



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Función de los factores de transcripción TFIIB1, TFIIB2, BRP4 y
BRP6 en *Arabidopsis thaliana*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BIOL. Dulce Jared Jaime Gallardo

Director: Dr. Ramón Suárez Rodríguez.

Co-Director: Dr. José Augusto Ramírez Trujillo.

CUERNAVACA, MORELOS

Febrero del 2018.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de plantas del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de los doctores Ramón Suárez Rodríguez y José Augusto Ramírez Trujillo

Agradecimientos

A CONACYT por la beca (715553) que me proporcionó, porque gracias a ésto fue posible la realización de este proyecto de investigación.

Al CEIB y la UAEM por la oportunidad y el apoyo brindado durante este tiempo de formación.

Quiero Agradecer a las personas especiales sin embargo no sé por donde empezar a dar gracias a todos ellos que han hecho directa o indirectamente que este trabajo haya sido posible, no sólo a nivel personal, sino también a nivel profesional he tenido ayuda para que el sueño que tenía desde niña se haya podido cumplir. En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor y guía de ésta tesis Dr. Ramón Suárez Rodríguez, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, por transmitirme su conocimiento y por ser demasiado accesible en todo momento, siempre he tenido su apoyo e incluso la mayoría de las veces he sentido que a su lado tenía más a un amigo que a un jefe. Gracias doc es usted una gran persona y profesional

La otra persona a la que le debo esto y muchas otras cosas más y quiero dar un agradecimiento muy especial es al Dr. José Augusto Ramírez Trujillo, por su grata colaboración, por su apoyo, paciencia, dedicación y por sus valiosos consejos sobre este trabajo, además de ser un gran ser humano, profesional y amigo.

No sólo científicamente son la persona más brillante que he conocido, sino personalmente sus cualidades humanas sobrepasan con gran diferencia a las de la mayoría de la gente que me he encontrado durante parte del camino de mi vida.

También deseo agradecer a los sinodales encargados de revisar y corregir este trabajo, Dra. Susana Valencia Díaz, Dr. Luis Caspeta Guadarrama y al Dr. Edgar Dantan González, gracias doctores por brindarme de su tiempo y apoyo.

Dentro de las personas que me encontré en ese laboratorio quiero agradecer a Sari, Antonio, Sam , Tania, Julio, Yael, Jess, y Ceci por su ayuda incondicional, porque compartimos momentos complicados pero también de los mejores durante esta etapa, gracias compañeros. A la M.C. Nancy Sofía Hernández Bueno, por el apoyo técnico en el laboratorio.

En el mismo laboratorio tengo que hacer una especial mención a mi compañera y amiga a la persona con la que he compartido tantísimos buenos momentos. Gracias Sari.

Dedicatoria

A Dios por brindarme todos los medios y haber podido culminar este proyecto, ya que sin él nada podemos hacer.

A mis padre Oscar, por siempre ser un ejemplo en mi vida, porque me brinda su amor y apoyo incondicional siempre, por ser mi persona favorita. Te amo.

A mi madre Martha, por ser siempre una guía espiritual, por todo el apoyo incondicional que me da siempre. Te amo.

A mis hermanos que son los que me impulsan día con día a ser mejor persona y profesional, Dan por ser un ejemplo de persona, Uzai, Joseph, Brisa, Emiliano e Ibzán, que son grandes en todo lo que hacen y hacemos juntos, Gracias los amo.

A Silvi que siempre me apoyo en dudas y complicaciones durante esta etapa de formación. Te quiero.

A mi abuelita Martha por ser siempre un enorme apoyo durante lo que llevo de vida, por impulsarme y darme ánimos siempre. Te amo abu.

A la familia Gallardo y Jaime por su apoyo y amor.

Índice

I Introducción.....	12
I.1 Estrés en plantas.....	12
I.II Estrés abiótico.....	12-13
I.III Estrés biótico.....	14
II.- Mecanismos de respuesta y tolerancia al estrés en plantas.....	15-18
III.- <i>Arabidopsis thaliana</i> , una planta modelo.....	19
IV. Antecedentes.....	21
V. El factor TFIIB en plantas.....	22-26
VI. Justificación.....	27
VII. Hipótesis.....	28
VIII. Objetivo general.....	28
IX Objetivos particulares.....	28
X Metodología.....	29
X.1 Material vegetal.....	30
X.2 Esterilización y siembra de semillas.....	30
X.3 Crecimiento de <i>Arabidopsis</i> en sustrato.....	30
X.4 Diseño de oligonucleótidos.....	31
X.5 Extracción de ADN de <i>A. thaliana</i> y amplificación de los promotores de los genes AtTFIIB1, AtTFIIB2, AtBRP4, AtBRP6.....	32
X.6 Clonación en el vector pTZ57R/T.....	32
X.8 Manejo del ADN plasmídico y transformación de células competentes.....	34
X.9 Transformación de células de <i>E. coli</i>	34
X.10 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34

X.11 Análisis del transcriptoma de las líneas mutantes TFIIB1 y TFIIB2 en <i>A. thaliana</i> mediante Microarreglos.....	34-35
X.12 Pruebas de germinación en la línea mutante TFIIB2 en condiciones de estrés y en condiciones normales.....	35
X.13 Cuantificación de clorofila.....	36
X.14 Cuantificación de biomasa.	36
X.15 Determinación histoquímica de la actividad de la Betaglucoronidasa (β -GUS).....	36-37
XI.- Resultados.....	38
XI.1 Análisis de las regiones promotoras de los miembros de la familia TFIIB.....	39
XI.2 Amplificación por PCR de las regiones promotoras de los factores BRP4 y BRP6.....	40
XI.3 Clonación en el vector pBI101.1 de la construcción pTZBRP6.....	41
XI.4 Transformación de la construcción BRP6GUS en <i>Agrobacterium</i>	41
XI.5 Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con la construcción BRP6GUS.....	42
XI.6 Clonación de la región promotora BRP4 en pTZ57R/T.....	44
XI.7 Clonación en el vector pBI101.1.	44
XI.9 Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con la construcción BRP4GUS.	45
XI.10 Obtención de líneas en estado homocigo de las mutantes por inserción de T-DNA de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46-47
XII.1 Corroboración de la interrupción del gen TFIIB2 en las líneas mutantes TFIIB2, mediante PCR.....	47
XII.2 Medición de diferentes parámetros en la línea mutante TFIIB2 (MIII) en plantas adultas bajo condiciones de estrés salino y control.....	49-50
XII.2 Evaluación de los parámetros fisiológicos bajo condiciones de estrés.....	50
XII.2.1 Cuantificación de clorofila.....	51
XII.2.2 Prueba de peroxidación de lípidos (Contenido de MDA).....	52

XII.2.3 Cuantificación de biomasa.....	53
XII.3 Medición de diferentes parámetros en la línea mutante BRP4 en plantas adultas bajo condiciones de estrés salino y control.....	54
XII.3.1 Validación molecular de la línea mutante BRP4.....	54
XII.3.2 Cuantificación de clorofila.....	55
XII.3.3 Peroxidación de lípidos (Contenido de MDA).....	56
XII.3.4 Cuantificación de biomasa.....	57
XIII.- Análisis transcriptómico de las líneas mutantes TFIIB1 y TFIIB2.....	58
XIII.I Análisis mediante RT-PCR de los genes sobreexpresados y reprimidos de las mutantes en TFIIB1 y TFIIB1.....	59
XIII.2 Análisis de expresión del promotor BRP6 y BRP4 con el gen reportero de <i>GUS</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	61-62
XIV Discusión.....	63-65
XV Conclusiones.....	66
XVI Perspectivas.....	67
XVII Bibliografía.....	68-72
XVIII Anexo I.....	72-80
XVIII.I Anexo II.....	81-87
XVIII.I.2 Anexo III.....	88-89

Índice de figuras

Figura 1 Mecanismos de respuesta y tolerancia al estrés en plantas.....	16
Figura 2 Diferentes órganos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
Figura 3 Esquema representativo de los cromosomas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
Figura 4 Formación del complejo de transcripción.....	21
Figura 5 Estructura de la proteína TFIIB.....	22
Figura 6.- Estrategia experimental.....	29
Figura 7 Esquema del vector de clonación pTZ57R/T.....	32
Figura 8 Esquema del vector de expresión pBI101.1.....	33
Figura 9 Esquemas de las Inserciones de T-DNA en las diferentes líneas mutantes.....	38
Figura 10 Amplificación de los promotores mediante PCR.....	40
Figura 11 Clonación del promotor BRP6 en el vector pTZ57R/T.....	40
Figura 12 Clonación del promotor BRP6 en el vector pBI101.1.....	41
Figura 13 Amplificación por PCR del promotor de BRP6 y el análisis de restricción en <i>A. tumefaciens</i> y <i>E. coli</i> de la construcción BRP6GUS.....	41-42
Figura 14 Líneas homocigas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con BRP6GUS.....	43
Figura 15 Clonación de la región promotora BRP4 en el vector pTZ57R/T.....	44
Figura 16 Clonación del promotor del gen BRP4 en el vector de expresión pBI101.1.....	44
Figura 17 Amplificación por PCR.....	45
Figura 18 Líneas homocigas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con BRP4GUS.....	46
Figura 19 Análisis de las líneas homocigas mediante la técnica de PCR en las mutantes de TFIIB2.....	47
Figura 20 Amplificación del gen TFIIB2 mediante PCR.....	48
Figura 21 Valor de germinación.....	49
Figura 22 Cuantificación de clorofila.	51
Figura 23 Cuantificación de MDA (malondialdehído) a los 34 días de crecimiento.....	52
Figura 24 Producción de biomasa en la línea mutante MIII y la línea silvestre Wt.....	53
Figura 25 Amplificación del gen <i>NPTII</i>	54
Figura 26 Cuantificación de clorofila en la línea BRP4.....	55

Figura 27 Cuantificación de MDA (malondialdehído) en la línea BRP4.....	56
Figura 28 Cuantificación de biomasa en la línea mutante BRP4 y la línea silvestre.....	57
Figura 29 Análisis de transcriptoma de las mutantes de <i>A. thaliana</i> en el factor TFIIB.....	58
Figura 30 Análisis de transcriptoma de las mutantes de <i>A. thaliana</i> en el factor TFIIB.....	59
Figura 31 Panorama general de los genes implicados en la respuesta al estrés biótico y abiótico derivados del transcriptoma de la línea mutante.....	59
Figura 32 RT-PCR de los genes sobreexpresados y reprimidos para la mutante TFIIB1 y TFIIB2.	60
Figura 33 Localización de GUS en tejidos vegetativos y reproductivos en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
Figura 34 Localización de GUS en tejidos vegetativos y reproductivos en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	62

Índice de tablas

Tabla 1 Mutantes de la familia génica TFIIB de <i>Arabidopsis thaliana</i> disponibles en el LFMP.	25
Tabla 2 Localización de la inserción de T-DNA en las mutantes de <i>Arabidopsis</i>	30
Tabla 3 Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones promotoras.....	31
Tabla 4 Elementos en <i>cis</i> de respuesta a diferentes tipos de estrés en los promotores de la familia génica TFIIB.....	39
Tabla 5 Genes que tuvieron un cambio de expresión ≤ 1 y ≥ 1 en la línea mutante en TFIIB2 (MIII).....	72-80
Tabla 6 Genes que tuvieron un cambio de expresión ≤ 1 y ≥ 1 en la línea mutante en TFIIB1 (M698C).....	81-87
Tabla 7 Genes que tuvieron un cambio de expresión ≤ 2 y ≥ 2 en la línea mutante en TFIIB2 (MIII) y TFIIB1 (M698C).....	88-89

Abreviaturas:

ROS	Reactive Oxygen Species
ERO's	Especies Reactivas de Oxígeno
GA	Giberelinas
CK	Citoquininas
ABA	Ácido abscísico
ET	Etileno
SA	Ácido Salicílico
JA	Ácido Jasmónico
HPS	“Heat Shock Proteins”
LEA's	“Late Embryogenesis Abundant proteins”
FT	Factores de transcripción
PIC	Complejo de pre-iniciación
GTF's	“General transcription factors”
GUS	β-Glucoronidasa
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
APX	Ascorbato peroxidasa
MDA	Malondialdehído
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana.</i>

RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles, que para un crecimiento óptimo requieren de ciertos factores ambientales; sin embargo, cualquier variación de estos factores ambientales los cuales pueden ser clasificados como bióticos y abióticos, afectan el crecimiento, desarrollo y productividad en las plantas. Es por ello que las plantas han desarrollado mecanismos de respuesta que les permita tolerar el estrés, entre las cuales se encuentran, los factores de transcripción los cuales se caracterizan por ser proteínas reguladoras que modulan la expresión; activando o reprimiendo la expresión de genes específicos mediante la unión con sus secuencias promotoras de los genes para contender a el estrés. TFIIB es un factor de transcripción (TF) esencial para el ensamblaje del complejo de pre-iniciación (PIC) en el proceso de la transcripción. Además, se ha demostrado que este factor general de transcripción está involucrado en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, por ejemplo; frutos de *Citrus clementina* en la cual los productores para darle una mayor vida en el anaquel, aplican un choque térmico a 37°C para posteriormente almacenarlas a 4°C, lo que evita la necrosis en los frutos y prolonga su vida en almacenamiento. Se llevó a cabo un análisis de expresión donde se observó que TFIIB se encuentra sobreexpresado bajo estas condiciones lo que sugiere que puede estar involucrado en la respuesta a condiciones adversas en las plantas. En este trabajo se analizó el perfil transcripcional de las líneas mutantes TFIIB1 y TFIIB2, crecidas en condiciones normales. Los resultados mostraron que la mutación en TFIIB1 y TFIIB2 causa la reprogramación del transcriptoma: genes que se encuentran sobreexpresados y reprimidos. También se analizaron las líneas mutantes TFIIB1 (MIII) y BRP4 bajo estrés abiótico (salino y osmótico) en las cuales se determinaron parámetros fisiológicos como la cantidad de clorofila, cuantificación de biomasa y el grado de peroxidación de lípidos con lo cual se demostró que las líneas mutantes son más susceptibles a estrés salino y osmótico respecto a la silvestre.

I. INTRODUCCIÓN:

I.I Estrés en plantas.

Para un crecimiento óptimo en las plantas son requeridos ciertos factores ambientales, sin embargo, cualquier exceso o déficit en el medio físico o químico; provoca deterioros en el crecimiento, desarrollo y productividad en las plantas; lo que se conoce como estrés. Este estrés puede ser inducido por diversos factores naturales y antropogénicos, los cuales pueden causar daños crónicos sobre las plantas que eventualmente conducen a la muerte celular (Atkinson y Urwin., 2012). El estrés se clasifica en abiótico originado a partir de condiciones físicas, químicas y energéticas fuera de lo óptimo y biótico el cual es ocasionado por la interacción con otros organismos vivos (plantas, insectos, bacterias, hongos, virus, nematodos) (Jones *et al.*, 2013)

I.II Estrés abiótico.

El estrés abiótico desencadena una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares en las plantas (Bhatnagar *et al.*, 2008 Koyro *et al.*, 2012), que limitan la productividad de los cultivos. A nivel mundial, aproximadamente el 22% de las tierras agrícolas están afectadas por la salinidad y 45% experimentan sequía (FAO 2004, Koyro *et al.*, 2012).

A escala mundial, la producción de cultivos está limitada por la sequía más que por cualquier otro estrés ambiental; por lo que este déficit hídrico afecta la morfología, fisiología y metabolismo en las plantas. El cierre de estomas es una de las principales respuestas de la planta, ligado con el reducido potencial hídrico y la pérdida de turgencia: lo que afecta a su vez su contenido relativo de agua en la planta. A su vez se disminuye la síntesis de proteínas, la velocidad de crecimiento, el aumento de cera en la cubierta de las hojas, cambios en la transpiración, en la respiración, en la fotosíntesis, en la distribución de nutrientes, las hojas cambian su ángulo de inclinación, se enrollan o se recambian e incrementa la relación del peso entre la raíz y la parte aérea (la raíz mantiene su velocidad de crecimiento, en tanto que la parte aérea la disminuye) (Osakabe *et al.*, 2014, Grant., 2012). Lo anterior es una respuesta adaptativa, de tal forma que aquellas especies que se han seleccionado en ambientes limitantes en agua inducen estas respuestas rápidamente y,

por tanto, disminuyen su velocidad de crecimiento, su transpiración, su eficiencia fotosintética; reorganizan la distribución de sus nutrientes (Robles *et al.*, 2007).

Respecto a la salinidad la mala calidad del agua de riego, drenaje inadecuado, inundación de las tierras costeras con agua salda y la acumulación de sal en las áreas secas. En plantas la salinidad inhibe la germinación de las semillas, reduce su capacidad de absorción de agua lo que esto conduce a la reducción de la tasa de crecimiento referido como el efecto osmótico. Las plantas expuestas a suelos salinos acumulan concentraciones tóxicas de Na^+ en las hojas, lo que reduce la longevidad de los tejidos fotosintéticos. Uno de los posibles mecanismos de toxicidad del Na^+ es el hecho de estar directamente involucrado con la interferencia en los transportadores celulares de K^+ , un macronutriente esencial, debido a que provoca un desequilibrio en el intercambio iónico (Na^+ / K^+), ya que para las reacciones metabólicas; las células de las plantas necesitan mantener un alto nivel de K^+ y bajos niveles de Na^+ (Karan y Subudhi, 2012, Ueda *et al.*, 2016).

Los cambios de temperatura en el ambiente ocasionan una variedad de disrupciones fisiológicas en la germinación de semillas y en el desarrollo de flores entre otras. A demás se modifica el metabolismo celular al ser afectadas las reacciones enzimáticas, la velocidad a la que las sustancias se mueven dentro de las células y la fluidez de las membranas; lo que provoca variación en el transporte de agua. Sin embargo, el principal efecto causado por este tipo de estrés en las plantas principalmente se ve reflejado en las funciones fotosintéticas (Vijayakumar *et al.*, 2016).

Todas estas gamas de factores bióticos y abióticos que enfrentan las plantas inducen algún tipo de estrés. Las células de las plantas producen especies reactivas de oxígeno (ROS) bajo condiciones normales, debido a que mantiene un balance entre la producción de (ROS) y el mecanismo de defensa anti-oxidante bajo condiciones normales; además desempeñan un papel importante en la señalización. Cuando se produce un exceso de radicales libres de oxígeno químicamente activos se induce un estrés oxidativo en la planta (Wang *et al.*, 2016)

I.III Estrés biótico.

Existen organismos vivos que son enemigos potenciales en la naturaleza: microorganismos, insectos, nematodos e inclusive otras plantas; sin embargo; puede haber una interacción de plantas con algún microorganismo la cual puede ser de manera benéfica o perjudicial (Moënné-Loccoz, 2015).

Los microorganismos que establecen una interacción perjudicial con la planta son considerados patógenos; los patógenos biotróficos son aquellos que extraen los nutrientes de una planta viva, mientras que los patógenos necrotrofos inducen la muerte celular en el hospedero u hospedante para acceder a los nutrientes descompuestos. La mayoría de los patógenos entran en la célula huésped, mientras que otros como *Blumeria* y *Hemelia* permanecen en el exterior y crecen en estructuras externas para la absorción de nutrientes dentro del huésped.

Durante la infección, la integridad de la pared celular externa es dañada por heridas mecánicas cuando los patógenos entran en la célula, ejemplos de ello son la punción por estilete de los pulgones, la digestión enzimática o la invasión de la pared celular. Una vez que se establece la infección, los patógenos pueden manipular al hospedador para liberar agua y los nutrientes necesarios para la proliferación del patógeno, que conduce a la deficiencia de nutrientes y agua en las células hospedadora. La infección con patógenos, también tiene un impacto significativo en la composición de hidratos de carbono en las partes infectadas de la planta, todo esto ocasiona efectos negativos sobre la planta infectada por alguno de estos patógenos (Abramowitch y Martin, 2004; Laluk y Mengiste, 2010; Cao *et al.*, 2011).

Las plantas son organismos sésiles, lo cual las limita al lugar donde crecen y esto provoca que frecuentemente estén expuestas a una amplia gama de estrés (Verma *et al.*, 2016). Sin embargo, para sobrevivir ante tales condiciones, las plantas utilizan diferentes mecanismos para responder y adaptarse a los factores ambientales cambiantes. Esto explica por qué el concepto de estrés está íntimamente asociado con las condiciones externas que afectan negativamente el crecimiento, desarrollo o la productividad de las plantas, esto lo llevan a cabo mediante la inducción de una respuesta como la alteración del metabolismo, crecimiento y desarrollo (Moreno, 2009).

II. Mecanismos de respuesta y tolerancia al estrés en plantas.

Las vías de señalización desempeñan un papel indispensable al actuar como una conexión entre la detección del estrés y la generación de una respuesta fisiológica y bioquímica apropiada. Como parte de la respuesta de las plantas es la regulación de la expresión génica que implica cambios generales y únicos en los niveles de transcripción de ciertos genes (Verma *et al.*, 2012).

La vía de transducción de señales que se generan en la percepción de estímulos estresantes inicia con la percepción de la señal por receptores que se encuentran presentes en la superficie celular, desencadenando una red de señales que atraviesa el citoplasma de la célula hasta llegar a la maquinaria transcripcional situada en el núcleo, esta señal esta modulada por una gran cantidad de mecanismos, en donde además participan un sinnúmero de moléculas capaces de amplificar la señal inicial por ejemplo; segundos mensajeros como el calcio Ca^{2+} , especies reactivas de oxígeno (ROS) y algunas fitohormonas estas vías de señalización están interconectadas para facilitar la generación de una eficaz respuesta al estrés (Verma *et al.*, 2016) (Figura 1).

Las respuestas de las plantas a diferentes tensiones son muy complejas e implican cambios a nivel molecular y celular. El control de la expresión génica se encuentra regulada de diversas formas, con la finalidad de contender contra diversas condiciones desfavorables que se conoce como estrés, esto mediante la expresión de factores de transcripción, síntesis de proteínas y metabolitos, los cuales generan en las plantas tolerancia hacia condiciones adversas desfavorables (Ye *et al.*, 2016).

Existe una gran variedad de fitohormonas producidas por plantas que disminuyen la tensión provocada por el estrés, dentro de éstas podemos mencionar las auxinas, giberelinas (GA), citoquininas (CK), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido salicílico (SA), jasmonato (JA) de los cuales se sabe que ABA, SA, JA y ET están involucrados en los mecanismos de defensa frente a patógenos y estrés abiótico, además de que estas fitohormonas pueden actuar en conjunto para responder a los diferentes tipos de estrés en plantas. (Cominelli *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2011).

Otra categoría de genes y proteínas son aquellos que modifican a enzimas o a otras proteínas, como las cinasas o fosfatasa que fosforilan o defosforilan específicamente a factores de transcripción, los cuales regulan los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés en plantas (Hong *et al.*, 2016).

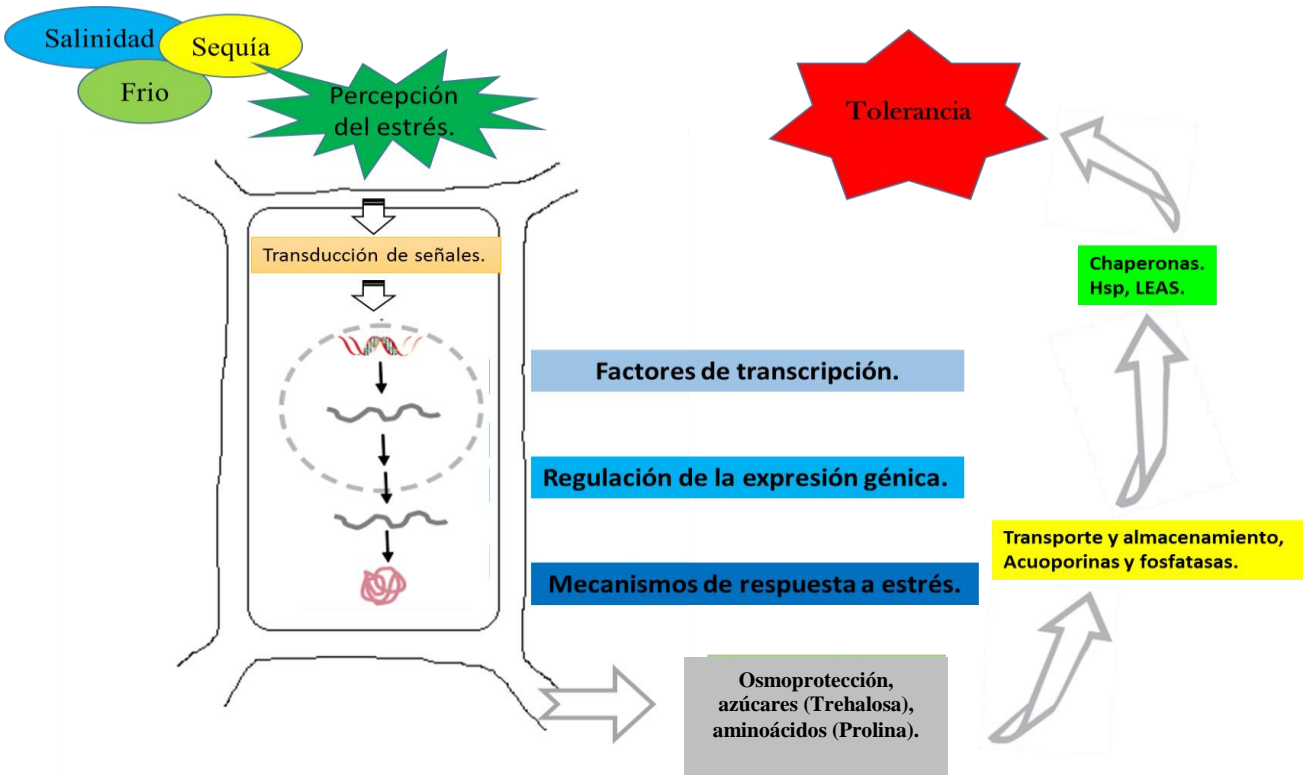


Figura 1.- Mecanismos de respuesta y tolerancia al estrés en plantas. Ilustración esquemática de los mecanismos que poseen las plantas los cuales les permiten captar las señales del medio externo, y regulan rápidamente su fisiología y metabolismo.

