

Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

Identificación y estudio de la expresión de los Factores de Respuesta al Etileno del Grupo VII en *Brachypodium distachyon* que participan en la respuesta al estrés por inundación

TESIS

Presentada por:

Teresa Zamora Hernández

Para obtener el grado de:

Ingeniero en Biotecnología

Asesor de proyecto

Dr. Julián Mario Peña Castro

San Juan Bautista, Tuxtepec Oaxaca

Enero de 2016.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la asesoría del Dr. Julián Mario Peña Castro y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto de Ciencia Básica 152643 y la asignación de becario de proyecto de investigación 21776.

Agradecimientos

A mis padres Teresa Hernández y Josafat Zamora por brindarme su apoyo incondicional, consejos y nunca dejarme sola para poder culminar con este proyecto.

A mis hermanas Liliana y Adriana por el apoyo que siempre me brindaron.

A Eliseo José Ramos por formar parte de mi vida, que confió en mí y me ayudó en todo momento.

A mis amigos Adriana Prado, Ivonne Janeth e Hipólito Torres por su apoyo incondicional, y por la amistad que me han brindado.

A José Francisco Pulido e Irma Karla Rivera por su ayuda y consejos brindados durante este proyecto.

A mis revisores la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, Dr. Enrique Villalobos Amador y al Dr. Edgar García López por sus comentarios y sus aportaciones para este trabajo.

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

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

Fragmentos del presente trabajo se presentaron en los siguientes congresos:

1.- Irma Karla Rivera-Contreras, **Teresa Zamora-Hernández**, Ariana Arlene Huerta-Heredia, Jacqueline Capataz-Tafur, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Piyada Juntawong, Julián Mario Peña Castro. Transcriptomic analysis of *Brachypodium distachyon* ecotypes with contrasting tolerance to submergence stress. Cuernavaca, Morelos. 6 y 7 de agosto de 2015. 1er Simposium Nacional de Genómica Estructural, Comparativa y Funcional. Poster.

2.- **Teresa Zamora-Hernández**, Irma Karla Rivera-Contreras, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Piyada Juntawong, Julián Mario Peña-Castro. A phylogenetic and transcriptional study of the ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR family active under submergence stress in *Brachypodium distachyon*. Querétaro, México. 7-11 de diciembre de 2015. XVI National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology & IX Symposium México/USA. Poster.

3.- Irma Karla Rivera-Contreras, **Teresa Zamora-Hernández**, Ariana Arlene Huerta-Heredia, Jacqueline Capataz-Tafur, Blanca Estela Barrera-Figueroa, Piyada Juntawong, Julián Mario Peña Castro. The transcriptomic study of *Brachypodium distachyon* ecotypes with contrasting survival under submergence stress reveals oxidative stress as a major tolerance factor. Querétaro, México. 7-11 de diciembre de 2015. XVI National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology & IX Symposium México/USA. Oral.

Índice

Resumen	1
1 Introducción.....	2
1.1 La inundación.....	2
1.2 Respuesta de las plantas ante la inundación	3
1.2.1 La fermentación.....	3
1.3 Factores de respuesta al etileno.....	6
1.3.1 Estructura.....	8
1.3.2 Señalización.....	10
1.3.3 El ciclo circadiano	12
1.4 Desarrollos biotecnológicos y la respuesta a la inundación.....	14
1.5 La planta modelo <i>Brachypodium distachyon</i>	14
2 Justificación	16
3 Pregunta científica	17
4 Hipótesis	17
5 Objetivos.....	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos específicos	17
6 Estrategia Experimental.....	18
7 Materiales y métodos.....	19
7.1 Búsqueda de ERFs-VII en bases de datos.....	19
7.2 Análisis de la estructura y creación del árbol filogenético	19
7.3 Diseño de oligonucleótidos.....	20
7.4 Material vegetal	21
7.5 Tratamiento de estrés y colecta.....	21
7.6 Extracción de gDNA.....	22
7.7 Calibración de oligonucleótidos	23
7.7.1 PCR de control de calidad	23
7.8 Extracción de RNA	24
7.8.1 Extracción de RNA con TRIzol.....	24
7.8.2 Extracción, digestión y purificación de RNA sólo por Direct-Zol.....	27

7.9	Síntesis de DNA complementario (cDNA) y control de calidad.....	27
7.9.1	Verificación de ausencia de gDNA	27
7.9.2	Síntesis de cDNA.....	28
7.9.3	PCR de verificación del cDNA	29
7.10	Análisis de la expresión mediante qPCR	30
7.10.1	Método comparativo del $\Delta\Delta CT$	31
7.11	Control de calidad de oligonucleótidos.....	32
7.11.1	Eficiencia de oligonucleótidos.....	32
7.12	Análisis de la expresión de ERFs-VII de <i>Brachypodium</i> por qPCR.....	32
7.13	Análisis por secuenciación de RNA.....	33
8	Resultados y discusión.....	34
8.1	Búsqueda bioinformática	34
8.2	Análisis de la estructura y creación del árbol filogenético	38
8.3	Análisis de dominios conservados en <i>Brachypodium</i>	40
8.4	Estructura génica de los ERFs-VII de <i>Brachypodium</i>	44
8.5	Control de calidad y análisis de la expresión.....	47
8.6	Extracción de RNA y ausencia de gDNA.....	49
8.7	Análisis de la expresión por qPCR	51
8.2	Análisis por RNA-Seq	55
8.3	Factores de transcripción co-expresados en <i>Brachypodium</i> durante el estrés por inundación.	57
9	Conclusión.....	59
10	Recomendaciones	60
11	Bibliografía.....	61
	Apéndices	69
	Apéndice A: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos	69
	Apéndice B: Secuencias seleccionadas por análisis bioinformático para <i>Brachypodium</i>	71
	Apéndice C: Resultados del análisis de dominios conservados con MEME 4.10.2	73
	Apéndice D: Tutorial Mega 6.....	94
	Apéndice E: Secuencias ERFs-VII <i>Brachypodium</i> para el diseño de oligonucleótidos (RNA-Seq NCBI).	96

Apéndice F: Preparación de reactivos	104
Apéndice G: Información de oligonucleótidos proporcionada por la compañía Macrogen	105
Apéndice H: Ecuaciones para la centrifuga Universal 320 R	106
Apéndice I: Multialineamiento MUSCLE de los ERFs-VII de <i>Brachypodium</i>	106
Apéndice J: Regiones genómicas NCBI.....	109
Apéndice K: Curvas Melting obtenidas en este trabajo.	112
Apéndice L: Imágenes de la primera prueba	113

Índice de figuras

Figura 1. Zonas en México de incidencia de huracanes del periodo de 1950-2004, donde 1-10 representa menor a mayor incidencia (Manson y Jardel 2009).	4
Figura 2. Ecorregiones más afectadas por huracanes de México (rojo más oscuro) que alcanzaron niveles 3 a 5 en la escala Saffir-Simpson (Manson y Jardel, 2009).	4
Figura 3. Estructura del domino APETALA2 de los ERFs.	6
Figura 4. Los mecanismos quiescente y de escape durante la respuesta ante el estrés por inundación en algunas variedades de arroz (Peña-Castro, 2014).	8
Figura 5. Multialineamiento MUSCLE de la sección del N-terminal de los ERFs-VII de <i>Arabidopsis</i>	9
Figura 6. Dominios conservados de los ERFs-VII y algunas de sus funciones caracterizadas a la fecha tomando como modelo a RAP2.12.	10
Figura 7. Mecanismo de acción de los ERFs-VII durante la normoxia (+O ₂) y el estrés por hipoxia (-O ₂ ; Peña-Castro, 2014).	11
Figura 8. Entrelazamiento de la señalización molecular de SUB1A, el ciclo circadiano, la inducción hormonal y las rutas metabólicas en la respuesta quiescente (Peña-Castro, 2014). .	13
Figura 9. Estrategia experimental seguida en este trabajo.	18
Figura 10. Preparación de las diluciones para la determinación de la eficiencia de amplificación de oligonucleótidos.	32
Figura 11. Búsqueda BLASTN de la secuencia de nucleótidos de <i>SUB1A</i> en el genoma de <i>Brachypodium</i>	34
Figura 12. BLASTP de la secuencia completa de aminoácidos de <i>SUB1A</i> en NCBI.	35

Figura 13. BLASTP de la sección del C-terminal de la secuencia de aminoácidos de <i>SUBIA</i> en NCBI.....	36
Figura 14. Alineamiento del resultado del BLASTP en NCBI de XP_003573983.1.	36
Figura 15. BLASTP de la sección del N-terminal de la secuencia de aminoácidos de <i>SUBIA</i> en NCBI.....	37
Figura 16. Resultados de alineamientos del BLASTP de la sección de CMVII-3 de <i>SUBIA</i> en NCBI.....	37
Figura 17. Árbol filogenético de los ERFs-VII de arroz, <i>Arabidopsis</i> y <i>Brachypodium</i> obtenido del multialineamiento con MUSCLE.	39
Figura 18. Árbol filogenético de ERFs-VII utilizando el multialineamiento ClustalW.....	40
Figura 19. Análisis de dominios en el ERF-VII RAP2.12 de <i>Arabidopsis</i> en MEME bajo modo normal y tres diferentes tipos de análisis.....	41
Figura 20. Análisis de dominios en el ERF-VII RAP2.12 de <i>Arabidopsis</i> en MEME bajo modo discriminativo y tres diferentes tipos de análisis.	42
Figura 21. Análisis de dominios en el ERF-VII Bradi3g60120 de <i>Brachypodium</i> en MEME bajo modo normal y discriminativo en tres diferentes tipos de análisis.	43
Figura 22. Comparación de los dominios conservados entre <i>Brachypodium</i> y <i>Arabidopsis</i>	44
Figura 23. Estructura de los genes ERFs-VII de <i>Brachypodium</i> a partir de NCBI.....	45
Figura 24. Gel de agarosa al 2% de la extracción de gDNA.	47
Figura 25. Comprobación de los oligonucleótidos a partir del gDNA.	47
Figura 26. RNA de <i>Brachypodium</i> en electroforesis de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 en gel de agarosa al 1% para la extracción de RNA mediante el kit.	49
Figura 27. PCR para la verificación de la ausencia de gDNA en las muestra de RNA de Bd21 y Bd2-3.	50
Figura 28. Verificación de cDNA.....	50
Figura 29. Expresión de los ERFs-VII de <i>Brachypodium</i> por qPCR.	53
Figura 30. Patrones de expresión para los ERFs-VII de <i>Arabidopsis</i> obtenidos de la base de datos DIURNAL.....	54
Figura 31. Patrón de expresión de los ERFs-VII de <i>Arabidopsis</i> durante estrés por hipoxia (1% O ₂).	55

Figura 32. Análisis de expresión por RNA-Seq de LogFC de Bd21 y Bd2-3 durante 48h de estrés.	56
---	----

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Brachypodium</i>	15
Tabla 2. Componentes del buffer de extracción.	22
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR de oligonucleótidos.	23
Tabla 4. Programa de PCR.	23
Tabla 5. Componentes de la digestión con DNAsa.	25
Tabla 6. Componentes de la PCR verificación de ausencia de gDNA.	28
Tabla 7. Componentes de la síntesis de cDNA	29
Tabla 8. Componentes de PCR de verificación de cDNA.	29
Tabla 9. Componentes de qPCR.	30
Tabla 10. Programa de qPCR.	31
Tabla 11. Proteínas ERFs-VII para <i>Brachypodium</i> , resultado del análisis en bases de datos. ...	38
Tabla 12. Oligonucleótidos sintetizados para <i>Brachypodium</i>	46
Tabla 13. Datos de Expresión de los ERFs-VII de <i>Brachypodium distachyon</i> obtenidos a las 48 h de estrés por inundación y controles por RNA-Seq (cuentas por millón \pm D.E.) para los ERFs-VII de <i>Brachypodium</i>	56
Tabla 14. Transcritos inducidos por inundación agrupados por análisis GO en la categoría Regulación de la transcripción dependientes de DNA y su identidad (RNA-Seq, GEO GSE74222)	58

Resumen

México se encuentra rodeado por aguas oceánicas intertropicales y está expuesto a los efectos del cambio climático. Eventos como la sequía y los huracanes provocan pérdidas en el sector agrícola que llevan a la aparición de migrantes ambientales puesto que no existe una buena prevención de los daños que estos cambios pueden causar. Es necesaria la implementación de instrumentos y seguros agropecuarios para los sectores de la población más pobre así como hacer disponibles cultivos con rangos más amplios de tolerancia a los cambios ambientales.

La investigación de los mecanismos de tolerancia y respuesta al estrés por inundación en plantas se ha convertido en un objetivo importante para los programas de mejoramiento que buscan obtener plantas capaces de tolerar ciertos periodos de anegamiento. En Asia, el programa de mejoramiento genético del International Rice Research Institute ha logrado obtener los cultivares *SUB1* de arroz (*Oryza sativa*) que poseen tolerancia a la inundación de hasta 14 días gracias a la presencia de un gen del tipo Factor de Respuesta al Etileno (ERF) llamado *SUB1A-1*. Con estas plantas en el campo, el agricultor puede planear sus ciclos productivos, evitar los costos de resiembra y atenuar las pérdidas económicas ante un desastre.

En el presente trabajo se realizó una búsqueda bioinformática en las bases de datos para seleccionar a los ERFs más similares a *SUB1A-1* en la planta modelo *Brachypodium distachyon*. Posteriormente, se analizó la expresión de estos ERFs bajo condiciones normales y de estrés por inundación para lo cual se realizó extracción de RNA y se cuantificó por qPCR.

Se encontraron 8 genes tipo ERF-VII en *Brachypodium* que se agruparon en dos grupos filogenéticos. Cada grupo tuvo una expresión característica que fue activada por la inundación o que permaneció constante, uno de ellos también respondió al ciclo circadiano. Al mismo tiempo, se encontraron expresados otros 12 factores de transcripción de diversas familias. Debido a que no se encontraron diferencias en la intensidad de la expresión en ecotipos de *Brachypodium* de tolerancia contrastante, se propone que la diferencia puede recaer en mecanismos postraduccionales. Esta información será de valor para encontrar los mecanismos de tolerancia en otras monocotiledóneas.

1 Introducción

1.1 La inundación

México está expuesto a una gran variedad de fenómenos meteorológicos como huracanes, tormentas tropicales, inundaciones, sequías, incendios forestales, deslizamientos de suelos, terremotos y erupciones volcánicas que causan daño a las poblaciones humanas y afectan su economía (CENAPRED, 2001). El 90% de los desastres naturales en la agricultura son hidrometeorológicos y de ellos, una quinta parte son inundaciones (AGROASEMEX, 2006) que afectan a todo el país, principalmente a las costas y al sureste del país (INEGI, 2013). Debido al cambio climático, se estima que entre los años 2020 y 2050 se resentirán los cambios en las temperaturas medias del país, por lo que se verán más afectadas las actividades agrícolas (SAGARPA, 2012).

Existen dos tipos de inundación, el anegamiento y la inmersión. Cuando los niveles de agua exceden la zona de la raíz y están presentes por un largo tiempo, se define como anegamiento. Cuando el agua cubre por completo toda la planta se define como inmersión (Gliessman, 2002; Ahmed *et al.*, 2013; Bailey-Serres y Colmer, 2014; CENAPRED, 2014). Las inundaciones causan daño a las propiedades, provocan la muerte de personas, causan la erosión del suelo y el depósito de sedimentos, afectan a los cultivos y a la fauna y son uno de los fenómenos naturales que provocan mayores pérdidas de vidas humanas y económicas (CENAPRED, 2001). Los más afectados por estos cambios son el tercio de la población de América Latina y el Caribe que vive bajo condiciones de pobreza (Conde-Álvarez y Saldaña-Zorrilla, 2007). Esta situación ha provocado en México la aparición de migrantes ambientales debido a las inundaciones en los estados de Veracruz y Chiapas (La Jornada, 2012).

La inundación de las tierras de cultivo puede reducir drásticamente la productividad vegetal, pues la inmersión parcial o total de las raíces y los órganos aéreos restringe la difusión del oxígeno y dióxido de carbono. Esto causa un impacto repentino en actividades bioquímicas como la respiración aeróbica y la fotosíntesis (Voesenek *et al.*, 2006; Peña-Castro, 2014). En la actualidad, los cultivos más afectados son monocotiledóneas como el arroz, con más del 35% de la superficie mundial afectada por inundaciones (Bailey-Serres *et al.*, 2012) así como el maíz y el trigo (Nelson *et al.*, 2009).

Debido a la mala regulación en México -y aunque no está del todo cuantificado- se observa que las zonas de mayor incidencia por huracanes son las costas de Yucatán, del Golfo de México y del Océano Pacífico, algunas zonas de Tamaulipas y de Baja California Sur (Figura 1 y 2; Manson y Jardel, 2009).

1.2 Respuesta de las plantas ante la inundación

Las plantas al enfrentarse frecuentemente a los cambios ambientales bruscos, han desarrollado diversos mecanismos de adaptación a zonas propensas a inundarse como son la formación de aerénquimas y raíces adventicias así como poseer hojas más delgadas para facilitar el intercambio de gases (Voeselek *et al.*, 2006; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Miro e Ismail, 2013; Atwell *et al.*, 2014; Bailey-Serres y Colmer, 2014).

Cuando la planta está sometida a largos periodos de inundación, se presentan daños como la reducción en la elongación del tallo y el crecimiento de pecíolos, retraso en la germinación, senescencia adelantada y una floración tardía (Peña-Castro *et al.*, 2011).

La comprensión detallada de los mecanismos de desarrollo, morfológicos, fisiológicos y moleculares durante la tolerancia a las inundaciones permitiría el desarrollo de estrategias de supervivencia de los cultivos ante este estrés (Voeselek *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de las plantas de cultivo no son tolerantes a la inundación. Así, se han realizado trabajos para estudiar la respuesta molecular vegetal a las inundaciones en soya (Tamang *et al.*, 2014; Syed *et al.*, 2015), maíz (Campbell *et al.*, 2015), trigo (Setter *et al.*, 2008) y arroz (Xu *et al.*, 2006; Miro e Ismail, 2013; Singh *et al.*, 2014).

1.2.1 La fermentación

La inundación conduce a la hipoxia (deficiencia de oxígeno) y progresivamente a la anoxia (ausencia de oxígeno) debido a que los niveles normales de oxígeno (normoxia) se ven modificados drásticamente bajo esta condición (Bailey-Serres y Voeselek, 2010; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Bailey-Serres y Colmer, 2014). Lo anterior, afecta la capacidad celular de producir ATP a través del ciclo del ácido cítrico y de la fosforilación oxidativa (Licausi, 2011). De esta forma, la hipoxia cambia el metabolismo aerobio normal de la planta a la vía

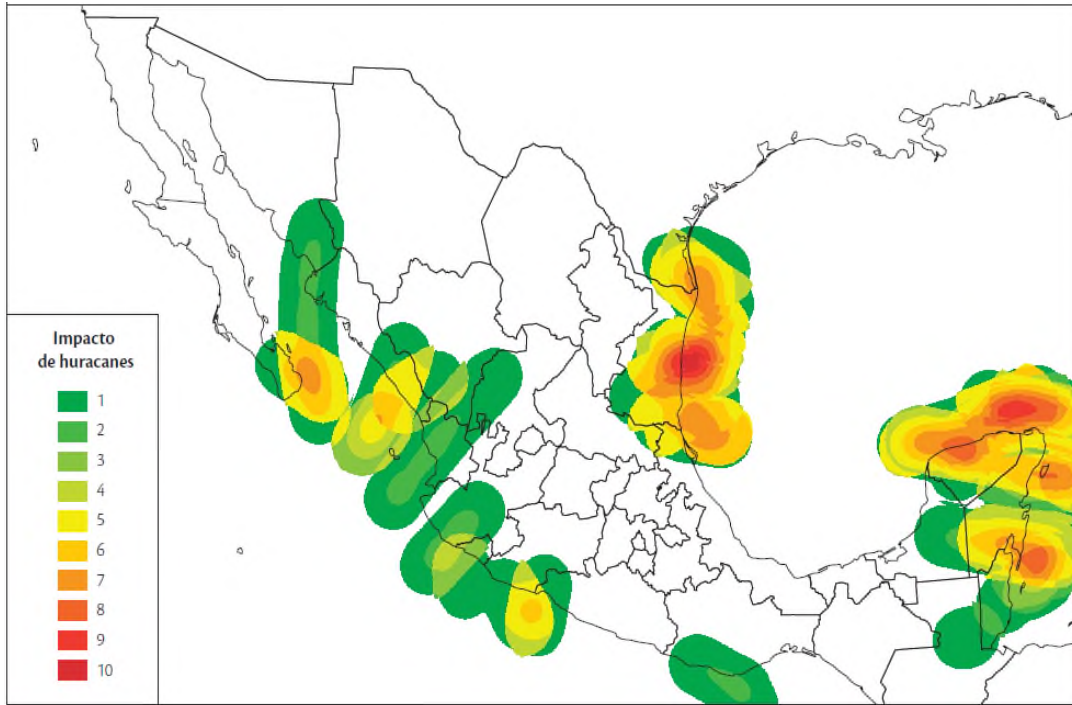


Figura 1. Zonas en México de incidencia de huracanes del periodo de 1950-2004, donde 1-10 representa menor a mayor incidencia (Manson y Jardel 2009).

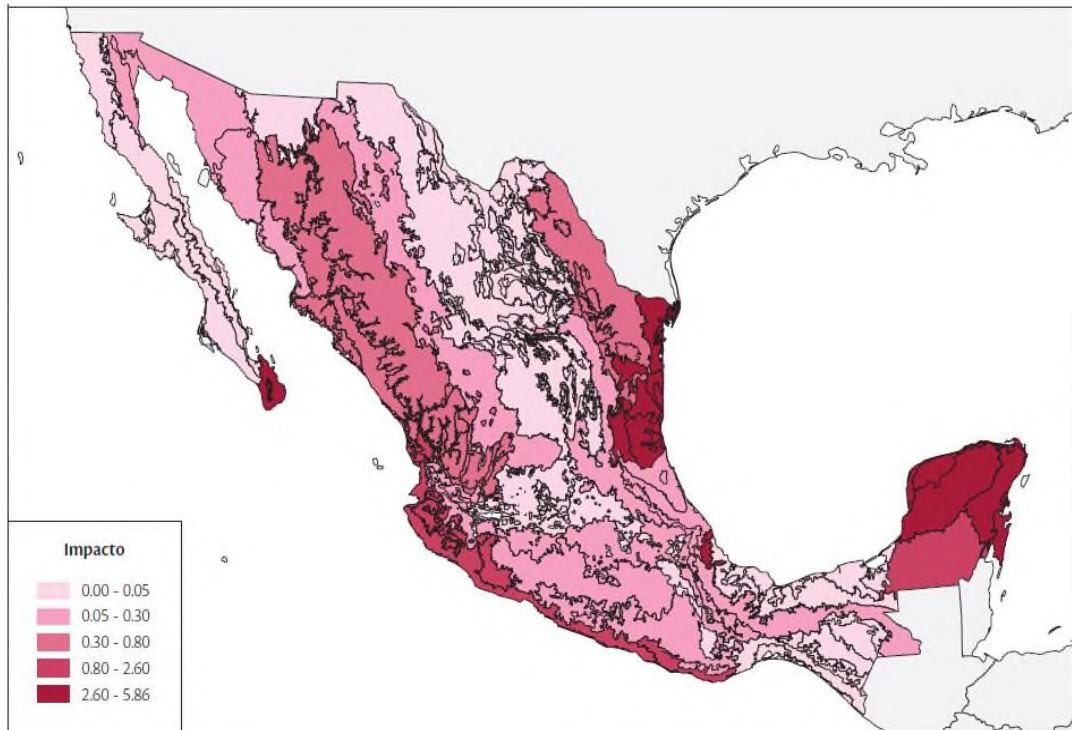


Figura 2. Ecorregiones más afectadas por huracanes de México (rojo más oscuro) que alcanzaron niveles 3 a 5 en la escala Saffir-Simpson (Manson y Jardel, 2009).

anaeróbica o fermentativa como mecanismo alternativo, para evitar que la glicólisis se detenga por la limitación en el contenido de NAD^+ y que disminuya la producción de ATP (Bailey-Serres y Voesenek, 2010; Voesenek y Bailey-Serres, 2013).

En condiciones de anoxia, la fuente principal de energía es la glucosa proveniente del almidón (Fukao *et al.*, 2006). Durante la glicólisis, se producen dos moléculas de ATP y dos moléculas de piruvato, al mismo tiempo, se da la reducción del NAD^+ a NADH (Branco-Price *et al.*, 2008; Peña-Castro, 2014). Para mantener la glicólisis funcionando bajo esta condición, las plantas regeneran el NAD^+ a través de varias vías fermentativas, la más conocida es la fermentación láctica en la que la enzima LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) utiliza como sustrato el piruvato para la producción de lactato, sin embargo este compuesto es tóxico para las células. Otra vía es la fermentación alcohólica en la que el piruvato es convertido en acetaldehído por la enzima PYRUVATE DECARBOXYLASE (PDC) para posteriormente ser transformado en etanol por la enzima ALCOHOL DEHYDROGENASE (ADH) (Branco-Price *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2012; Bailey-Serres *et al.*, 2012; Peña-Castro, 2014). Recientemente, otras rutas fermentativas como la síntesis de alanina, de ácido gamma-amino butírico y de amino ácidos aromáticos se han identificado activas en la inundación (Branco-Price *et al.*, 2008; Barding *et al.*, 2013; Miro e Ismail, 2013; Atwell *et al.*, 2014).

La inundación prolongada disminuye las reservas de carbohidratos y el ATP en los tejidos lo que se ve reflejado en la inhibición del crecimiento; experimentos realizados con soya donde se evaluó su respuesta bioenergética en condición de inundación indican que hay una reducción del almidón de hasta el 95% después de 5 días de inmersión, es decir la planta se ve expuesta a una condición de hambre por la falta de almidón (Tamang *et al.*, 2014). La inundación prolongada puede llegar a causar la muerte de la planta (Xu *et al.*, 2006; Peña-Castro, 2014; Tamang *et al.*, 2014). En apoyo de lo anterior, Tamang *et al.* (2014) evaluaron en soya diferentes condiciones de inundación y observaron que la oscuridad constante reduce la tolerancia a la inundación en comparación con los tratamientos con luz (12 h de luz / 12 h oscuridad).

1.3 Factores de respuesta al etileno

El etileno es una hormona gaseosa que se sintetiza de forma constitutiva en las células vegetales bajo condiciones de crecimiento normales y que se dispersa rápidamente en el ambiente; también es un mediador esencial de las respuestas de inundación ya que cuando los órganos de la planta se encuentran cubiertos por agua, el etileno se acumula a su alrededor induciendo la posterior traducción de señales (Bailey-Serres y Voesenek, 2008).

Los Factores de Respuesta al Etileno (ERFs) son una familia de factores de transcripción y forman parte de la superfamilia APETALA2 (AP2)/ERF (Nakano *et al.*, 2006; Tiessen *et al.*, 2009) que se define por el dominio AP2 que consiste de aproximadamente 60-70 aminoácidos (Figura 3). Los factores de transcripción son proteínas que controlan la expresión de muchos genes a través de la unión a elementos *cis* del DNA que se localizan en los promotores (Liu *et al.*, 1999; Riechmann *et al.*, 2000; Nakashima *et al.*, 2009, Tiessen *et al.*, 2009).

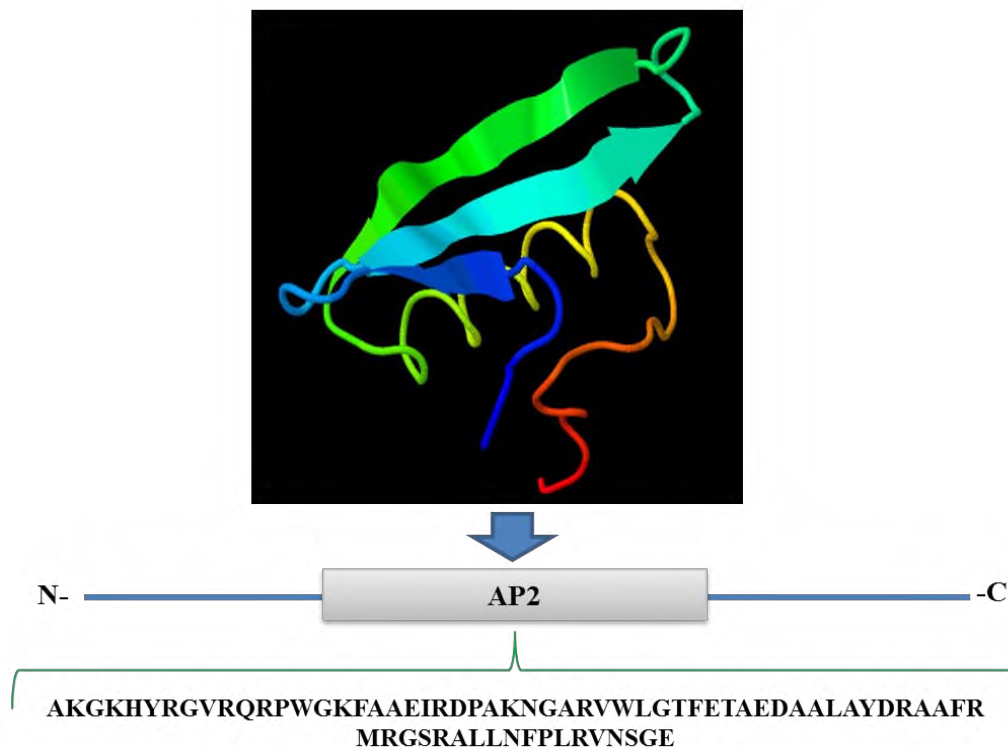


Figura 3. Estructura del dominio APETALA2 de los ERFs.

En gris, se esquematiza el dominio AP2, y la N y C indican el extremo amino y carboxilo terminal, respectivamente. Arriba la estructura tridimensional del dominio AP2 y abajo secuencia de aminoácidos (PDB: 2GCC.A).

Se ha demostrado que las proteínas AP2/ERF tienen funciones importantes en la regulación transcripcional en varios procesos biológicos relacionados con el crecimiento y el desarrollo, así como diversas respuestas a los estímulos ambientales, entre ellos la inundación (Nakano *et al.*, 2006).

Existen variedades de arroz tolerantes a la inundación que logran sobrevivir hasta dos semanas bajo el agua; estas variedades se caracterizan por poseer el locus *SUBMERGENCE 1* (*SUB1*) en el que se encuentran tres genes del tipo ERF-VII: *SUB1A*, *SUB1B* y *SUB1C*. Cabe destacar que el gen *SUB1A-1* es el principal determinante genético de la tolerancia a la inundación en las variedades de arroz (Xu *et al.*, 2006).

En las plantas de arroz *SUB1* se ha caracterizado la estrategia de supervivencia llamada quiescencia del cual es responsable el gen *SUB1A*, que restringe el metabolismo y el crecimiento celular al limitar el consumo de carbohidratos, fomentar la fermentación e inhibir la floración (Figura 4; Xu *et al.*, 2006; Fukao *et al.*, 2006; Peña-Castro *et al.*, 2011).

En otras variedades de arroz que toleran inundaciones poco profundas pero de larga duración, existe la estrategia de escape que se regula por los genes *SNORKEL* (*SNK1* y *SNK2*) que inducen la síntesis de ácido giberélico y promueven el consumo de carbohidratos para una rápida elongación de los tallos bajo el agua para reanudar la fotosíntesis una vez fuera de la inundación (Figura 4; Hattori *et al.*, 2009). Tanto *SUB1A* como *SNK1* y *SNK2* pertenecen a los ERFs-VII.

En diferentes variedades de arroz y sus ancestros silvestres *O. rufipogon* y *O. nivara* cuando se evaluó la relación filogenética de los ERFs-VII codificados en el locus *SUB1*, se observó que *SUB1C* es el ERFs-VII más antiguo (Fukao *et al.*, 2009). En *Arabidopsis thaliana* se encontraron cinco ERFs-VII que son: *RELATED TO AP2 12* (At1g53910, *RAP2.12*), *HYPOXIA RESPONSIVE ERF 1* (*HRE1*, At1g72360), *HYPOXIA RESPONSIVE ERF 2* (*HRE2*, At2g47520), *RELATED TO AP2 2* (At3g14230, *RAP2.2*) y *RELATED TO AP2 3* (At3g16770, *RAP2.3* o *AtEREBP*).

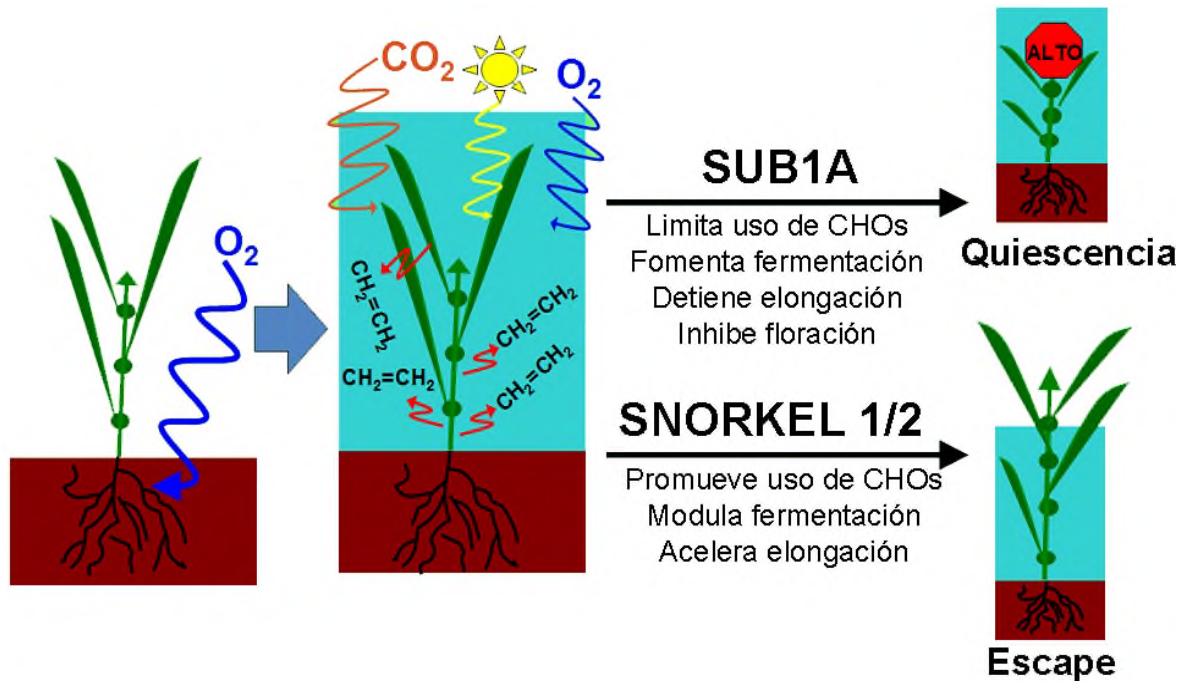


Figura 4. Los mecanismos quiescente y de escape durante la respuesta ante el estrés por inundación en algunas variedades de arroz (Peña-Castro, 2014).

HRE1 y *HRE2* son genes inducibles que contribuyen en la regulación tardía del metabolismo anaeróbico y a la supervivencia de las plántulas (Licausi *et al.*, 2010). Por otra parte, *RAP2.2*, *RAP2.12* y *RAP2.3* son ERFs-VII de expresión constitutiva que funcionan como sensores del estrés por hipoxia (Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011).

1.3.1 Estructura

Los factores de transcripción poseen diferentes dominios que varían en su ubicación y número; se caracterizan por contener una región de unión al DNA, algunos dominios con funciones diversas como interacción con otras proteínas y señales de localización nuclear (NLS). Dependiendo de estas características, los factores de transcripción se clasifican en diferentes familias y estas contienen a su vez subgrupos (Liu *et al.*, 1999).

Nakano *et al.* (2006) realizaron análisis bioinformáticos para la identificación de genes ERF en *Arabidopsis* y el arroz y obtuvieron datos de los motivos conservados (CM), su

estructura y relaciones filogenéticas con las que realizaron la agrupación (grupos I a X) de estos ERFs dependiendo de sus características.

Los ERFs-VII se caracterizan por poseer un motivo N-terminal MCGGAI (I/L) (CMVII-1). Este motivo, en especial la cisteína-2, es la zona donde se percibe la concentración de oxígeno y óxido nítrico ambiental que le confiere su propiedad de regulación durante la hipoxia (Figura 5; Nakano *et al.*, 2006; Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011).

```

HRE1           MCGGAVISDYIA---PEKIARSSGKSSW--
RAP2.3         MCGGAIISDYAPLVTKAKGRKLTAEELW--
HRE2           MCGGAIISDFI-----W--
RAP2.12        MCGGAIISDFIP---PPRSRRVTSEFIWPD
RAP2.2         MCGGAIISDFIP---PPRSLRVTNEFIWPD
                *****:***:

```

Figura 5. Multialineamiento MUSCLE de la sección del N-terminal de los ERFs-VII de *Arabidopsis*. Los colores corresponden a las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos; rojo: hidrofóbicos; verde: polares sin carga; azul: ácidos; rosa: básicos. (*) Representa aminoácidos 100% idénticos; (:) se han realizado sustituciones conservativas y (-): existe por lo menos un aminoácido que no está alineado.

Adicionalmente, se ha reportado que los ERFs-VII de *Arabidopsis* poseen hasta ocho motivos conservados en su estructura de aminoácidos (*RAP2.12* y *RAP2.2*) y otros sólo poseen algunos de estos dominios (*HRE1*, *HRE2*, *RAP2.3*) (Nakano *et al.*, 2006; Bui *et al.*, 2015).

Bui *et al.* (2015) estudiaron al ERF-VII *RAP2.12*, lo fraccionaron y mediante ensayos de trans-activación identificaron que el dominio CMVII-5 (LWS) en la región del C-terminal es suficiente para la transcripción. De igual manera, identificaron que la función del motivo interno CMVII-4 es inhibitoria de la transcripción (Figura 6).

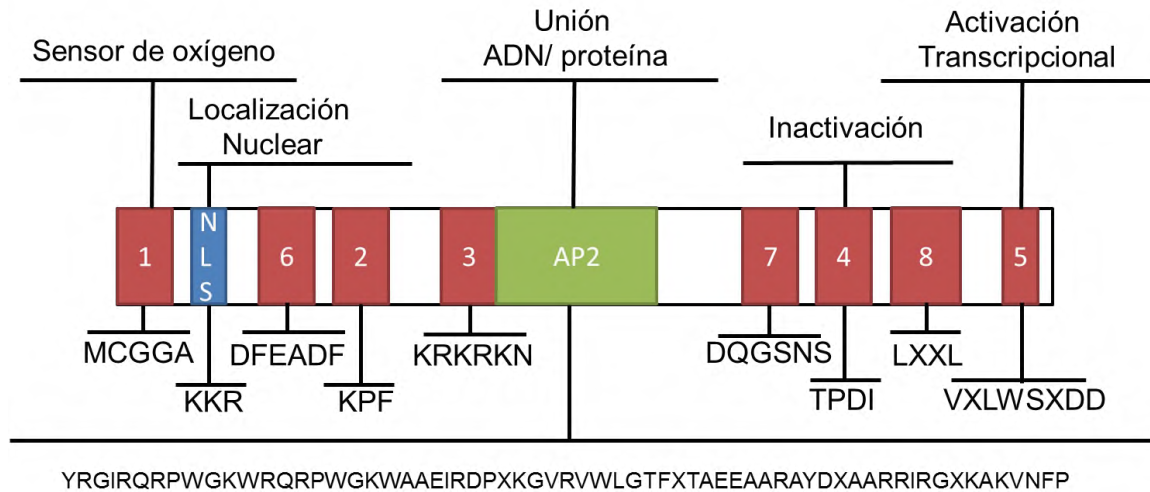


Figura 6. Dominios conservados de los ERFs-VII y algunas de sus funciones caracterizadas a la fecha tomando como modelo a RAP2.12.

Los números son los dominios obtenidos por Nakano *et al.*, (2006).

1.3.2 Señalización

Los ERFs no solo son factores de transcripción, también son los principales señalizadores de la concentración de oxígeno disponible. El control de la respuesta a la hipoxia se media por el mecanismo de señalización de la ruta del N-terminal donde la identificación de un motivo conservado en el extremo amino (Met-Cys) se reconoce y posteriormente se degradada en el proteosoma. De esta manera, se censan los niveles bajos de oxígeno para la regulación de ERFs-VII (Gibbs *et al.*, 2011; Licausi *et al.*, 2011; Tasaki *et al.*, 2012; Kosmacz *et al.*, 2015). En normoxia, hay una baja producción de etileno y la transcripción de los ERFs también es baja; las pocas proteínas ERFs se encuentran secuestradas por proteínas llamadas ACYL-COA BINDING PROTEIN (ACBP) y otra parte se oxida por la ruta del N-terminal por acción de las enzimas PLANT CYSTEINE OXIDASE (PCOs) y ARGINYL-TRANSFERASES (ATE) generando una proteína desestabilizada que se degradará en el proteosoma, para así evitar la transcripción de los genes centrales de hipoxia (GCH ; Figura 7; Licausi *et al.*, 2011).

También se ha demostrado que el óxido nítrico (NO) juega un papel importante en la degradación de los ERFs-VII pues en su presencia, se degradan mediante la ruta del N-terminal. Lo anterior coordina a la proteólisis y a la respuesta normal del NO, que es relevante

en diversas etapas del desarrollo de las plantas como la germinación y respuestas al estrés por sequía (Gibbs *et al.*, 2014).

Kosmacz *et al.* (2015) caracterizaron la localización nuclear y el amplio rango de concentraciones de oxígeno censadas por *RAP2.12*. También observaron su degradación y/o cambio de localización a la membrana durante la reoxigenación.

