



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
PROMOTORES DE LOS GENES DREB2 Y RAP2.4A
DE *Carica papaya* L. VAR. MARADOL ROJA EN
RESPUESTA A ESTRÉS ABIÓTICO**

Tesis que presenta

Sandi Julissa Reyes Hernández

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México, enero 2017

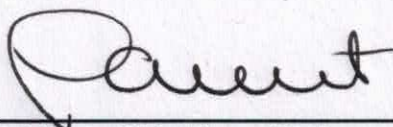
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Sandi Julissa Reyes Hernández**, titulado **“Caracterización molecular de promotores de los genes DREB2 y RAP2.4A de *Carica papaya* L. Var. Maradol roja en respuesta a estrés abiótico”**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología y Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología y Morfogénesis y Regulación Genética, bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y el Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de enero de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Sandi Julissa Reyes Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Estudio del transcriptoma y proteoma de papaya (*Carica papaya* L.) en respuesta a estrés hídrico: identificación de genes con potencial para mejorar su eficiencia en el uso de agua” bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata y con apoyo de CONACYT, fondo de ciencia básica CONACYT-CB-2013-01.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo académico, por su tiempo y paciencia brindados. Le agradezco la dirección otorgada para poder llevar a cabo este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca concedida número 394524 y por el financiamiento del proyecto de ciencia básica: “Estudio del transcriptoma y proteoma de papaya (*Carica papaya* L.) en respuesta a estrés hídrico: identificación de genes con potencial para mejorar su eficiencia en el uso de agua” (con clave 221208).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y personal, por ser parte de mi formación y por las facilidades prestadas.

De manera particular al M. en C. Jesús Alejandro Zamora Briseño, por sus consejos y enseñanzas. Por el apoyo incondicional prestado para la realización de este proyecto.

Gracias al comité tutorial, conformado por: el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, el Dr. Enrique Castaño de la Serna, el Dr. Gabriel Lizama Uc y el Dr. Stefan de Folter, por las críticas y recomendaciones dadas.

Gracias al comité revisor integrado por el Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, El Dr. Enrique Castaño de la Serna, el Dr. Gabriel Lizama Uc, el Dr. Manuel Martínez Estévez y el Dr. Jorge Tonatiuh Ayala Sumuano, por su valioso tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A los técnicos Q.F.B Miguel Keb Llanes e Ing. Wilma González Kantún por su apoyo en el laboratorio y materiales proporcionados.

Al M. en C. Samuel Gamboa Tuz, por su amistad y por compartir sus experiencias de laboratorio.

Especialmente a mis queridos amigos: el Biol. Aaron Xavier G.Cantón Bastarrachea, el IBT. Edyciel Jordán Alvarado Robledo, QFB. Ricardo Ortiz Luévano, el Dr. Víctor Gonzalez Mendoza y la Dra. Maria Eugenia Sánchez por sus gentileza y amistad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio el Dr. Alejandro Pereira Santana, el M. en C. Christian Alcocer Jáuriga, el M. en C. Jorge Espadas Alcocer, la IBQ. Karina Maricela Sosa Martínez, la Biol. Gabriela Flores Vargas, la IBQ. Evelyn Carrillo Bermejo, la IBQ. Carolina Abigail Sulu Uc, la IBQ. Merly Itzab Pech por hacer más agradable mi estadía.

DEDICATORIAS

Al niño más encantador que he conocido, a la razón que me hace pensar que todo es posible, al pequeño que hace más amena mi vida y que pinta de colores nuestra realidad, al pequeño que con su inocencia y carisma alegra mis motivos...a mi pequeño Alejandro Josué.

A ti Alejandro, por compartir conmigo esta antología colmada de bellezas y suplicios como es la vida, por tu paciencia y espera, por tu tiempo, por tu apoyo incansable...por tu sonrisa...

A ti Chelito, por tu apoyo incondicional, sin esperar nunca nada a cambio...por tu disponibilidad, por la serenidad en tu mirar.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1. Antecedentes. Dinámica de la expresión génica.....	3
1.1 Transcripción en eucariotas.....	3
1.1.1 Factores de transcripción.....	5
1.1.2 El papel de los promotores en el control de la expresión génica.....	5
1.1.3 Organización del promotor.....	6
1.1.3.1 Promotor basal o <i>core promoter</i>	7
1.1.3.2 Promotor proximal.....	7
1.1.3.3 Promotor distal.....	7
1.1.4 Promotores en plantas.....	8
1.1.5 Estrés en las plantas.....	10
1.1.6 Percepción y transducción de señales.....	10
1.1.7 El ácido abscísico en la señalización.....	11
1.1.7.1 Expresión de genes durante el estrés vía dependiente de ABA.....	13
1.1.7.2 Expresión de genes durante el estrés vía independiente de ABA.....	14
1.1.8 Rol de los factores de transcripción.....	15
1.1.8.1 Secuencias específicas de los FTs.....	15
1.1.8.2 Dominios de unión a DNA.....	17
1.1.9 Factores de transcripción en plantas.....	17
1.1.9.1 Clasificación de los FTs.....	17
1.1.9.1.1 bZIP FTs.....	18
1.1.9.1.2 NAC FTs.....	18
1.1.9.1.3 WRKY FTs.....	19
1.1.9.1.4 Dedos de zinc FTs.....	19
1.1.9.1.5 MYB FTs.....	19
1.1.9.1.6 bHLH FTs.....	20
1.1.9.1.7 AP2/ERF FTs.....	20
1.1.10 Superfamilia AP2/ERF.....	20
1.1.10.1 Subfamilia DREB.....	21