La mayor contribución al conocimiento de estas vías de respuesta, se refiere a la identificación de factores transcripcionales encontrados en el penúltimo paso de la cascada de señalización. A partir de un análisis bioinformático realizado en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, se predijeron entre 1,500 y 2,000 factores de transcripción (FT) (Capella *et al.*, 2014).

Los factores de transcripción se caracterizan por ser proteínas reguladoras que modulan la expresión; activando o reprimiendo la expresión de genes específicos mediante la unión con sus secuencias promotoras de los genes para contender a el estrés. Las principales familias de estos factores de transcripción son: (bZIP) zipper de leucina básico, WRKY, APETALA2/factor de respuesta a etileno (AP2/ERF), NAC (NAM/ATF1/CUC2), MYB, dedos de zinc (ZF), estos factores de transcripción desempeñan un papel importantes en las planta sin embargo, sólo algunas familias de factores de transcripción (FT) se han caracterizado fuera de los sistemas de plantas modelos bien estudiados, como *Oryza sativa* (arroz) y *Arabidopsis* (Shu *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2016).

Cabe resaltar que las vías o cascadas de señalización determinan la activación o represión no de un solo gen, sino de grupos de genes; asimismo, un solo tipo de factor transcripcional es capaz de activar la expresión de más de un gen. Por tanto, las vías de transducción de señales ejercen un efecto amplificador ante una señal o estímulo en particular (Robles., 2007). Además, existen también múltiples interacciones proteína-proteína y proteína-DNA que frecuentemente determinan el nivel de transcrito (activación/represión) de un promotor bajo ciertas condiciones ambientales (Bartels y Sunkar., 2005). Una gran familia de factores de transcripción específicos en plantas es: NAM, ATAF y CUC (NAC) los cuales se caracterizan por tener regiones conservadas conocidas como dominio NAC, otro dominio de unión al DNA en el N-terminal y finalmente un dominio C- terminal que está implicado en la determinación de sus genes específicos que generalmente regulan la activación a nivel transcripcional (Singh *et al* 2016).

Los factores de transcripción NAC están involucrados en varios procesos de desarrollo desde el meristemo apical hasta la señalización de auxinas, sin embargo, se ha encontrado su participación en la señalización en estrés abiótico y biótico en plantas. Un estudio realizado mediante el análisis del perfil transcriptómico, reveló que al menos el 33% de los genes que codifican para factores de transcripción tipo NAC de *Arabidopsis* están involucrados en respuesta al estrés abiótico. Del mismo modo, también se encontró que una gran parte de la familia de los factores de transcripción NAC en arroz, exhibió la sobreexpresión en los patrones de expresión bajo estrés bióticos y abióticos (Hong *et al.*, 2016, Singh *et al* 2016).

La familia de los AP2 / ERF factores de transcripción responden a etileno y se caracterizan por tener un dominio de unión a DNA que interactúan directamente con secuencias promotoras de genes blanco, como la caja GCC y/o DRE/CRT, además de que regulan gran número de procesos biológicos de las plantas, como su crecimiento, desarrollo y actúan en respuesta a diversos tipos de estrés. Algunos de los miembros de esta familia regulan el desarrollo reproductivo en *Arabidopsis*, incluyendo la flor, el óvulo, y el desarrollo del sépalo (Xu *et al* 2008, Shu *et al.*, 2016).

En el caso de los factores de transcripción MYB (myeloblastosis) se encuentran altamente distribuidos en todos los organismos eucariontes y constituyen una gran familia de factores de transcripción en plantas, estas proteínas MYB se caracterizan por estar involucradas en la regulación del ciclo celular en las plantas; además de estar altamente conservadas con un dominio de unión a DNA localizado en la región N-terminal de la proteína (He *et al.*, 2016). Sin embargo, en la mayoría de las plantas las proteínas MYB pertenecen a la subfamilia de R2R3-MYB y desempeñan un papel central en el control de procesos específicos, incluyendo el metabolismo primario y secundario, además de estar involucradas en respuesta al estrés biótico y abiótico. La expresión de diversos genes *MYB* está regulada por la sequía, un ejemplo de ello es en arroz; en donde el 65% de proteínas *MYB* en esta especie fueron regulados diferencialmente en condiciones de sequía (Baldoni *et al.*, 2015).

Otra familia de factores de transcripción son las proteínas WRKY, las cuales se caracterizan por tener una región de 60 aminoácidos con una secuencia conservada WRKYGQK de aminoácidos en su extremo N-terminal, y un C-C-H-H/C dedo de zinc en su C-terminal, en comparación con otras familias de factores de transcripción (FT) en plantas, las proteínas WRKY pueden desempeñar un papel clave en la regulación en estrés biótico.

Hasta el momento se sabe que 49 de 72 genes WRKY examinados en *Arabidopsis*, inducen su expresión ante condiciones de estrés biótico (infección bacteriana) y estrés abiótico (ácido salicílico). Estas familias de factores de transcripción también desempeñan funciones vitales en la señalización por fitohormonas (Guan-Hua *et al.*, 2016, Singh *et al.*, 2015, Satapathy *et al.*, 2018).

III. *Arabidopsis thaliana*, una planta modelo.

Las cascadas de señalización en sistemas biológicos, requieren una modulación continua que necesitan señales precisas a través de toda la vía de señalización, debido a toda esta complejidad ha sido necesario contar con un sistema modelo genético y molecular, como lo es *Arabidopsis* (Koiwa *et al.*, 2006).

Arabidopsis es utilizada como modelo, debido a que posee un tamaño relativamente pequeño de 10 a 20cm, lo cual facilita su manejo, conservación y cultivo en laboratorios experimentales, cada planta puede producir de 10,000 a 40, 000 semillas, tiene un tiempo de generación corto de seis semanas, se autofertiliza, la planta la conforman; la raíz, las hojas de la roseta, las hojas caulinas, el escapo, las silicuas y las flores (Figura 2).

Así que se ha empleado de manera extensiva para estudios genómicos, en buena medida, porque resulta ser un organismo ideal que presenta además un ciclo de vida corto en comparación con cultivos tales como el maíz, frijol, arroz, etc., lo que ha permitido realizar estudios detallados de la respuesta de miles de genes a condiciones ambientales específicas y de la forma en que estos se encuentran involucrados en los procesos de transcripción y regulación de señales, dando luz respecto a ciertos mecanismos implicados en la forma en que las plantas se expresan ante condiciones ambientales adversas (Bruce *et al.*, 2002).

A. thaliana fue la primera especie de planta cuyo genoma fue completamente secuenciado en el año 2000 (*The Arabidopsis Initiative*, 2000) y se encuentra organizado en cinco cromosomas (Figura 3), siendo su tamaño de 125 Mb (125,000,000 pb), (Pierce., 2009), el cual codifica para aproximadamente 30,000 genes.

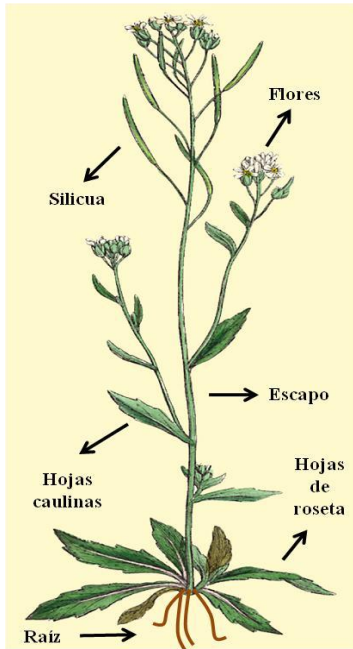


Figura 2.- Diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.

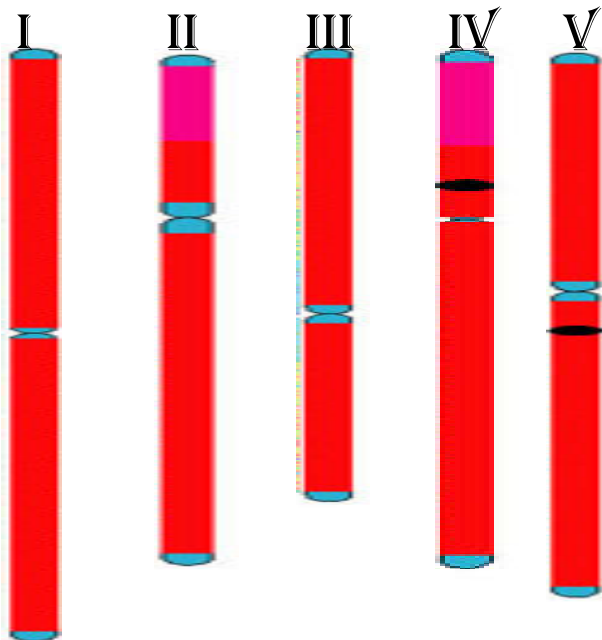


Figura 3.- Esquema representativo de los cromosomas de *Arabidopsis thaliana*. (Tomado de “the *Arabidopsis* genome initiative 2000”).

IV. ANTECEDENTES

Existe un grupo de proteínas conocidas como factores generales de la transcripción que son necesarios para una transcripción basal actuando en conjunto con la RNA polimerasa II, para formar el complejo denominado, complejo de pre-iniciación (PIC) (Zhou *et al.*, 2013). Dentro de estos factores se encuentra TFIID el cual participa en el reconocimiento del promotor en los genes y está conformado de TBP (proteína de unión a TATA) en un complejo de diez factores asociados (TAF's) a TBP, TFIIA estabiliza el complejo de TFIID al promotor, pero, no es necesario para el complejo de pre-iniciación (Deng y Roberts., 2007).

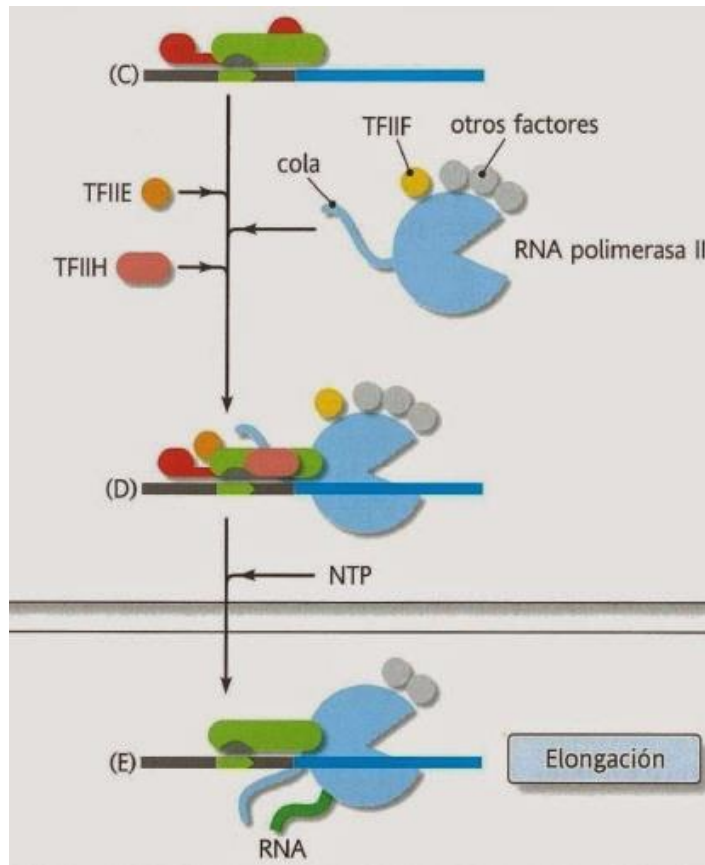


Figura 4.- Formación del complejo de transcripción. Los factores de transcripción generales junto con las demás proteínas se unen al promotor del gen, estos factores son necesarios para que la RNA polimerasa II se fije al promotor y comience la transcripción del gen.

TFIIB es uno de los factores que desempeña una función importante en la selección del sitio de inicio de la transcripción, la formación del complejo de pre-inicio en los promotores de genes, dependientes de la RNA polimerasa II e involucrado en la activación de la expresión génica (Knutson y Hahn., 2013, Deng y Robles., 2007),

TFIIF es otro factor que interactúa con TFIIB, TFIIE y TFIIH interaccionan con los demás factores generales de la transcripción (GTF's), finalmente con el ensamblaje de estos factores forman lo que se conoce como complejo de pre-iniciación (PIC) (Figura 4), necesario para que se lleve a cabo la transcripción de los RNA mensajeros (Liang *et al.*, 2013).

V. El factor TFIIB en plantas

TFIIB es una proteína (Figura 5) que se encuentra altamente conservada en los organismos eucariontes conformado por una cadena que contiene motivos que forman un dominio *zinc ribbon* en el N- terminal que interactúa con la polimerasa II y se une a la caja TATA (TBP-

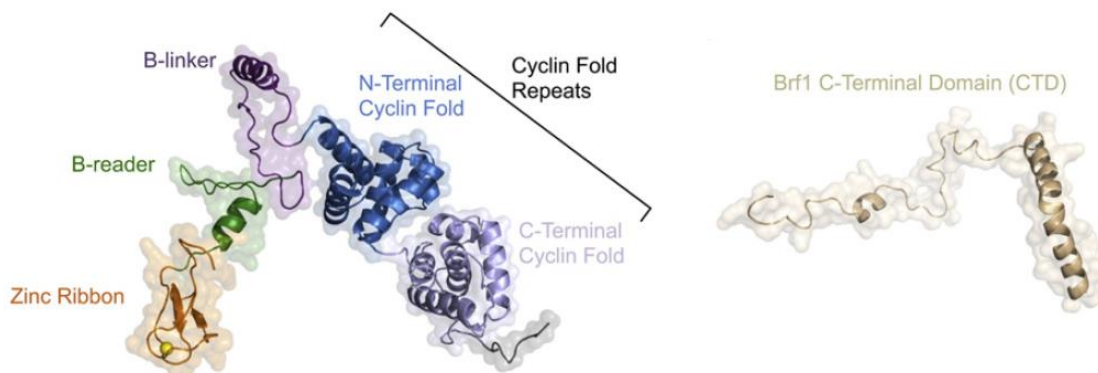


Figura 5.- Estructura de la proteína TFIIB. Visualización de los diferentes dominios de la proteína del factor de transcripción TFIIB. Hahn y Roberts 2013, Deng y proteína de unión a la caja TATA), en la región C- terminal contiene dos dominios tipo ciclina, que estabilizan la unión al DNA, TBP y las secuencias BRE las cuales son elementos en *cis* que flanquean la caja TATA (Figura 4) (Kostrewa, *et al.*, 2009).

El factor TFIIB es un factor universal, requerido para el inicio de la transcripción en eucariotas y arqueobacterias. Hasta hace algunos años, se habían descrito ocho difentes proteínas como TFIIB: dos factores de transcripción (TFIIB1 y TFIIB2), tres factores relacionados a TFIIB (Brf), una proteína Rrn7/TAF1b y dos proteínas específicas de la planta relacionadas con TFIIB (Brp) en *A. thaliana* (Cavel *et al.*, 2011). Sin embargo, en el 2013 Knutson reporta para *A. thaliana* 14 proteínas relacionadas con TFIIB (dos AtTFIB's, cuatro AtBrf1, dos AtRrn7, un AtBrp1, AtBrp2, AtBrp3, AtBrp4, AtBrp5, AtBrp6) nombrándola como una familia de proteínas de TFIIB, las cuales conservan tres dominios comenzando con un dominio zinc ribbon, un dominio linker y dos repeticiones de ciclinas. (Cavel y colaboradores, 2011), reportan la identificación de una de las proteínas relacionadas con TFIIB en plantas (pBPR1), implicada en la transcripción mediada por la RNA polimerasa I en células vegetales, además de que su expresión se encontró en órganos reproductivos y semillas secas. También se demostró que BRP2 está involucrado en la proliferación del endospermo (Imakura *et al.*, 2008).

Zhou y colaboradores en el 2013, en este trabajo se reporta que el gen *TFIIB1* es similar a *TFIIB2* y TFIIB3/ BRP2 de *A. thaliana*, esto se comprobó mediante una comparación en las secuencias de los diferentes genes. También se llevó a cabo la caracterización en una mutante por inserción de T-DNA en el gen *TFIIB1* de *A. thaliana* dando como resultado un drástico retardo en el crecimiento del tubo polínico y desarrollo del endospermo, sin embargo en un análisis de complementariedad de la mutante se demostró que la expresión de TFIIB2 impulsada por el promotor TFIIB1 podría restablecer por completo el crecimiento, orientación y recepción del tubo polínico defectuosos, sin embargo solo recuperó parcialmente el desarrollo de la semilla en TFIIB1, mientras que la expresión de TFIIB3 / BRP2 impulsada por el promotor TFIIB1 podría rescatar solo las semillas defectuosas . Estos resultados sugirieron que TFIIB1 desempeña un papel importante en el crecimiento, orientación y recepción del tubo polínico, así como en el desarrollo del endospermo, y es funcionalmente diferente de TFIIB2 y TFIIB3 / BRP2. (Zhou *et al* 2013).

Qin y colaboradores (2014), reportaron que la proteína BRP4 de *Arabidopsis thaliana* otro de los miembros pertenecientes a la familia de las proteínas relacionadas a TFIIB, está involucrada en la regulación del ciclo celular mitótico y la progresión durante la gametogénesis. Sin embargo, a pesar de que TFIIB es un factor general de la transcripción, también se ha demostrado su expresión bajo condiciones de estrés. Por ejemplo, estudios realizados en tilapia (*Oreochromis mossambicus*), TFIIB se expresa durante un estrés hiperosmótico (Fiol y Kultz., 2005). Kultz en 1999, propone que TFIIB puede ser requerido para compensar el compactamiento de la cromatina y el decremento de la eficiencia de la transcripción durante el estrés osmótico. Un estudio realizado en mandarina (*Citrus clementina*), en donde los agricultores inducen un choque térmico de 37°C a 4°C con la finalidad de alargar la vida de los mismos en el anaquel se demostró mediante una análisis de expresión que uno de los genes que se encuentra altamente expresado es *TFIIB* (Sanches-Ballesta *et al.*, 2003).

En la Universidad de Lovaina, Bélgica el Dr. Johan Thevelein aisló 15 mutantes por inserción de T-DNA de la planta *A. thaliana* ecotipo Columbia 0, como insensibles al disacárido trehalosa, denominadas *Tin1-Tin15* y proporcionadas para su posterior análisis y caracterización en el laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación en Biotecnología (LFMP-CeIB). Mediante la técnica TAIL-PCR se logró determinar el sitio de inserción del T-DNA y la identidad de los genes mutados. En este grupo de mutantes, se logró determinar que la línea *tin14* poseía la inserción del T-DNA cercana al locus del factor *AtBRP3* perteneciente a la familia TFIIB (Hernández *et al.*, 2014). Con esta información y mediante un análisis bioinformático realizado en el genoma de *A. thaliana*, se determinó que existen al menos dos genes TFIIB y proteínas auxiliares y relacionadas al mismo. Posterior a esto, nos dimos a la tarea de documentarnos con el objetivo de determinar si estaban disponibles mutantes por inserción de T-DNA de *Arabidopsis*; en el banco de semillas (SIGnal-Salk Institute Genomic). Las líneas mutantes disponibles previas al inicio de este trabajo, fueron adquiridas por el LFMP-CeIB. (Tabla 1).

Tabla 1.- Mutantes de la familia génica TFIIB de <i>Arabidopsis thaliana</i> disponibles en el LFMP.		
ID	Gen mutado	Código de la mutante por T-DNA.
At2g41630	TFIIB1	Salk_084698 Salk_100740c
At3g10330	TFIIB2	Salk_086510 Salk_0691560
At3g57370	BRP4	Salk_008549
At5g29380	BRP6	Salk_055342c

Se analizó el fenotipo de dos las líneas mutantes por inserción de T-DNA en *A. thaliana*, correspondientes a TFIIB1 Salk_084698 (Mutante por inserción en la región codificante) y Salk_100740c (Mutante por inserción en la región promotora), se comparó el fenotipo de las mutantes con la planta silvestre, en condiciones de estrés salino (NaCl) y estrés osmótico (Sorbitol). Los resultados de la evaluación del fenotipo en las líneas mutantes, nos mostraron una mayor susceptibilidad bajo condiciones de estrés abiótico, en la cuantificación de la biomasa; las mutantes presentaron menor peso fresco y seco en ambas condiciones, en la evaluación de la eficiencia fotosintética; había mayor daño en las mutantes y finalmente en el perfil transcriptómico; los genes involucrados en la fotosíntesis, estrés abiótico y metabolismo de lípidos, sufrieron un cambio de expresión, es decir, que algunos de los genes se encontraban sobreexpresados y otros reprimidos esto

probablemente como consecuencia de la inserción de T-DNA el cual tiene un tamaño de 4929pb proveniente del vector pROK2 insertado en la región promotora del gen TFIIB1, lo cual podría estar impidiendo la expresión del factor al estar interrumpiendo la unión de la polimerasa al promotor, la represión del factor fue vista en el perfil transcriptómico de la mutante en TFIIB1, por lo que esta baja expresión podría estar afectando a los genes regulados por TFIIB1 frente a condiciones de estrés abiótico (Jaime-Gallardo, 2015).

Posteriormente se evaluó la expresión de diferentes miembros de la familia TFIIB (*BRP1*, *BRP2*, *BRP3*, *BRP4* y *TFIIB1*) bajo condiciones de estrés abiótico mediante RT-PCR, además del análisis de expresión en diferentes etapas de desarrollo; ya que se ha visto una expresión diferencial bajo ciertas condiciones adversas. Los resultados sugieren que TFIIB1 se expresa constitutivamente bajo salinidad y deshidratación, pero que además se genera un mRNA alternativo producto del “splicing” alternativo (por retención del tercer intrón) que se incrementa conforme aumenta la concentración de NaCl o el tiempo de deshidratación (Miranda et al., datos no publicados). Bajo condiciones normales de crecimiento, se observa una expresión constitutiva en flor, hojas caulinas y hojas de la roseta. Sin embargo, *BRP2*, *BRP3* y *BRP4* solo se expresa en la flor en condiciones normales, comparada con la nula expresión en estrés (Miranda 2014).

VI. JUSTIFICACION

Las condiciones ambientales actuales han tenido un impacto significativo en los cultivos con interés agronómico, ya que afectan en gran medida su crecimiento, desarrollo y productividad, lo que da lugar a una creciente preocupación y se ve reflejado en el aumento del número de publicaciones que se han centrado en cómo afecta y responden las plantas ante estas condiciones adversas, promoviendo la identificación de genes implicados en la regulación de la respuesta y de un reajuste metabólico, principalmente en plantas modelos, como es *Arabidopsis*. Diferentes estudios sobre la regulación transcripcional en plantas han demostrado que una gran cantidad de genes son regulados por diversos factores de transcripción que se inducen y son esenciales para contender contra condiciones desfavorables. En el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del CeIB-UAEM se han caracterizado algunos miembros de la familia génica pertenecientes al factor basal de transcripción TFIIB, que se expresan constitutivamente, y se inducen en condiciones de estrés biótico y abiótico (datos no publicados), por lo que la caracterización de mutantes nos arrojará información relevante sobre la participación de estos FT sobre los cambios de expresión de genes implicados con la respuesta para hacer frente a las condiciones adversas y en cómo impacta en los mecanismos implicados en la tolerancia al estrés.

VII. HIPÓTESIS

La interrupción de los transcritos de los factores de transcripción TFIIB1, TFIIB2, BRP4 y BRP6, por la inserción de un T-DNA provocará que las plantas de *A. thaliana* presenten menor tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico debido a una desregulación de los genes de respuesta a estas condiciones.

VIII. OBJETIVO GENERAL:

Entender el papel de los genes *AtTFIIB1*, *AtTFIIB2*, *AtBRP4*, *AtBRP6* en *A. thaliana*, bajo condiciones normales de crecimiento y de estrés.

IX. OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar el perfil transcripcional en las mutantes *AtTFIIB1*, *AtTFIIB2*, de *A. thaliana*.

Determinar el fenotipo de las plantas mutantes bajo diferentes condiciones de estrés abiótico.

Comparar la expresión espacio temporal de los genes *TFIIB1*, *TFIIB2*, *BRP4* y *BRP6*.

X. METODOLOGIA

El presente trabajo, se desarrolló bajo la estrategia experimental mostrada en la figura 6, para cumplir con los objetivos ya establecidos.

