



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Facultad de Ciencias Biológicas

Centro de Investigación en Biotecnología



**Análisis estructural y funcional de la familia  
TFIIB de *Arabidopsis thaliana* durante el desarrollo y en  
condiciones de estrés abiótico**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

**P R E S E N T A**  
**M. en B. JOSÉ ANTONIO MIRANDA RÍOS**

**D I R E C T O R D E T E S I S**  
**DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ**

**CUERNAVACA,**

**MORELOS**

**2024**



**Laboratorio de Fisiología  
Molecular de Plantas**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. Ramón Suárez Rodríguez. Para la realización de los estudios de posgrado se contó con la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (316339).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al doctor Ramón Suárez Rodríguez, tutor de este proyecto, profesor investigador y titular del laboratorio de fisiología molecular de plantas (LFMP) del CeIB-UAEM, al doctor José Augusto Ramírez Trujillo, investigador del LFMP. A los miembros del comité tutorial de este proyecto, los doctores Edgar Dantán González, Irene de la Concepción Perea Arango, Mario Ramírez Yáñez, Verónica Obregón Barboza y Fernando Martínez Morales.

Al Centro de Investigación en Biotecnología, a las y los investigadores así como al personal administrativo que mostraron su apoyo y empatía en este proyecto.

A la educación pública y autonomía universitaria, fruto de la lucha social, a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Al doctor Gabriel Iturriaga de la Fuente.

## **DEDICATORIAS**

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, tantas personas que vienen a mi mente, con quienes compartimos sonrisas, comidas, ratos y hasta sinsabores, para con quienes se forjaron vínculos y que hay si bien no una amistad, si existen vínculos que nos permiten saludarnos con gusto de cuando en cuando.

Tengo en mi mente y en mi corazón a mis alumnos con quienes se han forjado amistades y alianzas a lo largo de años, siempre han sido mi prioridad y en ustedes pongo esperanzas para un país mejor.

A mis amigos, los hermanos del alma, Mau, Gibil, Alex, Javier y sus apreciables y hermosas familias, gracias por su amor tan incondicional, como un rayo, es un hermoso acontecimiento intangible, pero perceptible.

A mis padres y mi hermano, ya tan sólo su mera presencia y existencia permitieron esta culminación, sirva este documento un reconocimiento a su apoyo, si bien es meramente intelectual y no material, igual tiene un alto costo y es inversión. Y desde luego, a mi pareja, gracias, Maru, por llegar a mi vida.

Anh ấy đưa ra những lời này được viết dưới ánh sáng của đôi mắt, Rototo Xe tăng chiến tranh!

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	10
1. Calentamiento global.....	10
2. Importancia de las plantas.....	11
3. Estrés en plantas y seguridad alimentaria.....	12
4. Importancia de <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo de estrés.....	13
5. Mecanismos de respuesta al estrés.....	14
5.1. Percepción, receptores y sensores de estrés abiótico.....	16
5.2. Transducción de señales, segundos mensajeros y señalización .....	16
5.3. Hormonas.....	16
Ácido Abscísico (ABA).....	17
Ácido salicílico (AS).....	17
Auxinas y Giberelinas (GAs).....	18
Citoquininas (CKs).....	18
Brasinosteroides (BRs).....	18
Etileno (Et).....	19
5.4. Solutos compatibles.....	19
Ciclitoles.....	20
Prolina.....	20
Glicinbetaína.....	20
Manitol.....	21
Pinitol.....	21
5.5. Azúcares.....	21
trehalosa.....	22
5.6. Proteínas, elementos en trans, efectoras y reguladoras.....	22
Proteínas abundantes en embriogénesis tardía (LEAs).....	22
Clasificación de las LEAs.....	22
Acuaporinas.....	24
Proteínas de choque calórico (HSPs).....	24
Clasificación de las HSPs.....	25
Proteasas e inhibidores de proteinasas.....	25
5.7. Ácidos nucleicos, elementos regulatorios en <i>cis</i> (CRE) relacionados al estrés.....	25
Elementos de respuesta a deshidratación (DRE).....	26
Elementos de respuesta a ABA (ABRE).....	26
Elementos de acoplamiento (CEs).....	26
6. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	27
6.1. Factores Generales de la transcripción (GTFs) y <i>TFIIB</i> .....	27
6.2. Factores de transcripción (TFs) relacionados al estrés.....	30
6.3. <i>Splicing</i> alternativo (AS) de TFs relacionados al estrés.....	30
7. JUSTIFICACIÓN.....	33
8. HIPÓTESIS.....	33
9. OBJETIVOS.....	33
9.1. Objetivo general.....	33
9.2. Objetivo particular.....	33



10. Mapa conceptual de la estrategia experimental.....	34
11. Diagrama de flujo de la metodología.....	35
Diagrama de flujo de la metodología ( <i>continuación</i> ).....	36
12. Materiales y métodos.....	37
A) Material biológico.....	37
1) Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
2) Cepas bacterianas.....	37
B) Tratamientos de estrés en las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	37
1) Salinidad.....	37
2) Calor.....	37
3) Deshidratación.....	37
C) Herramientas moleculares.....	38
1) Extracción de <i>RNA</i> y <i>qRT-PCRs</i> .....	38
2) Clonación de isoformas de <i>AtTFIIB1</i> .....	38
3) Análisis de expresión por microarreglos.....	38
III. RESULTADOS.....	39
13. Análisis <i>in silico</i> .....	40
14. Dominios presentes en miembros de la familia génica <i>AtTFIIB</i> .....	44
15. Análisis <i>in silico</i> de elementos en <i>cis</i> relacionados al estrés en la familia génica <i>AtTFIIB</i> .....	47
16. Caracterización de los elementos regulatorios en <i>cis</i> de la familia <i>AtTFIIB</i> .....	49
17. Análisis transcripcional de miembros de la familia <i>AtTFIIB</i> en condiciones control.....	59
18. Pruebas de estrés.....	60
19. Clonación de isoformas del transcrito <i>AtTFIIB1</i> .....	63
20. Análisis de las secuencias de los amplicones de <i>AtTFIIB1</i> .....	64
21. <i>qPCRs</i> en condiciones control.....	66
22. Cuantificación de la expresión en pruebas de estrés.....	67
A) <i>TFIIB1</i> en plántulas bajo estrés salino.....	67
B) <i>BRPs</i> en plántulas bajo estrés salino.....	68
C) <i>AtTFIIB1</i> y <i>BRPs</i> en estrés por calor, bajas temperaturas y deshidratación en plántulas.....	69
D) <i>AtTFIIB1</i> y <i>BRPs</i> en diferentes tejidos de plantas adultas sometidas a deshidratación.....	70
23. Consideraciones notables de <i>AtTFIIB1</i> .....	71
24. Análisis <i>in silico</i> del producto de empalme canónico y alternativo de proteínas <i>TFIIB1</i> .....	72
25. Microarreglos de las plantas mutantes insercionales en <i>TFIIB1</i> .....	73
26. Discusión.....	74
27. Conclusiones.....	77
28. Perspectivas.....	77
29. Referencias.....	78
30. Material suplementario.....	94
A) Links.....	94
B) Servicios Externos.....	95
C) Lista de <i>primers</i> .....	95
D) Esquema de selección y segregación de líneas homocigas.....	96
E) Microarreglos <i>SALK_084698C</i> .....	97
• Artículo indizado “ <i>Arabidopsis thaliana AtTFIIB1 gene displays an alternative splicing under different abiotic stresses</i> ” <i>Biologia plantarum</i> , 65: 255-264.	

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema general de la respuesta al estrés en plantas.....	15
2. Elementos involucrados en la formación del complejo de preinicio de la transcripción.....	27
3. Secuencia en el ensamble del complejo de preiniciación.....	28
4. Esquema de los elementos en cis del núcleo del promotor reconocidos por el <i>TFIIB</i> .....	29
5. Regiones de <i>TFIIB</i> que interactúan con los elementos <i>BRE</i> y la <i>RNA pol II</i> .....	29
6. Patrones de expresión de <i>AtTFIIB1</i> , <i>AtTFIIB2</i> , <i>AtBRP1</i> y <i>AtBRP2</i> .....	40
7. Patrones de expresión de <i>AtBRP3</i> , <i>AtBRP4</i> , <i>AtBRP5</i> y <i>AtBRP6</i> .....	41
8. Patrones de expresión de <i>AtBRF1</i> , <i>AtBRF2</i> , <i>AtBRF3</i> y <i>AtBRF4 CTD</i> .....	42
9. Patrones de expresión de <i>AtMEE 12</i> y <i>AtMEE 12 CTD</i> .....	43
10. Estructura génica de los miembros de la familia <i>TFIIB</i> de <i>Arabidopsis</i> .....	45
11. Representación en cajas y lineal de los dominios de la familia génica <i>TFIIB</i> .....	46
12. Secuencias consenso de los promotores de los miembros de la familia <i>TFIIB</i> de <i>At</i> .....	47
13. Tamaño de los promotores de la familia <i>TFIIB</i> .....	48
14. Abundancia de elementos en cis en los miembros de la familia <i>TFIIB</i> de <i>At</i> .....	57
15. Productos de <i>RT-PCR</i> de miembros de la familia génica <i>TFIIB</i> .....	59
16. Amplicones de <i>RT-PCRs</i> semi-cuantitativos de estrés abiótico .....	60
17. Amplificación en fondo genómico de <i>TFIIB1</i> .....	61
18. Amplificaciones de <i>TFIIB1</i> en templados de <i>cDNA</i> , .....	62
19. Amplificación de las dos posibles isoformas de marcos de lectura de <i>TFIIB1</i> .....	63
20. Análisis <i>in silico</i> de los amplicones de las isoformas de <i>AtTFIIB1</i> .....	65
21. Análisis de expresión por <i>qRT-PCR</i> de miembros de <i>TFIIB</i> bajo condiciones control en <i>At</i> ....	66
22. Análisis de expresión por <i>qRT-PCR</i> de miembros de <i>TFIIB</i> bajo estrés salino en <i>At</i> .....	67
23. Niveles de expresión de miembros de la familia <i>BRPs TFIIB</i> bajo estrés salino en <i>At</i> .....	68
24. Análisis de expresión por <i>qRT-PCR</i> de miembros de la familia <i>TFIIB</i> bajo frío .....	69
25. Análisis de expresión por <i>qRT-PCR</i> de miembros de la familia <i>TFIIB</i> por deshidratación.....	70
26. Modelo lineal de los probables productos de expresión de <i>AtTFIIB1</i> .....	71
27. Estructuras proteicas de las posibles isoformas de <i>TFIIB1</i> .....	72
28. Microarreglos de la línea mutante <i>SALK_084698C</i> .....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

1. Potenciales escenarios del forzamiento radiativo al final del siglo XXI.....	11
2. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>TFIIB1</i> ( <i>At2g41630</i> ).....	50
3. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>TFIIB2</i> ( <i>At3g10330</i> ).....	50
4. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>MEE 12</i> ( <i>At2g02955</i> ).....	51
5. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRP4</i> ( <i>At3g57370</i> ).....	51
6. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>MEE 12 CTD</i> ( <i>At4g01340</i> ).....	52
7. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRF4 CTD</i> ( <i>At4g19550</i> ).....	52
8. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRF2</i> ( <i>At2g45100</i> ).....	52
9. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRF-like</i> ( <i>At1g30455</i> ).....	53
10. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRP1</i> ( <i>At4g36650</i> ).....	53
11. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRP2</i> ( <i>At3g29380</i> ).....	54
12. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRP3</i> ( <i>At4g10680</i> ).....	54
13. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRF1</i> ( <i>At3g09360</i> ).....	55
14. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRP6</i> ( <i>At5g39230</i> ).....	55
15. Elementos regulatorios en <i>cis</i> en el promotor del gen <i>BRP5</i> ( <i>At4g35540</i> ).....	56
16. Elementos regulatorios en <i>cis</i> de la familia génica <i>AtTFIIB</i> agrupados.....	58

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxi-ribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>AS</b>	Alternative splicing
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate, trifosfato de adenosina
<b>CBL-CIPK</b>	Calcineurin B-like proteins (CBL)-CBL-interacting protein kinases (CIPK), Proteínas tipo calcineurinas B, Protein-cinasas de interacción con CBL
<b>BRE<sup>d</sup></b>	B recognition element downstream, Elemento de reconocimiento de B "río abajo" secuencia adyacente a caja TATA
<b>BRE<sup>u</sup></b>	B recognition element Upstream, Elemento de respuesta de B "río arriba" secuencia adyacente a caja TATA
<b>CO<sub>2</sub> eq</b>	Equivalentes de CO <sub>2</sub>
<b>FR</b>	Forzamiento radiativo
<b>GHG</b>	Greenhouse gas, Gas de efecto invernadero
<b>IPCC</b>	Intergovernmental Panel on Climate Change, Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático
<b>GTF</b>	Factores gene
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase, proteína cinasa activada por mitógeno
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina dinucleótido Fosfato + Ión hidruro
<b>NMD</b>	Nonse Mediated Decay, Sistema que detecta transcritos con codones de para prematuros para ser eliminados
<b>NPP</b>	Net Primary Productivity, Productividad Primaria Neta
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
<b>PTC</b>	Premature termination Codon, Codón de Paro prematuro
<b>RCP</b>	Representative Concentration Pathways, Trayectorias de Concentración Representativa
<b>RNA pol II</b>	RNA polimerasa II
<b>RUST</b>	Regulated Unproductive Splicing and Translation, Sistema que usa el NMD para detectar transcritos no productivos para su eliminación
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la polimerasa acoplada a Transcriptasa Reversa
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en Cadena de la polimerasa cuantitativa acoplada a Transcriptasa Reversa
<b>snRNP</b>	Small nuclear ribonuclearproteins, Ribo-nucleo-proteínas pequeñas nucleares
<b>TMG</b>	Temperatura Media Global



## RESUMEN

El incremento de la temperatura media global del planeta debido a la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera provocará cambios en el entorno fisicoquímico de la pedósfera como desertificación, erosión, salinización y cambios en los patrones e intensidades en los patrones de lluvia, diversos estudios plantean diversos escenarios para final de la centuria los cuales en mayor o menor grado estiman la pérdida de miles de especies de plantas y animales así como el riesgo en la seguridad alimentaria debido al fallo en la sustentabilidad la cual depende de los cultivos de importancia agrícola. Estos efectos adversos en la biósfera y sus componentes biocenóticos como las plantas se verán afectados por condiciones meteorológicas como la sequía, en cambios químicos como la acumulación de sales en el suelo y electromagnéticos como la luz ultravioleta, generando incluso riesgo de extinción en especies sensibles y el riesgo en la seguridad alimentaria en el caso de la plantas de interés agrícola debido al bajo rendimiento generado por estos tipos de estrés abiótico o sus combinaciones.

Las plantas al ser organismos sésiles han desarrollado estrategias evolutivas para adaptarse condiciones específicas del entorno y estas se rigen por la selección natural durante periodos largos de tiempo en términos evolutivos como la sustitución de hojas por espinas, modificación de estomas, raíces profundas, acumulación de agua en raíces, preferencias en rutas metabólicas, por citar algunas; a la par de estas adaptaciones evolutivas especializadas, han desarrollado una batería de estrategias para contender o hacer frente a condiciones adversas súbitas del entorno permitiéndoles mecanismos de diversas respuestas como un “ajuste metabólico” que les permite adaptarse hasta que las condiciones medias del entorno se reestablezcan mediante la acumulación de metabolitos involucrados en el ajuste osmótico, mecanismos de contención como proteínas protectoras de estructuras celulares, péptidos involucrados en la acumulación de iones en contra de un gradiente y aumento de turgencia vacuolar, entre otros, todos estos mecanismos obedecen a un “circuito biológico” de señalización, transmisión y amplificación de la señal hasta el núcleo, en donde se genera un cambio en la expresión genética de activación y supresión en la expresión de diversos genes cuya consecuencia será la “adaptación *de novo* o súbita a las condiciones externas, con una mayor probabilidad de supervivencia.

Estos mecanismos de expresión génica pueden ser generales o de respuesta específica y están comandados por un grupo de genes ampliamente distribuidos y conservados en los tres dominios biocenóticos, los cuales son indispensables para la homeostasis de todas las formas de vida hasta ahora conocidas ya que de su regulación dependen funciones generales para el correcto funcionamiento de una célula o un organismo o para contender contra condiciones de estrés. Los primeros son los llamados Factores Generales de la Transcripción y tan sólo en *Arabidopsis* se estima que existen alrededor de 1, 800 de estos factores, sin embargo, muy poco se sabe sobre su papel en respuesta a condiciones de estrés abiótico como sequía, calor y salinidad.

En este trabajo se reporta el estudio de miembros de la familia de los Factores Generales de la Transcripción *TFIIB* tales como *TFIIB1*, *BRP1*, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* en diversas condiciones de estrés abiótico como deshidratación, salinidad, calor y bajas temperaturas en diversos estadios de desarrollo y tejidos específicos de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, siendo el *Splicing* alternativo de *TFIIB1* por retención de intrón lo más relevante y novedoso que aporta esta investigación.

## **ABSTRACT**

The increase in the global mean temperature of the planet due to the accumulation of greenhouse effect gases in the atmosphere will cause changes in the physicochemical environment of the pedosphere such as desertification, erosion, salinization and changes in the patterns and intensities of rainfall patterns, several studies propose various scenarios for the end of the century which, to a greater or lesser degree, estimate the loss of thousands of species of plants and animals as well as the risk in food security due to failure in sustainability, which depends on crops of agricultural importance. . These adverse effects on the biosphere and its biocenotic components such as plants will be affected by meteorological conditions such as drought, in chemical changes such as the accumulation of salts in the soil and electromagnetics such as ultraviolet light, generating even risk of extinction in sensitive species and the risk in food safety in the case of plants of agricultural interest due to the low yield generated by these types of abiotic stress or their combinations.

Plants, being sessile organisms, have developed evolutionary strategies to adapt to specific environmental conditions. These are governed by natural selection for long periods of time in evolutionary terms, such as replacing leaves with thorns, modifying stomata, deep roots and water accumulation in roots, preferences in metabolic routes, to name a few; Along with these specialized evolutionary adaptations, they have developed a battery of strategies to contend or deal with sudden adverse environmental conditions, allowing them mechanisms of various responses such as a "metabolic adjustment" that allows them to adapt until the average environmental conditions are re-established. Through the accumulation of metabolites involved in osmotic adjustment, containment mechanisms such as protective proteins of cellular structures, peptides involved in the accumulation of ions against a gradient, and increased vacuolar turgor, among others, all these mechanisms obey a "circuit biological "signaling, transmission and amplification of the signal to the nucleus, where a change is generated in the genetic expression of activation and suppression in the expression of various genes, the consequence of which will be the" de novo or sudden adaptation to external conditions, with a higher chance of survival.

These gene expression mechanisms can be general or specific response and are commanded by a group of genes that are widely distributed and conserved in the three biocenotic domains, which are essential for the homeostasis of all forms of life known so far since their regulation depends on general functions for the proper functioning of a cell or an organism or to contend against stressful conditions. The first are the so-called General Transcription Factors and only in *Arabidopsis* it is estimated that there are around 1,800 of these factors, however, very little is known about their role in response to abiotic stress conditions such as drought, heat and salinity.

This work reports the study of members of the family of General Transcription Factors TFIIIB such as *TFIIB1*, *BRP1*, *BRP2*, *BRP3* and *BRP4* in various abiotic stress conditions such as dehydration, salinity, heat and low temperatures in various stages of Development and specific tissues of the model plant *Arabidopsis thaliana*.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La temperatura media global del planeta tierra está incrementando a una razón de entre  $\sim 0.1^{\circ}\text{C}$  y  $\sim 0.3^{\circ}\text{C}$  por década después de la era industrial, esta diferencia entre las temperaturas medias actuales con respecto a las anteriormente registradas a la era industrial se le llama calentamiento global, esto debido a las altas concentraciones de gases de efecto invernadero presentes en la atmósfera, siendo el  $\text{CO}_2$  el de mayor concentración, lo que traerá como consecuencias el calentamiento de la pedósfera provocando un aumento en la fuerza radiativa del planeta, generando el llamado efecto invernadero, este aumento en la temperatura media global tendrán efectos adversos en los sistemas biológicos, se estima que para el año 2050 se extinguirán entre 20,000 y 70,000 especies vegetales como consecuencia directa de las alteraciones del entorno físico-químico debido al cambio climático.

Las modificaciones del entorno fisicoquímico que se desvían de la tendencia y que influyen de manera adversa a un sistema biológico como lo es una planta se conocen en conjunto como estrés abiótico, cuyas consecuencias fisiológicas, bioquímicas, celulares y moleculares son diferentes de las observadas bajo condiciones óptimas. Dentro de las condiciones de estrés abiótico más comunes que comprometen el desarrollo idóneo encontramos la sequía y la salinidad, las cuales de acuerdo con la intensidad-concentración, periodo de exposición, combinaciones con otros factores y estadio de desarrollo de la planta puede comprometer incluso la sobrevivencia de esta.

Las plantas responden a estas variaciones del entorno para mantener su homeostasis a partir de varios procesos de expresión génica, con repercusión a nivel bioquímico, celular y fisiológico. El esquema general inicia con la percepción de la señal derivada del estrés, la cual es transferida al núcleo en donde un conjunto de elementos regulatorios en *cis* y en *trans* constituyen la maquinaria que regula los cambios en la expresión génica para contender contra el estrés, existen dos grandes categorías de los elementos en *trans*; los primeros son el producto de los genes de respuesta; los llamados “efectores” y que están involucrados en contrarrestar directamente el estrés, por ejemplo, genes que codifican para proteínas tipo *LEAs*, chaperonas, proteínas canal, enzimas de diversas funciones, entre otras; por otro lado, están los genes involucrados en las vías de señalización y regulación de la expresión, este último proceso es el que finalmente estará coordinando la expresión de una gran diversidad de genes que constituyen el intento de la planta para mantener las condiciones internas óptimas ante las adversidades del entorno, estos elementos en *trans* que son clave para la regulación de la expresión bajo regímenes de estrés, son los llamados factores de transcripción, los cuales son los principales reguladores del control transcripcional.

Se estima que *Arabidopsis* posee cerca de 1,800 factores de transcripción, aproximadamente 7% del genoma de esta planta. Además de existir factores específicos para diversas condiciones, existen los llamados factores generales de la transcripción, los cuales se consideran indispensables para el desarrollo óptimo de la planta. Aunado a esto, la diversidad y funciones pueden verse incrementadas por procesos de edición alternativa del transcrito que pueden generar proteínas con funciones, localizaciones o interacciones diferentes a las formas canónicas.

Reportes previos demuestran que el factor de transcripción general *TFIIB* está involucrado en la respuesta a estrés abiótico en levadura, cítricos y tilapia. En este trabajo se reporta el análisis de expresión en condiciones de estrés de algunos miembros de la familia *TFIIB* como *TFIIB1*, *BRP1*, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* en *Arabidopsis thaliana*. El análisis de las regiones promotoras demostró que



poseen diversos elementos de respuesta a estrés, mientras que el análisis transcripcional mediante microarreglos de líneas mutantes insercionales en *TFIIB1* y *BRP4* muestra diversos genes regulados significativamente, los análisis por *RT-PCR* muestran que *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* son preferencialmente expresados en tejidos de flor, mientras que *TFIIB1* y *BRP1* son constitutivos, además, *TFIIB1* exhibe un *splicing* alternativo mediante la retención del tercer intrón bajo condiciones específicas de estrés salino, calor y deshidratación, generando un marco de lectura con un codón de término prematuro. y que pudiera ser regulado transcripcionalmente por el sistema *Regulated Unproductive Splicing and Translation (RUST)* o de traducirse, estaría actuando como un péptido de interferencia al carecer de un dominio ciclina, pudiendo tener funciones regulatorias en los procesos de expresión génica bajo estrés abiótico en un amplio y vasto número de genes dependientes de la *RNA pol II* y genes poseedores de caja TATA en sus promotores.

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. CALENTAMIENTO GLOBAL**

En 1960 Charles Keeling (Keeling, 1960) alertó por primera vez sobre el incremento en la concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera y su correlación con el incremento de la temperatura media global (TMG), actualmente existen cuatro plausibles escenarios considerados por el IPCC (Allen, et al., 2018; [www.ipcc.ch/](http://www.ipcc.ch/)) para estimar las concentraciones de  $\text{CO}_2$  y la TMG para el año 2100, estos parámetros llamados “Trayectorias de concentración representativas” (RCP) contemplan las probables concentraciones de los gases de efecto invernadero (GHG) que pudieran presentarse al final del siglo XXI y sus efectos en la TMG. Tales índices consideran las concentraciones de diversos GHG en ppm usando  $\text{CO}_2$  eq como referencia por ser el GHG con mayor concentración en la atmósfera, el cual es derivado de actividades antropogénicas (Walsh, et al., 2014) y cuya presencia en la atmósfera genera un aumento en el índice del forzamiento radiativo (FR) total del planeta expresado en  $\text{Watts m}^{-2}$  favoreciendo un aumento en la temperatura de la pedósfera por su capacidad de retención de energía infrarroja. El primer escenario plantea una posible mitigación y reducción en la concentración de los GHG en 421 ppm y proyecta un FR de  $2.6 \text{ W m}^{-2}$ , a este primer escenario se le llama RCP2.6 (van Vuuren et al., 2006; 2007); dos escenarios de estabilización RCP 4.5 (Smith and Wigley; 2006; Clarke et al., 2007; Wise et al., 2009) y RCP6 (Fujino et al.; 2006; Hijioka et al., 2008) y uno final que sigue la tendencia actual del incremento de las emisiones de GHG llamado RCP 8.5 (Rao & Riahi; 2006; Riahi et al., 2007; 2011) los cuales se muestran en la tabla 1.

Estos cuatro posibles escenarios tienen en común la clara tendencia en que la acumulación de los GHG (Sillmann, et al., 2017) aumentarán la TMG de la superficie del planeta, cuyas estimaciones oscilan entre  $\sim 0.9^\circ\text{C}$  (RCP2.6) y  $\sim 5.4^\circ\text{C}$  (RCP8.5) al final del siglo, las cuales provocarán aumentos en la temperatura del aire, en la temperatura máxima diaria por mes (Wang, et al., 2017) generando sequías, desertificación y erosión en diversas zonas (Huang, et al., 2015), mientras que en otras el aumento en el volumen, intensidad y mayor prevalencia en los días de lluvia generando precipitaciones extremas e inundaciones ( Alexander, 2016, Dittus, et al., 2018) y finalmente el derretimiento de la criósfera aumentando el nivel oceánico (Mengel, et al., 2018, Overland, et al., 2018, Schlosser, et al., 2018).

**Tabla 1: Potenciales escenarios del forzamiento radiativo al final del siglo XXI; Modificada de [https://sedac.ciesin.columbia.edu/ddc/ar5\\_scenarioprocess/RCPs.html](https://sedac.ciesin.columbia.edu/ddc/ar5_scenarioprocess/RCPs.html)**

[ ]	Descripción	Modelo IA	Referencia
<b>RCP8.5</b>	Aumento del forzamiento radiativo 8.5 W/m <sup>2</sup> para el 2100.	MESSAGE	Riahi et al. (2007) Rao & Riahi (2006)
<b>RCP6</b>	Estabilización sin aumento a 6 W/m <sup>2</sup> y estable para el 2100	AIM	Fujino et al. (2006) Hijioka et al. (2008)
<b>RCP4.5</b>	Estabilización sin aumento a 4.5 W/m <sup>2</sup> y estable para el 2100	GCAM (MiniCAM)	Smith and Wigley (2006) Clarke et al. (2007) Wise et al. (2009)
<b>RCP2.6</b>	Pico en el forzamiento radiativo ~ 3 W/m <sup>2</sup> antes del 2100 y decreciente	IMAGE	van Vuuren et al. (2006; 2007)

## 2. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS

Las bases de datos “*The plant list*” ([www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)) y “*World flora online*” ([www.worldfloraonline.org](http://www.worldfloraonline.org)) estiman que existen más de 350, 000 especies de plantas, mientras que la “Estrategia Mundial para la Conservación de las Especies” (GSPC, <https://www.cbd.int/gspc/intro.shtml>) estima que pudieran estar en el orden de 400, 000 especies, por lo que las embriofitas constituyen el mayor grupo taxonómico de organismos terrestres; las plantas están involucradas de forma directa o indirecta en los ciclos biogeoquímicos de diversos elementos conformacionales de las macromoléculas que sustentan la materia viva, principalmente en el ciclo del carbono; la fotosíntesis, proceso que utiliza el carbono disponible en un entorno fisicoquímico como lo es la atmósfera en forma de CO<sub>2</sub> gaseoso de donde es tomado e incorporado a los sistemas biológicos y por ende a la biósfera mediante un proceso *redox* de transferencia de electrones que convierte energía proveniente del sol en energía química (*ATP* y *NADPH*) para después ser almacenada al sintetizar moléculas altamente energéticas como los azúcares, este sustento energético es transferido a todos los seres vivos mediante redes tróficas perpetuando y sustentando la vida en la superficie terrestre al transformar CO<sub>2</sub> en materia viva, la importancia de la fotosíntesis vegetal en la productividad primaria neta (*NPP*) y su conversión en biomasa en los ecosistemas terrestres es incluso mayor que la mediada por microorganismos fotosintéticos en los océanos (Field, *et al.*, 1998, Falkowski, *et al.*, 2008, Zehr & Kudela, 2009, Serret, *et al.*, 2015, Moran, *et al.*, 2016, Stein y Klotz, 2016, Hutchins & Fu, 2017).

La relevancia de las plantas en la biósfera radica en que, al ser productores primarios, son la base de las redes tróficas de cualquier ecosistema terrestre que dependa de luz solar y son por tanto el sustento de gran parte de las formas de vida de la geobiósfera, hace aproximadamente ~475 millones de años las embriofitas colonizaron la superficie terrestre y transformar el planeta (Porada, *et al.*, 2014, Shaw, 2015, Fischer, *et al.*, 2016, Lenton, *et al.*, 2016, Morris, *et al.*, 2018) mediante procesos evolutivos al desarrollar adaptaciones metabólicas y estructurales que les permitió colonizar la superficie terrestre y especializarse para en un amplio rango de condiciones físicas, químicas y radiativas que hoy podemos definir como biocenosis, es decir, los elementos abióticos de un ecosistema como son luz, humedad, temperatura, tipos de suelos, por citar algunos ejemplos (Kenrick & Crane, 1997, Gensel, 2008, Wellman, 2010, 2014, Edwards, *et al.*, 2014, Boyce & Lee, 2017, de Vries y Archibald, 2018) cuyas variaciones son mínimas o progresivamente lentas en

tiempos geológicos, permitiendo su adaptación a las nuevas condiciones. Al ser las plantas sistemas abiertos desde una perspectiva termodinámica, estas adquisiciones evolutivas favorecidas por la presión de selección de las condiciones del entorno también favorece las interacciones con otros seres vivos permitiendo un dinámico intercambio de materia y energía, las interacciones pueden ser básicamente neutrales, adversas o benéficas, estas últimas importantes para el sustento de la vida, ya que las plantas han coevolucionado con diversos organismos para favorecer y optimizar este flujo de materia y energía mediante interacciones benéficas tales como polinización, simbiosis, mutualismo y protooperación entre otras, estas relaciones eficientizan y maximizan la incorporación de elementos abióticos del entorno, formando parte de los ciclos biogeoquímicos de diversos elementos indispensables para la vida, tales como el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, el cual integra este elemento presente en la atmósfera a la materia viva mediante la fijación biológica del nitrógeno y cuya importancia sólo es equiparable con la fotosíntesis (Ahmad, *et al.*, 2019).

Diversos estudios han tratado de determinar los posibles efectos en las interacciones debido al aumento drástico en la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera y la *TMG*, modificando los patrones climáticos del mundo y afectando el desarrollo óptimo de las plantas y sus interacciones con otros seres vivos (Forrest, 2014, Crowther, *et al.*, 2015, Yuan y Chen, 2015, Meyerholt, *et al.*, 2016, Baldocchi, *et al.*, 2016).

### **3. ESTRÉS EN PLANTAS Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

Por lo antes mencionado y tomando en cuenta que las embriofitas son importantes para el sustento de virtualmente todas las formas de vida de la superficie debido a la incorporación de carbono en forma de azúcares y la fijación biológica de nitrógeno, constituyendo las principales fuentes de estas moléculas para el resto de los organismos heterótrofos, es importante señalar que alteraciones fisiológicas adversas como la pérdida de agua o la falta de disponibilidad de ésta pueden tener consecuencias catastróficas para el resto de los seres vivos que dependen de las plantas en las redes tróficas debido a un desajuste y desacoplamiento de diversos procesos biológicos, recientes estudios han demostrado que el incremento de la *TMG* incrementará las sequías por ausencia o disminución de precipitaciones, reducción de humedad relativa y evaporación, generando aridez (Berg, *et al.*, 2016).

Esta condición meteorológica provoca una disminución o ausencia de agua en suelo disminuyendo la disponibilidad para las plantas, a su vez, en éstas hay una mayor tasa de evapotranspiración de agua a través de los estomas provocando la salida del líquido de las células al espacio extracelular reduciendo la turgencia, esta deshidratación sistemática provoca la condición fisiológica de marchitez, lo que compromete el desarrollo óptimo de ésta debido a que la homeostasis y la energía son canalizadas a expresar mecanismos de sobrevivencia, los cuales, si son superados por una sequía intensa, varios episodios de exposición o acompañada de otros tipos de estrés como salinidad y factores inherentes a la planta como la etapa de desarrollo y la predisposición genética, entre otros, habrá fallo total, provocando la muerte de esta, estos factores abióticos externos se enlistan a continuación:

- Incremento de la temperatura
- Aumento de la evaporación, disminución o ausencia de precipitaciones
- Sequía, la sequía persistente se convierte en aridez

- Pérdida de agua en los sistemas biológicos por evapotranspiración, generando estrés abiótico
- Se genera una respuesta de contención
- Fallo parcial, la planta sobrevive, se compromete el rendimiento.
- Fallo total, la planta muere.

Por extensión, los cultivos de importancia agrícola también se verán afectados por las condiciones adversas derivadas del cambio climático poniendo en riesgo la seguridad alimentaria, al afectar de manera directa a cultivos para alimentación humana o indirecta al afectar cultivos forrajeros, aunado a esto, hay un constante aumento poblacional (Ehrlich, *et al*, 2015, Grafton, *et al.*, 2015, Crist, *et al.*, 2017), lo que a su vez genera mayor demanda de superficies de producción, por lo que existen tres principales factores involucrados que ponen en riesgo la seguridad alimentaria:

1. Incremento de la población humana mundial.
2. Mayor demanda de áreas destinadas a producción agrícola.
3. Fallo en el rendimiento de cultivos agrícolas debido al cambio climático.

Por lo tanto, el aumento en la *TMG* tendrá consecuencias como variaciones en los patrones de lluvia anuales, aumento de la temperatura promedio, olas de calor, proliferación de plagas y disminución de rendimiento (Raza, *et al.*, 2019). Diversos estudios han estimado un descenso gradual en la productividad global de los principales cultivos de importancia agrícola como trigo, arroz, maíz y soya para las próximas décadas hasta en un 40%, este bajo rendimiento está correlacionado con los cuatro posibles escenarios de concentración atmosférica de *GHG* y la *TMG* siendo la sequía la principal causa en la disminución en el rendimiento (Zhao, *et al.* 2017, Leng y Huang 2017, Leng y Hall, 2018). Por lo antes mencionado, es necesario elucidar los mecanismos moleculares que les permiten a las plantas hacer frente a las condiciones adversas del entorno y desarrollar cultivos de importancia agrícola capaces de tolerar el estrés abiótico en las próximas décadas y garantizar la seguridad alimentaria a nivel mundial.

#### **4. IMPORTANCIA DE ARABIDOPSIS COMO PLANTA MODELO DE ESTRÉS**

*Arabidopsis thaliana* es la primera planta cuyo genoma ha sido totalmente secuenciado (Schoof, *et al*, 2002, Cheng, *et al*, 2017), usada ampliamente como organismo modelo en biología vegetal, es miembro de la familia *Brassicaceae*, el pequeño tamaño de su genoma de aproximadamente 132Mb, alrededor de 38, 000 loci y codifica para más de 20, 000 proteínas y dispuesto en cinco cromosomas haploides, su facilidad de cultivo ofrecen importantes ventajas para la investigación básica en las áreas de desarrollo vegetal, biología celular, genética y biología molecular. ([https://plants.ensembl.org/Arabidopsis\\_thaliana/Info/Index](https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index), Woodward y Bartel, 2018).

El corto ciclo de vida de la planta, el cual incluye la germinación de la semilla, formación de roseta, desarrollo de la inflorescencia, floración, desarrollo de silicuas y maduración de semillas, completado en aproximadamente seis semanas. Las flores son de 2mm de largo, se autopolinizan y puede haber polinización cruzada artificialmente aplicando polen sobre la superficie del estigma, pueden crecer en cámaras de cultivo bajo condiciones adecuadas de luz, temperatura y humedad controlada. La floración comienza alrededor de la tercera semana de haberse sembrado y resulta en una progresión lineal de producción de flores y silicuas por varias semanas antes de iniciar la

senescencia, son fáciles de transformar genéticamente, hacer cultivos *in vitro*, además de que se cuenta con una colección de mutantes insercionales por T-DNA, es modelo ideal de diversas disciplinas además de la genómica como proteómica, metaboloma, transcriptoma, modelo de estrés biótico y abiótico (Carneiro, *et al*, 2015, Provar, *et al*, 2016).

Por tanto, Arabidopsis se ha consolidado en el ámbito científico como la planta modelo por excelencia, tan sólo en el año 2019 se registraron 4, 551 publicaciones científicas indizadas relacionadas a Arabidopsis en diversos rubros como respuesta a patógenos, caracterización de proteínas, desarrollo de estructuras reproductivas, regulación de hormonas, estructuras celulares, respuesta a estrés abiótico entre otros. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=arabidopsis>) además de que existen diversos sitios repositorios de secuencias y bancos de semillas las cuales están a disposición de los centros de investigación (<https://abrc.osu.edu/researchers>, <https://www.arabidopsis.org/>, <http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>, Tian, *et al*, 2019, Jin, *et al*, 2014, 2015, 2017).

##### **5. MECANISMOS DE RESPUESTA AL ESTRÉS**

Las plantas, por ser organismos sésiles, han desarrollado mecanismos evolutivos que les han permitido adaptarse a las condiciones específicas del entorno, como por ejemplo las plantas de fotorrespiración C4 y CAM, las cuales están más adaptadas a climas cálidos y secos con respecto a la mayoría de las plantas de metabolismo C3 (Yamori y Hikosaka, 2014, Bräutigam, *et al.*, 2017), poseen también adaptaciones físicas como la sustitución de hojas por espinas, raíces profundas y órganos reservantes producto de un proceso de selección natural a largo plazo, pero también poseen un bagaje genético que les permite responder *de novo* a nivel metabólico y excepcionalmente físico a variaciones súbitas o fuera del rango en los factores abióticos del entorno o combinaciones de estos para mantener la homeostasis, por ejemplo, todas las plantas responden a la falta de agua, ya sea con un ajuste osmótico, síntesis de osmoprotectores o proteínas chaperonas, pero la susceptibilidad, tolerancia y respuesta dependerá de la intensidad de la deshidratación, la cual, si excede los rangos limítrofes a la capacidad de respuesta, hay fallo y la planta muere, así, todas las plantas poseen mecanismos de respuesta a una deshidratación anormal o atípica que comienzan a salir de sus rangos idóneos, pero esta será diferente entre las especies adaptadas evolutivamente a un entorno cálido y seco con respecto a las adaptadas evolutivamente a un entorno lluvioso y húmedo. La figura 1 muestra un esquema general de la percepción, transducción y respuesta al estrés en plantas cuando sus rangos bióticos idóneos son alterados.



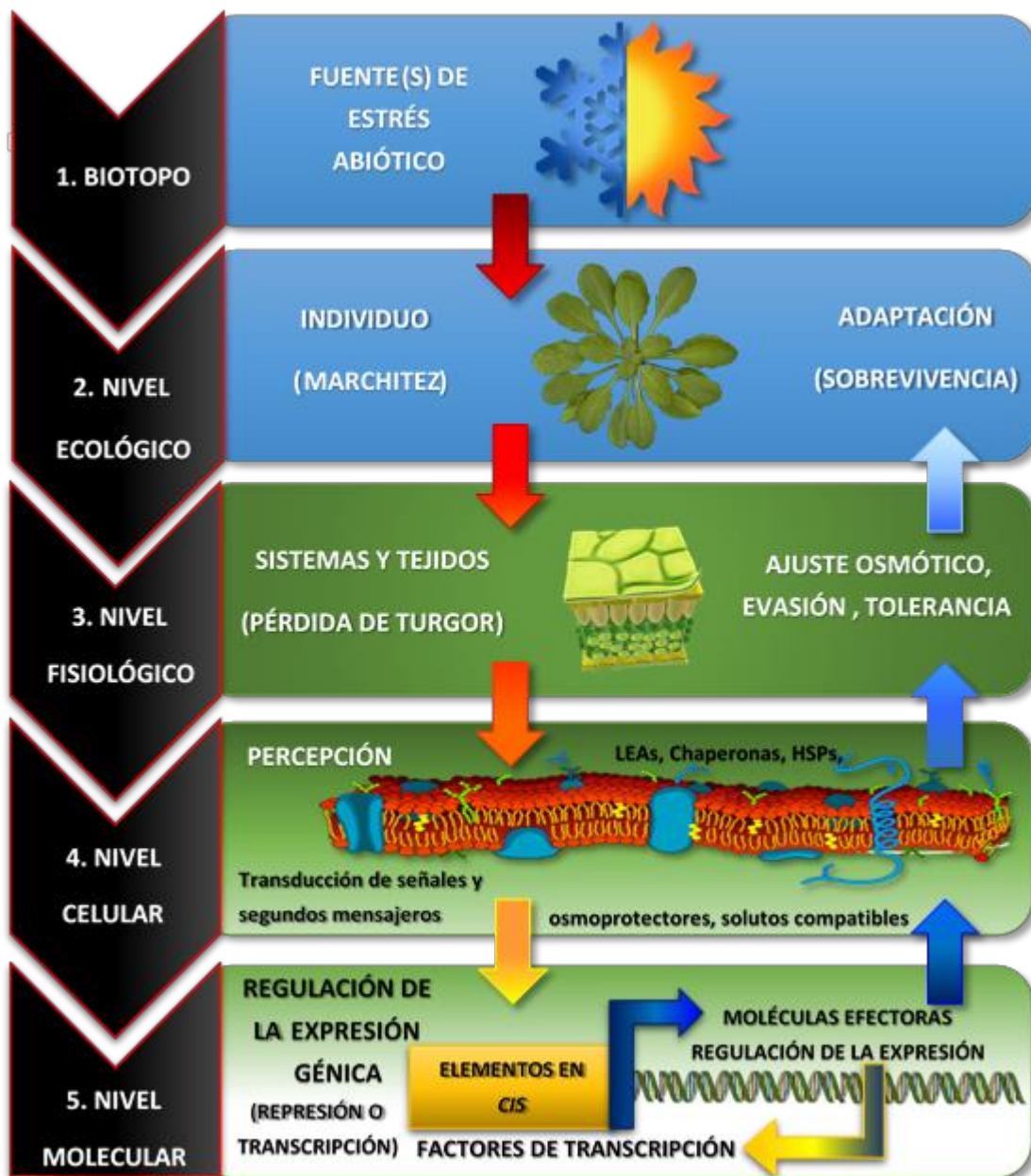


Figura 1: Esquema general de la respuesta al estrés en plantas en diferentes niveles de organización; 1. Biotopo, elementos abióticos de un ecosistema, cuando se genera un cambio en los patrones habituales de éstos, ejerciendo estrés sobre los sistemas biológicos, 2. La unidad mínima de un ecosistema es el individuo, la alteración en la homeostasis por cambios súbitos en los patrones físico-químicos comprometen el desarrollo óptimo, 3. A nivel fisiológico, hay pérdida de turgencia, 4. El cual se percibe a nivel celular, el mejor sistema caracterizado es el complejo CBL-CIPK, generando la cascada de transducción de señales, el cual depende principalmente del sistema MAP cinasas, llevando la señal hasta el núcleo, 5. A nivel molecular inician los cambios en la expresión génica dependiente de elementos en cis (secuencias regulatorias de ADN y RNAs regulatorios) y trans como factores de transcripción. Los productos se pueden dividir en dos grandes grupos, las moléculas efectoras, es decir, proteínas que están involucradas directamente en la tolerancia al estrés, mientras que el otro grupo son las que realizan cambios en la expresión génica, o activación de respuestas más específicas al estrés.

### **5.1. PERCEPCIÓN, RECEPTORES Y SENSORES DEL ESTRÉS ABIÓTICO**

Las plantas poseen diversos receptores-sensores para percibir condiciones adversas, tales como cinasas, proteínas G, fitocromos, etcétera, los cuales pueden estar asociados a una respuesta de estrés específica, sin embargo, un mecanismo de percepción de estrés más ampliamente caracterizado es el sistema *CBL-CIPK*, el cual es dependiente de  $Ca^{2+}$ , dicho complejo consta de las Proteínas tipo calcineurinas B (*CBL*) y sus ligandos, las proteína-cinasas de interacción con *CBLs* (*CIPK*) (Nuruzzaman, *et al.*, 2015). El complejo *CBL-CIPK* puede fosforilar postraduccionalmente diversas proteínas diana para contender contra el estrés abiótico de manera célula-específica o tejido-específico, por lo que se sabe que el complejo *CBL-CIPK* responde a “firmas de calcio”, las cuales son concentraciones de  $Ca^{2+}$  citosólico derivado de reservorios internos o del exterior como el apoplasto, estas “firmas de calcio” son determinadas por el tipo de estímulo y condicionan la frecuencia (periodo), amplitud y forma de la señal de calcio y están relacionadas con algún tipo de estrés abiótico y activando una respuesta ya sea dependiente de canales, sistemas antiporter o factores de transcripción según haya sido la “firma de calcio” precedente (Li, *et al.*, 2009, Sanyal, *et al.*, 2016).

### **5.2. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES, SEGUNDOS MENSAJEROS Y SEÑALIZACIÓN**

Los cambios fisicoquímicos en las cascadas de señalización de estrés depende principalmente de la familia y subfamilias de las proteínas quinasa activada por mitógeno (*MAPK*) las cuales transducen señales de estrés tanto intra y extracelular además de una amplia gama de condiciones de adversas, generando a su vez diversas respuestas, este mecanismo depende primordialmente de tres componentes, *MAPKKKs*, *MAPKKs* y *MAPKs* (enzimas involucradas en la transducción de señales) llevando a cabo las reacciones de fosforilación secuenciales de un receptor “río arriba” hacia un objetivo “río abajo” del proceso (Jaimi y Sinha, 2015). Este mecanismo de señalización de estrés está ampliamente distribuido y conservado en eucariontes incluyendo diversas especies vegetales, como *Arabidopsis*, donde se han caracterizado diversas familias de cada grupo de *MAPK*, se ha demostrado su relación a respuestas de estrés abiótico como altas y bajas temperaturas, salinidad, daño mecánico, anegación, calor, UV, choque osmótico, metales pesados, entre otros (Sinha, *et al.*, 2011) resultando al final en la activación de un grupo heterogéneo de proteínas efectoras como factores de transcripción, fosfolipasas, proteínas de citoesqueleto, proteínas asociadas a microtúbulos así como la expresión de grupos de genes asociados a un estímulo-respuesta específico e incluso “cruce” entre estos, (Taj, *et al.*, 2010, Smékalová, *et al.*, 2013).

### **5.3 HORMONAS**

Las hormonas vegetales tienen un rol relevante en todo el desarrollo vegetal, ya que las plantas al ser organismos sésiles deben mantener un constante reajuste homeostático con respecto al entorno, desde estructuras latentes como las semillas para la coordinación de germinación, pasando por el desarrollo vegetativo, hasta coordinar procesos harto complejos como la reproducción, por tanto, estas fitohormonas son una amplia gama de mensajeros químicos específicos y con una gran variedad de funciones dependiendo sus sitios de acción o localización, etapa de desarrollo, ligandos, receptores, elementos de respuesta, concentración, así como su interacción con otras moléculas señal y hormonas, por citar un ejemplo, la presencia de ácido abscísico en hojas favorece el cierre de estomas y senescencia de hojas (Esperança, *et al.*, 2019) mientras que en semilla promueve la síntesis de proteínas de reserva y retraso en la germinación (Zhao, *et al.*, 2018; Yan, *et al.*, 2019).

