



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TESIS**

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA AL ESTRÉS  
HÍDRICO EN PLANTAS DE *Sorghum bicolor* (L) Moench EN PRESENCIA Y  
AUSENCIA DE ASOCIACIONES CON HONGOS MICORRÍZICOS**

**PRESENTA:**

**LBT. Mariana Georgina Muñoz Carrillo**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

**TUTORES:**

**Dr. José Francisco Morales Domínguez**

**Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez**

**ASESORA:**

**Dra. Cristina Garcidueñas Piña**

Aguascalientes, Ags., 23 de noviembre del 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS  
P R E S E N T E

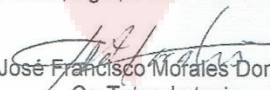
Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **MARIANA GEORGINA MUÑOZ CARRILLO** con ID 115792 quien realizó la tesis titulado: **ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA AL ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS DE SORGHUM BICOLOR (L) MOENCH EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ASOCIACIONES CON HONGOS MICORRÍZICOS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

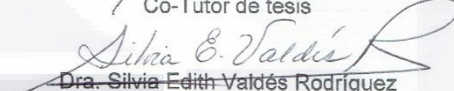
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

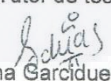
ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 5 de noviembre de 2018.

  
Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Co-Tutor de tesis

  
Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez  
Co-Tutor de tesis

  
Dra. Cristina Garcidueñas Piña  
Asesora

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**MARIANA GEORGINA MUÑOZ CARRILLO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS, ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL  
P R E S E N T E.**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA AL ESTRÉS HIDRICO EN PLANTAS DE *SORGHUM BICOLOR* (L) MOENCH EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ASOCIACIONES CON HONGOS MICORRIZICOS”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 08 de noviembre de 2018

*“Se lumen proferre”*

**EL DECANO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruiz Gallegos'.

**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS**

c.c.p.- Archivo.

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo para la realización de mis estudios de maestría (Beca No.766020).

A los miembros de mi comité tutorial, al Dr. José Francisco Morales Domínguez por haberme guiado, no solo en este trabajo de titulación, sino a lo largo de mi carrera universitaria y maestría, por su amistad, paciencia e invaluable apoyo, a la Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez por sus consejos y correcciones que me ayudaron a mejorar académicamente y a la Dra. Cristina Garcidueñas Piña por compartir su experiencia, por su paciencia, conocimientos y motivación.

Al Dr. Abraham Loera Muro, al Dr. Aaron Barraza Celis, a la Dra. María Goretty Caamal Chan y al M.C. Ángel Edgardo Carrillo García por compartir su conocimiento y consejos durante mi estancia en el laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz, Baja California Sur.

A la I.I.Q. Martha E. Pérez Reyes, Dra. Alejandra Palomeque Carlin, M.C. Isaac Reyes Silva, M.C. Lucia Chávez, M.C. Adilene Dávila del laboratorio de Biotecnología Vegetal, por su apoyo y facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de generación del posgrado, pero especialmente a, Memo, Vivian y Fernando por su amistad, palabras de aliento y buenos momentos que pasamos durante estos dos años, gracias por extenderme su mano en momentos difíciles y por el apoyo brindado cada día, de verdad mil gracias, siempre los llevo en mi corazón.

A mis compañeros del laboratorio de Biología molecular de plantas, Daniel, Lily, Caro, Nancy, Josafath, Fanny, Mario Arzate, Mario Mejía, Juan Pablo, Vicky Herrera, Dr. Gustavo Santos Medrano y al Dr. Roberto Rico Martínez, gracias a ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

## Dedicatorias

A mis padres, Victor y Martha, por su amor, trabajo, sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy ahora.

Es un orgullo y privilegio ser su hija, son los mejores padres.

A mi hermano Victor, mi gran ejemplo de dedicación, constancia y compromiso, gracias por tus palabras de aliento, consejos y sobre todo el cariño incondicional.

A mi familia, especialmente a mis abuelos: Etelvina, Luis, Victor, María y Ofelia por ser mi gran ejemplo para seguir.

A todas las personas que de alguna manera me apoyaron y han hecho posible el éxito de este trabajo, especialmente aquellos que me abrieron sus puertas y compartieron sus conocimientos.

## Índice general

<b>Índice general</b> -----	<b>1 -</b>
<b>Índice de Tablas</b> -----	<b>4 -</b>
<b>Índice de Figuras</b> -----	<b>5 -</b>
<b>Acrónimos</b> -----	<b>8 -</b>
<b>Resumen</b> -----	<b>10 -</b>
<b>Abstract</b> -----	<b>11 -</b>
<b>Introducción</b> -----	<b>12 -</b>
<b>Antecedentes</b> -----	<b>15 -</b>
1.1 Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench)-----	15 -
1.1.1 Cultivo del sorgo-----	16 -
1.1.2 Usos del sorgo-----	18 -
1.2 Estrés hídrico-----	19 -
1.2.1 Subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC) -----	20 -
1.2.2 Proteína asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica ( <i>PSBA</i> )-----	25 -
1.2.3 Péptido natriurético (PN)-----	27 -
1.2.4 Péptidos natriuréticos en plantas (PNP's)-----	28 -
1.3 Micorrizas-----	30 -
1.3.1 Beneficios que aportan las micorrizas-----	31 -
1.3.2 <i>Glomus</i> spp.-----	32 -
1.4 Análisis proteómico -----	33 -
1.5 Análisis de expresión genética-----	36 -
<b>Justificación</b> -----	<b>40 -</b>
<b>Hipótesis</b> -----	<b>41 -</b>
<b>Objetivos</b> -----	<b>41 -</b>
5.1 Objetivo general -----	41 -
5.2 Objetivos específicos-----	41 -
<b>Estrategia experimental (Diagrama)</b> -----	<b>42 -</b>

6.1 Amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés ----- 42 -

6.2 Análisis de expresión de genes en respuesta ante estrés hídrico en presencia y ausencia de hongos micorrízicos ----- 43 -

**Metodología ----- 44 -**

7.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés ----- 44 -

7.2 Material vegetal ----- 46 -

7.3 Extracción de ADN genómico ----- 47 -

7.4 Identificación de los genes por PCR en *Sorghum bicolor* (L) Moench ----- 48 -

7.4.1 Ligación del fragmento amplificado de PNP en un vector de clonación ----- 49 -

7.4.2 Transformación genética de *E. coli* DH5 $\alpha$  ----- 50 -

7.4.3 Extracción del ADN plasmídico (Miniprep) ----- 51 -

7.4.4 Digestión del plásmido pGEM<sup>®</sup>-T Easy con la enzima de restricción Eco RI ----- 51 -

7.4.5 Secuenciación ----- 52 -

7.5 Análisis bioinformático ----- 52 -

7.6 Extracción de ARN ----- 53 -

7.7 Síntesis del ADNc ----- 53 -

7.8 PCR en tiempo real (RT-qPCR) ----- 53 -

7.9 Análisis estadístico ----- 54 -

**Resultados ----- 55 -**

8.1 Predicción *in silico* de un posible PNP en *Sorghum bicolor* (L) Moench ----- 55 -

8.2 Diseño de oligonucleótidos ----- 59 -

8.3 Extracción de ADN en *Sorghum bicolor* (L) Moench ----- 61 -

8.3 Amplificación de los genes de interés mediante PCR ----- 61 -

8.3.1 Amplificación de un PNP ----- 61 -

8.3.2 Amplificación de  $\alpha$ NAC ----- 64 -

8.3.3 Amplificación de *PSBA* ----- 67 -

8.4 Extracción de ARN total ----- 70 -

8.5 Análisis de expresión de genes en respuesta ante estrés hídrico en presencia y ausencia de hongos micorrízicos ----- 71 -

8.5.1 Expresión del gen  $\alpha$ NAC ----- 71 -

8.5.2 Expresión del gen *PSBA* ----- 73 -

8.6 Predicción <i>in silico</i> de modificaciones postraduccionales en las secuencias de $\alpha$ NAC y PSBA.	74 -
<b>Discusión</b>	<b>75 -</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>85 -</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>86 -</b>
<b>Anexos</b>	<b>101 -</b>
Anexo 1: Buffer de lisis para la extracción de ADN (Lodhi <i>et al.</i> , 1994)	101 -
Anexo 2: Secuencias en aminoácidos de los genes $\alpha$ NAC y PSBA	101 -
Anexo 3: Purificación de ADN con el kit Wizard de PROMEGA	102 -
Anexo 4: Características de los oligonucleótidos diseñados, las características son de acuerdo con el programa DNASTAR	102 -
Anexo 5: Medio Lb	103 -
Anexo 6: Soluciones Birnboim	103 -
Anexo 7: Protocolo de extracción de ARN (PureZol) de Biorad	103 -
Anexo 8: Protocolo de síntesis de cADN del kit Scientific First Strand Synthesis Kit (Thermo scientific)	104 -
Anexo 9: Características de los oligonucleótidos diseñados para PCR en tiempo real, las características son de acuerdo con el programa DNASTAR	104 -
Anexo 10: Resultados RT-qPCR del gen PSBA en <i>Sorghum bicolor</i> asociado a hongos micorrízicos en presencia y ausencia de estrés hídrico	105 -
Anexo 11: Resultados RT-qPCR del gen $\alpha$ NAC en <i>Sorghum bicolor</i> asociado a hongos micorrízicos en presencia y ausencia de estrés hídrico	106 -
Anexo 12: Análisis de varianza y Prueba de Tukey entre los tratamientos en el gen $\alpha$ NAC	107 -
Anexo 13: Análisis de varianza y Prueba de Tukey entre los tratamientos en el gen PSBA	109 -



**Índice de Tablas**

**Tabla 1.** Niveles de rendimiento de sorgo en los principales países productores ..... - 16 -

**Tabla 2.** Tipos de péptidos natriuréticos ..... - 28 -

**Tabla 3.** Tipos de hongos micorrízicos..... - 31 -

**Tabla 4.** Técnicas más usadas para el análisis de expresión génica en plantas ..... - 38 -

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar un probable PNP en sorgo ..... - 49 -

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar  $\beta$ -actina como gen de referencia para la RT-qPCR..... - 54 -

**Tabla 8.** Características de AtPNP-A y de las proteínas similares encontradas en *Sorghum bicolor* ..... - 56 -

**Tabla 9.** Dominios identificados en la secuencia de AtPNP-A..... - 56 -

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos de los genes que codifican para las proteínas en estudio ..... - 60 -

**Tabla 11.** Oligonucleótidos utilizados para medir la expresión de los genes de interés por qPCR..... - 60 -

**Tabla 12.** Dominio encontrado en la secuencia obtenida de  $\alpha$ NAC..... - 66 -

**Tabla 13.** Concentración y pureza de las muestras de ARN ..... - 70 -

**Índice de Figuras**

**Figura 1.** Ejemplar de *Sorghum bicolor* (L) Moench en etapa de floración..... - 15 -

**Figura 2.** Gráfica de cultivo y producción de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) en el mundo..... - 17 -

**Figura 3.** Gráficas de producción y consumo de sorgo en México..... - 18 -

**Figura 4.** Estructura secundaria y terciaria de NAC..... - 22 -

**Figura 5.** Red de señalización de NAC's ante estrés abiótico..... - 24 -

**Figura 6.** Esquema del Fotosistema II (PSII)..... - 27 -

**Figura 7.** Esquema del gen del péptido natriurético tipo A en *Arabidopsis thaliana*.- 30 -

**Figura 8.** Resumen del análisis proteómico realizado en *Sorghum bicolor* (L) Moench en presencia y ausencia de micorrizas ..... - 36 -

**Figura 9.** Procedimiento para realizar una PCR en tiempo real (qPCR) ..... - 39 -

**Figura 10.** Esquema general de amplificación de fragmentos de los genes que codifican para las proteínas de interés. .... - 42 -

**Figura 11.** Esquema general del análisis de expresión de genes en respuesta ante estrés hídrico en presencia y ausencia de hongos micorrízicos..... - 43 -

**Figura 12.** Esquema del gen, del transcrito y del producto de PCR que codifica para la subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC) en sorgo..... - 45 -

**Figura 13.** Esquema del gen, del transcrito y del producto de PCR que codifica para la proteína asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica (*PSBA*) en sorgo..... - 45 -

**Figura 14.** Fenotipo de plantas de sorgo expuestas ante la presencia y ausencia de hongos micorrízicos y déficit hídrico ..... - 47 -

**Figura 15.** Mapa del pGEM®-T Easy..... - 50 -

**Figura 16.** Proteínas similares a AtPNP-A sin caracterizar en *Sorghum bicolor* (L) Moench. .... - 55 -

**Figura 17.** Búsqueda de dominios en las tres proteínas de sorgo con alta identidad al PNP reportado en *A. thaliana* en NCBI ..... - 57 -

**Figura 18.** Identificación de un péptido señal en proteínas homólogas a AtPNP-A en el genoma de *Sorghum bicolor* (L) Moench..... - 58 -

**Figura 19.** Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos del péptido AtPNP-A y de las proteínas homólogas encontradas en el proteoma del sorgo ..... - 58 -

**Figura 20.** Alineamiento múltiple entre AtPNP-A y las proteínas homólogas encontradas en el proteoma de *Sorghum bicolor* (L) Moench..... - 59 -

**Figura 21.** Electroforesis en un gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *Sorghum bicolor* (L) Moench ..... - 61 -

**Figura 23.** Digestión del vector pGEM®-T Easy para la liberación del fragmento SbPNP-A ..... - 62 -

**Figura 24.** Secuencia de SbPNP-A ligada en el vector pGEM®-T Easy ..... - 63 -

**Figura 25.** Visualización en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados a partir de ADN genómico para  $\alpha$ NAC en sorgo..... - 64 -

**Figura 26.** Búsqueda de dominios y secuencias similares a Sb $\alpha$ NAC en la base de datos de NCBI..... - 64 -

**Figura 27.** Secuencia hipotética parcial de Sb $\alpha$ NAC ..... - 65 -

**Figura 28.** Estructura tridimensional de  $\alpha$ NAC, presencia de dominios y el fragmento amplificado ..... - 66 -

**Figura 29.** Visualización en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados a partir de ADN genómico para PSBA en sorgo..... - 67 -

**Figura 30.** Búsqueda de secuencias similares a SbPSBA en la base de datos de NCBI..... - 67 -

**Figura 31.** Secuencia hipotética parcial en nucleótidos y aminoácidos de SbPSBA... - 68 -

**Figura 32.** Secuencia en nucleótidos y aminoácidos del material codificante de SbPSBA- 69 -

**Figura 33.** Estructura tridimensional de la proteína D1, presencia de dominios y el fragmento amplificado ..... - 69 -

**Figura 34.** Electroforesis en un gel de agarosa al 1% del ARN total de *Sorghum bicolor* (L) Moench ..... - 71 -

**Figura 35.** Gráfica de los resultados de RT-qPCR para el análisis de expresión del gen  $\alpha$ NAC en hojas de plantas de sorgo ante los 6 tratamientos ..... - 72 -

**Figura 36.** Gráfica de los resultados obtenidos en el análisis proteómico de la proteína  $\alpha$ NAC en hojas de plantas de sorgo ante la presencia del consorcio selva con y sin estrés hídrico ..... - 72 -

**Figura 37.** Gráfica de los resultados de RT-qPCR para el análisis de expresión del gen *PSBA* en hojas de plantas de sorgo ante los 6 tratamientos ..... - 73 -

**Figura 38.** Gráfica de los resultados obtenidos en el análisis proteómico de la proteína D1 en hojas de plantas de sorgo ante la presencia del consorcio selva con y sin estrés hídrico ..... - 74 -



## Acrónimos

°C: grados centígrados

µg: microgramo

µL: microlitro

µM: micromolar

ABA: ácido abscísico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADNc-AFLP: polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados en ADNc

AM: micorrízicos arbusculares

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

DMSO: dimetilsulfóxido

g: gramo

GMPC: guanosina 3'5 monofosfato cíclico

HCl: ácido clorhídrico

kDa: kilodalton

kg/ha: kilogramo por hectárea

Mb: megabases

mg: miligramo

min: minutos

mL: mililitro

mM: milimolar

MPSS: secuenciación paralela masiva a la firma

NAC: complejo asociado al polipéptido naciente

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

ng: nanogramo

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Pfam: Protein Data Base

PN: péptido natriurético

PNP: péptido natriurético en plantas

PROSITE: Database of proteins domains

PSBA: proteína asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica

PSI: fotosistema I

PSII: fotosistema II

PVPP: pirrovinilpirrolidona

QB: plastoquinona

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

SAGE: análisis de expresión génica en serie

SDS-PAGE: electroforesis del Gel de poliacrilamida de sodio dodecil sulfato

Ser: serina

Thr: treonina

VA: vesiculoarbusculares

$\alpha$ NAC/NACA: subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente.

## Resumen

El déficit hídrico es el tipo de estrés abiótico más frecuente que afecta el crecimiento y productividad de los cultivos ante el cambio climático que se ha venido desarrollando en la actualidad. Sin embargo, existen plantas que, al estar sometidas a condiciones de deshidratación, desarrollan mecanismos de tolerancia. Por otra parte, algunas plantas pueden generar asociaciones simbióticas con microorganismos del suelo que las benefician a nivel nutricional y de absorción de agua, por ejemplo: con los hongos micorrízicos. Una especie vegetal que es capaz de desarrollar tolerancia al déficit hídrico es el sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench), que se asocia con hongos micorrízicos del género *Glomus* sp. Debido a esto, se están realizando estudios para dilucidar los mecanismos de tolerancia de estas plantas y cómo las micorrizas pueden estar involucradas. El Dr. Victor Olalde y la Dra. Silvia Valdés del CINVESTAV Unidad Irapuato realizaron estudios proteómicos en sorgo en donde determinaron cambios significativos en 52 proteínas en respuesta al déficit hídrico en presencia y ausencia de micorrizas (consorcio selva), entre ellas la proteína D1 del fotosistema II y la subunidad  $\alpha$  del complejo NAC (por sus siglas en inglés *Nascent polypeptide-associated complex*), por otro lado, se estudió un péptido natriurético de plantas (PNP) en sorgo, el cual está asociado con la apertura y cierre de estomas. En el presente trabajo se identificaron los genes que codifican para estas proteínas y para el del PNP, así como un estudio de expresión por tiempo real de estos genes bajo las mismas condiciones que el estudio proteómico. Los resultados del estudio proteómico y de expresión mostraron que no siempre existe una relación transcrito-proteína en los diferentes tratamientos y que las micorrizas son capaces de generar cambios significativos en la expresión de algunos genes y proteínas cuando se asocian al sorgo.

## Abstract

Water deficit is the most frequent type of abiotic stress that affects growth and productivity in the face of climate change that has been developing today. However, there are plants that every time they are on low water conditions they can develop tolerance to some mechanisms. Another important aspect is the fact that some plants can generate symbiotic associations with soil microorganisms that benefit them at a nutritional and water absorption level, for example: with mycorrhizal fungi. One of the plant species that are able to develop tolerance to water deficit is sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench), which is associated with mycorrhizal fungi of the genus *Glomus* sp. Due to this, studies are being carried out to elucidate the tolerance mechanisms of these plants and how mycorrhizae may be involved. Dr. Victor Olalde and Dr. Silvia Valdés from CINVESTAV in Irapuato carried out proteomic studies in sorghum where they determined significant changes in 52 proteins in response to water deficit in the presence and absence of mycorrhizae (jungle consortium), among them the protein D1 of the Photosystem II and the  $\alpha$  subunit of the NAC complex (*Nascent polypeptide-associated complex*), on the other hand, studied a plant natriuretic peptide (PNP), which is associated with the opening and closing of stomata. Therefore, in this work, the genes that code for these proteins and for the PNP were identified, as well as a study of the real time expression of these genes under the same conditions as the proteomic study. The results of the proteomic and expression study showed that there is not always a transcript-protein relationship in the different treatments and also that the mycorrhizae is capable of generating significant changes in the expression of these genes and proteins when they are associated with sorghum.



## Introducción

El déficit hídrico es el tipo de estrés ambiental que afecta de manera más frecuente el crecimiento y productividad de los cultivos ante el actual cambio climático (Fracasso et al., 2016). Existen plantas que son especialmente tolerantes a este tipo de estrés, debido a que han desarrollado diversos mecanismos fisiológicos y moleculares que les permiten sobreponerse (Marmol, 1994). A la vez existen asociaciones simbióticas de las plantas con microorganismos del suelo que las benefician y son capaces de proveerles cierta tolerancia ante la sequía, tal es el caso de las micorrizas, las cuales se definen como relaciones simbióticas entre un hongo y el sistema de raíces de un organismo huésped (Cobb et al., 2016). Estas relaciones se consideran como simbiosis nutricionales ya que le provee a la planta de fósforo y otros minerales como zinc y cobre (Zhang et al., 2011), además de que las hifas micorrízicas asociadas a las raíces de las plantas pueden aumentar el área de alcance del sistema radicular y la posibilidad de encontrar un acceso a los recursos que pueden limitar el crecimiento de la especie vegetal como el agua y los nutrientes (Cobb et al., 2016).

Una especie vegetal que es capaz de desarrollar estos dos mecanismos es el sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench), que se caracteriza por tener una alta tolerancia al estrés abiótico (Reddy et al., 2009; Rakshit et al. 2016), además de que es capaz de generar una relación simbiótica con los hongos micorrízicos del género *Glomus* spp, los cuales son considerados hongos arbusculares obligados y son capaces de conferir una mayor tolerancia al estrés por déficit hídrico (Morton y Benny, 1990). Por lo anterior en la actualidad se ha utilizado esta especie vegetal como modelo de estudio, tratando de dilucidar que genes y/o proteínas intervienen en estos mecanismos de tolerancia en plantas sin micorriza y asociadas a hongos micorrízicos.

En estudios proteómicos realizados en el 2015 en el Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato, se analizó la respuesta al estrés hídrico del sorgo, y encontraron cambios en los patrones de acumulación de 52 proteínas en plantas de sorgo con y sin un consorcio selva de micorrizas (Valdés y Olalde, en prensa). Entre las proteínas que mostraron cambios significativos en respuesta al déficit hídrico se encontraron la proteína D1 del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fotosistema II y la subunidad  $\alpha$  del complejo NAC (por sus siglas en inglés *Nascent Polypeptide-associated complex*). La proteína D1 está asociada al fotosistema II y es codificada por el gen *PSBA*. Esta proteína interviene en el metabolismo fotosintético el cual es afectado bajo condiciones de estrés hídrico. La fotosíntesis es sensible a este tipo de estrés y es una de las principales limitantes del metabolismo del carbono, se ha reportado que existe un daño a la maquinaria fotosintética primaria ante la presencia de este tipo de estrés (Liu et al., 2006). Mientras que  $\alpha$ NAC es una subunidad de un heterodímero proteico. Este heterodímero proteico es capaz de proteger a los polipéptidos recién sintetizados y trasladarlos al retículo endoplásmico y a las mitocondrias, además de actuar como proteínas chaperonas y ayudar al plegado de las cadenas polipeptídicas nacientes (Bukau et al., 2000), cada una de las subunidades que lo conforman son multifuncionales.

Existen otras diversas proteínas que se les ha relacionado con los mecanismos que dan tolerancia a una planta ante déficit hídrico, tal es el caso de los PNP's. Los PNP's son una novedosa clase de hormonas peptídicas que actúan por la vía de señalización del guanosina 3'-5' monofosfato cíclico (GMPC) que intervienen sistemáticamente en el balance hídrico y osmótico de la planta, actúan en la defensa a distintos patógenos y la apertura estomática (Turek y Gehring, 2016).

Se logró identificar por PCR fragmentos de los genes que codifican para las proteínas  $\alpha$ NAC y D1 mientras que se pudo identificar un probable PNP a partir de un estudio bioinformático. Además, se determinó la expresión de los genes  $\alpha$ NAC y *PSBA* a partir de la técnica de RT-qPCR en sorgo en respuesta a déficit hídrico, en presencia y ausencia de asociaciones con diferentes hongos micorrízicos. Esta información se comparó con los resultados de proteómica, previamente analizados, para contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de estas proteínas. Se identificó que el transcrito de  $\alpha$ NAC no muestra diferencias significativas en sus niveles de expresión en presencia y ausencia de estrés hídrico. Así mismo, el transcrito de  $\alpha$ NAC aumenta significativamente su expresión cuando la planta está asociada al consorcio selva, en comparación con el control sin micorriza, los cambios en los niveles de transcrito coinciden con los cambios en los niveles de proteínas. En cuanto *PSBA* se identificó que es sensible a la deshidratación ya que su transcrito disminuyó

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

significativamente, mientras que en el estudio proteómico D1 aumenta sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación postraduccionales. Se observó que las micorrizas evitan la disminución del transcrito de *PSBA* ante déficit hídrico y se cree que estas podrían promover un aumento en el metabolismo fotosintético aumentando la productividad de la planta y su tolerancia al estrés.



## Antecedentes

### 1.1 Sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench)

El sorgo es un cereal perteneciente a la familia de las *Poaceae* (Figura 1), es autopolinizante, diploide ( $2n=2x=20$ ), con un genoma pequeño secuenciado que consta de 730 Mb (Nagy et al., 1995). Es una planta con un metabolismo C4 por lo que tiene una eficiencia fotosintética alta y se caracteriza por tener una gran tolerancia al estrés abiótico (Reddy et al., 2009; Rakshit et al., 2016). Al ser altamente tolerante a la sequía ha hecho que sea ampliamente usado al noreste de África, India y el sur de Estados Unidos (Paterson et al., 2009). Reddy et al., (2011) afirman que este cultivo ha sido de los que mejor se han adaptado al cambio climático.

Este cereal es uno de los cinco más importantes en cuanto a su producción y cosecha en el mundo. El género *Sorghum* se compone de muchas especies y subespecies por lo que existen distintos tipos de sorgo, entre los que se destacan: el sorgo de grano; el sorgo forrajero, que se produce para pasto o heno; y el sorgo dulce, que se utiliza para la fabricación de biocombustibles (Rakshit, 2016). Al ser un cultivo que es capaz de crecer bajo condiciones de sequía y alta temperatura es un excelente modelo para generar conocimientos acerca de los mecanismos que utiliza para encarar el estrés por déficit hídrico. Esto se ha facilitado debido en que en años recientes se ha secuenciado el genoma del sorgo y se han reportado genes y proteínas que cambian su expresión en presencia de alguno de estos tipos de estrés abiótico (Patterson et al., 2009).



**Figura 1.** Ejemplar de *Sorghum bicolor* (L) Moench en etapa de floración (Tomada por: Jonathan Walther, USDA-NRCS, Tucson Plant Materials Center).

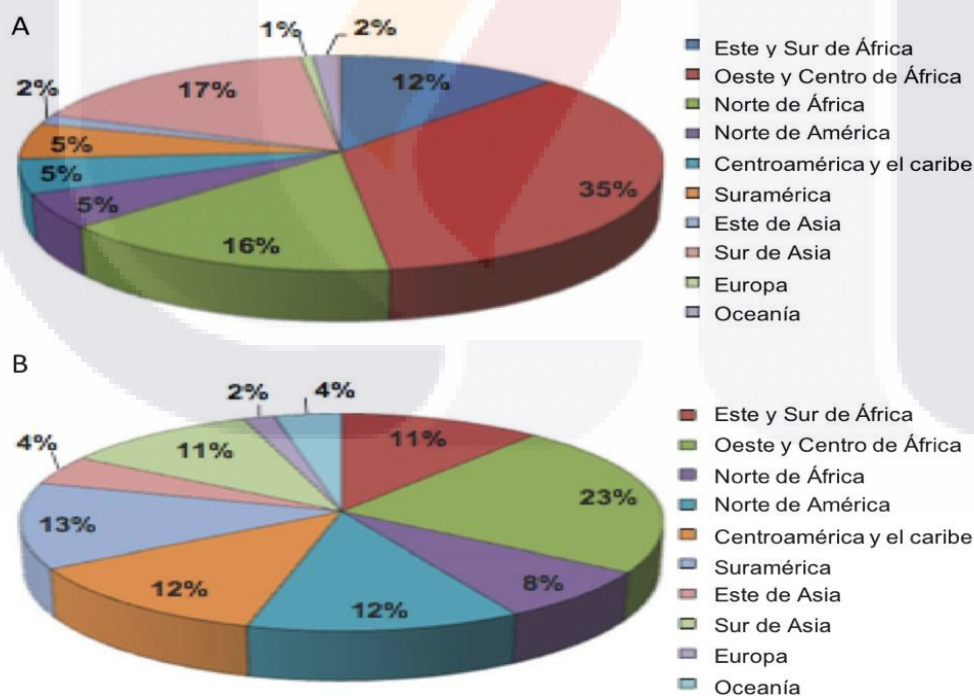
### 1.1.1 Cultivo del sorgo

El sorgo se cultiva en 105 países, dentro de los cuales 37 cuentan con más de 0.1 millones de hectáreas de superficie cosechada. Países como Sudán, India, Nigeria, Níger, Estados Unidos, Etiopia, Burkina Faso y México aportan el 71% de la superficie mundial cosechada (Tabla 1) (Rakshit et al., 2016).