1.1.10.2 Subfamilia AP2: RAP.....	22
1.1.11 Cisgénicos como herramienta para el mejoramiento vegetal.....	24
1. 2 Justificación.....	25
1.3 Objetivos.....	25
1.3.1 Objetivo general.....	25
1.3.2 Objetivos específicos.....	25
1. 4 Estrategia experimental.....	26

CAPÍTULO II. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PROMOTORES PUTATIVOS DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DREB2 Y RAP2.4A DE *Carica papaya* var. Maradol

2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y métodos.....	28
2.2.1 Localización de elementos <i>cis</i> -regulatorios de los promotores putativos de los genes DREB2 y RAP2.4A.....	28
2.2.2 Análisis filogenético de DREB2 y RAP2.4A y su relación con los elementos regulatorios de sus secuencias promotoras.....	31
2.3 Resultados.....	32
2.4 Discusión.....	52
2.5 Conclusión.....	59

CAPÍTULO III. AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE LAS REGIONES PROMOTORAS PUTATIVAS DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DREB2 Y RAP2.4A DE *Carica papaya* var. Maradol

3.1. Introducción.....	61
3.2 Materiales y métodos.....	62
3.2.1 Aislamiento de DNA genómico.....	63
3.2.2 Amplificación de los promotores DREB2 y RAP2.4A.....	63
3.2.3 Clonación de los promotores putativos en el vector pGEM®-T Easy.....	64
3.2.4 Eliminación del promotor 35S del vector pH7RWG2.....	65
3.2.5 Clonación de los promotores putativos en el vector pDONR 221.....	68

3.2.6 Recombinación de los promotores putativos en el vector binario pH7RWG2-35S.....	69
3.2.7 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con las construcciones en el vector binario.....	69
3.2.8. Deleciones en el extremo 5' de las regiones de los promotores de DREB2 y RAP2.4A.....	70
3.2.9. Secuenciación y análisis de los fragmentos clonados.....	70
3.3 Resultados.....	72
3.3.1 Aislamiento de gDNA de <i>Carica papaya</i> y clonación de promotores.....	72
3.4 Discusión.....	74
3.5 Conclusión.....	76

CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS PROMOTORES PUTATIVOS DE DREB2 Y RAP2.4

4.1 Introducción.....	77
4.2 Materiales y métodos.....	80
4.2.2 Evaluación de la expresión de la proteína roja fluorescente.....	80
4.2.2.1 Acondicionamiento hidropónico de <i>Lactuca sativa</i>	80
4.2.2.2 Preparación de cultivos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa EHA105.....	80
4.2.2.3 Infiltración de hojas de <i>Lactuca sativa</i>	81
4.2.2.4 Tratamientos empleados para evaluar la expresión transitoria de DREB2 y RAP2.4A.....	81
4.3 Resultados.....	82
4.4 Discusión.....	84
4.5 Conclusión.....	89

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones.....	91
5.2 Perspectivas.....	92

BIBLIOGRAFÍA.....	93
--------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1.1. Esquema que muestra la maquinaria transcripcional basal. El complejo proteínico formado por los factores generales de transcripción interacciona con la región promotora. Sin embargo, durante este proceso no hay cambios en la dinámica de la transcripción, es decir, esta no aumenta ni disminuye. Tomado de Tiessen <i>et al.</i> , 2009.....	4
Figura 1.2. Modelo representativo de la regulación transcripcional. Adaptado de Dey <i>et al.</i> , 2015.....	6
Figura 1.3. Esquema general sobre las redes de regulación transcripcional de los factores de transcripción implicados en la respuesta a estrés. Tomado y modificado de Lata <i>et al.</i> , 2011.....	16
Figura 1.4. Regulación transcripcional de DREB2A. Tomado de Mizoi <i>et al.</i> , 2012.....	23
Figura 1.5. La estrategia experimental está comprendida por tres etapas de desarrollo.....	26

CAPÍTULO II

Figura 2. 1. Esquema representativo de la estrategia bioinformática para inferir CREs en los promotores de DREB2 y RAP2.4A. En la estrategia se incluyó tanto un método de inferencia a priori (MEME) como a posteriori (NewPLACE).....	29
Figura 2.2. Ubicación de sitios de unión de factores de transcripción en los promotores DREB2 y Rap2.4A de <i>Carica papaya</i> . Cada color representa un motivo diferente. El	

análisis fue hecho con las herramientas de MEME, TOMTOM, PLACE y PLANTCARE.....34

Figura 2.3. Motivos sobre-representados en las regiones promotoras de Dreb2 y Rap2.4A de *C. papaya*.....35

Figura 2.4. Inferencia filogenética de DREB2 de *Carica papaya* y de las secuencias proteicas ortólogas de dicotiledóneas y monocotiledóneas. La construcción se ajustó de acuerdo al método de Maximum Likelihood con el modelo Jones-Taylor-Thornton y una prueba de 1000 Bootstrap.....36