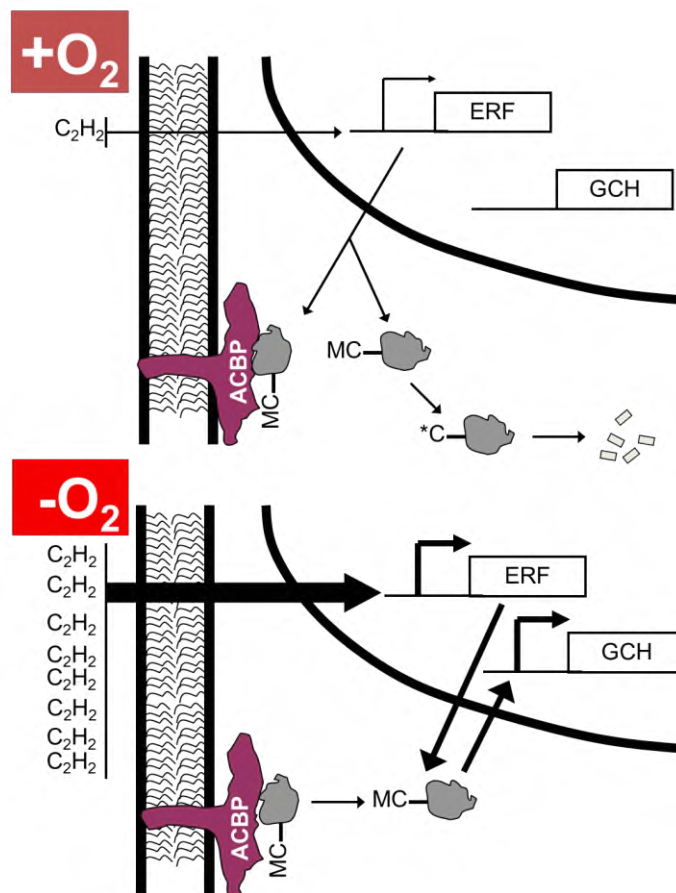


Figura 7. Mecanismo de acción de los ERFs-VII durante la normoxia (+O₂) y el estrés por hipoxia (-O₂; Peña-Castro, 2014).

Aunque la planta hace un pequeño gasto energético al mantener de reserva proteínas ERFs-VII, le permite poder responder rápidamente ante cualquier cambio en la cantidad de oxígeno disponible. Así, cuando hay una baja concentración de oxígeno, también hay una acumulación de etileno en la periferia de la planta lo que induce una transcripción elevada de los ERFs mientras que las proteínas presentes en el citoplasma cambian su localización al núcleo, donde promueven la transcripción de los genes centrales de hipoxia y así, responder ante la inundación (Figura 7, Gibbs *et al.*, 2011, Licausi *et al.*, 2011).

1.3.3 El ciclo circadiano

El ciclo circadiano es un mecanismo autónomo en el que se relacionan las condiciones ambientales y las respuestas biológicas de las plantas durante un periodo aproximado de 24 h en el que las plantas tienen cambios en las proporciones luz-oscuridad, el también llamado fotoperiodo (Raven *et al.*, 1992; Guevara y Jiménez, 2006).

La capacidad de las plantas para identificar la longitud del día y la cantidad de luz es gracias a los fotorreceptores vegetales que transmiten la información luminosa y permiten que la planta pueda censar las condiciones del medio y responda mejor ante las condiciones ambientales (Capel *et al.*, 2003; Mockler *et al.*, 2003; Blázquez *et al.*, 2011); un ejemplo de ellos es la regulación de la síntesis y degradación del almidón para la regulación del balance óptimo del carbono fijado durante la fotosíntesis para ser consumido en el crecimiento durante la noche (Tofiño *et al.*, 2006; Núñez-López *et al.*, 2015). Otros procesos que se encuentran regulados por el ciclo circadiano son la señalización de hormonas y las respuestas a los ataques bióticos y abióticos (Mas, 2015)

En *Arabidopsis* se han encontrado tres genes involucrados en el ciclo circadiano: *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y *LATE ELONGATION HYPOCOTYL (LHY)* que tienen máxima expresión en la mañana y *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* que codifica para una proteína llamada *ARABIDOPSIS PSEUDO RESPONSE REGULATORS (APRR)* y se expresa durante el atardecer. Estos tres genes tienen que ver en un ciclo de regulación positiva y negativa ya que *TOC1* induce la expresión de *CCA1* y *LHY*; a su vez que estos dos últimos hacen que disminuya la expresión de *TOC1* (Guevara y Jiménez, 2006; de Montaigu *et al.*, 2010; Sánchez, 2011; Mas, 2015).

Otro proceso que se encuentra regulado por el ciclo circadiano es la floración, ya que depende de la duración de los días. Por ejemplo, en *Arabidopsis* la floración se induce por fotoperiodos de más de 16 h de luz (días largos) y se inhibe en días con periodos de luz menores a 16 h (días cortos) (Raven *et al.*, 1992).

En el caso de los días largos se da la activación de *CONSTANS (CO)*, un gen relacionado con la floración que tiene su máxima expresión durante la noche y va

disminuyendo durante el día; *CO* actúa sobre el gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* que es un promotor de la floración y sólo lo activa durante días largos. En condiciones de día corto, *CO* disminuye su expresión al final de la noche, no activa a *FT*, y por lo tanto no hay floración (Guevara y Jiménez, 2006; Cesario, 2015).

Peña-Castro *et al.* (2011) evaluaron la sobreexpresión de los genes *SUB1A* y *SUB1C* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* OxSUB1A (35S:FLAG-SUB1A) y OxSUB1C (35S:FLAG-SUB1C) y se observó la reducción en la elongación del tallo y el crecimiento de pecíolos, un retraso en la germinación y una floración tardía. En el nivel molecular, el etileno acumulado en la periferia de la planta, induce la expresión del *SUB1A* (Figura 8), el cual inhibe la floración por medio de la represión de *FT*. Además, se hipotetiza que puede modificar la síntesis de trehalosa-6-fosfato (T6P) que dará como producto trehalosa la cual inhibe el crecimiento y el consumo de almidón (Lee *et al.*, 2011).

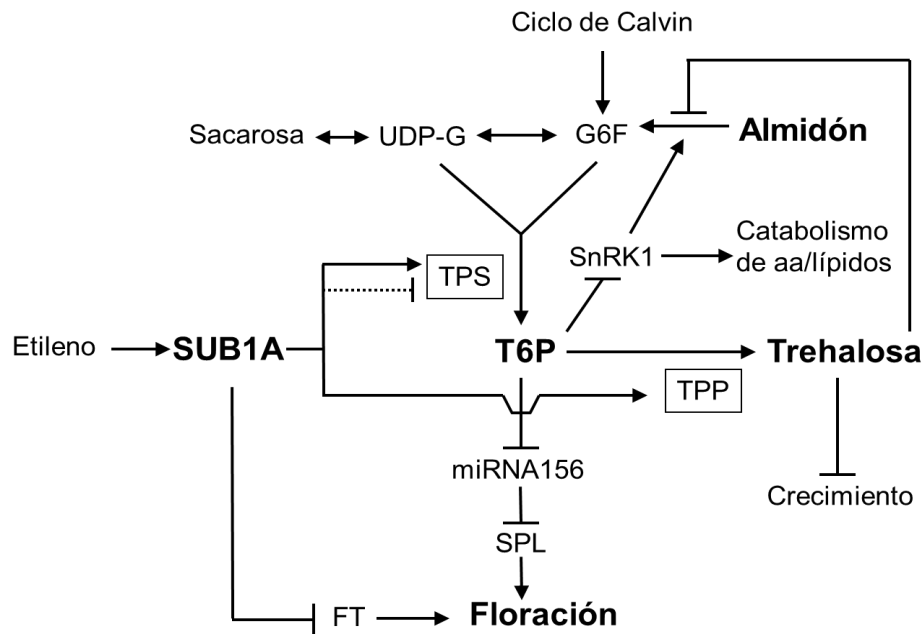


Figura 8. Entrelazamiento de la señalización molecular de SUB1A, el ciclo circadiano, la inducción hormonal y las rutas metabólicas en la respuesta quiescente (Peña-Castro, 2014).

Actualmente, se cuenta con información de expresión de genes circadianos y diurnos para varias especies de plantas modelo en la base de datos DIURNAL (www.mocklerlab.org) en la que se puede predecir el comportamiento génico individual mediante la respuesta de las plantas y los datos genómicos.

1.4 Desarrollos biotecnológicos y la respuesta a la inundación

Debido a la gran importancia de los ERFs-VII en algunas variedades de arroz, en especial de *SUBIA-1*, en el IRRI se desarrolló una estrategia basada en cruza y selección de plantas para introducir el locus *SUB1* en varias variedades comerciales de arroz utilizadas por los agricultores. Estas nuevas variedades *SUB1* tienen una productividad superior en condiciones de inundación de hasta 3.8 toneladas por hectárea contra 1.6 toneladas de las variedades normales y sin variar la calidad del grano (Septiningsih *et al.*, 2008; Bailey-Serres y Voeselek, 2010).

Inicialmente, en las Filipinas se probó esta variedad de arroz con muy buenos resultados a pesar de estar sumergido a causa de las lluvias. El uso de esta nueva variedad tiene un impacto económico importante en esta región y actualmente, las variedades de arroz *SUB1* se usan en la India, Bangladesh, Tailandia, Indonesia, Camboya, Myanmar, Nepal, Filipinas y Vietnam (Jiménez, 2013; Bailey-Serres *et al.*, 2010).

Por ejemplo, la introducción del locus *SUB1* en la variedad Swarna (IRTP12715) de la India dio como resultado la variedad Swarna-*SUB1* (IR05F102) que mantiene las características de la variedad original, además de que soporta inundaciones de hasta 17 días (Dar *et al.*, 2013).

Recientemente, Núñez-López *et al.* (2015) utilizaron la característica de *SUBIA-1* de inhibición de la floración por represión del gen *FT* en *Arabidopsis* para aumentar la concentración de almidón en las plantas y mejorar sus características como biomasa útil para la fabricación de bioetanol.

1.5 La planta modelo *Brachypodium distachyon*

Brachypodium distachyon es una planta anual que pertenece al grupo de las monocotiledóneas de la familia *Poaceae* (Tabla 1), es originaria de Oriente Medio y del sur de Europa y también se ha establecido en las zonas templadas de Australasia, América y Asia (Hands y Drea, 2012).

Brachypodium posee un genoma pequeño de 300 Mpb, cuenta con 5 cromosomas (Draper *et al.*, 2001), y llega a medir aproximadamente 20 cm de altura en la madurez. Tiene una densidad de siembra de 1000 plantas/m², en comparación con otros cultivos como el trigo que en el mismo espacio sólo acomoda a 50 plantas o 36 de arroz. Tiene un tiempo de generación de 8-12 semanas y sus requerimientos de crecimiento son simples (Vogel y Bragg, 2009).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Brachypodium*.

Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Subfamilia	<i>Pooideae</i>

Los análisis han revelado que el genoma de *Brachypodium* es filogenéticamente más cercano a los genomas de cultivos económicamente importantes como el trigo, el arroz, la cebada, y a varias gramíneas potenciales para utilizarse como biocombustibles (Hong *et al.*, 2008; Huo *et al.*, 2009).

Debido a su fácil manipulación en condiciones de laboratorio y a que posee un genoma pequeño, se han desarrollado métodos de transformación estable mediada por *Agrobacterium* para el descubrimiento de la función de genes (Vogel y Hill, 2008; Alves *et al.*, 2009). *Brachypodium* está desempeñando un papel importante en diversos estudios de respuesta al estrés biótico y abiótico, como así como en diversos programas para la mejora de pastos para la producción de biocombustibles (www.brachypodium.org; Garvin, 2007).

En un trabajo simultáneo al presente, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UNPA, se realizó la búsqueda de material genético tolerante a la inundación en *Brachypodium*, se pudo identificar un ecotipo tolerante Bd2-3 y uno susceptible Bd21. Con estos materiales se obtuvo una base de datos transcriptómica (RNA-Seq) de los genes que están regulados durante dos días de inundación en los que se encontró un grupo de 20 factores de transcripción de respuesta a la inundación, entre ellos 4 ERFs-VII (Rivera-Contreras, 2015).

2 Justificación

México se encuentra rodeado por aguas oceánicas y por su ubicación intertropical, es un país afectado por ciclones tropicales. A pesar de esto, no existe una buena planeación sobre los riesgos que estos fenómenos puedan causar ni variedades y seguros agropecuarios para los sectores de la población más pobre que depende de la agricultura de autoconsumo.

En los países desarrollados, existe mayor infraestructura y cuentan con más recursos institucionales, humanos y financieros, por lo que normalmente resisten mejor y se recuperan más rápido después de eventos catastróficos. En cambio, en los países en desarrollo, una de las causas principales de que los efectos de las perturbaciones naturales sean mayores, es su vulnerabilidad extrema a dichos eventos, especialmente en la agricultura.

La investigación de los mecanismos de tolerancia y respuesta al estrés por inundación en plantas se ha convertido en un objetivo importante en la agricultura. Es básico para los programas de mejoramiento que buscan hacer disponibles plantas capaces de tolerar ciertos periodos de anegamiento o inundación.

Debido al papel biológico central que tienen los ERFs-VII durante el estrés por inundación y a su éxito biotecnológico para conseguir variedades tolerantes a este estrés para disminuir los riesgos y facilitar la planeación, en este estudio se caracterizaron los ERFs-VII de *Brachypodium distachyon*, una planta modelo de alta sintenia con monocotiledóneas de importancia económica. Al momento, los miembros de la familia ERFs-VII de *Brachypodium* aún no se han estudiado, a pesar de la probabilidad de que estos genes tengan un papel importante en muchos aspectos fisiológicos.

3 Pregunta científica

¿Cuáles Factores de Respuesta al Etileno se expresan durante la inundación en *Brachypodium distachyon*?

4 Hipótesis

Existen Factores de Respuesta al Etileno del grupo VII activos durante la inundación en *Brachypodium distachyon*.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar los Factores de Respuesta al Etileno de la Familia VII (ERFs-VII) de *Brachypodium distachyon* que se expresen durante el estrés por inundación.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar los ERFs-VII del tipo *SUBIA* en *Brachypodium distachyon*.
2. Analizar la secuencia de los ERFs-VII en *Brachypodium distachyon*.
3. Medir la expresión de los ERFs-VII de *Brachypodium distachyon* en condiciones normales.
4. Medir la expresión de los ERFs-VII de *Brachypodium distachyon* en condiciones de inundación.

6 Estrategia Experimental

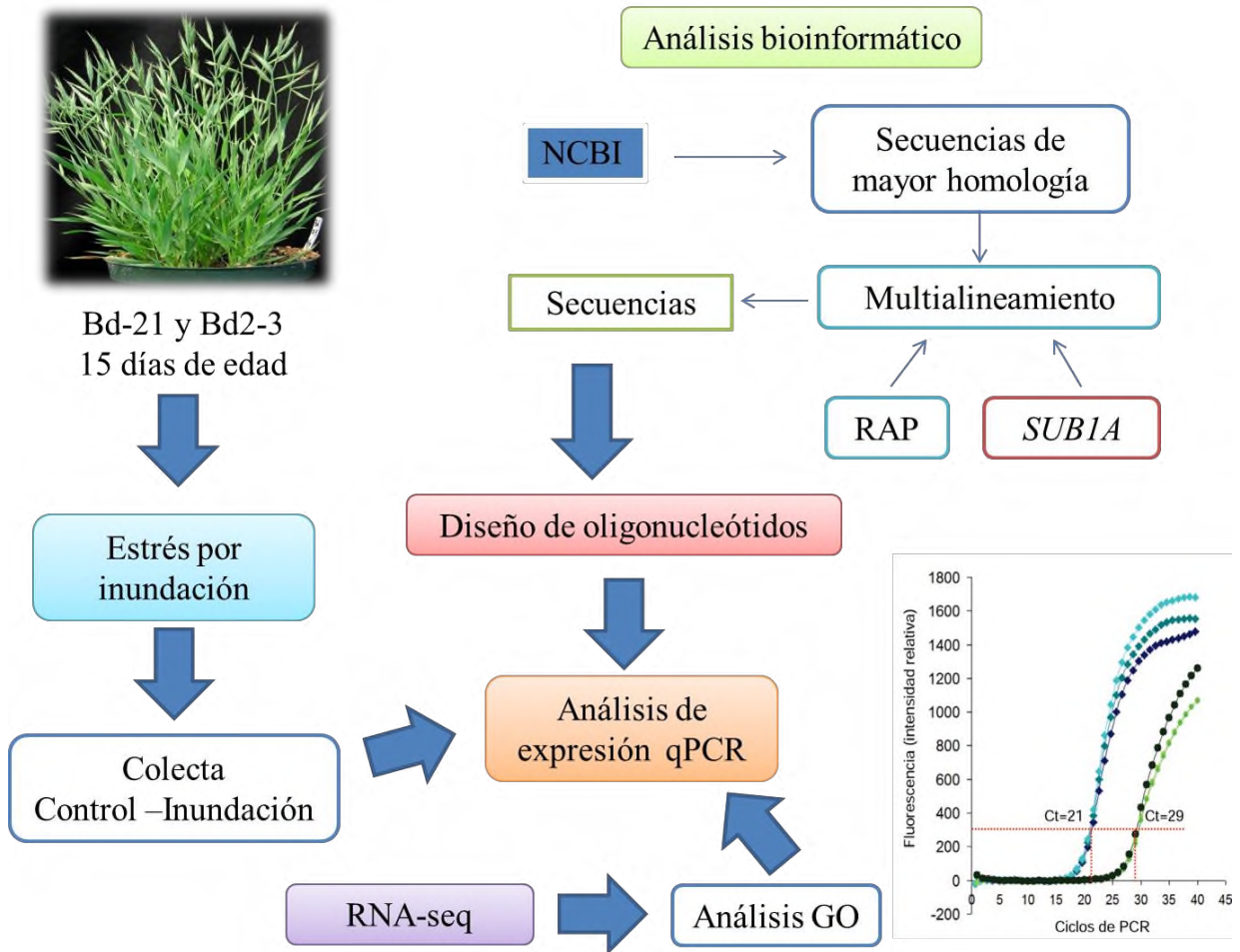


Figura 9. Estrategia experimental seguida en este trabajo.

Para conocer la identidad de los ERFs-VII se realizó un análisis bioinformático con secuencias conocidas con las que se obtuvieron secuencias del tipo ERFs-VII en *Brachypodium* y se realizó el diseño de oligonucleótidos para cada una de ellas. Se utilizaron plantas de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 de 15 días de edad que se sometieron a estrés por inundación o en condiciones normales (control, sin inundar). Posteriormente, se realizaron colectas y se extrajo RNA para el análisis de la expresión por qPCR. Simultáneamente, se tomaron datos de RNA-seq con el que se realizaron análisis de ontología de genes (GO). Bd21 y Bd2-3 son ecotipos de tolerancia contrastante (sensible y tolerante, respectivamente); *RAP/SUBIA* son ERFs-VII; GO (Gene Ontology).

7 Materiales y métodos

7.1 Búsqueda de ERFs-VII en bases de datos

Para realizar la búsqueda de los ERFs-VII en *Brachypodium*, se tomó como referencia la secuencia de nucleótidos de *SUBIA* (GeneBank: DQ011598) del arroz (Apéndice A; Fukao *et al.*, 2009). Con ella, se realizó en *Brachypodium distachyon* (taxid 15368) una búsqueda BLASTN en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Posteriormente, la secuencia se tradujo a proteína con ayuda del programa ExPASy-Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>; Apéndice A). Con la secuencia de aminoácidos se realizó la búsqueda de homología por medio del algoritmo BLASTP de secuencia completa y de cada una de las secciones antes (N-terminal) y después del dominio AP2 (C-terminal). Todas las secuencias de aminoácidos se obtuvieron de NCBI.

7.2 Análisis de la estructura y creación del árbol filogenético

Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de los cinco genes ERFs-VII de *Arabidopsis* de www.arabidopsis.org (Apéndice A) que son: At1g53910 (*RAP2.12*), At1g72360 (*HRE1*), At2g47520 (*HRE2*), At3g14230 (*RAP2.2*) y At3g16770 (*RAP2.3*) así como las secuencias de *SUB1B* (AK068688), *SUB1C* (NP_001062781.1), *SNK1*(AB510478) y *SNK2* (AB510479), estos últimos cuatro, se obtuvieron de la base de datos de la NCBI. Con todas las secuencias se realizaron multialineamientos de aminoácidos con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y se comparó la homología con la secuencias de *SUBIA*, *RAP* y *HRE*. De esta forma, se seleccionaron los homólogos ERFs-VII en *Brachypodium* (Apéndice B). Se verificaron los códigos de acceso en las bases de datos de IBI *Brachypodium* (www.brachypodium.org) y PlantGDB (<http://www.plantgdb.org/BdGDB/cgi-bin/blastGDB.pl>).

Para el análisis de la estructura de los ERFs-VII se tomaron como referencia las secuencias de los ocho motivos conservados de la familia de ERFs-VII (CMVII) de *Arabidopsis* reportados por Nakano *et al.* (2006). Para hacer una análisis de dominios propio, se utilizó el programa MEME versión 4.10.2 (Bailey y Elkan, 1994; meme-suite.org) con el cual se

realizaron tres pruebas. En la primera se utilizaron solamente las secuencias de *Arabidopsis* reportadas por Nakano *et al.* (2006). La segunda prueba consistió en introducir sólo las secuencias obtenidas para *Brachypodium* y la tercera fue introducir todas las secuencias al análisis. En todas las pruebas se realizó en modo *normal* y posteriormente en modo *discriminativo* (en este caso se introducían las secciones de secuencias de cada uno de los ocho dominios de *RAP2.12*). También se realizaron pruebas para la distribución de los motivos en las secuencias (cero o una ocurrencia por secuencia; una ocurrencia por secuencia o cualquier número de repeticiones). Para todos los tipos de análisis se introdujeron las secuencias seleccionadas en formato FASTA y se indicó la cantidad de dominios esperados (Apéndice C).

Finalmente, se realizó un nuevo multialineamiento con MUSCLE en donde se incluyeron las secuencias de *SUB1A*, *SUB1B*, *SUB1C*, *SNK 1* y *2*, *RAP2.3*, *RAP2.2*, *RAP2.12*, *HRE1* y *2* así como los ERFs-VII de *Brachypodium*. Con él, se hizo la construcción de un árbol filogenético con el método de *Neighbor-Joining* (con 1000 *bootstrap*) por el modelo de Poisson con *Pairwise Deletion* utilizando el programa MEGA6 para Mac (<http://www.megasoftware.net/>; Apéndice D).

7.3 Diseño de oligonucleótidos

A partir de las secuencias con mayor homología que se obtuvieron con los procedimientos anteriores, se descargó de NCBI la información intrón-exón predicha a través de RNA-Seq de cada ERF-VII y se identificaron las regiones 5'UTR, 3'UTR, exón, intrón y el codón de inicio. Del mismo modo, se identificaron estas regiones para el diseño de los oligonucleótidos constitutivos (Apéndice E).

Una vez identificadas estas regiones, se realizó el diseño de los oligonucleótidos para qPCR en la región cercana al 3'UTR con una T_m de 62 °C en IDT (www.idtdna.com > Products & Services > Real time qPCR Assay Entry) y se sintetizaron por la compañía MacroGen (ver sección de Resultados Tabla 12). Para el gen ERF-VII Bradi4g31040 el diseño de oligonucleótidos se realizó abarcando la zona del intrón para usarse como control de ausencia de DNA genómico (gDNA).

7.4 Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Brachypodium distachyon* ecotipos Bd21 y Bd2-3 donadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos a través del Dr. David Garvin (USDA). Las semillas se desinfectaron dentro de tubos tipos Falcon de 50 ml con 30 ml de hipoclorito comercial 1:1 con agua destilada estéril (concentración fina de hipoclorito de 1.6% w/v); se agitaron en un orbital de mesa durante 5 min y se enjuagaron con agua destilada tres veces. Posteriormente, se adicionó agua desionizada estéril y se incubaron a 4 °C en oscuridad durante 4 días para sincronizar la germinación.

Las semillas de *Brachypodium* se crecieron en una mezcla de sustrato Sunshine No.3 y perlita (3:1) previamente esterilizado (121 °C durante 15 min a 15 psi) adicionado con 3.08 g/L (equivalente a 2% w/w) de fertilizante Nitrofoska Perfect (15-5-20). Las plantas se germinaron y crecieron en un cuarto de crecimiento controlado con humedad relativa de 60%, bajo condiciones de día largo (16 h de luz / 8 h de oscuridad), iluminación de luz blanca de 180 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad y 23 °C de temperatura.

7.5 Tratamiento de estrés y colecta

A los 15 días de edad después de la germinación, las plantas se sometieron a estrés por inundación total en una bandeja grande de plástico que se llenó completamente de agua de la llave filtrada (30 cm de altura). La colecta del tejido aéreo se realizó en los tiempos 0 (planta control), 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas (para cada uno de los ecotipos) después de la inundación, así como cada uno de sus controles que crecieron a un lado sin ser sumergidos. Estos tiempos corresponden a los Zeitgeber Time (ZT) 13, 15, 17, 1, 0+12, 0+24 y 0+48. El tejido se colocó inmediatamente en papel aluminio, se introdujo en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C, hasta su procesamiento.

7.6 Extracción de gDNA

Para la extracción de gDNA se tomó una muestra control de Bd21 que se encontraba almacenada a -80 °C y se colocó en un tubo de 1.5 ml congelado y se molió en nitrógeno líquido con ayuda de un minipistilo estéril. Se añadieron 500 µl de buffer de extracción (EB, Tabla 2), se dispersó por inversión y se incubó durante 30 min a 65 °C en un termobloque.

Tabla 2. Componentes del buffer de extracción.

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

Posteriormente, se añadieron 500 µl de cloroformo, se mezcló en vortex durante 10 s y se centrifugó (Heraeus Pico 21, Thermo Scientific) a máxima velocidad (14,000 x g) durante 10 min; el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 500 µl de isopropanol, se mezcló vigorosamente y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min y se removió el sobrenadante cuidando de mantener la pastilla de DNA en el tubo. Se lavó con 750 µl de etanol al 70% y se mezcló en vortex. Se centrifugó la mezcla a máxima velocidad durante 7 min y se decantó el etanol. El gDNA se diluyó en 100 µl agua destilada desionizada estéril (ddH₂O; Apéndice F) con RNasa A (2 µl/ml, EN0531, Thermo Scientific) y se incubó a 37 °C durante 30 min en un termobloque.

El gDNA se observó en un gel de agarosa al 1% (w/v Apéndice F) con buffer de corrida TAE 1X (Apéndice F) y se visualizó en un fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene); se utilizó como marcador de peso molecular a O'Gene Ruler 1KB DNA Ladder (SM1163, Thermo Scientific).

7.7 Calibración de oligonucleótidos

7.7.1 PCR de control de calidad

Los oligonucleótidos se resuspendieron con ddH₂O añadiendo el volumen correspondiente en la información proporcionada por la compañía MacroGen (Apéndice G), posteriormente se realizaron diluciones 1:10 de cada oligonucleótido (45 µl de ddH₂O y 5 µl de oligonucleótido).

Se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific). Se preparó una mezcla maestra en tubos para PCR de 0.2 ml con los componentes de la Tabla 3 (utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 12; sección de Resultados). Se usó como control positivo el gDNA extraído en la sección 7.6 en una dilución 1:50 (45 µl de ddH₂O y 5 µl de gDNA) y como control negativo una reacción que contenía sólo ddH₂O.

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR de oligonucleótidos.

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

Se utilizó el programa de ciclado con los pasos como se muestran en la Tabla 4 en un termociclador automático (Termociclador Maxy Gene Gradient, Axygen).

Tabla 4. Programa de PCR.

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

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

7.8 Extracción de RNA

Se utilizaron las muestras almacenadas a -80 °C de los tiempos 0, 2, 8 y 12 horas de Bd21 y Bd2-3. Se colocaron en tubos de 1.5 ml congelados y se molieron los tejidos en nitrógeno líquido con ayuda de un pistilo estéril hasta que se obtuvo un polvo muy fino, evitando el descongelamiento de la muestra.

7.8.1 Extracción de RNA con TRIzol

Se utilizó el protocolo de TRIzol (15596-026, Life Technologies) que es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y buffers que facilitan el aislamiento del RNA.

Las muestras de tejido macerado se mantuvieron en nitrógeno líquido. En una campana de extracción de gases se añadió 1 ml de TRIzol por 50-100 mg de muestra de tejido, se incubó la muestra homogeneizada durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se añadieron 0.2 ml de cloroformo por ml de TRIzol utilizado para la homogeneización. Se agitó el tubo energicamente durante 15 s y se incubó durante 2-3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12,000 x g (11,237 rpm; para la conversión de unidades se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 del Apéndice H; donde $r = 85$ mm y $r_{fc} = g$) durante 15 min a 4 °C (centrífuga Universal 320 R, Hettich Lab Technology).

Se transfirió por pipeteado la fase acuosa de la muestra inclinando el tubo 45° y se colocó en un tubo nuevo. Se añadieron 0.3 ml de cloroformo, se centrifugó a 12,000 x g (11,237 rpm) y se removió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se añadieron 0.75 ml de isopropanol a la fase acuosa por cada ml de TRIzol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego, se centrifugó a 12,000 x g (11,237 rpm) durante 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante del tubo, dejando sólo la pastilla de RNA y se lavó con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de

TRIzol. Se llevó la muestra al vortex, y luego se centrifugó a 7,500 x g (8,884 rpm) durante 10 min a 4 °C. Se desechó el lavado y se secó el precipitado de RNA hasta que la pastilla de RNA estuviera transparente (40 min aproximadamente). Posteriormente, se resuspendió en 50 µl de agua con dietilpírocarbonato (DEPC; Apéndice F) y se mezcló por vortex hasta disolver completamente la pastilla.

7.8.1.1 Verificación de la integridad y cuantificación de la concentración del RNA

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

7.8.1.2 Digestión con DNAsa

Se utilizó la enzima DNase I (EN0521, Thermo Scientific) que contiene los componentes que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la digestión con DNAsa.

Componente	Cantidad
Buffer 10X	5 µl
DNase I	8 µl
RNA	-
H ₂ O DEPC	Necesario
Volumen final	50 µl

Se ajustó el volumen de RNA para la reacción de digestión dependiendo al mayor volumen de RNA para la concentración necesaria y se añadió el volumen correspondiente de

agua DEPC a cada una de las muestras, posteriormente se añadieron los demás componentes de la reacción. Los tubos se colocaron en una gradilla y se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 min.

7.8.1.3 Purificación de RNA con Direct-zol y Trizol.

Se utilizó el kit Direct-zol RNA MiniPrep (R2050, Zymo Research); se adicionaron 100 µl de agua DEPC a cada solución de RNA a purificar (volumen final 150 µl). Posteriormente, en una campana extractora de humos (CH-76, Prendo) se adicionaron 150 µl de TRIzol a cada tubo y se mezcló por vórtex durante 5 min. Se añadieron 300 µl de etanol al 100% y se mezcló por vortex (volumen final 600 µl). La mezcla se pasó por una columna (Zymo-Spin IIC Column) con el tubo colector proporcionado por el fabricante y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente.

La columna se transfirió a un tubo colector nuevo y se añadieron 400 µl de Direct-zol RNA PreWash a la columna. Se centrifugó (Heraeus Pico 21, Thermo Scientific) a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente, se descartó el flujo que atravesó, y se añadieron 400 µl de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó nuevamente a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Se añadieron 700 µl de RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente, se descartó el flujo que atravesó y para la remoción completa de etanol, se centrifugó de nuevo por 2 min.

La columna se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se añadieron 20 µl de DNase/RNase-Free Water, se dejó incubar durante 1 min y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min. El flujo que atravesó se recuperó con ayuda de la pipeta y se colocó de nuevo en la columna; se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min.

La integridad del RNA y su cuantificación se realizó de acuerdo a lo indicado en la sección 7.8.1.1.

7.8.2 Extracción, digestión y purificación de RNA sólo por Direct-Zol

Para la segunda réplica experimental de RNA, se utilizó el kit Direct-zol RNA MiniPrep (R2050, Zymo Research). Se agregó 1 ml de TRI Reagent por 100 mg de tejido, se homogeneizó en vórtex durante 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 x *g* durante 2 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a un microtubo de 2 ml.

Para la purificación del RNA se realizó como se describió en la sección 7.8.1.3 con la excepción que la digestión con DNAsa se realizó directamente en la columna del kit y se empleó la DNAsa provista en el kit. Para ello, se agregaron 80 µl de DNAsa I Reaction Mix (5 µl de DNase I y 75 µl de DNA Digestion Buffer) directamente en la columna y se incubó a 20-30 °C durante 15 min. Se añadieron 400 µl de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó a 10,000 x *g* durante 30 s y se descartó el flujo que atravesó. Este paso se repitió una vez más.

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

La integridad del RNA y la cuantificación se realizó de acuerdo a lo indicado en la sección 7.8.1.1.

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

7.9.1 Verificación de ausencia de gDNA

Se realizó una PCR para verificar la ausencia de gDNA en las muestras de RNA. Para ello, se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific).

En tubos para PCR de 0.2 ml, se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 6. Del RNA purificado de las secciones 7.8.1.3 y 7.8.2 se realizó una dilución 1:20 (0.5 µl de RNA y 9.5 µl de ddH₂O) y se usó como templado.

Como control positivo, se emplearon 2 µl gDNA 1:50 y como control negativo una reacción que contenía solo ddH₂O.

Tabla 6. Componentes de la PCR verificación de ausencia de gDNA.

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

Se utilizó el programa de ciclado con los pasos como se muestra en la Tabla 4 (de la sección 7.7.1) en un termociclador automático (Maxy Gene Gradient, Axygen).

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 2% (w/v) con buffer de corrida TAE 1X y se visualizó en un fotodocumentador. Se utilizó como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (10787-108, Invitrogen).

7.9.2 Síntesis de cDNA

Se utilizó la enzima retrotranscriptasa de kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (K1642, Thermo Scientific). Se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 7. Se añadió el volumen necesario para usar 2.15 µg de RNA y se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen de 14 µl.

Tabla 7. Componentes de la síntesis de cDNA

Componente	Cantidad
5X Reaction Mix	4 μ l
Maxima Enzyme Mix	2 μ l
RNA	-
ddH ₂ O	Necesario
Volumen total	20 μ l

Se incubaron las muestras en un termociclador (TC-512, Techne) a 25 °C durante 10 min seguido de 50 °C 30 min, para terminar la reacción a 85 °C por 5 min. Se prepararon diluciones 1:10 del cDNA sintetizado (6 μ l de cDNA y 54 μ l de ddH₂O).

7.9.3 PCR de verificación del cDNA

Se utilizó la enzima DNA polimerasa del kit DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (K1081, Thermo Scientific); se utilizaron tubos para PCR de 0.2 ml y se preparó una mezcla maestra con los componentes de la Tabla 8. Se usó a Bradi4g31040 como control de ausencia de gDNA por tener un intrón dentro de su amplicón genómico (Tabla 12). Se usó como control positivo 2 μ l de gDNA dilución 1:50 y como control negativo una reacción que contenía solo ddH₂O.

Tabla 8. Componentes de PCR de verificación de cDNA.

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

Se utilizó el programa de ciclado con los pasos como se muestra en la Tabla 4 (de la sección 7.7.1) en un termociclador automático (Termociclador Maxy Gene Gradient, Axygen).

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

7.10 Análisis de la expresión mediante qPCR

Se utilizó la enzima DNA polimerasa del kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), sin ROX (K0251, Thermo Scientific). Se preparó la mezcla maestra con los componentes en la Tabla 9.

Tabla 9. Componentes de qPCR.

Componente	Cantidad
SYBR Green qPCR MM sin ROX	10 μ l
Oligonucleótido F	2 μ l
Oligonucleótido R	2 μ l
cDNA	1 μ l
H ₂ O del kit	5 μ l
Volumen total	20 μ l

La enzima Maxima SYBR Green se cubrió con papel aluminio y se descongeló en hielo. Después de mezclarse suavemente por inversión, se preparó una mezcla maestra en un tubo de 1.5 ml; se añadió primero el H₂O que acompaña el kit, posteriormente la enzima Maxima SYBR y se mezcló por inversión y pipeteo ligero. Se centrifugó durante algunos segundos y se verificó la ausencia de fases en la mezcla a contraluz.

Después, la mezcla se distribuyó en tubos para PCR de 0.2 ml que contenían la cantidad de oligonucleótidos y molde necesarios. Las mezclas se agitaron suavemente 30 veces por inversión y se centrifugaron durante unos segundos, se verificó nuevamente que la mezcla estuviera homogénea y se realizó el llenado de la placa para qPCR (de 96 pozos); en cada

pozo se añadieron 20 µl de mezcla cuidando que no se formaran burbujas, al término del llenado, se colocó una cinta protectora translúcida a la placa (4360954, Thermo Scientific).

La PCR cuantitativa se hizo en un termociclador (PikoReal Real-Time PCR System, Thermo Scientific) utilizando el software PikoReal 2.2 (Thermo Scientific) con el programa de ciclado que se muestra en la Tabla 10 y detección de SYBR green.

Tabla 10. Programa de qPCR.

Activación de la polimerasa y desnaturalización inicial a 95 °C	10 min	
Desnaturalización a 95 °C	15 s	40 ciclos
Alineamiento a 56 °C	30 s	
Extensión a 72 °C	30 s	
Elongación final a 72 °C	30 s	
Curva Melting de 60-95 °C		
Temperatura de enfriamiento a 25 °C		

7.10.1 Método comparativo del $\Delta\Delta C_T$

El ciclo umbral (C_T) corresponde al ciclo de PCR en que la señal fluorescente de SYBR Green cruzó la línea llamada umbral colocada arbitrariamente. El C_T se usó para cuantificar la expresión de los genes mediante el método comparativo $\Delta\Delta C_T$ (Schmittgen y Livak, 2008). Se comparó la expresión de un gen de interés (GI) en dos muestras diferentes (control y muestra tratada), en la que cada muestra está relacionada con un gen de control interno (CI). Se presentan los datos como valores de duplicación o Fold Change, que se determina por la ecuación 3.

$$Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad Ec.3$$

Dónde:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_{T\ GI} - C_{T\ CI})_{muestra\ tratada} - (C_{T\ GI} - C_{T\ CI})_{muestra\ control}]$$

7.11 Control de calidad de oligonucleótidos

7.11.1 Eficiencia de oligonucleótidos

Para verificar la eficiencia de oligonucleótidos se utilizó cDNA sintetizado de RNA de Bd21 de dos días de estrés con una cantidad total de 4,000 ng. Se realizaron diluciones de cDNA 1:4, 1:16, 1:64 y 1:256 como se muestra en la Figura 10 para obtener un cambio de magnitud de dos C_T entre diluciones. Para calcular la eficiencia, los valores de % de eficiencia y coeficiente de determinación (R^2) se analizaron con el software PikoReal 2.2.

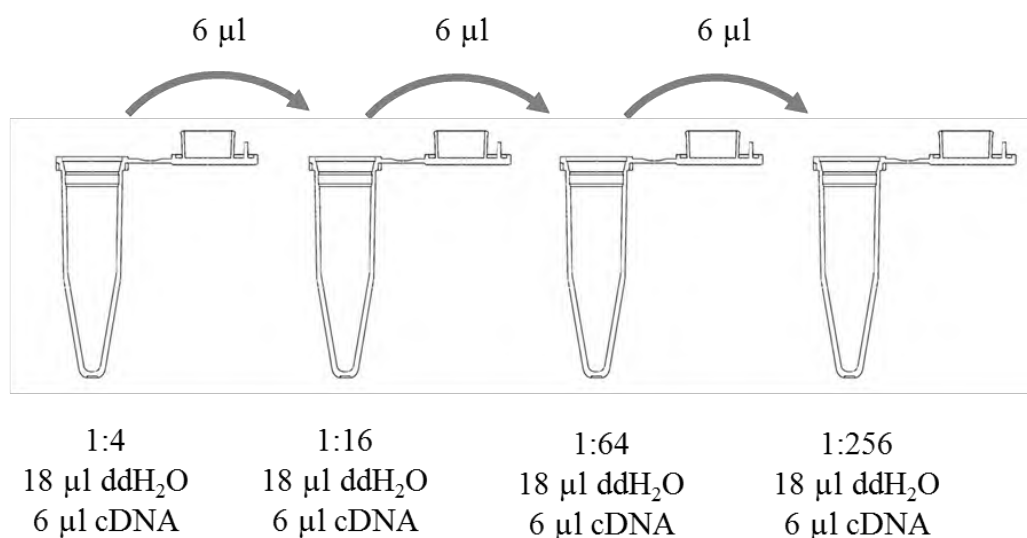


Figura 10. Preparación de las diluciones para la determinación de la eficiencia de amplificación de oligonucleótidos.

7.12 Análisis de la expresión de ERFs-VII de *Brachypodium* por qPCR

Para el análisis de la expresión por qPCR se utilizó el cDNA de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 en los tiempos 0, 2, 8 y 12 h, control e inundación.

Se utilizaron como control constitutivo para la normalización del qPCR a *ACTINA* (*ACT*, Bradi2g24070) y *UBIQUITINA* (*UBI*, Bradi1g32860). Se siguió el programa de qPCR como se muestra en la Tabla 10.

7.13 Análisis por secuenciación de RNA

Los datos de secuenciación por RNA (RNA-Seq) fueron proporcionados por la bióloga Irma Karla Rivera Contreras (Gene Expression Omnibus, GEO GSE74222). Se realizó un análisis de ontología de genes (GO) en la base de datos de Phytozome 10.3. Los datos se ordenaron de acuerdo al nivel de expresión. Se consideraron regulados positivamente a aquellos que tuvieran un valor $\text{LogFC} \geq 1.5$. Posteriormente se generó una lista con los resultados y en Phytozome 10.3 se seleccionó la herramienta PhytoMine. En la sección de *Analyze* se introdujo la lista y se generó una tabla. Se seleccionó *Gene Ontology Enrichment* y se ajustaron los parámetros Test Correction (Bonferroni), Max p-value (1.0) y Ontology (Biological_process) y posteriormente se guardaron los bloques de genes como tablas de Excel.

8 Resultados y discusión

8.1 Búsqueda bioinformática

La identificación de los genes ERFs-VII en *Brachypodium* se realizó utilizando la secuencia de *SUBIA* del arroz como referencia, las búsquedas se hicieron con ayuda de la herramienta BLAST en la base de datos de la NCBI para *Brachypodium*. De la comparación efectuada con BLASTN para la secuencia de nucleótidos de *SUBIA* no se obtuvieron resultados prometedores para EFRs-VII (Figura 11). Sólo se obtuvieron cuatro secuencias que cubrieron 100 nt de los 800 enviados. Lo anterior indica, que la secuencia de nucleótidos es altamente específica de cada proteína.