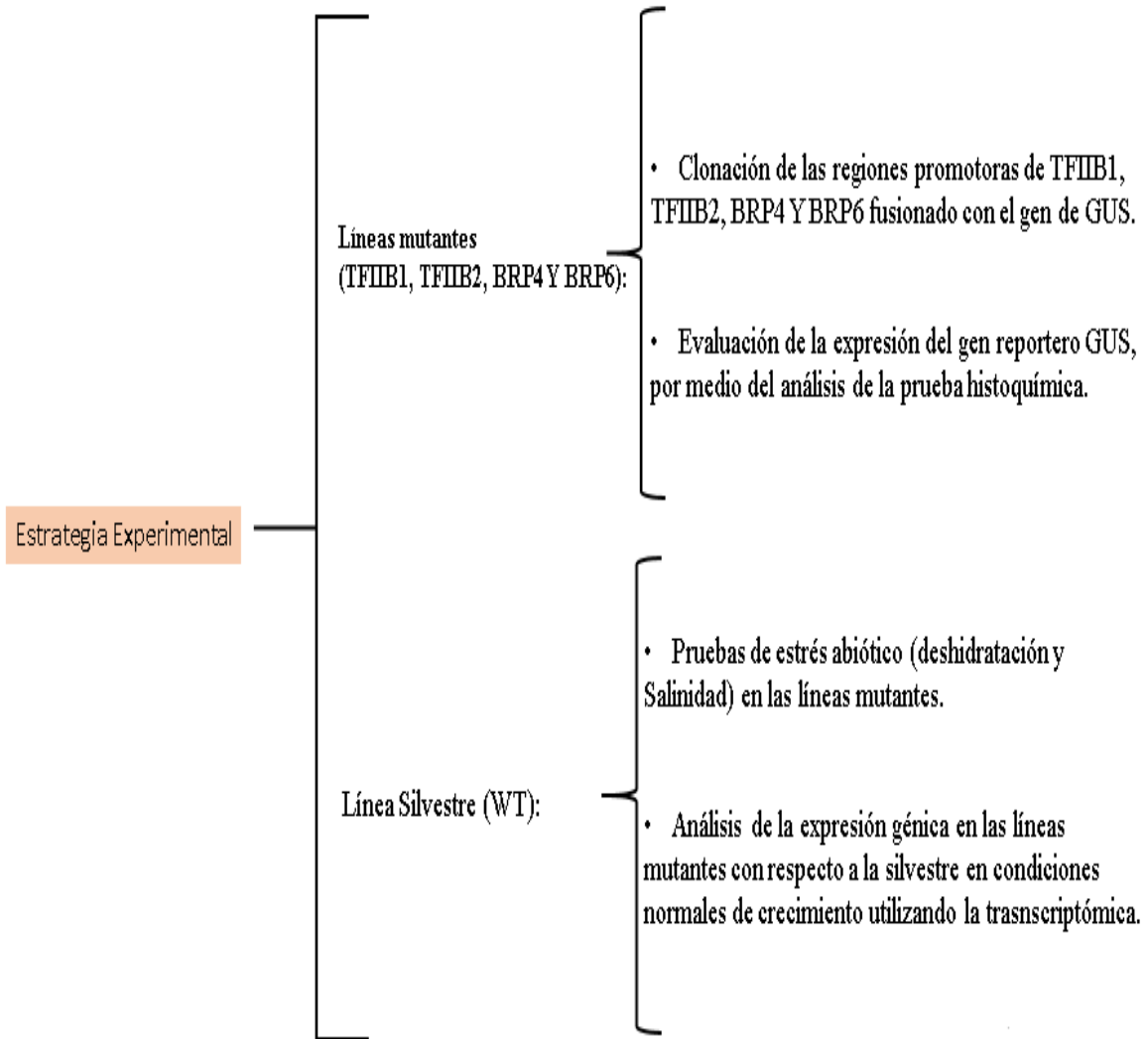


Figura 6.- Estrategia experimental. La figura muestra de manera desglosada los diferentes experimentos para cumplir con los objetivos establecidos, utilizando cuatro líneas mutantes (TFIIB1, TFIIB2, BRP4, BRP6) que fueron analizadas bajo diferentes condiciones de estrés abiótico.

X.1 *Material vegetal.*

Se utilizaron plantas silvestres de *A. thaliana*, ecotipo Columbia 0 (Col-0) para generar líneas transgénicas con la región promotora del gen *BRP4* y *BRP6* fusionada al gen reportero de la β -Glucoronidasa (β -GUS).

Las líneas mutantes por inserción de T-DNA adquiridas del Salk Institute e información relevante sobre la posición de inserción se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.- Localización de la inserción de T-DNA en las mutantes de Arabidopsis.	
ID (nomenclatura SALK)	Localización de la inserción del T-DNA
Línea mutante AtTFIIB1 Salk_084698 Salk_100740c	El T-DNA está insertado a 240pb río abajo del ATG, en la región codificante del gen TFIIB1. El T-DNA esta insertado a 259pb río arriba del ATG en la región promotora del gen TFIIB1.
Línea mutante AtTFIIB2 Salk_086510 Salk_0691560	El T-DNA de ambas mutantes está en la región codificante deTFIIB2.
Línea mutante AtBRP4 (Salk_008549).	El T-DNA está insertado en la región promotora del gen.
Línea mutante AtBRP6 (Salk_055342c).	El T-DNA está insertado en la región promotora del gen.

X.2 *Esterilización y siembra de semillas.*

El procedimiento de esterilización de semillas, se realizó en una campana de flujo laminar. Se llevó a cabo de la siguiente manera: En un microtubo de 1.5ml se colocaron las semillas y se adicionó 1ml de etanol (96%), se agitó por 1 min aproximadamente. Posteriormente se retiró el etanol y se agregó 1ml de solución de hipoclorito de sodio al 20%, se agitó durante 7min en el vortex. Se centrifugó a 13,000rpm por 1min, se descartó el hipoclorito de sodio y se realizaron 4 lavados con 1ml de agua estéril. Finalmente, las semillas estériles se sembraron en cajas petri con medio MS completo (Murashige and Skoog 1962) para su crecimiento.

X.3 Crecimiento de Arabidopsis en sustrato.

Las plantas de *Arabidopsis* se trasplantaron en macetas con sustrato METROMIX, aproximadamente a las 2 semanas. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas, a una temperatura constante de 22°C y un fotoperiodo de 16h-luz/8h-oscuridad, con riegos periódicos (3 veces por semana).

X.4 Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se diseñaron y enviados a sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (<http://www.ibt.unam.mx/síntesis/oligos.html>) (Tabla 3).

Tabla 3.- Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones promotoras.	
Nombre del oligonucleótido.	Secuencia
pTFIIB-F pTFIIB-R	5'- ATCCTTACTTGTTATTCAAGTCATATA-3' 5'- TTCTCTTTTCTTTCTTTTTCCCGAAAGA-3'
pTFIIB2-F pTFIIB2-R	5'- CTCCGAGTGTGGTTTGGTTT - 3' 5'- CACCGCATGGTTAGACATTG- 3'
pBRP4-F pBRP4-R	5'-GAGAGAGAGGATGTTTTCAAATTGAATGAAGGTTGTTTTCG- 3' 5'-CGAAACCCTAATTTTCTGTCTGATTATAGGATTCTTCTTC- 3'
pBRP6-F pBRP6-R	5'- TCTTTCCTCACATTTATTGAACTTTTG- 3' 5'- GTGACTTATATAAATATTCTCTATTGCG- 3'

X.5 Extracción de ADN de A. thaliana y amplificación de los promotores de los genes AtTFIIB1, AtTFIIB2, AtBRP4, AtBRP6.

El ADN de planta se obtuvo usando el método de CTAB. Este ADN se utilizó como templado para realizar las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos diseñados.

La amplificación por PCR se realizó utilizando las siguientes condiciones de amplificación y utilizando la enzima *Taq* DNA polimerasa de acuerdo con las indicaciones del fabricante, iniciando con la siguiente: un ciclo de 98 °C por 30 seg, 35 ciclos con 98 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72°C por 1min 30 seg, finalmente 72°C 10 min.

X.6 Clonación en el vector pTZ57R/T.

Los fragmentos de ADN correspondientes a las secuencias promotoras (pBRP4 y pBRP6) fueron amplificados mediante la técnica de PCR con los oligonucleótidos mostrados en la tabla 2, los cuales fueron clonados en el vector de pTZ57R/T, el producto de PCR fue clonado en los sitios de restricción Xba I-Bam HI del plásmido (Figura7), usando la mezcla de reacción sugerida por el fabricante. Las características que posee este vector permitió facilitar la clonación de los productos de PCR, aprovechando la actividad de la ADN polimerasa la cual produce ADNs que poseen una adenina terminal no apareada colgando de su extremo 3'A la cual añade en ambos lados; esto no solo facilita la clonación al vector que contiene ddT , sino que también evitan la recircularización del vector y por lo consiguiente la obtención de clonas recombinantes que contienen el vector con el inserto.

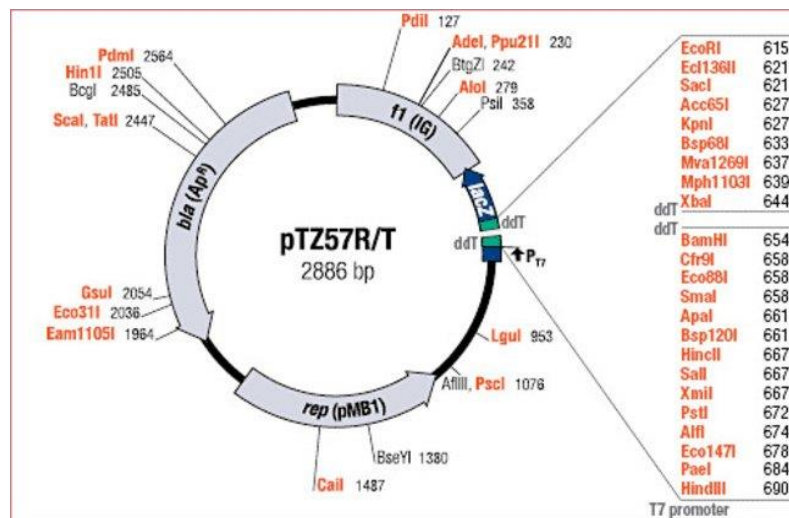


Figura 7.- Esquema del vector de clonación pTZ57R/T. El vector consta de un tamaño de 2887pb, tiene un sitio de multiclonación, un sitio de origen, un gen *lacZ* del operón *lac*. que expresa la enzima β -galactosidasa, permitiendo se seleccionan clones recombinantes en base al cribado azul / blanco y un gen de selección resistente a ampicilina.

X.7 Clonación en el vector de expresión pBI101.1.

El vector de expresión pBI101.1 fue utilizado debido a que posee como características el gen reportero de *gus* lo cual permitirá analizar las regiones promotoras de los miembros de la familia TFIIB, este tiene un tamaño de 12,000pb y un gen de selección con resistencia a Kanamicina. Además, cuenta con un polilinker o sitio de multiclonación lo cual permitió subclonar las regiones promotoras (pBRP4 y pBRP6) clonadas en el vector pTZ57R/T las cuales fueron digeridas con las enzimas de restricción XbaI y BamHI (Figura 8).

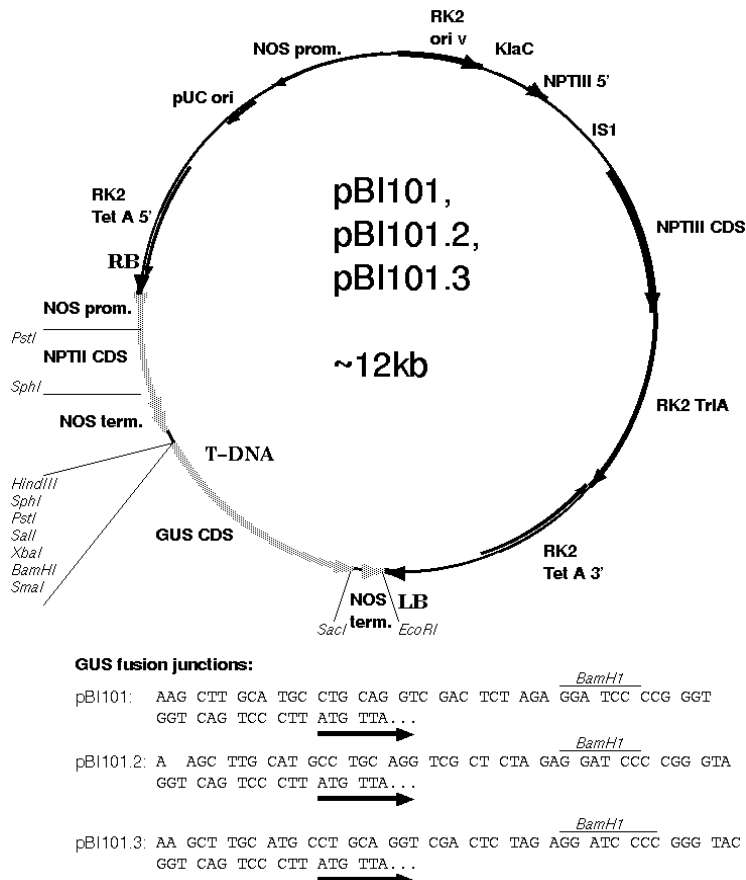


Figura 8.- Esquema del vector de expresión pBI101.1. El vector tiene un tamaño de 12,000pb, un sitio de multiclonación, la región codificante del gen de la neomicina fosfotransferasa (*NPTII*), un sitio de origen (PUC ori), un codón de terminación (secuencia de ADN) que se utiliza para "terminar" la expresión del gen insertado (NOS Term), el borde derecho (RB) y borde izquierdo (LB) de la región de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* y finalmente el gen reportero *gus* utilizado como control

X.8 Manejo del ADN plasmídico y transformación de células competentes

Para la replicación y obtención de ADN de los plásmidos se utilizó la cepa XL1BLUE de *E. coli* (Sambrook y Russel, 2001). La cepa se creció en medio LB que contiene 1% de Bacto triptona, 0.05% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio. Para medio sólido se adiciona 1.5% de agar bacteriológico. El aislamiento del ADN de los plásmidos bacterianos se realizó con el método de Miniprep (Sambrook y Russel, 2001). Las condiciones de corte con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante (INVITROGEN).

X.9 Transformación de células de E. coli.

Las células de *E. coli* se transformaron por electroporación. Se llevó a cabo de la siguiente manera; las células electrocompetentes de la cepa XL1BLUE de *E. coli* se descongelaron en hielo, se añadió el DNA (reacción de ligación o plásmido purificado) y se transfirió a una celda de electroporación. Las células se recuperaron por incubación en medio LB a 37°C, en agitación continua durante una hora. La selección de colonias transformantes, se llevó a cabo en medio LB adicionado como antibiótico Carbenincilina (100µg/ml) mismo que contiene el vector como gen de selección, X-gal (20 µg/ml) e IPTG (20 µg/ml), finalmente se incubaron a 37°C durante 12h.

X.10 Transformación de Agrobacterium tumefaciens.

Se utilizaron células electrocompetentes de la cepa (LBA4404) de *A. tumefaciens*. Las células se descongelaron en hielo y se agregó 5µl de plásmido de las diferentes construcciones. Finalmente, mediante electroporación se transformaron las células y se sembraron en cajas con LB adicionado con Kanamicina (50µg/ml) y Rifampicina (100µg/ml). Se incubaron a 28°C por aproximadamente 2 días (Jones *et al.*, 2005).

X.11 Análisis del transcriptoma de las líneas mutantes TFIIB1 y TFIIB2 en A. thaliana mediante Microarreglos.

Para conocer el cambio de expresión de los genes en las mutantes de TFIIB1 y TFIIB2, se realizó el macerado de una planta completa adulta de ambas líneas, así como de la planta

completa control silvestre (Wt), en un mortero con nitrógeno líquido y se realizó la extracción de RNA total con Trizol reacción sugerida por el fabricante (Invitrogen)

Las muestras de RNA se enviaron a la Unidad de Microarreglos de DNA del instituto de Fisiología Celular-UNAM y se realizó el análisis del transcriptoma mediante la técnica de microarreglos. Los datos crudos que se obtuvieron del Microarreglo fueron depurados, eligiendo aquellos que mostraran al menos un valor del doble de sobreexpresión o represión. Se utilizó el programa Mapman (<http://mapman.gabipd.org>) (Thimm *et al.*, 2004) para identificar las diferentes rutas metabólicas en la cual cada uno de los genes participan, además de mostrar la diferencia en su expresión, es decir, sobreexpresados y/o reprimidos.

X.I2 Pruebas de germinación en la línea mutante TFIIB2 en condiciones de estrés y en condiciones normales.

Para los experimentos de estrés salino se analizaron por estudios previos las concentraciones a utilizar de NaCl y sorbitol para los diferentes tratamientos. Los resultados mostraron que a concentraciones de 100Mm de NaCl la germinación de las semillas es por debajo del 5% y en sorbitol a más de 200Mm la germinación es de 10%, por ello se tomaron en cuenta las concentraciones de 50 y 75 Mm de NaCl, 100 y 150 mM de sorbitol donde pudo ser evaluada la germinación.

Sin embargo, para los tratamientos de estrés salino en plantas adultas se utilizaron dos concentraciones diferentes 150 y 200mM de NaCl. Para llevar a cabo estos experimentos las semillas fueron estratificadas por 48hrs a 4°C, posteriormente se sembraron 100 semillas en medio MS adicionando NaCl y sorbitol en las concentraciones anteriormente mencionadas para evaluar la germinación (Valor de germinación) y para los experimentos de plantas adultas fueron crecidas directamente en sustrato para su germinación y crecimiento, transferidas al cuarto de crecimiento con luz y mantenidas en condiciones normales.

Como control, se utilizaron plantas regadas con H₂O destilada y solución nutritiva hasta los 21 días de crecimiento. Al final de los diferentes tratamientos se llevó a cabo la determinación de los diferentes parámetros:

X.13 Cuantificación de clorofila.

Debido a que la clorofila participa en la absorción de energía luminosa de la planta, su disminución podría ser un factor importante en la determinación del efecto de estrés salino sobre las plantas. La extracción de clorofila se realizó con metanol 100%, se cortó un disco de hoja de los diferentes ejemplares, se colocaron en el mortero y se molieron adicionando 1ml de metanol frío 100%, colocando las muestras en hielo y total oscuridad para evitar la degradación de la misma, en seguida se centrifugaron las muestras a 3500rpm durante 5min, finalmente el sobrenadante de la muestra es colocado en celdas de plástico para medir en el espectrofotómetro a dos longitudes de onda (para la clorofila a, 665.2nm y para la clorofila b, 652nm).

Las fórmulas utilizadas para la determinación de clorofila fueron las siguientes:

$$\text{Chla} = 16.29 * A_{\text{peak Chla}} - 854 * A_{\text{peak Chla} - 13.2\text{nm}}$$

$$\text{Chlb} = 30.66 * A_{\text{peak Chla} - 13.2\text{nm}} - 13.58 * A_{\text{peak Chla}}$$

$$\text{Chla+b} = 22.12 * A_{\text{peak Chla} - 13.2\text{nm}} - 2.71 * A_{\text{peak Chla}}$$

X.14 Cuantificación de biomasa.

Con la finalidad de poder determinar la cantidad de biomasa en las diferentes líneas por los efectos del estrés abiótico, se determinó el peso fresco y peso seco de las plantas en condiciones de estrés salino 150mM y 200mM NaCl, además del control (plantas sin estrés). Las muestras se pesaron al culminar los diferentes tratamientos de estrés para determinar el peso fresco, seguido de esto se guardaron en bolsas de papel y se mantuvieron entre 24-48 hrs a 80°C, para determinar su peso seco.

X.15 Prueba de peroxidación de lípidos (malondialdehído).

Uno de los efectos del estrés en plantas es la peroxidación de lípidos, ya que el estrés inducido por salinidad u osmótico aumenta las especies reactivas de oxígeno (EROs), como el ión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para atenuar la toxicidad celular de estas sustancias, las plantas disponen de varias enzimas, entre las que cabe mencionar a la superóxido dismutasa (SOD) y la ascorbato peroxidasa (APX), de las que existen varias isoenzimas distribuidas en diferentes compartimentos subcelulares. Dichas enzimas forman parte de un complejo mecanismo de detoxificación de las EROs.

Para evaluar el efecto del estrés sobre las plantas mutantes se llevó a cabo la cuantificación de malondialdehído, formado por la ruptura de ácidos grasos insaturados, que sirven como indicativo para determinar el daño oxidativo causado en las células. Para su determinación se hace reaccionar un extracto de material vegetal con ácido 2-tiobarbitúrico, generando una coloración de color rojo que tiene un máximo de absorbancia a 535nm.

Para el procedimiento se pesó 0.1g de hoja y se colocaron en un mortero. Se añade 1ml de reactivo preparado con TCA-TBA-HCL, se homogeniza y se colocan las muestras durante 30min a 90°C, se prepara un tubo de blanco, es decir la solución de MDA sin muestra. Pasando este período, los tubos se introdujeron en hielo y posteriormente se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos. Finalmente, se transfieren con la pipeta 750 microlitos del sobrenadante a las celdas de plástico para realizar la determinación a dos longitudes de onda (535nm y 600nm), haciendo el primer ajuste con la muestra blanco.

Para hacer los cálculos se emplea la ley de Lambert-Beer:

$$\text{nmol MDA/ gPF} = (A_{535} - A_{600}) * \text{mmol} / 1.56 * 10^5 \text{ ml} * 10^6 / 1 \text{mmol} * 1 \text{ml} / 0.1 \text{ gPF}.$$

X.16.- Determinación histoquímica de la actividad de la β -glucuronidasa (β -GUS).

Para la detección histoquímica de la actividad de la β -glucuronidasa las plántulas se colocaron en una solución amortiguadora de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M, pH 7.0; Na_2EDTA 10 mM; K_3Fe 0.5 mM; K_4Fe 0.5 mM; X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D glucurónido, Sigma) 0.5 mg mL⁻¹, previamente disuelto en DMSO. Estas reacciones se incubaron a 37 °C durante 16-24 h en la oscuridad. Posteriormente, los tejidos se sometieron a lavados con metanol:acetona (3:1) para eliminar la clorofila y evitar que interfiriera con la tinción; después se conservaron en una solución con glicerol-agua (1: 1) a 4 °C.

XI.- RESULTADOS.

Para el análisis de cada una de las líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con la finalidad de localizar las inserciones de T-DNA se utilizó el programa tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/do:regular, mediante un análisis de alineamiento de secuencias (Figura 6).

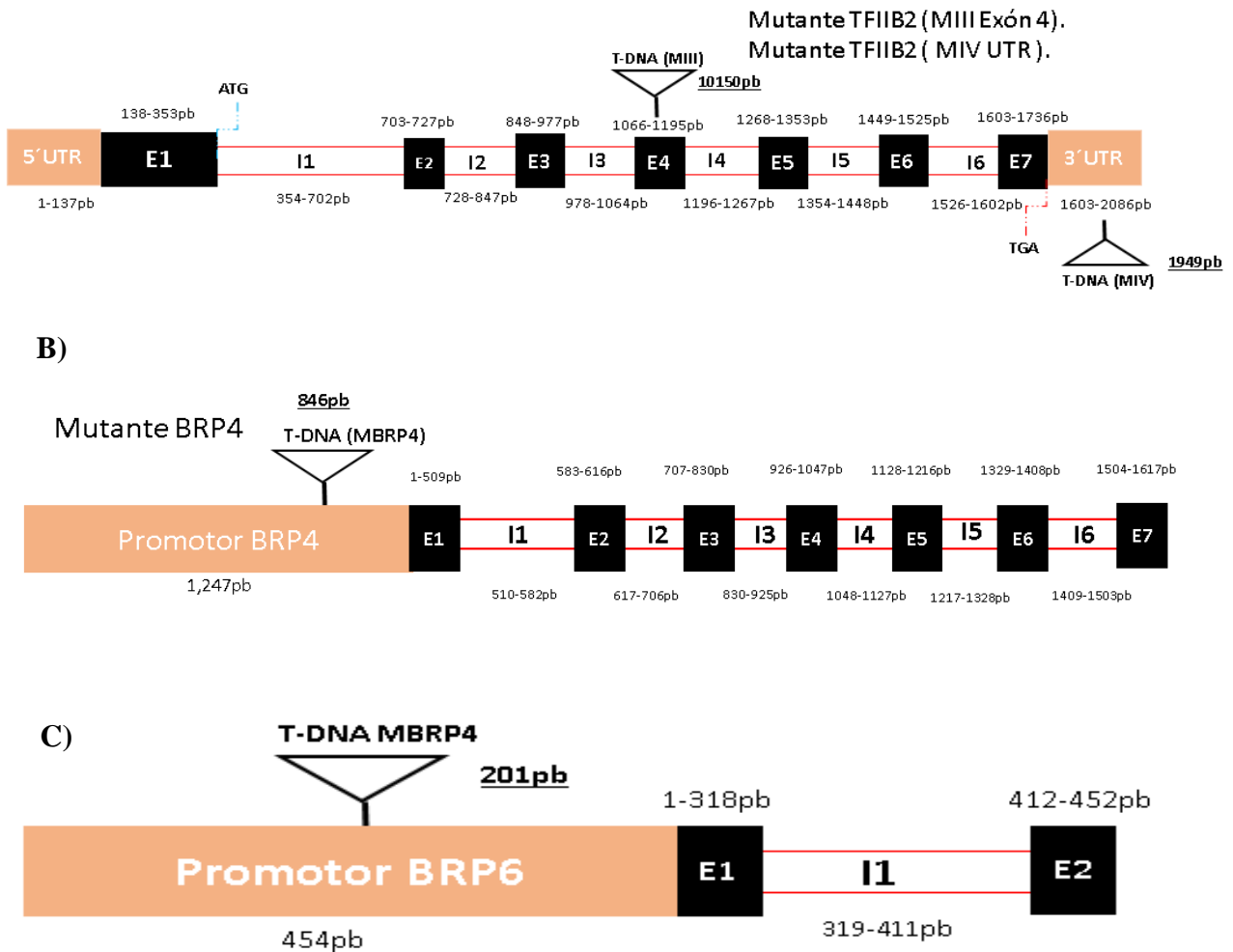


Figura 9.- Esquemas de las Inserciones de T-DNA en las diferentes líneas mutantes.
A) Mutantes TFIB2 (Salk_086510, Salk_086510) la primera posición de T-DNA se localiza en el cuarto exón exactamente en la posición 1150pb, la segunda inserción está en la región 3' UTR. **B)** Mutante BRP4 (Salk_008549) la inserción está en la región promotora a 846pb. **C)** Mutante BRP6 (Salk_055342c) la inserción está en la región promotora a 201pb.

XI.I Análisis de las regiones promotoras de los miembros de la familia TFIIB.

