/o impedirá la supervivencia de la planta en condiciones de anegamiento o inundación (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

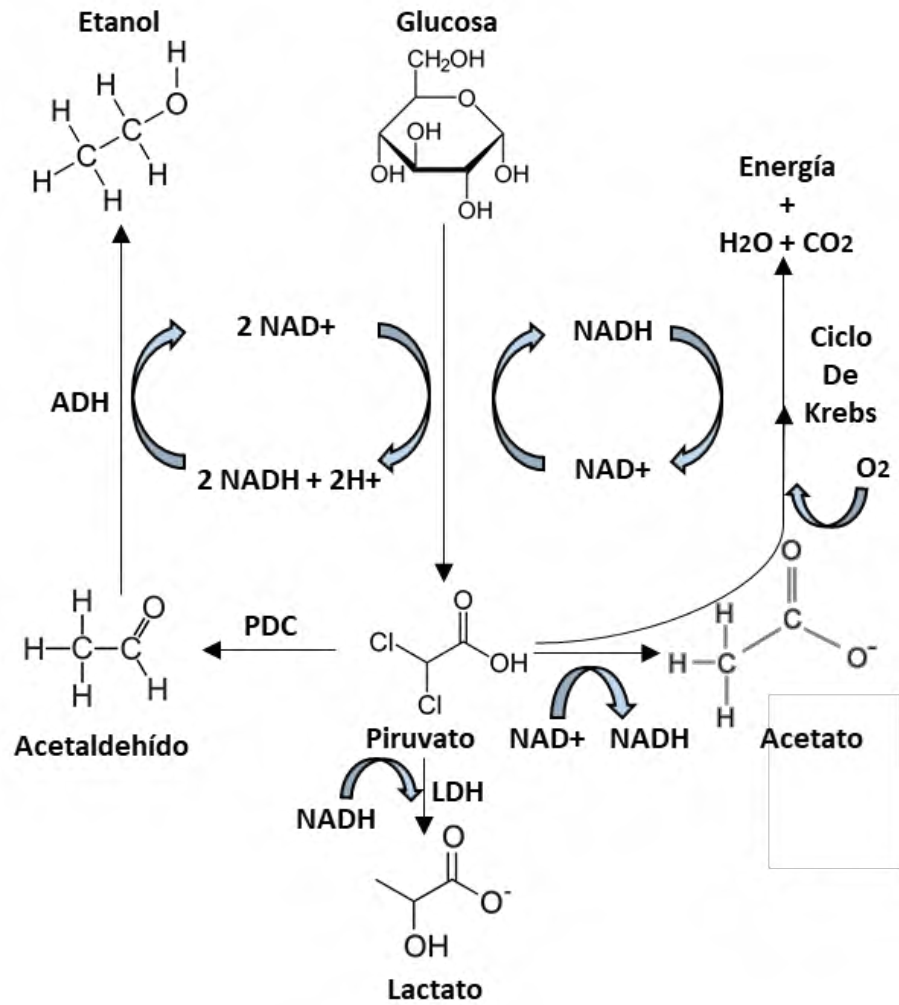


Figura 2. Ruta bioquímica de la fermentación alcohólica.

Metabolismo de los carbohidratos en una condición normal con dirección al ciclo de Krebs y de hipoxia cuando se degrada el piruvato obteniendo como producto final el etanol.

En condiciones de hipoxia y anóxica se ven resultados de crisis energética con daño celular donde la mitocondria, uno de los principales orgánulos para la producción de energía, se ve limitada en su función. La razón es que el oxígeno ya no puede ser el receptor final de electrones en el Complejo IV. En el transcurso del evento de hipoxia, los mecanismos alternos de recepción de electrones como el *citocromo oxidasa* (COX) y *oxidasa alternativa* (AOX), poseen la capacidad limitada para funcionar usando oxígeno (Igamberdiev *et al.*, 2010). Así que además del estrés energético, también sucede un estrés oxidativo.

Las mitocondrias de las plantas han evolucionado una estrategia para funcionar en condiciones de hipoxia de corto plazo. Pueden mantener el transporte de electrones en ausencia del oxígeno a través del manejo de nitrito como aceptor final de electrones, la ruta de reducción del nitrito a óxido nítrico (NO) en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria recicla el NADH y conduce a una tasa limitada en la producción de ATP, este ATP producido junto con el ATP generado por vía fermentativa ayuda temporalmente a los procesos de transcripción y traducción útiles para la supervivencia ante la hipoxia y recuperación de la planta (Gupta y Igamberdiev, 2016). Sin embargo, el NO es una especie reactiva de oxígeno, también aporta al estrés oxidativo y como se explicará en secciones más adelante, tiene consecuencias negativas en la estabilidad de proteínas de señalización.

La falta de energía durante la presencia de un estrés por hipoxia limita la síntesis proteica dentro de la célula vegetal, excepto a un conjunto de enzimas y factores de transcripción nombrados originalmente “péptidos anaeróbicos” (Peña-Castro *et al.*, 2011). Estas proteínas conocidas ahora como *Genes Centrales de Hipoxia* (GCH), representan un conjunto de factores de transcripción, transductores de señales, hemoglobinas, chaperonas, proteínas de identidad desconocida y enzimas del metabolismo fermentativo de carbohidratos, este conjunto proteico posibilita a la célula un cambio bioquímico en la respiración oxidativa de la mitocondria hacia el metabolismo anaeróbico y así obtener energía en forma de ATP y NAD⁺ en la glicolisis y fermentación (Mustroph *et al.*, 2010).

1.3 Respuesta molecular de las plantas al estrés por hipoxia

Ante los múltiples factores ambientales se ven afectados tanto el crecimiento y desarrollo de las plantas, ellas tratan de adaptarse ante estas condiciones a través de diversos mecanismos evolutivos como alteraciones bioquímicas y fisiológicas que van conectadas a redes de procesos reguladores (Voeselek y Bailey-Serres, 2015).

Para poder afrontar estas situaciones de estrés, las plantas han desarrollado una gran variedad de adaptaciones tanto morfológicas como metabólicas que les permite sobrevivir por periodos cortos a la inundación ya sea completa o parcial (Hinz *et al.*, 2010).

La señalización molecular durante la inundación involucra a hormonas vegetales, como el ácido giberélico (GA) y al etileno, y recientemente, al NO. También existe un mecanismo molecular de percepción de oxígeno.

El locus *SUBMERGENCE 1* (*SUB1*) en el cromosoma 9 del arroz fue el primer factor génico involucrado en la señalización de la inundación al ser modulado por el etileno y GA, dos hormonas de efectos antagónicos (Fukao y Bailey-Serres, 2008). Este locus *SUB1* tiene de dos a tres reguladores transcripcionales del tipo *ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR* (ERFs) que pueden ser *SUB1-A*, *SUB1-B* y *SUB1-C* (Jung *et al.*, 2010).

La diversidad en la composición alélica de *SUB1* dicta el tipo de estrategia fisiológica ante la inundación. Durante una inundación completa de 1 a 2 semanas, la mayoría de los cultivos de arroz mueren (Xu *et al.*, 2006; Perata y Voeselek, 2006). Sin embargo, existen algunos cultivares, como FR13A (arroz *Oryza indica*), que tiene la capacidad de sobrevivir hasta por 2 semanas en inundación completa (Jung *et al.*, 2010). La secuenciación del locus *SUB1* en el arroz FR13A, ha demostrado que la presencia del alelo *SUB1A-1* es el principal determinante de tolerancia mediante la inhibición de los genes relacionados con la elongación que constituye la principal característica de la respuesta fisiológica quiescente (Xu *et al.*, 2006). De tal forma, en FR13A se detiene el crecimiento vegetal con el fin de economizar recursos energéticos y resistir la inundación total de la planta por más tiempo (Fukao *et al.*, 2006).

De manera interesante, la respuesta de escape, otro de los mecanismos moleculares que se presentan en el arroz ante la inundación, es controlado también por genes de la familia *ERFs* que se denominan *SNORKEL1* y *SNORKEL2* (*SK1/SK2*). Estos *ERFs* se activan en respuesta a la acumulación de etileno, pero al contrario de *SUB1-A*, permiten también potenciar el efecto del *GA*, la hormona responsable de la elongación de la pared celular. La presencia de *SK1* y *SK2* en el genoma del arroz permite el alargamiento de los entrenudos y promueve la síntesis de *GA* (Hattori *et al.*, 2009). Este mecanismo se llama escape y permite que la planta haga crecer por encima de la inundación a una porción de sus hojas y reactive la difusión de gases.

Tanto *SUB1A-1* como *SK1/SK2* ejercen sus efectos fisiológicos a través de la activación de decenas de genes blancos. Por ejemplo, *SUB1A-1* inhibe a las amilasas que degradan el almidón y a las enzimas de modificación de pared celular que permiten la elongación (Jung *et al.*, 2010). Por su parte, en el cultivar C9285 donde se descubrieron los genes *SK1/SK2*, la ruta biosintética de *GA* está más expresada que en cultivares que no usan la ruta de escape (Minami *et al.*, 2018).

De tal manera, se han identificado y caracterizado a los factores de transcripción del grupo VII de respuesta al etileno (*ERF-VII*) como los principales factores genéticos de respuesta a la inundación, ya que actúan como sensores de concentraciones bajas de oxígeno y reguladores de los principales mecanismos de supervivencia que son el escape y la quiescencia (Voeselek *et al.*, 2014).

La constante renovación de proteínas dependerá de las características específicas de los extremos N-terminales y de la proteólisis dirigida de la vía de la regla N-terminal, además de que en la vía de los *ERF-VII* y de la regla N-terminal tienen componentes similares, lo que sugiere que varias especies de plantas superiores conservan este mecanismo, y que las plantas en algún momento pueden presentar en algunos tejidos condiciones de hipoxia o anoxia durante su ciclo de vida (semillas, frutas, tubérculos y meristemas) (Rivera-Contreras *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la regla N-terminal de proteólisis dirigida actúa como un sensor homeostático de oxígeno en *Arabidopsis*. A través de la regulación de los factores de transcripción *ERFs-VII* mediante su desestabilización por la enzima *PROTEOLYSIS6* (Gibbs *et al.*, 2011, 2015). Este conocimiento se ha usado para

obtener nuevas variedades de cebada que toleran el anegamiento (Mendiondo *et al.*, 2016). Por lo tanto, los factores de transcripción *ERFs-VII*, coordinan respuestas moleculares en la homeostasis del oxígeno y en el control de una gran variedad de procesos mediados por óxido nítrico (*NO*, Gibbs *et al.*, 2015).

El *NO* es una molécula gaseosa de señalización en una amplia gama de procesos en las plantas (Yu *et al.*, 2014), un ejemplo es la señal asociada a la hipoxia inducida por la acumulación de *NO* por la inundación (van Dongen y Licausi, 2015). En una condición de normoxia, los *ERF-VII* representan los sustratos para la eliminación post-transcripcional enzimática a través la regla N-terminal en la secuencia Met-Cys (Licausi *et al.*, 2011) con la oxidación conjunta de la segunda cisteína a cisteína sulfínica, o ácido cisteínsulfónico por parte de la enzima cisteína oxidasa de plantas (*PCO*) (Weits *et al.*, 2014). Esto ocurre en presencia de O_2 y de *NO* dando la señal para la degradación del *ERF-VII* en el proteosoma (Gibbs *et al.*, 2014).

El caso contrario es en un estado de hipoxia-anoxia, donde la cisteína deja de ser oxidada y ocurre la estabilización de las proteínas *ERF-VII* con dirección al núcleo de las células he iniciar la inducción de la activación transcripcional, fundamentalmente dirigidos para establecer el metabolismo fermentativo (Gibbs *et al.*, 2011). Estos genes se conocen en conjunto como genes centrales de hipoxia (*HCG*), e incluyen a proteínas de la fermentación como por ejemplo al alcohol deshidrogenasa, alanina aminotransferasa (*AAT*), piruvato descarboxilasa (*PDC*) y el ácido glutámico descarboxilasa (*GDH*) (Rivera-Contrera *et al.*, 2016). Los *HCG* evitan la sobrerreducción del $NAD^+/NADH$ manteniendo en la glucolisis la síntesis de ATP para otras rutas fermentativas de las reservas de almidón (Lee *et al.*, 2011).

Las investigaciones realizadas en arroz y *Arabidopsis* nos han dado un conocimiento molecular sobre los fundamentos de la tolerancia a la sumersión, teniendo en cuenta que estas plantas sobreviven de 10 a 14 días en inmersión, son de gran interés para la agricultura y la identificación de las bases moleculares a la tolerancia (Akman *et al.*, 2012). Aun con todas las herramientas científicas actuales se desconocen muchos factores moleculares responsables ante el estrés abiótico por inundación.

1.4 El papel de los iones en la inundación

La nutrición de las plantas es de fundamental importancia en el desarrollo vegetal y tiene un impacto tanto en la agricultura como en la salud humana, todo lo anterior implica tener la garantía que las plantas puedan recibir un suministro adecuado de micronutrientes y poder llevar a cabo sus procesos celulares vitales e incluso evitar su acumulación en exceso y llegar a niveles tóxicos. No solo el oxígeno, dióxido de carbono y agua son elementos esenciales, las plantas también necesitan de al menos 14 elementos para su nutrición, nitrógeno (N), potasio (K), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), cloro (Cl), boro (B), hierro (Fe), Manganeseo (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni) y molibdeno (Mo) que se obtiene generalmente del suelo (Mengel *et al.*, 2004). Durante el estrés por inundación, se ha detectado que aumenta la solubilidad y dispersión de los iones (Setter *et al.*, 2009).

Entre los metales pesados más comunes y esenciales se encuentran el Cu y Zn de gran importancia para el desarrollo y crecimiento vegetal debido a que representan componentes principales de muchas proteínas y enzimas, pero las altas concentraciones de estos elementos esenciales pueden llevar a una toxicidad e inhibición del desarrollo de la gran mayoría de las plantas (Hall, 2002). Un ejemplo visible ante los efectos tóxicos y la acumulación de metales pesados en las plantas es la baja biomasa, clorosis, inhibición del crecimiento y la fotosíntesis, alterando el equilibrio de agua y la asimilación de los nutrientes y senescencia y como punto final la muerte de la planta. (Singh *et al.*, 2015).

El estudio de los fundamentos moleculares al transporte de metales es de gran importancia biológica en plantas, y ahora se cuentan con nuevas herramientas moleculares para su estudio, el conocimiento al respecto ha aumentado (Williams, *et al.*, 2000). Un ejemplo está en la tolerancia del Na⁺, donde variedades comerciales de trigo duro (*Triticum turgidum* ssp. *Durum*) que carecen del gen *HKT1* (*HIGH-AFFINITY K TRANSPORTER1*) sensibles a las altas concentraciones de sales, se les introdujeron el locus *Nax2* (*TmHKT1;5-A*) del trigo silvestre (*Triticum monococcum*) lo cual redujo sustancialmente las concentraciones de Na⁺ y aumentó el rendimiento del grano en 25% en suelos salinos (Munns *et al.*, 2012; James *et al.*, 2012). En el arroz,

la tolerancia está relacionada con una variación alélica de *OsHKT1;5* (conocido *SKC1*), este gen se encontró en un QTL de Saltol a partir de la raza autóctona Pokkali del arroz que proporciona una tolerancia significativa a las sales (Platten *et al.*, 2013).

En la búsqueda de información sobre descripciones de proteínas, la base de datos de *Arabidopsis* el (TAIR), se encontraron una amplia gama de proteínas asociadas al zinc (1272), seguida del cobre (108), hierro (106), manganeso (12) y níquel (4.), implicados en la maquinaria fotosintética de las plantas (Krämer *et al.*, 2007). Esta elevada cantidad de proteínas destinadas al control de la homeostasis de metales pesados es un indicador de su relevancia en la fisiología vegetal.

La disposición y el uso de nuevas herramientas genéticas y moleculares podrían descubrir nuevas familias de genes que participan en la homeostasis de metales como proteínas transportadoras de iones metálicos y homólogos de plantas hiperacumuladoras (Yang *et al* 2005).

Todavía, aún se sabe poco de los mecanismos que se desencadenan en las plantas para mantener su desarrollo en presencia de concentraciones variables de metales tóxicos o para el transporte y almacenamiento del exceso de estos. Se desconoce mucho sobre la señalización y activación de genes en respuesta al estrés por metales pesados (Kumar *et al.*, 2016b). La variabilidad natural de los metales pesados, ahora se une con las actividades antropogénicas que han ocasionado el aumento de metales en el medio ambiente, originado una acumulación excesiva en relación con su proporción natural en la corteza terrestre (Nagajyoti *et al.*, 2010; Viehweger, 2014).

Para la planta, una de las formas para defenderse, es la formación de complejos metálicos estables no tóxicos con agentes quelantes (fitoquelinas, ácidos orgánicos, aminoácidos, metalotieninas o compuestos fenólicos) y/o atrapando los metales desde zonas con metabolismo activo (citoplasma) a el interior de las vacuolas o en la pared celular, donde no puedan causar efectos adversos (Hall, 2002; Schat *et al.*, 2002). En lo que concierne la tolerancia de elementos tóxicos (metales esenciales y no esenciales) en las plantas puede definirse como el resultado de un proceso de evolución que le confiere a los organismos vegetales la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de elementos nocivos (Hall,

2002). Schat *et al.* (2000) clasificaron en dos tipos de tolerancia de acuerdo con el conjunto de mecanismos moleculares o bioquímicos que lo forman: (1) co-tolerancia, puede ser el resultado de un mecanismo específico que confiere tolerancia a diversos metales; y (2) tolerancia múltiple, donde la tolerancia es generada por una serie de vías independientes para cada metal o metales que interactúan de manera conjunta para evitar daño a la planta.

Las respuestas en la transducción de señales ante el estrés abiótico y biótico desencadenan una cascada de transcritos esenciales para la señalización ante los diferentes tipos de estrés lo cual pueden mantener un control ante múltiples factores con cierta especificidad (Nicky *et al.*, 2012).

Es importante saber aquellas respuestas que desencadenan las plantas tanto en su transporte y desintoxicación de metales pesados con el fin de poder mejorar los cultivos de interés agronómicos, actualmente se realizan estudios tomando todos los aspectos que conllevan los metales pesados en las plantas usando herramientas “omic” considerando la ionómica, metabolómica, transcriptómica y la proteómica (Singh *et al.*, 2015).

1.5 Biotecnología de la inundación

Actualmente los cambios en el clima han aumentado la incidencia en las inundaciones y la baja productividad en los diferentes cultivos de interés comercial como el maíz, el trigo y el arroz (Rosenzweig *et al.*, 2014). Aun así, la producción masiva en los cultivos principales a través de la creación de bancos de germoplasmas y el desarrollo de nuevas técnicas agrícolas ha servido para el incremento del rendimiento incluso ante la variabilidad del clima, mediante el descubrimiento de mecanismos genéticos que aumentan la competencia y disponibilidad de los nutrientes y agua (Mickelbart *et al.*, 2015). Sin embargo, las plantas al ser seres sésiles presentan mecanismos tanto de tolerancia, aclimatación y adaptación desarrollados durante su selección natural que pueden estar regidos por reguladores centrales que codifican factores de transcripción y otros componentes río arriba aún desconocidos (Tamang *et al.*, 2015).

Un ejemplo está en la resistencia que le confiere el locus *Sub1A* a la variedad de arroz *indica* (FR13A) que se le integró a una variedad de arroz *japónica* usando la selección por marcadores (Xu *et al.*, 2006). También se logró con éxito la introgresión de *Sub1A* mediante retrocruzamiento por marcadores a una variedad de arroz *indica* Swarna que tiene un rendimiento de hasta 1 a 3 Ton/ha más que las variedades originales después de un estrés severo por inundación (Singh *et al.*, 2013).

Sub1A ha demostrado ser un factor génico muy importante en la tolerancia, que puede transferirse a otras variedades de arroz y generar nuevas variedades para implementar en los campos de la región asiática a cielo abierto, proporcionando ganancias de eficiencia con una menor variabilidad y mayor rendimiento esperado (Dar *et al.*, 2013).

El logro de aportar una característica genética de tolerancia en variedades de arroz como el gen *Sub1A* (Bailey-Serres *et al.* 2010), abre la puerta para el uso de otros recursos genéticos de especies diferentes con modulaciones novedosas en las respuestas ante los estreses bióticos y abióticos (Jackson y Ismail, 2015).

1.6 Genes de función desconocida en la inundación

Diversos estudios transcriptómicos han observado un grupo muy abundante de genes sin identidad conocida que se expresan durante la inundación. Uno de los trabajos pioneros al respecto es el de [Mustroph et al. \(2010\)](#) en el que se reveló que las plántulas de *Arabidopsis* en hipoxia (Fig. 3), además de inducir genes para los mecanismos conocidos de la fermentación, también se indujeron mRNAs que codifican proteínas con función desconocida. Más del 40% de los transcritos eran de esta categoría (3,595 mensajeros) y tenían ortólogos regulados en álamo, arroz y *Chlamydomonas reinhardtii*.

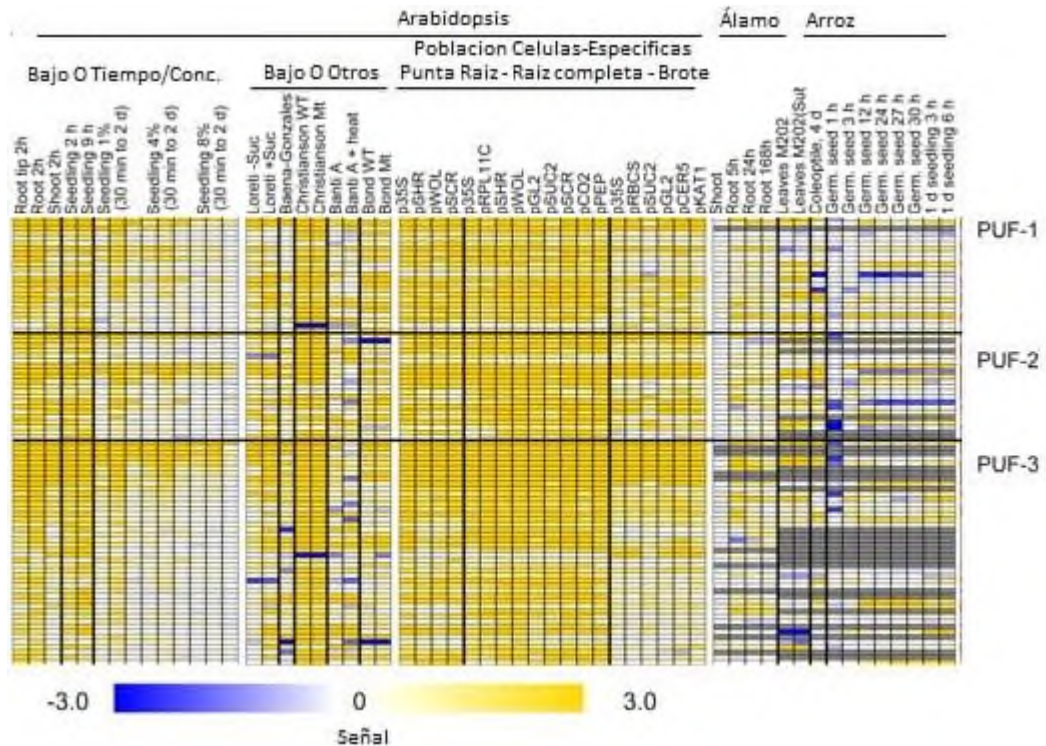


Figura 3. Genes de Arabidopsis inducidos por bajo oxígeno: expresión a través de experimentos, tipos de células y ortólogos en otros organismos.

Se seleccionaron los 200 genes expresados diferencialmente inducidos. Cada fila representa un gen. Los genes se agruparon manualmente en categorías funcionales y a la izquierda, valores de relación señal-registro para los genes en diferentes experimentos de plantas (Mustroph et al., 2010).

El patrón encontrado por [Mustroph et al., \(2010\)](#) se ha repetido en subsecuentes estudios transcriptómicos. Por ejemplo, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan se realizó la comparación transcriptómica de ecotipos sensibles y tolerantes de *Brachypodium distachyon* en inundación con fotoperiodo. Se encontró que la mitad de este transcriptoma fueron de genes con identidad desconocida ([Rivera-Contreras et al., 2016](#)). Otro ejemplo fue la comparación de nueve estreses abióticos diferentes en el transcriptoma de *Arabidopsis*, encontrando a 67 genes regulados comúnmente por cada estrés sugiriendo que presenta un componente universal en las respuestas a cada condición ([Swindell, 2006](#)). También en la comparación de los estreses biótico y abióticos se presentaron respuestas compartidas entre ellas el estrés por alta salinidad y con un patógeno fúngico ([Mantri et al., 2010](#)).

El uso de una definición para las proteínas con función desconocida (PUF) se divide en dos. Un punto donde se consideran aquellas proteínas PUF que no revelan ninguna similitud estructural con aquellas proteínas en bases de datos con características funcionales referidas ([Boeckmann et al., 2003](#); [Leinonen et al., 2004](#)). En contraposición, se tiene una visión más empírica conservadora que define a las PUF como aquellas proteínas que tienen una evidencia experimental como soporte para una función conocida, pero las secuencias funcionales no han sido caracterizadas ([Horan et al., 2005, 2008](#)).

Para la mayoría de estas proteínas su función se mantiene ya sea sólo parcialmente conocida o completamente desconocida, sólo un pequeño porcentaje de las proteínas que codifican en el genoma de vegetales están previamente caracterizadas respecto a sus funciones ([Niehaus et al., 2015](#)). Para proporcionar una visión amplia acerca de lo que aún no se sabe, las técnicas bioinformáticas abren un panorama de oportunidades. Un ejemplo de ellos son las PUF en su asociación con las proteínas de función conocida, relacionándolas por la comparación de secuencias y estructura con estrategias de búsqueda ([Horan et al., 2008](#)). [Schwacke et al., \(2003\)](#) indicaron que para la visión y aprobación de funciones se puede hacer en base a experimentos, además de la predicción de características funcionales de sus secuencias, estructuras secundarias, señales de orientación celular y dominios.

El uso de tecnologías como la proteómica y la interacción de proteínas son herramientas importantes para la relación de funciones adicionales (Johnson y Liu, 2006). Sin embargo, los recursos de proteómica no son suficientes debido a que no están del todo disponibles para todos los genomas. Para este inconveniente, la utilización de microarreglos públicos y estudios de secuenciación masiva (transcriptómica), son un recurso de fácil acceso para los estudios en la búsqueda de asignación de funciones a genes PUF que representan una cantidad alta en datos de expresión génica (Horan *et al.*, 2008). No obstante, la experimentación es indispensable para asignar una función a cada gen.

1.7 La mutagénesis como herramienta en el descubrimiento de funciones génicas en plantas

En la actualidad la mutagénesis química es una técnica importante en lo que refiere a la investigación de la genética vegetal pues es muy grande la capacidad de generar líneas mutantes con una amplia variabilidad de mutaciones, para después poder realizar un escrutinio de una población más pequeña e identificar aquel gen responsable de algún fenotipo en particular. Estos cambios son perceptibles cuando hay pérdida parcial o total de la función del gen o mutaciones ocasionales con ganancia de función (Yung-Tsi *et al.*, 2011). Esencialmente, hay dos tipos de mutagénesis, la química y la biológica.

Dentro de las opciones de mutagénesis química, la más popular es por EMS (metanosulfonato de etilo) como agente químico que produce la modificación química de los nucleótidos, sucediendo cambios en las bases debido a una alquilación sesgada de la guanina. El resultado de este tipo de mutación química no sólo nos deja ver la ganancia o pérdida de la función de un gen, también se pueden comprender ciertas funciones de los residuos de aminoácidos específicos en la proteína, y de acuerdo con otros ensayos, permiten el manejo de este tipo de mutantes para obtener información útil en el entendimiento de genes primordiales mediante la generación de alelos que ocasionen diferentes grados de afectación (Kim *et al.* 2006).

El método químico de mutagénesis se puede combinar con métodos de selección por PCR que se conocen como TILLING (Targeting Induced Local Lesion in Genome) en la identificación de los cambios en los alelos mutados para la detección de mutaciones puntuales en genes de interés (Serrat *et al.*, 2014). No obstante, el enfoque que pretende esta técnica en el descubrimiento de mutaciones afronta el problema en la obtención de una gran población de mutantes.

Un método mutagénico biológico de alto uso en años recientes es el de inserciones de T-DNA por *Agrobacterium tumefaciens*, basado en la introducción de un DNA ajeno en un gen de interés inhibiendo su expresión e identificándolo por pérdida de función. (Østergaard y Yanofsky, 2004; Alonso *et al.*, 2003). Con este tipo de metodología, aunado al desarrollo de cómputo biológico de alta capacidad, las secuencias genómicas y transcriptómicas anotadas, es posible crear grandes colecciones de mutantes con secuencias de T-DNAs indexadas y referenciadas al genoma.

Una herramienta innovadora en el ámbito de la mutagénesis es el uso de CRISPR-Cas9. CRISPR es una proteína del tipo endonucleasa que usa una secuencia guía de RNA dúplex para la formación de pares bases con secuencias blanco sobre el DNA. CRISPR-Cas9 realiza un corte en la zona del DNA específico, que, al ser reparado por el sistema de verificación del organismo, termina con una secuencia extraña y diferente del DNA al original (Douna y Charpentier, 2014; Bortesi y Fischer, 2015). Con el uso de nuevas herramientas y tecnologías en la edición de genes, con énfasis en el sistema CRISPR-Cas9, se proporciona un nuevo enfoque en la edición genética de manera eficiente y simple (Yu *et al.*, 2017).

Una de las bases más grandes con recursos bioinformáticos es TAIR (The Arabidopsis Information Resource) que proporciona una base de datos genéticos, biológicos y moleculares de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los datos disponibles incluyen la secuencia completa del genoma, las estructuras de los genes, información de productos génicos, expresión genética, semillas y reservas de DNA, mapas genómicos, marcadores físicos y genéticos, e información y publicaciones sobre las investigaciones en *Arabidopsis*. (TAIR; Berardini *et al.*, 2015)

Las plantas modelo donde se han desarrollado más extensamente las colecciones mutagénicas son *Arabidopsis thaliana* con 89,705 líneas (dicotiledónea) y *Brachypodium distachyon* con 23,649 líneas (JGI-DOE). Las mutaciones basadas en T-DNA son más estables y fáciles de detectar al transcurrir generaciones (usando un gen marcador seleccionable usado para la transformación de plantas). La inserción de un T-DNA también puede usarse para genes trampa o regiones promotoras, así como la activación de un marcador (Springer, 2000). Un recurso más para especies monocotiledóneas es la base de datos de *Brachypodium* del JGI-DOE, cuyo objetivo es aumentar la colección de recursos genómicos en *Brachypodium* al generar líneas de mutantes de T-DNA. No obstante, hay otros recursos para otras plantas que, aunque no llegan a la magnitud del que se posee *Arabidopsis*, se encuentran en desarrollo y son útiles para el establecimiento de funciones génicas.

En los últimos años, en conjunto con la liberación del genoma del ecotipo Bd21 y el desarrollo de recursos informáticos, *Brachypodium* se ha posicionado como una gran herramienta de genómica funcional y estructural (Bragg *et al.*, 2012). Hay bases de datos gratuitas que proporciona el acceso a las secuencias completas del genoma de *Brachypodium* y su ecotipo Bd21, por ejemplo, Phytozome 12.

Brachypodium es una planta con muchos atributos biológicos, físicos y genómicos requeridos para ser un sistema experimental, entre ellos, el método de mutagénesis por T-DNAs (Vogel y Hill, 2008). El porcentaje de eficiencia está en un 50% referido a la producción de cientos de líneas de inserción de T-DNA (JGI-DOE). Para esta colección, no todas las mutantes con inserciones truncan a los genes, algunas contienen promotores fuertes para crear sobre expresantes, o a la proteína GUS como gen reportero de expresión. Las construcciones usadas por DOE fueron pOL001, que se utilizó como punto de referencia para poder realizar a las otras construcciones y contiene un gen hptII bajo el control del promotor 35S de CaMV para la selección de callo transgénico y un gen indicador GUS bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz. A partir de éste se crearon las demás construcciones pJJB2LB, pJJ2LBA, pJJ2LBP y pJJ2LBP (Bragg *et al.*, 2012). Otro uso que se le puede dar a este tipo de transformación es poder caracterizar la función de genes a través de la sobreexpresión o silenciamiento génico (Brkljacic *et al.*, 2011).

1.8 Estudios de mutagénesis en la biología del estrés por inundación

Desde el primer reporte sobre PUFs en inundación (Mustroph *et al.*, 2010), se utilizó la herramienta de mutagénesis por T-DNA para estudiarlas y se reportaron 16 proteínas desconocidas de hipoxia sobreexpresantes (Genes HYPOXIA UNKNOWN PROTEINS, HUP) que incluían a 4 específicas de *Arabidopsis*, de manera interesante, ninguna de las líneas mostró un fenotipo altamente diferencial con respecto a Col-0 salvo la línea 41, que mostró mayor sensibilidad a la hipoxia y que no ha continuado siendo estudiada en este contexto (Mustroph *et al.*, 2010). Esta línea codifica para una proteína desconocida llamada COR28 (At4g33980) que media la señalización de frío y floración (Li *et al.*, 2016). Este conjunto de genes desconocidos se estudió tanto en mutantes sobre expresantes como en knock-out por pérdida de función, pero ahora en el contexto de un estrés por inundación en oscuridad (Lee *et al.*, 2011).

La inundación completa causó cambios en el transcriptoma, y se identificaron genes co-regulados en el desarrollo o de órganos específicos, y 34 genes co-regulados por la falta de O₂ en inundación, el 40% correspondían a HUPs del total transcrito (Lee *et al.*, 2011). Al probar el aumento o el descenso de la tolerancia a la inundación, sólo HUP53 mostró un fenotipo de mayor tolerancia en comparación con Col-0 de entre 24 mutantes. Al momento, el estudio de este gen no ha tenido mayor seguimiento, otros trabajos lo ubican como una proteína de tonoplasto que disminuye su expresión ante el estrés por frío (Schulze *et al.*, 2012).

Peng *et al.* (2001) examinaron la señalización hormonal que lleva a la activación hipóxica del ADH. Por medio de un inhibidor del metabolismo del etileno, y de mutantes knock-out del receptor y el transductor de las respuestas del etileno, se observó que esta hormona es necesaria para que ADH alcance su expresión máxima, pero no es la única.

La fermentación etanólica configura a la fermentación anaeróbica, y por medio de mutantes knock-out, Kürsteiner *et al.* (2003) reveló que *PDC1* es esencial para sobrevivir a la anoxia, pero no a estrés salino y por deshidratación.

Se sabe que las plantas superiores son sistemas aeróbicos, sésiles y obligados, tienden a desarrollar ciertos mecanismos para la supervivencia a condiciones

hipóxicas generadas por las inundaciones. [Ismond et al., \(2003\)](#) manipularon los niveles de actividad de la fermentación alcohólica de las enzimas piruvato descarboxilasa (*PDC*) y la alcohol deshidrogenasa (*ADH*) sobreexpresándolas por medio de mutaciones sobreexpresantes o anti sentido (bajo el control del promotor 35S) a los genes que corresponde (*PDC1*, *PDC2* y *ADH1*) en *Arabidopsis*. Las plantas que sobreexpresan se les asignó el prefijo “Ox” (sobreexpresión) y en el caso de *ADH1*, se seleccionó un mutante *adh1*⁻ nula. Observaron que la sobreexpresión de *PDC1* o *PDC2* mejoró la tolerancia de la planta en situaciones de bajo oxígeno, y la mutante de *adh1*⁻ resultó ser poca tolerante en condiciones de bajo oxígeno. De esta forma se resaltó la importancia del proceso bioquímico de la fermentación (Fig. 4).

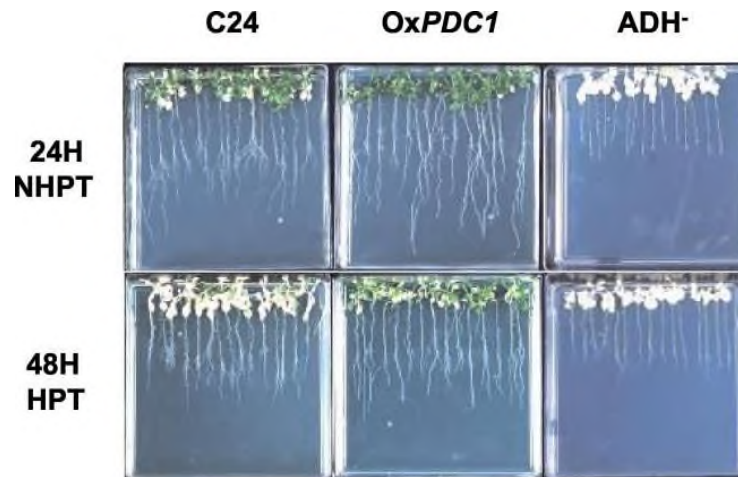


Figura 4. Fenotipos de las plantas mutantes de OxPDC1, ADH⁻ y silvestre C24. Plantas silvestres y mutantes después de los ensayos de supervivencia de las plántulas de *Arabidopsis* sometidas a un tratamiento con bajo oxígeno (HPT) y otras sin pretratamiento hipóxico (NHPT) (Ismond et al., 2003).

Un ejemplo de un gen sin función conocida involucrado en la inundación, que se llamó originalmente *HYPOXIA RESPONSE ATENUATOR 1*, pertenece a la familia factores de transcripción "trihelix" y se induce por hipoxia. El uso de mutantes knock-out y sobreexpresantes de este gen permitió observar que ninguno aumentó su tolerancia a la inundación, lo que indica que participa en un bucle auto regulatorio. El *ERF-VII RAP2.12* induce la transcripción de *HRA1*, el cual la proteína *HRA1* interactúa con *RAP2.12* para disminuir su actividad. También el mensajero *HRA1* se regula negativamente tras la unión con *RAP2.12-HRA1* y esto permite modular la respuesta a la hipoxia (Fig. 5) (Giuntoli *et al.*, 2014).

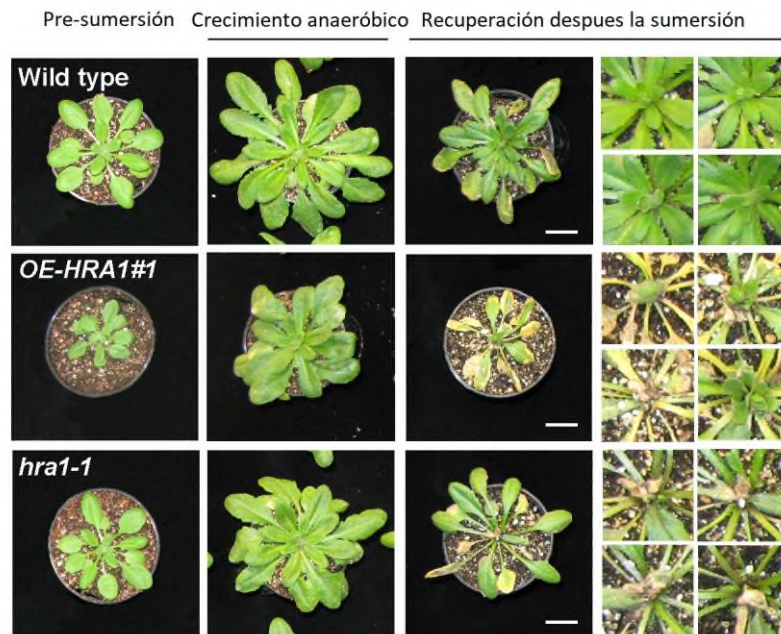


Figura 5. Supervivencia ante la inundación de las plantas silvestres vs transgénicas ante la modificación en la expresión de *HRA1*.

Efecto en la expresión de *HRA1* en el crecimiento de las rosetas después de la recuperación desde la sumersión por 72 h. (Giuntoli *et al.*, 2014).

Gracias a la mutagénesis por T-DNA, se descubrieron enzimas que oxidan a la cisteína por la vía del N-terminal, ahora llamadas *PLANT CYSTEINE OXIDASE (PCO)*, oxidan la cisteína-2 de los *ERF-VII* usando O_2 como co-sustrato y controlando su tiempo de vida. Se utilizaron plantas para sobre expresar a PCO (35S:PCO1 y 35S:PCO2) así como plantas knock-out de *PROTEOLYSIS6 (PRT6)* que codifica a una ligasa de ubiquitina, y se probaron en inundación y oscuridad por 72 horas. Se observó que la sobreexpresión en plantas de PCO disminuía la tolerancia a la inundación debido a que no activa una respuesta molecular durante la hipoxia, contrario a las silvestres y mutantes en la ruta N-terminal *prt6* (Fig. 6) (Weits *et al.*, 2014).

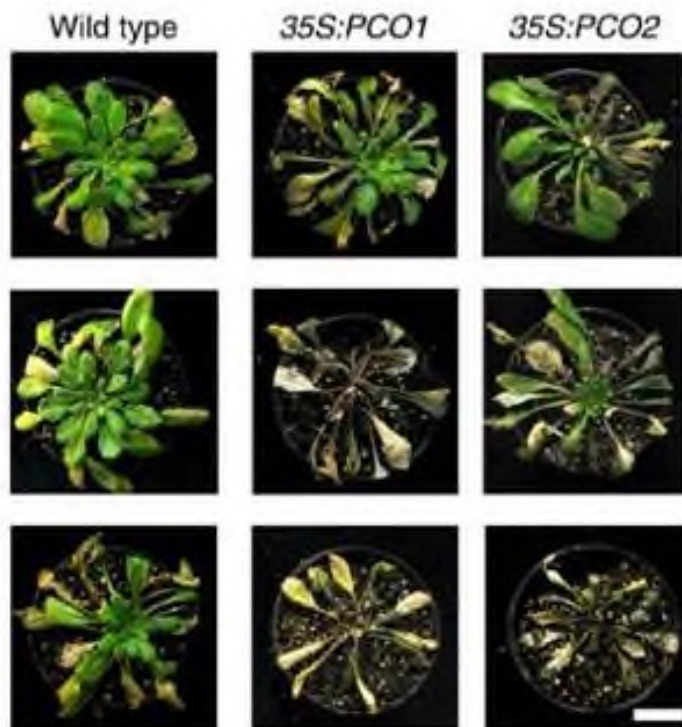


Figura 6. Fenotipos de tipo silvestre, 35S: PCO1 y 35S: PCO1 en plantas prt6. Plantas después de la recuperación por inundación por 72 h (Weits *et al.*, 2014).

Se conoce que las plantas en condiciones bajas de oxígeno cambian su metabolismo al iniciar la vía fermentativa. Para inducirla se necesitan enzimas como la piruvato descarboxilasa (*PDC*) y la alcohol deshidrogenasa (*ADH*) Mithran *et al.*, 2014, donde un gen codifica para *ADH* y cuatro genes para *PDC*. En *Arabidopsis*, por medio de mutantes knock-out, se reveló que no solo *PDC1* sino también *PDC2* desempeñan un papel en condiciones hipóxicas. Para el ensayo, se utilizaron plantas mutantes de T-DNA de *Arabidopsis* de *pcd1* (At4g33070) y *PDC2* (At5g54960) y se observó que *PDC2* es el transcrito más importante para la tolerancia a la hipoxia, sin que esto signifique que *PDC1* no sea relevante destacando el papel de las isoenzimas están involucrados en respuesta de bajo oxígeno (Fig. 7).



Figura 7. Fenotipos de las plantas mutantes por T-DNA de *pcd1* y *pcd2* con su control silvestre.

Plantas sometidas a inundación durante 8 días seguido de un tiempo de recuperación de 3 días (Mithran *et al.*, 2012).

La tolerancia a la baja disponibilidad de oxígeno e inmersión en las plantas está regulada por miembros del subgrupo VII de la familia *ERF* (*RAP2.12*) (Licausi *et al.* 2011). Con mutantes sobreexpresantes de versiones nativas y mutantes sitio específico en los aminoácidos iniciales, se identificó una secuencia conservada en la región del N-terminal de *RAP2.12* mediante el cual el oxígeno molecular actúa sobre *RAP2.12* para desencadenar respuestas de aclimatación molecular. Se evaluaron las plantas con distintas construcciones que sobreexpresan a *RAP2.12*, una constitutiva (35S::*RAP2.12*), otra con una etiqueta de hemaglutinina (*HA*) en su extremo N-terminal (35S::*HA*::*RAP2.12*) y una versión de *RAP2.12* a la cual se eliminaron los 13 primeros aminoácidos (35S:: Δ 13::*RAP2.12*). Se observó que las plantas con la primera construcción aumentaron la biomasa después del estrés en comparación a las silvestres, que la construcción con la etiqueta *HA* en su extremo N-terminal redujo el crecimiento y tolerancia al estrés, y de forma similar actuó la versión *RAP2.12* a la cual se le eliminaron los 13 primeros aminoácidos (35S:: Δ 13::*RAP2.12*) (Fig. 8).

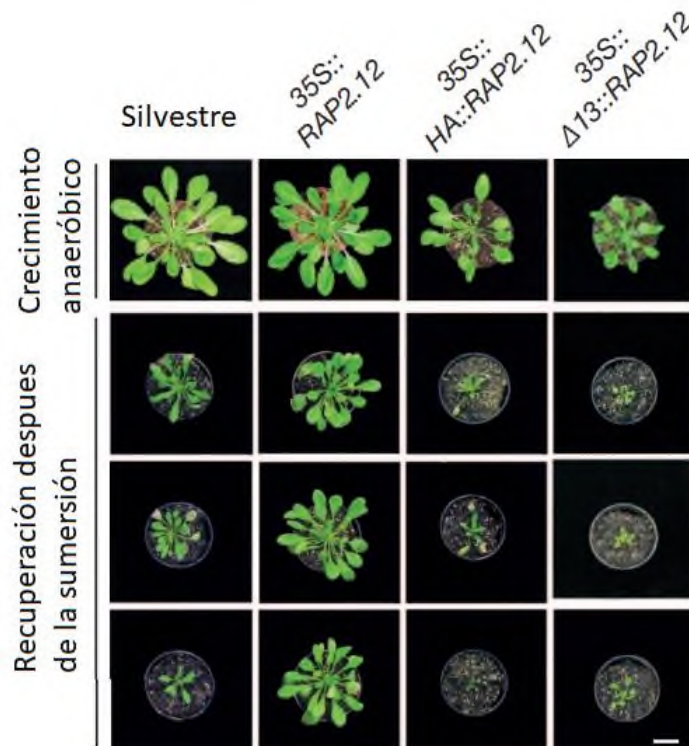


Figura 8. Fenotipos de las plantas mutantes del *ERF-VII RAP2.12* que regula la tolerancia a la hipoxia.

Plantas silvestres y mutantes después de la inmersión. (Licausi *et al.* 2011).

No solo en *Arabidopsis* se estudian las enzimas relacionadas a la hipoxia sino también en arroz. El trabajo realizado por [Rahman et al. \(2001\)](#), utilizó un método transgénico para poder manipular los niveles del piruvato descarboxilasa (*PDC*) y la alcohol deshidrogenasa (*ADH*) en el arroz, con la finalidad de conocer si se puede ver afectada la tolerancia anaeróbica alterando la fermentación del etanol. Para el ensayo se utilizaron una línea transgénica con una construcción anti sentido *Adh1*, lo que mostro una baja producción de etanol y un crecimiento bajo anoxia del coleóptilo. Otra línea mutante transformada con cDNA de *Adh2* de algodón con orientación en sentido relativo a un promotor constitutivo, mostrando una actividad de 3 a 4 veces mayor de *ADH* que en sus respectivos controles no transformadas y en una variedad de arroz tolerante (FR13A) a inundaciones.

2. Justificación

En México, los huracanes y las inundaciones causadas por las lluvias intensas y prolongadas son los desastres que más daño ocasionan al país con pérdidas económicas elevadas en los últimos 20 años. Dado a que no cuentan con el suficiente apoyo para el sector agrícola en casos de desastres naturales como los eventos hidrometeorológicos, la población más desfavorecida ante ello es aquella que aún sigue en el autoconsumo de sus cultivos y sus ingresos son los más bajos del país.

Es de vital importancia el uso y descubrimiento de nuevas tecnologías para permitir la obtención de nuevos cultivos resistentes a la inundación, y que a su vez tengan el menor impacto en sus propiedades nutrimentales y de biomasa.

En países desarrollados o comprometidos con el desarrollo basado en conocimiento, cuentan con una mayor infraestructura, recursos y logística para este tipo de eventos, que aunado a la incorporación de factores genéticos que funcionan como seguros de productividad ante la inundación, pueden minimizar los efectos negativos socioeconómicos en la agricultura.

Dado que aún al país le falta mucho por el desarrollo para una mejor infraestructura y recursos, además la importancia económica de los cereales existe la necesidad de buscar factores genéticos que les confieran mayor resistencia ante los diferentes tipos de estrés ambientales.

En este trabajo, se usó a la herramienta de mutagénesis por T-DNA para buscar una función a aquellos genes desconocidos que se expresan positivamente en la parte aérea de la planta monocotiledónea modelo *Brachypodium distachyon* en inundación.

3. Hipótesis

Los genes sin identidad que se expresan positivamente durante el estrés por inundación serán responsables de aspectos sobre el desarrollo y supervivencia vegetal de *Brachypodium distachyon*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar homocigotos de plantas mutantes de T-DNA en genes sin identidad regulados positivamente durante el estrés por inundación en *Brachypodium distachyon*.

4.2 Objetivos Específicos

1. Seleccionar genes sin función conocida de *Brachypodium distachyon* que se expresen durante el estrés por inundación en los ecotipos Bd21 y Bd21-3.
2. Buscar mutantes homocigotos de T-DNA de *Brachypodium distachyon* Bd21-3 en estos genes.
3. Investigar la tolerancia al estrés por inundación de los mutantes de T-DNA en contraste con las silvestres.
4. Confirmar mediante RT-PCR la anulación de la expresión de genes descubiertos por el análisis de secuenciación.
5. Proponer las funciones a los genes de interés que estén dados por la respuesta ante el estrés por inundación de *Brachypodium distachyon*.