Figura 2.5. Reconstrucción del árbol filogenético para RAP2.4A de *Carica papaya* con sus respectivos ortólogos, en él se aprecia la separación diferencial de los taxones Se empleó el método de Neighbor Joining con el modelo de Sustitución y 1000 bootstrap.....37

2.6. Elementos reguladores encontrados en las regiones promotoras de los ortólogos de DREB2 de *Carica papaya*.....38

2.7. Elementos reguladores distribuidos en las regiones promotoras de los ortólogos de RAP2.4A de *Carica papaya*.....39

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Esquema representativo de la estrategia para la elaboración de las construcciones que se emplearán a lo largo de este trabajo.....62

Figura 3.2. Esquema del vector pH7RWG2 en el que se muestra la disposición del casete Gateway entre el 35S y la RFP66

Figura 3.3. Esquema representativo de los experimentos de delecciones 5' de las regiones promotoras de los genes DREB2 y RAP 2.4A, para ser probados en análisis funcionales.....71

Figura 3.4. Análisis de integridad del gDNA de <i>Carica papaya</i> aislado de hojas.....	72
--	----

Figura 3.5. Amplificación de las regiones promotoras putativas de los genes RAP2.4 y DREB2 clonados en pGem T-Easy.....	72
--	----

Figura 3.6. Confirmación por PCR de las delecciones hechas para DREB2 clonados en pGem T Easy., empleando los primers attB1-pGEM F y attB2-Dreb2 R.	73
---	----

Figura 3.7. Confirmación por PCR de las delecciones hechas para RAP2.4a clonados en pGem T-easy, empleando los primers attB1-pGEM F y attB2-RAP2.4a R.....	73
---	----

CAPÍTULO IV.

Figura 4.1. Expresión de la proteína roja fluorescente en hojas de <i>Lactuca sativa</i> por inducción de los promotores putativos de DREB2 y RAP2.4A, bajo condiciones simuladas de estrés por sequía y salinidad.....	83
--	----

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1. Secuencia proteica de los FTs analizados en este trabajo.....	30
Cuadro 2.2. Elementos reguladores putativos en los promotores de los ortólogos de DREB2 de <i>Carica papaya</i> . Como muestra representativa, se consideraron los tres primeros motivos con los valores más bajos de <i>E</i> -value (<0.05) para observar la conservación de secuencias.....	40
Cuadro 2.3. Elementos reguladores descubiertos y sobre-representados para los ortólogos de RAP2.4A de <i>Carica papaya</i> . Los motivos predichos mantienen un considerable grado de conservación.....	43
Cuadro 2.4. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 1, observado en los promotores ortólogos de DREB2.....	46
Cuadro 2.5. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 2, observado en los promotores de los ortólogos de DREB2.....	47
Cuadro 2.6. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 3, observado en los promotores de los ortólogos de DREB2.....	48
Cuadro 2.7. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 1, observado en los promotores ortólogos de RAP2.4A.....	49
Cuadro 2.8. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 2, observado en los promotores ortólogos de RAP2.4A.....	50

Cuadro 2.9. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 3, observado en los promotores ortólogos de RAP2.4A.....	51
--	----

CAPÍTULO III

Cuadro 3.1. Mezcla de reacción de PCR para amplificar las regiones promotoras putativas.....	63
---	----

Cuadro 3.2. Composición de la reacción de adenilación de los amplicones obtenidos.....	64
---	----

Cuadro 3.3. Composición de la reacción de ligación de los fragmentos en el vector pGEM®-T Easy.....	65
--	----

Cuadro 3.4. Composición de la reacción para digerir el vector pH7RWG2 con SpeI y HindIII.....	66
--	----

Cuadro 3.5. Mezcla de reacción para eliminar los extremos cohesivos en el vector pH7RWG2 tratado con SpeI y HinIII, usando la T4 DNA polimerasa.....	67
---	----

Cuadro 3. 6. Composición de la mezcla de reacción de las clonas seleccionadas para confirmar la pérdida del 35 S.....	67
--	----

Cuadro 3.7. Composición de la mezcla de reacción del control (vector pH7RWG2 vacío) para demostrar la presencia del promotor 35 S.....	67
---	----

Cuadro 3. 8. Composición de la reacción BP usada para insertar los amplicones en el vector pDONR 221.....	68
--	----

Cuadro 3.9. Composición de la reacción de recombinación en el vector de destino.....	69
---	----

ABREVIATURAS

A	Adenina
ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elemento de respuesta a ácido abscísico
ABF	Factores de unión a ABRE
AP2	Apétala 2
AP2/ERF	Apétala 2/Factor de respuesta a etileno
AREB	Proteínas de unión a ABRE
ATP	Trifosfato de adenosina
BDB	Dominio de unión a DNA
BLAST	Alineamiento de secuencias tipo loca
bHLH	Hélice-bucle-hélice-básico
bZIP	Cremallera de leucinas básico
C	Citosina
CAMTA	Activador transcripcional de unión a calmodulina
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CBF	Factor de unión a C-repeat
CE	Elemento de acoplamiento
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CREs	Elementos reguladores en <i>cis</i>
CRMs	Módulos de regulación en <i>cis</i>
CRT	C- repeat