Existe en el genoma de las plantas una gran cantidad de elementos regulatorios conocidos como elementos en *cis* gran parte de éstos, se encuentran localizados en las regiones promotoras de los genes y tienen como función controlar o regular la expresión de una gran cantidad de genes, la variación de estas secuencias en *cis* pueden impactar en la expresión de los genes, además también en la expresión de tejido específica y en el tiempo de desarrollo en las plantas. Estos elementos en *cis* son reconocidos por proteínas denominadas factores de transcripción los cuales regulan la expresión de genes blanco, algunos específicos para permitir a la planta confrontar condiciones desfavorables del ambiente. En este estudio se analizaron las regiones promotoras de cuatro miembros pertenecientes a la familia genica del factor general de la transcripción TFIIB. Utilizando la base de datos (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/search.php#species>), se identificaron las secuencias regulatorias en los promotores de los genes *TFIB1*, *TFIB2*, *BRP4*, *BRP6* de *Arabidopsis thaliana*, estos promotores poseen elementos de regulación (elementos en *cis*) que responden a diversas condiciones de estrés.(Tabla 4).

Tabla 4.- Elementos en *cis* de respuesta a diferentes tipos de estrés en los promotores de la familia génica TFIIB.

TFIIB/ BRP	MYB	MYC	NAC	WRKY	AP2/ERF	bZIP	GATA	DRE	RAV	ABRE
TFIIB1	29	3	4	24	97	111	10	NP	8	10
TFIIB2	34	4	6	30	120	100	9	3	6	12
BRP4	NP	NP	NP	NP	NP	2	8	NP	3	NP
BRP6	NP	NP	NP	NP	NP	NP	5	NP	NP	NP

XI.2 Amplificación por PCR de las regiones promotoras de los factores BRP4 y BRP6.

Se llevó a cabo la amplificación de las regiones promotoras de los genes BRP4 y BRP6 mediante la técnica de PCR (Figura 10).

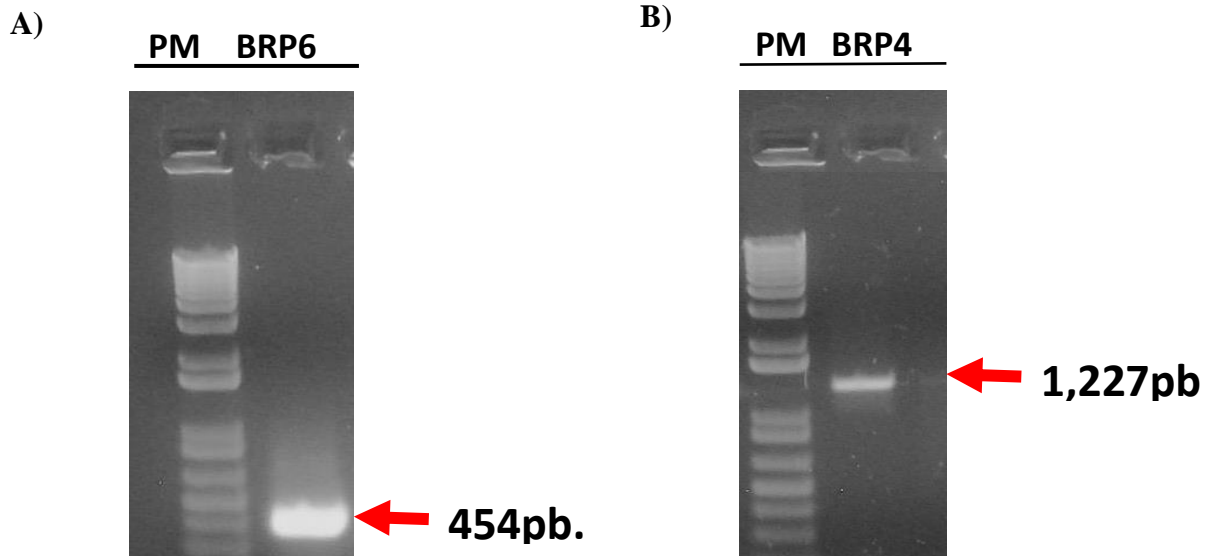


Figura 10.- Amplificación de los promotores mediante PCR. A) Imagen del PCR de la región promotora del gen BRP6 (pBRP6), correspondiente a la banda con un tamaño de 454pb. **B)** La región promotora del gen BRP4 (pBRP4), correspondiente a la banda con un tamaño de 1,227.

Posteriormente, se realizó la clonación del fragmento obtenido en el vector pTZ57R/T y se analizó por restricción con las enzimas XbaI y BamHI (Figura 11).

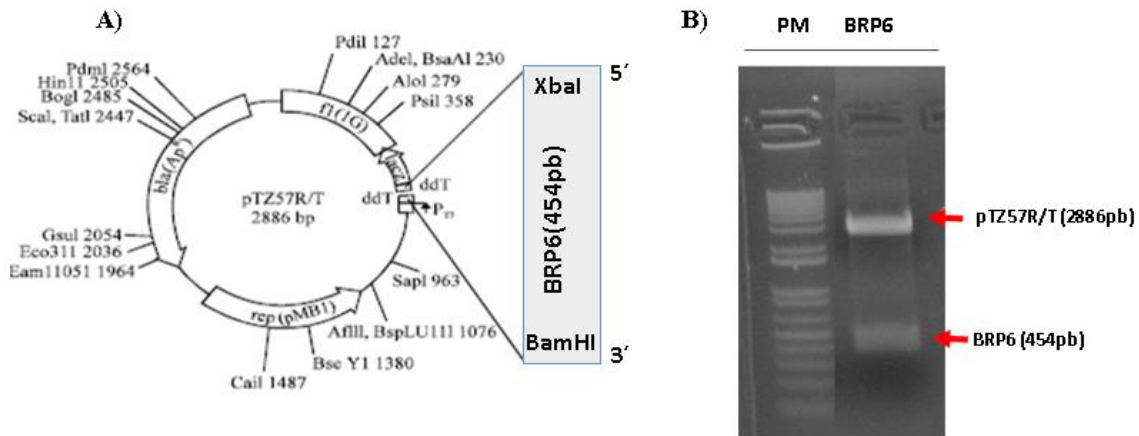


Figura 11.- Clonación del promotor BRP6 en el vector pTZ57R/T. A) Una representación del vector de clonación y los sitios de corte que fueron utilizados para su posterior análisis del patrón de restricción. **B)** Imagen del vector pTZBRP6 digerido con XbaI y BamHI donde se observa la banda de 2886pb del vector y el promotor de BRP6 de 454pb.

XI.3 Clonación en el vector *pBI101.1* de la construcción *pTZBRP6*.

Una vez obtenida la construcción se digirió el vector con las enzimas *XbaI* y *BamHI* para obtener el fragmento correspondiente y clonarlo en el vector de expresión *pBI101.1*, el cual posee el gen reportero de *GUS* (Figura 12Ay 12B).

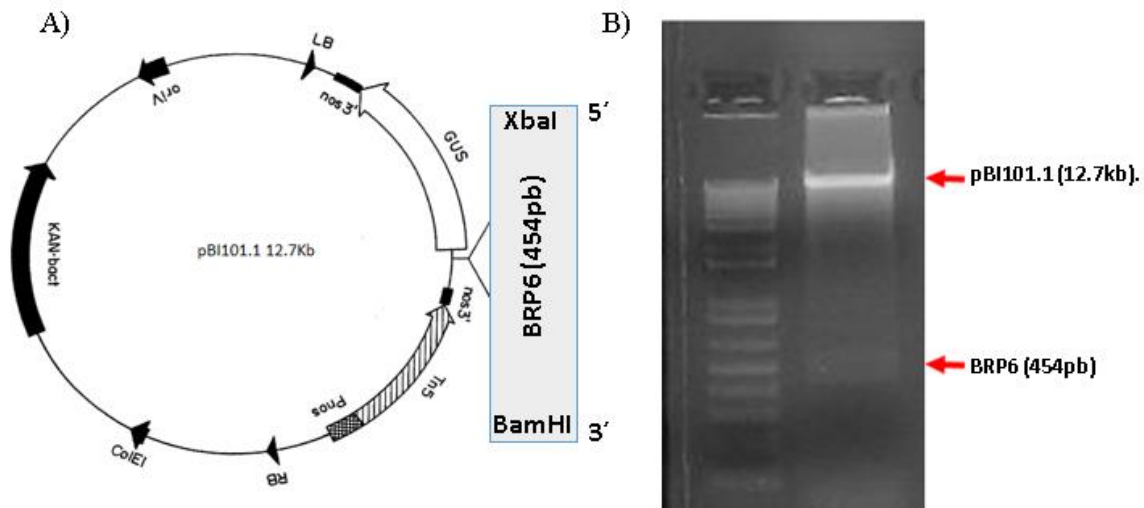
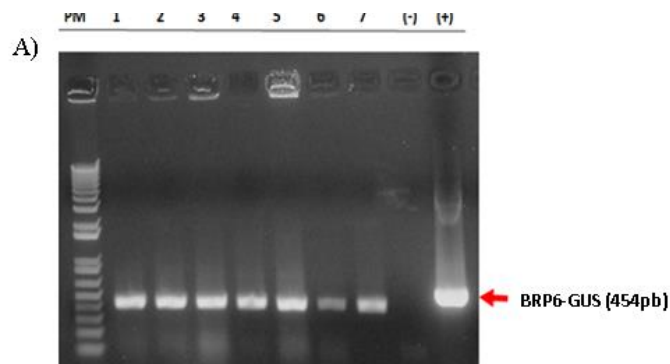


Figura 12.- Clonación del promotor BRP6 en el vector *pBI101.1*. A) Fragmento de 454pb pertenecientes al promotor del gen *BRP6* fusionado al gen reportero de B) Vector digerido con *XbaI* y *BamHI* correspondiente a la banda de 12.7Kb y el inserto con un tamaño de 454pb.

XI.4 Transformación de la construcción *pBRP6GUS* en *Agrobacterium*.

La transformación del vector se realizó en células de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 con la finalidad de llevar a cabo la transformación en plantas de *A. thaliana*, las clonas fueron analizadas mediante la técnica de PCR (Figura 13A), aquellas que fueron positivas fueron analizadas por patrón de restricción con *XbaI* y *BamHI* (Figura 13B).



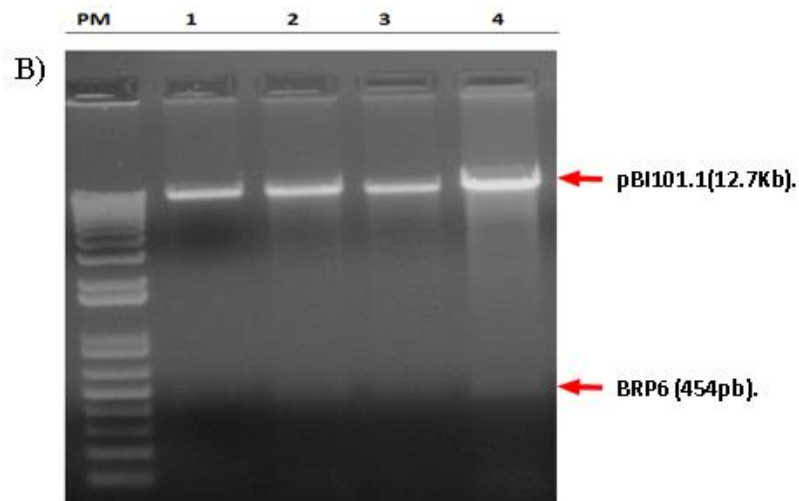


Figura 13.- Amplificación por PCR del promotor de BRP6 y el análisis de restricción en *A. tumefaciens* y *E. coli* de la construcción pBRP6GUS.

A) Amplificación mediante PCR de la región promotora del gen *BRP6* en las clonas transformantes en células de *Agrobacterium tumefaciens*. B) Digestión de clonas transformadas en *E.coli* a partir del plásmido purificado de *Agrobacterium*, para corroborar el patrón de restricción

XI.5 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con la construcción pBRP6GUS.

Las plantas de *Arabidopsis* de cuatro semanas de crecimiento fueron transformadas por el método de floral dip ya anteriormente descrito. Analizando la eficiencia de transformación se realizó la amplificación del gen *BRP6* fusionado con el gen reportero de *gus* utilizando un oligonucleótido específico “forward” del promotor de BRP6 y un oligonucleótido específico reverso del gen de *gus*. También se realizó la amplificación del gen de resistencia NTPII por PCR, de esta manera se obtuvieron las líneas positivamente transformadas y posteriormente fueron seleccionadas en Km^{50} para generar las líneas homocigas (Figura 14)

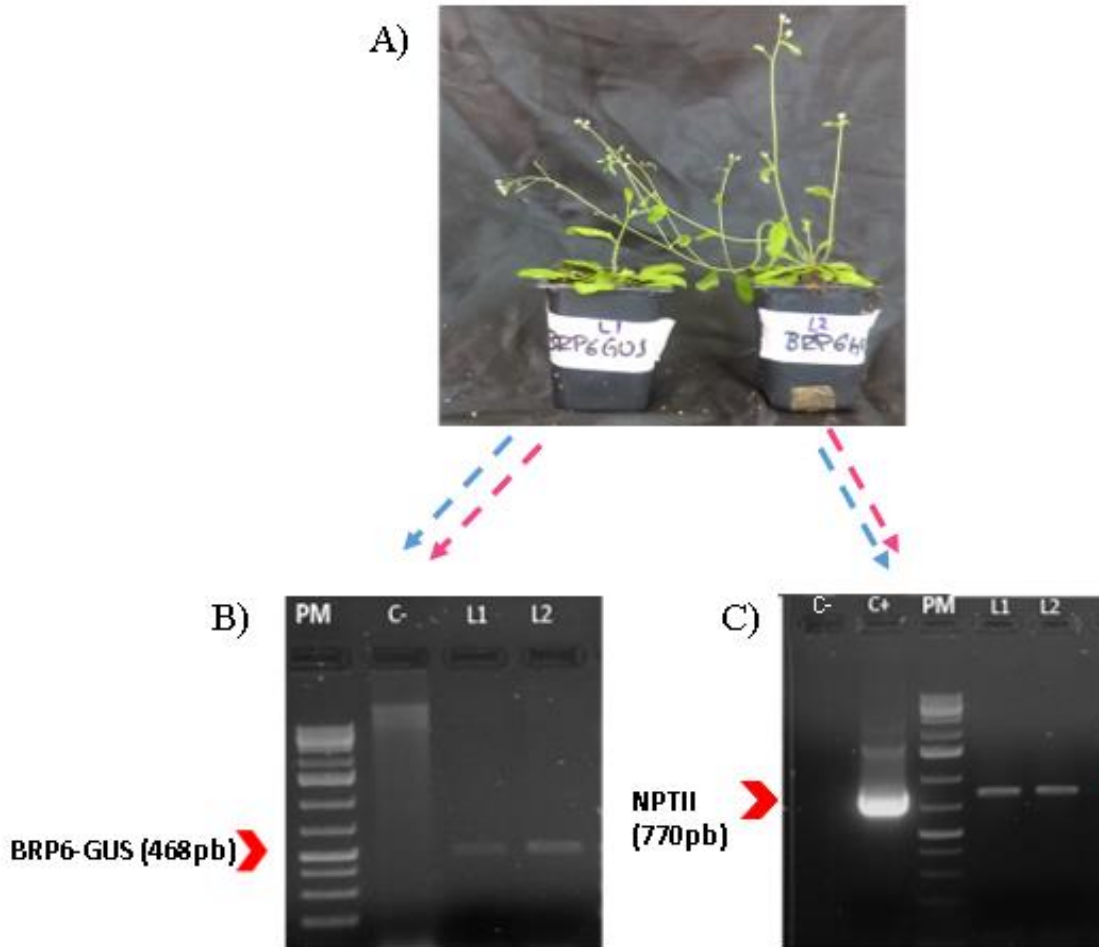


Figura 14.- Líneas homocigas de *Arabidopsis thaliana* con pBRP6GUS. A) Se obtuvieron plantas transformadas con la construcción BRP6::GUS, las cuales fueron crecidas en Km⁵⁰ el antibiótico de selección para obtener la línea homocigas, a estas líneas se les realizo análisis molecular mediante PCR amplificando la fusión del promotor-GUS **B)** amplificación del promotor BRP6 **C)** Amplificación del gen *NPTII* (PM) el marcador de peso molecular, (C-) control negativo sin muestra de ADN, (L1-L2) dos líneas homocigas obtenidas de la transformación. (C+) amplificación del gen de selección Kanamicina con un tamaño de 770pb.

XI.6 Clonación de la región promotora BRP4 en pTZ57R/T.

Se amplificó la región promotora del gen del BRP4 y se clonó en el vector pTZBRP4, (Figura 15A y 15B).

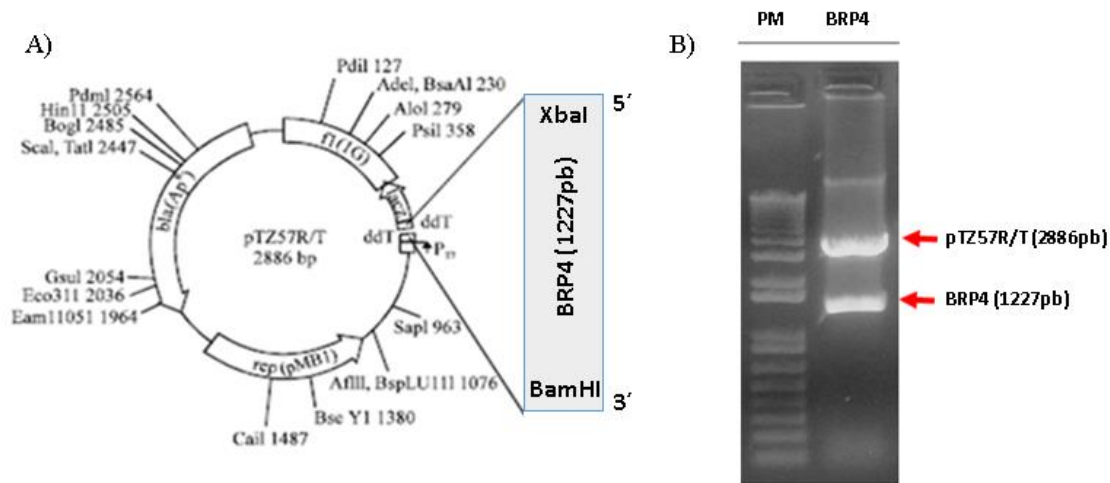


Figura 15.- Clonación de la región promotora BRP4 en el vector pTZ57R/T. A) Mapa del vector de clonación y los sitios de corte que fueron utilizados para su posterior análisis del patrón de restricción. B) Vector digerido con XbaI y BamHI correspondiente a la banda de 2886pb y el inserto con un tamaño de 1,227pb.

XI.7 Clonación en el vector pBI101.1.

A partir de la construcción pTZBRP4 se llevó a cabo la sub-clonación en el vector pBI101.1 (Figura 16Ay 16B).

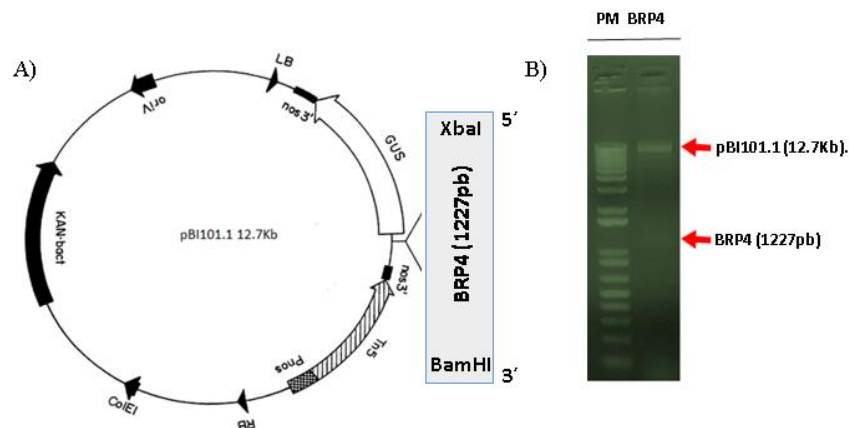


Figura 16.- Clonación del promotor del gen BRP4 en el vector de expresión pBI101.1. A) Un diagrama esquemático del vector de expresión pBI101.1, en el cual fue sub-clonado el promotor del gen BRP4. B) Electroforesis del vector pBI101.1 digerido con las enzimas de restricción XbaI y BamHI (banda de 12.7Kb) y el inserto con un tamaño de 1227pb.

XI.8 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con la construcción pBRP4GUS.

La transformación del vector se realizó en células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 con la finalidad de llevar a cabo la transformación en plantas de *A. thaliana*, las clonas fueron analizadas mediante la técnica de PCR (Figura 17A) y posteriormente el vector purificado de *A. tumefaciens* fue transformado en *E. coli* para identificar aquellas que fueron positivas mediante el análisis de restricción utilizando las enzimas XbaI y BamHI (Figura 17B).

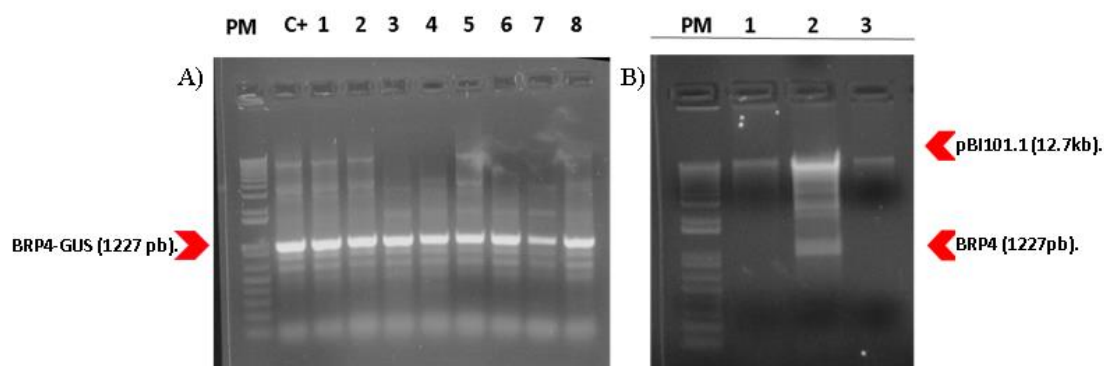


Figura 17.- A) PCR de las clonas transformantes positivas en células de *Agrobacterium tumefaciens*. B) Digestión de clonas transformadas en *E.coli* a partir del plásmido purificado de *Agrobacterium*, para corroborar el patrón de restricción.

XI.9 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con la construcción pBRP4GUS.

Las plantas de *Arabidopsis* de cuatro semanas de crecimiento fueron transformadas por el método de floral dip ya anteriormente descrito. Para corroborar la transformación de las plantas, se realizó la amplificación de la fusión promotor-GUS y la amplificación del gen de resistencia *NTPII* por PCR, de esta manera se identificaron las líneas transformadas y posteriormente fueron segregadas en Km⁵⁰ para generar las líneas homocigas (Figura 18).

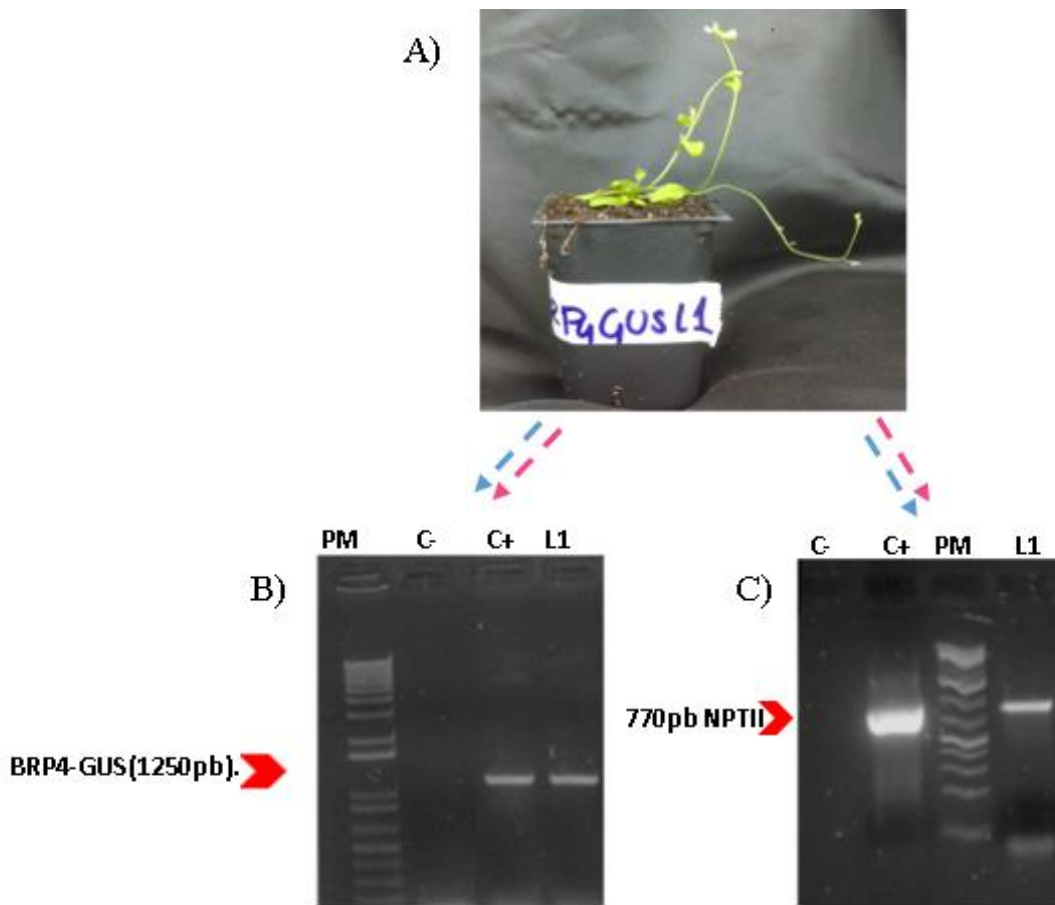


Figura 18.- Líneas homocigas de *Arabidopsis thaliana* con pBRP4GUS. A) Se obtuvieron plantas transformadas con la construcción pBRP4GUS, las cuales fueron crecidas en Km^{50} el antibiótico de selección para obtener la línea homocigas, a esta línea se le realizó análisis molecular mediante PCR amplificando la fusión promotor-GUS B) amplificación del promotor BRP6 C) Amplificación del gen *NPTII*. (PM) el marcador de peso molecular, (C-) control negativo sin muestra de ADN, (L1) una línea homociga obtenida de la transformación con pBRP4GUS, (C+) amplificación del gen de selección *NPTII* a partir del vector pBRP4GUS.