Figura 11. Búsqueda BLASTN de la secuencia de nucleótidos de *SUBIA* en el genoma de *Brachypodium*.

A continuación, se utilizó la secuencia de aminoácidos y se realizó un BLASTP introduciendo la secuencia completa de *SUBIA*. Como resultado, se obtuvieron 100 secuencias que alinearon con el dominio conservado AP2 que consta de 60-70 aminoácidos. En la Figura 12 se observa que AP2 corresponde a las líneas de color verde y rosa (50-80 y 80-200 aminoácidos alineados, respectivamente).

AP2 se presenta en una gran familia de genes (Liu *et al.*, 1999), además de los ERFs-VII. Nakano *et al.* (2006) determinaron por análisis bioinformáticos que hay 122 genes en *Arabidopsis* y 139 genes en arroz que contienen en su secuencia un dominio característico AP2, por lo tanto, esto no fue un buen criterio de selección de los ERFs-VII. De esta forma, se realizaron dos pruebas seccionando a la secuencia de *SUBIA* en la región de N-terminal y el C-terminal, en ambas secciones se omitió al dominio AP2.

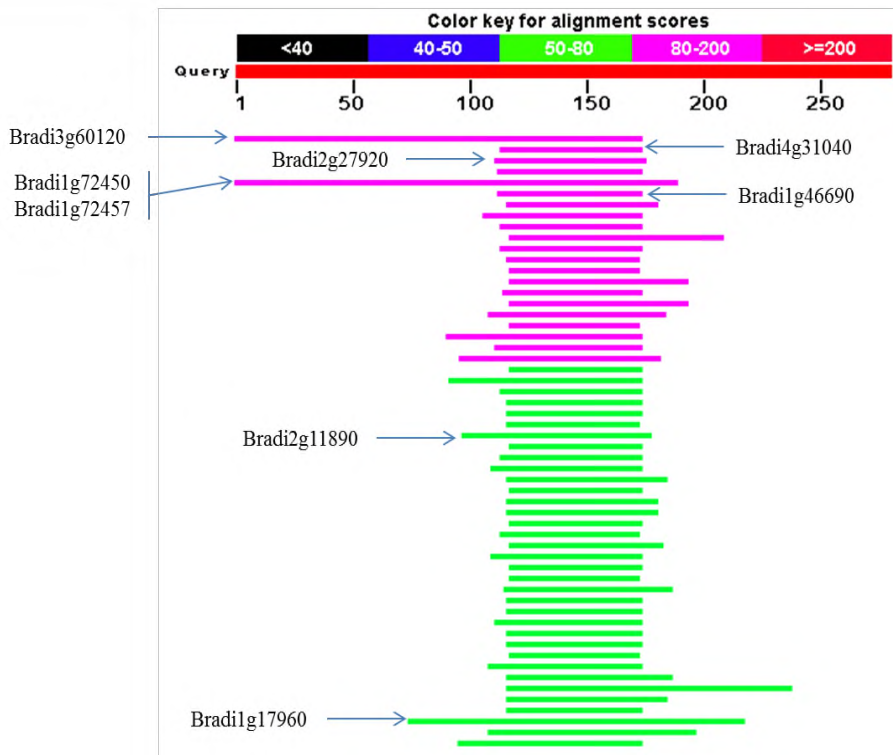
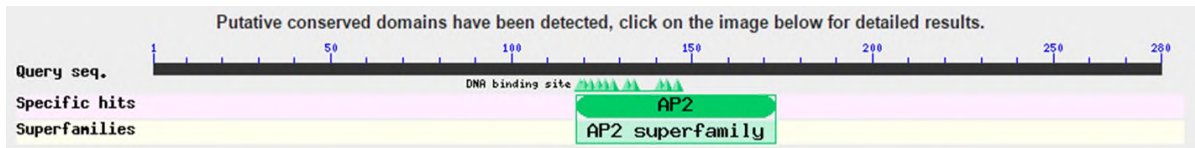


Figura 12. BLASTP de la secuencia completa de aminoácidos de *SUBIA* en NCBI.
Se indica con flechas los ERFs-VII identificados por la presencia del dominio CMVII-1.

Para la prueba de la sección C-terminal sólo se obtuvieron tres resultados los cuales cubrieron <40 aminoácidos como lo representan las barras negras (Figura 13); dos eran las enzimas (citocromo P450 y quinasa), el tercer resultado fue un ERF que no pertenece al grupo VII a pesar de poseer un 53% de identidad, pues al verificar la cobertura de 16% se observó que solo 9 aminoácidos se encontraban alineados, además no cuenta con el dominio característico MCGGAI (I/L) en la región del N-terminal (Figura 14); por lo que en este análisis no se obtuvo información sobre los genes candidatos en la respuesta al estrés por inundación.

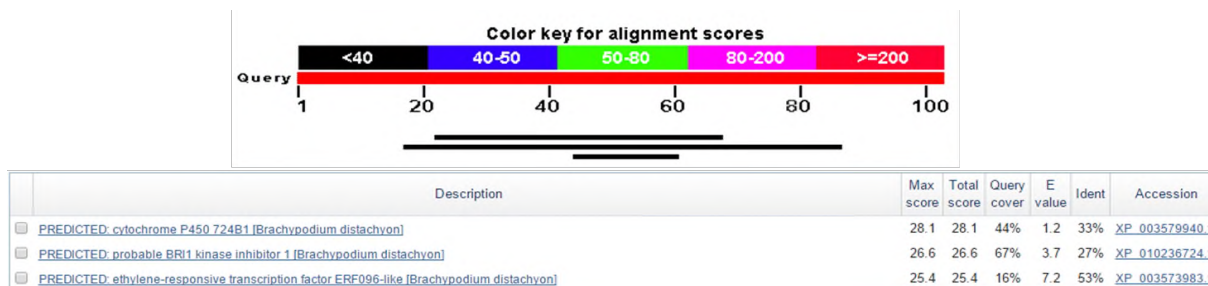


Figura 13. BLASTP de la sección del C-terminal de la secuencia de aminoácidos de *SUBIA* en NCBI.

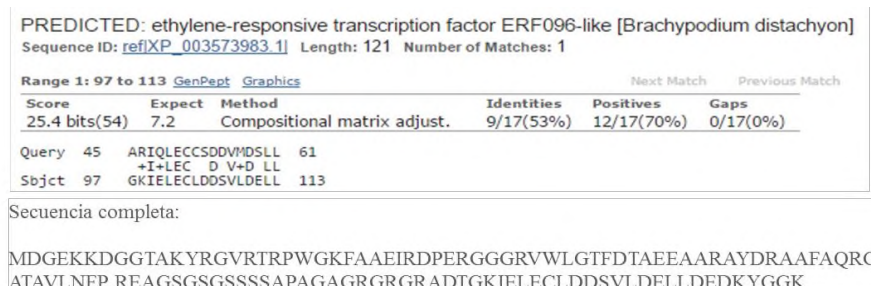
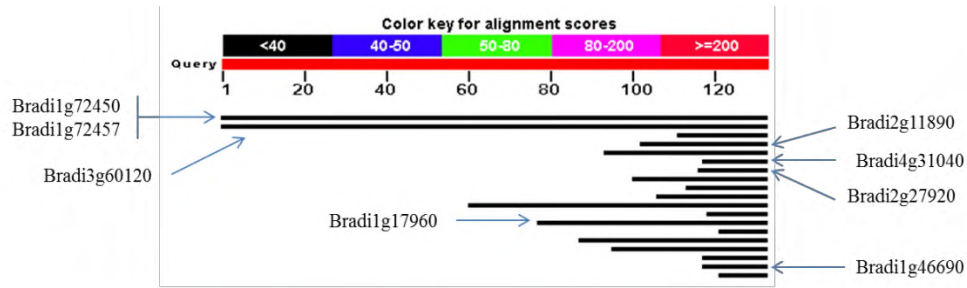


Figura 14. Alineamiento del resultado del BLASTP en NCBI de [XP_003573983.1](#).

El BLASTP de la sección N-terminal de *SUBIA* presentó mejores resultados ya que se obtuvieron 19 secuencias candidatas; los resultados obtenidos cubrieron <40 aminoácidos alineados en su secuencia (barras negras, Figura 15). Estas secuencias tuvieron un porcentaje de identidad de entre 29-67% y una cobertura del 9-100%. Sin embargo, sólo dos secuencias mostraron alineamiento con el dominio MCGGA (I/L) (Bradi1g72450 y Bradi3g60120; Figura 15) el alineamiento obtenido por BLASTP muestra que hay una región presente en las 19 secuencias antes del dominio AP2 que tiene una longitud de 12-14 aminoácidos que corresponde al dominio CMVII-3 KRKRKN que es una secuencia de señalización nuclear (Figura 16; Nakano *et al.*, 2006).

Se descargaron todas las secuencias del resultado del BLASTP para la sección N-terminal ya que de las 19 secuencias obtenidas solo 2 ([XP_003561984.2](#) y [XP_010236158.1](#)) estaban alineados los aminoácidos iniciales. Con las 19 secuencias se realizó un alineamiento con el que se discriminaron aquellas que no tuvieran el dominio característico MCGGAI (I/L) en la sección N-terminal (Liu *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2006; Licausi *et al.*, 2011) lo que dio como resultado siete secuencias ERFs-VII (Tabla 11).



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100826410 [Brachypodium distachyon]	38.5	38.5	100%	6e-04	30%	XP_003561984.2
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like [Brachypodium distachyon]	33.1	33.1	100%	0.037	29%	XP_010236158.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF109-like [Brachypodium distachyon]	32.3	32.3	16%	0.063	55%	XP_003574623.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF071-like [Brachypodium distachyon]	30.0	30.0	23%	0.37	42%	XP_003567604.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like [Brachypodium distachyon]	28.9	28.9	30%	0.86	35%	XP_003570010.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like [Brachypodium distachyon]	28.9	28.9	12%	0.98	63%	XP_003578162.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like [Brachypodium distachyon]	28.5	28.5	12%	1.2	65%	XP_003568621.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ABR1-like [Brachypodium distachyon]	27.3	27.3	24%	2.8	48%	XP_010231329.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF039-like [Brachypodium distachyon]	27.3	27.3	15%	3.1	52%	XP_003581499.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF039-like [Brachypodium distachyon]	26.9	26.9	20%	4.6	44%	XP_003581498.1
PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At4g30825_chloroplastic [Brachypodium distachyon]	26.9	26.9	54%	5.5	29%	XP_003576535.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 3-like [Brachypodium distachyon]	26.6	26.6	11%	5.9	60%	XP_003572677.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like [Brachypodium distachyon]	26.2	26.2	42%	6.7	31%	XP_003559809.1
PREDICTED: AP2/ERF and B3 domain-containing protein Os01q0693400-like [Brachypodium distachyon]	26.2	26.2	9%	7.9	67%	XP_003581490.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 2 [Brachypodium distachyon]	26.2	26.2	34%	8.5	40%	XP_003580272.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor RAP2-13-like [Brachypodium distachyon]	26.2	26.2	28%	9.0	32%	XP_003574464.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like isoform X2 [Brachypodium distachyon]	25.8	25.8	12%	9.6	50%	XP_010227910.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like isoform X1 [Brachypodium distachyon]	25.8	25.8	12%	9.7	50%	XP_003564157.1
PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 6 [Brachypodium distachyon]	25.8	25.8	9%	9.7	67%	XP_003572768.2

Figura 15. BLASTP de la sección del N-terminal de la secuencia de aminoácidos de SUBIA en NCBI. Se indica con flechas los ERFs-VII identificados por la presencia del dominio CMVII-1.

PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF109-like [Brachypodium distachyon]
Sequence ID: [ref|XP_003574623.1|](#) Length: 279 Number of Matches: 1

Range 1: 127 to 148 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
32.3 bits(72)	0.063	Compositional matrix adjust.	12/22(55%)	17/22(77%)	0/22(0%)

Query 112 PRRRRPRRSYEHGIRQRPWGR 133
P+RRR + +Y G+RQRPWG+
Sbjct 127 PQRRRRNKKNKYRGVQRPWGK 148

PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF071-like [Brachypodium distachyon]
Sequence ID: [ref|XP_003567604.1|](#) Length: 197 Number of Matches: 1

Range 1: 30 to 60 [GenPept](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
30.0 bits(66)	0.37	Compositional matrix adjust.	13/31(42%)	18/31(58%)	0/31(0%)

Query 103 EAEPVAEKPRRRPRRSYEHGIRQRPWGR 133
+A K RR + + +Y GIRQRPWG+
Sbjct 30 DAHSTAPHKARRAKREKRNYRGIRQRPWGK 60

Figura 16. Resultados de alineamientos del BLASTP de la sección de CMVII-3 de SUBIA en NCBI

Con las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos en formato FASTA se identificó en la base de datos NCBI su ubicación en los cromosomas y el tamaño de la secuencia de

aminoácidos para cada ERF-VII de *Brachypodium* (Tabla 11). También se pudo identificar que había dos genes ERFs-VII en tándem (Bradi1g72450.1 y Bradi1g72457.1) reportados como uno sólo. No obstante, en las bases de datos de Brachypodium.org y Phytozome 10.3 se observan como dos ERFs separados (Apéndices E y J). Así, encontramos un total de ocho secuencias tipo ERFs-VII.

Tabla 11. Proteínas ERFs-VII para *Brachypodium*, resultado del análisis en bases de datos.

Número	Nombre	Código de acceso NCBI	Cromosoma	Aminoácidos
1	Bradi3g60120.3	XP_010236158.1	3	394
2	Bradi1g46690.3	XP_003564157.1	1	351
3	Bradi4g31040	XP_003578162.1	4	401
4	Bradi1g17960.1	XP_003559809.1	1	219
5	Bradi1g72450.1	XP_003561984.2	1	344
6	Bradi1g72457.1	XP_003561984.2	1	307
7	Bradi2g11890.1	XP_003567604.1	2	197
8	Bradi2g27920.1	XP_003568621.1	2	168

8.2 Análisis de la estructura y creación del árbol filogenético

Para el análisis de la estructura, se realizaron multialineamientos (alineamiento con MUSCLE, Apéndice I) utilizando las secuencias de *SUBIA*, *SUBIB*, *SUBIC*, *SNORKEL 1* y *2*, las cinco secuencias de *Arabidopsis* así como las de *Brachypodium*. Con esta información se realizaron árboles filogenéticos. A partir de este análisis, se puede observar cómo las proteínas *SUB* y *SNK* del arroz se encuentran en un clado separado lo que indica que estos genes son únicos de arroz (Figura 17). Además, se observó la separación previamente reportada que existe entre *SUBIC* con *SUBIA* y *SUBIB* (Fukao *et al.*, 2009; Puciarello y Perata, 2013). *SUBIC* se considera el ancestro de estos dos genes (Fukao *et al.*, 2009). A pesar de que *Brachypodium* y el arroz pertenecen a la familia de las monocotiledóneas, tienen hábitos de crecimiento muy diferentes, donde el arroz incluso se considera semi-acuática

(Voeselek y Bailey-Serres, 2015). Adicionalmente, debido a que el arroz es una planta domesticada y *Brachypodium* es una planta silvestre, se ha encontrado que el gen *SUB1A* ha tenido una fuerte selección humana a partir de variedades silvestres de nicho ecológico muy estrecho (Puciarello y Perata, 2013).

Las proteínas ERFs-VII que se encontraron en *Brachypodium* se agrupan con las reportadas en *Arabidopsis* (Figura 17). De forma similar, Tamang *et al.* (2014) encontraron nueve ERFs-VII en la soya que tienen una estrecha relación con *HRE1*, *HRE2*, *RAP2.2*, *RAP2.3* o *RAP2.12*. A pesar de ser plantas mono y dicotiledóneas, se infiere que han generado mecanismos de tolerancia a la inundación muy similares que involucran a los ERFs-VII.

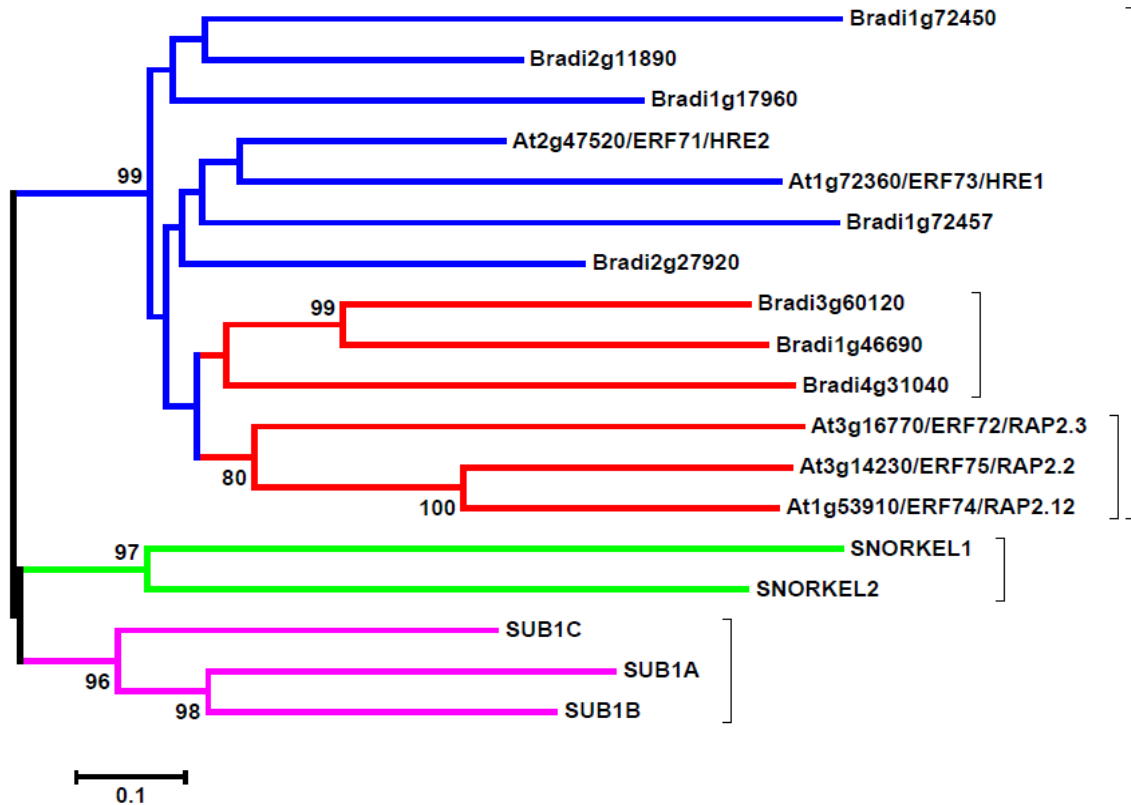


Figura 17. Árbol filogenético de los ERFs-VII de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium* obtenido del multialineamiento con MUSCLE.

En rojo ERFs-VII constitutivos; azul inducibles, verde y lila ERFs-VII de arroz.

Tanto el alineamiento usando ClustalW como MUSCLE apoyan la hipótesis de que hay dos grupos de ERFs-VII en *Arabidopsis* y *Brachypodium*. Las diferencias observadas se deben a que el árbol filogenético generado a partir del multialineamiento con MUSCLE se realiza a partir de bloques o dominios conservados entre las proteínas mientras que el

multialineamiento con ClustalW se basa en multialineamientos de aminoácidos conservados (Figura 18).

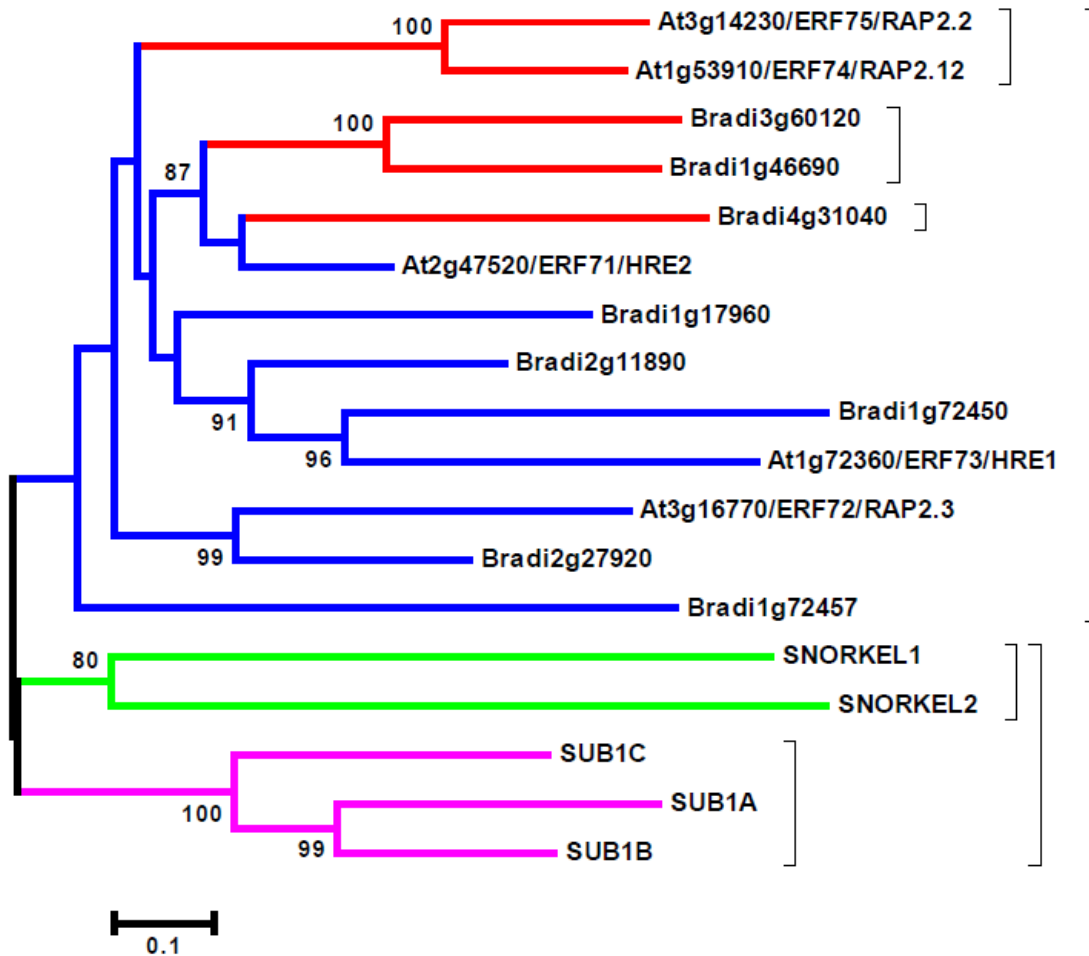


Figura 18. Árbol filogenético de ERFs-VII utilizando el multialineamiento ClustalW. En rojo ERFs-VII constitutivos; azul inducibles, verde y lila ERFs-VII de arroz.

8.3 Análisis de dominios conservados en *Brachypodium*

Los ERFs-VII de *Brachypodium* identificados se analizaron con el programa MEME 4.2.10 donde se obtuvieron los motivos conservados. De estos análisis, se observó que hay dos grupos de proteínas en los ERFs-VII tanto en *Arabidopsis* como en *Brachypodium*. El primer grupo son aquellos con homología con los ERFs-VII constitutivos de *Arabidopsis* (*RAP 2.2*, *RAP 2.12* y *RAP 2.3*) y son Bradi3g60120, Bradi1g46690, Bradi4g31040. El segundo grupo es

homólogo con los ERFs-VII inducibles por hipoxia de *Arabidopsis* (*HRE1* y *HRE2*) y son Bradi1g17960, Bradi2g11890, Bradi1g72457, Bradi2g27920 y Bradi1g72450.

Con el programa MEME, se hicieron diferentes tipos de análisis para poder replicar los resultados obtenidos en *Arabidopsis* por Nakano *et al.* (2006). A través de la búsqueda de dominios, se logró identificar siete de nueve dominios reportados, en todos los casos no se identificó a CMVII-3 ni a CMVII-8. En el Apéndice C, se pueden apreciar los resultados completos para todas las demás secuencias de *Arabidopsis*. El dominio CMVII-3 está inmediatamente adyacente a AP2 por lo que se pudo haber ocultado su detección automática, el dominio CMVII-8 sólo está presente en 2 ERFs de 5 y por esto no se pudo detectar (Figura 19).

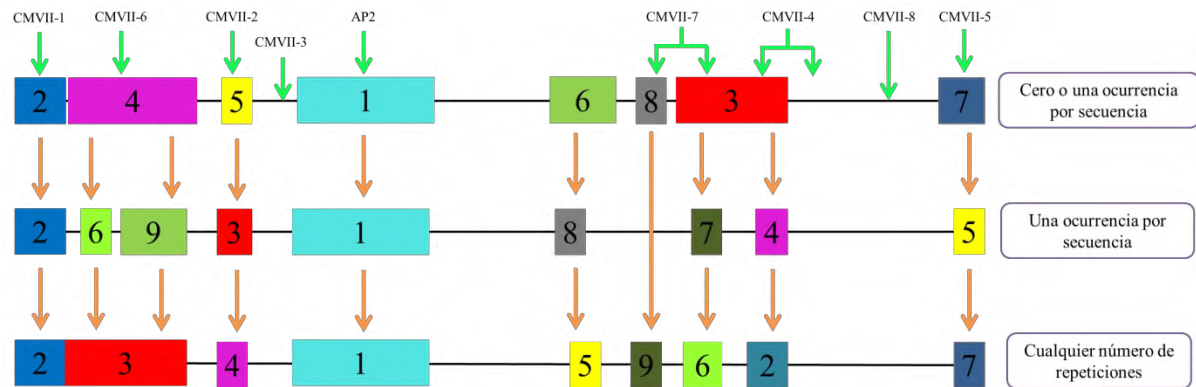


Figura 19. Análisis de dominios en el ERF-VII RAP2.12 de *Arabidopsis* en MEME bajo modo normal y tres diferentes tipos de análisis.

Las flechas verdes indican la localización reportada por Nakano *et al.* (2006), las flechas naranjas indican si ese dominio se detectó.

En la Figura 20 se puede observar el análisis utilizando el modo de discriminación, en este caso, se introdujeron como control al análisis las secuencias de los ocho dominios ya reportados para *Arabidopsis*. Con cero o una ocurrencia por secuencia, se identificaron sólo cinco motivos conservados, en este caso no se identificó CMVII-2 y el análisis mostró parcialmente la secuencia de aminoácidos de *RAP2.12* por lo que no se obtuvo información de los demás dominios. En el análisis con una ocurrencia por secuencia, de igual manera se identificaron cinco dominios conservados; los que no se lograron observar fueron CMVII-2, CMVII-7, CMVII-4 y CMVII-5. En el caso del análisis realizado con cualquier número de repeticiones, no se logró identificar al CMVII-2 y CMVII-8.

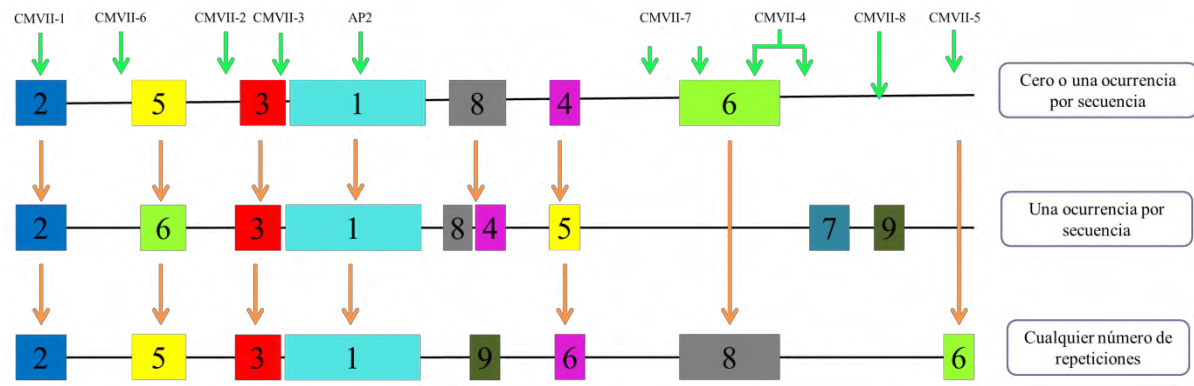


Figura 20. Análisis de dominios en el ERF-VII RAP2.12 de *Arabidopsis* en MEME bajo modo discriminativo y tres diferentes tipos de análisis.

Las flechas verdes indican la localización reportada por Nakano *et al.* (2006), las flechas naranjas indican si ese dominio se detectó.

En estos análisis a pesar de haber introducido como control las secuencias de los ocho motivos de *Arabidopsis*, la herramienta MEME no identificó todos los motivos dentro de la secuencia de *RAP2.12*, también se puede observar que en todos los análisis hay un motivo en la región del C-terminal (6, 8 y 5 del análisis en modo normal y 4, 5 y 6 en el análisis con discriminación) que no fue reportado por Nakano *et al.* (2006) (Apéndice C).

Por lo tanto, el análisis en conjunto del modo normal y el discriminativo ayudan a la obtención de todos los dominios reportados para *Arabidopsis*. Cuando estas mismas pruebas se realizaron para *Brachypodium* en modo normal y modo discriminativo, utilizando a Bradi3g0120 como referencia (ya que fue el que presentó más dominios conservados), indican que posee hasta nueve dominios conservados, incluyendo al dominio AP2. En el Apéndice C, se encuentran los análisis MEME para todos los ERFs-VII identificados de *Brachypodium* y en la Figura 21, se reporta el resumen de todos estos análisis.

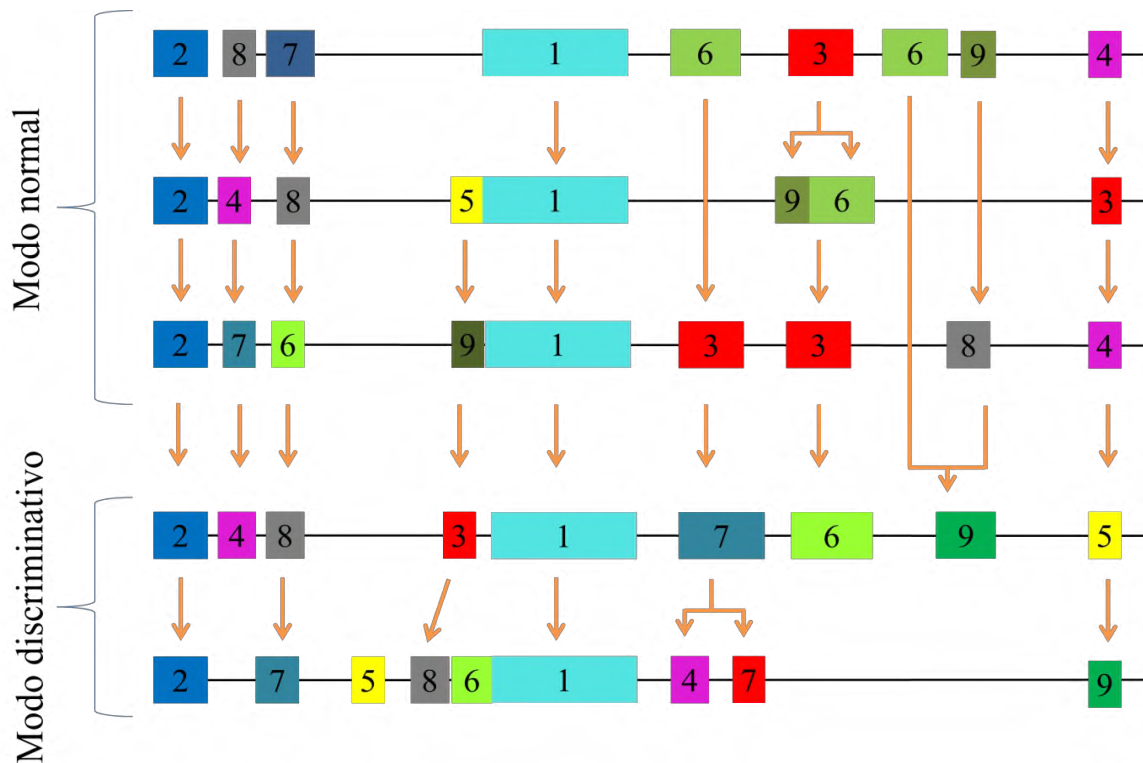


Figura 21. Análisis de dominios en el ERF-VII Bradi3g60120 de *Brachypodium* en MEME bajo modo normal y discriminativo en tres diferentes tipos de análisis.

El primer renglón corresponde a cero o una ocurrencia por secuencia, el segundo corresponde a una ocurrencia por secuencia, el tercero a cualquier número de repeticiones tanto en modo normal como discriminativo (en este último no se presenta el análisis con cualquier número de repeticiones).

Se concluyó que, al igual que los árboles filogenéticos, el análisis asistido de dominios indica que hay dos tipos de ERFs. Aquellos constitutivos poseen más dominios proteicos en comparación con los inducibles (hasta un total de 9 dominios conservados). En los ERFs-VII inducibles los que más se conservan son el CMVII-1, CMVII-3 y CMVVII-5 (utilizando la nomenclatura ya establecida para los dominios de los ERFs-VII de *Arabidopsis*) y AP2. En la Figura 22, se hace un resumen gráfico de los resultados anteriores, y se puede observar que algunas secuencias poseen parcialmente algunos dominios en comparación a *RAP2.12*.

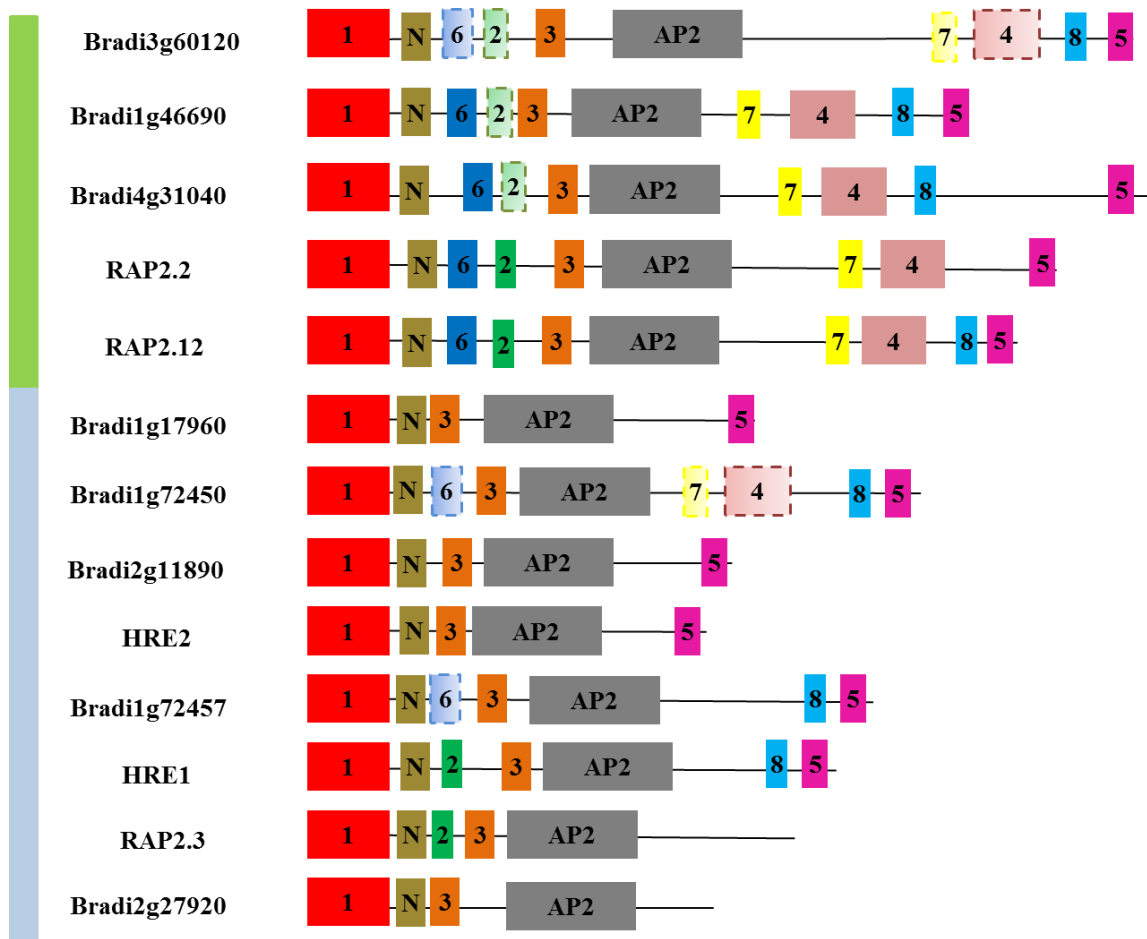


Figura 22. Comparación de los dominios conservados entre *Brachypodium* y *Arabidopsis*.

La construcción de *Arabidopsis* fue en base a lo reportado por Nakano *et al.* (2006). Para *Brachypodium*, se utilizó el análisis de dominios asistido por MEME y la comparación manual. La barra verde indica ERFs-VII de *Arabidopsis* y *Brachypodium* constitutivos y en azul los inducibles; N: localización nuclear. En cuadros discontinuos se indican dominios parciales.

8.4 Estructura génica de los ERFs-VII de *Brachypodium*

A partir de los multialineamientos realizados, se determinó que las secuencias seleccionadas de *Brachypodium* poseen una región N-terminal muy similar además de contener un dominio AP2 por gen (Figura 5). En la Figura 23, se observan las estructuras génicas de cada uno de los ERFs-VII donde se detectó que todos poseen un intrón en su estructura salvo Bradi4g31040 que posee dos. Para el diseño de los oligonucleótidos que se usaron para la medición de la expresión génica, se tomó la sección génica que corresponde al extremo C-terminal, y a su vez en la región más cercana al 3'UTR. Lo anterior debido a que es una sección más variable y de este modo, aumentar la seguridad de que el producto de la amplificación corresponda al transcrito correcto.

En el caso de Bradi4g31040, se explotó la presencia del intrón en el diseño para que los oligonucleótidos lo abarcaran y así, sirvió como control para confirmar que en la extracción de RNA no se tenía contaminación por DNA (Apéndice J se pueden observar las regiones genómicas de NCBI).

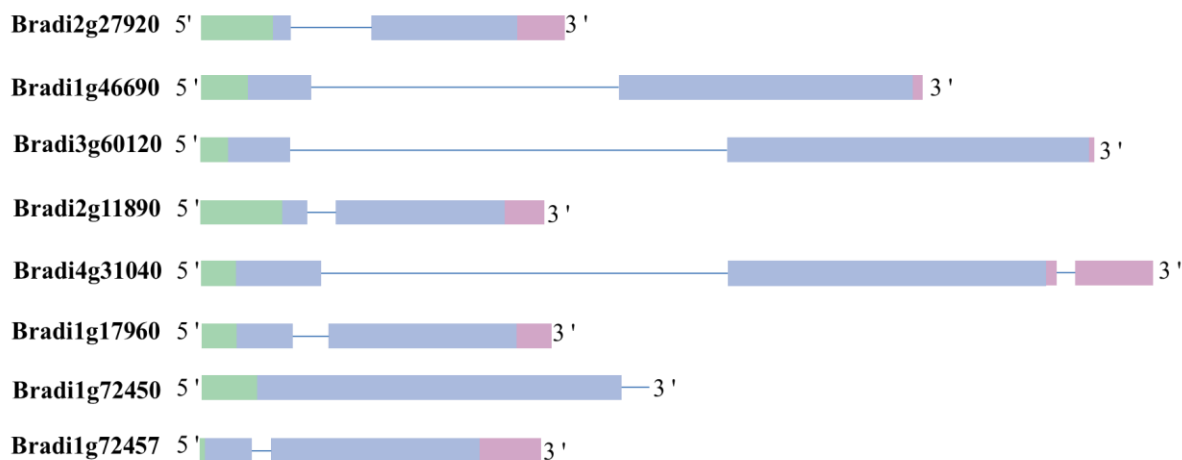


Figura 23. Estructura de los genes ERFs-VII de *Brachypodium* a partir de NCBI.

El color verde representa la zona del 5'UTR, en azul el exón, la línea representa la zona del intrón y el color lila al 3'UTR.

Para confirmar las hipótesis de grupos de expresión que el análisis bioinformático permitió postular, se realizaron mediciones de expresión génica con los oligonucleótidos de la Tabla 12.

Tabla 12. Oligonucleótidos sintetizados para *Brachypodium*

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón	Eficiencia (%)	R ²
Bradi2g27920.1	Bradi920F	CTCTTGTAGCCTTGACTGTCG	62.1	116	102.29	0.99
	Bradi920R	TTATTTTGGATCAGAGGGTCCTG	62.1			
Bradi1g46690.3	Bd690-5F	CTACCACCTGTGATGGGTAATG	62	202	98.21	0.99
	Bd690-5R	GCACCAATAGACCTCAGATCC	62			
Bradi3g60120.3	Bradi120F	CACCAAGACTCCAGATACAACG	62.4	79	113.64	0.98
	Bradi120R	ACCCTTACAACCGCATATTC	62.7			
Bradi2g11890.1	Bradi890F	ATGGCGTACGAGAACTACATG	61.8	147	97.73	0.99
	Bradi890R	GGACACTGATTTCTGCCACTAG	62.5			
Bradi4g31040.1	Bradi040F	GGCAAGTAATGTGGATGTCTG	61	250 gDNA / 150 cDNA	107.4	0.98
	Bradi040R	AACCATAGCGGATATAACCTGC	62.1			
Bradi1g17960.1	Bradi960F	ATCAGCAGCAACAGGAGG	61.6	82	134.29	0.97
	Bradi960R	ACCACTAATTACATAGACACGGC	62.2			
Bradi1g72450.1	Bradi450F	GTTTCGTGTAATGCAGAGCG	61.5	83	93.6	0.99
	Bradi450R	CCGATCCAAGGAAAAGGGAAG	62.6			
Bradi1g72457.1	Bradi457F	TTCTCTGCTATTACTGCCGC	61.9	81	103.83	0.99
	Bradi457R	CACGTCGAAATATGGCATTGG	61.8			
Bradi1g32860.1	UBI-860F	ACTTGCTTCTGTCTGGGTTC	62	203	113.58	0.99
	UBI-860R	GTAGAATTACACACGGGCTCA	62			
Bradi2g24070.1	ACT-070F	TGTCCACATGAAGTGCTTCTAA	62	202	113.58	0.99
	ACT-070R	CAGGTATACCATTACGACCATACAA	62			

8.5 Control de calidad y análisis de la expresión.

Para demostrar la calidad de los oligonucleótidos diseñados se realizó una serie de pasos de verificación. Primero, se extrajo gDNA de los ecotipos de Bd21 y Bd2-3 que se observaron cómo bandas de alto peso molecular en la parte superior del gel, (Figura 24).