5. Estrategia Experimental

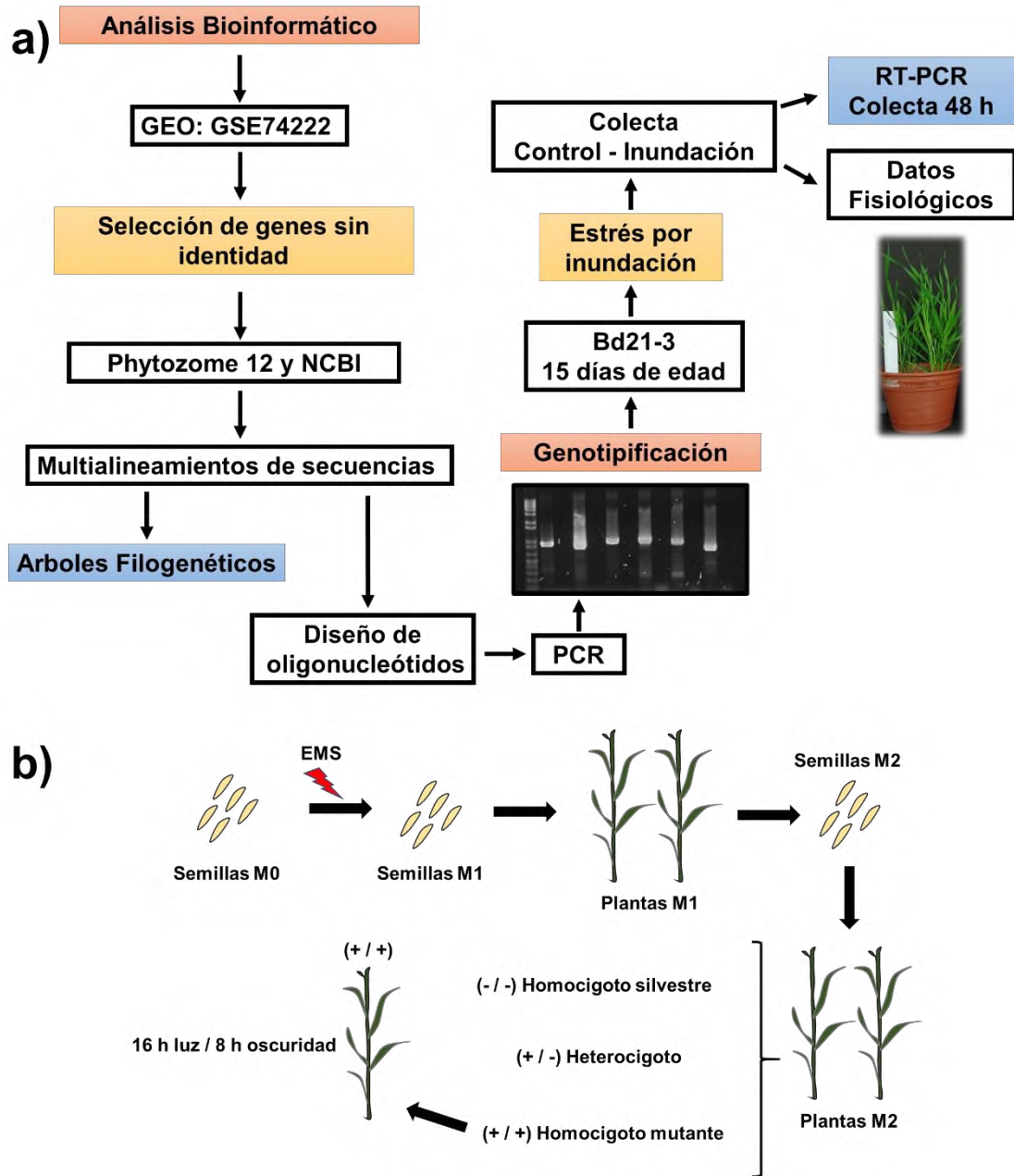


Figura 9. Estrategias utilizadas de mutagénesis del presente trabajo.
a) Escrutinio de mutantes de T-DNA, b) mutagénesis química por EMS.

6. Materiales y Métodos

6.1 Búsqueda de líneas de mutantes de T-DNA en la base de RNA-Seq

Con los datos obtenidos de la secuenciación (RNASeq) de *Brachypodium distachyon* Bd21 sometido a estrés por inundación (Gene Expression Omnibus GSE74222; [Rivera-Contreras et al., 2016](#)), se seleccionaron aquellos genes que presentaron una expresión positiva de actividad durante la inundación, haciendo un filtrado por el criterio de expresión de $\text{LogFC} \geq 1.5$. Una vez identificados estos candidatos, se contrastó con la base de mutantes de T-DNA de Phytozome del ecotipo Bd21-3 para encontrar a aquellos que tuvieran una línea de T-DNA anotada en estos genes.

Los candidatos con solapamiento en ambas bases de datos, se solicitaron al Joint Genome Institute (JGI) del Departamento de Energía de Estados Unidos ([JGI-DOE, 2016](#)). Del escrutinio de genes, se obtuvieron dos bloques con candidatos donde el JGI-DOE sólo nos envió el primer bloque.

6.2 Composición de las construcciones de T-DNA

Para generar la colección de líneas mutantes de *Brachypodium*, el JGI construyó varias versiones de T-DNA. La primera construcción, pOL001 es un punto de referencia para evaluar las nuevas construcciones y para la producción inicial de las líneas de T-DNA. Estas construcciones se pueden separar en el resultado del mutante esperado, por ejemplo, pOL001 generará mutantes knock-out, pJJB, pJJ, pJJB2LB y pJJ2LB sobreexpresantes con 35S, el pJJ2LBP2 y pJJ2LBP trampas génicas de GUS, pOL001 incluye un gen HPTII bajo el control del promotor CaMV 35S y un gen marcador GUS bajo el control del promotor de ubiquitina de maíz (ZmUbi). El pJJB contiene el gen de selección de fosfinotricina acetil transferasa (BAR) bajo control del promotor de ubiquitina de maíz., pJJ contiene un gen de selección a higromicina fosfotransferasa (HPTII) bajo control del promotor de ubiquitina de maíz. pJJ2LB contiene el fragmento HPTII bajo control del promotor ZmUbi y el gen GUS bajo el

control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) además de contener un gen marcador GUS bajo el control del promotor CaMV 35S y el pJJB2LB con la diferencia en el fragmento BAR. pJJ2LBA contiene una construcción potenciadora 4x35S CaMV para el aumento de la transcripción de genes vecinos además de un gen HPTII bajo el control del promotor ZmUbi. pJJ2LBP2 y pJJ2LBP ambos contienen el gen HPTII impulsada por el promotor ZmUbi, un gen GUS sin promotor, además de un gen reportero de proteína fluorescente verde (sGFP) sin promotor (Fig. 10).

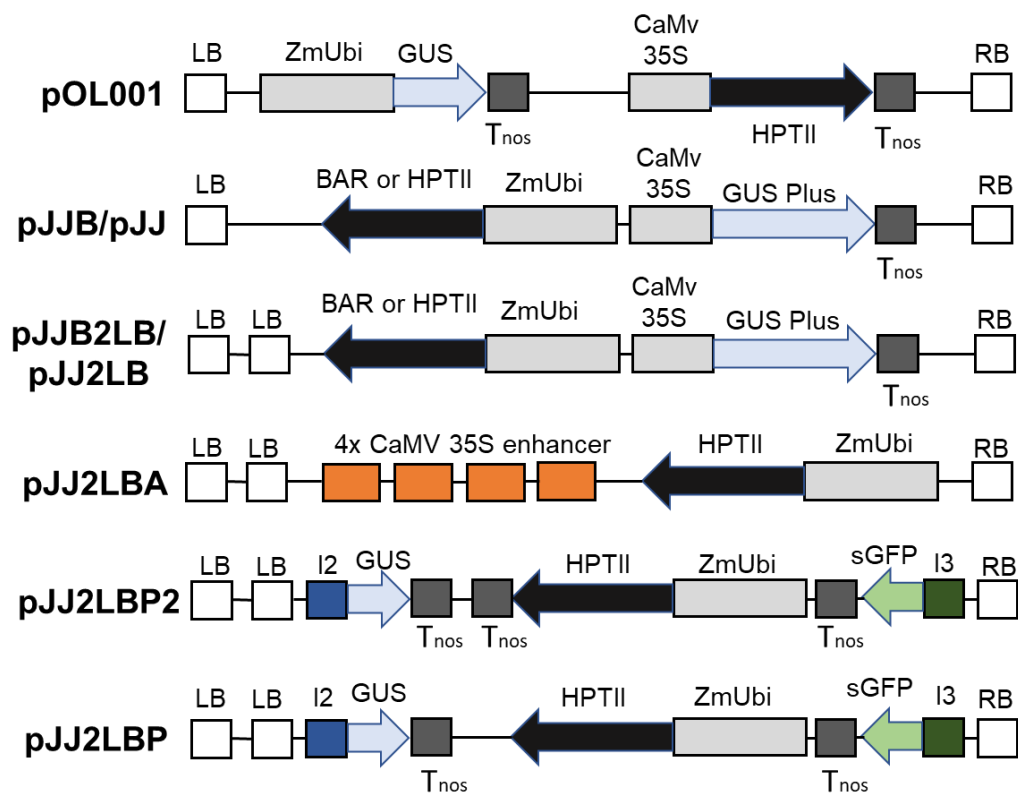


Figura 10. Construcciones realizadas y utilizadas por JGI-DOE para la generación de líneas mutantes de T-DNA en *Brachypodium distachyon*.

Las construcciones del tipo insercional simple son: pOL001, pJJB, pJJ, pJJB2LB y pJJ2LB, una trampa génica el pJJ2LBA y como trampas génicas el pJJ2LBP2 y pJJ2LBP. Promotor de Ubiquitina con un intrón: ZmUbi; virus del mosaico de la coliflor y promotor 35S: CaMV 35; secuencia de terminación: T_{nos}; gen de selección de fosfotricina acetil transferasa o higromicina fosfotransferasa: BAR o HPTII; genes indicadores β-glucoronidasa: GUS/GUS Plus; intrón de tubulina del arroz que contiene un sitio donante de empalme y sitios aceptores: I2/I3; gen reportero de proteínas: sGFP; secuencias potenciadoras transcripcionales: 4x CaMV 35S (Bragg *et al.*, 2012).

En la base de datos JGI-DOE, se detalla el sitio y coordenada de inserción, la dirección de la inserción, así como el detalle de anotaciones génicas del gen truncado o el más cercano. Todos estos datos se recolectaron para las inserciones detectadas.

6.3 Análisis filogenético

Para la obtención de todas las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos de aquellos genes candidatos sin identidad, se utilizó la base de datos de Phytozome 12 con el fondo genético de Bd21-3 V3.1, además del uso de la base NCBI para la búsqueda de aquellos homólogos no encontrados en Phytozome. En la construcción de alineamientos y árboles filogenéticos se utilizó el software Mega 7 en versión gráfica (<http://www.megasoftware.net/>; Kumar *et al.*, 2016a).

Para el diseño de la filogenia de los 7 genes candidatos se tomaron sus respectivos homólogos utilizando Clustal W para alinearlos y posteriormente generar un árbol filogenético por el siguiente método: *Construc/Test Neighbor-Joining Tree* (1000 *bootstrap* modelo de *Poisson*, *uniform rates* y *Pairwise deletion*). Además, se obtuvieron los niveles de expresión digitales de toda la filogenia realizada con sus respectivos Log₂FC y cuentas por millón (CPM) en escala de colores condicional de la base de datos GSE74222.

6.4 Análisis del RNAseq por Integrative Genomics Viewer (IGV)

Para la observación de estructuras genómicas tanto de intrones como de exones de los genes seleccionados, se utilizó el software IGV (Thorvaldssdóttir *et al.*, 2013). Se cargaron los archivos de cuentas de expresión de mRNAs secuenciados de la base de datos GEO GSE74222, se etiquetaron por condiciones (inundación, control, y ecotipo) y las réplicas experimentales. Para poder ver lo mapeos, se utilizaron 3 archivos digitales, uno que contiene el genoma de *Brachypodium v3.1* en formato fasta, otro con las anotaciones con formato .gff y el ultimo de la secuenciación en las diferentes condiciones en formato .tdf y se presentó para su examinación en conjunto gráfico.

6.5 Diseño de oligonucleótidos para genotipificación y RT-PCR

Para el diseño de los oligonucleótidos para PCR de genotipificación se buscaron las secuencias que flanquean los bordes de las inserciones reportadas de T-DNA en la base de datos JGI-DOE en Phytozome. Se descargaron las secuencias génicas para identificar los sitios de inserción del T-DNA, se tomaron 1000 pb (500 pb de cada borde del sitio de inserción) (Anexo B). Posteriormente, estas secuencias se alimentaron sitio web Primer3 v 0.4.0 con las condicionantes de tamaño de amplicón mínimo de 400 a 500 pb y 65° C de T_m. Estos oligonucleótidos se denominaron "gen específico" o GSP (Tabla 1).

El fin del diseño de estos oligonucleótidos GSP es determinar el estado de homocigosis y verificar la presencia de las inserciones reportadas como se ilustra en la Fig. 11. La síntesis de todos los oligonucleótidos reportados en este trabajo se llevó a cabo por los servicios de la compañía OligoT4 (Anexo E) incluyendo el oligonucleótido de T-DNA que se localiza 120 pb hacia arriba del 5' del extremo LB (T3 T-DNA LB AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG) como se muestra en el protocolo de genotipificación de T-DNA del JGI-DOE ([Vogel, 2014](#))

Para el diseño de los oligonucleótidos para RT-PCR se obtuvieron las secuencias de los transcritos de Phytozome 12 de los genes que resultaron ser homocigotos (Tabla 1); el diseño se realizó cerca o dentro de los exones del extremo 3' (Anexo A) con una T_m de 63°C y optimizados para evitar auto alineamiento, y estructura secundaria en el sitio IDT DNA.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C	Amplición
Bradi5g02420	Bradi420F	GGCATGTGACCACCAAGA	61.4	189
	Bradi420R	GATCTGTCGATGCCTACATCTC	63	
Bradi2g33110	Bradi110F	CTCTCGTTCCACCAGTTCTT	64	167
	Bradi110R	GGGCTATTGGCGTTGTAGA	63	
Bradi4g31040	Bradi040F	GGCAAGTAATGTGGATGTCTG	61	250 gDNA / 150 cDNA
	Bradi040R	AACCATAGCGGATATAACCTGC	62.1	

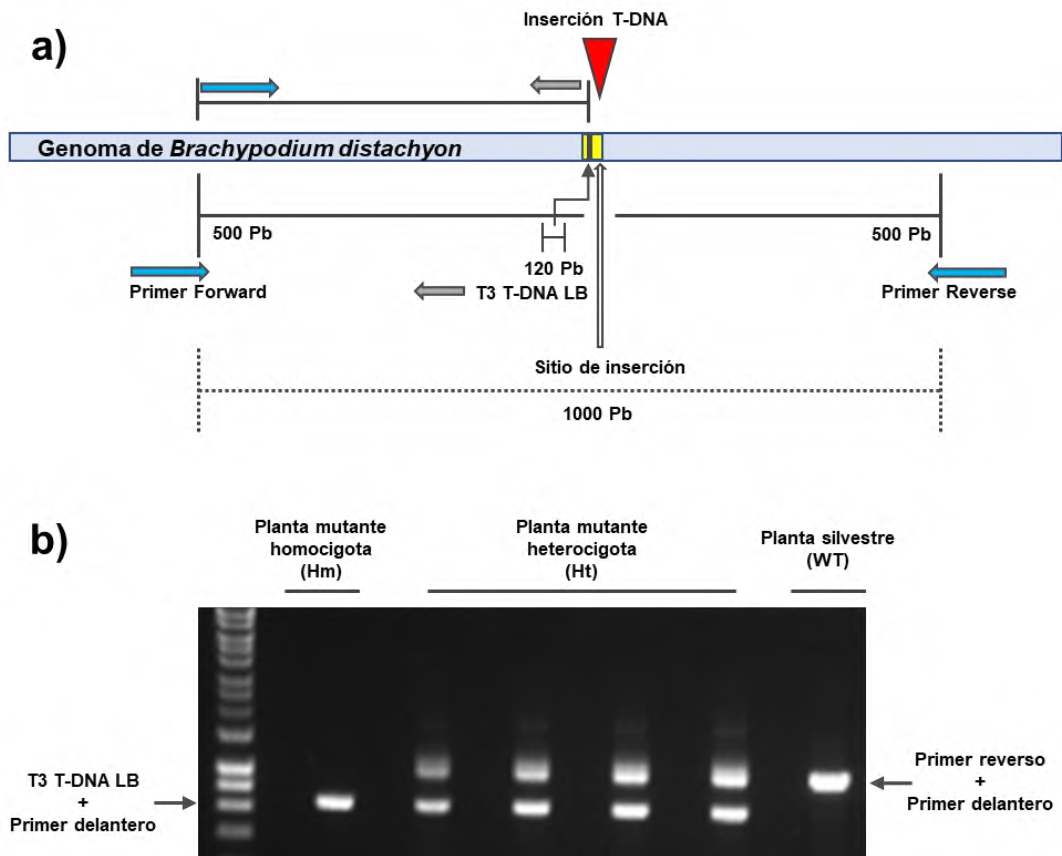


Figura 11. Diseño de oligonucleótidos para las líneas mutantes y el oligonucleótido T3. Las flechas de color indican el sitio de diseño de los oligonucleótidos, las flechas de color azul indican a los oligonucleótidos GSP y la flecha gris el oligonucleótido T3 T-DNA LB. b) muestra de un gel con resultados de la genotipificación con ambos oligonucleótidos GSP (forward) + T3 T-DNA LB, donde las bandas observadas indican la presencia o ausencia de la inserción de T-DNA (Tomado de Vogel, 2014).

6.6. Material Vegetal

6.6.1 Obtención y siembra de *Brachypodium distachyon*

Las líneas mutantes de T-DNA del JGI-DOE se encuentran en el fondo genético del ecotipo Bd21-3 para el cual no hay reportes de tolerancia a la inundación. De tal forma, se ensayó junto a los ecotipos silvestres Bd21, Bd2-3, y Tek10. Posteriormente, las líneas mutantes de T-DNA de *Brachypodium* se contrastaron con la línea silvestre de Bd21-3. Los primeros ecotipos se obtuvieron del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan, procedentes de la colección original del Departamento de Agricultura de Estados Unidos por el Dr. David Garvin (USDA). Las líneas de mutantes de T-DNA y el silvestre de Bd21-3 se obtuvieron de la colección de JGI.

Para realizar la siembra de *Brachypodium distachyon*, las semillas se desinfectaron en un tubo de 50 ml con cloro a una concentración final de 1.65 v/v. Se sometieron a agitación en un oscilador (5 min), se enjuagaron con agua destilada estéril (3 veces) e incubaron a 4°C por cuatro días en agua desionizada estéril para sincronizar la germinación.

Las semillas se crecieron en una mezcla de sustrato Cosmopeat (Cosmocel; Canadá) y perlita (3:1) previamente esterilizados (121 °C durante 15 min a 15 psi) y adicionados con 16.6 g por cada litro (equivalente a 2% w/w) de fertilizante Nitrofoska Perfect (15-5-20).

Para la germinación y propagación de las semillas mutantes y silvestres de Bd21-3, se etiquetaron por líneas y se crecieron en una cámara de crecimiento (Adaptis, Conviron) en condiciones de 60% de humedad relativa, a 23 °C de temperatura con una iluminación de luz blanca de 180 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad y días largos (16 h de luz / 8 h de oscuridad).

6.7 Verificación de las líneas con inserciones de T-DNA

6.7.1 Selección de semillas líneas de T-DNA

El JGI-DOE envía 10 semillas de cada línea, sin embargo, son segregantes de la mutación y es posible obtener todos los estados cigóticos para la inserción. Se sembraron las semillas en las condiciones arriba descritas, y cuando tuvieron más de 10 hojas, se cortó una hoja usando tijeras limpiadas con etanol al 70% después de cada corte y evitar contaminación cruzada. Cada hoja se le identificó con una letra y número correspondiente a la línea o al control silvestre Bd21-3. Finalmente, se almacenaron en tubos de 1.5 ml a -80 °C (Fig. 12).

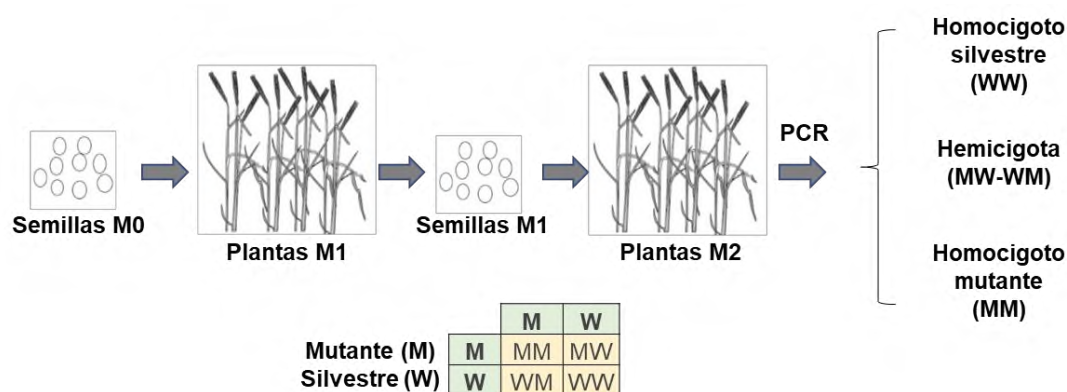


Figura 12. Estrategia en la selección de las plantas homocigotas y el tipo de segregación esperada.

6.7.2 Genotipificación (PCR Multiplex)

Para la identificación de las líneas mutantes homocigotas se realizó genotipificación por PCR utilizando la enzima MyTaq Plant-PCR Kit (BIO-2505, Bionline). Esta enzima es capaz de realizar amplificación de DNA sin necesidad de hacer extracciones de gDNA o que permite mayor procesamiento de muestras y elimina la necesidad de realizar extracciones de ADN. Para la reacción maestra se mezclaron en tubos de PCR de 0.2 ml a los componentes de la Tabla 2 y utilizando los oligonucleótidos del gen específico (GSP) diseñados como se explicó en la sección 6.8

y el oligonucleótido T3 T-DNA LB. La muestra fue un círculo de hoja perforada con pipetas Pasteur estériles con un tamaño de 1.2 mm y recuperadas con la punta de un alfiler estéril para depositarla en el tubo de PCR. Se incluyó un control positivo silvestre (Bd21-3), y para el control negativo solo se usó una reacción que contenía oligonucleótidos.

Tabla 2. Mezcla de PCR para la genotipificación.

Componentes	Cantidades
MyTaq Plant PCR	10 µl
GSP-F	2 µl
GSP-R	2 µl
T3 T-DNA LB	2 µl
ddH ₂ O	4 µl
Muestra de hoja (1.2 mm)	-
Volumen final	20 µl

En el termociclador (Veriti 96 well, Applied Biosystems) se generó un programa de ciclados como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de la PCR.

Estados	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95 °C	3 min	
Desnaturalización 95 °C	15 s	30
Alineamiento 55 °C	15 s	
Extensión 72 °C	1 min	
Elongación final 72 °C	5 min	

Los productos que resultaron de la PCR se observaron en un gel de agarosa al 1.5 % con buffer de corrida TAE 1X (Anexo C). con un marcador de peso molecular HyperLadder 50pb (BIO-33054, Bionline) y se observaron en un transiluminador UV (InGenius LHR, Syngene).

6.8 Verificación de oligonucleótidos

6.8.1 Extracción de gDNA

Para probar el correcto diseño de los oligonucleótidos, se extrajo gDNA de hojas del ecotipo Bd21-3 que se colectaron y almacenaron a -80 °C. La hoja se trituró en nitrógeno líquido con la ayuda de un mini pistilo estéril. Posteriormente, se añadió 500 µl de buffer de extracción (Tabla 4) dispersándolo por inversión e incubándolo por 30 min a 65 °C en un termobloque.

Tabla 4. Componentes del buffer de extracción.

Componentes	Cantidades
0.5 M EDTA pH. 8	1.0 ml
2.5 M NaCl	2.0 ml
1 M Tris pH. 8	0.5 ml
10% SDS	0.4 ml
H ₂ O desionizada	6.1 ml
Volumen final	10.0 ml

Se añadieron 500 µl de cloroformo mezclándolo en un vortex por 10 s y centrifugándolo (Heraeus Pico 21, Thermo Scientific) a máxima velocidad (14,000 x g) por 10 min. La fase sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, y se añadieron 500 µl de isopropanol, mezclando vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Nuevamente se volvió a centrifugar a máxima velocidad por 15 min y se decantó el sobrenadante y manteniendo el pellet de DNA en el fondo del tubo. Se realizó un lavado con 750 µl de etanol al 70% y se mezcló en vórtex. Se centrifugo la mezcla a máxima velocidad por 7 min decantando el etanol. El pellet de DNA se disolvió en 50 µl de agua destilada desionizada estéril (ddH₂O) adicionada con 2 µl/ml de RNasa A (EN0531, Thermo Scientific) para incubarse a 37 °C por 30 min en un termobloque. Finalmente, se guardó a -20°C hasta su uso.

La integridad del gDNA se observó en un gel de agarosa al 1% con un buffer de corrida TAE 1X (Anexo C) con un marcador de peso molecular a 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen 10787-018 (Anexo D) y se observó en un transiluminador UV (Ingenius LHR, Syngene).

6.8.2 Verificación de diseño de oligonucleótidos de PCR y RT-PCR

Para reconstituir los oligonucleótidos liofilizados, se disolvieron con ddH₂O de acuerdo a la cantidad indicada y proporcionada por OligoT4 (molaridad 100µM). Posteriormente, se realizaron diluciones 1:10 de cada oligonucleótido (45 µl ddH₂O y 5 µl oligonucleótido). Para hacer PCR se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific) con los componentes de la Tabla 5 y los oligonucleótidos de la Tabla 16 y usando como molde a una solución de gDNA de Bd21-3 (Tabla 5) en una dilución 1:50 y un control negativo que solo contenía ddH₂O y oligonucleótidos.

Tabla 5. Mezcla de la reacción de PCR.

Componentes	Cantidades
ddH ₂ O	5 µl
DreamTaq Green MM	10 µl
Oligonucleótido F	2 µl
Oligonucleótido R	2 µl
gDNA 1:50	1 µl
Volumen final	20 µl

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

Tabla 6. Programa para la PCR.

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

El resultado de la PCR se observó en un gel de agarosa al 1.5% con un buffer de corrida TAE 1X (Anexo C) y se fotografió en un transiluminador UV (Ingenius LHR, Syngene)

6.9 Ensayo de estrés por inundación de Bd21-3

Dada que Bd21-3 no había sido previamente caracterizado en su tolerancia a la inundación, se sometió a un ensayo para compararlo con los ecotipos ya evaluados por [Rivera-Contreras et al. \(2016\)](#), que son Bd21 (sensible) y Bd2-3 (tolerante). Para el ensayo se utilizaron plantas de 14 días después de su germinación que se sumergieron en 24 cm de agua en tinas de plástico (110 L). Las condiciones del cuarto de crecimiento fueron de un 60% humedad relativa, en condiciones de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad) a 23 °C de temperatura. Se colocaron dos tipos de controles, uno con iluminación de luz blanca de intensidad completa ($180 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y otro con la iluminación existente al lado de las tinas de agua ($70 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) pero sin agua. Todos los ensayos se efectuaron dentro del cuarto de crecimiento vegetal del laboratorio de la Universidad del Papaloapan.

Antes de la inundación se midieron las plantas y se contó el número de hojas. La inundación se realizó tres horas antes del anochecer y las plantas se sometieron a inundación por 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 y 6 días. Las plantas rescatadas del estrés se mantuvieron en condiciones normales de crecimiento durante 6 días cuando se registró el número de hojas, se calculó el porcentaje de sobrevivientes para cuantificar la tolerancia por inundación (LT_{50}) y se fotografiaron. El material utilizado para los

ensayos realizados por triplicados fueron macetas con forma hexagonal con 5 plantas cada una con su respectivo etiquetado.

6.10 Ensayo de estrés por inundación para las líneas de T-DNA

Las líneas de T-DNA homocigotas resultantes fueron sometidas a un estrés por inundación, usando controles y condiciones como el ensayo anterior, pero con el ecotipo silvestre Bd21-3 como testigo. El estrés sólo se realizó por 3, 3.5 y 4 días de inundación correspondientes a 100, 50 y 0% de supervivencia para Bd21-3. El conteo de hojas se realizó 4 días después del estrés por inundación además de una inspección visual diaria de las plantas, tomando los datos como altura y morfología general y el tiempo letal 50 (LT₅₀).

6.11 Análisis estadístico

De los datos obtenidos en las mediciones, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el software Minitab 17 con un valor $p < 0.05$ y una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con el 95% de confianza para comparar las medias individuales y observar diferencias significativas de los ecotipos o líneas probadas en la evaluación el efecto de las características morfológicas y los tiempos de estrés de cada planta seleccionada. Además, se utilizó la herramienta en línea BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>) para generar los gráficos de cajas y bigotes.

6.12 Extracción de RNA

Para poder verificar la inserción de T-DNA en los genes candidatos, se colectó material vegetal de todas las líneas homocigotas y del silvestre Bd21-3 a las 48 horas después de la inundación. El tejido aéreo se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. El kit utilizado para la extracción de RNA fue Direct-zol RNA

MiniPrep (R2050, Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante como a continuación se detalla.

Se adicionó 1 ml de TRI Reagent por 100 mg de tejido, se homogeneizó en un vortex por 5 min a temperatura ambiente, seguido del centrifugado a 12,000 x g por 2 min a temperatura ambiente obteniendo el sobrenadante que se trasvasó a otro tubo de 2 ml. Al sobrenadante se añadió 1 ml de etanol grado molecular y se mezcló por vortex. La mezcla final se colocó en una columna (Zymo-Spin IIC Column) con un tubo colector proporcionado por el fabricante para ser centrifugado a 10,000 x g durante 30 s a temperatura ambiente (Heraeus Pico 21, Thermo Scientific). Dicha columna se transfirió a otro tubo colector nuevo y se adicionó 400 µl de Direct-zol RNA PreWash a la columna. Nuevamente se centrifugó a 10,000 x g por 30 s a temperatura ambiente descartando el tubo colector al final. A la columna se agregaron 80 µl de DNase I Reaction Mix (5 µl DNase I y 75 µl de DNA Digestion Buffer) y se incubó a 20-30 °C por 15 min. Se añadieron 400 µl de Direct-zol RNA PreWash en la columna y se centrifugó a 10,000 x g por 30 s descartando el flujo del tubo colector repitiendo nuevamente este último paso. Se añadieron 700 µl de RNA Wash Buffer en la columna y se centrifugó a 10,000 x g por 2 min a temperatura ambiente descartando el flujo que queda en el tubo colector transfiriendo la columna a un nuevo tubo colector. Se añadieron 50 µl de agua libre de DNase/RNase proporcionada por el kit sobre la columna y se centrifugó a 10,000 x g por 30 s, el flujo del tubo colector se colocó en la misma columna. Para eluir, se centrifugó a 10,000 x g por 1 min. El eluido se guardó a -80°C en un ultracongelador hasta su posterior uso.

Finamente, para observar la integridad del RNA, la extracción se corrió en un gel de agarosa al 1% con un buffer de corrida MOPS 1X (Anexo C) y se observó en un transiluminador (Ingenius LHR, Syngene). Para cuantificar el RNA obtenido se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), utilizando como blanco el agua con el que resuspendió la muestra de RNA (agua o buffer de elución) y se verificaron las relaciones 260/280 y 260/230 que fuesen de 2 o mayor.

6.13 Control y calidad de la síntesis del DNA complementario (cDNA)

6.13.1 Control de calidad de la ausencia de gDNA en el RNA

Para verificar la ausencia de gDNA en las muestras de RNA, se procedió a realizar una reacción de PCR con la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2x (K1081, Thermo Scientific) como se describió en la sección 6.13.1 con la diferencia de que se usaron oligonucleótidos que amplifican una sección intrónica del gen Bradi4g31040 de 250 pb (Tabla 7). El molde fue RNA extraído de la sección 6.13.2 (1.0 µg/15µl) en una dilución 1:10 con ddH₂O. Como control positivo se utilizaron 2 µl de gDNA 1:50 y un control negativo que sólo contenía ddH₂O en lugar de muestra.

Tabla 7. Mezcla para la PCR.

Componentes	Cantidades
ddH ₂ O	5 µl
DreamTaq Green MM	10 µl
Oligonucleótido F	2 µl
Oligonucleótido R	2 µl
RNA 1:10	1 µl
Volumen final	20 µl

El programa utilizado para el ciclado se muestra en la Tabla 8 en un termociclador (Veriti 96 well, Applied Biosystems).

Tabla 8. Programa para PCR.

Estados	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95 °C	3 min	
Desnaturalización 95 °C	30 s	40
Alineamiento 55 °C	30 s	
Extensión 72 °C	1 min	
Elongación final 72 °C	5 min	

Lo obtenido de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 2 % (Anexo C.) con un buffer de corrida TAE 1X con un marcador de peso molecular Hypper Ladder 50pb y se observó en un transiluminador UV.

6.13.2 Síntesis del cDNA

Para la reacción se utilizó la enzima retrotranscriptasa del kit SensiFAST cDNA Synthesis kit (BIO-65053, Bioline). Se realizó una mezcla con los componentes de la Tabla 9 a la cual se añadió un volumen necesario para utilizar 1 µg de RNA y completar con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 15 µl.

Tabla 9. Mezcla para la síntesis de cDNA.

Componentes	Cantidades
5X TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
RNA	1 µg
ddH ₂ O	C.B.P.
Volumen final	20 µl

Las muestras se incubaron en un termociclador (Veriti 96 well, Applied Biosystems) a 25 °C por 10 min luego a 42 °C por 15 min y a 85 °C por 5 min para finalizar la reacción. Una vez terminado, el cDNA sintetizado se diluyó 1:10 para usarse en RT-PCR (3 µl cDNA y 27 µl ddH₂O).

6.13.3 Control de calidad del cDNA

En la verificación del cDNA se usó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific). En tubos de PCR de 0.2 ml se realizó la mezcla maestra con los componentes de la Tabla 10 además, se utilizó a Bradi4g1040 como control de ausencia dado que contiene un intrón dentro del amplicón genómico, generando una banda de 250 pb si proviene de gDNA o de 150 pb si proviene de cDNA. Como

control positivo se utilizaron 2 µl de gDNA 1:50 y como control negativo sólo una reacción con ddH₂O.

Tabla 10. Mezcla para la PCR.

Componentes	Cantidades
ddH ₂ O	5 µl
DreamTaq Green MM	10 µl
Oligonucleótido F	2 µl
Oligonucleótido R	2 µl
cDNA 1:10	1 µl
Volumen final	20 µl

El programa de ciclado utilizado fue el que se indica en la Tabla 8 y los productos finales se separaron en un gel de agarosa al 2% con un buffer de corrida TAE 1X. El gel se observó en un transiluminador UV.

6.14 RT-PCR de los transcritos seleccionados

Para el ensayo de RT-PCR se utilizaron muestras de cDNA 1:10 de las líneas mutantes de T-DNA de 48 h de las condiciones control e inundación de la Tabla 12. Se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific) para amplificar al control constitutivo *UBIQUITIN* (*UBI*, Bradi1g32860). Se realizó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 11 y 12, tomándose muestras a los 20, 25 y 30 ciclos de la PCR para verificar la zona de amplificación exponencial y evitar los ciclos donde las muestras sean indetectables o estén saturadas para determinar la cantidad de cDNA donde *UBI* se detecta con una intensidad similar en los geles (Fig. 59).

Tabla 11. Mezcla para la PCR.

Componentes	Cantidades
ddH ₂ O	variable
DreamTaq Green MM	10 µl
Oligonucleótido F	2 µl
Oligonucleótido R	2 µl
cDNA 1:10	variable
Volumen final	20 µl

Tabla 12. Volúmenes finales utilizados para cada muestra de cDNA.

Línea de T-DNA	Bd21-3 C	Bd21-3 I	A4RT C	A4RT I	A1TZn C	A1TZn I
cDNA 1:10 (µl)	3	2	3	2	2	3.5

El programa de ciclado para la PCR realizado en un termociclador (Veriti 96 well, Applied Biosystems) se ilustra en la Tabla 13 y los amplificadores se observaron en geles de agarosa al 2% con un buffer de corrida TAE 1X.

Tabla 13. Programa para la PCR.

Estados	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial 95 °C	3 min	
Desnaturalización 95 °C	30 s	30
Alineamiento 55 °C	30 s	
Extensión 72 °C	1 min	
Elongación final 72 °C	5 min	

6.15 RT-PCR

Para la verificación de la expresión positivamente en muestras de inundación de plantas silvestres o la ausencia del mensajero de las líneas de T-DNA, se utilizó la enzima DreamTaq Green Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific) adicionada con los cDNAs correspondientes a las mezclas de reacción. Los oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 14 y como control negativo por cada línea se utilizó una mezcla con ddH₂O.

Tabla 14. Componentes de la PCR.

Componentes	Cantidades
ddH ₂ O	1 µl
DreamTaq Green MM	10 µl
Oligonucleótido F	2 µl
Oligonucleótido R	2 µl
cDNA 1:10	Tabla 12
Volumen final	20 µl

El programa utilizado para el ciclado se indica en la Tabla 13 (modificación el número de ciclos a 35) en el termociclador (Veriti 96 well, Applied Biosystems). En los ciclos 25, 30 y 35 se tomaron muestras de la PCR, y las muestras se observaron en un gel de agarosa al 2% con buffer de corrida TAE 1X.

6.16 Mutagénesis química por EMS

6.16.1 Mutación por EMS en *Brachypodium distachyon*

Se realizó un ensayo de mutagénesis por etil metil sulfonato (EMS) con base en el protocolo de mutagénesis a Bd21-3 de [Vogel \(2009\)](#). Se usaron 1900 semillas (7.10 g) de *Brachypodium*. Para evitar pérdidas en el uso de semillas, el lavado se dividió en dos frascos y se realizó en matraces con las soluciones descritas (Anexo J). Posteriormente, se trataron a las semillas con 0.6% EMS (v/v; 50 mM) en 100 ml de agua durante 17h, se enjuagó 10 veces con agua destilada, se dejó en frío por 4 días a 3°C. Se secaron las semillas en papel y se plantaron en charolas con una densidad de 13 semillas por espacio por 3x3 pulgadas para sembrar en 7 charolas. Se creció en el cuarto de crecimiento con las condiciones ya descritas (Sección 6.9 y Anexo J).

7. Resultados y Discusión

7.1 Comparación de base de datos RNAseq y DOE

Como resultado del escrutinio inicial de la base de GSE74222 se identificaron 162 genes expresados positivamente en la inundación en *Brachypodium*, que cumplían con el criterio de ser genes de función desconocida. Por otra parte, para verificar la existencia de las líneas mutantes de dichos genes, se inició una búsqueda en la base de datos transcriptómica GEO GSE74222 con la base de datos en línea de mutantes insercionales de Phytozome (V12). En paralelo se usó a la base de datos GEO GSE74222 alineada con la versión 3 del genoma de *Brachypodium distachyon* contrastando lo obtenido hasta ahora y ver las diferencias tanto en sus LogFC y las cuentas por millón (CPM).

Los genes que se expresaron positivamente y con identidad desconocida, y que poseían mutante insercional, fueron sólo 3 genes: Bradi1g22010, Bradi1g00210 y Bradi5g02420 (Fig. 13). De tal forma, para aumentar la población de estudio, se amplió la búsqueda a una categoría que, aunque no es desconocida, su anotación es pobre pero que se puede predecir sería de importancia en el estrés de inundación. Esta categoría fue genes asociados a metales que se regulan positivamente como bloque ante la inundación. Hasta el momento, no hay reportes que indiquen la importancia o actividad molecular de este grupo ante el estrés por inundación, a pesar de que en el campo se ha medido que la concentración de metales pesados aumenta en las plantas después de sufrir un estrés por anegamiento ([Setter et al., 2009](#)). De tal forma, se amplió la cantidad de genes a 4 más que son con los siguientes: Bradi2g33110, Bradi3g27550, Bradi1g34140 y Bradi4g01540 (Fig.13).

Todas las líneas de T-DNA que se encontraron en la base de datos del DOE son mutantes de inserción y, por lo tanto, tienen el potencial de crear genes *knockouts*. El T-DNA de los vectores pJJ2LBP y pJJ2LBP2 contiene secuencias de genes trampa y dentro de ellos hay un gen GUS y un GFP sin promotor que al integrarse río debajo de un promotor, la expresión de uno de los genes indicadores se podría utilizar para inferir el patrón de expresión del gen interrumpido. Estas líneas tienen el potencial

de proporcionar pistas sobre el papel del gen alterado e identificación de promotores con patrones de expresión útiles. Los vectores pJJ2LBA y pJJ2LBA2 contienen potenciadores de la transcripción dentro de la secuencia del T-DNA y están diseñadas para aumentar la transcripción de genes cercanos si la dirección del promotor está alineada con la del gen, de lo contrario, funciona como un knock-out convencional. La activación de expresión está pensada para asignar la función de los genes con funciones redundantes, en donde los miembros *knock-outs* de una familia no producen un fenotipo.

Se solicitaron al JGI-DOE las líneas con T-DNA en los genes del primer bloque, sin embargo, sólo estuvieron disponibles 7 líneas (10 semillas de cada una) de T-DNA de *Brachypodium* Bradi1g22010 (JJ7792), Bradi1g00210 (JJ9855), Bradi5g02420 (JJ16414), Bradi2g33110 (JJ20631), Bradi3g27550 (JJ10258), Bradi1g34140 (JJ709) y Bradi4g01540 (JJ6903) Tabla 15 (Fig. 13). Las líneas restantes no llegaron debido a que no se contaban con semillas suficientes y se tenía que realizar una recuperación de la línea. Todas las líneas enviadas germinaron, excepto la línea JJ709, por lo tanto, al final se trabajó con 6 líneas. En la Tabla 15 se enlistan las líneas mutantes analizadas en este trabajo y sus características.

Tabla 15. Identificación de los genes candidatos regulados positivamente durante la inundación.

Los primeros tres genes son del grupo de genes sin identidad y los últimos cuatro son los asociados a metales. En negritas se indica a las dos líneas que resultaron ser homocigotas.

Gen	Identidad	Inserción	Construcción	Tipo de construcción	Línea	Código
Bradi1g22010	Proteína B12	Exón	pJJ2LBP2	Trampa génica	JJ7792	A8B12
Bradi1g00210	Proteína WD40	Exón	pJJ2LBA	Activador	JJ9855	A5WD
Bradi5g02420	Retro transcriptasa	Intrón	pJJ2LBA	Activador	JJ16414	A4RT
Bradi2g33110	Transportador de Zinc	Exón	pJJ2LBA	Activador	JJ20631	A1TZn
Bradi3g27550	Transportador de Cobre	Exón	pJJ2LBA	Activador	JJ10258	A8TCu
Bradi1g34140	Transportador de Cobre	Exón	pOL001	Inserción	JJ709	A9ACu
Bradi4g01540	Transportador de Potasio	Exón	pJJ2LBP2	Trampa génica	JJ6903	A3TK
Bradi2g56416	-	Intrón	pJJ2LBA	Activador	JJ15200	No enviada
Bradi1g10200	-	near	pJJ2LBA	Activador	JJ7651	No enviada
Bradi1g10200	-	Exón	pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA	Activador	JJ1246, JJ1246, JJ1246, JJ1246, JJ1247, JJ1246, JJ1246, JJ1246, JJ1246, JJ1246	No enviada
Bradi1g68950	-	Intrón	pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA	Activador	JJ1145, JJ1156, JJ1146, JJ1148, JJ1149, JJ1150, JJ1153, JJ1154, JJ1155	No enviada
Bradi4g31330	-	3'UTR	pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA, pJJ2LBA	Activador	JJ8891, JJ8888, JJ8890, JJ8893, JJ8894, JJ8896, JJ8883	No enviada

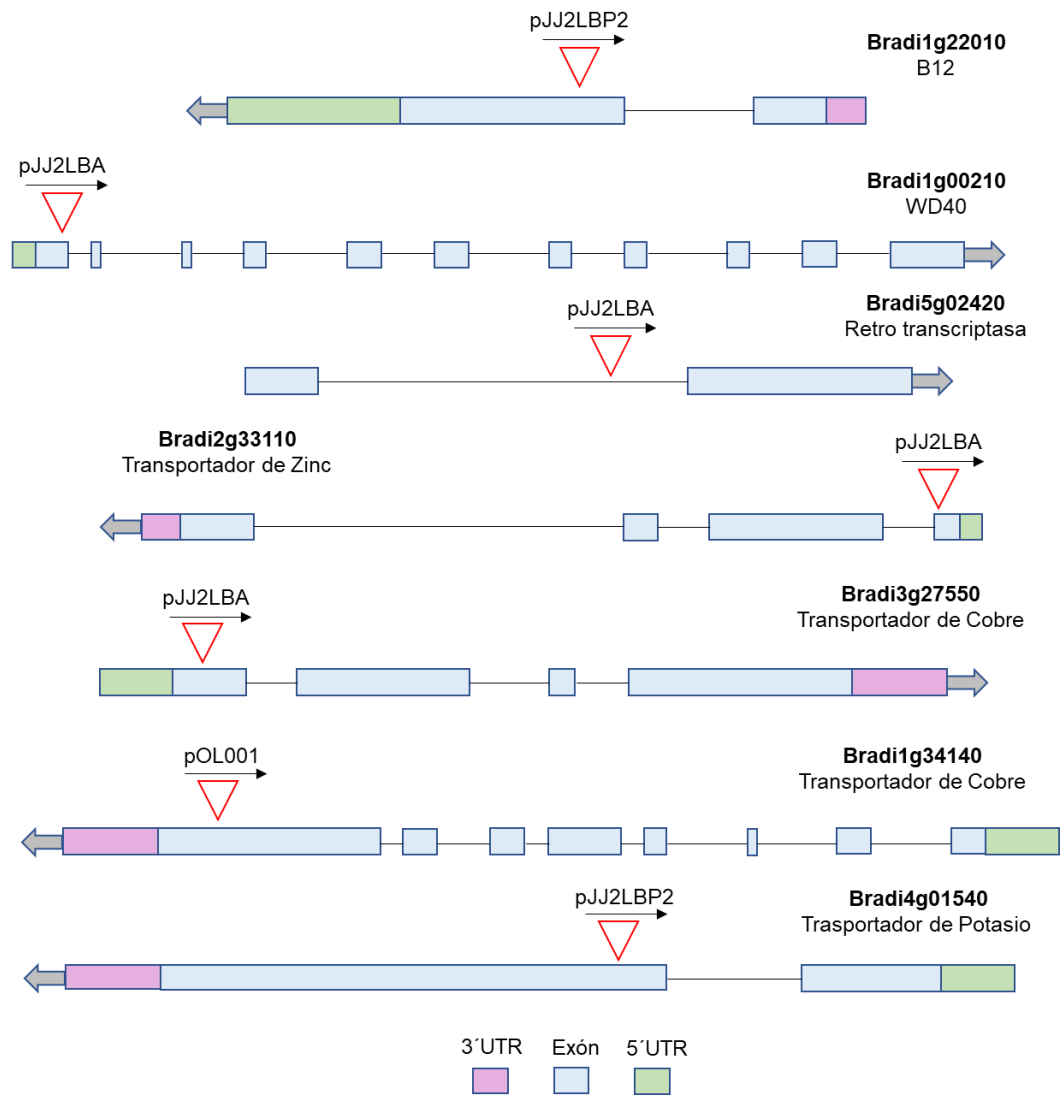


Figura 13. Genes candidatos seleccionados presentes en el estrés por inundación con sus respectivos sitios de inserción por T-DNA disponibles en JGI-DOE.

Los triángulos rojos indican la inserción, el color y las flechas negras la dirección del T-DNA, el color rosa indica la región 3'UTR, el verde la región 5'UTR, las líneas negras a los intrones y el azul la región de exones.

7.2 Genotipificación de líneas de T-DNA de *Brachypodium distachyon*

El diseño de los oligonucleótidos para genotipificación permitió encontrar pares en los flancos de cada una de las inserciones y que amplifiquen secciones de ADN alrededor de los 500 pares de bases para el mutante y de 1000 para el silvestre (Tabla 16).

Los oligonucleótidos se utilizaron en una PCR empleando gDNA de Bd21-3 como molde. Se observaron bandas únicas y del tamaño esperado para todos los casos. En la Fig. 14 se muestran los resultados de las reacciones de PCR para las 6 líneas mutantes.

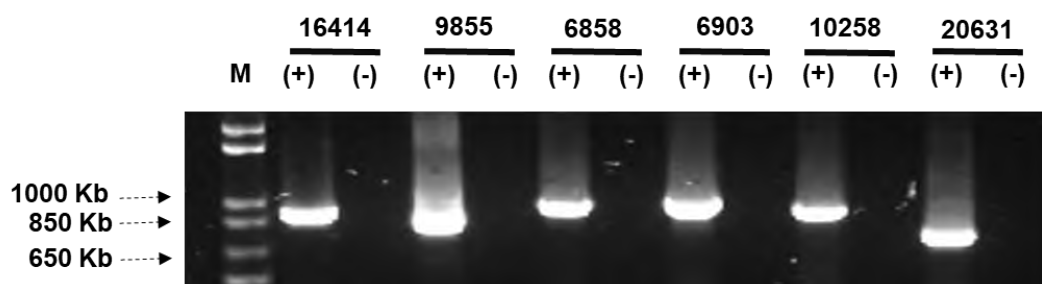


Figura 14. Gel de agarosa al 1.5% para la verificación de los oligonucleótidos para la PCR utilizando gDNA de Bd21-3.

Las bandas que se observan corresponden al tamaño esperado para cada uno de los oligonucleótidos. Para el control negativo (-) solo se utilizó ddH₂O como molde. La nomenclatura de la parte superior corresponde a los últimos números del nombre de la inserción empleado como se muestra en la Tabla 15. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 10787-018).

Tabla 16. Oligonucleótidos de ADN diseñados para genotipificación.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C	Amplicón		
				WT	Homocigoto	Heterocigoto
Bradi5g02420 JJ16414	16414-F	GAGGTTATTGACCAAACCAA	57.63	926	457	926/457
	16414-R	ATTGATATCGAGGTCTCACG	59.7		468	
Bradi1g00210 JJ9855	9855-F	GATAGCTTGATCACCTCGAT	58.8	899	400	899/400
	9855-R	AAAGGGCACTTGAATTA CTG	58.8		501	
Bradi1g22010 JJ6858	6858-F	GATACGAAGCGTAGTTGACC	59.3	972	499	972/499
	6858-R	AAGCAAAATCTGGAACAGAA	59.4		474	
Bradi1g22010 JJ7792	7792-F	GATACGAAGCGTAGTTGACC	-	-	-	-
	7792-R	AAGCAAAATCTGGAACAGAA	-		-	
Bradi4g01540 JJ6903	6903-F	AAGTTGATCAGAGCAAGAGC	59.3	985	495	985/495
	6903-R	GACGATGTAGACCTCCTTGA	59.8		491	
Bradi1g34140 JJ709	709-F	GCCATTGTGAGGAACTAAG	59.3	915	435	915/435
	709-R	TGCATACAGCACAAA CTTC	59.5		481	
Bradi3g27550 JJ10258	10258-F	AAGCGGAAGAACAGTGAAC	60	930	434	930/434
	10258-R	CCTCCTTAGGCTTG TCAAC	59.4		497	
Bradi2g33110 JJ20631	20631-F	CGAAGAGGGTCCATCACAAC	65	742	495	742/495
	20631-R	ATGGCGATCCACTTGAGC	64.4		248	

7.3 Análisis de la expresión

El diseño de los oligonucleótidos para la RT-PCR se realizó en una región de los exones del extremo 3' para cerciorarse de la presencia del transcrito y amplificar un fragmento de cDNA menor a 200 pb (Tabla 1). Aunque se recibieron 7 líneas con sus respectivas semillas, solo 2 resultaron ser homocigotas, por medio de la genotipificación (ver detalles en las secciones siguientes); estas fueron Bradi5g02420 y Bradi2g33110. Por lo tanto, sólo estas dos líneas fueron susceptibles de análisis por RT-PCR. La evidencia para cada línea individual se detalla en secciones subsecuentes.

Para realizar el análisis por RT-PCR, se hizo un experimento de inundación por 48 h en el que se colectó material vegetal de las mutantes y de la planta silvestre, tanto en estrés como en condición control (luz baja; [Rivera-Contreras *et al.*, 2016](#)). Se extrajo el RNA de la parte aérea y se constató en un gel de agarosa al 1% que no hubo degradación de las muestras silvestre (Bd21-3) ni de las líneas mutantes pues no presentaban un barrido y se observan las subunidades del RNA ribosomal íntegras (Fig. 15).

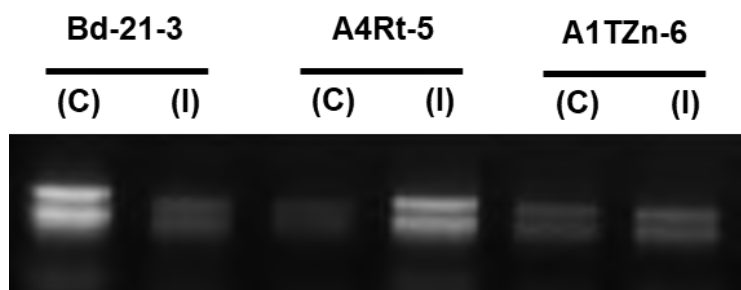


Figura 15. Gel de agarosa al 1% para el RNA de las líneas mutantes de T-DNA y Bd21-3. C: control, I: inundadas. La nomenclatura en la parte superior corresponde al nombre del gen con T-DNA en la línea correspondiente como lo indica la Tabla 15.