### **Ácido abscísico (ABA)**

Además de su amplio papel en desarrollo embrionario (Zhao, *et al.* 2017, Zhao, *et al.*, 2018), esta fitohormona está asociada a una respuesta a condiciones de estrés como sequía, bajas temperaturas, deshidratación, estrés osmótico y salinidad en una vía de señalización y respuesta llamada ABA dependiente, cuyos elementos en *cis* son llamados ABRE (ABA Binding Response Elements, elementos de respuesta a ABA) regulando en consecuencia grupos de genes involucrados en una respuesta al estrés que incluye Factores de Transcripción, segundos mensajeros y diversos efectores involucrados en ajuste osmótico, cierre de estomas y protección de estructuras celulares (Skubacz, *et al.*, 2016, Basu y Rabara, 2017, Dar, *et al.* 2017, Vardhini, 2017, Komatsu, *et al.*, 2020).

### **Ácido jasmónico (JA)**

El ácido jasmónico y sus derivados como el metil-jasmonato (MeJA), Isoleucina-ácido jasmónico (Ile-JA) y *cis*-jasmonato son moléculas que además de estar relacionadas con diversos procesos de desarrollo, crecimiento y morfología, son moléculas señalizadoras de estrés asociadas a un amplio número de condiciones adversas bióticas y abióticas como heridas o daño mecánico, sequía, salinidad, calor, luz, ozono, dióxido de carbono, metales pesados y estrés por micronutrientes (Ali, *et al.*, 2020; Wang, *et al.*, 2019) esta hormona volátil además de poseer mecanismos de acción a tejidos adyacentes, puede actuar a larga distancia en el organismo y debido a su naturaleza volátil, se ha caracterizado su mecanismo de dispersión aéreo, por lo que puede incluso desencadenar o elicitar mecanismos de respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas adyacentes a la emisora, además, interactúa y su acción se modula con otras hormonas como ácido salicílico, auxinas y giberelinas, brasinosteroides y etileno (Raza, *et al.*, 2020; Yang, *et al.*, 2019).

La regulación de la expresión génica mediada por ácido jasmónico depende del binomio JAZ-MYC, (Factores de transcripción asociado a ácido jasmónico) el sistema “Dominio ZIM jasmonato” (JAZ) es una proteína con dominios ZIM y Jas, que interactúan con COI1 del complejo de señalización dependiente de ácido jasmónico SKP1/CULLIN/F-Box (SCF)COI1 para reclutar a NINJA, el cual a su vez reclutará a otros co-supresores transcripcionales generales, de esta interacción con miembros de la familia de factores de transcripción MYC dependerá un tipo de respuesta específica mediada por ácido jasmónico (Jang, *et al.*, 2020; Ruan, *et al.*, 2019; Carvalis, *et al.*, 2017).

### **Ácido salicílico (AS)**

El ácido salicílico es un compuesto fenólico que actúa como molécula señal y elicitor, tiene múltiples roles regulatorios en diversos procesos fisiológicos y de desarrollo como germinación de semillas, crecimiento vegetativo, fotosíntesis, respiración, termogénesis, formación floral, producción de semilla y senescencia (Hernández, *et al.*, 2017), también está involucrado en la respuesta sistemática asociada a estrés biótico, principalmente patógenos (*systemic acquired resistance, SAR*) (Tripathi, *et al.*, 2019, Klessig, *et al.*, 2018), además de la respuesta a estrés oxidativo (Zaid, *et al.*, 2019), recientemente se ha demostrado su importancia en la tolerancia a diversas condiciones de estrés abiótico como metales pesados (Sharma, *et al.*, 2020), salinidad (Kim, *et al.*, 2018, Tahjib, *et al.*, 2018) y deshidratación (Sohag, *et al.*, 2020, Sharma, *et al.*, 2017).



### ***Auxinas y giberelinas (GAs)***

Auxinas como el ácido-indol-3-acético (IAA) están involucradas en diversos procesos de crecimiento y desarrollo, así como su mejoramiento en la tolerancia al estrés abiótico en coordinación con otras fitohormonas como AS y ABA ( Park, 2007), las giberelinas son hormonas que también han sido asociadas a la formación de estructuras florales, brotes laterales y dormancia de semilla, pero además está asociada a respuesta a estrés abiótico, principalmente salinidad y especies reactivas de oxígeno (Egamberdieva, *et al.*, 2017, Banerjee y Roychoudhury, 2019).

### ***Citoquininas (CKs)***

Las citoquininas son un grupo heterogéneo de poco más de 25 moléculas derivadas de la base nitrogenada púrica Adenina, su diversidad se debe a diversas sustituciones en el N<sup>6</sup>, dependiendo el tipo de sustitución, es la especificidad de sus funciones (Nguyen, *et al.*, 2017), estas moléculas están asociadas a diversos procesos celulares tales como división celular, crecimiento apical, florescencia, procesos fotosintéticos, desarrollo de hojas y raíz, entre otros (Hallmark y Rashotte, 2019). El mecanismo de señalización dependiente de citoquininas consta de dos componentes para percibir y responder a estímulos fuera de la célula, el cual consta de Histidin-cinasas (HKs) asociadas a la membrana y reguladores de respuesta (RRs) en el citoplasma, y subsecuentes fosforilaciones alternadas de residuos de Asparagina e Histidina hasta llegar al núcleo (Liu, *et al.*, 2020).

Las citoquininas están asociadas a diversas condiciones de estrés tanto biótico como abiótico como calor, sequía, salinidad y bajas temperaturas, esta respuesta está asociada un grupo de factores transcripción relacionados a las citoquininas llamados Factores de respuesta a citoquininas (CRF) los cuales pertenecen a la familia génica AP2/ERF y que al ser fosforilados en esta cadena de activación por fosforilación-desfosforilación dependiente de cinasas regula la expresión génica dependiente de citoquininas (Hai, *et al.*, 2020; Liu, *et al.*, 2020; Hallmark y Rashotte, 2019).

### ***Brasinosteroides (BRs)***

En los primeros años del siglo XX, algunos experimentos donde se utilizaba polen, extractos o fracciones de polen de ciertas especies vegetales, al ser aplicados a los estigmas de otras especies, por ejemplo, extractos de polen de maíz promovían la elongación del primer internodo en plántulas de frijol, mientras que el polen de *Brassica napus* ya que extractos del polen al ser aplicado a diversas plantas promovía el crecimiento vegetal, a estos compuestos se les llamó Brasinas, con el tiempo, se aislaron en diversas plantas, se elucidaron sus estructuras de tipo esteroides polihidroxilados y sus decenas de variantes y funciones como elongación de tallo y raíz, expansión de hojas, fotomorfogénesis, desarrollo floral, desarrollo de estomas, entre otros (Hussain, *et al.*, 2020; Peres, *et al.*, 2020; ). A pesar de que se han elucidado y descrito casi un centenar de brasinosteroides, todavía no es claro la especificidad de cada brasinosteroides a nivel celular, como interactúa y se regula con respecto a otras hormonas y en los tejidos en los cuales se originan (Planas-Riverola *et al.*, 2020). Como muchos otros mensajeros celulares, elicitores u hormonas, los brasinosteroides son percibidos por proteínas específicas localizadas en la membrana y nombradas BRI (*Brasinosteroids Insensitive*) las cuales son de la familia de las receptor cinasas (RKs) desencadenando una cadena de mensajeros activando Factores de Transcripción relacionados a brasinosteroides (Nolan, *et al.*, 2019). Recientemente se ha propuesto que el mecanismo de acción de los brasinosteroides es generando especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno cuando interactúa con sus cinasas transmembranales y estas ROS activan MAP-cinasas y

potenciales REDOX hasta activar Factores de transcripción los cuales regularán los genes dependientes de brasinosteroides (Ahammed, *et al.*, 2019). En las últimas décadas se ha demostrado la importancia de los brasinosteroides en la respuesta al estrés, principalmente de tipo abiótico como calor, bajas temperaturas, congelamiento, sequía, salinidad, metales pesados y xenobióticos (Hola, 2019; Núñez *et al.*, 2019; Sadura y Janeczko, 2018; Nawaz, *et al.*, 2017).

### **Etileno (ET)**

Conocido ampliamente como una hormona relacionada a la maduración de frutos, inhibición de crecimiento y abscisión de tejidos como hojas, es una hormona de carácter volátil que se sintetiza en todos los tejidos de las plantas dependiente de un grupo de enzimas llamadas ácido carboxílico sintasas y oxidasas (ACS y ACO) las cuales son producto de una familia multigénica cuya expresión varía de acuerdo al estado de desarrollo, tejido y estímulos externos (Hussain, *et al.*, 2020; Lin, *et al.*, 2009; Wang, *et al.*, 2002), la síntesis de etileno está ligado a la homeostasis de su precursor S-adenosyl-Lmetionina (SAM), dependiente de la enzima SAMsintetasa, además de que la S-adenosyl-Lmetionina puede entrar en un ciclo de reciclaje (ciclo de Yang) para disposición rápida de etileno (Pattyn, *et al.*, 2020). El etileno puede interactuar con otras hormonas vegetales como auxinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido salicílico, giberelinas, probablemente estrigolactonas y brasinosteroides, no así los niveles de ácido jasmónico (Li, *et al.*, 2018). Debido a su relación con la maduración de frutos, senescencia y abscisión de hojas y flores, esta hormona está estrechamente ligada a la respuesta al estrés tales como hipoxia, anoxia, sequía, metales pesados, calor y salinidad (Hussain, *et al.*, 2020). Se sabe que el etileno es percibido por receptores específicos, localizados principalmente en la membrana del retículo endoplásmico, iniciando la cascada de transducción de señales hasta llevar la señal al núcleo. En *Arabidopsis*, se han identificado hasta ahora 5 diferentes tipos de receptores de etileno; Respuesta a Etileno1 y 2 (*ETR1*, *ETR2*), Sensor de Respuesta a Etileno1 y 2 (*ERS1* y *ERS2*) e Insensible a Etileno4 (*EIN4*), este último un regulador negativo de la respuesta etileno. Estos receptores comparten características en común tales como los dominios de unión a etileno, un motivo GAF (fosfodiesterasa específica cGMP, adenil-ciclasa FhIA), y un dominio cinasa, la señal continúa mediante las MAP cinasas, siendo los efectores finales factores de transcripción de la familia AP2/ERF (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTORS*) los cuales regularán genes dependientes o de respuesta a etileno mediante su unión a secuencias específicas de respuesta a etileno localizadas en sus regiones promotoras (Riyazuddin, *et al.*, 2020).

### **5.4. SOLUTOS COMPATIBLES**

Son compuestos orgánicos diversos que son altamente solubles y no interfieren con el metabolismo celular; incluso a altas concentraciones. La síntesis y acumulación está ampliamente distribuido en las plantas, pero la especificidad varía de acuerdo con las especies. El aminoácido prolina se acumula en varios grupos taxonómicos, mientras la  $\beta$ -alanina betaína parece estar confinada a algunos géneros de las *Plumbaginaceae*. Un mecanismo para incrementar la concentración de solutos compatibles es que su síntesis es irreversible; la concentración de otros solutos es mantenida a través de una combinación de síntesis y catabolismo, como la prolina. Los azúcares monoméricos pueden obtenerse de formas poliméricas en respuesta al estrés, al final del cual pueden repolimerizarse fácilmente para un ajuste osmótico (Bray, *et al.*, 2000). Estas moléculas juegan un papel primario del mantenimiento del turgor, pero también pueden estar involucradas en la estabilización de proteínas y protección de estructuras celulares (Yancey, *et al.*, 1982).

## **CICLITOLES**

La acumulación de polioles cíclicos como como *D-pinitol* o *D-ononitol* ha sido reportado frecuentemente como respuesta a sequía y salinidad (Streeter, *et al.*, 2001; Vernon y Bohnert, 1992). El pinitol puede acumularse en cloroplastos, lo cual es consistente con la acumulación de ciclitol y asimilación de bióxido de carbono en sequía. Evidencias directas del papel desempeñado por los ciclitoles ha sido demostrado en plantas de tabaco transgénicas que acumulan ononitol, mejorando la respuesta a salinidad y sequía (Sheveleva, *et al.*, 1997).

## **PROLINA**

Probablemente el osmolito más distribuido no sólo en plantas (Delauney, *et al.*, 1993; McCue y Hanson, 1990) sino también en otros organismos, además de ajuste osmótico se le han atribuido otros papeles: Protección de la integridad de la membrana plasmática (Mansour, *et al.*, 1998), reservorio energético (Verbruggen, *et al.*, 1998), fuente de carbono y nitrógeno (Ahmad y Hellebust, 1998; Peng, *et al.*, 1996), supresor de radicales hidroxilo (Hong, *et al.*, 2000; Smirnov y Cumbes, 1989). La acumulación de prolina en plantas ocurre por dos rutas biosintéticas: Vía dependiente de ornitina y vía dependiente de glutamato, posiblemente la más predominante, sobre todo en condiciones de estrés (Delauney y Vernna, 1993; Delauney, *et al.*, 1993). La L-prolina es sintetizada a partir del ácido L-glutámico vía  $\Delta$  pirrolina 5-carboxilato (P5C). Esta reacción es catalizada por dos enzimas, la P5C sintasa (P5CS) y la P5C reductasa (P5CR); los genes que codifican para estas proteínas han sido aislados de numerosas plantas (Yoshiba, *et al.*, 1997). La segunda ruta de síntesis de prolina involucra la transaminación de ornitina y es catalizada por la  $\delta$ -aminotransferasa (OAT) por dos posibles intermediarios: P5C y P2C. Ambos pueden ser reducidos a prolina (Mestichelli, *et al.*, 1979), y existen experimentos que demuestran que en *Arabidopsis* la vía de ornitina opera principalmente en plántulas (Roosens, *et al.*, 1998). Por la expresión de P5CS en tabaco, OAT en *Arabidopsis* y arroz, y un bloqueo antisentido de la oxidación de la prolina por parte de ProDH (Roosens, *et al.*; 2002; Hong, *et al.*; 2000; Nanjo, *et al.*; 1999; Zhu, *et al.*; 1998 y Kavikishov, *et al.*, 1995), demostraron un incremento de la prolina y un mejoramiento a tolerancia a estrés osmótico, a excepción de ProDH, que incrementó la concentración de prolina, pero no mostró mejoramiento en tolerancia a estrés osmótico (Mani, *et al.*, 2002).

## **GLICINBETAÍNA**

Es sintetizada por algas y plantas superiores (Bray, *et al.*, 2000). Protege la planta manteniendo el balance hídrico entre la célula vegetal y el medio ambiente estabilizando las macromoléculas. Las plantas sintetizan glicinbetaína mediante la oxidación de colina en dos pasos: La Colina es catalizada a betaínaldehído por medio de la colina monooxigenasa (CMO) (Rhodes y Hanson, 1993) y esta a glicinbetaína mediante la betainaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (BADH) (Chen y Murata, 2002; Rontein, *et al.*, 2002). Ambas actividades enzimáticas favorecen la acumulación de glicinbetaína. Hay poco mejoramiento en la tolerancia al estrés en plantas transgénicas (Nuccio, *et al.*, 1999). El principal factor que limita la acumulación de glicinbetaína es la disponibilidad de colina como sustrato para la reacción y su transporte de cloroplasto a citosol (Chen y Murata, 2002; Rontein *et al.*, 2002; McNeil *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000 y Nuccio *et al.*, 1998).

## **MANITOL**

Es la forma reducida del azúcar manosa, ampliamente distribuido entre las plantas, en proporciones sustanciales con relación a los azúcares. Por ejemplo, en el apio, donde el carbón reducido durante la fotosíntesis es a menudo traslocado a manitol, se ha demostrado en experimentos in vivo que las cantidades de *mannitol* incrementan en respuesta a estrés osmótico. Contrario a la glicinbetaína, la acumulación de manitol parece ser regulada por la inhibición de rutas competitivas y por la disminución de los niveles de consumo y catabolismo de manitol. El estrés salino inhibe la síntesis de sacarosa, pero no parece afectar las enzimas que sintetizan manitol. Al mismo tiempo, los niveles de utilización de manitol bajan, particularmente en tejidos de reserva como raíces jóvenes y hojas, así como un bloqueo de la oxidación del manitol por parte del manitol deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>. El tabaco y *Arabidopsis*, ambas sensibles a salinidad, han sido genéticamente modificadas para la producción de *mannitol*, que usualmente no producen estas plantas. Las plantas que expresaron la manitol-1-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de *E. coli* (convierte fructosa-6-fosfato a manitol-1-fosfato), pese a las bajas concentraciones, mejoraron la tolerancia a salinidad, las semillas de *Arabidopsis* transgénicas geminaron en presencia de sal (Bray, et al., 2000).

## **PINITOL**

El D-pinitol, es el principal soluto en las familias *Pinaceae*, *Fabaceae* y *Caryophyllaceae*. Su concentración es alta entre las especies halofíticas, permitiendo que sean tolerantes a la sequía. La acumulación de pinitol ocurre en leguminosas tolerantes a salinidad y en halofitas facultativas. En *Mesembryanthemum crystallinum* el pinitol puede constituir hasta el 70% de los carbohidratos solubles presente en las plantas tratadas con 400mM de cloruro de sodio, en contraste con el 5% de las plantas control, en hojas, el pinitol se localiza en cloroplastos y citosol, pero no en vacuolas (Bray et al., 2000).

## **5.5 AZÚCARES**

Una observación común en los procesos de deshidratación es la acumulación de azúcares solubles. Un ejemplo es la acumulación de sacarosa durante la desecación de la planta de resurrección *Craterostigma plantagineum*, la deshidratación induce la conversión de un azúcar de ocho carbonos, la 2-octulosa en sacarosa (Bianchi et al., 1991), esta conversión está correlacionada con el incremento de la expresión génica de la sacarosa sintasa (Sus) y sacarosa fosfato sintasa (Sps), involucradas en la síntesis y metabolismo de sacarosa, que en general se ve un incremento en su expresión durante condiciones de estrés osmótico y sequía (Kleines et al., 1999; Ingram et al., 1997). Además de su papel en el ajuste osmótico, los efectos protectores de los azúcares puede ser la estabilización de las proteínas (Carpenter, Crowe y Arakawa, 1990).

Los grupos hidroxilo de los azúcares sustituyen al grupo OH del agua para mantener las interacciones hidrofílicas con los lípidos de la membrana y las proteínas, por lo tanto, estas moléculas ayudan a mantener la integridad estructural de la membrana. En condiciones de estrés, los carbohidratos pueden servir como señales metabólicas de respuesta, la concentración de azúcares solubles por lo general aumenta o al menos se mantiene constante bajo condiciones de adversas. Oligosacáridos como rafinosa y galactinol son sintetizados en respuesta a sequía, los cuales parecen funcionar como osmoprotectores a la vez que proveen de un ajuste osmótico (Taji, et al., 2002). El manitol es uno

de los azúcares más distribuidos en la naturaleza, funciona secuestrando especies reactivas de oxígeno (ROS) y estabilizando proteínas (Zhu, 2001). Dentro de los azúcares encontramos la trehalosa, el cual es un disacárido no reductor y que se ha demostrado ayuda a mantener la estructura de las membranas y proteínas durante la sequía, además, se ha demostrado que ayuda a la protección del fotosistema II contra la fotooxidación (Garg, *et al.*, 2002; Avonce, *et al.*, 2004).

### **TREHALOSA**

Descrita por primera vez en el siglo XIX como un componente del cornezuelo del centeno (hongo parásito) (Schiraldi, *et al.*, 2002). La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl  $\alpha$ -D-glucopyranosida) está compuesta por dos moléculas de glucosa y es uno de los dos disacáridos no reductores de mayor distribución en la naturaleza. A pesar de que su síntesis es semejante a la de la sacarosa, es de un origen evolutivo más antiguo por el hecho de presentarse en todos los reinos, la ausencia de extremos reductores la hace altamente resistente al calor y cambios de pH, entre otros factores (Goddijn y van Dun, 1999). Entre los organismos en los que encontramos la trehalosa, se encuentran algas, bacterias, levaduras, plantas vasculares y algunos animales como insectos, nemátodos y crustáceos (Eun-Taeg, *et al.*, 1999; Iturriaga, *et al.*, 2000).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede acumularse más del 15% del peso seco dependiendo las condiciones de cultivo, por lo que se considera como almacenamiento de carbono, más aún, se considera como protector contra el estrés por diversos experimentos (Jules, *et al.*, 2004). En plantas, las cantidades de trehalosa son indetectables, salvo en plantas de resurrección como *Selaginella lepidophylla* y *Myrothamnus flabellifolius* en donde llega a ser hasta el 12% del peso seco. Esto se puede deber a la actividad de la trehalasa, enzima capaz de degradar la trehalosa (Sakaguchi, 2020).

En plantas como *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* se lograron acumular mayores cantidades de trehalosa cuando se añadía a la planta un fuerte inhibidor de la trehalasa, validamicina A, indicando la posibilidad de la síntesis de trehalosa en plantas superiores (Goddijn, *et al.*, 1997). En insectos, la trehalosa es el principal azúcar en la hemolinfa y músculos del tórax y es consumido durante el vuelo (Müller, *et al.*, 1999). En un insecto criptobionte, *Polypedilum vanderplanki*, el cual es el mayor animal pluricelular conocido que tolera una casi completa deshidratación sin efectos evidentes en periodos de hasta 17 años, muestra también tolerancia a temperaturas extremas (-270 °C a 106 °C), se comprobó que llegan a acumular rápidamente trehalosa, hasta 18% de peso seco, durante un periodo de dos días de sequía (Watanabe, *et al.*, 2002).

## **5.6 PROTEÍNAS, ELEMENTOS EN TRANS, EFECTORAS Y REGULADORAS**

### **PROTEÍNAS ABUNDANTES EN LA EMBRIOGÉNESIS TARDÍA (LEA's)**

Las proteínas LEAs fueron identificadas en un principio como producto de genes inducidos durante la maduración de la semilla y desecación. La cantidad de LEAs son ahora conocidas por su incremento en tejidos de plantas expuestas a estrés (Bray, *et al.*, 2000). Se identificaron y caracterizaron en algodón y representan las principales proteínas y ARNm durante la maduración del embrión, la acumulación de LEAs durante el desarrollo del embrión se correlaciona con el incremento de niveles de ABA y la adquisición de tolerancia a sequía (Galau, *et al.*, 1986).

También se ha reportado su acumulación en respuesta a bajas temperaturas, salinidad y por supuesto, ABA exógeno están ampliamente distribuidas en cotiledóneas y monocotiledóneas (Ramanjulu y Bartels, 2002). Los tratamientos de embriones con ABA exógeno desarrollan una precoz acumulación de LEAs y adquisición de tolerancia por desecación (Bartels et al, 2005). La mayoría de las LEAs son hidrofílicas, un rasgo consistente con su localización citoplasmática, muchas son ricas en alanina y glicina, careciendo de cisteína y triptofano. Su importancia radica por sus abundantes patrones de expresión (Bray et al, 2000). Las LEAs y otras proteínas de *S. cerevisiae* y *E. coli* inducidas como respuesta a estrés osmótico han sido agrupadas en una clase de proteínas llamadas hidrofílicas basándose en criterios como su naturaleza hidrofílica, su contenido de glicina, su estabilidad a altas temperaturas y en la mayoría de los casos, su regulación transcripcional dependiente de ABA (Mertens, et al., 2018).

Se ha sugerido que las LEAs actúan como ligandos de moléculas de agua, secuestro de iones y estabilización de macromoléculas en la membrana (Wang et al 2003). Esto se ha corroborado en el nematodo *Aphelenchus avenae*, donde un un transcrito de LEA es expresado en respuesta a deshidratación (Browne et al, 2002). Este nemátodo pertenece al grupo de los animales que entran en un estado de animación suspendida conocida como anhidrobiosis, sobreviviendo por periodos indefinidos hasta que la rehidratación le permite retomar un metabolismo normal (Crowe et al, 1992). Los genomas de ciertos organismos contienen secuencias que codifican para proteínas semejantes a LEAs. Esto sugiere que plantas, animales y microorganismos pueden usar estrategias comunes para enfrentar la deshidratación (Bartels et al, 2005).

### **Clasificación de las LEAs**

La mayoría de las LEAs y deshidrinas son estructuras  $\alpha$ -hélices, sugiriendo que son como largas estructuras sin plegar en su estado nativo, aunque algunas proteínas llegan a acomplejarse en dímeros o tetrameros. La clasificación se basa en características de sus estructuras conservadas:

1. Grupo 1: caracterizadas por un alto contenido de glicinas (20%), aminoácidos con carga en sus grupos R (40%) y la presencia de un grupo de veinte residuos de aminoácidos hidrofílicos, que pueden estar involucrados en un reemplazamiento hídrico.
2. Grupo 2: Las deshidrinas se caracterizan por una región de residuos de serinas, un motivo conservado que contiene la secuencia consenso DEYGNP cerca del extremo amino y una secuencia motivo de quince residuos de aminoácidos rica en lisina (segmento K; EKKGIMDKIKEKLP) presente en la mayoría de los casos en el extremo carboxilo y presentando una estructura anfipática  $\alpha$ -hélice.
3. Grupo 3: La principal característica es la presencia multicopia de un motivo de once aminoácidos, sugiriendo una estructura anfipática  $\alpha$ -hélice con posibles interacciones inter e intramoleculares.
4. Grupo 4: Con un extremo amino conservado, formando una  $\alpha$ -hélice y una diversidad en el extremo carboxilo con estructuras en anillo.
5. Grupo 5: Con una alta proporción de residuos hidrofóbicos adoptando probablemente una forma globular, no son solubles después de hervir.

(Wang et al, 2003; Bartels y Sunkar, 2005).



Las proteínas de los grupos 2 y 4 pueden contribuir a mantener la estructura de las proteínas de membrana. Las proteínas de los grupos 3 y 5 se ha sugerido que forman dímeros anillo-anillo capaces de secuestrar iones, los cuales se acumulan durante la privación de agua (Bartels y Sunkar, 2005).

### **ACUAPORINAS**

El estrés por salinidad y deshidratación requiere cambios en el flujo de agua que permita a la célula adaptarse a la situación de estrés. La velocidad en el flujo del agua dentro o fuera de la célula es determinada por el potencial de gradiente de agua, actuando como una fuerza en la permeabilidad del agua en la membrana (Schaffner, 1998; Kjellbom et al, 1999). Las acuaporinas facilitan las osmosis formando poros específicos para agua como una alternativa para el transporte de agua a través de la bicapa lipídica, las acuaporinas pertenecen a una superfamilia de proteínas integrales de membrana, las principales proteínas intrínsecas (*MIPs*).

En plantas, se encuentran en el tonoplasto y son llamadas intrínsecas al tonoplasto (*TIPs*), mientras las que se encuentran en la membrana plasmática se llaman *PIPs*, a través de diferentes especies, las acuaporinas son altamente conservadas y son codificadas por similares secuencias de ADN. En *Arabidopsis thaliana* forman una familia de al menos treinta genes que despliegan diferentes patrones de expresión. Las *MIPs* son las más abundantes en cuanto a expresión en tejidos de crecimiento rápido y en células involucradas en alto volumen de flujo de agua, son inducidas por salinidad y sequía, otro tipo de regulación en el que participan es disminuyendo el flujo de agua, impidiendo su salida y permitiendo una mayor conservación de agua dentro de la célula (Bartels et al, 2005).

Muchos de los genes que codifican para acuaporinas son inducibles por deshidratación, por ejemplo, rd28 de *Arabidopsis*, mientras que otros son dependientes de ABA, sugiriendo rutas ABA dependientes y ABA independientes (Ramanjulu y Bartels, 2002).

### **PROTEÍNAS DE CHOQUE CALÓRICO (HSP's)**

La respuesta al estrés por calor implica una disminución en la síntesis normal de proteínas y el incremento en la síntesis de nuevas proteínas conocidas como proteínas de choque calórico (HSPs), esta respuesta se ha observado cuando las plantas son expuestas al menos a 5°C por encima de su temperatura óptima (Bray et al, 2000).

Las proteínas necesitan de un correcto plegamiento, eliminación y disposición de proteínas no funcionales para adecuadas funciones celulares, el grupo de las *HSPs* (incluye muchas chaperonas, en plantas, son usualmente indetectables bajo condiciones normales de crecimiento, pero pueden ser inducidas por estrés ambiental y estímulos en el desarrollo. La acumulación de de *HSPs* coincide con la adquisición de tolerancia a estrés. Experimentos in Vitro sugieren que *HSPs* citosólicas funcionan como chaperonas previniendo la agresión termal en contra de otras proteínas, facilitando su subsecuente reactivación, la abundancia de pequeñas proteínas de choque calórico (*sHSPs*) su funcionalidad de unión y estabilización de proteínas desnaturalizadas sugieren su importante desempeño en la tolerancia al estrés (Bartels, et al, 2005).

## **Clasificación de las HSPs**

Las HSPs son agrupadas en cinco clases, de acuerdo con su peso molecular:

1. Familia HSP100: incluye proteínas de bacterias, tripanosomas, mamíferos y plantas, contienen dos dominios conservados de unión a ATP, a su vez se divide en tres subfamilias, una subfamilia Club es inducible por calor, proteínas miembros de esta familia son necesarias para la termotolerancia.
2. Familia HSP90: se encuentran en bacterias, citosol, núcleo, Retículo endoplásmico y otros compartimentos eucariotas, con probable función de chaperonas.
3. Familia HSP70: esenciales para las funciones normales de la célula, algunos miembros de esta familia se expresan constitutivamente, otros son inducibles por calor o frío, se encuentran en diferentes organelos migrando hacia el núcleo durante el estrés redistribuyéndose durante la recuperación.
4. Familia HSP60: presentes en citosol bacteriano, matriz mitocondrial y estromas de los cloroplastos, probablemente funcionan como chaperonas, en plantas la más estudiada es la chaperonina 60 involucrada en el ensamble de las Rubisco.
5. sHSPs: Abundantes en plantas, con cinco o tal vez seis familias, mientras que otros eucariotas presentan sólo una. Una probable explicación es su compartimentalización en los organelos de las plantas. El extremo carboxilo de todas las clases de sHSPs comparte homología con  $\alpha$ -cristalina, una proteína del cristalino de los vertebrados.

## **PROTEASAS E INHIBIDORES DE PROTEINASAS**

La proteólisis es una importante actividad celular para mantener la propia homeostasis, el incremento de la proteólisis en respuesta a estrés es frecuente y se interpreta como una manera de impedir daño a las proteínas o movilización de nitrógeno, este proceso se incrementa durante deshidratación y salinidad (Bartels, et al, 2005).

La actividad proteolítica es alta durante condiciones de estrés y se ha demostrado que coincide con un proceso de apoptosis. Tanto en plantas como en animales, las cisteínproteasas están involucradas en este proceso de muerte celular, las plantas poseen muchos genes inhibidores de proteasas, la mayoría conocidos por sus funciones en defensa de herbívoros. Se ha demostrado que la inhibición de las cisteínproteasas a través de la sobreexpresión de la cisteína bloquea la apoptosis. BnD22 del rábano o WSCP de coliflor representan a miembros de la familia de inhibidores de proteinasas tipo Kunitz, los cuales se inducen por salinidad y sequía (Ramanjulu y Bartels, 2002).

## **5.7 ÁCIDOS NUCLEICOS, ELEMENTOS REGULATORIOS EN CIS (CRE) RELACIONADOS AL ESTRÉS**

Las secuencias de ADN involucradas en el reclutamiento del aparato basal de la transcripción son parte del mecanismo de la regulación de este proceso y flanquean el sitio de inicio de la transcripción (TSS) se considera secuencias regulatorias, por favorecer o bloquear la expresión génica (Khan, et al., 2018).



### **ELEMENTOS DE RESPUESTA A DESHIDRATACIÓN (DRE)**

La investigación de los genes que se inducen por estrés en *Arabidopsis* revela una línea independiente de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinosaki, 2000). Esta investigación se ha llevado a cabo en plantas mutantes *aba* (deficientes de ABA) y *abi* (insensibles a ABA). Por ejemplo, los genes *rd29A* y *rd29B* de *Arabidopsis* son inducidos diferencialmente bajo condiciones de deshidratación salinidad, bajas temperaturas y ABA. La secuencia TACCGACAT del promotor del gen *rd29A* es un elemento de respuesta a deshidratación (DRE) de una rápida respuesta a sequía, salinidad y bajas temperaturas. La baja respuesta a ABA es mediado por un elemento ABRE dentro del mismo promotor (Yamaguchi-Shinosaki y Shinozaki, 1993, 1994). El elemento en *cis* DRE es esencial para la regulación e inducción en la respuesta a sequía independiente del ABA (Schöffl et al, 1998). Los motivos DREs han sido reportados en los promotores de varios genes regulados por diversos factores de estrés abiótico (Wang et al, 1995; Kawasaki et al, 1997).

### **ELEMENTOS DE RESPUESTA A ABA (ABREs)**

Muchos genes que son inducidos por estrés son también inducibles por la aplicación de ABA (Chandler y Robertson, 1994; Leung y Giraudat, 1998). Hasta ahora, se conocen dos vías dependientes de ABA en respuesta a estrés. La distinción se basa en los elementos en *cis* que se encuentran en los promotores de los genes inducibles por ABA. Se piensa que una vía ABA-dependiente regula la expresión génica a través de un elemento ABRE y un factor de transcripción tipo *b-ZIP* (cierres de leucinas) (Busk y Pages, 1998). Mientras que la otra vía la hace a través de dos familias de factores de transcripción MYC y MYB (Yamaguchi-Shinosaki y Shinosaki, 1993). Muchos genes inducibles por ABA comparten la secuencia consenso (C/T)ACGTG(G/T)C en su promotor, que es un elemento en *cis* llamado ABRE (ABA-responsive element, elemento de respuesta a ABA) (Guiltinan et al, 1990; Mundy et al, 1990; Ingram y Bartels, 1996; Busk y Pages, 1998). El elemento base de este ABREs es un motivo CACGTG, también conocido como “caja G” el cual funciona en la regulación de genes de plantas estimulados por diversas señales ambientales. Algunos ejemplos de proteínas que interactúan con ABREs y regulan la expresión génica son *OsTRAB*, *AtAREB/ABF* y *ABI5* (Hobo et al, 1999; Choi et al, 2000; Finkelstein y Lynch, 2000; Lopez-Molina y Chua, 2000; Uno et al, 2000; Kang et al, 2002). La expresión constitutiva de *ABF3* o *ABF4* aumentó la tolerancia a sequía en *A. thaliana* con una alteración de expresión en genes de respuesta a ABA y estrés (Kang et al, 2002).

### **ELEMENTOS DE ACOPLAMIENTO (CEs)**

Se han identificado elementos en *cis* llamados elementos de acoplamiento los cuales se activan en combinación con ABRE pero no solos (Shen et al, 1996). En los promotores de los genes *HVA22* y *HVA1* de la cebada, el acoplamiento a los elementos *CE1* y *CE3* son necesarios para la activación por ABA. La disección molecular de estos promotores definió a los complejos de respuesta a ABA (ABRC) que consiste en un elemento acoplador (CE) y un ABRE capaz de conferir una transcripción inducible por ABA (Bartels et al, 2005).

También se consideran elementos en *cis* a los ARNs regulatorios, los cuales se pueden separar en las siguientes categorías: 1) ARN no codificantes (ta-siRNAs, nat-siRNAs, rasiRNAs, siRNAs y miRNAs), 2) control y estabilización de RNAs (chaperonas de RNAs), 3) proteínas de unión a RNAs y 4) *Splicing* alternativo. Cada uno de los cuales se divide en varias categorías (Reddy, 2007; Sunkar, 2010; Khraiweh, et al, 2012, Matsui, et al, 2013, Matsui, et al, 2019).

## 6. ANTECEDENTES DIRECTOS

### 6.1 FACTORES GENERALES DE LA TRANSCRIPCIÓN (GTF) y TFIIB.

Se consideran factores de transcripción a las proteínas involucradas directamente en el proceso de preinicio de la transcripción por el reclutamiento del aparato basal de la transcripción y su interacción directa con secuencias específicas regulatorias de dicho proceso en el ADN, dentro de los cuales se encuentra TFIIB, el cual es necesario para la formación del complejo de preinicio en los promotores de genes dependientes de la *RNA pol II* para su expresión (Butler y Kadonaga, 2009). La figura 2 muestra los principales elementos involucrados en la formación del complejo de preinicio de la transcripción.

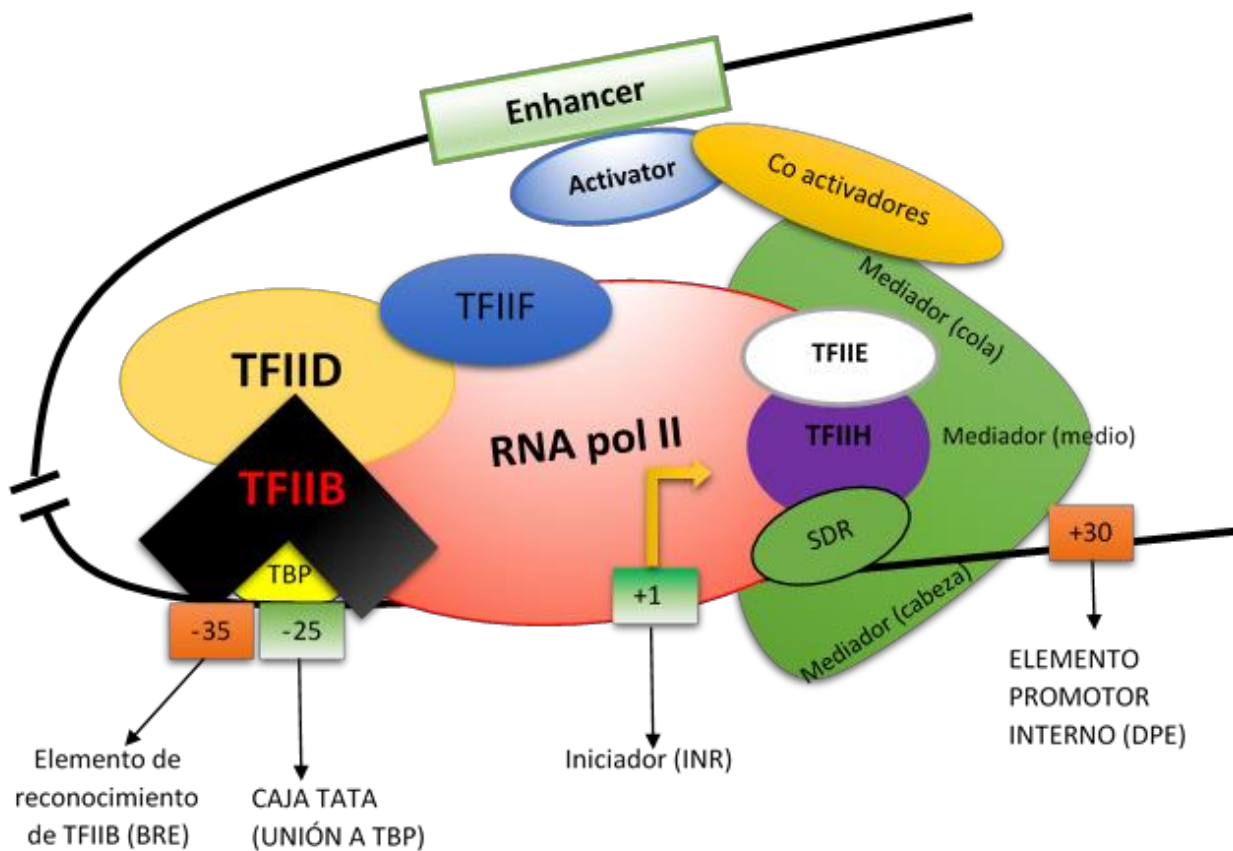


Figura 2: Elementos involucrados en la formación del complejo de preinicio de la transcripción; Se esquematiza la integración de diversas proteínas alrededor de una región promotora para formar el complejo de preiniciación de la transcripción alrededor del promotor mínimo (modificada de Krishnamurthy y Hampsey, 2009).

La transcripción en eucariontes inicia con la formación del llamado complejo de preiniciación (*PIC*), el cual se forma con los factores generales de la transcripción, entre los cuales se encuentran TFIIB, -D, -E, F y -H, ensamblados con la *RNA pol II* sobre una secuencia promotora que contenga una caja TATA. Esta caja es reconocida por la proteína TBP de TFIID junto con 11 proteínas TAFs, uniéndose entonces TFIIA, que estabiliza el complejo TFIID-ADN, para unirse después TFIIB dando estabilidad entre TFIIA-TBP-DNA. La figura 3A muestra cómo TBP es estabilizado en la caja TATA por el TFIIA y TFIIB, la figura 3B esquematiza el orden secuencial en que estos factores van uniéndose al promotor (Wang y Roberts, 2010).

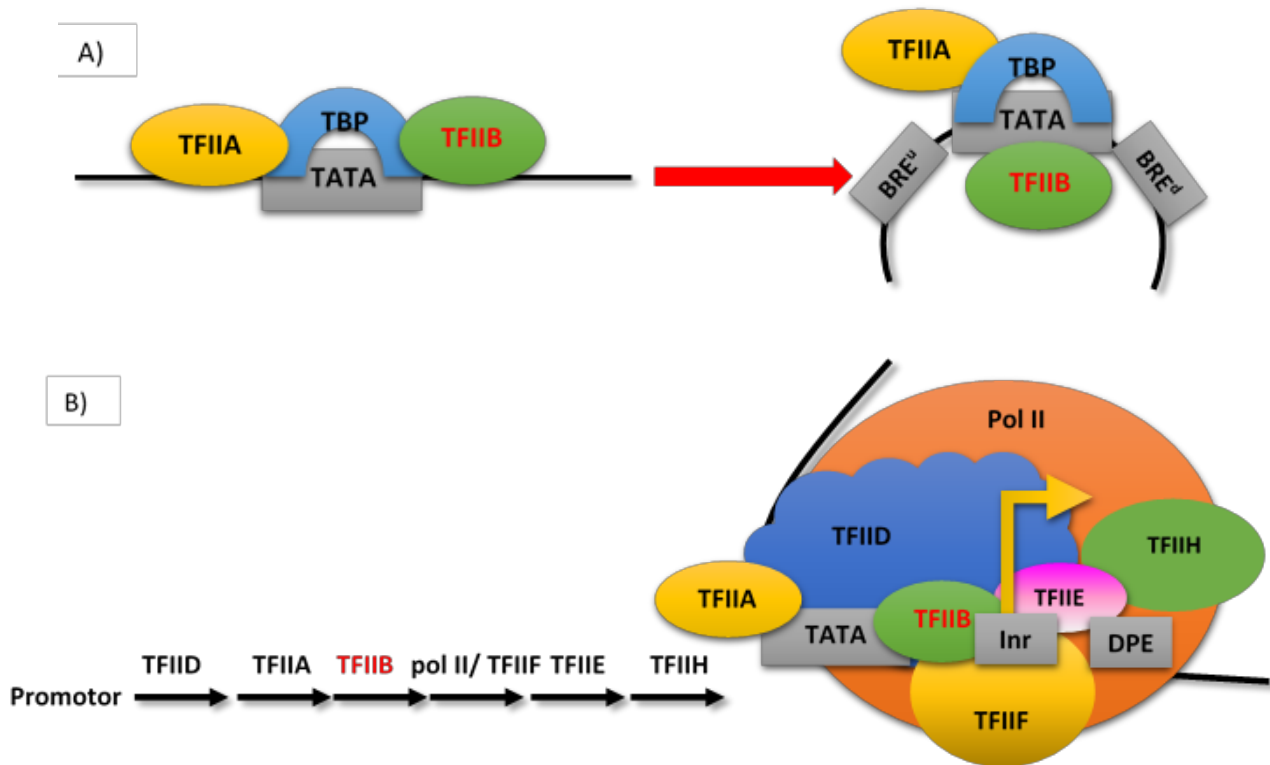


Figura 3: Secuencia en el ensamble del complejo de preiniciación; A) Estabilización de TBP en la caja TATA por parte de los TFIIA y IIB. B) Orden secuencial de los TF involucrados en la formación del PIC (Thomas y Chiang 2006).

El factor TFIIB reconoce dos elementos en *cis* llamados BRE<sup>u</sup> (*Binding response element upstream*) y BRE<sup>d</sup> (*Binding response element downstream*) alrededor de la caja TATA (Figura 4), para finalmente reclutar a TFIIE y TFIIF para que finalmente TFIIF forme el complejo abierto, fosforilar el tallo CTD de la RNA pol II, dando así inicio la transcripción (Liu, et al, 2010). Interesantemente, TFIIB y TBP son suficientes para que la RNA pol II inicie la transcripción in vitro (Parvin y Sharp, 1993).

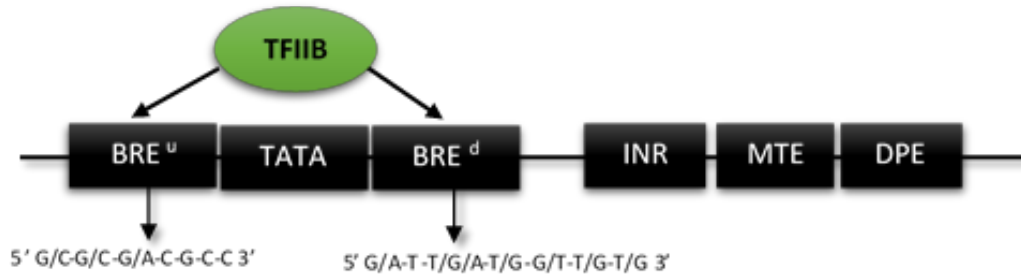


Figura 4: Esquema de los elementos en *cis* del núcleo del promotor reconocidos por el TFIIB; Se muestran las secuencias consenso río arriba y río debajo de la caja TATA, así como otros elementos río abajo del sitio de inicio de la transcripción como el motivo de diez elementos y el promotor río abajo (Deng y Roberts 2006).

El TFIIB está ampliamente conservado en eucariontes y posee mucha similitud estructural y de secuencia de aminoácidos con el factor de transcripción de Arqueas TFB, en el extremo amino posee un *zinc ribbon* que interacciona con la RNA polimerasa II y TBP (TFIIF), mientras que el extremo carboxilo posee dos repeticiones directas imperfectas que interactúan tanto con TBP como con ADN (BRE<sup>u</sup> y BRE<sup>d</sup>), se muestra en la figura 5 (Thomas y Chiang, 2006).

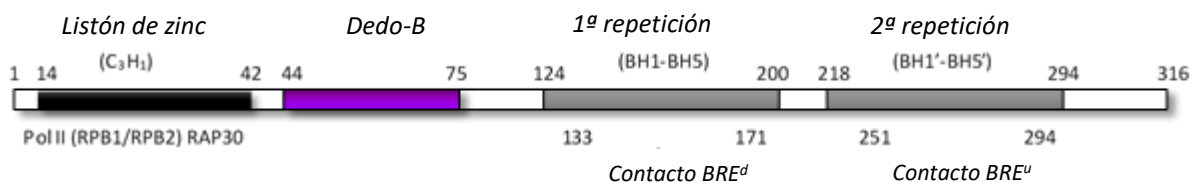


Figura 5: Regiones de TFIIB que interactúan con los elementos BRE y la RNA pol II; en el primer cuadro se observa el motivo dedo de Zinc y de unión a la RNA polimerasa II, los cuadros en claro son los sitios de unión a los elementos en *cis* que flanquean a la caja TATA en el promotor (modificada de Thomas y Chiang, 2006).

Se ha reportado que células de levadura mutantes en el gen que codifica para el TFIIB son deficientes en el crecimiento a 15 y 37 °C (Buratowski, et al, 2002); por otra parte, TFIIB se expresa en condiciones de bajas temperaturas en mandarina (*Citrus nobilis*) y toronja (*Citrus paradisi*) (Sánchez-Ballesta, et al, 2003; Maul, et al. 2008) así como por estrés hiperosmótico en tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Fiol y Kültz, 2005).