DNA	Ácido desoxirribonucleico
dH ₂ O	Agua destilada
DPE	Elemento río abajo del promotor
DRE	Elemento de respuesta a deshidratación
DREB	Proteína de unión a DRE
EMSA	Ensayo de cambio en la corrida electroforética
ET	Etileno
ERF	Factor de respuesta a etileno
FT	Factor de transcripción
G	Guanina
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
HF	Alta fidelidad
HSF	Factor de choque térmico
Inr	Elemento iniciador
JA	Ácido jasmónico
Kb	Kilobases
LB	Luria-Bertani
LEA	Proteínas de la embriogénesis tardía
MADS	MCM-AGAMOUS-DEFIECIENS-SFR
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MEME	Multiple Em for Motif Elicitation
MYB	Mieloblastosis
MYC	Mielocitomatosis
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

NAC	NAM-ATAF-CUC2
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PLACE	Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements
RFP	Proteína roja fluorescente
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RAP	Relacionado a Apétala
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	RNA pequeño de interferencia
T	Timina
TF	Factor de transcripción
TFBS	Sitios de unión a factores de transcripción
TSS	Sitio de inicio de la transcripción

RESUMEN

Las plantas cuando perciben una condición de estrés, reprograman sus procesos celulares mediante el desencadenamiento de una red de eventos de señalización que conduce a cambios en la expresión génica, proceso en el que los factores de transcripción son piezas claves, de manera que actúan sobre la regulación transcripcional mediante la unión a secuencias cortas de nucleótidos (elementos en *cis*) que se encuentran en los promotores de los genes que están bajo su control. La superfamilia AP2/ERF es una de las más importantes en plantas y se sabe que muchos de los factores de transcripción pertenecientes a esta familia participan activamente en respuesta a estreses de tipo abiótico y biótico, por lo que varios autores señalan que sus miembros resultan de interés para su estudio. En este trabajo, se pretende ahondar sobre la regulación transcripcional mediante el análisis de las regiones promotoras putativas de dos miembros: RAP2.4A (subfamilia AP2) y DREB2 (subfamilia DREB) de *Carica papaya* bajo condiciones de estrés por salinidad y sequía, ya que con base a reportes previos, se conoce que DREB2 y RAP2.4A de *Carica papaya* son genes inducibles. Para ello, se hizo un análisis *in silico*, en el que se identificaron una variedad de motivos como los ABRE, ACGT-box, CGCG-box, DRE, MYB y W-box. Así también se realizó la clonación de un total de cuatro versiones para el promCpDREB2 y de tres versiones para el promCpRAP2.4A, incluyendo las regiones completas, versiones que fueron fusionadas a RFP. Finalmente para comprobar la inducibilidad de ambos promotores, se realizaron ensayos transitorios mediante agroinfiltración de las versiones completas, usando como modelo a *Lactuca sativa*, la expresión de la RFP sugiere que ambos promotores son inducibles.

ABSTRACT

Plants are able to reprogram its cellular processes when are exposed to different stress conditions, by changing signaling events that finally impact on the genic expression. At this level, transcription factors are key components, acting on the transcriptional regulation of genes by binding to *cis* binding elements (short sequences of nucleotides located in the promoters of genes). The AP2/ERF superfamily is one of the most important group of transcription factors in plants. A lot of transcription factors of this superfamily have important roles in the response to several kind of biotic and abiotic stresses. This work, we intend to address the analysis of the putative promoters regions that regulate the expression of two genes of this superfamily in *Carica papaya* (RAP2.4A -subfamily AP2- and DREB2 -subfamily DREB-) when are subjected to salt and drought stress conditions, because both genes are responsive to these conditions. For this purpose, in silico analysis were done to infer putative *cis* binding elements. A list of motives were found in both putative promoters, being ABRE, ACGT-box, CGCG-box, DRE, MYB and W-box, some examples. To corroborate experimentally this inferences, four 5'- truncated versions of promCpDREB2 promoter were cloned as well as three others for the promCpRAP2.4A. Each version was cloned into an expression vector to drive the expression of RFP reporter gene. With these constructions, transient expression assays were done using *Lactuca sativa* as model, and the induction by abiotic stress was confirmed.