Se realizó una PCR para la verificación de la ausencia de gDNA y se utilizó un control constitutivo, el gen Bradi4g31040, que tiene un amplicón de 250 pb en presencia de gDNA (Rivera-Contreras *et al.*, 2016). Los resultados indicaron que todas las muestras de RNA estaban libres de gDNA (Fig. 16) por lo que se procedió a la síntesis de cDNA. Adicionalmente a la prueba de ausencia de gDNA en el RNA, se verifico su ausencia en cDNA. Para esto, nuevamente se utilizó a Bradi4g31040 como control en una PCR con cDNA como molde y en todas las muestras sólo se aprecian bandas de 150 pb de las líneas mutantes y del silvestre en su variante control e inundación. Lo anterior indicó que las muestras de cDNA están libre de gDNA y son útiles para análisis de RT-PCR.

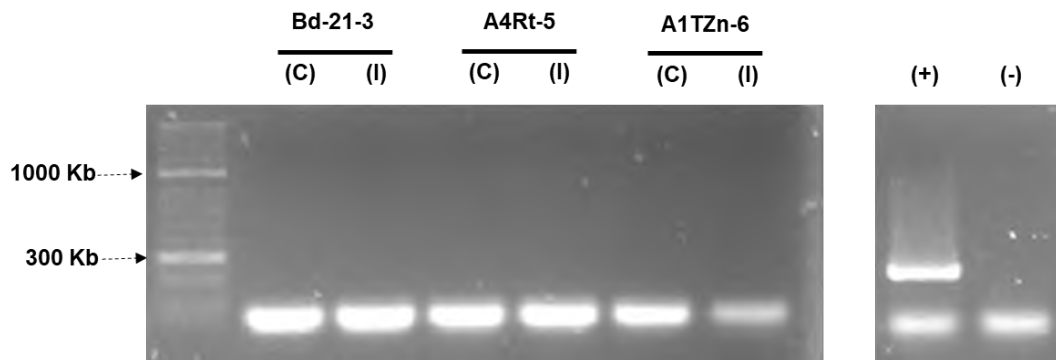


Figura 16. Gel de agarosa al 2% para la verificación de ausencia de gDNA en muestras de RNA de las líneas de T-DNA y de Bd21-3.
 Se utilizó como control Bradi040; M: Marcador de peso molecular HyperLadder 50 pb (BIO-33054, Bioline). C: control, I: inundación, control positivo (+): gDNA de Bd21-3 (1:50), control negativo (-): H₂O.

Una vez verificada la ausencia de gDNA en el RNA, se sintetizó el cDNA y se verificó una vez más con la amplificación del gen Bradi4g31040. En la Fig. 17 se observa una banda de 150 pb en los productos de cDNA del control e inundación de las líneas de T-DNA y Bd21-3,

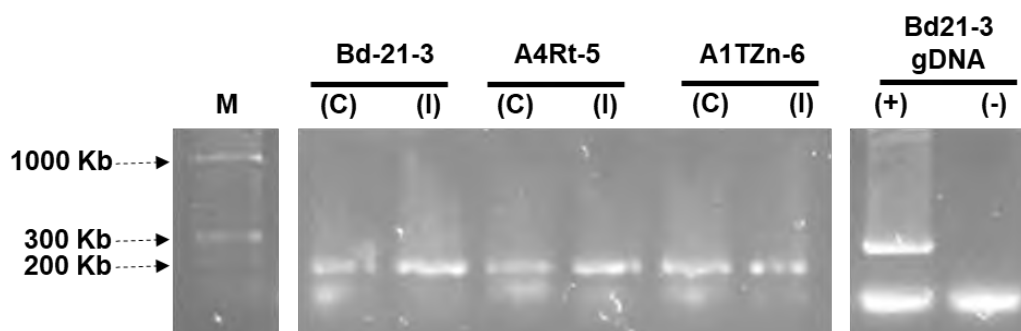


Figura 17. Gel de agarosa al 2% de verificación del cDNA de las líneas de T-DNA y Bd21-3.

Se utilizó como control a Bradi4g31040; M: marcador de peso molecular; C: control, I: inundación, control positivo (+): gDNA de Bd21-3 (1:50), control negativo (-): H₂O.

7.4 Caracterización genotípica de líneas de T-DNA y análisis bioinformático de los genes de interés

La verificación de nuestros genes candidatos como genes sin identidad, se basó en el uso de BLAST en NCBI y Phytozome. También se realizó el análisis de ontología de genes (GO) de la base de datos de Phytozome 12.

Con el objetivo de obtener más información sobre su posible función, para los 7 genes seleccionados se muestran los árboles filogenéticos con grupos de genes cercanos obtenidos por GO. Adicionalmente, se agregó la información de su expresión contrastante en control e inundación como se determinó en la base de datos GSE74222, así como sus CPM. También se hicieron predicciones de dominios con MEME-Suite para los 7 genes

7.5 Gen Bradi1g22010

El gen Bradi1g22010 está formado por dos intrones. La localización en el genoma está entre las posiciones 17709506 y 17710205 pb con dirección reversa. En la línea mutante, el gen cuenta con una inserción en la posición 17709954 a 17709955 pb en el gen, con una construcción del tipo trampa génica pJJ2LBP2. En cuanto la anotación que menciona Phytozome en la versión V3, es la de proteína B12D, relacionada con la familia de la NADH-Ubiquinona en la cadena transportadora de electrones. Esta anotación no se encontraba en la versión V2.

7.5.1 Filogenia y expresión del gen Bradi1g22010 relacionada a la cadena transportadora de electrones.

Se descargaron las secuencias homologas del gen de Phytozome de otras especies como *Arabidopsis*, maíz y arroz. Se generó un árbol filogenético que mostró dos grupos, I y II (Fig. 18). El grupo I cuenta con dos miembros, Bradi1g22010 y Bradi1g44510 con una expresión positiva tanto en el ecotipo Bd21 y Bd2-3, con una abundancia (CPM) similar en inundación. Sin embargo, Bradi1g44510 está previamente inducido en control mientras que Bradi1g22010 está prácticamente ausente. Lo que nos sugiere que Bradi1g22010 puede estar actuando como isoenzima ante el estrés por inundación.

En Phytozome, este gen tiene la anotación de "B12D" que es una proteína que se hipotetiza como constituyente del Complejo I de la cadena de transporte de electrones (CTE, Anexo G). No obstante, cuando se hace un alineamiento T-Coffee utilizando a las proteínas B12D de *Arabidopsis* ([Subrahmanian et al., 2016](#)), no existe identidad significativa entre ellas (Anexo I). En la literatura de subunidades del Complejo I existe la confusión sobre si es B12D o B12, en ocasiones tratándose de proteínas de secuencias diferentes, pero tamaños similares y presencia en la CTE. [Balsa et al. \(2012\)](#) realizaron un estudio donde localizan a los homólogos de B12 de mamífero ya no en el C-I sino en el C-IV (citocromo C oxidasa) de la CTE y hacen un alineamiento y experimentos de localización para disipar la confusión entre ellos y le

denominan a las proteínas presentes en el C-IV como NDUFA4. El análisis de alineamiento y filogenia del gen Bradi1g22010 de *Brachypodium* que se analiza en esta sección indica que pertenece entonces a la familia de NDUFA4 del C-IV.

[He et al. \(2014\)](#) transformaron a arroz con una construcción constitutiva de lo que denominan "B12D" y observan que aumenta la tolerancia a la inundación durante la germinación. En su artículo lo discuten como miembro de C-I, pero al alinear la secuencia que ellos reportan con la de Bradi1g22010 se observa que son de la misma familia (Fig. 18). Afortunadamente, tanto C-I como C-IV pertenecen a la misma ruta bioquímica por lo que, sin importar la identificación de la proteína, los datos experimentales de [He et al. \(2014\)](#) apuntan a la gran importancia que tienen las proteínas NDUFA4 del C-IV en el mantenimiento de CTE. Del grupo II representado en la Fig. 18, Bradi1g52750 resulta ser insensible a la inundación al igual que Bradi1g44510.

7.5.2 Análisis de dominios con MEME Suite

Dado la evidencia encontrada a través del análisis con MEME suite para Bradi1g22010, las secuencias comparten el dominio rojo (1) representado en la Fig. 19, lo que resulta en un segmento transmembranal. A partir de esto lo que podría decirse que todas las secuencias podrían estar dentro de la membrana de la mitocondria, igual al gen LOC_Os7g41350 encontrado por [He et al. \(2014\)](#). El homólogo At3g29970 tanto en el árbol filogenético como el de [He et al. \(2016\)](#) representa un 5% de divergencia en las secuencias y una variación de solo dos o tres exones con un tamaño similar con variaciones en los fragmentos intrónicos (Fig.19). Aunque esto no precisa realmente la función real del gen. Todavía queda mucho por investigar para saber qué dominio es el responsable de darle actividad, así como la naturaleza bioquímica de Bradi1g22010.

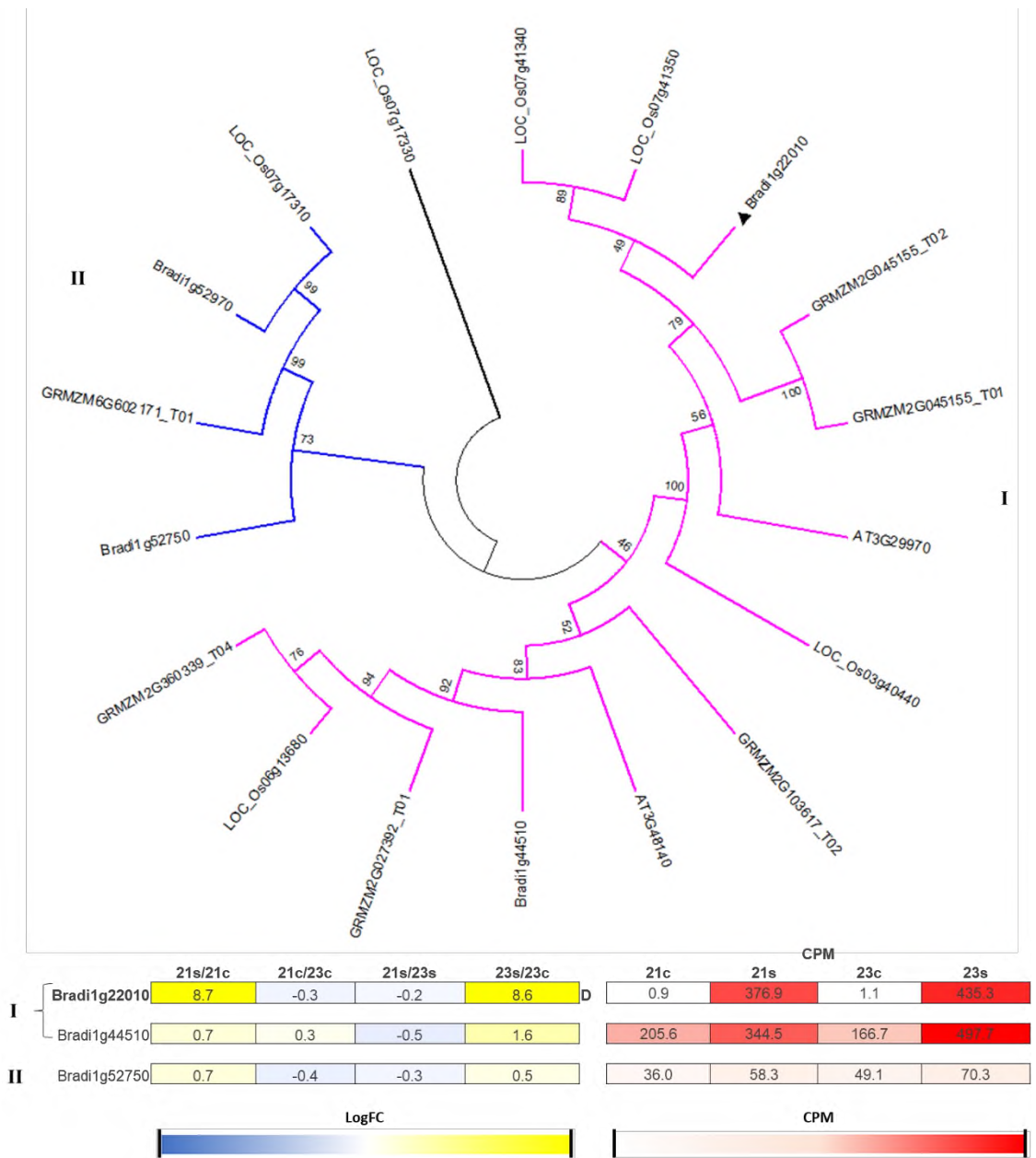


Figura 18. Árbol filogenético del gen Bradi1g22010 con sus respectivos perfiles de expresión en *Brachypodium distachyon* de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Las letras mayúsculas indican la 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 ($FDR < 0.05 \times 10^{-5}$; $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$ o ≤ -1.5). El color amarillo y azul indican los valores de Log_2FC , el rojo las cuentas por millón (CPM) respectivamente. Los números romanos indican el grupo en que se encuentran. En triángulo negro y el formato negritas señalan a nuestro gen.

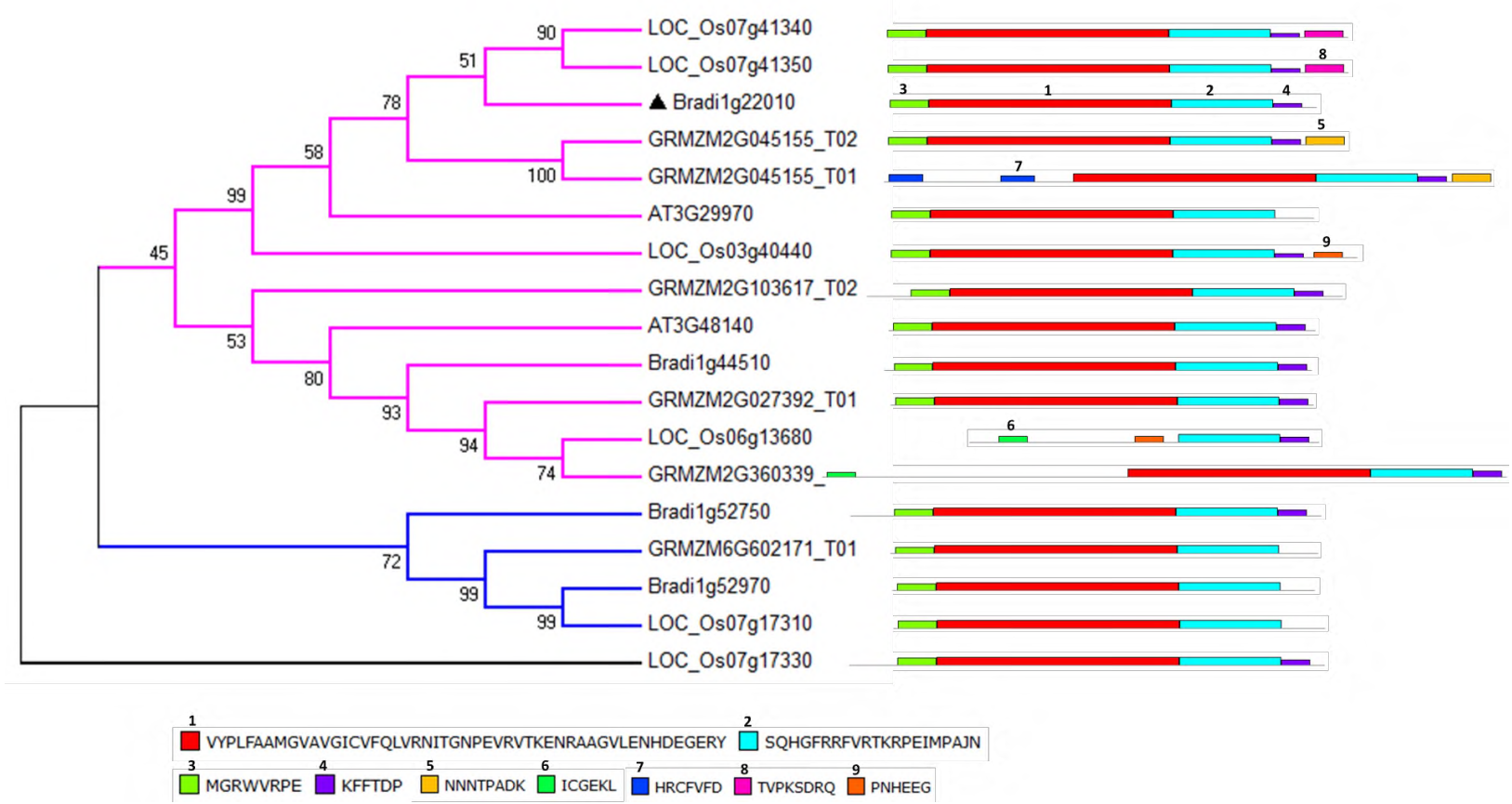


Figura 19. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.
 Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas.

7.5.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER

Se generó un modelo con la herramienta Protter para visualizar la posible disposición de los aminoácidos en una membrana contrastando con alguna evidencia experimental proteómica (Fig. 20). El resultado fue de una proteína transmembranal al igual que lo arrojado por el TMHMM (Anexo H) y concordó con lo encontrado en los alineamientos de [Balsa et al. \(2012\)](#).

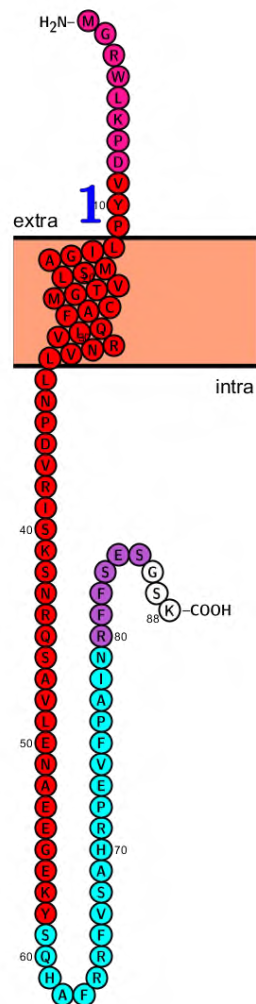


Figura 20. Proteoformas de Bradi1g22010 generada por Protter.

El color rojo indica la zona donde se encuentra el motivo de transmembrana, los otros colores representan los distintos dominios encontrados por MEME suite.

7.5.4 Visualización genómica con IGV

Para el análisis del gen Bradi1g22010 se puede observar que sólo se presenta en las condiciones de inundación (Bd21s y Bd2-3s), además de que corresponden los valores de expresión tanto de su 5'UTR, exón y 3'UTR con los que encuentran en Phytozome 12. Lo cual indica que Bradi1g22010 participa durante el estrés por inundación y que no posee isoformas de *splicing* (Figura 21).

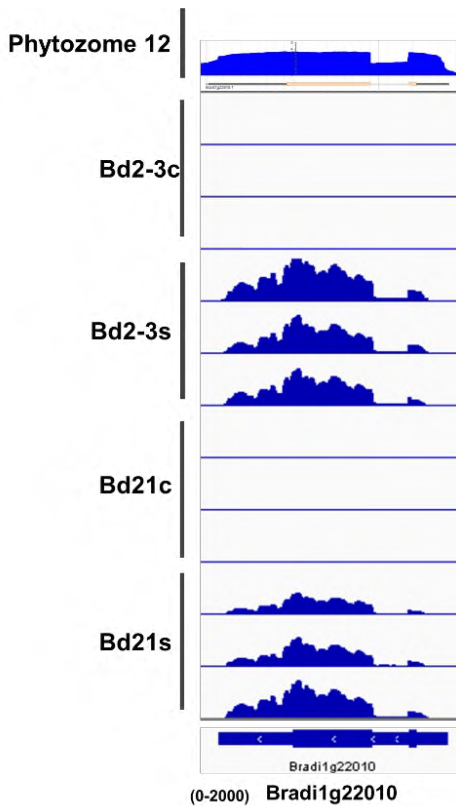


Figura 21. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi1g22010 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.

Visualización de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 tanto control (c) como inundado (s).

7.5.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi1g22010

El gen Bradi1g22010 solo tiene una línea de T-DNA, JJ7792 y al genotipificarse, las plantas recibidas resultaron ser silvestres (WT) al observarse sólo una banda aproximada de 972 pb (Fig. 22).

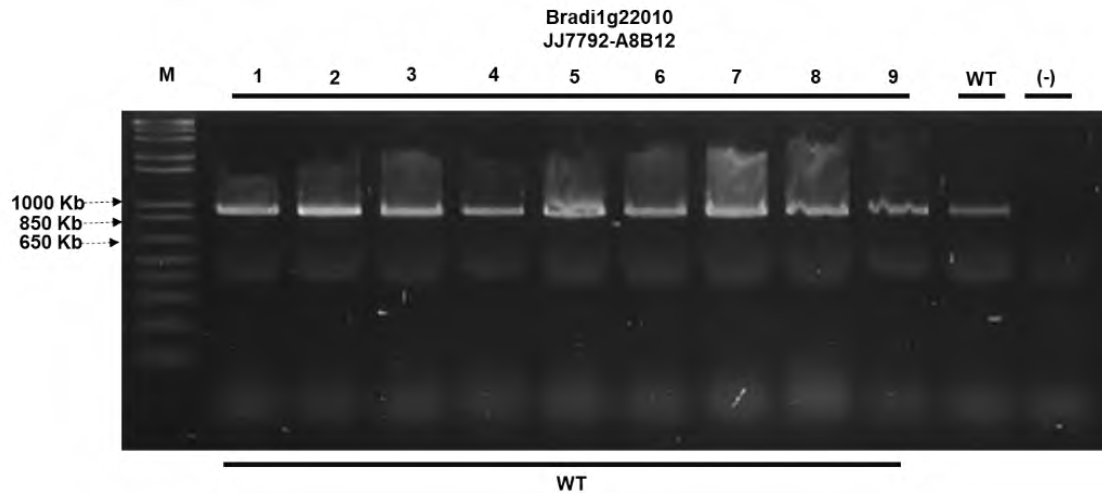


Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ7792 del gen Bradi1g22010 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 9 corresponden al total de individuos; el control silvestre Bd21-3 (WT) y negativo (-) ddH₂O, marcador de peso molecular (M) HypperLadder 50 pb. En la parte inferior se indica el resultado obtenido al cual WT corresponde a silvestre.

7.5.6 Modelo hipotético de la posible función de bradi1g22010

En análisis bioinformático nos dio la pauta para poder definir mediante alineamientos de secuencias proteicas que Bradi1g22010 podría estar participando la ruta bioquímica del transporte de electrones localizada en la mitocondria, pero no precisamente en el complejo I (Anexo G) como lo refiere Phytozome 12 como proteína B12D, si no como una proteína NDUFA4 como indica [Balsa et al. \(2012\)](#) en sus experimentos de alineamientos proteicos y separación de proteínas en los diferentes complejos de la CTE. Sin embargo el que no se encuentre la proteína B12 en el complejo I no afecta su probable importancia como isoenzima en la CTE. Este cambio trae consigo una nueva reestructuración del complejo IV para saber realmente su ubicación y función específica de NDUFA4, además de una redefinición sobre la anotación de Bradi1g22010.

7.6 Gen Bradi1g00210

El gen Bradi1g00210 está conformado por 11 exones, 10 intrones y un extremo 5'UTR. Su sitio en el genoma está entre 18453 y 21742 pb con dirección delantera. En la línea mutante, el gen cuenta con una inserción en el sitio 18612 y 18613 pb del gen, con una construcción del tipo activador pJJ2LBA. La anotación de Phytozome lo describe como una proteína WD40.

7.6.1 Filogenia y expresión del gen Bradi1g00210 relacionada a las proteínas WD40

En el árbol generado se agrupan nueve familias, Bradi1g00210 se encuentra en el grupo I. En cuanto a la expresión, Bradi1g00210 presenta una expresión de LogFC 9.2 en el ecotipo Bd21 sumergido, caso contrario al ecotipo Bd2-3 sumergido con una expresión negativa de -7.3. Otro miembro activo es Bradi4g21980 con una expresión positiva de 2.5. Los valores de CPM para ambos genes son bajos, Bradi1g00210 con 3.3 y Bradi4g21980 con 13.3 de máximos. Respecto a los demás grupos, los genes están apagados o en su mayoría, insensibles ante el estrés por inundación. En lo que respecta a los valores de CPM, algunos genes cuentan con valores elevados, por ejemplo, Bradi2g46840 con 186.2 (grupo IV; Fig. 23).

Las proteínas con repeticiones WD40 (WDR) prevalecen en eucariotas, pero rara vez en procariontas ([Stirnemann et al., 2010](#)), además de que en plantas como en *Arabidopsis*, *Oryza sativa* y *Setaria itálica* codifican más de 200 proteínas putativas que contienen el dominio WDR ([Ouyang et al., 2012](#)). Las proteínas que contiene el dominio WDR tienen como función básica de servir como soporte para aquellas interacciones proteína-proteína y proteína-DNA ([Miller et al., 2016](#)).

La estructura que presentan estas proteínas es una hélice β de 40-60 aminoácidos (residuos conservados GH y WD) con pliegues β laminar antiparalelas de cuatro cadenas ([Stirnemann et al., 2010](#)). Estos pliegues β laminar se disponen en el espacio de manera circular alrededor de un eje central tomando una forma toroidal de varias palas que pueden interaccionar molecularmente tanto en la parte inferior,

superior y circunferencial (Guerrero, *et al.*, 2015). Aun así, la identificación resulta difícil debido al bajo nivel en las secuencias conservadas y la gran diversidad en funcionalidad de los dominios WD40 (Gachomo *et al.*, 2014; Stirnimann *et al.*, 2010). El trabajo de las proteínas WD40 es dar un soporte rígido para aquellas interacciones tanto de proteínas como en otras partes celulares (Mishra *et al.*, 2012), ayudando al control de ciertas funciones vitales como las cascadas de señalización, el transporte celular y la apoptosis (Xu y Min 2011).

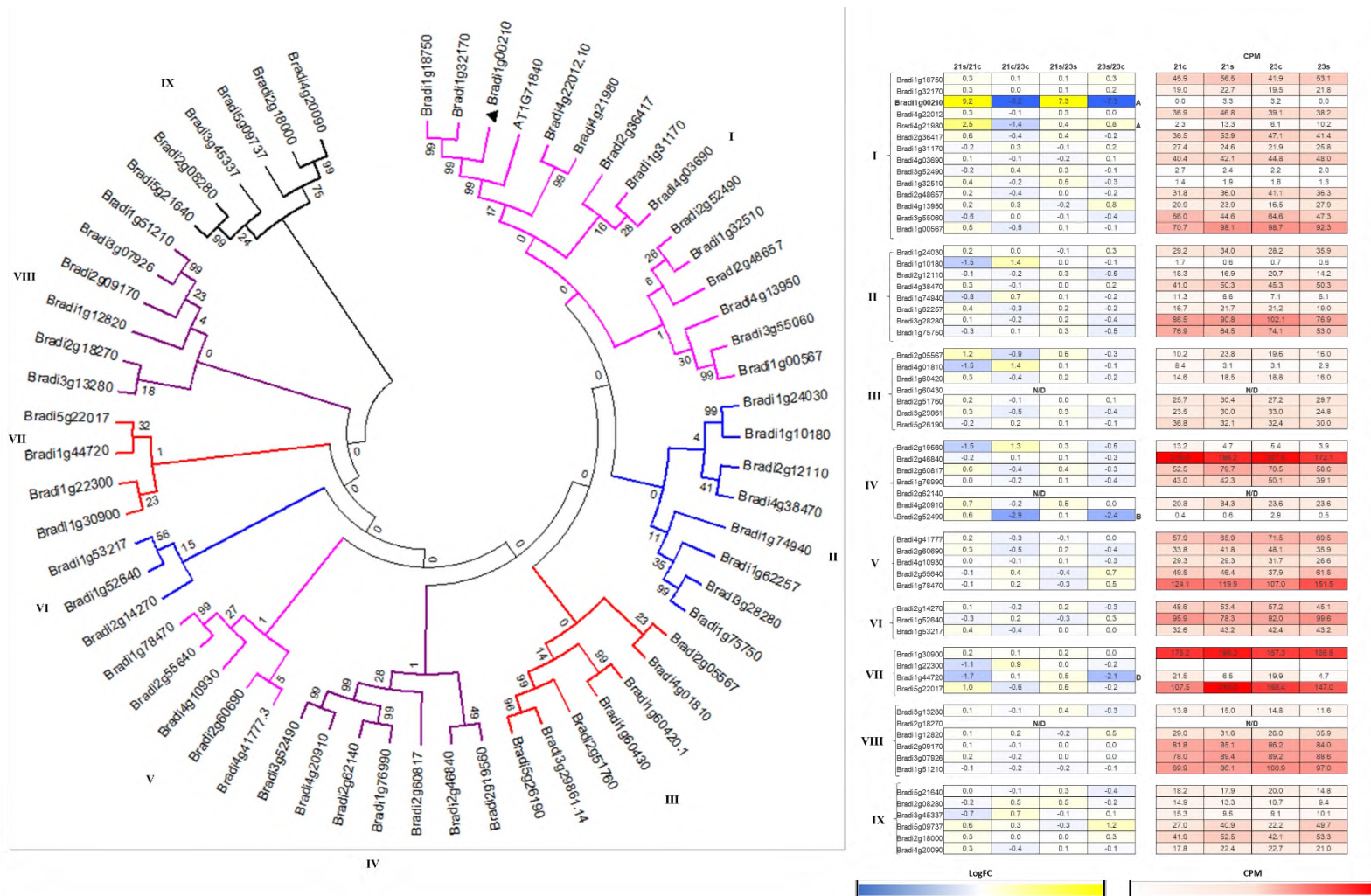


Figura 23. Árbol filogenético del gen *Bradi1g00210* con sus respectivos perfiles de expresión en *Brachypodium distachyon* de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Figura 23. Continúa. Las letras mayúsculas indican la 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}; $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$ o ≤ -1.5). El color amarillo y azul indican los valores de Log_2FC , el rojo las cuentas por millón (CPM) respectivamente. Los números romanos indican el grupo en que se encuentran. En triángulo negro y el formato negritas señalan a nuestro gen.

7.6.2 Análisis de dominios con MEME Suite

Los resultados obtenidos del análisis de dominios, mostró que Bradi1g00210 comparte los 3 dominios (1, 2 y 3) en los nueve grupos que conforma el árbol filogenético, en el cual se observa una gran variabilidad en el orden y secuencia, algo característico de la familia con dominios WD40 (Fig. 24; Anexo K).

7.6.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER

Para el análisis de Protter, se observa una proteína con un dominio intermembranal (Fig. 25). No obstante, esto no concuerda con el análisis de TMHMM donde no se predice algún dominio intermembranal (Anexo H). La base de datos UNIPROT proporciona una secuencia de 509 aminoácidos la cual no corresponde a los 404 aminoácidos que Phytozome 12 presenta en su base de datos. Con base en nuestros datos, se propone que existe un problema de anotación con el extremo 3', que se discute en la siguiente sección.

7.6.4 Visualización genómica con IGV

En el análisis del IGV el gen Bradi1g00210 se observa que en la condición de inundación (Bd21s) tiene casi el mismo patrón tanto en los intrones como en los exones de acuerdo a lo reportado por Phytozome 12, salvo el último intrón para el cual no hay señal ni en Phytozome ni en nuestra propia base de datos. Se observa (Fig. 26) que hay señal de expresión en Phytozome en el extremo 3'UTR, sin embargo, en nuestra base de datos no se observa esta señal, haciendo poco probable la existencia del dominio transmembranal que predice UNIPROT indicando que es una proteína soluble. La expresión concuerda con los LogFC diferenciales entre los dos ecotipos analizados molecularmente (Fig. 26).

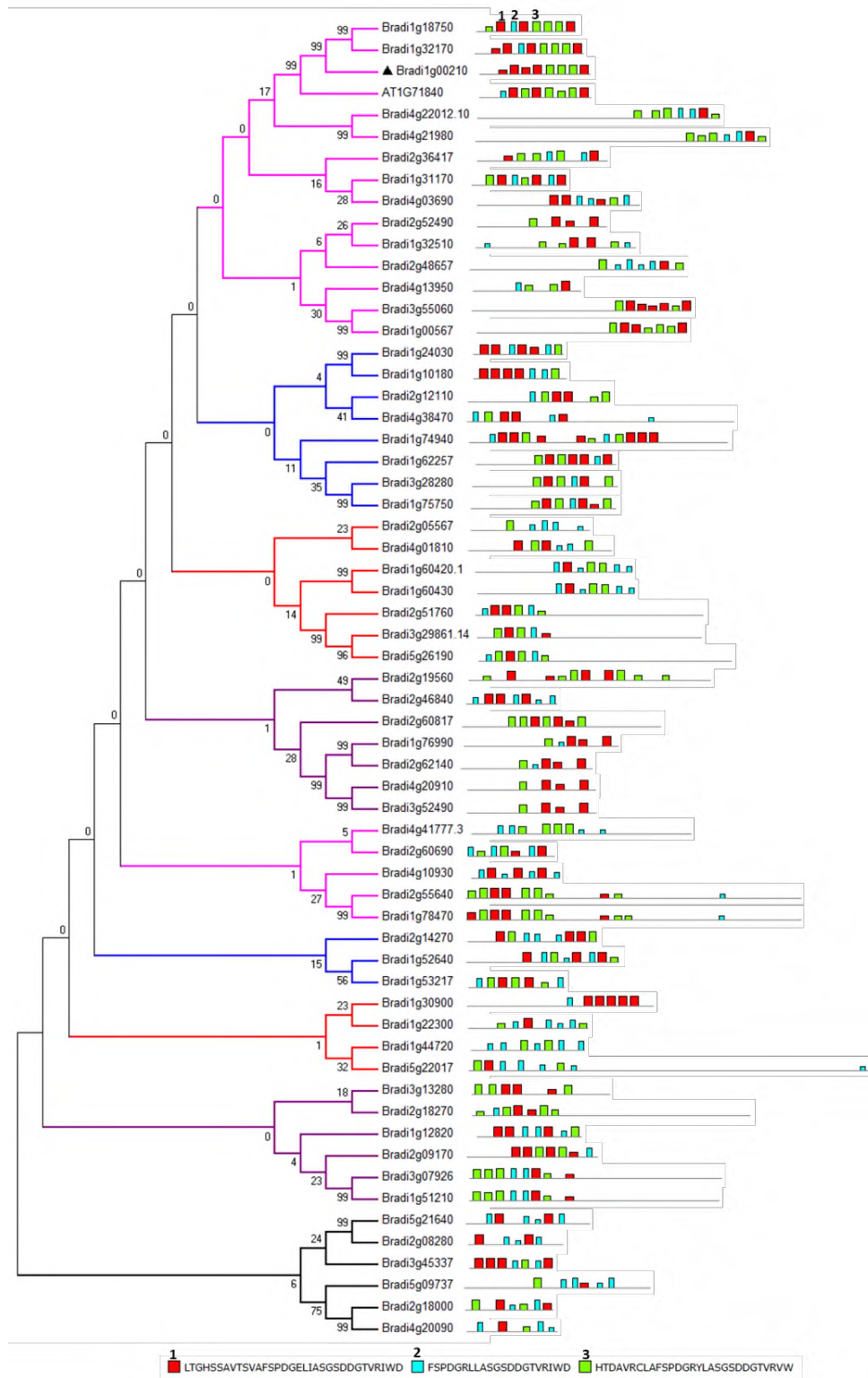


Figura 24. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.
 Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas.

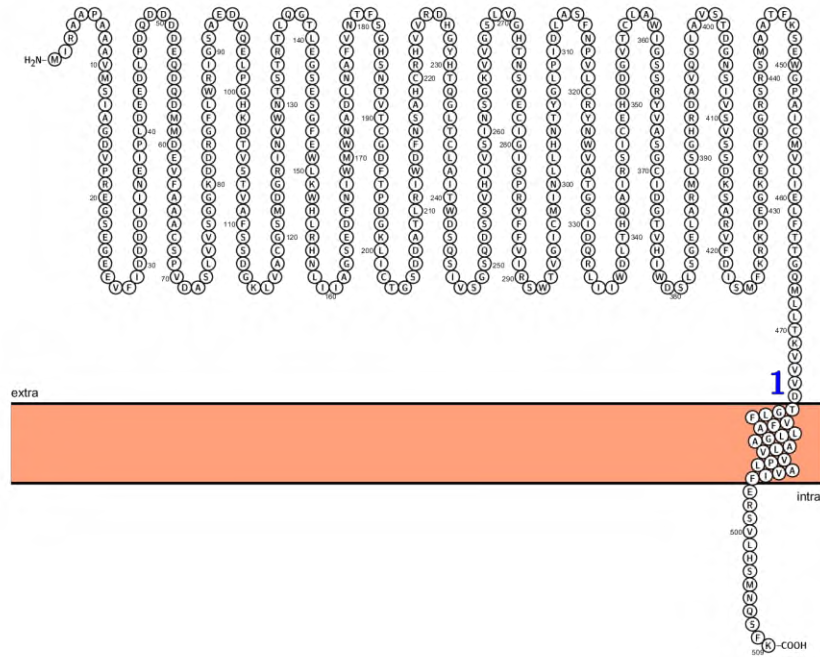


Figura 25. Modelo generado por el servidor Protter.

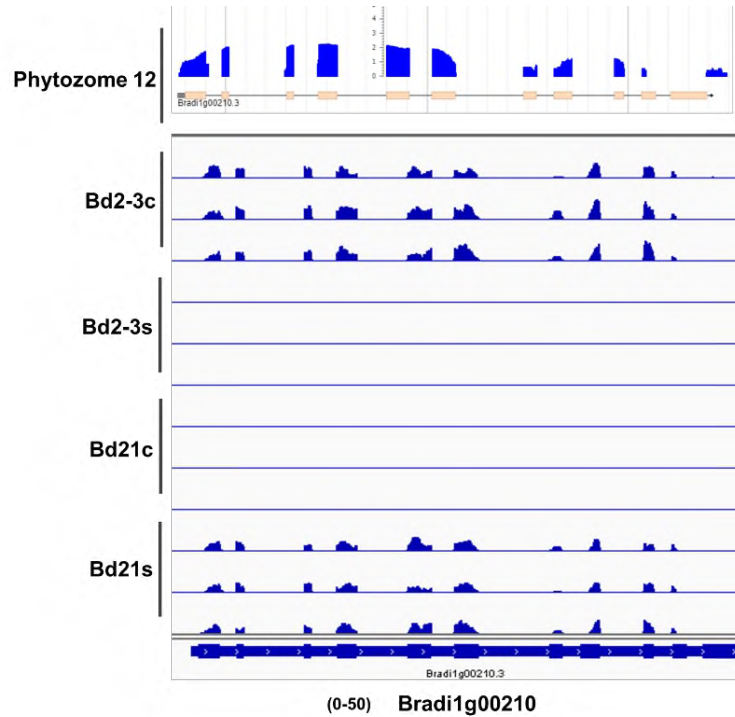


Figura 26. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi1g00210 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.

Visualización de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 tanto control (c) como inundado (s).

7.6.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi1g00210

En análisis de PCR para la línea JJ9855 (Bradi1g00210) conto sólo con una planta la cual resulto ser silvestre (1) ya que presentó una banda de 700 pb (Fig. 27).

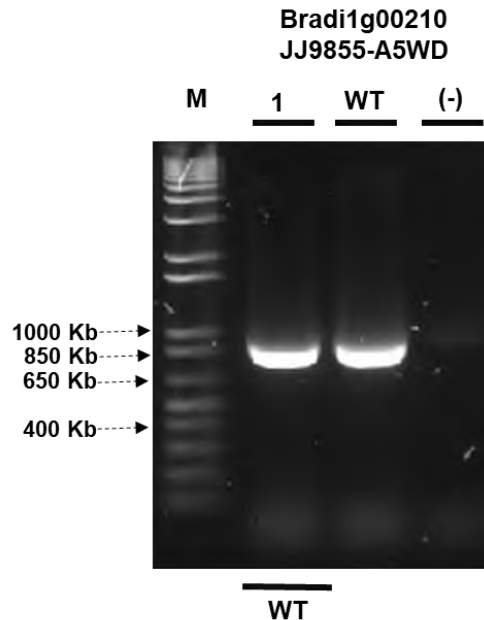


Figura 27. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ9855 del gen Bradi1g00210 de *Brachypodium*.

El numero 1 corresponden al total de individuos; el control silvestre Bd21-3 (WT) y negativo (-) ddH₂O, marcador de peso molecular (M) HypperLadder 50 pb. En la parte inferior se indica el resultado obtenido al cual WT corresponde a silvestre.

7.6.6 Modelo hipotético de la posible función de bradi1g00210

El análisis bioinformático nos dio la pauta para poder integrar a Bradi1g00210, de acuerdo a los alineamientos de secuencias proteicas, en una gran familia de las WDR. Es difícil precisar realmente la posible función que podría estar realizando, además de la inconsistencia en las secuencias proteicas obtenidas tanto de Phytozome 12 y como la obtención del código de la proteína en la UNIPROT para generar la proteoforma de Bradi1g00210. Es necesario diseñar experimentos de doble híbrido o inmunoprecipitaciones para poder encontrar las proteínas con las que interactúa este producto génico.

7.7 Gen Bradi5g02420

El gen Bradi5g02420 presenta dos intrones y un exón, se localiza en el genoma entre 2558941 y 2560479 pb. En la línea mutante, el gen cuenta con una inserción en la posición 2559675 y 2559676 pb en el gen, con una construcción del tipo activador pJJ2LBA. La anotación que maneja Phytozome es la de una retrotranscriptasa.

7.7.1 Filogenia y expresión del gen Bradi5g02420 relacionada a una retro transcriptasa

Con base en el árbol generado y representado en la Fig. 28 se desprenden 4 grupos dentro del cual Bradi5g02420 se encuentra en el grupo II, siendo el único activo con un LogFC de 11.9 y un CPM de 22.4. Los genes del grupo I y IV genes presentan insensibilidad ante el estrés por inundación excepto Bradi3g26650 que se expresa de manera negativa con un LogFC de -2.6. Algo interesante es que Bradi5g02420 se expresa diferencialmente entre genotipos de *Brachypodium*, siendo prevaeciente en el fenotipo sensible y con expresión negativa en el tolerante (Fig. 28).

Las transcriptasas inversas (RT)son un tipo de enzimas de ADN-polimerasa, la cual sintetiza ADN de doble cadena usando ARN como molde, la relación entre las RT pueden ser estructurales pero diferentes entre las enzimas del tipo RT; se cree que la gran mayor parte de las enzimas del tipo RT tiene su origen a partir de los retrotransposones o virus (Gladyshev y Arkhipova, 2011). Los retrotransposones LRT (LRT-TEs) son elementos genéticos móviles presentes en gran parte del genoma del huésped y particularmente son abundantes en genomas de plantas (Lisch, 2013). Están constituidos de fracciones de DNA que pueden moverse a través del genoma usando de intermediario al DNA (transposones de DNA) o un intermediario de RNA (retrotransposones) (Griffiths *et al.*, 2017), además pueden abarcar en *Arabidopsis* más del 14% del genoma (The Arabidopsis Genome Initiative., 2000) y más del 80% en maíz (Schnable *et al.*, 2009). Una vez activos los retrotransposones pueden aumentar un gran número de copias en el genoma del huésped, apareciendo mutaciones, inestabilidad genómica y cambios en la regulación de genes vecinos a las

nuevas inserciones ([Lisch, 2013](#)). Las nuevas inserciones de los retroelementos que presentan fenotipos constituyen una pequeña parte del número total de nuevas integraciones, no obstante, recientemente se ha determinado que son factores importantes en la evolución de las plantas al generar diversidad genética que puede ser estabilizada en el genoma al proveer de una ventaja evolutiva al huésped ([Galindo-Gonzalez et al., 2017](#); [Griffiths et al., 2017](#)).

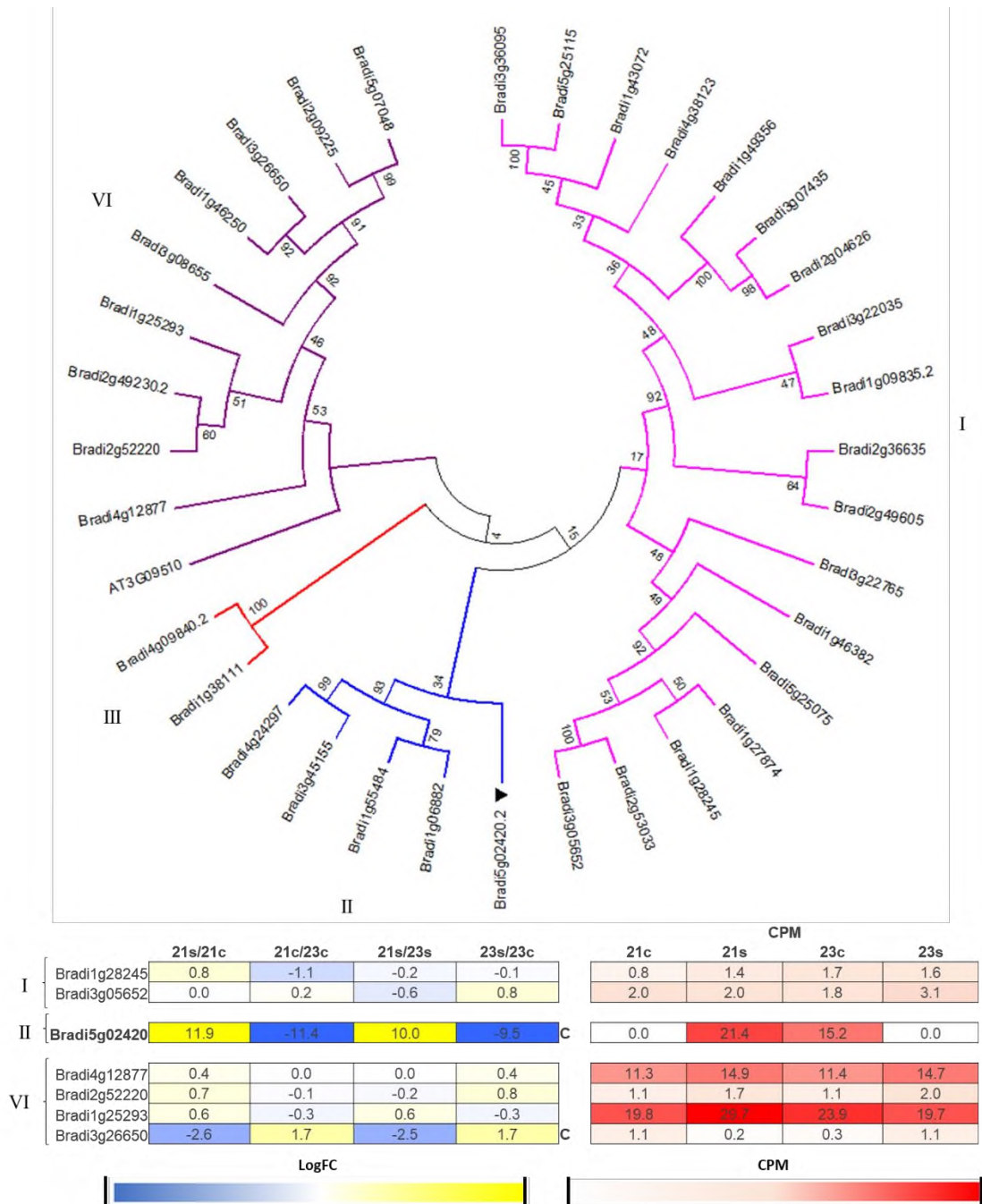


Figura 28. Árbol filogenético del gen *Bradi5g02420* con sus respectivos perfiles de expresión en *Brachypodium distachyon* de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Las letras mayúsculas indican la 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 amarillo y azul indican los valores de Log2FC, el rojo las cuentas por millón (CPM) respectivamente. Los números romanos indican el grupo en que se encuentran. En triángulo negro y el formato negritas señalan a nuestro gen.

7.7.2 Análisis de dominios con MEME Suite

El análisis de dominios demostró que Bradi5g02420 presenta 3 dominios (1, 2, y 3), del cual los comparte con todos los miembros del árbol filogenético. Aunque no todos presentan los tres dominios (1, 2 y 3) debido a la diversidad de secuencias (Fig. 29). El análisis del TMHMM nos indica que no es una proteína intermembranal (Anexo H).

7.7.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER

En el análisis de Protter, se muestra que es una proteína con un tamaño de 255 aminoácidos sin ningún dominio intermembranal. Además de que no se encontró algún dominio en específico para esta secuencia (Fig. 30).

7.7.4 Visualización genómica con IGV

Para el análisis del gen Bradi5g02420 se observa la expresión en la condición de inundación para Bd21 (Bd21s) y, pero no Bd2-3 (Bd2-3c), lo que sugiere que en Bd21 es importante para el estrés en inundación y para Bd2-3 podría estar actuando de manera constitutiva en condiciones normales. En cuanto a la estructura del mensajero, se observa un patrón muy diferente al reportado por Phytozome 12, ya que no corresponden las regiones tanto de sus exones e intrones, lo que sugiere que hay una variante predominante de este gen adicional a la reportada por Phytozome 12 (Fig. 31). La reconstrucción de esta variante indica que podría ser un retrotransposón (Anexo L), además de realizar un Blast genómico para realizar la comparación entre secuencias y ver aquellas regiones que pudiera estar compartiendo (Anexo M).

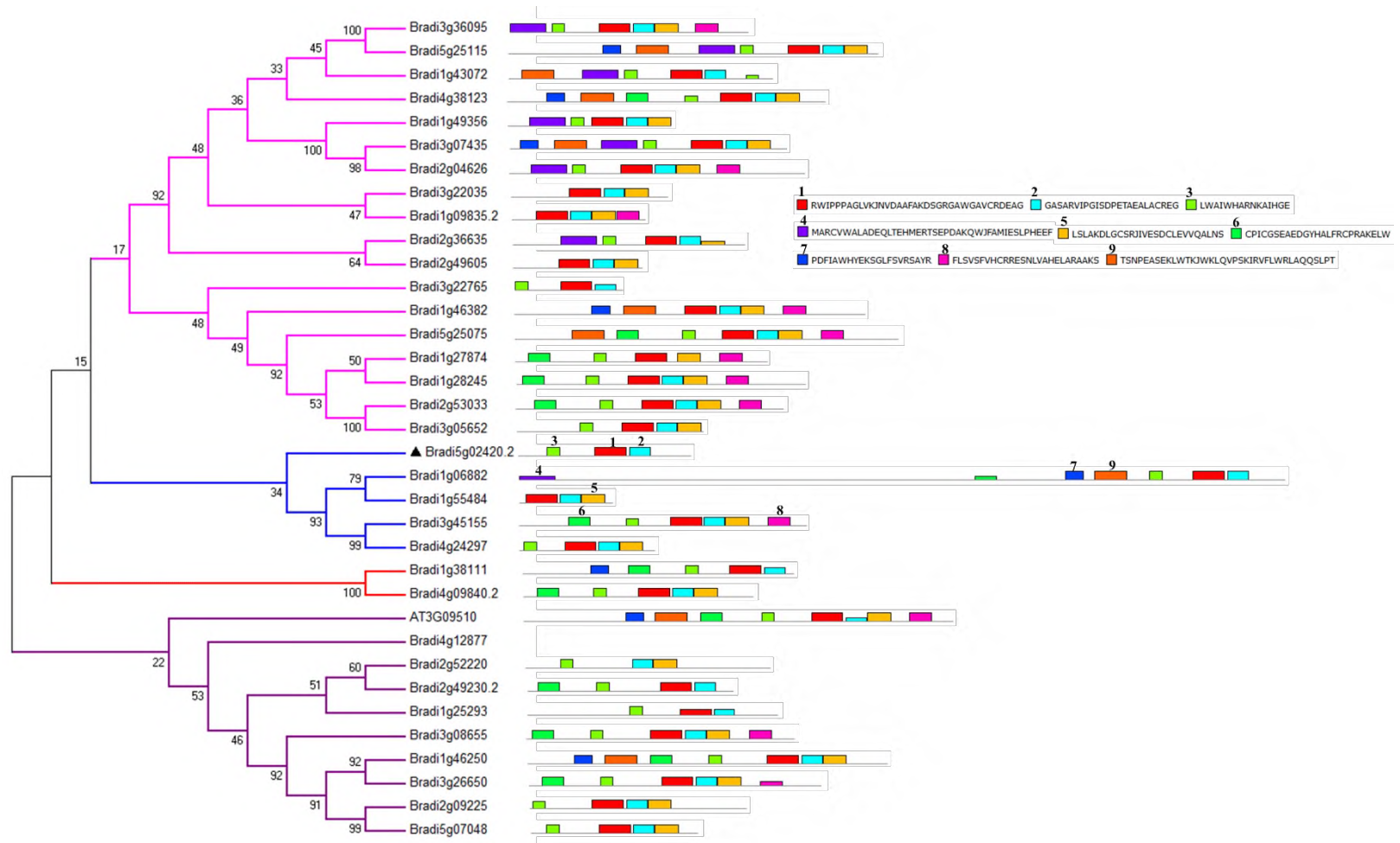


Figura 29. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.
 Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas.