## 6.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (TF) RELACIONADOS AL ESTRÉS

Una vez que la señal ha llegado al núcleo celular, se desencadena la activación transcripcional de diversos genes que repercuten en el mejoramiento de la tolerancia al estrés. Para que se lleve a cabo este proceso, es necesaria la regulación de la expresión de diversos genes, esto se lleva a cabo mediante los factores de transcripción, que se definen como proteínas de unión a una secuencia específica de ADN (elemento en *cis*) y que interactúan con otros reguladores transcripcionales, incluyendo proteínas de remodelamiento y modificación de la cromatina, lo que favorece el acceso o bloqueo de las RNA polimerasas al templado de ADN, *Arabidopsis* posee al menos 2,300 factores de transcripción organizados en 58 familias de acuerdo con las bases de datos (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) (Jin, et al, 2015) representando más del 7% de las proteínas de esta planta y solamente un décimo de éstas han sido caracterizadas (Riechmann, et al, 2000; Riechmann y Ratcliffe, 2000; Qu y Zhu, 2006, Charu, et al, 2011; Lindemose, et al, 2013; Franco-Zorrilla, et al, 2014); los cuales, se agrupan en familias de factores de transcripción como AP2/EREBP, Myb, bZIP/HD-ZIP, WRKY y diversos tipos de dedos de Zinc (Umezawa et al, 2006; Bhatnagar-Mathur et al., 2008), que regulan a su vez un gran número de genes involucrados en la tolerancia a diferentes condiciones de estrés como por ejemplo DREB1, el cual está involucrado en la tolerancia a la sequía (Seki, et al, 2002) sólo por citar un ejemplo. Al ser genes clave en la tolerancia al estrés, se han generado plantas que mejoran la tolerancia a condiciones de estrés al sobreexpresar éstas proteínas (Villalobos, et al, 2004; Yi, et al, 2004; Mao, et al, 2012), la expresión de un factor de transcripción de la familia AP2/EREBP, el elemento de unión en respuesta a deshidratación DREB1B de arroz en plantas de tabaco mejora la tolerancia a estrés biótico y abiótico (Gutha y Reddy, 2008), otro ejemplo se refiere a plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el factor de transcripción GmZIP1 de soya y que también mejoran su tolerancia a condiciones de estrés biótico y abiótico (Shi-Qing, et al, 2011). Además, está reportado que existe un solapamiento o convergencia de diversos genes en la respuesta a diversos tipos de estrés mediado por alguno de estos factores de transcripción (Chen, et al, 2002; Fujita, et al, 2006; Baena-González y Sheen, 2008; Century, et al, 2008). También la sobreexpresión de un dedo de zinc tipo TFIIIA (ZFP) de papa (StZFP1) el cual es inducible por sequía, salinidad y ABA, al ser sobreexpresado en tabaco le confiere resistencia a múltiples condiciones de estrés biótico y abiótico (Tian, et al, 2010).

## 6.3 SPLICING ALTERNATIVO (AS) de TFs RELACIONADO AL ESTRÉS.

Se considera como *splicing* canónico la eliminación de secuencias intrónicas dentro de un transcrito primario o pre-ARN por parte de un complejo de proteínas y ribonucleoproteínas pequeñas nucleares, (*snRNP*) llamado "Spliceosoma" conformado por dos principales grupos: *sm* y *sm-like*, el primer grupo está conformado por U1, U2, U4, U4atac, U5, U11 y U12, mientras que el segundo grupo por U6 y U6atac, más una pequeña molécula de ARN la cual sirve para localizar los sitios a transesterificar por apareamiento de las regiones flanqueantes GU-AG de los intrones y la subsecuente eliminación de éstos y el empalme de los exones, generando el transcrito maduro para su posterior traducción por los ribosomas (Matera y Wang, 2014).

Sin embargo, uno de los mecanismos moleculares que permite generar una mayor y amplia diversidad de transcritos es el empalme alternativo (*AS*, *alternative splicing*) de estos ARN mensajeros multi exónicos-intrónicos, generando múltiples isoformas de transcritos, los cuales, al ser traducidos a proteínas en los ribosomas, genera diversas proteínas con funciones diferentes al

producto canónico del empalme “estándar”. Este proceso es regulado por un grupo de proteínas llamadas *SR* por su alto contenido de residuos de Serina y Arginina (Palusa y Reddy, 2010, Reddy y Shad, 2011, Reddy, et al, 2013).

*A. thaliana* posee aproximadamente 27, 000 genes y cerca de 35 ,000 proteínas de los cuales al menos 80% poseen más de un intrón, por lo que son secuencias potencialmente blanco de *AS* generando una amplia diversidad de productos a partir de diversas isoformas de un solo transcrito y pudiendo incrementar este porcentaje en condiciones de estrés, estas nuevas proteínas tienen una diversidad de funciones, afinidades, interacciones o localizaciones y (Filichkin, et al, 2010, Kalostrá and Cooper, 2011, Reddy, et al, 2011, Reddy et al, 2012 Filichkin, et al, 2015,).

Los principales tipos de *AS* hasta ahora descritos son:

- 1) *Cassete exon*: Consiste en la combinación específica de exones en diferentes ordenes o presencia y ausencia en determinados transcritos maduros.
- 2) *AS 5'*: Fragmentos del extremo 5' de un exon es incluido en el producto final del splicing.
- 3) *AS 3'*: Similar al anterior, incluye la presencia de sólo un fragmento 3' en el transcrito.
- 4) *Exon mutuamente exclusivo*: La combinación de ciertos exones condiciona la presencia de otros.
- 5) *Cassete de exones coordinados*: También llamado *cassetes en tándem*, consiste en la presencia o ausencia de un grupo de exones en el RNA mensajero.
- 6) *Primer exon alternativo*: El transcrito maduro posee un primer exon diferente
- 7) *Retención de intrón*: Presencia de un intrón en el transcrito maduro, el cual puede contener codones de paro encriptados o bien generar un nuevo producto de traducción.

Siendo la retención de intrones el proceso más común en *Arabidopsis* (Marquez, et al, 2012, Marquez, et al, 2015). Hay similitudes en los procesos que involucran el cassette exón y la retención de intrones; en el primer caso se ha reportado donde se excluye la inclusión de un exón en un *AS* constitutivo bajo condiciones que no son de estrés, sin embargo, este se retiene cuando se produce estrés, estos llamados "exones suicidas" poseen un codón de paro prematuro (*PTC*) situado antes del codón de paro canónico, estos exones forman una estructura similar a la subunidad ribosómica 5S, que es reconocida por un sistema llamado *Nonse Mediated Decay* (*NMD*) para el marcado y la degradación de este transcrito con el *PTC*, este sistema es llamado *RUST* (*Regulation of Unproductive Splicing and Translation*). En el caso de retención de intrones es común la presencia de *PTC*, estas isoformas alternativas son reconocidas por el sistema *NMD* y se degradan rápidamente (Reddy, et al, 2013; Ding et al, 2014). Sin embargo, hay transcripciones alternativas con *PTC* que evaden la degradación mediada por *NMD*, se transcriben y son claramente estables, por lo que pueden traducirse en pequeños péptidos llamados microproteínas (*miP*) o pequeños péptidos de interferencia (*siP*), que debido al codón final prematuro se traducen en proteínas que carecen de uno o dos dominios funcionales, por lo que pueden tener diferentes funciones, ubicación o interactores para contender contra el estrés (Reddy, et al, 2013).

*AS de TFs*: Se han reportado que diversos *TFs* que exhiben *AS* en condiciones de estrés, cuyas isoformas están claramente relacionadas con la mejora de la tolerancia tanto a la regulación de la transcripción como a la generación de proteínas con diferentes niveles de funciones, algunos

miembros de la superfamilia *MYB* y *DREB / CBF* han sido ampliamente descritos que presentan AS bajo condiciones de estrés. (Mastrangelo, *et al*, 2012).

*TFIIIA*: Además de los factores de transcripción específicos para lidiar con el estrés, hay un caso interesante de un Factor General de la transcripción (*GTF*), *AtTFIIIA*, que está relacionado con la *ARN pol III*, este *GTF* exhibe un AS constitutivo en condiciones normales al excluir el tercer exón, pero en condiciones de estrés abiótico se conserva, este exón tiene una similitud con la subunidad ribosómica 5S y tiene un *PTC*, por lo que forma parte del binomio RUST-NMD, en plantas transgénicas que sobreexpresan esta versión de transcrito con *PTC* mejoran la tolerancia al estrés abiótico (Fu, *et al*, 2009, Barbazuk, 2010, Layat, *et al*, 2012).

*TFIIB*: Hay informes que involucran al *GTF TFIIB* en condiciones de estrés, por ejemplo, en levaduras, las cepas mutantes isogénicas del homólogo *TFIIB (SUA7)* muestran deficiencias en el crecimiento a 16 ° y 30 ° C (Pinto, *et al*, 1994). Otro informe menciona que la formación de dos transcritos de *SUA7* que difieren en tamaño cerca de 100 nucleótidos cuando las células están expuestas al estrés por calor (Hoopes, *et al*, 2000). Además, *TFIIB* se expresó en condiciones de adaptación a altas temperaturas en cítricos (Sánchez-Ballesta, *et al*, 2003). Curiosamente, *TFIIB* aumenta su expresión en estrés hiperosmótico en el pez *Oreochromis mossambicus* (Fiol y Kültz, 2005). Hasta ahora, se ha informado que *TFIIB* y los miembros de esta familia de genes Proteínas Relacionadas al factor de transcripción B (*BRP*) reclasificadas recientemente (Knutson, 2013) están involucradas en el desarrollo y el establecimiento de estructuras reproductivas en *Arabidopsis* (Cavel, *et al*, 2011; Zhou, *et al*, 2013; Qin, *et al*, 2014), hasta ahora, Sólo un informe menciona a *AtTFIIB1* bajo condiciones de estrés y que interactúan con miembros de la familia HD-Zip (Capella, *et al*, 2014).

En 2014, en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del CeIB-UAEM se caracterizaron plantas de *A. thaliana* mutantes insercionales insensibles al disacárido trehalosa, el cual, como se menciona previamente, ha demostrado ser un osmoprotector, elicitador y protector de estructuras celulares en condiciones de estrés abiótico, estas mutantes fueron denominadas *tin (trehalose insensitive)*, una de estas líneas mutantes (*tin14*) la cual posee la mutación insercional (*Cassette* de resistencia a kanamicina) en el extremo 3' del gen *BRP3*; At4g10680, miembro de la familia génica *TFIIB*, las cuales mostraban una mayor tolerancia a condiciones de estrés abiótico (Hernández-Campuzano, *et al.*, 2014).



## **7. JUSTIFICACIÓN**

Debido a los cambios en los patrones climáticos y la tendencia en el incremento de la temperatura en los próximos años, es necesario caracterizar, entender y elucidar los mecanismos con los cuales las plantas reaccionan a las condiciones adversas del entorno que afectan su desarrollo, rendimiento e incluso la supervivencia, dichos mecanismos de respuesta se pueden categorizar a niveles de organismo, sistémico, celular, y en última instancia, molecular, esta última es la más importante ya que la regulación génica antecede a los otros niveles de respuesta, por lo que entender los mecanismos moleculares de respuesta al entorno constituyen la “línea de salida” para contender contra las variaciones físico-químicas del medio ambiente que comprometen la homeostasis de un ser vivo como lo es una planta. En este trabajo se describe el estudio de la expresión en condiciones de estrés abiótico de la familia génica *TFIIB* de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* del cual el factor general de la transcripción *AtTFIIB1* (*At2g41630*) es miembro y que se considera el importante por estar relacionado con la transcripción dependiente de la *RNA pol II* formando parte del *complejo de pre-inicio de la transcripción (CPI)*, considerándose por esto, esencial para el óptimo desarrollo de la planta durante su senescencia.

## **8. HIPOTESIS**

Los factores generales de transcripción *TFIIB1*, *TFIIB2*, *BRP1*, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* de *A. thaliana* presentarán cambios en la expresión génica espaciotemporal y al ser sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico.

## **9. OBJETIVOS**

### **9.1. OBJETIVO GENERAL**

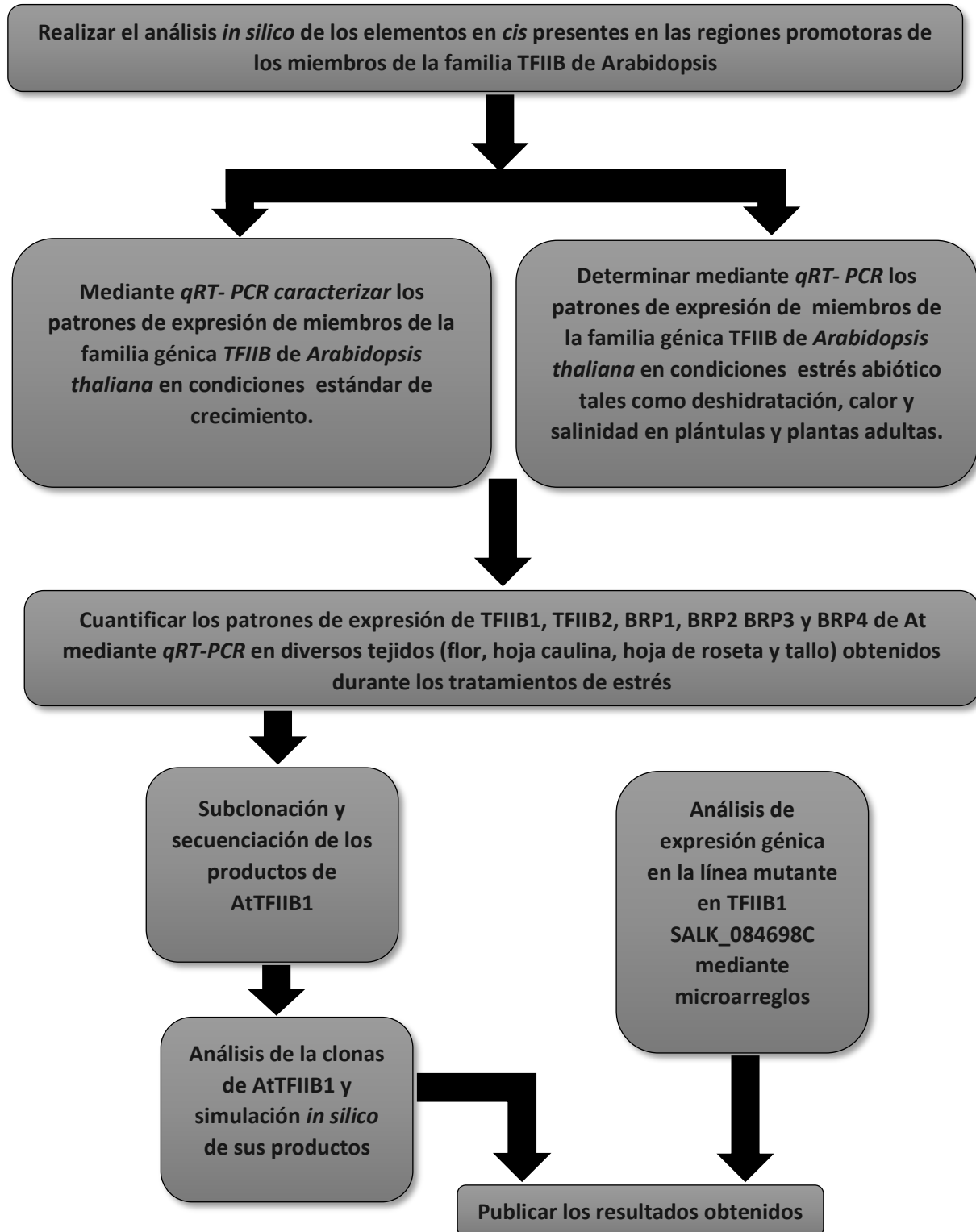
Determinar experimentalmente y mediante el uso de herramientas bioinformáticas, si miembros de la familia génica *TFIIB* de *A. thaliana* pueden estar involucrados en la respuesta al estrés abiótico.

### **9.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

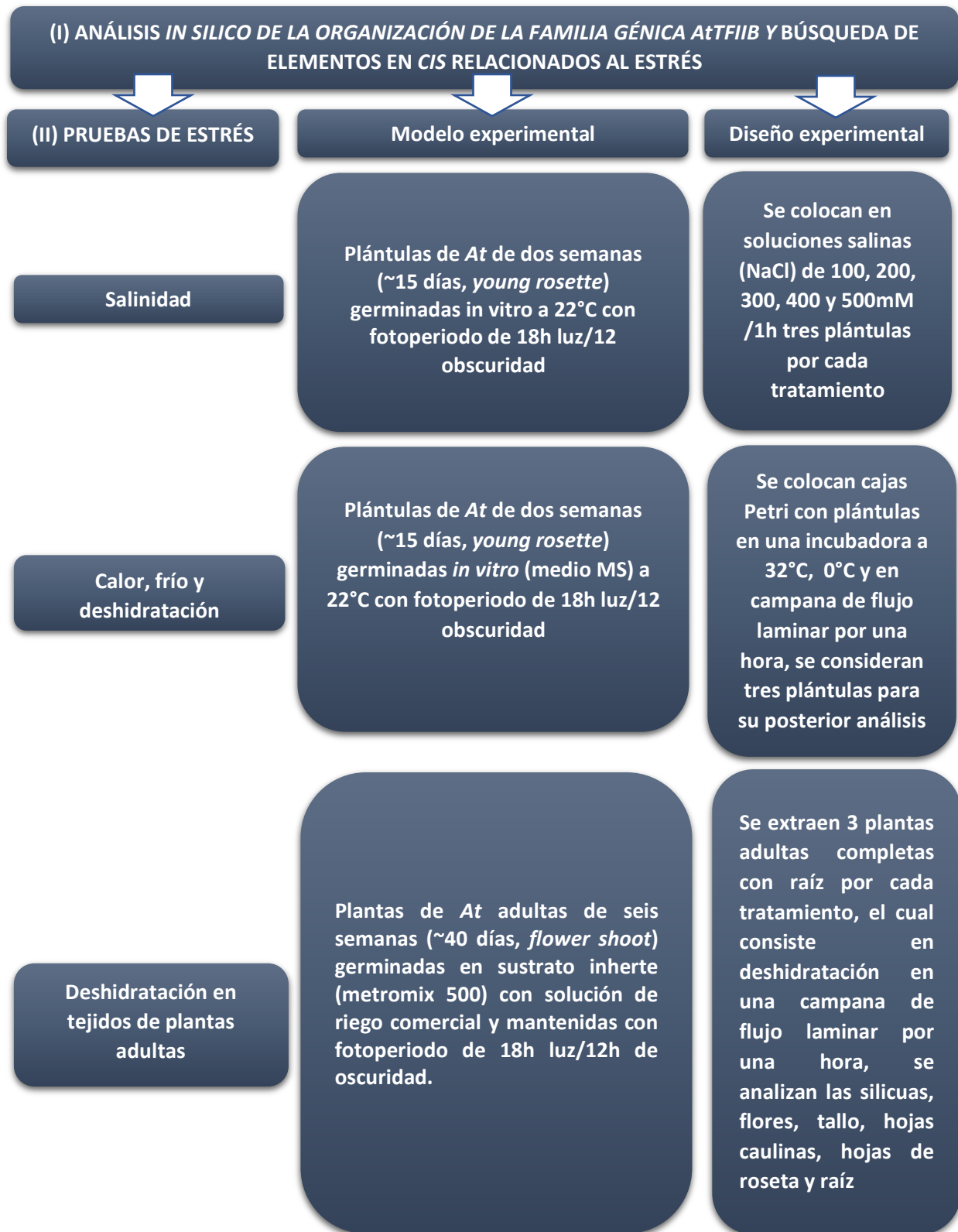
1. Analizar *in silico* la presencia de elementos regulatorios en *cis* relacionados a respuestas mediadas por condiciones de estrés abiótico en las regiones promotoras de los miembros de la familia *TFIIB* de *A. thaliana*.
2. Determinar los patrones de expresión de miembros de la familia génica *TFIIB* de *A. thaliana* bajo diversas condiciones de estrés abiótico y en diversas fases de desarrollo.
3. Determinar el efecto de la mutación en *TFIIB1* sobre la regulación génica en *A. thaliana*.

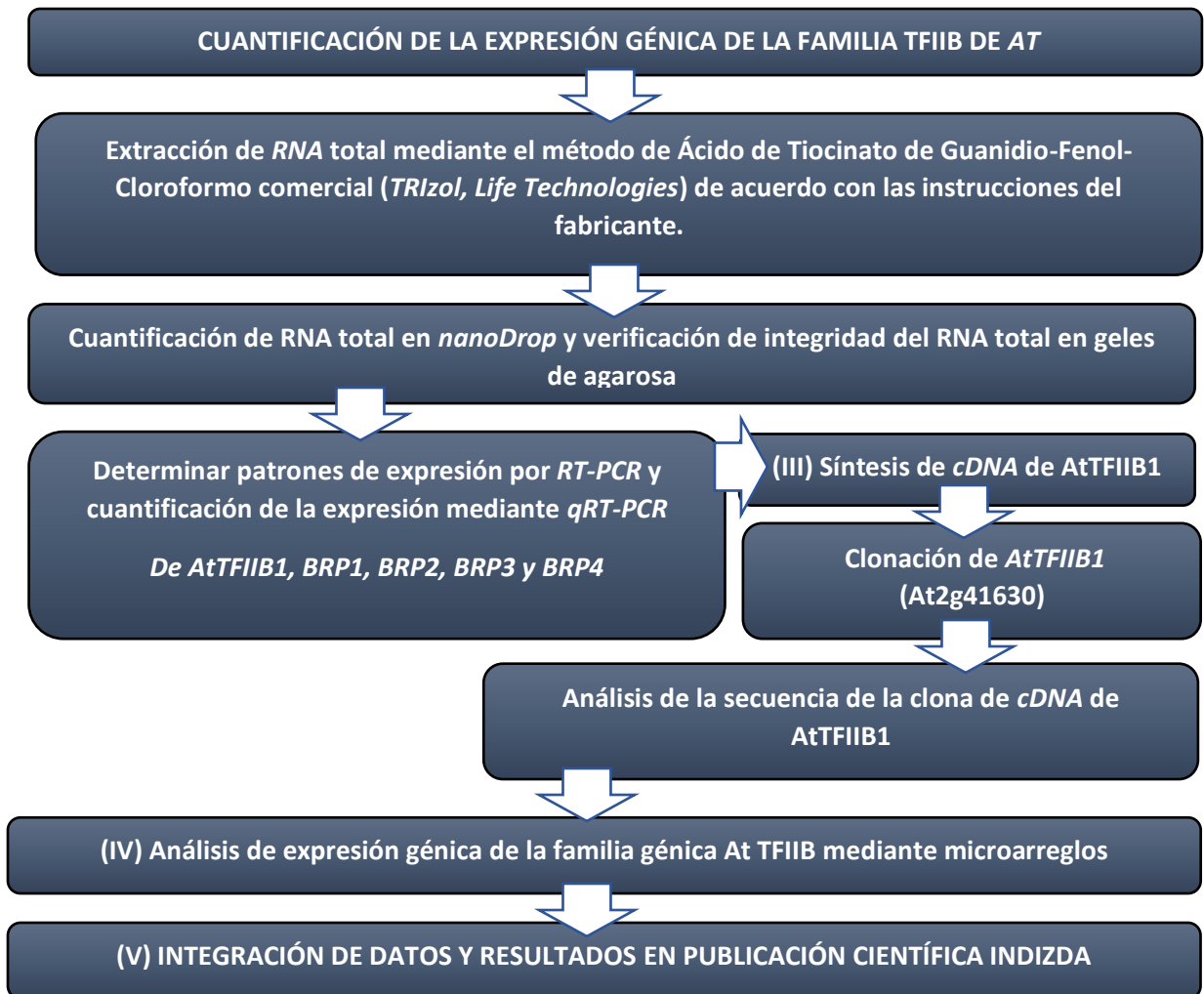


## 10. MAPA CONCEPTUAL DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**11. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA**





## **12. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A) MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **1. PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA**

Se utilizaron plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0.

Mutantes insercionales del banco *SALK\_084698C (at2g41630)* fueron adquiridas en el Centro de Recursos Biológicos Arabidopsis (<https://www.arabidopsis.org/abrc/>). Las semillas se esterilizaron en hipoclorito de sodio al 0,5% durante 15 minutos, seguido de 5 lavados y luego germinaron en medio Murashige y Skoog (MS) en phytigel con o sin kanamicina en un cuarto de cultivo a 22 ° C en fotoperiodo 16 h / 8 h (luz / oscuridad) con iluminación blanca fría (80–90 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Las plántulas se trasplantaron a Metro-Mix 200 (Grace-Sierra, Milpitas, CA, EE. UU.).

La condición homocigótica de las plantas mutantes se determinó por selección genética mendeliana (se describe en material anexo) en placas de medio *MS* suplementadas con kanamicina (50mg/mL) como agente de selección para las líneas mutantes insercionales (*pROK2::nptII*) las cuales fueron preseleccionadas en el instituto *Salk Lake* por poseer un evento único de inserción mediante la misma técnica, ya en el laboratorio, se realizaron dos eventos generacionales de selección para obtener líneas homocigotas puras, corroborando mediante *PCR* de punto final la inserción en las líneas homocigotas seleccionadas en kanamicina usando cebadores específicos para amplificar el gen *nptII* (material anexo).

#### **2. CEPAS BACTERIANAS.**

Para la clonación de los productos obtenidos por *PCR* se usó la cepa de *E. coli* DH5-α

### **B) TRATAMIENTOS DE ESTRÉS DE LAS PLANTAS DE ARABIDOPSIS**

Las semillas de *Arabidopsis* previamente incubadas a 4 ° C se sembraron en placas de medio *MS* phytigel y se incubaron a 22 ° C para la germinación bajo fotoperíodo de 16 h / 8 h (luz / oscuridad).

#### **1. Estrés por NaCl**

Plántulas de dos semanas de edad crecidas en las condiciones mencionadas anteriormente se hicieron flotar en diferentes concentraciones de NaCl (100 a 500 mM) durante 1 hora antes de proceder a la extracción de *ARN*.

#### **2. Estrés por calor**

Plántulas de dos semanas de edad crecidas en las condiciones mencionadas anteriormente, se incubaron a 32 ° C durante 1 hora antes de proceder a la extracción de *ARN*.

#### **3. Estrés de deshidratación**

Plantas de dos y cuatro semanas de edad que germinaron en el suelo se retiraron cuidadosamente de las macetas para mantener las raíces intactas y se deshidrataron en diferentes períodos (1 a 3 horas) antes de proceder a la extracción de *ARN*.

## **C) HERRAMIENTAS MOLECULARES**

### **1. Extracción de ARN y qRT-PCR**

Las plántulas, las hojas caulinas, las hojas de roseta y los tejidos de flores de plantas adultas se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron hasta obtener un polvo fino con mortero y mano de mortero. El ARN total se aisló usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se analizó en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y la concentración se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.).

Se sintetizó cadena de ADNc utilizando 2.0 µg de ARNm total, se trató con DNasa I y se usó para la síntesis de ADN complementario (ADNc) con RevertAid H Minus M-MuLV *Reverse Transcriptase* (ambas de Thermo Scientific, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se usó para análisis de expresión génica. Se usó una PCR usando el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (AT2G24270) como control de expresión de un gen endógeno. Los ADNc resultantes se diluyeron 10 veces y se usaron para realizar los experimentos de qRT-PCR usando SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezclas de reacción se dispusieron en una placa de 96 pozos y se analizó usando el termociclador en tiempo real Applied Biosystem 7300 (Foster City, CA, Estados Unidos).

Las condiciones del termociclador fueron los siguientes:

94 ° C durante 1 min, seguido de 40 ciclos de 94 ° C durante 20 s y 60 ° C durante 60 s.

Los niveles de transcripción relativos para cada muestra se obtuvieron utilizando el "método Ct comparativo" (*Schmittgen y Livak, 2008*) y se normalizaron con la media geométrica del gen GAPDH (AT2G24270). Se realizó un análisis estadístico de análisis de varianzas múltiples (ANOVA) para evaluar si existe diferencia significativa de la expresión diferencial utilizando los valores medios de tres réplicas biológicas para cada condición.

### **2. Clonación de isoformas AtTFIIB1**

Para la purificación de los productos de PCR a partir de gel de agarosa, se utilizó el kit de extracción de gel QIAEX II® (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados se clonaron en el vector de clonación pTZ57R / T para la secuenciación según el proveedor (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), y la secuenciación del ADN se realizó utilizando el secuenciador 3130xl de Applied Biosystems en el Instituto de Biotecnología, UNAM, México (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>).

### **3. Análisis de expresión por microarreglos (microarrays)**

Se tomaron plantas adultas de Arabidopsis de líneas mutantes y WT, y se purificó el ARN total como se describió anteriormente. Se usó ADNc marcado (alexa555 y Alexa647) para la hibridación de los microarrays de 70 meros oligo Arabidopsis V.3.0.3, que se realizó en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México. (<http://microarrays.ifc.unam.mx/>). El análisis de datos de microarrays se realizó con el software libre genArise, desarrollado en la Unidad de Computación del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>).

## ***III RESULTADOS***

### 13. ANÁLISIS IN SILICO

Para tener un panorama sobre los patrones de expresión de los miembros de la familia TFIIB se realizó una búsqueda en la base de datos "GENEVESTIGATOR" (Hruz, et al., 2008) donde se depositan los patrones de expresión cuantificados por microarreglos los cuales se condensan en la siguiente serie de figuras, en la figura correspondiente a TFIIB1 se muestra una alta tasa de expresión, mientras que TFIIB2 muestra un nivel medio, al igual que BRP1 y un nivel bajo en BRP2, en todos los estados de desarrollo de la planta.

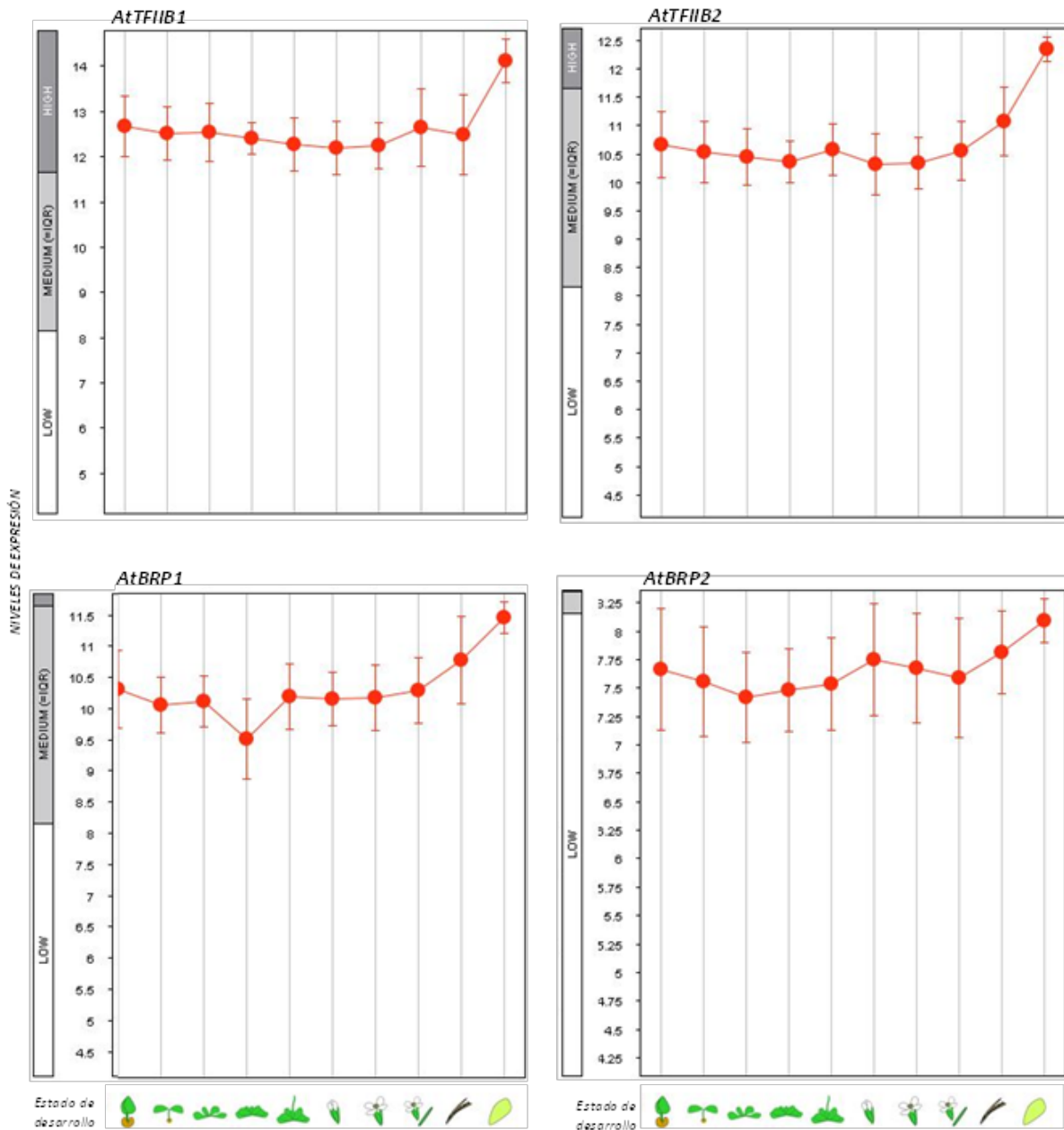


Figura 6: Patrones de expresión de AtTFIIB1, AtTFIIB2, AtBRP1 y AtBRP2 depositados en la base de datos "Genevestigator", los cuales se muestran en diferentes tejidos de la planta, desde germinación, plántula, roseta 1, roseta 2, roseta-florescencia, primordio floral, flor, flor-silicua, silicua y semilla.

La figura 7 muestra los patrones de expresión de BRP3 son medios y restringidos solamente a plántula, roseta y flor, mientras que BRP4 presenta niveles bajos en todos los tejidos, mientras que BRP5 presenta niveles medios en todos los tejidos y BRP6 niveles bajos en todos los tejidos.

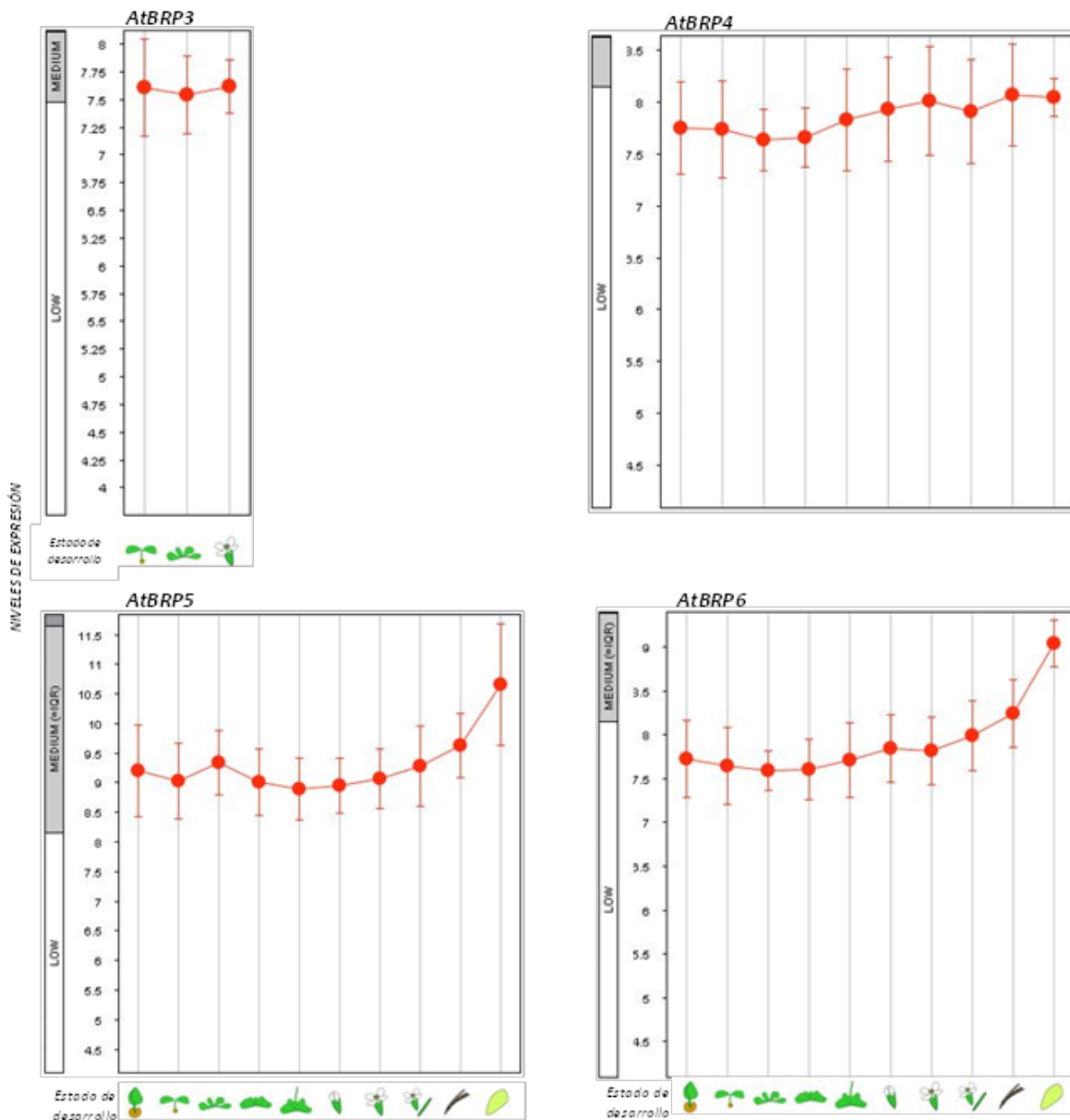


Figura 7: Patrones de expresión de AtBRP3, AtBRP4, AtBRP5 y AtBRP6 depositados en la base de datos "Genevestigator", los cuales se muestran en diferentes tejidos de la planta, desde germinación, plántula, roseta 1, roseta 2, roseta-florescencia, primordio floral, flor, flor-silicua, silicua y semilla.



La siguiente figura, muestra los patrones de expresión de BRF1 y BRF2, los cuales tienen patrones de expresión medianos en todos los tejidos, mientras que BRF3 y BRF4 CTD presentan niveles bajos de expresión, mostrando BRF4 CTD patrones de expresión restringidos a plántula, roseta y flor.

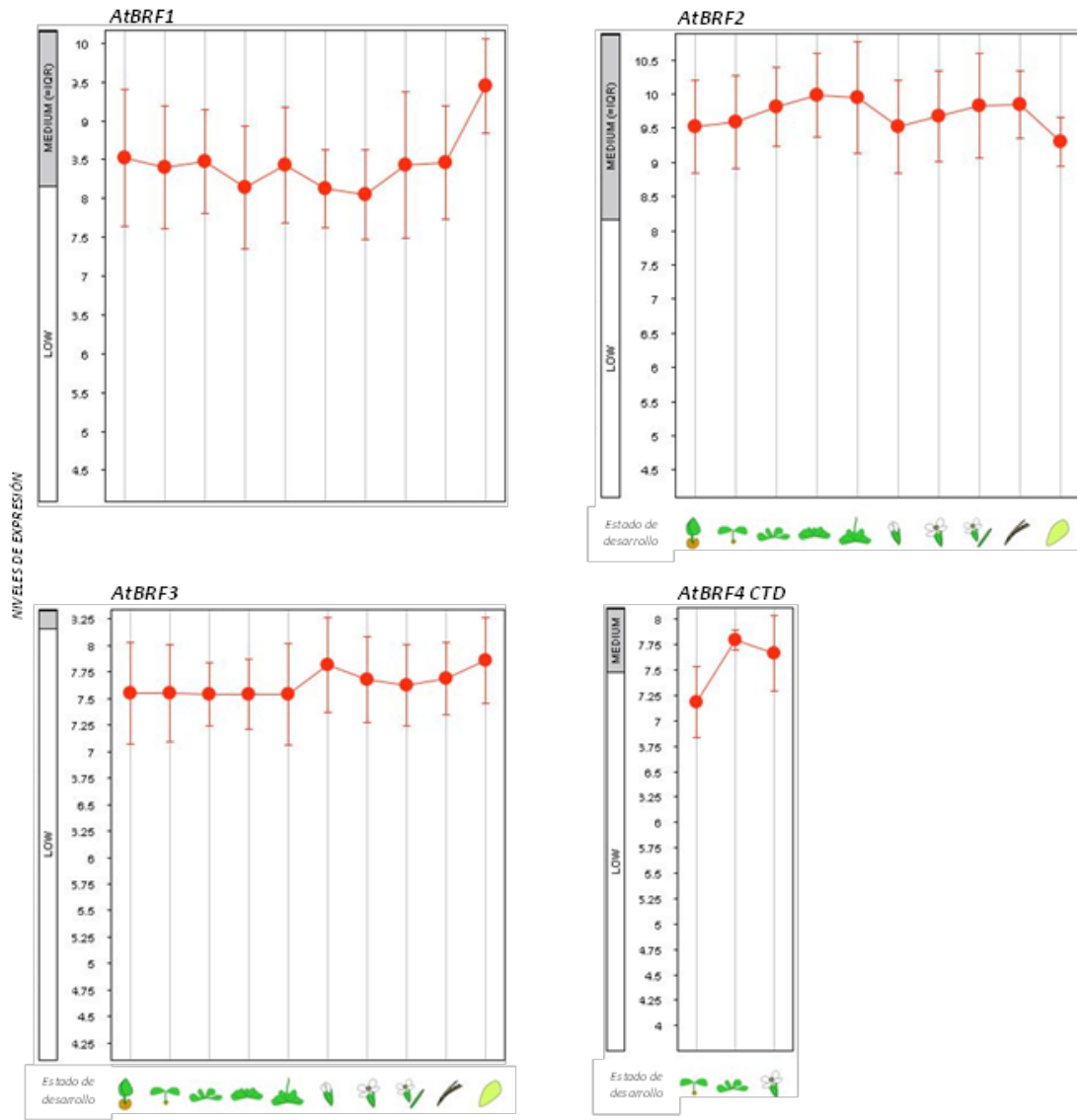


Figura 8: Patrones de expresión de AtBRF1, AtBRF2, AtBRF3 y AtBRF4 CTD depositados en la base de datos "Genevestigator, los cuales se muestran en diferentes tejidos de la planta, desde germinación, plántula, roseta 1, roseta 2, roseta-florescencia, primordio floral, flor, flor-silicua, silicua y semilla.

La última figura muestra los patrones de expresión de AtMEE 12 y AtMEE 12 CTD, los cuales son de expresión media y baja respectivamente, aunque AtMEE 12 se restringe solamente a plántula, roseta y flor, mientras que AtMEE 12 CTD se expresa en todos los tejidos.

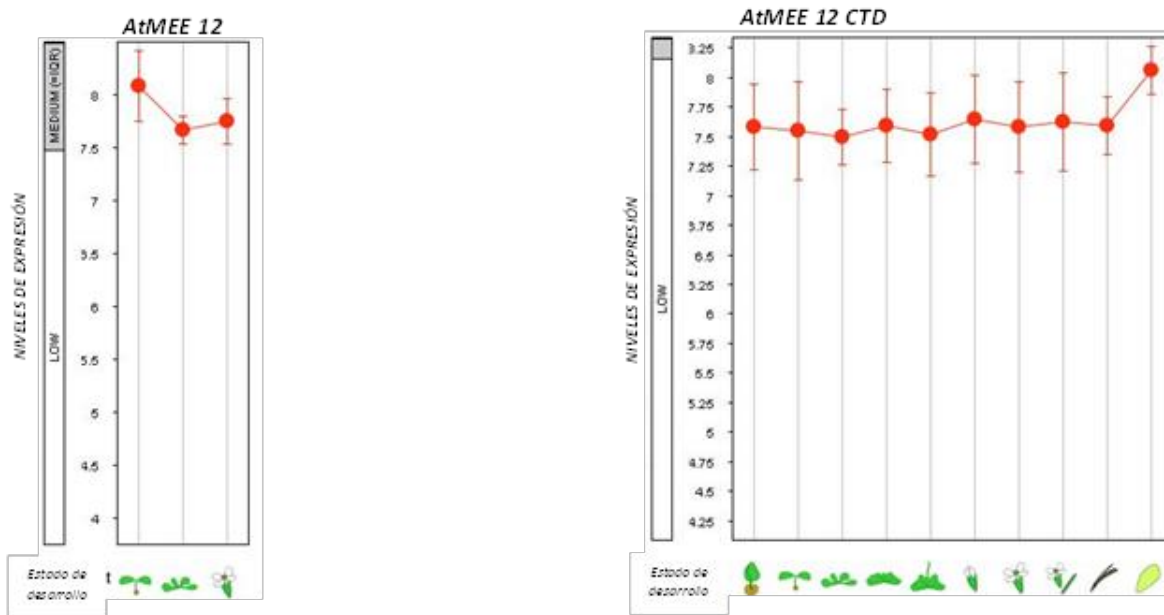


Figura 9: Patrones de expresión de AtMEE 12 y AtMEE 12 CTD depositados en la base de datos "Genevestigator, los cuales se muestran en diferentes tejidos de la planta, desde germinación, plántula, roseta 1, roseta 2, roseta-florescencia, primordio floral, flor, flor-silicua, silicua y semilla.

#### **14. DOMINIOS PRESENTES EN MIEMBROS DE LA FAMILIA GÉNICA ATTFIIB.**

Se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org) [www.genome.jp](http://www.genome.jp)) para obtener las secuencias génicas y proteicas de la familia TFIIIB, la cual posee 15 miembros los cuales se enlistan, se describen y se esquematizan brevemente sus principales características:

##### **2 genes TFIIIB**

TFIIB1; At2g41630

TFIIB2; AT3G10330

sus productos poseen un dominio *zinc ribbon* y dos dominios ciclinas.

##### **6 genes BRP (*plant-specific TFIIIB-related protein*)**

BRP1; At4g36650

BRP2; At3g29380

BRP3; At4g10680

BRP4; At3g57370

BRP5; At4g35540

BRP6; At5g39230

cuyas proteínas poseen dominios *zinc ribbon*, BRP1 posee dos dominios ciclinas, BRP2, 3 y 4 poseen sólo un dominio ciclina, mientras que BRP5 y 6 sólo poseen un *zinc ribbon*.

##### **5 genes BRF (*TFIIB-Related Factor*)**

BRF1; At3g09360

BRF2; At2g45100

BRF3; At2g01280

BRF like, AT1G30455

BRF4 CTD; At4g19550

los cuales codifican para proteínas donde BRF1, 2 y 3 poseen dos dominios ciclinas y un dominio BRF, BRF-like posee un dominio ciclina y un dominio BRF y BRF4 CTD sólo posee un dominio BRF.

##### **MEE (*Maternal Effect Embryo Arrest*)**

AtMEE 12; At2g02955

AtMEE 12 CTD; At4g01340

AtMEE12 codifica para una proteína que posee un dominio RRN7, el cual es semejante a un *zinc ribbon*, AtMEE 12 CTD codifica para un producto semejante, pero con un tallo CTD (*C-terminal domain*).

La figura 10 esquematiza la estructura génica de los integrantes de la familia génica TFIIIB.

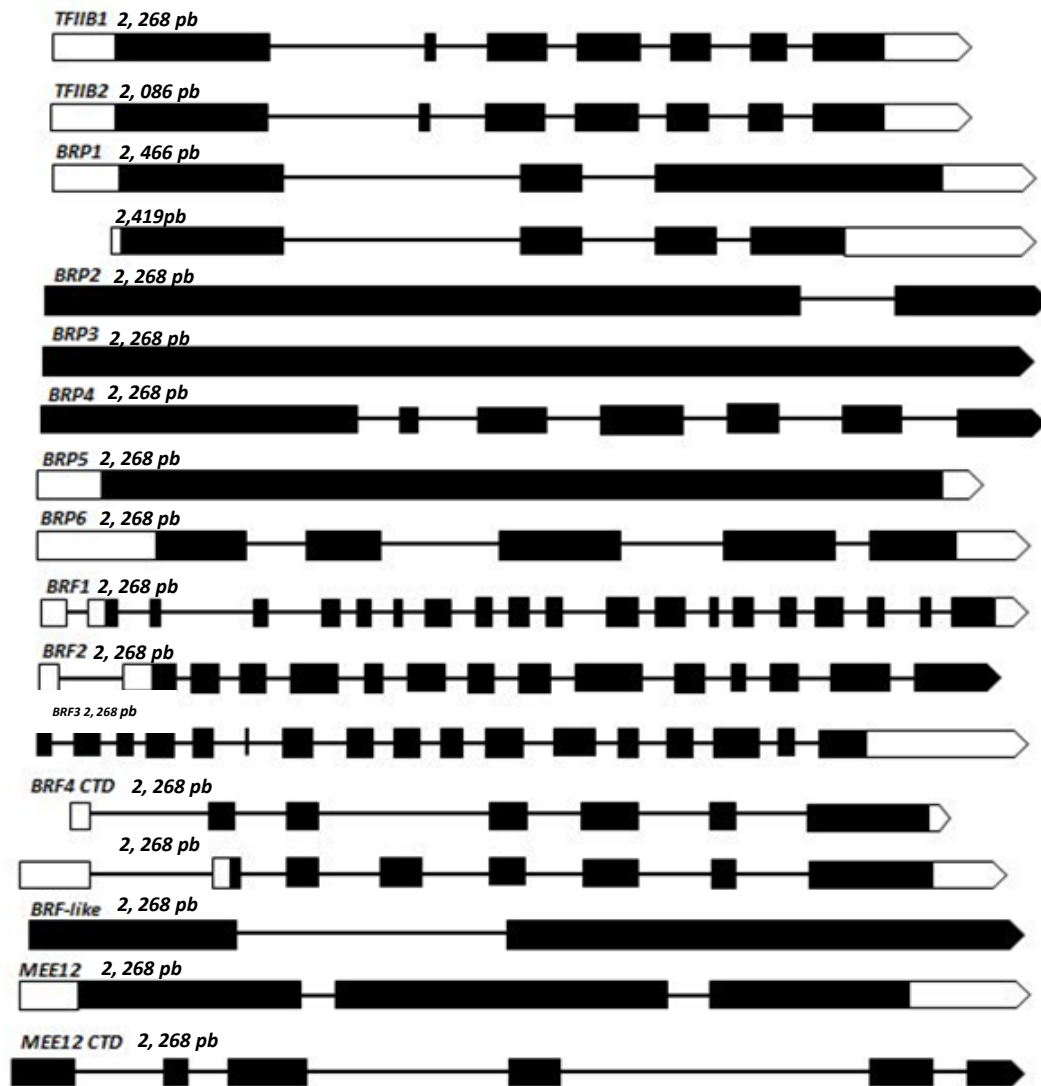


Figura 10: Estructura génica de los miembros de la familia TFIIIB de *Arabidopsis*, las flechas indican la direccionalidad de la transcripción, las cajas blancas indican los UTRs 5' y 3' respectivamente de los marcos de lectura de cada gen, las cajas negras representan los exones y las líneas representan los intrones, de todos los miembros de esta familia, sólo BRP3 no presenta intrones.