Posteriormente, se realizó una PCR con los oligonucleótidos diseñados (Tabla 12) con la que se verificó que se obtuvieran productos del tamaño esperado en el gel de agarosa al 2%, las bandas que se observan en los controles negativos corresponden a los oligonucleótidos que no se sintetizaron durante la reacción (Figura 25).

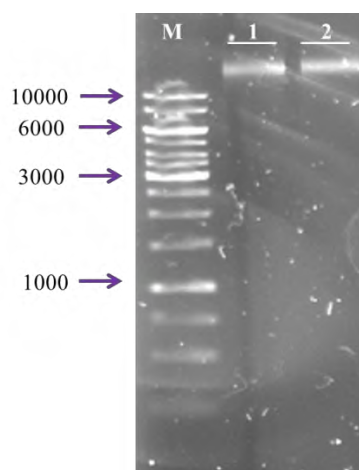


Figura 24. Gel de agarosa al 2% de la extracción de gDNA.

1: DNA de Bd21 y 2: DNA de Bd2-3; M: marcador de peso molecular.

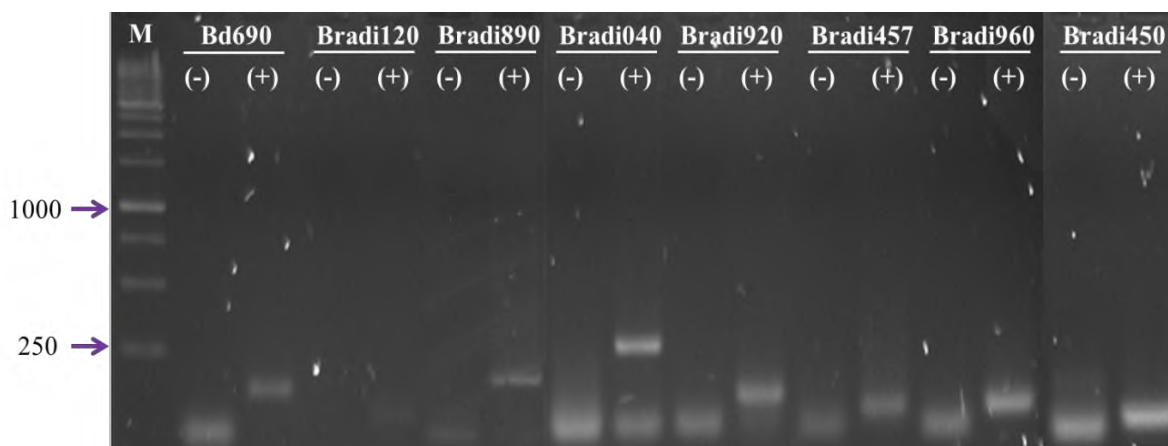


Figura 25. Comprobación de los oligonucleótidos a partir del gDNA.

Se utilizó como control negativo (-) H₂O; en el gel se pueden observar diferentes tamaños de banda dependiendo cada oligonucleótido. Las abreviaturas utilizadas corresponden al nombre del oligonucleótido utilizado como se muestra en la Tabla 12.

Para utilizar oligonucleótidos en qPCR, se debe asegurar que en cada ciclo se obtenga el doble de productos que en el anterior. De esta manera, se obtuvieron las eficiencias que indican las cantidades de DNA que se copian en cada ciclo, y conocer límite de detección y cuantificación de la qPCR; los porcentajes de eficiencia recomendados van de 90-120% en la PCR (Svec *et al.*, 20015); nuestros resultados de las eficiencias para ocho de los oligonucleótidos se encuentran dentro de ese rango sin embargo para Bradi1g17960 se utilizó con la eficiencia de 134.29% ya que su R^2 fue de 0.97 lo que indica que existe poca variabilidad en los valores obtenidos (Tabla 12). En seguida, se realizó el análisis de las curvas Melting donde el producto de la amplificación se calienta gradualmente de 60 hasta 95, de tal forma que las cadenas de DNA se van separando y al mismo tiempo va disminuyendo la fluorescencia. De esta forma, en las gráficas de fluorescencia contra temperatura, se puede detectar el número de productos de la amplificación, un pico corresponde a un producto. En el Apéndice K se pueden observar los resultados para la calibración de los oligonucleótidos, para cada uno de ellos se obtuvo un pico, lo que indica que se amplificó la región correcta, en el caso de Bradi4g31040, Bradi1g17960, Bradi1g71450, Bradi2g11890, Bradi1g72457, Bradi2g72920 y Bradi1g32890 (*UBI*) se observan picos extra que son artefactos que corresponden a los controles negativos.

8.6 Extracción de RNA y ausencia de gDNA

Se realizaron las extracciones de RNA en el tiempo 0, 2, 8, 12, 24 y 48 h de inundación así como de sus respectivos controles de los ecotipos Bd21 y Bd2-3. Estas muestras corresponden ZT 13, 15, 21, 1, 0+24 y 0+48 para estudiar el efecto de las condiciones ambientales de luz. La muestra de 24 y 48 h no se procesó más debido a que durante el desarrollo de trabajo, se pudo contar con datos de expresión por RNA-Seq de los mismos ecotipos de *Brachypodium* sometidas a estrés por inundación durante 48 h (Rivera-Contreras, 2015). La verificación de la integridad del RNA en agarosa indicó que no hubo degradación del RNA pues no había un barrido y se obtuvieron las dos bandas definidas de las dos subunidades del RNA ribosomal (Figura 26 y en el Apéndice L se encuentran las imágenes de los geles de la primer prueba experimental).

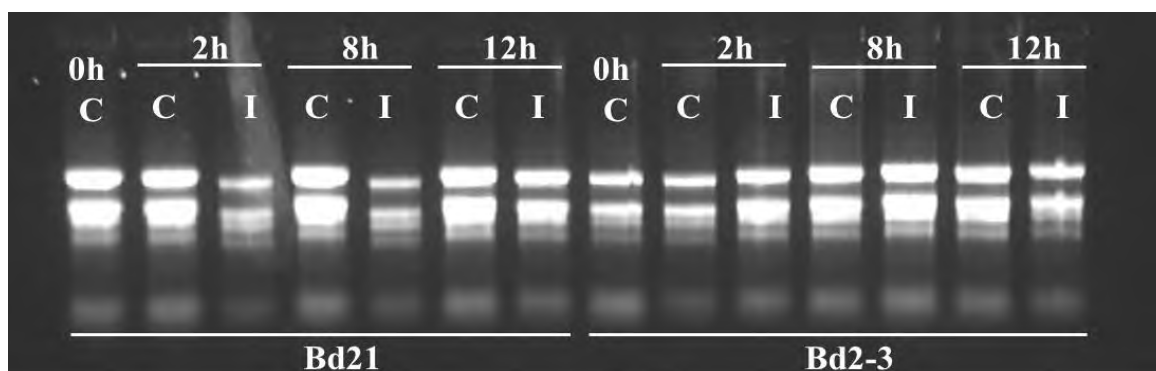


Figura 26. RNA de *Brachypodium* en electroforesis de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 en gel de agarosa al 1% para la extracción de RNA mediante el kit. C: control; I: plantas sometidas a inundación.

Con el RNA extraído, se realizó una PCR para la verificación de ausencia de gDNA. Para ello, se utilizó como control constitutivo *ACT* (Bradi2g24070). De todas las muestras probadas, solamente el control positivo mostró la amplificación esperada de 200 pares de bases (Figura 27).

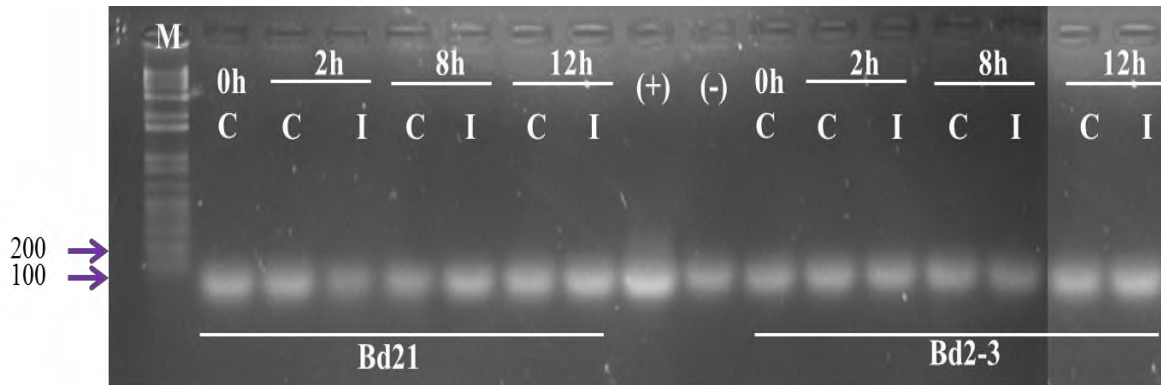


Figura 27. PCR para la verificación de la ausencia de gDNA en las muestra de RNA de Bd21 y Bd2-3.

Se utilizó como control constitutivo *ACT*; M: marcador de peso molecular; C: control; I: plantas sometidas a inundación; control positivo (+): gDNA de Bd21 1:50; control negativo (-): reacción solo con H₂O.

También se realizó una verificación del cDNA con Bradi4g31040. En la Figura 28 se observa una banda de 150 pares de bases (pb) en el caso de las muestras de cDNA control e inundación para Bd21 y Bd2-3 que corresponde al tamaño de banda esperado para ese gen cuando proviene de cDNA y en el caso del control positivo, se observa una banda de 250 pb que corresponde a la sección genómica con intrón (100 pb) incluido.

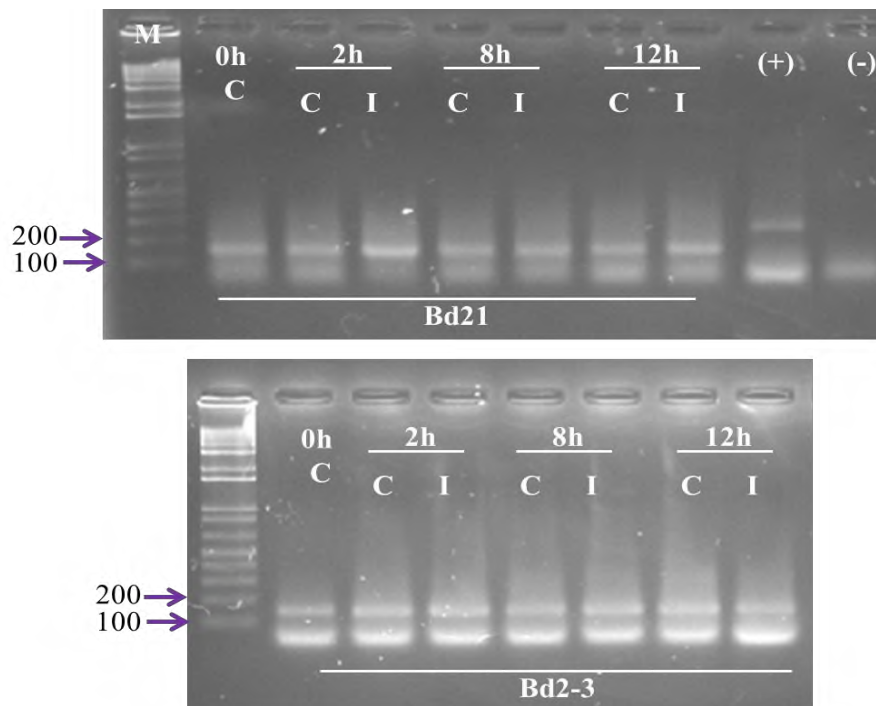


Figura 28. Verificación de cDNA.

Se utilizó como control constitutivo Bradi4g31040. M: marcador de peso molecular C: control; I: plantas sometidas a inundación; control positivo (+): gDNA de Bd21 1:50; como control negativo (-): reacción sólo con H₂O.

8.7 Análisis de la expresión por qPCR

Se midió la expresión de los genes ERFs-VII en *Brachypodium* por qPCR para ver su dinámica en el tiempo bajo estrés por inundación total. El análisis de la expresión confirmó la división observada a través del análisis bioinformático de transcritos constitutivos e inducibles (Figura 29).

Los genes que son constitutivos en control e inundación son Bradi3g60120 y Bradi1g46690 y no se afectaron por el ciclo luz-oscuridad. Bradi4g31040, también se predijo como constitutivo, sin embargo sólo fue así durante las dos primeras horas. Después de ocho horas de estrés, aumentó ligeramente su expresión al doble y a las 12 h de inundación se expresó tres veces más que en su condición control. No obstante, al compararse con los inducibles que se expresan >10 veces, este cambio en la magnitud de expresión es pequeño (Figura 29).

Tal y como se predijo, los genes inducibles son Bradi1g17960, Bradi1g72457, Bradi2g11890 y Bradi2g27920; en ellos se observó un aumento en sus niveles de expresión comparados con su control. Bradi1g17960, Bradi1g72457, Bradi2g11890, y Bradi2g27920 aumentaron su expresión desde las 2 h de inundación y su control no responde al ciclo luminoso. En el caso de Bradi1g72457, podemos observar que los niveles de expresión son hasta de 100 veces más comparadas con su condición control, incluso en comparación con Bradi1g17960, Bradi2g11890 y se mantiene fuertemente expresado durante todo el tratamiento de inundación. En este ensayo, no se pudo encontrar una diferencia en el nivel de expresión entre el ecotipo tolerante (Bd2-3) y el sensible (Bd21).

También se obtuvo información del ERF-VII Bradi1g72450 que a diferencia de los demás, su control si presenta un comportamiento oscilatorio ante el ciclo luminoso al ser inducible en la noche y tener un pico máximo aparente al amanecer (Figura 29); de este gen no se encontró nada reportado en el análisis por RNA-Seq, sin embargo, apareció como candidato a ERF-VII en el análisis bioinformático. Se observa que induce su expresión en las 2 primeras horas de inundación y posteriormente va disminuyendo a las 8 h (noche para la planta) y a las 12 h sigue disminuyendo su expresión (1 hora de luz de la planta).

Licausi *et al.* (2011) encontraron que *HRE1* y *HRE2* aumentan su expresión después de 2 h bajo el tratamiento de hipoxia (1% de O₂) y que *RAP2.2*, *RAP2.3* y *RAP2.12* se mantenían durante todo el tratamiento. En la base de datos DIURNAL de *Arabidopsis*, se buscaron cada uno de los ERFs y su oscilación en dos diferentes condiciones, días cortos y largos. Se detectó que *RAP2.3* es un transcrito oscilatorio (Figura 30). En este trabajo se propone que Bradi1g72450 es el gen oscilatorio de *Brachypodium*.

En la Figura 31 se ilustran los ERFs-VII de *Arabidopsis* tratados bajo hipoxia (1% de oxígeno) y su expresión. Se aprecian los genes que se expresan de manera constitutiva durante el tratamiento de estrés y los inducibles *HRE1* y *HRE2* aumentan su expresión después de las 2 h de este estrés (Licausi *et al.*, 2010; Licausi *et al.*, 2011).

El aumento de la tolerancia en condiciones anaeróbicas tiene que ver con la capacidad de regenerar el NAD⁺ mediante la fermentación alcohólica. Licausi *et al.* (2010) encontraron que plantas de *Arabidopsis* 35S::*HRE1* mostraban expresión de *ADH* y *PDC* más altas que en plantas de tipo silvestre en condiciones aeróbicas, ellos verificaron que las actividad enzimática de ADH tenían una relación opuesta en plantas doble mutante (*hre1hre2*) y 35S::*HRE1*.

Bui *et al.* (2015) realizaron comparaciones entre los cinco factores de transcripción ERFs-VII de *Arabidopsis* mediante ensayos de trans-activación en protoplastos de *Arabidopsis* y la fusión de los promotores de *ADH*, *PDC* y *HEMOGLOBIN (HB)* con el gen reportero luciferasa. Sus ensayos mostraron que tres de los cinco genes ERF-VII poseen la capacidad de activación más fuerte (*RAP2.2*, *RAP2.3* y *RAP2.12*) y el resto (*HRE1* y *HRE2*) no mostraron actividad trans-activación significativa.

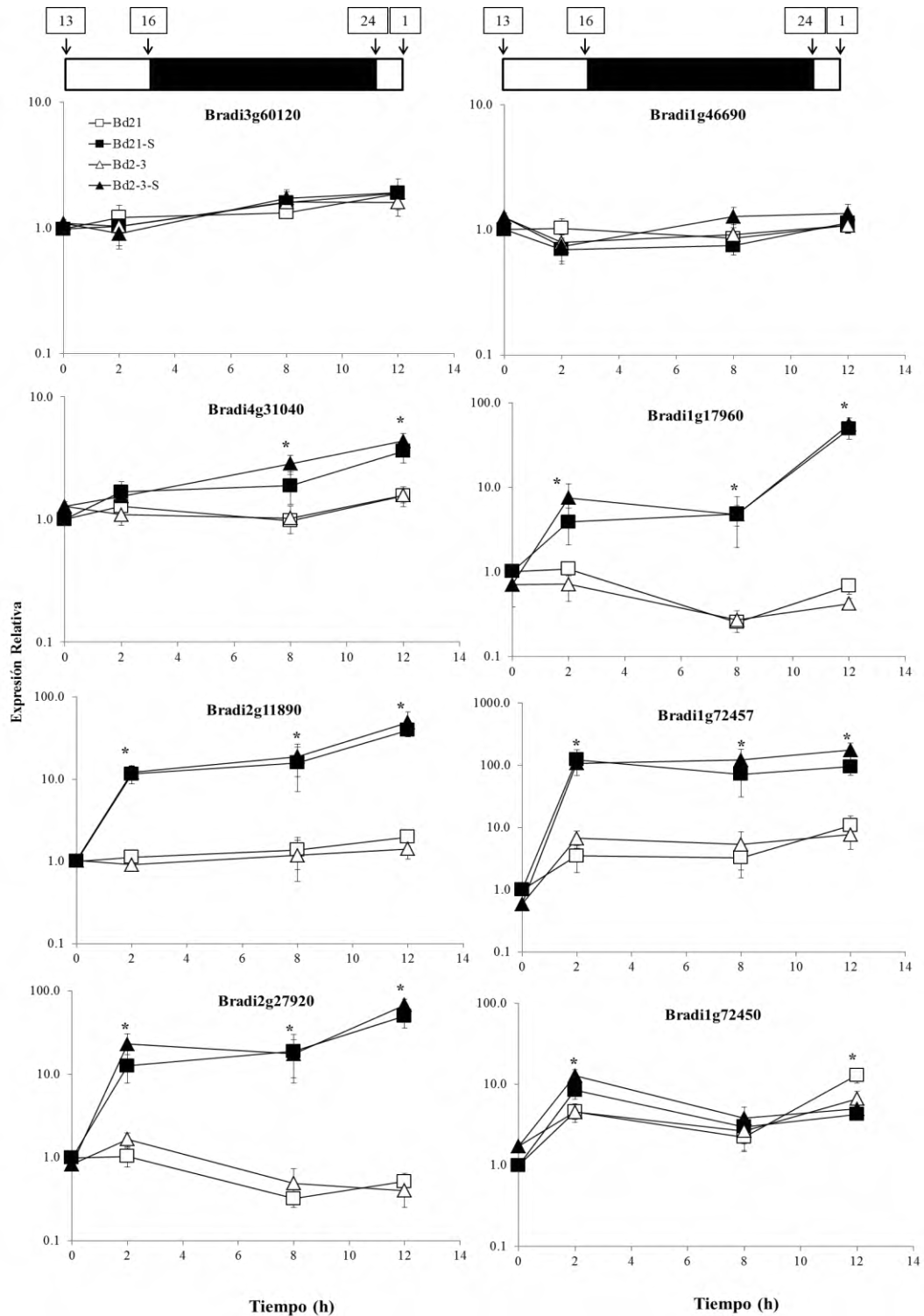


Figura 29. Expresión de los ERFs-VII de *Brachypodium* por qPCR.

Los valores están normalizados con *ACT* y *UBI*, se expresan como promedio de cuantificación relativa de cuatro análisis; la barra negra corresponde a la oscuridad para la planta. Los asteriscos representan diferencias significativas entre control e inundación comparadas en el mismo tiempo ($p < 0.05$, prueba t-Student). Los símbolos blancos y negros indican muestras control e inundación, respectivamente.

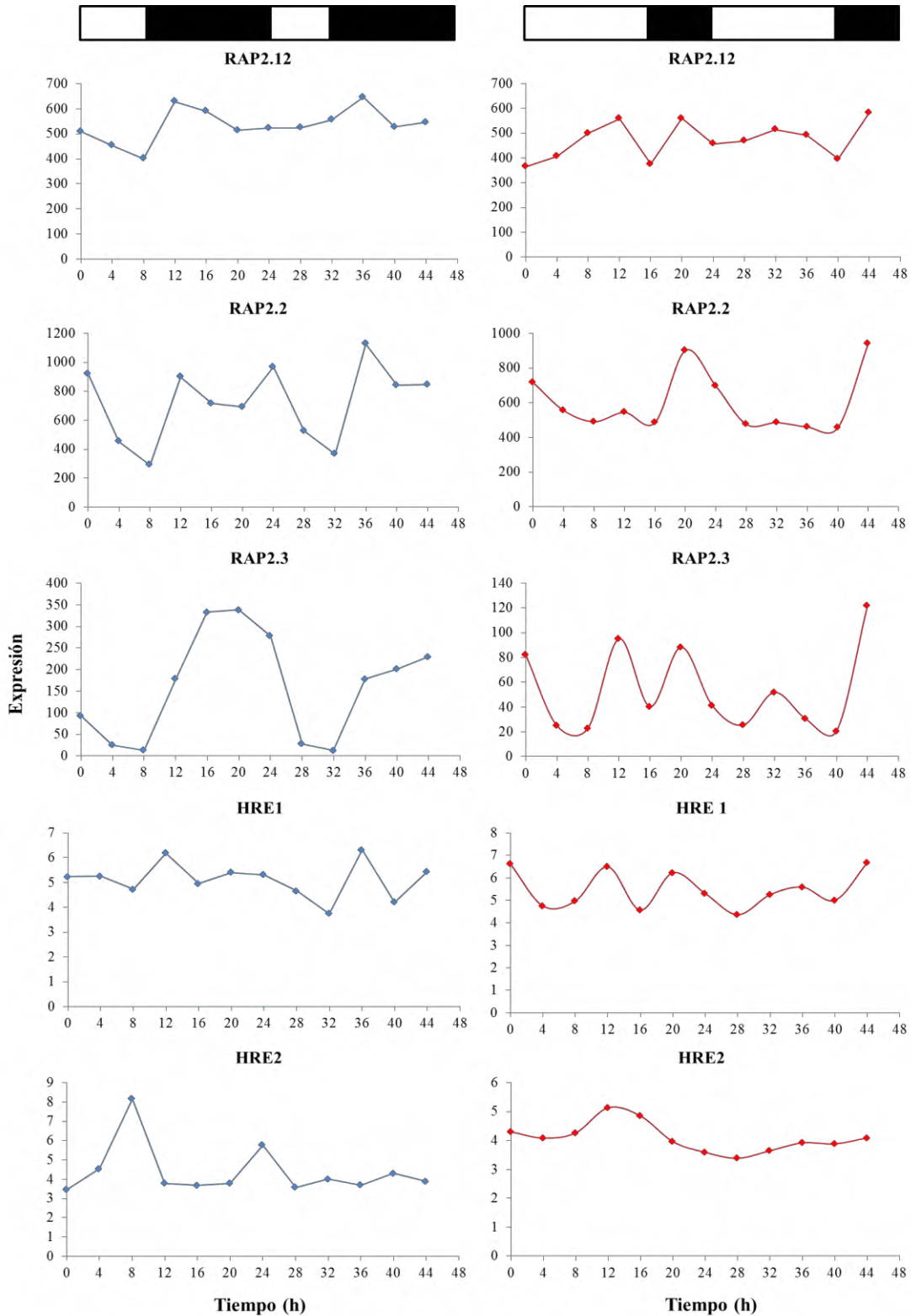


Figura 30. Patrones de expresión para los ERFs-VII de Arabidopsis obtenidos de la base de datos DIURNAL.

Las unidades del eje de las ordenas son fluorescencia de microarreglos. Azul corresponde a días cortos y el color rojo a días largos (diurnal.mocklerlab.org).

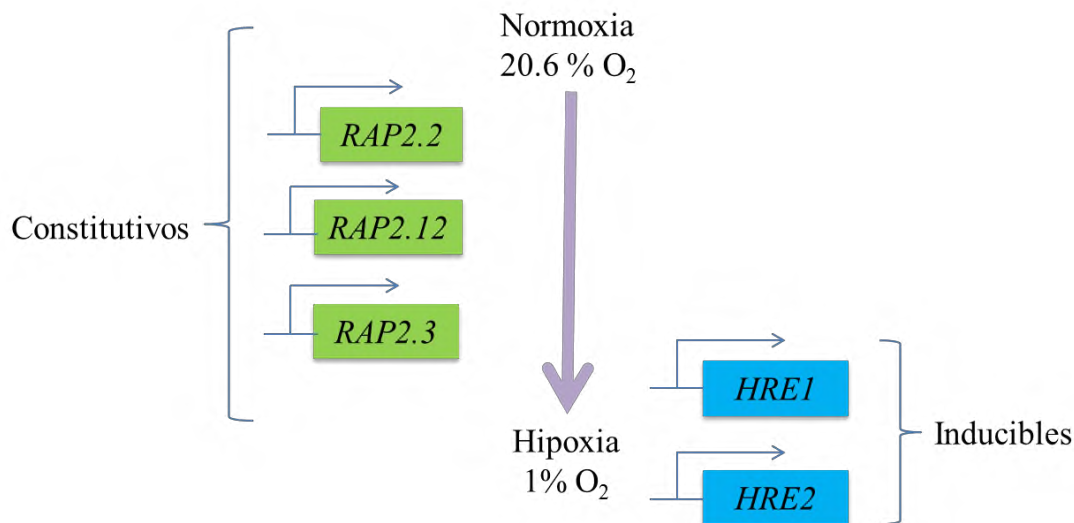


Figura 31. Patrón de expresión de los ERFs-VII de *Arabidopsis* durante estrés por hipoxia (1% O₂).

8.2 Análisis por RNA-Seq

Los datos obtenidos se confirmaron a través de la base de datos de RNA-Seq de los genes que se expresan en Bd21 y Bd2-3 durante dos días de inundación (Rivera-Contreras, 2015). Se observó tanto en Bd21 como en Bd2-3 la presencia de siete ERFs-VII (Tabla 13), también a partir de estos datos podemos realizar la clasificación antes mencionada de los genes constitutivos Bradi3g60120, Bradi1g46690 y Bradi4g31040 y los ERFs-VII inducibles Bradi1g17960, Bradi2g11890, Bradi1g72457 y Bradi2g27920. Con los datos obtenidos de este análisis sólo pudimos verificar la expresión de los genes en un punto de tiempo específico, en comparación con el análisis de la expresión por qPCR donde se caracterizó la dinámica de los genes durante diferentes tiempos de estrés, además que los datos aportados por qPCR se pueden observar la abundancia en la que se encuentran los ERFs-VII por la formación de un producto en la muestra (los valores de CT están relacionados inversamente con la abundancia del gen en la muestra). En el RNA-Seq la abundancia se puede apreciar por medio de las cuentas por millón (Tabla 13).

Al cuantificar los ERFs-VII de *Brachypodium* en LogFC, también se observó la división entre los inducibles y los constitutivos (Figura 32). No se detectaron diferencias significativas en su expresión control o en inundación entre el ecotipo susceptible y el tolerante. De esta forma, se demostró por análisis bioinformático, estudios de la expresión por

qPCR y por RNA-Seq que los ERFs-VII de *Brachypodium* se dividen en dos grupos con características estructurales y de expresión dinámicas.

Tabla 13. Datos de Expresión de los ERFs-VII de *Brachypodium distachyon* obtenidos a las 48 h de estrés por inundación y controles por RNA-Seq (cuentas por millón \pm D.E.) para los ERFs-VII de *Brachypodium*.

Gen	Ecotipo			
	Bd21 Control	Bd21 Inundación	Bd2-3 Control	Bd2-3 Inundación
Bradi3g60120	23.99 \pm 2.36	46.45 \pm 2.86	25.38 \pm 1.52	52.44 \pm 1.85
Bradi1g46690	106.42 \pm 8.68	137.11 \pm 3.52	123.00 \pm 7.64	138.62 \pm 5.53
Bradi4g31040	61.37 \pm 5.97	59.67 \pm 5.65	36.90 \pm 1.60	67.72 \pm 8.45
Bradi1g17960	0.12 \pm 0.08	36.38 \pm 12.92	0.06 \pm 0.02	68.65 \pm 31.45
Bradi2g11890	3.69 \pm 0.78	119.98 \pm 23.74	4.76 \pm 0.77	169.14 \pm 10.63
Bradi1g72457	13.19 \pm 2.71	76.26 \pm 11.92	8.75 \pm 1.65	82.28 \pm 7.04
Bradi2g27920	0.06 \pm 0.03	31.41 \pm 2.20	0.06 \pm 0.06	40.67 \pm 6.11

	Bd21-S/ Bd21-C	Bd21-C/ Bd2-3-C	Bd21-S/ Bd2-3S	Bd2-3-S/ Bd2-3-C
Bradi3g60120	0.955	-0.081	-0.173	1.047
Bradi1g46690	0.366	-0.209	-0.016	0.173
Bradi4g31040	-0.042	0.734	-0.184	0.876
Bradi1g17960	8.256	0.809	-0.913	9.979
Bradi2g11890	5.034	-0.374	-0.494	5.153
Bradi1g72457	2.526	0.597	-0.111	3.234
Bradi2g27920	8.749	0.100	-0.375	9.224

Figura 32. Análisis de expresión por RNA-Seq de LogFC de Bd21 y Bd2-3 durante 48h de estrés.

En amarillo y azul se indican los genes que se expresan positivamente y negativamente. La intensidad del color es proporcional al valor. C: control; S: inundación.

8.3 Factores de transcripción co-expresados en *Brachypodium* durante el estrés por inundación.

Para observar qué otros factores de transcripción se están induciendo en *Brachypodium* simultáneamente a los ERFs-VII, se realizó un análisis por GO en Phytozome 10.3. Se identificaron 20 factores de regulación de la transcripción dependientes de DNA (Tabla 14; GO:0006355) de los cuales cuatro son ERFs-VII inducibles (Bradi1g17960, Bradi1g72457, Bradi2g11890 y Bradi2g27920). El quinto ERF (Bradi1g72450) no se detectó por RNA-Seq debido a que no está anotado en el genoma de *Brachypodium* y sólo fue encontrado por nuestro análisis bioinformático y de qPCR. Debido a que se realizó un análisis para agrupar a aquellos genes que se expresan fuertemente durante la hipoxia, los tres ERFs-VII constitutivos identificados en este trabajo, no están en esta categoría GO. No obstante, sí se encuentran en los genes que no responden a la inundación.

En esta categoría GO, también se encontraron otros cuatro ERFs pero que no pertenecen a la familia VII (Bradi2g02710, Bradi2g24175, Bradi3g18070 y Bradi4g35650; Tabla 14). También se obtuvo su secuencia de aminoácidos y a partir de los criterios anteriormente mencionados se realizó la comparación de las secuencias, estos factores de transcripción no poseen un dominio MCGGAI (I/L) en la sección del N-terminal.

Adicionalmente a los ERFs, se encontraron otros 12 FTs que representan a las familias de respuesta a choque térmico, auxina y ácido abscísico (Voesenek y Bailey-Serres, 2015). Además, también hay FTs conocidos por regular etapas del desarrollo como NAC, NAM, dedos de Zn (Bailey-Serres *et al.*, 2010) y mediadores de la respuesta biótica como WRKY (Hsu *et al.*, 2013). Esta diversidad de factores de transcripción inducidos muestra que la planta está respondiendo no sólo a la baja de oxígeno, sino que también está ajustando su desarrollo y respondiendo a la probabilidad aumentada de ser atacada por patógenos.

Tabla 14. Transcritos inducidos por inundación agrupados por análisis GO en la categoría Regulación de la transcripción dependientes de DNA y su identidad (RNA-Seq, GEO GSE74222) .
Subrayados se destacan los ERFs-VII.

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

9 Conclusión

A partir del análisis bioinformático de *Brachypodium*, se encontraron ocho genes ERFs-VII que se expresan durante la inundación. Se logró predecir e identificar dos grupos distintivos de ERFs-VII, los constitutivos y los inducibles durante la inundación. Esta observación se confirmó por cuantificación de expresión por dos métodos diferentes, qPCR y RNA-Seq.

Tanto *Brachypodium* como *Arabidopsis* poseen estos dos grupos de genes. No obstante, *Brachypodium* posee tres ERFs-VII más que *Arabidopsis* para poder sobrellevar el estrés por inundación. Bradi1g17960, Bradi2g27920, Bradi1g72457 y Bradi2g11890 son muy similares en estructura y tendencia de expresión con *HRE1* y *HRE2* de *Arabidopsis*, lo mismo se pudo observar con las proteínas de RAP2.2 y RAP2.12 comparadas con las proteínas codificadas en los genes de expresión constitutiva de Bradi3g60120, Bradi1g46690, y Bradi4g31040. *Brachypodium* posee un ERF-VII que responde al ciclo luz-oscuridad, Bradi1g72450. Este gen puede ser el responsable de comunicación entre la respuesta a la inundación y la de estrés por hambre. De manera interesante, no es el más cercano estructuralmente a RAP2.3 de *Arabidopsis*, siendo Bradi2g27920 el homólogo.

La intensidad de la expresión de mRNA ni su rapidez fueron factores diferenciales entre el ecotipo tolerante y el sensible a la inundación, esto a pesar de que los ERFs-VII son los principales determinantes de la respuesta a la hipoxia. Esto permite proponer que la regulación del estrés puede estar a otro nivel, como sería el postranscripcional de estabilidad de las proteínas ERFs-VII.

Adicionalmente a los ERFs-VII, hay otros factores de transcripción no caracterizados que poseen identidades diversas. Se puede hipotetizar que este conjunto de transcritos será responsable de acciones de tolerancia paralelas y concomitantes a las controladas por los ERFs-VII.

Brachypodium, al igual que *Arabidopsis*, es una planta que crece en zonas que no son muy propensas a las inundaciones, a pesar de esto, conserva un grupo de ERFs-VII activos en la inundación. Esto adquiere más importancia debido a que por su pequeño tamaño, debe estar preparado para enfrentar estas condiciones aún en lluvias no torrenciales

10 Recomendaciones

Realizar una caracterización genética con el uso de sobreexpresantes, silenciamiento, localización y knock-out de los ocho genes de *Brachypodium* para ver la respuesta de las plantas cuando se sobreexpresan o cuando están ausentes estos genes en los tratamientos de inundación.

Evaluar si los ERFs-VII y los otros FTs co-regulados, interaccionan entre sí y en qué medida dependen entre ellos para conferir la respuesta a la hipoxia y los efectos que puedan tener en las plantas. Lo anterior para conocer qué características puede aportar a los cultivos que no poseen genes que permiten tener tolerancia a este estrés y cuantificar su importancia relativa en la respuesta global al estrés por inundación.

Realizar transformaciones con versiones de dominios modificados para ver el impacto en la tolerancia en las plantas y evaluar características benéficas le pueda traer estos nuevos genes a las plantas.

11 Bibliografía

1. AGROASEMEX (2006) La Experiencia Mexicana en el Desarrollo y Operación de Seguros Paramétricos Aplicados a la Agricultura. Agroasemex, México. 60 p.
2. Ahmed F, M Y Rafii, M R Ismail, A S Juraimi, H A Rahim, R Asfaliza, M A Latif (2013) Waterlogging tolerance of crops: Breeding mechanism of tolerance, molecular approaches, and future prospects. *BioMed Research International* 2013: 1-10.
3. Alves S C, B Worland, V Thole, J W Snape, M W Bevan, P Vain (2009) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nature Protocol* 4: 638–649.
4. Atwell B J, H Greenway, T D Colmer (2014) Efficient use of energy in anoxia-tolerant plants with focus on germinating rice seedlings. *New Phytologist* 206: 36-56.
5. Bailey T L, C Elkan (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press 36 p.
6. Bailey-Serres J, L A C J Voesenek (2008) Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* 59: 313-339.
7. Bailey-Serres J, L A C J Voesenek (2010) Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 489-494.
8. Bailey-Serres J, S C Lee, E Brinton (2012) Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiology* 160: 1698–1709.
9. Bailey-Serres J, T D Colmer (2014) Plant tolerance of flooding estress – recent advances. *Plant, Cell and Environment* 37: 2211-2215.
10. Bailey-Serres J, T Fukao, D J Gibbs, M J Holdsworth, S C Lee, F Licausi, P Perata, L A C J Voesenek, J T van Dongen (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends in Plant Science* 17: 129-138.
11. Bailey-Serres J, T Fukao, P Ronald, A Ismail, S Heuer, D Mackill (2010) Submergence Tolerant rice: SUB1’s Journey from landrace to Modern Cultivar. *Rice* 3: 138-147.
12. Barding G A, J S Béni, T Fukao, J Bailey-Serres, C K Larive (2013) Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research* 12: 898-909.

13. Blázquez M A, M Piñeiro, F Valverde (2011) Bases moleculares de la floración. *Investigación y ciencia*: 29-36.
14. Branco-Price C, K A Kaiser, C J H Jang, C K Larive, J Bailey-Serres (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56: 743-755.
15. Bui L T, B Giuntoli, M Kosmacz, S Parlanti, F Licausi (2015) Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 236: 37-43.
16. Campbell M T, C A Proctor, Y Dou, A J Schmitz, P Phansak, G R Kruger, C Zhang, H Walia (2015) Genetic and molecular characterization of submergence response identifies *Sub1a* as a major submergence tolerance locus in Maize. *Plos One* 10: e0120385.
17. Capel J, R Lozano, J M Martínez-Zapater, J A Jarillo (2003) Ritmos y relojes circadianos de la plantas. *Ecosistemas* 12: 1-9.
18. CENAPRED (2001) Diagnóstico de peligros e identificación de riesgos de desastres en México: atlas nacional de riesgos de desastres en México. Centro Nacional de Prevención de Desastres. Secretaría de Gobernación, México. 225 p.
19. CENAPRED (2014) Inundaciones Serie Fascículos. Centro Nacional de Prevención de Desastres. Secretaria de Gobernación. México. 54 p.
20. Cesario M E (2015) Caracterización fisiológica y molecular de la floración en *Brachypodium distachyon* bajo estrés por déficit hídrico. Tesis. Maestría en biotecnología. Universidad del Papaloapan.
21. Conde-Álvarez C, S O Saldaña-Zorrilla (2007) Cambio climático en América Latina y el Caribe: Impactos, vulnerabilidad y adaptación. *Revista Ambiente y Desarrollo* 23: 23-30.
22. Dar M H, A de Janvry, K Emerick, D Raitzer, E Sadoulet (2013) Flood-tolerant rice reduces yield variability and raises expected yield, differentially benefitting socially disadvantaged groups. *Scientific Reports* 3: 3315.
23. de Montaigu A, R Tóth, G Coupland (2010) Plant development goes like clockwork. *Trends in Genetics* 26: 296–306.
24. Draper J, L A J Mur, G Jenkins, G C Ghosh-Biswas, P Bablak, R Hasterok, A P M Routledge (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology* 127: 1539-1555.

25. Enciso L A (2012) En México ya se presentan migraciones por causas ambientales, dicen expertos. Consultado en: La jornada <http://www.jornada.unam.mx/2012/06/13/sociedad/050n1soc>.
26. Fukao T, K Xu, P C Ronald, J Bailey-Serres (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell* 18: 2021-2034.
27. Fukao T, T Harris, J Bailey-Serres (2009) Evolutionary analysis of the *Sub1* gene cluster that confers submergence tolerance to domesticated rice. *Annals of Botany* 103: 143-150.
28. Garvin D (2007) Spotlight *Brachypodium*: a new monocot model plant system emerges. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1177–1179.
29. Gibbs D J, N M Isa, M Movahedi, J Lozano-Juste, G M Mendiando, S Berckhan, N Marin-de la Rosa, J V Conde, C S Correia, S P Pearce, G W Bassel, B Hamali, P Talloji, D F A Tomè , A Coego, J Beynon, D Alabadi, A Bachmair, Josè Leòn, J E Gray, F L Theodoulou, M J Holdsworth (2014) Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Molecular Cell* 53: 369–379.
30. Gibbs D J, S C Lee, N M Isa, S Gramuglia, T Fukao, G W Bassel, C S Correia, F Corbineau, F L Theodoulou, J Bailey-Serres, M J Holdsworth (2011) Homeostatic response to hipoxia is regulated by the N- end rule pathway in plants. *Nature* 479: 415-418.
31. Gliessman S R (2002) Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible. Turrialba, Costa Rica. *Catie*. 358 p.
32. Guevara y Jiménez (2006) La reproducción de las plantas. Universidad de Costa Rica, 82p.
33. Hands P, S Drea (2012) A comparative view of grain development in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Cereal Science* 56: 2-8.
34. Hattori Y, K Nagai, S Furukawa, S Xian-Jun, R Kawano, H Sakakibara, J Wu, T Matsumoto, A Yoshimura, H Kitano, M Matsuoka, H Mori, M Ashikari (2009) The ethylene response factor *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026-1031.
35. Hong S Y, P J Seo, M S Yang, F Xiang, C M Park (2008) Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology* 8:112.