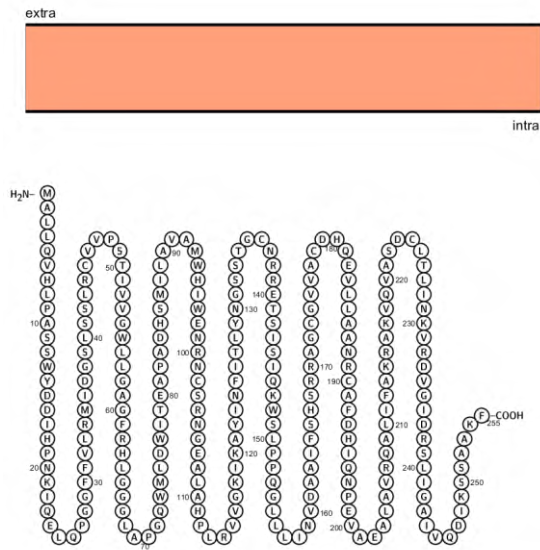


Figura 30. Modelo generado por el servidor Protter.

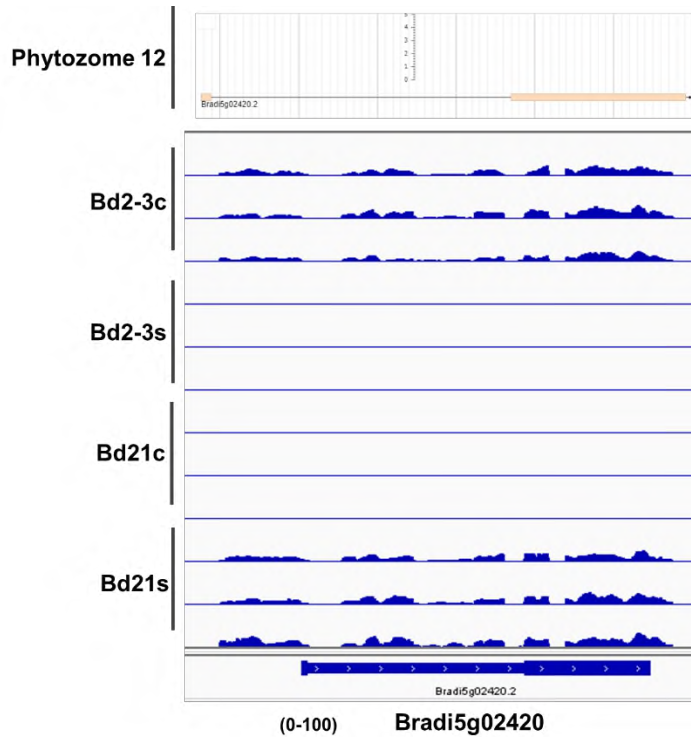


Figura 31. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi5g02420 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.

Visualización de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 tanto control (c) como inundado (s).

7.7.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi5g02420

La línea JJ16414 (Bradi5g02420) tuvo 10 plantas germinadas, una homocigota (Hm) que presento una banda 700 pb, 7 heterocigotas (Ht) con la presencia de dos bandas; una de 800 pb y otra de 700 pb, y 2 silvestres (WT) con una banda de 800 pb (Fig. 32).

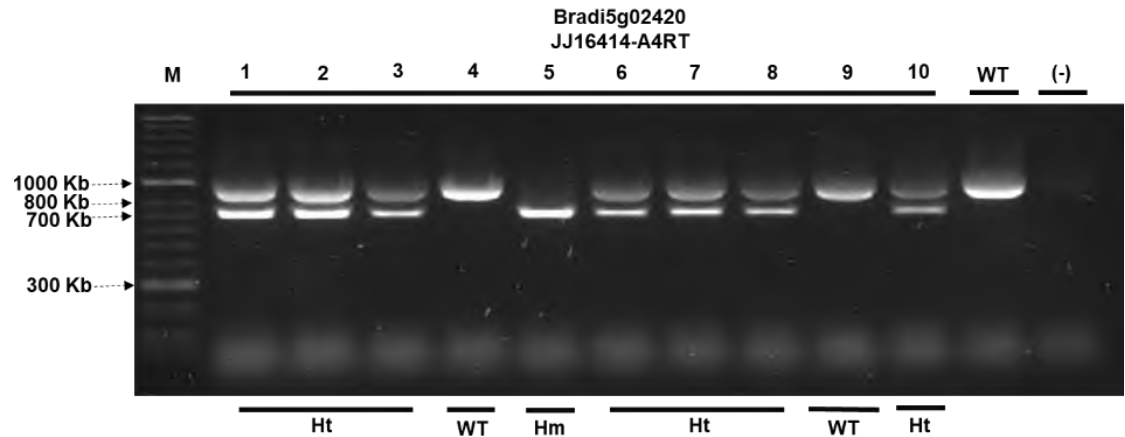


Figura 32. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ16414 del gen Bradi5g02420 de Brachypodium.

Los números del 1 al 10 corresponden al total de individuos; control silvestre Bd21-3 (WT) y negativo (-) ddH₂O, marcador de peso molecular (M) HypperLadder 50 pb. En la parte inferior se indica el resultado obtenido al cual WT corresponde a silvestre.

7.7.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi5g02420

Debido a que los retrotransposones son elementos móviles, no podrían tener un lugar en específico en su localización celular, pero si encontrarse en el genoma replicándose o insertándose en secuencias vecinas, dando lugar a mutaciones parciales o totales de las secuencias codificantes dotándole de nuevas características que podrían no presentarse de forma inmediata, presentarse después de ciertas generaciones, o simplemente no presentarse. No obstante, al ser una secuencia móvil, podría estar expresándose de manera positiva ante un evento como la inundación con el objetivo de inducir la modificación, expresión o represión de genes que son esenciales ante los eventos por estrés (Ito *et al.*, 2016; Grandbastien, 2015), pero no

con miras a un objetivo inmediato, sino para crear diversidad genética para que una generación subsecuente, pueda tolerar mejor el estrés.

No obstante, este objetivo es de muy largo plazo, lo que ha hecho que se investigue si la inducción característica de retrotransposones durante el estrés, que se ha visto en muchas especies, pueda tener un objetivo más útil en el corto plazo. [Cho y Paszkowski \(2017\)](#) demostraron recientemente que la inducción de retrotransposones puede funcionar como una "esponja" de miRNA, donde el transcrito del transposón actúa como un blanco espurio del miRNA para que sus blancos verdaderos (factores de transcripción), no se degraden y puedan mantener una función durante el estrés (Fig. 33).

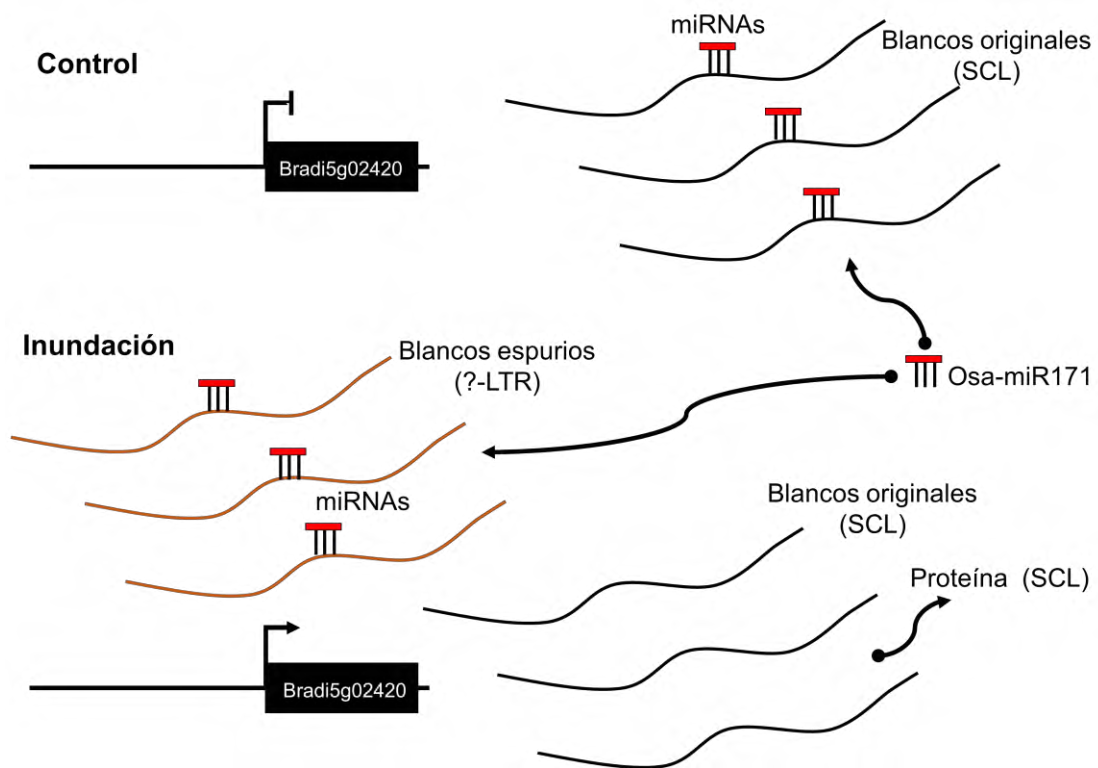


Figura 33. Modelo hipotético del papel de retrotranscriptasa Bradi5g02420 (LTR) en inundación.

En condición control LTR no se expresa y el miRNA degrada a los factores de transcripción SCL. En la inundación Bradi5g02420 se expresa y atrae a los miRNAs para liberar del control postranscripcional a los FTs SCL (Con base en Cho y Paszkowski, 2017).

7.8 Gen Bradi2g33110

Bradi2g33110 está conformado por 4 exones, 3 intrones además de su 5' y 3' UTR. Se localiza en el genoma entre 32911898 y 32915886 pares bases con dirección reversa. En la línea mutante, la inserción está en la posición 32915604 y 32915605 pares bases dentro del gen, con una construcción tipo pJJ2LBA como potenciadores de la transcripción. En la anotación que menciona Phytozome es la de actividad de transporte transmembranal del ion zinc.

7.8.1 Filogenia y expresión del gen Bradi2g33110 relacionada a una familia transportadora de metales

Para el análisis se generó la filogenia (Fig. 34) y se separó a las secuencias en dos grupos (I y II), donde Bradi2g33110 aparece en el grupo I con siete miembros más. Respecto a sus LogFC Bradi2g22520 (5.1), Bradi3g17900 (1.2) y Bradi2g33110 (1.6) son los genes con expresión positiva durante la inundación, caso contrario de Bradi5g21580 (-7.4). Bradi2g22530, Bradi1g53680 y Bradi1g12860 son no detectables (N/D). En el grupo II, sus miembros aparecen como insensibles al estrés por inundación y uno como no detectable. Dentro de los genes con mayor abundancia (CPM) corresponde a Bradi1g60110 (131.2), Bradi3g17900 (53.4) y Bradi2g33110 (56.2) (Fig. 34).

La anotación de Phytozome es la de "Transportador de membrana del ion zinc" lo que se hipotetiza que podría estar en la membrana plasmática o en la vacuola, además de encontrarse en una familia de homólogos en *Brachypodium* de transportadores del ion zinc, teniendo una mayor certeza de la actividad de Bradi2g33110 con el alineamiento T-Coffee, observando el domino que presentan los transportadores de zinc en este caso el grupo I del árbol filogenético (Fig. 35).

Se cree que la absorción del ion zinc está mediada por transportadores membranales de metal tipo ZIP (ZRT/IRT), dichas proteínas se localizan en la raíz de la membrana plasmática del xilema, donde ocurre el flujo del zinc (o de otros metales tóxicos como cadmio) hacia el xilema (Papierniak *et al.*, 2018). La absorción del ion

zinc es un mecanismo fisiológico complejo por agentes transportadores y quelantes de metales en el sistema de la planta (Gupta *et al.*, 2016). Esto se debe a que el zinc es un metal que no se difunde a través de la membrana celular, y requiere de ayuda específica para transportarlo al citoplasma.

En los últimos años, se han identificado varios tipos de transportadores de metales en plantas como la familia ATPasa P_{1B}, transportadores regulados por zinc (ZRT), transportadores regulados por hierro (IRT), proteína macrófago-asociada a la resistencia natural (NRAMP) y facilitadores de difusión de cationes (CDF) (Colangelo y Guerinot, 2006). Li *et al.* (2013) identificaron a nueve genes que codifican proteínas ZIP en el genoma del maíz, donde se reveló que dichas proteínas ZmZIP comparten un dominio transmembranal y una región variable entre TM-3 y TM-4. En Bradi2g33110 pude encontrar un número similar de motivos transmembranales y un sitio de unión a metales (Fig. 35).

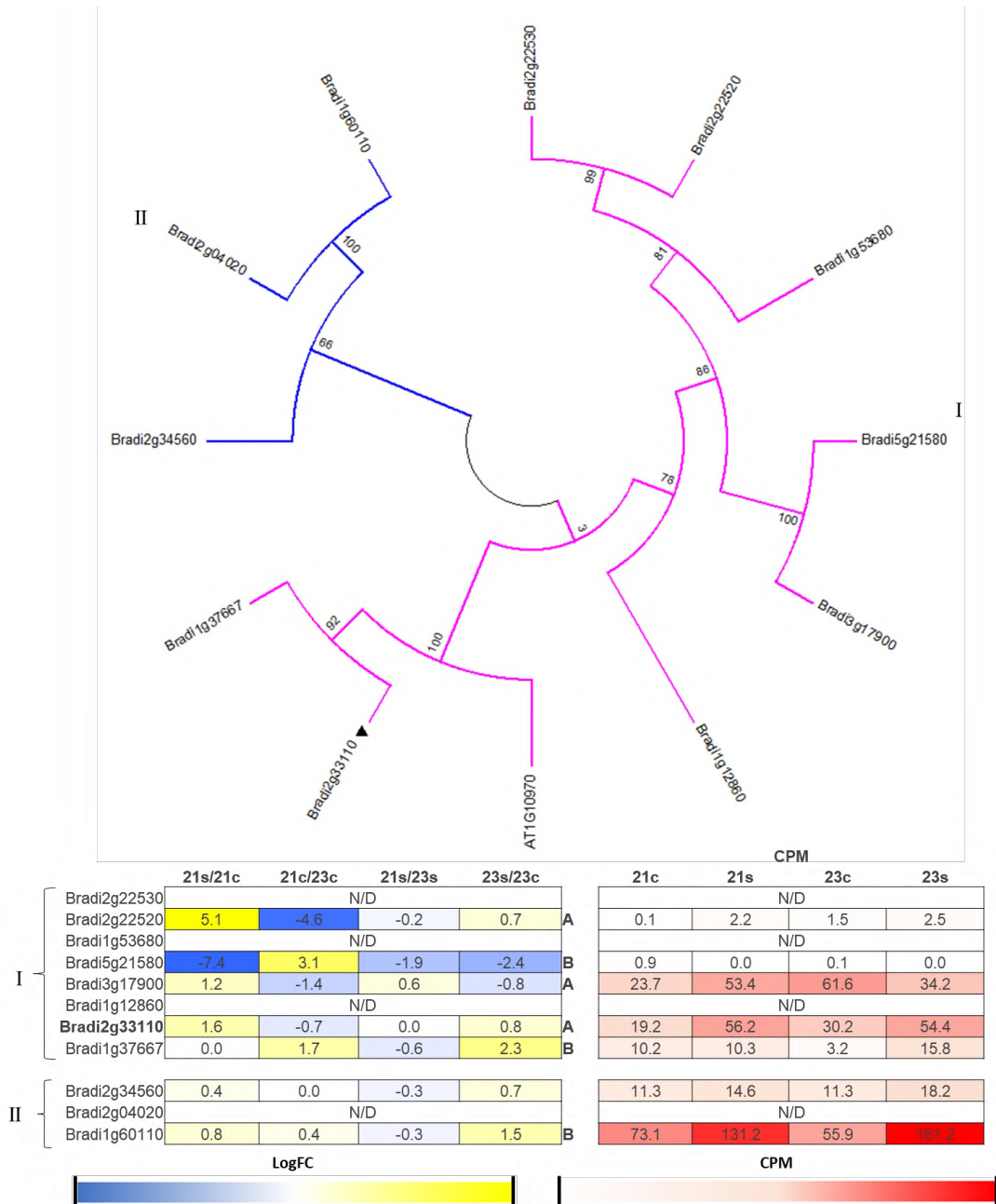


Figura 34. Árbol filogenético del gen Bradi2g33110 con sus respectivos perfiles de expresión en *Brachypodium distachyon* de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Las letras mayúsculas indican la 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 amarillo y azul indican los valores de Log₂FC, el rojo las cuentas por millón (CPM) respectivamente. Los números romanos indican el grupo en que se encuentran. En triángulo negro y el formato negritas señalan a nuestro gen.

7.8.2 Análisis de dominios con MEME Suite

Los resultados obtenidos del análisis de dominios, arrojó que Bradi2g33110 comparte todos los dominios del grupo I, con excepción de Bradi3g17900 que no presenta el dominio 4. El segundo grupo tampoco comparte todos los dominios. El análisis TMHMM (Anexo H) dio el resultado de una proteína transmembranal con 6 dominios a los que puede corresponder a los identificados por MEME (Fig. 35). Además de que no todas las secuencias comparten el dominio 8 que es donde se encuentra el dominio a unión a metales.

7.8.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER

Para el análisis de Protter, se observa una proteína transmembranal de un tamaño de 388 aminoácidos con seis dominios transmembranales, además de una región variable de unión a metal que se localiza entre los dominios tres y cuatro. Las regiones amino y carboxilo se localizan en la superficie externa de la membrana plasmática. La región variable contiene un dominio potencial a unión a metales rico en aminoácidos de histidina (H) conservados. El alineamiento T-Coffee nos deja ver la región variable en los diferentes genes comparados con Bradi2g33110 donde todas las secuencias presentan esta pequeña región de menor a mayor grado de similitud (Fig. 36).

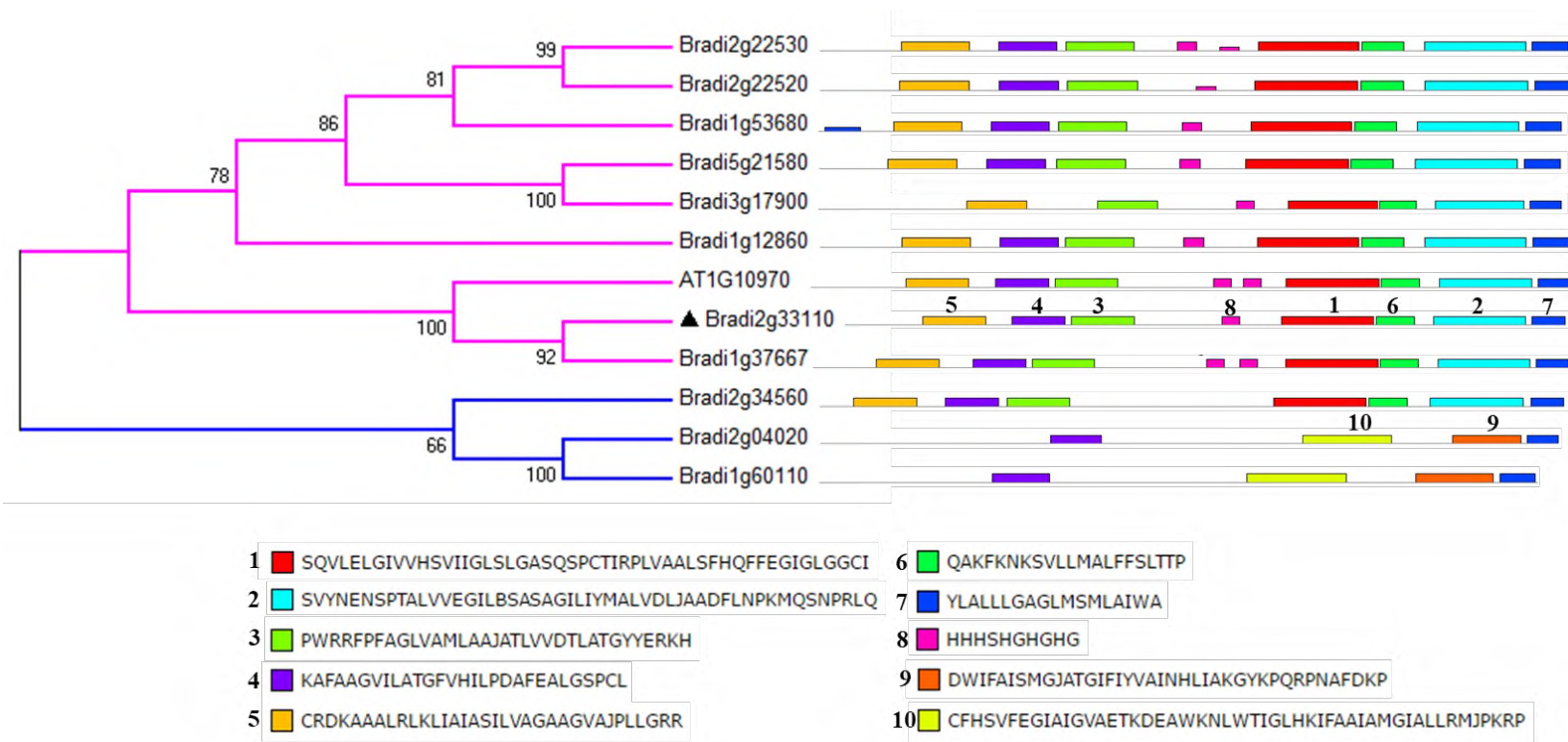


Figura 35. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.
 Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas.

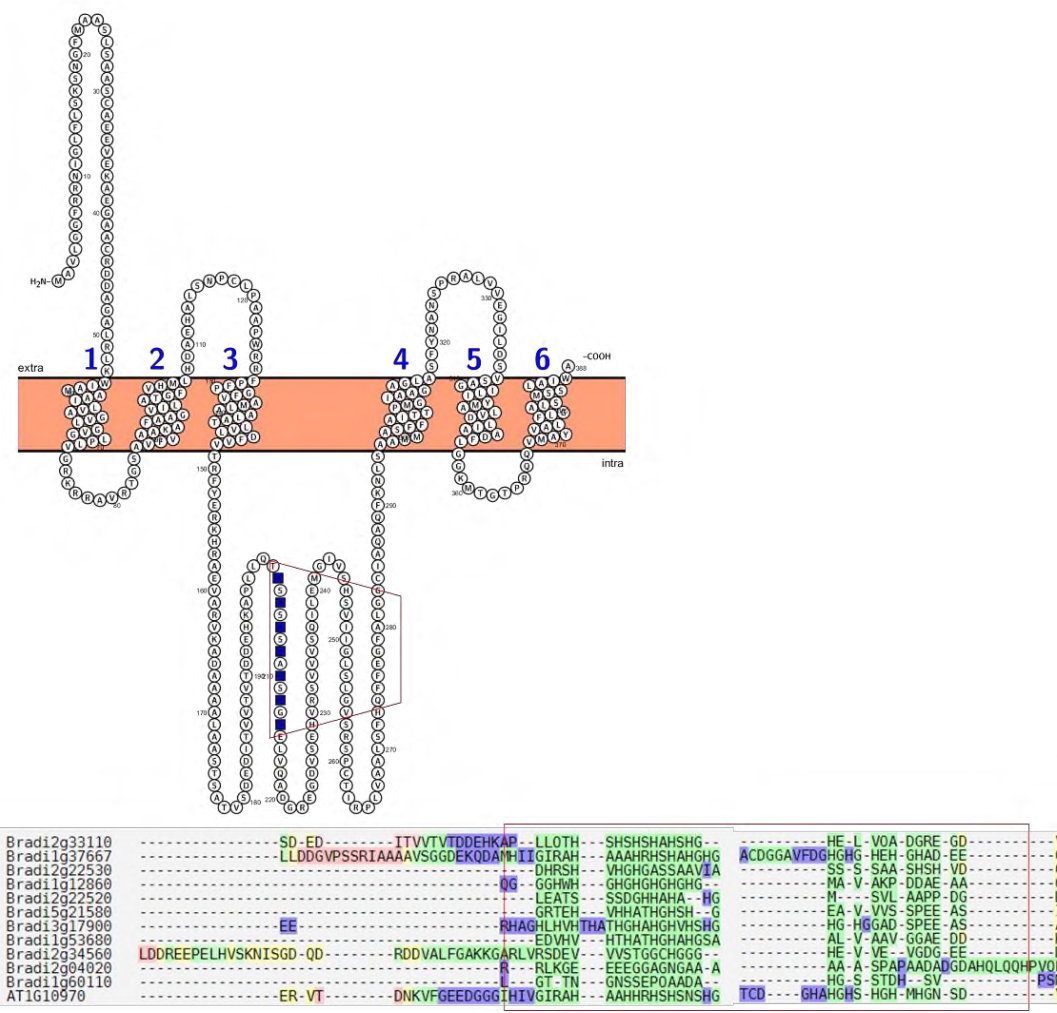


Figura 36. Modelo generado por el servidor Protter y su alineamiento realizado por T-Coffee.
 Las zonas dentro de los cuadros rojos del Protter indican los dominios a unión a metal (HxHxHxH) de Bradi2g33110.

7.8.4 Visualización genómica con IGV

Para el análisis del gen Bradi2g33110 se puede observar que existe una expresión en todas las condiciones (Bd2-3c, Bd2-3s, Bd21c y Bd21s) pero que aumenta en las condiciones inundadas. El patrón de expresión coincide con el patrón reportado por Phytozome 12, salvo que hay dos intrones pequeños indicados de manera teórica pero que no se observan en la base de datos experimental. Esto nos indica que Bradi2g33110 puede estar de manera constitutiva en condiciones normales y aumentar su expresión en condiciones de estrés por inundación (Fig. 37).

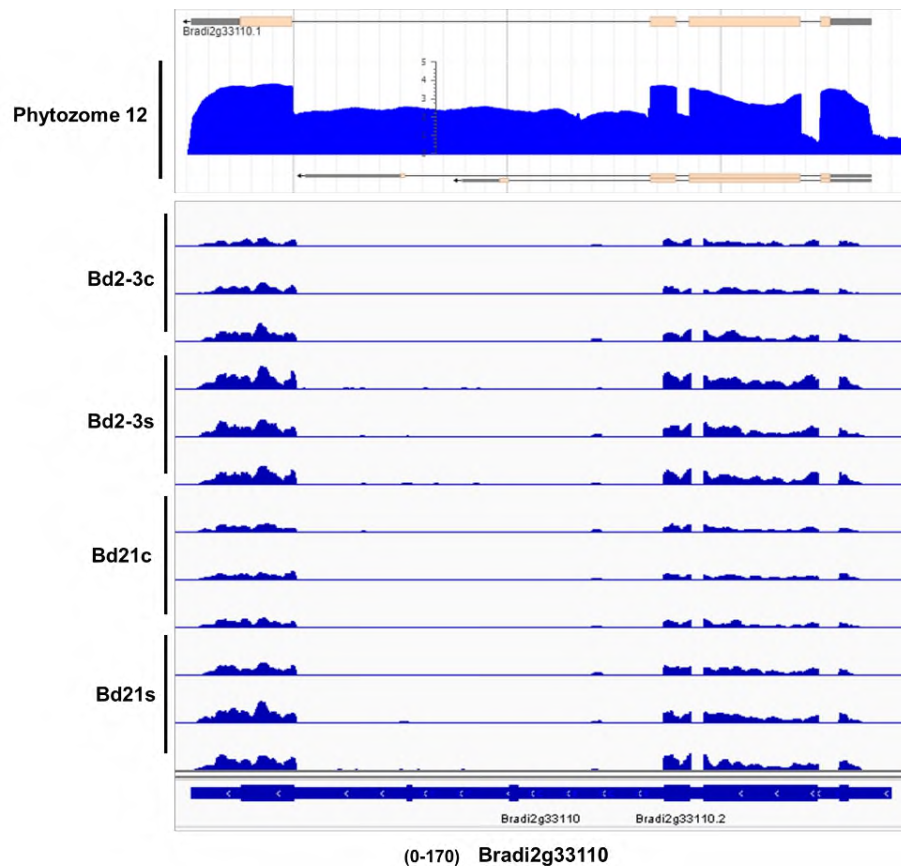


Figura 37. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi2g33110 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.

Visualización de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 tanto control (c) como inundado (s).

7.8.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi2g33110

En la verificación de la línea de T-DNA JJ20631 (Bradi2g33110) se probaron 6 plantas, donde el primer ensayo se colocaron las 3 últimas, la cual resultó silvestre la planta 4 con una banda de 742 pb y homocigotas 5 y 6 con una banda de 495 pb (Fig. 38).

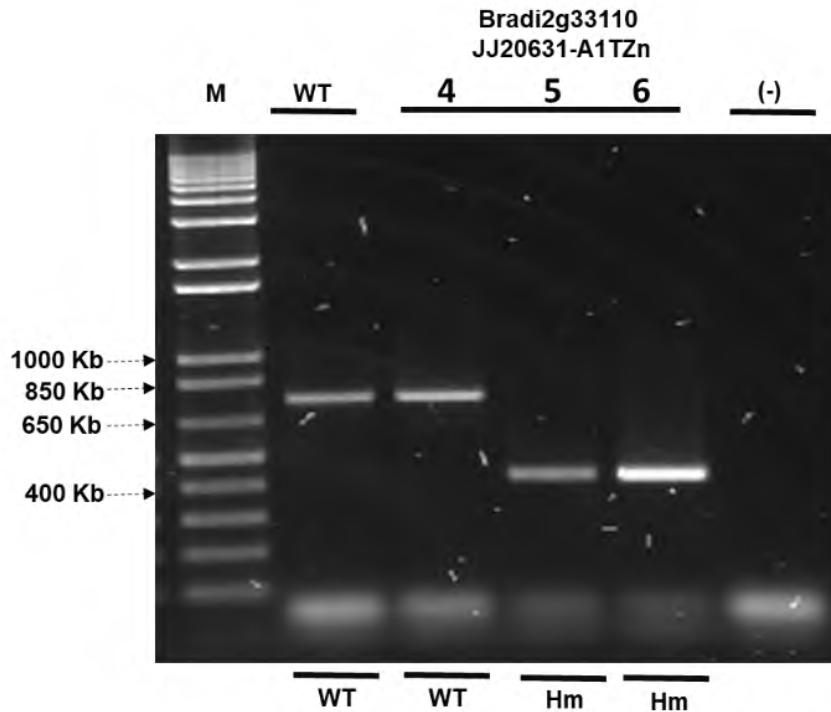


Figura 38. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ20631 del gen Bradi2g33110 de *Brachypodium*.

Los números del 4 al 6 corresponden al total de individuos; control silvestre Bd21-3 (WT) y negativo (-) ddH₂O, marcador de peso molecular (M) HyperLadder 50 pb. En la parte inferior se indica el resultado obtenido al cual WT corresponde a silvestre.

Para el segundo ensayo en la verificación nos dio como resultado que la planta 1 resultó silvestre (WT) con una banda de 742 pb, la planta 2 resultó ser homocigota (Hm) con una banda de 495 pb y la planta numero 3 salió heterocigota (Ht) con dos bandas una de 742 y la otra de 495 pb (Fig. 39).

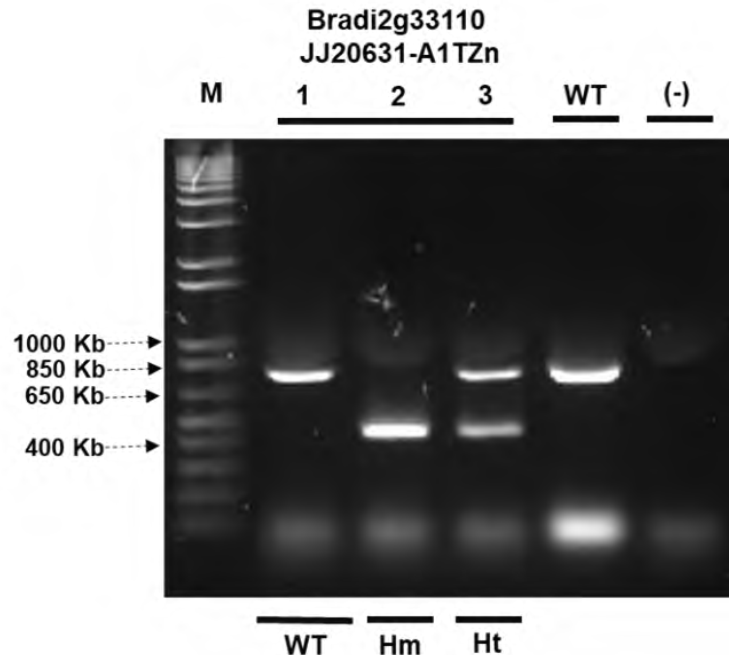


Figura 39. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ20631 del gen Bradi2g33110 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 10 corresponden al total de individuos; control silvestre Bd21-3 (WT) y negativo (-) ddH₂O, marcador de peso molecular (M) HypperLadder 50 pb. En la parte inferior se indica el resultado obtenido al cual WT corresponde a silvestre.

7.8.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi2g33110

El modelo hipotético de la localización celular y acción de Bradi2g33110 es la de una proteína transportadora del ion zinc de la familia de proteínas ZIP. La literatura sobre el estrés por inundación lo identifica como un estrés compuesto, donde la hipoxia ha recibido la mayor atención (Bailey-Serres *et al.*, 2012). No obstante, se reconoce que tiene otros componentes como bajas concentraciones de CO₂, acumulación de patógenos, estrés por baja intensidad de luz y mayor disponibilidad de metales (Mn, Fe, Al) y otros iones (Na, B) para la planta. Precisamente de este último componente del estrés existe muy poca información, sólo Setter *et al.*, (2009) demostraron que algunas variedades de trigo acumulan iones y metales en inundación mientras que otras los excluyen indicando diferencias genéticas de homeostasis. El gen Bradi2g33110 al identificarse como un gen de la familia de homeostasis de Zn, podría

estar involucrado en estos procesos de amortiguamiento de daño por mayor disponibilidad de metales.

Estudios realizados por [Guerinot \(2000\)](#), [López-Millan *et al.* \(2004\)](#), [Li *et al.* \(2013\)](#) y [Vatansever *et al.* \(2015\)](#) reportan que las proteínas ZIP tienen una topología parecida con 8 dominios, una región variable (HxHxHxH) citoplasmática entre los dominios 3 y 4, con un dominio potencial rico en histidina a unión a metales. [Vatansever *et al.* \(2015\)](#) en su reporte construye una filogenia confirmando las anteriores observaciones y extendiéndolas a *Brachypodium*. Cuando se compara la filogenia aquí reportada y la búsqueda de dominios, se llega a la misma conclusión donde Bradi2g33110 pertenece a una familia ZIP de transportadores de metales además de que podría estar actuando como su homólogo en *Arabidopsis* el AtZIP4 en la célula. En esta tesis, esto se complementó con el análisis de la expresión digital que indicó a tres miembros de la familia expresándose positivamente (Fig. 40).

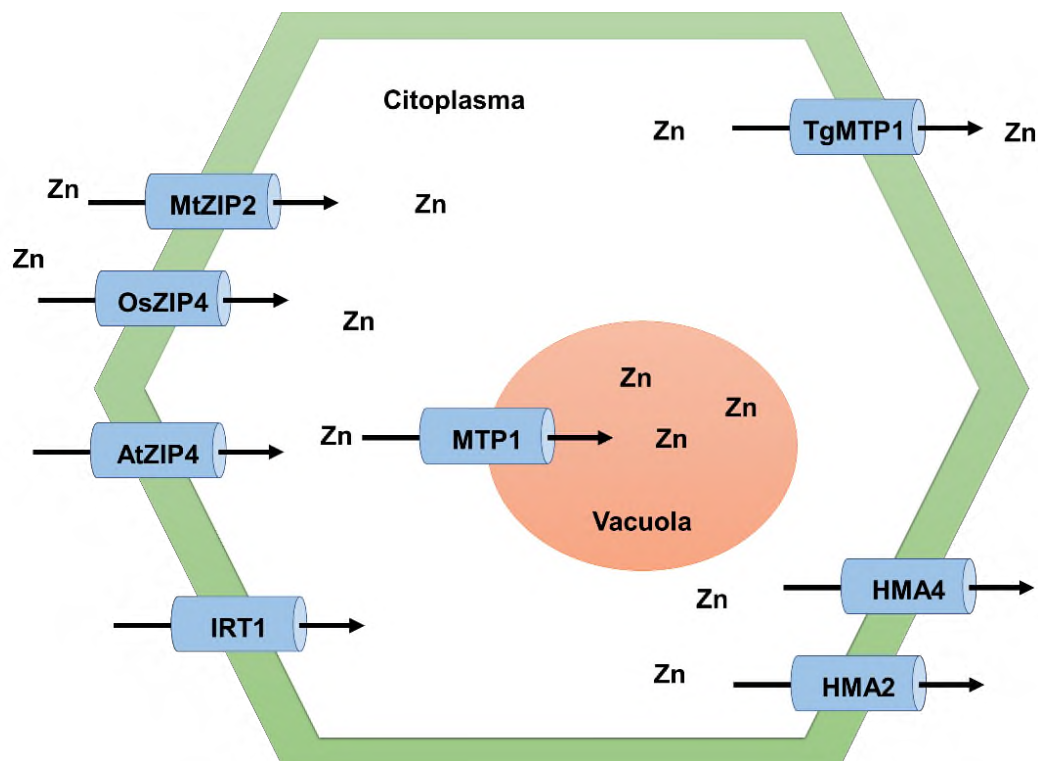


Figura 40. Modelo hipotético de la ubicación del transporte de zinc de Bradi2g33110. Diferentes transportadores del ion zinc ubicados en diferentes lugares de la célula vegetal en el cual Bradi2g33110 podría estar actuando en la membrana citoplasmática, así como su homólogo AtZIP4.

7.9 Gen Bradi3g27550

El gen bradi3g27550 lo conforman 4 exones, 3 intrones y sus extremos 5'UTR y 3'UTR. Su localización se encuentra a 28304882 y 28306672 pb. En la línea mutante, la inserción está en la posición 28305114 y 28305115 pares bases del gen, con una construcción tipo potenciador pJJ2LB. La anotación en Phytozome la describe como proteína transportadora de cobre.

7.9.1 Filogenia y expresión del gen Bradi3g27550 asociado al transporte del ion cobre

En la generación del árbol filogenético se desprenden cuatro grupos del cual el grupo I se subdivide en dos (A y B) donde Bradi3g27550 se localiza en el grupo I-A (Fig. 41); en este grupo no solo Bradi3g27550 tiene una expresión positiva de LogFC 1.6 sino también Bradi1g74900 (1.7) y Bradi5g08240 (1.2) excepto Bradi3g04270 (-1.5), los demás genes del grupo aparecen de manera insensible o no detectables (N/D) durante el estrés por inundación. El grupo II son insensibles al estrés, el grupo 3 la mayoría de los genes esta regulados negativamente excepto Bradi2g62600, Bradi4g42910 y Bradi4g26615 que son insensibles al estrés y el grupo IV Bradi2g48360 regulado negativamente y los demás son insensibles al estrés (Fig. 41).

La base de datos de Phytozome presenta a este gen como "Proteína de transporte de cobre relacionada a ATOX1" que indica que está involucrado en el tráfico de iones metálicos, en específico con proteínas receptoras de metales solubles, también conocidas como "metalo-chaperonas". El trazado de esta identidad asignada se encontró hasta el estudio de la proteína bacteriana CopZ y la proteína antioxidante de levadura 1 (ATX1).

Resultados filogenéticos de [Abreu-Neto et al. \(2013\)](#) identificaron un gran número de genes de metalochaperonas similares a ATX1 (Proteína vegetal isoprenilada asociada a metales pesados, HIPP) y proteína vegetal asociada a metales pesados (HPP) en plantas, además aparece At5g03380 como parte de la filogenia de los HIPP al igual que aparece en la filogenia como homólogo de Bradi3g27550. [Suzuki](#)

et al. (2002) identificaron previamente un gen que codifica una proteína putativa a unión a metal Cdl19, sugiriendo que esta proteína juega un papel importante en la homeostasis y/o desintoxicación de los metales pesados, proporcionando a las membranas plasmáticas un punto de control contra el ingreso de iones de metales libres a la célula.

La característica que presentan los HIPP es la presencia de uno o dos dominios HMA y un motivo de isoprenilación, también conocida como farnesilación, que es una modificación postraducciona con la adición de un anclaje hidrofóbico C-terminal importante para la interacción proteína-proteína o con membranas (Abreu-Neto *et al.*, 2013), el cual puede presentar un motivo CaaX (C es cisteína, a es un aminoácido alifático y x cualquier aminoácido) en el C-terminal (Tehseen *et al.*, 2010), además, la mayoría presenta una región flexible rica en glicina entre estos dominios (Suzuki *et al.*, 2002).

Con los estudios bioinformáticos que se reportan a continuación, se observó que Bradi3g27550 presenta todos estos elementos en su secuencia de aminoácidos, dos dominios a unión a metales y un sitio de isoprenilación en su C-terminal, además el homólogo At5g03380 presente en nuestra filogenia fue encontrado en los trabajos de Suzuki y Abreu-Neto como proteína AthHIPP06, lo que nos indica que Bradi3g27550 pertenece a esta familia de proteínas transportadoras de metales.

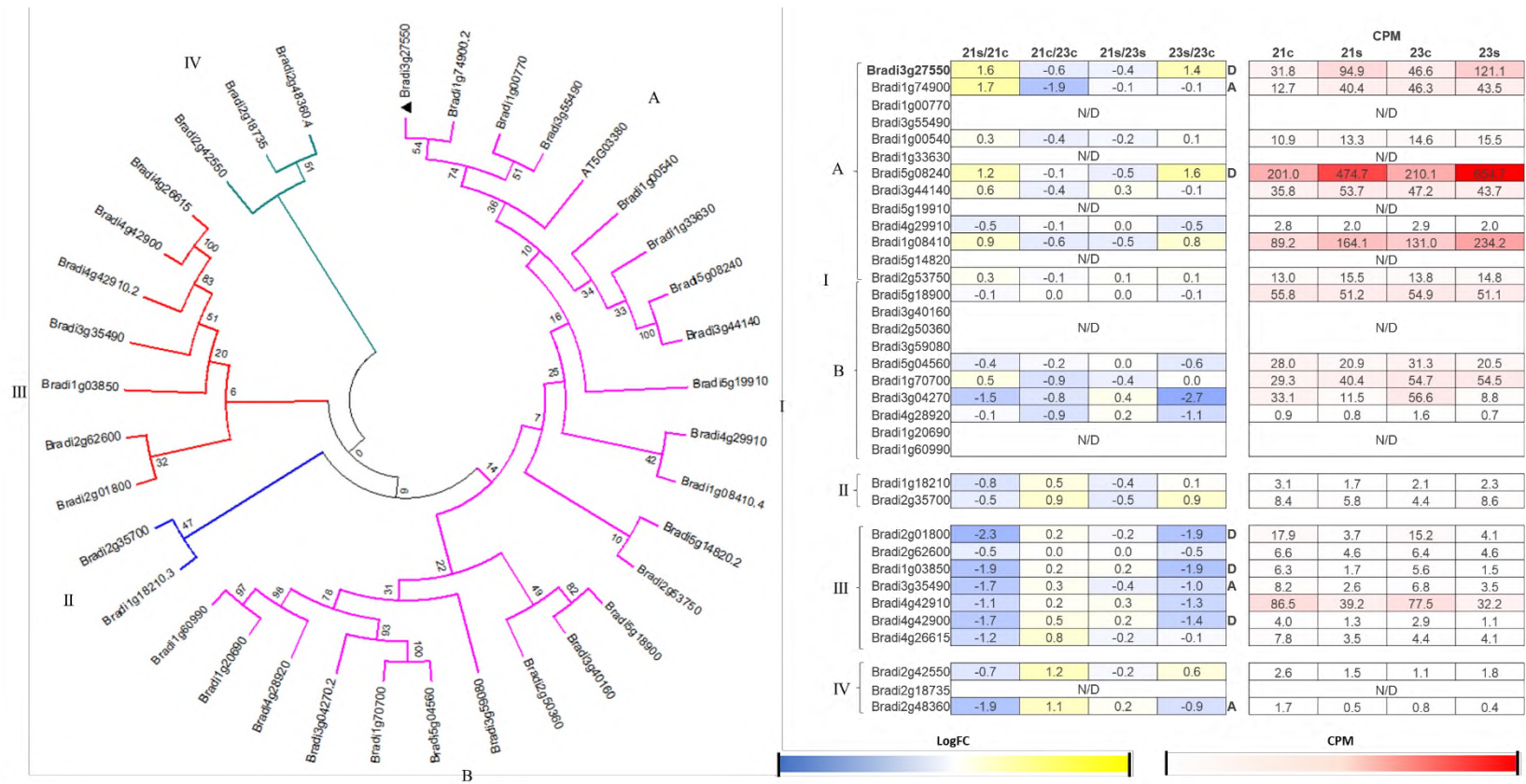


Figura 41. Árbol filogenético del gen **Bradi3g27550** con sus respectivos perfiles de expresión en *Brachypodium distachyon* de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Las letras mayúsculas indican la 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 x 10⁻⁵; Log2FC ≥ 1.5 o ≤ -1.5). El color amarillo y azul indican los valores de Log2FC, el rojo las cuentas por millón (CPM) respectivamente. Los números romanos indican el grupo en que se encuentran. En triángulo negro y el formato negritas señalan a nuestro gen.

7.9.2 Análisis de dominios con MEME Suite

Con la ayuda del servidor MEME, se encontró que Bradi3g27550 comparte el dominio 1 en toda la filogenia generada, ya sea con uno o dos motivos de unión a metal, además de que la gran mayoría de los genes alineados presenta el dominio isoprenilado salvo 4 genes del grupo I, 3 del grupo III y todo el grupo IV que no presentan el motivo isoprenilado. La ausencia de la zona rica en glicinas no la presentan todos los genes de la filogenia (Fig. 42). No obstante, el servidor TMHMM confirmó que Bradi3g27550 no es una proteína transmembranal (Anexo H).

7.9.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER

Para el análisis de Protter, se muestra que no es una proteína transmembranal con un tamaño 341 aminoácidos sin ningún dominio intermembranal. Cuenta con una región de unión al metal cobre, el cual es CxxC (C es la cisteína y x es cualquier aminoácido, Fig. 44, dominio 1) y CaaX el sitio isoprenilado (C es cisteína, a es un aminoácido alifático y X es el residuo de carboxi terminal, Fig. 43, dominio 2). Además de mostrar las zonas de los dominios generadas por el alineamiento de T-Coffee que visualiza a los dos motivos a unión a metal y su dominio isoprenilado en la zona del C-terminal (Fig. 43).

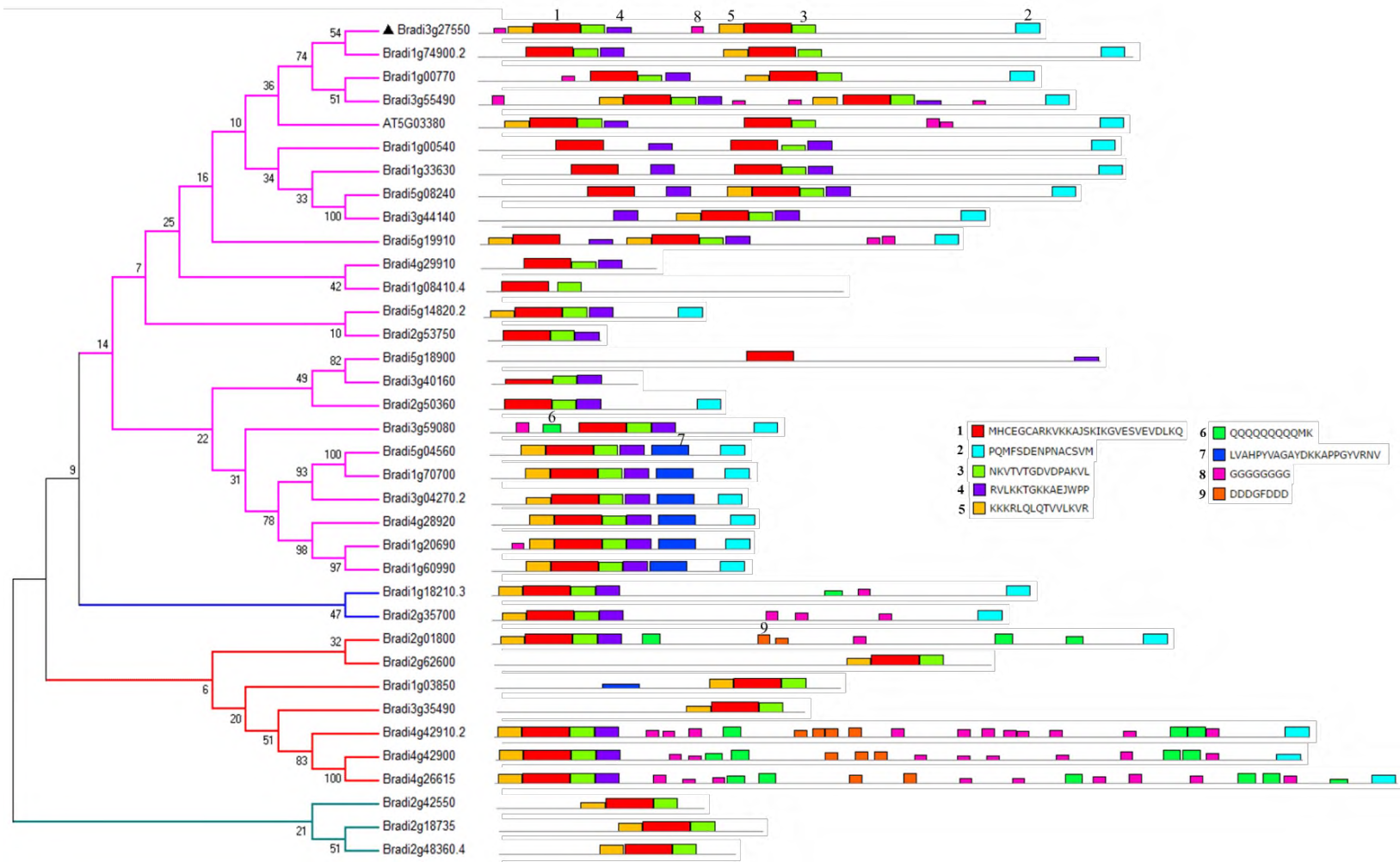


Figura 42. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.
 Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas.

extra



intra

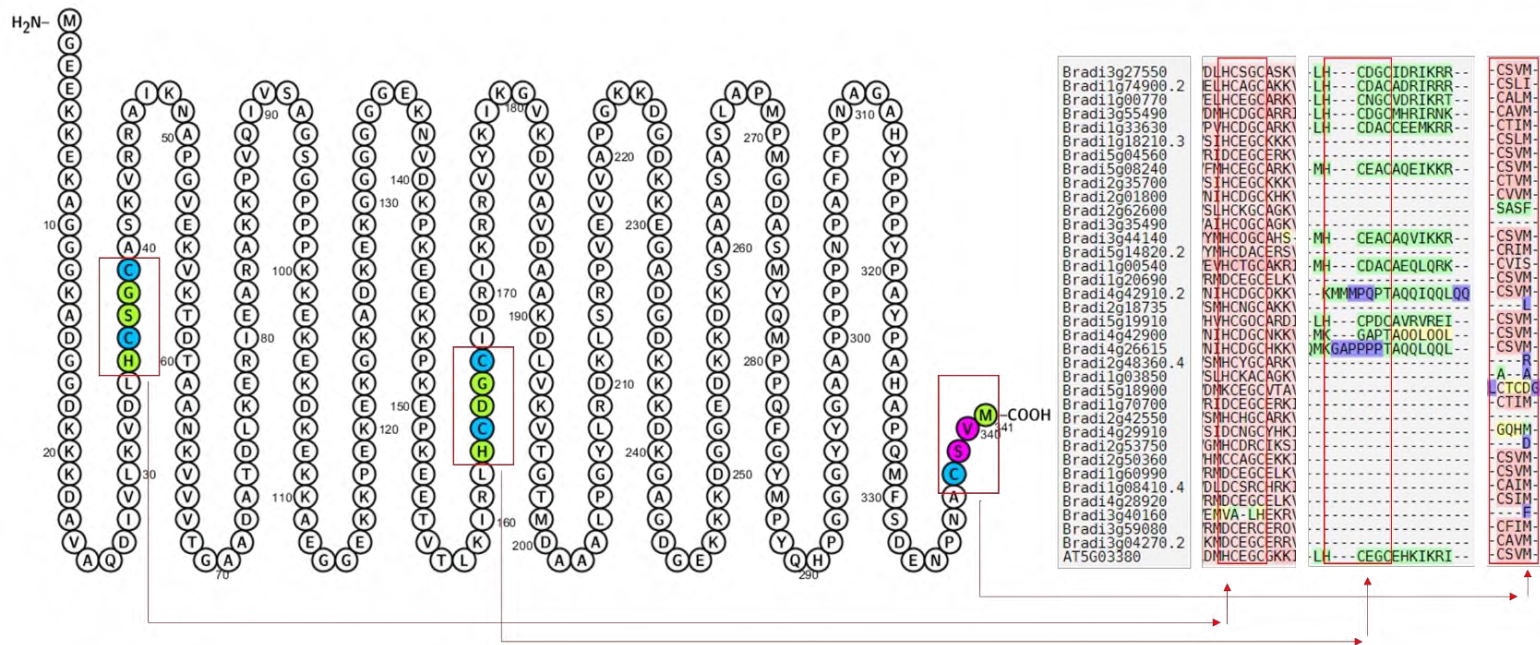


Figura 43. Modelo generado por el servidor Protter y su alineamiento realizado por T-Coffee.