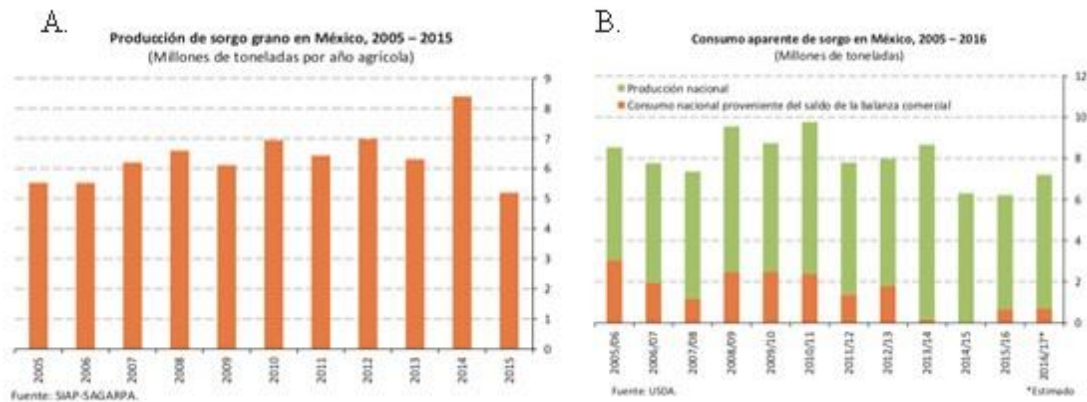
**Tabla 1.** Niveles de rendimiento de sorgo en los principales países productores (Rakshit et al., 2016)

País	Rendimiento (kg/ha)					
	1961-1963	1971-1973	1981-1983	1991-1993	2001-2003	2011-2013
Estados Unidos	2736	3624	3596	4013	3416	3431
Nigeria	856	637	1624	1043	1119	1294
México	2347	2601	3491	3317	3214	3762
India	490	485	703	845	762	920
Argentina	1718	1953	3332	3636	5014	4380
Etiopia	793	950	1462	1402	1280	2169
Sudán	936	776	642	621	688	576
Australia	1693	1912	1738	1938	2402	3400
China	971	1710	2715	3755	3785	3809
Brasil	2500	2232	1952	1740	2044	2721
Burkina Faso	482	471	583	985	938	1016
Níger	675	370	322	165	290	379
Camerún	858	710	659	765	1317	1456
Mali	681	765	847	829	773	998
<b>Mundial</b>	<b>932</b>	<b>1248</b>	<b>1498</b>	<b>1380</b>	<b>1329</b>	<b>1443</b>
*Se representa el promedio de cada uno de los periodos						

África es el continente con una mayor área de cultivo de este cereal a nivel mundial, se concentra en su mayoría en el oeste y centro, seguido del norte y en tercer lugar el este y sur (Figura 2A). En cuanto producción de sorgo, el oeste y centro de África se llevan el primer lugar, el este y el sur el segundo lugar y el norte de América el tercer lugar (Figura 2B). En América, México es el segundo productor de sorgo más importante después de Estados Unidos, teniendo un área de cultivo de 1.74 millones de hectáreas, y una producción de 6.59 millones de toneladas de sorgo entre los años del 2011-2013 (Rakshit et al., 2016). En el 2014, México alcanzó su mayor producción, con más de 8 millones de toneladas (Figura 3A) y se estimó una producción de 7 millones de toneladas entre los años 2016/2017 (Figura 3B) (FIRA, 2016). Para el ciclo 2016/17 México se encontraba como el segundo principal consumidor de sorgo a nivel mundial, por detrás de China, con un consumo de 7.2 millones de toneladas. El principal productor de sorgo a nivel nacional es Tamaulipas con una producción del 40.2% de la totalidad, seguido de Guanajuato con 15.9% y en tercer lugar esta Sinaloa con un 13.3% (FIRA, 2016).



**Figura 2.** Gráfica de cultivo y producción de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) en el mundo. A. Área de cultivo de sorgo en el mundo del 2011-2013, B. Producción mundial de sorgo de 2011-2013 (Rakshit et al., 2016).



**Figura 3.** Gráficas de producción y consumo de sorgo en México A) Producción de sorgo en México B) Consumo de sorgo en México (USDA, 2016; SIAP-SAGARPA, 2016).

En Oceanía, Australia es el único productor significativo. La producción en Europa se limita a pequeñas áreas en Francia, Italia y Ucrania. La producción en Asia se concentra principalmente en dos países: China e India, los cuales contribuyen con el 85% de la producción total regional (Rakshit et al., 2016).

### 1.1.2 Usos del sorgo

Se utiliza para dos propósitos:

- Alimentación humana, es fuente de alimento y parte fundamental de la dieta de 500 millones de personas, principalmente en África (Rosenow et al., 1983).
- Alimentación de ganado/ forrajero (Rakshit et al., 2016).

Según la FAO (1995), en 1960 una parte del sorgo cosechado se empleaba para el consumo humano, sin embargo, este uso ha ido disminuyendo y ahora se utiliza en mayor proporción para la alimentación de ganado. Existen usos alternativos para el grano y el tallo del sorgo, los cuales comercialmente se utilizan para la obtención de alcohol, jarabes, glucosa, almidones modificados, sorbitol y ácido cítrico (CFC & ICRISAT, 2004). En México su principal uso es para consumo forrajero (Rakshit et al., 2016).

## 1.2 Estrés hídrico

El estrés hídrico se produce en las plantas en respuesta a un ambiente escaso en agua, en donde la tasa de transpiración excede a la toma de agua, por temperaturas bajas y por una salinidad alta en el suelo. El estrés hídrico es una de las limitaciones ambientales más importantes, ya que se plantea que cerca del 10 % de la superficie del planeta está afectada por este tipo de estrés e incide en la productividad de los cultivos agrícolas (Ashraf et al., 2007). Las plantas han desarrollado respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares ante este tipo de estrés, las cuales les han permitido su sobrevivencia ante estas condiciones ambientales adversas (Nakashima et al., 2012). Por lo que una planta al experimentar estrés hídrico presenta una serie de cambios en la síntesis proteica, alteración en la expresión génica y un cambio en la cantidad de proteínas y clorofila (Liu et al., 2006).

A nivel fisiológico el déficit hídrico se ve reflejado en la reducción del potencial hídrico en las hojas y el cambio de la turgencia celular. Pardossi et al., 1991; Comstock (2002), y Davies y Zhang (1991) afirman que el estrés hídrico ocasiona el cierre de los estomas mediado por la producción del ácido abscísico. Todos estos cambios a nivel fisiológico resultan en una disminución de la concentración de  $\text{CO}_2$  y en un incremento en la resistencia del mesófilo generando una modificación del metabolismo fotosintético (Pinheiro y Chaves, 2011), llevando como consecuencia una inhibición del crecimiento de las células y por lo tanto de la misma planta (Boyer y Westgate, 2004). Se ha reportado que es capaz de inhibir la cadena de transporte de electrones e incrementar el estrés oxidativo (Masojídek et al., 1991). Potters et al., (2007) reportaron que cuando el estrés hídrico se desarrolla lentamente, la planta responde a nivel morfológico disminuyendo su expansión foliar y aumentando su crecimiento radicular.

A nivel molecular, una de las principales respuestas que se presentan es la modificación de la expresión de genes que codifican para proteínas que intervienen en la protección de la célula, de enzimas clave en la síntesis de osmólitos que regulan el potencial hídrico, de enzimas antioxidantes y de factores de transcripción, por lo que



podemos afirmar que con esta respuesta se da inicio a los mecanismos de resistencia (Moreno, 2009).

Algunos ejemplos de proteínas funcionales que participan en la tolerancia de la planta son las dehidrinas, miembro de las proteínas de la embriogénesis tardía (LEA); y algunas enzimas que son necesarias para la síntesis de compuestos osmoprotectores como por ejemplo la prolina y algunos azúcares. También hay proteínas reguladoras que se activan en presencia de estrés abiótico, dentro de las cuales se incluyen factores de transcripción (TFs) como lo son DREBs (proteínas que se unen a elementos que responden ante la deshidratación), AREB (proteínas que se unen a elementos que responden a ABA) y proteínas NAC, las cuales se han identificado en *Arabidopsis thaliana* (Nakashima et al., 2009).

Tanto los mecanismos fisiológicos como los moleculares van de la mano, por lo que el entender cómo la expresión genética se relaciona con las respuestas fisiológicas, es un punto importante para aplicar la información genética en una herramienta eficaz para el manejo y la producción de cultivos más tolerantes (Bruce et al., 2002). En estudios proteómicos realizados en sorgo (Valdés y Olalde, en prensa) se observó un cambio en la presencia de 52 proteínas ante estrés hídrico, entre las cuales se encuentran la subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC/NACA) y una proteína asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica (PSBA).

### **1.2.1 Subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC/NACA)**

Los ribosomas son máquinas moleculares que se encuentran en el citoplasma y son capaces de sintetizar pequeñas cadenas de aminoácidos llamadas polipéptidos ante distintas condiciones ambientales. Los polipéptidos recién sintetizados se unen a una proteína denominada NAC (por sus siglas en inglés *Nascent Polypeptide-associated complex*) a la cual también se le conoce como factor de transcripción Btf3 ( $\beta$ NAC). Esta proteína juega un papel de suma importancia para que las proteínas recién sintetizadas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

no interactúen con factores que se encuentran dentro del citoplasma que podría afectar su localización intracelular (Karan et al., 2012).

Las proteínas NAC han sido asociadas a otras funciones dentro de la célula como:

- Las proteínas NAC son capaces de promover la interacción de los ribosomas con la superficie mitocondrial para que estas sean capaces de direccionarse a la superficie del organelo eficientemente y a distintos subcompartimentos mitocondriales para que al llegar a su destino desarrollen su función (George et al., 2002; Ponce-Rojas et al., 2017).
- Proteger a los polipéptidos recién sintetizados y trasladarlos al retículo endoplasmático y a las mitocondrias (Rospert et al., 2002).
- Actuar como proteínas chaperonas y ayudar al plegado de las cadenas polipeptídicas nacientes (Kramer et al., 2009).

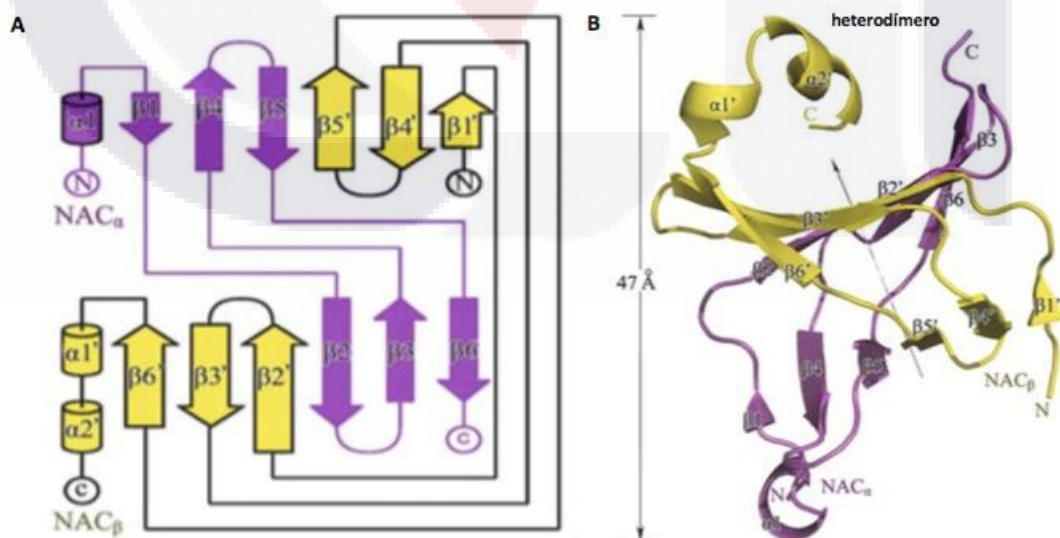
La proteína NAC es un complejo heterodimérico que está conformado por dos subunidades: la alfa ( $\alpha$ NAC) y la beta ( $\beta$ NAC) codificadas por diferentes genes, esto únicamente se presenta en organismos eucariontes ya que en los genomas de las arqueobacterias contienen un solo gen homólogo a  $\alpha$ NAC y forma homodímeros ( $\alpha$ eNAC) (Wiedman et al., 1994). Jafarov et al., (2012), mencionan que no únicamente es posible generarse un heterodímero entre las subunidades, sino que es posible que entre ellas se formen homodímeros, los cuales tienen la característica de ser menos estables, además de que un homodímero de  $\alpha$ NAC no se va a formar si está presente  $\beta$ NAC. La funcionalidad es distinta en cada subunidad individual, así como para el heterodímero u homodímero (Kogan et al., 2014).

$\alpha$ NAC y  $\beta$ NAC difieren en sus secuencias N- y C- terminal, mientras que tienen conservado el dominio NAC de 61 residuos de aminoácidos presente en el centro de la región de la cadena polipeptídica. La región N-terminal comprende de 160 residuos de aminoácidos, los cuales se dividen en cinco subdominios conservados, a los cuales se les nombra de la A-E (Spreter et al., 2005). Existe una baja homología entre la secuencia de aminoácidos entre  $\alpha$ NAC,  $\beta$ NAC y  $\alpha$ eNAC (homodímero de  $\alpha$ NAC en arqueobacterias), únicamente existen residuos de aminoácidos conservados responsables de la estructura espacial de NAC, esto se ha visto desde una levadura hasta el ser humano (Kogan et al., 2014).

Los heterodímeros de NAC tienen una estructura de  $\beta$  barril, que está formada por seis cadenas  $\beta$  antiparalelas de las dos subunidades (Figura 4A y 4B).

Se han reportado secuencias de  $\alpha$ NAC en las cuales se identifican regiones conservadas, entre las cuales se destacan: un sitio de unión a ADN, el cual tiene una afinidad por los ácidos nucleicos principalmente los que se involucran en el control de la expresión génica, el dominio de unión a C-Jun el cual se requiere para la interacción con el factor de transcripción c-jun, el dominio NAC el cual es necesario para la dimerización con la subunidad  $\beta$ NAC y un dominio UBA el cual es el encargado de la ubiquitinación de las proteínas (Mueller et al., 2002). El dominio UBA en  $\alpha$ NAC (dominio asociado a la ubiquitinación) es conservado en la región C-terminal y favorece a la ubiquitinación (poliubiquitinación), es decir que dirige la proteína modificada a la degradación proteosomal (Kogan et al., 2014).

Se ha reportado que existe una expresión diferente para cada una de las subunidades debido a la regulación de la transcripción y la diferenciación celular lo que nos indica una diferencia en cuanto la función tanto de la subunidad  $\alpha$  como de la  $\beta$  (Rospert et al., 2002). Rospert et al., (2002) reportan que  $\alpha$ NAC tiene actividad transcripcional y es capaz de unirse a ADN, ARNr, y ARNt, mientras que la  $\beta$ NAC es capaz de unirse a la enzima ARN-polimerasa II, pero no es capaz de activar la transcripción.



**Figura 4.** Estructura secundaria y terciaria de NAC. A. Topología del complejo  $\alpha$ NAC- $\beta$ NAC B. Estructura 3D del heterodímero  $\alpha$ NAC- $\beta$ NAC (Wang et al., 2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

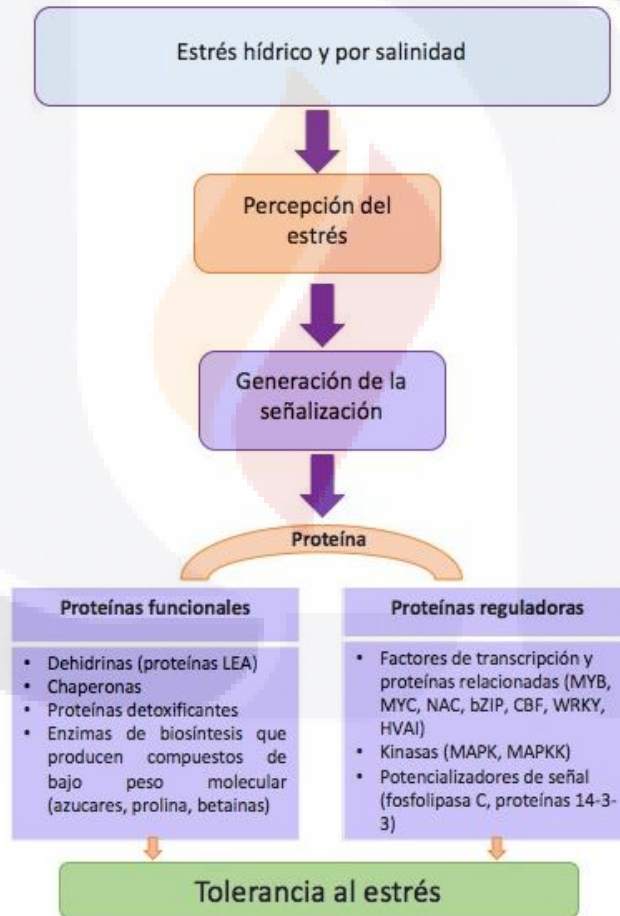
En plantas, las funciones celulares que lleva acabo esta proteína no ha sido muy estudiadas. Yang et al., (2005) demostraron que  $\beta$ NAC interviene en la expresión génica en cloroplasto y mitocondria y también está relacionado con la presencia de defectos en el desarrollo en cloroplasto y mitocondria. En la planta del tabaco, Kaido et al., (2007) demostraron que  $\beta$ NAC está implicado en el movimiento e invasión de célula a célula del virus del mosaico del tabaco. Sin embargo, otros estudios les han atribuido a las proteínas NAC funciones relacionadas con distintos tipos de estrés abiótico.

Yan et al., (2005), mencionan que  $\alpha$ NAC es un probable coactivador transcripcional. En sus resultados demostraron que esta subunidad disminuyó su expresión ante estrés salino en plantas de arroz, ellos hacen mención que la disminución del nivel proteico de esta subunidad afecta la funcionalidad de la proteína NAC y por lo tanto afecta en proceso de transcripción génica, traducción y localización proteica. Por lo tanto, de una manera inevitable se lleva a un desorden en el metabolismo de la planta, por lo que sugieren que esta subunidad es sensible al estrés salino y representa un papel de importancia en la toxicidad en este tipo de estrés, por lo que sugieren que sería de sumo interés realizar la sobreexpresión de esta subunidad ya que se tiene la hipótesis de que puede conferir resistencia. Zhang et al., (2010) reportaron que la expresión de una proteína NAC transgénica da como resultado la resistencia a distintas enfermedades y estrés por sequía en plantas de tomate. A  $\beta$ NAC se le atribuye que es capaz de regular la resistencia a diferentes tipos de estrés, esto se observó en plantas transgénicas de *Arabidopsis* sometidas a estrés en donde se sobreexpresa esta subunidad (Karan et al., 2012). El silenciamiento del gen que codifica para  $\beta$ NAC afecta a la resistencia al frio, sequía y otros tipos de estrés en trigo (Kang et al., 2013).

El homodímero de  $\alpha$ NAC tiene una estructura especial la cual determina su propiedad de ser un factor de transcripción presente en plantas. Se caracteriza por contener una región conservada de residuos de arginina y lisina que se encuentra en el dominio NAC, al que se le atribuye que es capaz de interactuar con los ácidos nucleicos, mientras que el heterodímero NAC no es capaz de interactuar con los ácidos nucleicos (Liu et al., 2010). El dominio NAC del homodímero  $\alpha$ NAC difiere estructuralmente del heterodímero en tener una región de aminoácidos aromáticos conservados (Tyr112 y Phe123) y residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Leu85 y Ile121) en la estructura  $\beta$ -

barril. Esta región se presume que es la que interviene en la función de factor de transcripción. Se ha observado que el dímero de  $\alpha$ NAC interactúa con regiones regulatorias de diversos genes (Kogan et al., 2014). NAC juega un papel de suma importancia en diversos procesos del desarrollo, en la respuesta a señales bióticas y abióticas, así como de la señalización hormonal.

Dependiendo del tipo de estrés a que esté sometida la planta, se genera una señalización para generar tolerancia, que involucra cambios en los niveles de proteínas funcionales o reguladoras, tal es el caso de las proteínas NAC (Figura 5) (Mahalingam et al., 2015).



**Figura 5.** Red de señalización de NAC's ante estrés abiótico (Modificado de: Mahalingam, 2015).

### 1.2.2 Proteína asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica (*PSBA*)

La fotosíntesis es un sistema sensible al estrés por déficit hídrico, que puede ser atribuido a que se produce un daño en la maquinaria fotosintética primaria (Liu et al., 2006). Es una de las principales limitantes del metabolismo del carbono, por lo que se ha realizado una serie de estudios en diversos cultivos (Griffiths y Parry, 2002; Lawlor, 2002). Las reacciones fotoquímicas del proceso de fotosíntesis ocurren en dos complejos proteicos asociados a la membrana del tilacoide denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII).

Yoo et al., (2004), afirman que el PSII es el complejo más funcional en cuanto a importancia que se encuentra dentro de los cloroplasto en las membranas de tilacoides, tiene la función de convertir la energía de la luz a energía electroquímica. EL PSII es un complejo pigmento-proteína de suma importancia en la respuesta fotosintética ante diversos tipos de estrés en las plantas superiores (Liu et al., 2006).

El PSII está compuesto por un heterodímero de proteínas homólogas, las denominadas D1 y D2 (Figura 6), las cuales contienen el centro de reacción de la clorofila (P680) y tiene asociados los aceptores de electrones. D1 se une a la plastoquinona (QB), la cual es el segundo aceptor de electrones del PSII. En plantas, la proteína D1 es codificada por un único gen que se encuentra en el genoma del cloroplasto denominado *PSBA* (Vrba et al., 1990). La proteína codificada es de aproximadamente de 32kDa (Livore et al., 1989).

Se ha demostrado que el proceso de fotosíntesis es sensible al estrés hídrico (Griffith y Parry, 2002). El estrés hídrico en las hojas da como resultado la reducción de la tasa fotosintética, lo cual se atribuye al deterioro de la maquina fotosintética primaria (Kaiser, 1987). El PSII juega un papel de suma importancia en la fotosíntesis ya que responde al estrés ambiental en plantas superiores (Baker, 1991). También se presentan cambios en la síntesis de proteínas, alteración en la expresión genética, se disminuyen algunas proteínas y el contenido de clorofila y se lleva a cabo la producción de especies reactivas de oxígeno al percibirse el estrés hídrico (Liu et al., 2002). Wiltens et al., (1978) reportaron que en organismos como las algas y en estudios con cloroplastos aislados, tanto el PSI y PSII, pero principalmente el PSII se ven afectados por estrés hídrico y esto lleva a una menor eficiencia del transporte de electrones. Se tiene la hipótesis de que el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

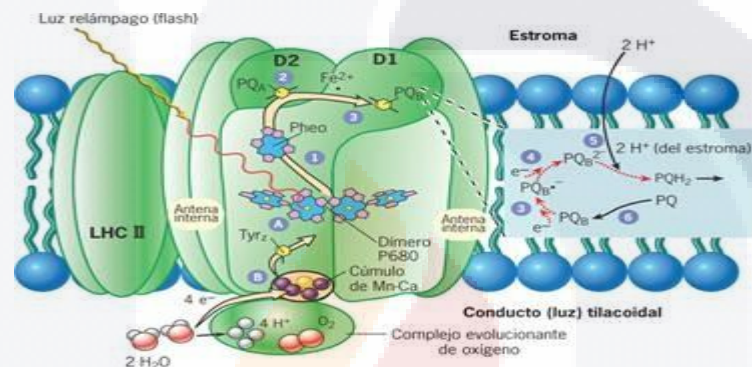
estrés abiótico puede afectar el tamaño de los complejos antenas, los cuales son necesarios para la captura de la luz durante la fotosíntesis, así como también puede afectarla eficiencia cuántica del PSII y por consecuencia se ve afectada la asimilación del CO<sub>2</sub> (Baker, 1991., Liu et al., 2006).

La proteína D1 puede aumentar su síntesis/degradación (Yamamoto, 2001). Liu et al., (2006), reportaron que en trigo el transcrito del gen *PSBA* que codifica para la proteína D1 tuvo un decrecimiento muy marcado cuando las plántulas de trigo fueron sometidas a déficit hídrico gradual. He et al., (1998) mencionaron que el déficit hídrico afecta la expresión de los genes *PSBA* y *PSBD*, posiblemente a nivel transcripcional. Análisis de Southern blot y ADN dot blot mostraron que el déficit hídrico no afecta los niveles de los genes *PSBA* y *PSBD*, sino que provoca una disminución de sus transcritos, posiblemente como resultado de una baja actividad en la tasa de transcripción y/o un cambio en la estabilidad del ARNm (Liu et al., 2006). Análisis de Western blot indican que la concentración de la mayoría de las proteínas de PSII, incluyendo D1 y D2 que se encuentran en el centro de reacción, disminuyen con el incremento del déficit hídrico, posiblemente como resultado del incremento en su degradación (Yuan et al., 2005). Estudios de traducción *in vitro* y análisis cuantitativos de ARN's de cloroplasto, indicaron que el potencial de la síntesis de proteínas a partir de su ARNm en el cloroplasto se ve dañado por el déficit hídrico (He et al., 1995) Estos efectos en el metabolismo de las proteínas del PSII, principalmente en el centro de reacción, se puede dar por un daño fotoquímico del PSII (Yordanov et al., 2000 y He et al., 1995).

Yuan et al., (2005), reportaron que el estrés hídrico es capaz de regular la expresión génica del PSII, así como la síntesis proteica en todos los niveles: transcripcional, traduccional, postranscripcional y postraduccional. Así también afirman que un estrés medio suave da como resultado la inhibición de la transcripción de los genes *PSBA* y *PSBD* y se incrementa la degradación del ARNm del cloroplasto. Estos cambios se ven reflejados en un daño en el PSII. El someter a la planta a un estrés hídrico moderado y severo causa los mismos efectos mencionados anteriormente, se ve un decremento en la síntesis de D1 y D2, así como un incremento en su degradación, dañando el PSII, lo cual conduce a la inhibición de las

funciones de este fotosistema, por lo que se presenta un decremento en el transporte de electrones y una disminución en la eficiencia de oxígeno.

Saibo et al., (2009) afirman que las especies reactivas de oxígeno producidas por la planta como mecanismo de defensa ante el estrés hídrico y otros tipos de estrés, inhiben el PSII suprimiendo la transcripción y traducción de los genes *PSBA* que codifican para la proteína D1. En la cianobacterias *Synechocystis* sp., el estrés salino inhibió la transcripción y traducción de los genes *PSBA*, limitando la eficiencia de fotosíntesis al inactivar el fotosistema II (Saibo et al., 2009).



**Figura 6.** Esquema del Fotosistema II (PSII). Se puede visualizar el heterodímero proteico formado por las proteínas D1 y D2 (Karp, 2014).

### 1.2.3 Péptido natriurético (PN)

Los péptidos natriuréticos (PN) son un grupo de sustancias peptídicas novedosas de estructura similar pero genéticamente distintas. Son una familia de hormonas peptídicas en vertebrados que tienen un papel en la osmorregulación (Toop y Donald, 2004). Este tipo de proteínas fueron identificadas por primera vez en extractos atriales de rata (PNA). Hasta el momento se han identificado 3 tipos de péptidos natriuréticos: auricular, cerebral y endotelial (Fuster, 2002; Valle-Rodríguez., 2016).



**Tabla 2.** Tipos de péptidos natriuréticos (Tomada de Valle-Rodríguez, 2016)

<b>Tipos de péptidos natriuréticos</b>
Péptido natriurético Auricular (PNA)
Péptido natriurético Cerebral (PNB)
Péptido natriurético Endotelial (PNC)

Los péptidos natriuréticos auricular (PNA) y cerebral (PNB) son de origen cardiaco, estos son secretados por la atrial cardiaca y los ventrículos, el péptido tipo C (PNC) es de origen endotelial y se tiene reportado que puede estimular el crecimiento longitudinal del hueso y el péptido tipo D se ha aislado recientemente en serpientes (Valli et al., 1999). Los PN participan principalmente en la regulación de iones y la homeostasis de la célula. Principalmente los PN ejercen efectos fisiológicos en los vertebrados como por ejemplo en el control de la presión sanguínea (Turek y Gehring et al., 2016).

#### **1.2.4 Péptidos natriuréticos en plantas (PNP's)**

En plantas también se han identificado péptidos natriuréticos similares a los PN encontrados en vertebrados, estos son moléculas que se mueven sistémicamente y comparten una serie de aminoácidos con sus análogos en vertebrados (Turek y Gehring et al., 2016). Los primeros trabajos de PN en plantas se llevaron a cabo en *Dracena godseffiana*, donde se reconocieron en hojas y tallos utilizando radioinmunoensayos (Maqungo, 2005). Estos péptidos son una clase novedosa de hormonas peptídicas que se activan por la señalización de la vía guanosina 3,5-monofosfato cíclico (GMPC) y afecta sistemáticamente al balance de sal y agua en la planta y la respuesta biotrófica hacia los patógenos de plantas (Turek y Gehring et al., 2016).

Gehring (1999) menciona que el término PNA fue usado originalmente para designar el extremo C-terminal (aa 99-126), además afirma que el PNA está codificado por un gen con tres exones y codifica para una prepro-PNA que contiene un péptido señal (24-mero) y dos argininas en el C-terminal (no presentes en PNA de humano) que son escindidas para formar pro-PNA (aa 1-126). La posterior proteólisis da lugar a PNA (1-98) y PNA (99- 126). El extremo C-terminal (28-mero) forma una estructura circular

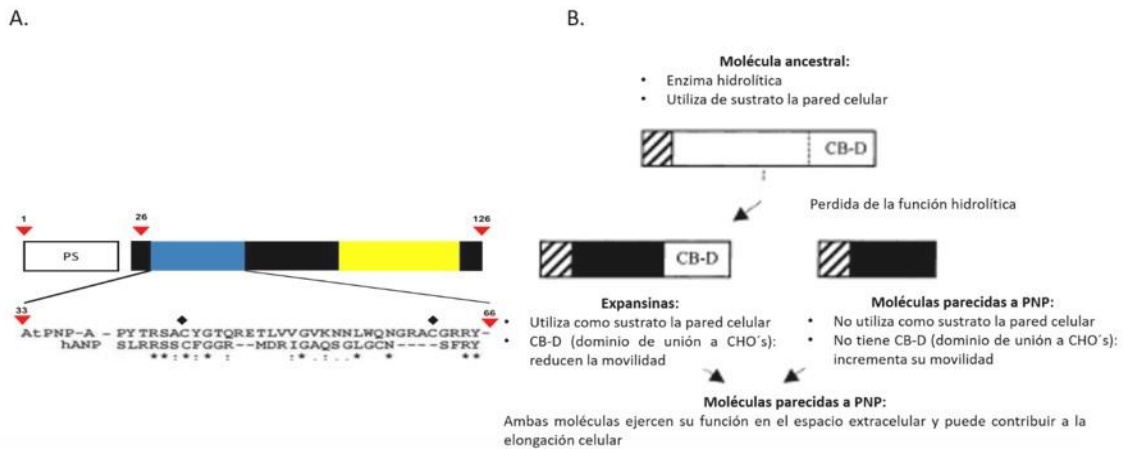
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

debida a los puentes disulfuro entre cisteínas 7 y 23, y se piensa que es la que tiene la principal actividad biológica. El extremo N-terminal contiene un péptido señal que lleva a la molécula al espacio extracelular (Garavaglia et al., 2010).

A partir de técnicas de biología molecular se ha aislado y secuenciado parcialmente un PNP en papa, así también se ha identificado y aislado un transcrito en *A. thaliana* (AtPNPA) (Figura 7A) que codifica para un PNP. AtPNP-A se caracteriza por ser una pequeña proteína de 126 aminoácidos de longitud, codificada por un gen con un único intrón. Del aminoácido 1-24 de dicha proteína, corresponde al péptido señal (Morse et al., 2004). Los PNPs promueven una serie de respuestas fisiológicas, incluyendo movimientos radiales de agua fuera del xilema, hinchamiento de protoplastos dependientes de osmólitos, aumentos transitorios en GMPc y flujos de iones H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> (Gehring e Irving, 2012). Así también se les ha atribuido que responden a estrés abiótico (Morcuende et al., 2007) y a la presencia de patógenos en las plantas (Meier et al., 2008).

A partir de los trabajos reportados se podría creer que este tipo de proteínas pueden tener cierta influencia en el desarrollo de mecanismos de tolerancia a la sequía en diferentes especies vegetales principalmente porque interviene en el cierre estomático.