Las proteínas producto de la expresión génica de la familia TFIIIB1, poseen una estructura general en cuyo extremo amino se distingue un *zinc ribbon* el cual interactúa con la RNA polimerasa II y la subunidad TBP de TFIIIF, en el extremo carboxilo poseen dos repeticiones directas imperfectas que interactúa tanto con la proteína TBP y con los elementos en *cis* BRE<sup>U</sup> y BRE<sup>D</sup> de regiones promotoras TATA, la figura 8 muestra los péptidos en un esquema lineal y de cajas sus elementos característicos.

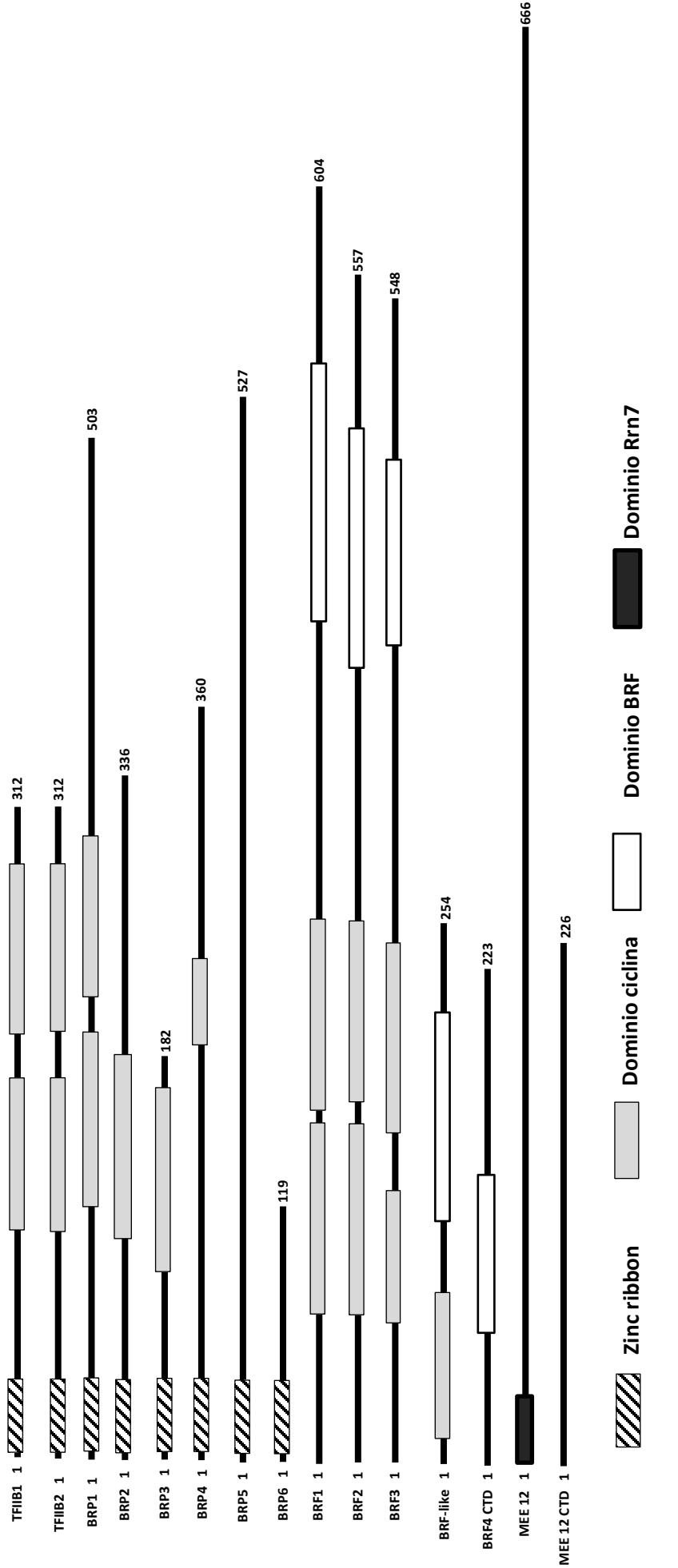


Figura 11: Representación en cajas y línea de los dominios de la familia génica TFIIIB; la caja con líneas representa los dominios zinc ribbon presentes en TFIIB1, TFIIB2, BRP1, BRP2, BRP3, BRP4, BRP5 y BRP6; las cajas grises esquematizan los dominios ciclina presentes en TFIIB1, TFIIB2, BRP1, 2, 3, 4, 5, 6 y BRF1, 2, 3 y BRF-like; el dominio BRF representado en caja lisa, presente solamente en los miembros BRF; mientras que el dominio Rrn7 está solamente presente en el MEE12.

## 15. ANÁLISIS IN SILICO DE ELEMENTOS EN CIS RELACIONADOS AL ESTRÉS EN LA FAMILIA GÉNICA AtTFIIB

Para analizar las regiones promotoras de la familia génica TFIIB en *Arabidopsis*, se tomaron las secuencias intercistrónicas entre el gen que le antecede “río arriba” a nuestro gen de interés y antes del sitio de inicio de la transcripción de este, las cuales están disponibles en línea (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>) las cuales fueron descargadas y analizadas usando las herramientas disponibles en línea como PLACE, PlantPAN y PlantCARE databases (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>, <http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/> <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

Una de las principales características que define a una familia génica es su funcionalidad, independientemente de si su mensajero intermediario es traducido a proteína o si su producto es un transcrito con funciones regulatorias, en ambos casos debe tener una región promotora asociada a alguna RNA polimerasa, en el caso de la familia génica TFIIB estas deben ser asociadas a la RNA pol II, un análisis de las regiones promotoras usando la herramienta disponible en línea weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) nos permitió identificar secuencias regulatorias asociadas a la RNApol II (Figura 9).

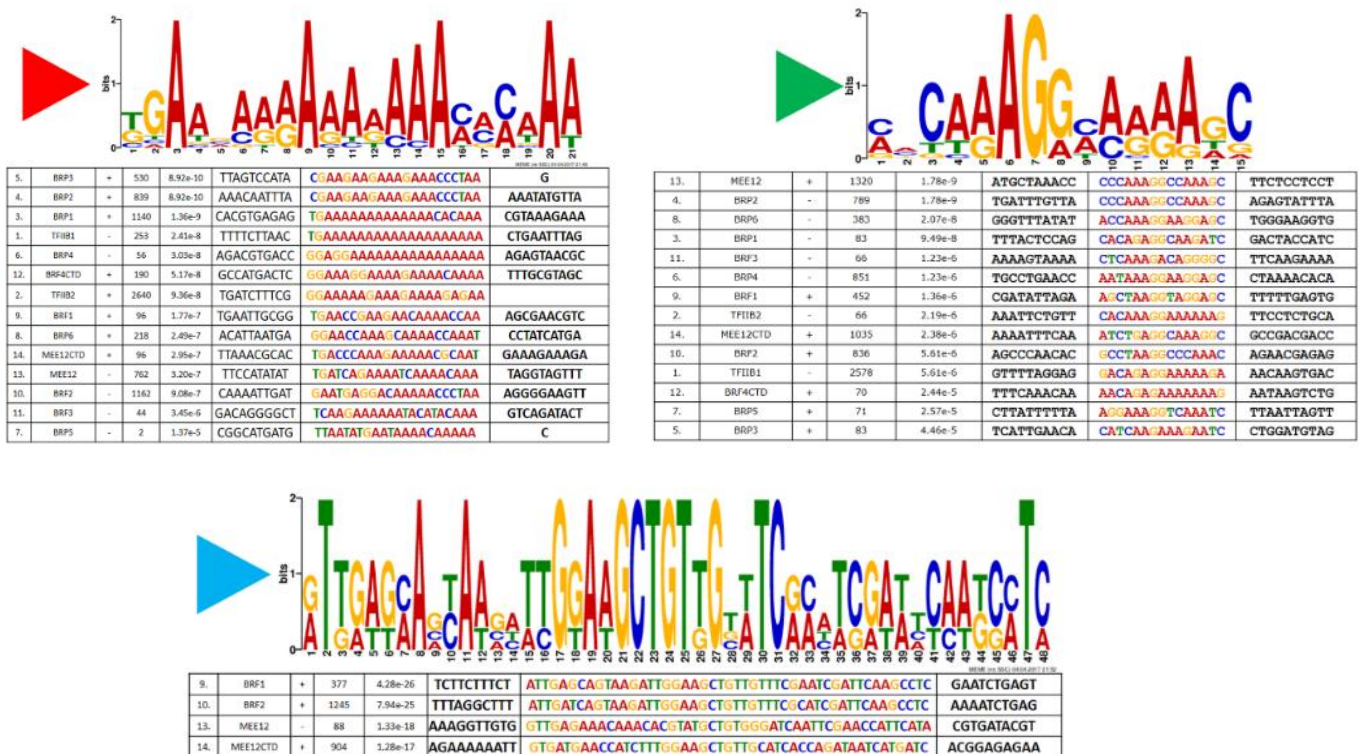


Figura 12: Secuencias consenso de las regiones promotoras de los miembros de la familia TFIIB de *Arabidopsis thaliana*, Los triángulos rojos señalan regiones conservadas ricas en Adenina-Timina (cajas TATA), los triángulos verdes indican las islas CpG y finalmente los triángulos azules señalan regiones semi-conservadas de A-T y C-G (Caja CAAAT).

En la figura 13 muestra el tamaño en pares de bases de las regiones promotoras de los miembros de la familia TFIIIB a partir de las secuencias depositadas en AtcisDB - Arabidopsis *cis*-regulatory element database (<https://agris-knowledgebase.org/AtcisDB/>) y alineados con la herramienta de alineamiento múltiple clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

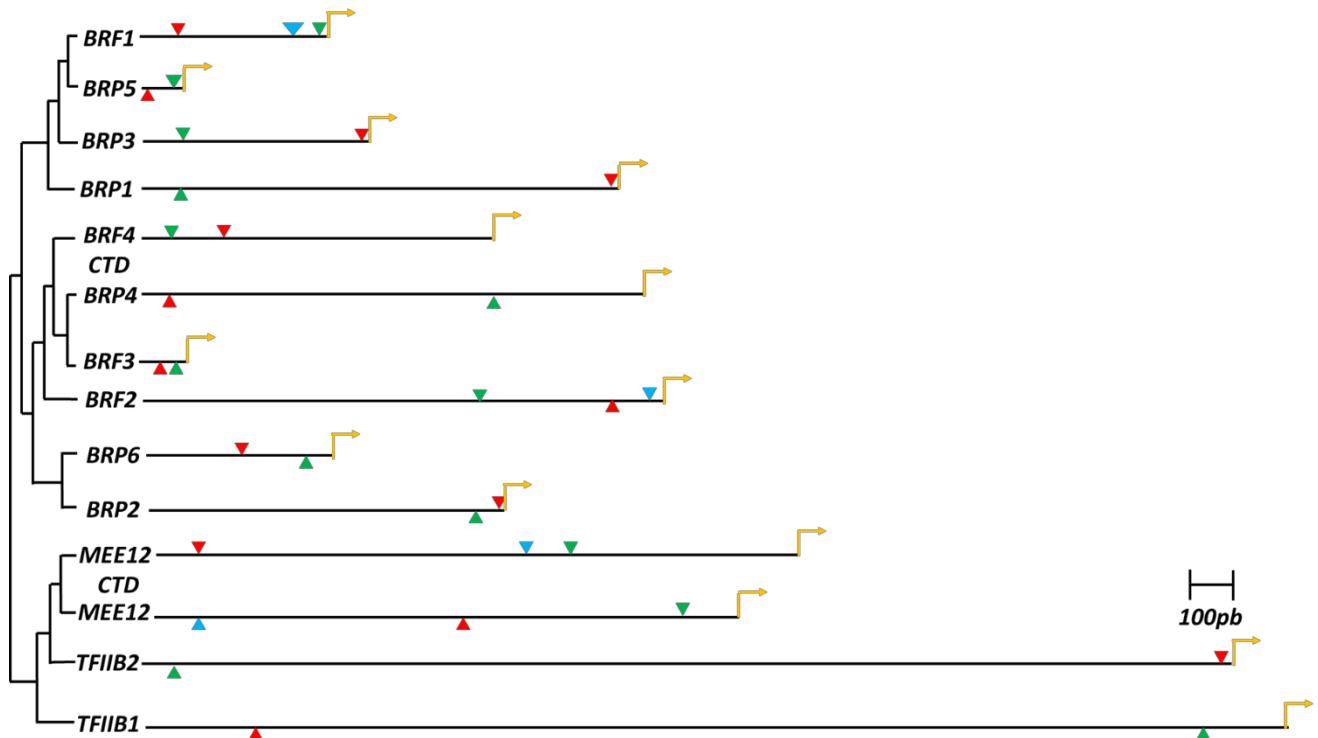


Figura 13: Tamaño de los promotores de la familia TFIIIB: TFIIIB1 (2,804pb), TFIIIB2 (2,704pb), BRP1 (1,178pb), BRP2 (870pb), BRP3 (551pb), BRP4 (1,247 pb), BRP6 (454pb), BRF1 (483pb), BRF2 (1,313pb), BRF3 (100pb), BRF4 CTD (887pb), MEE12 (1,460pb), MEE 12 CTD (1,597pb). Los triángulos rojos señalan regiones conservadas ricas en Adenina-Timina (cajas TATA), los triángulos verdes indican las islas CpG y finalmente los triángulos azules señalan regiones semi-conservadas de A-T y C-G (Caja CAAAT) las cuales fueron identificadas usando la herramienta bioinformática weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>), la flecha amarilla marca el sitio de inicio de la transcripción.

## **16. CARACTERIZACIÓN DE LOS ELEMENTOS REGULATORIOS EN CIS DE LA FAMILIA TFIIB.**

Además de los elementos involucrados en el proceso de transcripción general y asociados a funciones *housekeeping*, se hizo una búsqueda de otros elementos en *cis* en los promotores de la familia génica TFIIB que estuvieran asociados a una regulación por estrés, a partir de las secuencias depositadas en <https://agris-knowledgebase.org/>. Estas secuencias pueden constituir elementos regulatorios y de respuesta asociados a estrés biótico y abiótico ya que sus ligandos son factores de transcripción asociados a la respuesta al estrés, los cuales se depuraron y condensaron en el siguiente grupo de tablas:

- TFIIB 1 (At2g41630) (Tabla 2)
- TFIIB 2 (At3g10330) (tabla 3)
- MEE 12 (At2g02955) (tabla 4)
- BRP 4 (At3g57370) (tabla 5)
- MEE 12 CTD (At4g01340) (tabla 6)
- BRP 4 CTD (At4g19550) (tabla 7)
- BRP 2 (At2g45100) (tabla 8)
- BRP-like (At1g30455) (tabla 9)
- BRP 1 (At4g36650) (tabla 10)
- BRP 2 (At3g29380) (tabla 11)
- BRP 3 (At4g10680) (tabla 12)
- BRP 1 (At3g09360) (tabla 13)
- BRP 6 (At5g39230) (tabla 14)
- BRP 5 (At4g35540) (tabla 15)

Estos están ordenados de mayor a menor de acuerdo con el número de pares de bases en su región promotora, NP indica la ausencia del elemento.



Tabla 2: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen *TFIIB1* (*At2g41630*) de 2,804 pb.

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	4
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	1
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	4
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	2
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	1
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	2
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	2
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	2
MYB4 binding site motif	aacaac	MYB	Bajas temp	5
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	9
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	1
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	3
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	1
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	6
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	1
Z-BOX promoter motif	atcgtgt	MYC	ABA y sequía	1
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	1
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 3: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen *TFIIB2* (*At3g10330*) de 2,704 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	3
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	2
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	2
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	1
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	5
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	2
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	1
MYB4 binding site motif	aacaac	MYB	Bajas temp	6
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	7
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	2
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	2
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	8
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	1
Z-BOX promoter motif	atcgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	2
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	2

Tabla 4: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen MEE 12 (At2g02955) de 1, 460 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	12
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	NP
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	NP
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggtaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	NP
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 5: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRP4 (At3g57370) de 1,247 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	1
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	1
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	NP
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	2
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	4
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	1
BOX II promoter motif	ggtaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	6
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	1
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 6: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen MEE 12 CTD (At4g01340) de 1,597 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	7
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	NP
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggtaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	NP
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 7: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRF4 CTD (At4g19550) de 887 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	3
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	3
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	6
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggtaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	NP
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 8: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen *BRF2* (*At2g45100*) de 1,313 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	7
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	9
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	NP
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	NP
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 9: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen *BRFluke* (*At1g30455*) (sin reporte previo)

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	NP
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	NP
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	NP
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 10: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRP1 (At4g36650) de 1,178 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	1
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	3
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	3
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	NP
MYB4 binding site motif	aaccaaac	MYB	Bajas temp	6
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	2
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	6
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HLTF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 11: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRP2 (At3g29380) de 870 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	1
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	1
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	1
MYB4 binding site motif	aaccaaac	MYB	Bajas temp	1
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	3
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	2
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	1
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HLTF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 12: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRP3 (At4g10680) de 551 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	NP
MYB4 binding site motif	aaccaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	3
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	1
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	1
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	1
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 13: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRF1 (At3g09360) de 483 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	15
MYB4 binding site motif	aaccaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	NP
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	NP
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atacgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 14: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRP6 (At5g39230) de 454 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	1
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	NP
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	1
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	2
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atcgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP

Tabla 15: Elementos regulatorios en cis en el promotor del gen BRP5 (At4g35540) de 100 pb

Nombre del elemento	secuencia consenso	Elemento en trans	tipo de regulación	copias
AtMYC2 BS in RD22	cacatg	BHLH	estrés	NP
ATB2/AtbZIP53/AtbZIP44/GBF5 BS in ProDH	actcat	bZIP	estrés osmótico	NP
W-BOX	ttgac(c/t)	WRKY	estrés, SA	NP
ARF binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	12
ARF1 binding site motif	tgtctc	ARF	auxinas	NP
DPBF1&2	acacg(a/t)g	bZIP	Sequía	NP
HSEs binding site motif	agaaatttct	HSF	Calor	NP
MYB	aaccaaac	MYB	estrés	NP
MYB4 binding site motif	aacaaac	MYB	Bajas temp	NP
RAV1-A binding site motif	caaca	ABI3VP1	etileno	NP
ABRE-like binding site motif	(c/g/t)acgtg(g/t)(a/c)	bZIP	ABA	NP
BOX II promoter motif	ggttaa	bZIP	luz	NP
DRE-like promoter motif	agccgacca	DREB/CBF	Sequía	NP
GATA promoter motif	(a/t)gatag	MYC	ABA y sequía	NP
I-BOX promoter motif	gataag	MYB	Luz	NP
Z-BOX promoter motif	atcgtgt	MYC	ABA y sequía	NP
SORLIP 1 y 2	agccac y gggcc	HL TF	Luz	NP
G-BOX promoter motif	cacgtg	bZIP	Luz, ABA, JA,	NP



En la figura 14, se enumeran de forma detallada los elementos más abundantes en cuanto a número de copias y en el recuadro de la derecha los ligandos específicos para cada elemento en *trans* siendo *TFIIB1* (At2g41630) cuyo promotor posee más elementos regulatorios en su región promotora, la cual incluye además de los elementos asociados a estrés, elementos de *housekeeping*.

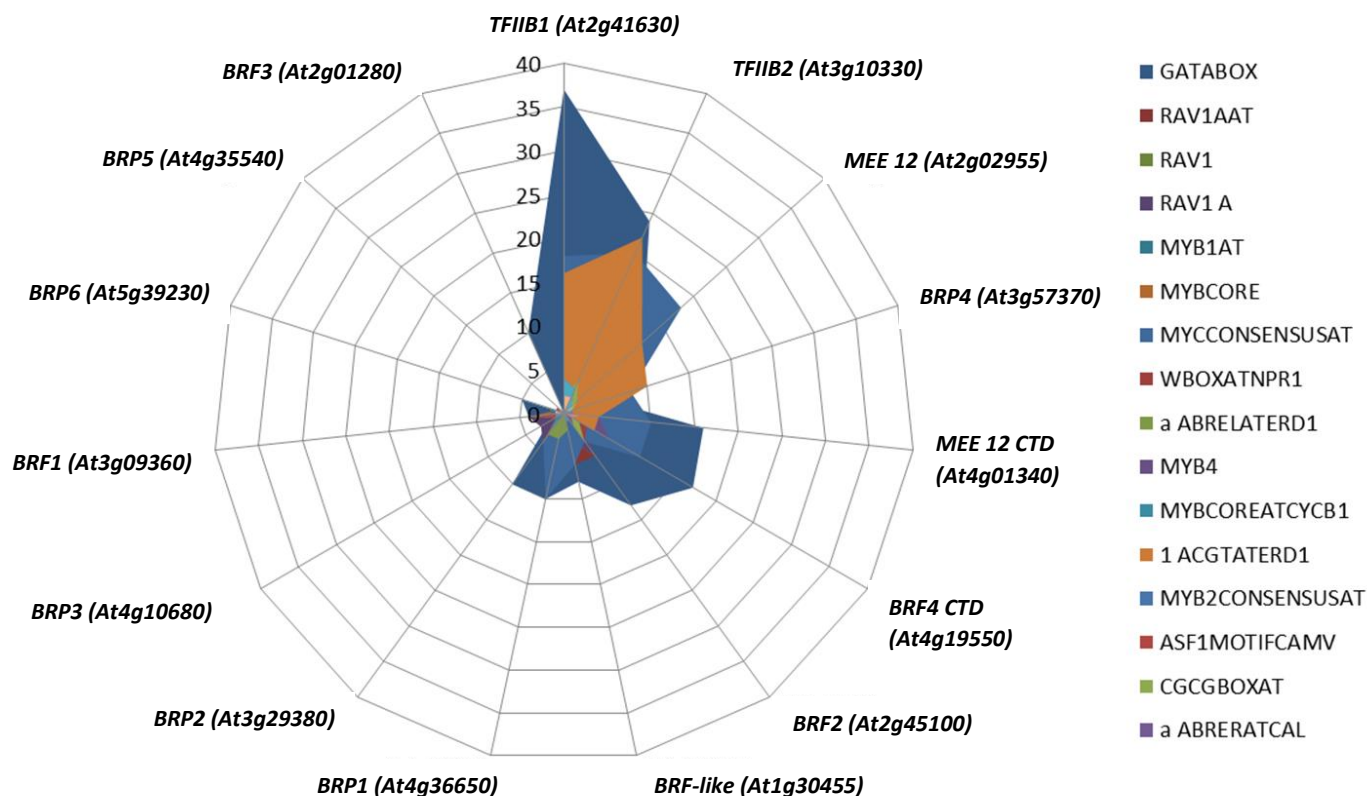


Figura 14: Abundancia de elementos en *cis* en los miembros de la familia TFIIB de *Arabidopsis thaliana*; At2g41630 (TFIIB1), At3g10330 (TFIIB2), At2g02955 (MEE 12), At3g57370 (BRP4), At4g01340 (MEE 12 CTD), At4g19550 (BRF4 CTD), At2g45100 (BRF2), At1g30455 (BRF-like), At4g36650 (BRP1), At3g29380 (BRP2), At4g10680 (BRP3), At3g09360 (BRF1), At5g39230 (BRP6), At4g35540 (BRP5) y At2g01280 (BRF3).

En la tabla 16 se muestra el número de elementos regulatorios en *cis* presentes en las regiones promotoras en los miembros de la familia génica AtTFIIB asociados a estrés abiótico ordenados de mayores repeticiones o copias presentes, siendo AtTFIIB1 (At2g41630) el que posee varios elementos regulatorios asociados a condiciones de estrés (Miranda-Ríos, *et al*, 2021).



Tabla 16: Elementos regulatorios en cis de la familia génica AtTFIIB agrupados.

Miembro de la familia génica	TFIIB1	TFIIB2	MEB1	SRM4	AME1102D	BRF4CTD	BRF2	BRF1-iso	BRP1	BRP2	BRP3	BRF1	BRP4	BRP5	BRF3
ID	Atg1450	Atg10350	Atg292955	Atg17370	Atg10340	Atg19550	Atg4510	Atg10455	Atg5650	Atg29380	Atg10680	AtgNP9160	Atg29230	Atg15140	AtgNP1280
Nombre del motivo	repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones	Repeticiones
GATABOX	37	24	12	5	16	17	13	8	10	10	2	4	5	-	10
RAV1AAT	10	8	2	4	3	2	6	6	2	3	3	4	1	-	-
RAV1	10	8	3	6	2	2	6	3	2	4	3	4	1	-	-
RAV1-A	10	8	3	6	2	2	6	3	2	4	3	4	1	-	-
MYB1AT	8	2	6	2	2	-	3	3	2	3	1	1	2	-	-
MYBCORE	8	1	4	1	1	1	3	2	4	1	4	1	-	-	-
MYBCONSENSUSAT	18	20	18	8	10	10	4	6	10	4	-	2	1	-	-
WBOXATNPR1	8	8	2	2	3	3	4	-	1	3	-	-	1	1	-
ABRELATERD1	3	4	1	2	3	2	-	2	3	3	-	1	-	-	-
MYB4	5	6	3	3	4	6	-	1	-	2	1	-	-	-	-
MYBCOREATCYCB1	4	1	1	2	2	-	-	2	-	3	1	-	-	1	-
ACGTATERD1	16	22	12	10	4	4	-	-	4	-	-	-	-	-	-
MYB2CONSENSUSAT	4	-	1	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
ASF1MOTIFCAMV	3	3	1	1	-	-	-	-	-	1	1	3	-	-	-
CGCGBOXAT	2	4	2	-	-	2	4	-	2	-	-	-	-	-	-
ABRERATCAL	1	3	-	-	1	1	2	-	3	-	-	-	-	-	-
ANT	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-
GBF5	1	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PREATPRODH	1	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AIMY2	4	3	1	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
MYBPLANT	2	1	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
MYCATERD1	4	3	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
MYCATRD22	4	3	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
ACGTABREMOTIFAZOSEM	1	1	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GADOWNAT	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTRECOREATCOR15	1	-	-	-	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
CACGTGMOTIF	-	2	-	-	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-
ABREHse	1	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
AIMYB2	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
HSE4	2	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MYBATRD22	-	-	1	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
MYB2AT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-
ABREATCONSENSUS	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-
MYB1LEPR	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2FAT	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
GCCCORE	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABRE	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
MYB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
DRE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Familias de secuencias regulatorias asociadas a estrés encontradas en los promotores de la familia génica TFIIB: 1) GATABOX: Elemento de respuesta a luz y estímulos abióticos, 2) Familia RAV: Respuesta a deshidratación y salinidad, 3) Familias MYC y MYB: Respuesta a déficit hídrico, señalización por ácido jasmónico, ácido abscísico y ácido salicílico, 4) Familia ABRE: Des respuesta a ácido abscísico, 5) ACGT: De respuesta a deshidratación y ácido abscísico, 6) ARF: De respuesta a auxinas, 7) ASF1MOTIFCAMV: De respuesta a auxinas, ácido salicílico, estrés biótico y abiótico, 8) CGCGBOXAT: De respuesta a ácido abscísico y estrés abiótico, 9) ANT: De respuesta a estrés biótico y abiótico, 10) GBF5: De respuesta a estrés osmótico, 11) PREATPRODH: De respuesta cambios osmóticos, 12) GADOWNAT: De respuesta a ácido abscísico y deshidratación, 13) TRECOREATCOR15: Respuesta a ácido abscísico y deshidratación, 14) CACGTGMOTIF: Asociada a defensa, 15) HSE: Elemento de respuesta a calor, 16) E2FAT: Respuesta a deshidratación, 17) GCCCORE: De respuesta a estrés biótico, 18) DRE: De respuesta a deshidratación y ácido abscísico, salinidad y congelamiento, 19) WBOXATNPR1: De respuesta a estrés biótico.

### 17. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE MIEMBROS DE LA FAMILIA *AtTFIIB* EN CONDICIONES CONTROL

Se caracterizaron los patrones de expresión mediante *RT-PCR* de algunos miembros de la familia génica *TFIIB*, para este sesgo se tomó como criterio seleccionar aquellos genes cuyo productos posean un dominio *zinc ribbon*, y al menos un dominio ciclina, *TFIIB1*; *At2g41630* y *TFIIB2* poseen un dominio *zinc ribbon* y dos dominios ciclina (en este trabajó sólo se caracterizó *TFIIB1* ya que *TFIIB2* se considera una duplicación del mismo gen, al tener la misma secuencia génica y estructura génica y proteica, y por lo tanto, mismas funciones), *BRP1*; *At4g36650*, *BRP2*; *At3g29380*, *BRP3*; *At4g10680* y *BRP4*; *At3g57370* poseen dominios *zinc ribbon*, además, *BRP1* posee dos dominios ciclina, mientras que *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* poseen un dominio ciclina, se extrajo RNA total de diferentes tejidos de *Arabidopsis* para la síntesis de *cDNA* previo a su análisis cuantitativo por *qRT-PCR*, se caracterizaron los patrones de expresión de forma semi-cuantitativa mediante *RT-PCRs* como describe en materiales y métodos de los genes mencionados los cuales se presentan en la siguiente figura, donde se muestra la expresión constitutiva del factor general *TFIIB1* y *BRP1*, mientras que *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* se restringen a tejido floral.

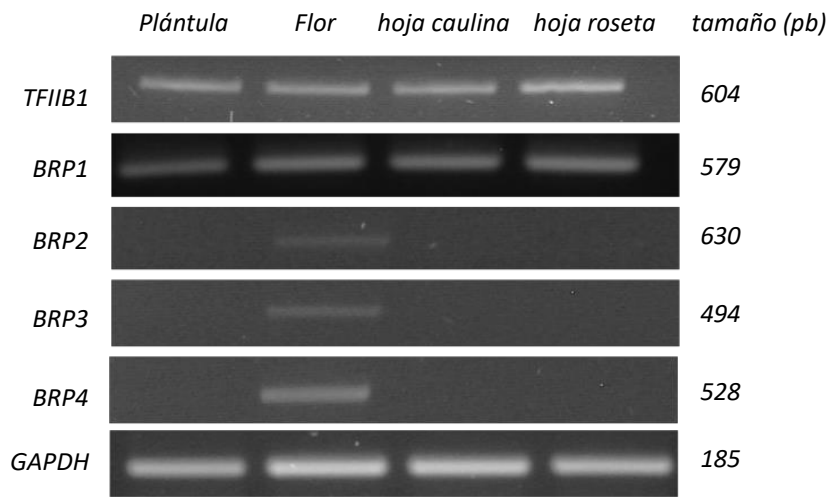


Figura 15: Productos de *RT-PCR* de miembros de la familia génica *TFIIB*, en condiciones sin estrés usando como templado *cDNA* sintetizado a partir de RNA total de plántulas de 15 días (Young rosette), y flores, hojas caulinas y hojas de roseta a partir de plantas adultas (flower shoot), mostrados en orden descendente los amplicones de *TFIIB1*, *BRP1*, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4*. *GAPDH* fue usado como gen de expresión referencial.

## 18. PRUEBAS DE ESTRÉS

Se llevaron a cabo análisis previos de RT-PCR semicuantitativos para determinar si existían patrones diferentes a los observados en condiciones de crecimiento estándar, en donde algunos miembros de la familia TFIIIB y *AtTFIIIB1* presentaron patrones de expresión diferencial en condiciones de estrés abiótico como calor, deshidratación y salinidad, la siguiente figura compuesta muestra estas observaciones. Un resultado notable es la amplificación de un producto específico extra de *AtTFIIIB1* en condiciones de deshidratación, calor y salinidad.

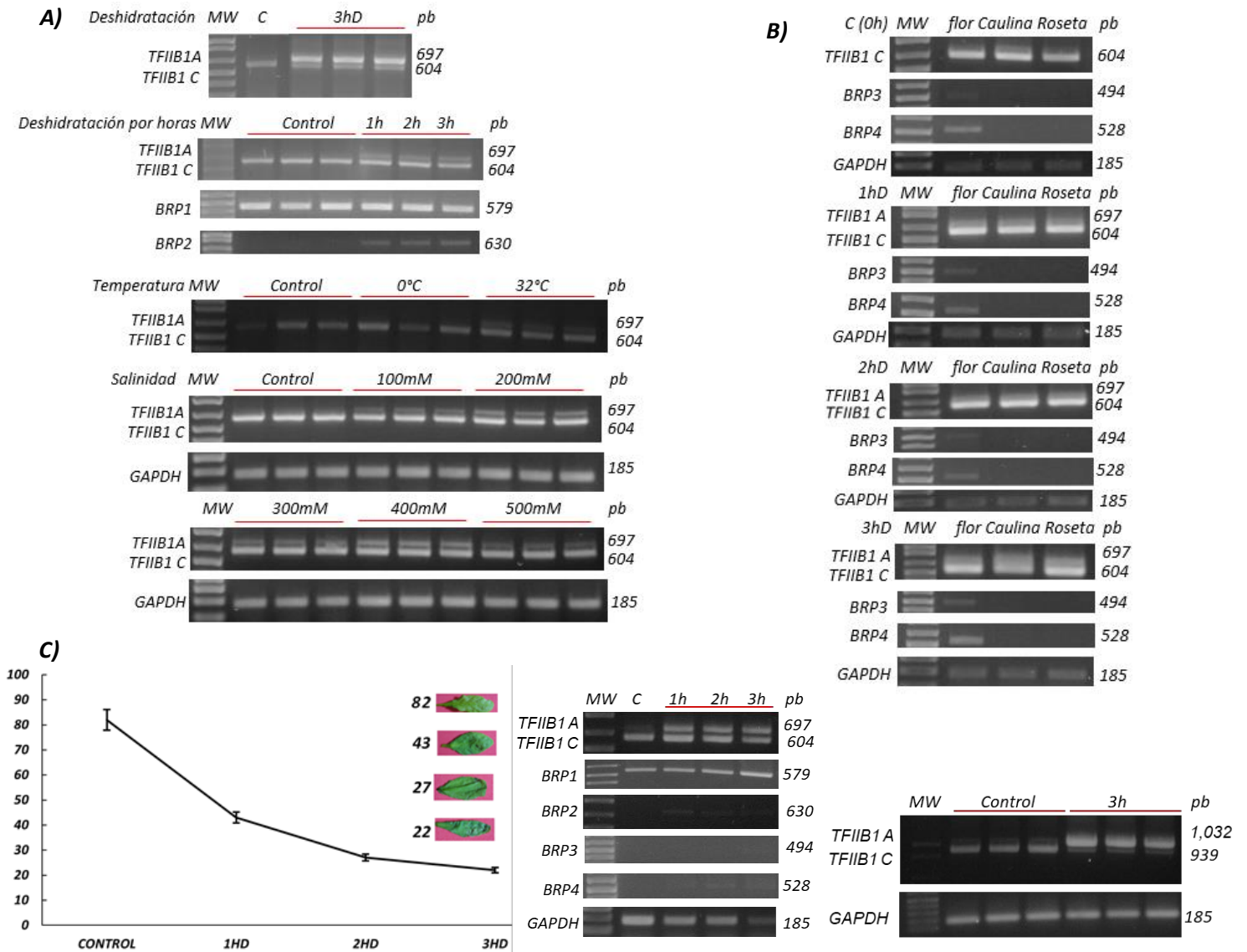


Figura 16: Amplicones de RT-PCRs semi-cuantitativos de estrés abiótico; En la columna A) se muestran los realizados en plántula (Young rosette) en 3 horas de deshidratación (3hD), se observan dos amplicones de *TFIIIB1*, un producto esperado de 604 pb y uno mayor de 697 pb, en un experimento más detallado de 1, 2 y 3 horas de deshidratación se observan en los tres tiempos, no así en el control, así como un aumento en la expresión de *BRP2*, en estrés por alta temperatura (32°C) se observa la amplificación de ambos productos de *AtTFIIIB1* observados en deshidratación, finalmente, se observa un patrón de bandas similares a lo observado en deshidratación y calor en estrés salino de 100, 200, 300, 400 y 500mM de NaCl. En la columna B) los realizados en tejidos de plantas adultas, donde en flor, hoja caulina, y hoja roseta hay dos amplicones de 604 y 697 pb para *TFIIIB1* en condiciones de 1, 2 y 3 h de deshidratación. y en C) los realizados en plantas adultas procesadas completas, en la gráfica se muestra el contenido relativo de agua (RWC), los amplicones de 604 y 697 pb para *TFIIIB1* en deshidratación de 1, 2 y 3 horas, además de amplicones más amplios que abarcan todo el marco de lectura de *TFIIIB1* de 939 y 1,032 pb. En todos los casos se usó *GAPDH* como gen de expresión referencial.

### Estructura genómica de AtTFIIB1 (At2g41630)

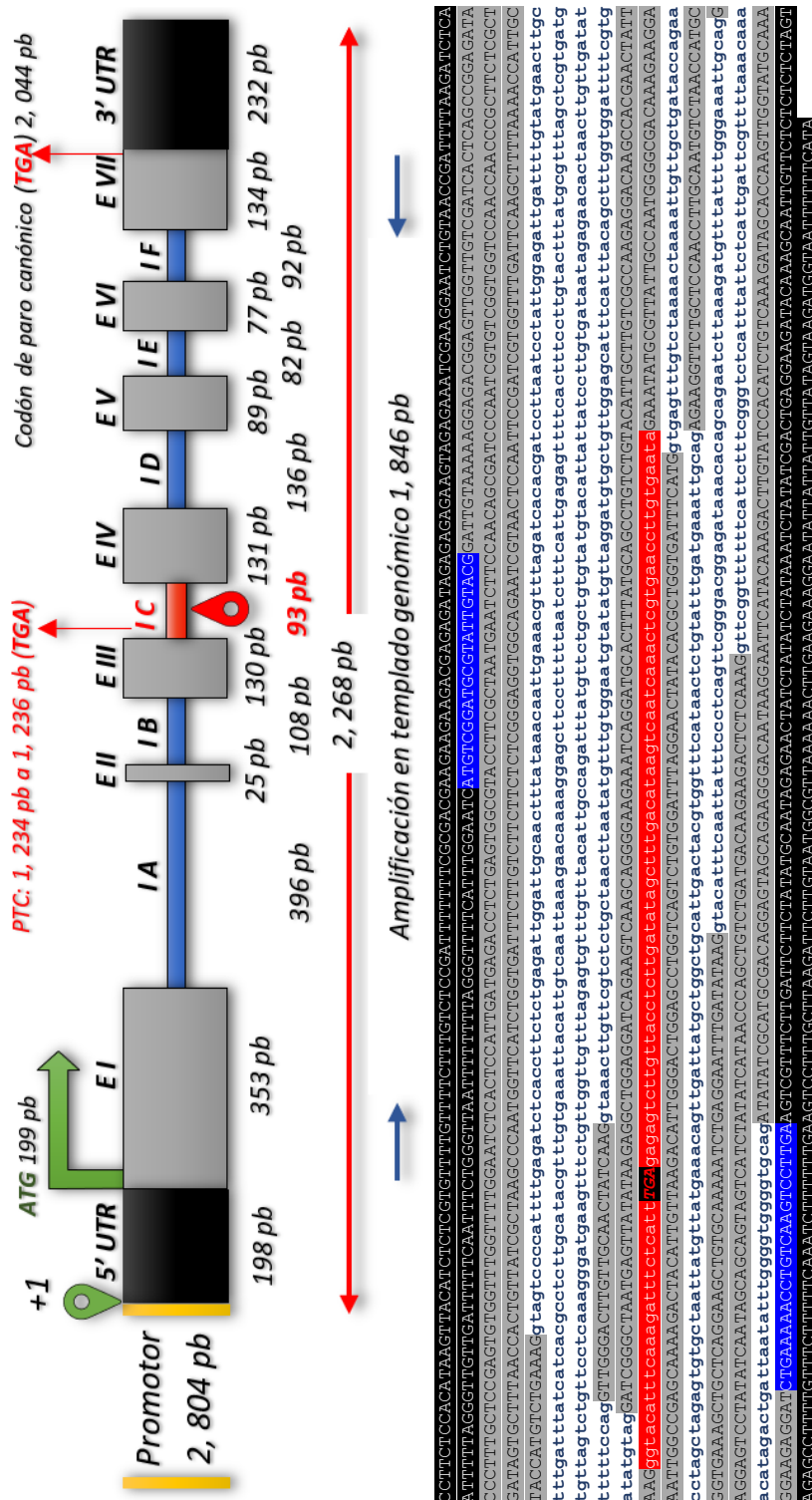
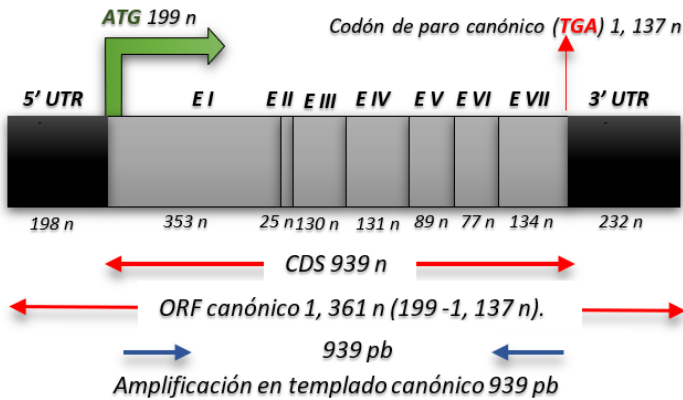


Figura 17: Amplificación en fondo genómico de TFIIB1, con un tamaño de 2, 268 pb, posee 7 exones (I-VII) y seis intrones (A-F). Los oligonucleótidos TFIIB1UP: GGTACCACTGCGGATGCGTATTGTACG y TFIIB1Down: ICTAGATCAAGGACTTGACAGGTTTTTCAG la cual complementaria del siguiente templado: CTGAAAAACCTGTCAAGTCCCTGACTAGA. Permiten amplificar la región transcribible de TFIIB1 en un fondo de templado genómico de 1, 846 pb incluyendo tanto exones como intrones. La caja en verde indica el codón de inicio y la caja en rojo el codón de paro.

### Transcrito canónico de AtTFIIB1 (At2g41630) 1, 361 n

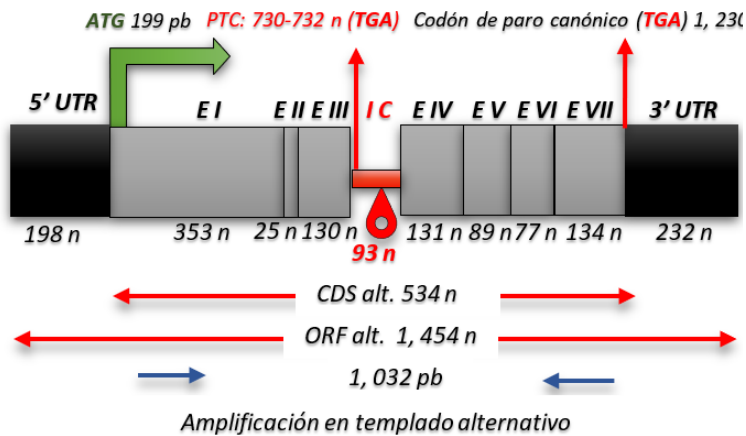


### TRANSCRITO CANÓNICO AtTFIIB1 (At2g41630)

```

CCTTCTCCACATAAGTTACATCTCTCGTGTTTTGGTTTTCTTTGTCTCCGATTTT
TTTCGCGCAGCAAGAAGAAGACGAGAGATAGAGAGAGAAGTAGAGAAATCGAAGG
AATCTGTAACCGATTTTAAGATCTCAATTTTATAGGTTGTTGATTTTCAATTT
CTGGGTAAATTTTTTTAGGGTTTTTCATTTGGAATCATGTCGGATCGGTATTGT
ACCGATTGTAAAAAGGAGACGGAGTTGGTTGTCGATCACTCAGCCGGAGATACC
CTTTGCTCCGAGTGTGGTTTTGGTTTTTGAATCTCACTCCATTGATGAGACCTCT
GAGTGGCGTACCTTCGCTAATGAATCTTCCAACAGCGATCCCAATCGTGTCCGT
GGTCCAACCAACCCGCTTCTCGTGTAGTGTCTTTAAACCAGTGTATCGCTAAG
CCCAATGGTTCATCTGGTGATTTCTTGTCTCTCTCTCGGGAGGTGGCAGAAT
CGTAACCTCAATTCGGATCGTGGTTTTGATCAAGCTTTTAAACCATTGCTACC
ATGCTGTAAAGGTTGGGACTTGTGCAACTATCAAGGATCGGGCTAATGAGTTA
TATAAGAGGCTGGAGGATCAGAAGCTCAAGCAGGGGAAGAAATCAGGATGCACCT
TATGCAGCTGTCTGTACATTTGCTTGTCCGCAAGAGGACAAGCCAGCAATATT
AAGGAAATATGCGTTATTCGCAATGGGGGACAAAGAAGGAAATGGCCGAGCA
AAAGACTACATTGTTAAGACATTGGGACTGGAGCCTGGTCAGTCTGTGGATTA
GGAACTATACACGCTGGTGATTTTCATGAGAAGTTCTGCTCCAACCTTGCAATG
TCTAACCATGCGGTGAAAGCTGCTCAGGAAGCTGTGCAAAAATCTGAGGAATTT
GATATAAGGAGGAGTCTATATCAATAGCAGCAGTAGTCACTATATATATAACC
CAGCTGTCTGATGACAGAAGACTCTCAAAGATATATCGCATGCGACAGGAGTA
GCAGAAGGGACAATAAGGAATTCATACAAAGACTTGTATCCACATCTGTCAAAG
ATAGCACCAGTTGGTATGCAAAGGAAGGATCTGAAAAACCTGTCAAGTCTCT
TGAAGTCGTTCTTGATTTCTTATATGCAATAGAGAATCTATATATCTATAA
ATCTATATCGACTGAGGAAGATACAAGCAATGTTCTCTCTCTCTAGTAGAGC
CTTTTGTCTTTTCAAACTTTTTTGAAGTCTTTGCTTAAGATCTCTGTAA
TGGCGTTAAAAACTTGAAGAAAGGAATATATTATTGTTATAGTAAGATGGTA
ATTTTTTCATA
    
```

### Transcrito alternativo de AtTFIIB1 (At2g41630) 1, 454 n



### TRANSCRITO ALTERNATIVO AtTFIIB1 (At2g41630)

```

CCTTCTCCACATAAGTTACATCTCTCGTGTTTTGGTTTTCTTTGTCTCCGATTT
TTTTTCGCGCAGCAAGAAGAAGACGAGAGATAGAGAGAGAAGTAGAGAAATCGAA
GGAACTCTGTAACCGATTTTAAGATCTCAATTTTATAGGTTGTTGATTTTCAAA
TTCTGGGTAAATTTTTTTAGGGTTTTTCATTTGGAATCATGTCGGATCGGTA
TTGTACCATTGTAAAAAGGAGACGGAGTTGGTTGTCGATCACTCAGCCGGAG
ATACCCTTTGCTCCGAGTGTGGTTTTGGTTTTTGAATCTCACTCCATTGATGAG
ACCTCTGAGTGGCGTACCTTCGCTAATGAATCTTCCAACAGCGATCCCAATCG
TCTCGGTGGTCCAAACCAACCCGCTTCTCGCTGATAGTGTCTTTAAACCACTGTTA
TCGCTAAGCCCAATGGTTCATCTGGTGATTTCTTGTCTCTCTCTCGGGAGG
TGGCAGAATCGTAACTCCAATTCGGATCGTGGTTTTGATTCAGCTTTTAAAAAC
CATTTGCTACCACTGTCTGAAAGGTGGGACTTGTGCAACTATCAAGGATCGGG
CTAATGAGTTATATAAGAGGCTGGAGGATCAGAAGTCAAGCAGGGGAAGAAAT
CAGGATGCACTTTATGCAAGCTGTCTGTACATTTGCTTGTGCAAGAGGAGCAA
GCCACGAACTATTAAGggtacatttcaagatttctcattTGAAGagagctcttg
ttacctcttgatataagctttgacataaagctcaatcaaacctgtaaccttgtag
ataGAAATATGCGTTATTGCCAATGGGGGACAAAGAAGGAAATGGCCGAGC
AAAAAGACTACATTGTTAAGACATTGGGACTGGAGCCTGGTCAGTCTGTGGATT
TAGGAACTATACACGCTGGTGATTTTCATGAGAAGGTCTGCTCCAACCTTGCA
ATGCTAACCATGCGGTGAAAGCTGCTCAGGAAGCTGTGCAAAAATCTGAGGA
ATTTGATATAAGGAGGAGTCTATATCAATAGCAGCAGTAGTCACTATATCA
TAACCCAGCTGTCTGATGACAAGAAGACTCTCAAAGATATATCGCATGCGACA
GGAGTAGCAGAAGGGACAATAAGGAATTCATACAAAGACTTGTATCCACATCT
GTCAAAGATAGCACCAGTTGGTATGCAAAGGAAGAGGATCTGAAAAACCTGT
CAAGTCTTGAAGTCGTTCTTGATTTCTTATATGCAATAGAGAATCTATCTA
TATCTATAAATCTATATCGACTGAGGAAGATACAAGCAATGTTCTCTCTCTCT
CTAGTAGAGCCTTTTGTTCTTTTTCAAACTTTTTTGAAGTCTTTGCTTAA
GATTTCTGTAATGGCGTTAAAAAACTTGAAGAAAGGAATATATTATTGTTAT
AGTAAGATGGTAATTTTTTCATA
    
```

Figura 18: Amplificaciones de TFIIB1 en templados de cDNA, con un tamaño de 939 pb, el cual posee 7 exones (I-VII) y seis intrones (A-F), mientras que en un templado alternativo se retiene el tercer intrón de 93 pb, generando un amplicón de 1, 032 pb. Los oligonucleótidos TFIIB1UP: GGTACCATGTCGGATGCGTATTGTACG y TFIIB1Down: TCTAGATCAAGGACTTGACAGTTTTTCAG la cual complementaria del siguiente templado: CTGAAAAACCTGTCAAGTCTTGATCTAGA.