36. Hsu F C, M Y Chou, S J Chou, Y R Li, H P Peng, M C Shih (2013) Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25: 2699-2713.
37. Huo N, J P Vogel, G R Lazo, F M You, Y Ma, S McMahon, J Dvorak, O D Anderson, Ming-Cheng Luo, Y Q Gu (2009) Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant Mol Biol* 70:47-61.
38. INEGI (2013) Estadísticas a propósito del día internacional para la reducción de los desastres. Consultado en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/Desastres0.pdf>
39. Jiménez J C, L P Moreno, S Magnitskiy (2012) Respuesta de las plantas a estrés por inundación. Una revisión. *Revista Colombiana de ciencias Hortícolas* 6: 96-109.
40. Jiménez S G (2013) La innovación genómica genera un arroz resistente a inundaciones. Consultado en : <http://www.siempre.com.mx/2013/09/la-innovacion-genomica-genera-un-arroz-resistente-a-inundaciones/>
41. Kosmack M, S Parlanti, M Schwarzländer, F Kragler, F Licausi, J T Van Dongen (2015) The stability and nuclear localization of the transcription factor RAP2.12 are dynamically regulated by oxygen concentration. *Plant, Cell and Environment* 38: 1094-103.
42. Lee S C, A Mustroph, R Sasidharan, D Vashisht, O Pedersen, T Oosumi, L A C J Voesenek , J Bailey-Serres (2011) Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *New Phytologist* 190: 457-471.
43. Licausi (2011) Regulation of the molecular response to oxygen limitations in plants. *New Phytologist* 190: 550-555.
44. Licausi F, J T van Dongen, B Giuntoli, G Novi, A Santaniello, P Geingerberger, P Perata (2010) *HRE1* and *HRE2*, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 62: 302-315.
45. Licausi F, M Kosmacz, D A Weits, B Giuntoli, F M Giorgi, L A C J Voesenek, P Perata, J T van Dongen (2011) Oxygen sensing in plants is mediated by an N- end rule pathway for protein destabilization. *Nature* 479: 419-422.

46. Liu L, M J White, T H MacRae (1999) Transcription factors and their genes in higher plants Functional domains, evolution and regulation. *European Journal of Biochemistry* 262: 247-257.
47. Manson R H, E J Jardel Peláez (2009). Perturbaciones y desastres naturales: impactos sobre las ecorregiones, la biodiversidad y el bienestar socioeconómico, en *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, 184 p.
48. Mas P (2015) El reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana*: ¡las plantas siguen el ritmo! *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*: 1-2.
49. Miro B, A M Ismail (2013) Tolerance of anaerobic conditions caused by flooding during germination and early growth in rice (*Oriza sativa L.*). *Plant Science* 4: 269.
50. Mockler T, H Yang, XH Yu, D Parikh, Y Cheng, S Dolan, C Lin (2003) Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 4: 2140–2145.
51. Nakano T, K Suzuki, T Fujimura, H Shinshi (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 140: 411-432.
52. Nakashima K, Y Ito, K Yamaguchi-Shinozaki (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* 149: 88–95.
53. Nelson G C, M W Rosegrant, J Koo, R Robertson, T Sulser, T Zhu, C Ringler, S Msangi, A Palazzo, M Batka, M Magalhaes, R Valmonte-Santos, M Ewing, D Lee (2009) Cambio Climático El impacto en la agricultura y los costos de adaptación. *Food Policy Report 21*. Washington, D.C.: International Food Policy Research Institute (IFPRI). 19 p.
54. Nuñez-Lopez L, A Aguirre-Cruz, B E Barrera-Figueroa, J M Peña-Castro (2015) Improvement of enzymatic saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* by ectopic expression of the rice *SUBIA-1* transcription factor. *PeerJ* 3: e817.
55. Peña-Castro J M (2014) Respuesta molecular de las plantas ante el estrés por inundación: lecciones aprendidas del gen *SUBIA*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 325–337.
56. Peña-Castro J M, M van-Zanten, S C Lee, M R Patel, L A C J Voeselek, T Fukao, J Bailey-Serres (2011) Expression of rice *SUBIA* and *SUBIC* transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. *The Plant Journal* 67: 434-446.

57. Pucciariello C, P Perata (2013) Quiescence in rice submergence tolerance: an evolutionary hypothesis. *Cell Press* 18: 337-381.
58. Raven P H, R F Evert, S E Eichhorn (1992) *Biología de las plantas Volumen 2*. Revertè, Barcelona ,402 p.
59. Riechmann J L, J Heard, G Martin, L Reuber, C Z Jiang, J Keddie, L Adam, O Pineda, O J Ratcliffe, R R Samaha, R Creelman, M Pilgrim, P Broun, J Z Zhang, D Ghandehari, B K Sherman, G L Yu (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
60. Rivera-Contreras I K (2015) Búsqueda y análisis molecular de ecotipos de *Brachypodium* tolerantes al estrés por inundación. Tesis. Universidad del Papaloapan.
61. Rocha M, F Licausi, W L Araujo, A Nunes-Nesi, L Sodek, A R Fernie J T van Dongen (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 152: 1501-1513.
62. SAGARPA (2012) México: el sector agropecuario ante el desafío del cambio climático. Consultado en: <http://www.sagarpa.gob.mx/programas2/evaluacionesExternas/Lists/Otros%20Estudios/Attachments/37/Cambio%20Climatico.pdf>
63. Sánchez S E (2011) PRMT5, un nexa entre el reloj circadiano y el splicing alternativo. Tesis Doctoral en el área de ciencias biológicas. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Instituto de Investigaciones Fisiologicas y Ecologicas Vinculadas a la Agricultura.
64. Schmittgen T D, K J Livak (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols* 3: 1101-1108.
65. Septiningsih E M, A M Pamplona, D L Sanchez, C N Neeraja, G V Vergara, S Heuer, A M Ismail, D J Mackill (2009) Development of submergence-tolerant rice cultivars: the *Sub1* locus and beyond. *Annals of Botany* 103: 151-160.
66. Setter T L, I Waters, S K Sharma, K N Singh, N Kulshreshtha, N P S Yaduvanshi, P C Ram, B N Singh, J Rane, G McDonald, H Khabaz-Saberi, T B Biddulph, R Wilson, I Barclay, R McLean, M Carik (2008) Review of wheat improvement for waterlogging

- tolerance in Australia and India: the importance with different soils. *Annals of Botany* 103: 221–235.
67. Singh S, D J Mackill, A M Ismail (2014) Physiological basis of tolerance to complete submergence in rice involves genetic factors in addition to the *SUB1* gene. *AoB Plants* 6: plu060.
 68. Svec D, A Tichopad, V Novosadova, M W Pfaffl, M Kubisa (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 9-16.
 69. Syed N H, S J Prince, R N Mutava, G Patil, S Li, W Chen, V Babu, T Joshi, S Khan, H T Nguyen (2015) Core clock, *SUB1*, and *ABAR* genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. *Journal of Experimental Botany*: 2-21.
 70. Tamang B G, J O Magliozzi, M A S Maroof, T Fukao (2014) Physiological and transcriptomic characterization of submergence and reoxygenation responses in soybean seedlings. *Plant, Cell & Environment* 37: 2350–2365.
 71. Tasaki T, S M Sriram, K S Park, Y T Kwon (2012) The N-End rule pathway. *Annual Review of Biochemistry* 81: 261-289.
 72. Tiessen A, F C Gómez-Merino, L I Trejo-Téllez, A López-Fabre, D P Chacón, E Vargas-Ortiz, N Palacio Rojas (2009) Fundamentos y metodologías innovadoras para el mejoramiento genético de maíz. *Fundación Ciencia Activa, Cinvestav Irapuato*, 518 p.
 73. Tofiño A, M Fregene, H Ceballos, D Cabal (2006) Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación. *Acta Agronomica* 55: 1-18.
 74. Voesenek L A C J, T D Colmer, R Pierik, F F Millenaar, A J M Peeters (2006) How plants cope with complete submergence. *New Phytologist* 170: 213–226.
 75. Voesenek L A C J, J Bailey-Serres (2013) Flooding tolerance: O₂ sensing and survival strategies. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 647-653.
 76. Voesenek L A C J, J Bailey-Serres (2015) Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist* 206: 57–73.
 77. Vogel J, J Bragg J (2009) *Brachypodium distachyon*, a New model for the Triticeae. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 7: 427-449.
 78. Vogel J, T Hill T (2008) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* 27: 471–478.

79. Xu K, X Xu, T Fukao, P Canlas, R Maghirang-Rodriguez, S Heuer, A M Ismali, J Bailey-Serres, P C Ronald, D J Mackill (2006) *Sub1A* is an ethylene-responsive-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705-708.

Apéndices

Apéndice A: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos

Secuencia de nucleótidos

>***SUBIA***

ATGTGTGGAGGAGAAGTGATCCCCGCCGACATGCCGGCGGGCCGTTACGCCACGCCACGGCGACGGCGAGACA
GGTTGACAGAAAGAGGAGGAACAAGAAGAAGAGGAAGCGCGCGCCGACGAAGAATGGGAGGCCGCCTTCCAGGA
TCATGGCTGCTGACGACGACGACGACGGCGGGCGGACTCGTGTTAAGTAGTAAATCTTTGGTGTGAGGTCACCAG
GAAAATGATGCAGGCCGGGGCGCCGCCACCATGTCCATGCCGCTGGACCCCGTGACCGAGGAGGCCGAGCCG
GGTGGCTGAGAAGCCTCGCCGGCGCCGGCCGAGGCGGAGCTACGAGTACCACGGCATCCGGCAGCGGCCGTGGGG
GGTGGTTCGTCGGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGCGTCCGCCCTGGCTCGGCACCTTCGACACCGCCGTGCAAG
GCGCTCGCTACGACGCCGAGGCCCGCCGCATCCACGGCTGAAAGCCCGGACAAACTTCCCACCCGCCGATCTT
TTCGCCGCCGCCGCGTTCGACGCCGCTCGCTTCTTGCTCAACGACAACGGCTCATCACAATCGGAGAAGCGCC
CCGACGACGCCGCGTTCGACGTCGACGTCGACGACGGAGGCGTCCGGCGACGCGGCATACAACCTGGAGTGTGCT
GACGACGTGATGGACAGCCTCCTCGCCGGCTACGACGTGGCCAGCGGGCAGCAGACATATGGACATGGACATCTGGA
CTCCTCCACCTCTGTTAACCAAGAGATCAAGACCCCATCGATCCACCAAACATATCATATGCAGGGGAAGCCTG

Secuencias de aminoácidos

Arroz

>***SUBIA***

MCGGEV I PADM PAA PFTPRHGDGETWVDRKRNRK KKRKRGADEEWEAAFQEFMAADDDDDGGGLVLSSKSLVLR
SPGEN DAGR GAAATMSMPLDPVTEEAEPVAEKPRRRRPRRSYEYHGIRQRPWGRWSS EIRDPVKGVRLWLGT F
DTAVEAALAYDAEARRIHGWKARTNFPPADLSSPPPPSQPLCFLLNDNGLITIGEAPTDDAASTSTSTTEASGD
ARIQLECCSDDVMDSL LAGYDVASGDDIWTWTS GASSTSVNQEIKTPSIHQNISYAGEA

>***SUBIB***

MCGGALI PNDYGDKPPPPSESEWDATTKMKKKKKRGGGDDDEWAAAFREFIAGDDDDDDGGVSMFPPSGAGT
METTTEVAPAAAVVERPRRRRVRRSYPYRGVQRWPGRWASEIRDPVKGARVWLGTFTAVEAARAYDAEAR
RIHGHKARTNFPPDEPLPAPSQAPFCFLDDDDDDGVARGNSPASSAPDRASACTTSTSTVASGERGDELI
LLECCSDDVMDSL LAGFVDSSEPRSVLGMVN

>***SUBIC***

MRRRVSSSPSSSSSSSPARHHKARRSRRKLVAD EDWAAAFREFLSRDDDDDDDDGGHHVVVAPLIRSSNKCV
HGHEVVASTVGGGASGRRRADD DDGERRRRRRRERRSYPYRGIRQRPWGRWASEIRDPVKGIRVWLGTFTDA
EGAARAYDDEVRRIYGNKARTNFPPSPPPPEQPAAPVAAERSPSTTTTTTPSAEDSGDSRILIECCSDDLMS
LLAAFDMTTGDMRFS

>***SNORKELI***

MCGGCLIPDELVGKPARRTRAAAAGGDSGDGWKHGRRRLCPAAAPCNCKPRRRAGAADD DDVGRRRRTTRTRAA
SEVRFHGIHMRSYGRWSAEIRDSSYRHRVWIGTYATAEAAAARAYDAEARRIHGAKANTNFPPPNVDVDSGAP
PPPPWDLEAHMRFLEGEVELDDGGAEP PPPPSYGIPELLPMEPELVSATQSVHGDDEPWGLDKYMRFLSEVELD

DGGAPLPPPPSQHGGVAAAGSPQYGCRYDYLLLMCN

>SNORKEL2

MENAGTTSAVESVTNLQARTSPLPNVVPQTGTKASKRGDSGAKAKPAAAKKRRSKHGFLGVHQRTYGRWSAE
IRDNVIKGSRFWIGTFDTALDAALAYDAVSRRLYGLNAKTNFPAAAGEDDLPPPPPPAKPCSSTKRPKCCNTS
GDLGAAAAPPQAVDTPAAAAAGVELTSLCSVAAQAQEVSDGWEFIQE LLLLGGGVSPLDYLNQELAGAAVG
DLWSF

Arabidopsis

>RAP2.12 (At1g53910)

MCGGAIISDFI PPPRSRRVTSEFIWPD LKKNLKGSKKS SKNRSNFFDFDAEF EADFQGFKDDSSIDCDDDFDV
GDVFADV KPFVFTSTPKPAVSAAAEGSVFGKVTGLDGD AEKSANRKRKNQYRGIRQRPWGKWAAEIRD PREG
ARIWLGTFKTAEEAARAYDAAARRIRGSKAKVNFPEENMKANSQKR SVKANLQKPVAKPNPNPSALVQNSNI
SFENMCFMEEKHQVSNNNNNQFGMTNSVDAGCNGYQYFSSDQGSNSFDCSEFGWSDQAPITPDISSAVINNNN
SALFFEEANPAKKLKSMDFETPYNTEWDASLDFLNE DAVTTQDNGANPMDLWSIDEIHS MIGGVF

>RAP2.2 (At3g14230)

MCGGAIISDFI PPPRSLRV TNEFIWPD LKNKVKASKKRSNKRSDFFDLDDDFEADFQGFKDDSAFDCEDDDDV
FVNVKPFVFTATTKPVASAFVSTGIYLVGSAYAKKTVESAEQAEKSSKRKRKNQYRGIRQRPWGKWAAEIRD P
RKGSREWLGTFTAE EAARAYDAAARRIRGTKAKVNFPEEKNPSVVSQKRPSAKTNNLQKSVAKPNKSVTLVQ
QPTHLSQQYCNNSFDNSFGDMSFMEEKPQMYNNQFGLTNSFDAGNNGYQYFSSDQGSNSFDCSEFGWSDHGP
KTPEISSMLVNNNEASFVEETNAAKKLPNSDESDDL MAYLDNALWDTPLEVEAMLGADAGAVTQEEENPVEL
WSLDEINFMLEGDF

>RAP2.3 (At3g16770)

MCGGAIISDYAPLVTKAKGRKLTAEELWSEL DASAADDFWGFYSTSKLHPTNQVNVKKEAVKKEQATEPGKRR
KRKNVYRGIRKR PWGKWAAEIRDPRKGV RVWLGTFTAE EAAMAYDVA AKQIRGDKAKLNF PDLHPPPPNYT
PPSSPRSTDQPPAKKVCVVSQSESELSQPSFPVE CIGFNGDEFQNL SYGFEPDYDLKQQISSLESFLELDG
NTAEQPSQLDES VSEVDMWML DDVIASYE

>HRE1 (At1g72360)

MCGGAVISDYIAPEKIARSSGKSSWR SNGVFDCSIYDFDGNFDELESEDEPFVFSSTHKHHASGSASDGKKKQS
SRYKGI RRRPWGRWAAEIRDPIKGV RVWLGTFTAE EAARAYDLEAKRIRGAKAKLNF PNESSGKRKAKAKTV
QQVEENHEADLDVAVVSSAPSSSCLDFLWEENPD TLLIDTQWLEDIIMGDANKKHEPN DSEEANNVDASLLS
EELLAFENQTEYFSQMPFTEGNCDSSSTSLSSLF DGGNDMGLWS

>HRE2 (At2g47520)

MCGGAIISDFIWSKSESEPSQLGSVSSRKKRKPVS VSEERDGKRERKNLYRGIRQRPWGKWAAEIRDPSKGV
RVWLGTFTKTADEAARAYDVAAIKIRGRKAKLNF PNTQVEEEADTKPGGNQNELISENQVESLSEDLMALEDYMR
FYQIPVADDQSATDIGNLWSYQDSN

Apéndice B: Secuencias seleccionadas por análisis bioinformático para *Brachypodium*

❖ **Bradi3g60120.3**

>gi|721668873|ref|XP_010236158.1|PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like
[*Brachypodium distachyon*]

MCGGAILTDLKRPPAVSRRLAEGLLWPEKKKVCWKGEEDDFEADFGGFVVEDELEFGGEEEEAGDDDDVVEIKP
PPVKRAFTGDDLSMTSAAFDGPAAERSAKRKRKNQFRGIRQRPWGKWAEEIRDPNKGVVWLGTFNSAEEAARA
YDAEARRIRGNKAKVNFPEEPRAAQKRRAGPAAAKVPSRVEQKPNVKPAVNNLANNTNASAYPSADFASNKPFV
QPDNKPFFVQSDDLFFQPDLPFVQPDMPFVPMNSAVPIGAPCMNLYSDQGSNSFGCSDLGWDCDTKTPDPTT
SVAPISTIVEGFEYAVVKGNTQDSVVPVPMETNTVDHTNVLETPVDPTSGGLADLEPLLKFLLEEDAGESIDSF
LNLDESQDVNGLWSFDDLISDFY

❖ **Bradi1g46690.3**

>gi|357124945|ref|XP_003564157.1| PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like isoform
X1 [*Brachypodium distachyon*]

MCGGAILSDIIPPPRRVTDGHLWPAEKKRGKGVGGRRPRRVPEEEFEFEAGFEGFEEELGEVEVGFGEDEIK
PSLASRNGSAGDGLNATSAGADGRASGSSKRKRKNQFRGIRRRPWGKWAEEIRDPRKGVVWLGTYNSAEEAAR
AYDAEARRIRGKAKVNFPEEAPVTSQRHAEPFVKVSEFNTEEKPIVNTMGNTNAHSYPVVDYSLHEPFLQPQ
NMSFMPVMNAVEAPFMNLSQGSNSFSCSDFSWENDIKTPDITSVLASIPTSTEVEDESAFLQNNANNAALPPV
MGNANVDIADLEPYMKFLMDSGSDSIDSMSCDGS PDAVDLWTFDDMPMSAGFY

❖ **Bradi4g31040.1**

>gi|357158546|ref|XP_003578162.1|PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 1-like
[*Brachypodium distachyon*]

MCGGAILSGFI PPSAAAAAAAAAKKKKQQQQRVMADALWPGLQRKAPQAEVEDFEADFRREFERDSSEEDAGGDDD
DVVEVVP PPPAKAGFAFAVAEGALPPTVDAVTI PKSV EHDGSGTGPKVRNRKNQYRGIRQRPWGKWAEEIRD
SKGVVWLGTYNTAEAAARAYDAEARKIRGKAKVNFPEEPTSWKSTVKTIAQKSIQKATATNSAKLTTTPNT
CDDESFSHLSNADNDFAMFAFDDKKVPAKPDESGDFLTQAKPLVPTETFGMNMLSQSSNSFGSTDFGWDDDEA
MTPDYTSVFPDAPYSKVAYLEGGAPKRMRI NFGVDLSPQGNDAPNLAQDISVFDPEMKYLPLPYVGSSSDRSM
DNLVVNDVMQDGASNVDVWGLDELLEMAAGAY

❖ **Bradi1g17960.1**

>gi|357116073|ref|XP_003559809.1|PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like
[*Brachypodium distachyon*]

MCGGAIIPDCIPEHDDHRTADFWPLASDAGHELYPAGLSLTGACKFPHYQEPAEPSRRREGSNNKRERKTAYRG
IRRRPWGKWAEEIRDPGKGARVWLGTFADAEAAARAYDRAARRIRGAKAKVNF PNEDPPPGDEVVHRGTAMAP
LPWYYDDGDGVSGLCRHPYDVAGNDVVTADGEPAAAAAYVHHQMPPQHQQQQEAGLELWSFDDNINMAVSM

❖ **Bradi1g72450.1**

>gi|721630480|ref|XP_003561984.2|PREDICTED: uncharacterized protein LOC100826410 [*Brachypodium
distachyon*]

MCGGAILAELIPTAPARRVTAGHLWPGKGGKNQQQKRRSGADDFEAAFREFDEDESEEEERQEQVEVVMAEVEE
EVAESKPFANASSKKASSGGRPGRRGGSGRKPAQYRGVRRRPWGKAAEIRDPVKGVRVWLGTFFPSAEAAAALA
YDDAALGIRGPRAKLNFPSSSSSSAAAANAGLGTRKRGRAADPVAKATPVVDLVHEDAAAVDAHRSSGMKHEAAE
SSESSGSALPDFSWQMSASALPEIEQQLGCGGAAKRPRAAEDTDEASADSDALFDGLYFAQDPFAFFDGGAY
ESLDCLFSGDAVQSNANAAADETVGLWSFDDDCLVDESSLSFKSTQPT

❖ **Bradi1g72457.1**

MCGGAILAELTPPPARGGGASKPVGAKQVWPVSSKKEGGTNKTRHGSVVDDEAAAFEGFHDDFPVLFASKPAF
SPVHGDSGRAREAQAAASCRKKKRVRLHGIQRPWGKAAEIRDPHGKARVWLGTYDTADEAARAYDVAARRL
RGSNAKLNFPAPGRARPRCGTAPKPRRPTTAQTACFSAITAAAAARAQEIEQELMPMPYFDVDAFLDLAASVA
ELPPVIIGSSFADSAGGAATRGFADLEFDPFMLCELPWSESDTCEIEGLFAGDAVQDAGGVNTGMDSVSLWS
FDEFPMDAAAF

❖ **Bradi2g11890.1**

>gi|357131966|ref|XP_003567604.1| PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF071-like
[*Brachypodium distachyon*]

MCGGAI IYDYI PAPRRVSAADFWDADDSDAHSTAPHKARRAKREKRNQYRGIRQRPWGKAAEIRDPVKGVRV
WLGTYP TAEAAAARAYDRAARRIRGAKAKVNFNEELLLASSPATAAAAAPPVLSFFKKEEDA EFGSVACSGEA
KELSEELMAYENYMSFLGVPYMQGGDTAAPAAEEAPAPAPAALWSFEDY

❖ **Bradi2g27920.1**

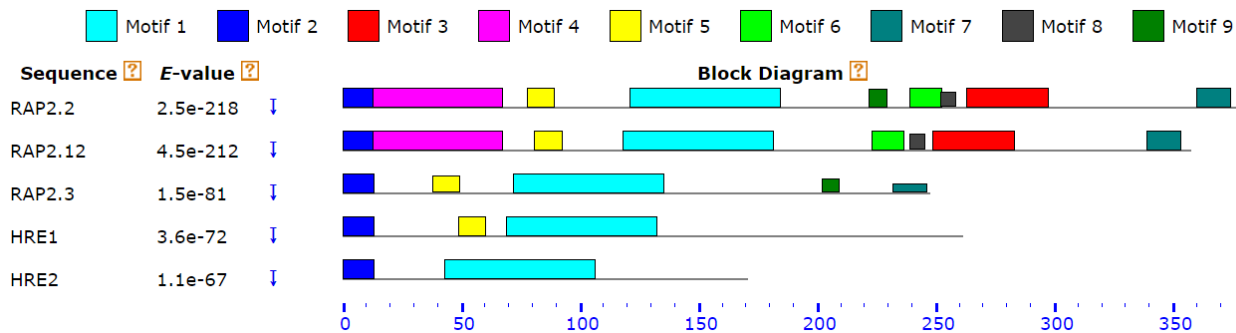
>gi|357134027|ref|XP_003568621.1| PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor RAP2-3-like
[*Brachypodium distachyon*]

MCGGAVIAGFVPEGSSSSSLTGEELTTEKPPAPGRKTAYRGIRRRPWGRWAAEIRDPRKGT RVWLGT YATAEEA
ALAYDVAARDIRGAKAKLNFP PAVDHA AVEEAKKRRTKAAAVESSCSSSPLPATSTGGGGGAERLRECMGLE
AFLELENPAGVGEDVDLMFE

Apéndice C: Resultados del análisis de dominios conservados con MEME 4.10.2

Arabidopsis/ modo normal/ cero o una ocurrencia por secuencia

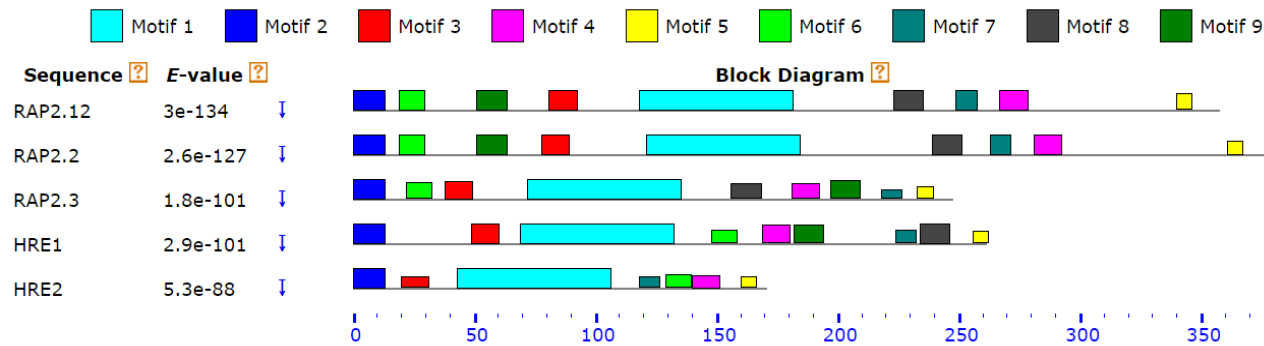
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	RKRKNQYRGIRQRPWGWAAEIRDPRKGVVRVWLGTFNTA EEAARAYDVAAKRIRGTKAKLNFP	-	0.25	0.20	0.19	0.31	0.32	0.26	0.39	0.43
2	MCGGAIISDYIPP	0.25	-	0.30	0.42	0.2	0.2	0.12	0.29	0.27
3	GCNGYQYFSSDQGSNSFDCSEFGWSDHGPIPEI	0.2	0.3	-	0.22	0.34	0.24	0.34	0.64	0.36
4	PRSRRTNEFIWPDLLKKLKGSKKRSKKRSDFFDFDDEFEA DFQGFKDDSAFDC	0.19	0.42	0.22	-	0.32	0.32	0.32	0.47	0.59
5	PFVFTSTHKPH	0.31	0.2	0.34	0.32	-	0.27	0.31	0.42	0.27
6	MCFMEEKHQMYNN	0.32	0.20	0.24	0.32	0.27	-	0.3	0.42	0.50
7	NPMELWSIDEIHF	0.26	0.12	0.34	0.32	0.31	0.32	-	0.29	0.27
8	QFGMTN	0.39	0.29	0.64	0.47	0.47	0.42	0.29	-	0.32
9	HLKQQYC	0.43	0.27	0.36	0.59	0.27	0.50	0.27	0.32	-



Ubicación de dominios para las secuencias de *Arabidopsis* resultado del análisis normal con cero o una ocurrencia por secuencia.

Arabidopsis/ modo normal/ una ocurrencia por secuencia

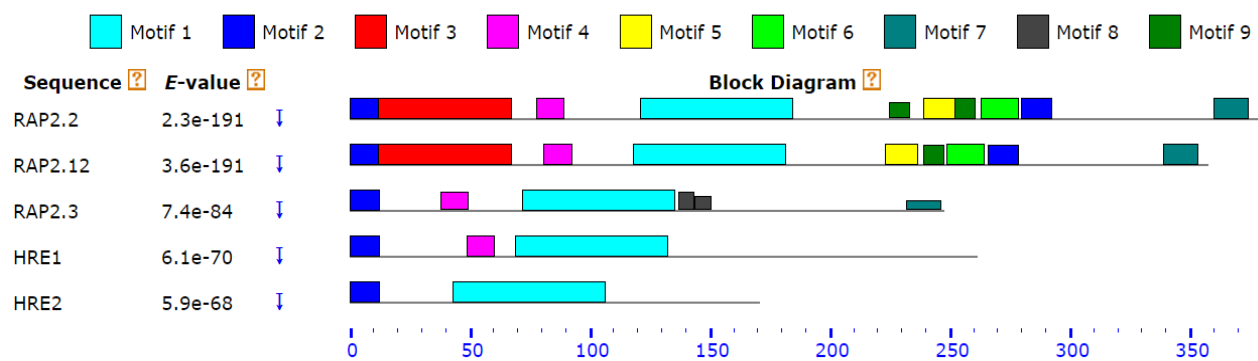
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	RKRKNQYRGIRQRPWGKWAAEIRDPRKGVRVWLGFNTA EEAARAYDVAAKRIRGTKAKLNFP	-	0.25	0.31	0.29	0.43	0.33	0.34	0.26	0.33
2	MCGGAIISDYIPP	0.25	-	0.19	0.38	0.28	0.36	0.33	0.33	0.37
3	PFVFTSTHKHH	0.31	0.19	-	0.18	0.34	0.19	0.20	0.25	0.15
4	CIDFGWSDQIP	0.29	0.38	0.18	-	0.24	0.41	0.26	0.24	0.40
5	PMDLWS	0.43	0.28	0.34	0.24	-	0.38	0.21	0.27	0.30
6	TVEFIWPDLM	0.33	0.36	0.19	0.41	0.38	-	0.27	0.26	0.29
7	GCNQYQYF	0.34	0.33	0.20	0.26	0.21	0.27	-	0.27	0.40
8	MCFMEEKCQVSN	0.26	0.33	0.25	0.24	0.27	0.26	0.27	-	0.40
9	FEADYQWFQDIS	0.33	0.37	0.15	0.40	0.30	0.29	0.40	0.40	-



Ubicación de dominios para las secuencias de *Arabidopsis* resultado del análisis normal con una ocurrencia por secuencia.

Arabidopsis/ modo normal/ cualquier número de repeticiones

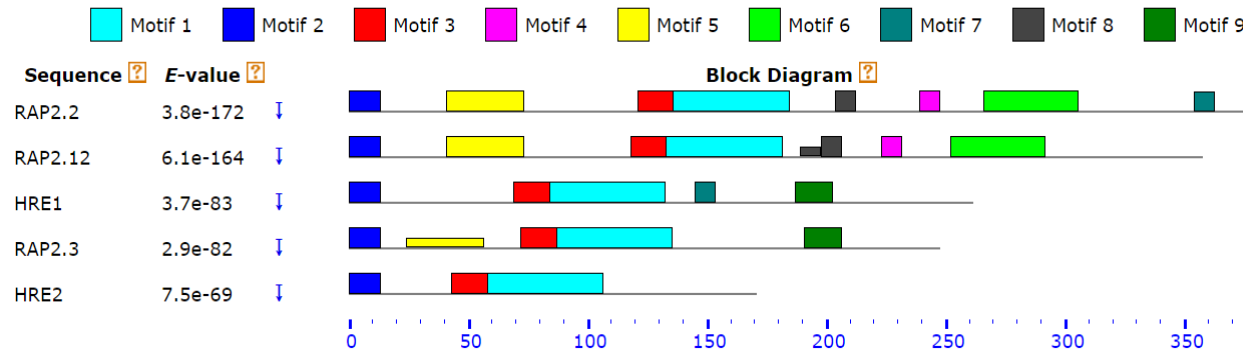
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	RKRKNQYRGIRQRPWGKAAEIRDPRKGVVWLGTFN EEAARAYDVAAKRIRGTKAKLNF	-	0.26	0.19	0.31	0.32	0.23	0.26	0.26	0.35
2	MCGGAIISDYIP	0.26	-	0.38	0.20	0.17	0.26	0.15	0.28	0.33
3	PPRSRRVTNEFIWPDLLKKLKGSKKRSKRSDFDFDDEFE ADFQGFKDDSAFDC	0.19	0.38	-	0.32	0.32	0.28	0.32	0.44	0.45
4	PFVFTSTHKPH	0.31	0.20	0.32	-	0.27	0.34	0.31	0.38	0.38
5	MCFMEEKHQMYNN	0.32	0.17	0.32	0.27	-	0.21	0.30	0.21	0.34
6	GCNGYQYFSSDQGSN	0.23	0.26	0.28	0.34	0.21	-	0.34	0.30	0.35
7	NPMELWSIDEIHFM	0.26	0.15	0.32	0.31	0.30	0.34	-	0.22	0.26
8	HHPPPP	0.26	0.28	0.44	0.38	0.21	0.30	0.22	-	0.23
9	QFGCTNSF	0.35	0.33	0.45	0.38	0.34	0.35	0.26	0.23	-



Ubicación de dominios para las secuencias de *Arabidopsis* resultado del análisis normal con cualquier número de repeticiones.

Arabidopsis /discriminación / cero o una ocurrencia por secuencia

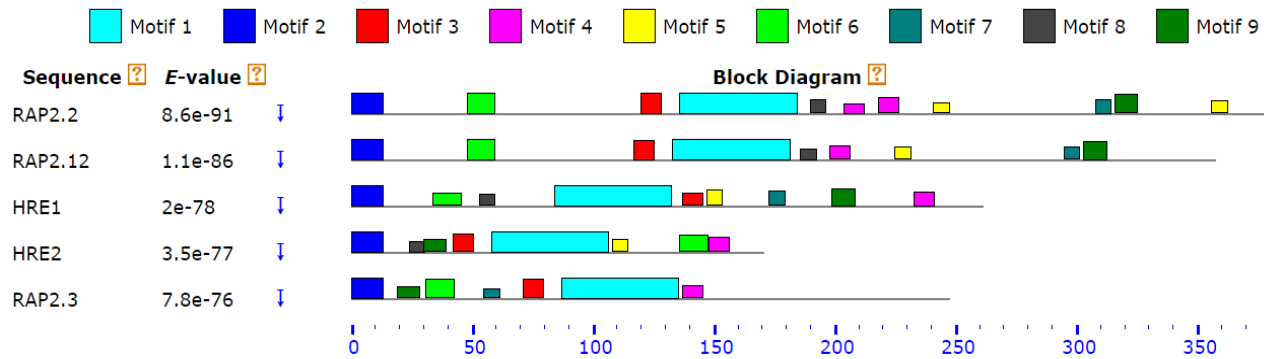
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	GKWAAEIRDPRKGVRVWLGTFNTAEEAARAYDVAAKRIR GTKAKLNFP	-	0.25	0.28	0.29	0.16	0.22	0.36	0.46	0.25
2	MCGGAIISDYIPP	0.25	-	0.14	0.19	0.21	0.30	0.14	0.18	0.24
3	RKRKNQYRGIRQRPW	0.28	0.14	-	0.26	0.19	0.17	0.24	0.33	0.17
4	MCFMEEKH	0.29	0.19	0.26	-	0.32	0.32	0.48	0.25	0.35
5	RSDFDFDDEFEADFQGFKDDSAFDCEDDDDDV	0.16	0.21	0.19	0.32	-	0.22	0.34	0.19	0.31
6	GYQYFSSDQGSNSFDCSEFGWSDHGPITPEISSMLINN	0.22	0.30	0.17	0.32	0.22	-	0.33	0.33	0.20
7	VQQEEENH	0.36	0.14	0.24	0.48	0.34	0.33	-	0.21	0.26
8	QKPVAKPN	0.46	0.18	0.33	0.25	0.19	0.33	0.21	-	0.26
9	QWLEDIFMGDYDKKH	0.25	0.24	0.17	0.35	0.31	0.20	0.26	0.26	-



Ubicación de dominios para las secuencias de *Arabidopsis* resultado del análisis con discriminación con cero o una ocurrencia por secuencia.

Arabidopsis /discriminación / una ocurrencia por secuencia

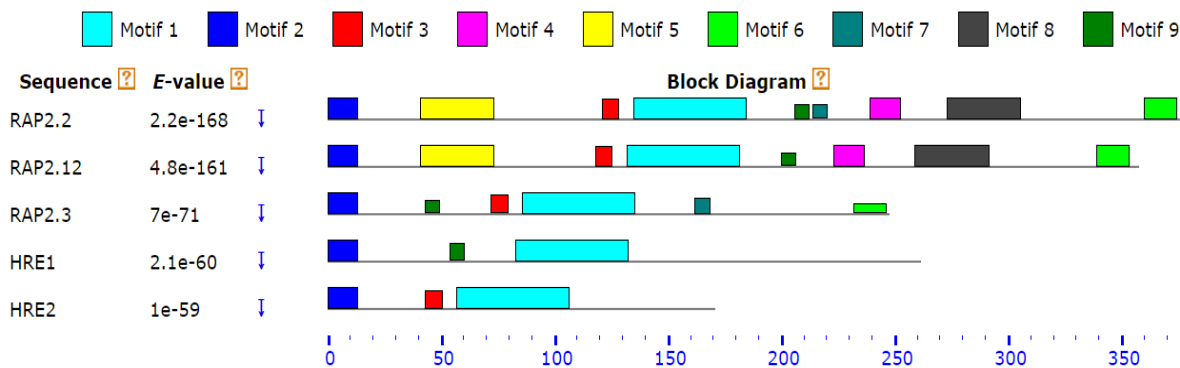
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	GKWAAEIRDPRKGVVWLGTFNTAEEAARAYDVAAKRIR GTKAKLNFP	-	0.25	0.43	0.28	0.40	0.25	0.45	0.45	0.30
2	MCGGAIISDYIPP	0.25	-	0.11	0.19	0.21	0.17	0.31	0.26	0.10
3	KRKRKNQY	0.43	0.11	-	0.24	0.21	0.17	0.15	0.43	0.35
4	QHPVHENQ	0.28	0.19	0.21	-	0.35	0.28	0.37	0.28	0.43
5	QVEENH	0.40	0.21	0.21	0.35	-	0.39	0.54	0.27	0.37
6	DYDFEADFGF	0.25	0.17	0.17	0.28	0.39	-	0.27	0.19	0.21
7	LIEENN	0.45	0.31	0.15	0.37	0.54	0.27	-	0.24	0.27
8	VTSQKH	0.45	0.26	0.43	0.28	0.27	0.19	0.24	-	0.32
9	KKLKPMLE	0.30	0.10	0.35	0.43	0.36	0.21	0.27	0.32	-



Ubicación de dominios para las secuencias de *Arabidopsis* resultado del análisis con discriminación con una ocurrencia por secuencia.

Arabidopsis /discriminación / cualquier número de repeticiones

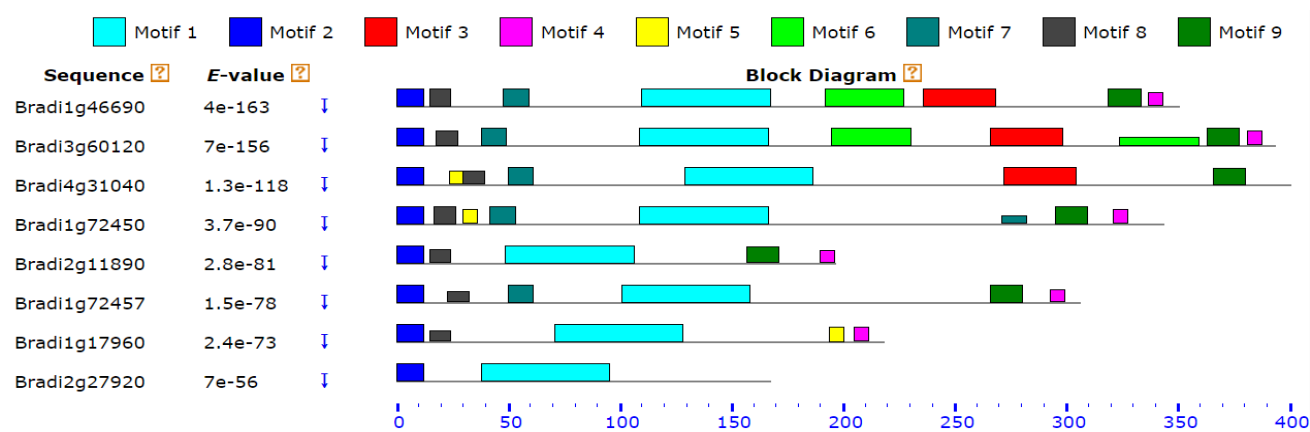
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	WGKWAAEIRDPRKGVVWLGTENTAEAAARAYDVAAKRI RGTAKALNFP	-	0.25	0.42	0.32	0.16	0.23	0.39	0.27	0.54
2	MCGGAIISDYIPP	0.25	-	0.12	0.20	0.21	0.12	0.47	0.30	0.21
3	RKRKNQY	0.42	0.12	-	0.40	0.38	0.22	0.15	0.31	0.29
4	MCFMEEKHQMYNN	0.32	0.20	0.40	-	0.23	0.30	0.53	0.31	0.37
5	RSDFDFDDEFEADFQGFKDDSAFDCEDDDDDV	0.16	0.21	0.38	0.23	-	0.32	0.27	0.22	0.30
6	NPMELWSIDEIHFM	0.23	0.12	0.22	0.30	0.32	-	0.35	0.25	0.46
7	VCLVQQ	0.39	0.47	0.15	0.53	0.27	0.35	-	0.51	0.35
8	DQGSNSFDCSEFGWSDHGPITPEISSMLINNN	0.27	0.30	0.31	0.31	0.22	0.25	0.51	-	0.45
9	STHKPH	0.54	0.21	0.29	0.37	0.30	0.46	0.35	0.45	-



Ubicación de dominios para las secuencias de *Arabidopsis* resultado del análisis con discriminación con cualquier número de repeticiones.