INTRODUCCIÓN

Las plantas están constantemente expuestas a estreses abióticos tales como sequía, salinidad, deficiencia nutricional, oxidación, altas o bajas temperaturas, entre otros factores que afectan el crecimiento y desarrollo vegetal en general, y la productividad en el caso de especies de importancia agrícola. Por ello, las plantas poseen diferentes mecanismos para responder a tales desafíos. A nivel molecular estos mecanismos involucran genes de respuesta a estrés y genes de tolerancia a estrés (Matsui *et al.*, 2008). En general, los productos de los genes inducibles por estrés pueden agruparse en dos categorías: los que regulan la expresión de genes y la transducción de señales y los que directamente protegen contra el estrés (Hasegawa *et al.*, 2000). Siguiendo esta clasificación, en el primer grupo se incluyen los productos de genes: los que codifican para factores de transcripción, tales como los factores de respuesta a deshidratación (DREB) y los factores de unión a C repetidas (CBF) (Wang *et al.*, 2003), mientras que en el segundo, se encuentran los genes implicados en la biosíntesis de azúcares solubles y otros solutos compatibles (Abe *et al.*, 1997; Garg *et al.*, 2002). Los factores de transcripción son proteínas que se unen a regiones regulatorias de DNA, los cuales juegan un rol crucial en la regulación de la expresión génica y en general, su número aumenta a medida que incrementa el número de genes en el genoma de un organismo (Levine y Tjian, 2003). A su vez, éstos pueden ser activadores de la transcripción, pero también pueden actuar inhibiendo la transcripción específica de genes (Latchman, 1997). Los TF se unen a secuencias de DNA conocidas como sitios de unión a factores de la transcripción, los cuales son muy cortos y generalmente degenerados. Por otra parte, es posible distinguir los TFs basales de los potenciadores o *enhancers* basados en la posición en la que se unen al motivo de DNA en el promotor y en su relación con la activación de la transcripción de dicho gen. El dominio del TF que se une al DNA se denomina dominio de unión a DNA (DBD), y de hecho los TFs se clasifican de acuerdo a la similitud estructural del DBD (Stegmaier *et al.*, 2004). Aparte de los DBD, los TF usualmente contienen dominios de transactivación (TAD), los cuales contienen sitios de unión para otras proteínas denominados co-reguladores de la transcripción (Warnmark *et al.*, 2003). Adicionalmente, los TFs algunas veces poseen un dominio sensor de señales (SSD), el cual se encarga de detectar señales externas y en respuesta, transmite estas señales al

resto del complejo transcripcional, resultando en una regulación positiva o negativa de la expresión génica (Latchman, 1997). En muchas ocasiones, el TAD y el SSD son lo mismo.

En los genomas vegetales, aproximadamente del 5% al 7% de las secuencias codificantes son asociadas a factores de transcripción (Udvardi *et al.*, 2007) y muchos de éstos genes son genes de respuesta temprana a estrés (Kilian, 2012). Algunos de éstos TFs son reguladores maestros de vías de señalización y regulación de la aclimatación al estrés, por lo que uno o pocos de éstos pueden ser suficientes para incrementar la tolerancia a estrés en plantas, lo que los hace blancos atractivos para el empleo en el mejoramiento por ingeniería genética (Gollack *et al.*, 2011).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. DINÁMICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La regulación de la expresión que se da en diferentes tipos de tejidos y órganos, en diferentes etapas de crecimiento y desarrollo de un individuo, y que es afectada por los estímulos ambientales está regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. Sin embargo, la estrategia de regulación más determinante es la asociada a la tasa de transcripción del gen (Allison, 2011).

La regulación transcripcional tiene un importante rol en la activación y supresión de la expresión génica, y está controlada en gran parte por los promotores de los genes blanco, así como de la relación de estos con los factores de transcripción y de sus interacciones con secuencias regulatorias (Agarwal y Jha, 2010; Finer y Hernández, 2014).

1.1 TRANSCRIPCIÓN EN EUCARIOTAS

La transcripción comienza con el reclutamiento de la RNA polimerasa II en los promotores de los genes blanco, con la modificación de los nucleosomas y el remodelamiento de la cromatina. La maquinaria transcripcional basal requiere de la participación de varios componentes como lo son los factores de transcripción generales o basales (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, que se han nombrado de acuerdo al orden en que han sido aislados, ver figura 1) y el complejo mediador (Rachez y Freedman, 2001). La caja TATA es reconocida y ligada al factor de transcripción TFIID, el cual permite la unión al factor TFIIB. El resto de los factores generales de transcripción, así como la RNA polimerasa se ensamblan al promotor.

Los factores y el proceso de iniciación de la transcripción se describen a continuación según Orphanides y colaboradores en 1996:

- 1) Reconocimiento de los elementos del promotor basal por el factor TFIID.
- 2) Reconocimiento del complejo TFIID por TFIIB.
- 3) Reclutamiento de la ARN polimerasa y el factor TFIIF.
- 4) Unión de TFIIE y TFIIH para completar el complejo de pre-iniciación.
- 5) Formación de un complejo de iniciación abierto, por la separación de cadenas del DNA.

-
- f) Síntesis del primer enlace fosfodiéster en el transcrito nascente del RNA mensajero.
- g) Liberación de los contactos de la RNA polimerasa II y aclaramiento del promotor.
- h) Alargamiento del transcrito de R. De manera que TFIIA puede unirse al complejo en cualquier etapa después de la unión de TFIID, estabilizando el complejo de iniciación.

También se requiere de otros factores que activen o desactiven este proceso. En eucariontes, el aparato molecular que controla la transcripción está integrado por cuatro componentes. Los factores de transcripción generales son esenciales para la transcripción, pero no pueden por si mismos incrementar o disminuir la tasa de transcripción. Esto lo llevan a cabo moléculas regulatorias conocidas como activadores y represores. Los activadores, y posiblemente los represores, se comunican con los factores basales a través de proteínas co-activadoras que están asociadas en un complejo a las proteínas que se unen a la caja TATA.