Las zonas dentro de los cuadros rojos del Protter indican los dominios a unión a metal (CxxC) y el dominio isoprenilado (CaaX) en su C-terminal de Bradi3g27550.

7.9.4 Visualización genómica con IGV

Para el análisis del gen Bradi3g27550 se puede observar que existe una expresión en todas las condiciones (Bd2-3c, Bd2-3s, Bd21c y Bd21s), donde las condiciones control están de manera constitutiva mientras que las condiciones de estrés se expresan más. Respecto a las zonas de expresión del gen tanto en sus extremos 5'UTR, 3'UTR, exones e intrones corresponden a lo reportado por Phytozome 12 indicando que no hay isoformas de *splicing* en estas condiciones (Fig. 44).

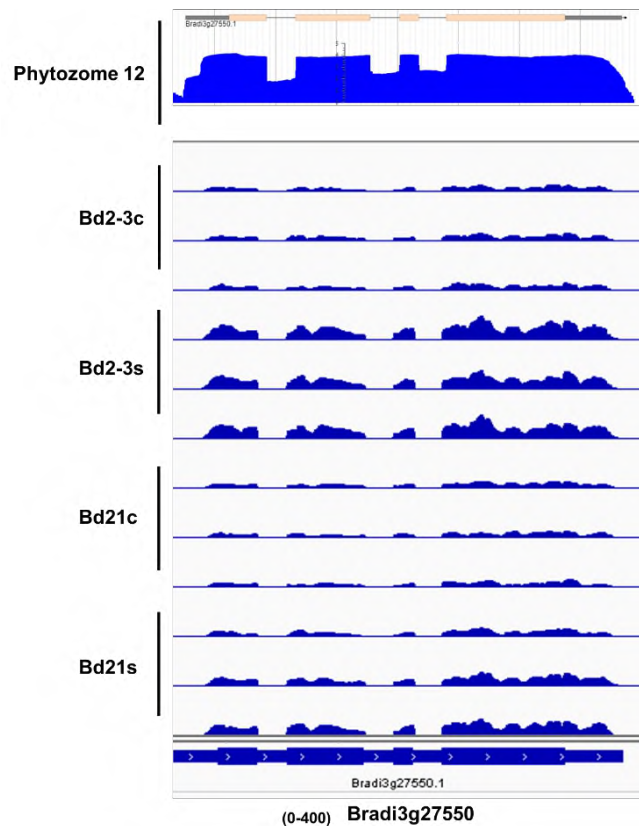


Figura 44. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi3g27550 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.

Visualización de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 tanto control (c) como inundado (s).

7.9.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi3g27550

Para el análisis de la línea JJ10258 sólo germinó una planta, la cual resultó ser silvestre (WT) con una banda de 742 pb (Fig. 45).

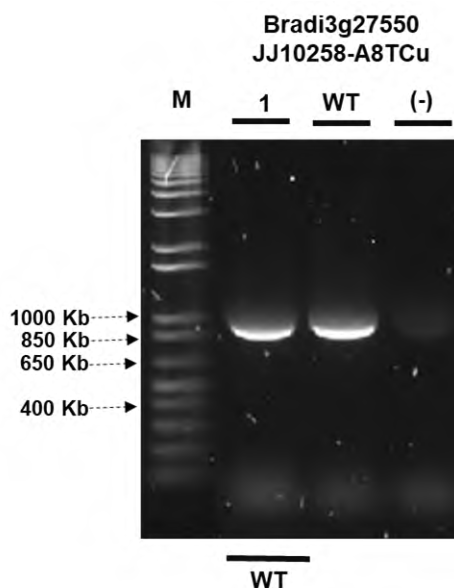


Figura 45. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ10258 del gen Bradi3g27550 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 10 corresponden al total de individuos; control silvestre Bd21-3 (WT) y negativo (-) ddH₂O, marcador de peso molecular (M) HypperLadder 50 pb. En la parte inferior se indica el resultado obtenido al cual WT corresponde a silvestre.

7.9.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi3g27550

Con base en los descubrimientos que se han realizado a partir de la caracterización de nuevas proteínas transportadoras de metales como son las HIPP, Bradi3g27550 puede presentarse como una metalochaperona HIPP de la cual su homólogo en *Arabidopsis* lo catalogan de esa manera en la filogénesis realizada por [Abreu-Neto et al \(2013\)](#). No obstante, al no ser una proteína intermembranal esta podría estar en el citoplasma y cumplir funciones de atrapar a los metales o fungir como transportadora hacia otros organelos o proteínas en el contexto de la mitigación de la porción de estrés iónico del estrés por inundación (Fig. 46).

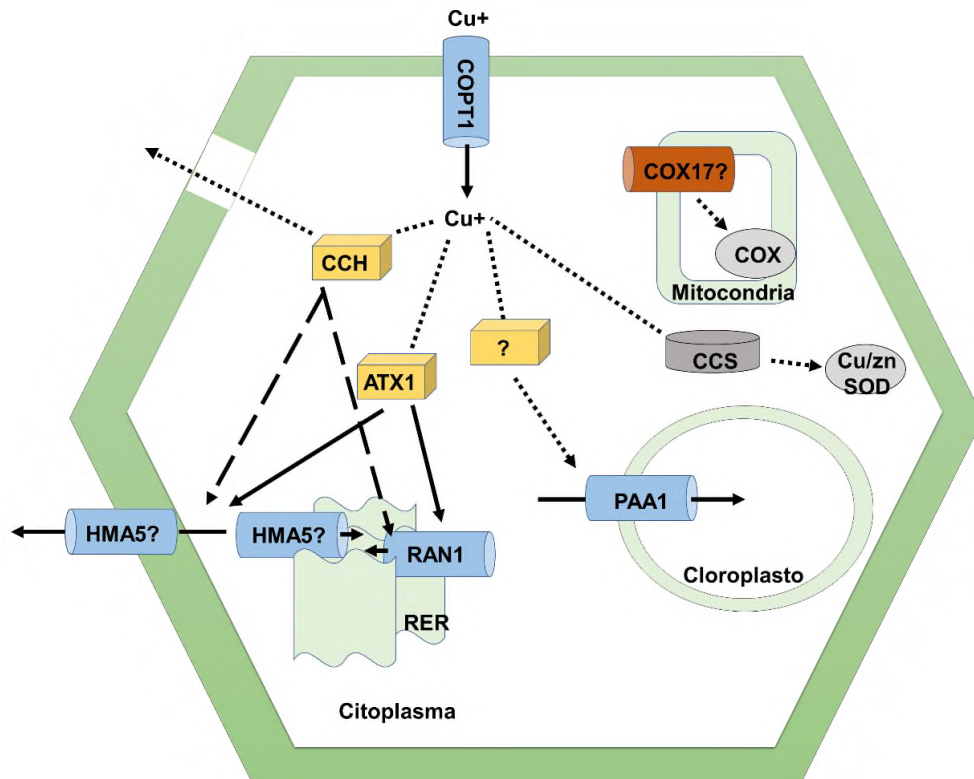


Figura 46. Modelo hipotético de la ubicación del transportador de cobre para Bradi3g27550 con base en ATX1.

Diferentes transportadores del ion cobre ubicados en diferentes lugares de la célula vegetal. Las flechas punteadas representan aquellas vías que son putativas, las flechas continuas son vías ya conocidas y las flechas con líneas entrecortadas indican que el transportador puede actuar es más de un receptor.

7.10 Gen Bradi1g34140

El gen bradi1g34140 lo estructuran 9 exones, 8 intrones, el 5'UTR y 3'UTR. Su localización está entre las coordenadas 29827924 y 29835867 pb. En la línea mutante, la inserción con la que cuenta es de tipo trampa génica en la posición 29828655 al 29828656 pb. En la descripción con la que cuenta en Phytozome es la de una ATPasa de metales pesados tipo-P.

7.10.1 Filogenia y expresión del gen Bradi1g34140 relacionada a las ATPasas de metales.

En la generación del árbol filogenético se desprenden cinco grupos, en el cual Bradi1g34140 se encuentra en el grupo I con una expresión LogFC de 2.1 con la presencia de otros genes regulados positivamente como Bradi1g63650 (1.5), Bradi3g26890 (1.5), Bradi1g78577 (1.7) del grupo IV y Bradi2g21180 y con una regulación negativa Bradi5g17990 (-1.5), los demás del grupo I se presentan como insensibles o no detectables (N/D) ante el estrés por inundación. Del grupo II, III, IV y V los genes están de manera insensible ante el estrés por inundación. También se observa que, aunque Bradi5g24690 es insensible ante el estrés su CPM es muy elevado (1479.6) en comparación de aquellos que están regulados positivamente como Bradi1g33140 (329.4) (Fig. 47).

En la base de Phytozome Bradi1g34140 tiene una anotación como una ATPasa de metales pesados del tipo P de la subfamilia P1. En la familia de las ATPasas del tipo P se encuentra la subfamilia de las ATPasas tipo P1B que acopla la hidrólisis del ATP al transporte de metales a través de las membranas celulares (Lu *et al.*, 2016), las ATPasas P1B presentan varias características topológicas como de seis a ocho hélices transmembranales (TM) (Gaitan-Solis *et al.*, 2015), además presenta en la sexta TM (TM6) la secuencia firma (CPC,CPH, SPC, PCP), también uno o más dominios de unión a metal en el citoplasma en la región N o C-terminal (N-MBD, C-MBD) y la zona de fosforilación catalítica (DKTGT) entre TM6 y TM7 (Argüello, 2003). Mills *et al.*, 2012 realizaron un árbol filogenético con secuencias de ATPasas del tipo

P1B, además de homólogos de cebada, *Arabidopsis* y de otras monocotiledóneas incluyendo a Bradi1g34140 y su homólogo At4g30110, el cual identificaron que las ATPasas P1B de las monocotiledóneas identificadas se dividen en dos subgrupos difiriendo notablemente en la composición de los C-terminales citoplasmáticos, además que los homólogos de *Brachypodium* presentaron altos porcentajes en los residuos de histidina (>17%) y hasta con seis pares de cisteínas CC distribuidos en toda la secuencia.

También [Takahashi et al., \(2012\)](#) demostraron al realizar una filogenia solamente de homólogos de ATPasas de metales pesados (HMA) de arroz y *Arabidopsis*, que de los 9 genes HMA que posee el arroz solo OsHMA1 y OsHMA3 pertenecen al subgrupo que transporta metales como Zn, Co, Cd y Pb, incluyendo al homólogo AtHMA2 (At4g30110). Lo que se podría establecer con base a la bioinformática obtenida que Bradi1g34140 es una ATPasa del tipo P de la subfamilia P1B, el cual presenta los dominios encontrados por [Argüello \(2003\)](#) además de la filogenia basada en homólogos de monocotiledóneas y dicotiledóneas realizada por [Mills et al \(2010\)](#).

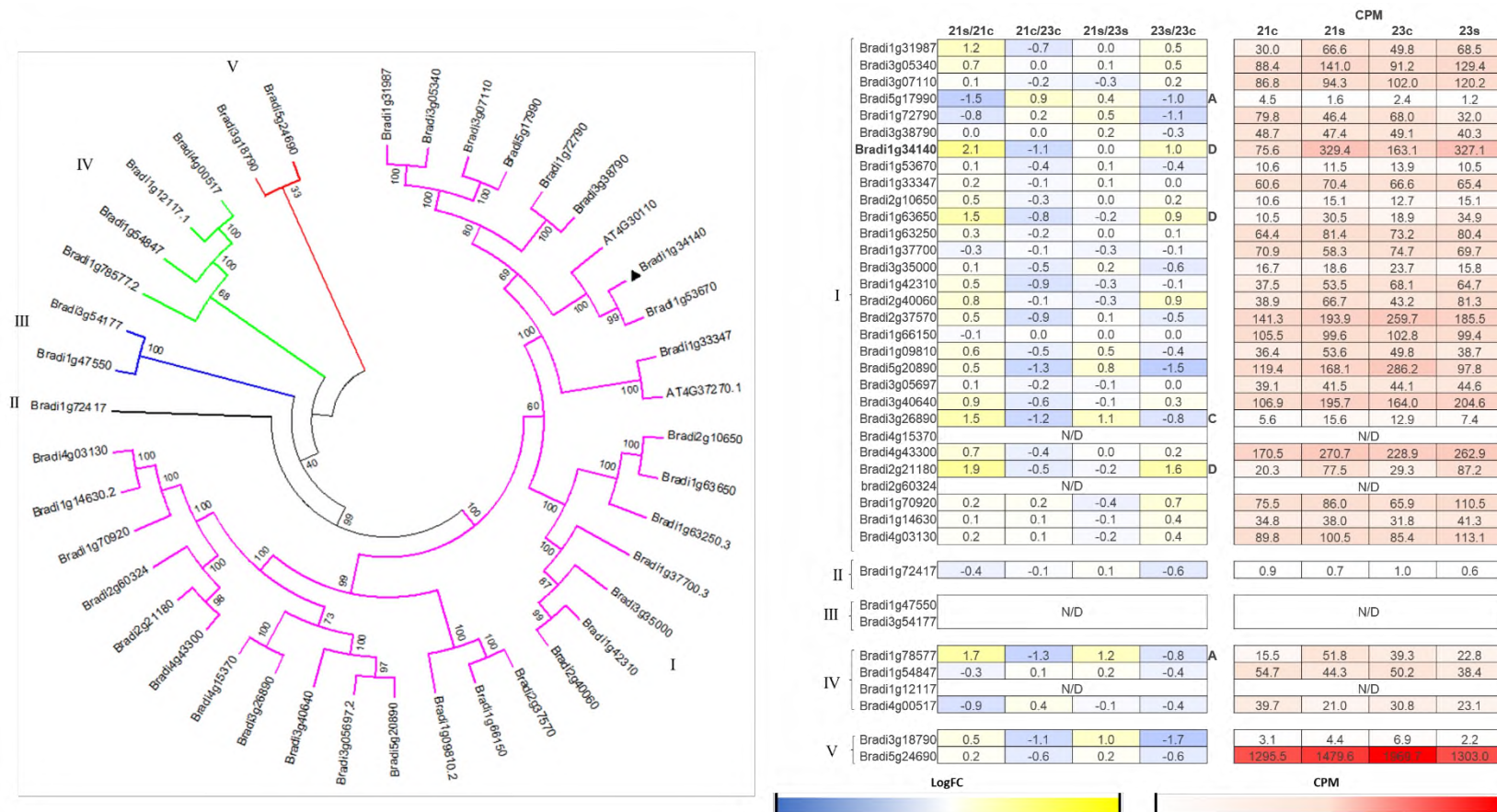


Figura 47. Árbol filogenético del gen Bradi1g34140 con sus respectivos perfiles de expresión en *Brachypodium distachyon* de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Las letras mayúsculas indican la 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 x 10⁻⁵; Log2FC ≥ 1.5 o ≤ -1.5). El color amarillo y azul indican los valores de Log2FC, el rojo las cuentas por millón (CPM) respectivamente. Los números romanos indican el grupo en que se encuentran. En triángulo negro y el formato negritas señalan a nuestro gen.

7.10.2 Análisis de dominios con MEME Suite

En los resultados del análisis de dominios, Bradi1g34140 presenta los dominios 1, 2, 4, 5, y 6 que no todos los miembros del grupo I los presentan, a diferencia del grupo II, II, IV y V todos presentan los dominios excepto el dominio 9 reflejando su alta conservación en los dominios presentes. Los únicos dominios que comparten todos los genes en la filogenia son el dominio 1 y 4 siendo estos muy conservados (Fig. 48). En el análisis del TMHMM el modelo generado nos indica que es una proteína transmembranal con 6 zonas de anclaje a la membrana (Anexo H).

7.10.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER

En el análisis de Protter, se observó como una proteína transmembranal de un tamaño de 1039 aminoácidos con seis dominios intermembranales. Además de una región a unión a zinc o cobre con la secuencia (GxCCxxE), la región CPC es el sitio de unión al cadmio, el sitio DKTG conservado es la zona de fosforilación de la proteína y las zonas de dipéptidos como CC (Cisteína) y HxH (Histidina y x cualquier aminoácido) son otros receptores de metales (Fig. 49).

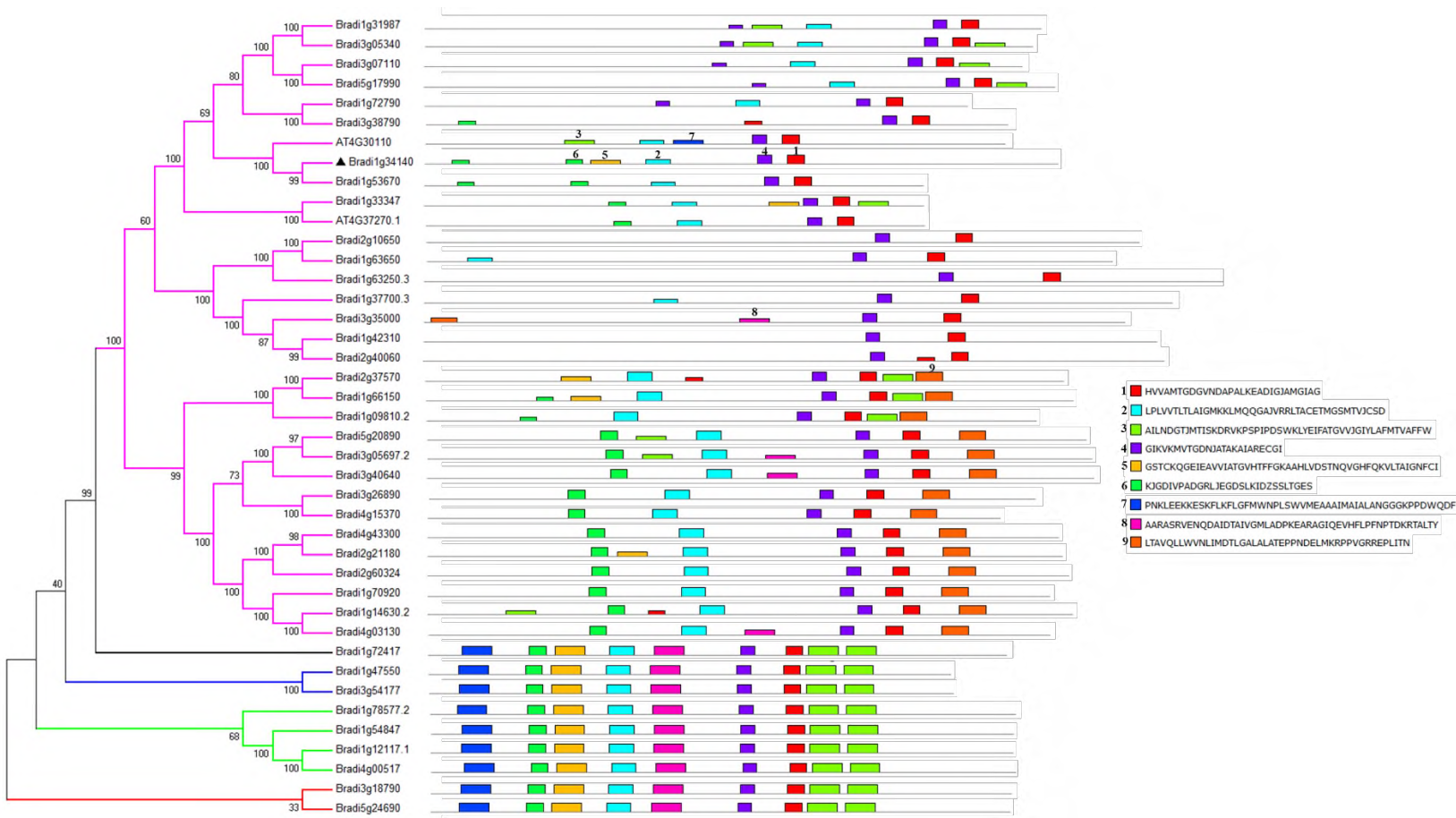


Figura 48. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.
 Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas.

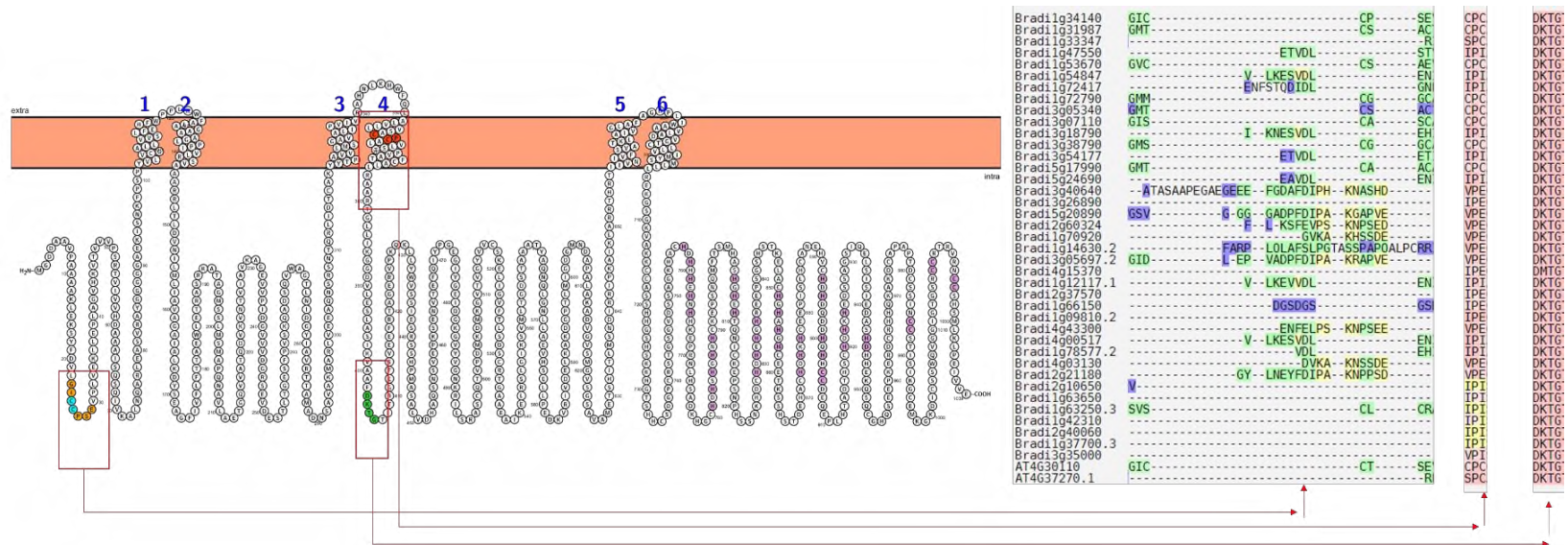


Figura 49. Modelo generado por el servidor Protter y al lado el alineamiento de las regiones variable.

El color naranja representa el dominio de unión a zinc, el color rojo el dominio a unión a Cd, el verde el sitio de fosforilación y el lila los sitios del C-terminal de unión a metales.

7.10.4 Visualización genómica con IGV

En el caso del gen Bradi1g34140 se puede observar una estructura predicha por Phytozome 12 similar a la que se observa en todas las condiciones (Bd2-3c, Bd2-3s, Bd21c y Bd21s), lo que indica que no tiene isoformas de *splicing* alternativo. Se confirma que está presente en las condiciones control y en las condiciones de estrés por inundación se expresa un más (Fig. 50).

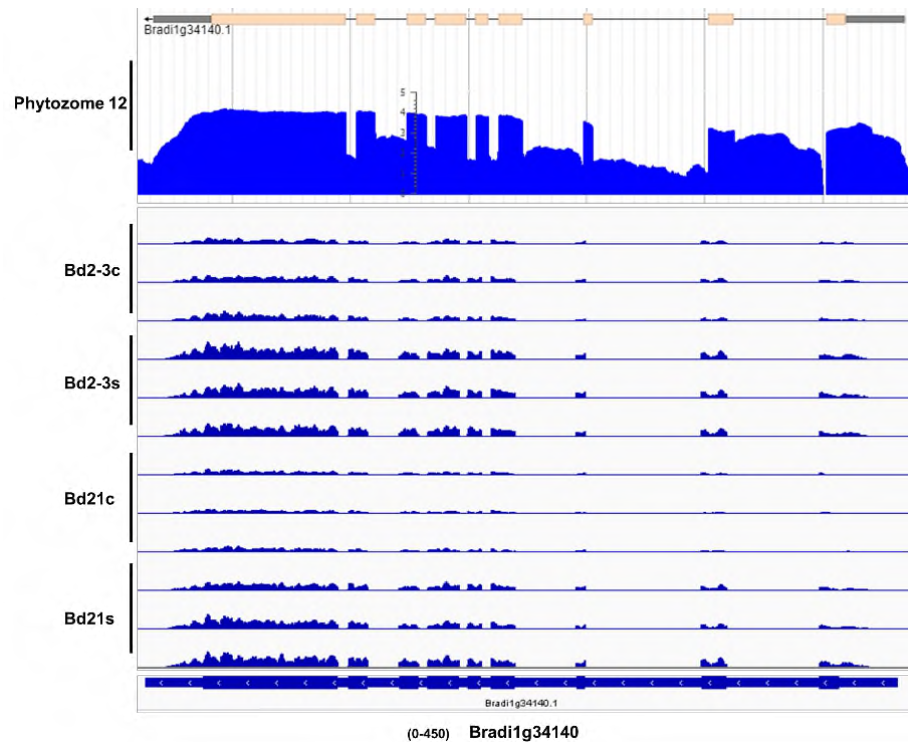


Figura 50. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi1g34140 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV.

Visualización de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 tanto control (c) como inundado (s).

7.10.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi1g34140

Este análisis no se pudo llevar a cabo debido a que las semillas sembradas no germinaron y por consiguiente no se obtuvieron muestras para la verificación de su inserto (Anexo N).

7.10.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi1g34140

De la información recabada se concluye que esta proteína está integrada en la membrana plasmática como transportador de metales ATPasa tipo-P. Estas ATPasas se han localizado en una gama amplia de organismos y están implicadas en el transporte de una variedad de metales esenciales y tóxicos (Cu, Zn, Pb) a través de las membranas celulares (Williams, *et al.*, 2000). En *Arabidopsis* el ortólogo At4g30110 (AtHMA4) tiene un dominio en el C terminal como transportador de metales (Mills *et al.*, 2010). La posible función estaría en mantener la homeostasis del ion zinc y el cadmio en la célula en un contexto de estrés por alta disponibilidad de metales pesados por la inundación (Fig. 51).

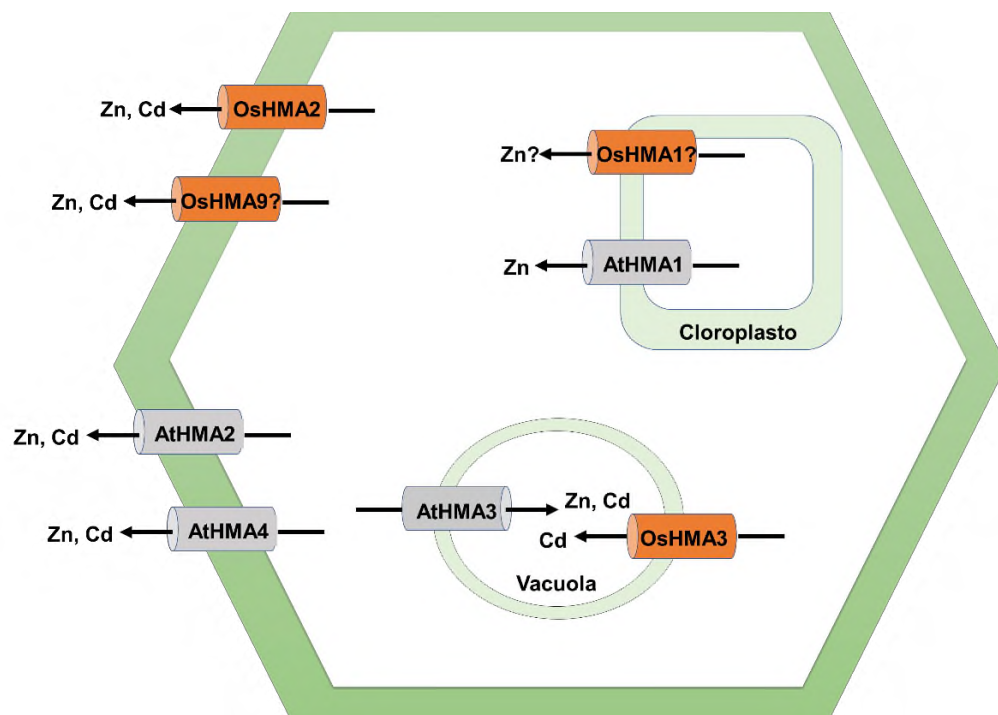


Figura 51. Modelo hipotético de la ubicación del transportador de zinc de Bradi1g34140. Diferentes transportadores de los iones zinc y cadmio de *Arabidopsis* y arroz ubicados en diferentes lugares de la célula vegetal.

7.11 Gen Bradi4g01540

Bradi4g01540 está constituido por dos exones, un intrón, el 5'UTR y 3'UTR. Se localiza entre 1025818 y 102874 pb. En la línea mutante, el gen cuenta con una inserción que está entre 1028161 y 1028162 pb del gen, con una construcción tipo trampa génica. En la anotación que tiene Phytozome es la de actividad antiporte K/H en específico, la familia CHX.

7.11.1 Filogenia y expresión del gen Bradi4g01540 asociado al transporte de potasio.

Para el análisis filogenético se generaron dos grupos, del cual Bradi4g01540 aparece en el grupo II con un LogFC de 5.4 junto con Bradi4g01526 (1.3) con una regulación positiva en el grupo ya que Bradi2g36828 es insensible y los demás están no detectado (N/D) ante en el estrés por inundación. Del grupo I Bradi4g01430 es insensible ante la inundación y los demás están no detectados (N/D). En cuanto a la abundancia, Bradi4g01430 (76.4) es quien más está presente a diferencia de Bradi4g01540 (7.5) (Fig. 52).

En las plantas, la familia CHX es grande, en *Arabidopsis* y en arroz hay 28 y 17 respectivamente. Se localizan en diferentes tejidos y probablemente en diferentes membranas celulares (Pardo *et al.*, 2006) además de que se expresan durante la gametogénesis (Sze *et al.*, 2004). Se ha demostrado que algunas de las proteínas CHX están localizadas en compartimentos de endomembrana (Pittman, 2012). Los genes CHX pertenecen a la superfamilia CPA2 de intercambiadores de iones que codifican para supuestos intercambiadores de K, Na / H (Brett *et al.*, 2005).

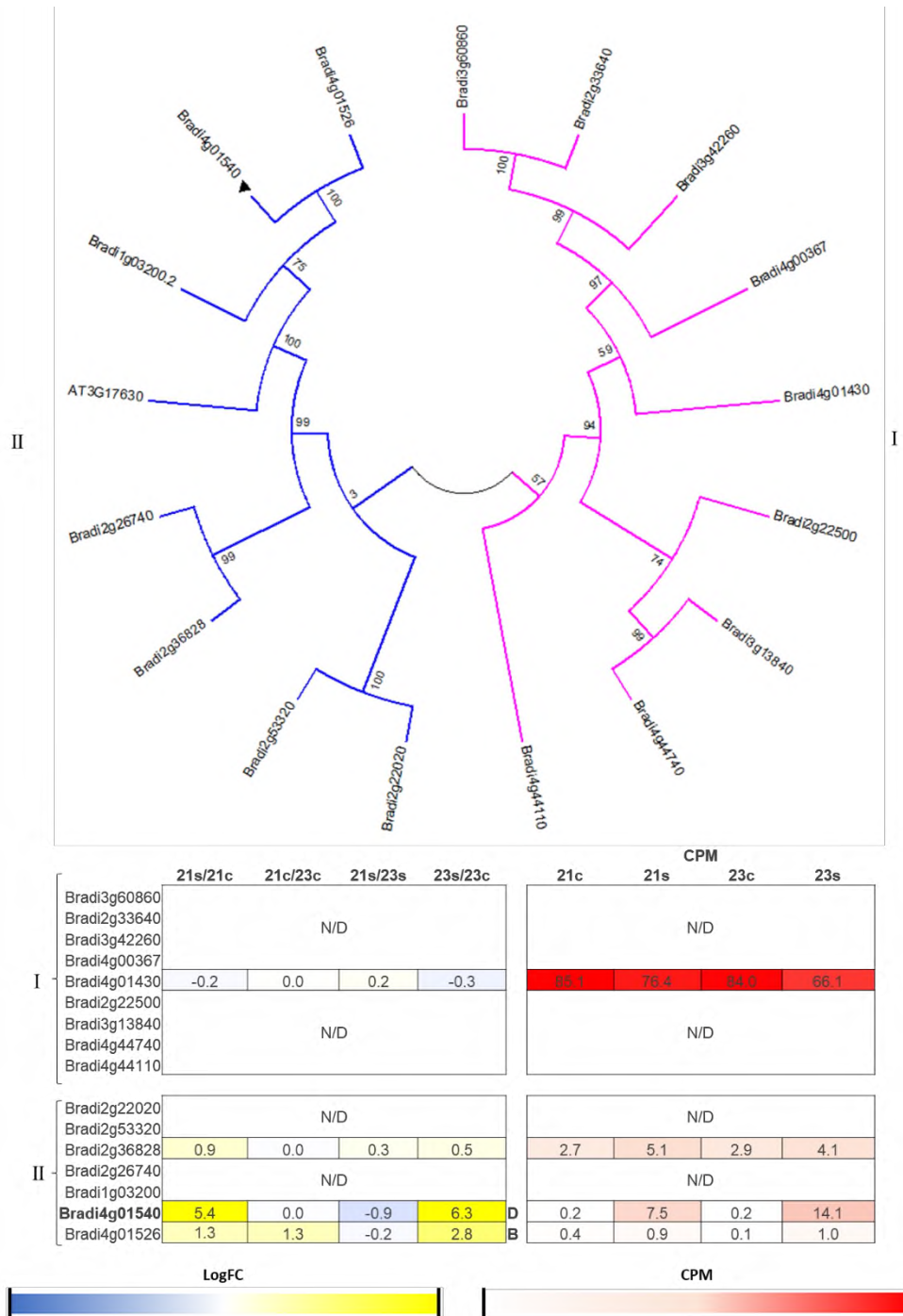


Figura 52. Árbol filogenético del gen Bradi4g01540 con sus respectivos perfiles de expresión en *Brachypodium distachyon* de 48h de estrés por inundación y de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

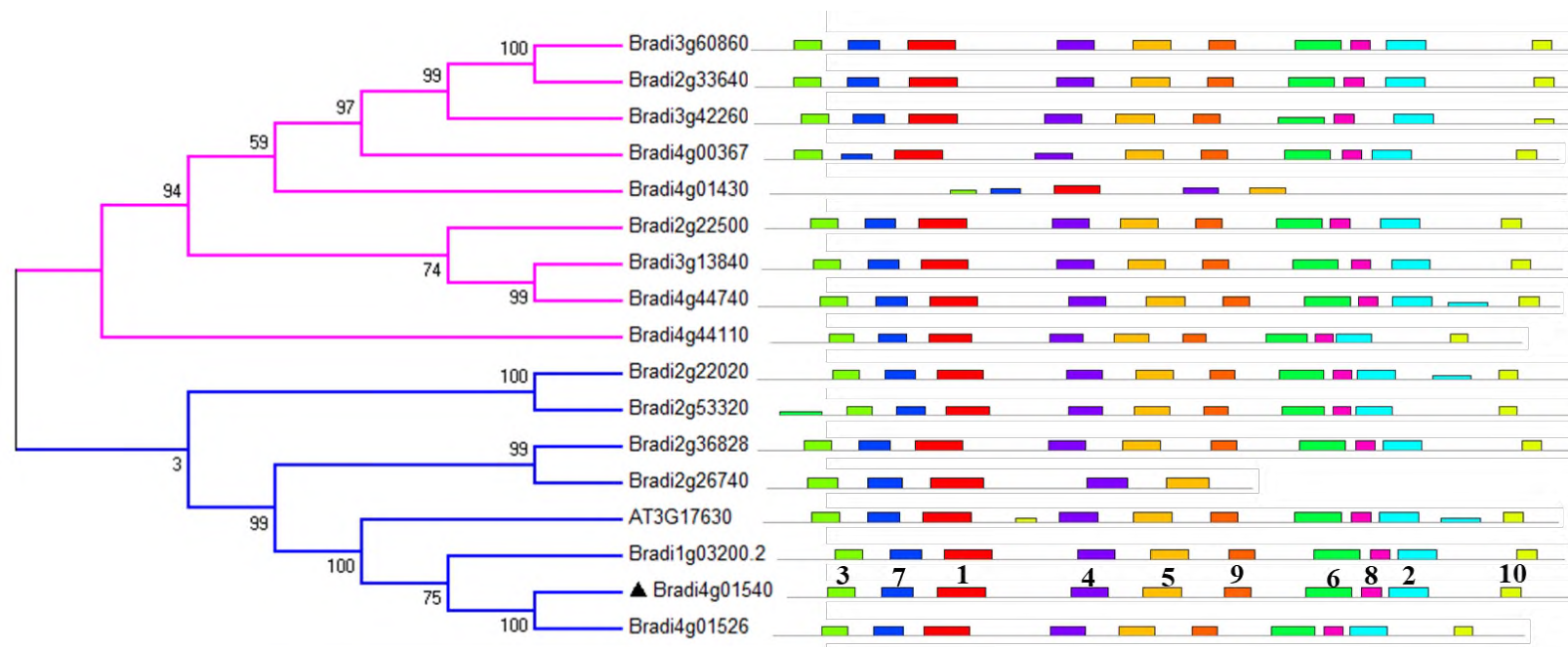
Las letras mayúsculas indican la diferencia significativa: A y B regulados positiva o negativamente en Bd21 y Bd2-3, respectivamente; C inversamente regulado entre Bd21 y Bd2-3 y D ambos están regulados positiva o negativamente en ambos ecotipos ($FDR < 0.05 \times 10^{-5}$; $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$ o ≤ -1.5). El color amarillo y azul indican los valores de Log_2FC , el rojo las cuentas por millón (CPM) respectivamente. Los números romanos indican el grupo en que se encuentran. En triangulo negro y el formato negritas señalan a nuestro gen.

7.11.2 Análisis de dominios con MEME Suite

El análisis de dominios demostró que Bradi4g01540 presenta los 10 dominios encontrados en la familia, además de que todas las secuencias presentan estos dominios excepto Bradi4g01430 que sólo tiene los dominios 1,3, 4, 5, 7 y 9. Esto indica que son dominios muy conservados de estos genes (Fig. 53). En el análisis TMHMM se reveló que es una proteína transmembranal por sus 10 zonas de anclaje a la membrana (Anexo H).

7.11.3 Análisis y visualización de proteoformas de características de secuencia con PROTTER

En el análisis de Protter se observa una proteína transmembranal con un tamaño de 810 aminoácidos con 10 dominios intermembranales. Para la proteína de Bradi4g01540 solo se encontró un dominio putativo en la región TM5 que particularmente esta conservado en casi todas las secuencias alineadas (dominio 1), lo que sugiere que podría estar participando en el transporte de cationes y protones (H) a través de la membrana al igual a lo encontrado por [Sze et al., \(2004\)](#) (Fig. 54).



- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 ■ FLVFLGVALSITAFPVLARILAEKLLTTDLGRLAMSAAAVNDVAAWILL | 6 ■ GAVSVRPMTAISPLATMHEDVCALAEDKRAALIVLPFHKRLRVDGGME |
| 2 ■ SAVAYRVALLFFGGPDDREALAYAARMAEHGVALTVVRFL | 7 ■ FLFLVGLELDLRAJRRSGKKALAIAGIALPF |
| 3 ■ ALLLRPLRQPRVIAEILAGILLGPSALGR | 8 ■ NRRVLQEAPCSVAILVDRGLG |
| 4 ■ PKEGPLARALIEKLEDLVSGLLPLFYFASSGLRRTBVATI | 9 ■ ELRVLACVHGARBVPALJNLELSRGTR |
| 5 ■ REAVALGFLMNTKGLVELIVLNIGRDRKVLNDZAFAILVL | 10 ■ CPELGPVGDLLASSDFSTAS |

Figura 53. Árbol en forma cuadrada con el análisis de dominios de MEME.
 Los números indican el orden de los dominios encontrados de las secuencias proteicas.

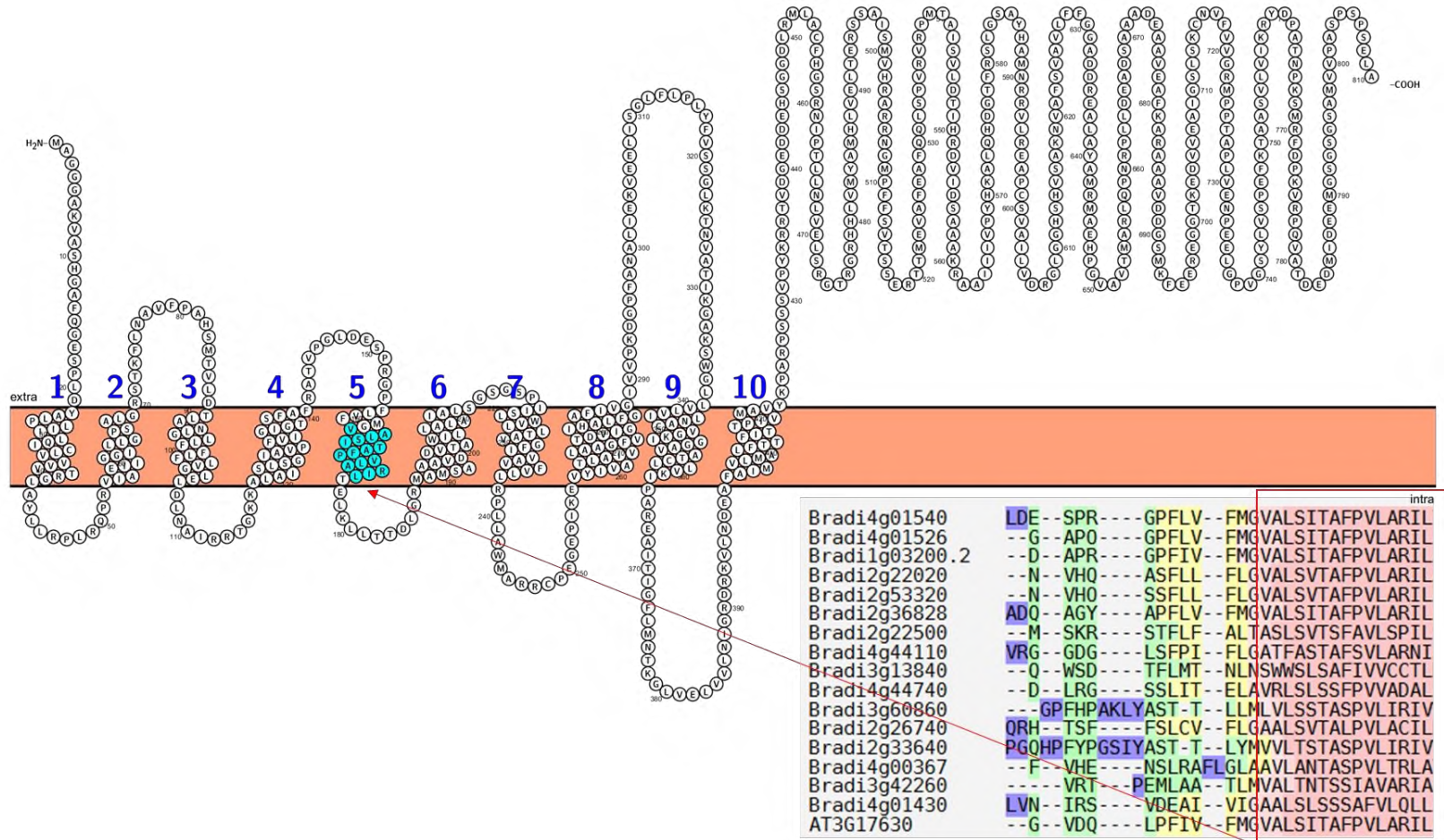


Figura 54. Modelo generado por el servidor Protter y su alineamiento realizado por T-Coffee.
 La zona dentro del cuadro rojo del Protter indican el dominio putativo de Bradi4g01540.

7.11.4 Visualización genómica con IGV

En el análisis del gen Bradi4g01540 en Phytozome no se observa una buena concordancia entre el modelo génico y su análisis de expresión, lo anterior se debe a que esta base de datos no probó la condición de inundación en *Brachypodium*. En este trabajo, sí se probó la condición de inundación y se observó que Bradi4g01540 es un gen de expresión prácticamente exclusiva de este estrés. Lo anterior permite confirmar la estructura computacional propuesta por Phytozome (Fig. 55).

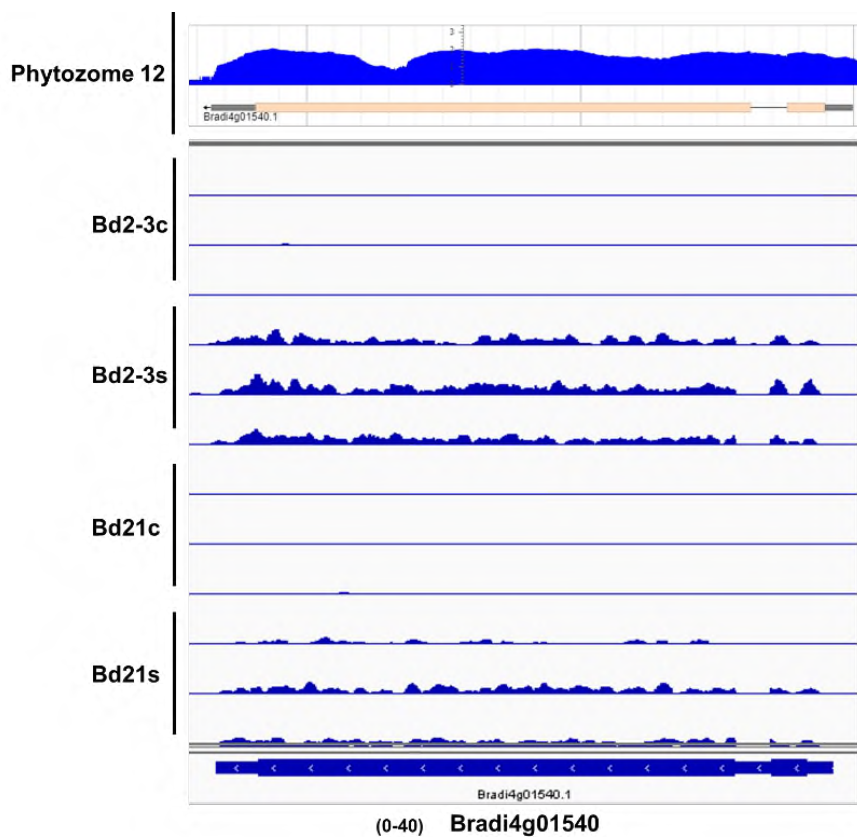


Figura 55. Cartogramas de alineamientos de secuencias de expresión de Bradi4g01540 que se expresan durante la inundación en dos ecotipos de *Brachypodium distachyon* (Bd21 y Bd2-3) visualizados en IGV. Visualización de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 tanto control (c) como inundado (s).

7.11.5 Verificación del inserto de T-DNA en Bradi4g01540

La línea JJ6903 (Bradi4g01540) tuvo solo dos plantas germinadas, de las cuales todas fueron silvestres (WT) presentando una banda 900 pb (Fig. 56).

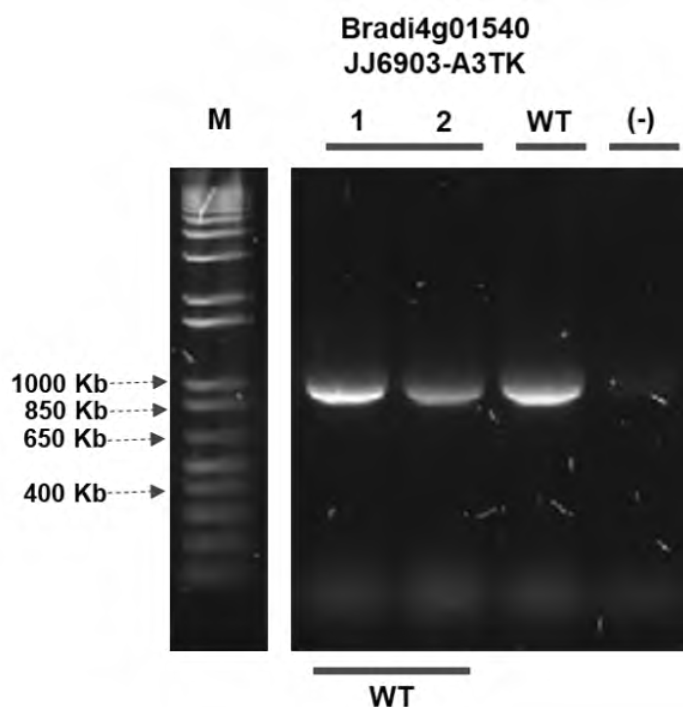


Figura 56. Gel de agarosa al 1.5% con las amplificaciones de PCR de la genotipificación para las líneas de T-DNA JJ6903 del gen Bradi4g01540 de *Brachypodium*.