Para la identificación de péptidos natriuréticos en plantas, Ludidi et al., (2002) afirman que mantienen características en sus secuencias de aminoácidos, tales como: seis residuos de cisteínas que favorecen al plegamiento y a la función biológica del péptido, además de que después del cuarto residuo conservado de cisteína se presenta una glicina conservada. Los PNPs son moléculas parecidas a las expansinas sólo que de menor tamaño (12-14 kDa los PNPs y 24 kDa la expansinas); Los PNPs contienen únicamente un intrón mientras que las expansinas contienen 2, por lo que los PNPs no tienen la capacidad de unirse a la pared celular y por lo tanto facilita su movilidad. Los PNP's contienen los siguientes motivos conservados: A: K[VI]VD y B: [LM]SxxAFxxI (Ludidi et al., 2002). Tanto los PNP's como las expansinas provienen de una molécula ancestral que tenía la capacidad de actuar como una enzima hidrolítica, esta enzima perdió el dominio de unión a carbohidratos para originar a los PNP's (Figura 7B).



**Figura 7.** Esquema del gen del péptido natriurético tipo A en *Arabidopsis thaliana*. A. La región azul comprende la región del aminoácido 33 al 66, la parte amarilla en la parte C terminal la proteína contiene un dominio para una lipoproteína A (Rlp A), dentro del mismo se encuentra un dominio EG45 B. Modelo evolutivo de los PNP's. Modificadas de: (Ludidi et al, 2002).

### 1.3 Micorrizas

Las micorrizas se definen como relaciones simbióticas entre un hongo y el sistema de raíces de un organismo huésped (Cobb et al., 2016). Se consideran como simbiosis nutricionales ya que esta asociación le provee a la planta de fósforo y otros minerales como zinc y cobre (Zhang et al., 2011). Las hifas micorrízicas asociadas a las raíces de las plantas pueden aumentar el área de alcance del sistema radicular y aumentar la posibilidad de encontrar un acceso a los recursos que pueden limitar el crecimiento de la especie vegetal (Cobb et al., 2016). Existe varios tipos de hongos micorrízicos, cada tipo de hongo micorrízico difiere en cuanto el tipo de hifas que produce, plantas a las cuales coloniza y la forma en la cual se genera el crecimiento del micelio (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tipos de hongos micorrízicos Modificado de: Smith et al., 2010.

	VA	Ectomicorriza	Ectoendomicorriza	Arbuscular	Monotropoide	Ericoide	Orquideoide
Hongo							
Septado	-	+	+	+	+	+	+
Aseptado	+	-	-	-	-	-	-
Colonización intracelular	+	-	+	+	+	+	+
Cobertura fúngica	-	+	+/-	+/-	+	-	-
Red Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Vesículas	+/-	-	-	-	-	-	-
Acloróticas	-	-	-	-	+	-	+
Taxa del hongo	Zygo	Basidio/Asco (Zygo)	Basidio/Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Taxa de la planta	Bryo Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropaceae	Ericales Bryo	Orchidaceae
<p>*Todas las orquídeas son acloróticas en las etapas tempranas de semillas. Muchas orquídeas son verdes en su etapa adulta. El taxa fúngico se abreviaron de : Zygomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes, el taxa de las plantas son: Bryophyta, Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae.</p>							

\*Todas las orquídeas son acloróticas en las etapas tempranas de las semillas. Muchas orquídeas son verdes en su etapa adulta.

El taxa fúngico se abreviaron de: Zygomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes, el taxa de las plantas son: Bryophyta, Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae.

VA: vesiculoarbusculares

Una de las claves más exitosas para un buen cultivo de sorgo es la aplicación de asociaciones mutualistas con microorganismos beneficiosos del suelo como por ejemplo de los hongos micorrízicos arbusculares (AM) (Cobb et al., 2016).

### 1.3.1 Beneficios que aportan las micorrizas

Estos hongos tienen un papel de suma importancia como fuente de carbono ya que genera un aumento en la tasa fotosintética por lo que el hongo está relacionado directamente con un aumento en el metabolismo del carbono de la planta (Miller et al., 2002) y en la estructuración de los suelos (Zhu y Miller, 2003). Además, no sólo son fundamentales para mejorar la absorción de nutrientes y del agua de las plantas, sino que también la benefician dándole una mayor resistencia a enfermedades. Aunado a esto, favorecen la estructura del suelo y la actividad microbiana benéfica en los ecosistemas naturales (Gosling et al., 2006).

Una larga serie de investigaciones han probado que el uso de hongos micorrízicos ayuda a la planta a conllevar el estrés hídrico (Augé et al., 2001). La inoculación con AM mejoró la captación de agua en muchas especies de plantas que fueron sometidos a estrés por sequía, ya que estos hongos son simbioses que tienen la capacidad de mejorar el crecimiento de las especies vegetales incluso al estar expuestas a distintos tipos de estrés principalmente al déficit hídrico.

Los hongos AM al asociarse a las raíces de la planta huésped exploran un mayor volumen de suelo, lo que aumenta la captación de agua y su transporte en las raíces. Esto ayuda a tener una mejora en los efectos fisiológicos, celulares y osmóticos que desarrolla la planta (Zarik et al., 2016).

Los hongos AM se identifican por poder crecer de dos maneras: intra e intercelular en la corteza de las raíces, así también porque es capaz de desarrollar dos estructuras: los arbusculos y las vesículas (Quilambo, 2003). Barker et al., (1998) define al arbusculo como hifas que se dividen dicotómicamente, las cuales sufren una invaginación por la membrana plasmática de las células de la corteza de la raíz, las cuales tienen un periodo de vida corto. Peterson et al., (2004) define las vesículas como estructuras cuya función es principalmente la de almacenar nutrientes, las cuales se forman en los extremos de las hifas de los hongos micorrízicos.

### **1.3.2 *Glomus* spp.**

Los hongos del Phylum *Glomeromycota* con la excepción de *Geosiphon pyriformis* son considerados hongos arbusculares obligados que son capaces de generar asociaciones mutualistas con plantas vivas (Morton y Benny, 1990).

Las micorrizas del género *Glomus* spp. consisten en arbusculos, vesículas (las cuales no siempre se forman), así como hifas que crecen intra e intercelular. Los arbusculos de estos hongos se caracterizan por tener troncos cilíndricos o ligeramente acampanados con ramas las cuales se van estrechando gradualmente hacia las puntas, así también sus vesículas son de paredes delgadas y elipsoides. Las hifas intraradicales crecen a lo largo de las raíces y pueden tomar la forma de Y, conexiones con forma de H y espirales.

El género *Glomus* es el grupo de hongos más grande y diverso en el phylum *Glomeromycota*, Schwarzott et al., (2001) afirman que el 53% de los hongos arbusculares descritos a la fecha se incluyen dentro de este grupo, el cual inicialmente se dividía en tres grupos filogenéticos: A, B y C.

#### **1.4 Análisis proteómico**

Las proteínas son moléculas cruciales de todos los seres vivos ya que tienen múltiples funciones de entre las cuales se encuentran: catálisis de las reacciones químicas celulares, transporte de moléculas, transducción de señales, metabolismo: producción y manejo de la energía. La síntesis de todas estas proteínas está codificada por los genomas (Mojica et al., 2003). Wilkins et al., (2013) definen a la proteómica como todas las proteínas que han sido expresadas a partir de un genoma.

La proteómica no consiste únicamente en el analizar todas las proteínas de un individuo a gran escala, sino que también incluye el poder identificar y caracterizar las proteínas, así como comprender cómo las proteínas pueden ser modificadas posterior a su traducción. Estas modificaciones son capaces de cambiar la estructura y/o la funcionalidad de la proteína (Fields, 2001). Algunas modificaciones postraduccionales que presentan las proteínas son: la fosforilación: esta se define como la unión de un grupo fosfato a una proteína previamente existente, es una manera en la que la proteína cambia evolutiva y metabólicamente modificando su estructura y sus propiedades (Weise y Lenz, 2018). En este proceso el grupo fosfato es transferido a partir de una molécula de ATP en sitios específicos de la proteína a partir de las enzimas kinasas. La fosforilación siempre ocurre en los residuos de aminoácidos de serina, treonina y tirosinas presentes en las proteínas. El proceso es reversible y la fosforilación está relacionado con la gran mayoría de procesos fisiológicos y patológicos como la transducción de señales celulares (Hu et al., 2006).

Otra modificación postraduccional es la glicosilación la cual se refiere al proceso en el cual oligosacáridos se combinan con residuos de aminoácidos específicos en una proteína (Hu et al., 2006). Existen dos tipos de glicosilaciones: La N-glicosilación: el azúcar se une al grupo amino de las asparaginas y la O-glicosilación: el azúcar se une a los residuos de serina o treonina (Blom et al., 2004) (Gavel et al., 1990). Este tipo de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

modificación está relacionado con procesos como: reconocimiento molecular, adhesión y señalización celular (Geyer y Geyer, 2006).

La ubiquitación es otro tipo en donde las proteínas se unen a una ubiquitina, la cual es un polipéptido altamente conservado de 76 aminoácidos. La proteína al estar unida a la ubiquitina favorece a que la proteína sea reconocida y llevada al proteosoma para su degradación (Hu et al., 2006).

La lipidación se define como el proceso en el cual una cadena larga de hidrocarburos alifáticos se une a la proteína para formar conjugados con los átomos de oxígeno y fósforo. Este proceso es fundamental para la conducción de señales, además que favorece a la unión de los lípidos a las proteínas de la membrana (Hu et al., 2006).

Otro tipo de modificación es la metilación que consiste en añadir un grupo metilo a una proteína, las metilasas son las encargadas de realizar esta unión (Hu et al., 2006)

Valdés et al., (2017), mencionan que las proteínas también pueden ser modificadas a partir de oxidaciones generados por especies reactivas de oxígeno (ROS) tal es el caso del óxido nítrico y el peroxinitrito. Los ROS generados por las plantas participan en la señalización celular y en su desarrollo.

Para la realización de los estudios proteómicos se hace uso de diferentes técnicas de entre las cuales se destacan: la electroforesis bidimensional en la cual las proteínas son separadas en base a sus puntos isoeléctricos (pH's) para posteriormente separarse en base a sus masas moleculares, esta técnica nos puede indicar de manera semicuantitativa la presencia y/o ausencia de un patrón de proteínas y dependiendo de la intensidad de la señal se puede inferir una cuantificación, así como generar una comparación del patrón de proteínas presentes para identificar proteínas que intervienen en la tolerancia a diferentes tipos de estrés (Valdés et al., 2017) (Barkla et al., 2013). Otra técnica utilizada es la espectrofotometría de masas, en donde se puede hacer la identificación y caracterización de la proteína, ya que nos provee de la estructura química de las moléculas orgánicas, en este caso de las proteínas (Pomilio et al., 2011).

La proteómica ha facilitado el entendimiento de procesos vitales en la planta tanto como su crecimiento, desarrollo, y tolerancia a estrés biótico y abiótico han llevado a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

conocer cómo afectan de manera frecuente a la productividad de los cultivos. La presencia de ambos tipos de estrés es capaz de desencadenar modificaciones en su proteoma, por lo tanto, desencadena cambios en su estado fisiológico y metabólico. La tolerancia al estrés abiótico es otro de las ramas que se ha estudiado a partir de la proteómica ya que se realizan comparaciones del patrón de presencia y/o ausencia de proteínas en bajo diferentes condiciones de estrés, evaluando los cambios que ocurren en la acumulación de las proteínas llevando a generar cambios en la fisiología y morfología de la planta (Valdés et al., 2017).

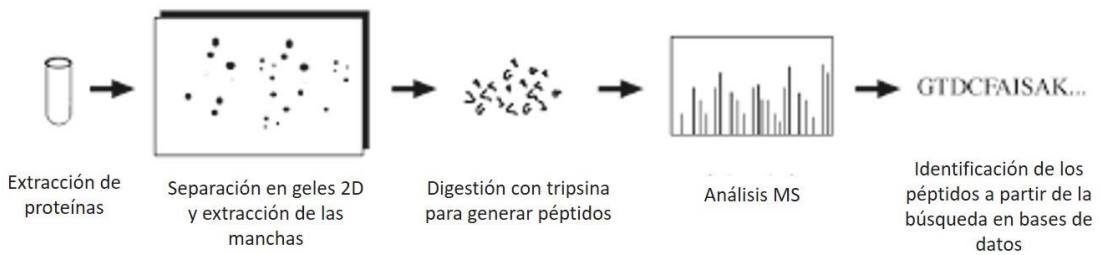
Por ejemplo, en sorgo se tienen reportado estudios proteómicos diferenciales en respuesta al estrés salino en donde se identificaron 21 proteínas usando electroforesis bidimensional, destacando proteínas que intervienen en la transducción de señales y el transporte de iones inorgánicos y donde también se observó la sobreexpresión de enzimas involucradas en el metabolismo del estrés oxidativo como: glutatión-transferasa y la l-ascorbato peroxidasa, así también se identificaron proteínas de unión al ARN, entre otras (Swami et al., 2011).

Otro estudio reportado por Yan et al., (2005) afirma la identificación de proteínas en respuesta al estrés salino en plantas de arroz, entre las proteínas identificadas se encuentra UDP-glucosa pirofosforilasa, una subunidad 6b-1 de un citocromo c oxidasa, proteína del complejo asociado al polipéptido naciente subunidad alfa ( $\alpha$ NAC), entre otras.

*Hippophae rhamnoides* L. es una planta capaz de crecer bajo condiciones ambientales extremas por lo que realizaron un estudio proteómico ante la presencia de estrés hídrico. En este estudio se encontró que existen cambios en la abundancia de 55 proteínas, de las cuales encontraron 3 proteínas que desaparecían: una proteína de choque térmico, así como tres proteínas que aumentaban su presencia como las tres subunidades largas de la Rubisco y proteínas que únicamente se presentaban ante estrés hídrico como es el caso de una 4-hidroxifenil piruvato deshidrogenasa (Xu et al., 2009).

El análisis proteómico previo a este estudio realizado por el Dr. Victor Ogalde y la Dra. Silvia Valdés en el CINVESTAV Unidad Irapuato se resume en la Figura 8.





**Figura 8.** Resumen del análisis proteómico realizado en *Sorghum bicolor* (L) Moench en presencia y ausencia de micorrizas (Olalde y Valdés, en prensa). El análisis proteómico únicamente se realizó con la asociación al consorcio selva en presencia y ausencia de estrés hídrico.

### 1.5 Análisis de expresión genética

A lo largo del tiempo las regiones con actividad agrícola han estado más expuestas a condiciones ambientales extremas como de frío y sequía, sin embargo, la demanda de alimentos no ha dejado de incrementarse por lo que es necesario el desarrollo de cultivos tolerantes, los cuales generen mejores rendimientos y puedan satisfacer la demanda de la población mundial.

Es necesario comprender los mecanismos que se involucran en la respuesta de las plantas a condiciones adversas ambientales, éste sería el primer paso en la generación de cultivos tolerantes a diferentes tipos de estrés. La búsqueda se puede dar a nivel génico (genómica), a nivel proteína (proteómica), a nivel de metabolitos (metabolómica), a nivel individual (fisiología, sistema biológico) o a nivel comunidad (ecología). Por lo que en los últimos 20 años se ha desarrollado ampliamente el área de las ciencias genómicas, para tener un mayor entendimiento de varias áreas como la expresión génica, la organización y la relación de los genes que conllevan a la tolerancia al estrés. Existe un área de estudio que se denomina genómica funcional, la cual se encarga del estudio de la función de los genes en un organismo y se centra en procesos como la transcripción, traducción, interacción génica, así como estos intervienen en la generación de diferentes fenotipos (Pérez-Torres et al., 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El análisis de los genomas para la identificación de estos genes de importancia se ha limitado a ciertas plantas que poseen características, tales como: 1) genoma de tamaño pequeño, 2) tiempo de generación/crecimiento corto, 3) tamaño pequeño para que sea capaz de desarrollarse en un espacio pequeño, 4) que tenga la capacidad de ser utilizada para ser manipulada genéticamente (Tabata, 2002). Una de las áreas más prometedoras en la actualidad se le denomina genómica comparativa en donde se realiza la comparación entre genomas y transcriptomas de diferentes organismos (Gale y Devos, 1998). El hecho de poder identificar variaciones en los genomas o en los transcriptomas en las diferentes plantas modelo de estudio relacionados con rasgos agronómicos es de gran importancia para la biotecnología de cultivos (van de Mortel y Aarts, 2006).

Green et al., (2001) afirman que un paso fundamental para cualquier estudio de genómica funcional es el análisis de la expresión génica, es decir tener la posibilidad de analizar la expresión desde pocos hasta miles de genes de manera simultánea, pudiendo tener una imagen más completa de los cambios que ocurren a nivel transcriptoma.

Las tecnologías que sirven para el análisis de la expresión génica se dividen en dos categorías: los sistemas cerrados y los abiertos. Los sistemas cerrados se caracterizan por evaluar un número finito de genes, por lo que el estudio de los genes está limitado al conocimiento del genoma que se estudia. Los sistemas cerrados se han usado ampliamente en el análisis de expresión génica en plantas (Ma et al., 2005; Rensink et al., 2005). Los sistemas abiertos no requieren del conocimiento previo del genoma o transcriptoma de un organismo, estas se han utilizado de manera exitosa para cuantificar la transcripción y poder generar datos de expresión en diferentes tejidos o etapas del desarrollo de una planta (Fizames et al., 2004).

Las técnicas más usadas tanto de sistemas abiertos, así como los cerrados se resumen en la Tabla 4.

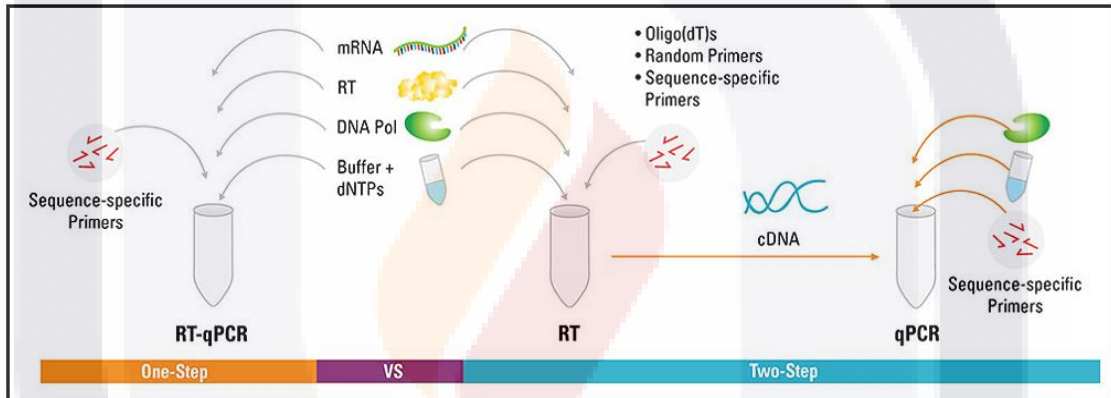
**Tabla 4.** Técnicas más usadas para el análisis de expresión génica en plantas Modificado de: Pérez-Torres et al., 2009.

<b>Sistemas abiertos</b>	<p><b>ADNc-AFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados en ADNc):</b> es una técnica reproducible, sensible y funcional para la detección de la expresión génica diferencial (Bachem et al., 1998), consiste en 4 pasos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Síntesis de ADNc utilizando los oligonucleótidos poli-Dt</li> <li>2) Se realizan dos digestiones a partir de enzimas de restricción</li> <li>3) Se realiza una ligación de los adaptadores</li> <li>4) Proceso de preamplificación usando oligonucleótidos que se unen a los adaptadores</li> <li>5) Amplificación selectiva en los cuales los oligonucleótidos están etiquetados radioactivamente y permite visualizar los productos de la amplificación a partir de una electroforesis (Weiberg et al., 2009).</li> </ol>
	<p><b>SAGE (Análisis de la expresión génica en serie):</b> método que es ampliamente utilizado para la caracterización de transcriptomas, en esta técnica se basa en tomar pequeñas secuencias de ADNc (10-27 pb) que se obtienen de fragmentos específicos para la identificación única de los transcritos. Los fragmentos pueden ser concatemerizados para formar un fragmento de ADN de mayor longitud, estos fragmentos pueden ser clonados y secuenciados para incrementar la eficiencia de la secuencia obtenida para realizar el análisis transcriptómico. El nivel de expresión de cada uno de los transcritos es cuantificado, determinando el número de veces que se presenta determinado fragmento (Hu et al., 2006).</p>
	<p><b>MPSS (Secuenciación paralela masiva de la firma):</b> es una técnica que es capaz de medir el nivel de expresión de genes en una muestra a partir del conteo del número de moléculas de ARNm producidos por cada gen. Se generan secuencias de aproximadamente 17 pares de bases de cada ARNm río arriba de la cola poli A. Estas secuencias posteriormente se utilizan como marcadores para identificar cada ARNm y para el conteo de la expresión se determina el número total de los marcadores de cada ARNm (Reinartz et al., 2002).</p>
<b>Sistemas cerrados</b>	<p><b>Microarreglos:</b> técnica que consiste en que diferentes fragmentos de ADNc de diferentes genes de un tejido problema y uno control se unen a una matriz o un soporte sólido tal como podría ser vidrio, plástico, silicón, etc. Estos se ponen en contacto con ácido nucleico diana (para expresión ADNc) el cual es marcado con una sustancia fluorescente o radioactiva y se procede a la hibridación para que cada ADN se una a su ADN complementario inmovilizado en la matriz. A mayor hibridación, mayor expresión y por lo tanto mayor es la fluorescencia emitida (Vallin, 2007).</p>

**PCR en tiempo real (RT-qPCR):** Es una variante de una PCR convencional en donde se puede detectar y cuantificar la expresión de un número limitado de genes, la cuantificación de la expresión se realiza a partir de la medición de la fluorescencia. Diferentes moléculas fluorescentes se han utilizado para detectar y cuantificar la amplificación del ADN, sin embargo, la más utilizada es el SYBR Green, la cual es altamente sensible. Esta molécula fluorescente es capaz de unirse a la doble cadena del ADN y emitir luz al ser excitado, por lo tanto, la fluorescencia es proporcional a la amplificación de moléculas de ADN específicas (Pabla et al., 2008).

De manera resumida la técnica consiste en 3 pasos (Figura 9):

- 1) Transcripción reversa: conversión del ARN al ADNc (ADN de doble cadena)
- 2) La amplificación de un fragmento del ADNc haciendo uso de oligonucleótidos específicos.
- 3) Detección y cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real (Nolan et al., 2006).



**Figura 9.** Procedimiento para realizar una PCR en tiempo real (qPCR). La PCR en un solo paso consiste en realizar la transcripción reversa y la PCR en una sola reacción y la PCR en dos pasos consiste en realizarlos por separado, se utilizan oligonucleótidos específicos para únicamente amplificar una región de interés: Tomado de ThermoScientific (Bustin, 2004).

## Justificación

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) es el quinto cereal de mayor consumo en el mundo y es un alimento básico para millones de personas que viven en aproximadamente 30 países en las regiones subtropicales y semiáridas de África y Asia.

El sorgo se destaca por poseer tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico como: calor, sequía, salinidad y escasez de nutrientes. Aunado a esto, es capaz de asociarse a hongos micorrízicos, lo cual le confiere beneficios adicionales ya que esta relación simbiótica le permite tener una mayor absorción de agua y nutrientes.

También se sabe que las plantas son capaces de responder al estrés a nivel fisiológico, celular y molecular. En particular, el mecanismo molecular se basa en la modificación de la expresión génica y por consecuencia a nivel proteico. En estudios proteómicos de sorgo bajo estrés hídrico y asociaciones micorrizicas se observaron cambios significativos en la expresión de la proteína D1; que forma parte del fotosistema II (PSII) y está involucrada en el proceso de fotosíntesis y también de la subunidad alfa del complejo del polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC); que forma parte del heterodímero proteico encargado de la localización, plegamiento y síntesis proteica (Olalde y Valdés, en prensa). Por otro lado, se ha visto que otras proteínas intervienen en la apertura y cierre estomático cuando las plantas están bajo estrés hídrico, este es el caso de los péptidos natriuréticos de plantas (PNP's).

Sin embargo, en la mayoría de los casos los niveles de proteínas expresadas al compararse con los transcritos no tienen ninguna correlación, esto puede ser a que existen mecanismos regulatorios postranscripcionales y/o postraduccionales.

Por lo tanto, es importante conocer el comportamiento de estos genes, ya que en un futuro serán importantes para conocer más las rutas involucradas en la tolerancia ante este tipo de estrés y por lo tanto poder utilizarlos en la generación de variedades resistentes a partir de técnicas de ingeniería genética, así también poder conocer que hongo micorrízico le brinda mayores beneficios al sorgo ante el déficit hídrico.

## Hipótesis

La expresión de genes que codifican para  $\alpha$ NAC, la proteína D1 del PSII y un probable péptido natriurético de plantas (PNP) se alteran en respuesta al estrés por déficit hídrico en plantas de sorgo *Sorghum bicolor* (L) Moench asociadas a hongos micorrízicos.

## Objetivos

### 5.1 Objetivo general

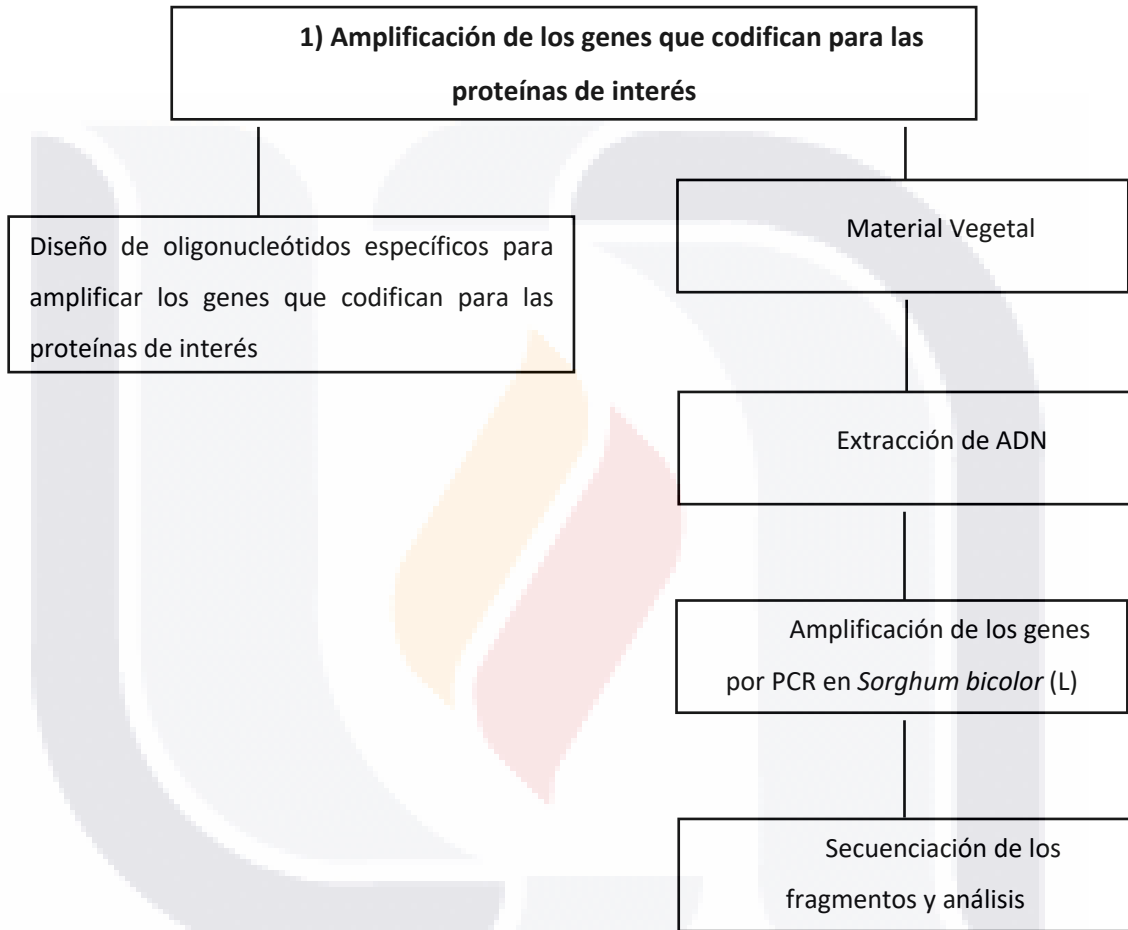
Identificar y analizar la expresión de los genes que codifican para las proteínas D1, PNP y  $\alpha$ NAC involucrados en la respuesta al estrés hídrico en plantas de *Sorghum bicolor* (L) Moench en presencia y ausencia de hongos micorrízicos.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Diseñar oligonucleótidos específicos para las proteínas  $\alpha$ NAC, D1 del PSII y PNP's.
2. Amplificar por PCR fragmentos de los genes que codifican para las proteínas de interés.
3. Secuenciar los fragmentos amplificados y analizarlos bioinformáticamente.
4. Verificar y cuantificar la expresión de transcritos de estas proteínas en plantas de sorgo en presencia y ausencia de hongos micorrízicos ante déficit hídrico.