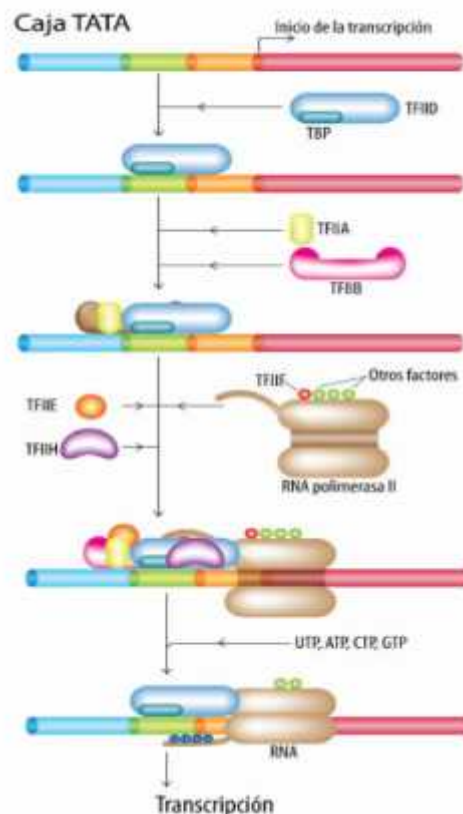


Figura 1.1. Esquema que muestra la maquinaria transcripcional basal. El complejo proteínico formado por los factores generales de transcripción interacciona con la región promotora. Sin embargo, durante este proceso no hay cambios en la dinámica de la transcripción, es decir, esta no aumenta ni disminuye. Tomado de Tiessen *et al.*, 2009.

1.1.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

A diferencia a los factores de transcripción generales, los factores de transcripción regulatorios o específicos se unen de manera proximal y distal, actuando como factores constitutivos o inducibles. Estas proteínas afectan la iniciación de la transcripción al entrar en contacto con componentes del aparato basal de la transcripción. Los factores de transcripción regulatorios ejercen funciones específicas hacia genes o tejidos y modulan la tasa transcripcional de sus genes blanco en respuesta a diferentes estímulos (Tiessen *et al.*, 2009).

Los factores de transcripción son proteínas que se unen al DNA para controlar los genes. Los factores de transcripción tienen funciones fundamentales en casi todos los procesos biológicos como desarrollo y crecimiento, así también en las respuestas a factores ambientales. Estas proteínas estimulan o reprimen la tasa transcripcional de sus genes blanco al unirse a regiones promotoras específicas elementos *cis*, lo que desencadena en la activación o desactivación de cascadas de señalización de genes.

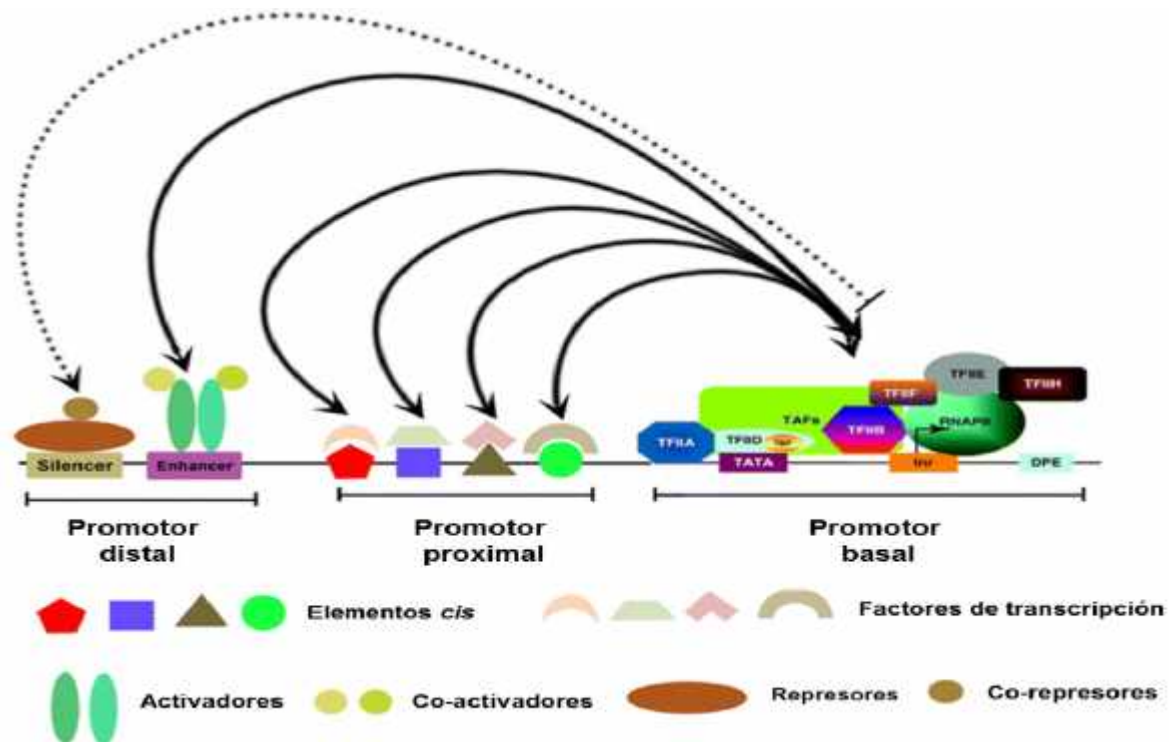
Los sitios de unión a factores de transcripción (elementos *cis*-reguladores o motivos) son secuencias de DNA que influyen de manera temporal y espacial en la actividad transcripcional. Múltiples elementos en *cis* forman módulos de regulación *cis* (CRMs), los cuales integran las señales de múltiples factores de transcripción, resultando en un control combinatorial con patrones específicos de regulación. Es por ello que la identificación y entendimiento de las funciones de los elementos en *cis* en conjunto con los CRMs es importante para la elucidación de los mecanismos en los cuales las células perciben y responden correctamente a su entorno (Mockler, 2009).