Los números del 1 al 10 corresponden al total de individuos; control silvestre Bd21-3 (WT) y negativo (-) ddH₂O, marcador de peso molecular (M) HypperLadder 50 pb. En la parte inferior se indica el resultado obtenido al cual WT corresponde a silvestre.

7.11.6 Modelo hipotético de la posible función de Bradi4g01540

La posible función y localización de la proteína Bradi4g01540 como proteína transmembranal es congruente con su posible función de intercambiador de protones y potasio. Aún falta más información para develar la función real, no solo para Bradi4g01540 si no para la toda la familia CAP2 y la subfamilia CHX y obtener más datos experimentales. No obstante, al ser una proteína intermembranal podría no solo estar en vacuola si no en otras partes de la célula donde se requiera en situaciones de

estrés intentando mantener el equilibrio tanto ácido como osmótico en la célula en un contexto donde las altas concentraciones de iones potasio o protones en un estrés por inundación (Setter *et al.*, 2009) (Fig. 57).

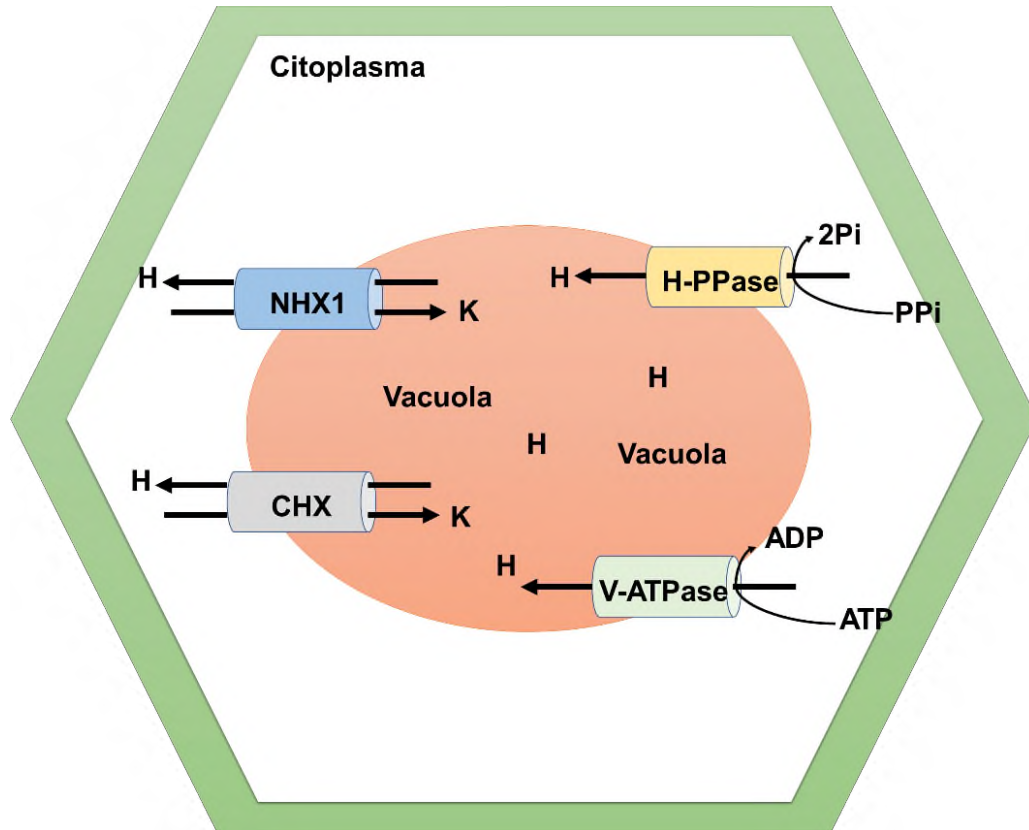


Figura 57. Modelo hipotético de la ubicación del transportador de zinc de Bradi2g33110. Diferentes transportadores del ion zinc ubicados en diferentes lugares de la célula vegetal en el cual Bradi2g33110 podría estar actuando en la membrana citoplasmática, así como su homólogo AtZIP4.

7.12 Análisis por RT-PCR

El primer paso a seguir fue la verificación de los oligonucleótidos de RT-PCR para corroborar que tuviesen el amplicón deseado, dado que no amplifico Bradi110 se procedido a su rediseño (Fig. 58), una vez confirmada su utilidad, se pasó a la verificación de la ausencia del transcrito por efecto de la inserción de T-DNA por RT-PCR en las muestras colectadas a las 48 h de las líneas mutantes de T-DNA homocigotas tanto en condiciones control y de inundación, así como las muestras control de Bd21-3 silvestres.

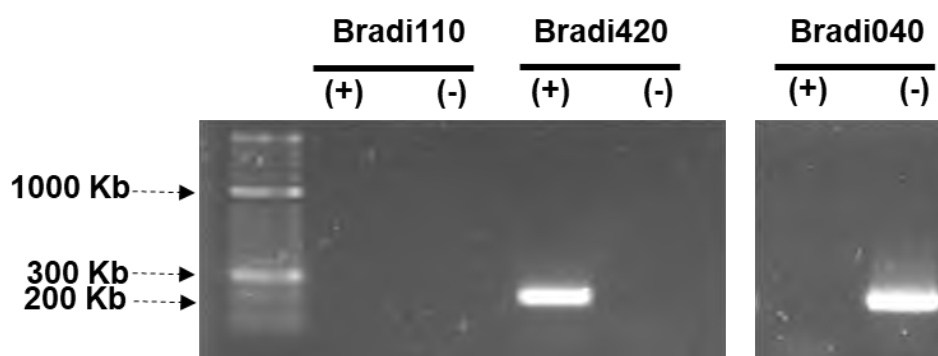


Figura 58. Gel de agarosa al 1.5% para la verificación de la amplificación por los oligonucleótidos para la RT-PCR usando gDNA de Bd21-3 silvestre.

En el gel se observa una banda de alrededor de 200 pb; como control negativo (-) se utilizó ddH₂O. Además, se utilizó un control negativo (-) de ddH₂O. la nomenclatura usada para los oligonucleótidos corresponden a la línea mutante. El marcador de peso molecular 1kb PlusDNA Ladder (Invitrogen 10787-018).

El análisis y ensayo de RT-PCR (Fig. 60) nos mostró que para la línea A4RT-5 (Bradi5g02420, JJ16414) en la condición control, se observó una banda de menor expresión en las mutantes en comparación con las plantas silvestres (Fig. 59 c y d), lo que indica que son mutantes knock-out “leaky” dado que no fueron afectadas en su totalidad por la inserción de T-DNA. En el caso de las silvestres, se observó que es un gene inducible ante el estrés por inundación, como se esperaba de los datos transcriptómicos.

Para A1TZn-6 (Bradi2g33110, JJ20631), se observó que es una mutante KO, pues la banda observada en las mutantes es muy inferior al control silvestre. No

obstante, el método de RT-PCR no tuvo la sensibilidad suficiente para observar la inducción de 1.6 veces más que se registró en el análisis transcriptómico (Fig. 59 d).

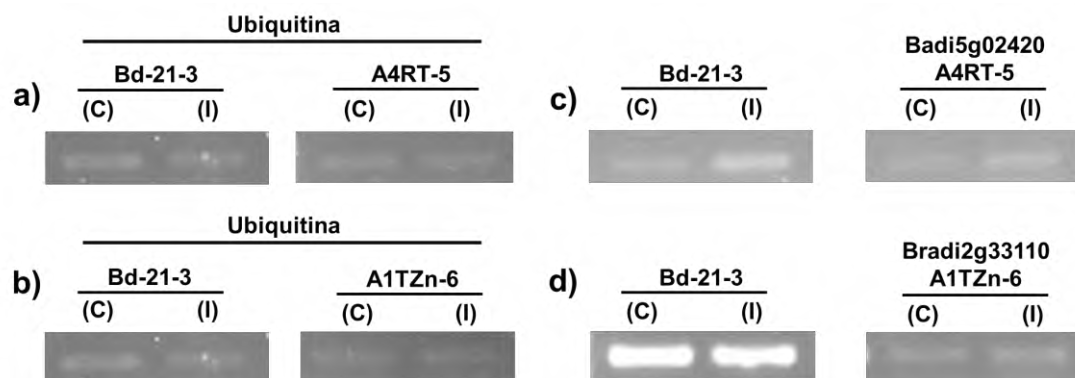


Figura 59. Análisis de RT-PCR de los niveles de transcripción de las líneas mutantes por T-DNA.

Comparación de los niveles de expresión entre controles silvestres (Bd21-3) y mutantes homocigotas.

7.13 Ensayo de tolerancia en inundación con Bd21-3

En ensayos realizados por Rivera-Contreras *et al.* (2016) se concluyó que Bd21 es un ecotipo sensible a la inundación. No obstante, en ese trabajo no se probó al ecotipo Bd21-3 que es el fondo genético sobre el que se construyeron las líneas de T-DNA empleadas en este trabajo. De tal forma, se vio la necesidad de determinar su tolerancia relativa a los otros ecotipos ya probados. Se montaron 3 ensayos de inundación agregando los ecotipos Bd21 (sensible), Bd2-3 (tolerante), Tek-10 (tolerante) y así comparar el tipo de comportamiento ante en estrés en las líneas mutantes de T-DNA.

Durante el primer ensayo se inundaron a los cuatro ecotipos con los tiempos: 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4.5 y 6 días de inmersión. El experimento mostró lo ya reportado por Rivera-Contreras (2016) donde el ecotipo Bd21 es más sensible (Fig. 61 a). Al evaluarse visualmente, Bd21-3 presentó una tolerancia similar o superior con respecto a los ecotipos reportados anteriormente como tolerantes (Fig. 61 c). Se observa que Bd21 ya no logra recuperarse del estrés en comparación con Bd21-3 y Bd2-3.

En la cuantificación en respuesta al estrés como porcentaje de hojas sanas, se observa que entre las plantas rescatadas en el día tres de inundación, el ecotipo Bd21 muestra una dispersión de datos hacia la baja, contrario a Bd21-3, aunque estadísticamente no presentan diferencia entre los ecotipos hasta el día 4. Al día cuatro, Bd21-3 mostró ser más tolerante a la inundación con el mayor número de hojas sanas y el 100% de plantas vivas después del estrés (Fig. 62). Los gráficos no se llegaron a los días cinco y seis debido a que los individuos no lograron sobrevivir en todos los ecotipos (Fig. 63)

En el segundo y tercer ensayo se utilizaron solo los ecotipos Bd21, Bd2-3 y Bd21-3, debido a que no se contaban con semillas suficientes de Tek-10. Los cambios ante el estrés fueron evidentes en el día tres y Bd21-3 se mantuvo como tolerante. Al cuarto día se observa que no se presenta diferencia significativa entre los ecotipos Bd21-3 y Bd2-3 ya que aproximadamente el 70% de las plantas aún están vivas. La Fig. 61 c) Cuando se analizan todos los ensayos en conjunto, más del 70% de las hojas sanas se conservan en la mitad de los individuos de los ecotipos Bd21-3 y Bd2-3, mientras que en Bd21, ya no hay conservación de hojas sanas (Fig. 61 d).

De tal manera. Bd21-3 debe considerarse como un ecotipo tolerante al estrés por inundación debido a su característica de resistencia por cuatro días bajo inmersión total (Fig. 62 y 63).

Cuando se analizaron los datos como LT_{50} , el análisis estadístico indicó que Bd21-3 es estadísticamente igual a Bd2-3 y Tek-10 ya que pueden resistir hasta cuatro días de inmersión al presentar más del 50% del número de hojas vivas, y Bd21 llega a ese punto un día antes.

Con estos ensayos de inundación, se estableció el tiempo de inundación para las plantas mutantes de T-DNA con una predicción de una tolerancia reducida a la inmersión por la interrupción de los genes por los T-DNA que normalmente estarían expresados, decidiendo empezar a partir del día tres para la inundación.

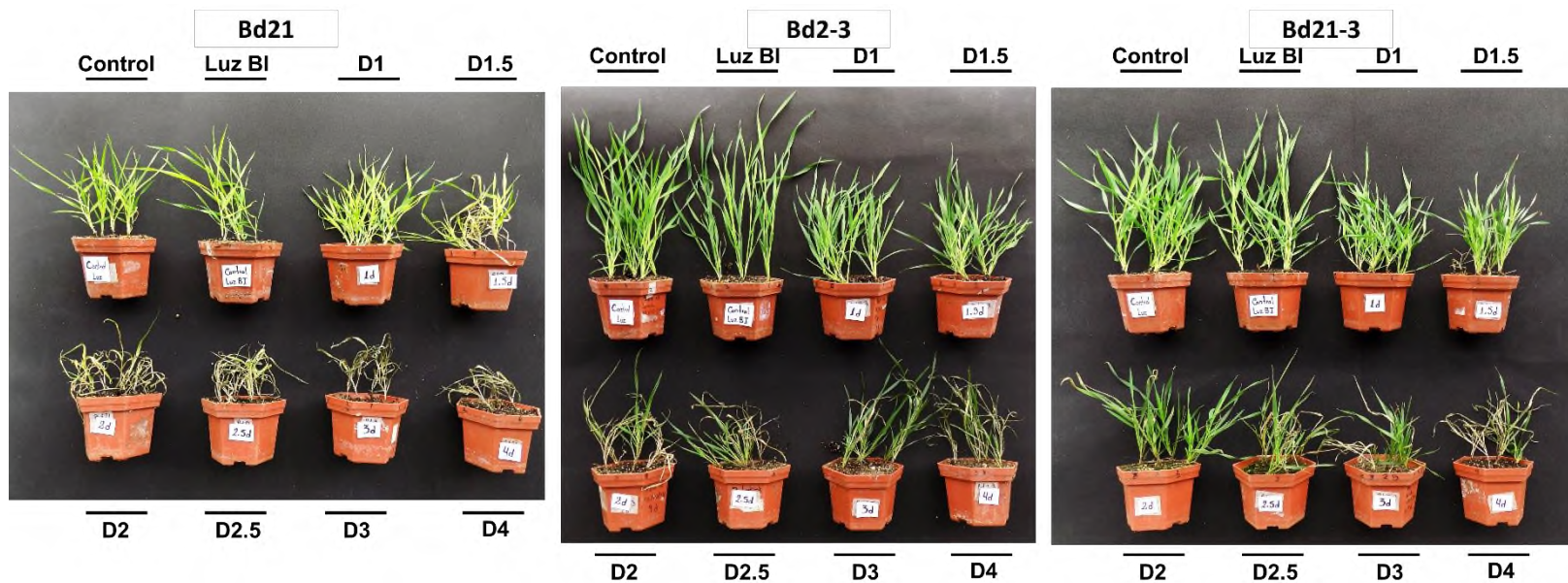


Figura 60. Supervivencia de los ecotipos utilizados de *Brachypodium* del segundo ensayo de inundación.
 Ecotipos: Bd21, Bd2-3 y Bd21-3 en los días 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4, con 23 días de edad, después de 5 días de recuperación

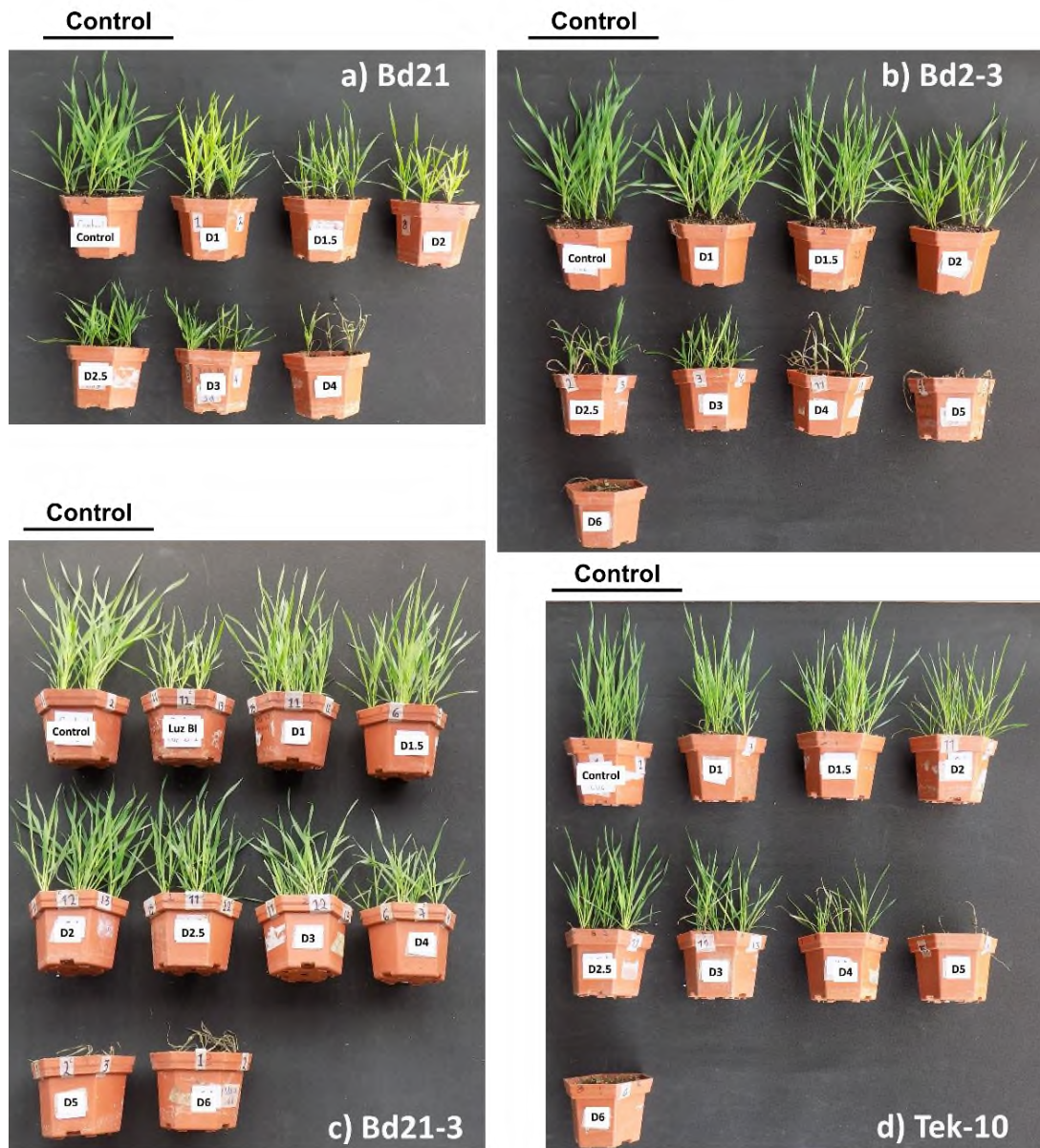


Figura 61. Supervivencia de los diferentes ecotipos de *Brachypodium* utilizados en el primer ensayo.

Comparativa entre ecotipos con una edad de 24 días sometiéndolas a diferentes días de inmersión y con cuatro días de recuperación.

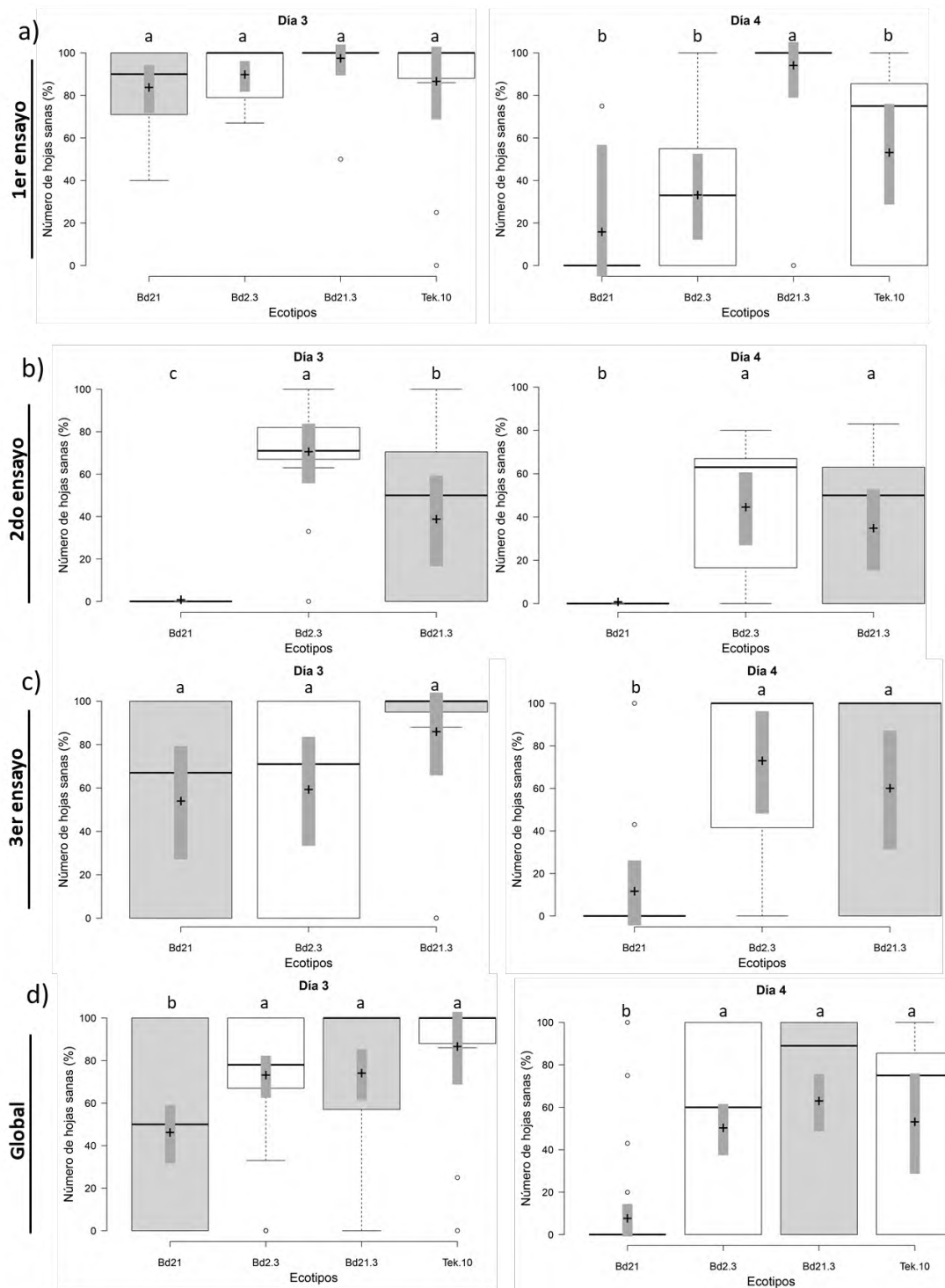


Figura 62. LT_{50} de los ecotipos utilizados Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek 10.

Las líneas centrales representan las medianas; los límites de cada caja indican los percentiles 25 y 75 según lo determinado por el software R; los bigotes se extienden 1.5 veces en 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 con el análisis con el software Minitab 17 con la prueba de Tukey.

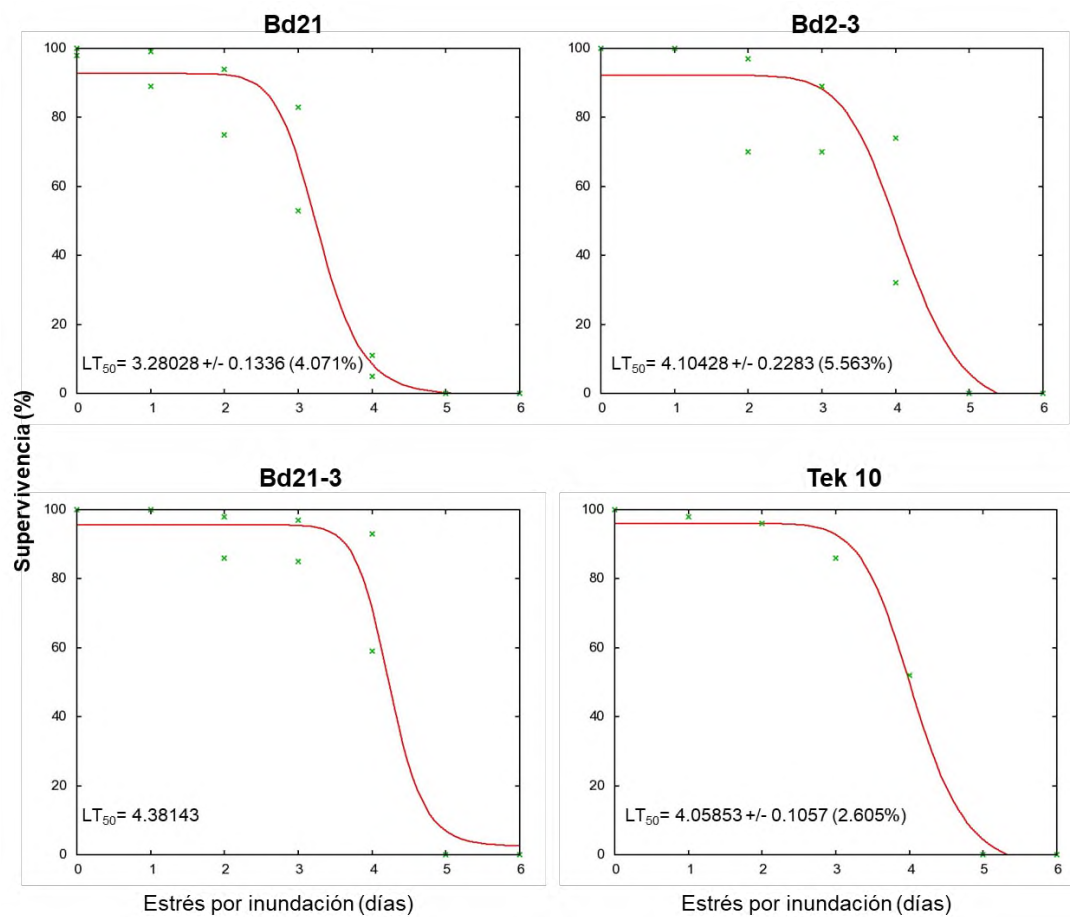


Figura 63. LT_{50} de los ecotipos utilizados Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek 10.
 Se muestran los resultados obtenidos de dos experimentos independientes para los ecotipos Bd21, Bd2-3, Bd21-3 y Tek 10.

7.14 Tolerancia por estrés para las líneas de T-DNA

Para los ensayos por inundación solo se realizaron dos con las líneas de T-DNA homocigotas JJ16414 JJ20631 (Bradi2g33110, A1TZn) transportador de zinc y una con Bradi5g02420, (A4RT, retro transcriptasa). Con la segunda línea sólo se pudo hacer un ensayo, debido a la baja cantidad de semillas obtenidas a partir de la segunda generación, lo cual se debe considerar como el primer fenotipo expresado por esta línea (Tabla 17).

Tabla 17. Semillas obtenidas de plantas homocigotas de las líneas de T-DNA (Segunda generación).

Gen	Líneas	Código	Semillas totales
Bradi5g02420	JJ16414	A4RT-5	43
Bradi2g33110	JJ20631	A1TZn-6	230

Para los ensayos por inundación, los tiempos de recolección de las plantas fueron de 3, 3.5 y 4 días de inmersión, seguido de la toma de datos para el porcentaje de hojas sanas después de 6 días de recuperación. En el primer ensayo, se observa que no se presenta diferencias entre las líneas de T-DNA con respecto a su control del día 3 y 3.5 de estrés, sin embargo, para el día 4 se observa que algunas plantas de las líneas A4RT.5 y A1TZn.6 muestran un menos vigor con respecto al control Bd21-3 (Fig. 64 y 66). Al cuantificar estos datos, sí se registró una diferencia estadística en la línea A4RT.5 con respecto a Bd21 en el número de hojas sanas (Fig. 65).

Para A1TZn.6, no se observó en ningún ensayo alguna diferencia estadística, no obstante, se apreció una disminución en la cantidad de hojas sanas en A1TZn.6. La ausencia de alguna diferencia estadística detectable en los ensayos realizados para Bradi2g33110 se pudo deber a varias razones. Por ejemplo, al resultado de la RT-PCR indicando que es una mutante “*leaky*” que aún puede tener una expresión, a que es un gen que pertenece a una familia poligénica donde alguno otro puede sustituir su función, o que no probamos las condiciones correctas donde se puede observar un fenotipo (salinidad, metales pesados, pH de suelo), o a que el transcrito tiene un efecto local, por ejemplo, en las hojas maduras.

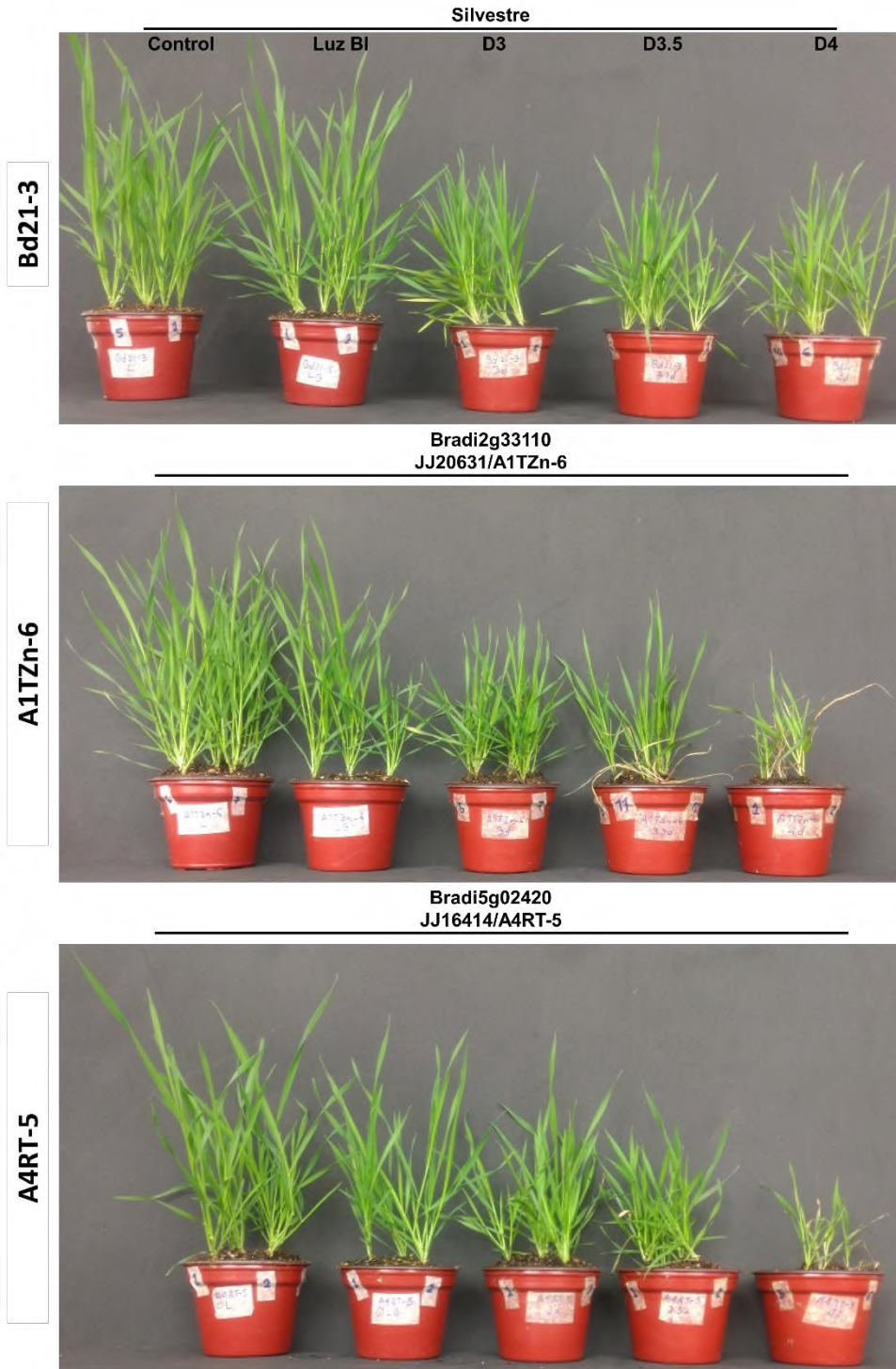


Figura 64. Plantas silvestres y de T-DNA de *Brachypodium* sometidas a estrés por inundación. Plantas inundadas a los 14 días después de la germinación por intervalos de tiempo. Las imágenes se tomaron 21 días después de la germinación.

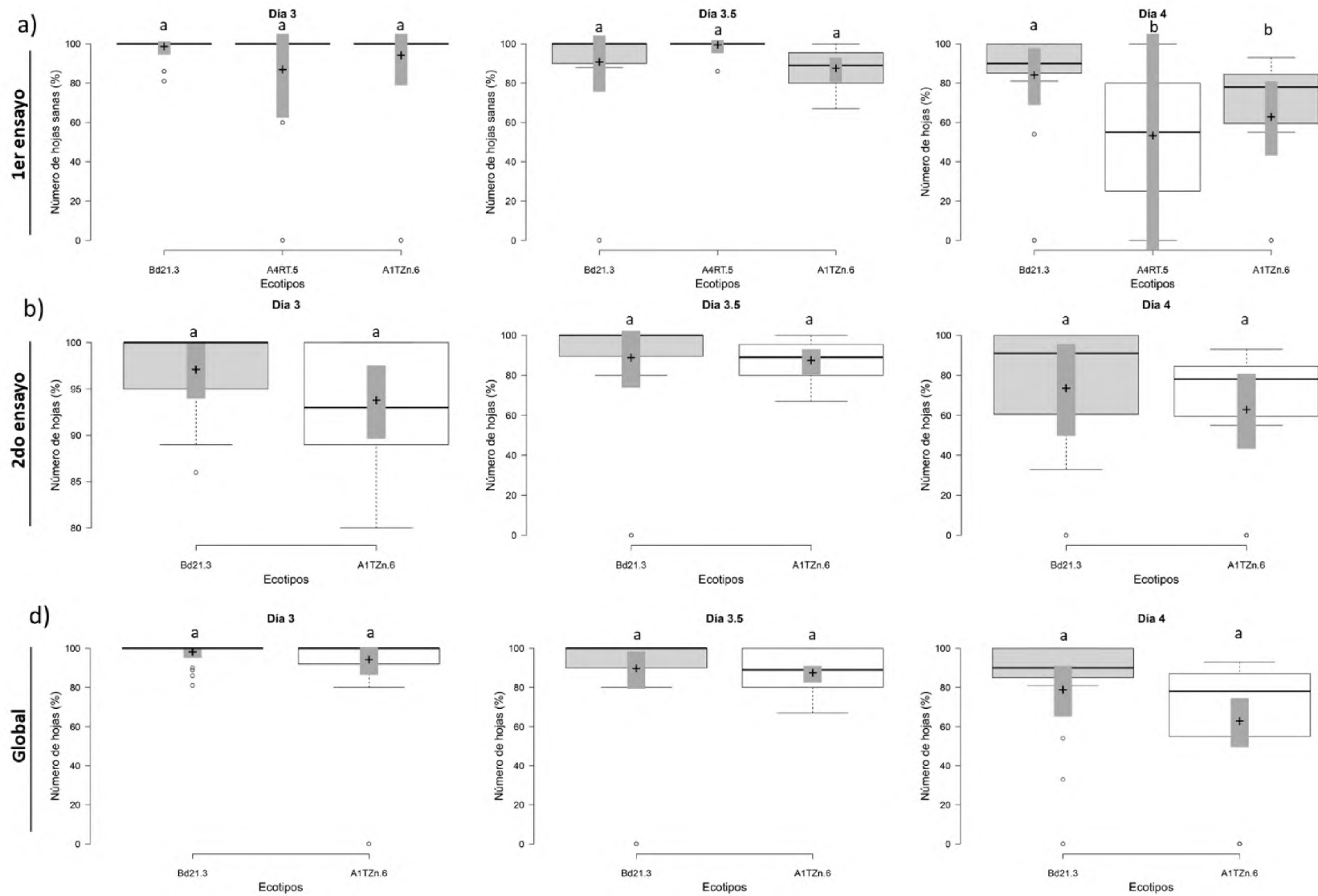


Figura 65. Porcentaje de hojas sanas de las líneas de T-DNA.



Figura 66. Plantas silvestres y de T-DNA de *Brachypodium* sometidas a estrés por inundación.
Plantas que corresponden al segundo ensayo por inundación; 26 días de edad después de la germinación.

Figura 65 (continuación). 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 con el Método de Tukey.

7.15 Mutagénesis por EMS en *Brachypodium distachyon* ecotipo Bd21

Como una metodología alternativa y paralela a la genotipificación de líneas de T-DNA procedentes del JGI-DOE (Anexo J), se realizó un ensayo de mutagénesis por EMS en el ecotipo Bd21. Las primeras plantas en germinar se observaron a los 4 días, después de semana y media se notó una germinación más generalizada, siendo este un comportamiento similar al de las plantas sin tratamiento. De las 1900 semillas, sembradas, se obtuvo un 80% de germinación (Fig. 67).



Figura 67. Germinación de *Brachypodium distachyon* del ecotipo Bd21 en su primera semana.

En el transcurso del desarrollo del ecotipo Bd21, se lograron observar cuatro plantas con diferente desarrollo y floración temprana. La Fig. 68 muestra los diferentes rasgos encontrados, por ejemplo, a) y b) presentaron un fenotipo enano y con una floración temprana con tan sólo 4 hojas, mientras que Bd21 florece al tener aproximadamente 12 hojas. No obstante, la planta fotografiada en a) murió

prematuramente y b) produjo 2 semillas con embrión de las cuales ninguna germinó en la segunda generación.

Otro tipo de plantas que se observaron son las fotografiadas en la Fig. 69. La planta c) tenía un crecimiento normal, pero contaba en los bordes de sus hojas una línea de color beige, sin embargo, esta planta no logro sobrevivir hasta madurez. La planta d) presentó en sus hojas un fenotipo comúnmente llamado en inglés "curly" con hojas curvadas, esta planta tampoco llegó a madurez. El fenotipo de estas cuatro plantas sugiere que se pudieron haber tratado de mutantes con ganancia de función.

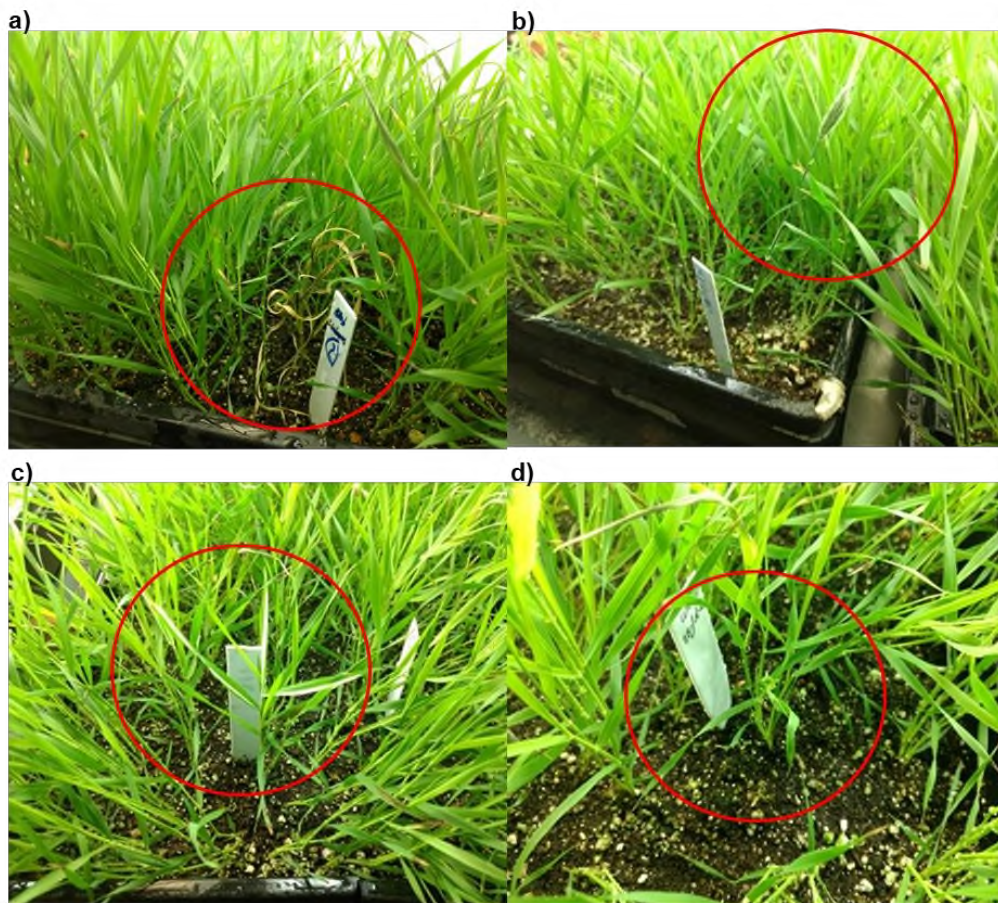


Figura 68. Aspectos fenotípicos encontrados durante el desarrollo de Bd-21 con el mutágeno EMS.

a) y b) planta enana con floración temprana, c) hojas con líneas amarillas y d) hojas tipo curly.

El resto de las plantas pudo no haber tenido un fenotipo observable en la generación T1 por permanecer como silvestres, con mutaciones inducidas en secciones no expresables del DNA, o por tener mutaciones recesivas que se observarán sólo en la generación T2 o superiores. La colección mutagenizada completa se colectó y se encuentra disponible en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNPA. No se sembró a generaciones superiores para ocupar el espacio para las mutantes de T-DNA.

8. Conclusiones

En la base de datos de T-DNA y GEO GSE7422 de 48 h de *Brachypodium* por estrés en inundación se encontraron 20 genes que tienen una línea de T-DNA en *Brachypodium* en la colección del JGI-DOE. Sin embargo, solo 10 líneas de 7 genes se encontraron disponibles, y dos se pudieron analizar en su estado homocigoto en estrés por inundación: JJ16414 y JJ20631.

Al someter a las líneas de T-DNA homocigotas a un estrés por inundación se observó una disminución en el vigor de la planta, y para la línea JJ16414, sí se pudo demostrar estadísticamente. Lo anterior indica que el mecanismo de inducción de retrotransposones en la planta puede aportar a su capacidad de tolerar el estrés por inundación, probablemente bajo el esquema de "esponjas" de miRNA.

Con los análisis de filogenia se identificaron y analizaron familias involucradas en la CTE, señalización y transporte de iones. Con ello, se analizó su comportamiento en el sentido de los niveles de regulación tanto positiva como negativamente, estructura génica, posible papel como isoenzimas y mecanismos de acción durante el estrés por inundación.

El uso del ecotipo Bd21-3 usado como fondo genético por el JGI-DOE, nos permitió identificarlo como tolerante ante el estrés por inundación, resultando superior a los ecotipos (Bd2-3 y Tek-10) ya utilizados por el equipo de investigación.

En la mutagénesis en *Brachypodium* por EMS se obtuvieron algunos ejemplares con fenotipos diferentes, pero no lograron sobrevivir, aun se necesita hacer un segundo sembrado para observar alguna diferencia fenotípica en estado homocigoto.

9. Perspectivas y Recomendaciones

Debido a que hubo baja germinación que no permitió un análisis más extenso de la mutante de T-DNA asociada a una retrotranscriptasa, que por razones de multigenes no se observó un fenotipo para el transportador de zinc, o que no se pudo recuperar mutantes para transportadores y miembros de CTE, se podrían utilizar nuevas herramientas moleculares de edición de genes como CRISPR-Cas9 que permitiría la obtención de mutantes no solo de los genes encontrados en este trabajo, sino también de aquellos genes activos en las familias relacionadas para obtener mutantes múltiples y observar fenotipos.

Realizar ensayos individuales y específicos para las familias de genes, un ejemplo sería el transportador de zinc para someterlo a variabilidad de este microelemento y observar el comportamiento con este ion.

El mecanismo de "esponjas" de miRNA se debe abordar con construcciones inducibles de este gen y acompañarse de análisis bioinformático de posibles secuencias de miRNAs, y mediciones de expresión cuantitativa de los miRNAs probables para determinar los detalles de este mecanismo. Esto constituye la mayor perspectiva para continuar con la investigación de este trabajo.