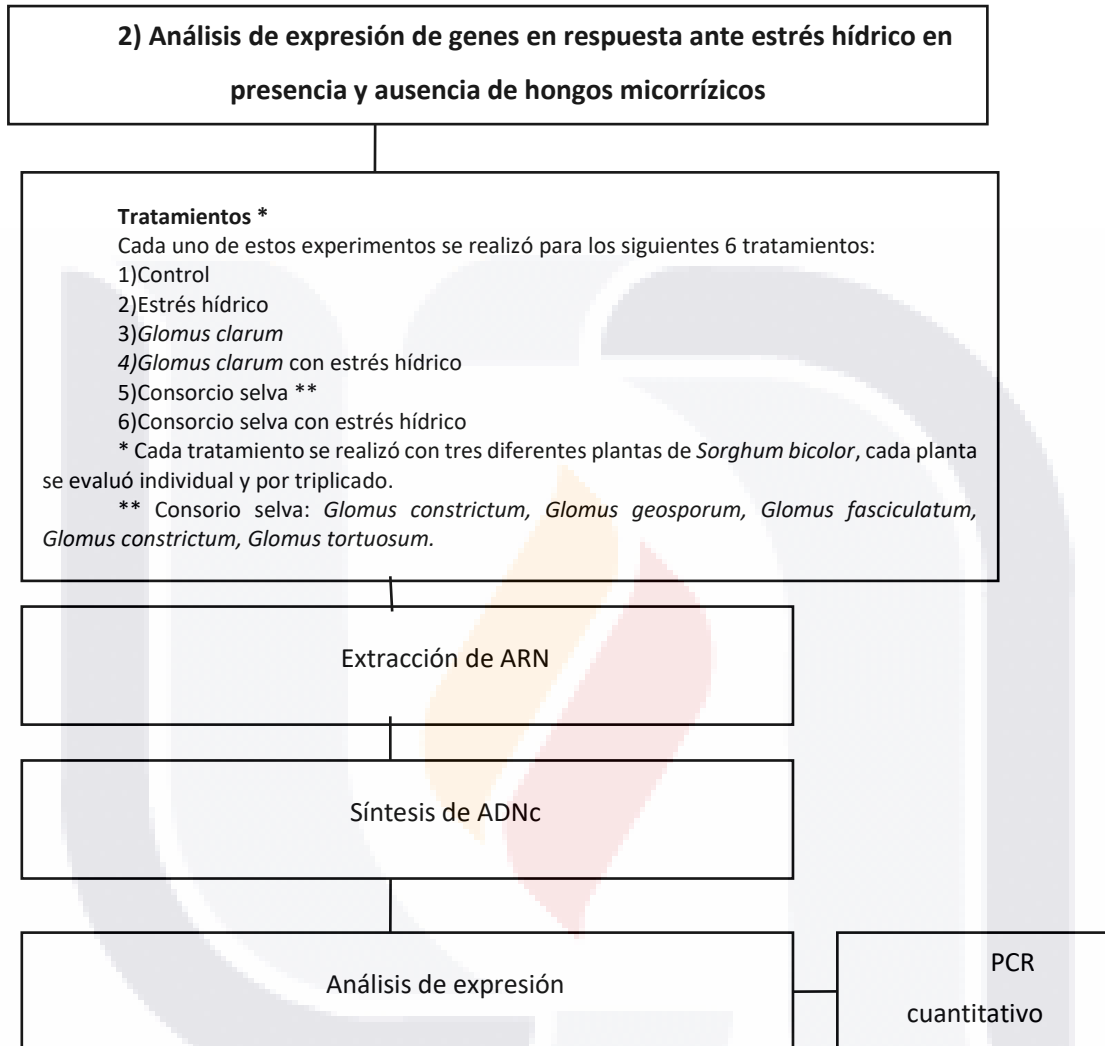
Estrategia experimental (Diagrama)

6.1 Amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés



**Figura 10.** Esquema general de amplificación de fragmentos de los genes que codifican para las proteínas de interés.

6.2 Análisis de expresión de genes en respuesta ante estrés hídrico en presencia y ausencia de hongos micorrízicos



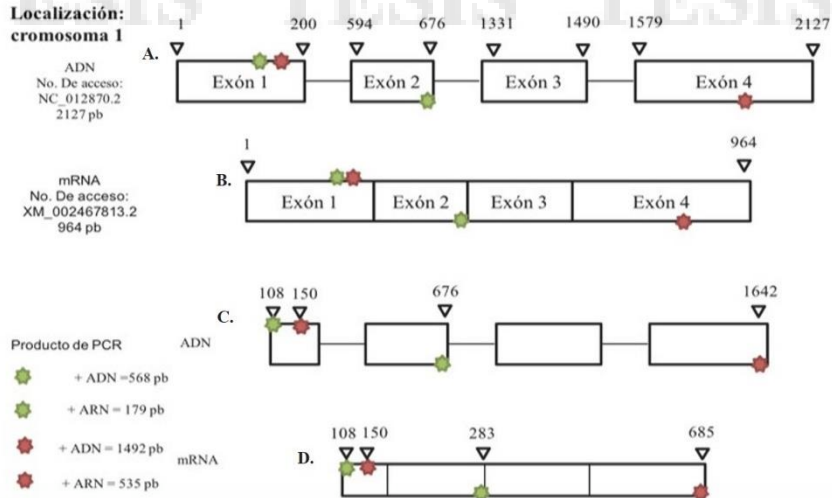
**Figura 11.** Esquema general del análisis de expresión de genes en respuesta ante estrés hídrico en presencia y ausencia de hongos micorrízicos.



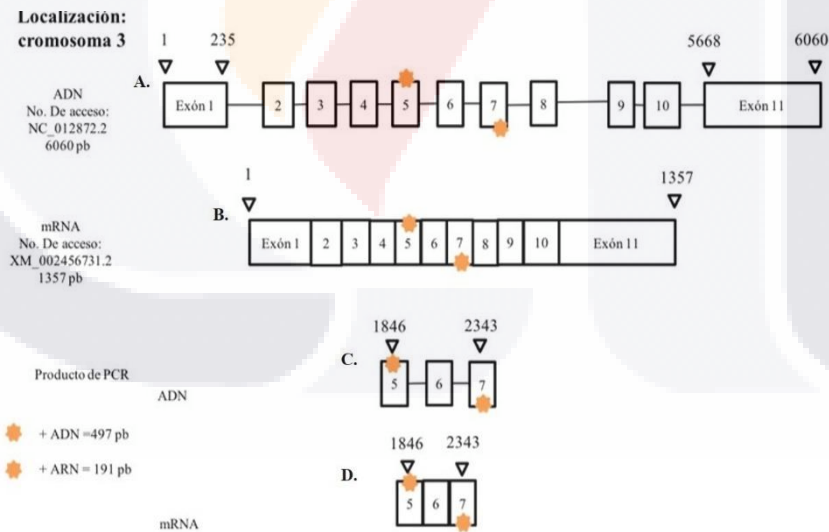
## Metodología

### 7.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés

En el caso del gen *PSBA* se obtuvo la secuencia hipotética con el No. De acceso: 03g042550 y para  $\alpha$ NAC con el No. De acceso: 01g035320, estas secuencias se obtuvieron del genoma/proteoma del sorgo (Phytozome: <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Para verificar la identidad de las proteínas hipotéticas se realizó una búsqueda de proteínas homólogas con el programa BLASTP (Basic Local Alimenta Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para el diseño de los oligonucleótidos para ambos genes se utilizó como molde la secuencia del ARNm, ambas disponibles en NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el número de acceso XM\_002456731.2 y XM\_002467813.1 respectivamente. El diseño se realizó en el programa DNASTar con el subprograma Primer Select 5.0 de DNASTAR, Inc. (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). Para delimitar la región amplificada se realizó una búsqueda de dominios utilizando las plataformas bioinformáticas PROSITE (Data base of protein domains, families and functional sites) del servidor EXPASy del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>), PFAM (Protein Data Base) del servidor EBI (<http://pfam.xfam.org>) y BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), esto con la finalidad de diseñar oligonucleótidos de regiones más allá de los dominios y aumentar la especificidad de estos al ser genes pertenecientes a familias multigénicas. Se tomó como consideraciones que los oligonucleótidos diseñados fueron de un tamaño de entre 19-22 nucleótidos, una diferencia de temperaturas de alineamiento menor a 4° C y un porcentaje de guanina y citosina mayor al 40%. El tamaño de los fragmentos amplificados y la posición de los oligonucleótidos diseñados para  $\alpha$ NAC y *PSBA* se muestran en las Figuras 12 y 13. Los oligonucleótidos diseñados se muestran en el apartado 8.2 de Resultados.



**Figura 12.** Esquema del gen, del transcrito y del producto de PCR que codifica para la subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC) en sorgo. A) Se muestran el gen con sus 3 intrones y 4 exones. B) Se muestra el transcrito con sus 4 exones. C) Localización de los oligonucleótidos en el ADN genómico. D) Localización de los oligonucleótidos en el ARNm. Las estrellas de color verde representan los oligonucleótidos para RT-qPCR, mientras que las rojas son los de punto final.



**Figura 13.** Esquema del gen, del transcrito y del producto de PCR que codifica para la proteína de asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica (*PSBA*) en sorgo. A) Se muestran el gen con sus 10 intrones y 11 exones. B) Se muestra el transcrito con sus 11 exones. C) Localización de los oligonucleótidos en el ADN genómico. D) Localización de los oligonucleótidos en el ARNm. Las estrellas en color naranja representan la localización de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por RT-qPCR y punto final.

## 7.2 Material vegetal

Se trabajó con hojas de *Sorghum bicolor* (L) Moench de seis diferentes tratamientos. El material vegetal fue proporcionado por la Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas del CINVESTAV Unidad Irapuato. Los tratamientos se describen a continuación:

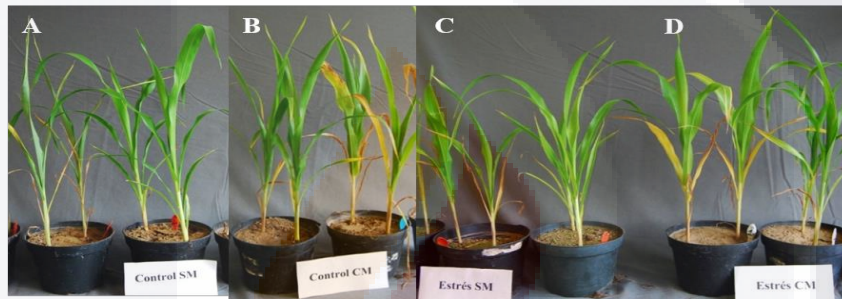
1. Sorgo sin estrés hídrico y sin micorrizas (Con)
2. Sorgo con estrés hídrico (Est)
3. Sorgo asociado al hongo micorrízico *Glomus clarum* (Gc)
4. Sorgo asociado al hongo micorrízico *Gomes clarum* con estrés hídrico (Gc+Est)
5. Sorgo asociado al consorcio selva\* (Cs)
6. Sorgo asociado al consorcio selva con estrés hídrico (Cs+Est)

\*El consorcio selva está conformado por hongos micorrízicos del género *Glomus*: *Glomus constrictum*, *Glomus georsporum*, *Glomus fasciculatum* y *Glomus tortuosum*.

Las 10 plantas de sorgo fueron cultivadas en invernadero durante 45 días y fueron expuestas a estrés hídrico por 7 días, mediante una disminución gradual del agua de riego como se muestra en la Tabla 5. Las plantas se recolectaron 24 hrs después de haber estado en ausencia de agua y fueron disectadas y almacenadas a -70 °C. Cada tratamiento se trabajó con 3 réplicas biológicas (3 plantas de cada uno de los tratamientos) de hojas de sorgo. El fenotipo observado en cada uno de los tratamientos se muestra en la Figura 14.

**Tabla 5.** Modelo de simulación del estrés hídrico en *Sorghum bicolor* (L) Moench (Olalde y Valdés, en prensa).

Día	mL de agua por maceta	Capacidad de campo (%)
1	100	66.0
2	80	53.3
3	60	40.0
4	40	26.6
5	20	13.3
6	0	0
7	Fin del estrés hídrico	



**Figura 14.** Fenotipo de plantas de sorgo expuestas ante la presencia y ausencia de hongos micorrízicos y déficit hídrico: A) Control sin asociaciones con hongos micorrízicos B) Control con asociaciones con hongos micorrízicos C) Planta de sorgo sometida a estrés hídrico sin asociaciones con hongos micorrízicos (consorcio selva) D) Planta de sorgo sometida a estrés hídrico con asociaciones con hongos micorrízicos (consorcio selva) (Olalde y Valdés, en prensa).

### 7.3 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN de *Sorghum bicolor* (L) Moench se realizó mediante el protocolo descrito por Lodhi et al., (1994). Se utilizó de 1-5 mg de hojas de sorgo, se les añadió 0.5 gr de pirrovinilpirrolidona (PVPP) y se almacenaron a -70 °C por toda la noche o se pulverizaron con nitrógeno líquido. 50 mg de tejido pulverizado se colocó en un microtubo de 1.5 mL, y se añadió 800 µL de Buffer de lisis (Anexo 1) + 0.3 µL de β-mercaptoetanol, se mezcló perfectamente por inversión y se incubó a 65 °C durante 15 min. Los tubos se colocaron en hielo durante 5 min y se añadió 500 µL de fenol-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cloroformo (1:1), se mezclaron hasta emulsificar. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min para recuperar la fase acuosa en un tubo limpio. A cada uno de los tubos se le añadió 1  $\mu\text{L}$  de RNAasa, posteriormente se mezclaron por inversión y se incubaron a 37 °C por 20 min. Se añadió 500  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo (1:1), se emulsificaron y se recuperó la fase acuosa. Se añadió 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo-alcohol isoamílico, se emulsificó y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se añadió un volumen igual de isopropanol, se mezcló por 1 min y se incubó a -20 °C por 10 min. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante, a la pastilla se le añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se mezclaron por inversión. Se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante, se secaron las pastillas y se resuspendieron en 40  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. El ADN se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz Ultravioleta (UV) en el fotodocumentador DyNA Ligth Dual Intensity UV de Labnet. Se cuantificó y se midió su pureza por espectrofotometría en el rango de luz UV en un nanodrop Colibrí Microvolume Spectrometer.

#### **7.4 Identificación de los genes por PCR en *Sorghum bicolor* (L) Moench**

La amplificación se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Para el caso de *PSBA* y  $\alpha\text{NAC}$  se utilizó el kit comercial Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega) y para PNP el kit Hot Start de Agilent.

Las condiciones de amplificación para cada gen se muestran a continuación:

La reacción para el kit Go Taq se lleva a cabo en un termociclador Science Cyclyer II de Select cyclyer Bioproducts. El ADN molde (100-200 ng) se mezcló con los correspondientes oligonucleótidos (0.5  $\mu\text{L}$  del forward y 0.5  $\mu\text{L}$  del reverse) (10 $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 5x, 1.25  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (1.5 mM), 0.062  $\mu\text{L}$  de la enzima Taq polimerasa (5u/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de DNTP's (10 mM) y 6.17  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 12.5  $\mu\text{L}$ .

La reacción para el kit de Hot Start se llevó a cabo en un termociclador Peltier. La reacción consistió en 10  $\mu\text{L}$  de Hot Start PCR Master mix 2X (2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 250  $\mu\text{M}$  de cada DNTP's), 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido forward y reverse (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de ADN

templado (100-200 ng) y 7  $\mu$ L de agua libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 20  $\mu$ L. Los oligonucleótidos de PNP diseñados por Morales-Domínguez (en prensa) se muestran en la Tabla 6.

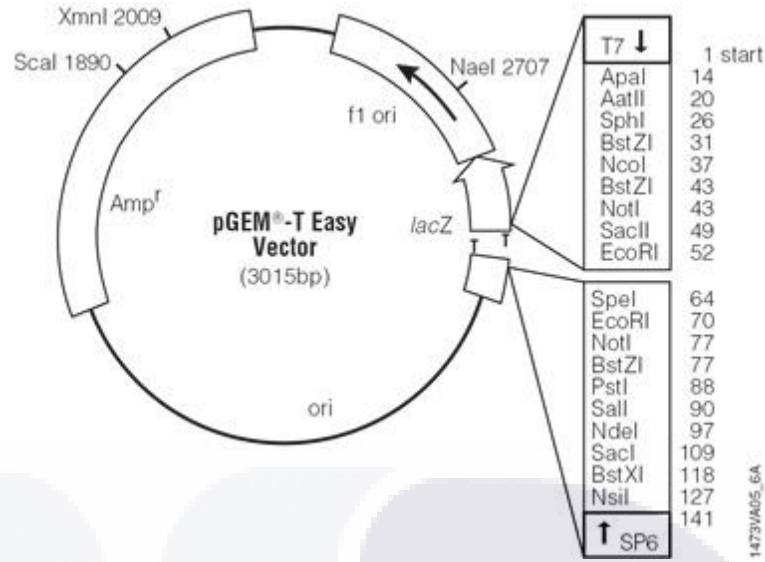
**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar un probable PNP en sorgo (Morales-Domínguez, en prensa).

Proteína	Nucleótidos	No.	Secuencia
Péptido natriurético en plantas (PNP)	19	85	F 5'- GTCGGAGGTACAGGGTTCG-3'
	22	84	R 5'-CATATCCTGCAGAAGAAAAGAA-3'
	25	60	F 5'-CCATAACAAGCAGATGGAGTATAAGG-3'
	26	61	R 5'-CCAGCATCAGGATTAGCAATTAGASN-3'
	21	108	F 5'-CAACGTGAGACGCTGGTAGTC-3'
	21	109	R 5'-CGAATACCCACTTCGATCCGT-3'

El programa consistió en una desnaturalización previa a 94°C durante 5 min, cada uno de los 30 ciclos de la reacción de PCR consistió en: 1 min para la desnaturalización a 94 °C, 1 min para la hibridación de los oligonucleótidos con el ADN a 50 °C en el caso de PNP's y *PSBA* y para el caso de  $\alpha$ NAC a 58 °C y 1 min para la elongación de las cadenas a 72 °C. Al concluir todos los ciclos, las muestras se sometieron a 72 °C durante 7 min. Los fragmentos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz Ultravioleta (UV). La purificación de los fragmentos amplificados por PCR a partir del gel de agarosa se realizó con el kit Wizard SV Gel (PROMEGA) siguiendo los protocolos especificados por el fabricante (Anexo 3).

#### 7.4.1 Ligación del fragmento amplificado de PNP en un vector de clonación

El fragmento amplificado SbPNP se ligó al vector de clonación, la reacción de ligación se realizó con la enzima T4 ADN Ligasa (PROMEGA). El volumen final fue de 10  $\mu$ L y se siguió las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. El tubo de reacción se incubó a 4 °C por 16-18 hrs.



**Figura 15.** Mapa del pGEM<sup>®</sup>-T Easy (PROMEGA). Este vector contiene sitios promotores de la ARN polimerasa (T7 Y SP6), el sitio de inserción del fragmento, sitios de restricción múltiple, el gen de resistencia a ampicilina (Amp), el sitio inicial para la replicación del ADN (ori) y el gen que codifica para la β-galactosidasa (lacZ).

#### 7.4.2 Transformación genética de *E. coli* DH5α

Se prepararon células competentes a partir de la bacteria *E. coli* DH5α, las cuales se cultivaron en medio LB (Anexo 5) sólido a 37 °C durante 16-20 hrs. Se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 mL de LB, se incubó con agitación a 37 °C de 16-20 hrs. Se inoculó 1 mL de las células cultivadas un día anterior en 10 mL de LB a 37 °C por 3 hrs aproximadamente, el cultivo se repartió en 10 microtubos de 1.5 mL y se dejó enfriar en hielo por 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 s, se eliminó el sobrenadante en solución con cloro y se resuspendió la pastilla muy suavemente con 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M) estéril y frío, se incubó en hielo por 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15s. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla, después se resuspendió la pastilla muy suavemente con 30 μL de CaCl<sub>2</sub> (0.1 M con DMSO al 7%) y se almacenó a -70 °C. La transformación se llevó a cabo por el método de “choque térmico” (Sambrook et al., 1989). El choque térmico consistió en añadir 1 μL del plásmido a 30 μL de células competentes, en este caso sería a tres tubos: A) Ligación pGEM<sup>®</sup>-T Easy -SbPNP, B) Vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy y C) sin plásmido, posteriormente se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 20 min. Después se calentó a 42 °C por 90 s para rápidamente

transferir a hielo e incubar durante 2 min. Se añadió 200  $\mu$ L de medio LB y se incubó a 37 °C durante 45 min con agitación y se esparció en medio sólido de LB suplementado con ampicilina (50 mg/mL). Después de aproximadamente 18-24 hrs de incubación a 37 °C, se aislaron las colonias obtenidas y se realizó su crecimiento. Cada colonia fue recuperada utilizando un palillo estéril, la cual fue inoculada en medio LB sólido con ampicilina (50 mg/mL) y posteriormente el palillo se depositó en un tubo que contenía 6 mL de medio LB líquido con la misma proporción de ampicilina, se incubó a 37 °C con agitación constante 200 rpm durante toda la noche. Las colonias transformantes fueron analizadas mediante digestión enzimática del ADN plasmídico.

#### **7.4.3 Extracción del ADN plasmídico (Miniprep)**

La purificación del ADN plasmídico se realizó a partir del método de lisis alcalina (Anexo 6) (Birnboim y Doly, 1979), con algunas modificaciones que se describen a continuación. Se tomó dos veces una alícuota de 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en agitación y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 100  $\mu$ L de Birnboim I (Anexo 6A) y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 200  $\mu$ L de Birnboim II (Anexo 6B) para incubarse durante 5 min a temperatura ambiente. Seguido se neutralizó con 150  $\mu$ L de Birnboim III (Anexo 6C) y se incubó en hielo durante 5 min. Se realizó una centrifugación a 12,000 rpm por 5 min. Posteriormente se realizaron dos extracciones, una con 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo 1:1 y otra con 200  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. El ADN plasmídico presente en la fase acuosa se precipitó agregando 1 volumen de isopropanol y se dejó incubando a -20 °C durante 1 hora. Se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm. La pastilla obtenida se lavó con 200  $\mu$ L de etanol al 70% y por último se resuspendió en 40  $\mu$ L de agua destilada estéril.

#### **7.4.4 Digestión del plásmido pGEM®-T Easy con la enzima de restricción Eco RI**

Para la comprobación de la ligación del inserto de SbpNP en el vector de clonación se realizó una digestión a los plásmidos extraídos con la enzima Eco RI (Invitrogen) bajo las siguientes condiciones: para cada reacción se colocaron 4.4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ L de Buffer, 4  $\mu$ L de ADN, 0.3  $\mu$ L de la enzima Eco RI y 0.3  $\mu$ L de RNAsa ajustando un volumen total de 10  $\mu$ L. La mezcla se incubó por 2 hrs a 37 °C y posteriormente se verificó por



electroforesis en gel de agarosa de 1.2% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta (UV). La presencia de una banda del tamaño de los fragmentos amplificados nos indicó la presencia de nuestro inserto ligado al plásmido.

#### **7.4.5 Secuenciación**

Los productos de PCR y de clonación de los genes *SbPNP*, *SbPSBA* y *Sb $\alpha$ NAC* fueron enviados al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) y/o a la empresa Macrogen Inc (Maryland, EUA) donde fueron secuenciados de manera bidireccional. Las secuencias fueron limpiadas en el programa 4Peaks.

#### **7.5 Análisis bioinformático**

Se realizó una búsqueda de proteínas homólogas con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a partir de la herramienta Protein Blast (Blastp), así también se utilizó la herramienta BLAST de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). El alineamiento múltiple de las secuencias tanto en aminoácidos como en nucleótidos se realizó en el programa Clustal OMEGA y MUSCLE con el método Clustal W (European Bioinformatics Institute; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La traducción de nucleótidos a aminoácidos se realizó con ExPASy translate del Instituto Suizo de Bioinformática (<https://web.expasy.org/translate/>) y con Analyze sequence de la plataforma Addgene (<https://www.addgene.org/analyze-sequence/>). La determinación del marco de lectura abierta se realizó con ORF del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Se realizó una búsqueda de dominios funcionales con las herramientas PROSITE (Database of protein domains, families and functional sites) del servidor EXPASy del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>), PFAM (Protein Data Base) del servidor EBI (<http://pfam.xfam.org>) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La predicción de las estructuras tridimensionales y de la estructura terciaria de las proteínas se realizó con el software Scratch protein predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

predicción de la estructura secundaria se realizó con el programa Psipred del UCL Department of Computer Science (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y el modelado gráfico de la estructura 3D se realizó en Chimera 3D 4.3. La búsqueda del péptido señal se realizó a partir de SignalP 4.1 Server del Center of Biological Sequence Analysis (CBS; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Se realizó una búsqueda de modificaciones postraduccionales con el IPTMnet del Protein Information Resource (PIR; <https://research.bioinformatics.udel.edu/iptmnet/>). La búsqueda de las modificaciones por fosforilación se realizó en Plant Protein Phosphorylation DataBase (P3DB; <http://www.p3db.org/index.php>).

### **7.6 Extracción de ARN**

La extracción de ARN de hojas se realizó con el kit PureZol (Biorad) siguiendo los protocolos especificados por el fabricante (Anexo 7). El ARN se cuantificó en un Nanodrop 2000 Spectrophotometer de Thermoscientific.

### **7.7 Síntesis del ADNc**

La síntesis de ADNc se realizó con el kit Scientific First Strand Synthesis (Thermo scientific) siguiendo los protocolos especificados por el fabricante (Anexo 8). El ADNc se cuantificó en un Nanodrop 2000 Spectrophotometer de Thermoscientific.

### **7.8 PCR en tiempo real (RT-qPCR)**

El análisis de expresión se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz, Baja California Sur en el laboratorio de Ecología Microbiana Molecular con el Dr. Abraham Loera Muro. La RT-qPCR se realizó para los diferentes tratamientos de plantas de sorgo asociadas y no asociadas a hongos micorrízicos, bajo condiciones de estrés hídrico. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos que se muestran en el apartado de resultados. Las características especiales de estos oligonucleótidos son: que el amplicón preferentemente deberán de tener más de un exón, los productos de la amplificación deben de ser pequeños de entre 50-200 pb, así también al igual que en la PCR en punto final el contenido de guanina y citosina de los oligonucleótidos debe de ser mayor al 40%, la diferencia de las temperaturas de alineamiento no deben de ser mayores a 4 °C, evitar repeticiones de las bases y la

complementariedad de los oligonucleótidos para prevenir la formación de dímeros entre ellos y/o formación de estructuras denominadas bucles.

Como referencia se utilizó el gen de  $\beta$ -actina. Tanto en el gen referencia como en los genes de interés se utilizó una temperatura de alineamiento de 60 °C. El ADNc se ajustó a 100 ng/ $\mu$ L con el Nanodrop 2000 Spectrophotometer de ThermoScientific. La amplificación de los transcritos se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción: Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR 12.5  $\mu$ L de Maxima SYBR Green Buffer el cual contiene la enzima Maxima Hot Start Taq DNA polimerasa (5 U/  $\mu$ L), 1  $\mu$ L del oligonucleótido forward (100  $\mu$ M), 1  $\mu$ L del oligonucleótido reverse (100  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de ADNc (100 ng) y 9.5  $\mu$ L de agua para llevar a un volumen final de 25  $\mu$ L.

Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s y una extensión de 60 s. La qPCR se realizó en un equipo Bio-Rad C100 Touch Thermal Cycler. La expresión relativa normalizada se calculó por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados numéricos de la expresión normalizada se presentan en los Anexos 10 y 11.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar  $\beta$ -actina como gen de referencia para la RT-qPCR (Morales-Domínguez, en prensa).

Gen de referencia	Nucleótidos	Secuencia
$\beta$ -actina (Act)	20	F 5'- AACTGGGATGACATGGAGAA-3'
	24	R 5'-ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA-3'

## 7.9 Análisis estadístico

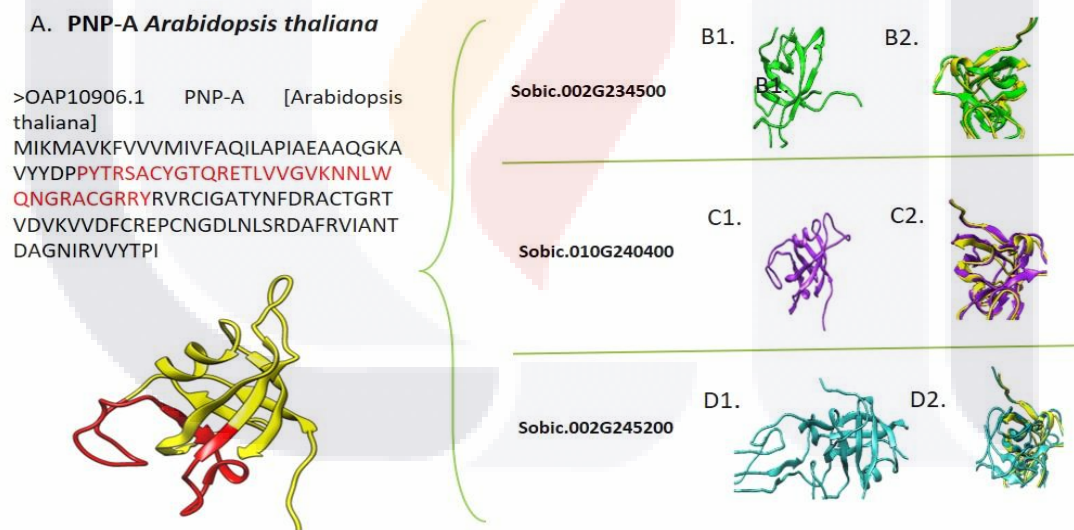
Los resultados de niveles de expresión de los transcritos se sometieron a un análisis estadístico con el programa Minitab. Se determinó la variabilidad entre los tratamientos con un ANOVA de un factor y se realizó una prueba de Tukey-Kramer ( $\alpha$  0.05) para evaluar las significancias de las diferencias observadas. Los gráficos se realizaron en el programa GraphPad Prism 6.0, graficando el promedio de las repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Los resultados estadísticos se muestran en los Anexos 12 y 13.

## Resultados

### 8.1 Predicción *in silico* de un posible PNP en *Sorghum bicolor* (L) Moench

A partir de la secuencia de aminoácidos de un PNP (AtPNP-A; OAP10906.1) de *Arabidopsis thaliana*, se realizó la búsqueda de proteínas con alta identidad en el proteoma de sorgo donde obtuvieron tres proteínas hipotéticas que podrían ser caracterizadas como PNP-A. Por lo tanto, se realizó un análisis bioinformático de cada una de ellas para tratar de deducir *in silico* si en realidad se trata de un PNP-A no reportado en sorgo. Las proteínas con mayor similitud fueron: Sobic.002G234500, Sobic.010G240400 (Sb10g028070) y Sobic.002G245200 (Sb02g028190).

En la Figura 16 se visualiza la estructura tridimensional de las proteínas homólogas encontradas en sorgo y su respectivo empalme con AtPNP pudiendo demostrar que las tres proteínas tienen una gran similitud estructural, encontrando que la única diferencia es la longitud de la secuencia.



**Figura 16.** Proteínas similares a AtPNP-A sin caracterizar en *Sorghum bicolor* (L) Moench. A) Secuencia y modelado tridimensional de AtPNP-A (No. de acceso: OAP10906.1) B1) Modelado 3D de la proteína Sobic.002G234500 B2) Empalme de la proteína AtPNP-A y Sobic.002G234500 C1) Modelado 3D de la proteína Sobic. 010G240400 C2) Modelado 3D de la proteína Sobic.002G234500 B2. Empalme de la proteína AtPNP-A y Sobic.002G234500 D1) Modelado 3D de la proteína Sobic. 002G245200 D2) Empalme de la proteína AtPNP-A y Sobic. 002G245200. Los modelados tridimensionales se realizaron con el software Chimera 3D 4.3.

La proteína Sobic. 002G234500 tiene una identidad del 96% con el PNP reportado en *A. thaliana* y un 50.7% de similitud con el reportado en *Theobroma cacao*, la proteína Sobic.010G240400 tiene una identidad del 85.38% con el PNP reportado en *A. thaliana* y un 63.3% de similitud con el reportado en *Theobroma cacao* y la proteína Sobic.002G245200 tiene una identidad del 96.15% con el PNP reportado en *A. thaliana* y un 40.6% de similitud con el reportado en *Theobroma cacao*. La longitud de la secuencia de aminoácidos, el peso molecular y la localización en el cromosoma de AtPNP-A, así como de las tres proteínas hipotéticas se encuentran en la Tabla 8.