1.1.2 EL PAPEL DE LOS PROMOTORES EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión génica que ocurre tanto en procariotas como en eucariotas está regulada cuantitativamente por secuencias río arriba de DNA, tales secuencias son comúnmente conocidas como promotores, no obstante los promotores eucariotas resultan ser más complejos, más grandes y variables (Mckee, 2009). El inicio de la transcripción está mediada por proteínas que reconocen secuencias específicas de DNA ubicadas en el promotor, de esta manera induciendo la actividad de la RNA polimerasa (Kanhare & Bansal, 2005; Dutt *et al.*, 2014). Los promotores regulan la expresión de genes mediante el

reconocimiento de secuencias concretas, las cuales interactúan con los complejos de inicio de la transcripción y los factores de transcripción generales. La secuencia de reconocimiento incluye el promotor mínimo, basal o “core”, la región proximal y la región distal, en la que ésta última comprende secuencias potenciadoras o “*enhancers*” y secuencias silenciadoras o “*silencers*”. De tal modo, la transcripción puede ser activada por enhancers independientemente de su localización, distancia u orientación respecto al promotor del gen (Buchanan *et al.*, 2000; Porto *et al.*, 2014).

1.1.3. ORGANIZACIÓN DEL PROMOTOR



1.1.3.1. PROMOTOR BASAL O CORE PROMOTER

Consiste en una secuencia de 50 a 100 pb que se encuentra adyacente al sitio de inicio de la transcripción. Esta región posee dos elementos claves, la caja TATA (presente en muchos genes, pero no en todos, se localiza a 20-30 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, consiste en la secuencia consenso de 8 pb (TATA(A/T)A(A/T) y fue el primer fragmento de DNA conservado descrito) y la región iniciadora (Inr) (es una secuencia que se ubica en la posición -3 y +5 que tiene como función el facilitar la unión de TFIID, el cual este factor a su vez forma parte del complejo de pre-iniciación de la RNA polimerasa II) (Butler y Kadonaga, 2002).

1.1.3.2 PROMOTOR PROXIMAL

Estos elementos no especifican una posición de inicio, se ubican aproximadamente a 80 pb en flujo ascendente del sitio de inicio de la transcripción y está relacionada directamente sobre la eficiencia de la actividad transcripcional. Otros componentes son la caja CAAT y el elemento río abajo del promotor (DPE) (al igual que la secuencia Inr, participa en el reconocimiento de TFIID y se sabe que en plantas, múltiples copias de este está altamente regulado por estímulos externos), sin embargo no todos estos elementos están presentes en cada promotor. En plantas, en lugar de la caja CAAT se ha identificado la caja AGGA (Bilas *et al.*, 2016).

El elemento proximal también posee la caja GC, el cual participa intensificando la expresión del gen. Este motivo no se encuentra en todas las plantas, pero en animales juega un papel trascendental. También se caracteriza por ser más frecuente en promotores sin caja TATA y en promotores de genes con expresión constitutiva como *housekeeping* (Liu *et al.*, 2013).

1.1.3.3 PROMOTOR DISTAL

Esta región del promotor está comprendida por secuencias llamadas potenciadoras, silenciadoras y delimitadoras, que se localizan a cientos de pares de bases en flujo ascendente del TSS, aproximadamente de 700 a 1 000 pb ó más, e incluyendo secuencias intrónicas. La naturaleza de estos elementos es modular, por lo que se encuentran generalmente en los genes inducibles. A continuación se explica la función de cada elemento:

Secuencias potenciadoras: también conocidas como intensificadores o estimuladores, son secuencias en *cis* que incrementan la transcripción de un gen, independientemente de la orientación y distancia a la que se encuentren en relación al TSS. Además tienen la capacidad de actuar bajo condiciones externas específicas, pueden actuar tejido-específico o en una etapa de desarrollo determinada (Recillas y Escamilla, 2004).

Secuencias silenciadoras: Son elementos similares a las secuencias enhancers, no obstante, estas secuencias reprimen la actividad del gen (Allison, 2011).

Secuencias delimitadoras: Son secuencias que poseen la habilidad común de proteger a los genes de una inapropiada señal emitida por el entorno. Tienen tamaños aproximados entre 0.3 y 3 kb y su función es servir de marcador para delimitar las regiones entre la heterocromatina y la eucromatina, así también como tener la capacidad de bloquear la actividad positiva de un enhancer (sólo cuando las secuencias delimitadoras se encuentren entre el potenciador y el promotor) (Recillas y Escamilla, 2004; Allison, 2011).

Elementos reguladores en cis: Son secuencias cortas de DNA funcionales, en el que su distribución y presencia contribuye a un patrón de expresión temporal y espacial de un gen en particular. Los factores de transcripción se unen a estas secuencias, por lo que se les conoce como sitios de unión de factores de transcripción, TFBS, del inglés *transcription factor binding sites*, también llamados motivos de unión a DNA o elementos reguladores en *cis*. Dichos elementos se encuentran en ambos promotores, el proximal y el distal (Mockler *et al.*, 2009; Tomovic y Oakeley, 2009; Vedel y Scotti, 2011).