Bibliografía

- Abreu-Neto, J. B., Turchetto-Zolet, A. C., de Oliveira, L. F. V., Bodanese Zanettini, M. H., & Margis-Pinheiro, M. (2013). Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. *FEBS Journal*, *280*(7), 1604–1616. <https://doi.org/10.1111/febs.12159>
- Akman, M., Bhikharie, A. V., McLean, E. H., Boonman, A., Visser, E. J. W., Schranz, M. E., & van Tienderen, P. H. (2012). Wait or escape? Contrasting submergence tolerance strategies of *Rorippa amphibia*, *Rorippa sylvestris* and their hybrid. *Annals of Botany*, *109*(7), 1263–1276. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs059>
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., ... Ecker, J. R. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, *301*(5633), 653–657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>
- Argüello, J. M. (2003). Identification of Ion-Selectivity Determinants in Heavy-Metal Transport P 1B -type ATPases. *Journal of Membrane Biology*, *195*(2), 93–108. <https://doi.org/10.1007/s00232-003-2048-2>
- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Ronald, P., Ismail, A., Heuer, S., & Mackill, D. (2010). Submergence Tolerant Rice: SUB1's Journey from Landrace to Modern Cultivar. *Rice*, *3*(2–3), 138–147. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9048-5>
- Bailey-Serres, J., Lee, S. C., & Brinton, E. (2012). Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiology*, *160*(4), 1698–1709. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208173>
- Bailey-Serres, J., & Voesenek, L. A. C. J. (2008). Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 313–339. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092752>
- Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M. O., & Enríquez, J. A. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the *mammalian* electron transport chain. *Cell Metabolism*, *16*(3), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.015>
- Banti, V., Giuntoli, B., Gonzali, S., Loreti, E., Magneschi, L., Novi, G., ... Perata, P. (2013). Low oxygen response mechanisms in green organisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(3), 4734–4761. <https://doi.org/10.3390/ijms14034734>
- Berardini, T. Z., Reiser, L., Li, D., Mezheritsky, Y., Muller, R., Strait, E., & Huala, E. (2015). The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the gold standard; annotated reference plant genome. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *53*(8), 474–485. <https://doi.org/10.1002/dvg.22877>
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M.-C., Estreicher, A., Gasteiger, E., ... Schneider, M. (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research*, *31*(1), 365–370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12520024>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, *33*(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2014.12.006>

- Bragg, J. N., Wu, J., Gordon, S. P., Guttman, M. E., Thilmony, R., Lazo, G. R., ... Vogel, J. P. (2012). Generation and Characterization of the Western Regional Research Center *Brachypodium* T-DNA Insertional Mutant Collection. *PLoS ONE*, 7(9), e41916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041916>
- Brett, C. L., Donowitz, M., & Rao, R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(2), C223–C239. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00360.2004>
- Brkljacic, J., Grotewold, E., Scholl, R., Mockler, T., Garvin, D. F., Vain, P., ... Vogel, J. P. (2011). *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiology*, 157(1), 3–13. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179531>
- Cenapred. 2018. Consultado en línea: <http://www.cenapred.gob.mx/>
- Cho, J., & Paszkowski, J. (2017). Regulation of rice root development by a retrotransposon acting as a microRNA sponge. *eLife*, 6, e30038. <https://doi.org/10.7554/eLife.30038>
- Colangelo, E. P., & Guerinot, M. Lou. (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 322–330. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2006.03.015>
- Colmer, T. D. (2003). Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell and Environment*, 26(1), 17–36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00846.x>
- Colmer, T. D., & Pedersen, O. (2008). Underwater photosynthesis and respiration in leaves of submerged wetland plants: gas films improve CO₂ and O₂ exchange. *New Phytologist*, 177(4), 918–926. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02318.x>
- Colmer, T. D., & Voesenek, L. A. C. J. (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology*, 36(8), 665. <https://doi.org/10.1071/FP09144>
- Colmer, T. D., Winkel, A., & Pedersen, O. (2011). A perspective on underwater photosynthesis in submerged terrestrial wetland plants. *AoB PLANTS*, 2011, plr030. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr030>
- Dar, M. H., de Janvry, A., Emerick, K., Raitzer, D., & Sadoulet, E. (2013). Flood-tolerant rice reduces yield variability and raises expected yield, differentially benefitting socially disadvantaged groups. *Scientific Reports*, 3(1), 3315. <https://doi.org/10.1038/srep03315>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096–1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Fukao, T., & Bailey-Serres, J. (2008). Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16814–16819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807821105>
- 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 ONLINE*, 18(8), 2021–2034. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043000>

- Gachomo, E. W., Jimenez-Lopez, J. C., Baptiste, L., & Kotchoni, S. O. (2014). GIGANTUS1 (GTS1), a member of Transducin/WD40 protein superfamily, controls seed germination, growth and biomass accumulation through ribosome-biogenesis protein interactions in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-37>
- Gaitán-Solís, E., Taylor, N. J., Siritunga, D., Stevens, W., & Schachtman, D. P. (2015). Overexpression of the transporters AtZIP1 and AtMTP1 in cassava changes zinc accumulation and partitioning. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 492. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00492>
- Galindo-González, L., Mhiri, C., Deyholos, M. K., & Grandbastien, M.-A. (2017). LTR-retrotransposons in plants: Engines of evolution. *Gene*, *626*, 14–25. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.04.051>
- Gibbs, D. J., Conde, J. V., Berckhan, S., Prasad, G., Mendiondo, G. M., & Holdsworth, M. J. (2015). Group VII Ethylene Response Factors Coordinate Oxygen and Nitric Oxide Signal Transduction and Stress Responses in Plants. *Plant Physiology*, *169*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00338>
- Gibbs, D. J., Lee, S. C., Md Isa, N., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G. W., ... Holdsworth, M. J. (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature*, *479*(7373), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature10534>
- Gibbs, D. J., Md Isa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., ... Holdsworth, M. J. (2014). Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular Cell*, *53*(3), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.020>
- Giuntoli, B., Lee, S. C., Licausi, F., Kosmacz, M., Oosumi, T., van Dongen, J. T., ... Perata, P. (2014). A Trihelix DNA Binding Protein Counterbalances Hypoxia-Responsive Transcriptional Activation in *Arabidopsis*. *PLoS Biology*, *12*(9), e1001950. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001950>
- Gladyshev, E. A., & Arkhipova, I. R. (2011). A widespread class of reverse transcriptase-related cellular genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(51), 20311–20316. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100266108>
- Grandbastien, M.-A. (2015). LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1849*(4), 403–416. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.017>
- Griffiths, J., Catoni, M., Iwasaki, M., & Paszkowski, J. (2018). Sequence-Independent Identification of Active LTR Retrotransposons in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, *11*(3), 508–511. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.012>
- Guerinot, M. Lou. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1465*(1–2), 190–198. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-3)
- Guerriero, G., Hausman, J.-F., & Ezcurra, I. (2015). WD40-Repeat Proteins in Plant Cell Wall Formation: Current Evidence and Research Prospects. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 1112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01112>
- Gupta, K. J., & Igamberdiev, A. U. (2016). Reactive Nitrogen Species in Mitochondria and

- Their Implications in Plant Energy Status and Hypoxic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 369. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00369>
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X.-J., Kawano, R., Sakakibara, H., ... Ashikari, M. (2009). The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*, 460(7258), 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nature08258>
- He, D., Zhang, H., & Yang, P. (2014). The mitochondrion-located protein OsB12D1 enhances flooding tolerance during seed germination and early seedling growth in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(8), 13461–13481. <https://doi.org/10.3390/ijms150813461>
- Hinz, M., Wilson, I. W., Yang, J., Buerstenbinder, K., Llewellyn, D., Dennis, E. S., ... Dolferus, R. (2010). *Arabidopsis* RAP2.2: An Ethylene Response Transcription Factor That Is Important for Hypoxia Survival. *Plant Physiology*, 153(2), 757–772. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155077>
- Horan, K., Jang, C., Bailey-Serres, J., Mittler, R., Shelton, C., Harper, J. F., ... Girke, T. (2008). Annotating Genes of Known and Unknown Function by Large-Scale Coexpression Analysis. *Plant Physiology*, 147(1), 41–57. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117366>
- Horan, K., Lauricha, J., Bailey-Serres, J., Raikhel, N., & Girke, T. (2005). Genome Cluster Database. A Sequence Family Analysis Platform for *Arabidopsis* and Rice. *PLANT PHYSIOLOGY*, 138(1), 47–54. <https://doi.org/10.1104/pp.104.059048>
- Igamberdiev, A. U., Bykova, N. V., Shah, J. K., & Hill, R. D. (2010). Anoxic nitric oxide cycling in plants: participating reactions and possible mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 393–404. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01314.x>
- Ismond, K. P., Dolferus, R., de Pauw, M., Dennis, E. S., & Good, A. G. (2003). Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiology*, 132(3), 1292–1302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857811>
- Ito, H., Kim, J.-M., Matsunaga, W., Saze, H., Matsui, A., Endo, T. A., ... Seki, M. (2016). A Stress-Activated Transposon in *Arabidopsis* Induces Transgenerational Abscisic Acid Insensitivity. *Scientific Reports*, 6(1), 23181. <https://doi.org/10.1038/srep23181>
- Jackson M B (2004). The Impact of Flooding Stress on Plants and Crops. Disponible en línea: http://www.plantstress.com/Articles/waterlogging_i/waterlog_i.htm
- Jackson, M. B., & Ismail, A. M. (2015). Introduction to the Special Issue: Electrons, water and rice fields: plant response and adaptation to flooding and submergence stress. *AoB Plants*, 7, plv078. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv078>
- James, R. A., Blake, C., Zwart, A. B., Hare, R. A., Rathjen, A. J., & Munns, R. (2013). Impact of ancestral wheat sodium exclusion genes Nax1 and Nax2 on grain yield of durum wheat on saline soils. *Functional Plant Biology*, 39(7), 609. <https://doi.org/10.1071/FP12121>
- JGI-DOE. Consultado en línea: <https://jgi.doe.gov/our-science/science-programs/plant-genomics/brachypodium/brachypodium-t-dna-collection/>

- Johnson, O., & Liu, J. (2006). A traveling salesman approach for predicting protein functions. *Source Code for Biology and Medicine*, 1, 3. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-1-3>
- Jung, K.-H., Seo, Y.-S., Walia, H., Cao, P., Fukao, T., Canlas, P. E., ... Ronald, P. C. (2010). The Submergence Tolerance Regulator Sub1A Mediates Stress-Responsive Expression of AP2/ERF Transcription Factors. *Plant Physiology*, 152(3), 1674–1692. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152157>
- Kato-Noguchi, H. (2000). Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in lettuce roots in anoxia. *Physiologia Plantarum*, 109(1), 28–33. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.100105.x>
- Kim, Y., Schumaker, K. S., & Zhu, J.-K. (2006). EMS Mutagenesis of *Arabidopsis*. In *Arabidopsis Protocols* (Vol. 323, pp. 101–104). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:101>
- Krämer, U., Talke, I. N., & Hanikenne, M. (2007). Transition metal transport. *FEBS Letters*, 581(12), 2263–2272. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.04.010>
- Kulichikhin, K. Y., Chirkova, T. V., & Fagerstedt, K. V. (2008). Intracellular pH in rice and wheat root tips under hypoxic and anoxic conditions. *Plant Signaling & Behavior*, 3(4), 240–242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19704641>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016a). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, S., & Trivedi, P. K. (2016b). Heavy Metal Stress Signaling in Plants. In *Plant Metal Interaction* (pp. 585–603). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00025-4>
- Kürsteiner, O., Dupuis, I., & Kuhlemeier, C. (2003). The pyruvate decarboxylase1 gene of *Arabidopsis* is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiology*, 132(2), 968–978. <https://doi.org/10.1104/pp.102.016907>
- Lee, S. C., Mustroph, A., Sasidharan, R., Vashisht, D., Pedersen, O., Oosumi, T., ... Bailey-Serres, J. (2011). Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytologist*, 190(2), 457–471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03590.x>
- Leinonen, R., Diez, F. G., Binns, D., Fleischmann, W., Lopez, R., & Apweiler, R. (2004). UniProt archive. *Bioinformatics*, 20(17), 3236–3237. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth191>
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., ... Chen, R. (2013). Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biology*, 13(1), 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-114>
- Li, X., Ma, D., Lu, S. X., Hu, X., Huang, R., Liang, T., ... Liu, H. (2016). Blue Light- and Low Temperature-Regulated COR27 and COR28 Play Roles in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *The Plant Cell*, 28(11), 2755–2769. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00354>
- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D. A., Giuntoli, B., Giorgi, F. M., Voesenek, L. A. C. J., ... van Dongen, J. T. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature*, 479(7373), 419–422. <https://doi.org/10.1038/nature10536>

- Lisch, D. (2013). How important are transposons for plant evolution? *Nature Reviews Genetics*, 14(1), 49–61. <https://doi.org/10.1038/nrg3374>
- López-Millán, A.-F., Ellis, D. R., & Grusak, M. A. (2004). Identification and Characterization of Several New Members of the ZIP Family of Metal Ion Transporters in *Medicago Truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 54(4), 583–596. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000038271.96019.aa>
- Lu, M., Li, Z., Liang, J., Wei, Y., Rensing, C., & Wei, G. (2016). Zinc Resistance Mechanisms of P1B-type ATPases in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020. *Scientific Reports*, 6(1), 29355. <https://doi.org/10.1038/srep29355>
- Manson, R.H., E.J. Jardel P., M. Jiménez-Espinoza y C.A. Escalante-Sandoval. 2009. Perturbaciones y desastres naturales: impacto sobre las ecorregiones, la biodiversidad y el bienestar socioeconómico. En: R. Dirzo, R. González e I.J. March (Compiladores) Capital Natural de México. Vol. II. Estado de conservación y tendencias de cambio. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F. Pp.131-184
- Mantri, N. L., Ford, R., Coram, T. E., & Pang, E. C. K. (2010). Evidence of unique and shared responses to major biotic and abiotic stresses in chickpea. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 286–292. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2010.05.003>
- Mendondo, G. M., Gibbs, D. J., Szurman-Zubrzycka, M., Korn, A., Marquez, J., Szarejko, I., ... Holdsworth, M. J. (2016). Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase *PROTEOLYSIS6*. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/pbi.12334>
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H., & Appel, T. (2001). Plant Nutrients. In *Principles of Plant Nutrition* (pp. 1–13). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2_1
- Mickelbart, M. V., Hasegawa, P. M., & Bailey-Serres, J. (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*, 16(4), 237–251. <https://doi.org/10.1038/nrg3901>
- Miller, J. C., Chezem, W. R., & Clay, N. K. (2016). Ternary WD40 Repeat-Containing Protein Complexes: Evolution, Composition and Roles in Plant Immunity. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1108. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01108>
- Mills, R. F., Peaston, K. A., Runions, J., & Williams, L. E. (2012). HvHMA2, a P1B-ATPase from Barley, Is Highly Conserved among Cereals and Functions in Zn and Cd Transport. *PLoS ONE*, 7(8), e42640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042640>
- Mills, R. F., Valdes, B., Duke, M., Peaston, K. A., Lahner, B., Salt, D. E., & Williams, L. E. (2010). Functional Significance of AtHMA4 C-Terminal Domain In Planta. *PLoS ONE*, 5(10), e13388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013388>
- Minami, A., Yano, K., Gamuyao, R., Nagai, K., Kuroha, T., Ayano, M., ... Reuscher, S. (2018). Time-Course Transcriptomics Analysis Reveals Key Responses of Submerged Deepwater Rice to Flooding. *Plant Physiology*, 176(4), 3081–3102. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00858>

- Mishra, A. K., Puranik, S., & Prasad, M. (2012). Structure and regulatory networks of WD40 protein in plants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21(S1), 32–39. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0134-1>
- Mithran, M., Paparelli, E., Novi, G., Perata, P., & Loreti, E. (2014). Analysis of the role of the pyruvate decarboxylase gene family in *Arabidopsis thaliana* under low-oxygen conditions. *Plant Biology*, 16(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/plb.12005>
- Munns, R., James, R. A., Xu, B., Athman, A., Conn, S. J., Jordans, C., ... Gilliham, M. (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 30(4), 360–364. <https://doi.org/10.1038/nbt.2120>
- Mustroph, A., Lee, S. C., Oosumi, T., Zanetti, M. E., Yang, H., Ma, K., ... Bailey-Serres, J. (2010). Cross-Kingdom Comparison of Transcriptomic Adjustments to Low-Oxygen Stress Highlights Conserved and Plant-Specific Responses. *Plant Physiology*, 152(3), 1484–1500. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151845>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., ... Shinozaki, K. (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: Analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology*, 55(3), 327–342. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0685-1>
- Nicky, J. A., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–3543. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>
- Niroula, R.K., Pucciariello, C., Ho, V.T., et al., (2012). SUB1A-dependent and -independent mechanisms are involved in the flooding tolerance of wild rice species. *Plant J.* 72, 282-293.
- Niehaus, T. D., Thamm, A. M., de Crécy-Lagard, V., & Hanson, A. D. (2015). Proteins of unknown biochemical function - A persistent problem and a roadmap to help overcome it. *Plant Physiology*, 169(3), pp.00959.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00959>
- ONU y WWAP. (2003). Primer informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo: agua para todos, agua para la vida. UNESCO
- Østergaard, L., & Yanofsky, M. F. (2004). Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39(5), 682–696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02149.x>
- Ouyang, Y., Huang, X., Lu, Z., & Yao, J. (2012). Genomic survey, expression profile and co-expression network analysis of OsWD40 family in rice. *BMC Genomics*, 13(1), 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-100>
- Papierniak, A., Kozak, K., Kendziorek, M., Barabasz, A., Palusińska, M., Tiuryn, J., ... Antosiewicz, D. M. (2018). Contribution of NtZIP1-Like to the Regulation of Zn Homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 185. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00185>
- Pardo, J. M., Cubero, B., Leidi, E. O., & Quintero, F. J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1181–1199. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj114>

- Pardos J A. (2004). Respuestas de las plantas al anegamiento del suelo. *Invest Agrar: Sist Recur For. Fuera de serie*, 101-107.
- Pedersen, O., Rich, S. M., & Colmer, T. D. (2009). Surviving floods: leaf gas films improve O₂ and CO₂ exchange, root aeration, and growth of completely submerged rice. *The Plant Journal*, 58(1), 147–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03769.x>
- Peña-Castro, J. M., van Zanten, M., Lee, S. C., Patel, M. R., Voesenek, L. A. J. C., 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(3), 434–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04605.x>
- Peng, H. P., Chan, C. S., Shih, M. C., & Yang, S. F. (2001). Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(2), 742–749. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11402202>
- Perata, P., & Voesenek, L. A. C. J. (2007). Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends in Plant Science*, 12(2), 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.12.005>
- Pittman, J. K. (2012). Multiple Transport Pathways for Mediating Intracellular pH Homeostasis: The Contribution of H(+)/ion Exchangers. *Frontiers in Plant Science*, 3, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00011>
- Platten, J. D., Egdane, J. A., & Ismail, A. M. (2013). Salinity tolerance, Na⁺ exclusion and allele mining of HKT1;5 in *Oryza sativa* and *O. glaberrima*: many sources, many genes, one mechanism? *BMC Plant Biology*, 13(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-32>
- Rahman, M., Grover, A., Peacock, W. J., Dennis, E. S., & Ellis, M. H. (2001). Effects of manipulation of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase levels on the submergence tolerance of rice. *Functional Plant Biology*, 28(12), 1231. <https://doi.org/10.1071/PP00137>
- 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(1), 27686. <https://doi.org/10.1038/srep27686>
- Rosenzweig, C., Elliott, J., Deryng, D., Ruane, A. C., Müller, C., Arneth, A., ... Jones, J. W. (2014). Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3268–3273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222463110>
- Saldaña-Zorrilla, S. O., & Sandberg, K. (2009). Impact of climate-related disasters on human migration in Mexico: a spatial model. *Climatic Change*, 96(1–2), 97–118. <https://doi.org/10.1007/s10584-009-9577-3>
- Saldaña Zorrilla, PhD, S. O. (2015). *Natural Disasters, Foreign Trade and Agriculture in Mexico*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-17359-7>
- Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B. J., Colmer, T. D., Fagerstedt, K., ... Voesenek, L. A. C. J. (2017). Community recommendations on terminology and

- procedures used in flooding and low oxygen stress research. *New Phytologist*, 214(4), 1403–1407. <https://doi.org/10.1111/nph.14519>
- Sauter, M. (2013). Root responses to flooding. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.03.013>
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., & Bleeker, P. M. (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2381–2392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432030>
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... Wilson, R. K. (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, 326(5956), 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.1178534>
- Schulze, W. X., Schneider, T., Starck, S., Martinoia, E., & Trentmann, O. (2012). Cold acclimation induces changes in *Arabidopsis* tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters. *The Plant Journal*, 69(3), 529–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04812.x>
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., ... Kunze, R. (2003). ARAMEMNON, a Novel Database for *Arabidopsis* Integral Membrane Proteins. *PLANT PHYSIOLOGY*, 131(1), 16–26. <https://doi.org/10.1104/pp.011577>
- Semarnat-INE (2006). Tercera comunicación de México ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, México
- 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(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-5>
- Setter, T. L., Waters, I., Sharma, S. K., Singh, K. N., Kulshreshtha, N., Yaduvanshi, N. P. S., ... Cakir, M. (2009). Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India: the importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. *Annals of Botany*, 103(2), 221–235. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn137>
- Shiono, K., Ogawa, S., Yamazaki, S., Isoda, H., Fujimura, T., Nakazono, M., & Colmer, T. D. (2011). Contrasting dynamics of radial O₂-loss barrier induction and aerenchyma formation in rice roots of two lengths. *Annals of Botany*, 107(1), 89–99. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq221>
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Singh, U., Dar, M., Singh, S., Zaidi, N., Bari, M., Mackill, D., Collard, B., Singh, V., Singh, J., Reddy, J., y cols. (2013). Field performance, dissemination, impact and tracking of submergence tolerant (Sub1) rice varieties in South Asia. *SABRAO Journal of Breeding & Genetics* . 45(1), 112-131.
- Springer, P. S. (2000). Gene traps: tools for plant development and genomics. *The Plant Cell*, 12(7), 1007–1020. <https://doi.org/10.1105/TPC.12.7.1007>

- Steffens, B., & Rasmussen, A. (2016). The Physiology of Adventitious Roots. *Plant Physiology*, 170(2), 603–617. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>
- Stirnemann, C. U., Petsalaki, E., Russell, R. B., & Müller, C. W. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.003>
- Subrahmanian, N., Remacle, C., & Hamel, P. P. (2016). Plant mitochondrial Complex I composition and assembly: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(7), 1001–1014. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.01.009>
- Suzuki, N., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., & Sano, H. (2002). Functional characterization of a heavy metal binding protein Cdl19 from *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 32(2), 165–173. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12383082>
- Swindell, W. R. (2006). The Association Among Gene Expression Responses to Nine Abiotic Stress Treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 174(4), 1811–1824. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.061374>
- Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., Honys, D., Cheng, N.-H., Bock, K. W., ... Hirschi, K. D. (2004). Expression Patterns of a Novel AtCHX Gene Family Highlight Potential Roles in Osmotic Adjustment and K⁺ Homeostasis in Pollen Development. *PLANT PHYSIOLOGY*, 136(1), 2532–2547. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046003>
- TAIR. Obtenido de <https://www.arabidopsis.org/>
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland
- Takahashi, N., Kajihara, T., Okamura, C., Kim, Y., Katagiri, Y., Okushima, Y., ... Umeda, M. (2013). Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots. *Current Biology: CB*, 23(18), 1812–1817. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.051>
- Takahashi, R., Bashir, K., Ishimaru, Y., Nishizawa, N. K., & Nakanishi, H. (2012, December). The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. *Plant Signaling & Behavior*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4161/psb.22454>
- Tamang, B., & Fukao, T. (2015). Plant Adaptation to Multiple Stresses during Submergence and Following Desubmergence. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30164–30180. <https://doi.org/10.3390/ijms161226226>
- Tehseen, M., Cairns, N., Sherson, S., & Cobbett, C. S. (2010). Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics*, 2(8), 556. <https://doi.org/10.1039/c003484c>
- The Arabidopsis Genome, I. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2015). Oxygen Sensing and Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 345–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114813>

- Vatansever, R., Filiz, E., & Ozyigit, I. I. (2015). Genome-wide analysis of iron-regulated transporter 1 (IRT1) genes in plants. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(4), 516–523. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0014-4>
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Voesenek, L. A. C. J., & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, 206(1), 57–73. <https://doi.org/10.1111/nph.13209>
- Voesenek, L. A. C. J., Colmer, T. D., Pierik, R., Millenaar, F. F., & Peeters, A. J. M. (2006). How plants cope with complete submergence. *New Phytologist*, 170(2), 213–226. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01692.x>
- Voesenek, L. A. C. J., van Veen, H., & Sasidharan, R. (2014). Learning from nature: the use of non-model species to identify novel acclimations to flooding stress. *AoB PLANTS*, 6. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu016>
- Vogel (2009). Obtenido de: <https://jgi.doe.gov/our-science/science-programs/plant-genomics/brachypodium/>
- Vogel (2014). Obtenido de: lab 11-7-2014, <http://1ofdmq2n8tc36m6i46scovo2e-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2015/05/T-DNA-genotyping.pdf>
- Vogel, J., & Hill, T. (2008). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Reports*, 27(3), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0472-y>
- Vogel, M. O., Moore, M., König, K., Pecher, P., Alsharafa, K., Lee, J., & Dietz, K.-J. (2014). Fast Retrograde Signaling in Response to High Light Involves Metabolite Export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF Transcription Factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(3), 1151–1165. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121061>
- Weits, D. A., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., Hubberten, H.-M., Riegler, H., ... Licausi, F. (2014). *Plant cysteine oxidases* control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Communications*, 5(1), 3425. <https://doi.org/10.1038/ncomms4425>
- Williams, L. E., Pittman, J. K., & Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1–2), 104–126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10748249>
- Xu, C., & Min, J. (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & Cell*, 2(3), 202–214. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1018-1>
- Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., ... Mackill, D. J. (2006). Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*, 442(7103), 705–708. <https://doi.org/10.1038/nature04920>
- Yang, X.-E., Jin, X.-F., Feng, Y., & Islam, E. (2005). Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance/Hyperaccumulation in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(9), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00144.x>
- Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2014). Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytologist*, 202(4), 1142–1156. <https://doi.org/10.1111/nph.12739>

- Yu, Q., Wang, B., Li, N., Tang, Y., Yang, S., Yang, T., ... Asmutola, P. (2017). CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines. *Scientific Reports*, 7(1), 11874. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12262-1>
- Yung-Tsi, B., Haun, W. J., Xu, W. W., Grant, D., Stacey, M. G., Nelson, R. T., ... Vance, C. P. (2011). Phenotypic and genomic analyses of a fast neutron mutant population resource in soybean. *Plant Physiology*, 156(1), 240–253. <https://doi.org/10.1104/pp.110.170811>

Anexo B. Secuencias genómicas utilizadas para el diseño de oligonucleótidos

En subrayado y el color azul turquesa indica la región donde se diseñaron los oligonucleótidos de PCR, en negritas de color fucsia los de RT-PCR. El color amarillo indica las 500 de donde se encuentra el sitio de inserción del T-DNA y el rojo indica el sitio de inserción del T-DNA.

5'UTR



3'UTR



Exón



>Bradi5g02420

ATGGGTGGAGTGATCGCCCCCTTCAAGGGCCGTAAGGAAGTTCTCTTGAAGTCGGTGGCTCAGGGCAT
CCCAACATATGTCATGAGTTGCTTCCAGATTCTTTAACTATTTGTGATAAGCTAAGGCAACCAATATC
AAACTTCTGGTAGGGTACTGAAGAGGGGAAGAAGGTACATTGGAGATCTTGGGACTGGTTATCATCACC
AAAGTAATTGGGTGGAATGGGCTTCCGGGAATCATGGCAATCTTTAATCAAGCTATGCTTGGAAAACAATG
TTG**GAGGTTATTGACCAAACCAA**ATTCTCTAAGCGCCCGGGTGTAAAGGGTCGATACTAGCCTGACGG
GGATTTTTGGACAGCACAATGTCCAAGATCATCTTCATACACTTGGCGTAGTATCATGCATGACAAGAA
GCTACTGCAGAAAAGGTATATTCTGGAGAGTTGGAGACAGTAAGCACATAAGCATTTCTTAGGGTCACTGG
ATCCAAGGTATCATCCCTGCCACCTTATTGGCTTACCCTTACATAGATGTTAACCAAACAGTAAACTCT
CTCATGTTGGAAAACGAGCATAGGTGGAATGAAAGTGCTATAAAAAACTAATTTCCGGAGGAGATACCA
GAGAAAATCTTAAGCATACCTATTAGCATAGAGGGGTATAATGATTTCCCTTCCCTGGTCCCCTCCAAA
TCTGTTGCATACACGGTTAGATCAGCATATAATTTGCTGAGAACCTATCGATTCTGGAATAACCGGAGT
TTTTCAGGTAAAGGCTCCTCATCAAACAAGATCCCATGGAGAAGGCTTGAAGAAACTATGGACAATT
CAGTGCCCAAACAAGATGAAGATTGTACTATGGAGAATAACTCACAATTGCCTACCTACAGGTTTCCTA
CTTCGTCAATATGTGACAGAAAATTTGGAAGCAATTAAGAAGGATTATGGCATTTCCCTTAAAACATTTT
TTTTTCATTATCATATTAGCCAATGGATGCTGGACTGGATAACTGAGGCTCCGGCTGACCACTCCATGATC
CTAGCGGTTGCTATGTGGCATAATTTGGGAGAACAGAAATTTGTTCTCGTAATGGTGAGGCACCTGCTCAC
CCTCTTCGTGTGGTGGGAAAATCAAGGCTTATATTAATTTCACTTTGTATAATGGCAGTTCAACG
GGCTGCAACAGG**CGTGAGACCTCGATATCAAT**TCAGAAATGGTCTCTGCCGCCGCAAGGCCTGTACTG
ATCAATGTGGATGCTGCGATCTTTCCCACTCAAGACGAGCAGGCTGTGGCGTGTGGCATGTGACCAC
CAAGAGGTGTTATTGGCAGCAAATCGATGTGCTTTTGATCATAATCCAAAACCCAGAAGTGGCTGAAGCT
CTTGCTGTTTCGTCAAGCCCTCATCTTCGCCAAAAGAGCTAAGGTTTCAGGTAGCTTCTGACTGCCAACG
CTGATAAACAAGGTGCGAGATGTAGGCATCGACAGATCCCTTATTGGCGCCATTGTCCAGGACATCAA
TCTAGTGCTGCAAAGTTTTAA

>Bradi1g00210

GTTTCGCCGATGGCTCGGTTCGCTCCATGTGCTCGGTTAAGGATGAAGGAGCCAGAGCCCACACAC
TTGAAGTCTTCGTGTGCCTTGTGCTCAATGG**GATAGCTTGATCACCTCGAT**ACCATCGGAAGGAAAAA
CTCCTCGGATCCCGGTGGTTCGCTTCGTGTGGACTATCAAGATTTATTCATCAAACATAACGTCAAAC
GATTCTACTGGGCCAAAACGAAAGCTTTTACATGTATTGGGCCGGCCATGCGGAATCCTACTGTGAC
TCTGCGAGCGGTCCCTCGTGTGCTCGCTTCAATACATAGGGCGACCCCAAGGTAGGGTTTGCCCC**GCGCCC**
ACCTTCCACCCGCCACCGCCTACCCACCTCACCGCAACCATGATCCGTGCGGCACCAGCGGCGGCGGT
CATGAGTATTGCAGGCGATGTCCCAGAGAAGGCTCCGAAGGGGAGGAGGTCTTCATCGACGACGATGA
CATCATCAATGAGATACCCCTGGACGAGGAAGGTCAATACTACCTATAACAAGTACCATGTGCTACACAG
AAACAGCTTCTAGTCTCTCCTTAGTTCCGCTTGCTCCGTGCTTACTTTTTTCCCTTGCTCAGATCTCCCCG
ACCAAGACGATGATGACGAGCAGGACCAAGACATGATGGGTACGTGCCTTTTTTGTATCTGTCATCTG

TTTTAGTATAGCTGTACTAGCGCTGCTTACATGATTAACTATTATGTTTGTGTCCGTTCTTACTTGAGA
GCGCTGATCTTGACGGAATAAGATACTGTCTTGTACTAGTGATGACTGAATATTTTGCCTTCTAAACTG
AATTTTCTTGTAAGTTCAGGCTTCTAGGTTTACCTTTTAAAAAAAATATAAACCTTGGCATCAT
GCTATTCGTTATCTGGTTGTTTACATTTTACATGCAGTACACTTTAGACAATCTGAAGTTCTTTACCCCT
GACAGTATAATGTGC **CAGTAATTCAAGTGCCCTT** AATTTATGTTGTTTCAGATGAGGTTGAGGATCAT
TCAGCATATGCATTTTCATGGGCATACAGGCAAGATCTCGTTGAACGAAGTACTTACAATGTCTTGTGA
CTATGATTTATTGTTTGCCTTTGTCGACTCTTGTAAACATCCGCTTCCAGAGTACCTTTGCATTGAAAA
TCACATATATTAATAGCTGCTCTTCATATTTTGGGTACAGATGAGGTATTTGCTGCTGCGTGCAGTCCT
GTAGATGCATCACTTGTGTTTCTGGAGGTAAAGATGACAGAGGGTTTCTTTGGAGGATTGGATCTGCA
GAGGATGTTCAAGAGCTGCCTGGTATGGTTCACTCATTTTCTTAGTCTAATTGGGAATTCCTTAGTCTGA
TTTGTGATGTAAATGTTTCTCGGGACTTTCCCTATGCTTGTCACTTTTACTATTAGTTCTTAAATGT
GCTGTTTCTATTTCTTTTAGCTATAACTCCAAACGTATTATTGATATATTGCAGCAAGTCTTCTTCTTT
GTTTTTTTAGGAAAATCTTTATATTTATGTTCTGTTGCATCGTTTTTATACTTAAATTTGCGGATGC
ATCCCTAGAATTGCTATGAAGCTTATATAATATCTGTTGCCGATACAG **GACATAAAGATACTGTCAGC**
ACTGTGGCTTTCAGTTCAGATGGGAAATTAGTAGCCTGTGGAAGTATGGATGGACGGATAAATGTTTGG
AATACATCTACACGAACACTTCAGGGAACCCTTGAGGGCTCTGAATCAGGCTTTGAGGTGAGATGATGC
TGATCACTTTAATCCGTTTAGCTGAGCCTCCTTACTGTTTCAATTGCAAAATCCGCATTTCTGCTGTT
AACTGTATATATTAGTACTCGATGATTAATTATATGCATCTGGTTTCGTAGTGGCTTAAATGGCATC
TGCGACATAACCTTATAATTGCTGGATCAGAGGACTTCAACATATGGATGTGGAATGCTGACCTAAATG
CCTTTGTGAATACATTTTCTGGCCACAGTAACACAGTGACATGTGGTGATTTTACACCTGATGGTACTG
AGTAATTTTCTCTAATGCTATTTAATTTGATATATGTTAACGTTATGAACCTGCCTCTTAGTATGGTAC
AAAATATATCACCCCAGTCTGGACTTTATTGGGTCCTGTTTTTGGAACGCTTGCATGAAAAATTTTCA
CCTTATGTCACAATCTGTTTTTAGCTATCAACACAGCTTCTTCATATTTGTTTCAGATTTTCCAGAGGAACT
TATGGATCATGGTGTATTTAATTTTCTGCTACTAACTTATGTTATAAGTTAATCTCAGTGAAACTAGA
AGTTGATCATAAATGTAATTAACATAATGACTTCTATGATGGTTAACATCTTAGATCCGTTTTACCA
TTTTACTTGATGTTTCAGATCCCCGATGTAGCCTACCCTTTTTTAGCTAATTCACATGTTTCTTTTGAA
GGTAAGCTTATTTGTACCGGATCAGATGATGCAACACTGAGGATATGGGACTTTAATAGTGCACACTGC
AGACATGTTGTTTCGAGGTAAATTATTGTCTATGTTGCAATTACCATATATTCATATGGTTGTTTCTCTG
TGTTCTCTGTTAACCTGAATGTTATTATCTGACCGTTTTACC CGATCCAGATCATGGTTATCATACTC
AAGGACTGACATGTTTAGCTATTACATGGGACTCCCAATCAATTGTTAGTGGCTCTCAGGATAGTTCTG
TGCACATCGTGAGCATAAACTCAGGCAAGGTGGTGTATGTCGTGATTTTGCCTATTTTTTAAACAAA
AAGGTTTCATGTAAAAAAGAAATTATTGATCACCTTATTTTGTCTGTAGTGAATTTCTGCAGAGTTTTGT
TTTTGAGATACTGCAGGATTTGTTTTCTTAGGATAGTCGATACTCTGTTGGGTAGTTTTTAACTTTT
AGAAGCATGTGCCATGGCTTTGCATCTAACTCTGAAGGTAAGATCTGATTTGTGTCTAACAAGTTTTGT
TGGTTGATTTTGCAG **GTTGTCGGTTCATTAGTTGGCCACACTAATCCGTCGAGTGCATTGGCATCTCA**
CCGAGGTACTTTTTCTGTGATACGTTCTTGGACTGTTGGAATCTGTATGATAAATCTGTTGCACAATACT
TATGGCTTCTTATTGACCTAGCTAGCTTCAACCCTGTTCTCTGCAGGTACAACCTGGGTGGCTACTGGG
AGCATTGATCAGAGACTCATCATCTGGGACCTCACTACCAAGCAATTCGATCCATTTGCGAGCATGAT
GTGGGTGTAGAAATCAGTTAACATTTATGGTTATCTTGTATTTTATGTCGCTGTGAACCTTATTGCTGT
TGGTGGTGTGACAAGCAGGATGGCGTCACTTGCCTGGCGTGGATAGGTTTCGTCGAGGTATGTGGCGT
CAGGATGCATCGACGGCACAGTGACATCTGGGACAGCCTCTCTGGGGAGCTGGCTCGCATGCTGAGTG
GGCACCGTGATCCGTGCAGTGCCTGGCCGTCTCCACTGACGGCAACTCCATTGTCTCGGTCTCTCGG
ATAAGTCTGCTCGTGTCTTTGACATATCCATGTTCAAGTA **A**

>Bradi1g22010

ACA **GATACGAAGCGTAGTTGACC** GAGCTTGGCATCATTATCCGTCGTGTGAGAGAAATGTAAGTGGGCA
GGCTGACCCAAAAAAGACCAAAACCGGAAGTGTTCACCTTTGACAAACAAGCTCTCCGAAAA
CAGCGGGCAGCTCATGGTTTTCTCCGAGGGAACAATTAATCCTGCATGCCCCGCCACAGAAATCCCG
TCGACGTACACATGTATAAATATACGATCCGTTGATCAGCCCTTA **TACTGCACATTACATTGGCATCCA**
CGGAAGCCAAAAATAGAAAGCAATCAGCAGCCAGTGTCAATTCAGAGTTTTTCGGTTTTCTTGTGCTTTG
ACA **TGGGCCGTTGGTTGAAGCCAGAT** GTACGTCCAAGTTTACAAGAACCTCTTCTCTTTGGATCGGTC
GAATAGAAGCTAAGCTGATTTCTGTGTTTTCTGTCTAATACTGATTTTCTGCTGCTGCTGCTGCAGTT

GTACCCGTTGATCGGCGC CATGTCGCTGGTGACGGGGATGTGCGCGTTCCAGCTGGTGAGGAACGTCCT
GCTCAACCCGGACGTGCGGATCAGCAAGAGCAACCGGCAGAGCGCGGTGCTGGAGAACGCCGAGGAAGG
GGAGAAGTACAGCCAGCACGCCTTCCGCCGCTTCGTAGCGCGCACCCGCCGGAGGTCTTCCCCGCCAT
CAACCGCTTCTTCTCCGAGTCCGGCAGCAAGTGA TCCATCTTGGGCAAACATGTTACTACGTGCCAGGA
ATGAAGATATTTGTTAGATAAAAATAAAAGCCCGGCAACTTGTGTTTGTGCGCTTAATTATTCGCGAC
GCGCCTAGGTTTTGAATTTTTTATTTCAAGTTGAACCATCAAATATTGGTGAAAGTGATGTCTTCCATA
GATCAACAGGCAATCATTTGAATTCGGGTGTCAATATATTCAGAGTTCAGATTGGATA TTTCTGTTCCAG
ATTTTGCTT GGGAGCTCAGAGTACAGGACCCCAAGA

>Bradi4g01540

ATCCGTACCACACGGCAGGCCGTACGGACAACAAGCACTTTTATAACAAGCTAACGAGGCTTAGCAACT
AAACGTCACTACT TACCC AAGTTGATCAGAGCAAGAGC AAGAGTAAGAGAGAGAGATGGCCGGCGGT
GGAGCGAAGGTGGCGTCGCACGGCGCGTTCAGGGGGAGAGCCCGCTGGACTACGCGCTGCCGCTCATC
ATCCTGCAGATCTGCCTCGTCGTCGTCGTCACCAGAGGCCTCGCGTACCTCCTCCGCCGCTCCGACAA
CCCCGCGTCATCGCAGAGATCATC GTAAGTGAGCGTATATGTGCTACCCCTATATCCCTCGAGTAATAT
CGATCGTACACGGTTTTCCAAATCTTCTGTTGACTAACGATGCTTTTGACTTGTGGCTCACTGACTT
GGCATGACGTAATATGTGTCTAATTACGCTGCTGGAATTCATGGATATGCAGGGAGGGATCCTGCTGGG
CCCGTCGGCGCTGGGCCGGAGCACCAATTCCTGAACGCCGCTTCCCGGGCAGCAGCATGACGGTGTCT
GGACACGCTGGCCAACCTGGGCCTCCTCT TTTCTCTTCCCTCGTGGGCCTCGAGCTGGACCTCAACGC
CATCCGCCGGACCGGCAAGAAGGCCCTGGCCATCTCCCTCTCCGGCATCGCCGTCCTTTCGTATCGG
CATCGGCACCTCCTTCGCCTTCCGCGCCACCGTGCAGGGCCTCGACGAGTCCCCTAGGGGGCCCTTCCCT
CGTCTTCATGGGCGTCGCGCTCTCCATCACCGCCTTCCCGCTCCTCGCCCGCATCCTCACCGAGCTCAA
GCTCCTCACCAACCGACCTCGGCCGATGGCCATGTGGCCGCGCCGCTCGACGACGTCACGGCATGGAT
CCTCCTCGCGCTCGCCATCGCGCTCTCGGGTTCGGATCGCCGATCATCTCCCTCTGGGTGCTCCTCAC
CGCCGTCGGCTTCATCGTTCGCGTTCGTCGCTCCTCCGCCCGCTGCTGGCGTGGATGGCGCGGGGTG
CCCTGAGGGCGAGCCCA TCAAGGAGGTCTACATCGTC GCCACGCTC GCCATCGTCCTCGCCGCGGGGT
CGTACCAGAGCTGATCGGCATCCACGCGCTGTTGCGGCGCTTCATCGTTCGGCATCGTTCGTTCCCAAGGA
CGGGCCGTTCCGCAACGCGCTCATCGAGAAGGTGGAGGAGCTCATCTCGGGCCTTCTCCTCCCGCTCTA
CTTCGTCTCCAGCGGGCTGAAGACCAACGTGGCCACCATCAAGGGGGCAAGTCATGGGGTCTCCTCGT
GCTCGTATCCTCAACGCCTGCGTCGGCAAGATCGGGCGCGCCGTAGCCACTTGCCTGCTGGTCAAGAT
CCCGGCCAGGGAGGCGATCACCATCGGCTTCCCTGATGAACACCAAGGGGCTCGTGGAGCTCGTTCGTGCT
CAACATCGGCAGGGACCGCAAGGTGCTCAACGACGAGGCGTTCGCCATCATGGTGTCTATGGCGCTCTT
CACCACCTTCATCACCAACCCCATCGTCATGGCCGTGTACAAGCCGGCGCGTCCCTCGAGCTCGGTGCC
GTACAAGCGCCGACCGTCGACGGAGAAGACGACGAACACAGCGGCGGCGACCTGCGCATGCTCGCCTG
CTTCCACGGCAGCCGGAACATCCCCACCCTCCTCAACCTCGTGGAGCTCTCGCGAGGACCCCGGGGCG
CCACCACCTGGTTCATGTACGCCATGCACCTGGTAGAGCTCACGGAGCGCTCGTTCAGCCATCTCCATGGT
GCACCGGGCGCGCCGCAACGGCATGCCGTTCTTCAGCGTGACATCGTTCGGAGAGGACAACGATGGAAGT
CGCCTTCAGAGCATTTCAACAGCTAAGTCCGGTGCAGTGCAGGCCATGACGGCCATCTCCGTGCTGGA
CACCATCCACCGGACGTGATCGACAGCGCCCGCCAAACGCGCCGATCATCATCGTCCGTACCA
CAAGGCGCTGCAGCACGACGGCACGTTCCGCTCGTGGGGTGGCGTACCACGCCATGAACCGGCGGGT
GCTCCGGGAGGCGCCCTGCTCCGTGGCCATCCTCGTCGACCGCGGCCTCGGCGGCCACTCCCATGTCTC
CGCCAAGAACGTGGCCTTCTCCGTGGCCGTGCTCTTCTTCGGCGGCGCCGATGACCGAGAAGCGCTGGC
CTACGCGATGCGCATGGCCGAGCACCCGGGAGTCGCCGTACCATGGCGAGGCTGCAGCCCAACCGCCC
GCTCCTCGATGAAGCCGATAGTGCCGCCGCGACGAAGCGGCGTTCAGGGCGTTCAGGGCCAGGGCGGC
TGCCGTGATGATGGGTCTATGAAGTTCGAGGAGCGGGAAGGGGGTACCAAGGAGGACGTGGTGGAGGC
CATCGGCTCACTGTCCAAGTGAACGTGTTTCGTGTCGCGCCGGATGCCGCCGACAGCGCCGCTGGTGG
GAACCCCGAGGAGCTGGGCCCCGTGGGGAGCTACCTGGTATCGCCGGAGTTCAGACCGGCGGCGTCCGGT
GCTGGTTCATCAAGAGGTACGACCCGGCAACGAACCCGAAGAGCATGAGGTTTCAGCCGAAGGTTCAGGCC
GCAGGTGGCGACGGACGAGGACATGATCGACGAGGAGATGGGCAGCGGCGAGCGGAAGCGCCATGGTGGT
GCCGGCGTCCCTTCGCCGAGCGAACTCGCCTGAGGAGCCGACCGAGGGCCAGTGTGTCTGAAACGGAA
CAGCCATGTAAAGAAACGGCTCCCTTCTGTTCTGTCTGAATAAAGCAGGTACGATGAGTATGTTTCATAT

GTTGCACAAATTATTTATACAGACTAGCTAGCTAGTTGAAGGCTTCCATTGCGAGCATGTTTCCAGTAT
TTTCCATTAAATTTGCCAAGGAAAGGGA

>Bradi1g34140

ATACTCCTGTTCCCTCTTTGCTTTCCGAGATCACGCTTCCTTTTCCTCACCAGCTTCATCACACGCATC
TCCCTCTCTGTCTTTCTGCGCCAGAATTCTTTCTCAGGTGGGATCCAGCGTGTGAGAAGAACTCGGAGC
CGAAGCAGCCCAGCAATCCAGCATTTCTGATTCTGTGGAGAAGAAAGTCAAGAAGCACTTCTCCCGATCGA
ATCCCAGTGCCCCCTTCGTTCATCATCCATCCAAAACCAGCCTTCTGTCCTGTGCGCGTCTCTGCTCTG
CTCTGCGGGCTGCCTGCGTTAAATGCCCCGCTCACTCTTCCCTCGTCTTCTCCAAGAACTCTCTTCGCG
TTCCAAGTTTCCAACATCACAGTGCTCTGCGTGGCCGTGACTGCACTGCGTCCGTTAGGCGGCTGGCGG
CTGGCGGCGGAAGGAAGTCTAGTGAATAATACTACTGCTGCTGCCAATCCCTCTCGACCTACCGCCGGC
GCGTTGGCTGCACGCCAAGATTGCTCGCCTGCAGGTTAATTTGGTTCCTACGGGGATAAACAAACAGG
AGGGGAGAGGAGAGCGCACGCCAAGAGAGCTCGAGGCTGATTGCCAAGAAGGGTAGTTAGATAGAGAGA
AGGATGGGGGACGACGCGGCGGTTCCGGCGGCGGCGGCCAAGTTGGAGAAGAGCTACTTCGACGTGCTG
GGGATCTGCTGCCCGTCGGAGGTGCCGCTGGTGGAGAAGCTGCTGGAGCCGCTCGCCGGCGTGCACAAG
GTGACGGTGGTCTGCCCTCCAGGACCGTCATCGTCCGACGACGCCCGCCCATCTCCAGTCCCAG
ATCGGTAAATACTCCCCCCCCCCCCCCCCCGTCCCTCCTTACAGCCTCTTGTGCTTTCCGCCCA
GATTTCCCTCTTCCCTCGCGCTTCTCGTGCCATGGAGACTTGCTTTCTTTTCTCTTGGTGATGGGGA
AATTTTGATCCAATTATGATTGCATCAGGGCCGGGTTGTTTCAAGTGGATTGATTGCTTTTCGATGTTAC
CCTCTCTTGATGAAACCTTTTGGTCTAATCATGTTTGAATTTGGACTGATTGACTACAGTAGACTAGA
ACAAGACCAGTGTCCGTCTTTTGTGGTAAACGTGCTGCCAGCCTGCCCTGTGCGCCGGCCCCCTCCTAATT
TTCTGATGCTGCCGTGGAAACCGACTTCGCCGTCTTGCTGATCCATGTCTGGAATTCTGGATCGGTTT
TACGTGTAGTTTAGCTTGAAGGAAGGATATTTGAACTCCGGGAAGAAATCATTTCTTTTGTCTTCTG
TCTCTGTTCTTTCTGAATTTTTTATACTACACTCTTTCCTTTTCTGTACTCGGTTAGTAGTGGAGTCTGA
TTTTTTTGTATGCCCGCTCTCTGATGTTCTTTGTCTGGAGTCTGGATCGGTGCTAGAGTAGCTTGAAA
GATAAAGAAATCTTAGTTTACTCCAAGCAATGGAAAGAATATTTGAACTCCGGCGAAGGATCAGTTTCT
TTTTGTTTCTGTCTCTGCTCTTTCTGAATTTTTTATACTGCACTCTTTTCTTTTCTGTCTCTCGG
TCAGTGGAGTGTGATTGTTCTATCAAATCTTCCCCCTTCTTGTTTTTTCTCAAATGTTACCATGAGAT
CAGCCTCCAGCAATCCTCCTAATCTCGCAGGCCAATTAACAATCTCTTATTATTATTATTCTCTGAAAA
AAAAATCTATATCCGCACTTCCCGCAGAAACCGCCCCAATTTGTGGATGAACTGATTTATGTTTAAATG
ATTTTTTTTTTTCAGTCAAGGCGCTGAACCAGGCGAGGCTGGAGGCGTCCGTTGCGGGCCTATGGCGGCGG
GGCGGCGGAGAAATCTCCAACAAGTTTCTAGCCCCTACGTGCTCGTCTGCGGCGCCCTGCTGGTG
GTGTCGCTGTTTCGAGCACTTCTGGCCGCGCTCAAGTGGTTTGGCTGGCCGGGGCCCGCCGCGGCTG
CCGCTATCGTCCCTCAGGAGCGTCGCCGCGCCCGGAGGCTCACCTGGACGTCAACATACTCATGCTC
ATCGCAGGTACCGTTCCTTCTGATGGATTGATGATTTGCTGGCTGCCACTGACGGTGTGTTCCATGTG
ATTGCTGGTTGTCCACACGCACACAACATGTTTTCCATGTGATTGGGCTTGCCTTTTTTTTTTCAGAGAA
AAATACATTGCGCTAGATTCTCAGTAGCATTGGGCAAGTATAACTAGTACATACTTGGCTTGTCTGGT
GAATTTTTTTGTAGTCTTATACAAATAAGAAATGCTATGAATTAATACTTACGTAGTACTACATTAATA
AAATAGTGTATTAAAAATATCACCGATGTCAAGCAGAGTCTTAGAAGAAAGAAATTTTCTGTTGCCGAA
ATATTCTTCTGTTGTTTGTGTTGCGACCCTGACATGACACCAGGTTGAAAATCAACCAGACTGAAATTA
TTGATGCTGATATATGTCAATATGTGCTGTTAAACAGTTTCTCCAATGTGACAAAAGGACCCAAGAAAA
CTGGGTCAAGACAATTTGTTTTCTAGGACCAATATGCATGTGGATGCTTAATTTACTCAAAGCTT
ATGCTCGCTTGTCAAACCTTCTCCCTGCCTTTTTATCCTGGAGGGGCCCAACTTTCCTACTGTAATA
AAGAGATAGGTTGCCGTGATGCTAATATATATGCTAAGTGGACAGAAATCTGCTTCGTTTCTCCATGT
GACGATGTGCACTCAGATAGGGTATCGTATTCTACTTGGATTAAGCAGCACTTTGTTTCAATCAATTCT
TTTTGGAGTTTGGTCTGTGGTATCAAGATAGCTTGTCCGTGAAGCAATTAGCATACTAACTTGGACGA
AGCATTGTTGTTTTTATTTTCACTACTATGCCAAAACAAAATTGCCTGATCAATTC AACACATAGAAACA
TGTTAGCATCCCTTTTTTTTTATGGAGACTCAATTATGATAGTAGGAGACATTGAAATGGCAAGTGGTCT
ATTTGTAGTGATAAAATATAGAGGGAAAGTTGTATCTACAATTTTTGCAAGTCTATGTATAGTTGCTACTT
TTTCGTCAAATAATATATGATGCATATATATAGTATTCACCTTTGGCGTTGTAGGCAGTATCTCCTCAT
CTAGGAGGACTACTATCTTGTTCATCATCAAATATCTTTAATCATTTCTGCCCTGCCGTCCCTAATGCC
TGCAATTTTTGGCAGGAGATGGCCAAGAGCTCACAAGTTTTATTTGCTTTGTTTGCAGTTGCTGGGGCAA

TAGCTCTCAAGGACTATTCTGAGGCTGGGTTTCATTGTCTTCCTCTTCACCACAGCCGAATGGCTCGAGA
CCAGGGCGAGCCGCAAGGTCTCTCCTTCTCTTTTCACAAATTTCTTGTGCCTAACAAATCATGATGGCT
GGGGGGTTTTCTCCTTTTCAAAAAATAAAATCAGAATAATCCATGTATCTTTATGTTTTAAAAAGGAAAG
CAGAAAAAATATTTGCAGGATTGCTGAGGTCCTTTCATGATCCAATTTACCAGAAAAGGGAACCTTTTTT
TACGTGTACATTTAGGAGCACGTATTCATCATCTTAATGCAGCATAACGCGGCATGTAGATTTTGATG
CGCACTAGCCCTACTGATGGAAATATGAACAGATTTTGGTCTGCCATTCTGGGCGTAGTTGGTTGGACC
AGCGTCAGGTCTATTTTGCTGATTGTATCACCATTCTAGCATAACCCACCTAACAAATTTTCAGCCAAGA
GACAAATGACTTTGCATCTAGTGGGGACTCAAACATGCATATAACCCACTCATACCTAGGTGTAAAGCAT
GATTAAGGAAAATAAGTCAGATAAGCGAAAAAGTAATTTTGGAAAGAGGATGAGCAGAATACAACACAT
AAAGTAAAGTCTTTAAAAAAGTAATACCAATTATTACCTTTGTACATAGGCTTTTTTTCGCTACTTTGT
CTCGGAAATATCTTATTAATACTTTTTTGCATGTAGGCCACTGCTGGGATGTCATCACTAATGAGCA
TGGCACCACAAAATGCTGTTCTGGCAGAGACTGGACAAGTGGTTGCTACCCAGGATGTGAAGGTCAATA
CAGTAATAGCTGTCAAGGCAGGGGAAGTCGTTCCGATCGACGGTGTGTTGTCGATGGGCGGAGTGAGG
TTGACGAGAGCACGCTCACCGGGGAGTCCCTCCAGTGTCCAAGCAGGCAGACTCCCAGGTCTGGGCTG
GCACACTCAACATAGATGGTAATACATACTACTATATTGTAAGCAGAATTGACATTGCTGATATGCCTA
AAATTCATTGGTGGTCACTGATCCTGCGTTGATCCTGTGTTGGTGTATGCCAGTTACATTGCTGTGA
GGACAACCTGCTATGGCTGACAACCTCGGCAGTTGCGAAAATGGCAAGGCTGGTTGAAGAAGCCAAAACA
GTAGATCCAATACACAGAGGCTGATTGACACGTGCGCTAAGTACTACACACCTGTAAATCTAAATAGAC
GAGATTGGGCTGCAGTAAAAAAAACAGAGATAGAAAACATTGAATCAGGTGGTTTTTCTTACTGTTA
TTTTTACCTTGCACTGTTGTTTTGATGTCTGGAGCAGTAGCATTGATCCCTGTGATAGTCAGAGCACA
CAACCTCAAACACTGGTTCCAATTGGCCCTAGTCCCTCCTCGTGAGTGCTTGTCCGTGCGCTCTTGTGCT
GTCAACACCTGTGGCCACCTTCTGCGCGTTACTGAGGGCCGCAAGGACAGGGCTCCTCATCAAAGGAGG
GGATGTCCTTGAATCCTTGGCCAGTATCAAAGTTGCTGCTTTTGACAAAACCTGGTACAATTACTAGAGG
GGAGTTCTCTGTCGAGGAGTTTCGGACAGCTGGCGAGCGTGTTCGAAGCAAAAACCTTCTTTACTGGTT
AGTGCTGTTTTCTTGTGCGATGTCACACTGCACAACAATGACGGTATGTGATTCAATCTTCTTCGGTGCC
TGAATTCATTTTCATGGCTGTTTAGGGTCTCAAGCATTGAGAGCAGATCAAGCCACCCAATGGCTTCTG
CTCTTGTGATCATGCGCAATCAAACCTCCGTGGAACCAAATCAGAAAATGTTACTGAATTCCAAATCT
ATCCTGGTGAGGGAATTTATGGTGAATCGATGGAAAGGGAGTATATGTTGGGAACAAAAGGATCTTGT
CAAGGGCTTCATGTCAAACAGGTTGGTTCGAATGTGAAATCAACACTTCCAAAGTATGTTAAGAGTGTCA
TTGACATTCTGTTGCTAGGTTTTCAATTGGAATCTCTTATATCCTAAAAGCACAATACGGGGTTCCCTGG
GGAAAACACCACGTTGATCCACACCATCTGAATTTAGACTCCCAATGCATGAAGTTACTGTAATAA
AAATGGCTCTCGTTCAGGGAAATGACATTAGTCATTTTACAGGATCTTGTACCGTATGTATCTTCT
ATTTGCTTCATCAAAGCACGATTCATGTTGAAGTATTCATCTGCTAAACGATTGTGTAAGATTTTCTT
TTTTATGCTCTAGTTCCAGACATGAAGGATATGAAAGGAGTTACCGTGGGATACGTGGTCTGCAGCAAGG
AATTGATTGGGGTATTCACTCTTTCTGATTCTTGCCGAACCTGGAGCAGCTGAAGCCATCAAGGAGTTGA
GATCACTGGGCATCAAGTCGGTGATGCTTACAGGCGATAGTACTGCCGCTGCCACATATGCACAGAACC
AGGTAAAAGATTTCCGTAGAATTTATGTCGATTCTGTTTTGGTTTTGCTTTCTTTTCTCTAGTGGATAC
AAGCACAACACCTAATTTGCTGCTTCTGCCTTCTTTCTGGTAGCTGGGAAACCTCCTTGTGAGGTTCA
CTCTGAACCTTCTGCCAGAAGACAAAGTGAAGAATTGTTGATGAACTGAAGGCAAAAAGATGGCCCTACACT
GATGATCGGTGACGGCATGAATGATGCCCCAGCATTGGCTAAGGCTGATGTTGGAGTCTCCATGGGTGT
TTCCGGTTCAGCCGTTGCAATGGAGACGAGCCACATTAATCTTATGTCAAATGACATCCGCAGGATTC
GAAGGCTATCAAGCTGGCAAGGAGGACACACCGACTATCATCGTGAACATTGTTTTCTCAGTGGCTAC
AAAGCTTGAATGTTGGACTTGCATTTGCCGACATCCGCTTATCTGGGCAGCAGTCTTGTGATGT
TGGCACATGTTTGTGGTGTGATCATGTACAGCATGCTGTTGCTGAGAGAGAAAGGCAGTGGAAAGGTGGC
AAAGAAATGTTGCGCTTCTTCTCATCATGGATCTCATTCAAAGAAGCACGGCACTTCCCACCATGCTC
GGATGGTCCGTGCAGATCAACAGGCAGTGGTGTAGATTCATCTGCAGGTAAGCATGCTTGCCATGATCA
TCACCATGAGCATAACCATCACAAAGAGCCGAGGAACCTGCATTCTGCAGACAAGCATGGTTGCCATGA
TCATAGTCATGGCCATAACCACTGCAAGGAACCTAGCAACCAGATGTTTACAAGCATGCATGCTTCCCA
TGGTCATGAGCATAACCAAGACATCTGCAAAGAGCCGAGCAACCCGCACTCCAGCAACAAGCATGATTG
CCATGACCATGAACATGCGCCACCGCAAGAACCAGTGGCTCGCATTCTACCAAGGAGCTCGCTTGTCA
TGGCCATGCTCATGGCCATTGTGAGAACTAAGAGTTTACATAGTACCAGTGAACATGCTTGGCCATGA
TCATAAGCACTGCGAAGAACCAATCAGCTTGCATTTGTGCCAATGAGCATGTTTGGCCATGACCATGACCA