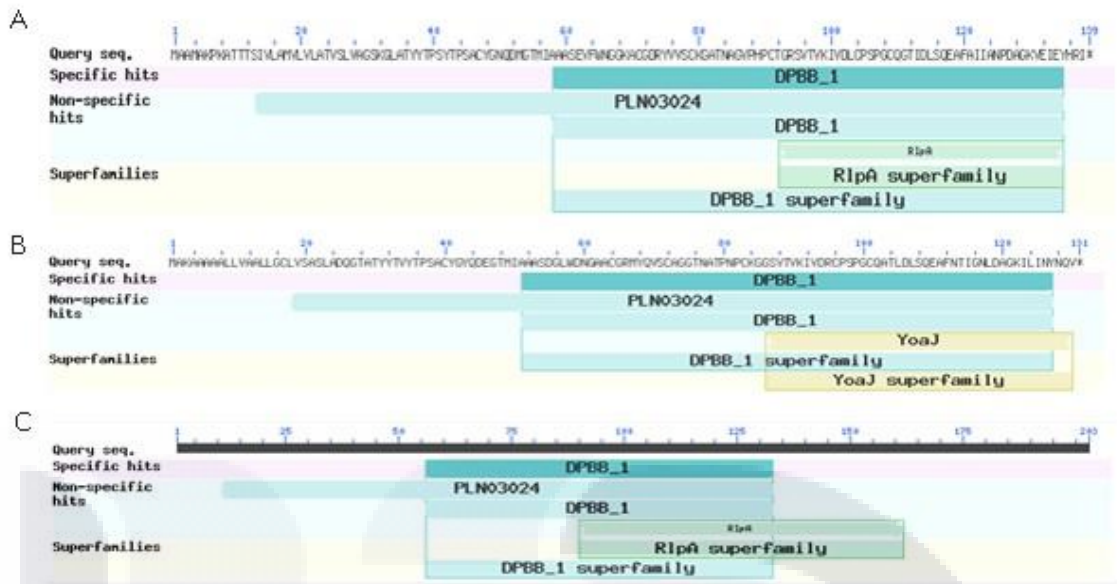
Los dominios encontrados tanto en AtPNP-A como en las tres proteínas hipotéticas coinciden, ya que se identificó el dominio RplA el cual contiene el dominio doublebetabarril (DPBB) (Figura 17).

**Tabla 7.** Características de AtPNP-A y de las proteínas similares encontradas en *Sorghum bicolor*.

Proteína	Longitud de la secuencia (aminoácidos)	Tamaño (kDa)	Cromosoma que se encuentra	Localización del péptido señal	Dominios presentes
At-PNPA	130	14.51	2	1-25	RplA (DPBB)
Sobic 002G234500	138	14.26	2	1-30	RplA (DPBB)
Sobic.010G240400	130	13.22	10	1-24	RplA (DPBB)
Sobic.002G245200	202	12.17	2	1-33	RplA (DPBB)

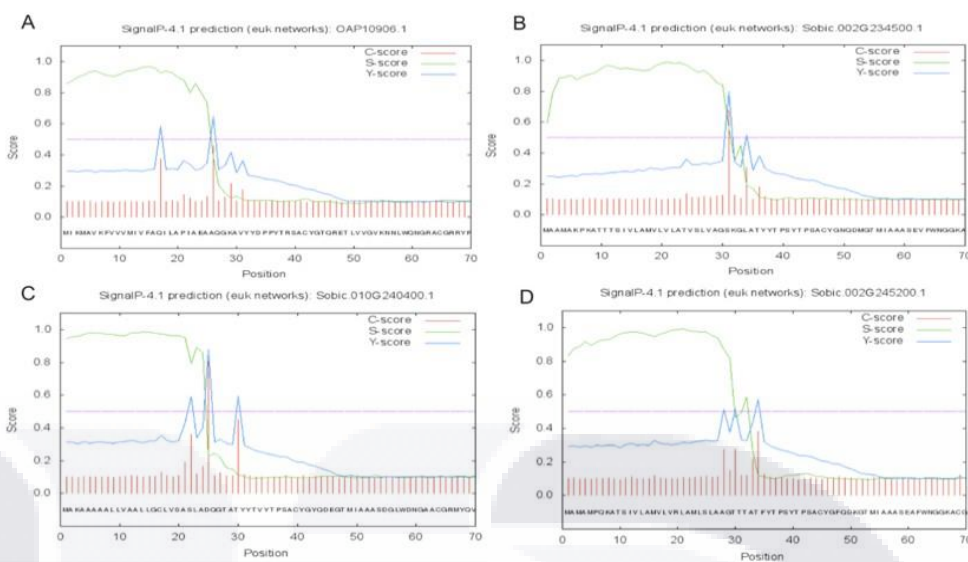
**Tabla 8.** Dominios identificados en la secuencia de AtPNP-A.

Dominio	Descripción	Secuencia	Localización
PLNo3024	Putative EG45-like domain containing protein 1; Provisional	MAVKFVVMIVFAQLAplAEAAQKAVYDPPYTRSACYGTQRETLVVG VKNNLWQNGRACGRRYRVCIGATYNFDRACGTVDVKVDFCREPC NGDLNLSRDAFRVIANTDAGNIRVVYTP	4-129
DPBB_1	Rare lipoprotein A (RlpA)-like double-psi beta-barrel; Rare lipoprotein A (RlpA) contains a ...	LWQNGRACGRRYRVCIGATYNFDRACGTVDVKVDFCREPCNDL NLSRDAFRVIANTDAGNIRVVY	58-127
Rlp A	Rare lipoprotein A, peptidoglycan hydrolase digesting "naked" glycans, contains C-terminal SPOR domain [Cell wall/membrane/envelope biogenesis]	TGRTVDVKVDFcREPCNDLNSRDAFRVIANTDAGNIRVVYTP	85-130

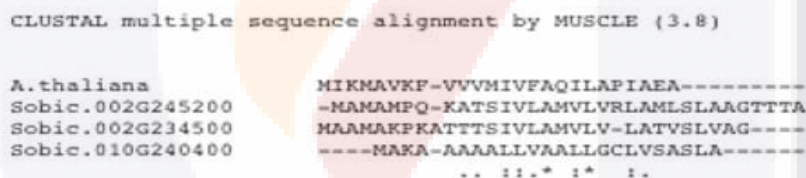


**Figura 17.** Búsqueda de dominios en las tres proteínas de sorgo con alta identidad al PNP reportado en *A. thaliana* en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A) Dominios de Sobic. 002G234500 B) Dominios de Sobic.010G240400 C) Dominios de Sobic.010G240400.

Los PNP-A se caracterizan por tener un péptido señal que le favorece su movimiento a través de la célula, la presencia en cada una de las proteínas se resume en la Tabla 8 y Figura 18. El alineamiento múltiple de las secuencias del péptido señal mostró que no existen regiones similares entre el péptido señal de *A. thaliana* y los péptidos presentes en las proteínas similares encontradas en sorgo (Figura 19).



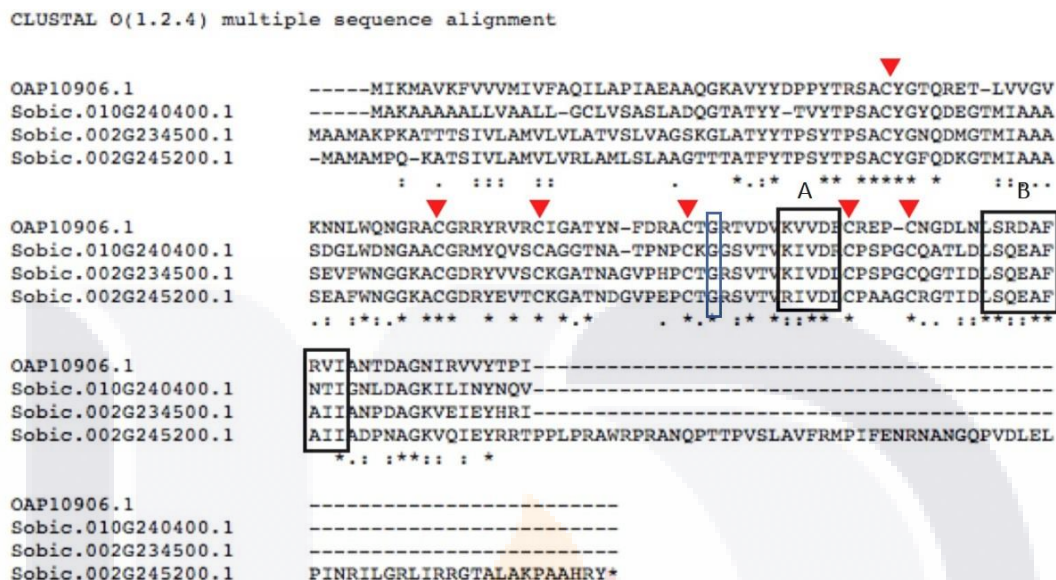
**Figura 18.** Identificación de un péptido señal en proteínas homólogas a AtPNP-A en el genoma de *Sorghum bicolor* (L) Moench. A) péptido señal en la posición 1-25 de AtPNP-A. B) péptido señal en 1-30 de Sobic.002G234500 C) péptido señal en 1-24 de Sobic.010G240400 D) péptido señal en 1-33 de Sobic. 002G245200.



**Figura 19.** Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos del péptido AtPNP-A y de las proteínas homólogas encontradas en el proteoma del sorgo. El alineamiento múltiple se realizó con el programa MUSCLE con el método Clustal W (European Bioinformatics Institute; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas hipotéticas con la de AtPNP-A (Figura 20) mostró motivos y dominios conservados en los probables PNP's. Se encontró que las tres proteínas presentan los seis residuos de cisteínas característicos (triángulos rojos), así también se encuentran presentes los motivos A: K[VI]VD y B: [LM]SéxAFxxI (recuadros negros) presentes en péptidos natriuréticos en plantas. La proteína Sorbic 002G245200 presenta modificaciones en el motivo A en donde cambia la lisina (K) por una arginina (R) y el motivo B se modifica a

LxxxxFxxl. Las tres proteínas tienen la presencia de una glicina conservada después del cuarto residuo de cisteína conservada, esto se resalta en un recuadro azul en la Figura 20.



**Figura 20.** Alineamiento múltiple entre AtPNP-A y las proteínas homólogas encontradas en el proteoma de *Sorghum bicolor* (L) Moench. El alineamiento múltiple se realizó con el programa Clustal Omega con el método Clustal W (European Bioinformatics Institute; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>)

### 8.2 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR tanto en punto final como para tiempo real, las secuencias se mencionan en las Tabla 10 y 11. Para la amplificación por PCR en punto final se utilizó como molde el ADN genómico, mientras que para RT-qPCR se utilizó ADNc. Las características de los oligonucleótidos se muestran en el Anexo 4 y 9.



**Tabla 9.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar fragmentos de los genes que codifican para las proteínas en estudio (Anexo 4).

Proteína	Nucleótidos	Secuencia	Tamaño del fragmento	
			ADN	ARN
Subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC/NACA)	19	F 5'-AGGAGCTGCCACCCAGAT-3'	1492 pb	535 pb
	21	R 5'-AGTTTCGTCGACCTCCTCATT-3'		
Proteína asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica ( <i>PSBA</i> ) *	19	F 5'-CAAAGGGTGACGAGGATC-3'	497 pb	191 pb
	19	R 5'-GCACGAGCTTTTAGGGTAT-3'		

\* Para el caso de *PSBA* se utilizaron el mismo par de oligonucleótidos tanto para PCR en punto final como para RT-qPCR

**Tabla 10.** Oligonucleótidos utilizados para medir la expresión de los genes de interés por qPCR (Anexo 9).

Proteína	Nucleótidos	Secuencia	Tamaño del fragmento	
			ADN	ARN
Subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente ( $\alpha$ NAC/NACA)	22	F 5'-TCCACAACTCCGAGACACCAA-3'	568 pb	179 pb
	25	R 5'-TCCATCGAGTTCATCCATCATCCTT-3'		
Proteína asociada a la membrana de 30 kDa, tipo cloroplástica ( <i>PSBA</i> )	19	F 5'-CAAAGGGTGACGAGGATC-3'	497 pb	191 pb
	19	R 5'-GCACGAGCTTTTAGGGTAT-3'		

Para corroborar la especificidad de los oligonucleótidos se procedió a realizar una PCR *in silico* en donde se obtuvo que los pares de oligonucleótidos realmente amplifican fragmentos de las proteínas de interés, esto se comprobó insertando los fragmentos amplificados en el programa BLASTx. El fragmento amplificado de  $\alpha$ NAC tuvo una similitud con la proteína de interés del 99%, mientras que para *PSBA* se obtuvo un 100%.

La localización de los oligonucleótidos tanto para ADN genómico, así como para ARNm para  $\alpha$ NAC y *PSBA* se muestran en las Figuras 12 y 13.

### 8.3 Extracción de ADN en *Sorghum bicolor* (L) Moench

Se obtuvo ADN genómico de *Sorghum bicolor* (L) Moench de buena calidad cuya concentración va de los 180.64 a 2,165 ng/  $\mu\text{L}$ , obteniendo una relación  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$  que van desde 1.84-2.01 (Figura 21).

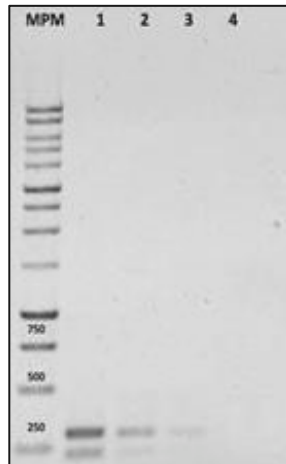


**Figura 21.** Electroforesis en un gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *Sorghum bicolor* (L) Moench. Los tres carriles muestran ejemplos de ADN de sorgo.

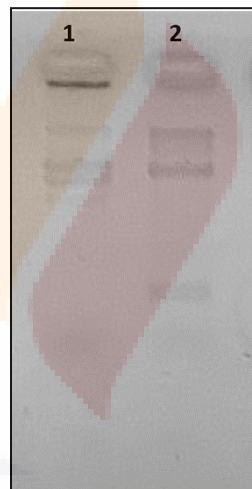
### 8.3 Amplificación de los genes de interés mediante PCR

#### 8.3.1 Amplificación de un PNP

Para el caso del gen PNP se obtuvo una banda entre 300 nucleótidos (Figura 22), la cual se purificó, pero debido a su tamaño pequeño no se obtuvo una buena resolución en la secuencia por lo que esta secuencia se clonó en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy para obtener múltiples copias y obtener una secuencia de buena calidad. La clonación se comprobó por restricción del ADN plasmídico con la enzima Eco RI (Figura 23).



**Figura 22.** Visualización en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados a partir de ADN genómico para un probable PNP-A en sorgo. Del carril 1-3 se muestra la amplificación de SbPNP-A por triplicado, mientras que en el carril 4 se muestra el control negativo. Se utilizó como marcador de peso molecular el de 1Kb de PROMEGA.



**Figura 23.** Digestión del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy para la liberación del fragmento SbPNP-A. En el carril 1 se muestra el vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T Easy (vector sin inserto) digerido con Eco RI sin la liberación del fragmento (Control negativo), mientras que en el carril 2 se muestra el vector de clonación pGEM<sup>®</sup>-T Easy digerido con Eco RI que delimita al inserto, observando la liberación del fragmento SbPNP-A.

Se obtuvo una secuencia de 1236 nucleótidos, de los cuales 304 nucleótidos corresponden al inserto y el resto al vector de clonación. La secuencia se muestra en la Figura 24.

```

1 G K V I V I R L T I G R I G P D V A C S 20
1 GGGAGGTAATTGTAATCCGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCC 60
21 R P P W R P R E F D C R R Y R V R A + C 40
61 CGGCCGCATGGCGGCGCGGGAAITCGAATTGTGCGRGGTACAGGGTTCGCGCCTAATGC 120
41 T I G + E T I L D A H D G T P + + R G S 60
121 ACCATAGGCTAAGAAACAATTTTGGACGCACACGATGGTACTCCTTGATGAAGAGGCTCA 180
61 S G I F V L S I W R + F + S W C K I G A 80
181 AGTGGAAATCTTTGTTCTATCTAATTGGAGATAGTTCATACTTGGTGCAAAATAGGTGCA 240
81 R F A W N I P Y A Q K S I W T N P M E L 100
241 CGGTTTGCATGGAACATACCATATGCTCAGAAATCAATTTGGACAAAACCGATGGAAGT 300
101 + M H P M E L L D E V Y H M E S H F G P 120
301 TAGATGCACCCATGGAACTACTAGATGAAGTGTATCATATGGAATCTCACTTCGGTCCA 360
121 V G D S I L F P C R I + I T S E F A A A 140
361 GTTGGAGATAGTATTCTTTCTCTGCGAGGATATGAATCCTAGTGAATTCGCGCGGCC 420
141 C R S T I W E S S Q R V G C I A + V F Y 160
421 TGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT 480
161 S V T + I A W R N H G H S C F L C E I V 180
481 AGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTTGAAATGTT 540
181 I R S Q F H T T Y E P E A + S V K P G V 200
541 ATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCGGAAAGCATAAAGTGAAGCCTGGGGTG 600
201 P N E + A N S H + L R C A H C P L S S R 220
601 CCTAATGAGTGAAGTCACTCACAATTAATTCGCTTGGCTCACTGCGCCGCTTCCAGTCGG 660
221 E T C R A Q L H + + I G Q R A G R G G L 240
661 GAAACCTGTCGTCGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAGAGGCGGTTG 720
241 R I G R S S A S S L T D S L R S V V R L 260
721 CGTATTGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTGCTGCGCTG 780
261 R A S G I S S L K R R + Y G L S H R I R 280
781 CGGGCGAGCGGATACGCTCACTCAAAGCGGTAATCGGTTTATCCACAGAAATCAGG 840
281 G I T Q E K N M + A K G Q Q K A Q E P + 300
841 GGAATAACGCGAGAAAGAACATGTGAGCAAGGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAA 900
301 K R P R C W A F F Q + A P P P L T E H H 320
901 AAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCAATAGGCTCCGCCGCCCTGACGGAGCATCAC 960
321 K N P T L Q V R R W R N P D R T I K D T 340
961 AAAATCCACGCTTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATTAAAGATACC 1020
341 R R F P P P G K L P S W R L S C S G P L P 360
1021 AGGCGTTTTCCCGCTGGAAAGCTTCCCTCGTGGCGCCTCTCCCTGTTCCGGACCTTGCCG 1080
361 L T G I P W S A L S S L S G K A V W R F 380
1081 CTTACCGGATACCCCTGGTCCGCCCTTTCTCCCTTTCGGGAAAGCCGTTGGCGCTTT 1140
381 F S I T S H A L V G I L L S S R + V M E 400
1141 TTCTCAATTACCTCTCACGCCCTTGTAGTATCCCTTAAGTTCCGCGGTGAGTTATGGAG 1200
401 S V L C P L P Q D L C S 412
1201 TCGTTCTCTGCGCTCTCCACAGACCTTTGTAGC 1236
    
```

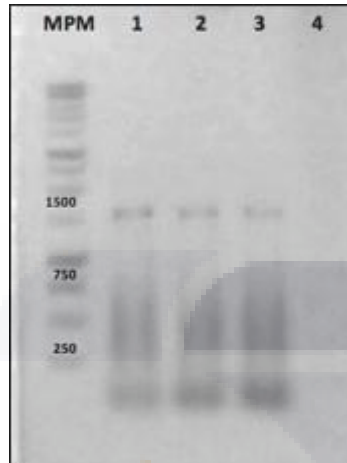
**Figura 24.** Secuencia de SbPNP-A ligada en el vector pGEM®-T Easy. El análisis de la secuencia se realizó en Addgene (<https://www.addgene.org/analyze-sequence/>). Los oligonucleótidos específicos utilizados se encuentran del nucleótido 91-110 y del 374-395, mientras que la secuencia del vector se encuentra del nucleótido 1-91 y del 396-1236, el fragmento amplificado se nombró como SbPNP-A y se encuentra en la posición del nucleótido 92-395.

Esta secuencia se comparó con la base de datos de NCBI y no se encontró similitud con *PNP's* previamente reportados como en *Arabidopsis thaliana*, *Pereskia sacharosa* y *Theobroma cacao*, sin embargo, se encontró una identidad del 94% con un fragmento del genoma de *Sorghum bicolor* (E-value:2e-211).

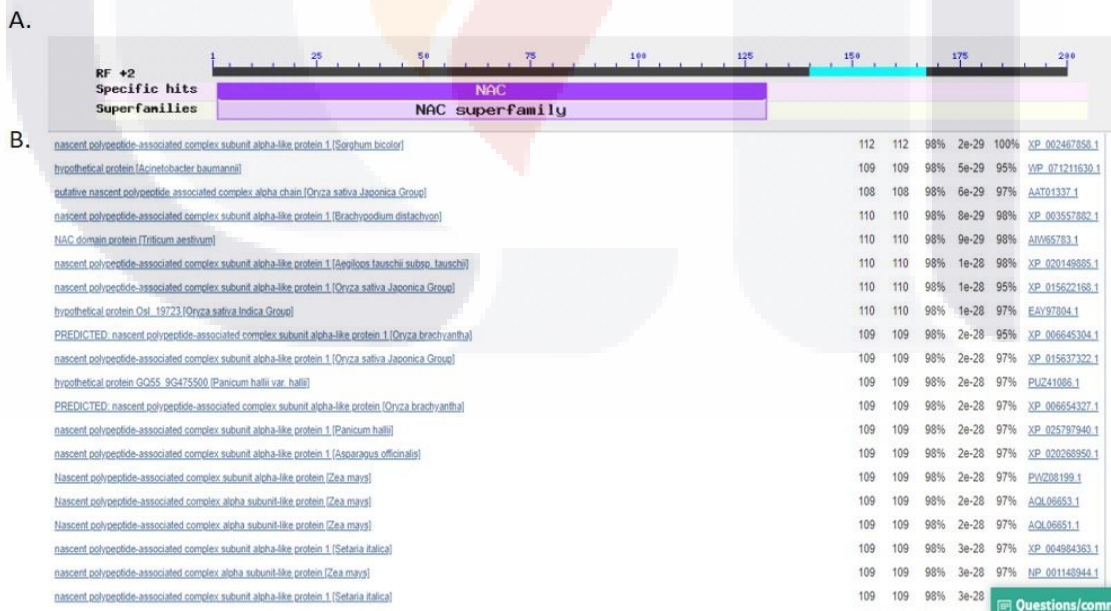
Posteriormente se probaron dos pares de oligonucleótidos diferentes, previamente diseñados para amplificar *PNP's* en diferentes especies vegetales. En el caso del segundo y tercer par de oligonucleótidos para PNP mostrados en el apartado de Metodología 1 nos dio como resultado la presencia de múltiples bandas a pesar de mover las condiciones de amplificación. Las bandas obtenidas con ambos pares de oligonucleótidos fueron purificadas y secuenciadas, pero tampoco se encontró similitud con alguno de los *PNP's* previamente reportados.

### 8.3.2 Amplificación de $\alpha$ NAC

Para el gen que codifica para la proteína  $\alpha$ NAC se obtuvo un fragmento amplificado de 1500 pb (Figura 25). El fragmento amplificado se nombró como Sb $\alpha$ NAC.



**Figura 25.** Visualización en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados a partir de ADN genómico para  $\alpha$ NAC en sorgo. Del carril 1-3 se muestra la amplificación de Sb $\alpha$ NAC por triplicado, mientras que en el carril 4 se muestra el control negativo. Se utilizó como marcador de peso molecular el de 1Kb de PROMEGA.



**Figura 26.** Búsqueda de dominios y secuencias similares a Sb $\alpha$ NAC en la base de datos de NCBI en el programa Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A) Dominio NAC encontrado en  $\alpha$ NAC. B) Secuencias similares a  $\alpha$ NAC encontradas.

Al compararse con la base de datos de NCBI se encontró que nuestra secuencia tenía una identidad del 100% con la proteína del complejo asociado al polipéptido naciente subunidad alfa reportado en *Sorghum bicolor* (E value:5e-9), un 95% en *Zea mays* (E value:2e-80), un 85% en *Curcubita máxima* (E value:2e-45), un 82% en *Vitis vinífera* (E value:5e-37), en *Picea glauca* un 87% (E value:7e-11) y un 98% al dominio NAC de *Triticum aestivum* (Figura 26).

La secuencia en nucleótidos para Sb $\alpha$ NAC fue de 197 nucleótidos en el sentido 5'>3', el tamaño de la secuencia fue menor debido a que se limpió con el programa 4Peaks para eliminar las regiones de baja calidad.

A partir de un alineamiento múltiple con el ADN genómico y el ARN mensajero de *Sorghum bicolor* se determinó que el fragmento amplificado comprende parte del exón 3 (1439-1490 nts), el intrón 3 (1491-1578 nts) y parte del exón 4 (1579-1717 nts) (Figura 13), la secuencia se encuentra localizada en el cromosoma 1 del genoma del sorgo. A la secuencia de nucleótidos se le realizó la traducción *in silico* obteniendo 65 aminoácidos en el segundo marco de lectura. La secuencia tanto en nucleótidos como aminoácidos se muestra en la Figura 27.

```

1M K S I T G V S R V T V K K S K N I L F 20
2 ATGAAGTCCATCACTGGTGTGTCAGCCGTGTCAGTGAAGAAAAGCAAGAATATACTGTTT 61
21V I S K P D V F K S P N S D T Y V I F G 40
62 GTCATCTCCAAGCCAGATGTGTTCAAGAGCCCGAATTCGGACACCTACGTTCATATTGGGT 121
41E A K I E D L S S Q L Q S Q A A E Q F K 60
122 GAGGCCAAGATCGAGGACCTCAGCTCCAGCTGCAGAGCCAGGCTGCAGAGCAGTTCAAG 181
61A P D L S 65
182 GCTCCTGACTTGAGCC 197
    
```

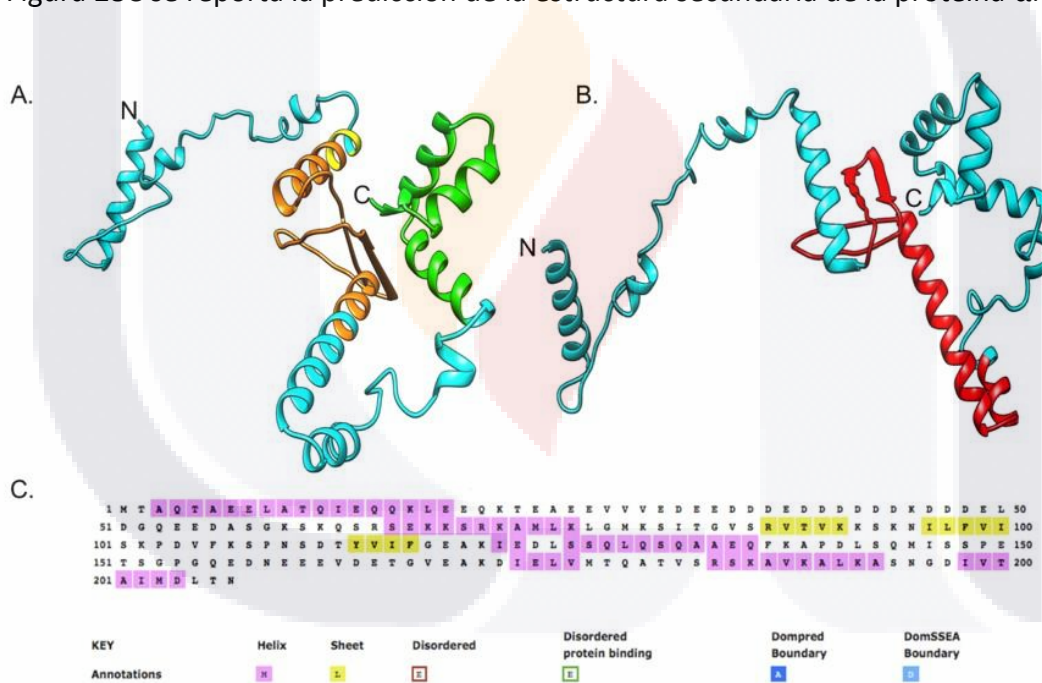
**Figura 27.** Secuencia hipotética parcial de Sb $\alpha$ NAC en nucleótidos y en aminoácidos. El análisis de la secuencia se realizó en Addgene (<https://www.addgene.org/analyze-sequence/>).

Dentro de la secuencia de aminoácidos se pudieron reconocer el dominio que se encuentra reportado en la Figura 26A y la Tabla 12.

**Tabla 11.** Dominio encontrado en la secuencia obtenida de  $\alpha$ NAC (Li et al., 2015) (Kogan et al., 2013).

Secuencia	Características
<b>MKSITGVS RVTVVKKSKNILFVISKPDVFKSPNSDTYVIFGEAK</b>	Parte del dominio NAC

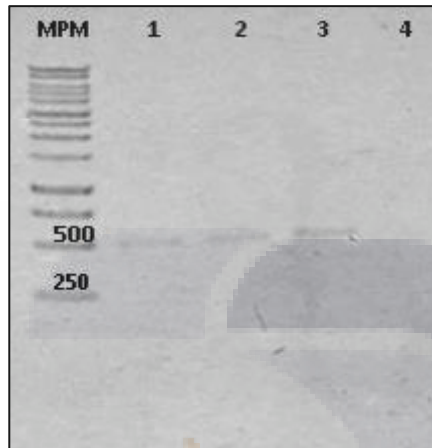
Los demás dominios presentes en la proteína completa se resaltan en la secuencia del Anexo 2. A la vez se realizó el modelado tridimensional de la proteína completa a partir de la secuencia previamente reportada en NCBI (XP\_002467858.1), se identificaron los dominios (Figura 28A) y el fragmento amplificado (Figura 28B). En la Figura 28C se reporta la predicción de la estructura secundaria de la proteína  $\alpha$ NAC.



**Figura 28.** Estructura tridimensional de  $\alpha$ NAC, presencia de dominios y el fragmento amplificado. El modelado se realizó en el programa Chimera 3D 4.3. A) La estructura de color azul representa toda la proteína (No. De acceso: XP\_002467858.1), el color amarillo representa el sitio de unión a ADN, de naranja el dominio NAC y de color verde se resalta el dominio UBA. B) La estructura de color azul representa toda la proteína y de color rojo se representa el fragmento amplificado. C) Predicción de la estructura secundaria de la proteína a partir del programa Psipred.

### 8.3.3 Amplificación de PSBA

Para el gen *PSBA* que codifica para la proteína D1 se obtuvo una amplificación de un fragmento del ADN genómico de 500 pb (Figura 29). El fragmento amplificado se nombró *SbPSBA*.