XI.10 Obtención de líneas en estado homocigo de las mutantes por inserción de T-DNA de *Arabidopsis thaliana*.

La selección se llevó a cabo mediante la segregación siguiendo el gen marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina (*nptII*). Para lo cual se sembraron las semillas en medio MS adicionado con Km^{50} , las semillas que germinaron se consideraron

como líneas independientes de la generación filial 1 (T1). Las plántulas se trasplantaron a sustrato para obtener plantas adultas con semillas y de éstas, obtener la generación filial 2 (T2). Estas semillas fueron germinadas en medio MS+Km⁵⁰ en donde se obtuvo una germinación del 75%, posteriormente este 75% fueron crecidas nuevamente bajo este medio selectivo obteniendo las líneas T2 y finalmente de estas líneas dieron semillas que pertenecen a la generación filial (F3) y la obtención de líneas homocigas crecidas el 100% (Figura 19).

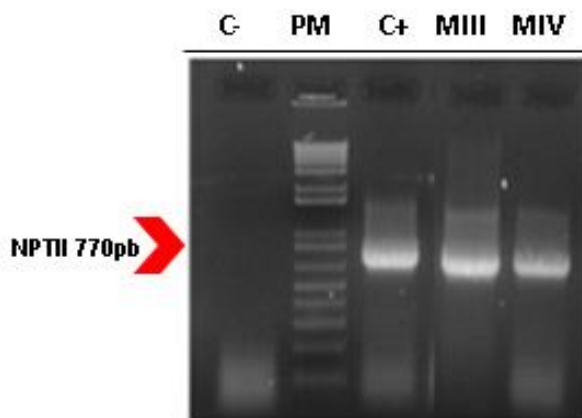


Figura 19.- Análisis de las líneas homocigas mediante la técnica de PCR en las mutantes de TFIIIB2. (C-) control negativo (PM) marcador de peso molecular, (C+) control positivo, (MIII) línea mutante TFIIIB2 inserción del T-DNA en el exón 4 y (MIV) línea mutante TFIIIB2 con inserción del T-DNA en la región 3'UTR.

XII.1 Demostración de la interrupción del gen TFIIIB2 en las líneas mutantes TFIIIB2, mediante PCR.

Otro de los objetivos del presente trabajo, fue el de corroborar la interrupción del gen *TFIIIB2* por la inserción de T-DNA sobre el gen en las líneas mutantes (Salk_086510 y Salk_069156c). A partir de un fondo silvestre y DNA genómico de las mutantes se llevó a cabo la amplificación del gen *TFIIIB2* que tiene un tamaño de 383pb, debido a que las inserciones de T-DNA se localizan una en el cuarto exón y la otra en la región 3'UTR, se utilizaron los oligonucleótidos que amplificaron del cuarto al sexto exón, esto permitió saber si el gen estaba siendo o no interrumpido por el T-DNA mismo que tiene un tamaño de 4939pb ya que al ser insertado el transgen la secuencia del gen se ve interrumpida por este fragmento en DNA genómico, es decir en condiciones de PCR (Figura 20).

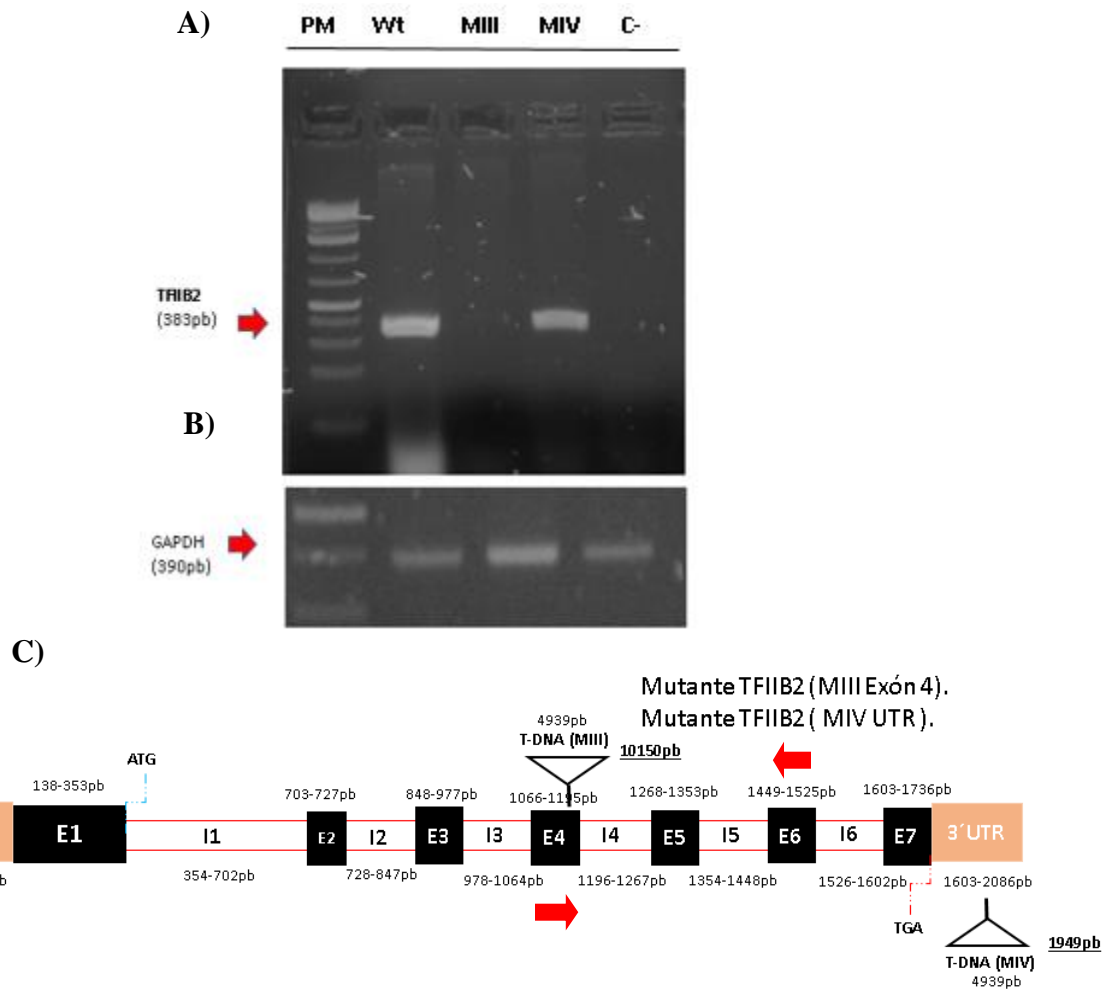


Figura 20.- Amplificación del gen TFIIB2 mediante PCR. A) Se utilizaron oligonucleótidos específicos para TFIIB2 en las dos líneas mutantes por inserción de T-DNA (MIII Y MIV). B) se utilizó gen GAPDH (390pb) en DNA genómico como control positivo de un gen housekeeping. C) esquema representativo del gen TFIIB2 con intrones y exones donde se encuentran localizadas las inserciones de T-DNA (las flechas rojas indican la posición de los oligonucleótidos específicos para TFIIB2).

Este análisis mediante PCR permitió validar ambas líneas mutantes en *TFIIB2* denominadas MIII y MIV, los resultados demostraron que la inserción del T-DNA en el cuarto exón afecta su transcripción y al no haber RNA mensajero de este gen es muy probable que tampoco se sintetice la proteína; por esto se seleccionó solo a la mutante MIII ya que nos podría arrojar información relevante sobre la función del gen en respuesta a condiciones desfavorables.

XII.2 Medición de diferentes parámetros en la línea mutante TFIIB2 (MIII) en plantas adultas bajo condiciones de estrés salino y control.

Para determinar el efecto de estrés en las plantas de la línea mutante TFIIB2 (Salk_086510) fueron crecida en dos diferentes tipos de estrés abiótico: estrés salino (50mM y 75mM NaCl) (Figura 21A) y estrés osmótico (100mM y 150mM Sorbitol) (Figura 21B); con la finalidad de poder evaluar primero los efectos sobre la germinación (valor de germinación) de la línea MIII (Figura 21).

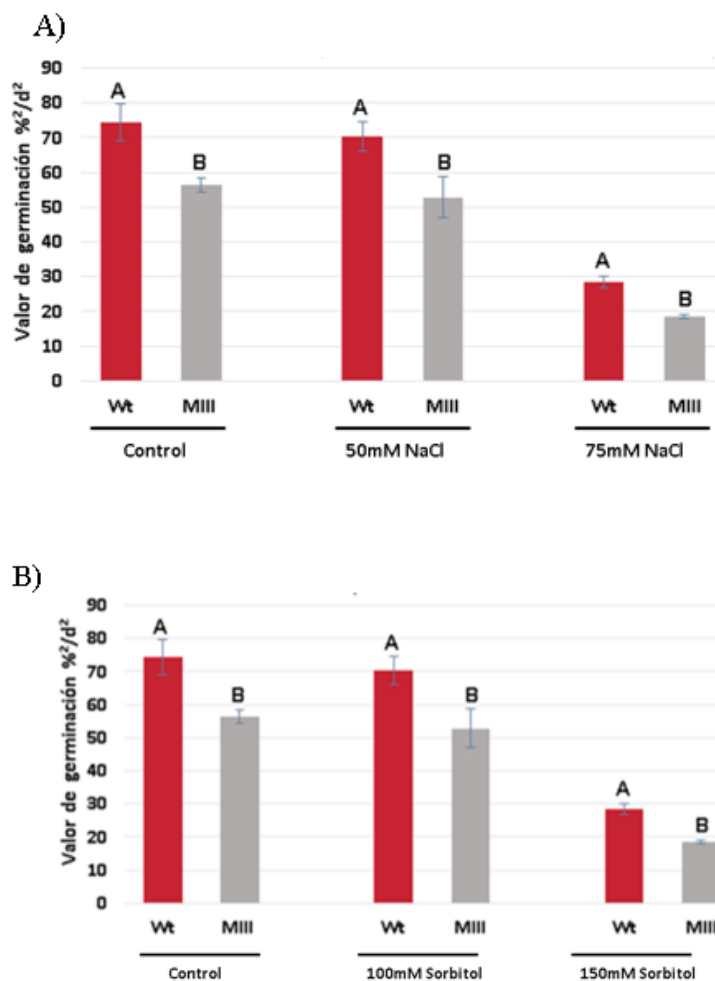


Figura 21.- Valor de germinación. **A)** 12 días de germinación de la línea mutante III en TFIIB2 sometidas a estrés salino utilizando NaCl. **B)** 12 días de germinación de la línea mutante III en TFIIB2 sometida a estrés por deshidratación utilizando Sorbitol. Letras iguales no tiene diferencias significativas y la letra diferentes muestras diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p < 0.05$). $n = 300$

Los resultados de germinación indican que la línea mutante se ve más afectada no solo bajo condiciones de estrés, sino también bajo condiciones normales de crecimiento con respecto a la línea silvestre (Wt). Se observó que el mayor efecto sobre la línea mutante fue bajo estrés salino (Figura 21).

XII.2 Evaluación de los parámetros fisiológicos bajo condiciones de estrés.

Se utilizó la línea mutante MIII crecida en sustrato hasta los 21 días para comenzar los tratamientos de estrés salino (NaCl) durante dos semanas y evaluar los parámetros de cuantificación de clorofila, cuantificación del contenido de MDA y biomasa.

XII.2.1 Cuantificación de clorofila.

Se llevó a cabo la cuantificación de clorofila en las plantas de la línea MIII y silvestre (Wt) las cuales fueron sometidas a estrés salino durante un periodo de dos semanas. Para este experimento se utilizaron dos concentraciones de NaCl (150mM y 200Mm) (Figura 22). Los resultados muestran que la cantidad de clorofila en las líneas mutantes TFIIB2 son menores tanto para la clorofila a, b y la total (a+b) este efecto podría estar sucediendo debido a la interrupción del transcrito en el gen TFIIB2 el cual al estar reprimido impide la regulación de los genes regulados por el mismo.

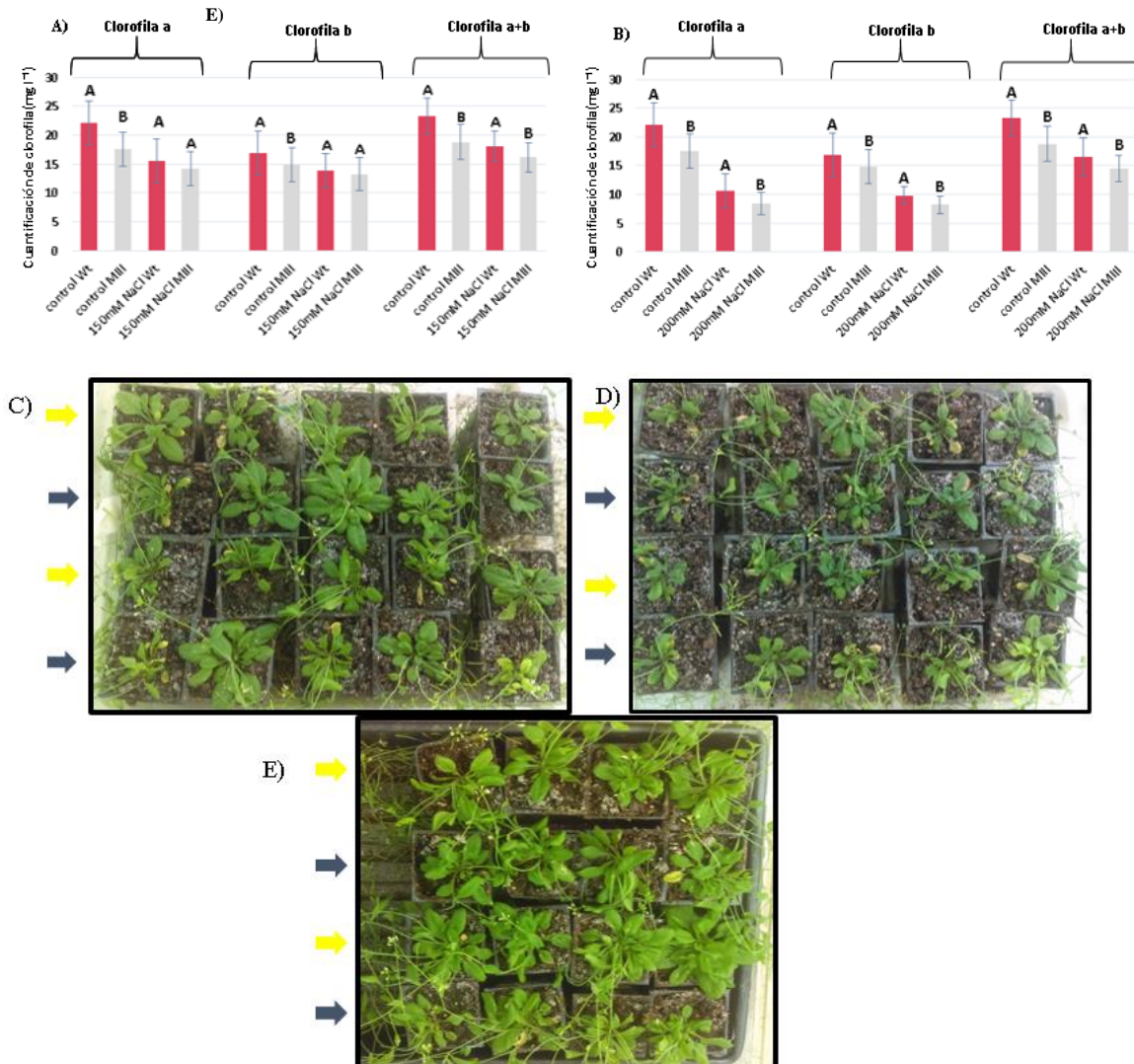


Figura 22.- Cuantificación de clorofila en *A. thaliana* (MIII y Wt). **A)** Cuantificación de clorofila a, b y total en plantas sometidas a estrés salino (150mM NaCl). **B)** Cuantificación de clorofila a, b y total en plantas sometidas a estrés salino 200mM. **C)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino 150mM. **D)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino 200mM. **E)** Aspecto de las líneas sin estrés (control) Letras iguales no muestran diferencias significativas y la letra diferentes muestras diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n=5$. Las plantas fueron colocadas en la charola de manera intercalada las flechas amarillas indican la línea silvestre (Wt) y flecha azul indican la línea mutante.

XII.2.2 Prueba de peroxidación de lípidos (Contenido de MDA).

La cuantificación de MDA residuo proveniente de la peroxidación de lípidos por el efecto del estrés en plantas mostró una mayor cantidad de MDA en la línea mutante MIII *versus* la silvestre Wt, la mayor cantidad la obtuvo en 200mM de NaCl con 60nmolMDA y la Wt con 20nmolMDA, mostrando diferencias significativas en cada tratamiento.

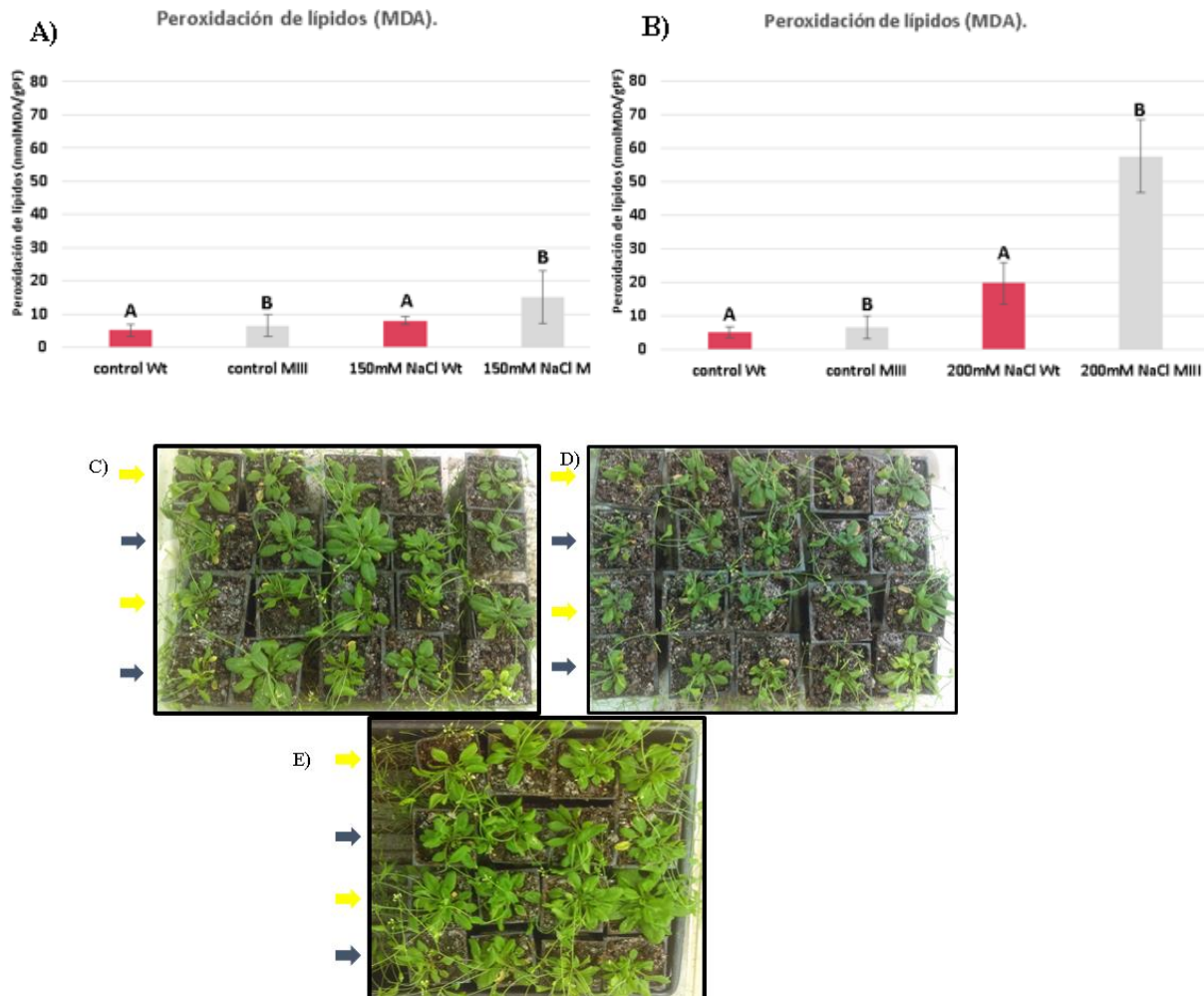


Figura 23.- Cuantificación de malondialdehído (MDA) a los 34 días de tratamiento **A)** Contenido de MDA en las plantas sometidas a estrés salino (150mM NaCl). **B)** Contenido de MDA en las plantas sometidas a estrés salino (200m NaCl) **C)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino (150mM). **D)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino 200mM. **E)** Aspecto de las líneas sin estrés (control). Letras iguales no muestran diferencias significativas y la letra diferentes muestras diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n = 5$. Las plantas fueron puestas en la charola de manera intercalada las flechas amarillas indican la línea silvestre (Wt) y las azules la línea mutante.

XII.2.3 Cuantificación de biomasa.

Al finalizar los tratamientos de estrés salino en la línea mutante TFIIB2 y Wt, se realizó la cuantificación de biomasa en peso fresco y peso seco de ambas líneas. La línea mutante disminuye la producción de biomasa bajo condiciones de estrés y en condiciones normales de crecimiento con respecto a la línea silvestre, MIII mostró 1g de peso fresco y la línea silvestre Wt 2g de peso fresco, siendo lo doble de la mutante MIII en el experimento sin estrés, en peso seco la línea silvestre llegó a 0.15g y la mutante MIII sólo 0.08 de peso seco. En condiciones de estrés salino (150mM NaCl) no existe diferencia significativa en el peso fresco en ambas líneas, sin embargo, en peso seco sí hubo diferencias. En 200mM la línea mutante MIII tiene 0.5g de peso fresco y la línea silvestre Wt tuvo 0.9g de peso fresco existiendo una diferencia significativa en ambas líneas, en peso seco la línea MIII tiene 0.05 de PS y la línea silvestre Wt 0.12g en estrés salino (150mM) habiendo diferencias significativas entre las líneas (Figura 24).

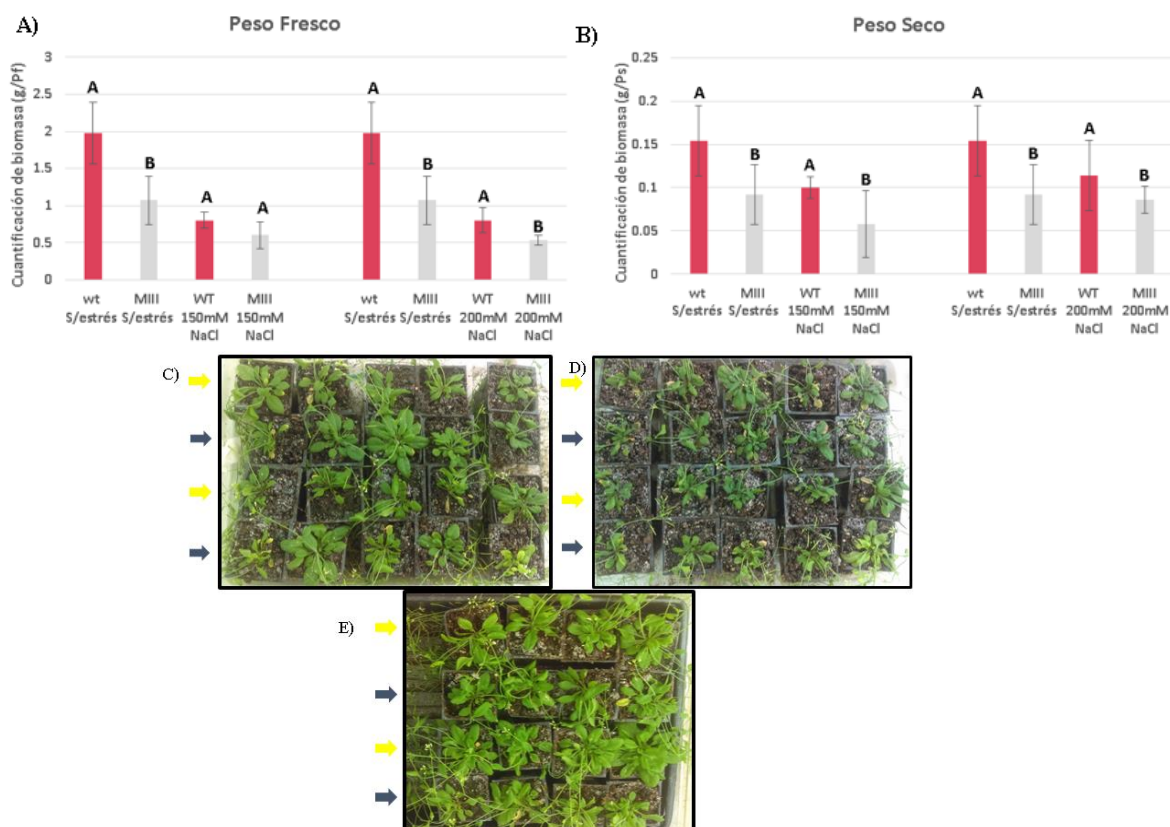


Figura 24.- Cuantificación de biomasa en la línea mutante MIII y silvestre. A) Peso fresco y B) peso seco en plantas de la línea mutante MIII versus la línea silvestre, bajo condiciones normales y de estrés por NaCl. C) Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino (150mM). D) Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino (200mM). E) Aspecto de las líneas sin estrés (control) Letras iguales no muestran diferencias significativas y letras diferentes muestran diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p < 0.05$), $n = 5$. Las plantas fueron puestas en la charola de manera intercalada (flechas amarillas indican la línea silvestre (Wt) y flechas azules la mutante).