GGATGATCATCAGCATCATTGCTGTGATGAACAGGAACCTTTGCACACCCGAGATACACACTCCTGCCA
TGACCATAAACATGAAGACAGTTCAGCTGGGTCAATTCAAGAGCTCTCGATATCGATCGAGGATGCATC
GCATGATCACCATGAGAAGCAAAGCCAATGCGGTACCAGAGCGAAGAACCCAAAGAGAGAGACTGCAG
ACATCACCAGAAGGCAAAGATTGTGCTCCAGCTCCGACAGATTGCAGCAGCATAAACTGTTGCAGCAC
TATTAGCATCAAGGGATGCGAAATGAAAGGTAAAGACATTTGTTCAAGCTGGCAAGTTGGTGAATTGG
CACGGGCAGTCGCTGTTGCAGGACCAGGGTACGCAACTGCTGCAGCCACAGCATGCTGAAACTGCCTGA
GATCGTTGTAGAGTAGGATCGAAAATATATACATATATGCATATACTAGCGACCAAAGTTTGCCTCGTC
AGCAGTTAAATTTTGTGCTGAAGAAATGGTGCACAGGTCTGAATTTTGGTGAAGCAGGTTTCTGTGCG
TCTGAAAGGATGCTGCTCTTTTTGTCTTCTCCTTGATTTTGCATCTTTTGAAGGATTTGAGAAAAGTGCA
AAGATATACTAGTGCCTAGCGTATCAGTGCCTTAAGAAATTGGAAAAAGGTGGTTAAGTTAATAACT
TCATCTTAGATTTTCTTAGTTAGAGTACGAAGCTGTAATTTAGTTATGCTGATAAAACACCTTTAACTA
AGTTCAGTTATGGAAGTTTTGTGCTGTATGCAATGCTGTATCCCTTTAATAATGGGACAAGTAGCTGAAT
CACTACAGCAGTCAGGATGGGTGCTCCACCCCTTCTTCTTGACATTTTCGCTTTGATTCCGAAAATTA
TTACAGCACTTCATCTGCGGCAAATATGTATATAGAAATCTTGCGAAGGACTGCTTCTTTGGGGCG
GCAGTGTGCAGCAAGCAGGATCTCTCAAATTCGAGAAACACAAAATATATTTGGTTATTAGCTGTAA
AGAAATGGA

>Bradi3g27550

ACTGGACTCATTTCGTCTAGTCGAATAGCACCGCTGACACGAGCTCGCTCGCTGTGGGAAACAACGAGGA
AGCGGAAGAACAGTGAACGGCACGCACGTATTGACGGCAACCTTTGATCAGCCCAGCCGGTCAGCGCAG
CCATCAATCAGCCTTTCCCGTTCCGGGTCTGACCCGCTTTGATCGGCCGGCCGATCCAGACCCGGGC
CGCCGTTGCCACTCAAACCTCCGCCCTCTCCTTCACTGCACCCACCACCGCGCACAGGTACACACACC
CCTGCCTATTTAACTTTGCCCCCCACCCACCTCTCCATTTCAAAGACCAGACACAGACAGAGGACAAC
GCCCCACGCACAACACAGCCTGCTCCTCGAACCACGCGCCACTCCAGCACTAAGTCTGCGCGTCCCC
GGGAGTTCGGTGAGACGATCGAGAGTTAAGCCATGGGAGAGGAGAAGAAGGAGAAGGCCGGCGGGCA
AGGCTGACGGCGGCGACAAGAAGAAGGACGCGGTGGCGCAGGACATCGTGTCAAGGTCGACTTGCATT
GCTCCGGCTGCGCCAGCAAGGTCCGGCGGGCCATCAAGAACGCCCTGGTACGTGCCGCGCCAGCCCTT
GCTTTTTGAATCAGCCATCCGTGCCGTGCCGCGCCGTGCGGTTGGTTTGTGTTGATTTTTAGTTTTGAC
CGTTTGTCTGTGCTCTGTCTGTGTGCAGGGTTGAGAAGGTGAAGACGGACACCCGCGCCAACAAGGT
GGTGGTGACCGGCGCCGACGCGACGGACCTCAAGGAGCGCATCGAGGCGAGGGCCAAGAAGCCCGT
GCAGATCGTCTCCGAGGCTCCGGCCCCGCGCCAAGAAGGAGAAGGAAAAGGACAAGGAAAAGAAGGC
GGAAGGCGGCGAGAAGAAGCCGGAGAAAGAGAAGGGCAAGGCCGACAAGGAGAAGGGCGGCGGCGGCG
CGGTGAGAAGAAGGTTGACAAGCCTAAGGAGGAGAAGAAGCCCAAGGAACCCAAAGAGGTCTGTGACCC
ACCCGACGACTGGAATTTATCTGCTCTAGCGGTCTAGCCATGAATATTCAAGAATGGAAAAAAAAAAGC
ATGGTCTCATATTCCTCTGCTTTTTGTTTTTAATTCATCAGGAGACGGTGACGCTCAAGATCCGGCTGC
ACTGCGACGGCTGCATCGACCGCATCAAGCGCCGCTCTACAAGATCAAAGGTGAGTTTCTTTGCGGCG
GAGCAGATTCCCCATCTGGAATCAAAAACCATTAATAACGATTAGTTTGAACTTTTTGCAGAACTGA
CACTTCTTTCTTTGTAAATTTCCAGGAGTGAAGGATGTGGCCGTAGACGCCGCAAGGATCTGGTGAA
GGTGACCGGCACCATGGACGCGCTGCCCTGCCGGGTACCTCCGGGACAAGCTCAGTCGGCCGGTGGA
GGTCGTCGCGCCCGCAAGAAAGACGGTGACAAGAAGGAAGGCGCCGACGGGACAAGAAGAAGGACAA
GGGCGTGGGGACGGCGAGAAGAAGAAGGATGGCGGCGAGGACAAGAAGGACAAGTCCGCGGCCGCTC
CGGTCGCTGGCGCCGATGCCATGGGCGACGCGAGCATGTACCAGATGCCCCGCGAGTTCGGCTACAT
GCCGTATCAGCACCCGGCGGGCTACTACGGCGCCGCCCCGCGCCGCCCCAACCCGCTTCTTCCC
CAACGCGGCGCCCATTACCCGCGCCCTACCCGGCGTACCCTGCCACGCGCCCCAGATGTTTACGCGA
CGAGAACCCCAACGCCTGCTCTGTATGTGAGATGAGCCGTTCTGACCCGGTGTGCCAGAACATGGC
GGATCCTAGTTACCATTAGCTAGCTAGCTACTAGTTAAGTACTGTAGCTTGTAGATTTTAGCAGAGATG
TAAATGACGATAGTGAGAACGTACGGTTCCATCCATGTAATGCTCGTCCGTCACCCGATAAAATTTTTG
TCCTGCTCTTGTAAATTAAGTACTGTACTACCATCATCGTTAAATTTATGCTAGTCGT

>Bradi2g33110

AGCCCCCGAAGAGGGTCCATCACAAACCCGACGCCCTCATAGGCCATCGCTGCCGTACACCGCTTTAAT
CGACGGTCCGCGCAAGAGAAGGTGCATGGACCCGTTTTACACAGCCGTTTTGTCTCGCGCTTTTTTAC

TCAGACCCCGCATGGACCCACTTGTGAGAAACACAGGACCTTTGTATACGTCAAATTTGGAATCGGCGG
TGGCGTCGACGGA TCGCGTCCGCCGGATGGCAGTTGTTCCGGTGCAGTGCCACCATGACGACATCCCCAC
CGCTACGACTTCGACTGCCCTTCCTTCTCCTCTCCACTCAGCGAGCTTTTACGTGCGAAGGGAGCGAGG
CATCCACCACAGCGAAAAAGTAGGGCAAGTGGTTAAAGAATCGATCGATCTTTCCTAGATTTTTTTTCT
TGTCCCCGAGGAATTCGGTTTCGCTCGGAATTCTCCAGCCAGCCCATGGCGGTTCTTGGCGGCTTCCG
CCGGAACATCGGCCTGT TCTTGAGTAAAAGCAACGGTATGTATTACAGTAGATTGCTTTTTCGTGGTTCC
CTAGGAAAGCATTCTGTTTTCTTCGGTGTCAATTTGCTTCGGCGCGGGGGTTTGATGTTGGCTTGGCT
TTTTGCGTGCCTGCAGGATTTATGGCGGCGTGCCTGTCGGCGGCGAGCTGTGCGGAGGAGGTGGAGAAGG
CCGAGGGGGCGGCGTGCCGGGACGACGCGGGGGCGCTGAG GCTCAAGTGGATCGCCATGGCCGCGATT
TGGTGGCCGGAGTGCTGGGAGTGGGCTTGCCGCTCGTGGGCGCAAGCGGCGCGGTGCGGACCGGCA
GCGCCGTGTTTCGTCGCCGCCAAGGCCTTCGCGGCCGGCGTGATCCTGGCCACGGGGTTCGTCCACATGC
TGCACGACGCCGAGCAGCGCTCTCCAACCTTGCTCCCCGCCGCGCCTGGCGCCGGTTCGCGTTCC
CAGGGTTCGTCGCCATGCTCGCCGCCCTCGCCAC GCTCGTGTCTGACTTCGTCTGTCACCAGGTTCTACG
AGCGCAAGCACCGCGCCGAGGTCGCTCGTGTCAAGGCCGACGCCGCTGCCGCGCTCGCCGCGTCCACCT
CTGCCACCGTTAGCGACGAAGACATCACCGTGGTCACAGTTACTGACGATGAGCACAAGGCGCCGCTCT
TGCAAACCCACTCGCATTCCCATTCACGCGCACCTCGCACGGTCACGAGCTGGTGCAGGCAGATGGCC
GCGAGGGGGATGTATCAGAGCACGTGCGCTCCGTCGTGGTGTACAGGTGGTTTATCTCATTGTGCGGT
TTCACCTTGTGTTTAAACGGCAATGCATTTCTTTACCGATTCTGTTTCGTGTAGATACTGGAGATGGGA
ATCGTGTGCGCACTCGGTGATCATTTGGCCTCTCGCTGGGGGTATCACGGAGCCCCGTCACAATTAGGCCG
CTGGTGGCAGCGCTCTCGTTCCACCAGTTCTTCGAGGGGTTTGGCGTTGGTGGATGCATTGCCAGGTG
AGGAATTTAATTCAGTTGCATGATTTGTGAGACAACCTCAATGGGAATAAAATACACAAGATGATGACA
GAATTCCTACTGTTTGCACCTTGTGTTGATCTATATATAATTCGTCGATATATCCTCAAAAATGCACCTCT
GAATTTTAGTATTTACGGTTGGCAATTTCTAGCATCACATGCAACAGAAAAGAATTATACTTTTCAA
TGAAATTCAGAAATTTGAACTTCAGAACCATCAAGTTCTGAGTGGCTAAAAGGAAATGTCCAGATTTAC
AAGTCAAATAATACATCAAATAACTAAATACCCCTCCCTTCTAGACTCAATTTTTTTTATCAAAGTAT
TTCCCAAAGTGGTCGGACCCTTCCCGGACCCTGCGCAAGCGGGAGCTACATGCACCGGGCTGCCCTT
TTTTTTTTTTTTATTTCTTTTCTAGACATCTAGGTGAGTTTGGTCATCTTGTCTTGTGAGCCATTCA
TCAATGCCATCAAGAAAATAGGTAATTAGCTCTTCTCATGCTTGCAGTCCCTAAGTCTTTTTTGC
GGATGTCTTGTCTTCGGATTAACGCTGTTGCGGAAAAGAGATTAATTAATGCCTTGTGATAAATAG
ACGGACAAAGAAAATAATTGAAGGCAAATGTTAACATCTCAGTCACACTCTTAATTTCTCGTTCCCATTT
TAAAATACATTAAGTTTGAAGCAGAGGGAAAGTATTCATTAATAATACTCCGCTCTATTTCAAATAGA
TGTTTTTCTAGTGTGGGCACAAGAATTTAAGTGAAGTACAAGGTTGTTTTGCCATCTTTTCGTCAGGAC
ATTAATGAAGGTCAAATATGAACACAATGATAAAAATTCGATTGGAAGTGTAGAAAGACAAATATTGA
TTGAAAAAATGAAGAGGCTAAAAGCAGGAGTACTCTATTGAAGGGAGCACTTGTGAGAGGTCCAGTTA
CAGCTGCCGTAGCAAGAGAAATTAATCCGCCCTGGATGCTGTTAACTGGGGTAAATCCAGCAATTT
ATTAGTTGAATTTAAGTCCATGTGGTCATGAAAGGCACCTCTGTTAACTGGATGGATGAGCTAACCAGC
TACCTCTAACTATTTGAATTTAATCCTGATTTGTGGATGTTTTATCACCACGTTGTAAGGTTACTACC
TCCGTTCCATAAATTTGTGTCGCTGTTTTAGTATAAATTTGAACTAAAACAACGACAAGAATTTAAGAAC
GGAGGGAGTGTAATTTTCATGCTACAATCAGTTTCTTTAACACCTTGTCAAACCTTTAGTCTTGC
ATCACTATAGACTTGATAGCATGGAGATAAACTTGCATGTGGATTACCTTTAATGTGCATGATTTGACT
CCTAGTTCAGCGAGTTCACCTGAAGCATTAACTTTCTGTTATTTTCGATAGCTATTTCTGACGAGGCA
TGCACATAGCTAAGAACTGTCCGACATAATTAGGTGGGTACTGCTACTAAATCCTATTGGCATCAGTA
TGCTTCTCAAAAATTTAGTTCCACACAGTTAAGGTGGCTTCACTCAGCAGGAGCAACTGTTGCTTC
TGAACCTTTTTGGCTTTGTAATCAATGATTAACATGATATCTGGAAAAGTGAAGTACCTTCGTGTGTT
CACTGTTCAATTTGCATATCTTCTGAATAGCTTGCTGTTATATCAGTATATGCAACATCCGGAGTTCTGA
TCTCATAGGTGTCATCCACATGATTTCAACTTACCCATTGATGTTTCCAAATATATTGTTATTGTGTT
ACTTTTTCAACCTTGATATCTATATCAGACAGCTGATTTTCAGTAAAATAAACTATCATGCCATGTATC
TCTTGTGGTTGTGGTCATATCTTATTTTTATTTATGTTTATTGGTATATTTGTAATAATGTTATGTTGC
TATTATTTTGAATTATAACTGCCAGCTACTTTGATTTATATGAGTTACCTACTGACTGTACTGTTCTTT
GCACTTTGCATCATTGATTTCTTGTGATGGCTTTATAGTATGTTACTTTACTCATCTGGATTATAGAAT
TTGACACACCACCAATTTTTCGTCCAACAGGCACAATTTAAGAATCTTTCCGGCAGCTATGATGGCATCC
TTTTTTGCCATCACACCTATGGGTATTGCTGCTGGGGCTGGTTTGGCCTCGTTCTACAACGCCAAT

AGCCCCAGGGCTCTGGTGGTGGAAAGGCATCCTTGACTCCGTGTCAGCCGGCATACTCATATACATGGCG
CTCGTGGATCTCATCGCTGCCGACTTCTTGGGTGGGAAAATGACGGGGACGCCGCGGCAGCAGGTGATG
GCATATGTCGCCCTGTTCCCTGGCGCGCTCTCGATGTCATCTCTTGCAATCTGGGCCTGAACCACAGGC
ATTTTAACGGACGGTCGCGTCCTAAAGATGTTGCCTTCAACATGTATAGAACTAATGTGTGTGCATGTG
TTCTTGTGGTAATATGCCCTTGTTTTTTATGGGCATGAGAGGGGACAGCGCTGGTGGAAAACCTGGGGC
ATTGTGTATATGTACTTTTGGCTTTGTAAATGCTACTGCCCCATTGCTGAAAACCACGACAGCAGCTGC
TTATGTGAAGAGTGATCTGGTTGCGTTTACTCGGGTATAAATTGCAGGGCATCTGCGAAACTTGGGCTG

Anexo C. Preparación de Reactivos y Soluciones

➤ ddH₂O

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

➤ H₂O DEPC

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

➤ MOPS 10x pH 7

Disolver 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.

➤ TAE 50X

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

➤ **Gel de agarosa 2 %**

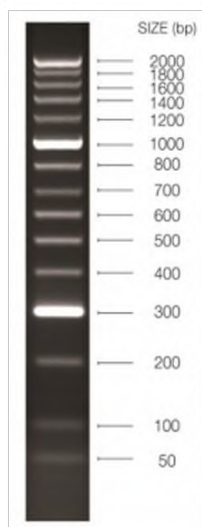
En un matraz de 250 ml mezclar 50 ml de TAE 1X y 2g de agarosa, la mezcla se calentó en el microondas durante varios segundos hasta que se observara transparente (se utilizaron guantes para evitar quemarse con el matraz caliente).

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

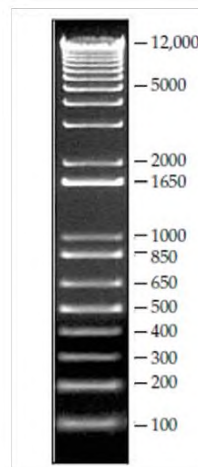
Se pesó 1 g de agarosa y se disolvió en 72 ml de H₂O DEPC, la mezcla se calentó en un microondas durante varios segundos, se dejó atemperar por un momento; se adicionan 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehido (este paso se realizó en una campana extractora de humos). Para la preparación de las muestras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

Anexo D. Ladders

1Kb Plus DNA Ladder
Invitrogen 10787-018



HyperLadder 50 bp
BIOLINE Bio-33054



Anexo E. Información de oligonucleótidos proporcionados 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: Bradi110F

ID: 18725

Modificaciones: 0

Escala: 25 nM

Purificación: DST

Secuencia: CTCTCGTTCCACCAGTTCTT

de bases: 20

µg/OD: 35.1

Tm: 61.4

PM: 5969.9

Nanomoles finales: 23.3

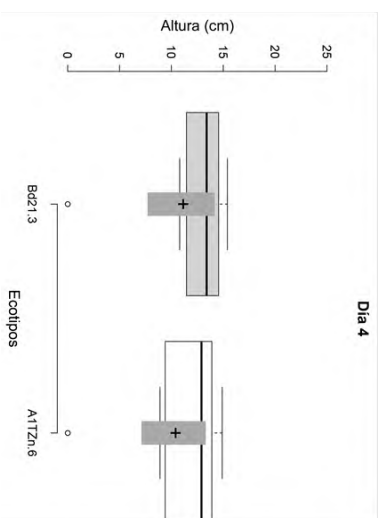
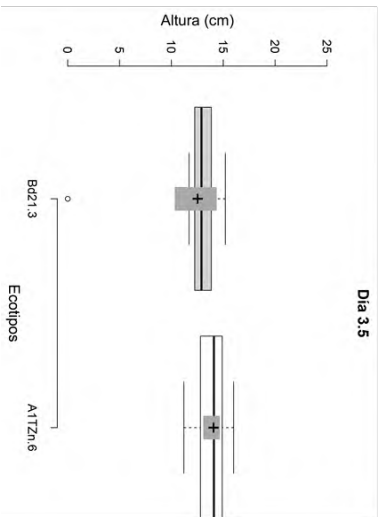
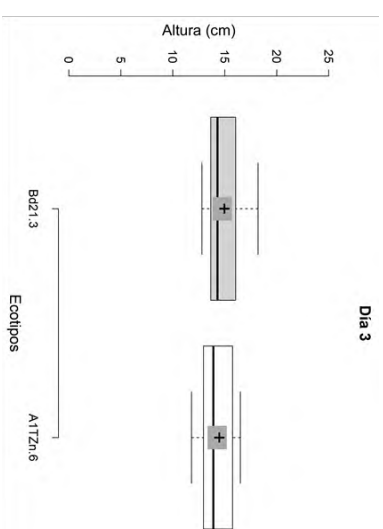
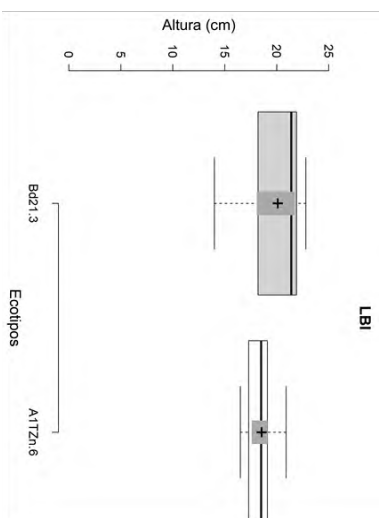
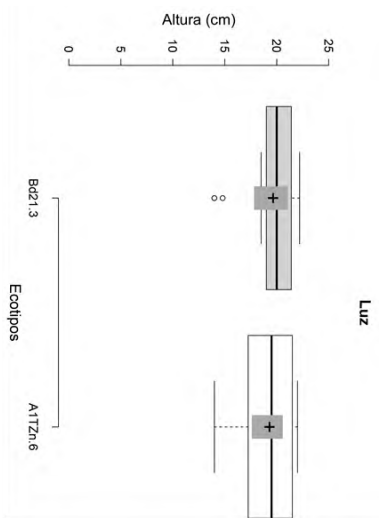
µg de Oligo : 139.12

233µl de agua para una concentración de 100µM

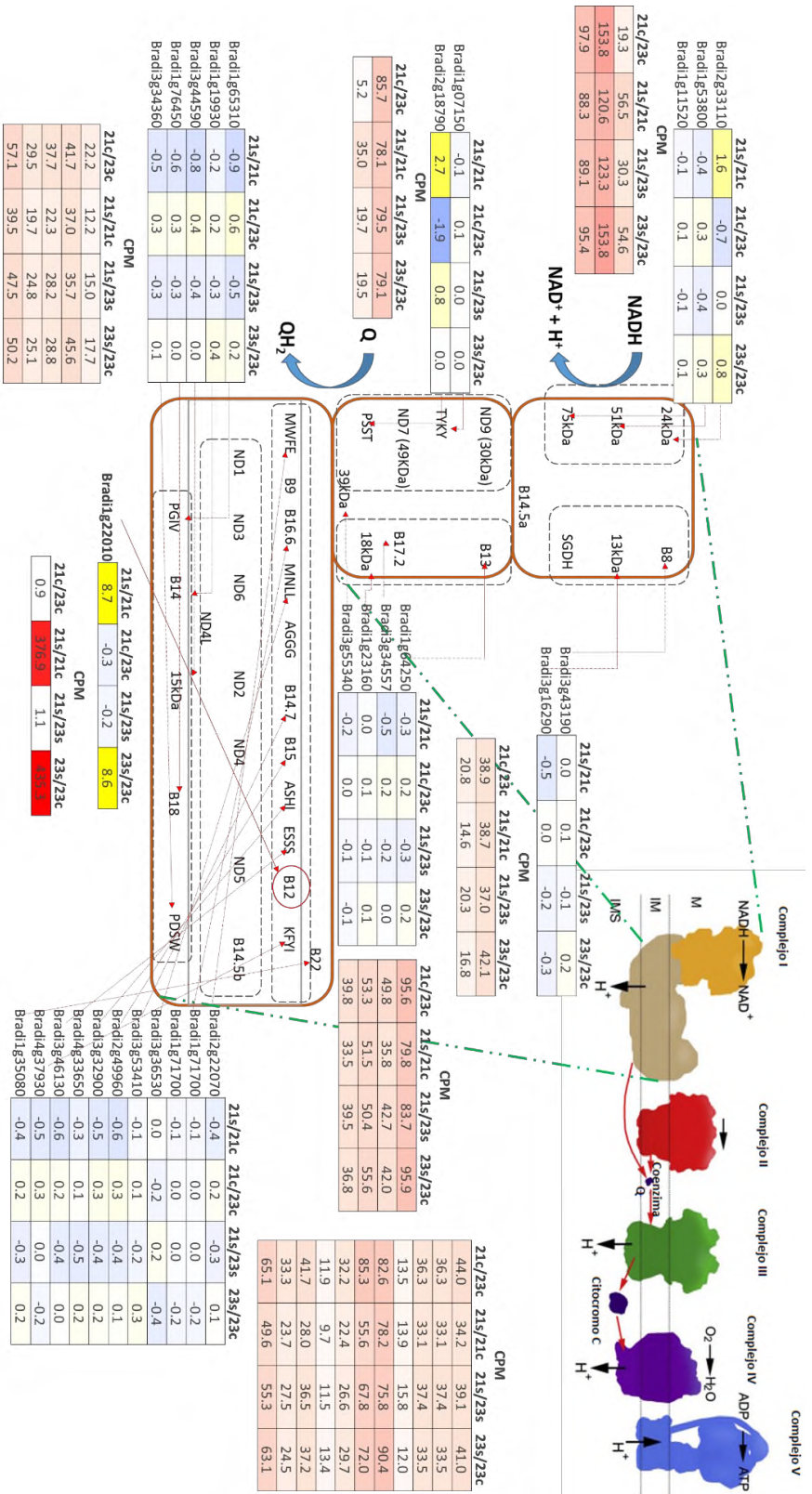
La Tm fue calculada de acuerdo a lo reportado por Breslauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3745-50 (1986). Se recomienda que el usuario realice el cálculo de dicho parámetro tomando como base la metodología que mejor se ajuste a sus propósitos

I. Q. Gabriela Castillo.

Anexo F. Análisis estadístico de las líneas de T-DNA
Altura final a la hoja más alta de las líneas de T-DNA del segundo experimento.

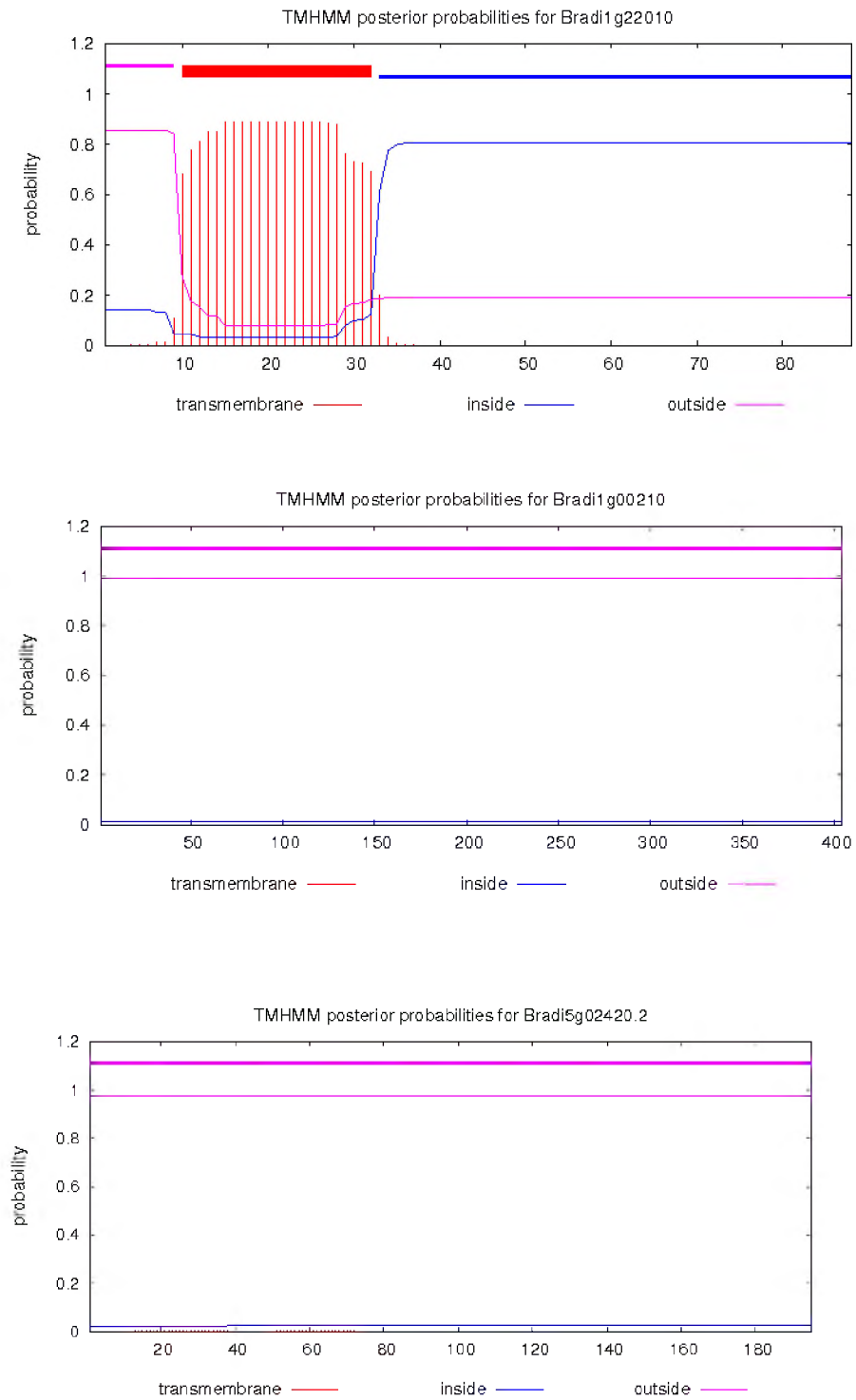


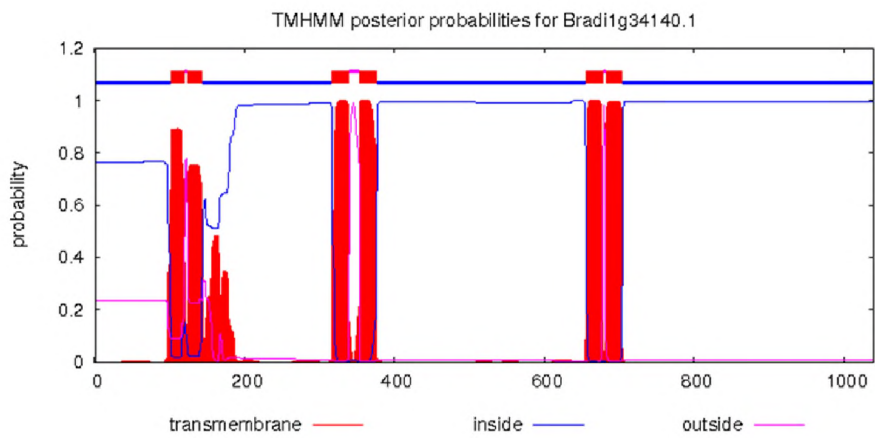
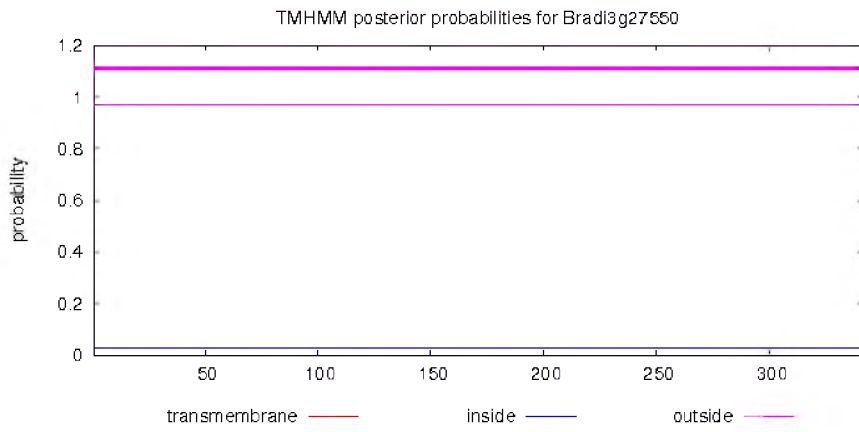
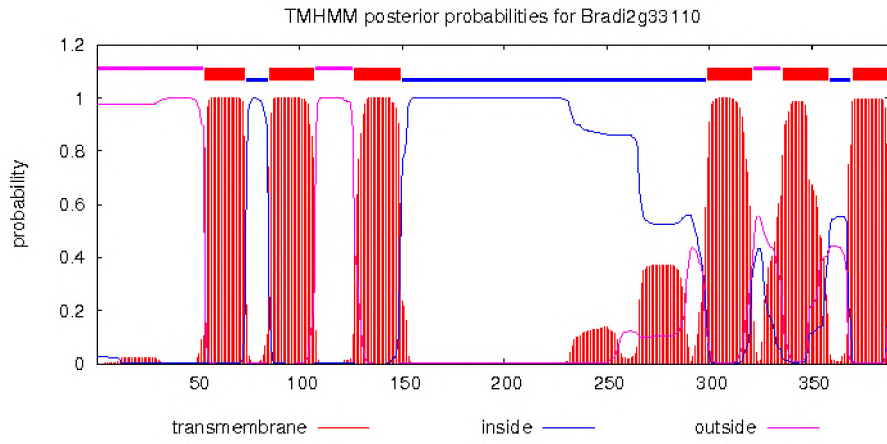
Anexo G. Modelo del complejo I del transporte de electrones.

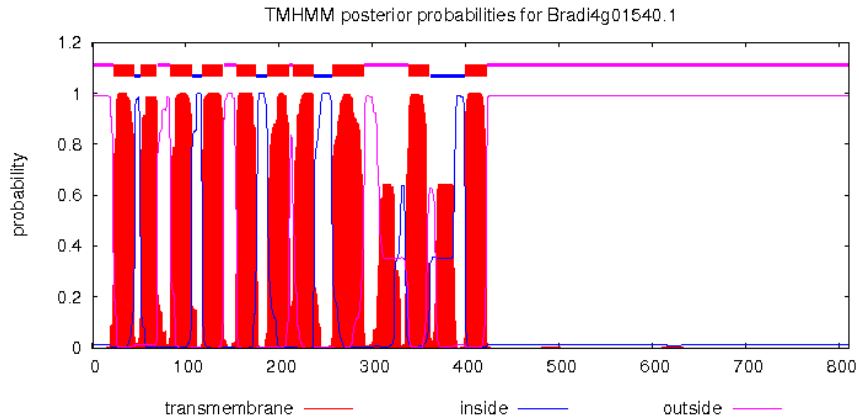


La figura de la esquina superior derecha representa a la cadena transportadora de electrones con los 5 complejos de la cadena transportadora de electrones.

Anexo H. Predicción de hélices de transmembrana en proteínas con TMHMM







Anexo I. Alineamiento por T-Coffee de Bradi1g22010 con secuencias B12 del CIV.

	Segmento transmembranal	
Homo	KHPSLIP---- <td>NPDVCWRNN-PE-----</td>	NPDVCWRNN-PE-----
Mus	KHPSLIP---- <td>NPDVSWRKNNPE-----</td>	NPDVSWRKNNPE-----
Drosophila	KNPALIP---- <td>NPDVTWNRSTNPE-----</td>	NPDVTWNRSTNPE-----
Nematostella	RYPELIP---- <td>HPEAAIDKKNPNY-----</td>	HPEAAIDKKNPNY-----
Debaryomyces	LPIEMYP---- <td>DKELRLWKNANL-SN-LDNVLN--</td>	DKELRLWKNANL-SN-LDNVLN--
Pichia	IPVELTP---- <td>DRTLRLGRKNPEFNEKFEEAVS--</td>	DRTLRLGRKNPEFNEKFEEAVS--
Neurospora	IPVELTP---- <td>DRTLRLGRKNPEFNEKFEEAVS--</td>	DRTLRLGRKNPEFNEKFEEAVS--
Cryptococcus	FPVEVMP---- <td>GPEVWDRSSDWR-----</td>	GPEVWDRSSDWR-----
Dictyostelium	IDYATAP---- <td>DODISLTRKGOML-W-K-DNPT--</td>	DODISLTRKGOML-W-K-DNPT--
Saccharomyces	IPVELTP---- <td>DETLRLTG-NPELSS-LDEVLA--</td>	DETLRLTG-NPELSS-LDEVLA--
Kluyveromyces	VPVELTP---- <td>DDSLRVSRKNPEOSA-LDKVLN--</td>	DDSLRVSRKNPEOSA-LDKVLN--
Schizosaccharom	EYPELFI---- <td>QHEDOVRIPSKN-AH-----</td>	QHEDOVRIPSKN-AH-----
Plasmodium	NDPSOYN---- <td>NPDVHFRRODKRRNI-IDRYOHHA</td>	NPDVHFRRODKRRNI-IDRYOHHA
Bradi1g22010	LKPDVYP---- <td>NPDVRISKSNROSAV-LENAEE--</td>	NPDVRISKSNROSAV-LENAEE--
Bradi1g44510	VRPEVYP---- <td>NPEVRVSKVGRAAGV-LDNHEE--</td>	NPEVRVSKVGRAAGV-LDNHEE--
LOC_0s7g41350	VKPDVYP---- <td>NPDVRVNKSHROSAV-LENADE--</td>	NPDVRVNKSHROSAV-LENADE--
At3g29970	VRPEVYP---- <td>NPDCRINKEHRKMG-I-LENKDE--</td>	NPDCRINKEHRKMG-I-LENKDE--
At3g48140	LRPEVYP---- <td>NPEVRCTKENRAAGI-LDNHAE--</td>	NPEVRCTKENRAAGI-LDNHAE--
At2g02510	HP-MLSNQMRHALPGIGVGAFCVYLV-GEIYSKLM-APSSOSSHO-----	KOPAP-----
At1g14450	HP-MLSNQMRHALPGLGIGVAAFCVYLV-GEIY-----	NKALAPSKSSHHHQ-----EQTAP

At2g02510 y At1g14450 son secuencias B12D de CI, se observa que no tiene similitud con el resto que pertenecen a B12 de CIV.

Anexo J. Mutagénesis por EMS en Bd21

El objetivo es de 1800 M1 teniendo 10 plantas vivas por maceta/pulgada, suponiendo que un 80% germinara al plantar 13 semillas/maceta por lo que se necesitara 1900 semillas totales a lo que equivale a 7.10 g de semillas. Para tener en cuenta las perdidas en el uso de semillas el lavado se divide en dos frascos 8 g (4 g/frasco). Tratar con 0.6% = 50 mM EMS. Usar 100 ml de agua con EMS diluido sol. n= 50 ml/matraz + 0.3 ml EMS.

1. Por la mañana se procede a remojar las semillas en agua. Ponga 4 g en cada uno de los matraces de 500 ml y añadir 300 ml de agua a cada matraz y remojar por 4 horas. Cambiar el agua cada hora.
2. Drenar y añadir 50 ml de agua en cada matraz y después adicionar 0.3 ml de EMS para cada matraz y mezclar bien, dejar remojar en EMS por 17 h a 25 °C con agitación suave en una incubadora. Nota: mantenga los frascos en un recipiente en caso de rotura. Colocamos los frascos firmemente ajustados en un agitador rotatorio. Mantener en campana de extracción.
3. Después de las 17 horas se lavan 10 veces con 300 ml de agua. Agitar durante 10 min cada lavado.
4. Poner las semillas húmedas en papel (5 capas en grandes placas de Petri y añadir agua hasta que el papel estén saturadas y verter el exceso) y dejarlo en un lugar frío durante 4 días.
5. Plantar en charolas dejando un área de 3x3 pulgadas para sembrar 13 semillas por espacio. La cantidad de sustrato a utilizar será de 7 litros por charola, esto dependerá del tamaño de la charola variando la cantidad de sustrato a usar. Crecer en un cuarto de crecimiento con un ciclo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Nota: tenga en cuenta que el autor no ha probado este protocolo con Bd21. Menciona que las personas que usaron Bd21 han tenido una mala germinación después del tratamiento con EMS, no haciendo mención de los detalles de cómo realizaron su tratamiento con EMS.

Precauciones

El EMS es un potente mutágeno (es por eso que utilizamos esto en primer lugar). Es probablemente lo más peligroso que va a manejar en este laboratorio. Use guantes dobles, bata y gafas de seguridad, y siempre que lo maneje que sea en campana de extracción.

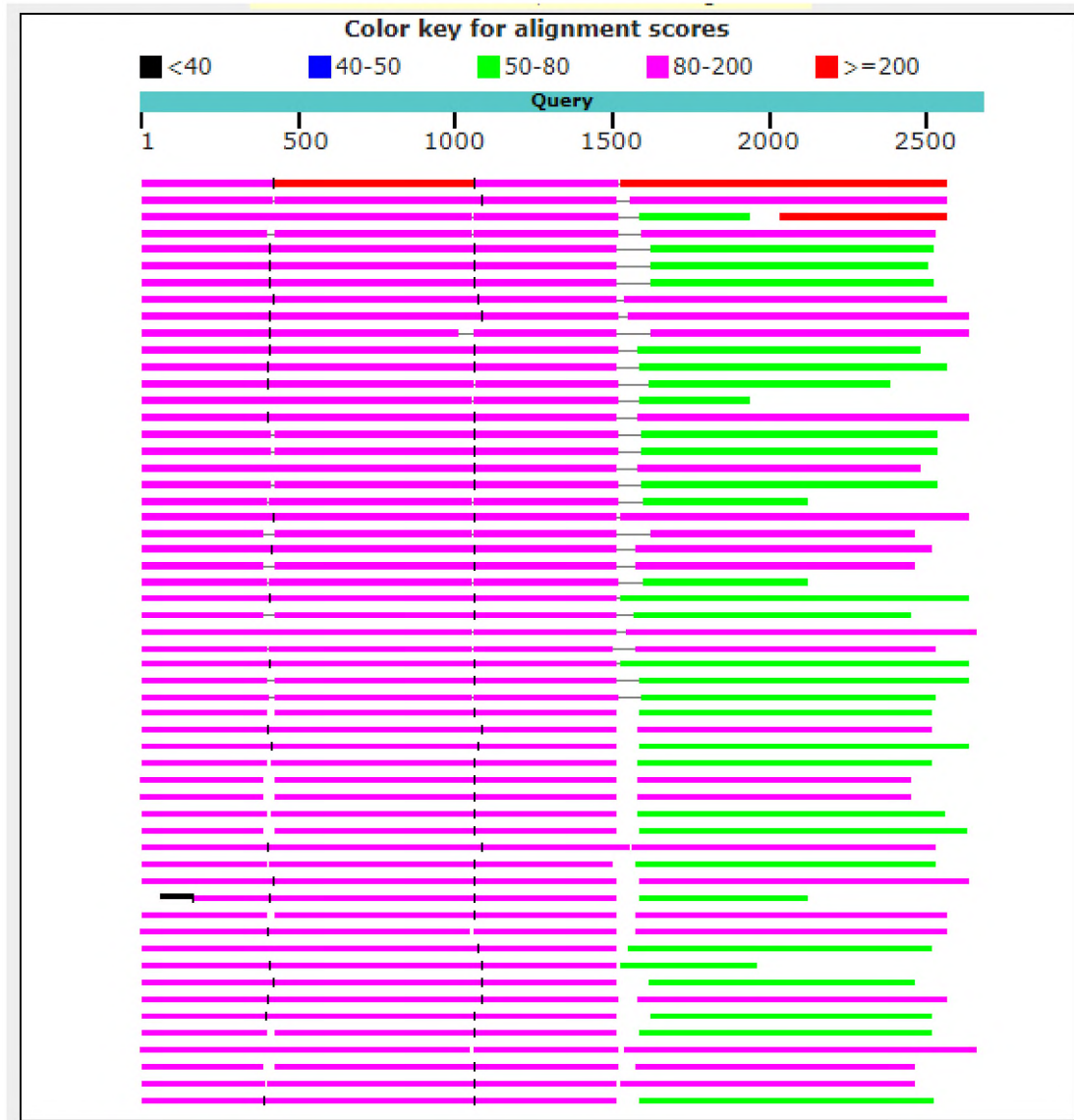
Anexo K. MEME-Suite de Bradi1g00210 con sus dominios y consensos de aminoácidos.



Anexo L. Secuencia genómica reconstruida de Bradi5g02420

CTTCAGGAAATCAGGTCTGCTTTGTTCCAGATGGGTCCAACCAAGGCACCAGGGCCAGATGGTTTCCCAGCATT
ATTTTATCAAAACATTGGGATTTATTGGGAGAAGATATTTGTGCAGCAGCAAAGGCTTTCTTTTGGGGCTAGA
TATTCCTGAAGGCTTTTGTCAATTCGGTAATAGTCCTTGTGCCAAAAGTTAATCATCCTGATACGCTTTATAATTT
CCTGCCAATAAGCCTTTGCAATGTCATTTATAAAAATAGCCTCTAAAGTAATTGCTAATTGCCTTAAACTCTTTTTG
CCGCATATTATCTCTGAACAGCAAACGCCTTTGTGCCAGGAGACTAATTACTGACAACATACTAGTTGCTTAT
GAATGCTTGACACAATCCGAAAACAGAAGGCGAAACATCCTTTTTTCCCCTGAAAATAGATATCACAAAGGCT
TATGATAGGGTAGATTGGCATTATTTGAGGGGAATTCTTTTGAATTCGGTTGCAACACCAGTTGCGTGGAAT
GGTCATGAGATGTGTAACCTTCTGTTAAATATGCTGTTAAAGTAAATGGTGTTTTAAACCGAGTCCTTTTTGCCAAC
TAGAGGCATTAGACAAGGGACCTATAAGTCCTTATTTATTTTTGTTATATGCTGAAGGCCTATCTTGCTTGTG
CAGCAAAAAGAAGCATCTGGTCAATTGAAGGTTATCCAATGGCAGAAATGGTTCACCTATCTCCCACTTATTGT
TTGCTGATGACAGTGTGTTCTTCACTAAAGGAGATGATATAAGCATCAATGGGCTTAAATCCGCACTGCGAACT
TACTGTGATGGATCAGGGCAGAAGATCAACCTACAAAATCCTCAATATTCTTTGGCACACACTGTAATGCACAG
GCCAAGGAAAAAGGTGAAGGAAAAATTGGAAGTGCATGATGAGTCGCTGCAAGCGACATATCTTGGCATGCC
AACCTGGGTGGGATGTTCCCAACGAGTAATTTAATTTTCTCACTGGTCTGCTACGAAACGCCTTAAATGGGT
GGAGTGATCGCCCCCTCAAGGGCCGGTAAGGAAGTTCTTGAAGTCGGTGGCTCAGGGCATCCCAACATAT
GTCATGAGTTGCTTCCAGATTCCTTAACTATTTGTGATAAGCTAAGGCAACCAATATCAAACCTTCTGGTAGGGT
ACTGAAGAGGGGAAGAAGGTACATTGGAGATCTTGGGACTGTTATCATCACCAAAGTAATTGGGTGGAATG
GGCTCCGGGACATGGCAATCTTAAATCAAGCTATGCTTGGAAAACAATGTTGGAGGTTATTGACCAAACCAAA
TTCTCTAAGCGCCCCGGTGCTAAAGGTCGATACTAGCCTGACGGGGATTTTTGGACAGCACAATGTCCAAGA
TCATCTTACACTTGGCGTAGTATCATGCATGACAAGAAGCTACTGCAGAAAGGTATATTCTGGAGAGTTGG
AGACAGTAAGCACATAAGCATTCTTAGGGTCACTGGATCCAAGGTATCATCCCTGCCACCTTATTGGCTTACCCT
TACATAGATGTTAACCAAACAGTAAACTCTCTCATGTTGGAAAACGAGCATAGGTGGAATGAAAGTGCTATAAA
AAACTAATTTCCGGAGGAGATACCAGAGAAAAATCTTAAAGCATACCTATTAGCATAGAGGGGTATAATGATTTCC
CTTCCTGGTCCCACTCCAATCTGTTGCATACACGGTTAGATCAGCATATAATTTGCTGAGAACCTATCGATTCT
GGAATAACCGGAGTTTTTTCAGGTAAAGGCTCCTCATCAAACAAGATCCCATGGAGAAGGCTTGAAGAAACT
ATGGACAATTCAGTGCCCAAACAAGATGAAGATTGACTATGGAGAATAACTCACAATTGCCTACCTACAGGTT
TCCTACTTCGTCATATGTGACAGAAATTTGGAAGCAATTAAGAAGGATTATGGCATTTCCTTAAACTATTTT
TTTTCATTCATATTAGCCAATGGATGCTGGACTGGATAACTGAGGCTCCGGCTGACCACTCCATGATCCTAGCG
GTTGCTATGTGGCATAATTTGGGAGAACAGAAATGTTCTCGTAATGGTGAGGCACCTTGCTCACCTCTTCGTGT
GGTGGGGAAAATCAAGGCTTATATTAATTTTACTTTGTATAATGGCAGTTCAACGGGCTGCAACAGGCGTG
AGACCTCGATATCAATTCAGAAATGGTCTCTGCCGCCGAAGGCCTGTTACTGATCAATGTGGATGCTGCGATC
TTTTCCCACTCAAGACGAGCAGGCTGTGGCGTTGTGGCATGTGACCACCAAGAGGTGTTATTGGCAGCAAATC
GATGTGCTTTTATCATATCCAAAACCCAGAAGTGGCTGAAGCTCTTGTGTTTCGTCAGCCCTCATCTTCGCCA
AAAGAGCTAAGGTTCAAGGTAGCTTCTGACTGCCTAACGCTGATAAACAAGGTGCGAGATGTAGGCATCGACAG
ATCCCTTATTGGCGCCATTGTCCAGGACATCAAATCTAGTGCTGCAAAGTTTTAATCTTGTAGTTTCATTCATGTT
AATCGTTGTTGTAATGAGATCAGGACCATTATCGGTAACGAACAACCTATTTATGAATGAGAAAATGCTG

Anexo M. Blast genómico reconstruido de Bradi5g02420



Anexo N. Germinación de las líneas mutantes de T-DNA



Líneas mutantes de T-DNA en contraste con su ecotipo silvestre Bd21-3.