Brachypodium /modo normal / cero o una ocurrencia por secuencia

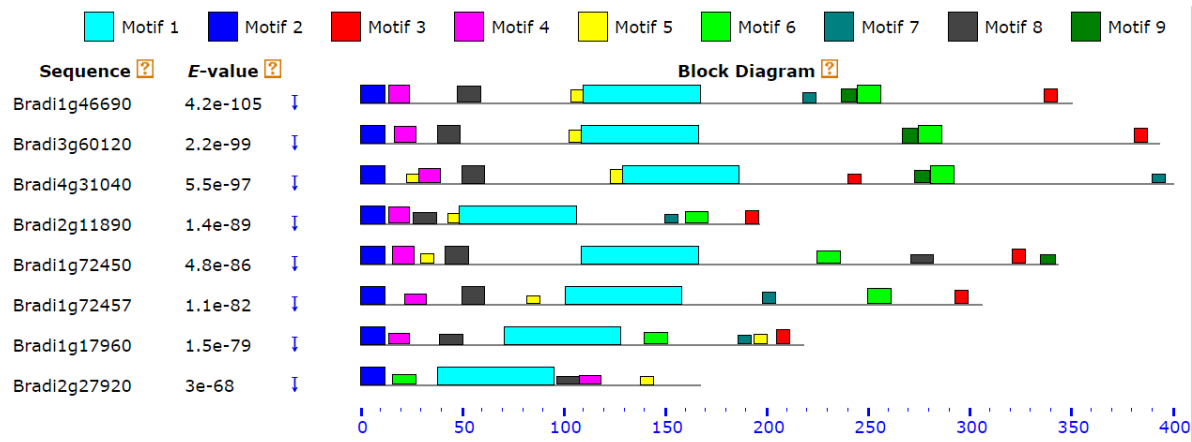
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	YRGIRQRPWGKWAAEIRDPHKGVRVWLGTYNTAEEAARA YDVEARRIRGKKAKVNF	-	0.25	0.19	0.53	0.39	0.20	0.38	0.35	0.23
2	MCGGAILYDLIP	0.25	-	0.32	0.17	0.11	0.31	0.19	0.33	0.29
3	CMNLYSDQGSNSFGCSDFGWDCDIKTPDITSV	0.19	0.32	-	0.47	0.33	0.43	0.31	0.27	0.32
4	LWSFDD	0.53	0.17	0.47	-	0.09	0.39	0.32	0.33	0.50
5	KHQQQQ	0.39	0.11	0.33	0.09	-	0.39	0.22	0.34	0.27
6	KPIVNNMGNTNAHSYPVVDYSLHKPFLQPQNMPFM	0.20	0.31	0.43	0.39	0.39	-	0.20	0.40	0.38
7	DDFEADFRGFE	0.38	0.19	0.31	0.32	0.22	0.20	-	0.14	0.28
8	RVTTGHLWP	0.35	0.33	0.27	0.33	0.34	0.40	0.14	-	0.23
9	YESIDSLSCDYMQ	0.23	0.29	0.32	0.50	0.27	0.38	0.28	0.23	-



Ubicación de dominios para *Brachypodium* análisis normal con cero o una ocurrencia por secuencia.

Brachypodium /modo normal / una ocurrencia por secuencia

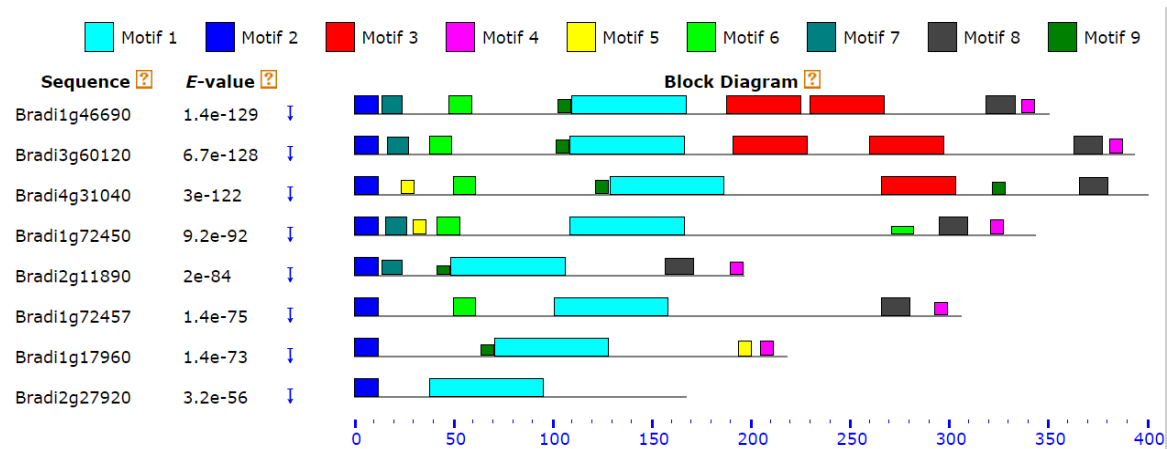
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	YRGIRQRPWGWAAEIRDPHKGVVRVWLGTYNIAEEA ARAYDVEARRIRGKKAKVNF	-	0.25	0.50	0.31	0.46	0.28	0.28	0.34	0.3
2	MCGGAILYDLIP	0.25	-	0.17	0.29	0.07	0.33	0.36	0.26	0.23
3	LWSFDD	0.50	0.17	-	0.36	0.06	0.28	0.24	0.31	0.28
4	RRVTAGHLWP	0.31	0.29	0.36	-	0.54	0.18	0.47	0.19	0.36
5	RHRQNQ	0.46	0.07	0.06	0.54	-	0.10	0.37	0.28	0.29
6	HNSFMCCDLMW	0.28	0.33	0.28	0.18	0.10	-	0.3	0.19	0.39
7	IQQLM	0.28	0.36	0.24	0.47	0.37	0.30	-	0.28	0.34
8	DDFEAHFEHFH	0.34	0.26	0.31	0.19	0.28	0.19	0.28	-	0.26
9	MNLTSHQ	0.30	0.23	0.28	0.36	0.29	0.39	0.34	0.26	-



Ubicación de dominios para *Brachypodium* análisis normal con una ocurrencia por secuencia

Brachypodium /modo normal / cualquier número de repeticiones

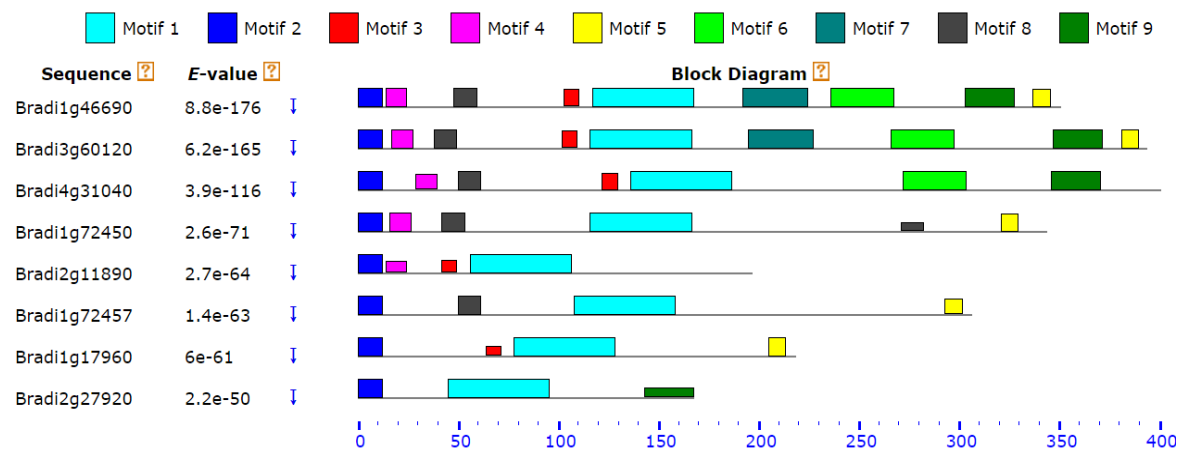
CMV	Secuencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	YRGIRQRPWGKWA AEIRDPHKGVRVWLGTYN TAE EAAR AYDVEARRIRGKKAKV NFP	-	0.25	0.19	0.53	0.39	0.38	0.30	0.23	0.49
2	MCGGAILYDLIP	0.25	-	0.33	0.17	0.11	0.19	0.31	0.29	0.09
3	NPIEKPCM NLLSDQNSNS YPCSDFGWDCDFMTPDNTS	0.19	0.33	-	0.48	0.36	0.27	0.26	0.35	0.27
4	LWSFDD	0.53	0.17	0.48	-	0.09	0.32	0.35	0.5	0.06
5	KHQQQQ	0.39	0.11	0.36	0.09	-	0.22	0.26	0.27	0.47
6	DDFEADFRGFE	0.38	0.19	0.27	0.32	0.22	-	0.11	0.28	0.09
7	RRVTEGHLWP	0.30	0.31	0.26	0.35	0.26	0.11	-	0.22	0.32
8	YESIDSL LSCDYMQ	0.23	0.29	0.35	0.50	0.27	0.28	0.22	-	0.18
9	KRKRKN	0.49	0.09	0.27	0.06	0.47	0.09	0.32	0.18	-



Ubicación de dominios para *Brachypodium* análisis normal con cualquier número de repeticiones.

Brachypodium / discriminación /cero o una ocurrencia por secuencia

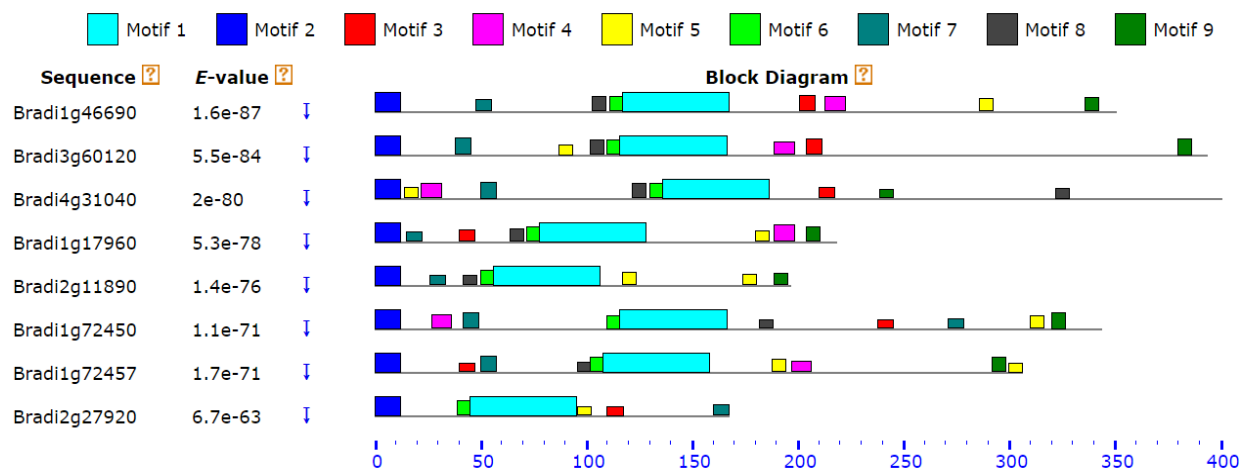
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	PWGKWAAEIRDPHKGVVRVWLGTYN TAE E A A R A Y D V E A R RIRGKKAKV N F P	-	0.25	0.44	0.28	0.35	0.20	0.20	0.38	0.21
2	MCGGAILYDLIP	0.25	-	0.07	0.35	0.23	0.32	0.30	0.19	0.33
3	KRKRKNQ	0.44	0.07	-	0.35	0.08	0.28	0.29	0.10	0.21
4	RRVTEGHLWP	0.29	0.35	0.35	-	0.26	0.19	0.32	0.10	0.27
5	LWSFDDMI	0.35	0.23	0.08	0.26	-	0.45	0.30	0.28	0.35
6	CMNLYSDQGSNSFGCSDFGWDCDIKTPDITS	0.20	0.32	0.28	0.19	0.45	-	0.41	0.31	0.27
7	KPIVNNMGNTNAHSYPVVDYSLHKPFLQPQNM	0.20	0.30	0.29	0.32	0.30	0.41	-	0.20	0.25
8	DDFEADFRGFE	0.38	0.19	0.10	0.10	0.28	0.31	0.20	-	0.28
9	IADLEPYMKFLMDPYVGESIDSFL	0.21	0.33	0.21	0.27	0.35	0.27	0.25	0.28	-



Ubicación de dominios para *Brachypodium* análisis con discriminación con cero o una ocurrencia por secuencia.

Brachypodium / discriminación / una ocurrencia por secuencia

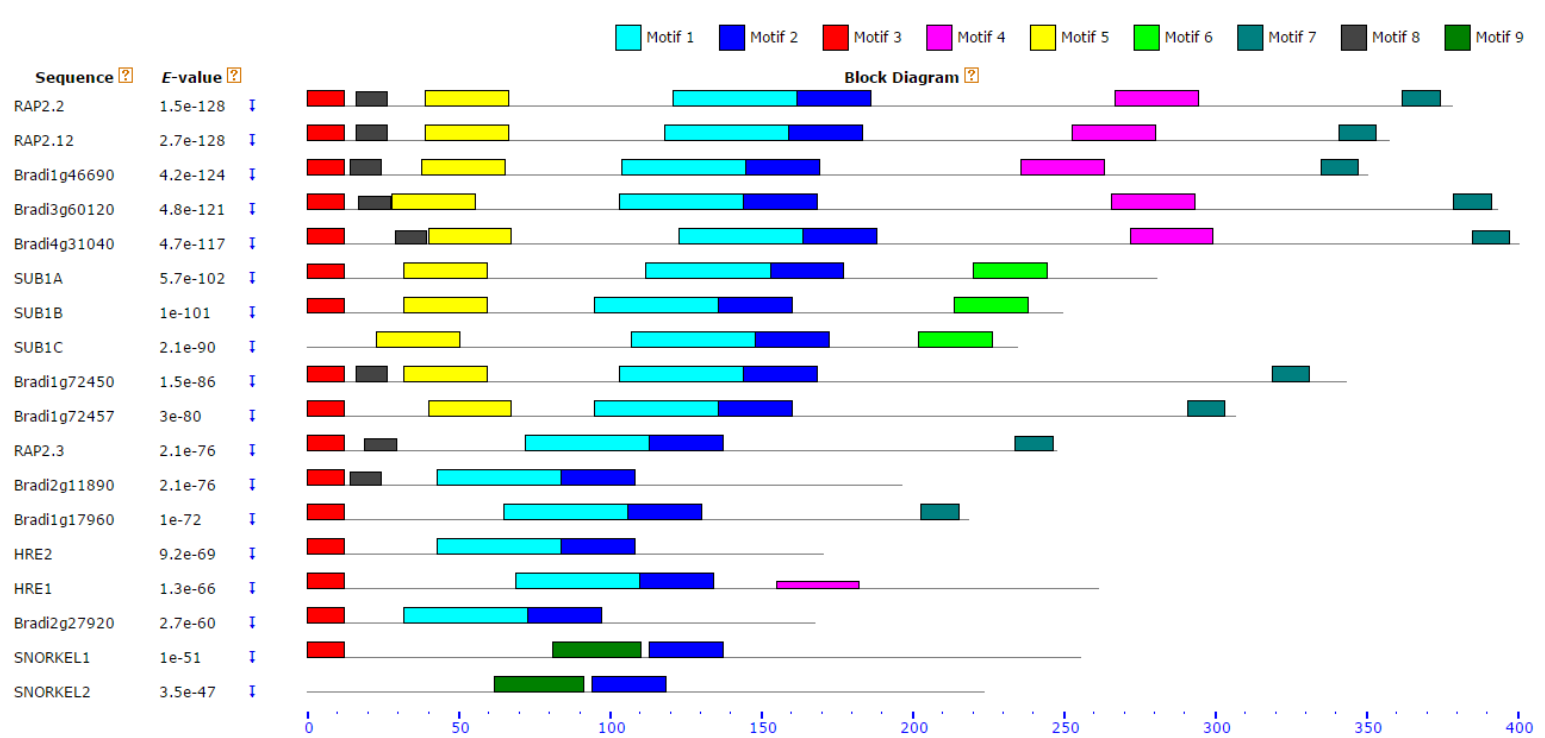
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	PWGKWAAEIRDPHKGVVRVWLGTYN TAEAA RAYDVEAR RIRGKKAKV NFP	-	0.25	0.40	0.25	0.72	0.57	0.34	0.52	0.48
2	MCGGAILYDLIP	0.25	-	0.37	0.17	0.30	0.22	0.26	0.11	0.29
3	TNACKYP	0.40	0.37	-	0.19	0.48	0.24	0.20	0.24	0.27
4	HQKPNQQQQ	0.25	0.17	0.19	-	0.26	0.34	0.18	0.41	0.07
5	TANHAA	0.72	0.30	0.48	0.26	-	0.10	0.26	0.15	0.21
6	RGIRQR	0.57	0.22	0.24	0.34	0.10	-	0.10	0.41	0.20
7	DDFEAHF	0.34	0.26	0.20	0.18	0.26	0.10	-	0.22	0.24
8	KRKRKN	0.52	0.11	0.24	0.41	0.15	0.41	0.22	-	0.15
9	GLWSFD	0.48	0.29	0.27	0.07	0.21	0.20	0.24	0.15	-



Ubicación de dominios para *Brachypodium* análisis con discriminación con una ocurrencia por secuencia.

Secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium*/modo normal/ cero o una ocurrencia por secuencia

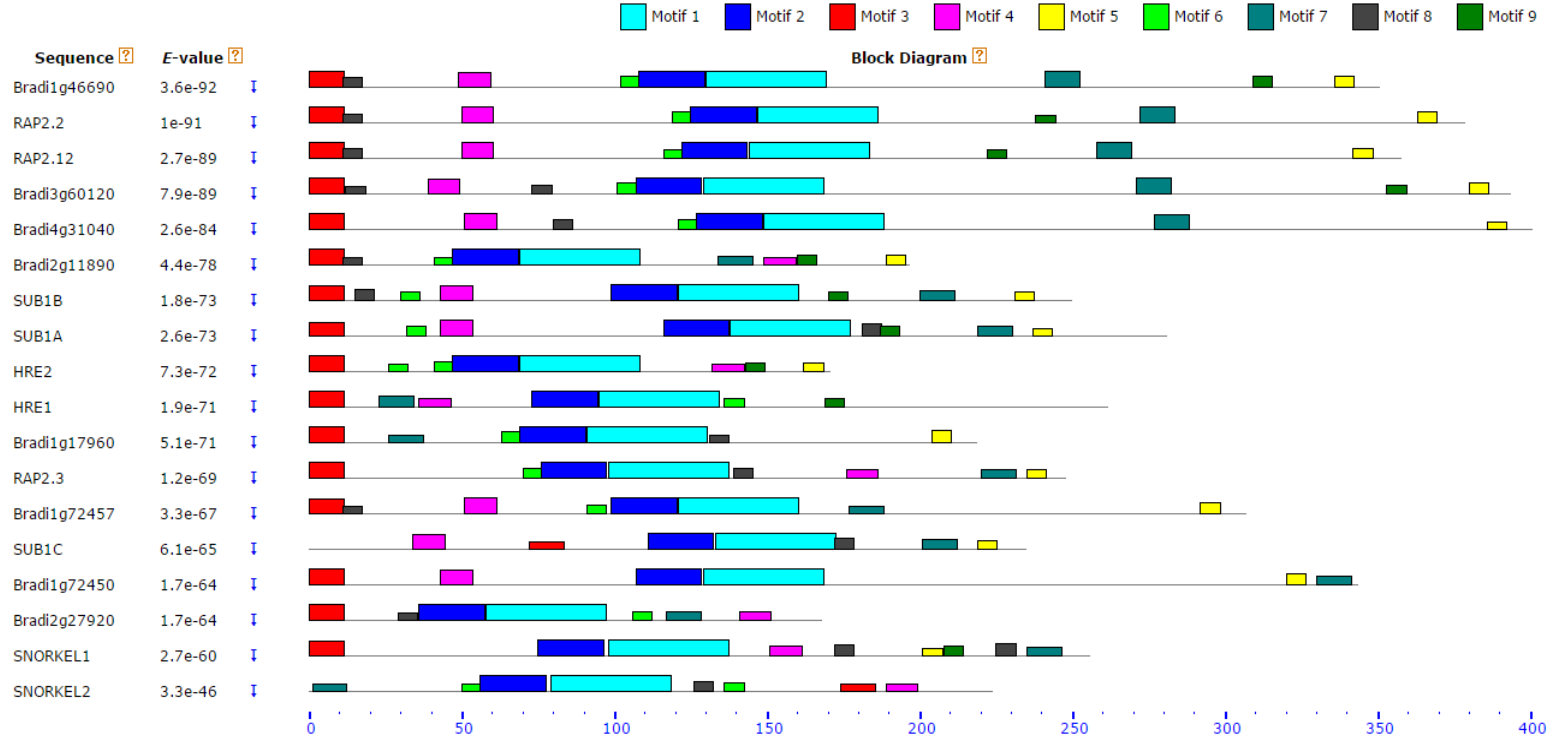
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	RKRKNQYRGIRQRPWGKWAAEIRDPVKGVRVWLGTFTA EE	-	0.18	0.17	0.12	0.17	0.22	0.30	0.30	0.39
2	AARAYDAEARRIHGHKAKVNFNE	0.18	-	0.22	0.15	0.15	0.12	0.15	0.30	0.23
3	MCGGAIISDYIP	0.17	0.22	-	0.19	0.19	0.31	0.19	0.33	0.24
4	YMYLSSDQGSNSFGCSDFGWDDHAPT	0.12	0.15	0.19	-	0.15	0.21	0.29	0.22	0.23
5	KKKKCHQGEDEDFEADFQEFHDDDDDD	0.17	0.15	0.19	0.15	-	0.21	0.26	0.31	0.17
6	GDERILLECCSDDVMSLLAGFDV	0.17	0.12	0.31	0.21	0.21	-	0.34	0.30	0.32
7	VDLWSFDDIIMM	0.22	0.15	0.19	0.29	0.26	0.34	-	0.24	0.29
8	RRVTAEHLWP	0.30	0.30	0.33	0.22	0.31	0.30	0.24	-	0.29
9	HQRTYGRWSAEIRDNVIKGHRFWIGTYDT	0.39	0.23	0.24	0.23	0.17	0.32	0.29	0.29	-



Análisis con las secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium* modo normal con cero o una ocurrencia por secuencia.

Secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium*/modo normal/ una ocurrencia por secuencia

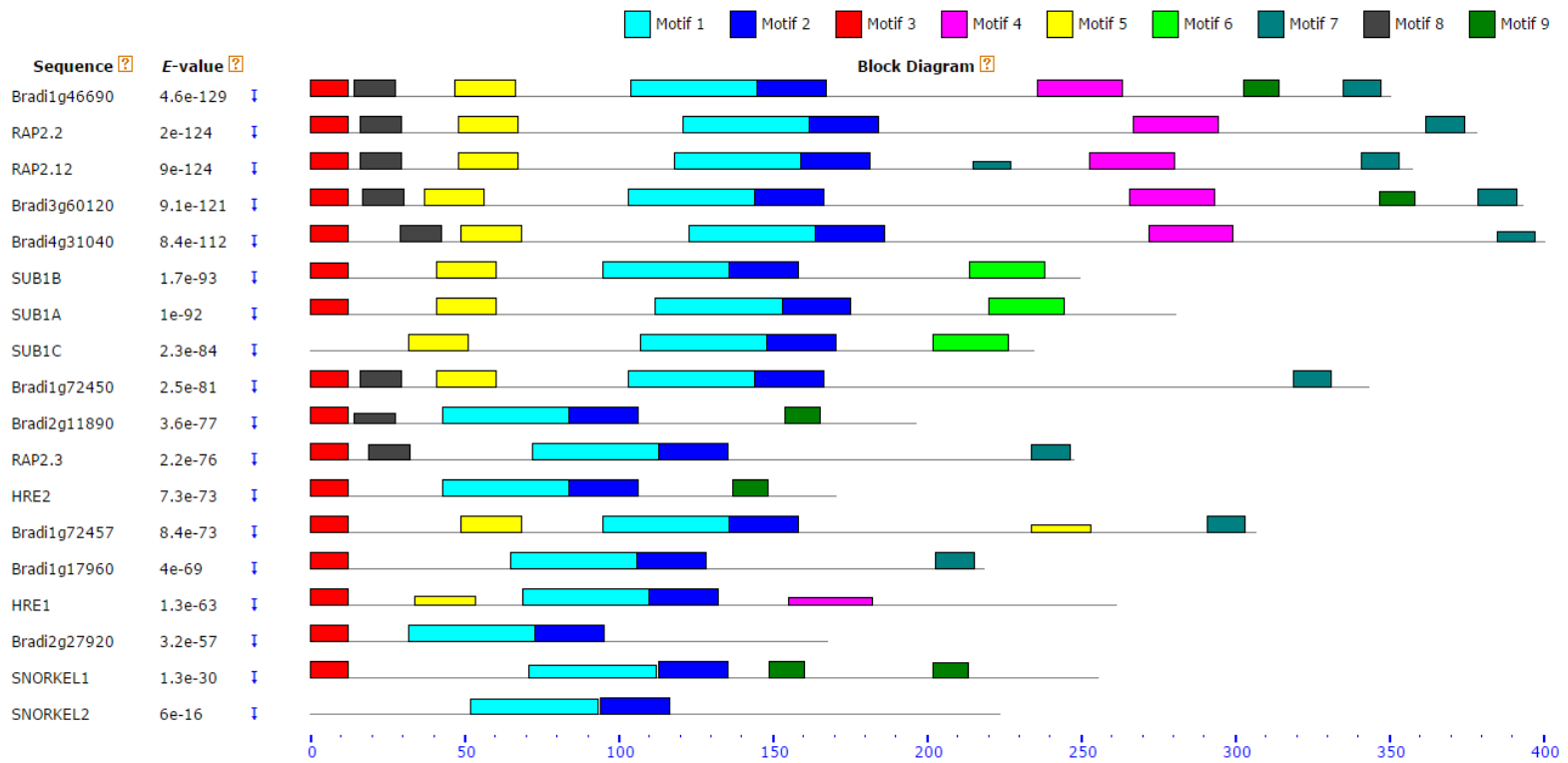
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	KGVRVWLGTYNIAEAAAYDAEARRIHGHKAKVNFNE	-	0.21	0.26	0.30	0.36	0.36	0.24	0.29	0.28
2	NQYRGIRQRPWGKWAAEIRD	0.21	-	0.17	0.28	0.40	0.45	0.17	0.21	0.16
3	MCGGAIISDYI	0.26	0.17	-	0.28	0.25	0.04	0.20	0.10	0.23
4	DFEAHFQEFH	0.30	0.28	0.28	-	0.37	0.16	0.26	0.22	0.30
5	CLWSFD	0.36	0.40	0.25	0.37	-	0.02	0.30	0.09	0.23
6	NKRKRK	0.36	0.45	0.04	0.16	0.02	-	0.22	0.28	0.03
7	SDQGSNQFDCS	0.24	0.17	0.20	0.26	0.30	0.22	-	0.19	0.14
8	PPPHQ	0.29	0.21	0.10	0.22	0.09	0.28	0.19	-	0.00
9	YMCFLH	0.28	0.16	0.23	0.30	0.23	0.03	0.14	0.00	-



Análisis con las secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium* modo normal con una ocurrencia por secuencia.

Secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium*/modo normal/ cualquier número de repeticiones

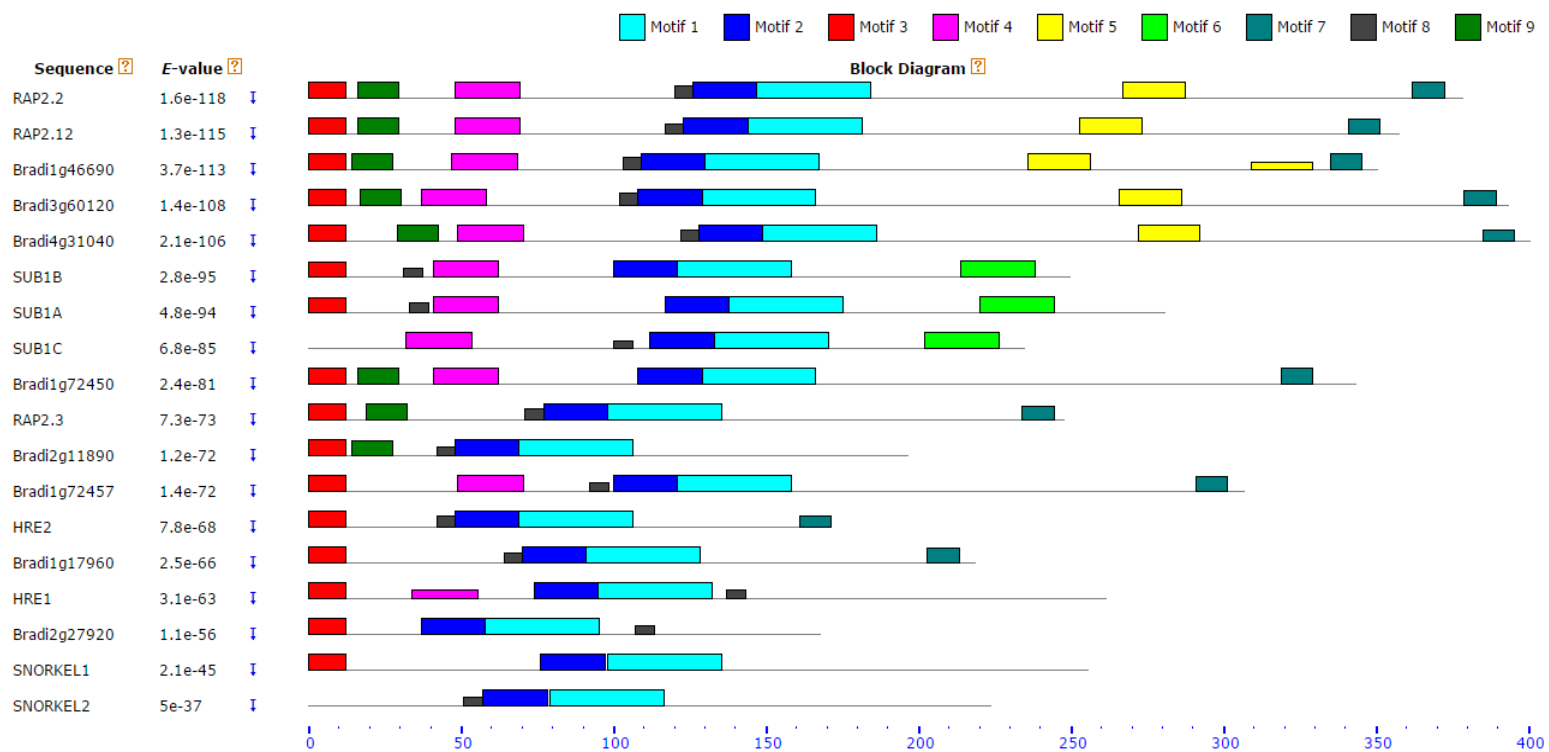
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	RKRKNQYRGIRQRPWGKWA AEIRDPVKGVRVWLGTFTA EE	-	0.18	0.17	0.12	0.16	0.17	0.23	0.34	0.27
2	AARAYDAEARRIHGHKAKV NFP	0.18	-	0.22	0.16	0.18	0.12	0.14	0.21	0.25
3	MCGGAIISDYIP	0.17	0.22	-	0.19	0.13	0.31	0.19	0.35	0.21
4	YMYLSSDQGSNSFGCSDFGWDDHAPT P	0.12	0.16	0.19	-	0.20	0.21	0.28	0.22	0.28
5	DEDFEADFQEFHDDDDDDDC	0.16	0.18	0.13	0.20	-	0.22	0.25	0.24	0.33
6	GDERILLECCSDDVMD SLLAGFDV	0.17	0.12	0.31	0.21	0.22	-	0.36	0.24	0.26
7	VDLWSFDDIIMM	0.23	0.14	0.19	0.28	0.25	0.36	-	0.20	0.38
8	RRVTNEHLWPELK	0.34	0.21	0.35	0.22	0.24	0.24	0.20	-	0.17
9	LMDLEPYMRFL	0.27	0.25	0.21	0.28	0.33	0.26	0.38	0.17	-



Análisis con las secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium* modo normal con cualquier número de repeticiones.

Secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium*/discriminación/ cero o una ocurrencia por secuencia

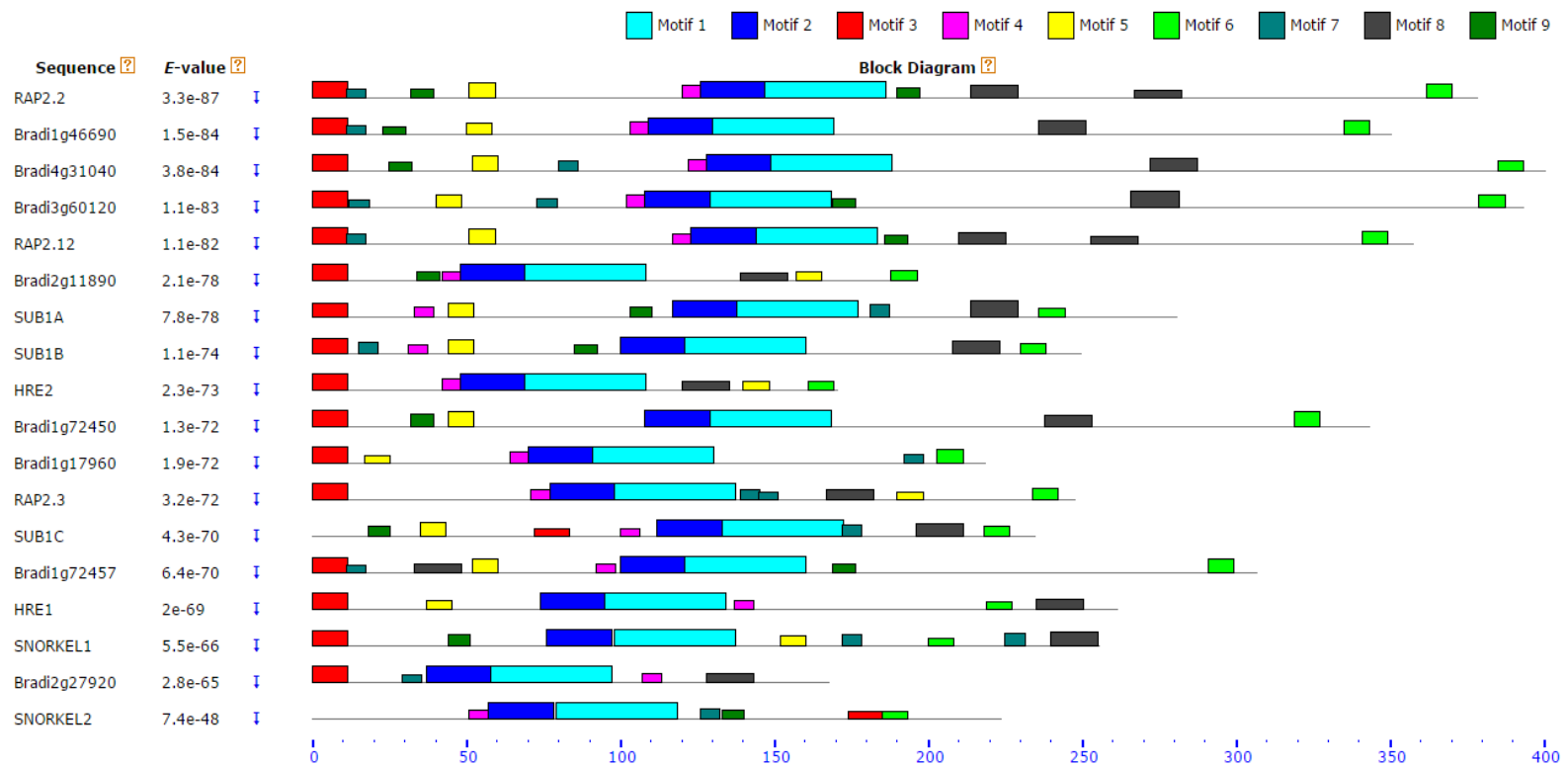
CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	KGVRVWLGTYN TAE E A R A Y D A E A R R I H G H K A K V N F P	-	0.18	0.22	0.18	0.19	0.25	0.31	0.41	0.24
2	Q Y R G I R Q R P W G K W A A E I R D P V	0.18	-	0.17	0.12	0.14	0.22	0.19	0.39	0.24
3	M C G G A I I S D Y I P	0.22	0.17	-	0.13	0.18	0.31	0.26	0.02	0.33
4	D E D F E A D F Q E F H D D D D D D C D G	0.18	0.12	0.13	-	0.21	0.20	0.32	0.21	0.28
5	Y M Y L S S D Q G S N S F G C S D F G W	0.19	0.14	0.18	0.21	-	0.23	0.33	0.18	0.23
6	G D E R I L L E C C S D D V M D S L L A G F D V	0.25	0.22	0.31	0.20	0.23	-	0.33	0.19	0.22
7	V D L W S F D D I I	0.31	0.19	0.26	0.32	0.33	0.33	-	0.06	0.24
8	K R K R K N	0.41	0.39	0.02	0.21	0.18	0.19	0.06	-	0.38
9	R R V T A E H L W P D L K	0.24	0.24	0.33	0.28	0.23	0.22	0.24	0.38	-



Análisis con las secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium* modo con discriminación con cero o una ocurrencia por secuencia.

Secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium*/discriminación/ ocurrencia por secuencia

CMV	Mejor coincidencia	Similitud								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	KGVRVWLGTYNTAEAAARAYDAEARRIHGHKAKVNFNE	-	0.21	0.26	0.42	0.32	0.33	0.31	0.16	0.30
2	QYRGIRQRPWGKWAAEIRDPV	0.21	-	0.17	0.37	0.28	0.26	0.19	0.19	0.37
3	MCGGAIISDYI	0.26	0.17	-	0.05	0.20	0.22	0.10	0.22	0.12
4	KRKRKN	0.42	0.37	0.05	-	0.09	0.06	0.25	0.23	0.46
5	FEAYFQEF	0.32	0.28	0.20	0.09	-	0.33	0.07	0.25	0.12
6	VDLWSFDD	0.33	0.26	0.22	0.06	0.33	-	0.13	0.27	0.07
7	PPPPSQ	0.31	0.19	0.10	0.25	0.07	0.13	-	0.33	0.44
8	CMNECSGQHSIQHMC	0.16	0.19	0.22	0.23	0.25	0.27	0.33	-	0.34
9	CHHQKRR	0.30	0.37	0.12	0.46	0.12	0.07	0.44	0.34	-



Análisis con las secuencias de arroz, *Arabidopsis* y *Brachypodium* modo con discriminación con una ocurrencia por secuencia.

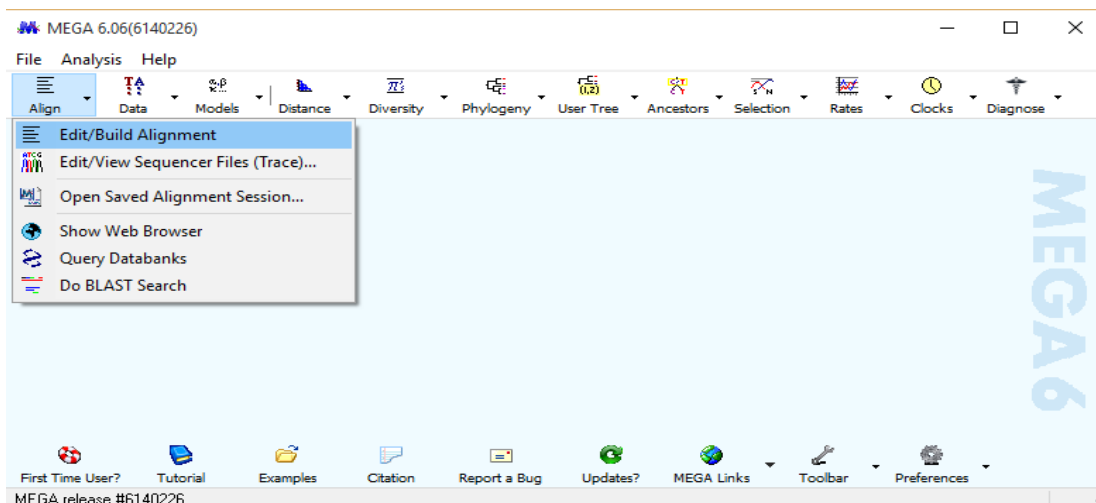
Apéndice D: Tutorial Mega 6

Para la generación del árbol filogenético usando el programa MEGA 6 se genera un archivo en un bloc de notas con las secuencias de aminoácidos de la siguiente manera:

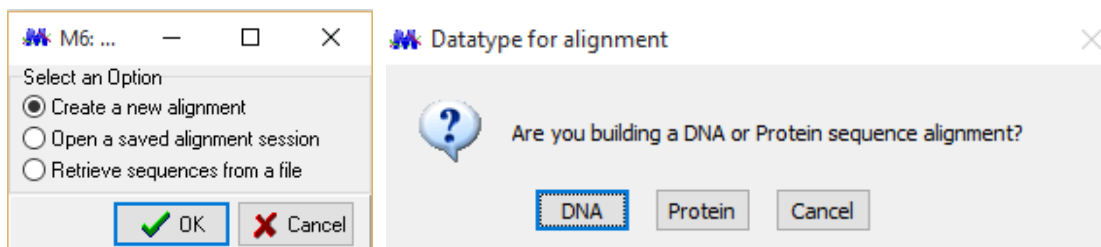
>Bradi1g72457.1

MCGGAILAELTPPPARGGGASKPVGAKGQVWPVSSKKEGGTNKTRHGSVVDDFEAAFE...