## 19. Clonación de las isoformas del transcrito de AtTFIIB1.

Los templates fueron sintetizados a partir de RNA total extraído de plantas adultas completas de *Arabidopsis thaliana* previamente crecidas en condiciones axénicas y estándar después de 3 horas de deshidratación en campana de flujo laminar; se diseñaron *primers* que permiten amplificar toda la región codificante de las hasta ahora dos posibles isoformas de AtTFIIB1, estos oligonucleótidos poseen adaptadores para añadir sitios de corte *KpnI* y *XbaI* ya que después de purificar los productos de PCR de los geles de agarosa (figura 16) como se describe en los materiales y métodos, estos amplicones fueron clonados en vectores *pKs*, transferidos a cepas de *E. coli DH5-α*, seleccionando a las cepas transformadas con ampicilina (50mg/mL) como marcador de selección, purificación de plásmidos de las colonias seleccionadas y verificando por PCR o digestión enzimática (*KpnI* y *XbaI*) la clonación de ambos productos en dicho vector, para su caracterización por secuenciación. (<http://oldwww.ibt.unam.mx/server/PRG.base?altern0:0,clase:ser,tipo:doc,tit:Unidad de S%EDntesis y Secuenciaci%F3n de ADN,dir:/sintesis/index.html>).

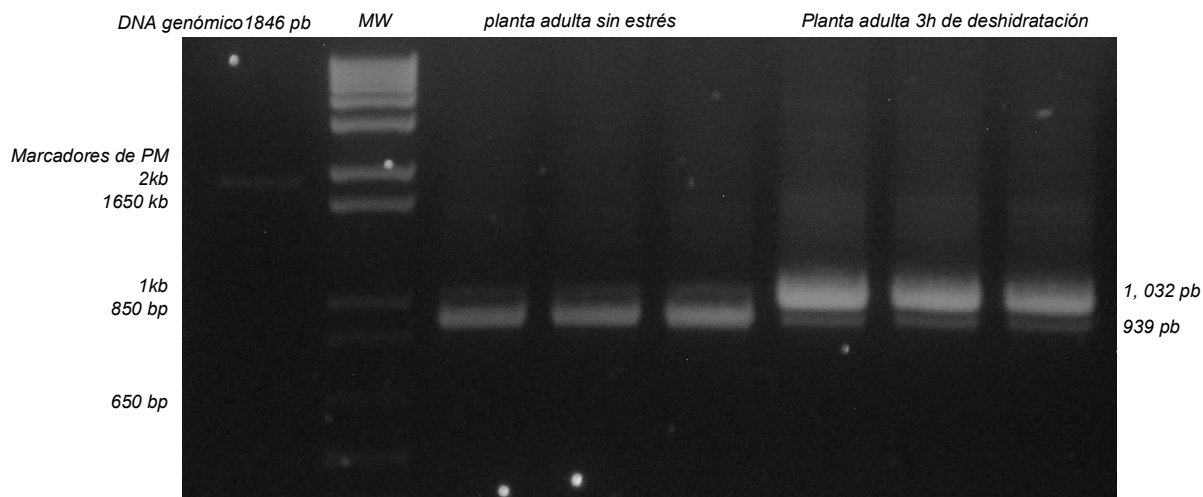
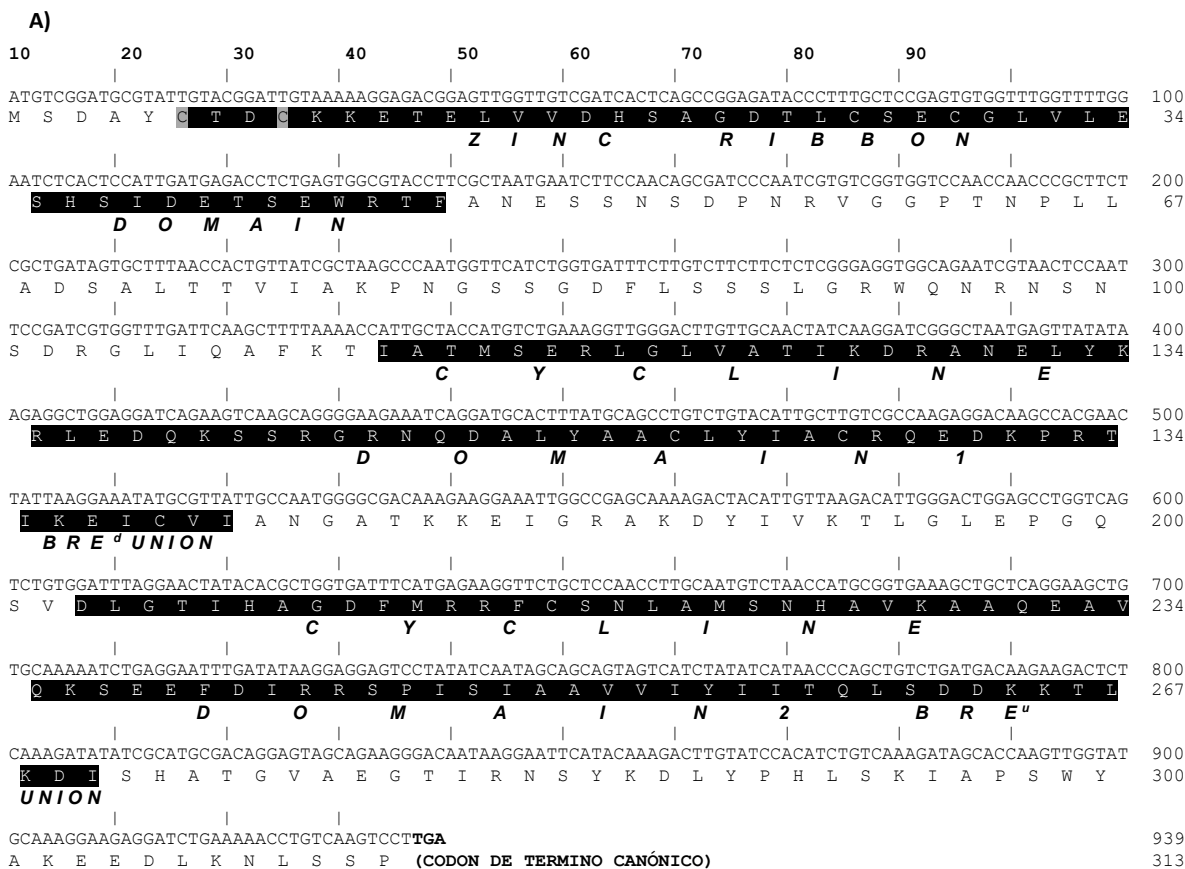


Figura 19: Amplificación de las dos posibles isoformas de marcos de lectura de TFIIB1 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos; el primero con un linker *KpnI* para su clonación en un vector *pKs*, TFIIB1UP: GGTACC**ATG**TCGGATGCGTATTGTACG, el siguiente oligonucleótido con un linker *XbaI* con el mismo propósito de clonación, TFIIB1Down: TCTAGA**TCA**AGGACTTGACAGGTTTTTCAG siendo complementaria del siguiente template: CTGAAAAACCTGTCAAGTCCT**TGAT**TCTAGA. Las amplificaciones en template genómico, cDNA canónico y cDNA alternativo son las siguientes: 1. Amplificación en template genómico: 1846pb, 2. Amplificación en template cDNA canónico: 939pb y 3. Amplificación en template cDNA alternativo: 1032pb. Los oligonucleótidos subrayados indican los linkers para sitios de corte, los oligonucleótidos en cuadro verde indica que anclará a la cadena complementaria del codón de inicio como template, los oligonucleótidos en rojo indican que anclará a la cadena complementaria del codón de término como template, mostrando en cuadro rojo indican la cadena complementaria a la cual ancla el oligonucleótido TFIIB1 Down.

## 20. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS AMPLICONES DE *TFIIB1*.

El análisis *in silico* de las secuencias de los productos clonados demuestran que existen dos transcritos de *AtTFIIB1*, la forma canónica de este gen codifica para un producto de 312 residuos de aminoácidos, el cual posee un dominio *zinc ribbon* y dos dominios ciclinas (*cycline domain*) de unión a *DNA*, mientras que el transcrito alternativo retiene el tercer intrón, el cual posee un codón de paro prematuro, este transcrito, de ser traducido a proteína carecería de un dominio ciclina (*BRE<sup>u</sup>*) de unión a *DNA*. Las secuencias analizadas se muestran en la siguiente figura compuesta.



B)





## 22. qPCRs EN CONDICIONES CONTROL

Previo a las pruebas de estrés, se caracterizaron los patrones de expresión de algunos miembros de la familia génica TFIIIB, para este sesgo se tomó como criterio seccionar aquellos genes cuyo productos posean un dominio *zinc ribbon*, y al menos un dominio ciclina, *TFIIIB1*; *At2g41630* y *TFIIIB2* poseen un dominio *zinc ribbon* y dos dominios ciclina (en este trabajo sólo se caracterizó *TFIIIB1* ya que *TFIIIB2* se considera una duplicación del mismo gen, al tener la misma secuencia génica y estructura génica y proteica, y por lo tanto, mismas funciones), *BRP1*; *At4g36650*, *BRP2*; *At3g29380*, *BRP3*; *At4g10680* y *BRP4*; *At3g57370* poseen dominios *zinc ribbon*, además, *BRP1* posee dos dominios ciclina, mientras que *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* poseen un dominio ciclina, se extrajo RNA total de diferentes tejidos de *Arabidopsis* para la síntesis de *cDNA* y su análisis de expresión cuantitativo mediante *qRT-PCRs* como describe en materiales y métodos de los genes mencionados los cuales se muestran en la figura 18 *TFIIIB1* muestra altos niveles de expresión en plántula y hojas roseta, mientras que en otros tejidos presenta una expresión basal, el transcrito alternativo presenta un ligero aumento de transcripción en hoja de roseta, *BRP 1*, *BRP 2*, *BRP 3* y *BRP 4* presentan un nivel basal de transcripción en flor.

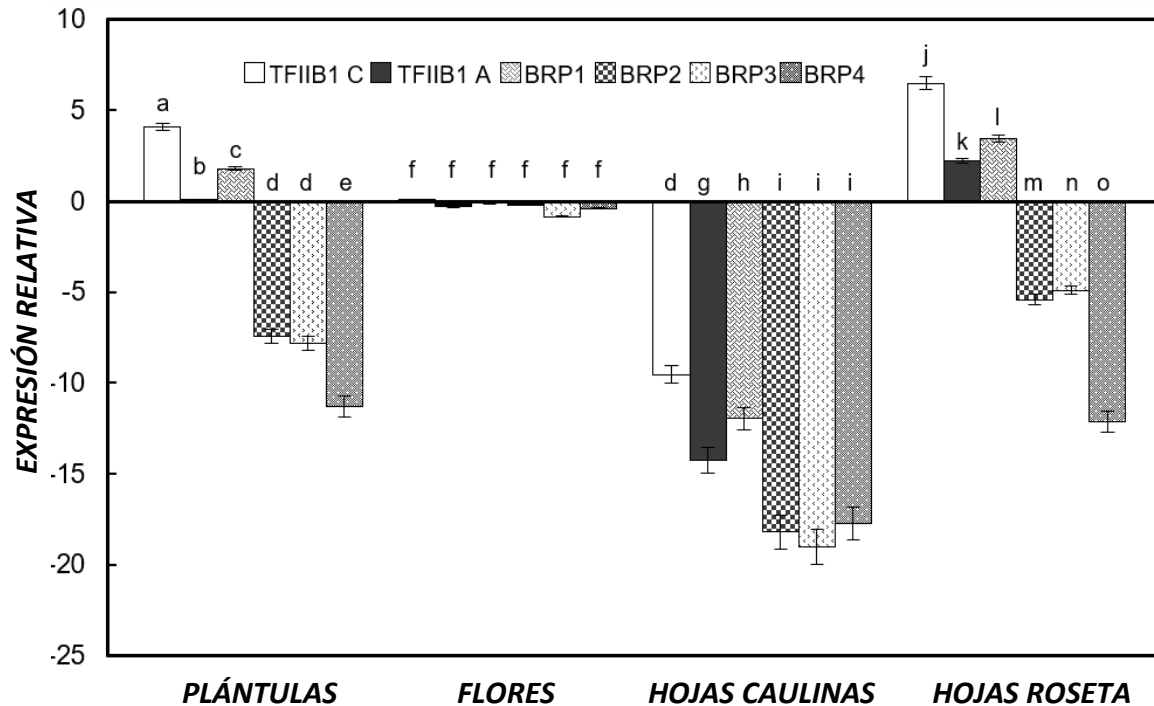


Figura.21: Análisis de expresión por qRT-PCR de miembros de la familia TFIIIB bajo condiciones control de no estrés en *A thaliana*. □ Indica la isoforma canónica de *AtTFIIIB1C* (*At2g41630*), ■ indica la isoforma alternativa de *AtTFIIIB1A*, ▨ indica *BRP1* (*At4g36650*), ▩ indica *BRP2* (*At3g29380*), ▪ indica *BRP3* (*At4g10680*) e ▫ indica *BRP4* (*At3g57370*) respectivamente. Los niveles de expresión relativa de cada muestra fueron obtenidos usando el método "comparative Ct method" como se menciona en materiales y métodos y normalizados con la media geométrica del gen referencial *GAPDH* (*AT2G24270*). Las literales sobre las barras indican una diferencia significativa de 0.01 de los patrones de expresión entre cualquier miembro de la familia TFIIIB analizados. Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.

## 22. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN PRUEBAS DE ESTRÉS

### A) TFIIB1 EN PLÁNTULAS BAJO ESTRÉS SALINO

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* silvestres de dos semanas sometidas a estrés salino (como se describe en materiales y métodos), para el análisis de expresión de las isoformas del factor de transcripción general TFIIB1 (At2g41630) mediante RT-qPCRs. Los resultados se muestran en las siguientes gráficas, donde se observa un cambio en los patrones de expresión de TFIIB 1, donde el alternativo aumenta conforme aumenta la concentración de cloruro de sodio, mientras que disminuye la isoforma canónica.

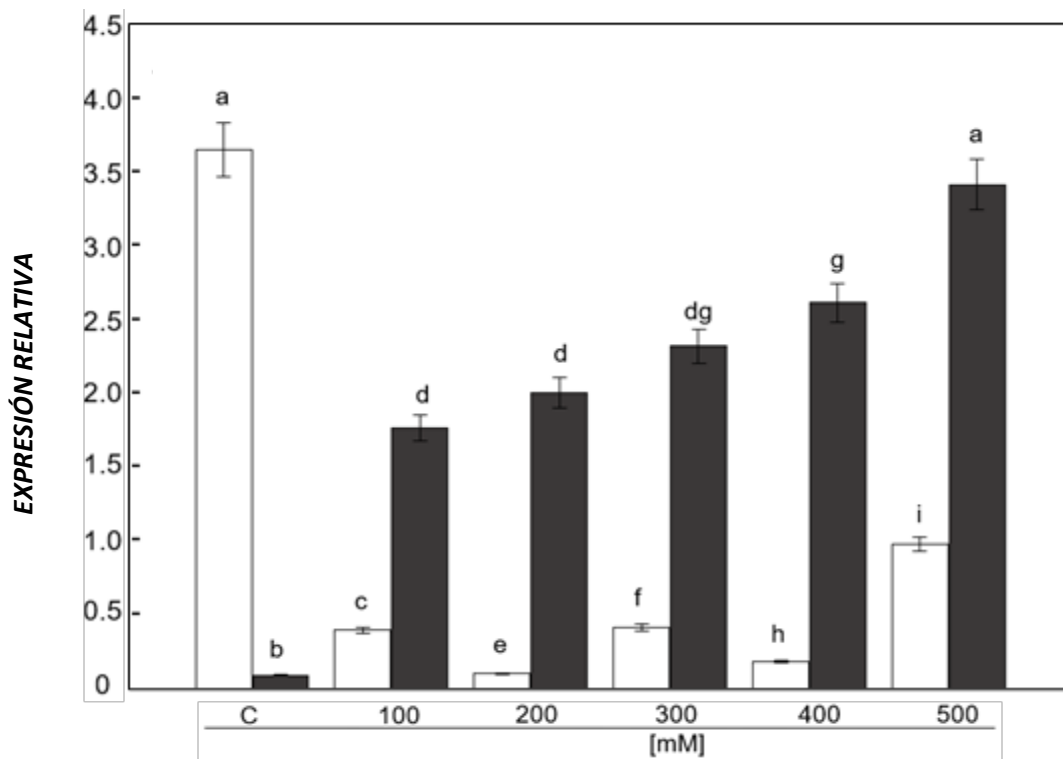


Figura. 22: Análisis de expresión por qRT-PCR de miembros de la familia TFIIB bajo estrés salino en *Arabidopsis thaliana*. Niveles de expresión de las isoformas de los transcritos de AtTFIIB1 cuantificados por qRT-PCR, los cDNAs templados fueron sintetizados a partir de RNA total aislado de plántulas (Young rosette) sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (100, 200, 300, 400 and 500mM) por una hora. □ Indica la isoforma canónica de AtTFIIB1, ■ indica la isoforma alternativa de TFIIB1, la cual tiene una mayor expresión en condiciones de estrés salino. Los niveles de transcripción relativos para cada muestra se obtuvieron usando el "método Ct comparativo" como se menciona en materiales y métodos y se normalizó con la media geométrica del gen GAPDH (AT2G24270). Las letras diferentes en superíndice encima de las barras indican una diferencia significativa a un nivel significativo de 0,001 entre los patrones de expresión de cualquier miembro de la familia TFIIB. Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas.

## B) BRPs EN PLÁNTULAS BAJO ESTRÉS SALINO

Plántulas silvestres de *Arabidopsis thaliana* de dos semanas fueron puestas en agua destilada con diferentes concentraciones de NaCl (descrito en materiales y métodos) para el análisis de expresión de algunos de los miembros de la familia TFIIB; BRP1; At4g36650, BRP2; At3g29380, BRP3; At4g10680 y BRP4; At3g57370 mediante RT-qPCRs. Los resultados se muestran en las siguiente figura. Sobresale el aumento en la expresión de BRP2, BRP4, un ligero aumento en BRP1 y una disminución en BRP3, el cual aumenta solamente en 500mM de NaCl, lo cual indica cambios en la expresión génica en estos miembros de la familia TFIIB en condiciones de estrés osmótico.

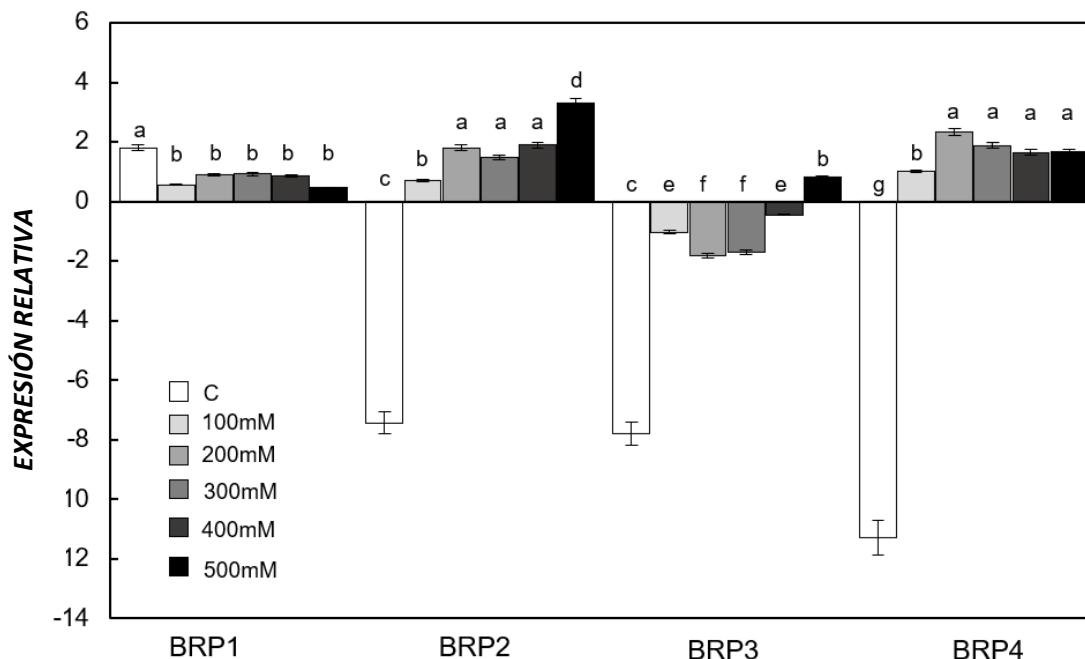


Figura 23: Niveles de expresión de miembros de la familia BRPs TFIIB bajo diferentes concentraciones de NaCl, □ significa tratamiento de control, ◻ significa NaCl 100 mM, ◻ significa NaCl 200 mM, ◻ significa NaCl 300 mM, ◻ significa 400 mM y ◻ significa NaCl 500 mM. Los niveles de transcripción relativos para cada muestra se obtuvieron usando el "método Ct comparativo" como se menciona en materiales y métodos y se normalizó con la media geométrica del gen GAPDH (AT2G24270). Las letras diferentes en superíndice sobre de las barras indican una diferencia significativa a un nivel significativo de 0,001 entre los patrones de expresión de cualquier miembro de la familia TFIIB. Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas.

**C) TFIB1 Y BRPs EN ESTRÉS POR CALOR, BAJAS TEMPERATURAS Y DESHIDRATACIÓN EN PLANTULAS**

Las plántulas sometidas a altas y bajas temperaturas (0 °C y 32 °C) y deshidratación presentaron una expresión diferencial cuantificada por *q-RT-PCR* en algunos de los miembros de la familia TFIB, TFIB1, At2g41630 presenta expresión diferencial, siendo la forma alternativa la que presenta mayor concentración en condiciones de altas temperaturas y deshidratación, BRP1; At4g36650, presenta mayor expresión en deshidratación, al igual que BRP2; At3g29380, mientras que BRP3; At4g10680, principalmente en bajas temperaturas, para finalmente BRP4; At3g57370 presenta un aumento en todas las condiciones de estrés mencionadas, mostrando cambios en los patrones de expresión.

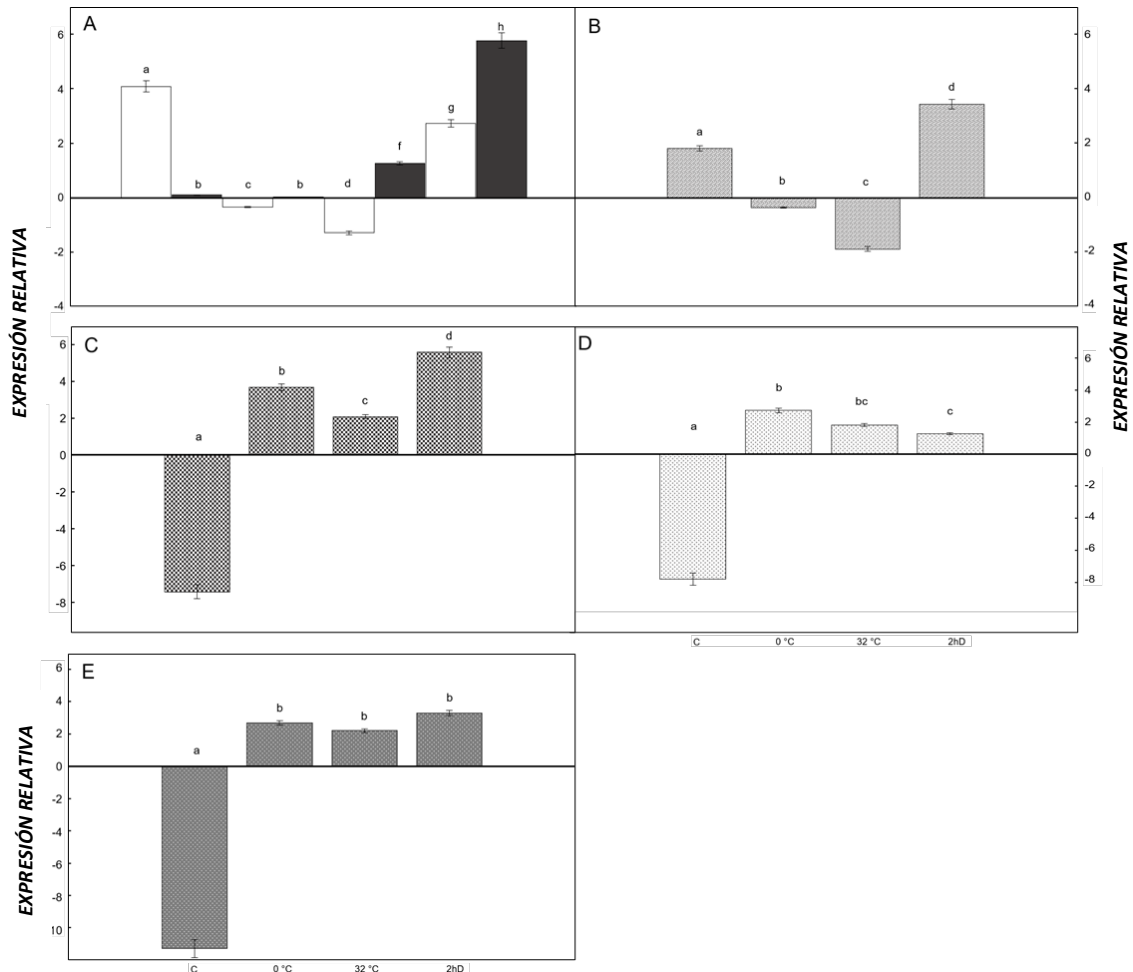


Figura 23: Análisis de expresión por *qRT-PCR* de miembros de la familia TFIB bajo frío (0 °C), calor (32 °C) y estrés por deshidratación de 2 horas en plántulas de *A. thaliana*. A) □ TFIB1 canónica y alternativa ■ de TFIB1 B) ▨ Niveles de expresión para BRP1, C) ▩ Niveles de expresión para BRP2, D) ▤ Niveles de expresión para BRP3 y E) ▥ Niveles de expresión para BRP4. En todos los casos C significa Condiciones de Control, frío (0 °C), calor (32 °C) y 2 horas de deshidratación (2hD). Los niveles de transcripción relativos para cada muestra se obtuvieron usando el "método Ct comparativo" como se menciona en materiales y métodos y se normalizó con la media geométrica del gen GAPDH (AT2G24270). Las letras diferentes en superíndice encima de las barras indican una diferencia significativa a un nivel significativo de 0,001 entre los patrones de expresión de cualquier miembro de la familia TFIB. Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas.

#### D) TFIIB1 Y BRPs EN DIFERENTES TEJIDOS DE PLANTAS ADULTAS SOMETIDAS A DESHIDRATACIÓN

Diversos tejidos como flor, hojas caulinas y hojas de la roseta mostraron una expresión diferencial a 1, 2 y 3 horas de deshidratación, TFIIB1, At2g41630; muestra un aumento del transcrito alternativo en hoja caulina en los tres casos de deshidratación, al igual que BRP1; At4g36650, BRP2; At3g29380, BRP3; At4g10680 mientras que BRP4; At3g57370 muestra un ligero aumento también en roseta.

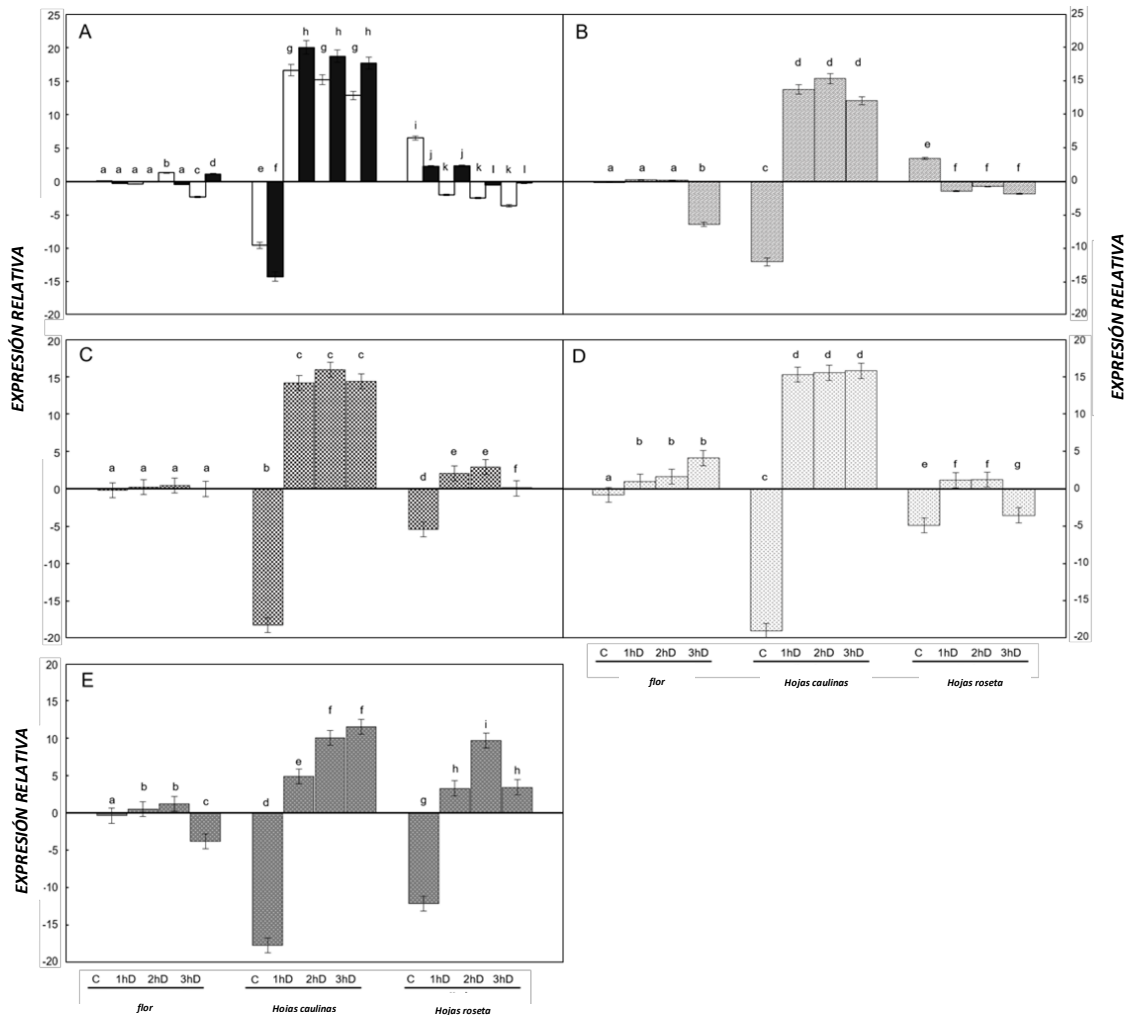


Figura 24: Análisis de expresión de miembros de la familia TFIIB mediante qRT-PCR bajo estrés por deshidratación en tejidos de *A. thaliana*. A) □ Forma canónica y ■ alternativa TFIIB1, B) ▨ Niveles de expresión para BRP1, C) ▩ Niveles de expresión para BRP2, D) ▤ Niveles de expresión para BRP3 y E) ▥ Niveles de expresión para BRP4, todos los casos C significa Condiciones de control, 1hD, 2hD y 3hD significa 1 hora, 2 horas y 3 horas de deshidratación respectivamente en tejido floral (Flores), hojas de Caulinas y hojas de roseta. Los niveles de transcripción relativos para cada muestra se obtuvieron usando el "método Ct comparativo" como se menciona en materiales y métodos y se normalizó con la media geométrica del gen GAPDH (AT2G24270). Las letras diferentes en superíndice encima de las barras indican una diferencia significativa a un nivel significativo de 0,001 entre los patrones de expresión de cualquier miembro de la familia TFIIB. Las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas.

### 23. CONSIDERACIONES NOTABLES DE AtTFIIB1

El factor de transcripción general de *Arabidopsis AtTFIIB* (At2g41630) es una secuencia multi-exónica compuesta por siete exones y seis intrones, el ORF canónico comprendía 2044 nucleótidos, cuando se transcribe, se produce el ARNm maduro canónico completo de los siete spliceosome de la unión del exón mediado y el tamaño del ORF de la transcripción es de 939 nucleótidos desde ATG hasta el codón de paro, cuando se traduce en proteína, el *AtTFIIB1* consta de 312 residuos de aminoácidos, la proteína consiste en un dominio *zinc ribbon* y dos dominios ciclina de unión a *ADN*, *TFIIB* juega un papel central en el ensamblaje del complejo de preiniciación, proporcionando un puente entre el *TFIID* de unión al promotor y la *ARN polimerasa II* estabilizando el complejo *ADN-TFIID*. *TFIIB* hace un amplio contacto con el promotor a través de dos sitios de reconocimiento de *ADN* independientes que flanquean la caja TATA, el elemento de Unión “río abajo” ( $BRE^d$ ; sitio de unión al dominio 1 de ciclina) y el elemento de de unión “río arriba” ( $BRE^u$ ; sitio de unión al dominio 2 de ciclina) para el posterior reclutamiento de *TFIIF* y *RNA pol II* en el promotor (Reese, 2003; Thomas y Chiang 2006, Sikorski y Buratowsky, 2009).

En la isoforma de transcripción alternativa cuyos niveles de expresión aumentan de forma específica en condiciones de estrés abiótico, la retención del tercer intrón proporciona un codón de paro prematuro, el cual, de traducirse, el posible producto carecería del segundo dominio de ciclina, generando una nueva microproteína (miP) o péptido de pequeña interferencia (SiP) con un rol de regulación (Syed, et al., 2012) *TFIIB1-like*. La siguiente figura esquematiza la descripción anterior. Esto sugiere que el factor de transcripción *TFIIB1* y las proteínas relacionadas con él (*BRP1*, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4*) además de participar en el desarrollo y los procesos reproductivos, también pueden estar involucrados en los mecanismos de regulación para lidiar con el estrés abiótico como la deshidratación y salinidad.

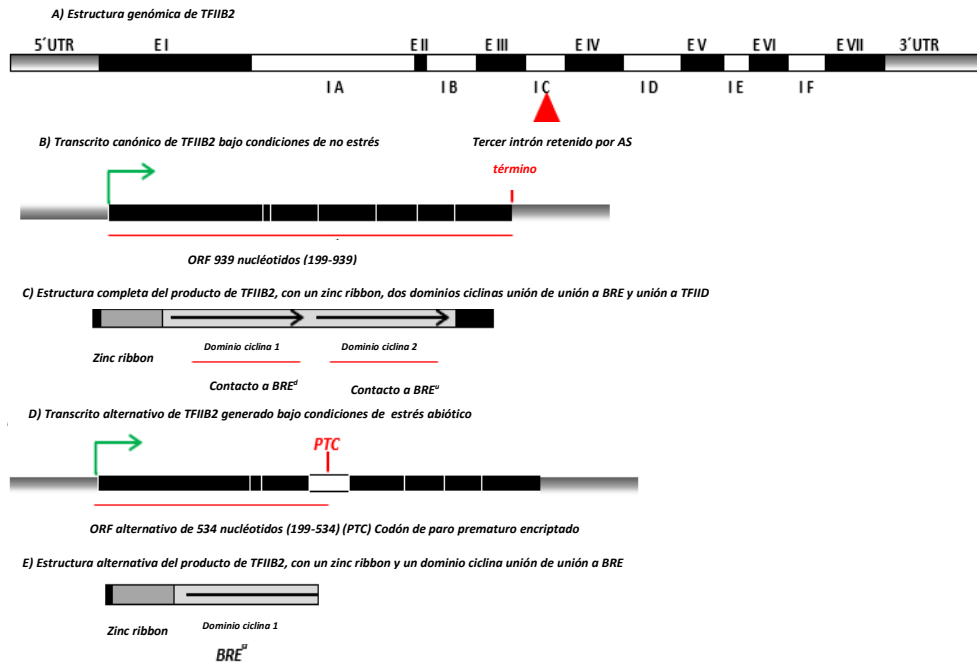


Figura 25: Modelo lineal de los probables productos de expresión de *AtTFIIB1* A) Estructura genómica del gen *TFIIB1*, que muestra 7 exones y 6 intrones. B) Transcripción canónica y producto que muestra un amplio ORF de 938 nucleótidos y una proteína de 313 residuos de aminoácidos, con todos los dominios funcionales de la proteína. C) Isoforma alternativa generada por AS en condiciones de estrés, el producto alternativo carece del segundo dominio de ciclina.

## 24. Análisis "in silico" del producto de empalme canónico y alternativo de proteínas TFIIB1

La superposición y la alineación estructural de ambos productos de cadenas de polipéptidos se analizaron utilizando un algoritmo para calcular la similitud estructural de dos proteínas (Zhang y Skolnick 2005). El análisis mostró que el producto de la isoforma alternativa no retiene el dominio de ciclina 2, a diferencia de la isoforma canónica, por lo que las funciones biológicas de unión a por lo menos un dominio  $BRE^d$  sigue intacto y la función del péptido puede ser de regulación negativa al impedir el reclutamiento del resto de la maquinaria de inicio de la transcripción relacionada a la *RNApol II*. Producto de estos novedosos resultados aquí enunciados y presentados, se publicaron en la revista indizada y revisada por pares *Biología plantarum* 65: 255-264. El cual se anexa en material suplementario

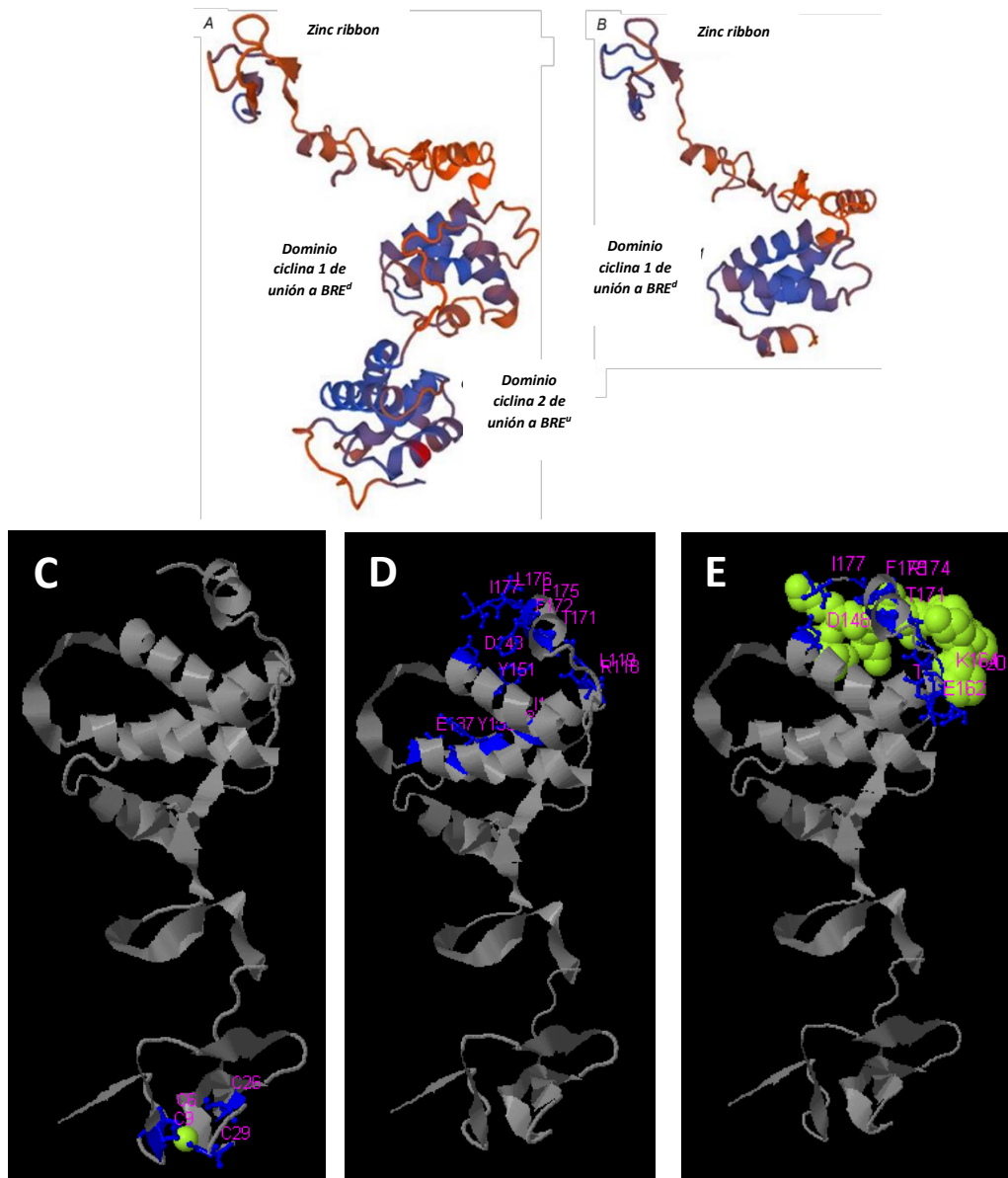


Figura 26. Estructuras proteicas de las posibles isoformas de TFIIB1. A) Isoforma canónica de AtTFIIB1 B) Isoforma alternativa de AtTFIIB1 C) Dominio zinc ribbon conservado. D) Dominio ciclina 1, de unión a  $BRE^d$ . E) Tallo TFD, dominio de unión a proteínas. Esta simulación in silico demuestra que la proteína conserva su estructura dimensional y los sitios de unión a otras proteínas, los dominios zinc ribbon y sólo un dominio ciclina ( $BRE^d$ ).



## 25. Microarreglos de las plantas mutantes insercionales en *TFIIB1*

Para obtener una idea general sobre las posibles funciones que regula *TFIIB1* en un contexto de estrés abiótico, se realizó un análisis transcripcional mediante microarreglos en la mutante insercional de *Arabidopsis SALK\_084698C* en *TFIIB1(at2g41630)* crecida previamente en condiciones controladas. En la mutante *TFIIB1*, 52 genes están regulados positivamente, y 205 están regulados negativamente. Los genes regulados positivamente incluyen genes regulados por la luz, genes implicados en el metabolismo del almidón, azúcar y aminoácidos, degradación de la pared celular, metabolismo secundario, estrés abiótico, procesos redox, transporte de electrones, regulación de la transcripción y estructura de la cromatina, modificación de proteínas, respuesta celular, desarrollo, y transportadores. El listado de los genes regulados en este fondo mutante se muestra en el material suplementario.

Estos microarreglos pueden darnos indicios sobre las funciones en las cuales está relacionado *TFIIB1*, se sabe, como se ha mencionado en este documento, que sus funciones además del tipo *housekeeping* de genes relacionados o dependientes de la *RNA pol II*, sus funciones son de notable importancia en el desarrollo del tubo polínico y arquitectura floral, interesantemente, los microarreglos indican un aumento en el número de genes regulados negativamente relacionados a la transcripción, además de otras funciones que pudieran estar relacionados a mecanismos de “contención” o de “resguardo” como genes relacionados a respuesta celular, transporte de electrones, modificación de proteínas y cromatina, lo que indica que además de sus funciones como factor general de la transcripción, *TFIIB1* está estrechamente relacionado a una respuesta para contener contra condiciones de estrés.

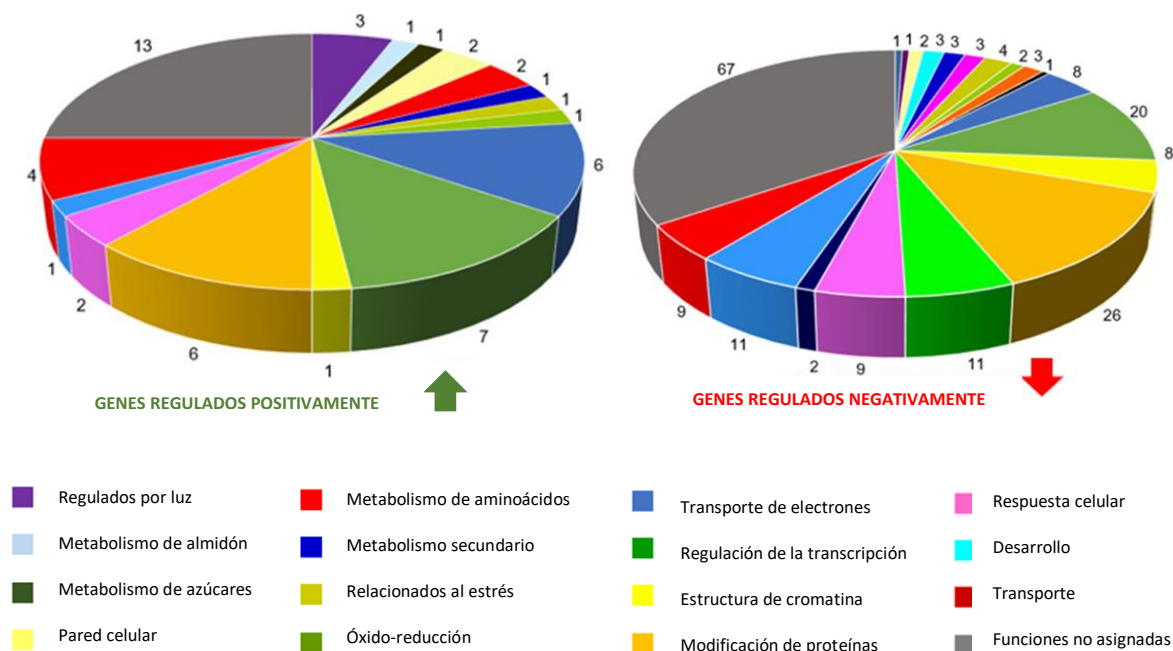


Figura 27: Microarreglos de la línea mutante *SALK\_084698C*, los cuales muestran el número de genes regulados positiva y negativamente, estos grupos de genes pueden indicarnos que además de sus funciones tipo “housekeeping” como factor de transcripción general, incluye diversos genes relacionados a procesos que pueden estar estrechamente relacionados a condiciones de estrés.