**Figura 29.** Visualización en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados a partir de ADN genómico para *PSBA* en sorgo. Del carril 1-3 se muestra la amplificación de *SbPSBA* por triplicado, mientras que en el carril 4 se muestra el control negativo. Se utilizó como marcador de peso molecular el de 1Kb de PROMEGA.

probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Sorghum bicolor]	53.5	53.5	16%	2e-05	100%	XP_002456176.1
unknown [Zea mays]	52.8	52.8	16%	6e-05	96%	ACF86091.1
Membrane-associated protein VIPP1_chloroplast; [Zea mays]	52.8	52.8	16%	6e-05	96%	AQK99024.1
Membrane-associated protein VIPP1_chloroplast; [Zea mays]	51.6	51.6	16%	1e-04	92%	OHM35707.1
membrane-associated 30 kDa protein; [Zea mays]	51.6	51.6	16%	1e-04	92%	ACG32836.1
IMN1 protein-like protein; [Zea mays]	51.6	51.6	16%	1e-04	92%	NP_001130281.1
probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Setaria italica]	51.6	51.6	16%	1e-04	92%	XP_004970889.1
Membrane-associated protein VIPP1_chloroplast; [Zea mays]	51.2	51.2	16%	1e-04	92%	OHM35708.1
PREDICTED: probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Orzyza brachyarthra]	50.4	50.4	16%	2e-04	88%	XP_015691989.1
outative membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Panicum miliaceum]	49.7	49.7	16%	5e-04	88%	BLN25263.1
outative membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Panicum miliaceum]	49.7	49.7	16%	5e-04	88%	BLN95450.1
probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Orzyza sativa Japonica Group]	49.3	49.3	16%	9e-04	85%	XP_015615370.1
probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Brachyrodium distachyon]	48.9	48.9	16%	0.001	85%	XP_003564772.1
hypothetical protein_Oh1_04768; [Orzyza sativa Indica Group]	48.5	48.5	16%	0.001	85%	EEG71949.1
hypothetical protein_POPTP_016G099400v1; [Populus trichocarpa]	48.1	48.1	19%	0.002	55%	BN588840.1
probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Phoenix dactylifera]	48.1	48.1	16%	0.002	81%	XP_008730190.1
outative membrane-associated protein_chloroplast; [Zea mays]	48.1	48.1	16%	0.002	96%	PNZ08703.1
PREDICTED: probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Scolobaria tomentosiformis]	47.0	47.0	16%	0.002	77%	XP_018626348.1
PpaAVM30; [Cochlosia caesutans]	47.8	47.8	16%	0.003	81%	OM088667.1
probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Lactuca sativa]	47.8	47.8	16%	0.003	77%	XP_003730710.1
PREDICTED: membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast-like; [Vigna arvensis]	47.0	47.0	17%	0.003	84%	XP_017449033.1
PREDICTED: probable membrane-associated 30 kDa protein_chloroplast; [Musa acuminata subsp. malaccensis]	47.8	47.8	16%	0.003		Questions.com

**Figura 30.** Búsqueda de secuencias similares a *SbPSBA* en la base de datos de NCBI en el programa Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).



La secuencia obtenida fue de 468 nucleótidos en el sentido 5'→3', la cual se encuentra localizada en el cromosoma 3 del genoma del sorgo, el gen completo tiene 11 exones y 10 intrones, de los cuales nuestra secuencia es el resultado de la amplificación del nucleótido 1846-2343 del gen que comprende el exón 5,6 y 7 y los intrones 5 y 6 (Figura 14). La secuencia hipotética parcial tanto en nucleótidos como en aminoácidos se muestra en la Figura 31.

```

1 C L K R E E N I F S K S S R G V N H I W 20
1 TGTCCTCAAAGGGAGGAGAATATTTTCTCGAAAAGCTCTCGAGGGGTAAATCATATATGG 60
21 Y M S Q R R C G A Q C L Y L V S P S R G 40
61 TATATGTCAGAGAAGATGTGGAGCACAGTGTATATTGGTTTCTCCTCCCGCGGA 120
41 D W K R M L H I Y D T W R I S I P N L L 60
121 GATTGGAAGAGAATGTTACATATATATGACACATGGAGAATAAGCATCCCAATTTATTA 180
61* R L C V C D C L L R I M R A P * G P S 80
181 TAGAGACTTTGTGTGTGTGATTGTTTACTTAGGATAATGCGAGCTCCTTAAGTCCGAGC 240
81 L I N R R V * L K I * F R I P R * V A I 100
241 TTGATCAACAGAAGGGTGTAGTTGAAAATCTGATTTCGAATACCAAGGTGAGTTGCTATT 300
101 L N C * N G L D P F L K S L L Y F M V Q 120
301 TTGAACTGCTAGAACGGTCTTGACCCTTTTTTGAATCCTTATTATATTTTCATGGTACAG 360
121 F Y V F M C T R * K V L I Q Y Y * T I N 140
361 TTCTATGTGTTTCATGTGCACCAGGTGAAAAGTGCCTCATTTCAGTATTATTGAACTATTAAC 420
141 H W S M P F C R S E S K M Q A R 156
421 CACTGGAGTATGCCATTCTGTAGGTCTGAGAGCAAGATGCAGGCCCGT 468
    
```

**Figura 31.** Secuencia hipotética parcial en nucleótidos y aminoácidos de *SbPSBA*. El análisis de la secuencia se realizó en Addgene (<https://www.addgene.org/analyze-sequence/>).

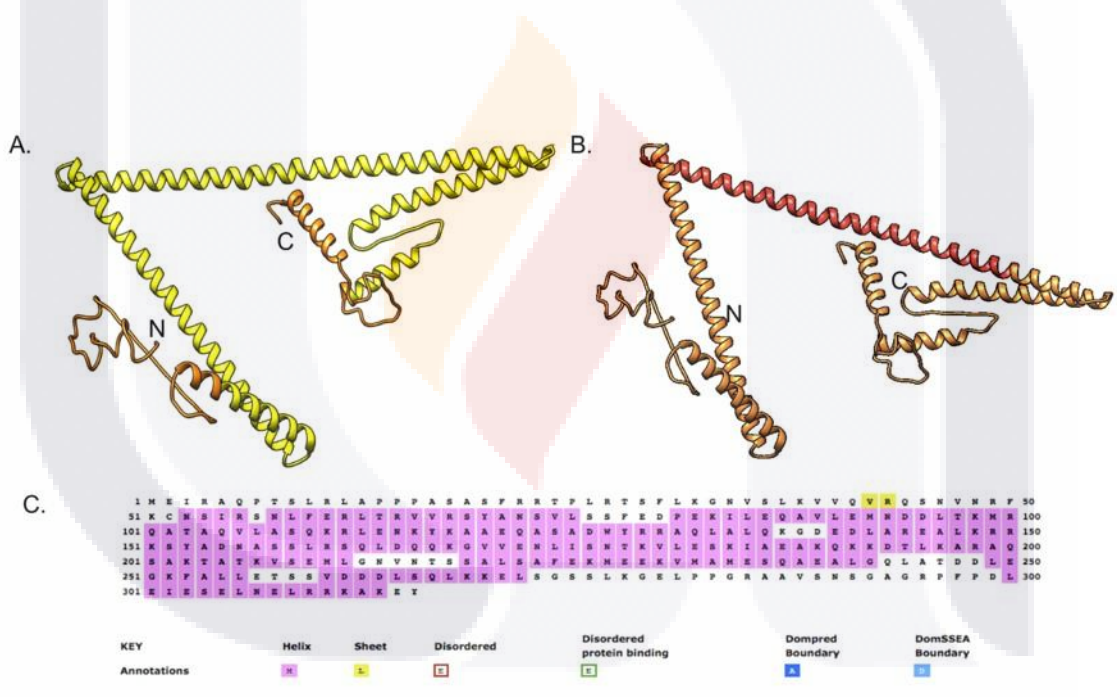
Al compararse con la base de datos de NCBI se encontró que *SbPSBA* tenía una identidad del 100% con la proteína asociada a la membrana de 30 kDa tipo cloroplástica reportado en *Sorghum bicolor* (E value:6e-30), el 95% en *Zea mays* (E value:8e-19) y 85% en *Musa acuminata* (E value:2e-10), esto comprueba que se amplificó un fragmento del gen de interés. A partir de la secuencia obtenida se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias ADN genómico y de ARN reportadas en el genoma de *Sorghum bicolor* para obtener el material codificante (ADNc) de nuestro fragmento *SbPSBA*, teniendo como resultado una secuencia de 189 nucleótidos. El fragmento codifica para una proteína de 36 aminoácidos en el primer marco de lectura, tanto la secuencia en nucleótidos como en aminoácidos se muestra en la Figura 32. No se encontraron dominios en la búsqueda en NCBI.

```

1 Q K G G E Y F L E K L S R G K S Y M D N 20
1 CAAAAGGGAGGAGAAATATTTTCTCGAAAAGCTCTCGAGGGGTAAATCATATATGGATAAT 60
21 A S S L R S Q L D Q Q K G V V E N L I S 40
61 GCGAGCTCCTTAAGGTCOCAGCTTGATCAACAGAAGGGTGTAGTTGAAAATCTGATTTCG 120
41 N T K V F E R T M V Q T R + K E Y A L R 60
121 AATACCAAGGTTTTTGAAGAACGATGGTACAGACCAGGTGAAAAGAGTATGCCTTGAGA 180
61 A R C 63
181 GCAAGATGC 189
    
```

**Figura 32.** Secuencia en nucleótidos y aminoácidos del material codificante de SbPSBA. El análisis de la secuencia se realizó en Addgene (<https://www.addgene.org/analyze-sequence/>). Los oligonucleótidos se muestran en las posiciones 1-16 y 170-189.

Se realizó el modelado tridimensional de la proteína completa a partir de la secuencia previamente reportada en NCBI (XP\_002456776.1), se identificaron los dominios de la secuencia completo (Figura 33A) y el fragmento amplificado (Figura 33B). En la Figura 33C se reporta la predicción de la estructura secundaria de la proteína a partir del programa Psipred.



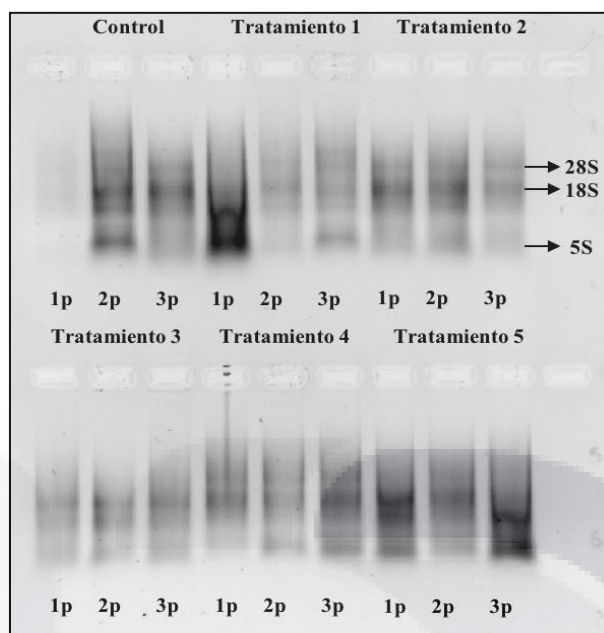
**Figura 33.** Estructura tridimensional de la proteína D1, presencia de dominios y el fragmento amplificado. El modelado se realizó en el programa Chimera 3D 4.3. A. La estructura de color azul representa toda la proteína (No. De acceso: XP\_002456776.1), el color amarillo representa el dominio *PspA*. B. La estructura de color naranja representa toda la proteína y de color rojo se representa el fragmento amplificado. C. Predicción de la estructura secundaria de la proteína a partir del programa Psipred.

#### 8.4 Extracción de ARN total

Se obtuvo ARN de buena calidad de cada uno de los tratamientos a probar, los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Tabla 13. La integridad del ARN se visualiza en la Figura 34.

**Tabla 12.** Concentración y pureza de las muestras de ARN de cada uno de los tratamientos

Tratamiento	Muestra	[ARN] ng/ $\mu$ L	Abs 260	Abs 280	Abs 260/280	Abs 260/230
Control	1P1	527.7	13.191	6.594	2	0.83
	1P2	3149.4	78.73	39.43	2	1.41
	1P3	1464.9	36.62	18.69	1.96	1.04
1	2P1	3894.6	97.36	49.33	1.97	1.91
	2P2	2440.8	61.02	31.41	1.94	1.06
	2P3	1540.4	38.50	20.06	1.92	0.63
2	3P1	1507.9	37.69	19.17	1.97	1.86
	3P2	1837.2	45.95	23.32	1.97	1.59
	3P3	1395.7	34.89	17.79	1.96	1.56
3	4P1	2027.4	50.68	26.24	1.93	1
	4P2	1219.5	30.48	15.84	1.92	1.34
	4P3	1614.2	40.35	20.88	1.93	0.80
4	5P1	1402.7	35.06	17.99	1.95	2.04
	5P2	1269.3	31.73	16.37	1.94	1.03
	5P3	1775.6	44.39	22.66	1.96	1.62
5	6P1	2879.0	71.97	37.00	1.94	1.50
	6P2	2115.5	52.88	27.36	1.93	1.81
	6P3	3034.3	75.85	38.34	1.98	1.58



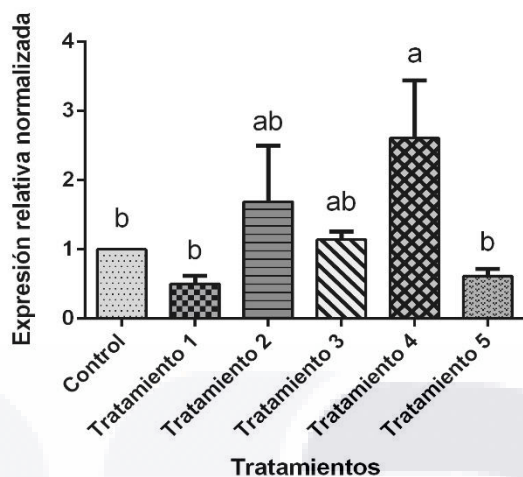
**Figura 34.** Electroforesis en un gel de agarosa al 1% del ARN total de *Sorghum bicolor* (L) Moench. Se observa de izquierda a derecha la extracción del control y los 5 tratamientos cada uno con su triplicado de réplicas biológicas.

## 8.5 Análisis de expresión de genes en respuesta ante estrés hídrico en presencia y ausencia de hongos micorrízicos

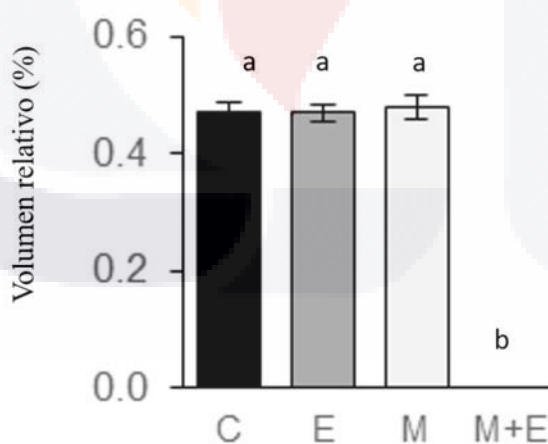
### 8.5.1 Expresión del gen $\alpha$ NAC

Se determinó el nivel de expresión del transcrito de  $\alpha$ NAC ante los seis tratamientos. En la Figura 35 se observa que el transcrito de  $\alpha$ NAC aumenta significativamente su expresión cuando la planta está asociada al consorcio selva (tratamiento 4), en comparación con el control sin micorriza. En cambio, en respuesta al estrés hídrico, los niveles del transcrito disminuyeron significativamente sólo en las plantas asociadas al consorcio selva. El transcrito no mostró cambios en sorgo sin micorriza y asociado a *Glomus clarum* en relación con su respectivo control.

Los cambios en la acumulación de transcritos coinciden con los cambios en la acumulación de proteína obtenida en el análisis proteómico. La proteína no se expresó cuando el sorgo asociado al consorcio selva fue sometido a déficit hídrico (Figura 36).



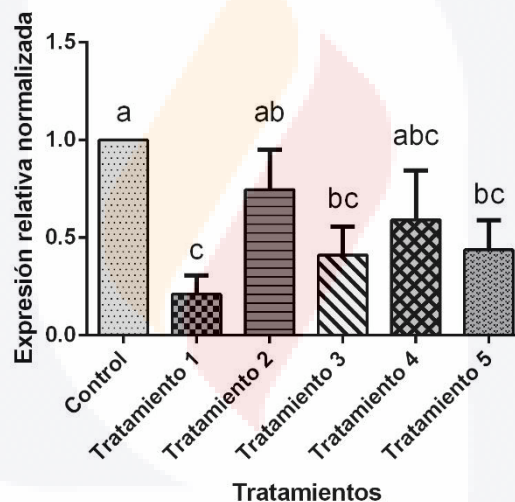
**Figura 35.** Gráfica de los resultados de RT-qPCR para el análisis de expresión del gen  $\alpha$ NAC en hojas de plantas de sorgo ante los 6 tratamientos. El experimento fue realizado con el triplicado de muestras biológicas. La expresión relativa normalizada fue calculada por el método  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . Las diferencias entre las medias que comparten una letra no son estadísticamente significativas. Los tratamientos consisten en lo siguiente: Control, 1) estrés ambos sin micorrizas, 2) *Glomus clarum*, 3) *Glomus clarum* + Estrés, 4) Consorcio selva, 5) Consorcio selva + Estrés.



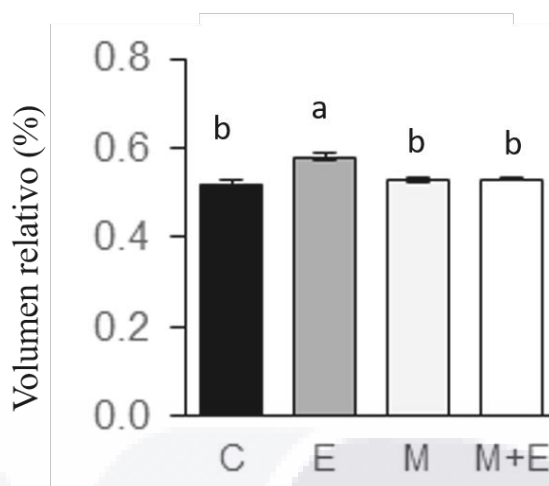
**Figura 36.** Gráfica de los resultados obtenidos en el análisis proteómico de la proteína  $\alpha$ NAC en hojas de plantas de sorgo ante la presencia del consorcio selva con y sin estrés hídrico Olalde y Valdés (en prensa). Los tratamientos consisten en lo siguiente: C-control, E-sin micorrizas/estrés hídrico, M-con consorcio selva / sin estrés, M+E-con consorcio selva/con estrés hídrico.

### 8.5.2 Expresión del gen *PSBA*

En lo que se refiere al nivel de expresión del transcrito de *PSBA* ante los seis tratamientos. En la Figura 37 se observa que *PSBA* disminuye significativamente bajo condiciones de estrés hídrico en la planta sin micorriza. En cambio, en las plantas asociadas a *Glomus clarum* y al consorcio selva la disminución del transcrito bajo condiciones de estrés no fue significativa. Al comparar los resultados obtenidos con el análisis proteómico se pudo visualizar que existe una correlación parcial en los patrones de acumulación del transcrito y la proteína, la proteína D1 aumentó en sorgo ante estrés hídrico mientras que el transcrito disminuyó comparándolos con el control sin micorriza (Figura 37 y 38). En cambio, en el sorgo asociado a hongos micorrízico, ni el transcrito ni la proteína cambiaron en respuesta al estrés. (Figura 37 y 38).



**Figura 37.** Gráfica de los resultados de RT-qPCR para el análisis de expresión del gen *PSBA* en hojas de plantas de sorgo ante los 6 tratamientos. El experimento fue realizado con el triplicado de muestras biológicas. La expresión relativa normalizada fue calculada por el método  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . Las diferencias entre las medias que comparten una letra no son estadísticamente significativas. Los tratamientos consisten en lo siguiente: Control, 1) estrés ambos sin micorrizas, 2) *Glomus clarum*, 3) *Glomus clarum* + Estrés, 4) Consorcio selva, 5) Consorcio selva + Estrés



**Figura 38.** Gráfica de los resultados obtenidos en el análisis proteómico de la proteína D1 en hojas de plantas de sorgo ante la presencia del consorcio selva con y sin estrés hídrico Olalde y Valdés (en prensa). Los tratamientos consisten en lo siguiente: C-control, E-sin micorrizas/estrés hídrico, M-con consorcio selva / sin estrés, M+E-con consorcio selva /con estrés hídrico.

### 8.6 Predicción *in silico* de modificaciones postraduccionales en las secuencias de $\alpha$ NAC y PSBA.

Se buscó hacer uso de herramientas bioinformáticas para tratar de predecir posibles modificaciones postraduccionales en las proteínas de interés con la finalidad de complementar y corroborar nuestros resultados con la finalidad de verificar la correlación transcrito-proteína.

Para el caso de  $\alpha$ NAC, la plataforma bioinformática IPTMnet (Ross et al., 2017) nos indicó que esta subunidad tiende a modificarse por fosforilación por lo que se procedió a comprobarlo en la base de datos de Planta Protein Phosphorylation Data Base (P3DB) (Yao et al., 2013). Después de realizar un BLAST de nuestra proteína da similitud con la misma subunidad reportada en *A. thaliana* en la cual se predice que se fosforila en los residuos de Ser36 y Ser 57.

Para el caso de la proteína D1 se comprobó en la plataforma bioinformática IPTMnet (Ross et al., 2017) que esta proteína tiende a la fosforilación en los residuos Thr2 y Ser232, además de que es sensible a la acetilación en el residuo Thr2.

## Discusión

Existen factores ambientales como las temperaturas extremas, salinidad y baja disponibilidad de agua que limitan el crecimiento y el desarrollo de las funciones vitales de una planta (Krasensky et al., 2012), esto conlleva a generar alteraciones morfológicas, fisiológicas y metabólicas (Nakashima et al., 2012). El desarrollo de estudios a diferentes niveles: genómica, proteómica, metabolómica han sido fundamentales para entender la respuesta de las plantas ante el estrés hídrico (Pérez-Torres et al., 2008) y por lo tanto se ha incrementado la identificación de genes que cambian su expresión e incluso que intervienen en la tolerancia a este tipo de estrés. Debido a esto se buscó identificar un péptido natriurético en sorgo, amplificar un fragmento de  $\alpha$ NAC, *PSBA* y analizar la expresión de dichos genes ante los seis diferentes tratamientos previamente descritos en la Metodología y compararlos con los resultados obtenidos en el estudio proteómico, esto con la finalidad de analizar si existen cambios en la expresión de estos genes ante estrés hídrico y en presencia y ausencia de hongos micorrízicos.

Se analizaron los PNP's ya que son moléculas de señalización que son secretadas al apoplasto bajo condiciones de estrés biótico y abiótico; además, están relacionados con la homeostasis, la regulación del flujo iónico que conlleva a los movimientos estomáticos y al flujo de la circulación en las plantas, y en *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado su expresión ante el estrés osmótico y por salinidad (Wang et al., 2011).

Para la identificación del PNP en sorgo se decidió seguir dos estrategias: 1) la *in silico* y 2) la experimental.

En la estrategia *in silico* se analizó el proteoma del sorgo, donde se encontraron 3 diferentes proteínas con diversos porcentajes de identidad con el AtPNP-A, PNP-A reportado en *Arabidopsis thaliana* (OAP10906.1): Sorbic 002G234500, Sorbic 010G240400 y Sorbic 002G245200. De acuerdo con lo reportado por Ludidi et al., (2002), los PNP's deben de contener: 1) seis residuos de cisteínas conservadas, 2) la presencia de un péptido señal, 3) la presencia de dos motivos conservados, el A: K[VI]VD y el B: [LM]SxxAFxxI, donde en el segundo motivo (B) se incluye una serina y una fenilalanina conservada, 4) un peso molecular que oscila entre 12-14 kDa y 5) la presencia de una glicina conservada después del cuarto residuo de cisteína conservada.



En estas tres proteínas se encontraron los residuos de cisteína resaltados con triángulos rojos en la Figura 20, los cuales forman enlaces disulfúricos entre ellos para favorecer el plegamiento de la molécula y tener una actividad biológica ya que de manera linealizada no es funcional, según lo observado en un péptido natriurético atrial (PNA) en ratas (Meier et al., 2008). En cuanto al péptido señal, las tres proteínas lo presentan (Figura 18). Los péptidos señal son los encargados de direccionar la molécula al espacio extracelular para que lleve a cabo su función (Ruzvidzo et al., 2011). Además, se verificó la presencia de dos motivos conservados en las secuencias de aminoácidos de PNP's, el A: K[VI]VD y el B: [LM]SxxAFxxI, donde en el segundo motivo incluye la serina y la fenilalanina conservada. En la Figura 20 se visualiza que ambos motivos se encuentran en At-PNP y en las tres proteínas de sorgo (resaltadas en cuadros). Sin embargo, en la proteína Sorbic 002G245200 el motivo A presenta cambiada la lisina (K) por una arginina (R). Existe un grupo de proteínas relacionadas con este tipo de péptidos llamadas proteínas Barwin las cuales presentan ambos motivos, pero con modificaciones, en el motivo A la lisina (K) puede ser remplazada por una arginina (R) y el motivo B se modifica a LxxxxFxxI, mientras que los residuos de cisteína se mantienen conservados (Ludidi et al., 2001). Estas modificaciones se visualizan en la secuencia de la proteína Sorbic 002G245200 por lo que podríamos predecir que se trata de una proteína de este tipo (Ludidi et al., 2001), las cuales son proteínas básicas de aproximadamente 125 residuos de aminoácidos encontradas por primera vez en extractos de la semilla de la cebada que es capaz de unirse débilmente a un análogo de quitina: el tetrámero 0- (1,4) oligosacárido de N-acetilglucosamina (Ludvigsen et al., 1992). A la vez, se ha visto que está estrechamente relacionada con los genes inducidos por la generación de una herida (win 1 y win 2), sin embargo, aún se desconoce su función exacta (Svensson et al., 1992). Estructuralmente esta proteína es muy parecida a los PNP's, también contienen seis residuos de cisteínas que se combinan para formar tres enlaces disulfúricos (Svensson et al., 1992; Ludvinsen et al., 1992) y poseen un dominio denominado Barwin el cual podría estar relacionado en la defensa mecánica de las plantas.

Además, podemos descartar que las tres proteínas hipotéticas sean expansinas ya que no poseen el residuo de triptófano cerca del C- terminal, ni un dominio de unión

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a carbohidratos que contenga una región rica en tirosinas y el motivo catalítico HFD (Ludidi et al., 2002; Barre y Rouge, 2002).

La búsqueda de dominios conservados en diferentes plataformas bioinformáticas mostró que todas presentan el dominio característico de PNP (Figura 17): el dominio RplA y el dominio doble beta barril (DPBB), por sus siglas en inglés *doublebetabarril*, que se encarga de darle una estructura secundaria a la proteína además de que puede actuar como un dominio enzimático. Los dominios de los miembros de esta familia son muy diversos y por lo tanto varía su funcionalidad. DPBB también se caracteriza por encontrarse en el N-terminal del alérgeno del polen (Finn et al., 2016). Este está formado por seis láminas envolventes que asumen un eje pseudo-doble en la cual cada una de la estructura psi consiste en las asas que se unen a tres láminas beta (Finn et al., 2016, Valle-Rodríguez, 2016). Cada estructura psi está conformada por una estructura de asa y una lámina beta generando una simulación de una letra griega psi (Castillo et al., 1999). Se tiene reportado que dentro de este dominio se encuentra un fragmento funcional encargado de conferir la actividad de homeostasis (Morse et al., 2004).

El peso molecular de las tres proteínas de sorgo oscila entre 12-14 kDa, lo que indica el tamaño aceptado para los PNPs (Tabla 8). Aunado a esto, las tres proteínas presentan una glicina conservada después de la cuarta cisteína de las seis conservadas (Figura 20).

En base a estos análisis se descartó la proteína Sorbic. 002G245200, ya que presentan modificaciones en sus motivos A y B, y si se consideraron las proteínas Sorbic 002G234500 y Sorbic 010G240400 como posibles PNP's, ya que ambas cumplen con los parámetros mencionados e incluso podrían tratarse de dos diferentes tipos de PNP's codificados por diferentes genes. Esto podría coincidir con lo reportado en *Arabidopsis thaliana* en la cual se ha detectado dos tipos: PNP-A y PNP-B (Wang et al., 2007). Así mismo, Valle-Rodríguez et al., (2017) identificaron un PNP en ajo (*Allium sativa*), mientras que Herrera-Martínez (2016) identificó uno en *Pereskia sacharosa* y ambos presentaban una alta similitud con la proteína Sorbic 002G234500.

En la parte experimental, se buscó amplificar un fragmento de PNP en sorgo con oligonucleótidos previamente diseñados y probados. Con el primer par de oligonucleótidos (Tabla 5) se obtuvo un fragmento de 304 pares de bases (Figura 22).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Al comparar la secuencia de este fragmento con la base de datos de NCBI no presentó similitud con alguno de los PNP's previamente reportados, aunque sí dio similitud con un fragmento del genoma de *Sorghum bicolor*, por lo que se descartó que hubiera contaminación del ADN. Haciendo un análisis del cromatograma obtenido, se observó una secuencia "sombra" o secuencias superpuestas, lo cual puede atribuirse a que los oligonucleótidos se unieron a un sitio secundario subóptimo dando lugar a picos extra de menor intensidad. Otra posibilidad es que los oligonucleótidos hayan estado parcialmente degradados o mal purificados durante su síntesis, y que se estén generando varios productos del mismo tamaño (PCR inespecífica), que no se hayan eliminado los oligonucleótidos de la PCR (purificación ineficiente) e incluso al estar en un vector podría ser que hubo contaminación con otra colonia que tenía el vector ligado a otro producto de PCR (CSIC, 2018).

Otra proteína que se analizó en este trabajo fue la  $\alpha$ NAC, que forma parte de un heterodímero proteico conservado que consiste en dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$  (Liu et al., 2015). Mediante PCR se amplificó un fragmento de 1500 nucleótidos de la subunidad  $\alpha$ , esta secuencia se limpió eliminando los fragmentos de baja calidad resultando una secuencia de 197 nucleótidos, además de que la secuenciación tipo Sanger es eficiente hasta con fragmentos de 1000 pb (Aguilar-Bultet et al., 2015). La secuencia putativa codifica para 66 aminoácidos en la cual se identificó un fragmento del dominio NAC (Tabla 12), que dimeriza las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , este dominio conservado es de aproximadamente 61 aminoácidos y no es exclusivo de la subunidad  $\alpha$ . Este tiene la función de dar estructura de seis hebras unidas en una estructura de beta barril, esto se puede visualizar en modelado tridimensional de la proteína (Figura 28) (Finn et al., 2016; Liu et al., 2015). Aunque no se encontraron en el fragmento amplificado,  $\alpha$ NAC contiene otros dos sitios/dominios importantes para su funcionalidad: sitio de unión al ADN el cual es un sitio ampliamente relacionado con la regulación de la transcripción y el dominio UBA el cual está relacionado con la ubiquitación de las proteínas (Mueller et al., 2002). Este dominio únicamente se encuentra en la subunidad  $\alpha$  y se encuentra hacia el carbono terminal, su estructura es homóloga en diferentes proteínas (Liu et al., 2015; Spreter et al., 2005).