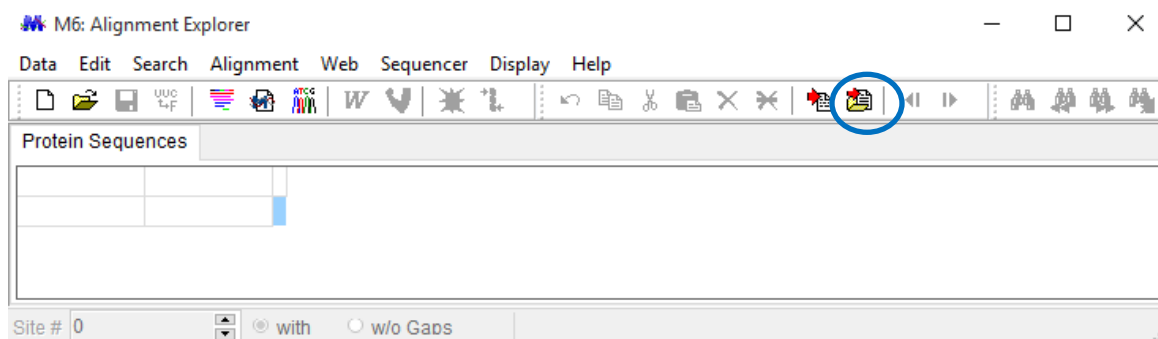
En el programa MEGA 6: *Align* → *Edit/Build Alignment*



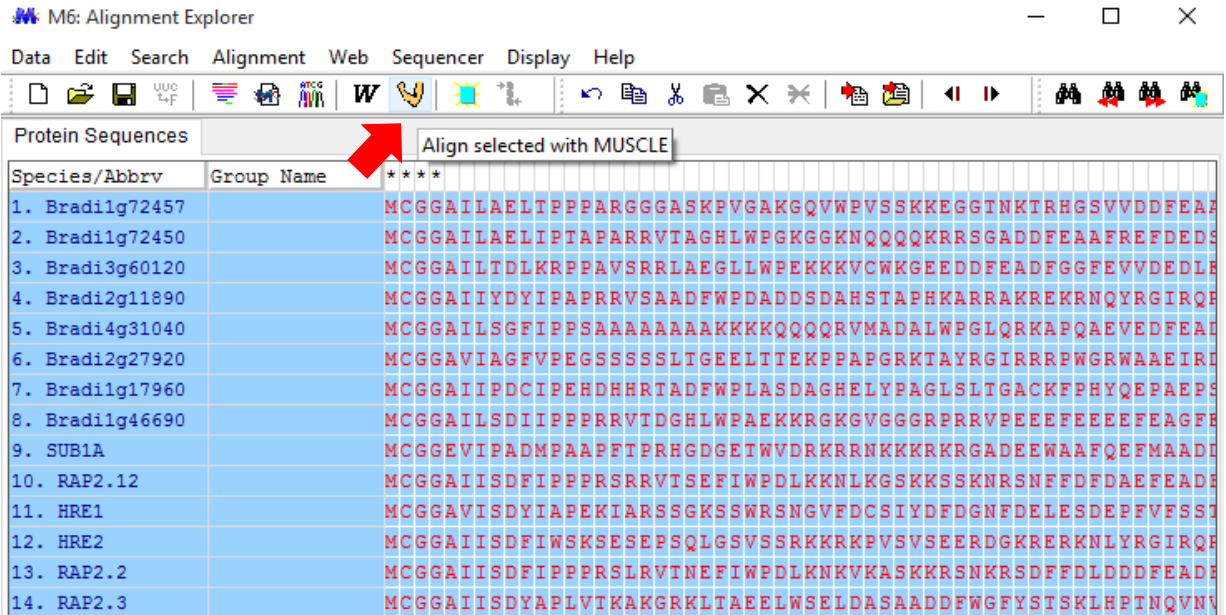
Aparecerá una ventana y seleccionamos *Create a new alignment* y luego *Protein*.



Aparecerá otra ventana seleccionamos *Insert sequences from MEGA/FASTA/text sequences file* (icono como se muestra en la imagen).

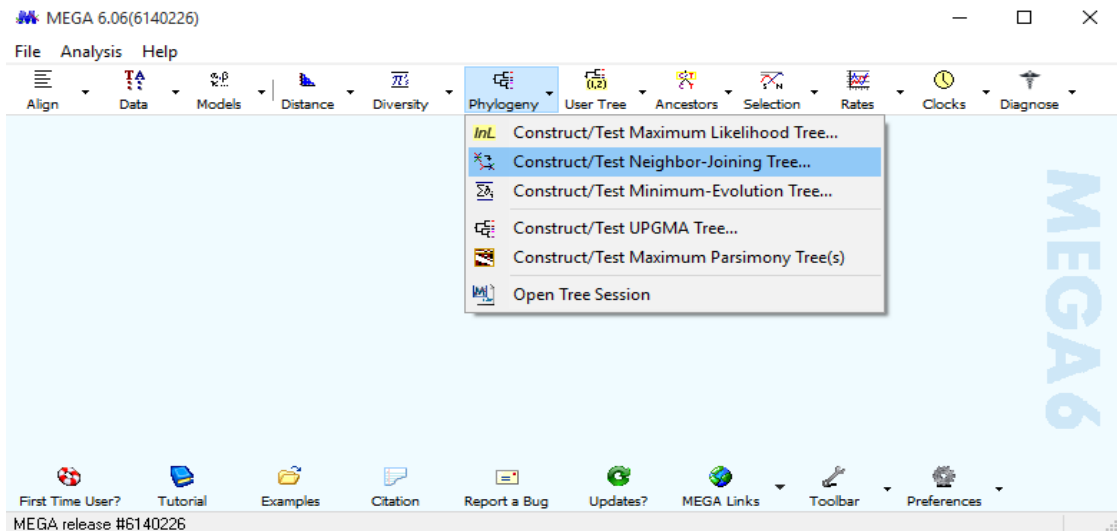


Se selecciona el archivo que se generó en el bloc de notas y posteriormente una opción de alineamiento, en este caso se utilizó *MUSCLE*.

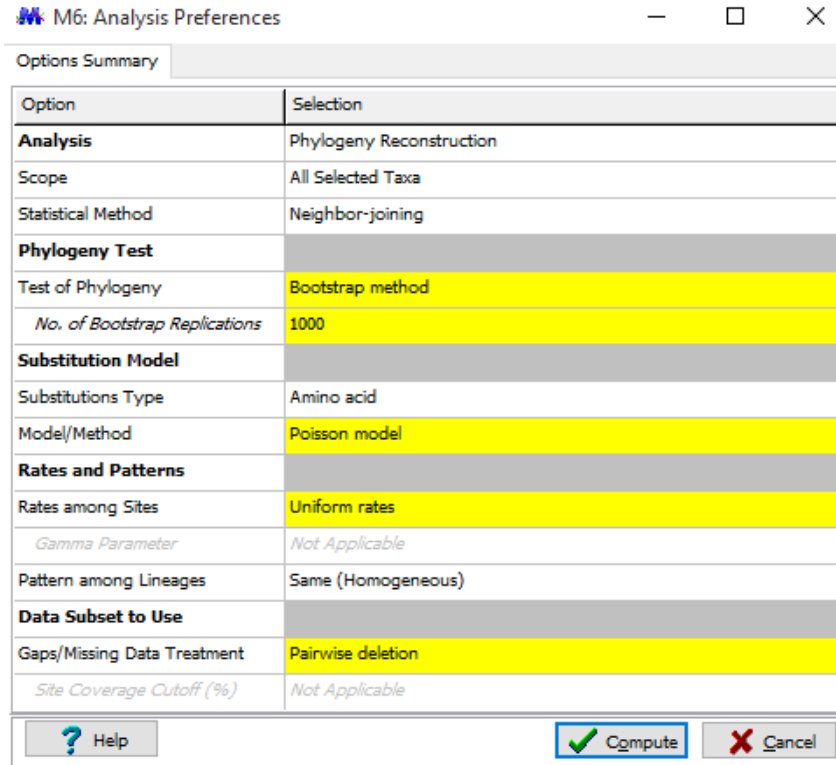


Seleccionamos *Compute*. Posteriormente esperamos a que termine de realizar las iteraciones y guardamos la sesión.

Para generar el árbol filogenético seleccionamos *Phylogeny* → *Construct/ Test Neighbor-Joining Tree* y seleccionamos la sesión que se guardó anteriormente.



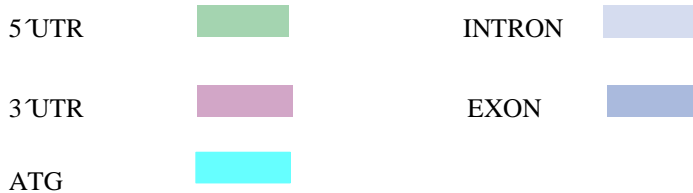
Aparecerá una ventana: *Analysis Preferences*; en la sección de *Test of Phylogeny* se selecciona *Bootstrap method*; en *No. of Bootstrap Replications*: 1000; *Model/ Method*: *Poisson* y en la sección de *Gaps/Missing Data Treatment*: *Pairwise deletion*. Se selecciona *Compute*.



Esperamos un momento y aparece la ventana “Tree Explorer”.

Apéndice E: Secuencias ERFs-VII *Brachypodium* para el diseño de oligonucleótidos (RNA-Seq NCBI).

En letras negras se indica la zona donde se diseñaron los oligonucleótidos. Código de colores (intrones en minúsculas):



❖ Bradi2g27920.1

```

5' TCCAGTATCATCACGGTATCAGTCTATATGTGTCAGCCCGCAGCATTGTACAGTACAGTACCACGGACATCGAC
TAGTCATACCCAGTACTTGTGCCACTGTGCTCCTCTGCACGCTCCACTCCTCTCTTTAGTCAGTTCTTCAAGC
TCGTGTTATATATATAAAGGAGCAAAGTGGGTGTTCTAAAACGAAGCAAATAACTAGCAATTGCTTTAGCCTCC
TGTATCTCGCGTTAGTTGTCAAAGCGAATAAGTTGAGAAACGACACAATGTCGGGAGGAGCGGTCATCGCCGGC
TTCGTCCCCGAGGGATCCTCCTCATCGAGCCTCACC GGtaaatactacactagccacttagccaggccgacttg
atgcgcgattccatthttatataatcaacttgtcagtacaaacttgaggcctcagtacttaatgctagtctcta
tctcatatatatgcaacttgtctgttcttattttctgcagatgattcttatacaatctataagcatggttac

```

agtggaccgatggcagttaatatgtgctgctggtttatgtgtcaGGGGAGGAGTTGACAACGGAGAAGCCGCCG
GCGCCTGGGCGGAAGACGGCGTACCGCGGGATCCGGCGCCGGCCATGGGGCCGCTGGGCAGCGGAGATCCGCGA
CCCAGGAAGGGGACGCGCTCTGGCTGGGCACCTACGCCACCGCCGAGGAGGCCGCGCTAGCCTACGACGTGG
CGGCGCGGACATCCGCGGGGCCAAGGCCAAGCTCAACTTCCCTCCGGCGGTGACCACGCGGCCGTGGAGGAG
GCAAAGAAGCGCAGGACGAAGGCCGCGGCCGTGGAGAGCTCGTGCTCTTCGTCTCCCCTTCCGGCAACGTCTAC
GGGCGGCGGCGGGCGGAGCTGAAAGGCTTCGGGAGTGCATGTCCGGGCTGGAGGCGTTCCTGGAGCTGGAGA
ACCCCGCTGGAGTCGGCGAAGATGTCGACCTCATGTTGAGTAGACTGTAGACGCTTCCATTGGACCGGTAGTC
TCTGGAATTTCCGTAGTCTCTTTGAGCCTTGACTGTCGCGGAGTCTCAAGTCTGCAGTTCAGCCCCCTGGTGCTG
TCACTGCTAGCGTGAGGCTGGCTAAATAAACAGATT**CAGGACCCTCTGATCCAAAATAA**ATGGATAAACAGATT
CAGGG3'

❖ **Bradi1g46690.3**

5' AAGACTCCATTTTTACTTACCTCGCCGCAAGCCCAAGTGCGCAAGCACAAACACATCACACGCATCTCCTC
CGTCTTGTTCCCCAGCGGCGTTTTTCCTTTGCAGTTTTTGTCTGCTCTCTACTGCTCCTCTAGCGGTGGGTAGTC
CCGCTCTCGCGAGTCGTCAGCCATGTGCGGCGGGGCCATCCTCTCCGACATCATCCCGCCCGCGGGCGGTCA
CCGACGGCCACCTCTGGCCGGCGGAGAAGAAGAGGGGGAAGGGCGTTGGCGGCGGGAGGCCCGCGCGGTGCC
GAGGAGGAGTTCGAGGAGGAAGAGTTCGAGGCCGGCTTCGAGGGGTTCGAGGAGGAGCTCGGGGAGGTGGAGGT
GGGATTCGGCGACGAGATCAAGCCCTCCCTCGCCAGCAGGAACGGCAGCGCCGGAGGTaaaaaggaattggttc
cgccgtccgctcgatctgtgtggctttgttggtcccttcgggagacatagaggggttggttcccttggtt
cgtcctgagaaatatctagtgttctgggtcactggtctgtggatccgtagatttgctcctcatattcatgcctt
gggagggagtataatgagttcataggtgggttggtgggtgattagcttagttttcttttccgatttggttact
aggaaggtaggtttctttaaagttaacccaaattccgactggtgagtatcagtaatcatctctatgatatga
tgtgagtacttccctggattcttaagatcgagcttccatacgtcaccgtaggagttgggttttttctgagaa
cttccccagattgcatctaattagttttcaatgtaaattgacttagcctcgttacttttgtgggagaacttt
gcctaactccagtcaaaacttattttttgtcatgttgactgggagatgtgggaaaataagtgatggatgccac
agccacgctggttgtagagaaggttgtaatttttgatgaagataggtggtgtagcagtggttctgattgatta
tttctttttaaatttctccaccttctgattgggtggtcatcagttctctctcatgaattttttatttgat
acagttcttggttaaaaagtatttcatgctctaatacctaataatgctgatgctcatagtcta
ccatatagtagagcttacttttatggaatagtgatctcttatggtgatctcactgcttcattcagATGGATTA
AATGCAACTAGTGTGGTGTGATGGCCGCGCATCAGGGTCCCTAAAAGGAAGAGAAAGAACCAATTCAGGGG
CATTCGACGCCGCCCTTGGGGTAAATGGGCTGCTGAAATCAGAGATCCTCGTAAGGGTGTCCGCGTCTGGCTTG
GCACTTACAACCTCTGCTGAGGAAGCTGCCAGAGCTTATGATGCTGAAGCACGCAGGATTCGTGGCAAGAAGGCA
AAGGTCAATTTCCCGAAGAGGCTCCTGTCACTTCTCAGCGCCATGCTGAACCTACCTTTGTGAAGGTGTCTGA
ATTCAACACTGAGGAGAAGCCCATAGTCAACACCATGGGCAACACAAATGCGCACTCCTACCCTGTTGTTGACT
ACAGCTTACATGAGCCATTCCTGCAGCCACAGAATGCTTTTCATGCCGTGAATGAATGCAGTTGAGGCTCCA
TTCATGAATCTTCCCTCTGATCAAGGGAGTAACTCCTCAGTTGCTCAGACTTTAGCTGGGAGAATGATATCAA
GACCCCTGACATAACATCTGTGCTTGCATCCATCCCCTTCGACAGAGGTCGATGAATCTGCATTCCTCCAGA
ACAATGCCAATAATGCAGCACTACCACCTGTGATGGGTAATGCTAACGTTGATATCGCCGACCTGGAACCATA
ATGAAGTTCCGTGATGGACAGTGGTTCAGATGAGTCAATTGACAGCATGCTAAGCTGTGATGGATCTCCGGATGC

GGTCGACCTTTGGACCTTCGATGACATGCCCATGTCTGCTGGCTTCTACTGAGGGATCTGAGGTCATTGGTGC
CTGTACATATAAAACAAAGGG3'

❖ **Bradi3g60120.3**

5'GCTGCCGTTTTTCGGTCTCTGACGACACACACAAGTTTGCTAGCAGACATTTTTTTTTCTCCGGCGCCGACGAG
TCCGACGAAGAAGACGAAGAGGAAGGGGAGCCATGTGCGGCGGCGCGATCCTCACCGACCTGAAGAGGCCCCCC
CGGGTGTGCGGAGGCTGGCGGAGGGGTTGCTGTGGCCTGAGAAGAAGAAGGTCTGCTGGAAGGGGGAGGAGGA
TGACTTCGAGGCCGACTTCGGCGGGTTCGAGGTTGTGGATGAGGACTTGGAGTTCGGGGGTGAGGAGGAGGAG
CTGGAGACGACGATGTCGTCGAGATCAAGCCGCCCCCGTCAAGAGGGCCTCACCGGAGGTAaccggtttttcg
tctctgctctgtccgggacttagttcatctctgtttttttttttcctttcgttctgattatttgtttagaagg
tcgaaatttgctgattgtttagaaggtagtagaaattattggaggcggtttgctcgtcggttggcgagga
agaggaattattctggggttggtgctggaaggctggattttagcgggttgctcctgtttggtattttagtga
ttttggagcggactggatgtgttcttgtggagtgatctgggataagggttaggccttaatcatcactccgtcgt
gttaggattttctgaaattatactaccctcgtaggctgttcggattctgctccttttgagaagcaaaatttcg
gttgtaggttctgatttgggatttctttaactccttgcgagcttatgatcattcatatgtttactgttttag
tcaaaggagttgaaaatctgcagaaaaggccaattgttctcgttttgcttgagggtcacggcatttgaatt
gctcctcttgcttgatggttctagatttgtgtgagaattgtctaaggttacttcaactagtcctccgtcccg
tattaattggcacgaaattgactaaatccgcgccagttaatatggaacggagggtatcaatctaaaggatt
ggtgtggtgattgttgtcctacaaagtacatcacactccttaattatttcaatcaatagctataccttgtg
gtgcaaatgtattgggagtttctttgtttgcttaggctatactagatgatcattttgttctattatctttaaa
aaaagtcctttgacttactttgaagcttttgatcttgcacatgaatgacactgatgtttcaccagggttc
ctcccacgtttgtatatactattgatagatgcagtcgactcttctgctcagtcctctgattaaattgtcaa
gtcagttctgttaggtaagccgcgagagttgaaatgttggcttttccccgaaaacttaccactgttagatctt
gttccatgtttacacctcagatgggcaatttaaatattgaattagccagaagttggatattgagcttctttttt
tatatatttgtttgagagttgatctgacaaaaaaatcctggattcacatagtctacaatggaggttatagata
taattgcagaatgatggtgaggcccatagcatgaggctgttcttaagaacctcgattttcttcaaaattttga
aggggagtgtactcatggttaaatgtctgttggagatattatacatataaattcatctccattatcaaactaac
ttgtttaataatagaagtttgccttgttggcctctcttaccattaacgttgccttccattgacagATGACTTA
AGCACCATGACTAGTGC'TGCTTTTTGATGGTCC'TGCAGAAAGGT'CAGCAAAAAGGAAGAGGAAGAACCAATTTAG
GGGTATCCGCCAGCGCCCC'TGGGGTAAGTGGGCTGCTGAAATCAGAGATCCTAACAAAGGTGTCCGTGCTGGC
TCGGTACTTTCAACAGTGC'TGAAGAAGCAGCAAGAGCTTATGATGCTGAAGCACGCAGGATCCGTGGCAACAAG
GCCAAGGTTAAC'TTCCAGAGGAACCAAGAGCTGCTCAGAAGCGCCGTGCTGGCCCTGCTGCTGCTAAAGTGCC
CAAGTCAAGGTGGAACAGAAACCTAATGTCAAACCAGCAGTCAACAACCTTGCCAACACAAATGCATCTGCGT
ACCCATCTGCTGACTTTGCCTCAAACAAGCCGTTTGTTCAGCCTGATAACAAGCCATTTGTTTCACTGATGAC
CTGTCAATTTTTTTCAGCCTGATGACCTGCCATTTGTTTCAAGCCGATGACATGCCATTTGTTTCCGCAATGAACCT
TGCTGTCCCTATCGGGGCTCCTTGTATGAATCTGTACTCTGACCAGGGAAGCAACTCCTTTGGCTGCTCAGACT
TGGGCTGGGATTTGTGACACCAAGACTCCAGATACAACGTCCGTTGCTCCCATCTCTACCATTGTTGAAGGTTTT
GAATATGCGGTTGTGAAGGGTAACTACTCAGGACTCAGTGGTGGCCCCCTGTTATGGAGACCAATACTGTTGATCA
CACCAATGTGCTGGAGACCAATCCTGTTGATCCTACCAGTGGGCTGGCTGATTTGGAACCTTTGTTGAAGTTTT

TTCTGGAGGAGGATGCGGGTGAGTCGATTGATAGCTTTCTGAACCTTGATGAATCTCAGGATGTCAACGGACTT
TGGAGCTTTGATGACCTCATCTCCAGCGATTTCTATTGATGAATGTGGAGCCTGTACATAGGGAGAAAGGG3'

❖ **Bradi2g11890.1**

5' TAACTCACGAGACGATGTGCCGGTGATTGTCTTGTTCGACGCTTTGTGGTGCTCCGTTTTCGAATTCTATAGGAA
TTGTCTGTCGCCACCTACACGCCCTACACTCCACAGTCCTGACCGTTGTATATAAACACACCCGGAGCTGGTAGTCC
AACGCCTCGTATCATCAAACCAATCCAACGTCCCCTAGTTCTTTCTACCCAGCGCGCGCTAAAATTTCTCAAAG
AATAGTTTGTCCCCGGTCTTTCCAATTTCCACCCCACTTTTGATCGAGCCCAGTATCCATGTGTGGCGGTGCC
ATCATCTACGACTACATCCCGGCGCCCCGCCGGGTGTCCGGCCGCGGACTTCTGGCCCCGACCCGACGACTCCGA
CGCCACAGCACCCGCCCCCACAAGgtacgcacgccacgcctacaatttcctacggagtataagaagtaggaa
tttccggttgccagctgataggactgaatgagtgggtgtgcatttgagCGCGGCGCGGAAGCGGGAGAAGAGGA
ACCAGTACCGCGGCATCCGGCAGCGGCCGTGGGGTAAGTGGGCGCGGAGATCCGCGACCCCGTCAAGGGCGTC
CGCGTCTGGCTCGGCACCTACCCACCGCCGAGGCCGCCGCGCGCCTACGACCGCGCCGCGCGCCGCATCAG
GGGCGCAAGGCCAAGGTCAACTTTCCAACGAGGAGCTCCTCCTTGCCCTTTCGCCGGCCACGGCGGGCGG
CGGCTCCGCCGGCCGTGCTTTCTCGTTCAAGAAGGAGGAGGACGCGGAGTTCCGGTCCGTGGCGTGTCCGGC
GAGGCCAAGGAGCTGTCCGAGGAGCTGATGGCGTACGAGAACTACATGAGCTTTCTTGCGTCCCTACATGCA
GGGCGGGGATACGGCAGCCCTGCCGCCGAGGAGGCCGCCGCGCCGCCGCTGCCGCGTATGGAGCTTCGAGG
ACTACTAGTGGCAGAAATCAGTGTCCAACTTCTGTGGTGTGTTTAATTTGTTCAATTCATTTTTTTCAGTTT
GTAAGTGTGTTTGGAGTCCAATGGCAATTCGCTTGCTCCGTGTAAGTGTGTAAGCAAAATTTGCAATTTAACTT
GTTTGCCGTTCTGCAAGTATTCGTCCTTTTCCAA3'

❖ **Bradi4g31040.1**

5' AGCTACCACACCAGTACACCACCCCGTCCATCTCCCCCTCCCCCGTTCGGCTTCCCTCCTCCCTCACACA
AACTGTGCCGCCCGTGTCTCCCTCCCACCGACCGACCCTTGATCCAACACCTCGCGATGTGCCGGGAGCCA
TCCTCTCCGGCTTCATCCCGCCGTCCGCGAGCGGCTGCCGGCGGGCGGCCAAGAAGAAGAAGCAGCAGCAGCAG
AGGGTGATGGCCGACGCGCTGTGGCCGGGGTGCAGAGGAAGGCCGCCAGGCTGAGGTGGAAGACTTCGAGGC
CGACTTCCGCGAGTTCGAGCGGGACTCGAGCGAGGAGGATGCTGGCGGCGACGACGACGATGTGGTGAAGTGG
TTCCCCCGCCGCCGCGGAAGGCGGGCTTCGCCCTTGCCGCCGTGGCCGAGGGTGGCTCCCTCCTACCGTCCgt
gagaactgagacgtccactgaagtggcgagacttcttctttttccgcttttaggagagcaaaagatgccgc
ctcttttgtagtgcttctttaaactcgttggttgagagggatgacatcgaatattaccgaatgggccttct
atggcaaggcgtagcttctgagggcagtgatggaacgagtagtgggtgctgtaaatttcgcttatttct
ccaaatctggctaattccagcgcaaacgaattgctaggaactctggttcttaaggggtgatggattgcttctg
tagtaccgtgaaatgggggtgatcgttaaactgaaactctgcttagtatctgctctcatttttttccctaaa
ctgatctagtctcttgagttccaaaggtagttcttatggtttcgagtggtttgctcatctccattactaatc
ttggggttttggttgtaagtttccgctctgtattacgacttttaggattaacctatgttttggtgatgctcttg
taataagtgaccagatatgtaactatggtcaaacataatttcttaattttacgtattgtggttatgttttcatt
cgatgtactgccatctccttgccgatcttgaaatttagatgatggcctttgaggatctattgctgtgaaca
agggtttattatgcttacttggtgatcatgggtgctgtactttttctgttaccttcatacagattgttagg
tgcaggtctaagtccttactttgcacttttaagataattagctcttgatttcagtttctttgtcaataaaa

gaatttaggactaagttaaataagctttttcctcccctgaggcaaacatcaatgtaaactaaagtaggtaa
aatagagtataatccttttgtagatctcatattgctgggctgctggatgaaatgtcaaagtgtgattgctcctaa
gaggcgtagaaaattaacagtggtgtagaaaatataatcctttgtcaccaatctgctgggtgctgtaggctgtttt
tactgtgaagcatttgcttggtctcttaacaatatgtagaattcatgtctattgtttctagctatcataatg
tgcataattggtcgttgattgctaacgggattgctgtactaacttctggttgttattcaaaatgtcatattggg
atttattaataagtaacctttaatgtagATGCTGTTACCATTCCAAAGTCTGTCTGAACATGATGGATCTGGTAC
TGGACCGTAAAGCGCAACAGGAAGAATCAGTACAGGGGGATCCGCCAGCGTCCCTGGGGAAAATGGGCAGCTG
AAATCAGAGATCCCAGCAAGGGTGTCCGGGTTTGGCTTGGGACTTACAACACTGCTGAGGAGGCAGCTAGGGCA
TATGATGCTGAAGCCCGTAAGATCCGTGGCAAGAAAGCCAAGGTCAATTTTCCCGATGAAGAGCCAACCTTCTG
GAAGTCCACTGTTAAGACAATTGCTCAGAAATCTATCCAGAAGGCAACTGCTACCAATTCAGCAAAGCTAACTA
CACCTCCGAACACCTGTGACGACGAGTCTTTTTCAGTCATCTGAGTAATGCAGACAATGATTTTGTTCGCCATGTTT
GCCTTTGATGACAAGAAGGTTCAGCAAAGCCAGATGAGAGTGGTGATTTCCCTCACTCAAGCGAAACCTCTTGT
TCCCACCGAGACATTTGGGATGAACATGCTCTCTGACCAGAGCAGCAATTCATTTGGCTCAACTGACTTTGGGT
GGGATGATGAGGCTATGACCCAGACTACACATCTGTATTTCGTTCCCTGATGCTCCCTATAGTAAGTTGCTTAC
CTGGAAGGTGGAGCGCCAAAGAGAATGAGGATCAATTTTGGTGTAGATCTTTCTCCTCAGGGAAAATGATGCACC
CAATCTCGCACAAGACATATCTGTTTTTGTATCCTGAGATGAAGTATTTGCCATTGCCTTATGTTGGGAGCAGCT
CGGACAGATCAATGGACAACCTTGTGGTAAATGATGTCATGCAAGATGGGGCAAGTAATGTGGATGCTCTGGGGC
CTTGATGAGCTGCTCATGGCAGCTGGTGTACTGAGGAGCCATTGTTCTGGTCAATGGTCTGTGCATTGCAAA
AATgtaagccatccgtacttcataatttggttcttctgatacttctcctttacaagttacacctgttgtaata
aataactattaactctggtttcttgccaGGTCCCATGCTTATGGCCAAGATGATAAGCAGGTTATATCCGCTATG
GTTTTGTAGCGGATCAAACCATAGGTATGCTAGATTATATGCTGGTGTAACTGGAACTTTATGACTTGTTTTATA
CTCTGTTGCTATATGTCGTGTCTATGATTGTGTGCATGTTTGGAGACTGGTTCAATAACTACCTTGGCCATATGT
GTGCTGTAATGTGCTTATTAAGTACTGTATGGTTGTGCCATATTTGTATTGCACCTTTGAAGTTCTTCCCTTCGC
TTTCTGCTGAGA^{3'}

❖ **Bradi1g17960.1**

5' ACCCACCTTTCGGCCTCGTTTACTATCAGCACCCGACGCAAGATTGCATAGATCTTTTCTCAAAAAAGAGAAA
AGAAAGATTGCATAGATTATTACCAGCAATGTTGTGGCGGTGCGATCATCCCCGACTGCATCCCGGAGCAGACC
ACCACCGCACAGCCGACTTCTGGCCGCTCGCCTCGGACGCCGGGCACGAGCTCTACCCGGCTGGCCTGAGCCTG
ACCGGCGCGTGCAAGTTCACACACTACCAAGgtacgtgctagtagtagtgcacatctttcctcacacgctaattag
ttgtaattcgtatcgaccttctgctgtaccgggaacacggatgagagcttgggtttcttccgagagCCCGCG
GAGCCGAGCAGGAGGCGGGAGGGCAGTAACAACAAGCGGGAGAGGAAGACGGCGTACCAGCGGCATCCGGCGCCG
GCCGTGGGGGAAAATGGGCGGCGGAGATCCGGGACCCCGGCAAGGGCGCGGGTGTGGCTCGGCACCTTCGCCG
ACGCCGAGGCTGCCGCAAGGGCTATGACCGCGCCGCGCCGATCCGGGGGGCCAAGGCCAAGGTCAACTTC
CCCAACGAGGACCCGCCCGGCGACGAGGTCCCGTCCACCGCGGCACGGCGATGGCACCTTGCCCTGGTA
CTACGACGACGGTGACGGTGTGTGGGCCCTCTGCCGCCATCCATATGACGTCGCCGGCAACGACGTCGTACGG
CGGATGAGGGGCGGCGGGCGGCTGCCTACGTGCACCACCAGATGCCGCCACAGC**ATCAGCAGCAACAGGAG**
GCTGGGTTGGAGCTCTGGAGCTTCGATGACAACATCAACATGGCCGTGCTATGTAATTAGTGGTGAAATGATC
GACTTGAAGATGTCCTTTCCATATGGTTTGGTTTTTGTAAAGACCTCGAAGTTCTTTTTTC^{3'}

AACAGTCCATGATCGAGTCGGTCATGTTTTCGATGCTTGTGATTGTGAATACTAGTACCAGATAAGTTTGTGA
ACCTGGTCGTCTAGTCTAGTGTATATGTGTCACCTAGTCATCCTGTGATGTTGAGTTGGTTATGTAAGAAGACC
ATGATTTGCTGGATTCAAGCTACAATTCTGGATGTCTAAACGTACAAA3'

Constitutivos

❖ **Bradi1g32860 (UBI)**

5'CGCAAACCGCCTCTCCCTCCTCTCTCGTCTATCCGCCCGGTGCCGTAGCCTCACGGGACTCTTCTTCCCTC
CCTTGCTATAAAATCCCCGCCCCCTCCCGTCTCCTCTCCACACATCCAAACTCTCAATCGCACCGAGAAAAATC
TCCTAGCGATCGAAGCGAAGCCTCTCCCGATCCTCTCAAGgtacgcccgtttcccgtcgatcctcctccttccg
ttcgtgttctgtagccgatcgattcgattcccttacaccggttcgtgttctctcgtggatcgatcgattgtttg
ttgctagaaggaactcgtagatctggcgttatgaactgtgattcgggtagtccagatcgattcaggtcggtc
gtcgttgagcctctcggctatgtctggattatcgtgtagatctgctggttcagttgattatgttcttctaggag
taatttcgttgggtcagcgcgatttctgcttaatctatgctgcttattgcgcctgtacctatctactaagctat
gtgcacctgtaattttgctagattattcgttcacctcgtagttggttgcacagtaatccgatgggttctg
acgatgttattggtgctacacctaggcttctccagattttatgtttaaattggatagatctgctactgat
agttgatgatggaatttgggtgctgaatctatgctatttattgcccctatactgatctatcgggctatgtacgg
ctgtagtttactggattattcgttcacctcggtagttggttcacgtttgggttctgacgataatattggtga
ttatgctgtaggcttctgcagattggtttaaattggatacatcggttactgatggttgatgatagatttgtgc
tgaacctatctgtttattgctcctatactgatctatagggtatgtatgcctgtaatttaccagattattcgt
tcacctcgtagttggttcacctctataattcgtatgggttcttatgatgttatcgttgattatgcctagtctt
atacagattattgtgtcaagattgaatatactgctactgatcggtgataatttgggttagtagtttgaatctg
ctaggaacacgttaccactgtaatctgtaaacaatggtttgccagagtagtttgttctactactcttgataggt
tgctgatttttagtgcctccttttgatcatgtattgatgccttgagatttccgtgtacttaccggtt
tgtgtacttctgtgtaaacagATGCAGATCTTTGTGAAGACCCTCACCGGCAAGACCATCACGCTCGAGGTCGAG
TCCTCGGACACGATCGACAACGTGAAGGCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCAGCGCCT
TATCTTCGCGGGCAAGCAGCTCGAGGATGGCCGCACCCCTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACACTCC
ACCTGGTGCCTCAGGCTGCGTGGTGGCATGCAGATCTTTGTCAAGACCCTCACCGGCAAGACCATCACGCTCGAG
GTCGAGTCTCTGACACAATCGACAACGTGAAGGCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGACCAGCA
GCGACTCATCTTCGCGGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCCCTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCA
CACTCCACTTGGTGCCTCAGGCTGCGTGGTGGCATGCAGATCTTTGTCAAGACCCTCACCGGCAAGACCATCACG
CTCGAGGTCGAGTCTTCTGACACCATCGACAACGTGAAGGCAAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCGGA
CCAGCAGAGGCTCATCTTCGCTGGCAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCCCTGGCTGACTACAACATCCAAAAGG
AGTCCACCCCTCCACCTGGTGCCTGAGGCTCCGTGGTGGCATGCAGATCTTTGTCAAGACCCTCACTGGCAAGACC
ATCACCCCTCGAGGTTGAGTCTTCGGACACAATTGACAATGTCAAGGCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCC
CCCCGACCAGCAGCTCATCTTTGCTGGCAAGCAGCTCGAAGATGGCCGTACCCCTGGCTGACTACAACATCC
AGAAGGAGTCGACCCCTCACCTTGTCTCCGCCCTCCGCGGTGGCATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTCACAGGC
AAGACCATCACGCTTGAAGTTGAGTCATCTGACACTATTGACAATGTGAAGGCAAGATCCAGGACAAGGAAGG
CATCCCCCAGACCAGCAGCGTCTCATATTGCTGGTAAGCAGCTTGAGGATGGCCGCACCCCTGGCGGACTACA
ACATCCAGAAGGAGTCCACCCCTCACCTGGTGCCTCCGCCCTCCGTGGTGGCCAGTAAAGTGCCCTGTCCATGGACTT

GCTTCTGTCTGGGTTCAACAAGTCTGGTTCAGGGTGTCCCTCCGGTGGAGTTGTGCGGTGTCTGAGTCTTATCTTT
GATCTGATCGTGTGTTTGTTCCTACAGTACTGTCGTGAGTGTATGCCTGTGTACCAGAACTTCTGCTGCGGTA
GCAGCGTTATGAACTATTATGATGAATAAGTGAGCCCGTGTGTAATTCCTACTGTCTGACATCTGTTGCGTGTG
TGGTCTTGTTCGAGTTCCTCACTGTTTTAAGTTATCCTACTGCATTTTATATCTG3'

❖ **Bradi2g24070 (ACT)**

5'GTGATACAGGTGATACCCCTCGCCCCATGCCCTGCTCGGCTGCTCTCCTTCAAGCCGTTTGATCTGCAA
AACAAATCTGCCAAGTGCAGCTTCCCAAGATAGATAGATCGCTTCGCTAGCTAGCTTCGGTGAACTTTTCATG
GTTTTTCTTGCCGTTTGGGCGAATTTGCGCGCTGATTTGGTGTGTGCGGCGGCGATCCTTCCAGATCAGAGAA
AAATTTCTGGGATAAgtgggtcatctctgatttgttatgttgtggtcgaaggcctcctcgttgtaaattt
ttttgctgtgaactgcaggttttgctttcctggagcttaccctttatttccaatgcttagcgttttaggcg
atgtgcgaattatagtgccgtccagtgattatttcttcagttggcagcagcagcagcaagccgaaaatagcag
gctatcttcattctatactgtttgagtatacttccatattgaacttggtgtgtgacctgtgatgatagcgtt
tactttataaattggaattgctctgctttagcagattgacaatttagccaatatctaaagagcccaagtttgct
ttactctgcattagcagattgacaatttagccgcggttaacacatttcataatctgttaaaaacggatgtattg
aatcaaaacacttgatgaaaaataaaatgggtctctcagaattgttctgtgtgaaatttgctttgatgtttc
taaattgagtgttgatcatttaagtctctcaatcctactagatgtcgattatatctgcaccagtctttaaag
gatttgcaagcactcttaagtctgaactgcgtatatcattggctttttgctcttatatactcgcacataaaca
tcagtgacagtttaacctagatctaggacatctagctagagtactcatgtaaaatcactgcaaatttctgttac
agAACAGTTGAGGAATGCGCTGATGAGGATGTTTCAGCCTATCGTGTGTGACAACGGCACTGGCATGGTCAAGgtt
gttgccctgcacaaatcatttcaagaaaacaagcatgttctccgtacctaataagaccatctatcgactcttaa
tctttgacagGCAGGTTTTGCCGGTACGATGCACCAAGAGCTGTCTTTCCAAGCATTGTCGGCAGACCAGCC
ATACTGGTGTGATGGTGGTATGGGCCAAAAAGATGCCATGTGGGTGATGAAGCTCAAGCAAAGAGAGGTATC
TTGACATTAAGTACCCCATCGAACATGGCATTTGTCAACAAC'TGGGATGACATGGAGAAAATATGGCATCACAC
ATTCTACAATGAGCTCCGTGTTGCACCTGAAGATCATCCTGTATTGCTAACTGAGGCCCTCTGAATCCCAAGG
CCAACAGAGAAAAGATGACCCAGATAATGTTTGAACCTTCAATTGCCAGCAATGTATGTCGCAATCCAGGCC
GTTCTATCCTTGTATGCCAGCGGTCGAACAAC'TGtatgtctattaccttggaacagttcacacttaagttaa
cgggacaggctgtgacaattttatttttgagGTATTGTGCTTGACTCTGGTGTGAGCCACACTGTCC
CAATATATGAGGGCTACACACTTCCATGCTATCCTTCGCTGGACCTTGC'TGGCCGTGACCTAACTGACAAC
CTCATGAAGATCCTTACAGAGAGAGGGTACTCCCTCACAACAAC'TGCCGAGCGGAAAATTGTCAGAGACATAAA
GGAGAAGCTTGCTTACGTTGCCCTTGATTATGAACAGGAGCTGGAAACGTCTAAGAGCAGCTCCTCTGTTGAGA
AGAGCTATGAGATGCCCGATGGACAGGTATCACTATTGGATCAGAAAGGTTTCAGGTGTCTGAAGTGTGTTT
CAGCCATCTCTTGTGGTATGGAAGCTCCTGGTATTCATGAAGCTACTTACAACCTCATCATGAAGTGTGATGT
CGATATTAGAAAAGATTTGTACGGTAATGTTGTCTCAGTGGAGGTTCAACCATGTTTCTGGAATTGCTGATC
GCATGAGCAAGGAGATCACGGCCCTGCTCCTAGCAGTATGAAGGTTAAAGTTATCGCGCCACCTGAAAGGAAA
TACAGTGTGGATTGGTGGCTCTATCTTGGCCCTCTTAGCAC'TTCCAGCAGgtaatttgtttcttccaacc
ctgaaaattgcatacttttctcagcagttttatagcggcctttgcggttaattttgtcagcctatttaattat
aattggactagaattctttgtctttgttctccatcagttttggttatcaggatagcaccgaccatttttggga
attccgtgctttcacatcctttaagaatcccctcaaaccgaatgagtccttattgggctagaatcctttgtcaa

tttccatcagttttggttggtcaggatacacactgaccatTTTTtagaattcaatttgaattcgcacttatccat
gtttaggaatttacggttagcatagatggccatactcttggtgaactccttgggtggtgatataatgctggttat
gagaataaaaaggtagtctgaagtcgtaataatattatgatggcttttgacagacacgaagtgtaagtggaa
tgactattgtggtaatatTTTTctggaacacccttggtcataaatcattaatatcgagctaagcaattggtagac
tgatggcttttaccgaatcatttctaacattgatttgtttgtatggcagATGTGGATCGCCAAGGCAGAGTAC
GATGAATCTGGTCCCGGCAT**TGTCCACATGAAGTGCTTCTAA**GCTCGCGGGGAAGGTTGTAGCTGTACTTATGG
TTGCTGCCATATGTTTGTGAGACATGTTTACAACGGAGGCTTGCTTCCCGCTATGTAGTACTGTACTAGTAC
ATGGTTGGATATACTTGTCAAAATGTTTAATAGTCTGTTAATTACTGCAT**TGTATGGTCGTAATGGTATACCTG**
AAGGAAAAATAAAAGGACAATAAAATAAACATGTTTGTTCGTTTAGGACAATAGAACTGTAGAGTGGCCTTG
GTATTGCAGGCCGTATAAAGCAACGAAATGGAACATAATAGATGTACTCAGTATTGATGTACCTCAAGTATTTT
TG3'

Apéndice F: Preparación de reactivos

❖ TAE 50X

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

❖ Gel de agarosa 1%

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

❖ Gel de agarosa 2 %

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

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

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

Para la preparación de las muestras de RNA, en tubos de 1.5 ml se agregan 2 µl de H₂O DEPC, 1 µl de buffer de carga 5X (contiene Bromuro de etidio y formaldehído) 2µl de muestra de RNA, se homogeniza por

vórtex y se centrifugo durante algunos segundos a 4 °C, posteriormente se incubo a 65°C durante 5 min (se utilizó un bloque de calentamiento) y después se colocaron rápidamente en hielo durante 5 min, se centrifugo durante unos segundos a 4°C.

❖ ddH₂O

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

❖ H₂O DEPC

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

❖ MOPS 10X pH. 7

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

Apéndice G: Información de oligonucleótidos proporcionada por la compañía Macrogen

Oligo	Bradi890F					
SEQ	5'- ATG GCG TAC GAG AAC TAC ATG - 3'(21 mer)					
GC%	MW		Yield		Scale (umoles)	Tm (c)
	Calculated	Measured	OD	nmol		
47.62	6479.2	0.0	3.2	13.1	0.025	59.4
Vol. for 100 pmol/ul	Purification		Modification			
131.0	desalt					

En amarillo se destaca la información usada para preparar los oligonucleótidos a 100µM.