XII.3 Medición de diferentes parámetros en la línea mutante BRP4 en plantas adultas bajo condiciones de estrés salino y control.

XII.3.1 Validación molecular de la línea mutante BRP4.

Para los experimentos de estrés salino de las líneas mutantes BRP4 las semillas fueron germinadas en sustrato para ser analizadas por PCR y seleccionar aquellas que amplificaran gen *nptII*, que permite identificar aquellas que portan el transgen debido a la deficiencia de las semillas para ser seleccionadas de manera clásica en medios adicionados con el antibiótico que confiere resistencia. Debido a que el gen *nptII* se metila en algunas mutantes como efecto de la inserción de T-DNA, las líneas pertenecientes a esta mutante tuvieron una nula germinación en medios adicionados con el antibiótico de selección, por lo que fueron crecidas directamente en sustrato, cuando llegaron a las 3 semanas de crecimiento se les realizó un PCR para la amplificación del gen *nptII* y de esta manera identificar y seleccionar aquellas plantas transgénicas para ser evaluadas durante estrés abiótico y a su vez medir parámetros en esta condición (Figura 25).

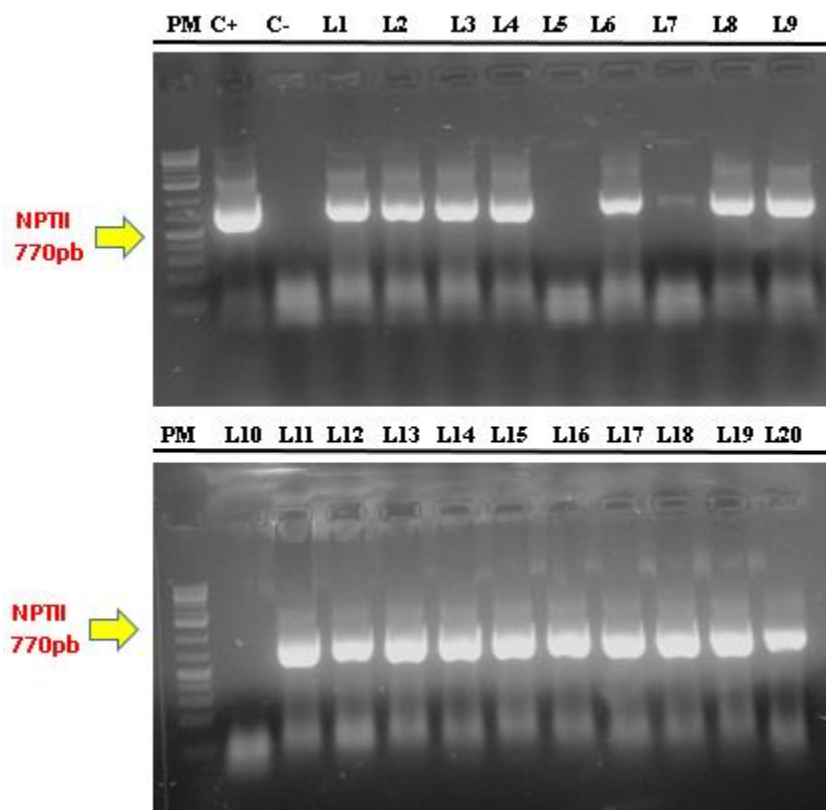


Figura 25.- Amplificación del gen NPTII. Las líneas mutantes BRP4 (L1-L20) fueron analizadas por PCR amplificando del gen marcador de kanamicina (*nptII*) y las líneas que dieron positivo fueron seleccionadas para llevar a cabo las pruebas de estrés. (PM) marcador de peso molecular, (C+) control positivo, (C-) control negativo.

XII.3.2 Cuantificación de clorofila

La síntesis de clorofila en las plantas de la línea BRP4, fue cuantificada después de dos semanas del tratamiento salino (150mM y 200mM), donde se pudo observar la disminución en la concentración de clorofila b en los diferentes tratamientos y con respecto a la línea silvestre, la mayor disminución de clorofila fue en 200mM de NaCl. La línea silvestre tuvo una mayor cantidad de clorofila durante todos los tratamientos, lo que sugiere que la fotosíntesis la mutante es susceptible bajo condiciones de estrés (Figura 26).

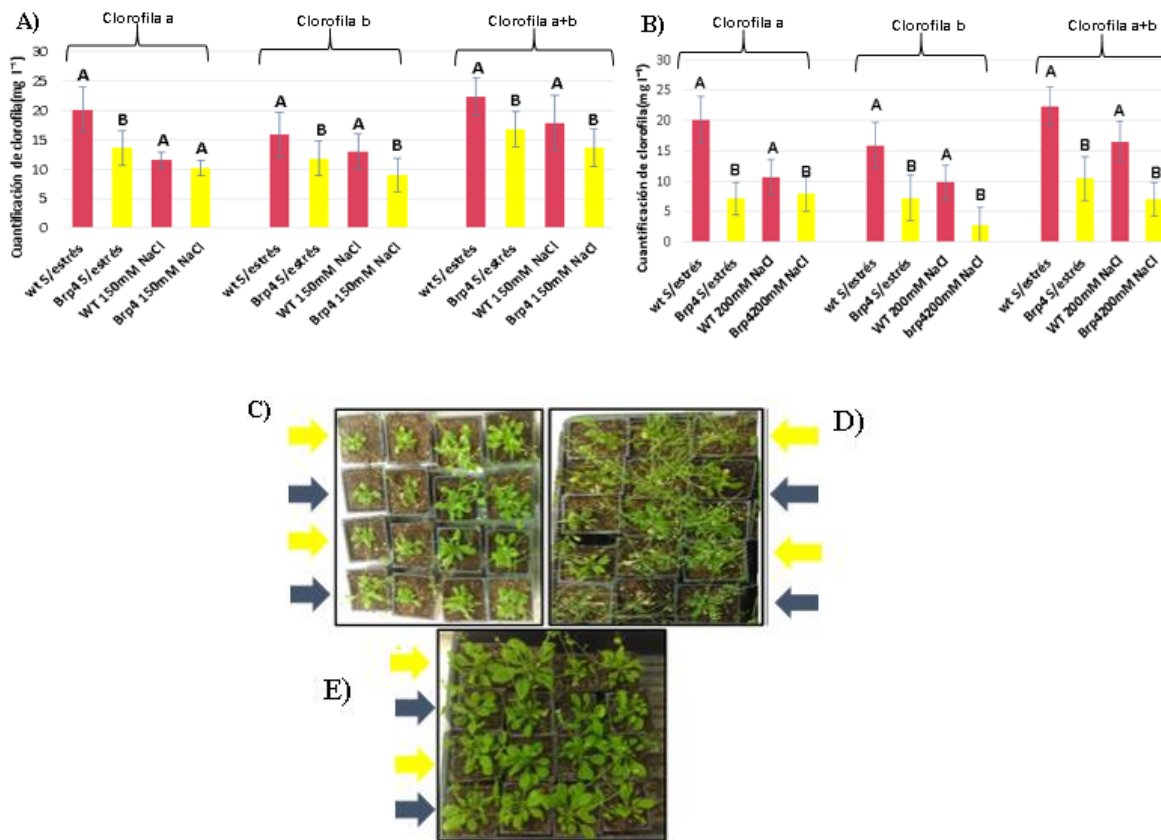


Figura 26.- Cuantificación de clorofila en *A. thaliana* (Mutante BRP4 y Wt). **A)** Cuantificación de clorofila a, b y total en plantas sometidas a estrés salino (150mM NaCl). **B)** Cuantificación de clorofila a, b y total en plantas sometidas a estrés salino 200Mm. **C)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino 150mM. **D)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino 200mM. **E)** Aspecto de las líneas sin estrés (control) Letras iguales no muestran diferencias significativas y la letra diferentes muestras diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n=5$. Las plantas fueron colocadas en la charola de manera intercalada las flechas amarillas indican la línea silvestre (Wt) y flecha azul indican la línea mutante.

XII.3.3 Peroxidación de lípidos (*Contenido de MDA*).

La peroxidación de lípidos en las plantas es una característica importante de la muerte celular hipersensible cuando se encuentran en condiciones de estrés es por ello que evaluar el efecto que provoca el estrés salino en las diferentes líneas mutantes da un indicativo del grado de sensibilidad ante estas condiciones. La prueba colorimétrica se realizó en plantas adultas, después de dos semanas de riego con dos concentraciones de NaCl (150 y 200mM). Los resultados mostraron que la mutante en BRP4 tiene una cantidad de 15-18nmol de MDA lo que indica que la mutante es más susceptible a condiciones de estrés salino. (Figura 27).

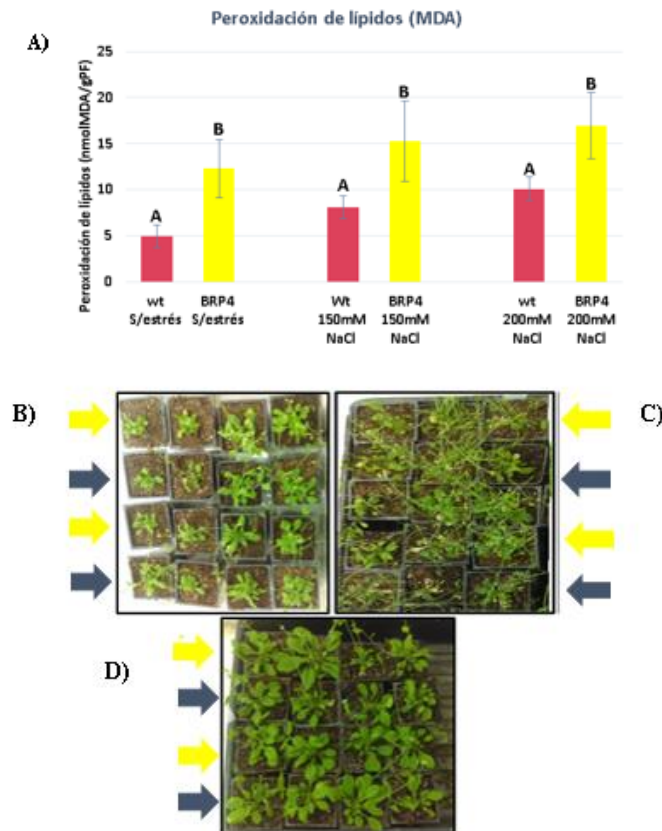


Figura 27.- Cuantificación de malondialdehído (MDA). **A)** Contenido de MDA en las plantas sometidas a estrés salino (150mM NaCl) y contenido de MDA en las plantas sometidas a estrés salino (200m NaCl). **B)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino (150mM). **C)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino 200mM. **D)** Aspecto de las líneas sin estrés (control). Letras iguales no muestran diferencias significativas y la letra diferentes muestras diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p < 0.05$) $n = 5$. Las plantas

fueron puestas en la charola de manera intercalada las flechas amarillas indican la línea silvestre (Wt) y las azules la línea mutante

XII.3.4 Cuantificación de biomasa.

Se llevó a cabo la cuantificación de biomasa (peso fresco y peso seco) en la línea mutante BRP4, en plantas sometidas a estrés salino en el cual se mantuvieron con riegos con diferentes concentraciones de NaCl cada tercer día durante dos semanas. En la línea BRP4 la cantidad de biomasa es menor, indicando que existe una diferencia significativa *versus* la silvestre; en condiciones de estrés y en condiciones normales (Figura 28).

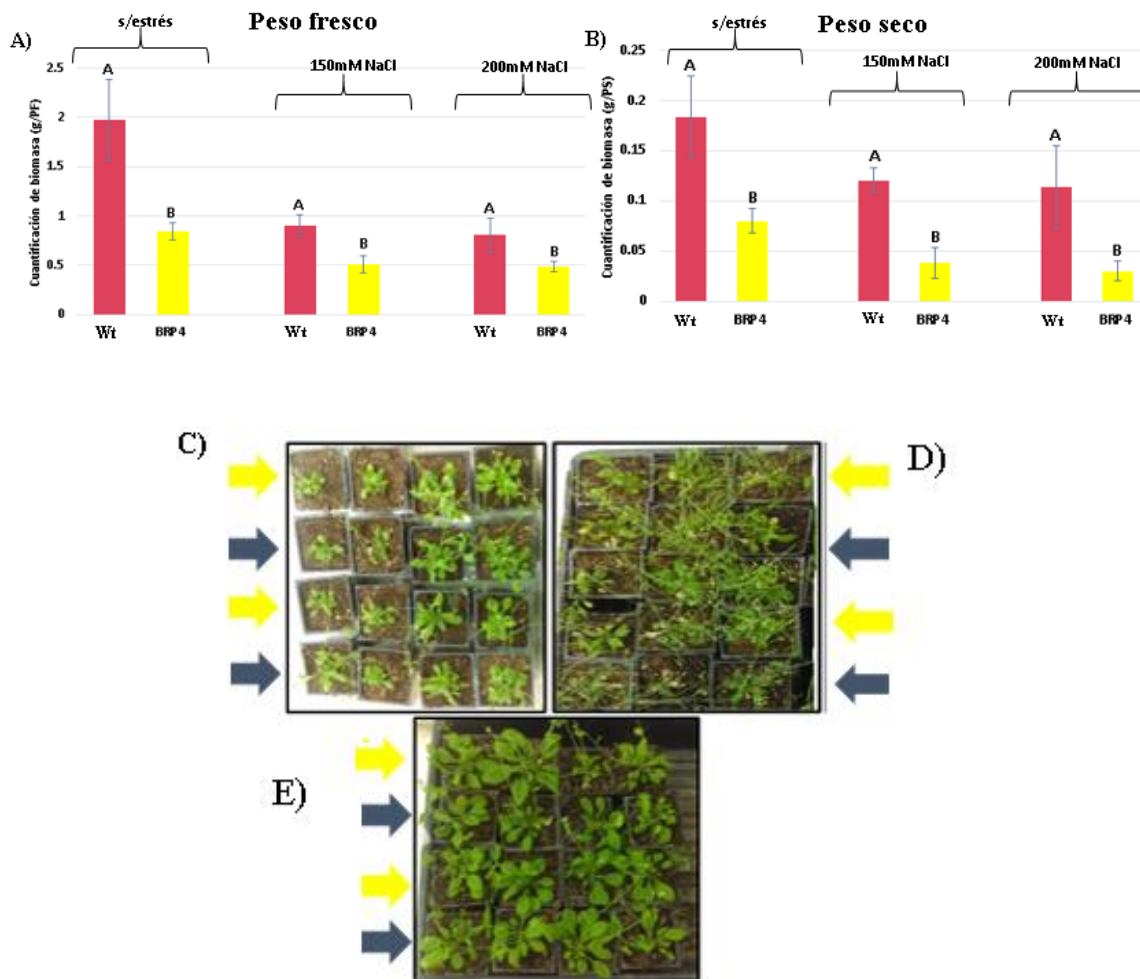


Figura 28.- Cuantificación de biomasa en la línea mutante BRP4 y la línea silvestre.

A) Peso fresco en plantas de la mutante BRP4 *versus* la silvestre WT. **B)** Peso seco en plantas de la línea mutante BRP4 *versus* la línea silvestre Wt. **C)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino (150mM). **D)** Aspecto de las plantas sometidas a estrés salino 200mM. **E)** Aspecto de las líneas sin estrés (control). Letras iguales no muestran diferencias significativas y la letra diferentes muestras diferencias significativas. Prueba de Tukey ($p < 0.05$). $n = 5$. Las plantas fueron puestas en la charola de manera intercalada las flechas amarillas indican la línea silvestre (Wt) y las azules la línea mutante.

XIII.- Análisis transcriptómico de las líneas mutantes TFIIB1 y TFIIB2.

Los resultados mostraron que en ambas líneas hubo una diferencia de expresión en los genes; 367 genes de la mutante TFIIB1, 442 genes de la mutante TFIIB2 se encuentran reprimidos ($\leq 1\text{Log}_2$). De estos genes, 227 genes son únicos para la mutante TFIIB1, 302 genes son únicos para la mutante TFIIB2 y 140 genes se comparten entre ambas líneas mutantes (Figura 29, Tabla 5 en el anexo).

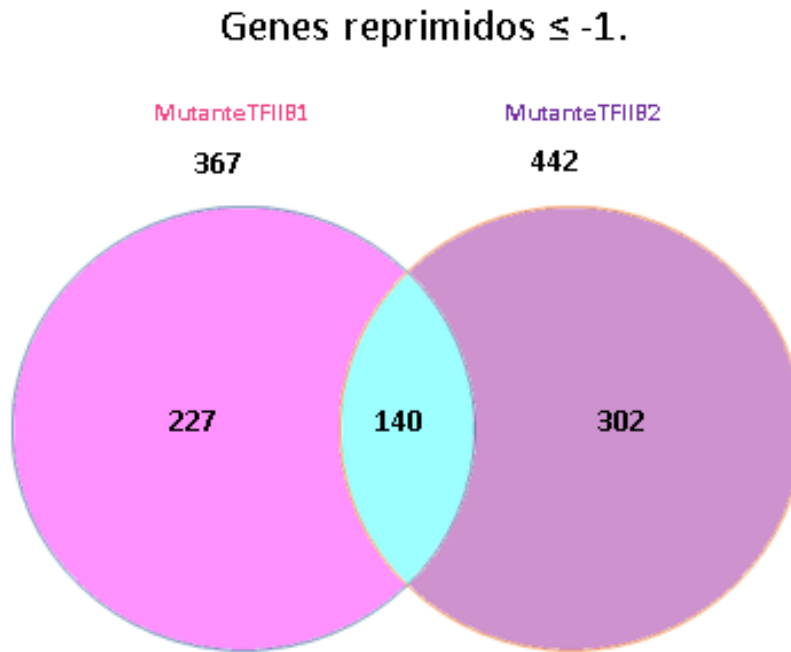


Figura 29.- Análisis de transcriptoma de las mutantes de *A. thaliana* en el factor TFIIB (reprimidos ($\leq 1\text{Log}_2$)) en las líneas mutantes TFIIB1 (rosa) y TFIIB2 (morado) y aquellos genes que comparten entre sí (azul).

Los genes que se encuentran sobreexpresados ($\geq 1\text{Log}_2$) para la mutante TFIIB1 fueron 154 y para la mutante TFIIB2 399 de los cuales 87 genes son únicos para TFIIB1, 332 genes únicos para TFIIB2, y entre ambas líneas 67 genes que se comparten (Figura 30, Tabla 5 en anexo).

Genes sobreexpresados ≥ 1 .

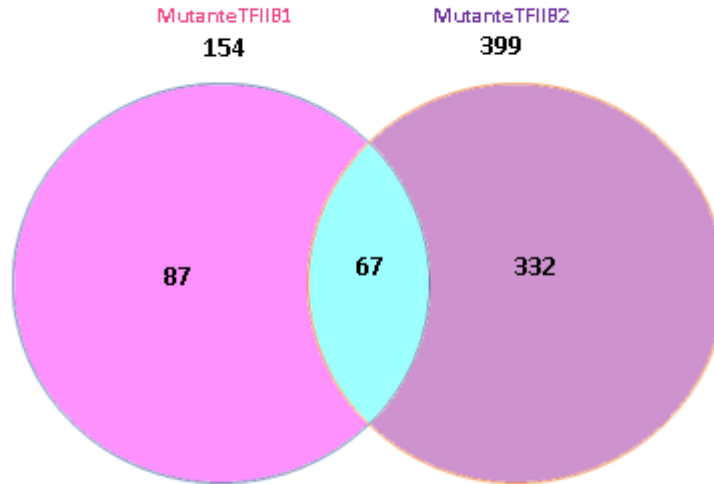


Figura 30.- Análisis de transcriptoma de las mutantes de *A. thaliana* en el factor TFIIB (reprimidos ($\leq 1 \text{ Log}_2$.) en las líneas mutantes TFIIB. (sobreexpresados ($\geq 1 \text{ Log}_2$) en las líneas mutantes TFIIB1 (rosa) y TFIIB2 (morado) y aquellos genes que comparten entre

En la figura 31 se muestra un panorama general de los genes con cambio diferencial de expresión realizado utilizando la herramienta de Mapman para determinar si las mutaciones en TFIIB1 y TFIIB2 regula la respuesta de genes relacionados al estrés biótico y abiótico.

XIII.1.-Análisis mediante RT-PCR de los genes a partir del análisis del transcriptoma de las mutantes en TFIIB1 y TFIIB2.

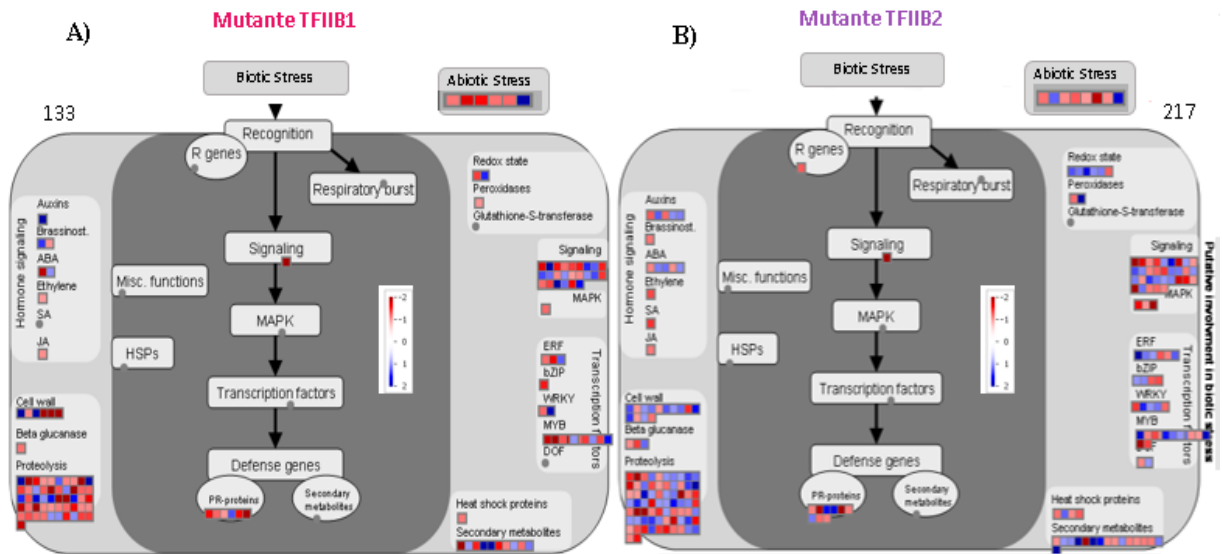


Figura 31.- Panorama general de los genes implicados en la respuesta al estrés biótico y abiótico derivados del transcriptoma de la línea mutante A) TFIIB1 B) TFIIB2 en condiciones normales de crecimiento. Los genes que se encuentran sobreexpresados ($\geq 1 \text{ Log}_2$) y reprimidos ($\leq 1 \text{ Log}_2$) se muestran de color azul y rojo, respectivamente. Los números 133 y 217, corresponden al total de genes que sufrieron cambio en las condiciones analizadas de estrés biótico y abiótico respectivamente.

Se seleccionaron en total cuatro genes, dos en la mutante TFIIIB1 y dos para la mutante en TFIIIB2, se tomaron en cuenta los genes que presentaron los valores más altos de sobreexpresión y represión para validar el resultado obtenido mediante microarreglo. Los genes fueron: NDF5 (At1g55370) y R2R3 (At1g56160) el primero con un valor de sobreexpresión 3.340114327 y el segundo reprimido con un valor de -6.33070, ambos para la mutante TFIIIB1. Para la mutante TFIIIB2 se seleccionaron los genes 4CL (At1g65060) y PKS (At2g34650), el primero sobreexpresados con un valor de 3.92218871 y el segundo gen reprimido con un valor de - 4.4650764. Estos genes fueron analizados mediante la técnica de RT-PCR lo cual permitió corroborar el cambio de expresión de los genes en las mutantes con respecto a la línea silvestre, y los resultados corroboraron el resultado obtenido en los microarreglos (Figura 31, Tabla anexo I y II).

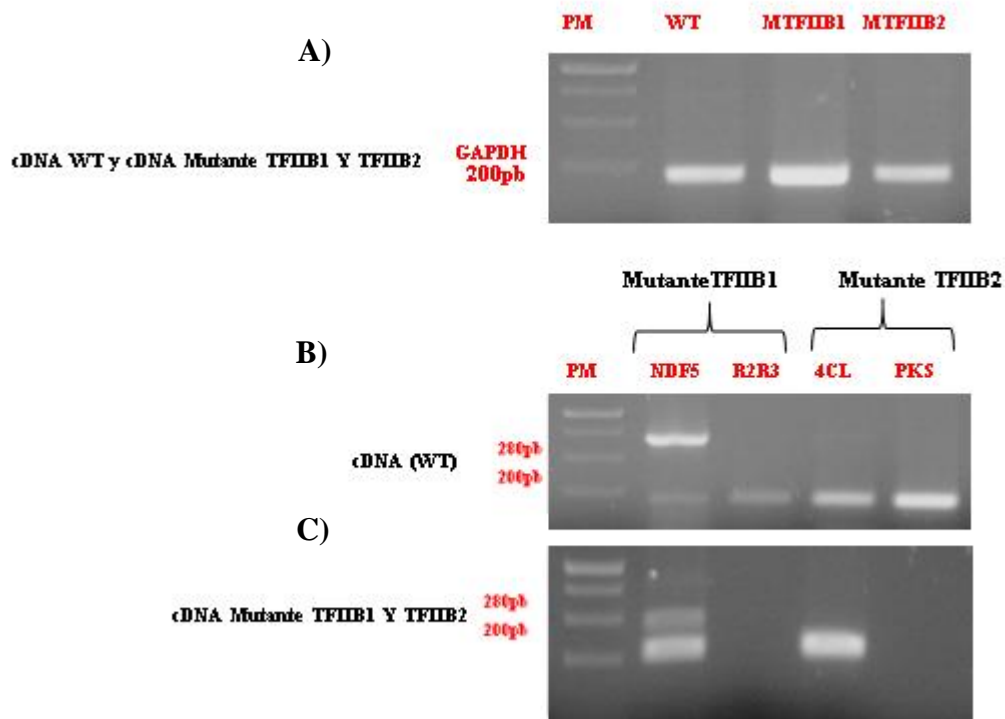


Figura 32.- RT-PCR de los genes sobreexpresados y reprimidos para la mutante TFIIIB1 y TFIIIB2.A) amplificación del gen GAPDH en las líneas mutantes y silvestre. B) amplificación de los genes en la línea silvestre. Pero arriba del gel dice que son mutantes C) amplificación de los genes en las líneas mutantes.