La otra proteína de interés fue la proteína D1 del PSII el cual es uno de los dos complejos pigmento-proteína que interviene en el proceso de fotosíntesis y es codificada por el gen *PSBA* que se encuentra en cloroplasto (Liu et al., 2002). Mediante PCR se amplificó un fragmento del gen *PSBA* de 468 nucleótidos (Figura 31), de los cuales 189 contienen el material codificante para la proteína D1 y la traducción virtual es de 36 aminoácidos (Figura 32). En la predicción de su estructura secundaria se observó que predomina la estructura de hélice (Figura 33). Järvi et al., (2015) mencionan que la proteína D1 se conforma de cinco hélices que se localizan de manera transmembranal, en la cual el N- terminal se localiza dentro del estroma del cloroplasto y que las primera dos estructuras de  $\alpha$  hélice que se encuentran de manera transmembranal de la proteína D1 interactúan débilmente con la proteína D2, la interacción de las proteínas D1-D2 se refuerza después de que se completa la traducción de las cuatro hélices restantes que se localizan de manera transmembranal.

Para el análisis de expresión de las plantas de *Sorghum bicolor* sometidas a los 6 diferentes tratamientos, se realizaron una serie de RT-qPCRs. Se utilizó como gen de referencia el gen de  $\beta$ -actina ya que Sudhakar et al., (2016) lo reportan como uno de los más indicados para esta planta por su buena eficiencia. En el caso de la expresión de  $\alpha$ NAC, se observó un aumento significativo en las plantas de sorgo asociadas al consorcio selva del grupo control (Figura 35). Hasta el momento no existen estudios de expresión con este gen ni en sorgo ni en ninguna otra planta. Sin embargo, en estudios de proteínas Yan et al., (2005) reportan que en raíces de arroz (*Oryza sativa*) se presenta una disminución de la cantidad de esta proteína ante estrés salino. Los mismos autores consideran que una baja síntesis de esta subunidad afecta la funcionalidad de la proteína NAC en cuanto a la transcripción génica, la traducción de proteínas y localización lo que lleva a un desorden metabólico. Sin embargo, los resultados de Yan et al., (2005) no coinciden con los resultados obtenidos por Valdés y Olalde (en prensa) quizá se deba a que la respuesta ante el mismo estímulo fue en diferentes órganos de la planta, fueron diferentes tipos de estrés, además depende de la intensidad del estrés a que se someta.

En el estudio proteómico realizado por Song et al., (2015) en *Amorpha fruticosa* asociada al hongo micorrízico *Glomus mosseae* reportan que aumenta la expresión de

la proteína  $\alpha$ NAC en las raíces, que esta se posiciona en la parte superior de los polipéptidos recién sintetizados y que es capaz de unirse reversiblemente a los ribosomas eucarióticos guiando la correcta distribución y translocación de los polipéptidos recién sintetizados. Ellos no solo observaron aumento de  $\alpha$ NAC, sino también de la proteína ribosómica 40s y afirman que ambas proteínas aseguran la síntesis y una distribución rápida y precisa de proteínas relacionadas con la relación simbiótica con hongos micorrízicos arbusculares (AM). Por lo contrario, Hajheidari et al., (2005) al trabajar con *Beta vulgaris* reportan un decremento en la cantidad de  $\alpha$ NAC al realizar un estudio proteómico en hojas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), mencionan que este decrecimiento conlleva una represión de la traducción proteica al estar bajo déficit hídrico, el decrecimiento puede llevar en un error en la traducción, desvió y la proteólisis de las proteínas y por lo tanto una disminución del rendimiento general de la planta. Consideramos que  $\alpha$ NAC aumenta al asociarse al consorcio selva ya que esta subunidad que conforma a NAC interviene en la síntesis proteica, no solo para generar la simbiosis del hongo, sino también las plantas deben aumentar su metabolismo para satisfacer la demanda nutrimental, tanto del sorgo como de los hongos micorrízicos que conforman al consorcio selva, para confirmar esto se deben de realizar otros estudios.

En nuestros resultados también se observó una transcripción significativamente mayor del gen  $\alpha$ NAC en las plantas de sorgo asociadas al consorcio selva que aquellas sometidas a déficit hídrico sin micorrizas y asociadas a *Glomus clarum* (Figura 35). Esto comprueba que el consorcio selva funge como protección, sin embargo, al presentarse el déficit hídrico, aunque esté protegido por la micorriza existe un decrecimiento en el transcrito, aunque en una menor proporción.

Si comparamos el análisis proteómico con el análisis de expresión génica (Figura 35 y 36) podemos deducir que en el caso de  $\alpha$ NAC si existe una correlación transcrito-proteína ya que los cambios en la acumulación de transcritos coinciden con los cambios en la acumulación de proteína en presencia de déficit hídrico. En cambio, cuando el sorgo asociado al consorcio selva y bajo déficit hídrico no hubo expresión de la proteína. Sin embargo, antes de realizar este estudio nosotros creíamos que no existiría esta correlación ya que se tienen identificados en  $\alpha$ NAC una serie de modificaciones

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

postraduccionales mediadas por eventos de fosforilación las cuales regulan su vida media, su actividad y su localización subcelular (Quelo et al., 2005), por lo que se pensó que la fosforilación podría actuar para regular la actividad de esta proteína ya que se han reportado estudios donde ante déficit hídrico se fosforilan las proteínas (Bhatotia et al., 2016). Los resultados de predicción de modificaciones postraduccionales en la plataforma bioinformática IPTMnet (Ross et al., 2017) indicaron que  $\alpha$ NAC tiende a modificarse por fosforilación. Esto se comprobó haciendo un BLAST de nuestra proteína en la base de datos de Plant Protein Phosphorylation Data Base (P3DB) (Yao et al., 2013) resultando que tiene una similitud con la misma subunidad reportada en *A. thaliana* en la cual se predice que se fosforila en los residuos de Ser36 y Ser 57.

Se analizó la transcripción del gen *PSBA*, ya que codifica para la proteína D1, una de las proteínas que se encuentra dentro del fotosistema II y que tiene la función de transformar la energía luminosa en energía química y en el transporte de electrones (Sekar y Ramasamy, 2015). Además, como lo afirman Saibo et al., (2008), existe un cambio significativo en la fotosíntesis en presencia de estrés abiótico y es capaz de interferir en diferentes puntos del proceso, como por ejemplo en la difusión del CO<sub>2</sub>, en la eficiencia del fotosistema II, en el transporte de electrones, la formación de ROS y el contenido de la enzima RUBISCO la cual es la encargada de llevar a cabo la fijación del carbono.

En los resultados de análisis de expresión se encontró que los transcritos de *PSBA* disminuyeron significativamente en las plantas sometidas a estrés hídrico con respecto del control. Mientras que en las plantas asociadas a micorrizas no se observaron diferencias significativas (Figura 37). Esto coincide con lo reportado por Liu et al., (2006), donde analizaron la expresión del gen *PSBA* mediante Northern blot en cultivos de trigo (*Triticum aestivum* L) bajo estrés hídrico. Ellos observaron una disminución gradual de los transcritos de *PSBA*, atribuyéndose a tres causas: daños en el ADN, disminución en la cantidad de transcrito y la estabilidad del ARNm. Sin embargo, en estudios con hojas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) demostraron que este tipo de estrés es capaz de regular la expresión génica del PSII, en todos los niveles: transcripcional, traduccional, postranscripcional y postraducciona (Yuan et al 2005).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Una posible explicación a la disminución del transcrito del gen *PSBA* en plantas sometidas a estrés hídrico son las especies reactivas de oxígeno (ROS) generados ante el estrés hídrico que inhiben la reparación del PSII a partir de la supresión de la transcripción y la traducción de los genes *PSBA* (Nishiyama, 2006), los ROS son segundos mensajeros esenciales para la señalización en las células vegetales (Bowler y Fluhr, 2000).

Nuestros resultados también coinciden con los de He et al., (1999) que realizaron estudios en hojas de trigo (*Triticum aestivum*) y analizaron la expresión de diferentes genes cloroplásticos y encontraron que la síntesis de ARN se ve claramente reducido por la degradación y no tanto por la disminución, esto en los genes *PSBA* y *PSBD*, sobre esto está también los resultados de Mason et al., (1988) donde mencionan que el estrés hídrico es capaz de generar una disminución de ribosomas y la proporción de polirribosomas (Mason et al., 1988) y además Green (1993) hace mención que los ribosomas son capaces de proteger a los ARNm de la degradación. Por lo tanto, la disminución de la proporción de ribosomas durante el estrés hídrico, así como la disminución del ARNm conlleva a una notable disminución de la síntesis de la proteína. Otra posible explicación del incremento en la degradación del ARNm es que se incrementa la expresión de una RNAasa cloroplástica que degrada los mensajeros sintetizados a partir del genoma cloroplásticos (He et al., 1995). Esto coincide no solo con nuestros resultados del análisis de transcripción de *PSBA*, sino también con el fenotipo observado, donde las plantas sometidas a estrés hídrico mostraron láminas foliares más pequeñas (Figura 14). A la vez se busca tratar de deducir la eficiencia de las micorrizas con respecto a la respuesta de la planta ante estrés por déficit hídrico, en la Figura 37 se observa que *PSBA* disminuye en presencia de estrés hídrico, sin embargo se visualiza que la expresión de este gen no es afectado por el estrés en las plantas asociadas a *Glomus clarum* y al consorcio selva por lo que se podría llegar a la conclusión de que la asociación a hongos micorrízicos le brinda una mayor protección ante el déficit hídrico ya que evita el decrecimiento del transcrito de este gen que está relacionado a la fotosíntesis y por lo tanto a la productividad de la planta.

En cuanto a la comparación con el estudio proteómico no existe una correlación ARNm-proteína, al menos ante estrés hídrico, ya que la tendencia en el transcrito de *PSBA* ante estrés hídrico sin micorrizas es la disminución mientras que en el estudio proteómico aumenta (Figura 37 y 38). Una razones de que no exista una correlación de los resultados proteómicos reportados por Olalde y Valdés (en prensa) con los de transcrito podrían ser que la respuesta a estrés varía en cada órgano de la planta y está íntimamente asociado con la intensidad del estrés al que se somete la planta. Aunado a esto, mecanismos postranscripcionales/ postraduccionales podrían estar involucrados en el proceso de conversión de ARNm a proteína y modificaciones de la misma proteína, por ejemplo, estas modificaciones posteriores a su traducción pueden ser desde la exclusión del péptido señal hasta procesos de fosforilación y glicosilación. Estas modificaciones están ligadas con la funcionalidad de la proteína y la localización subcelular (Yan et al., 2005). También podría ser que las proteínas difieren sustancialmente en su tiempo de vida y por último siempre existe un error experimental tanto en los experimentos que involucran ARNm, así como los de proteínas (Greenbaum et al., 2003).

En el caso específico de *PSBA* creemos que se debe a las modificaciones postraduccionales, ya que la expresión génica está controlada por PTM's esto se ha visto en los cloroplastos de algas verdes y en plantas superiores (Grabsztunowic et al., 2017). El estrés hídrico podría causar la fosforilación de las proteínas del PSII, incluidas la D1, la fosforilación la causa la luz sin embargo el estrés hídrico la potencializa, ayudando a la protección del fotosistema II del daño oxidativo en plantas superiores (Huo et al., 2015). El proceso de fosforilación de estas proteínas esta mediado por kinasas (Giardi et al., 1996). Como complemento a nuestros resultados, la fosforilación de la proteína D1 se comprobó *in silico* a partir de la plataforma bioinformática IPTMnet (Ross et al., 2017) donde se fosforilan los residuos Thr2 y Ser232. Así también, nos dio como resultado que esta proteína es sensible a la acetilación en el residuo Thr2. Los residuos de treonina en el N- terminal de la proteínas D1 han sido reportados como los lugares donde ocurre el proceso de fosforilación reversible, el proceso de fosforilación esta mediado por STN8 kinasa y ante condiciones de poca luz actúa la STN7 kinasa. La fosforilación de las proteínas del fotosistema II, incluyendo la D1, juegan un papel



fundamental para la reparación del PSII ya que facilita la migración del PSII dañado de la grana al estroma en los cloroplastos (Järvi et al., 2015). La importancia de la fosforilación fue estudiada por Giardi et al., (1996) ya que reportaron que una larga exposición de plantas de chícharo (*Psidium sativum*) a déficit hídrico incrementa de manera significativa la fosforilación de la proteína D1. Sin embargo, estos resultados se contradicen con los reportados por Liu et al (2009), los cuales afirman que las proteínas fosforiladas disminuyen ante estrés hídrico, es decir existe una desfosforilación lo cual es necesario para la degradación de D1. Se ha reportado que para la reparación del PSII es necesario la fosforilación de las proteínas del PSII para que después ocurra la monomerización del dímero (D1 y D2), la migración de grana al estroma en la membrana de los tilacoides, el proceso de desfosforilación de las proteínas D1, D2 y CP43, la degradación de la proteína D1 (Järvi et al., 2015) y el reensamblase de las nuevas proteínas D1 sintetizadas en un complejo PSII funcional (Wang et al., 2015). Por lo que podemos decir que la fosforilación de la proteína D1 regula su degradación, manteniéndola almacenada así hasta su remplazo y también puede intervenir en la regulación de la dimerización del centro de reacción (Rintamaki et al., 1995 Santini et al., 1994).

## Conclusiones

- Se amplificó secuencias parciales de los genes de  $\alpha$ NAC y *PSBA* en *Sorghum bicolor* (L) Moench.
- A partir de un análisis bioinformático se identificó dos posibles PNP's no reportado en el genoma/proteoma del sorgo, los cuales son: Sorbic 002G234500 y Sorbic 010G240400.
- El análisis de expresión en tiempo real mostró que el transcrito de  $\alpha$ NAC no sufre cambios en sorgo sin micorriza, asociado a *Glomus clarum* y bajo condiciones de estrés hídrico, comparado con su control.
- $\alpha$ NAC aumenta significativamente su expresión cuando la planta está asociada al consorcio selva en comparación con el control sin micorriza en presencia y ausencia de estrés hídrico.
- Existe una correlación en la expresión transcrito-proteína en la subunidad  $\alpha$ NAC.
- La expresión de *PSBA* disminuye ante estrés hídrico mientras que la proteína D1 aumenta, no existió cambios significativos al asociarse las micorrizas.
- No existió una correlación en la expresión transcrito-proteína ante déficit hídrico en la proteína D1 (*PSBA*).

## Bibliografía

- 1) Aguilar-Bultet, L., & Falquet, L. (2015). Sequencing and de novo assembly of bacterial genomes: an approach to study new pathogens. *Revista de Salud Animal*, 37(2), 125-132.
- 2) Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.
- 3) Augé, R. M., Kubikova, E., & Moore, J. L. (2001). Foliar dehydration tolerance of mycorrhizal cowpea, soybean and bush bean. *New Phytologist*, 151(2), 535-541.
- 4) Bachem, C. W., Oomen, R. J., & Visser, R. G. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16(2), 157-157.
- 5) Baker, N. R. (1991). A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 81(4), 563-570.
- 6) Barker, S. J., Tagu, D., & Delp, G. (1998). Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant physiology*, 116(4), 1201-1207.
- 7) Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., & Pantoja, O. (2013). Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics*, 13(12-13), 1801-1815.
- 8) Barre, A., & Rougé, P. (2002). Homology modeling of the cellulose-binding domain of a pollen allergen from rye grass: structural basis for the cellulose recognition and associated allergenic properties. *Biochemical and biophysical research communications*, 296(5), 1346-1351.
- 9) Bhatotia, Kirti & Khatodia, Surender & Khurana, SM. (2016). Abiotic stress specific phosphorylation in plant proteins: A review. *Current Advances in Agricultural Sciences (An International Journal)*. 7. 95. 10.5958/2394-4471.2015.00024.6.
- 10) Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
- 11) Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633-1649.
- 12) Bowler, C., and Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci.* 5, 241–246. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01628-9
- 13) Boyer, J.S., Westgate, M.E. (2004). Grain yields with limited water. *J. Exp. Bot.* 55 (407), 2385–2394.

- 14) Bruce, W.B., Edmeades, G.O., Barker, T.C. (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 53 (366), 13–25
- 15) Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., & Craig, E. A. (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, 101(2), 119-122.
- 16) Bustin S. (ed). (2004). A-Z of Quantitative PCR. IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, California.
- 17) Castillo, R. M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T. L., & Murzin, A. G. (1999). A six-stranded double-psi  $\beta$  barrel is shared by several protein superfamilies. *Structure*, 7(2), 227-236.
- 18) CFC & ICRISAT (2004) Alternative uses of sorghum and pearl millet in Asia. In: Proceedings of the Expert Meeting, ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India, 1-4 July 2003. CFC Technical Paper No. 34, Common Fund for Commodities, P.O. Box 74656, 1070 BR Amsterdam, The Netherlands; and International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India, 364 pp. ISBN 92-9066-471-1
- 19) Cobb, A. B., Wilson, G. W., Goad, C. L., Bean, S. R., Kaufman, R. C., Herald, T. J., & Wilson, J. D. (2016). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in grain production and nutrition of sorghum genotypes: Enhancing sustainability through plant-microbial partnership. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 432-440.
- 20) Comstock, J. P. (2002). Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, 53(367), 195–200. doi:10.1093/jexbot/53.367.195
- 21) Cosgrove DJ. (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407:321–326
- 22) Cosgrove DJ. (2000). New genes and new biological roles for expansins. *Curr Opin Plant Biol* 3:73–78
- 23) CSIC. (2018). Secuenciación de DNA. (2018). Retrieved from <http://www.ipb.csic.es/servicios/Genomica/secuenciacion-de-dna.html#guia>
- 24) Davies, W.J., Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development in plants in drying soils. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 55–70.
- 25) FAO (1995) Sorghum and millets in human nutrition. FAO Food and Nutrition Series, No. 27, ISBN 92-5-103381-1. <http://www.fao.org/docrep/t0818e/t0818e00.htm>
- 26) Fields, S. (2001). Proteomics in genomics. *Science*, 291(5507), 1221-1224.
- 27) Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., ... & Gough, J. (2016). InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic acids research*, 45(D1), D190-D199.

- 28) Fizames, C., Muños, S., Cazettes, C., Nacry, P., Boucherez, J., Gaymard, F., ... & Cooke, R. (2004). The Arabidopsis root transcriptome by serial analysis of gene expression. Gene identification using the genome sequence. *Plant physiology*, 134(1), 67-80.
- 29) Fracasso, A., Trindade, L., & Amaducci, S. (2016). Drought tolerance strategies highlighted by two Sorghum bicolor races in a dry-down experiment. *Journal of plant physiology*, 190, 1-14.
- 30) Gale, M. D., & Devos, K. M. (1998). Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 1971-1974.
- 31) Gamboa, A., & Raúl, V. A. P. (2002). Los péptidos natriuréticos y su efecto cardiovascular. *Rev Per Cardiol*, 28, 1.
- 32) Garavaglia, B. S., Thomas, L., Zimaro, T., Gottig, N., Daurelio, L. D., Ndimba, B., ... & Gehring, C. (2010). A plant natriuretic peptide-like molecule of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causes rapid changes in the proteome of its citrus host. *BMC plant biology*, 10(1), 51.
- 33) Gavel, Y., & Heijne, G. V. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Engineering, Design and Selection*, 3(5), 433-442.
- 34) Gehring, C. A. (1999). Natriuretic peptides—a new class of plant hormone? *Annals of Botany*, 83(4), 329-334.
- 35) Gehring, C., & Irving, H. R. (2012). Peptides and the regulation of plant homeostasis. In *Plant Signaling Peptides* (pp. 183-197). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 36) George, R., Walsh, P., Beddoe, T., & Lithgow, T. (2002). The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo. *FEBS letters*, 516(1-3), 213-216.
- 37) Geyer, H., & Geyer, R. (2006). Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(12), 1853-1869.
- 38) Giardi, M. T., Cona, A., Geiken, B., Kučera, T., Masojidek, J., & Mattoo, A. K. (1996). Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta*, 199(1), 118-125.
- 39) Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., & Bending, G. D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113(1-4), 17-35.

- 40) Grabsztunowicz, M., Koskela, M. M., & Mulo, P. (2017). Post-translational modifications in regulation of chloroplast function: Recent advances. *Frontiers in plant science*, 8, 240.
- 41) Green PJ. (1993). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol* 102: 1065–1070
- 42) Green, C. D., Simons, J. F., Taillon, B. E., & Lewin, D. A. (2001). Open systems: panoramic views of gene expression. *Journal of immunological methods*, 250(1-2), 67-79.
- 43) Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., & Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology*, 4(9), 117.
- 44) Griffiths, H., & Parry, M. A. J. (2002). Plant responses to water stress. *Annals of Botany*, 89(7), 801-802.
- 45) Hajheidari, M., Abdollahian-Noghabi, M., Askari, H., Heidari, M., Sadeghian, S. Y., Ober, E. S., & Hosseini Salekdeh, G. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5(4), 950-960.
- 46) He JX, An LZ, Lin HH, Liang HG. (1999). Evidence for transcriptional and post-transcriptional control of protein synthesis in water-stressed wheat leaves: a quantitative analysis of messenger and ribosomal RNA. *J Plant Physiol* 155: 63–69
- 47) He, J.X., Wang, J., Liang, H.G. (1995): Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. *-Physiol. Plant.* 93: 771-777.
- 48) He, J.-X., Wen, J.-Q., Chong, K., Liang, H.-G. (1998): Changes in the transcript levels of chloroplast psbA and psbD genes during water stress in wheat leaves. *-Physiol. Plant.* 102: 49-54.
- 49) Herrera Martínez, V. (2015). *Identificación y estudio de expresión de dos genes relacionados con la abertura y cierre de estomas en Opuntia ficus-indica y Pereskia sacharosa (CACTACEAE)* (Doctorado). Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- 50) Hu, J., Guo, Y., & Li, Y. (2006). Research progress in protein post-translational modification. *Chinese Science Bulletin*, 51(6), 633-645.
- 51) Hu, M., & Polyak, K. (2006). Serial analysis of gene expression. *Nature protocols*, 1(4), 1743.
- 52) Huo, Y., Wang, M., Wei, Y., & Xia, Z. (2015). Overexpression of the Maize psbA Gene Enhances Drought Tolerance Through Regulating Antioxidant System, Photosynthetic Capability, and Stress Defense Gene Expression in Tobacco. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1223. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.01223>

- 53) Jafarov, T., Alexander, J. W., & St-Arnaud, R. (2012).  $\alpha$ NAC interacts with histone deacetylase corepressors to control Myogenin and Osteocalcin gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(11), 1208-1216.
- 54) Järvi, S., Suorsa, M., & Aro, E. M. (2015). Photosystem II repair in plant chloroplasts—regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(9), 900-909.
- 55) K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses, *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 781–803.
- 56) Kaido M, Inoue Y, Takeda Y, Sugiyama K, Takeda A, Mori M, Tamai A, Meshi T, Okuno T, and Mise K. (2007). Downregulation of the NbNACa1 gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 671–81.
- 57) Kaiser, W. M. (1987). Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia plantarum*, 71(1), 142-149.
- 58) Kang, G., Ma, H., Liu, G., Han, Q., Li, C., & Guo, T. (2013). Silencing of TaBTF3 gene impairs tolerance to freezing and drought stresses in wheat. *Molecular genetics and genomics*, 288(11), 591-599.
- 59) Karan, R., & Subudhi, P. K. (2012). Overexpression of a nascent polypeptide associated complex gene (Sa $\beta$ NAC) of *Spartina alterniflora* improves tolerance to salinity and drought in transgenic *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 424(4), 747-752.
- 60) Karp, G. (2014). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos* (6a. McGraw Hill Mexico.
- 61) Kogan, G. L., & Gvozdev, V. A. (2014). Multifunctional nascent polypeptide-associated complex (NAC). *Molecular Biology*, 48(2), 189-196.
- 62) Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., & Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 589–597. doi:10.1038/nsmb.1614
- 63) Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.

- 64) Li, S., Chen, X., Geng, X., Zhan, W., & Sun, J. (2015). Identification and expression analysis of nascent polypeptide-associated complex alpha gene in response to immune challenges in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish & shellfish immunology*, 46(2), 261-267.
- 65) Liu WJ, Yuan S, Zhang NH, Lei T, Duan HG, Liang HG, Lin HH. (2006). Effect of water stress on photosystem 2 in two wheat cultivars. *Biol Plantarum* 50:597–602
- 66) Liu Y., Hu Y., Li X., Niu L., Teng M. (2010). The crystal structure of the human nascent polypeptide associated complex domain reveals a nucleic acid binding region on the NACA subunit. *Biochemistry*. 49 (13), 2890– 2896.
- 67) Liu, W. J., Chen, Y. E., Tian, W. J., Du, J. B., Zhang, Z. W., Xu, F., ... & Lin, H. H. (2009). Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(10), 1238-1245.
- 68) Livore, A., Scheuring, C., & Magill, C. (1989). The rice psb-A chloroplast gene has a standard location. *Current genetics*, 16(5), 447-451.
- 69) Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6-13.
- 70) Ludidi, N. N., Heazlewood, J. L., Seoighe, C., Irving, H. R., & Gehring, C. A. (2002). Expansin-like molecules: novel functions derived from common domains. *Journal of Molecular Evolution*, 54(5), 587-594.
- 71) Ludvigsen, S., & Poulsen, F. M. (1992). Secondary structure in solution of barwin from barley seed using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 31(37), 8771-8782.
- 72) Ma, L., Chen, C., Liu, X., Jiao, Y., Su, N., Li, L., ... & Bao, J. (2005). A microarray analysis of the rice transcriptome and its comparison to *Arabidopsis*. *Genome Research*, 15(9), 1274-1283.
- 73) Mahalingam, R. (2015). *Combined stresses in plants*. Switzerland: Springer International Publishing.
- 74) Maqungo, M. N. (2005). *Physiological and cellular characterization of a plant natriuretic peptide* (Doctoral dissertation, University of the Western Cape).
- 75) Marmol, J. F. (1994). Consideraciones para la selección y manejo de especies tolerantes a la sequía. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 11(2).



- 76) Masojídek, J., Trivedi, S., Halshaw, L., Alexiou, A., Hall, D.O., 1991. The synergistic effect of drought and light stresses in sorghum and pearl millet. *Plant Physiol.* 96 (1), 198–207.
- 77) Mason, H. S., Mullet, J. E., & Boyer, J. S. (1988). Polysomes, messenger RNA, and growth in soybean stems during development and water deficit. *Plant physiology*, 86(3), 725-733.
- 78) Meier, S., Bastian, R., Donaldson, L., Murray, S., Bajic, V., & Gehring, C. (2008). Co-expression and promoter content analyses assign a role in biotic and abiotic stress responses to plant natriuretic peptides. *BMC Plant Biology*, 8(1), 24.
- 79) Meier, S., Irving, H. R., & Gehring, C. (2008). Plant natriuretic peptides—emerging roles in fluid and salt balance. *Cardiac Hormones*. Kerala, India: Transworld Research Network, 1-17.
- 80) Miller, R.M. et al. (2002). Mycorrhizal mediated feedbacks influence net carbon gain and nutrient uptake in *Andropogon gerardii* Vitman. *New Phytol.* 155, 149–162
- 81) Mojica, T., Sánchez, O., & Bobadilla, L. (2003). La Proteómica, otra cara de la genómica. *Nova*, 1(1), 13-16.
- 82) Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B. D., BLÄSING, O., ... & SCHEIBLE, W. R. (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell & Environment*, 30(1), 85-112.
- 83) Moreno F., Liz Patricia, Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana* [en línea] 2009, 27 (agosto-Sin mes): [Fecha de consulta: 14 de octubre de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316234006>> ISSN 0120-9965
- 84) Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179.
- 85) Morgan, J. A. W., Bending, G. D., & White, P. J. (2005). Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1729-1739.
- 86) Morse, M., Pironcheva, G., Gehring, C. (2004). AtPNP-A is a systemically mobile natriuretic peptide immunoanalogue with a role in *Arabidopsis thaliana* cell volume regulation. *FEBS Letters* 556: 99-103.
- 87) Morte, A., Lovisolo, C., & Schubert, A. (2000). Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavaryi*. *Mycorrhiza*, 10(3), 115-119.

- 88) Morton J. B., Benny G. L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37, 471-491.
- 89) Mueller, T. D., & Feigon, J. (2002). Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein–protein interactions. *Journal of molecular biology*, 319(5), 1243-1255.
- 90) Nagy Z, Tuba Z, Zsoldus F, Erdei L. (1995). CO<sub>2</sub> exchange and water retention responses of sorghum and maize during water and salt stress. *J Plant Physiol* 145:539–544
- 91) Nakashima, K., Ito, Y., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant physiology*, 149(1), 88-95.
- 92) Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 97-103.
- 93) Nakashima, Y. Ito, K. Yamaguchi-Shinozaki. (2009). Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses, *Plant Physiol.* 149 88–95.
- 94) Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., & Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(7), 742-749.
- 95) Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559.
- 96) Pabla, S. S., & Pabla, S. S. (2008). Real-time polymerase chain reaction. *Resonance*, 13(4), 369–377. doi:10.1007/s12045-008-0017-x
- 97) Pardossi, A., Vernieri, P., Tognoni, F. (1991). Evaluation of the pressure chamber methods for the assessment of water status in chilled plants. *Plant Cell Environ.* 14, 675–682.
- 98) Paterson, A. H., Bowers, J. E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., ... & Schmutz, J. (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457(7229), 551.
- 99) Pérez-Torres, Eduardo, Paredes C, Mario, Polanco, Víctor, & Becerra B, Viviana. (2009). *Gene Expression Analysis: A Way to Study Tolerance to Abiotic Stresses in Crops*

Species. Chilean journal of agricultural research, 69(2), 260-269. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392009000200016>

100) Peterson, R. L., Massicotte, H. B., & Melville, L. H. (2004). Mycorrhizas: anatomy and cell biology. NRC Research Press.

101) Pinheiro, C., Chaves, M.M., (2011) Photosynthesis and drought: ¿can we make metabolic connections from available data? J. Exp. Bot. 62 (3), 869–882.

102) Pomilio, A. B., Bernatené, E. A., & Vitale, A. A. (2011). Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray. Acta bioquímica clínica latinoamericana, 45(1), 47-79.