Apéndice H: Ecuaciones para la centrifuga Universal 320 R

Ecuación 1

$$r = \frac{rcf}{1.118 \left(\frac{rpm}{1000}\right)^2}$$

Ecuación 2

$$rpm = \sqrt{\frac{rcf}{r * 1.118}}$$

Apéndice I: Multialineamiento MUSCLE de los ERFs-VII de *Brachypodium*

```

SNORKEL1      --MCGGCLIPDELVGKPARRTAAAA-----GGDSGDGKWHGRRLCPAAAPCNCCKPRRR
SNORKEL2      MENAGTTSAVESVTNLQART-----SPLPNVVPQTGTKASK-----
Bradi1g72457  --MCGGAILAELTPPPARGGGASK-P-----VGAKGQVWPVSSKKEGG-----TNKTR
Bradi3g60120  --MCGGAILTDLKRPPAVSR-----RLAEGLLWPEKKKVCWK-----
Bradi1g46690  --MCGGAILSIDIIPPR-----RVTDGHLPWPAEKKRGKGVGGGPPRRVPE
HRE1          --MCGGAVISDYIAPEKI-----A-----RSSGKSSWRS-----
SUB1C         --MRRRVSSS-----PSSSSSSSPARHHKARR-----SRR
SUB1A         --MCGGEVIPADMPAAPFT-----P-----RHGDGETWVDRKRR-----NKKKR
SUB1B         --MCGGALIPNDYGDKPP-----P-----PPESSEWDATTMKK-----KKKKR
RAP2.3        --MCGGAIISDYAPLVTKAKG-----R-----KLTAELWSELDAAD-----
Bradi1g17960  --MCGGAIIPDCIPEHD-----HHRTADFWPLASDAGHE-----
RAP2.12       --MCGGAIISDFIPPRS-----R-----RVTSEFIWPDLKKNLKG-SKKSSKNRSN
RAP2.2        --MCGGAIISDFIPPRS-----L-----RVTNEFIWPDLKNKVKASKKRSNKRSD
Bradi4g31040  --MCGGAILSGFIPPSAAAAAANKKKKQQQQRVMADALWPLQKQKAPQ-----
HRE2          --MCGGAIISDFI-----WSKSESEPSQ-----
Bradi2g11890  --MCGGAIIDYIPAPR-----RVSAADFWDADD-----
Bradi1g72450  --MCGGAILAELIPTAPA-----R-----RVTAGHLWPGKGGKNQQ-----QQKRR
Bradi2g27920  --MCGGAVIAGFVPEGSS-----
SNORKEL1      AGAADD-----
SNORKEL2      -----
Bradi1g72457  HGSVVDFEAAFEFGFHDD-----FPVLFASKPAF-----
Bradi3g60120  --GEEDDFEADFGGFVVDLEDFGG-----EEEEAGDDVVEIKPPVVKRAFTG-----
Bradi1g46690  EEEEEEEFEAGFEFEEELGEVEVG-----FGDEIKPSLASRNGSA-----
HRE1          ---NGVFDCSIYDFDGNFDELESDE-----PF-----
SUB1C         KLVADEDWEAAFRFLSRDDDDDDDD-----DDGHHVVVAPLIRSSNKCVHGHEV
SUB1A         KRGADEWEAAQEFMAADDDDDGGG-----LVLSSKSLVLRSPENDAGRGA
SUB1B         GGGGDDWEAAFRFIAGDDDDDDGG-----VSMFPSGAG-----
RAP2.3        -----DFWGFYSTSKLHPTN-----
Bradi1g17960  -----LYPAGLSLTGACK-----
RAP2.12       FFDFAEF EADFQGFKDDSSIDCDD-----FDVGDVFADVKPFVFTSTPKPAVSAAA
RAP2.2        FFDLDDDFEADFQGFKDDSAFDCED-----DDVFVNKPFVFTATTKPVASAFV
Bradi4g31040  --AEVEDFEADFRERFDSSEEDAGGD-----DDDVEVPPPPAKAGFAFAVAE
HRE2          -----
Bradi2g11890  -----
Bradi1g72450  S--GADDFEAAFRFEDSEEEERQEQVEVMAEEVEEV-AESKPF-----
Bradi2g27920  -----

```

```

SNORKE1      -----DVGRRRRTTRTRAA-----SEVRFHGIHMRSYGRWSAEIRDSSYRG
SNORKE2      -----RGDSGAKAKPAAAKKR----RSKHGFLGVHQRTYGRWSAEIRDNVIKG
Bradi1g72457 -----SPVHGDSGRAREAQAAASCRK---KKRVRGLHGIRQRPWGKWAAEIRDPH-KG
Bradi3g60120 -----DDLSTMTSAAF DGAERSAKR---KRKNQFRGIRQRPWGKWAAEIRDPN-KG
Bradi1g46690 -----GDGLNATSAGADGRASGSSKR---KRKNQFRGIRRRRPWGKWAAEIRDPR-KG
HRE1         -----VFSSTHKHHASGSASDGKK---KQSSRYKGI RRRPWGRWAAEIRDP I-KG
SUB1C        VASTVGGGASGGRRRADDGGERRRRR--RERRSYPRGIRQRPWGRAWASEIRD PV-KG
SUB1A        AATMSMPLDPVTEEAEPAAVAEKPRRRP---RRSYEYHGIRQRPWGRAWASEIRD PV-KG
SUB1B        -----TMETTTEVAPAAAVVERPRRR--RRVRSYPRGVRQRPWGRAWASEIRD PV-KG
RAP2.3       -----QNVVKEEAVKKEQATEPGKRR---KRKNVYRGI RRRPWGKWAAEIRDPR-KG
Bradi1g17960 -----FPHYQEPAEPSRRREGSNNKR---ERKTAYRGI RRRPWGKWAAEIRDPG-KG
RAP2.12      E-----GSVFGKKTGLDGDAAEKSANR---KRKNQYRGI RRRPWGKWAAEIRDP R-EG
RAP2.2       STGIYLVGSAYAKKTVESAEQA EKSSKR---KRKNQYRGI RRRPWGKWAAEIRDP R-KG
Bradi4g31040 GALPPTVDAVTIPKSV EHDGSGTGPVKR---NRKNQYRGI RRRPWGKWAAEIRDP S-KG
HRE2         -----LGSVSSRKRKPKVSVSEERDGR---ERKNLYRGI RRRPWGKWAAEIRDP S-KG
Bradi2g11890 -----SDAHSTAPHKARRAKR---EKRNQYRGI RRRPWGKWAAEIRDP V-KG
Bradi1g72450 -----AFNASSKKASSGGRPGRRGGSRKPAQYRGI RRRPWGKWAAEIRDP V-KG
Bradi2g27920 -----SSSLTGEELTTEKPPAP---GRKTAYRGI RRRPWGRWAAEIRDP R-KG

```

```

* . . * . . * . . : * * * * *

```

```

SNORKE1      HRVWIGTYATAEAAARAYDAEARRIHGAKANTNFP PPP-----
SNORKE2      SRFWIGTFDTALDAALAYDAVSRRLYGLNAKTNFPAAA-----
Bradi1g72457 ARVWLGTYDTADEAARAYDVAARRLGSNAKLNFPAAP-----GRARPRCG
Bradi3g60120 VRVWLGTFNSAE EAARAYDAEARRIRGNKAKVNFPEEP-----RAAQKRRAGPAAA
Bradi1g46690 VRVWLGTYNSAE EAARAYDAEARRIRGKAKVNFPEEA-----PVTSQRHAE
HRE1         VRVWLGTFNTAE EAARAYDLEAKRIRGAKAKLNFPNES-----SGKRKAK
SUB1C        IRVWLGTFDTAE GAARAYDDEVRIYGGNAKTNFPSP-----
SUB1A        VRLWLGTFDTAVEAALAYDAEARRIHGWKARTNFP PAD-----
SUB1B        ARVWLGTFDTAVEAARAYDAEARRIHGHKARTNFPDE-----
RAP2.3       VRVWLGTFNTAE EAAMAYDVAAKQIRGDKAKLNFPDLH-----HPPPPN
Bradi1g17960 ARVWLGTFADAE AAARAYDRAARRIRGAKAKVNFPNED-----
RAP2.12      ARIWLGTFKTAEEAARAYDAAARRIRGSKAKVNFPEEN-----MKANSQKRS
RAP2.2       SREWLGTFDTAE EAARAYDAAARRIRGTAKVNFPEEKNPSVVSQKRPSAKTNNLQK SVA
Bradi4g31040 VRVWLGTYNTAE EAARAYDAEARKIRGKAKVNFPEEPTSWKSTVKTIAQKSIQKATAT
HRE2         VRVWLGTFKTADEAARAYDVAAIKIRGRKAKLNFPNTQ-----
Bradi2g11890 VRVWLGTYPTAE EAARAYDAAARRIRGAKAKVNFPEE-----LL
Bradi1g72450 VRVWLGTFPSAE AALAYDDAALGIRGPRAKLNFPSS-----SSSAAANAG
Bradi2g27920 TRVWLGTYATAE EAALAYDVAARDIRGAKAKLNFP PAV-----DH

```

```

* * . . : * * * * * : * . . * *

```

```

SNORKE1      -NDVDSGAPPPPPWDL EAHMRF LGEVELDDGGAEP PPPPSYGIP-----
SNORKE2      ----GEDDLPPPPPAKPCSSTKRPKKNTSGDLGA-----
Bradi1g72457 TAPKPRRPTTAQTACFSAITAAAAARAQIEIQELMPMPYFDVDA-----
Bradi3g60120 KVPKSRVEQKPNV KPAVNLAN TNASAYPSADFASNKPFVQPDNKPFVQSD DLSFFQPDD
Bradi1g46690 PTFVKVSEFNTE EKPINVTMGNTNAHSYPVVDYSLHEPFLQPQN-----
HRE1         AKTVQQVEENHEADLDVAVVSSAPSSSCLDFLWEENNPD-----
SUB1C        -----PPPEQPAAPVAA-----
SUB1A        -----LSSPPPSQPLCFLLNDNGL---ITIGEAPT-----
SUB1B        -----PPLPAPSQAFFCFLLDDDDDDGVARGNSPASSSAP-----
RAP2.3       YTPPPSSPRSTDQPPAKKVCVVSQSES-----
Bradi1g17960 -----PPPGDEVVHR-----
RAP2.12      VKANLQKPVAKPNPNP SPALVQNSNISFENMCFMEEKHQVSNNN-----
RAP2.2       KPNKSVTLVQQPTHLSQQYCNNSFDNSFGDMSFMEEKPQMYNNQ-----
Bradi4g31040 NSAKLTT PPNTCDDES FSHLSNADNDFAMFAFD DKKVPAKPDE-----
HRE2         ---VEEADTKPGGNQNELIS-----
Bradi2g11890 LASSPATAAAAAPPAVLSSFKKEEDA EFGSVA-----
Bradi1g72450 LGTRKRGRAADPVAKATPVVDLVHEDAAAADAHRS SGMKHEAAE-----
Bradi2g27920 AAVEEAKKRRTKAAAVESSCS-----

```

```

SNORKEL1 ----- ELLPMEPELVSATQS -----
SNORKEL2 ----- AAAPPQAVDTPAAAA -----
Bradi1g72457 ----- FLDLAASVAELPPVII GSSSFADS -----
Bradi3g60120 LPFVQPDDMPFV PAMNSAVPIGAPCMNLYSDQGS --- NSFGCSDLGWDCDKTPDITTSV
Bradi1g46690 ----- MSFMPVMNAVEAPFMNLS SDQGS --- NSFSCSDFSWENDIKTPDITSV
HRE1 ----- TLLIDTQWL EDIIMG -----
SUB1C ----- ERSPSTTTTTT PSAE -----
SUB1A ----- DDAASTSTSTTEAS -----
SUB1B ----- DRASACTTSSTV ASG -----
RAP2.3 ----- ELSQSPFPVECI GFG -----
Bradi1g17960 ----- GTAMAPLPWYYDDGDG -----
RAP2.12 ----- NNQFGMTNSVDAGCNGYQY FSSD - QGSNSFDCSEFGWS DQAPI TPDISS
RAP2.2 ----- FGLTNSFDAGGNGYQY FSSDQGSNSFDCSEFGWS DHGPKTPEISS
Bradi4g31040 ----- SGDFLTQAKPLVPTETFGM NMLS DQSSNSFGSTDFGW DDEAMT PDYTSV
HRE2 ----- ENQVESLSEDLMA -----
Bradi2g11890 -----
Bradi1g72450 ----- SSESSGSALPDFS WQMSASA -----
Bradi2g27920 ----- SSPLPATSTGGGG -----

SNORKEL1 ----- VHGDDEPWG ----- LDKYMRFLSEV -----
SNORKEL2 ----- AGVELTSL L ----- CSVAAQAQEVSDGW EFI -----
Bradi1g72457 ----- AGGAATRGF ----- ADELE --- FDPFM-LCELP -----
Bradi3g60120 -APISTIV --- EGF EYAVVK --- GNTQD-SV VPPVME T NTV DHTNV
Bradi1g46690 LASIPTST --- EVDES AFLQ --- NNANN-AALPPVMGNANVD ---
HRE1 ----- DANKKHEPN ----- DSEEANNVDASLLSEEL LAFENQT -----
SUB1C ----- DSGDSRILI ----- ECCSD-DL MDSL LAAFDMT -----
SUB1A ----- GDARIQL ----- ECCSD-DVMDSL LAGYDVA -----
SUB1B ----- ERGDELILL ----- ECCSD-DVMDSL LAGFDVS -----
RAP2.3 ----- NGDEFQNL S ----- YGFEPDYDLKQQ ISSLESFLELD -----
Bradi1g17960 ----- VSGLCRHPY ----- DVAGN --- DVVTADEGPA -----
RAP2.12 AVINNNSALFFEEANPAK K LK --- SMDFETPYNNT -----
RAP2.2 MLVNNNEASFVE-ETNA AKK LK --- PNSDE --- SDDL MAYLDNA -----
Bradi4g31040 FVPDAPYSKVAYLEGGAPK RMRINFGVDLSPQNDAPNLAQDISVFDPEMKYLPLP -----
HRE2 ----- LEDYMRFYQIP -----
Bradi2g11890 ----- CSGEAKELS ----- EELMAYENYMSFLGVP -----
Bradi1g72450 --- LPEIEQQLGC GGA AKRPR --- AAEDTDEASADDS DALFDGLYFA -----
Bradi2g27920 ----- GGAERLR --- EMSG --- LEAFLELENPA -----

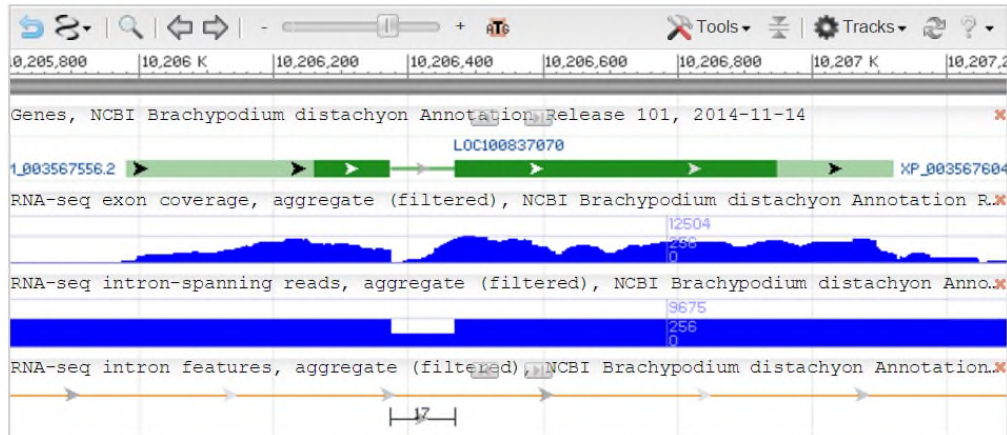
SNORKEL1 ----- ELDDGGAPLPPPPSQHG G V --- AAAGSPQYGC RYDYL L LMM
SNORKEL2 ----- QELL L LGGGV SPLDY L NGQE LAGAAVGD LWS --- F -----
Bradi1g72457 ----- WSESDTCESIEGLFAGDAVQDAGG VNT --- GMDSVSLWS --- FDFPMDA
Bradi3g60120 LETNPVDPTSG LADLEPLLKFLLEEDAGESIDSFLNLDE --- SQDVNGLWS --- FDDL-ISS
Bradi1g46690 ----- IADLEPYMKFLMDSGSD EIDSMLSCDG --- SPDAVDLWT --- FDDMPMSA
HRE1 ----- EYFSQMPFTEGNCSSTSLSLFD --- GGNDMGLWS -----
SUB1C ----- TGD MRFWS -----
SUB1A ----- SGDDIWTWTSGASSTS VNQEIK --- TPSIHQNIS --- YAGEA ---
SUB1B ----- SE --- PRSVLGMVN -----
RAP2.3 ----- GNTAEQPSQLDE --- SVSEVDMWM --- LDDVIASY
Bradi1g17960 ----- AAAAYVHHQMP PQHQQQ --- QEAGLELWS --- FDDNINMA
RAP2.12 ----- EWDASLDFLNEDAVTTQDN --- GANPMDLWS --- IDEIHSMI
RAP2.2 ----- LNDTPLEVEAMLGADAGAVTQE --- EENPVELWS --- LDEINFML
Bradi4g31040 ----- YVGSSSRSM DNLVVDVMQD --- GASNVQVWG --- LDELLMAA
HRE2 ----- VADDQS --- ATDIGNLWS --- YQDSN ---
Bradi2g11890 ----- YMQGGDTAAPAAEEAP --- APAPAALWS --- FEDY ---
Bradi1g72450 ----- QDPFAFFDGGAYESLDCLFSGDAVQSNANAA --- ADETVGLWS --- FDDDC LVD
Bradi2g27920 ----- GV --- GEDV DLMFE -----

```

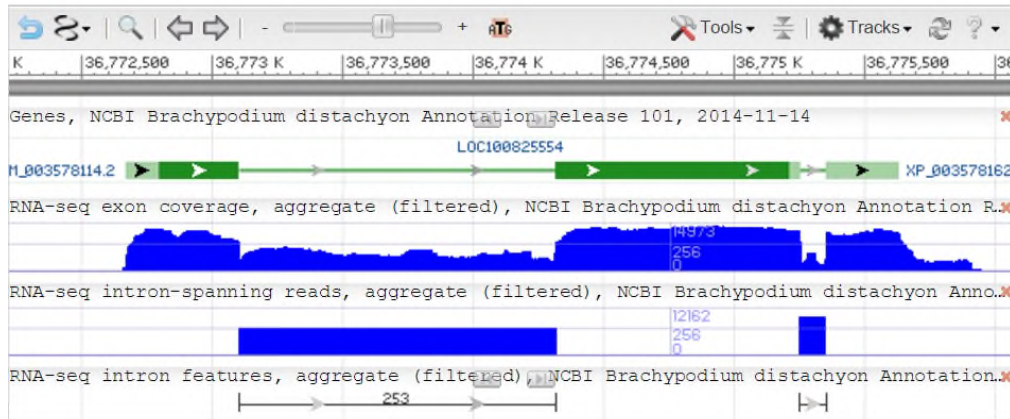
SNORKEL1	CN-----
SNORKEL2	-----
Bradi1g72457	AAF-----
Bradi3g60120	DFY-----
Bradi1g46690	GFY-----
HRE1	-----
SUB1C	-----
SUB1A	-----
SUB1B	-----
RAP2.3	E-----
Bradi1g17960	VSM-----
RAP2.12	GGVF-----
RAP2.2	EGDF-----
Bradi4g31040	GAY-----
HRE2	-----
Bradi2g11890	-----
Bradi1g72450	ESSLSFKSTQPT
Bradi2g27920	-----

Apéndice J: Regiones genómicas NCBI

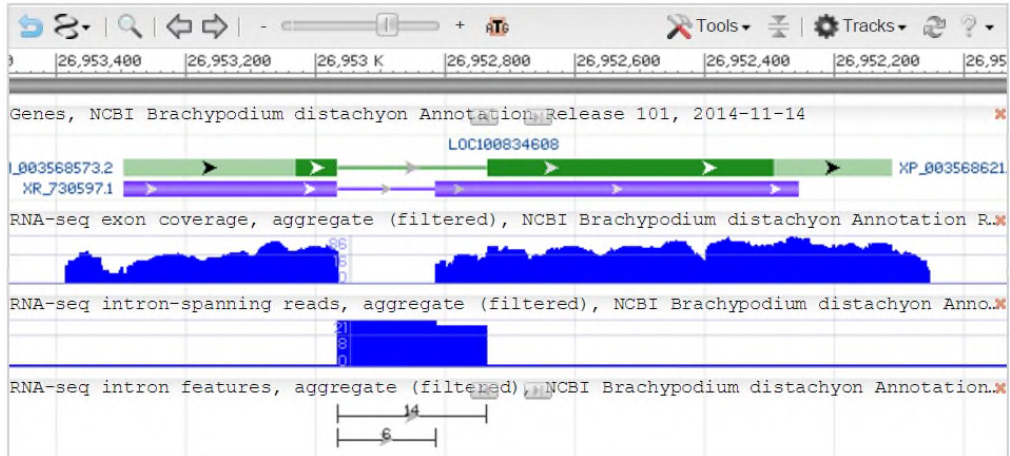
Bradi2g11890.1/XP_003567604.1/NC_016132.1



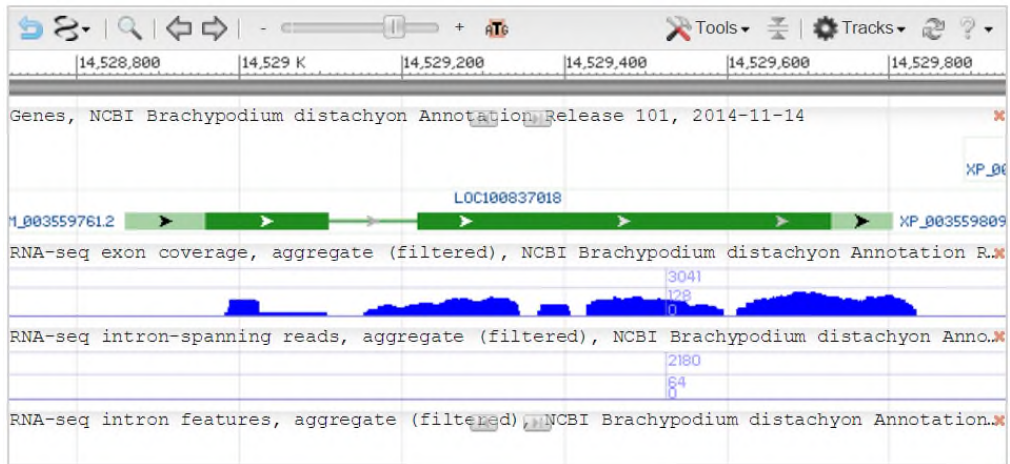
Bradi4g31040.1/XP_003578162.1/NC_016134.1



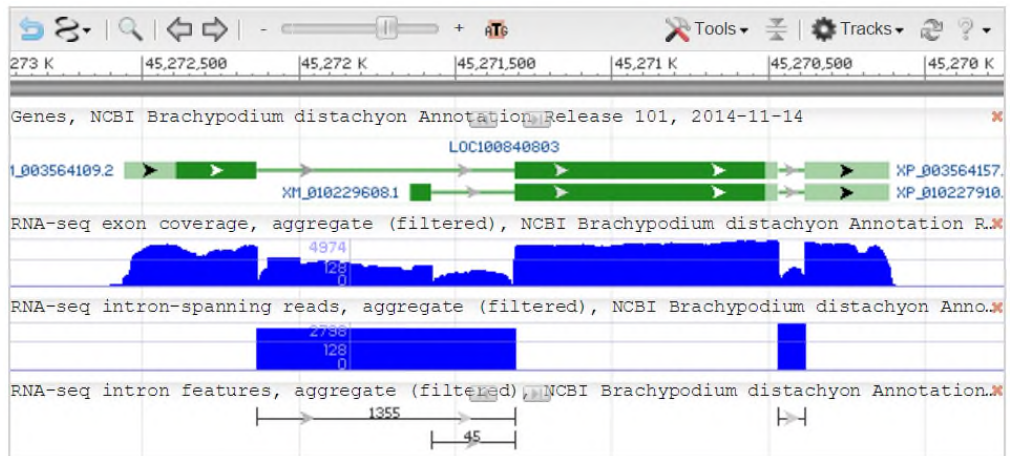
Bradi2g27920.1 /XP_003568621.1/NC_016132.1



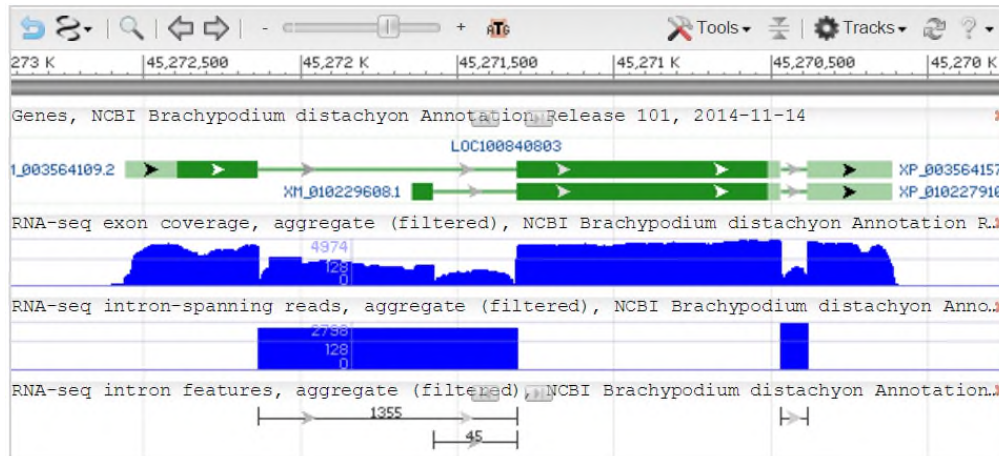
Bradi1g17960.1 /XP_003559809.1/NC_016131.1



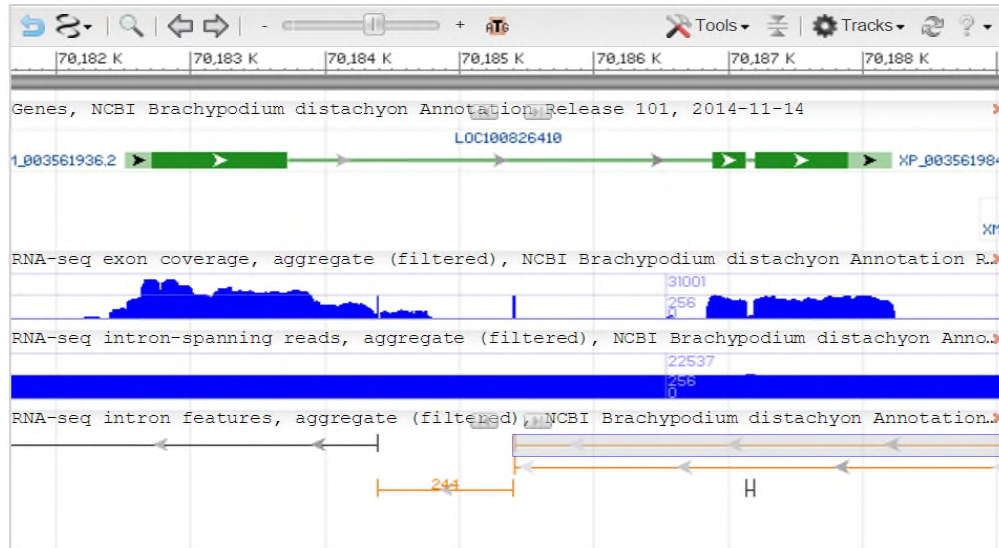
Bradi1g46690.3 /XP_003564157.1/NC_016131.1



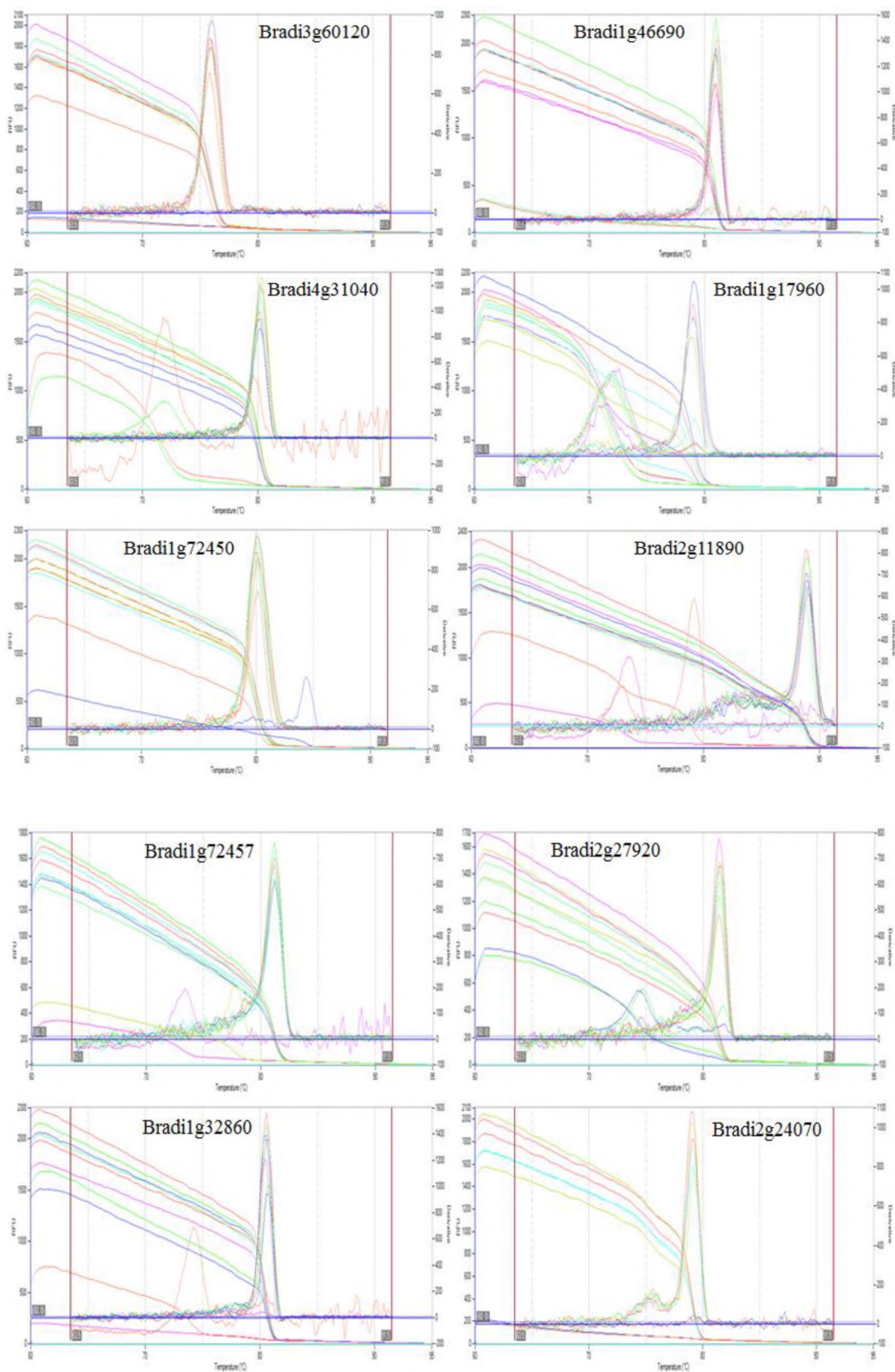
Bradi3g60120.3 / XP_010236158.1 / NC_016133.1



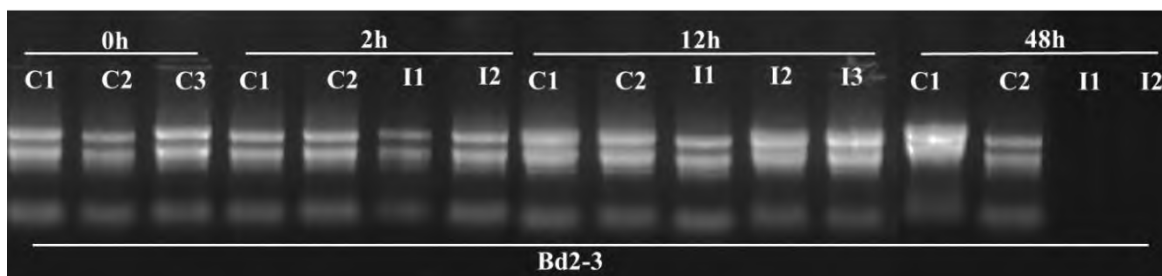
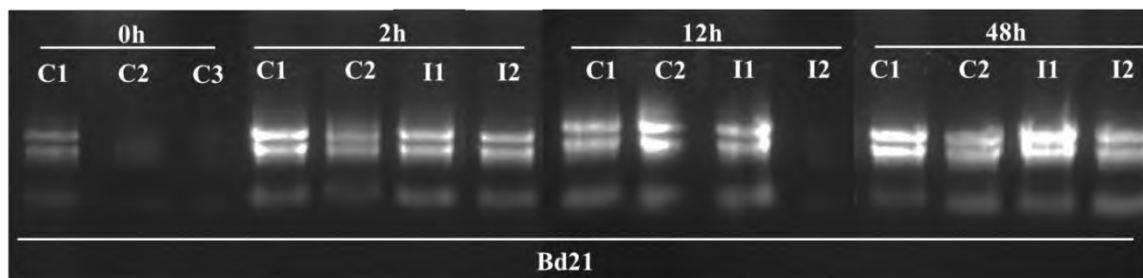
Bradi1g72450.1 / Bradi1g72457.1 / XP_003561984.2



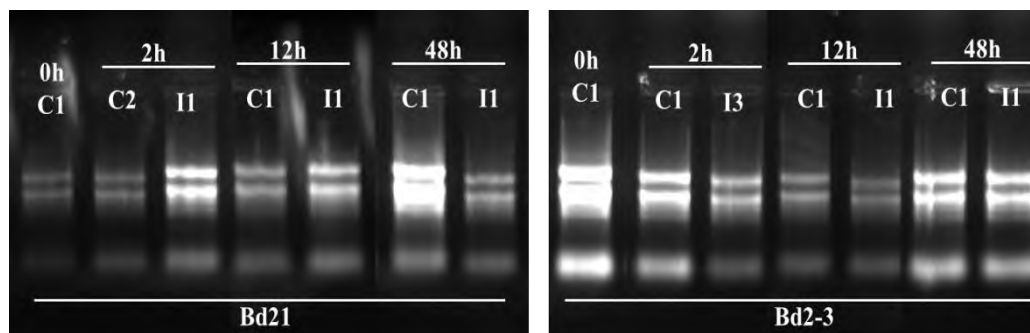
Apéndice K: Curvas Melting obtenidas en este trabajo.



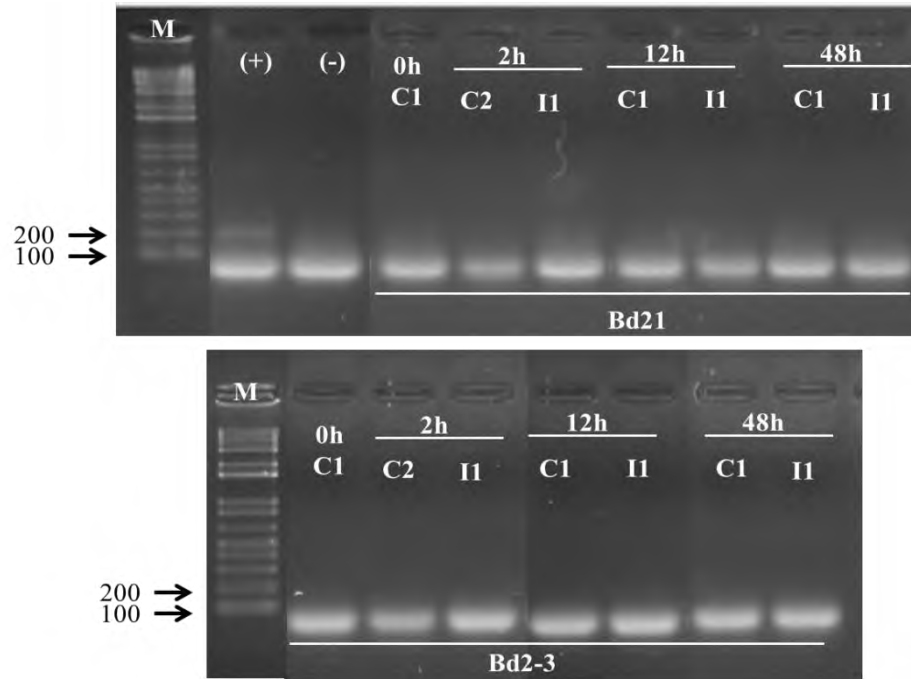
Apéndice L: Imágenes de la primera prueba



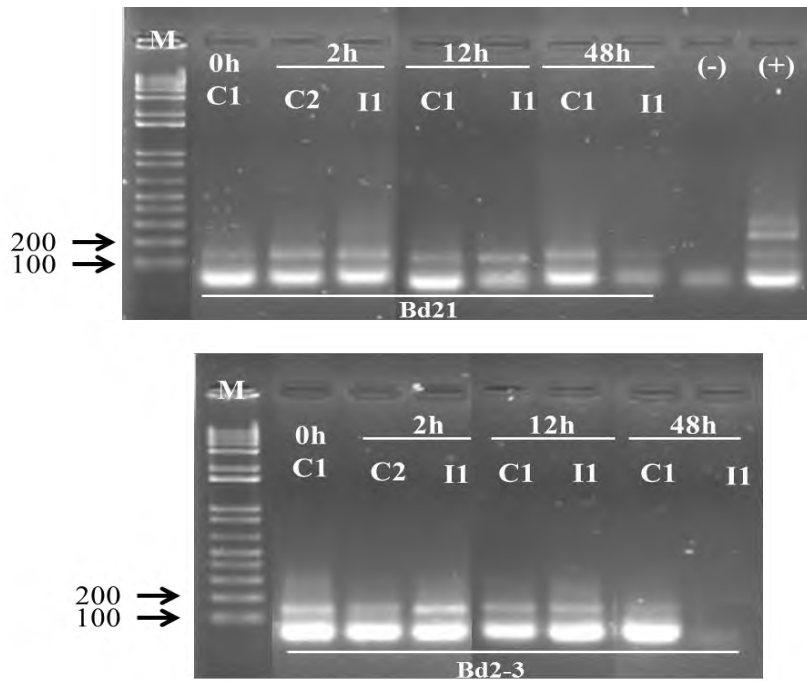
RNA de *Brachypodium* en electroforesis de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 en gel de agarosa al 1% para la extracción de RNA con Trizol C: control; I: plantas sometidas a inundación.



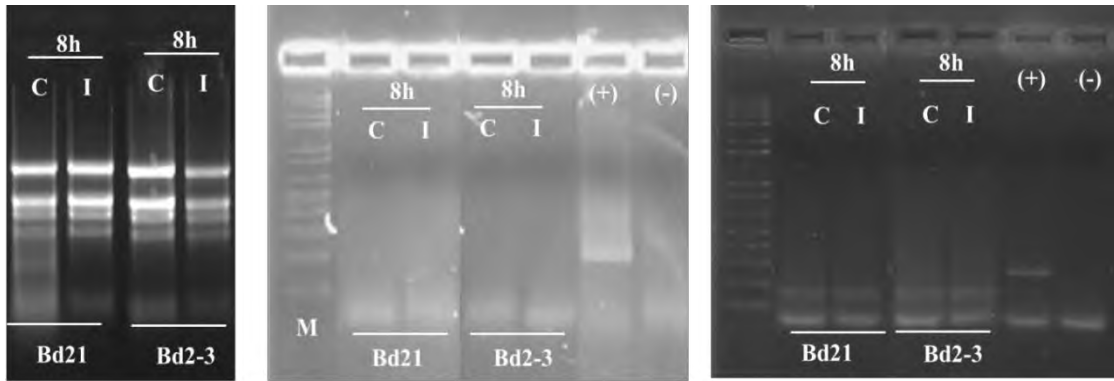
RNA de *Brachypodium* en electroforesis de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 en gel de agarosa al 1% para la purificación de RNA con Direct- zol. C: control; I: plantas sometidas a inundación.



PCR para la verificación de la ausencia de gDNA en las muestra de RNA de Bd-21 y Bd-2-3, se utilizó como control constitutivo *ACT*; M: marcador de peso molecular; C: control; I: plantas sometidas a inundación; control positivo (+): gDNA de Bd21 1:50; control negativo (-): reacción con H₂O.



Verificación del cDNA en muestras de Bd21 y Bd2-3, se utilizó como control constitutivo *Bradi4g31040*; M: marcador de peso molecular C: control; I: inundación; control positivo (+): gDNA de Bd21 1:50; como control negativo (-): reacción solo con H₂O.



Geles de agarosa para las muestras de 8 h; izquierda: RNA de *Brachypodium* en electroforesis de los ecotipos Bd21 y Bd2-3 en gel de agarosa al 1% para la extracción de RNA mediante el kit; centro: PCR para la verificación de la ausencia de gDNA en las muestra de RNA de Bd21 y Bd2-3, se utilizó como control constitutivo *UBI*; derecha: Verificación de cDNA, se utilizó como control constitutivo *Bradi4g31040*; M: marcador de peso molecular C: control; I: plantas sometidas a inundación; control positivo (+): gDNA de Bd21 1:50; como control negativo (-): reacción solo con H₂O.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 17 de Diciembre del 2015 a las **12:00 hr**, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Identificación y estudio de la expresión de los Factores de Respuesta al Etileno del Grupo VII *Brachypodium distachyon* que participan en la respuesta al estrés por inundación** presentado por la alumna **Teresa Zamora Hernández**, con número de matrícula **10090028**, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.**

Tuxtepec, Oax., a 18 de Diciembre del 2015.

ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA

Asesor de Tesis

Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor-Investigador

Presidente

Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor-Investigador

Secretario

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Profesor-Investigador

Vocal

Dr. Edgar García López
Profesor-Investigador