## 26. DISCUSIÓN

La expresión génica en plantas es un proceso finamente regulado, y el éxito en el mantenimiento de la homeostasis depende de la coordinación de varios elementos de acción tanto en *cis* como en *trans* que regulan una miríada de genes para enfrentar las condiciones adversas. Por lo tanto, muchas vías de señalización que controlan estos procesos son dirigidas para coordinar la maquinaria de transcripción central, como la regulación de la ARN polimerasa II (*Pol II*) y Factores de generales de la transcripción (*GTF*) (Grünberg y Hahn 2013). El orden de reclutamiento secuencial para la formación de Complejo de preinicio de la transcripción (*PIC*) es un proceso muy bien regulado debido a la alta afinidad de la *RNA Pol II* por *DNA*, este proceso comienza con *TFIID* (complejo multiproteico *TBP* y *TAF*) en la caja *TATA* (un elemento en *cis*), y el reclutamiento de *TFIIA*, *TFIIB*, *TFIIF*, *RNA pol II*, *TFIIE* y *TFIIH* (Thomas y Chiang 2006; Liu et al.2010; Grünberg y Hahn 2013 ). En *Arabidopsis*, hay 14 proteínas similares a *TFIIB* que se han recategorizado filogenéticamente en las subfamilias *TFIIB*, *Brf* y *Rrn7 / TAF1B / MEE12* (Knutson 2013; Niu et al.2013). La subfamilia *TFIIB* tiene ocho miembros, incluidos *TFIIB1*, *TFIIB2* y seis proteínas *BRP*, entre las cuales *BRP1* posee un dominio *zinc ribbon* y dos dominio ciclinas; por su parte *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* poseen un dominio *zinc ribbon* y sólo un dominio ciclina, *BRP5* y *BRP6* sólo poseen un *zinc ribbon* (Knutson 2013). Por lo que en este estudio se consideraron además de *TFIIB1* a *BRP1*, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* en este estudio debido a su funcionalidad.

### **BRP1**

En *Arabidopsis*, *BRP1* (*At4g36650*) se expresa en todos los tejidos y etapas de desarrollo, aunque con un alto nivel de expresión en las raíces y un nivel más bajo en flores y silicuas; *BRP1* se localiza tanto en plástidos como en núcleos y se ha informado que está involucrado en la síntesis de *ARNr* dependiente de *ARN polimerasa I* (Lagrange et al. 2003). Nuestros resultados del análisis de expresión génica en plántulas, hojas de caulina y roseta, y flores indicaron que *BRP1* es un gen expresado constitutivamente como lo han informado Lagrange y colaboradores (2003). Bajo estrés de deshidratación en plantas adultas, *BRP1* mostró un aumento en los niveles de expresión después de 1 hora y permaneció después de 2 y 3 horas en hojas de caulina y con regulación negativa en hojas de roseta y solo bajo deshidratación aumenta sus niveles de expresión en plántulas, sin embargo, bajo estrés de salinidad, *BRP1* está regulado negativamente, por lo que podemos hipotetizar, que *BRP1* es un gen regulado por estrés, o involucrado en la regulación de respuesta a estrés, más no *per se* como un gen respuesta a estrés o con un producto efector especializado.

### **BRP2**

La expresión de *BRP2* (*At3g29380*) está restringida a los órganos y semillas reproductivos y está implicada en la regulación del crecimiento del endospermo, se ha reportado que líneas mutantes en este gen exhiben una tasa de proliferación más lenta en la etapa sincitial del endospermo (Cavel et al., 2011). Los experimentos en este trabajo mostraron una inducción en la expresión de *BRP2* bajo deshidratación en hojas caulinas después de 1, 2 y 3 horas de estrés por deshidratación y ligeramente en hojas de roseta, así como en plántulas a baja y alta temperatura deshidratación y lo más importante, mostró un aumento en los niveles de expresión en condiciones de estrés de salinidad, por lo que al igual que lo propuesto para *BRP1*, puede ser que *BRP2* está siendo regulado o involucrado en la coordinación de respuesta a estrés abiótico.

### **BRP3**

Aunque esta proteína auxiliar relacionada con *TFIIB* se expresa principalmente en flores, nuestros datos mostraron que *BRP3* (*At4g10680*) exhibe un aumento evidente en la expresión del tejido floral bajo deshidratación después de 1, 2 y 3 horas y se induce en hojas caulinas y hojas de la roseta, así como en plántulas bajo frío, calor y deshidratación. Sin embargo, su expresión está regulada negativamente en plántulas bajo condiciones de estrés por salinidad, aunque con un ligero aumento en NaCl 500 mM.

### **BRP4**

Se corroboró que la expresión de *BRP4* (*At3g57370*) está restringida a las flores y exhibe un aumento en los niveles de expresión en la flor después de 1 y 2 horas de deshidratación, pero disminuye después de 3 horas; sin embargo, mostró una inducción en hojas caulinas y hojas de roseta después de la primera hora de deshidratación. Curiosamente, a pesar de considerarse la expresión de *BRP4* específica al tejido floral, se logró cuantificar una inducción de expresión en plántulas bajo frío, calor y deshidratación, así como una inducción bajo estrés de salinidad, por lo que puede tener un rol asociado a respuesta estrés abiótico en plántula.

### **TFIIB1**

Zhou y colaboradores (2013) describen que *AtTFIIB1* (*At2g41630*) está implicado en el crecimiento del tubo polínico y el desarrollo del endospermo, y la transcripción de este gen se encuentra en todas las etapas de desarrollo desde plántula, en la senescencia y desarrollo de planta siendo expresado los tejidos vegetativos, como raíces, tallos, hojas, flores, botones florales, granos de polen, silicuas, así como en estructuras reproductivas como flor y granos de polen, por lo que este factor general de la transcripción posee un rol importante en la reproducción sexual (Zhou *et al.* 2013), la expresión de *AtTFIIB1* es importante para diferenciación del polen y la formación del tubo de polínico que lleva los gametos masculinos a un saco embrionario para la doble fertilización, mientras que en la embriogénesis permite que el cigoto se desarrolle en un embrión, estos procesos son poligénicos e involucran la expresión de varios genes y *TFIIB1* al ser un factor general y ampliamente conservado en los tres dominios, es por tanto imprescindible para la viabilidad de la planta (Wang, *et al.*, 2008; Niu, *et al.*, 2013).

La estructura genómica *AtTFIIB1* es una secuencia multiexónica de siete exones y seis intrones (Knutson, 2013), es conocido que las regulaciones transcripcionales y postranscripcionales de los *ARNm* se modifican drásticamente durante las respuestas al estrés en las plantas para mantener la homeostasis y contender contra las condiciones adversas. Nuestros resultados mostraron que *AtTFIIB1* retiene el tercer intrón específicamente bajo condiciones de estrés abiótico como calor (32 °C), deshidratación y salinidad. Se ha descrito ampliamente la retención de intrones como el empalme alternativo más común en *Arabidopsis* (Hoang, *et al.*, 2017). El análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos de *AtTFIIB1* mostró que el tercer intrón retenido en estrés posee un codón de paro prematuro encriptado (*PTC*) localizado en la posición 532 después del nucleótido +1 en la isoforma alternativa del transcrito.

Informes previos mencionan que las isoformas de transcripciones alternativas con el *PTC* pueden ser parte de un sistema de dos componentes llamado *RUST* (por sus siglas en inglés para Regulación de empalme y traducción improductivo) donde la isoforma alternativa con el *PTC* es reconocida por un sistema especializado llamado *Nonse Mediated Decay (NMD)* que marca los transcritos maduros con *PTCs* para su degradación (Ni, *et al.*, 2007; Nyikó, *et al.*, 2013). Estos codones de paro que se encuentran distantes de los extremos 3' del *ARNm* o más de 50 nucleótidos “río arriba” de la unión de exón-exón de más de 30 nucleótidos son reconocidos como sustratos para el sistema *NMD* (Hori y Watanabe 2007).

Por otro lado, hay ejemplos de transcritos alternativos que evaden el sistema *NMD* (Lareau, *et al.*, 2007) que, en caso de ser traducido, genera una nueva proteína con posibles nuevas funciones llamadas microproteínas (miP) o péptido pequeño de interferencia, el cual puede generar cambios en la respuesta al estrés (Syed, *et al.*, 2012). Se ha descrito que un factor de transcripción general, *AtTFIIIA (AT1G72050)* el cual además de tener un rol en el desarrollo (Layat, *et al.*, 2012) está involucrado en la respuesta al estrés abiótico en *Arabidopsis* y arroz (Fu, *et al.*, 2009) el transcrito de este gen tiene un mecanismo de “*exon skipping*” en condiciones de desarrollo idóneas, pero en condiciones de estrés, retiene el tercer exón, el cual contiene un codón de paro prematuro. Plantas transgénicas que sobreexpresan esta isoforma, son más tolerantes al estrés abiótico, como salinidad y deshidratación (Layat, *et al.*, 2012; Barbazuk, 2010 y Fu, *et al.*, 2009). Un análisis genómico completo de empalme alternativo en *Arabidopsis* sugiere que el 78% de los transcritos alternativos poseen un *PTC* (Filichkin, *et al.*, 2010) y que proporcionan un enorme potencial para la producción de *miPs* (Syed, *et al.*, 2012; Magnani, *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos con los microarreglos de la mutante *AtTFIIB1*, los resultados obtenidos mediante los experimentos de estrés abiótico, así como los informes previos de *AtTFIIIA*, indican que un nutrido grupo de genes además de sus funciones de regulación de ciclo celular, desarrollo, formación de estructuras y tejidos, pueden también tener un rol de vital importancia en la respuesta a condiciones de estrés, como se ha demostrado en cítricos, levadura y tilapia, lo que respalda que *AtTFIIB1* está relacionado con la regulación de la respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis* además de su papel en gametofitos y desarrollo de embriones (Zhou, *et al.* 2013).

*AtTFIIB1* muestra varios elementos *cis* involucrados en el estrés abiótico en su secuencia promotora además de los de elementos involucrados en las funciones de “*housekeeping*” y ciclo celular. En este estudio, mostramos claramente una isoforma de transcripción alternativa de *AtTFIIB1* por la retención del tercer intrón bajo estrés abiótico como calor, deshidratación y salinidad. Este proceso parece estar muy estrictamente controlado, ya que se genera de forma específica a estas condiciones de estrés abiótico. La retención de intrones proporciona la inclusión de *PTC*, además, el análisis *in silico* sugiere que en caso de que se traduzca, el producto alternativo carece del dominio de unión a BRE<sup>u</sup>, pudiendo estar generando un siP o miP con un papel regulador en condiciones de estrés abiótico quizá interactuando con otras proteínas o a nivel *DNA*. Los informes anteriores de *TFIIB1* en levaduras, cítricos, tilapia y tomate parecen indicar que *TFIIB1* puede estar directamente involucrado en una respuesta rápida al estrés abiótico en estos organismos (Pinto, *et al.*, 1994; Hoopes, *et al.*, 2000; Sánchez-Ballesta, *et al.*, 2003; Fiol y Kültz, 2005; Keller, *et al.*, 2016).

En este trabajo se muestra una activación de *BRP1*, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* en hojas caulina después de 1, 2 y 3 horas después de la deshidratación, represión de *BRP1* en las mismas condiciones en hojas de roseta y una activación en *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* en el mismo tejido en condiciones de estrés. Estas observaciones pueden ser el puntero para estudios más robustos y específicos enfocados en estos miembros de la familia TFIIB, así como la sobreexpresión del *TFIIB1* canónico y alternativo en plantas transgénicas, así como la inhibición de la expresión por *ARNi*, para corroborar nuestros datos actuales y determinar los mecanismos de acción de ambas formas bajo estrés abiótico. Los resultados obtenidos en el presente trabajo proporcionan información valiosa para obtener una idea del posible papel de *TFIIB1* y las proteínas relacionadas (*BRP*) en la tolerancia al estrés abiótico en plantas de *Arabidopsis*, así como sus posibles implicaciones en varios genes involucrados en la respuesta al estrés abiótico.

## **27. CONCLUSIONES**

*AtTFIIB1* es un factor de transcripción general que presenta un *splicing* alternativo en condiciones específicas de estrés abiótico tales como deshidratación, salinidad, calor y bajas temperaturas.

La isoforma que se genera es un transcrito que retiene el tercer intrón, el cual posee encriptado un codón de término prematuro.

Este trabajo constituye el primer reporte de un *splicing* alternativo en un factor de transcripción general como lo es *TFIIB1* en condiciones de estrés abiótico, esto puede ser clave para la regulación en la expresión diferencial bajo estrés por el hecho de estar relacionado con la *RNA pol II*.

## **28. PERSPECTIVAS**

Se sugieren una serie de propuestas a futuro para determinar cuáles son las funciones que estaría regulando el transcrito alternativo de *TFIIB1* y/o su producto en condiciones de estrés, el cual puede tener al menos dos destinos, ser degradado por el sistema *NMD* (*Nonse Mediated Decay*) o de ser traducido a proteína, este producto pueda funcionar como un péptido de interferencia, por lo que es importante generar plantas transgénicas que sobre expresen las dos isoformas de *AtTFIIB1* y determinar su tolerancia a condiciones de estrés, determinar a nivel molecular sus funciones, ya sea funcionando como un péptido de interferencia, degradado por el sistema *NMD* o si funciona a nivel de represión en regiones promotoras, también es importante estudiar los roles de los *BRPs* que muestran patrones de expresión diferencial en condiciones de estrés, ya que pueden tener un rol de regulación en la respuesta al estrés abiótico.

## 29. REFERENCIAS

1. Ahammed, G. J., Li, X., Liu, A. y Chen, S. (2019) "Brassinosteroids in Plant Tolerance to Abiotic Stress" *Journal of Plant Growth Regulation*.
2. Ahmad, M., Nadeem, S. M., Zahir, Z. A. (2019) "Plant-Microbiome Interactions in Agroecosystem: An Application" Springer Nature Singapore Pte Ltd. V. Kumar et al. (eds.), *Microbiome in Plant Health and Disease* 251-291.
3. Akihiro Matsui, Anh Hai Nguyen<sup>1</sup> Kentaro Nakaminami, y Motoaki Seki (2013) "Arabidopsis Non-Coding RNA Regulation in Abiotic Stress Responses" *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11): 22642–22654.
4. Alexander, V. (2016). "Global observed long-term changes in temperature and precipitation extremes: A review of progress and limitations in IPCC assessments and beyond" *Weather and Climate Extremes* 11: 4–16.
5. Ali, M. S., & Baek, K.-H. (2020) "Jasmonic Acid Signaling Pathway in Response to Abiotic Stresses in Plants" *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 621.
6. Allen, M.R., O.P. Dube, W. Solecki, F. Aragón-Durand, W. Cramer, S. Humphreys, M. Kainuma, J. Kala, N. Mahowald, Y. Mulugetta, R. Perez, M. Wairiu, and K. Zickfeld, (2018). Framing and Context. In: *Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.)]. In Press.
7. Baena-González, E. and Sheen, J., (2008) "Convergent energy and stress signaling" *Trends Plant Sci.* 13(9): 474–482.
8. Baldocchi D, Ryu Y and Keenan T. (2016) "Terrestrial Carbon Cycle Variability" [version 1; referees: 2 approved] *F1000Research* 2016, 5(F1000 Faculty Rev):2371.
9. Banerjee, A., & Roychoudhury, A. (2019). "The Regulatory Signaling of Gibberellin Metabolism and Its Crosstalk with Phytohormones in Response to Plant Abiotic Stresses". *Plant Signaling Molecules*, 333–339
10. Barbazuk, B., W, (2010) "A conserved alternative splicing event in plants reveals an ancient exonization of 5S rRNA that regulates TFIIIA" *RNA Biology*, 7:4, 397-402.
11. Basu, S. y Rabara, R., (2017) "Abscisic acid — An enigma in the abiotic stress tolerance of crop plants", *Plant Gene*, 11 B, 90-98.

12. Berg, A., Findell, K., Lintner, B., Giannini, A., Seneviratne, S. I., van den Hurk, B., Lorenz, R., Pitman, A., Hagemann, S., Meier, A., Cheruy, F., Ducharne, A., Malyshev, S. & Milly, P. C. D. (2016) Land–atmosphere feedbacks amplify aridity increase over land under global warming NATURE CLIMATE CHANGE 6: 869–874.
13. Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V. and Sharma, K., (2008) “Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects” Plant Cell Reports. (27) 411-424.
14. Boyce, C. K. and Lee Jung-Eun (2017) Plant Evolution and Climate Over Geological Timescales Annual Review of Earth and Planetary Sciences 45:61-87.
15. Bräutigam, A., Schlüter, U., Eisenhut, M., and Gowik, U. (2017) On the Evolutionary Origin of CAM Photosynthesis Plant Physiology, 174: 473–477.
16. Buratowski, R.M., Downs, J. and Buratowski, S., (2002) “Interdependent Interactions between TFIIB, TATA Binding Protein, and DNA” Molecular and cellular biology (22) 8735–8743.
17. Butler, J.E.F. and Kadonga, J.T., (2009) 2RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression” Genes Development (16) 2583-2592.
18. Capella, M., Ré, D. A., Arce, A. L. and Chan, R. L. (2014) Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB, Plant Cell Reports, 33, 955–967.
19. Carneiro, J. M T., Chacón-Madrid, K., Miranda, B. C. M. and Arruda, M. A., Z (2015) Arabidopsis thaliana and omics approaches: a review, JOURNAL OF INTEGRATED OMICS, 5: 1-16.
20. Carvalhais, L. C., Schenk, P. M., & Dennis, P. G. (2017). Jasmonic acid signalling and the plant holobiont. Current Opinion in Microbiology, 37, 42–47
21. Cavel E, Pillot M, Pontier D, Lahmy S, Bies-Etheve N, Vega D, Grimanelli D, Lagrange T. (2011) A plant-specific transcription factor IIB-related protein, pBRP2, is involved in endosperm growth control. PLoS One. Feb 24;6(2): e17216.
22. Century, K.T., Reuber, L., Ratcliffe, O.J., (2008) “Regulating the Regulators: The Future Prospects for Transcription-Factor-Based Agricultural Biotechnology Products” Plant Physiology (147) 20–29.
23. Charu Lata, Amita Yadav and Manoj Prasad (2011). Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance, Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives, Prof. Arun Shanker (Ed.), ISBN: 978-953-307-672-0.

24. Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., and Zhu, Z., (2002) "Expression Profile Matrix of Arabidopsis Transcription Factor Genes Suggests Their Putative Functions in Response to Environmental Stresses" *The Plant Cell* (14) 559–574.
25. Cheng C. Y., Krishnakumar V., Chan A. P., Thibaud-Nissen F., Schobel S. and Town, C.D., (2017) *Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome.* *Plant J.* 89: 789–804
26. Clarke, L, Edmonds, J, Jacoby, H, Pitcher, H, Reilly, J and Richels, R. (2007). CCSP synthesis and assessment product 2.1, Part A: scenarios of greenhouse gas emissions and atmospheric concentrations. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
27. Crist, E., Mora, C. and Engelman, R. (2017) The interaction of human population, food production, and biodiversity protection *Science* 356, 260–264.
28. Crowther, T. W., Thomas, S. M., Maynard, D. S., Baldrian, P. K. C., Frey, S. D., van Diepen, L. T. A., and Bradford, M. A. (2015) Biotic interactions mediate soil microbial feedbacks to climate change *Proceedings of National Academy of Science*, June 2, 112 (22) 7033-7038.
29. Cuming AC, Stevenson SR. (2015). From pond slime to rain forest: the evolution of ABA signalling and the acquisition of dehydration tolerance. *New Phytol.* 206:5–7.
30. Dar, N.A., Amin, I., Wani, W., Wani, S. A., Shikari, A. B., Wani, S. H. y Masoodi, K. Z (2017). Abscisic acid: A key regulator of abiotic stress tolerance in plants, *Plant Gene*, 11 (B) 106-111.
31. de Vries, J., and Archibald, J. M. (2018) Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life *New Phytologist* 217: 1428–1434.
32. Deng, W., and Roberts, S.G.E., (2006) "Core promoter elements recognized by transcription factor IIB" *Biochemical Society Transactions* (34), 1051-1053.
33. Ding, F., Cui, P., Wang, Z., Zhang, S., Ali, S. and Xiong, L. (2014) Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in Arabidopsis, *BMC Genomics* 2014, 15:431.
34. Dittus, A. J., Karoly, D. J., Donat, M. G., Lewis, S. and Alexander, L. V. (2018). Understanding the role of sea surface temperature-forcing for variability in global temperature and precipitation extremes *Weather and Climate Extremes* 21: 1–9.

35. Edwards, D., Morris J.L., Richardson, J.B. and Kenrick, P. Cryptospores and cryptophytes reveal hidden diversity in early land floras. (2014) *New Phytologist* 202: 50–78.
36. Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd\_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). 2Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness”. *Frontiers in Microbiology*, 8.
37. Ehrlich, P. R. and Hart J. (2015) Opinion: To feed the world in 2050 will require a global revolution *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: no. 48. 14743–14744.
38. Esperança, C. F., Petri, J. L., de Rossi, A., Couto, M., Sezerino, A. A., and Gabardo, G. C., (2019) Induction of Senescence and Foliar Abscission in Apple Trees with the Use of Abscisic Acid, *Journal of Experimental Agriculture International*35(5): 1-10.
39. Falkowski, P.G., Fenchel, T., Delong, E.F. (2008). The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles *Science* 320: 1034-1038.
40. Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., Falkowski, P., (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components, *Science* 281: 237-240.
41. Filichkin, S. A., Priest, H. D., Megraw, M. and Mockler T. C., (2015) Alternative splicing in plants: directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress, *Current Opinion in Plant Biology*, 24:125–135.
42. Filichkin, S.A, Priest H.D, Givan, S.A, Shen. R., Bryant, D.W., Fox, S.E., Wong, W.K., Mockler, .TC., (2010) Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*, *Genome Research* 20(1):45-58.
43. Fiol, DF and Kültz, D (2005) “Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells” *Proceedings of National Academy of Sciences* (102) 927–932.
44. Fischer, W. W., Hemp, J., & Johnson, J. E. (2016). Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 44(1), 647–683.
45. Forrest, J. R. K. (2014) Plant – pollinator interactions and phenological change: what can we learn about climate impacts from experiments and observations? *Oikos* 00: 001-0010.
46. Franco-Zorrilla, José M, Irene López-Vidriero, José L. Carrasco, Marta Godoy, Pablo Vera, and Roberto Solano (2014) DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes, *Proceedings National Academy of Science*, vol. 111 no. 6 2367-2372.



47. Fu, Y., Bannach, O., Chen, H., Teune, J. H., Schmitz, A., Steger, G., Xiong, L. and Barbazuk, W. B., (2009) Alternative splicing of anciently exonized 5S rRNA regulates plant transcription factor TFIIIA, *Genome Research*, 19:913–921.
48. Fujino, J., Nair, R., Kainuma, M., Masui, T. and Matsuoka, Y. (2006). Multi-gas Mitigation Analysis on Stabilization Scenarios Using Aim Global Model, *The Energy Journal*, Vol. 27, Special Issue: Multi-Greenhouse Gas Mitigation and Climate Policy 343-353, Published by: International Association for Energy Economics.
49. Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., (2006) “Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks” *Current Opinion in Plant Biology* (9) 436-442.
50. Galau, G. A., Hughes, D. W., & Dure, L. (1986) “Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs” *Plant Molecular Biology*, 7(3), 155–170.
51. Gensel, P. G. (2008) *The Earliest Land Plants Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39:459–77.
52. Grafton, R. Q., Daugbjerg, C., and Qureshi, M. E. (2015) Towards food security by 2050, *Food Security*, 7:179–183.
53. Gutha, L.R. and Reddy, A.R., (2008) “Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance” *Plant Mol Biol* 68:533–555.
54. Hai, N. N., Chuong, N. N., Tu, N. H. C., Kisiala, A., Hoang, X. L. T., & Thao, N. P. (2020) “Role and Regulation of Cytokinins in Plant Response to Drought Stress” *Plants*, 9(4), 422.
55. Hallmark, H. T., & Rashotte, A. M. (2019). Review – Cytokinin Response Factors Responding to More than Cytokinin. *Plant Science*, 110251.
56. Benjamín Hernández-Campuzano, Patrick Van Dijck, Nelson Avonce, Gabriel Iturriaga y Ramón Suárez (2014). Una mutante de *Arabidopsis thaliana* por inserción de T-DNA, es insensible a azúcares y tolerante al estrés abiótico. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 1(5): 89-101.
57. Hernández, J. A., Diaz-Vivancos, P., Barba-Espín, G., & Clemente-Moreno, M. J. (2017). “On the Role of Salicylic Acid in Plant Responses to Environmental Stresses. Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone”, Springer Nature Singapore, 17–34.

58. Hijioaka, Y., Matsuoka, Y., Nishimoto, H., Masui, T. and Kainuma, M. (2008). Global GHG emission scenarios under GHG concentration stabilization targets. *Journal of Global Environment Engineering* 13: 97–108.
59. Hola, D. (2019) “Role of Brassinosteroids in the Plant Response to Drought: Do We Know Anything for Certain?” S. Hayat et al. (eds.), *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*, 101-168.
60. Hoopes Barbara C., Geoffrey D. Bowers y Matthew J. Di Visconte (2000) The two *Saccharomyces cerevisiae* SUA7 (TFIIB) transcripts differ at the 3'-end and respond differently to stress *Nucl. Acids Res.* 28 (22): 4435-4443.
61. Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., y Zimmermann, P. (2008) Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008(420747):420747.
62. Huang, J., Yu, H., Guan, X., Wang, G. and Guo, R. (2015). Accelerated dryland expansion under climate change, *NATURE CLIMATE CHANGE*, 7: 417–422.
63. Hussain, M. A., Fahad, S., Sharif, R., Jan, M. F., Mujtaba, M., Ali, Q., Ahmad, A., Ahmad, H., Amin, N., Ajayo, B. S., Sun, C., Gu, L., Jiang, A. Z. y Hou, J. (2020) “Multifunctional role of brassinosteroid and its analogues in plants” *Plant Growth Regulation*, 92, 141–156.
64. Husain, T., Fatima, A., Suhel, M., Singh, S., Sharma, A., Prasad, S. M., & Singh, V. P. (2020) “A brief appraisal of ethylene signaling under abiotic stress in plants” *Plant Signaling & Behavior*, 15.
65. Hutchins, D. A., & Fu, F., (2017). Microorganisms and ocean global change, *NATURE MICROBIOLOGY* 2, 17058.
66. Jalmi, S. K. and Sinha, A. K. (2015) ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences, *Frontiers in plants science* 6: 1-9.
67. Jang, G., Yoon, Y., & Choi, Y. D. (2020). Crosstalk with Jasmonic Acid Integrates Multiple Responses in Plant Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 305.
68. Jin J.P., He K., Tang X., Li Z., Lv L., Zhao Y., Luo J.C., Gao G. (2015). An Arabidopsis transcriptional regulatory map reveals distinct functional and evolutionary features of novel transcription factors. *Molecular Biology and Evolution*, 32(7):1767-1773.
69. Jin JP, Tian F, Yang DC, Meng YQ, Kong L, Luo JC and Gao G. (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D1040-D1045.

70. Jin JP, Zhang H, Kong L, Gao G and Luo JC. (2014). PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1):D1182-D1187.
71. Kalsotra, A., Cooper, T.A., (2011) "Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing", *Nature Review Genetics*, Sep 16;12(10):715-29.
72. Khan, Z. H., Kumar, B., Dhatteval, P., Mehrotra, S., Mehrotra, R., "Transcriptional Regulatory Network of Cis-Regulatory Elements (Cres) and Transcription Factors (Tfs) In Plants during Abiotic Stress, *International Journal of Plant Biological Research* 5(2): 1064.
73. Keeling, C. D. (1960) "The Concentration and Isotopic Abundances of carbon Dioxide in the Atmosphere", *Tellus*, 12:2, 200-203.
74. Kenrick, P. and Crane, P. R. (1997) The origin and early evolution of plants on land, *Nature*, 389: 33-38.
75. Khraiweh, B., Zhu, J.K. and Zhu, J., (2012) "Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1819, 2: 137-148.
76. Kim, Y., Mun, B.-G., Khan, A. L., Waqas, M., Kim, H.-H., Shahzad, R., ... Lee, I.-J. (2018). Regulation of reactive oxygen and nitrogen species by salicylic acid in rice plants under salinity stress conditions. *PLOS ONE*, 13(3), 1-20.
77. Klessig, D. F., Choi, H. W., & Dempsey, D. A. (2018). "Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(9), 871–888.
78. Knutson, B. A. (2013) "Emergence and expansion of TFIIIB-like factors in the plant kingdom" *Gene*, 526: 30–38.
79. Komatsu, K., Takezawa, D., Sakata, Y., (2020) "Decoding ABA and osmostress signalling in plants from an evolutionary point of view" *Plant Cell & Environment*; 1–18.
80. Krishnamurthy, S. and Hampsey, M., (2009) "Eukaryotic transcription initiation" *Current Biology* (4) 153-156.
81. Layat, E., Cotterell, S., Vaillant, I., Yukawa, Y., Tutois, S. and Tourmente, S., (2012) "Transcript levels, alternative splicing and proteolytic cleavage of TFIIIA control 5S rRNA accumulation during *Arabidopsis thaliana* development", *The Plant Journal*, 71: 35-44.
82. Leng, G. & Huang, M. (2017) "Crop yield response to climate change varies with crop spatial distribution pattern" *Scientific Reports* 7: 1463.

83. Leng, G., and Hall, J. (2019) "Crop yield sensitivity of global major agricultural countries to droughts and the projected changes in the future" *Science of the Total Environment* 654 811–821.
84. Lenton, T. M., Dahl, T. W., Daines, S. J., Mills, B. J. W., Ozaki, K., Saltzman, M. R., & Porada, P. (2016) "Earliest land plants created modern levels of atmospheric oxygen" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(35), 9704–9709.
85. Li, W., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Ha, C.V., Kojima, M. An, P., Tian, L., Tian, C., Sakakibara, H. y Tran, L.-S.P. (2018) "Effects of overproduced ethylene on the contents of other phytohormones and expression of their key biosynthetic genes" *Plant Physiology et Biochemistry*, 128: 170-177.
86. Li, Ruifen, Zhang, Junwen, Wei, Jianhua, Wang, Hongzhi, Wang, Yanzhen and Ma, Rongcai (2009) "Functions and mechanisms of the CBL–CIPK signaling system in plant response to abiotic stress" *Progress in Natural Science* 19: 667–676.
87. Lin, Z., Zhong, S. y Grierson, D. (2009) "Recent advances in ethylene research" *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 12, pp. 3311–3336.
88. Lindemose, Søren, O'Shea Charlotte, Krogh Michael Jensen, y Skriver Karen (2013) "Structure, Function and Networks of Transcription Factors Involved in Abiotic Stress Responses" *International Journal of Molecular Sciences* 14, 5842-5878.
89. Liu, X., Bushnell, D. A., Wang, D., Calero, G., Kornberg, R.D., (2010) "Structure of an RNA Polymerase II-TFIIB Complex and the Transcription Initiation Mechanism" *Science* (327), 206-209.
90. Liu, Y., Zhang, M., Meng, Z., Wang, B., & Chen, M. (2020) "Research Progress on the Roles of Cytokinin in Plant Response to Stress" *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6574.
91. Mao, X., Zhang, H., Qian, X., Li, A., Zhao, G. and Jing, R., (2012) "TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in Arabidopsis" *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63, No. 8, pp. 2933–2946.
92. Marquez, Y., Brown, J. W.S., Simpson, C., Barta, A. and Kalyna, M. (2012) "Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis" *Genome Research*, 22:1184–1195.
93. Marquez, Y., Höpfler, M., Ayatollahi, Z., Barta, A. and Kalyna, M., (2015) "Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exitrons and their role in proteome plasticity" *Genome Research* 25:995–1007.

94. Mastrangelo, A.M., Marone, D., Laido, G., De Leonardis, A.M., De Vita, P., (2012) Alternative splicing: enhancing ability to cope with stress via transcriptome plasticity. *Plant Science*, 185–186:40–49.
95. Matera, A. G. and Wang, Z. (2014) A day in the life of the spliceosome, *Nature Review Molecular Cell Biology*. 15(2): 108–121.
96. Matsui, A., Nakaminami, K. and Seki, M., (2019) Biological Function of Changes in RNA Metabolism in Plant Adaptation to Abiotic Stress, *Plant Cell Physiology*, 1;60(9):1897-1905.
97. Matsui, A., Nguyen, A. H., Nakaminami, K. and Seki, M., (2013) Arabidopsis Non-Coding RNA Regulation in Abiotic Stress Responses, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11): 22642–22654.
98. Maul P., McCollum, G.T., Popp, M., Guy, C.I. and Porat, R., (2008) “Transcriptome profiling of grapefruit flavedo following exposure to low temperature and conditioning treatments uncovers principal molecular components involved in chilling tolerance and susceptibility” *Plant, Cell and Environment* (31) 752–768.
99. Mengel, Matthias, Nauels, Alexander, Rogelj, Joeri & Schleussner Carl-Friedrich (2018). Committed sea-level rise under the Paris Agreement and the legacy of delayed mitigation action *NATURE COMMUNICATIONS* 9:601.
100. Mertens, J., Aliyu, H., Cowan, D. A. (2018) “LEA Proteins and the Evolution of the Why Domain” *Applied and Environmental Microbiology* 84:15, 1-8.
101. Meyerholt J., Zaehle, S., and Smith, M. J. (2016) Variability of projected terrestrial biosphere responses to elevated levels of atmospheric CO<sub>2</sub> due to uncertainty in biological nitrogen fixation *Biogeosciences*, 13, 1491–1518.
102. Miranda-Ríos, J. A., Ramírez-Trujillo, J. A., Jaime\_Gallardo, D. J., Hernández-Bueno, N. S., Ramírez-Yáñez, M., Iturriaga, G., Suárez-Rodríguez, iR. (2021) “Arabidopsis thaliana AtTFIIB1 gene displays an alternative splicing under different abiotic stresses. *Biologia plantarum*, 65: 255-264.
103. Moran, M. A., Kujawinski, E. B., Stubbins, A., Fatland, R., Aluwihare, L. I., Buchan, A., Crump, B. C., Dorrestein, P. C., Dyhrman, S. T., Hess, N. J., Howe, B., Longnecker, K., Medeiros, P. M., Niggemann, J., Obernosterer, I., Repeta, D. J., and Waldbauer, J. R. (2016). Deciphering ocean carbon in a changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3143–3151.
104. Morris, J. L., Puttick, M. N., Clark, J. W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Yang, Z., Schneider, H., and Donoghue, P. C. J. (2018). “The timescale of early land plant evolution”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10).

105. Nawaz, F., Naeem, M., Zulfiqar, B., Akram, A., Ashraf, M.Y., Raheel, M., Shabbir, R.N., Hussain, R.A., Anwar, I. y Aurangzaib, M. (2017) "Understanding brassinosteroid-regulated mechanisms to improve stress tolerance in plants: a critical review" *Environmental Science Pollution Research I* (19):15959-15975.
106. Nguyen Binh Anh Thu, Xuan Lan Thi Hoang, Mai Thuy Truc, Saad Sulieman, Nguyen Phuong Thao, y Lam-Son Phan Tran (2017) "Cytokinin Signaling in Plant Response to Abiotic Stresses", *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*, First Edition, Volume 1.
107. Nolan, T., Vukasinovic, N., Liu, D., Russinova, E., Yin, Y. (2020) "Brassinosteroids MultiDimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses" *The Plant Cell* 32(2):295-318
108. Nuruzzaman Manik, S. M., Shi, S., Mao, J., Dong, L., Su, Y., Wang, Q. and Liu, H. (2015) "The Calcium Sensor CBL-CIPK Is Involved in Plant's Response to Abiotic Stresses" *International Journal of Genomics*. 2015: 1-10.
109. Núñez, M. V., Reyes, Y., G., Torres, W. N., Martínez, L., G. y Teixeira, M. A. Z. (2019)" Advances on exogenous applications of brassinosteroids and their analogs to enhance plant tolerance to salinity: A review" *Australian Journal of Crop Sciences* 13(01):115-121.
110. Overland, J., Dunlea E., Box, J. E., Corell, R., Forsius, M., Kattsov, V., Olseng, M. S., Pawlak, J., Reiersen, L. and Wang, M. (2018). "The urgency of Arctic change", *Polar Science*.
111. Palusa, S.G., Reddy, A.S., (2010) "Extensive coupling of alternative splicing of pre-mRNAs of serine/arginine (SR) genes with nonsense-mediated decay". *New Phytology*, Jan;185(1):83-9.
112. Park, C. M., (2007) "Auxin Homeostasis in Plant Stress Adaptation Response" *Plant Signaling & Behavior*, 2:4, 306-307
113. Parvin, J.D. and Sharp P.A., (1993) "DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II" *Cell* (3) 533-540.
114. Pattyn, J. , Vaughan-Hirsch, J. y Van de Poel, B. (2020) "The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry" *New Phytologist*,
115. Peres, A., Soares, J., Tavares, R., Righetto, G., Zullo, M., Mandava, N., & Menossi, M. (2019). "Brassinosteroids, the Sixth Class of Phytohormones: A Molecular View from the Discovery to Hormonal Interactions in Plant Development and Stress Adaptation" *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 331.

116. Pinto, I., Wei-Hua, W., Jong, G. N. and Hampse, M., (1994) "Characterization of sua7 Mutations Defines a Domain of TFIIB Involved in Transcription Start Site Selection in Yeast" *The journal of biological Chemistry* Vol. 269, No. 48, Issue of December 2, 30569-30573.
117. Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegón-Putze, I., Bosch, N., Ibañes, M. y Caño-Delgado, A. I (2019) "Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress" *Development*, 146: 1-11.
118. Porada, P., Weber B., Elbert, W., Pöschl U., Kleidon, A. (2014) "Estimating impacts of lichens and bryophytes on global biogeochemical cycles" *Global Biogeochem Cycles* 28:71–85.
119. Provar, N. J., Alonso J., Assmann, S.M., Bergmann, D., Brady, S.M., Brkljacic, J., Browse, J., Chapple, C., Colot, V., Cutler, S., Dangl, J., Ehrhardt, D., Friesner, J.D., Frommer, W. B., Grotewold, E., Meyerowitz, E., Nemhauser, J., Nordborg, M., Pikaard, C., Shanklin, J., Somerville, C., Stitt, M., Torii, K.U., Waese, J., Wagner, D., McCourt, P., (2016) "50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions" *New Phytologist*. 209(3):921-44.
120. Qin, Z., Zhang, X., Zhang, X., Xin, W., Li, J. and Hu, Y. (2014) "The Arabidopsis transcription factor IIB-related protein BRP4 is involved in the regulation of mitotic cell-cycle progression during male gametogenesis" *Journal of Experimental Botany*. Jun;65(9):2521-31.
121. Qu, L.J. and Zhu, Y.X., (2006) "Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research" *Current Opinion in Plant Biology*. (5) 544-549.
122. Rao, S. & Riahi, K. (2006). The role of non-CO2 greenhouse gases in climate change mitigation: Long-term scenarios for the 21st century. *The Energy Journal* 27: 177-200.
123. Raza, A., Charagh, S., Zahid, Z., Mubarik, M. S., Javed, R., Siddiqui, M. H., Hasanuzzaman, M. (2020). Jasmonic acid. a key frontier in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*.
124. Raza, A., Razzaq, A., Mehmood, S. S., Zou, X., Zhang, X., Lv, Y., Xu, J. (2019) Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. *Plants*, 8: 34.
125. Reddy, A.S. (2007). Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 267–294.
126. Reddy, A.S. and Shad, A. G., (2011) Plant serine/arginine-rich proteins: roles in precursor messenger RNA splicing, plant development, and stress responses. *Wiley Interdisciplinary Review of RNA*. 2011 Nov-Dec;2(6):875-89.

127. Reddy, A.S., Ali, G.S., Celesnik, H., and Day, I.S. (2011). Coping with stresses: Roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell* 23: 2010–2032.
128. Reddy, A.S., Rogers, M.F., Richardson, D.N., Hamilton, M., and Ben-Hur, A. (2012). Deciphering the plant splicing code: Experimental and computational approaches for predicting alternative splicing and splicing regulatory elements. *Front Plant Sci* 3: 18.
129. Reddy, A.S.N., Marquez, Y., Kalyna, M. and Barta, A., (2013) Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants, *The Plant Cell*, Vol. 25: 3657–3683.
130. Riahi, K., Grübler, A. and Nakicenovic, N. (2007). Scenarios of long-term socio-economic and environmental development under climate stabilization, *Technological Forecasting & Social Change* 74: 887–935.
131. Riahi, K., Rao, S., Krey, V., Cho, C., Chirkov, V., Fischer, G., Kindermann, G., Nakicenovic, N. and Rafaj, P. (2011). RCP 8.5—A scenario of comparatively high greenhouse gas emissions *Climatic Change* 109: 33–57.
132. Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G., (2000) “Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes, *Science*, 290: 5499, 2105-2110.
133. Riechmann, J.L., Ratcliffe, O.J., (2000) “A genomic perspective on plant transcription factors” *Current Opinion in Plant Biology*. (5) 423-34.
134. Riyazuddin, R., Verma, R., Singh, K., Nisha, N., Keisham, M., Bhati, K. K., Kim, S. T., y Gupta, R (2020) “Ethylene: A Master Regulator of Salinity Stress Tolerance in Plants” *Biomolecules*, 10, 959, 1-22.
135. Ruan, J.; Zhou, Y.; Zhou, M.; Yan, J.; Khurshid, M.; Weng, W.; Cheng, J.; Zhang, K. (2019) “Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants” *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2479.
136. Sadura, I. y Janeczko A. (2018) “Physiological and molecular mechanisms of brassinosteroid-induced tolerance to high and low temperature in plants” *Biologia Plantarum* 62(4) 601–616.
137. Sakaguchi, M. (2020) “Diverse and common features of trehalases and their contributions to microbial trehalose metabolism” *Applied Microbiology Biotechnology* 104(5):1837-1847
138. Sanchez-Ballesta, María Teresa, Yolanda Lluch, María José Gosalbes, Lorenzo Zacarias, Antonio Granell, María Teresa Lafuente (2003) “A survey of genes differentially



expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit” *Planta*, Volume 218, Issue 1, 65-70.

139. Sanyal, S.K., Rao, S., Mishra, L.K., Sharma, M., Pandey, G.K. (2016) Plant Stress Responses Mediated by CBL–CIPK Phosphorylation Network, *The Enzymes* 40: 31-64.
140. Schlosser, E., F., Haumann A. and Raphael, M.N. (2018). Atmospheric influences on the anomalous 2016 Antarctic Sea ice decay *The Cryosphere*, 12: 1103–1119.
141. Schoof, H., Zaccaria, P., Gundlach, H., Lemcke, K., Rudd, S., Kolesov, G., Arnold, R., Mewes, H.W., Mayer, K.F., (2002) MIPS Arabidopsis thaliana Database (MAtdB): an integrated biological knowledge resource based on the first complete plant genome. *Nucleic Acids Research*. 1;30(1):91-3.
142. Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Miki, Youko, F., Asako, O., Maiko, K., Akiko, N., Tetsuya, E., Masakazu, S., Akiyama, S., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, Yoshihide Hayashizaki, Shinozaki, K., (2002) “Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray” *Plant Journal* 31, 279-292.
143. Serret, P., Robinson, C., Aranguren-Gassis, M., García-Martín, E. E., Gist, N., Kitidis, V., Lozano, J., Stephens, J., Harrys, C., Thomas, R. (2015). “Both respiration and photosynthesis determine the scaling of plankton metabolism in the oligotrophic ocean”. *Nature Communications*, 6 (1).
144. Sharma, A, Sidhu, G. P. S., Araniti, F., Bali, A. S., Shahzad, B., Tripathi, D. K., Brestic, M., Skalicky, M., y Landi, M., (2020). “The Role of Salicylic Acid in Plants Exposed to Heavy Metals”. *Molecules*, 25(3), 540.
145. Sharma, M., Gupta, S. K., Majumder, B., Maurya, V. K., Deeba, F., Alam, A., & Pandey, V. (2017). Salicylic acid mediated growth, physiological and proteomic responses in two wheat varieties under drought stress. *Journal of Proteomics*, 163, 28–51.
146. Shaw, G. H. (2015). “The Origin of Oxygenic Photosynthesis and Its Impact on the Atmosphere”. *SpringerBriefs in Earth Sciences*, 75–93.
147. Shi-Qing, G., Ming, C., Zhao-Shi; X., Chang-Ping, Z., Liancheng, L., Hui-jun, X., Yi-miao, T., Xin, Z., You-Zhi, M., (2011) “The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants” *Plant Mol Biol* 75:537–553.
148. Sillmann, J., Thorarinsdottir, T., Keenlyside, N, Schaller, N., Alexander, L.V., Hegerl; G., Seneviratne, S.I., Vautard, R., Zhang, X. and Zwiers, F.W. (2017). “Understanding, modeling and predicting weather and climate extremes: Challenges and opportunities” *Weather and Climate Extremes* 18: 65–74.

149. Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B. and Tuteja, N. (2011) "Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress" *Plant Signaling & Behavior* 6:2, 196-203.
150. Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2016). "The Role and Regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in Plant Development, Abiotic Stress Responses and Phytohormone Crosstalk". *Frontiers in Plant Science*, 7.
151. Smékalová V., Daskocilová A., George, K. and Samaj, J, (2013) "Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants", *Biotechnology Advances*. 32: 2-11.
152. Smith, S. J. and Wigley, T.M.L. (2006) "Multi-Gas Forcing Stabilization with Minicam, The Energy Journal", 27: Special Issue: Multi-Greenhouse Gas Mitigation and Climate Policy, 373-391.
153. Sohag, A. A. M., Tahjib-Ul-Arif, M., Brestic, M., Afrin, S., Sakil, M. A., Hossain, M. T., Hossain, M. A. y Hossain, M. A. (2020). "Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice". *Plant, Soil and Environment*, 66 (1): 7-13.
154. Stein, L. Y. and Klotz, M. G. (2016) "The nitrogen cycle" *Current Biology* 26: R83–R101.
155. Sunkar, R., (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21, 8: 805-11.
156. Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., and Kumar, A. (2010) "MAPK machinery in plants Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways" *Plant Signaling & Behavior* 5:11, 1370-1378.
157. Tahjib-Ul-Arif, M., Siddiqui, M. N., Sohag, A. A. M., Sakil, M. A., Rahman, M. M., Polash, M. A. S., ... Tran, L.-S. P. (2018). "Salicylic Acid-Mediated Enhancement of Photosynthesis Attributes and Antioxidant Capacity Contributes to Yield Improvement of Maize Plants Under Salt Stress". *Journal of Plant Growth Regulation*.
158. Thomas, M.C. and Cheng-Ming C. (2006) "The General Transcription Machinery and General Cofactors" *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (41) 105–178.
159. Tian F, Yang DC, Meng YQ, Jin JP and Gao G. (2019). *PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants*. *Nucleic Acids Research*, gkz1020.
160. Tian, Z.D., Zhang, Y., Liu, J. and Xie, C.H., (2010) "Novel potato C2H2-type zinc finger protein gene, StZFP1, which responds to biotic and abiotic stress, plays a role in salt tolerance" *Plant Biology* 12 689–697.

161. Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (2019). "Chemical Elicitors of Systemic Acquired Resistance – Salicylic Acid and Its Functional Analogs". *Current Plant Biology*. 17: 48-59.
162. Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., (2006) "Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future" *Current Opinion in Biotechnology*. (2) 113-122.
163. van Vuuren, D. P., den Elzen, M. G. J., Lucas, P. L., Eickhout, B., Strengers, B. J., van Ruijven, B., Wonink, Steven and van Houdt, Roy (2007). Stabilizing greenhouse gas concentrations at low levels: an assessment of reduction strategies and costs *Climatic Change* 81: 119–159.
164. van Vuuren, D.P., Cofala, J., . Eerens, H.E, Oostenrijk, R., Heyes, C., Klimont, Z., den Elzen, M.G.J., Amann, M. (2006). "Exploring the ancillary benefits of the Kyoto Protocol for air pollution in Europe Energy Policy" 34: 444–460.
165. Vardhini, V. B. (2017). "Modifications of morphological and anatomical characteristics of plants by application of brassinosteroids under various abiotic stress conditions - A review" *Plant Gene*, 11, 70–89.
166. Villalobos, M.A., Bartels, D., Iturriaga, G. (2004) "Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in Arabidopsis overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene" *Plant Physiology* (135) 309-324.
167. Walsh, K.J.E. , Suzana J. Camargo, G.A. Vecchi, A.S. Daloz, J. Elsner, K. Emanuel, M. Horn, Y.-K. Lim, M. Roberts, C. Patricola, E. Scoccimarro, A.H. Sobel, S. Strazzo, G. Villarini, M. Wehner, M. Zhao, J.P. Kossin, Ti. LaRow, K.Oouchi, S. Schubert, H. Wang, J. Bacmeister, P. Chang, F. Chauvin, C. Jablonowski, A.Kumar, H. Murakami, T. Ose, K.A. Reed, R. Saravanan, Y. Yamada, C.M. Zarzycki, P.L. Vidale, J.A. Jonas and N. Henderson (2015), Hurricanes and climate: the US CLIVAR working group on hurricanes. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 96: 997-1017.
168. Wang, J.; Song, L.; Gong, X.; Xu, J.; Li, M. (2020) "Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress" *International Journal of Molecular Sciences* , 21, 1446.
169. Wang, K. L. C., Li, H., y Ecker, J. R. (2002) "Biosynthesis and Signaling Networks" *The Plant Cell*, S131–S151
170. Wang, Y. and Roberts, S.G.E., (2010) "New insights into the role of TFIIB in transcription initiation" *Transcription* (3) 126-129.