XIII.2 Análisis de expresión del promotor BRP6 y BRP4 con el gen reportero de GUS en plantas de Arabidopsis thaliana.

Para evaluar la expresión BRP6 fueron analizados diferentes tejidos de plantas transformadas con la construcción pBRP6: GUS, sin embargo, mediante la prueba histoquímica en plantas T3 no se observó expresión del promotor BRP6 bajo el reportero de GUS, en semilla (B), plántula (cotiledones y raíz), (C) cotiledones de 6 días (D) raíz (E) silicuas de 36 días de crecimiento (F) flor de 28 días (Figura 33), (A) es un control positivo utilizando una línea transformada con la fusión de GUS bajo un promotor constitutivo, observando la expresión de GUS en hoja. Aún no existen reportes del tejido específico donde se encuentre expresado este gen, por lo que el análisis ha permitido identificar su expresión en tejido floral.

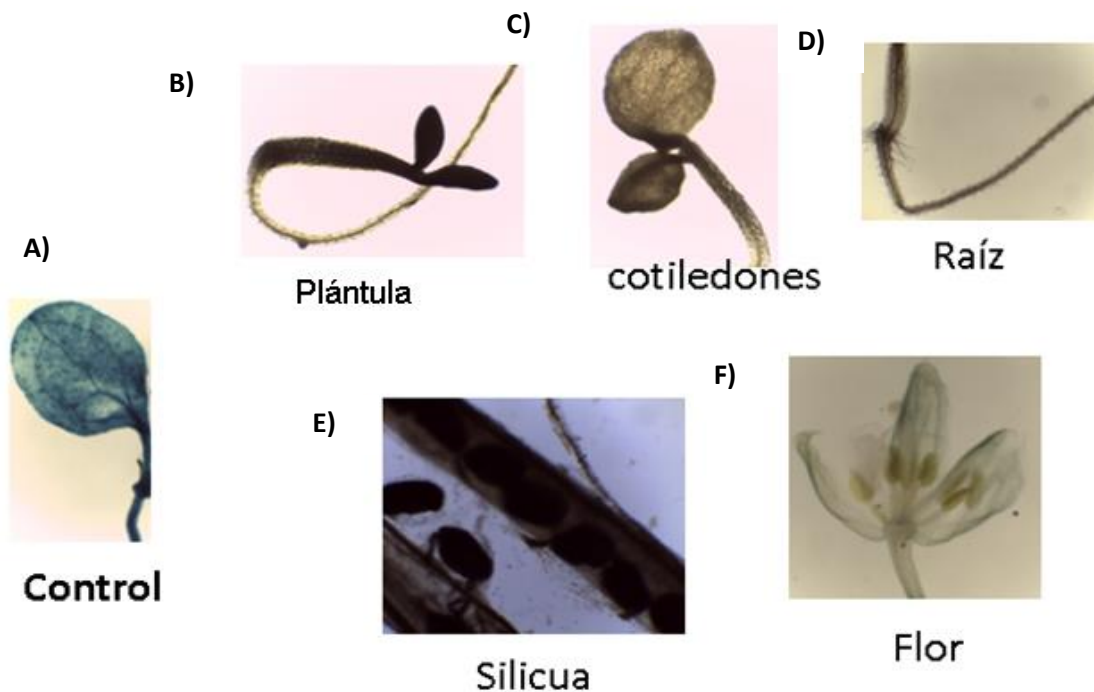


Figura 33.- Localización de GUS en tejidos vegetativos y reproductivos en plantas de *Arabidopsis thaliana*. (A-F) Análisis de la expresión de BRP6 bajo el reportero GUS utilizando un microscopio compuesto. **A)** control con un promotor constitutivo **B)** plántula de 3 días de crecimiento, **C)** cotiledones de 6 días de crecimiento, **D)** raíz de 6 días de crecimiento **E)** flor en plantas de 28 días de crecimiento, **F)** silicua de 36 días de crecimiento.

Para evaluar la expresión de BRP4 fueron analizados diferentes tejidos de plantas transformadas con la construcción pBRP4GUS, mediante la prueba histoquímica en plantas T3 se observó expresión de BRP4 bajo el reportero de GUS, en tejidos florales, lo que concuerda con los reportes que existen sobre el gen BRP4 que se expresa en tejidos reproductivos. Sin embargo, en plantas T3 de *A. thaliana* con la construcción de pBRP4GUS en semilla y radícula (B), cotiledones (C), raíz (D) estambres y (E) silicua (Figura 34), no mostraron actividad de GUS. (A) es un control positivo de la prueba histoquímica utilizando un promotor constitutivo, observando la expresión de GUS en hoja.

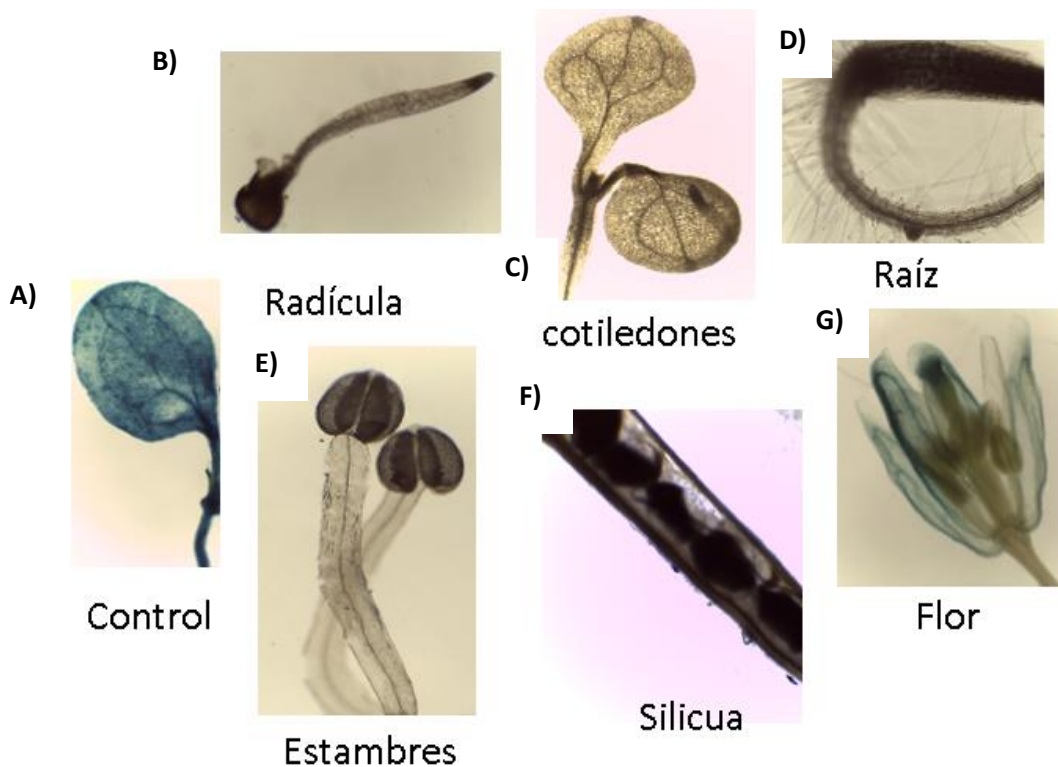


Figura 34.- Localización de GUS en tejidos vegetativos y reproductivos en plantas de *Arabidopsis thaliana*. (A-G) Análisis de la expresión de BRP4 bajo el reportero GUS utilizando un microscopio compuesto. A) control con un promotor constitutivo B) semilla y radícula, C) cotiledones 6 días de crecimiento, D) raíz 6 días de crecimiento E) estambres en plantas de 28 días F) silicua de 36 días de crecimiento G) flor en plantas de 28 días de crecimiento.

XIV Discusión

Knutson (2013), reporta para *A. thaliana* una familia génica del factor general de la transcripción TFIIB integrada por diversos miembros (TFIIB, Brf, BRP, Rrn7/TAF1B/MEE12) que participan en el proceso de transcripción. Estudios realizados en diferentes organismos demuestran que este factor general de transcripción está involucrado en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico por ejemplo; frutos de *Citrus clementina* en la cual los productores para darle una mayor vida en el anaquel les dan un choque térmico en los frutos y se observó que TFIIB estaba altamente expresado bajo estas condiciones de estrés abiótico lo que probablemente podría estar indicando que se encuentra involucrado en respuesta a condiciones adversas desfavorables en las plantas (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003). Zhou y colaboradores (2013), reportaron que TFIIB1 desempeña un papel importante en el crecimiento del tubo polínico y desarrollo del endospermo, lo que significa que está involucrado principalmente en aspectos del desarrollo en plantas. Jaime-Gallardo en el 2015, llevó a cabo la caracterización de un par de mutantes por inserción de T-DNA en la región promotora y en la región codificante del gen *TFIIB1*, la información que arrojó el análisis de estas mutantes fué su particular sensibilidad a estrés abiótico ya que las plantas crecidas en estrés salino fueron susceptibles, demostrando que efectivamente la mutación en TFIIB1 afecta el crecimiento y desarrollo de las líneas mutantes con respecto a la línea silvestre (Wt). En el presente estudio se evaluaron las líneas mutantes por inserción de T-DNA en TFIIB2 y BRP4 (AT3G10330, AT3G57370) miembros pertenecientes a la familia génica TFIIB, bajo diferentes condiciones de estrés abiótico; además se analizó el transcriptoma de la línea silvestre versus la mutante TFIIB2 (MIII) y la mutante TFIIB1 (M698c) la primera con una inserción de T-DNA en el cuarto exón del gen y la segunda mutante con la inserción en el primer exón. Ambas mutantes mostraron un cambio diferencial de expresión, de los genes reprimidos ≤ 1 en TFIIB1 fueron 367 mientras que la mutante TFIIB2 fueron 442 genes, de los cuales 140 genes se comparten entre las dos mutantes y 227 genes son únicos para TFIIB1 y 302 genes únicos para TFIIB1. Con respecto a la sobreexpresión, 154 genes estaban sobreexpresados en la mutante TFIIB1 y 399 genes están sobreexpresados en la mutante en TFIIB2, de los cuales 87 son únicos para la mutante TFIIB1, 332 para la mutante TFIIB2, y solo 67 genes son compartidos entre ambas mutantes. Para la caracterización de la línea mutante TFIIB2 se evaluaron parámetros como la germinación (Valor de germinación) de las semillas en condiciones de estrés abiótico. En la línea mutante TFIIB2 (MIII) muestran que las semillas de esta línea tienen un valor de germinación menor en todos los tratamientos respecto a la silvestre lo que probablemente la inserción de T-DNA en TFIIB2 la hace más susceptible a condiciones de estrés salino (NaCl) y choque osmótico (Sorbitol). Sin embargo, el perfil transcriptómico mostró que dentro de los genes que tienen una regulación negativa (reprimidos) y que están involucrados en la germinación de la semilla fueron aquellos que participan en el metabolismo de carbono y en vías de señalización por hormonas, por ejemplo; genes como *ATSP2* (AT3G52340) involucrado en la biosíntesis de sacarosa, glucosa y fructosa, existiendo reportes de que los azúcares modulan vías de señalización por hormonas como

ABA, SA, y Ácido Giberélico (AG), hormonas que a su vez dan lugar a la regulación de genes involucrados en la germinación (tabla 5 en el anexo) El AG promueve la germinación, y se ha reportado que mutantes deficientes en la síntesis de esta hormona su germinación se ve afectada (Osuna *et al.*, 2015), esta desregulación de genes podría estar afectando la germinación en las líneas mutantes de TFIIB2 (MIII). Los estudios anteriormente realizados en la mutante TFIIB1 demuestran que posee una deficiencia en la germinación con respecto a la silvestre (Jaime-Gallardo, 2015); sin embargo, el perfil transcriptómico no muestra un cambio diferencial de expresión dentro de los genes involucrados en la regulación de la germinación. Otro de los parámetros que fueron evaluados en esta mutante fue la biomasa y que correlaciona con la cantidad de genes involucrados en la maquinaria de la síntesis de proteínas (58 genes ≤ 1) y en la desregulación de genes involucrados en la fotosíntesis, lo que podría estar impidiendo la síntesis de moléculas (azúcares) como fuente de energía. En las líneas TFIIB2 Y BRP4 se pudo observar que las mutantes tuvieron una tendencia general en la disminución del contenido de clorofilas con respecto a la silvestre, la clorofila es un contenido importante en la maquinaria fotosintética La vía metabólica de la clorofila se puede dividir en tres fases distintas, (1) síntesis de la clorofila a del glutamato; (2) interconversión entre clorofila a y b (ciclo clorofila); y (3) degradación de la clorofila a en un catabolito de clorofila no fluorescente. La síntesis y la actividad de las enzimas implicadas en la vía metabólica de la clorofila están estrictamente reguladas de una manera específica del tiempo, del desarrollo. Las clorofilas se asocian con proteínas de unión a clorofila de los complejos de fotosistema I (PSI) y II (PSII) acumulándose en tejidos, la mutante BRP4 también presenta una susceptibilidad parecida al de la mutante TFIIB2 ya que se pudo observar que la línea es susceptible bajo estrés abiótico, los resultados de este hecho pudo estar asociado con la habilidad de la planta para optimizar su capacidad fotosintética debido a que la línea silvestre (control) y a su vez el funcionamiento de la planta está siendo normalmente regulada, esta correlación no siempre es generalizada y puede ser variable por efectos de factores ambientales (estrés biótico y abiótico) que suelen incrementar las tasas fotosintéticas hasta el punto de la desnaturalización de enzimas y la destrucción del fotosistema, ya que este parámetro se usa como un indicador sensitivo de la eficiencia fotosintética PSII y cuando los valores de las clorofilas se ven disminuidos puede haber un daño en el aparato fotosintético por todos los factores que causan inhibición de los centros de reacción de los fotosistemas o de la baja cantidad de clorofila, dentro de los genes involucrados en la fotosíntesis en el transcriptoma fueron At1g14150, At5g64040 At1g20340, At4g32590 los cuales son genes que están reprimido <1y son genes que codifican para el funcionamiento del fotosistema II (Tabla 5 en el anexo). Existen reportes aun no publicados por nuestro grupo de trabajo que indican que el factor TFIIB1 genera un producto de splicing alternativo por retención del tercer intrón, lo cual genera un codón de paro prematuro bajo condiciones de estrés. Estos datos estarían indicando que TFIIB1 tiene un efecto regulatorio bajo estrés abiótico. Zhou y colaboradores en el 2013, demostraron que el fenotipo observado en la deficiencia del crecimiento del tubo polínico en las mutantes puede ser restaurado completamente mediante la expresión de TFIIB2 dirigido por el promotor de TFIIB1, por lo que se podría pensar que en ausencia de la expresión del gen

TFIIB1 actuara en su lugar TFIIB2 de manera complementaria y estuviera llevando la función y que el efecto de las mutantes TFIIB2 no se vea un efecto negativo en condiciones normales de crecimiento; pero que en condiciones de estrés sea deficiente la participación de TFIIB1, y requiera a TFIIB2. Cabe mencionar que TFIIB2 en el genoma de *Arabidopsis thaliana* tiene el 85% de homología en secuencia a nivel de proteína con TFIIB1 Knutson y Hahn., 2013, interesantemente reporta que estos dos factores de transcripción pudieran estar actuando de manera cooperativa. Con respecto al análisis de la regiones promotoras, se localizaron elementos en *cis* como los MYB, NAC, AP2/ERF, DRE que están involucrados en respuesta a estrés biótico y abiótico, lo que permite dar una idea de la importancia que tienen los diferentes genes (TFIIB1, TFIIB2 y BRP4) para ayudar a regular bajo condiciones de estrés y el análisis de las mutantes valida que aquellas que la inserción está en la región codificante afecta tanto la transcripción cuando la inserción este en la región promotora o la traducción si está en la región codificante, viéndose reflejado en el perfil transcriptómico de ambas mutantes que por ello en algunas líneas el efecto negativo sea mayor, estudios anteriormente realizados donde la inserción estaba en TFIIB1 tanto en la región codificante como en la región promotora se pudo observar que a nivel de transcrito (RT-PCR) disminuía la expresión del gen TFIIB1 comparada con la silvestre y que sin embargo la mutante que tenía la inserción de T-DNA en la región codificante estaba siendo mayormente susceptible bajo condiciones de estrés, dentro de los genes que están involucrados en estrés abiótico y biótico se encuentran reprimidos.

XV Conclusiones

Los elementos en *cis* en la región promotora de TFIIB2 desempeñan un papel importante en la regulación de genes involucrados en estrés abiótico como los DRE, NAC, WRKY, AP2/ERF, MYB, MYC, bZIP y GATA.

La línea mutante TFIIB2 es sensible al estrés salino (NaCl) y estrés osmótico (Sorbitol), lo que provoca una disminución en el contenido de clorofila y biomasa en las plantas.

El transcriptoma de las líneas mutantes TFIIB1 Y TFIIB2 muestra que ambos factores de transcripción participan en la regulación de genes involucrados con la respuesta al estrés, hormonas, señalización, respuestas metabólicas.

Los genes BRP4 y BRP6 se expresan específicamente en tejidos florales en condiciones normales de crecimiento

XVI PERSPECTIVAS

Realizar el análisis del transcriptoma de las mutantes TFIIB1 y TFIIB2 de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico.

Realizar el análisis de la expresión espacio-temporal de los genes TFIIB1 y TFIIB2 mediante fusiones transcripcionales.

XVII BIBLIOGRAFIA.

Abramovitch B. R y Martin B. G. (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Plant Biology* 7: 356–364.

Atkinson N J y Urwin E P., (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.*10:3523-3543.

Bartels D, Sunkar R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Rev. in Plant Sci* 24:23-58.

Bhatnagar-Mathur P, Kiran V. V. Sharma K. (2008) Evaluation of transgenic groundnut lines under water limited conditions. *Plant Cell Rep* 27:411–424.

Baldoni E, Genga A y Cominelli E (2016) Factores de transcripción MYB planta: su papel en los mecanismos de respuesta a la sequía. *Int J Mol Sci* 7: 15811-15851.

Bruce W.B., G.O. Edmeades, y T.C. Barker. 2002. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 13-25.

Busk P. K y Pages M. (1993). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plnt Mol. Biol.* 37:425-435.

Capella M, Re A. D. L, Arce L. A y Chan L. R (2014). Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB. *Plant Cell Rep* 1576-1579

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. *Plöse One* 2:6

Cao, F. Y; Yoshioka, K; Desveaux, D. (2011). The roles of ABA in plant- pathogen interaction. *Journal Plant Research*, vol. 124: 489-499.

Deng W. y Roberts S. G. E. (2007) TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II. Springer link 116: 417.

FAO (Food, Agriculture Organization of the United Nations) (2004) FAO production yearbook. FAO, Rome

Gibson, T. Thompson D. Blocker A. Kouzarides T. (1994) Evidence for a protein domain superfamily shared by the cyclins, TFIIB and RB/p107. Nucl. Acids Res Vol. 22:946-952.

Guan-Hua H., Ji-Yuan Xu., Yan-Xia Wang., Jia-Ming L., Pan-Song L., Ming C., Y., Zhi Ma., Zhao-Shi X., (2016). Drought-responsive WRKY transcription factor genes *TaWRKY1* and *TaWRKY33* from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 16:116.

Grant M. O. (2012). Understanding and Exploiting the Impact of Drought Stress on Plant Physiology. Parvaiz, A. and Prasad, M. N. V. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the Era of climate change. *Springer, pp:89-104.*

Hahn S. y Roberts S. (2013) The zinc ribbon domains of the general transcription factors TFIIB and Brf: conserved functional surfaces but different roles in transcription initiation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 206:667-6497.

He Q, Jones Don C, Li W, Ma J X F, Sun, Wang Q, Zhu S y Zhang B (2016). Genome-Wide Identification of R2R3-MYB Genes and Expression Analyses during Abiotic Stress in *Gossypium raimondii*. *Sci. Rep.* 6:22980.

Hobo T., Kowyama Y, Hattori T. (1999). A Bzip factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:15348-15353

Hong Y., Zhang H., Huang L., Li D., y Song F (2016) Overexpression of a Stress-Responsive NAC Transcription Factor Gene ONAC022 Improves Drought and Salt Tolerance in Rice. *Front. Plant Sci.* 7:4.

Huang, G. T; Ma, S. L; Bai, L. P; Zhang, L; Ma, H; Jia, P; Liu, J; Zhong, y M. Guo, Z. F. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stress in plants. *Molecular biology reports*, vol. 39(2):969-987.

Imamura S. Hanaoka M. Tanaka K. (2008) The plant –specific TFIIB-related protein, pBrp, is a general transcription factor for RNA polymerase I. *The EMBO Journal* 27:2317-2327.

Jaime-Gallardo DJ. (2015) Análisis genómico-funcional de la mutante de *Arabidopsis thaliana* en el factor de transcripción TFIIB1. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas-UAEM.

Karan R. y Subudhi K. P. (2012). Approaches to Increasing Salt Tolerance in Crop Plants. Parvaiz, A. and Prasad, M. N. V. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the Era of climate change. Springer, pp:62-68.

Knutson A. B (2013) Emergence and expansion of TFIIB-like factors in the plants kingdom. *Gene* 526:30-38.

Knutson A. B. y Hahn S (2013) TFIIB-related factors in RNA polymerase I transcription. *Biochimica et Biophysica Acta* 1829:265-273.

Koiwa H., R.A. Bressan y P.M. Hasegawa. (2006). Identification of plant stress-responsive determinants in *Arabidopsis* by large-scale forward genetic screens. *Journal of Experimental Botany* 57(5): 1119–1128.

Lagrange T, Hakimi M. A, Pontier D, Courtois F, Alcaraz J. P, Grunwald D, Lam E, Lerbs-Mache S (2003) Transcription factor IIB (TFIIB)-related protein (pBrp), a plant-specific member of the TFIIB-related protein family. *Mol Cell Biol.* 9:3274-86.

Laluk, K. y Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: Wanton destruction or convert extortion. *The Arabidopsis book*, vol. 1-34.

Marcelo N. do A., Luis W. P. A., Letícia C. B., Rodrigo D., Daniel da R. F., Solange F. da S. S. Antonio C. de O., Luciano C. da M., Eugenia J. B. B. (2016) Comparative transcriptomics of rice plants under cold, iron, and salt stresses. *Funct Integr Genomics*, págs: 1-13.

Moënnelocoz, Y; Mavingui, P; Combes, C; Normand, P. y Steinberg, C. (2015). Microorganisms and biotic interactions. In: *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications: Microbial Ecology*, pp 395-445

Moreno P. L (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. *Una revisión. Agronomía Colombiana* 27(2):79-191.

Nicolov D., Chen, H. Halay, E., Usheva, A., Hisatake, K, Lee D., Roeder, R. Burley S. (1995) crystal structure of a TFIIB-TBP-TAT- element ternary complex. *Nature* 377:119-128.

Pinto I. Ware D. Hampsey. M. (1992) The yeast SUA7 gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo. *Cell* 68:977-988.

Qin Z, Zhang X, Zhang X, Xin W, Li J, Hu Y (2014) The Arabidopsis transcription factor IIB-related protein BRP4 is involved in the regulation of mitotic cell-cycle progression ,during male gametogenesis. *J Exp Bot* 9:2521-31.

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K y Tran Lam-Son P (2014) Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci* 5: 86.

Robles C. A. A (2007) Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología* 14:253-262.

Shen Q, Zhang P, Ho T. H. D. (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of genes expression in barley. *Plant Cell* 8:1107-1119.

Singh S, Grover A Y Nasim M. (2016). Biofuel Potential of Plants Transformed Genetically with *NAC* Family Genes. *Front. Plant Sci.* 7:22.

Shu Y, Liu Y, Zhang J, Song L y Guo C (2016) Genome-Wide Analysis of the AP2/ERF Superfamily Genes and their Responses to Abiotic Stress in *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci.* 6:1247.

Ueda M., Tsutsumi N., Fujimoto M. (2016). Salt stress induces internalization of plasma membrane aquaporin into the vacuole in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (474) 742-746.

Vijayakumar H., Thamilarasan SK., Shanmugam A., Natarajan S., Jung HJ., Park JI., Kim H., Chung MY., Nou IS., (2016). Glutathione Transferases Superfamily: Cold-Inducible Expression of Distinct GST Genes in Brassica oleracea. *Int J Mol Sci.* 17(8).

Verma, V; Ravindran, P. y Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BioMed Central Plant Biology*, vol. 16:86.

Verma, S; Nizam, S. y Verma, P. K. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plant. Sarwat, M. and Ahmad, A. In: Stress signaling in plants: Genomics and proteomics perspective. *Springer*, vol (1):25-50.

Wang D., Yu Y., Liu Z., Li S., Wang Z., Xiang F., (2016). Membrane-bound NAC transcription factors in maize and their contribution to the oxidative stress response. *Plant Sci* 250:30-9.

Wang H, Wang H, Shao H and Tang X (2016). Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. *Front. Plant Sci.* 7:67.

Wang, L; Wang, C; Qin, L; Hu, P. y Wang, Y. (2016). ThERF1 from *Tamarix hispida* confers decreased tolerance to oxidative and drought stress and is regulated by a WRKY protein. *Journal of Forestry Research*, vol. 27(4):767-772.