103) Ponce-Rojas, J. C., Avendaño-Monsalve, M. C., Yañez-Falcón, A. R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., ... & Funes, S. (2017).  $\alpha\beta'$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. The FEBS journal, 284(5), 814-830.

104) Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez, K.J. Palme y M.A.K. Jansen. (2007). Stress-induced morphogenic responses: ¿growing out of trouble? Trends Plant Sci. 12(3), 99-105.

105) Quélo, I., Gauthier, C., & St-Arnaud, R. E. N. É. (2005). Casein kinase II phosphorylation regulates  $\alpha$ NAC subcellular localization and transcriptional coactivating activity. Gene expression, 12(3), 151-163.

106) Quilambo, O. A. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. African Journal of Biotechnology, 2(12), 539-546.

107) Rajjou, L., Gallardo, K., Job, C., & Job, D. (n.d.). Proteome Analysis for the Study of Developmental Processes in Plants. Plant Proteomics, 151–184. doi: 10.1002/9780470988879.ch7

108) Rakshit, S., & Wang, Y. H. (Eds.). (2016). The Sorghum Genome. Springer International Publishing.

109) Reddy BVS, Ashok Kumar A, Sharma HC, Srinivasa Rao P, Blümmel M, Ravinder Reddy Ch, Sharma R, Deshpande S, DattaMazumdar S and Dinakaran E. (2012). Sorghum improvement (1980–2010): status and way forward. J SAT Agric Res 10. (ejournal. icrisat.org)

110) Reddy BVS, Ramesh S, Reddy PS, Kumar AA. (2009). Genetic enhancement for drought tolerance in sorghum. Plant Breed Rev 31:189–222

111) Reddy BVS, Sharma HC, Thakur RP, Ramesh S, Rattunde F, Mgonja M. (2006). Sorghum hybrid parents research at ICRISAT—strategies, status and Impacts. J SAT Agric Res 2(1). (ejournal.icrisat.org)

- 112) Reinartz, J., Bruyns, E., Lin, J. Z., Burcham, T., Brenner, S., Bowen, B., ... & Woychik, R. (2002). Massively parallel signature sequencing (MPSS) as a tool for in-depth quantitative gene expression profiling in all organisms. *Briefings in Functional Genomics*, 1(1), 95-104.
- 113) Rensink, W. A., Iobst, S., Hart, A., Stegalkina, S., Liu, J., & Buell, C. R. (2005). Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress. *Functional & Integrative Genomics*, 5(4), 201-207.
- 114) Rintamäki, E., Salo, R., Lehtonen, E., & Aro, E. M. (1995). Regulation of D1-protein degradation during photoinhibition of photosystem II in vivo: phosphorylation of the D1 protein in various plant groups. *Planta*, 195(3), 379-386.
- 115) Rizhsky, L., Liang, H., & Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant physiology*, 130(3), 1143-1151.
- 116) Rosenow, D. T., Quisenberry, J. E., Wendt, C. W., & Clark, L. E. (1983). Drought tolerant sorghum and cotton germplasm. In *Developments in agricultural and managed forest ecology* (Vol. 12, pp. 207-222). Elsevier.
- 117) Rospert, S., Dubaquié, Y., & Gautschi, M. (2002). Nascent-polypeptide-associated complex. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(10), 1632-1639.
- 118) Ross KE, Huang H, Ren J, Arighi CN, Li G, Tudor CO, Lv M, Lee JY, Chen SC, Vijay-Shanker K, Wu CH iPTMnet: Integrative Bioinformatics for Studying PTM Networks. *Methods Mol Biol*. 2017; 1558:333-353. doi: 10.1007/978-1-4939-6783-4\_16. [28150246](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4_16)
- 119) Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. *New perspectives for molecular studies. Mycorrhiza*, 13(6), 309-317.
- 120) Ruzvidzo, O., Donaldson, L., Valentine, A., & Gehring, C. (2011). The *Arabidopsis thaliana* natriuretic peptide AtPNP-A is a systemic regulator of leaf dark respiration and signals via the phloem. *Journal of Plant Physiology*, 168(14), 1710-1714. doi: 10.1016/j.jplph.2011.03.011
- 121) SAGARPA, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).
- 122) Saibo, N. J., Lourenço, T., & Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of botany*, 103(4), 609-623.
- 123) Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 124) Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*, 6(12), 242.

- 125) Santini, C., Tidu, V., Tognon, G., GHIRETTI MAGALDI, A., & Bassi, R. (1994). Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization in vivo. *European journal of biochemistry*, 221(1), 307-315.
- 126) Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D. and Lohmann, J.U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37, 501-6.
- 127) Schwarzott, D., Walker, C. & Schuber, A. (2001). *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190–197.
- 128) Sekar, N., & Ramasamy, R. P. (2015). Photosynthetic Energy Conversion: Recent Advances and Future Perspective. *The Electrochemical Society Interface*, 24(3), 67-73.
- 129) Shu, Y., & Hong-Hui, L. (2004). Transcription, translation, degradation, and circadian clock. *Biochemical and biophysical research communications*, 321(1), 1-6.
- 130) Simpson, D., & Daft, M. J. (1990). Interactions between water-stress and different mycorrhizal inocula on plant growth and mycorrhizal development in maize and sorghum. *Plant and Soil*, 121(2), 179-186.
- 131) Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- 132) Song, F., Qi, D., Liu, X., Kong, X., Gao, Y., Zhou, Z., & Wu, Q. (2015). Proteomic analysis of symbiotic proteins of *Glomus mosseae* and *Amorpha fruticosa*. *Scientific Reports*, 5, 18031. <http://doi.org/10.1038/srep18031>
- 133) Spreter, T., Pech, M., & Beatrix, B. (2005). The Crystal Structure of Archaeal Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC) Reveals a Unique Fold and the Presence of a Ubiquitin-associated Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15849–15854. doi:10.1074/jbc.m500160200
- 134) Sudhakar Reddy, P., Srinivas Reddy, D., Sivasakthi, K., Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K. (2016). Evaluation of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.)] reference genes in various tissues and under abiotic stress conditions for quantitative real-time PCR data normalization. *Frontiers in plant science*, 7, 529.
- 135) Svensson, B., Svendsen, I. B., Hoejrup, P., Roepstorff, P., Ludvigsen, S., & Poulsen, F. M. (1992). Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. *Biochemistry*, 31(37), 8767-8770.

- 136) Swami, A. K., Alam, S. I., Sengupta, N., & Sarin, R. (2011). Differential proteomic analysis of salt stress response in Sorghum bicolor leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2), 321-328.
- 137) Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan; 45: D362-68. [PubMed](#)
- 138) Tabata, S. (2002). Impact of genomics approaches on plant genetics and physiology. *Journal of plant research*, 115(4), 271-275.
- 139) Toop, T., & Donald, J. A. (2004). Comparative aspects of natriuretic peptide physiology in non-mammalian vertebrates: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, 174(3), 189-204.
- 140) Turek, I., & Gehring, C. (2016). The plant natriuretic peptide receptor is a guanylyl cyclase and enables cGMP-dependent signaling. *Plant molecular biology*, 91(3), 275-286.
- 141) USDA. Foreign Agricultural Service – 2106 GAIN Report. Mexico, Grain and Feed Update.
- 142) Valdés Rodríguez, S., Arias Padró, M. and Alonso Ojeda, B. (2018). Proteómica. In: A. Rodríguez Sahagún, G. Acevedo Hernández and O. Castellanos Hernández, ed., *Fundamentos de Biotecnología Vegetal*, 1st ed. Jalisco, pp.296-321.
- 143) Valle Rodríguez, C. (2016). *Aislamiento y estudio de la evaluación biológica de péptidos natriuréticos provenientes de plantas* (Doctorado). Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- 144) Valle-Rodríguez, C. M., Valdés-Rodríguez, S., vasco-Méndez, N. L., Garcidueñas-Piña, C., Soria-Guerra, R. E., & Morales-Domínguez, J. F. (2017). Evidencias bioquímicas y moleculares de la presencia de un péptido natriurético de plantas en ajo (*Allium sativum* L.). *Phyton* 2017: 143-150.
- 145) Valli, N., Gobinet, A., & Bordenave, L. (1999). Review of 10 years of the clinical use of brain natriuretic peptide in cardiology. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 134(5), 437-444.
- 146) Vallin Plous, C. (2007). Microarreglos de ADN y sus aplicaciones en investigaciones biomédicas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 38 (2), 132-135
- 147) Van De Mortel, J. E., & Aarts, M. G. (2006). Comparative transcriptomics—model species leads the way. *New Phytologist*, 170(2), 199-201.

- 148) Vrba, J. M., & Curtis, S. E. (1990). Characterization of a four-member psbA gene family from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Plant molecular biology*, 14(1), 81-92.
- 149) Wang, B., Guo, X., Wang, C. et al. *Plant Mol Biol* (2015) 87: 395. doi:10.1007/s11103-015-0286-1
- 150) Wang, L., Zhang, W., Wang, L., Zhang, X. C., Li, X., & Rao, Z. (2010). Crystal structures of NAC domains of human nascent polypeptide-associated complex (NAC) and its  $\alpha$ NAC subunit. *Protein & cell*, 1(4), 406-416
- 151) Wang, Y. H., Donaldson, L., Gehring, C., & Irving, H. R. (2011). Plant natriuretic peptides: control of synthesis and systemic effects. *Plant signaling & behavior*, 6(10), 1606-1608.
- 152) Wang, Y. H., Gehring, C., & Irving, H. R. (2011). Plant Natriuretic Peptides are Apoplastic and Paracrine Stress Response Molecules. *Plant and Cell Physiology*, 52(5), 837–850. doi:10.1093/pcp/pcr036
- 153) Wang, Y. H., Gehring, C., Cahill, D. M., & Irving, H. R. (2007). Plant natriuretic peptide active site determination and effects on cGMP and cell volume regulation. *Functional Plant Biology*, 34(7), 645-653.
- 154) Wang, Y., Zeng, L., & Xing, D. (2015). ROS-mediated enhanced transcription of CYP38 promotes the plant tolerance to high light stress by suppressing GTPase activation of PsbO2. *Frontiers in plant science*, 6, 777.
- 155) Weiberg, A., & Karlovsky, P. (2009). Components of variance in transcriptomics based on electrophoretic separation of cDNA fragments (cDNA-AFLP). *Electrophoresis*, 30(14), 2549–2557. <http://doi.org/10.1002/elps.200800756>
- 156) Weise, C. and Lenz, C. (2018). Identification of Protein Phosphorylation Sites by Advanced LC-ESI-MS/MS Methods. In: K. Christoph, ed., *Post-translational Modifications of Proteins*, 2nd ed. [online] Berlin: Series Editor, pp.33-35. Available at: <https://link-springer-com.dibpxy.uaa.mx/content/pdf/10.1007%2F978-1-60327-084-7.pdf> [Accessed 16 May 2018].
- 157) Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A., & Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 370(6489), 434.
- 158) Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (Eds.). (2013). *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer Science & Business Media.

- 159) Wiltens, J., Schreiber, U., & Vidaver, W. (1978). Chlorophyll fluorescence induction: an indicator of photosynthetic activity in marine algae undergoing desiccation. *Canadian Journal of Botany*, 56(21), 2787-2794.
- 160) Xu, G., Li, C., & Yao, Y. (2009). Proteomics analysis of drought stress-responsive proteins in *Hippophae rhamnoides* L. *Plant molecular biology reporter*, 27(2), 153-161.
- 161) Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10 (2), 88–94.
- 162) Yamamoto, Y. (2001). Quality control of photosystem II. *Plant and Cell Physiology*, 42(2), 121-128.
- 163) Yan S, Tang Z, Su W, and Sun W (2005) Proteomic analysis of salt stress responsive proteins in rice root. *Proteomics* 5, 235–44.
- 164) Yang KS, Kim HS, Jin UH, Lee SS, Park JA, Lim YP, and Pai HS (2005) Silencing of NbBTF3 results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants. *Planta* 225, 1459–69
- 165) Yao Q, Ge H, Wu S, Zhang N, Chen W, Xu C, Gao J, Thelen JJ, Xu D. (2013) P3DB 3.0: From plant phosphorylation sites to protein networks. *Nucleic Acids Res* 2013. 42(Database issue): D1206-D1213. [PubMed](#)
- 166) Yoo, K. Y., Park, D. S., & Tae, G. S. (2004). Molecular cloning and characterization of the psb L and psb J genes for photosystem II from *Panax ginseng*. *Journal of Plant Biology*, 47(3), 203-209.
- 167) Yordanov, I., Velikova, V. & Tsonev, T. *Photosynthetica* (2000) 38: 171. doi:10.1023/A:1007201411474
- 168) Yuan, S., Liu, W. J., Zhang, N. H., Wang, M. B., Liang, H. G., & Lin, H. (2005). Effects of water stress on major photosystem II gene expression and protein metabolism in barley leaves. *Physiologia Plantarum*, 125(4), 464-473.
- 169) Zarik, L., Meddich, A., Hijri, M., Hafidi, M., Ouhammou, A., Ouahmane, L., ... & Boumezzough, A. (2016). Use of arbuscular mycorrhizal fungi to improve the drought tolerance of *Cupressus atlantica* G. *Comptes rendus biologiques*, 339(5), 185-196.
- 170) Zhang Y, Yang X, Liu Q, Qiu D, Zhang Y, Zeng H, Yuan J, and Mao J (2010) Purification of novel protein elicitor from *Votrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants. *Microbiol Res* 165, 142–51.



171) Zhang, G. Y., Zhang, L. P., Wei, M. F., Liu, Z., Fan, Q. L., Shen, Q. R., & Xu, G. H. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi, organic fertilizer and soil sterilization on maize growth. *Acta Ecologica Sinica*, 31(4), 192-196.

172) Zhu, Y.-G., Miller, R.M., (2003). Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends Plant Sci.* 8, 407–409. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385\(03\)00184-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385(03)00184-5).



**Anexos**

**Anexo 1: Buffer de lisis para la extracción de ADN (Lodhi *et al.*, 1994)**

Componente del Buffer	Concentración
Tris HCl	0.1 M
NaCl	1.4 M
EDTA	0.02 M
CTAB	2%
β-mercaptoetanol	0.3%

**Anexo 2: Secuencias en aminoácidos de los genes αNAC y PSBA**

- **Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1 (αNAC)**

```
>XP_002467858.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_01g035320
[Sorghum bicolor]
MTAQTAEEELATQIEQQKLEEQKTEAEVVEDEEDDDDDDDKDDDELGDQEEEDASGKSKQS
RSEKKSRKAMLKLGMPITGVSRVTVKSKNILFVISKPDVFKSPNSDTYVIFGEAKIEDLSSQ
LQSQAAEQFKAPDLSQMISSPETSGPQEDNEEEVDETGVEAKDIELVMTQATVSRSKAVKALK
ASNGDIVTAIMDLTN
```

Amarillo: sitio de unión al ADN

Verde: dominio UBA (nucleótido 161-207)

Morado: dominio NAC (nucleótido 69-122)

- **Probable membrane-associated 30 kDa protein, chloroplastic-like (PSBA).**

```
>XP_002456776.1 hypothetical protein SORBIDRAFT_03g042550
[Sorghum bicolor]
MEIRAQPTSLRLAPPPASASFRRTPLRTSFLKGNVSLKVVQVRQSNVNRFKCNSIRSNLFERLT
RVVRSYANSVLSFFEDPEKILEQAVLEMNDLTKMRQATAQVLASQKRENKYKAAEQASADWY
RRAQLALQKGDEDLAREALKRRSYADNASSLRSQLDQQKGVVENLISNTKVLESKIAEAKQKK
DTLKARAQSAKTATKVSEMLGNVNTSSALSAFEKMEEKVMAMESQAEALGQLATDDLEGFFALL
ETSSVDDDLSQLKELSGSSLKGELPPGRAAVSNSGAGRPFPDLEIESELNELRRKAKEY
```

Amarillo: dominio PspA (nucleótido 58-275)

### **Anexo 3: Purificación de ADN con el kit Wizard de PROMEGA**

Los fragmentos amplificados se purificaron a partir de un gel de Agarosa 2% (SIGMA), en donde se obtuvieron las bandas de interés y se pusieron en tubos eppendorf de 1.5 mL. A cada tubo se añadió 10 µL de la solución Membrane binding por cada 10 mg del peso del gel. Se agitó en Vortex y se incubó a 65 °C hasta que el gel se disuelva en la solución. El gel disuelto se transfirió a una minicolumna colocada en un tubo de colecta y se incubó a temperatura ambiente por un minuto, posteriormente se centrifugó a 16,000 g por un minuto para descartar el sobrenadante y reinsertar la columna en el tubo de colecta. Se añadió 700 µL de la solución membrane wash y se centrifugó a 16,000 g por 1 min, se descartó el sobrenadante y se reinsertó la microcolumna en el tubo de colecta. Se realizó un segundo lavado añadiendo 500 µL de la solución membrane wash y se centrifugó a 16,000 g por 5 min. Posteriormente para eliminar los residuos de etanol se centrifugó por 1 minuto a 16,000 g y se dejó la columna a temperatura ambiente por 20 minutos. La microcolumna se pasó a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y se le añadió 30 µL de agua libre de nucleasas y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Para finalizar se centrifugó a 16,000 g por 1 min, se desechó la microcolumna y se almacenó el sobrenadante con el ADN purificado a 4 °C.

### **Anexo 4: Características de los oligonucleótidos diseñados, las características son de acuerdo con el programa DNASTar**

- Características de los oligonucleótidos FαNAC y RαNAC

**FαNAC:** F 5´-AGGAGCTCGCCACCCAGAT-3´

**RαNAC:** R 5´-AGTTTCGTCGACCTCCTCATT-3

F-63.1% GC, R-47.6% GC, dTm de 2.4° C, Temperatura de alineamiento de 58.3 °C, la longitud del fragmento es de 479 pb en ARNm.

- Características de los oligonucleótidos FPSBA y RPSBA

**FqpsbA:** F 5´- CAAAAGGGTGACGAGGAT T-3´

**RqpsbA:** R 5´- GCACGAGCTTTTAGGGTAT -3´

F-47.3% GC, R-47.3% GC, dTm de 0.4 °C, Temperatura de alineamiento de 52 °C, la longitud del fragmento es de 191 pb en ARNm.

- Características de los oligonucleótidos FPNP y RPNP (previamente diseñados)

**FPNP:** 5'- GTCGGAGGTACAGGGTTCG-3'

**RPNP:** 5'-CATATCCTGCAGAAGAAAAGAA-3'

#### **Anexo 5: Medio Lb**

0.5% de extracto de levadura, 1% de peptona de caseína, 0.5% de NaCl y se requiere agar bacteriológico se añade un 1.3%.

#### **Anexo 6: Soluciones Birnboim**

- A) Birnboim I:** Tris HCl pH 8 a 25 mM, EDTA pH 8 a 10 Mm, glucosa al 50 mM, la solución se esteriliza y almacena a 4 °C
- B) Birnboim II:** NaOH 0.2 N, SDS 1%. Preparar esta solución al momento de utilizarse.
- C) Birnboim III:** 60 mL de acetato de potasio al 5 M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua destilada.

#### **Anexo 7: Protocolo de extracción de ARN (PureZol) de Biorad**

Se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido vegetal a los cuales se les añadió 1 ml de PureZol por cada 50-100 mg de tejido vegetal e inmediatamente se homogenizó por 30-60 s. El lisado se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se añadió 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de PureZol usado en el primer paso, se cubrió el tejido y se agitó por 15 s, se incubó por 5 min a temperatura ambiente, mezclándose periódicamente, se centrifugó a 12,000 x g por 5 min a 4° C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo libre de RNAsa. Se añadió 0.5 mL de etanol absoluto por cada mililitro de PureZOL añadido en el paso uno. Se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C. El ARN apareció como una pastilla blanca en el fondo del tubo, por lo que se descartó el sobrenadante., se realizó un lavado de la pastilla con 1 mL de etanol al 75% por cada mililitro de PureZOL añadido en el paso 1, las muestras se agitaron en vortex y se centrifugaron a 7500 x g por 5 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó cuidadosamente. La pastilla de ARN se secó aproximadamente 20 min para posteriormente resuspenderla en 40 µL de agua tratada con DEPC.

## Anexo 8: Protocolo de síntesis de cADN del kit Scientific First Strand Synthesis Kit (Thermo scientific)

A un tubo libre de RNAsa se le añade lo siguiente:

10 x dsDNase Buffer	1 $\mu$ L
DsDNase	1 $\mu$ L
RNA templado	1pg-5 $\mu$ g de ARN total
Agua libre de nucleasas	A 10 $\mu$ L
Volumen total	10 $\mu$ L

La reacción se mezcló y se centrifugó, posteriormente se incubó por 2 min a 37 °C, se enfrió en hielo, se centrifugó y se mantuvo en hielo. Al mismo tubo se añadió los siguientes componentes:

5x Reaction mix	4 $\mu$ L
Maxima Enzyme mix	2 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	4 M $\mu$ L

La reacción se mezcló vigorosamente y se centrifugo, posteriormente se incubó a 25 °C por 10 min y después a 50° C por 10 min. Para terminar la reacción se calentó a 85 °C por 5 min. El producto final de la síntesis del ADNc se utilizó para la qRT-PCR y se almacenó a -20 °C.

## Anexo 9: Características de los oligonucleótidos diseñados para PCR en tiempo real, las características son de acuerdo con el programa DNASTar

- Características de los oligonucleótidos F $\alpha$ NAC y R $\alpha$ NAC

**F $\alpha$ NAC:** F 5' - TCCCACAACCTCCGAGACACCAA--3'

**R $\alpha$ NAC:** R 5' - TCCATCGAGTTCATCCATCATCCTT -3

F-54.5% GC, R-44% GC, dTm de 2.6 °C, Temperatura de alineamiento de 57.8 °C, la longitud del fragmento es de 179 pb en ARNm.

- Características de los oligonucleótidos *FPSBA* y *RPSBA*

**FqPSBA:** F 5´- CAAAAGGGTGACGAGGATT-3´

**RqPSBA:** R 5´- GCACGAGCTTTTAGGGTAT -3´

F-47.3% GC, R-47.3% GC, dTm de 0.4 °C, Temperatura de alineamiento de 52 °C, la longitud del fragmento es de 191 pb en ARNm.

**Anexo 10: Resultados RT-qPCR del gen *PSBA* en *Sorghum bicolor* asociado a hongos micorrízicos en presencia y ausencia de estrés hídrico**

Tratamiento	Expresión normalizada	Promedio	Desviación estándar
Control	1	1	0
	1		
	1		
<i>Sorghum bicolor</i> estresado hídricamente	0.167805407	0.21055609	0.09595398
	0.143407705		
	0.320455169		
<i>Sorghum bicolor</i> no estresado asociado al hongo micorrízico <i>Glomus clarum</i>	0.541435396	0.74672582	0.20285773
	0.947060029		
	0.751682043		
<i>Sorghum bicolor</i> estresado asociado al hongo micorrízico <i>Glomus clarum</i>	0.574957721	0.41187388	0.14489701
	0.362703133		
	0.2979608		
<i>Sorghum bicolor</i> no estresado asociado al consorcio selva	0.771031182	0.59186975	0.25337252
	0.412708325		
<i>Sorghum bicolor</i> estresado asociado al consorcio selva	0.330990361	0.43769001	0.15107155
	0.610555541		
	0.371524119		

**Anexo 11: Resultados RT-qPCR del gen  $\alpha$ NAC en *Sorghum bicolor* asociado a hongos micorrízicos en presencia y ausencia de estrés hídrico**

Tratamiento	Expresión normalizada	Promedio	Desviación estándar
Control	1	1	0
	1		
	1		
<i>Sorghum bicolor</i> estresado hídricamente	0.586586863	0.50651373	0.113240516
	0.426440589		
<i>Sorghum bicolor</i> no estresado asociado al hongo micorrízico <i>Glomus clarum</i>	2.261191742	1.69069	0.806806475
	1.120195082		
<i>Sorghum bicolor</i> estresado asociado al hongo micorrízico <i>Glomus clarum</i>	1.067140401	1.14557	0.11120436
	1.224407115		
<i>Sorghum bicolor</i> no estresado asociado al consorcio selva	3.197808029	2.60848	0.833435196
	2.019152672		
<i>Sorghum bicolor</i> estresado asociado al consorcio selva	0.501301342	0.613469	1.109692651
	0.61860197		
	0.720506491		

## Anexo 12: Análisis de varianza y Prueba de Tukey entre los tratamientos en el gen $\alpha$ NAC

### ANOVA de un solo factor: Control, T 1, T 2, T 3, T 4, T 5

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	Control, T 1, T 2, T 3, T 4, T 5

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	6.569	1.3137	7.54	0.007
Error	8	1.395	0.1744		
Total	13	7.964			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.417553	82.49%	71.54%	30.47%

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	1.000	0.000	(0.444, 1.556)
T 1	2	0.5065	0.1132	(-0.1743, 1.1874)
T 2	2	1.691	0.807	(1.010, 2.372)
T 3	2	1.1458	0.1112	(0.4649, 1.8266)
T 4	2	2.608	0.833	(1.928, 3.289)
T 5	3	0.6135	0.1097	(0.0576, 1.1694)

Desv.Est. agrupada = 0.417553

#### Comparaciones en parejas de Tukey

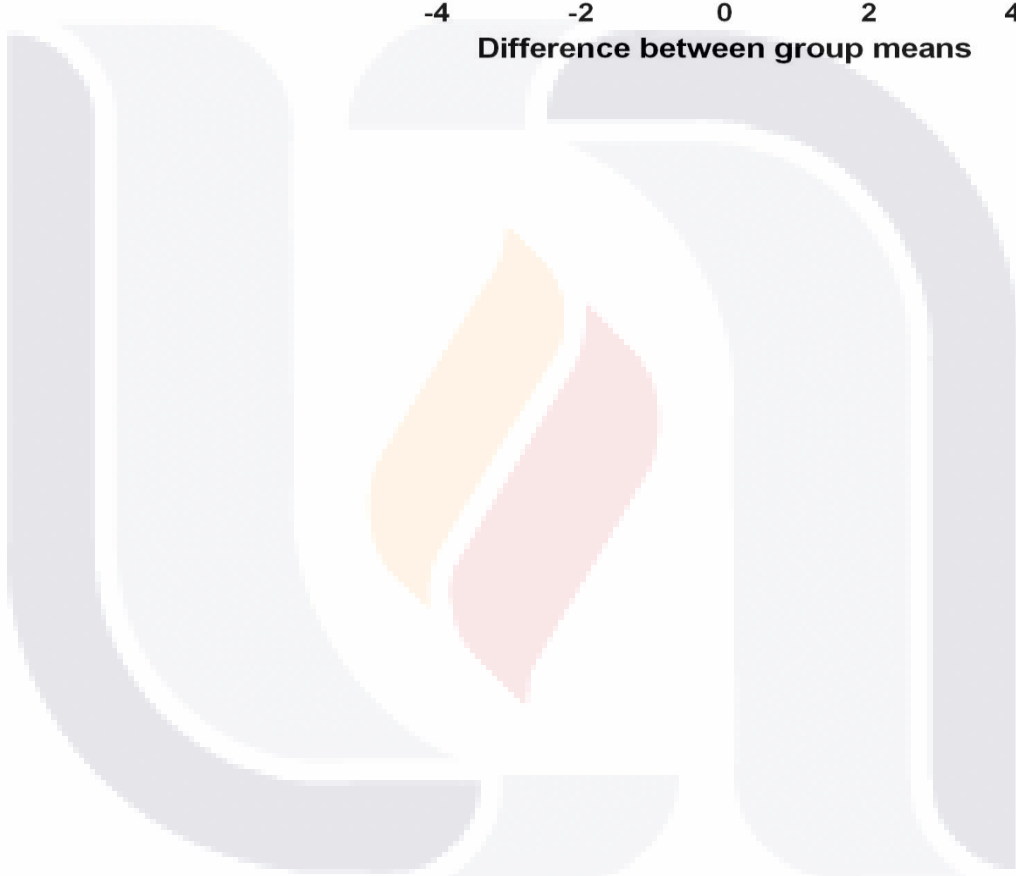
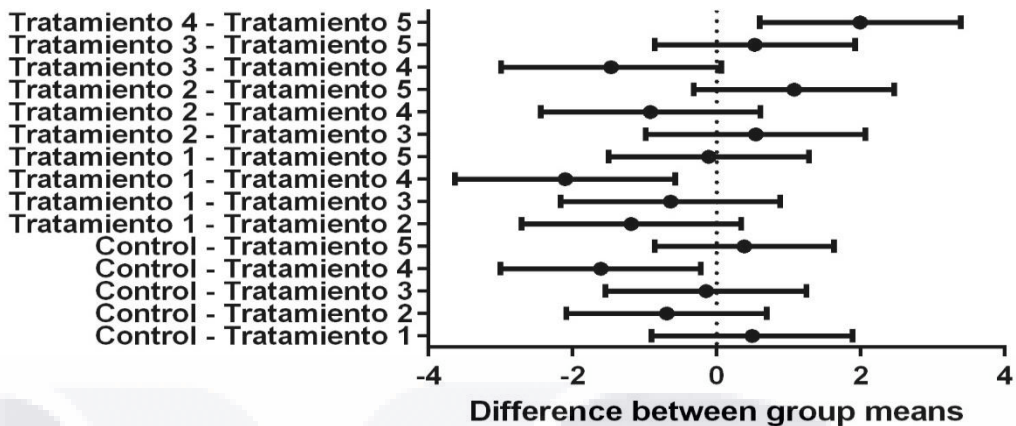
##### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
T 4	2	2.608	A
T 2	2	1.691	A B
T 3	2	1.1458	A B
Control	3	1.000	B
T 5	3	0.6135	B
T 1	2	0.5065	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



95% Confidence Intervals (Tukey)



## Anexo 13: Análisis de varianza y Prueba de Tukey entre los tratamientos en el gen *PSBA*

### ANOVA de un solo factor: Control, T 1, T 2, T 3, T 4, T 5

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	Control, T 1, T 2, T 3, T 4, T 5

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	1.1640	0.23281	10.14	0.001
Error	11	0.2526	0.02296		
Total	16	1.4166			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.151523	82.17%	74.07%	51.96%

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	1.000	0.000	(0.807, 1.193)
T 1	3	0.2106	0.0960	(0.0180, 0.4031)
T 2	3	0.747	0.203	(0.554, 0.939)
T 3	3	0.4119	0.1449	(0.2193, 0.6044)
T 4	2	0.592	0.253	(0.356, 0.828)
T 5	3	0.4377	0.1511	(0.2451, 0.6302)

*Desv.Est. agrupada = 0.151523*

#### Comparaciones en parejas de Tukey

##### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Control	3	1.000	A
T 2	3	0.747	A B
T 4	2	0.592	A B C
T 5	3	0.4377	B C
T 3	3	0.4119	B C
T 1	3	0.2106	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

#### ICs simultáneos de 95% de Tukey

#### Gráfica de intervalos de Control, T 1, ...

### 95% Confidence Intervals (Tukey)