171. Wang, Z., Lin, L., Zhang, X., Zhang, H., Liu, L. and Xu, Y. (2017). Scenario dependence of future changes in climate extremes under 1.5 °C and 2 °C Global Warming Scientific Reports. 7, 46432.
172. Wellman C.H. (2010) The invasion of the land by plants: when and where? *New Phytologist* 188: 306–309.
173. Wellman C.H. (2014) The nature and evolutionary relationships of the earliest land plants *New Phytologist* 202: 1–3.
174. Wise, M.A., Calvin, K.V., Thomson, A.M., Clarke, L.E., Bond-Lamberty, B., Sands, R.D., Smith, S.J., Janetos, A.C., Edmonds, J.A. (2009). The Implications of Limiting CO<sub>2</sub> Concentrations for Agriculture, Land Use, Land-use Change Emissions and Bioenergy PACIFIC NORTHWEST NATIONAL LABORATORY operated by BATTELLE for the UNITED STATES DEPARTMENT OF ENERGY.
175. Woodward, A. W. and Bartel, B., (2018) *Biology in Bloom: A Primer on the Arabidopsis thaliana Model System*, *Genetics*, 208, 1337–1349.
176. Yamori, W. and Hikosaka, K. (2014) Temperature response of photosynthesis in C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation, *Photosynthesis Research* 119, (1-2):101-17.
177. Yan, J., Fang, L., Yang, L., He, H., Huang, Y., Liu, Y., & Zhang, A. (2019). Abscisic acid positively regulates L-Arabinose metabolism to inhibit seed germination through ABI4-mediated transcriptional promotions of MUR4 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 225:2 1-19.
178. Yang J, Duan G, Li C, Liu L, Han G, Zhang Y and Wang C (2019) The crosstalks between JA and other plant hormone signalings highlight the involvement of JA as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*. 10:1349.
179. Yi, S. Y., Kim, J. H., Joung, Y. H. , Lee, S., Kim, W. T., Yu, Seung, H., and Choi, D., (2004) “The Pepper Transcription Factor CaPF1 Confers Pathogen and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*” *Plant Physiology*, Vol. 136, pp. 1–13.
180. Yuan, Z. Y., & Chen, H. Y. H. (2015). “Decoupling of nitrogen and phosphorus in terrestrial plants associated with global changes”. *Nature Climate Change*, 5(5), 465–469.
181. Zaid, A., Mohammad, F., Wani, S. H., & Siddique, K. M. H. (2019). Salicylic acid enhances nickel stress tolerance by up-regulating antioxidant defense and glyoxalase systems in mustard plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 575–587.
182. Zehr, J.P. and Kudela, R.M. (2009). Photosynthesis in the Open Ocean, *SCIENCE* 326: 945-946.

183. Zhao, C.; Liu, B.; Piao, S.; Wang, X.; Lobell, D.B.; Huang, Y.; Huang, M.; Yao, Y.; Bassu, S.; Ciais, P. Durand, J., Elliott, J., Ewert F., Janssens, I. A., Li, T., Lin, E., Qiang, L., Martre, P., Müller C., Peng S., Peñuelas J., Ruane, A. C., Wallach D., Wang, T., Wu D., Liu Z., Zhu Y., Zhu Z. and Asseng S. (2017) "Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates" *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 9326–9331.
184. Zhao, M., Li, Q., Chen, Z., Lv, Q., Bao, F., Wang, X., & He, Y. (2018). "Regulatory Mechanism of ABA and ABI3 on Vegetative Development in the Moss *Physcomitrella patens*". *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9).
185. Zhao, X., Dou, L., Gong, Z., Wang, X., & Mao, T. (2018). "BES1 hinders ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and promotes seed germination in Arabidopsis". *New Phytologist*. 221:2. 1-11.
186. Zhou J.J., Liang, Y., Niu, Q.K., Chen, L.Q., Zhang, X.Q. and Ye, D., (2013) "The Arabidopsis general transcription factor TFIIIB1 (AtTFIIIB1) is required for pollen tube growth and endosperm development". *Journal of Experimental Botany*. May;64(8):2205-18.

### **30. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

#### **A) LINKS**

<https://abrc.osu.edu/researchers>  
<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>  
<https://agris-knowledgebase.org/AtcisDB/>  
<https://www.arabidopsis.org>  
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>  
<https://www.cbd.int/gspc/intro.shtml>  
<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>  
[www.genome.jp](http://www.genome.jp)  
<http://www.expasy.org/>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Arabidopsis>  
<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>  
<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/>  
[https://plants.ensembl.org/Arabidopsis\\_thaliana/Info/Index](https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index)  
[https://sedac.ciesin.columbia.edu/ddc/ar5\\_scenario\\_process/RCPs.html](https://sedac.ciesin.columbia.edu/ddc/ar5_scenario_process/RCPs.html)  
[www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)  
[www.theplantlist.org](http://www.theplantlist.org)  
[www.worldfloraonline.org](http://www.worldfloraonline.org)

#### **B) Servicios externos**

##### **Unidad de microarreglos de ADN**

<http://www.ifc.unam.mx/servicios/microarreglos>

## Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN

<https://sibiotec.ibt.unam.mx/SiBioTec/modulos/SintesisSecuenciacion/OligosEditExterno.aspx>

### C) Lista de primers usados en este proyecto

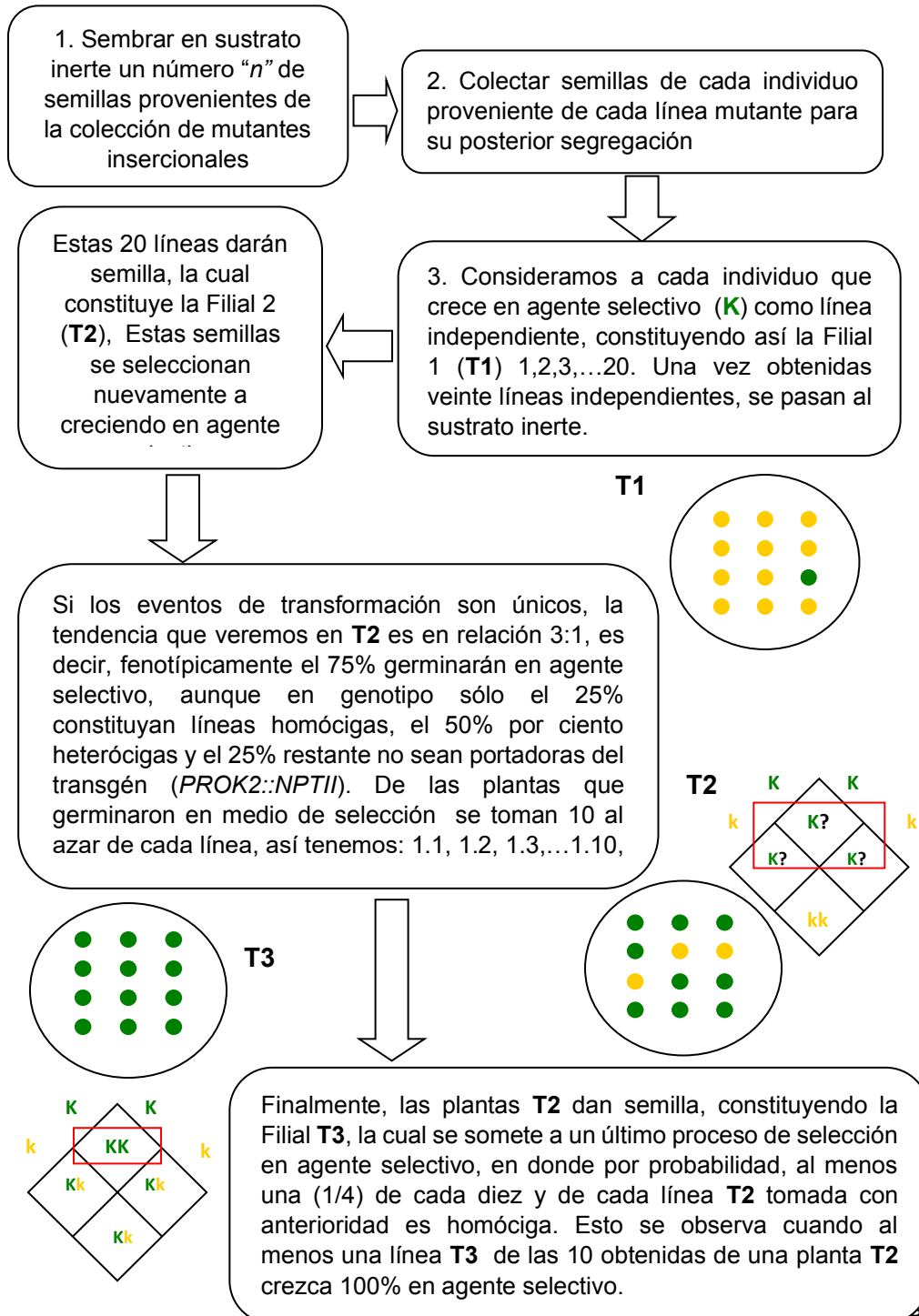
<i>Primers</i>			
Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	tamaño (pb)
NPTII	5'NPTII	GAACAAGATGGATTGTTGCACGC	763
	3'NPTII	GAAGAACTCGTCAAGAAGC	
TFIIB1	TFIIB Upper	CTCCGAGTGTGGTTTGGTTT	604
	TFIIB Lower	CACCGCATGGTTAGACATTG	
BRP1	TFIIB4.1.2 Upper	TCGCACGTGAGAGTGAAAAA	579
	TFIIB4.1.2 Lower	TCCCAATTTCTTCTGCTGT	
BRP2	TFIIB3.2 Upper	CCTAATCAAGCAAGCCTTCG	630
	TFIIB3.2 Lower	TTGATGATGTCTGATTCACAAGG	
BRP3	TFIIB4.2 Upper	GAAGACGGAATTTGCTTGGA	494
	TFIIB4.2 Lower	TCCTTCATATCCACGTTGGC	
BRP4	TFIB3.1 Upper	CCAAGCCGAATAAAGCTCTG	528
	TFIB3.1 Lower	TCGTGTTTTCTGCAACTCCA	
GAPDH	GAPDH Upper	GCCGGGACTGGATTGTTTGCTGAG	185
	GAPDH Lower	TTCGCCAGTTCATCACC GCGTA	

### Secuencia de primers usados en q-RT-PCR

Gen	nombre	Secuencia (5'-3')	tamaño (pb)
TFIIB1	5358	GAGGCTGGAGGATCAGAAGTC	200
	alt 5359	CTATTCACAAGGTCACGAGTTTG	
TFIIB1	5358	GAGGCTGGAGGATCAGAAGTC	116
	can 918	CGCATATTTCTTAATAGTTCGTG	
BRP1	UpBRP1-q	CTGAGCATGCTTCCAGTTG	174
	TFIIB4.1.2 Lower	TCCCAATTTCTTCTGCTGT	
BRP2	UpBRP2-q	TCCGGAGAAACCCTAAGTCA	202
	TFIIB3.2 Lower	TTGATGATGTCTGATTCACAAGC	
BRP3	TFIIB4.2 Upper	GAAGACGGAATTTGCTTGGA	160
	LoBRP3-q	GATGGCCGGATTGAGATTA	
BRP4	TFIB3.1 Upper	CCAAGCCGAATAAAGCTCTG	150
	LoBRP4-q	CAGCAAAAAGGACGTTTCGT	
GAPDH	GAPDH Upper	GCCGGGACTGGATTGTTTGCTGAG	185
	GAPDH Lower	TTCGCCAGTTCATCACC GCGTA	

## D) Selección de líneas homocigas

El siguiente diagrama de flujo muestra el proceso de selección por segregación clásica dependiente de la autopolinización y segregación de cada alelo (marcador de selección) de las líneas independientes (en este caso, líneas mutantes insercionales) siguiendo la resistencia al agente selectivo (kanamicina 50mg/mL) conferida por el gen marcador de selección (*PROK2::NPTII*) de las líneas mutantes.



## E) MICROARREGLOS SALK\_084698C

<i>Función General</i>	<i>ID</i>	<i>Nombre</i>	<i>Expresión</i>
Regulados Positivamente			
Light regulated			
PS calvin cyle. Rubisco small subunit	at1g67090	RBCS1A	1.21
PS light reaction. PSI polypeptide subunits	at5g64040	PSAN; calmodulin binding	1.19
PS light reaction. Photosystem I LHC-I	at1g19150	LHCA6; chlorophyll binding	1.02
Starch metabolism			
Major CHO metabolism. Degradation starch transporter	at5g46110	APE2	1.31
Sugar metabolism			
Minor CHO metabolism. Raffinose family	at1g55740	ATSIP1 (Arabidopsis thaliana seed imbibition 1)	1.52
Cellular wall			
Cell wall degradation. Pectate lyases and polygalacturonases	at4g32380	polygalacturonase (pectinase) family protein	1.72
Cell wall proteins. AGPs	at2g46330	AGP16 (arabinogalactan protein 16)	1.16
Aminoacid metabolism			
Amino acid metabolism	at5g16290	acetolactate synthase small subunit, putative	1.07
Amino acid metabolism	at2g30970	ASP1 (aspartate aminotransferase 1)	1.06
Secondary metabolism			
Secondary metabolism. Sulfur-containing glucosinolates	at5g57220	CYP81F2; electron carrier	1.24
Stress related			
Stress abiotic. Unspecified	at5g10130	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	1.01
Redox			
Redox: ascorbate and glutathione	at4g14965	AtMAPR4	1.15
Electron transport			
Nitrile lyases, berberine bridge enzymes, reticuline oxidases	at2g29370	tropinone reductase, putative	3.27
Misc. cytochrome P450	at5g24900	CYP714A2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding	2.35
Misc. cytochrome P450	at1g55940	CYP708A1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding	2.03
Misc. invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	at5g50040	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	1.13
Misc. cytochrome P450	at5g25140	CYP71B13; electron carrier/ heme binding / iron ion binding	1.11
Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	at4g22470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	1.07
Transcription regulated			
RNA regulation of transcription. GRF zinc finger	at5g28570	transposable element gene	1.46
RNA regulation of transcription. Alfin-like	at5g20510	ALS (ALFIN-LIKE 5); DNA binding	1.29
RNA regulation of transcription. MYB domain transcription factor	at5g40350	MYB24 (myb domain protein 24); DNA binding	1.21
RNA regulation of transcription. Unclassified	at5g50450	zinc finger (MYND type) family protein	1.1
RNA regulation of transcription. WRKY domain transcription factor	at5g46310	WRKY family transcription factor	1.05
RNA regulation of transcription. Methyl binding domain proteins	at4g00416	MBD3; DNA binding/methyl-CpG binding	1.02
RNA processing. Ribonucleases	at5g02250	EMB2730 (Embryo defective 2730)	1
Chromatin structure			
DNA. synthesis/chromatin structure	at4g31210	DNA topoisomerase family protein	1.02



<i>Protein modification</i>			
<i>Protein degradation. AAA type</i>	<i>at4g24710</i>	<i>ATP binding/ATPase/nucleoside-triphosphatase</i>	<i>2.1</i>
<i>Protein degradation. Ubiquitin E3, SCF, FBOX</i>	<i>at2g04920</i>	<i>F-box family protein (FBX9)</i>	<i>1.34</i>
<i>Protein degradation. Serine protease</i>	<i>at1g47710</i>	<i>serpin, putative/serine protease inhibitor, putative</i>	<i>1.19</i>
<i>Protein synthesis. Ribosomal protein. Eukaryotic 60S subunit L34</i>	<i>at3g28900</i>	<i>60S ribosomal protein L34 (RPL34C)</i>	<i>1.12</i>
<i>Protein synthesis. Ribosomal protein. Eukaryotic 60S subunit L29</i>	<i>at3g06680</i>	<i>60S ribosomal protein L29 (RPL29B)</i>	<i>1.07</i>
<i>Protein degradation. Ubiquitin</i>	<i>at5g09340</i>	<i>ubiquitin, putative</i>	<i>1.04</i>
<i>Cellular response</i>			
<i>Cell vesicle transport</i>	<i>at5g59420</i>	<i>ORP3C (osbp-related protein 3C)</i>	<i>1.43</i>
<i>Cell division</i>	<i>at5g60870</i>	<i>regulator of chromosome condensation (RCC1)</i>	<i>1.13</i>
<i>Development</i>			
<i>Development</i>	<i>at5g60690</i>	<i>REV (REVOLUTA); DNA binding/lipid binding/transcription factor</i>	<i>1.11</i>
<i>Transport</i>			
<i>Metabolite transporters at the envelope membrane</i>	<i>at5g25400</i>	<i>phosphate translocator-related</i>	<i>1.49</i>
<i>Transport. Amino acids</i>	<i>at5g49630</i>	<i>AAP6 (amino acid permease 6) transporter</i>	<i>1.15</i>
<i>Transporter. Sugars</i>	<i>at3g05155</i>	<i>sugar transporter, putative</i>	<i>1.1</i>
<i>Transport. Misc</i>	<i>at4g34580</i>	<i>phosphatidylinositol transfer protein</i>	<i>1.06</i>
<i>Not assigned</i>			
<i>Not assigned. No ontology</i>	<i>at2g36540</i>	<i>NLI interacting factor (NIF) family protein</i>	<i>2.51</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at5g29602</i>	<i>transposable element gene</i>	<i>2.47</i>
<i>Not assigned. No ontology. Pentatricopeptide (PPR)</i>	<i>at2g39230</i>	<i>pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein</i>	<i>2.38</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at5g29020</i>	<i>transposable element gene</i>	<i>1.95</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at4g04745</i>	<i>unknown protein</i>	<i>1.71</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at2g07260</i>	<i>transposable element gene</i>	<i>1.41</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at5g05965</i>	<i>unknown protein</i>	<i>1.29</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at5g44313</i>	<i>transposable element gene</i>	<i>1.17</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at5g36960</i>	<i>unknown protein</i>	<i>1.14</i>
<i>Not assigned. No ontology</i>	<i>at5g53490</i>	<i>thylakoid luminal 17.4 kDa protein, chloroplast</i>	<i>1.1</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at4g24680</i>	<i>BAT2, N-terminal, putative</i>	<i>1.08</i>
<i>Not assigned. Unknown</i>	<i>at5g25360</i>	<i>unknown protein</i>	<i>1.05</i>
<i>Not assigned. No ontology</i>	<i>at5g43745</i>	<i>phosphotransferase-related</i>	<i>1.03</i>

<i>Regulados negativamente</i>			
<i>Malic acid metabolism</i>			
<i>Transformation. Other organic acid transformations</i>	at2g13560	malate oxidoreductase, putative	-2.59
<i>Mitochondrial electron transport</i>			
<i>Mitochondrial electron transport</i>	at1g32710	cytochrome c oxidase subunit VIb family	-1.67
<i>Cellular wall</i>			
<i>Cell wall precursor synthesis, phosphomannose isomerase</i>	at1g67070	DIN9 (dark inducible 9)	-2.28
<i>Cell wall proteins. HRGP</i>	at3g54590	ATHRGP1 (hydroxyproline-rich glycoprotein)	-1.12
<i>Lipids metabolism</i>			
<i>Lipid metabolism. FA synthesis and FA elongation</i>	at2g28630	KCS12 (3-ketoacyl-CoA synthase 12)	-2.78
<i>Lipid metabolism. "exotics" (steroids, squalene etc)</i>	at1g10030	ERG28 (Arabidopsis homolog of yeast ergosterol28)	-1.81
<i>Lipid metabolism. "exotics" (steroids, squalene etc). Sphingolipids</i>	at1g14290	SBH2 (sphingoid base hydroxylase 2)	-1.12
<i>Aminoacids metabolism</i>			
<i>Metal handling</i>			
<i>Metal handling</i>	at5g58640	selenoprotein-related	-1.01
<i>Secondary metabolism</i>			
<i>Secondary metabolism. Phenylpropanoids</i>	at3g61990	O-methyltransferase family 3 protein	-1.93
<i>Secondary metabolism. Phenylpropanoids</i>	at1g51680	4CL1 (4-coumarate:coa ligase 1)	-1.53
<i>Secondary metabolism. Phenylpropanoids</i>	at1g20480	4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-1.23
<i>Hormone</i>			
<i>Hormone metabolism. auxin. Induced-regulated</i>	at1g29510	SAUR68 (small auxin upregulated 68)	-1.39
<i>Hormone metabolism. Ethylene.</i>	at5g51690	ACS12; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	-1.23
<i>Hormone metabolism. Jasmonate</i>	at2g25980	jacalin lectin family protein	-1.09
<i>Stress related</i>			
<i>Biotic stress</i>	at1g75030	ATLP-3	-1.67
<i>Biotic stress. Signalling. MLO-like</i>	at1g42560	MLO9 (mildew resistance locus O 9)	-1.56
<i>Biotic stress. Unspecified</i>	at5g38950	germin-like protein-related	-1.5
<i>Biotic stress. Receptors</i>	at5g46520	ATP binding transmembrane receptor	-1.32
<i>Redox</i>			
<i>Redox. Thioredoxin</i>	at1g43560	Aty2 (Arabidopsis thioredoxin y2); electron carrier	-1.39
<i>Redox. Thioredoxin</i>	at1g34780	ATAPRL4 (APR-like 4)	-1.24
<i>Nucleic acid metabolism</i>			
<i>Nucleotide metabolism. Degradation</i>	at5g18890	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	-1.65
<i>Nucleotide metabolism. Nudix hydrolases</i>	at1g18300	atnudt4	-1.01
<i>nucleotide metabolism. Nudix hydrolases</i>	at4g11980	ATNUDX14 (nudix hydrolase homolog 14)	-1.4
<i>Biodegradation</i>			
<i>Biodegradation of xenobiotics. Lactoylglutathione lyase</i>	at1g11840	ATGLX1 (glyoxalase I homolog)	-1.01

Electron transport			
Myrosinases-lectin-jacalin	at5g38550	jacalin lectin family protein	-3
Oxidases - copper, flavone etc.	at4g12270	copper amine oxidase family protein	-2.54
Cytochrome P450	at5g58860	CYP86A1 (CYTOCHROME P450 86 A1)	-1.53
Nitrile lyases, berberine bridge enzymes, reticuline oxidases	at2g29170	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	-1.5
Peroxidases	at4g21960	Symbols: PRXR1   PRXR1; electron carrier	-1.49
UDP glucosyl and glucuronyl transferases	at4g16710	glycosyltransferase family protein 28	-1.03
Cytochrome P450	at5g42590	CYP71A16; electron carrier/ heme binding / iron ion binding	-1.18
Oxidases - copper, flavone etc.	at1g56000	amine oxidase-related	-1.1
Transcription			
RNA binding	at2g14870	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	-2.28
Regulation of transcription. MYB-related transcription factor	at1g49950	TRB1, ATTRB1   DNA-binding protein, putative	-2.05
Regulation of transcription. PHOR1	at1g66160	ATCMPG1, CMPG1   U-box domain-containing protein	-1.89
Regulation of transcription. Zn-finger (CCHC)	at4g12200	transposable element gene	-1.82
Regulation of transcription. unclassified	at5g11470	DNA binding/nucleic acid binding	-1.73
Regulation of transcription. MADS box transcription factor	at5g26870	AGL26; transcription factor	-1.66
Regulation of transcription. Unclassified	at2g02620	DC1 domain-containing protein/PHD finger protein-related	-1.58
Regulation of transcription. Unclassified	at2g14255	zinc ion binding	-1.47
Regulation of transcription. bZIP transcription factor family	at1g06850	AtbZIP52 (Arabidopsis thaliana basic leucine zipper 52)	-1.44
Regulation of transcription. C3H zinc finger family	at5g51980	WD-40 repeat family protein / zfwd2 protein (ZFWD2)	-1.43
Regulation of transcription. AP2/EREBP, APETALA2	at5g18450	AP2 domain-containing transcription factor, putative	-1.41
Regulation of transcription. C2H2 zinc finger family	at3g28210	PMZ; zinc ion binding	-1.34
Regulation of transcription. B3 transcription factor family	at1g49475	DNA binding/transcription factor	-1.3
Regulation of transcription. AP2/EREBP, APETALA2	at4g23750	CRF2 (cytokinin response factor 2)	-1.21
Regulation of transcription. Unclassified	at5g52140	protein binding/zinc ion binding	-1.2
Regulation of transcription. bHLH, Basic Helix-Loop-Helix family	at1g49770	RGE1 (retarded growth of embryo 1)	-1.17
Regulation of transcription. C2C2 (Zn) DOF zinc finger family	at3g21270	ADOF2; DNA binding/transcription factor	-1.09
Regulation of transcription. HB, Homeobox transcription factor	at1g17920	HDG12 (homeodomain glabrous 12)	-1.09
Regulation of transcription. WRKY domain transcription factor	at2g46130	WRKY43; transcription factor	-1.04
Regulation of transcription.putative transcription regulator	at2g42940	DNA-binding family protein	-1

<i>Chromatin structure</i>			
DNA synthesis/chromatin structure	at3g02065	DEAD/DEAH box helicase family protein	- 1.09
DNA synthesis/chromatin structure	at5g07460	PMSR2 (peptidomethionine sulfoxide reductase 2)	- 1.19
DNA synthesis/chromatin structure	at5g04130	ATP-hydrolyzing, putative / DNA topoisomerase II, putative	- 1.11
DNA synthesis/chromatin structure	at1g08130	ATLIG1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> dna ligase 1)	- 1.08
DNA synthesis/chromatin structure. histone	at5g27670	HTA7 (histone H2A 7)	- 1.01
DNA synthesis/chromatin structure. histone	at1g54230	DNA binding	- 1.01
DNA repair	at5g48120	ARM repeat superfamily protein	- 1.01
DNA unspecified	at3g42670	CHR38 (chromatin remodeling 38); ATP binding	- 1.27
<i>Protein modification</i>			
Protein synthesis. Ribosomal protein	at3g08720	S6K2 (serine/threonine protein kinase 2)	-3
Protein degradation. Ubiquitin E3 RING	at3g62970	protein binding/zinc ion binding	- 2.52
Protein postranslational modification	at1g03960	calcium-binding EF hand family protein	- 2.51
Protein degradation. Ubiquitin E3 RING	at4g11370	Symbols: RHA1A RHA1A; protein binding/zinc ion binding	- 2.02
Protein degradation. Ubiquitin. E3. SCF. FBOX	at1g23780	F-box family protein	- 1.94
Protein targeting chloroplast	at5g05000	TOC34	- 1.71
Protein degradation. Ubiquitin E3 SCF FBOX	at2g29830	kelch repeat-containing F-box family protein	- 1.68
Protein degradation. Ubiquitin E2	at5g41700	UBC8 (ubiquitin conjugating enzyme 8)	- 1.58
Protein degradation. Ubiquitin E3 SCF FBOX	at5g25290	F-box family protein	- 1.51
Protein synthesis. Ribosomal protein eukaryotic 40S subunit S23	at5g02960	40S ribosomal protein S23 (RPS23B)	- 1.48
Ribosomal protein. Prokaryotic. chloroplast 30S subunit S9	at1g74970	RPS9 (ribosomal protein S9)	- 1.47
Protein postranslational modification	at1g67760	ATP binding/protein binding/unfolded protein binding	- 1.44
Protein degradation. Ubiquitin E3 SCF FBOX	at5g03020	kelch repeat-containing F-box family protein	- 1.43
Protein degradation	at5g05740	EGY2; metalloendopeptidase	- 1.37
Protein degradation. Ubiquitin E3 SCF FBOX	at5g52460	EDA41 (embryo sac development arrest 41)	- 1.36

Protein degradation. Ubiquitin E3 Ring	at1g01660	U-box domain-containing protein	- 1.33
Protein postranslational modification	at3g54030	protein kinase family protein	- 1.26
Protein degradation. Ubiquitin E3 SCF FBOX	at2g13630	F-box family protein-related	- 1.25
Protein degradation. Serine protease	at2g18080	EDA2 (embryo sac development arrest 2)	- 1.24
Protein degradation. Autophagy	at2g40810	ATATG18C	-1.2
Protein degradation. Serine protease	at2g05850	scpl38 (serine carboxypeptidase-like 38)	- 1.16
Protein synthesis	at1g80930	MIF4G domain-containing protein	- 1.14
Protein postranslational modification	at3g21650	(PP2A) regulatory subunit B' putative	- 1.12
Protein degradation. AAA type	at3g28610	ATP binding/ATPase/nucleoside-triphosphatase	- 1.12
Modification kinase receptor like cytoplasmatic kinase II	at5g01060	protein kinase family protein	-1.1
Protein postranslational modification	at4g13020	MHK; ATP binding/kinase/protein kinase	- 1.02

<i>Signalling</i>			
Signalling light	at5g04190	PKS4 (phytochrome kinase substrate 4)	- 2.84
Signalling misc	at1g28270	RALFL4 (ralf-like 4); signal transducer	- 2.46
Signalling calcium	at4g16350	CBL6 (calcineurin b-like protein 6)	- 1.84
Signalling phosphorelay	at3g21510	AHP1 (histidine-containing phosphotransmitter 1)	-1.7
Signalling receptor kinases. <i>Catharanthus roseus</i> -like RLK1	at5g38990	protein kinase family protein	- 1.33
Signalling. MAP kinases	at1g18350	ATMKK7; MAP kinase kinase	- 1.29
Signalling receptor kinases. DUF 26	at4g11490	protein kinase family protein	- 1.18
Signalling. G-proteins	at4g39520	GTP-binding protein, putative	- 1.07
Signalling. G-proteins	at5g42080	ADL1 (Arabidopsis dynamin-like protein)	-1
Signalling receptor kinases. DUF 26	at4g11470	protein kinase family protein	1.03
Signalling receptor kinases. <i>Catharanthus roseus</i> -like RLK1	at5g59700	protein kinase, putative	1.31
<i>cellular response</i>			
Cell organisation	at1g01950	ARK2   armadillo/beta-catenin repeat family protein	- 1.98
Cell organisation	at5g27550	ATP binding/microtubule motor	- 1.81

Cell division	at2g32900	ATZW10	- 1.67
Cell cycle	at5g11300	CYC3B (mitotic-like cyclin 3b from arabidopsis)	- 1.58
Cell cycle	at4g19560	CYCT1;2; cyclin-dependent protein kinase	- 1.45
Cell organisation	at1g10340	ankyrin repeat family protein	- 1.29
Cell organisation	at5g41310	kinesin motor protein-related	- 1.27
Cell organisation	at2g21950	Symbols: SKIP6   SKIP6 (SKP1 interacting partner 6)	- 1.13
Cell cycle	at2g32050	cell cycle control protein-related	- 1.11
<i>RNA regulated</i>			
micro RNA, natural antisense	at1g26973	MIR395A; miRNA	- 1.07
micro RNA, natural antisense	at2g25095	MIR156A   MIR156A; miRNA	- 1.03
<i>Development</i>			
Development. Unspecified	at1g18100	E12A11; phosphatidylethanolamine binding	- 2.38
Development. Unspecified	at5g22640	emb1211 (embryo defective 1211)	- 2.08
Development. Unspecified	at5g64530	ANAC104, XND1   XND1; transcription factor	- 1.62
Development. Unspecified	at1g01550	BPS1 (BYPASS 1)	- 1.52
Development. Unspecified	at2g22870	EMB2001 (embryo defective 2001)	- 1.48
Development. Unspecified	at5g14520	pescadillo-related	- 1.48
Development. Storage proteins	at2g28490	cupin family protein	- 1.37
Development. Unspecified	at4g00930	CIP4.1	- 1.26
Development. Unspecified	at1g29690	CAD1 (constitutively activated cell death 1)	- 1.25
Development. Unspecified	at4g37790	HAT22; transcription factor	- 1.24
Development. Unspecified	at4g23410	TET5 (tetraspanin5)	- 1.22

<i>Transport</i>			
ATPase	at3g08560	VHA-E2 (vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase subunit e isoform 2)	-1.94
Transport. Unspecified anions	at5g25430	anion exchanger	-1.87
Transport potassium	at4g00630	KEA2; potassium ion transmembrane transporter	-1.66
Transport	at3g08960	binding/protein transporter	-1.62
ABC transporters and multidrug resistance systems	at2g26910	PDR4 (pleiotropic drug resistance 4)	-1.6
Cyclic nucleotide or calcium regulated channels	at3g17690	ATCNGC19; calmodulin binding/cyclic nucleotide binding	-1.38
Unspecified cations	at4g22840	bile acid:sodium symporter family protein	-1.28
Transport peptides and oligopeptides	at4g27730	OPT6 (oligopeptide transporter 1)	-1.18
Transport misc.	at1g29310	P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter	-1.15
<i>Not assigned</i>			
Not assigned. No ontology	at5g11240	transducin family protein/WD-40 repeat family protein	-2.76
Not assigned. Unknown	at2g39690	unknown protein	-2.6
Not assigned. Unknown	at4g34215	hydrolase	-2.58
Not assigned. Unknown	at2g41600	Glycoprotein family protein	-2.56
Not assigned. Unknown	at2g01870	unknown protein	-2.49
Not assigned. No ontology	at5g62600	transportin-SR-related	-2.35
Not assigned. Unknown	at5g40830	methyltransferase	-2.19
Not assigned. Unknown	at5g22210	unknown protein	-2.09
Not assigned. Unknown	at5g13950	unknown protein	-2.02
Not assigned. Unknown	at1g62060	unknown protein	-1.93
Not assigned. No ontology	at2g39795	mitochondrial glycoprotein family protein/MAM33 family protein	-1.91
Not assigned. No ontology	at3g32410	FH2 domain-containing protein	-1.9
Not assigned. Unknown	at5g22430	unknown protein	-1.87
Not assigned. Unknown	at5g52230	Symbols: MBD13   MBD13; methyl-CpG binding	-1.86
Not assigned. Unknown	at2g32295	EXS family protein/ERD1/XPR1/SYG1 family protein	-1.83
Not assigned. Unknown	at4g32670	zinc ion binding	-1.82
Not assigned. Unknown	at1g13380	unknown protein	-1.79
Not assigned. Unknown	at5g63150	unknown protein	-1.75
Not assigned. Unknown	at5g41660	unknown protein	-1.74
Not assigned. Unknown	at3g15320	transposable element gene	-1.7
Not assigned. No ontology	at2g26370	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	-1.62
Not assigned. No ontology	at1g74720	C2 domain-containing protein	-1.58
Not assigned. No ontology	at1g10095	protein prenyltransferase	-1.57
Not assigned. No ontology	at5g54440	unknown protein	-1.55
Not assigned. No ontology	at5g26260	meprin and TRAF homology domain-containing protein	-1.54

Not assigned. Unknown	at5g54560	unknown protein	-1.54
Not assigned. No ontology	at3g54580	proline-rich extensin-like family protein	-1.49
Not assigned. Unknown	at1g64410	transposable element gene	-1.49
Not assigned. Unknown	at2g28690	unknown protein	-1.47
Not assigned. Unknown	at2g39440	DOMAIN/s: Ribonuclease H2	-1.42

Not assigned. No ontology	at3g07290	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	-1.4
Not assigned. No ontology.	at2g25580	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	-1.39
Not assigned. Unknown	at1g71850	ubiquitin thioesterase	-1.39
Not assigned. No ontology	at5g43090	Symbols: APUM13   APUM13 (Arabidopsis Pumilio 13)	-1.38
Not assigned. Unknown	at5g25470	DNA binding	-1.38
Not assigned. Unknown	at2g25460	C2 calcium-dependent membrane targeting	-1.36
Not assigned. Unknown	at2g42370	unknown protein	-1.35
Not assigned. Unknown	at1g28120	Ubiquitin thioesterase Otubain	-1.35
Not assigned. Unknown	at5g07940	dentin sialophosphoprotein-related, putative	-1.34
Not assigned. Unknown	at3g20680	unknown protein	-1.34
Not assigned. No ontology	at1g59650	CW14	-1.33
Not assigned. No ontology	at5g39710	EMB2745 (embryo defective 2745)	-1.33
Not assigned. No ontology	at1g16830	MEE40 (maternal effect embryo arrest 40)	-1.32
Not assigned. Unknown	at5g02580	unknown protein	-1.31
Not assigned. Unknown	at1g28327	RING1B (RING 1B)	-1.29
Not assigned. Unknown	at3g43540	unknown protein	-1.27
Not assigned. Unknown	at5g42110	unknown protein	-1.27
Not assigned. No ontology	at1g23720	proline-rich extensin-like family protein	-1.25
Not assigned. Unknown	at4g12370	unknown protein	-1.21
Not assigned. Unknown	at3g06895	unknown protein	-1.21
Not assigned. Unknown	at2g06005	FIP1, frigida interacting protein 1	-1.17
Not assigned. Unknown	at2g39410	hydrolase, alpha/beta fold family protein	-1.15
Not assigned. Unknown	at4g35140	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	-1.14
Not assigned. Unknown	at1g04910	unknown protein	-1.13
Not assigned. No ontology	at5g49080	transposable element gene	-1.13
Not assigned. Unknown	at2g36680	Modifier of rudimentary, Modr	-1.13
Not assigned. No ontology	at1g53600	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	-1.12
Not assigned. No ontology	at5g06640	proline-rich extensin-like family protein	-1.11
Not assigned. Unknown	at4g32090	galactosyltransferase	-1.09
Not assigned. Unknown	at2g21740	unknown protein	-1.09



Not assigned. Unknown	at3g01870	unknown protein	-1.07
Not assigned. Unknown	at5g02660	zinc ion binding	-1.05
Not assigned. Unknown	at2g42130	unknown protein	-1.05
Not assigned. No ontology	at2g22125	cellulose synthase-interactive protein 1, POM2	-1.04
Not assigned. Unknown	at3g18540	unknown protein	-1.04
Not assigned. Unknown	at5g14550	unknown protein	-1.03
Not assigned. Unknown	at2g25280	UPF0103/Mediator of ErbB2-driven cell motility, putative	-1.02

## *Arabidopsis thaliana* AtTFIIB1 gene displays alternative splicing under different abiotic stresses

J.A. MIRANDA-RÍOS<sup>1,+</sup>, J.A. RAMÍREZ-TRUJILLO<sup>1,+</sup> , D.J. JAIME-GALLARDO<sup>1</sup>,  
N.S. HERNÁNDEZ-BUENO<sup>1</sup> , M. RAMÍREZ-YÁÑEZ<sup>2</sup> , G. ITURRIAGA<sup>3</sup> ,  
and R. SUÁREZ-RODRÍGUEZ<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 622 09 Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup>Programa de Genómica Funcional de Eucariontes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 622 10 Cuernavaca, Morelos, México

<sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Roque, 381 10 Roque Celaya, Guanajuato, México

\*Corresponding author: E-mail: [rsuarez@uaem.mx](mailto:rsuarez@uaem.mx)

### Abstract

In *Arabidopsis*, there are 14 TFIIB-like proteins that have been phylogenetically categorized into the TFIIB, BRF, and Rrn7/TAF1B/MEE12 subfamilies. The TFIIB transcription factor (TF) subfamily plays a key role in the regulation of gene expression in eukaryotes. To identify the expression patterns of some members of the TFIIB and BRF subfamilies in *A. thaliana*, different approaches were carried out to determine the possible functions of some of these transcription factors. Through an *in silico* analysis, we identified possible *cis*-acting regulatory elements in the promoter regions that drive the expression of transcription factors, as well as we evaluated their expression by means of real-time qPCR, at different growth stages and under various stress conditions. *Cis*-acting elements analysis showed that general transcription factors possess stress-responsive elements such as W-Box (TTGACC/T type binding WRKY TFs), ARF1 (auxin response), MYB binding site promoter (auxin response and elicitors), RAV1-A (response to dehydration and salinity), and DRE elements (dehydration response) among others. The experimental results showed differential expression of *TFIIB1* and *TFIIB*. In addition, we demonstrate that in stress conditions a transcript of the TFIIB1 factor is generated as an alternative splicing product by retention of the third intron, where a premature termination codon is found. This is the first report of an alternative splicing event in a general transcription factor related to RNA pol II, which is synthesized when the plant is under abiotic stresses such as heat, dehydration, and salinity.

**Keywords:** abiotic stresses, alternative splicing, *Arabidopsis thaliana*, basal transcriptional factor, dehydration, heat, osmotic stress, salinity.

Received 11 September 2020, last revision 26 March 2021, accepted 30 March 2021.

**Abbreviations:** AS - alternative splicing; BRPs - TFIIB-related proteins; cDNA - complementary DNA; GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GTFs - general transcription factors; miPs - microproteins; MS - Murashige and Skoog; nptII - neomycin phosphotransferase II; NMD - nonsense-mediated decay; PLACE - plant *cis*-acting regulatory DNA elements database; PlantCARE - plant *cis*-acting regulatory elements database; PTC - premature termination codon; RUST - regulated unproductive splicing and translation; siPEP - small interference peptide; TFs - transcription factors.

**Acknowledgements:** This work was supported by grants from the Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-Spain (107PIC0312) and Fondo Mixto Morelos, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-México (120159) to Paul Gaytán and Eugenio López for oligonucleotide synthesis. We thank Lorena Chávez, Simón Guzmán, and Jorge Ramírez for technical assistance in the microarray determinations, and also to David Brown for editing the English text of a draft of this manuscript.

<sup>+</sup>These authors contributed equally.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## Introduction

Plants as sessile organisms have strategies to maintain homeostasis during their life cycle and respond to adverse external stimuli such as biotic and abiotic stresses. Abiotic stresses, such as low or high temperature, deficient or excessive water, high salinity, heavy metals, and ultraviolet radiation, are hostile to plant growth and development, leading to great crop yield penalty worldwide (He *et al.* 2018). To survive, grow, and reproduce in environments that fluctuate annually and diurnally, land plants have evolved a complex system that regulates adaptation in response to stress signals. Many aspects of adaptation processes, which include developmental, physiological, and biochemical changes, are controlled by stress-responsive gene expression (Agarwal *et al.* 2017). Transcription factors play central roles in gene expression by regulating downstream gene regulation, such as *trans*-acting elements *via* specific binding to *cis*-acting elements in the promoter of target genes (Mizoi *et al.* 2012). In addition, transcription factors finely regulate signal transduction pathways in the cell to adjust and achieve optimal growth and survival under stressful environmental conditions (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2006).

Well-established molecular and biochemical mechanisms underlying the regulation of transcription factor (TF) activities involve regulation at different stages of transcription, translation, and protein turnover (Seo *et al.* 2013). Recent studies have shown that in plant genomes post-transcriptional control of RNA metabolism is widespread. For example, in *Arabidopsis thaliana*, over 60 % of intron-containing genes undergo alternative splicing (AS). The diversity of the proteome and the expansion of the repertoire of gene/protein activities in response to developmental and environmental stimuli are provided by alternative splicing (Syed *et al.* 2012).

Plants can sense, process, and respond to environmental cues and activate related-gene expression to increase their stress tolerance (Nakashima *et al.* 2014). Many proteins interact with specific DNA sequences in the promoter regions and interact with other transcriptional regulators. It has been estimated that *A. thaliana* contains over 1 800 TFs representing more than 7 % of its proteins, and only a tenth of these have been characterized (Lindemose *et al.* 2013, Franco-Zorrilla *et al.* 2014).

The initiation of eukaryotic gene transcription requires the formation of a pre-initiation complex (PIC) on promoter regions. The PIC is composed of RNA polII, transcription factor IIB (TFIIB), and TATA box-binding proteins (TBP) (Kostrewa *et al.* 2009). In *A. thaliana*, 14 TFIIB-like proteins have been phylogenetically categorized into the TFIIB, BRF, and Rrn7/TAF1B/MEE12 subfamilies. The TFIIB subfamily has eight members, including TFIIB1, TFIIB2, and six BRP proteins, among which BRP3 and BRP6 contain only partial TFIIB domains that are predicted to function differently from the others TFIIB (Knutson 2013).

In *Saccharomyces cerevisiae*, the isogenic mutant strains on *TFIIB* (*SUA7*) show deficiencies in growth at 16 and 30 °C (Pinto *et al.* 1994); another report

described the synthesis of two *SUA7* transcripts differing in size near 100 nucleotides when cells are exposed to heat stress (Hoopes *et al.* 2000). Furthermore, TFIIB is expressed in terms of adaptation to high temperatures in *Citrus clementina* (Sánchez-Ballesta *et al.* 2003). Fiol and Kültz (2005) reported an increased expression of two transcription factors (OTSF1 and TFIIB) that were rapidly and transiently induced during hyperosmotic stress in the fish *Oreochromis mossambicus*, and an alternative isoform was reported in tomato (Keller *et al.* 2017). So far, *TFIIB* and members of this gene family (BRP) recently reclassified by Knutson (2013) have been reported to be involved in the development and establishment of reproductive structures in *A. thaliana* (Cavel *et al.* 2011, Zhou *et al.* 2013, Qin *et al.* 2014). In previous work, we reported the characterization of a T-DNA *tin14* mutant of *A. thaliana* insensitive to trehalose (Hernández-Campuzano *et al.* 2014). The T-DNA insertion in this mutant is located 728 bp downstream of the *AtBRP3* (plant-specific TFIIB-related protein) coding region. The *tin14* mutant displayed insensitiveness to glucose, abscisic acid, and tolerance to osmotic stress (sorbitol), but not to salinity (Hernández-Campuzano *et al.* 2014).

In the present work, we report data showing that *TFIIB1*, *BRP1*, *BRP2*, *BRP3*, and *BRP4* are differentially expressed under different developmental stages, in response to stress conditions, and that the *TFIIB1* gene shows alternative splicing under osmotic, heat, and dehydration stress.

## Materials and methods

**Plants and cultivation:** *Arabidopsis thaliana* L. wild-type plants used in this study were the Columbia ecotype (Col-0). Seeds were sterilized in 0.5 % sodium hypochlorite for 15 min, followed by 5 washes, and then germinated on Murashige and Skoog (MS) medium gelled with *Phytigel* with or without kanamycin in a plant culture room at a temperature of 22 °C, a 16-h photoperiod, and irradiance of 80 - 90  $\mu\text{mol}(\text{photons})\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . The seedlings were transplanted to *Metro-Mix 200* (*Grace-Sierra*, Milpitas, CA, USA).

To break dormancy and promote germination, *A. thaliana* seeds were stratified at 4 °C in the dark for 24 h. Later the seeds were surface-sterilized, sown on MS plates or in *Magenta* boxes, and incubated under the conditions mentioned above.

**Dehydration stress treatment in *Arabidopsis thaliana* adult plants:** *A. thaliana* seeds previously sterilized were germinated in *Magenta* boxes and after four weeks, the plants were carefully removed and placed inside a laminar flow hood to induce dehydration for 1, 2, and 3 h. Then the different tissues such as flower, cauline leaf, and rosette leaf were removed with sterile scissors to proceed with RNA purification.

**Stress treatments in *Arabidopsis thaliana* seedlings:** For heat stress, two-week-old seedlings growing in conditions previously mentioned were incubated at 32 °C for 1 h

before proceeding to RNA extraction. For cold stress, two-week-old seedlings were incubated at 0 °C for 1 h before proceeding to RNA extraction. For salt stress, two-week-old seedlings were removed and floated on different NaCl concentrations (100, 200, 300, 400, and 500 mM) in distilled water for 1 h before proceeding to RNA extraction. For dehydration stress, two-week-old seedlings were carefully removed and placed inside a laminar flow hood to induce dehydration (1, 2, and 3 h) before proceeding to RNA extraction.

**RNA extraction and real-time qPCR:** Seedlings, cauline leaves, rosette leaves, and flower tissues were frozen in liquid nitrogen and grounded to a fine powder using mortar and pestle. Total RNA was isolated using *TRIzol* reagent (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Integrity and concentration of the RNA were analyzed by electrophoresis on 1.5 % (m/v) agarose gel, stained with ethidium bromide, and quantified in *Nanodrop 2000* (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, USA) spectrophotometer.

The first cDNA strand was synthesized using 2.0 µg of total mRNA, treated with DNase I, and used for complementary DNA (cDNA) synthesis with *RevertAid H Minus M-MuLV* reverse transcriptase (both from *Thermo Scientific*) following the manufacturer's instructions. The obtained cDNA was used for gene expression analyses. A PCR using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) (AT2G24270) was used as a control. Primers used in the present work are listed in Table 1 Suppl.

The resulting cDNAs were then diluted 10-fold and used to perform the real-time qPCR experiments using *SYBR Green qPCR Master Mix* (*Fermentas*, Waltham, Ma, USA) following the manufacturer's instructions. The reaction mix was then dispensed in a 96 well plate and analyzed using real-time thermocycler *Applied Biosystem 7300* (Foster City, CA, USA). The thermal cycler settings

were as follows: 94 °C for 1 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 20 s and 60 °C for 60 s. Relative transcriptions for each sample were obtained using the 'comparative Ct method' (*Schmittgen and Livak 2008*) and normalized with the geometrical mean of the *GAPDH* gene. A multiple analysis of variances (*ANOVA*) statistical test was performed to evaluate the significance of the differential expression using the mean values from three biological replicates for each condition.