Xu, Z.-S; Chen, M; Li, L. C. y Ma, Y.-Z. (2008). Functions of the ERF transcription factor family in plants. *Botany*, vol. 86: 969-977.

Ya Y, Ding Y, Jiang Q, Wang F, Sun J, Zhu C (2016). The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Rep* pp 1-8 DOI 10.1007/s00299-016-2084-x.

Zhou JJ, Liang I, Niu QK, Chen LK, Zhang XQ y Ye D (2013). The *Arabidopsis* general transcription factor TFIIB1 (AtTFIIB1) is required for pollen tube growth and endosperm development. *Journal of Experimental Botany* 64: 2205–2218.

XVIII.-ANEXO I

MUTANTE MIII

Tabla 5.- Genes que tuvieron un cambio de expresión ≤ 1 y ≥ 1 en la línea mutante en TFIIB2 (MIII).

ID	Nombre	Cambio de expresión (Log2).	Función
Genes sobreexpresados			
at1g65060	4CL. CoA-ligasa.	3.92218871	Involucrada en la vía general de finilpropanoide
at1g21310	(ATEXT3) Extensina 3.	1.3111101	Constituyente estructural de la pared celular.
at2g37770	(AKR4C9) Aldo-keto reductasa	1.3785812	Procesos metabólicos de óxido reducción y responden a estrés por frío y sal.
Señalización por hormonas			
at2g37770	(AKR4C9) Aldo-keto reductasa	1.3785812	Procesos metabólicos de óxido reducción y responden a estrés por frío y sal
at1g31070	N-acetilglucosamina-1-fosfato que cataliza la formación de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc).	1.3471642	Involucrado en el desarrollo embrionario que termina en latencia de la semilla, desarrollo del saco embrionario, proceso metabólico y desarrollo del polen.
at5g66430	S- adenosil	1.4411917	Señalización.
Proteólisis			
at4g03370	Proteína de la familia ubiquitina.	1.0865482	Proceso de proteólisis.
at5g22920	Proteína de la superfamilia RING.	1.8541425	Proceso proteolítico.
at5g51530	Proteína ubiquitina carboxyl-terminal hydrolas.	1.2148288	Proteólisis.
at4g03370	Proteína de la familia ubiquitina.	1.0865482	Proceso de proteólisis.

at2g32790	Proteína de la familia ubiquitina.	1.4290173	Proceso de proteólisis.
at5g02880	Proteína ligasa 4.	3.0683148	Codifica una ubiquitina-proteína ligasa que contiene un dominio HECT.
at5g22920	Proteína de la superfamilia RING.	1.8541425	Proceso proteolítico.
at3g05670	Proteína RING.	1.0061593	Proceso proteolítico.
at3g14970	Proteína de la superfamilia RING / U-box.	1.0152543	Proceso proteolítico.
at5g60820	Proteína de la superfamilia RING / U-box	1.1858947	Proceso proteolítico.
at2g31780	Proteína de la superfamilia RING / U-box.	1.0655284	Proceso proteolítico.
at3g54360	NCA1, actividad no catalasa 1.	1.5221637	Codifica un chaperón de catalasa que es esencial para la actividad de la catalasa. Requerido para múltiples respuestas de estrés.
at1g60610	Proteína de la familia SBP.	1.075057	Proteína de unión a ribonucleasa S.
at3g15070	TEAR2, TIE1-ASSOCIATED 33 RING-TYPE E3 LIGASE 2.	1.0177698	Codifica una ligasa E3 de tipo RING que regula positivamente la actividad de TCP tipo CIN para promover el desarrollo de la hoja mediando la degradación del represor TCP TIE1.
Señalización.			
at1g51830	Proteína quinasa repetida rica en leucina.	1.0764539	Involucrada en el transporte intracelular.
at2g27030	Codifica una calmodulina que tiene mayor afinidad por la proteína motora que se une a la calmodulina tipo kinesina CAM4 o CAM6.	1.7524916	Involucrada en el transporte intracelular.

at3g43810	La proteína del dominio de HAND-EF codifica una calmodulina.	1.0084538	Involucrado en procesos biológicos, específicamente en la raíz.
at5g53010	ATPasa transportadora de calcio.	1.3540268	Involucrado en procesos biológicos, específicamente en la raíz.
at4g28600	codifica una proteína de unión a calmodulina que se expresa en polen.	1.1005769	Unión a calmodulina.
at2g29700	Codifica una proteína que contiene un dominio de PH.	1.2058377	Involucrada en la transducción de señales.
at1g21920	Histona H3 K4-metiltransferasa específica, proteína de la familia SET7 / 9.	1.1814382	Involucrada en la metilación y fosforilación.
at1g30960	Proteína de la familia de fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa.	1.0647309	Involucrada en la metilación y fosforilación.
Proteólisis			
at4g33210	Proteína (SLOMO).	1.0015674	Codifica SLOMO una proteína F-box necesaria para la homeostasis de la auxina y el tiempo normal de iniciación del órgano lateral en el meristemo de los brotes.
at5g56370	Proteína que contiene dominios F-box / RNI-like / FBD-like	1.4455075	Involucrada en el proceso de desarrollo de las plantas.
at2g33655	Proteínas con dominio asociados a F-box.	1.3794439	Función desconocida.
at2g05410	Dominio de MATH .	1.165616	Función desconocida.
at2g22310	ATUBP4, proteasa 4	1.3114923	Codifica una proteasa

	específica de ubiquitina 4.		específica de ubiquitina.
Señalización.			
at1g51830	Proteína quinasa repetida rica en leucina.	1.0764539	Involucrada en el transporte intracelular.
at2g27030	Codifica una calmodulina que tiene mayor afinidad por la proteína motora que se une a la calmodulina tipo kinesina CAM4 o CAM6.	1.7524916	Involucrada en el transporte intracelular.
at3g43810	La proteína del dominio de HAND-EF codifica una calmodulina.	1.0084538	Involucrado en procesos biológicos, específicamente en la raíz.
at5g53010	ATPasa transportadora de calcio.	1.3540268	Involucrado en procesos biológicos, específicamente en la raíz.
at4g28600	codifica una proteína de unión a calmodulina que se expresa en polen.	1.1005769	Unión a calmodulina.
at2g29700	Codifica una proteína que contiene un dominio de PH.	1.2058377	Involucrada en la transducción de señales.
at1g21920	Histona H3 K4-metiltransferasa específica, proteína de la familia SET7 / 9.	1.1814382	Involucrada en la metilación y fosforilación.
Factores de Transcripción (ERF)			
at5g18450	codifica un miembro de la subfamilia DREB A-2 de la familia de factores de	2.1833565	Participan en respuesta a la sequía.

	transcripción ERF / AP2.		
at5g52020	Proteína de unión a DNA.	1.1878718	Involucrado en la respuesta de defensa a estrés abiótico.
Factores de Transcripción (bZIP)			
at5g49450	Cremallera de leucina básica 1.	1.1023192	Codifica que un activador de la transcripción es un regulador positivo de la tolerancia de la planta a la sal, el estrés osmótico y la sequía.
Factores de Transcripción (WRKY)			
at2g21900	Factor de transcripción WRKY 59.	1.5138949	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at2g24570	Factor de transcripción WRKY 17.	1.0490084	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
Factores de Transcripción (MYB)			
at1g56160	Factor de transcripción MYB72.	1.8180594	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at1g25340	Proteína desconocida.	1.2122898	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
Metabolismo Secundario			
at1g60600	Proteína desconocida.	1.0641527	Procesos biológicos de las plantas.
at5g15460	Proteína de ubiquitina-plegaje anclada a membrana 2	1.0361857	Procesos biológicos de las plantas.
Proteínas Heat Shock			
at5g03030	Proteína desconocida.	1.2692335	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.

Genes reprimidos			
Señalización por hormonas			
at1g50580	Proteína de la superfamilia UDP-glicosiltransferasa.	-1.2927011	Involucrado en procesos metabólicos.
at2g46280	Proteína 1 que interacciona con el receptor de TGF-beta (TRIP-1).	-1.1843051	Respuesta al ion cadmio al estrés salino.
at1g01480	1-Amino-cyclopropano	-1.3651313	Señalización.
at5g66430	S- adenosil	1.4411917	Señalización.
Proteólisis			
at5g05740	Ategy2, egy2, dependiente del etileno.	-3.9566085	Proteólisis.
at5g35210	Factor de transcripción de tipo phd con dominios de transmembranos	-1.503902	Codifica un factor de transcripción de homeodominio (PHD) de planta ligado a la envoltura de cloroplastos con dominios transmembrana que funcionan en múltiples vías de señal retrógrada.
at5g40200	DEG9, DEGP proteasa 9	-1.7713473	Codifica a una proteasa.
at1g70170	Preproteína AT2-MMP.	-1.0436206	Regulación negativa de la senescencia foliar, proteólisis, respuesta al ion cadmio, respuesta al ácido jasmónico, respuesta al estrés salino.
at2g29070	Proteína de la familia UFD1	-1.2304575	Procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas.
at1g57800	ORTH3, ORTRUS 3, variante en metilación 5.	-1.0133564	Predicho que codifica una proteína con un dominio PHD N-terminal y dos dominios RING que rodean un dominio SRA.

at2g16090	Proteína de la superfamilia RING.	-1.0289754	Proceso proteolítico.
at4g11370	RHA1A, RING-H2 finger a1A.	-3.4638588	Codifica una proteína putativa del dedo RING-H2 RHA1A.
at1g79810	Arabidopsis peroxina 2, ATPEX2, peroxina 2, PEX2, reversión del fenotipo 3, TED3.	-1.1664578	Codifica una proteína peroxisomal esencial para el crecimiento de Arabidopsis.
at5g41430	Proteína de la superfamilia RING / U-box.	-1.4985459	Proceso proteolítico.
at1g05080	Proteína de la familia F-box.	-1.200286	Proceso proteolítico.
at1g70960	F-box y dominios asociados de interacción que contienen proteínas.	-2.5655477	Proceso proteolítico.
at1g65770	AMR1, regulador de la vía manosa de ácido ascórbico 1.	-2.636793	Codifica AMR1 (ácido ascórbico Mannose via de regulación 1). Coordina y regula negativamente la vía biosintética manosa / ácido L-galactosa ascórbico en respuesta a las señales de desarrollo y ambientales.
at5g25290	Proteína F-box (DUF295)	-1.8259429	Proceso proteolítico.
at3g47020	Proteínas con dominio asociados a F-box.	-1.6234795	Involucrada en el proceso de desarrollo de las plantas.
at4g33900	Proteína de la superfamilia de repetición de galactosa oxidasa.	-1.0047728	Involucrada en el proceso de desarrollo de las plantas.
at5g52460	EDA41, Parada de desarrollo de embrión SAC 41.	-1.3494469	Involucrado en la etapa de floración.

at4g15060	Proteína F-box.	-1.5450703	Función desconocida.
at5g42040	ATPasa 12B.	-1.1222914	Partícula reguladora no ATPasa.
at3g05530	Proteína RPT5a.	-1.5609846	Codifica una de las seis AAA-ATPasas de la partícula reguladora del proteasoma.
Señalización.			
at5g45800	Proteína de la proteína quinasa repetida rica en leucina	-2.066301	Proteína de fosforilación.
at3g47580	Proteína de la proteína quinasa repetida rica en leucina	-1.7335607	Proteína de fosforilación.
at4g11490	Codifica una proteína quinasa similar a un receptor rico en cisteína.	-1.1174846	Proteína de fosforilación
at5g40190	Proteína que codifica a una auxina.	-1.0409181	Involucrado en procesos biológicos, específicamente en la raíz.
at2g43680	Proteína con dominio IQ-14.	-1.123242	Unión a calmodulina.
at3g20290	Codifica AtEHD1, una de las proteínas de dominio de homología de <i>Arabidopsis</i> Eps15 implicadas en endocitosis.	-1.2574308	Involucrada en la transducción de señales.
at2g26300	Codifica una subunidad alfa de una proteína de unión a GTP heterotrimérica.	-1.7953088	Proteína transportadora
at5g27510	Codifica una proteína	-1.6370658	Proteína involucrada en la

	quinasa.		señalización.
at1g10210	Codifica una proteína MAPk quinasa.	-1.0415868	Proteína involucrada en la señalización.
at1g53570	Codifica una MAPK quinasa 3.	-2.0909114	Proteína involucrada en la señalización.
Factores de Transcripción (ERF)			
at1g77200	Codifica un miembro de la subfamilia DREB A-4 de la familia de factores de transcripción ERF / AP2.	-1.3207215	La proteína contiene un dominio AP2, involucrado en respuesta a estrés biótico.
MAPK			
at1g10210	ATMPK1, Proteínas quinasas activadas con mitógeno 1, MPK1.	-1.0415868	Vía de señalización activada por auxina, regulación de la expresión génica, transducción de señal.
at2g34650	PKS, codifica para una proteína serina/treonina cinasa que puede actuar como regulador positivo del flujo de salida de auxina celular.	- 4.4650764	Involucrado en la regulación negativa de la señalización de auxinas.
Factores de Transcripción (bZIP)			
at1g06850	Factor b-Ziper.	-1.2994683	Involucrado en respuesta a estrés biótico.
Factores de Transcripción (MYB)			
at5g12870	Factor de transcripción MYB46.	-1.1317161	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at3g30210	Factor de transcripción MYB121.	-1.3728623	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at5g29000	Factor de transcripción MYB116.	-1.2896491	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at1g57560	Factor de transcripción MYB50.	-1.0738001	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.

at1g06180	Factor de transcripción MYB13.	-1.0277531	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
Proteínas Heat Shock			
at1g71000	Proteína chaperona.	-1.0938197	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at1g54850	Proteína de la superfamilia de las chaperonas tipo HSP20.	-1.2957379	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.

XVIII.I.-ANEXO II

MUTANTE M698C

Tabla 6.- Genes que tuvieron un cambio de expresión ≤ 1 y ≥ 1 en la línea mutante en TFIIB1 (M698C).

ID	Nombre	Cambio de expresión (Log2)	Función
Genes sobreexpresados			
at1g31070	N-acetilglucosamina-1-fosfato que cataliza la formación de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc).	1.3471642	Involucrado en el desarrollo embrionario que termina en latencia de la semilla, desarrollo del saco embrionario, proceso metabólico y desarrollo del polen
at1g55370	NDF5	3.340114327	Involucrado en el transporte de electrones fotosintéticos del fotosistema I y procesos metabólicos de carbohidratos.
Señalización por hormonas			
at2g37770	(AKR4C9) Aldo-keto reductasa	1.3785812	Procesos metabólicos de óxido reducción y responden a estrés por frío y sal
at1g31070	N-acetilglucosamina-	1.3471642	Involucrado en el

	1-fosfato que cataliza la formación de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc).		desarrollo embrionario que termina en latencia de la semilla, desarrollo del saco embrionario, proceso metabólico y desarrollo del polen.
at5g66430	S- adenosil	1.4411917	Señalización.
Proteólisis			
at4g09190	F-box y dominios asociados de interacción que contienen proteínas.	1.0320597	Proceso proteolítico.
at5g56430	Dominios F-box / FBD-unión que contienen proteína.	1.6213331	Proceso proteolítico.
at1g50870	F-box y proteína que contiene dominios de interacción asociados.	1.2011185	Proceso proteolítico.
at2g02030	Proteína de la familia F-box.	1.1227763	Proceso proteolítico.
at1g20360	Proteína de la familia F-box.	1.4793745	Proceso proteolítico.
at1g70970	F-box y proteína que contiene dominios de interacción asociados.	1.458117	Proceso proteolítico.
at3g62430	Proteína con dominio similar a RNI / FBD.	1.0030217	Proceso proteolítico.
at3g18330	Putativa proteína F-box	1.2400861	Proceso catabólico proteasómico dependiente de ubiquitina dependiente de SCF.
at3g52510	F-box asociado a ubiquitinación proteína efectora de la familia.	1.1462833	Proceso proteolítico.
at4g23960	Proteína de la familia F-box	1.0410588	Proceso proteolítico.
at4g13985	Proteína F-box asociada al FDB,	1.0334574	Proceso proteolítico.

	FDB1.		
at5g56420	Proteína que contiene dominios F-box / RNI-like / FBD-like.	1.3807465	Proceso proteolítico.
at5g42430	F-box y dominios asociados de interacción que contienen proteínas.	1.448757	Proceso proteolítico.
at1g19070	Proteína de la familia F-box.	1.1114981	Proceso proteolítico.
at1g55070	Proteína que contiene dominios de interacción asociados a F-box .	1.0643116	Proceso proteolítico.
Señalización			
at5g18570	Codifica a una proteína AtObgC.	1.0647309	La proteína está doblemente localizada en el estroma y la membrana interna de la envoltura y está involucrada en la biogénesis.
at5g18570	Codifica a una proteína AtObgC.	1.1478537	La proteína está doblemente localizada en el estroma y la membrana interna de la envoltura y está involucrada en la biogénesis.
at5g45750	Proteína GTPasa.	1.4468828	Involucrada como proteína de transporte.
at4g32990	WD40 proteína similar a la repetición de la superfamilia de proteínas G.	1.1738672	Proteínas involucradas en el transporte de moléculas.
at4g02080	Un miembro de la familia GTPasa similar a ARF.	1.0217031	Proteína transportadora
at4g02080	Un miembro de la familia GTPasa	1.0217031	Proteína transportadora

	similar a ARF.		
at5g47960	Codifica una proteína G.	1.125649	Proteína transportadora.
at5g41790	codifica una proteína que interactúa físicamente específicamente con la región putativa de espiral enrollada de COP1.	1.1926627	Proteína involucrada en la señalización.
Factores de Transcripción (ERF)			
at2g20880	Proteína de unión a DNA.	1.0150057	Involucrado en la regulación de la transcripción, dependiente del ADN.
at1g21910	Unión al ADN, actividad de factor de transcripción de unión a ADN específica de secuencia.	1.2912012	Involucrado en: regulación de la transcripción, dependiente del ADN.
Factores de Transcripción (bZIP)			
at5g06960	Codifica una cremallera de leucina básica (B-ZIP) que contiene proteína que interactúa con NPR1.	1.0497018	Promover la expresión de genes inducidos por ácido salicílico.
Factores de Transcripción (WRKY)			
at5g26170	Factor de transcripción WRKY 50.	1.1960547	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
Factores de Transcripción (MYB)			
at5g16600	Factor de transcripción MYB43.	1.149015	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at1g16490	Factor de transcripción MYB58.	1.8977919	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
Metabolismo Secundario.			

at5g60500	Proteína de la familia de la Undecaprenil pirofosfato sintetasa.	1.0985204	Procesos biológicos de las plantas.
Genes reprimidos			
Señalización por hormonas			
at1g68370	Proteína chaperona (ATJ15).	-1.2375215	Tiene un papel importante en la distribución de auxinas.
at4g19230	Cytochromo P450	-1.0650477	Codifica una proteína con actividad ABA 8'-hidroxilasa, involucrada en el catabolismo de ABA.
at2g25980	Proteína de la superfamilia de lectina de unión a manosa.	-1.1776884	Señalización.
Proteólisis			
at2g06510	Proteína A A1	-1.2732726	Codifica un homólogo de la proteína de replicación A que está involucrada en la meiosis I en las células madre del polen.
at3g42690	Gen de elemento transponible.	-1.037438	Proteólisis.
at4g22290	Proteína relacionada con la familia de la proteasa específica de ubiquitina C19.	-1.3646079	Proteólisis.
at5g50870	Enzima UBC27	-1.0202891	Procesos catabólicos.
at5g41700	Codifica una enzima ubiquitina 8.	-1.0963751	Uno de los polipéptidos que constituyen la enzima E2 de conjugación de ubiquitina.
at1g79380	RGLG4, RING dominio ligasa 4.	-1.2499849	Codifica una ubiquitina ligasa que es un modulador ascendente esencial de la señalización de JA en respuesta a diversos estímulos.

at1g01660	Proteína de la superfamilia RING / U-box.	-1.7121428	Proceso proteolítico.
at2g16290	F-box proteína similar a SKIP23.	-1.106488	Proceso proteolítico.
at5g56390	Proteína que contiene dominios F-box / RNI-like / FBD-like.	-1.1183996	Proceso proteolítico.
at3g44080	Proteínas con dominio asociados a F-box.	-1.4237792	Función desconocida.
at5g44940	Proteínas con dominio asociados a F-box.	-1.5682857	Función desconocida.
at1g16940	Proteína que contiene dominios F-box / RNI-like / FBD-like.	-1.2212873	Función desconocida.
at1g66300	Proteína que contiene dominios F-box / RNI-like / FBD-like.	-1.1513388	Función desconocida.
Señalización.			
at5g43980	Codifica una proteína plasmodesmal que afecta el movimiento intercelular de moléculas.	-1.4566425	Involucrada en el transporte intracelular.
at3g49380	Proteína con dominio IQ-15.	-1.8567748	Involucrado en procesos biológicos, específicamente en la raíz.
at3g59690	Proteína con dominio IQ-13.	-1.4355229	Unión a calmodulina.
at1g10900	Proteína de la familia de fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa.	-1.168942	Involucrada en la metilación y fosforilación
at5g47200	AtRabD2b codifica una Rab GTPase.	-1.0429693	Desempeña un papel importante en el desarrollo del polen, la germinación.
at1g22920	AJH1 codifica una proteína similar a	-1.1638361	Proteína involucrada en la señalización.

	JAB1.		
at1g68370	Proteína ARG1, que interactúa con el citoesqueleto.	-1.2375215	Proteína involucrada en la señalización.
at2g20410	CESA6 Celulosa sintasa 6.	-1.1185404	Proteína involucrada en la señalización.
Factores de Transcripción (ERF)			
at1g77640	codifica un miembro de la subfamilia DREB A-5 de la familia de factores de transcripción ERF / AP2.	-1.1313314	La proteína contiene un dominio AP2, involucrado en respuesta a estrés biótico.
MAPK			
at1g53570	Proteínas quinasa quinasa activada por mitógenos 3	-2.0909114	Involucrada en la regulación del ciclo celular mitótico, transducción de señal por fosforilación de proteínas, cascada de señalización de proteína quinasa activada por estrés.
Factores de Transcripción (bZIP)			
at1g06850	Factor b-Ziper	-1.2994683	Involucrado en respuesta a estrés biótico.
at5g28770	Factor b-Ziper.	-1.3598933	Involucrado en respuesta a estrés biótico.
Factores de Transcripción (MYB)			
at1g56160	R2R3 es un dominio MYB de la proteína 72 (MYB72).	-6.33070,	Codifica un miembro de la familia de genes del factor de transcripción R2R3 que participa en la resistencia sistémica inducida.

at5g10280	Factor de transcripción MYB92.	-1.0369762	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at1g19510	Proteína desconocida.	-1.9875736	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
at5g40330	Factor de transcripción MYB23.	-1.3917758	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.
Proteínas Heat Shock			
at5g42020	Proteína Heat Shock 70.	-1.1989576	Involucrado en respuesta de defensa a estrés biótico y abiótico.

XVIII.I.2.-ANEXO III

Tabla 7.- Genes que tuvieron un cambio de expresión ≤ 2 y ≥ 2 en la línea mutante en TFIIB2 (MIII) y TFIIB1 (M698C).

ID	Nombre	Cambio (Log2)	Función
Genes sobreexpresados			
at5g02880	Proteína ligasa 4.	3.0683148	codifica una ubiquitina-proteína ligasa que contiene un dominio HECT.
at5g18450	codifica un miembro de la subfamilia DREB A-2 de la familia de factores de transcripción ERF / AP2.	2.1833565	Participan en respuesta a la sequía.
at5g05740	Metalproteasa	2.6654782	Tiene actividad metal proteasa (Señalización)

at1g56700	Codifica para una peptidasa C15	2.016482	Tiene función en el proceso de proteólisis (Señalización)
at2g22990	Codifica una proteína ANAC089.	2.117449	Un factor de transcripción fijado a la membrana que regula la iniciación floral y además controla la muerte celular programada inducida por patógenos. (Señalización)
Genes reprimidos			
at5g05740	Ategy2, egy2, dependiente del etileno.	-3.9566085	Proteólisis.
at1g70960	F-box y dominios asociados de interacción que contienen proteínas.	-2.5655477	Proceso proteolítico.
at1g65770	AMR1, regulador de la vía manosa de ácido ascórbico 1.	-2.636793	Codifica AMR1 (ácido ascórbico Manose via de regulación 1). Coordina y regula negativamente la vía biosintética manosa / ácido L-galactosa ascórbico en respuesta a las señales de desarrollo y ambientales.
at5g45800	Proteína de la proteína quinasa repetida rica en leucina	-2.066301	Proteína de fosforilación.(Señalización)
at1g53570	Codifica una MAPK cinasa 3.	-2.0909114	Proteína involucrada en la señalización.
at1g53570	Proteínas quinasa quinasa activada por mitógenos 3	-2.0909114	Involucrada en la regulación del ciclo celular mitótico, transducción de señal por fosforilación de proteínas, cascada de señalización de proteína quinasa activada por estrés.

at1g65360	Codifica para AGL23.	-2.0025387	Gen que controla el desarrollo del gametofito masculino y la biogénesis de organelos durante el desarrollo del embrión.(Transcripción)
at1g56160	Codifica para un factor de transcripción R2R3.	-6.3307014	Involucrado en la mediación de la resistencia sistémica. (Transcripción)
at3g60400	Codifica para un supresor llamado SHOT1.	-2.0312064	Proteína de la familia del factor de terminación de la transcripción mitocondrial. (Transcripción)
at1g57720	Codifica para un factor de elongación en la traducción EF1B.	-2.0693138	En la respuesta al ion cobre y respuesta al ion zinc. (Síntesis de proteínas)
at1g56700	Codifica para una peptidasa C15.	-2.1595538	Tiene función en el proceso de proteólisis. (Síntesis de proteínas)
at5g18910	Proteína cinasa	-2.01648	Involucrada en la autofosforilación en las proteínas (Síntesis de proteínas)
at1g62290	Proteína hipotética.	-3.9814959	Involucrada en procesos biológicos (Señalización)