**Cloning of AtTFIIB1 isoforms:** The RT-PCR products amplified with the primers TFIIB1Up and TFIIB1Do (Table 1 Suppl.) were cleaned-up directly from agarose gel by *QIAEX II*® gel extraction kit (*Qiagen*, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purified fragments were cloned in a pTZ57R/T cloning vector for sequencing according to the supplier (*Thermo Scientific*). The DNA-sequencing was performed using the *Applied Biosystems 3130xl* genetic analyzers at the Instituto de Biotecnología, UNAM, Mexico (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>).

**Data analysis:** The results are expressed as means ± standard deviations (SDs). One-way analysis of variance (*ANOVA*) was used to analyze the statistical significance between groups and the  $P < 0.01$  level was considered as statistically significant.

## Results

To determine the profile of *cis*-regulatory elements in upstream regions of *TFIIB* genes family members in *A. thaliana*, the 5'-upstream sequences available online (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>) were analyzed using *PLACE* and *PlantCARE* databases. Several response elements were found in the promoters of the *TFIIB* genes family, which in addition to elements involved in the

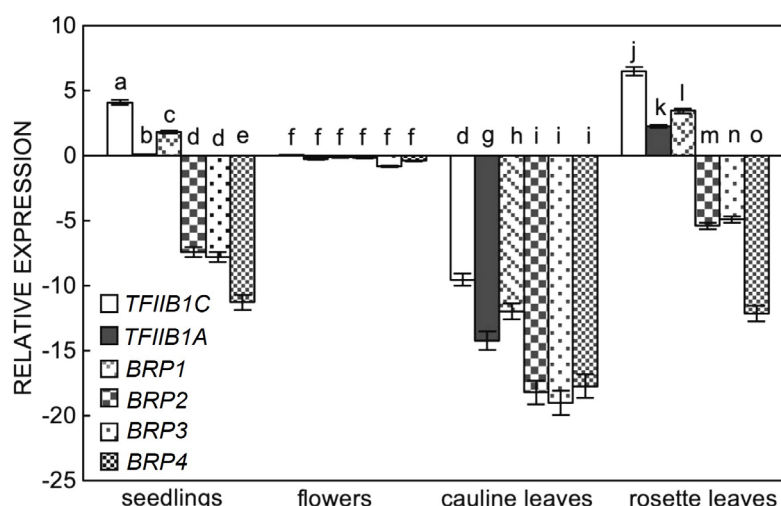


Fig. 1. Expression analysis by real-time qPCR of *TFIIB* family members under non-stressed conditions in different tissues of *A. thaliana*. Relative expressions for each sample were obtained using the comparative Ct method as mentioned in Materials and methods and normalized with the geometric mean of the *GAPDH* gene (AT2G24270). Means ± SDs,  $n = 3$ ; bars with different letters are significantly different at  $P < 0.01$  between any *TFIIB* family members.

general transcription process, contain several factors that may be associated with biotic and abiotic stress responses (Table 2 Suppl.).

To elucidate the expression of five *TFIIB* family members in *A. thaliana* at different developmental stages, a transcriptional analysis of the selected genes was performed using real-time qPCR. We selected genes

whose products of genetic expression possess at least zinc ribbon and cyclin domains in the same peptide. Our results showed that *TFIIB1* and *BRP1* under normal growth conditions are constitutively expressed in seedlings, flowers, and rosette leaves. The *TFIIB* family members showed a slightly repressed expression in cauline leaves. On the other hand, *BRP2*, *BRP3*, and *BRP4* showed

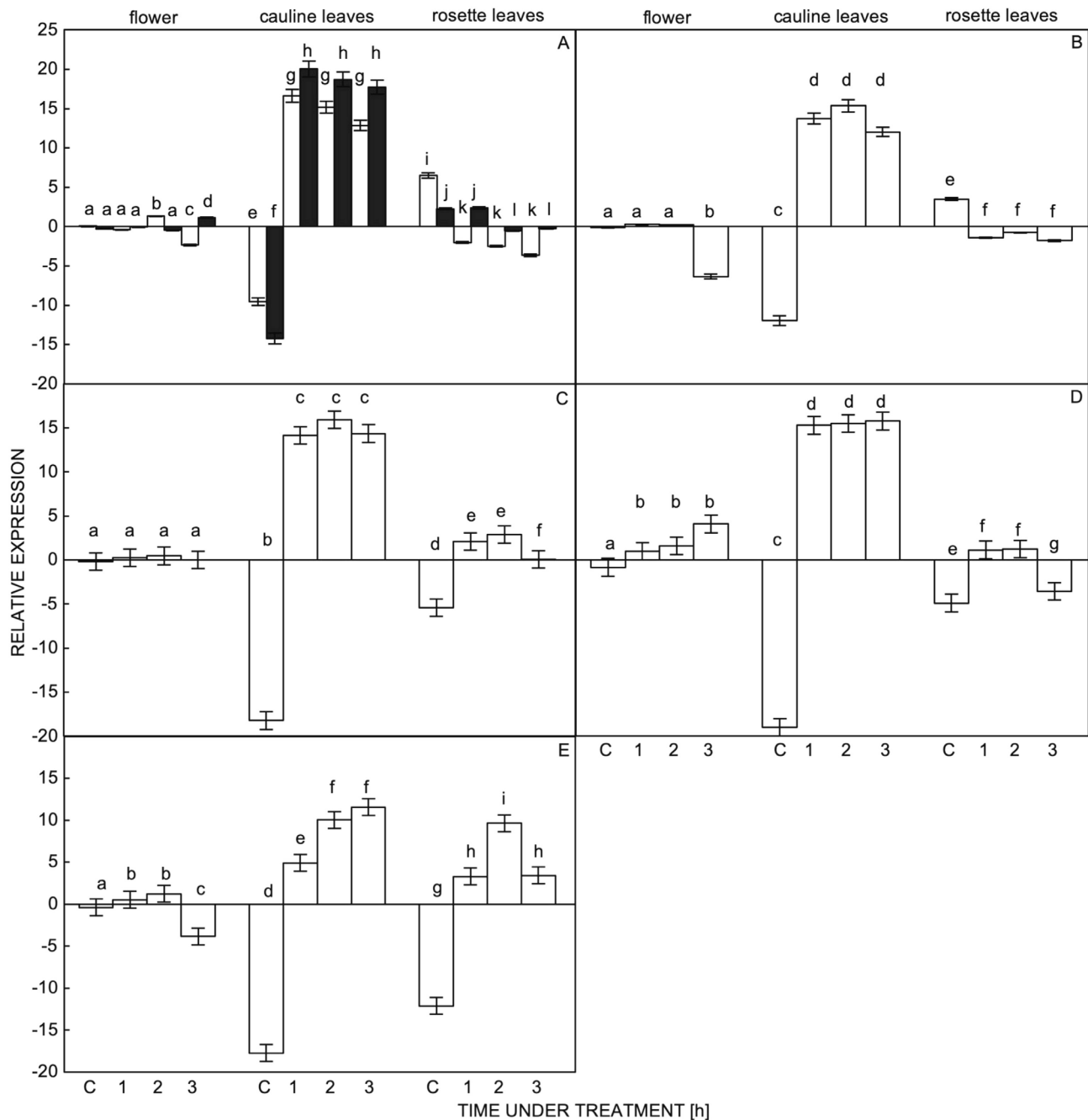


Fig. 2. Expression analysis of *TFIIB* family members under dehydration stress in different tissues of *A. thaliana*. A - *TFIIB1* canonical (white bars) and *TFIIB1* alternative splicing isoform (black bars), B - *BRP1*, C - *BRP2*, D - *BRP3*, and E - *BRP4*. C means growth under control conditions, 1, 2, and 3 means dehydration treatment for 1, 2, and 3 h. Relative expressions were obtained using the comparative Ct method as mentioned in Materials and methods and normalized with the geometric mean of the *GAPDH* gene. Means  $\pm$  SDs,  $n = 3$ ; bars with different letters are significantly different at  $P < 0.01$  between *TFIIB* family members.

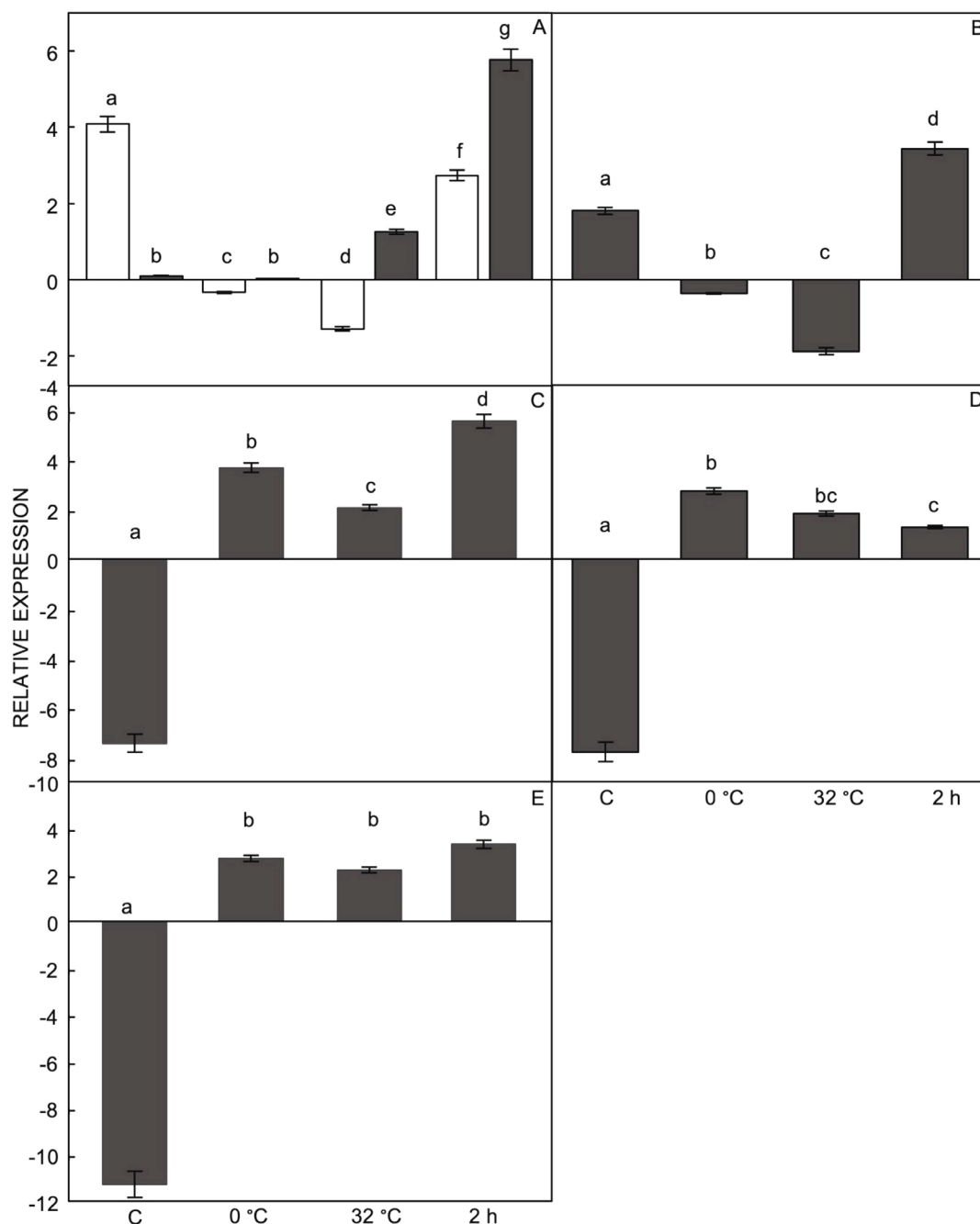


Fig. 3. Expression analysis of *TFIIB* family members under cold (0 °C), heat (32 °C), and dehydration (2 h) stress in *A. thaliana* seedlings. A - *TFIIB1* canonical (white bars) and *TFIIB1* alternative splicing isoform (black bars), B - *BRP1*, C - *BRP2*, D - *BRP3*, and E - *BRP4*. C means growth under control conditions. Relative transcriptions for each sample were obtained using the comparative Ct method as mentioned in Materials and methods and normalized with the geometric mean of the *GAPDH* gene. Means  $\pm$  SDs,  $n = 3$ ; bars with different letters are significantly different at  $P < 0.01$  between *TFIIB* family members.

repression in seedlings, basal expressions in flower tissue, and repression in cauline and rosette leaves (Fig. 1).

To demonstrate the role of stress-responsive *cis*-acting elements in promoters of *TFIIB1*, *BRP1*, *BRP2*, *BRP3*, and *BRP4* genes predicted through *in silico* analysis, qPCR experiments were conducted under dehydration stress as described in Materials and methods. The *BRP1* showed basal expressions at 1 and 2 h of dehydration in flowers. However, at 3 h of stress, the *BRP1* expression was repressed

in flowers, increased in cauline leaves, and repressed in rosette leaves (Fig. 2B). The *BRP2* did not show changes in expression in flower but showed increased expression in cauline and rosette tissues; however, it showed repression only in rosette after 3 h of dehydration stress (Fig. 2C). The *BRP3* showed an increased expression under dehydration after 1, 2, and 3 h in flowers, cauline, and rosette leaves, but only at 3 h of stress did the rosette show repression of expression (Fig. 2D). The *BRP4* showed an increase in



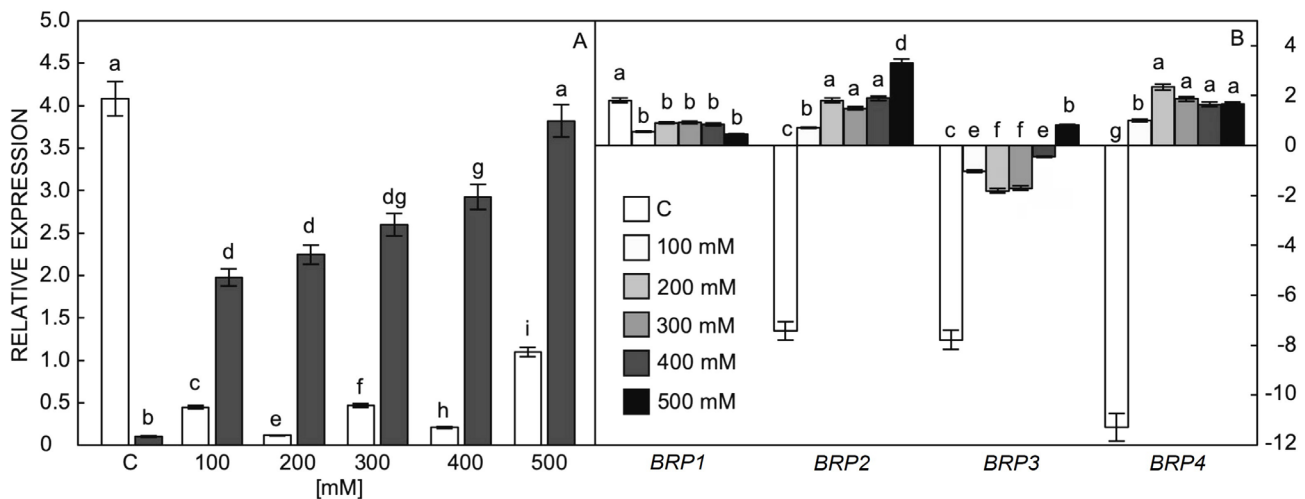


Fig. 4. Expression analysis of *TFIIB* family members in *A. thaliana* seedlings under different NaCl concentrations. *A* - Expressions of *TFIIB1* transcripts isoforms. White bars indicated *TFIIB1* canonical isoform while black bars indicated *TFIIB1* alternative isoform; *B* - *TFIIB* related protein (BRP) genes. Relative transcriptions were obtained using the comparative Ct method as mentioned in Materials and methods and normalized with the geometric mean of the *GAPDH* gene. Means  $\pm$  SDs,  $n = 3$ ; bars with different letters are significantly different at  $P < 0.01$  between *TFIIB* family members.

expression in almost all tissues after 1, 2, and 3 h but with slight repression in flowers after 3 h of dehydration stress (Fig. 2E).

The *TFIIB1* maintained similar expression patterns in normal growth conditions (Fig. 1) as well as under dehydration (Fig. 2A). Surprisingly, an additional amplification product (93 bp larger than the canonical transcript) was synthesized in *A. thaliana* plants exposed to heat, salinity, and dehydration stresses (Fig. 1 Suppl.).

Two-week-old seedlings were subjected to different abiotic stresses such as cold (0 °C), heat (32 °C), and dehydration (2 h), and *BRP1*, *BRP2*, *BRP3*, *BRP4*, and *TFIIB1* transcripts were quantified. The *BRP1* expression decreased under cold and high temperatures, but increased under dehydration, *BRP2*, *BRP3*, and *BRP4* showed an increase under cold, heat, and dehydration (Fig. 3B-D).

To determine if the expression of the alternative isoform of *TFIIB1* is induced specifically only under dehydration stress conditions, qPCR analysis under abiotic stress conditions mentioned above was taken (Fig. 3A and 4A). The results demonstrated that the expression of the alternative splicing product of *TFIIB1* also takes place under heat stress (32 °C for 1 h) (Fig. 3A) and salinity (100, 200, 300, 400, and 500 mM NaCl for 1 h); both *TFIIB1* transcript isoforms co-existed in control as well as in salinity stress. However, the canonical isoform is the most abundant under no stress conditions, whereas the alternative isoform increases according to the NaCl concentrations (Fig. 4A). This *TFIIB1* isoform was absent when *A. thaliana* plants were subjected to low temperature (0 °C for 2 h) (data not shown).

To verify the identity of the alternative splicing product, we amplified it by RT-PCR, cloned, sequenced the PCR fragment, and compared it with the canonical *TFIIB1* transcript (Fig. 5A). The sequencing results showed that both fragments belong to *AtTFIIB1*, but the larger isoform was the product of an alternative splicing

process by retention of the third intron of 93 nucleotides (Fig. 5B, Fig. 1 Suppl.). The cDNAs sequences analysis and *in silico* translation of both transcripts isoforms (<http://www.expasy.org/>) showed a 100 % identity compared to nucleic acid sequences. However, the intron retained generated an alternative isoform, which had a premature termination codon (PTC) (Fig. 5B).

The superimposition and structural alignment of both polypeptide chains products were analyzed using an algorithm to calculate the structural similarity of two proteins (Zhang and Skolnick 2005). The analysis showed structural similarity between these *TFIIB1* isoforms, both conserved zinc ribbon domain, cyclin domain 1, but only the canonical product retained the cyclin domain 2 (Fig. 6).

All our results suggest that the transcription factor *TFIIB1* and proteins related (*BRP1*, *BRP2*, *BRP3*, and *BRP4*), participate in the development and reproductive processes and may be involved in regulating mechanisms to contend with abiotic stresses such as heat, cold, dehydration, and salinity.

## Discussion

Gene expression in plants is a finely regulated process, and success in homeostasis maintenance depends on several *trans*-acting elements that regulate a myriad of genes to confront the adverse conditions. Thus, many signaling pathways controlling these processes target the core transcription machinery such as RNA polymerase II (Pol II) and general transcription factors (GTFs) regulation (Grünberg and Hahn 2013). The sequential recruitment order to PIC formation starts with *TFIID* (TBP and TAFs multiprotein complex) in TATA box, *TFIIA*, *TFIIB*, *TFIIF*, RNA pol II, *TFIIE*, and *TFIIH* (Thomas and Chiang 2006, Liu *et al.* 2010, Grünberg and Hahn 2013). In *A. thaliana* 14 *TFIIB*-like proteins have been phylogenetically re-

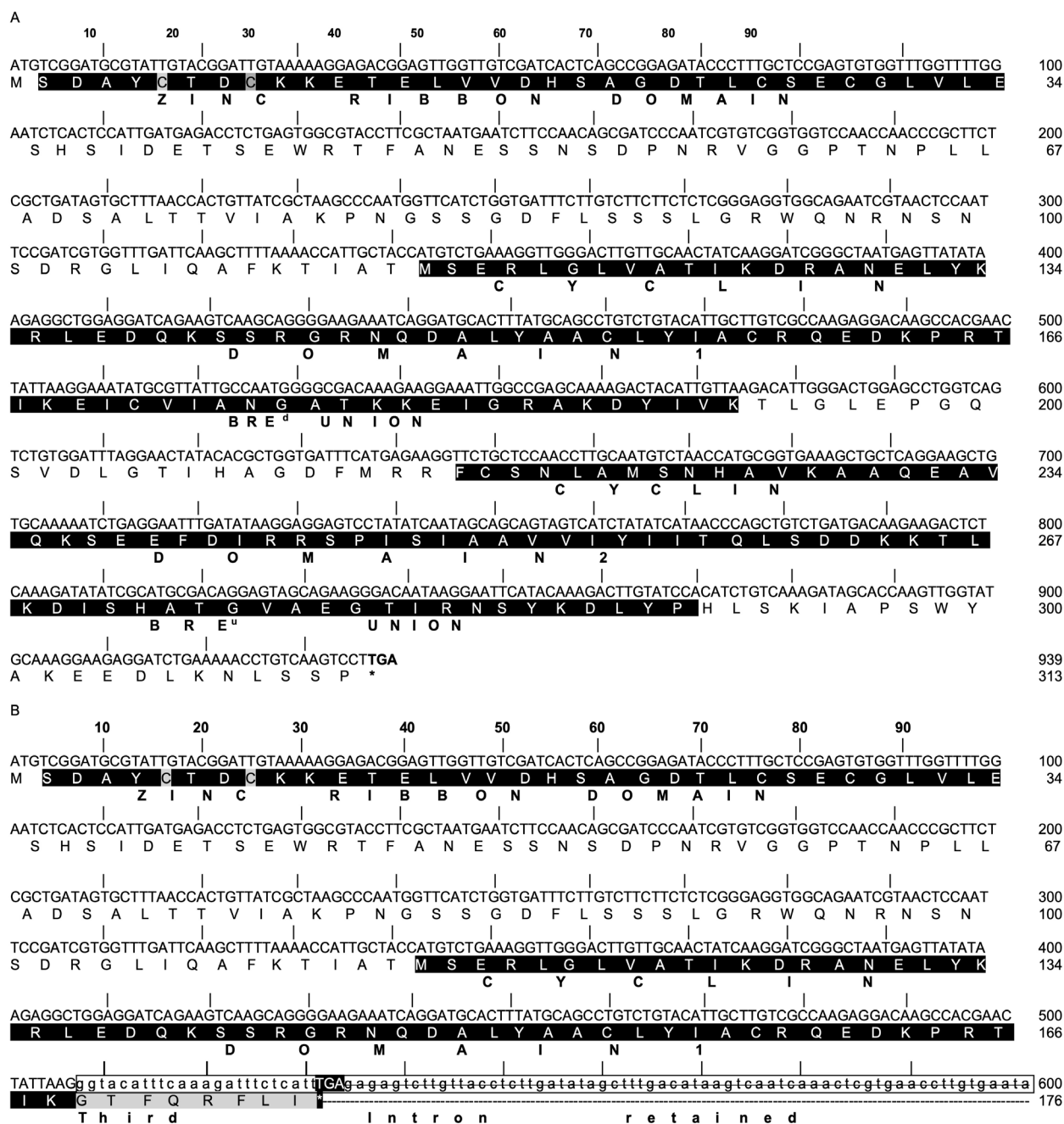


Fig. 5. Open reading frame of *A. thaliana* *TFIIB1*. *A* - Canonical sequence synthesized under non-stressed conditions has 939 nucleotides and encodes a polypeptide of 312 amino acid residues and *B* - sequence of the alternative *AtTFIIB1* splicing product showing the third intron retained and premature termination codon, PTC (\*). The retained intron is shown in lower case and an open rectangle.

categorized into the TFIIB, BRF, and Rm7/TAF1B/MEE12 subfamilies (Knutson 2013, Niu *et al.* 2013). The TFIIB subfamily has eight members, including TFIIB1, TFIIB2, and six BRP proteins, among which BRP3 and BRP6 contain only partial TFIIB domains and are predicted to function differently from the other TFIIBs (Knutson 2013).

In *A. thaliana*, *BRP1* (At4g36650) is expressed in all tissues and developmental stages, although with a high expression in roots and a lower in flowers and siliques.

The *BRP1* is localized both in plastids and nuclei and has been reported to be involved in RNA polymerase I-dependent rRNA synthesis (Lagrange *et al.* 2003). Our results of the expression analysis in seedlings, cauline leaves, rosette leaves, and flowers indicated that *BRP1* is a constitutively expressed gene as has been reported by Lagrange *et al.* (2003). Under dehydration stress in adult plants, *BRP1* showed an upregulated expression after 1 h and remained upregulated after 2 and 3 h in cauline leaves and downregulated in rosette leaves (Fig. 2B). Only



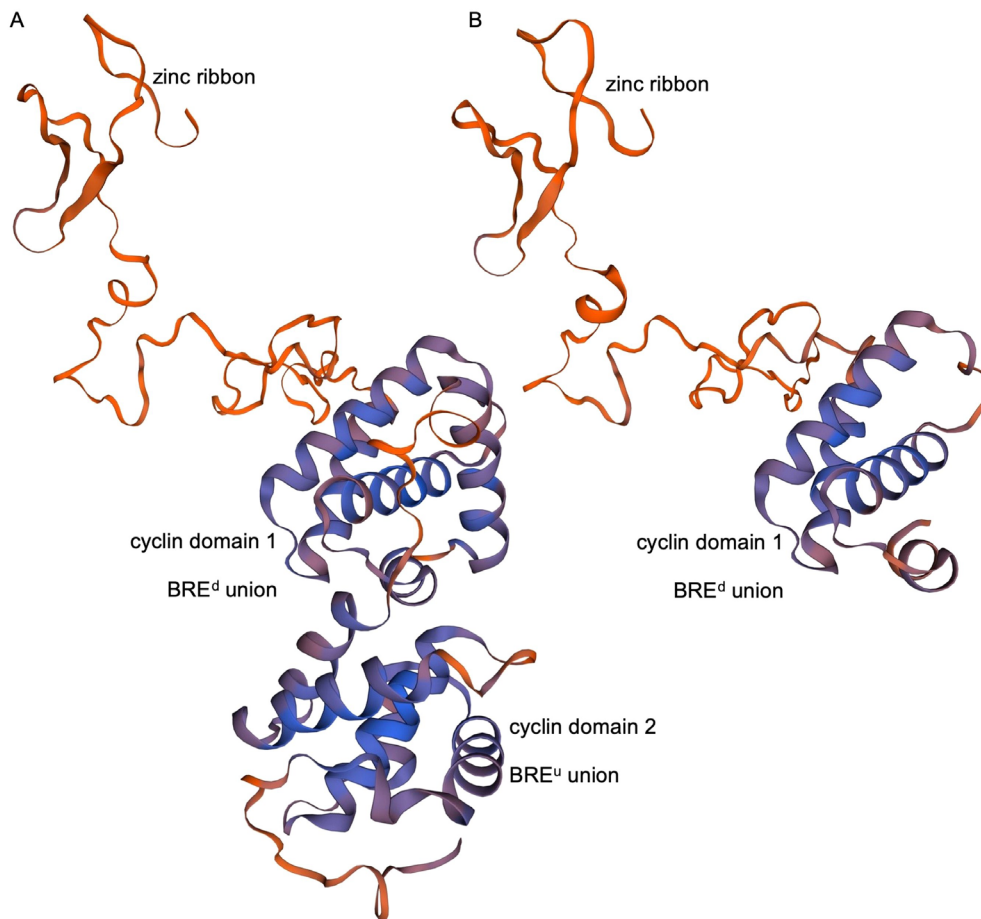


Fig. 6. Model for the structure of TFIIB1. *A* - Canonical product from *TFIIB1*, showing the complete structure of the transcription factor, such as zinc ribbon and the two cyclin domains. *B* - Model-based structure of the probable protein generated by the truncated mRNA derived from alternative splicing of the TFIIB1, the novel structure lacks the second cyclin domain, which contains the BRE<sup>u</sup> union domain. BRE<sup>d</sup> and BRE<sup>u</sup> refers to TFIIB-recognition element downstream and upstream respectively.

under dehydration, it increased its expression in seedlings (Fig. 3B), although, under salinity stress, the *BRP1* expression was downregulated (Fig. 4B).

The expression of *BRP2* (At3g29380) is restricted to reproductive organs and seeds and is involved in the regulation of endosperm growth, and mutant lines exhibit a slower proliferation rate at the endosperm syncytial stage (Cavel *et al.* 2011). The experiments in the present work showed induction in the *BRP2* expression after 1, 2, and 3 h under dehydration stress in cauline leaves and slightly in rosette leaves (Fig. 2C), as well as in seedlings under low and high temperature, dehydration (Fig. 3C), and salinity (Fig. 4B).

The *BRP3* was expressed mainly in flowers (Fig. 1). Our data showed that *BRP3* (At4g10680) exhibited an evident increase in expression in floral tissue under dehydration after 1, 2, and 3 h and it was induced in cauline and rosette leaves (Fig. 2D) as well as in seedlings under cold, heat, and dehydration (Fig. 3D). However, its expression was downregulated in seedlings under salinity with a slight increase in 500 mM NaCl (Fig. 4B).

We showed that *BRP4* expression was restricted to flowers and exhibited an increase in the expression in flowers after 1 and 2 h but a decrease after 3 h of dehydration.

The *BRP4* expression showed induction in cauline and rosette leaves after the first hour of dehydration (Fig. 2E). Although *BRP4* expression in seedlings was restricted to flower tissue, it showed upregulation under cold, heat, and dehydration (Fig. 3E) as well as an induction under salinity (Fig. 4B).

Zhou *et al.* (2013) mentioned that *AtTFIIB1* (At2g41630) is implicated in pollen tube growth and endosperm development. The transcript is found in all development stages of vegetative tissues such as roots, stems, leaves, flowers, flower buds, pollen grains, siliques, and seedlings but is up-regulated in flower and pollen grains. This GTF plays a special role in sexual reproduction (Zhou *et al.* 2013). Pollen germination generates a pollen tube that delivers the male gametes into an embryo sac for double fertilization, while embryogenesis enables the zygote to develop into an embryo, and those processes are polygenetic and involve the expression of several genes (Wang *et al.* 2008, Niu *et al.* 2013). The *AtTFIIB1* genomic structure is a multiexonic sequence of seven exons and six introns (Knutson 2013). Here we have shown that transcriptional and post-transcriptional regulations of RNAs were drastically altered during plant stress responses. Our results showed that *AtTFIIB1* retained the

third intron specifically under abiotic stress conditions such as heat, dehydration, and salinity. It has been widely described intron retention as the most common alternative splicing in *A. thaliana* (Hoang *et al.* 2017). The analysis *in silico* of the *AtTFIIB1* nucleotide sequence showed an encrypted premature stop codon (PTC) localized on the third intron in position 532 after +1 nucleotide in an alternative isoform transcript. Previous reports mentioned that the alternative transcripts isoforms with the PTC are part of a two-component system called RUST (regulated unproductive splicing and translation) where the alternative isoform with the PTC is recognized by a specialized system called NMD (non-sense mediated decay) which marks the mRNA with PTC for its degradation (Ni *et al.* 2007, Nyikó *et al.* 2013). Stop codons that are located distant from the mRNA 3' termini or more than 50 nucleotides upstream of the 30-most exon-exon junction are recognized as substrates for NMD (Hori and Watanabe 2007). However, there are examples of alternative transcripts that avoid the NMD system (Lareau *et al.* 2007) that in case it is translated, generates a novel protein with possible novel functions called microprotein (miP) or small interference peptide (siPEP), which can trigger a change in the stress response (Syed *et al.* 2012). A general transcription factor, AtTFIIIA, in addition to being involved in development (Layat *et al.* 2012), has been described to be involved in abiotic stress response in *A. thaliana* and rice (Fu *et al.* 2009) when the transcript retains the third exon, which contains a premature stop codon, and when this isoform is overexpressed, the transgenic lines are more tolerant to abiotic stress. Genome-wide analysis of alternative splicing (AS) in *A. thaliana* suggested that 78 % of alternative transcripts introduced in-frame PTCs (Filichkin *et al.* 2010) provide a huge potential for the production of miPs (Syed *et al.* 2012, Magnani *et al.* 2014).

*AtTFIIB1* promoter analysis shows several *cis*-elements involved in abiotic stress as well as elements involved in housekeeping and cell cycle functions. In this study, we showed an *AtTFIIB1* alternative transcript isoform by the third intron retention under abiotic stress such as heat, dehydration, and salinity. This process seems to be very strictly controlled. The intron retention provides the inclusion of PTC, and the *in silico* analysis suggests that in case it would be translated, the alternative product lacks the upstream TFIIB recognition element (BRE<sup>n</sup>) binding domain, generating a siPEP or miP with a regulatory role under abiotic stress conditions. Previous reports of TFIIB1 in yeast, citrics, tilapia, and tomato seems to indicate that TFIIB1 may be directly involved in rapid abiotic stress response in these organisms (Pinto *et al.* 1994, Hoopes *et al.* 2000, Sánchez-Ballesta *et al.* 2003, Fiol and Kültz 2005, Keller *et al.* 2017). Our studies showed activation of *BRP1*, *BRP2*, *BRP3*, and *BRP4* in cauline leaves 1, 2, and 3 h after dehydration, repression of *BRP1* under the same conditions in rosette leaves, and activation of *BRP2*, *BRP3*, and *BRP4* in the same tissue and stress conditions. More studies are needed, such as overexpressing the canonical *TFIIB1* and the product of alternative splicing version in transgenic plants, as well as the inhibition of expression by RNAi, to corroborate our current data. The results obtained

in the present work provide valuable information to gain an insight into the possible role of TFIIB1 and related proteins (BRPs) in abiotic stress tolerance in *A. thaliana* plants as well as its possible implications in several genes involved in abiotic stress response.

## References

- Agarwal, P.K., Gupa, K., Lopato, S., Agarwal, P.: Dehydration responsive element binding transcription factors and their applications for the engineering of stress tolerance. - *J. exp. Bot.* **68**: 2135-2148, 2017.
- Cavel, E., Pillot, M., Pontier, D., Lahmy, S., Bies-Etheve, N., Vega, D., Grimanelli, D., Lagrange, T.: A plant-specific transcription factor IIB-related protein, pBRP2, is involved in endosperm growth control. - *PLoS ONE* **6**: e17216, 2011.
- Filichkin, S.A., Priest, H.D., Givan, S.A., Shen, R., Bryant, D.W., Fox, S.E., Wong, W.K., Mockler, T.C.: Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. - *Genome Res.* **20**: 45-58, 2010.
- Fiol, D.F., Kültz, D.: Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells. - *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **102**: 927-932, 2005.
- Franco-Zorrilla, J.M., López-Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoy, M., Vera, P., Solano, R.: DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. - *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **111**: 2367-2372, 2014.
- Fu, Y., Bannach, O., Chen, H., Teune, J.H., Schmitz, A., Steger, G., Xiong, L., Barbazuk, W.B.: Alternative splicing of anciently exonized 5S rRNA regulates plant transcription factor TFIIIA. - *Genome Res.* **19**: 913-921, 2009.
- Grünberg, S., Hahn, S.: Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. - *Trends biochem. Sci.* **38**: 603-611, 2013.
- He, M., He, C.-Q., Ding, N.-Z.: Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. - *Front. Plant Sci.* **9**: 1771, 2018.
- Hernández-Campuzano, B., Van Dijk, P., Avonce, N., Iturriaga, G., Suárez, R.: [A mutant of *Arabidopsis thaliana* by T-DNA insertion is insensitive to sugars and tolerant to abiotic stress.]. - *Rev. Iberoamer. Cienc.* **1**: 89-101, 2014. [In Spanish]
- Hoang, X.L.T., Nhi, D.N.H., Thu, N.B.A., Thao, N.P., Tran, L.P.: Transcription factors and their roles in signal transduction in plants under abiotic stresses. - *Curr. Genomics* **18**: 483-497, 2017.
- Hoopes, B.C., Bowers, G.D., Di Visconte, M.J.: The two *Saccharomyces cerevisiae* SUA7 (TFIIB) transcripts differ at the 3'-end and respond differently to stress. - *Nucl. Acids. Res.* **28**: 4435-4443, 2000.
- Hori, K., Watanabe, Y.: Context analysis of termination codons in mRNA that are recognized by plant NMD. - *Plant Cell Physiol.* **7**: 1072-1078, 2007.
- Keller, M., Hu, Y., Mesihovic, A., Fragkostefanakis, S., Schleiff, E., Simm, S.: Alternative splicing in tomato pollen in response to heat stress. - *DNA Res.* **24**: 205-217, 2017.
- Knutson, B.A.: Emergence and expansion of TFIIB-like factors in the plant kingdom. - *Gene* **526**: 30-38, 2013.
- Kostrewa, D., Zeller, M.E., Armache, K.J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., Cramer, P.: RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. - *Nature* **462**: 323-330, 2009.
- Lagrange, T., Hakimi, M.A., Pontier, D., Courtois, F., Alcaraz, J.P., Grunwald, D., Lam, E., Lerbs-Mache, S.: Transcription factor IIB (TFIIB)-related protein (pBrp), a plant-specific

- member of the TFIIB-related protein family. - *Mol. cell. Biol.* **9**: 3274-3286, 2003.
- Lareau, L.F., Brooks, A.N., Soergel, D.A., Meng, Q., Brenner, S.E.: The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. - *Adv. exp. Med. Biol.* **623**: 190-211, 2007.
- Layat, E., Cotterell, S., Vaillant, I., Yukawa, Y., Tutois, S., Tourmente, S.: Transcript levels, alternative splicing and proteolytic cleavage of TFIIB control 5S rRNA accumulation during *Arabidopsis thaliana* development. - *Plant J.* **71**: 35-44, 2012.
- Lindemose, S., O'Shea, C., Jensen, K.M., Skriver, K.: Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. - *Int. J. mol. Sci.* **14**: 5842-5878, 2013.
- Liu, X., Bushnell, D.A., Wang, D., Calero, G., Kornberg, R.D.: Structure of an RNA polymerase II-TFIIB complex and the transcription initiation mechanism. - *Science* **327**: 206-209, 2010.
- Magnani, E., De Klein, N., Nam, H.-I., Kim, J.-G., Pham, K., Fiume, E., Mudgett, M.B., Rhee, S.Y.: A comprehensive analysis of micro proteins reveals their potentially widespread mechanism of transcriptional regulation. - *Plant Physiol.* **165**: 149-159, 2014.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki K.: AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. - *Biochim. biophys. Acta* **1819**: 86-96, 2012.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. - *Front. Plant Sci.* **5**: 1-7, 2014.
- Ni, J.Z., Grate, L., Donohue, J.P., Preston, C., Nobida, N., O'Brien, G., Shiue, L., Clark, T.A., Blume, J.E., Ares, M., Jr.: Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. - *Genes Dev.* **6**: 708-718, 2007.
- Niu, Q.-K., Liang, Y., Zhou, J.-J., Dou, X.-Y., Gao, S.-C., Chen, L.-Q., Zhang, X.-Q., Ye, D.: Pollen-expressed transcription factor 2 encodes a novel plant-specific TFIIB-related protein that is required for pollen germination and embryogenesis in *Arabidopsis*. - *Mol. Plants* **6**: 1091-1108, 2013.
- Nyikó, T., Kerényi, F., Szabadkai, L., Benkovics, A.H., Major, P., Sonkoly, B., Mérai, Z., Barta, E., Niemiec, E., Kufel, J., Silhavy, D.: Plant nonsense-mediated mRNA decay is controlled by different autoregulatory circuits and can be induced by an EJC-like complex. - *Nucl. Acids Res.* **41**: 6715-6728, 2013.
- Pinto, I., Wu, W.H., Na, J.G., Hampsey, M.: Characterization of *sua7* mutations defines a domain of TFIIB involved in transcription start site selection in yeast. - *J. biol. Chem.* **269**: 30569-30573, 1994.
- Qin, Z., Zhang, X., Zhang, X., Xin, W., Li, J., Hu, Y.: The *Arabidopsis* transcription factor IIB-related protein BRP4 is involved in the regulation of mitotic cell-cycle progression during male gametogenesis. - *J. exp. Bot.* **65**: 2521-2531, 2014.
- Sánchez-Ballesta, M.T., Lluch, Y., Gosalbes, M.J., Zacarias, L., Granell, A., Lafuente, M.T.: A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. - *Planta* **218**: 65-70, 2003.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J.: Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. - *Nat. Protocols* **3**: 1101-1108, 2008.
- Seo, P.J., Park, M.-J., Park, C.-M.: Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: mechanisms and functions. - *Planta* **237**: 1415-1424, 2013.
- Syed, N.H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., Brown, J.W.: Alternative splicing in plants – coming of age. - *Trends Plant Sci.* **17**: 616-623, 2012.
- Thomas, M.C., Chiang, C.M.: The general transcription machinery and general cofactors. - *Crit. Rev. Biochem. mol. Biol.* **41**: 105-178, 2006.
- Wang, Y., Zhang, W.-Z., Song, L.-F., Zou, J.-J., Su, Z., Wu, W.-H.: Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. - *Plant Physiol.* **148**: 1201-1211, 2008.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.: Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. - *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**: 781-803, 2006.
- Zhang, Y., Skolnick, J.: TM-align: a protein structure alignment algorithm based on TM-score. - *Nucl. Acids Res.* **33**: 2302-2309, 2005.
- Zhou, J.J., Liang, Y., Niu, Q.K., Chen, L.Q., Zhang, X.Q., Ye, D.: The *Arabidopsis* general transcription factor TFIIB1 (*AtTFIIB1*) is required for pollen tube growth and endosperm development. - *J. exp. Bot.* **64**: 2205-2218, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



DES de Ciencias Naturales  
Doctorado en Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos, 16 de febrero de 2024

### VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **Análisis estructural y funcional de la familia TFIIB de *Arabidopsis thaliana* durante el desarrollo y en condiciones de estrés abiótico**, que presenta el **C. José Antonio Miranda Ríos**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección del DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

#### Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ (director de tesis, CEIB UAEM)

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (CEIB UAEM)

DR. EDGAR DANTAN GONZALEZ (CEIB UAEM)

DR. MARIO RAMÍREZ YAÑEZ (CCG UNAM)

DRA. VERONICA OBREGON BARBOZA (CEIB UAEM)

DR. FERNANDO MARTINEZ MORALES (CEIB UAEM)

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO (CEIB UAEM)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO** | Fecha:2024-02-16 13:03:13 | Firmante

Uc1TRbeRzbZwTH8bhBRoRTutbX6WGaAGqbQII6G7h26Hr5oSp201O37SPM9HMdb4fbAZ9ycmD5i0milj7d7ap2j508Oh1CPB+4WTR9YWopTSk94p2zkcLCFI/yUAONJb7BKgse  
nsHlv0PhdXkPaKtgpQIWI2gg118CUSY3J+n19Pg26TqraSeLGkw3oGNeD4Rjw9fHEd8P1ZntTqmOQcelpJSW2B11XnOwfaY3Xyu70Wo0Rf6lxbAUF1UI0eueSKtLfpkprfatsKv6  
4bDklhx1cu/eB8nbu3oFyKLoQzbnkbvArhoMzBEEx64x82Ufabpev8IKQwzIIxYzX53Sv==

**EDGAR DANTAN GONZALEZ** | Fecha:2024-02-16 14:34:08 | Firmante

JbR7o3/y3YKT2P0+nYzTribU6XYUjYlc9ePKfcmRtCyWJ2RcSUEKn0laPJY1v7M4RilHzHnfzQ7TQNPWDd3KkG8JyshwUC5X5uvHK5R75RYorv6Aey80fx5EVI9rm5N8Ssq09QC  
4mj1Oxu+gH3Ju+FnYdtRbuZ6x0vDDNzYxz5WnPB5eXVPyL1U5qq1noEg3PAWwEb+eRWaoLnhxCSVV0oDODdy/bi5A4cgDjp4Vr+xJnRcVjFqoyn3C9FjrEWcLUeslwFygvSum  
UXTHt21Cmln3bVJnjSbX1AabAM7POPFGIUbCktHrwuAo3BTbENXrtn6vAlRvtiPYttVd2AA==

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ** | Fecha:2024-02-16 15:40:51 | Firmante

Vln8HcCg8VCQydn+FEgOpcsjwM/ueshzH8HFU9rc3qaj6GCRoRrKZrPfiq94LVuQuy20BWYuv9S42SIXdHC6Z/H1CaA1UQ+50++12NWSCATqtCze346iOuzbdlMBJ9SQZpSfhuv  
A9LrdIR9fE61rTfCqdVFhQrWape2PavcPRxr47OqDQ5jAXpO3xMKEONXOiqOWKI3XI3BOJ7T+AxyOaGwml256JgvXa2pjkilqpXP9sWpQr1QyQgA9CyZqXLV7w9cgijwbOFfs5  
PIEYlO13yJkC5Y0Mft/Er0GN5FLqkaT4hKy6WQnJk6fSJaHKOXVqG38ALJyIQNJ2KCA==

**VERONICA OBREGON BARBOZA** | Fecha:2024-02-16 19:40:52 | Firmante

kd4YK6PKfOdmLsvPrfVtILSED162pHSKYeWkOQz6JUBorX18A4Z0VlnBU/q4SAowiMKTaGwTc/Hx8n9dj6PpbvZfVhMoYsPfhQF27jmnOv06InPY/Eu6TLG49zCHwj9kaGzp  
WLGndzB2kIHIDR1IT8s/IFcKNT7xK3+95cbBtro2LHIMOjxJGxAWrPzSBtBy5EHxQzEJKCT+pdctm5IsV+qegUvcpNbW/SD9vpl1yY7G1uURI5uWTbCdU0Hyxp4WSdujElz1i34mgI  
TBYiszBmJqE2e2xqTT7mnYIPVtX6eL7vpfUjkkIXw+Gcy92LsfefYeb5HadyDJmve1dA==

**IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO** | Fecha:2024-02-19 08:41:48 | Firmante

lIfa2Z6t/CuoubgM7eRulyndfDdsRoVcEKkWiFUBJYmHGIZbVZxsjhBEVbdBRNUMg6+koPNlpZEo4Wq40+ZtCUuv27nMPdCTWaYM7O/RU8yke1TCovPLRWETQSO0JL5T1  
7eMH2pw8vqj8W24xVUOox3OrrjaN9CBqwn/7cRiGlxpKFeuatk/QLiQw0D77RLfXJ5uBDGJauvyHNo+08aYjVMrV70k29HR6HJCNr1uPyZvMvTs8QsrGf1jX3H4OFruHxUiyO2Ve  
1HiSyCuVLMs05drtcatCr0wwCKfEJdoX4rTXjji5FbVcVrW21Qzeewr7WbZtE4YdqtkUfA==

**MARIO RAMÍREZ YAÑEZ** | Fecha:2024-02-19 12:59:01 | Firmante

pGRX5ZrDF6h4naWeccAQxYa6KzRQTmCMiUKr2rplvjfpBmceDy/jBrSnJzzsg+V+tWe2XStfwkZILeudnuNfYzCjczvDzeqPriNMFTIFof6eNlquRf03X2SFyaXj7y0W/W6Nltxb/  
SwokRrkLS3RK+b3Uggxl4VVLMAJm1G9rPCd65AXVg9RXjsl/Ft3UBhBOCL8q1y5ldEr6heP8LP3p4kHowJYRw+xAAtGrNc6duwzDjmun+EurHul3VcJf/K9Xh6GLFrl810KpL8L  
T+ITRMrOTfOZKMOi4ggpQr+fX20zOESB6vhBh8KOU2uilQMuum2rpaZvG5bNjh9VQ==

**FERNANDO MARTINEZ MORALES** | Fecha:2024-02-19 18:09:42 | Firmante

UaTAcg2SYKTe6UY2tpPy/D1avLRKT8NHh2Jl+CtU0QA47dMU7iKEi0Luiqb859MaFHbaAjKrHkAfI8X4LoGUwjeCrlq5oRX1o/XggWfpJDY0eBdgzQUlaLSx52gk5T5nNRosY72M  
1pziQvrFmo+Bnqi/T8H6WGakcdl1AEJspvj0vA0imMP+2mXHVo4iPEis5pSzCruRPFs1Q8a1cX+2vzjZxPh212OUMpeo7koa9RN8OTwVcmk9X+ieftv6M3Jr1Tvd2x7KWAEIjWdan  
eRwKuuVaiXdwgKov+9e772WLv5jR2WY0C4cjJjCUTf/Cfmzxx77Rx+dHgvIQHvVBg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



1sAnMTupF

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0Nf0uvxwz8V29ecoWTO5xKS8K15tx4>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029