1.1.4 PROMOTORES EN PLANTAS

Las regiones promotoras pueden tener tamaños variables de 1-2 kb o más, y contienen varios elementos reguladores en *cis* que sirven como sitios de unión para las proteínas reguladoras de genes. Las secuencias reguladoras que juegan un papel preponderante en la especificidad cualitativa de la expresión génica se han estudiado intensamente, aunado a esto, el estudio de los promotores ha sido fundamental para entender la regulación de la expresión génica en plantas (Dutt *et al.*, 2014).

El aislamiento de las secuencias promotoras y el análisis de sus elementos son críticos a la hora de hacer mejoramiento genético. Hoy en día se han identificado una gran cantidad de

promotores aislados de diferentes fuentes, por ejemplo, para el caso de promotores provenientes de plantas, hay un total de 3922 colectados y pueden encontrarse en bases de datos específicas como lo es Plant Promoter Database (PlantProm DB) (Liu *et al.*, 2013). Por ejemplo, varios cultivos de importancia agrícola han sido modificados con un gran número de genes y elementos de promotores, en éste último caso, la expresión de los genes generalmente han sido dirigida por promotores constitutivos, el más popular es: el promotor 35 S obtenido del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Yutao *et al.*, 2003; Dutt *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2013).

Los promotores usados en biotecnología de plantas se clasifican de acuerdo con el tipo de control de la expresión génica deseado:

- 1) Promotores constitutivos: Dirigen la expresión a niveles constantes en todos los tejidos y en todo momento. Este tipo de promotores comúnmente provienen de virus de plantas o de genes housekeeping (Finer y Hernández-García, 2014).
- 2) Promotores tejido-específico: Este tipo de promotores proveen un mayor control de la expresión del gen nativo o transgén, la expresión se restringe a ciertas células, tejidos, órganos o etapas de desarrollo (Bilas *et al.*, 2016).
- 3) Promotores inducibles: Esta clase de promotores son inducidos por factores físicos como factores bióticos y abióticos (promotores que se inducen por temperatura, luz, heridas, etc.), así como por agentes químicos (inducidos por alcohol, tetraciclina, esteroides, metales, entre otros). Varios promotores se han aislado de especies agrícolas, así como también se han usado para el mejoramiento genético de otros cultivos (Dutt *et al.*, 2014; Naqvi *et al.*, 2016).
- 4) Promotores sintéticos: Este tipo de promotores están compuestos por un arreglo artificial de motivos, de manera que la selección, número de copias y espacio entre los elementos *cis* determina la intensidad de los patrones de expresión temporal y espacial del promotor sintético. La selección de motivos con funciones conocidas puede apoyarse de la información depositada en bases de datos (Liu y Stewart, 2016).

1.1.5 ESTRÉS EN LAS PLANTAS

Las plantas experimentan diversos estreses ambientales tales como la sequía, calor, frío, salinidad, entre otros. La susceptibilidad o tolerancia a estos estreses resulta ser un fenómeno muy complejo, debido a que él o los estreses pueden ocurrir en múltiples etapas de la vida de la planta, afectando su desarrollo y por ende, su productividad (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

La percepción del estrés y el desencadenamiento de señales para activar la respuesta adaptativa son pasos críticos para determinar la sobrevivencia y reproducción de las plantas expuestas a ambientes adversos (Chinnusamy *et al.*, 2003). Las plantas tienen respuestas de adaptación específicas ante determinado tipo de estrés, así como mecanismos que las protegen de más de un tipo. En este contexto, las diferentes rutas de señalización también son características para un tipo de estrés. A su vez, esas rutas pueden estar implicadas ante más de una clase de estrés. Este es el caso de los factores de transcripción que actúan regulando la expresión genes implicados en la respuesta a estrés y reprimiendo la expresión de genes que no son necesarios en esas condiciones (Mazzucotelli *et al.*, 2008).

1.1.6 PERCEPCIÓN Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La percepción de las señales es el primer paso en la respuesta de las plantas al estrés, Un sensor del estrés puede detectar cambios ambientales y transmitir, de manera puntual la señal inicial del estrés a los blancos celulares (Gao *et al.*, 2008). Cada estímulo ambiental proporciona a las células vegetales información específica, que es percibida a través de diferentes tipos de sensores (Hirayama y Shinozaki, 2010). Por ejemplo, el estrés ocasionado por sequía, salinidad o frío induce la acumulación momentánea de calcio en el citoplasma, proveniente del espacio apoplástico o de la liberación de depósitos internos como los orgánulos celulares, así que los canales de entrada de calcio representan un tipo de sensor (Rodríguez *et al.*, 2005). Otros tipos de sensores son los receptores tipo cinasa de proteínas, que consisten de un dominio extracelular que puede funcionar en la unión de ligandos o interacciones proteína-proteína, un dominio trans-membranal o un dominio cinasa intracelular (Rodríguez *et al.*, 2005).

En el caso de la transducción de señales, se han identificado varios componentes y aunque se desconoce cómo interactúan las moléculas entre sí y dónde se posicionan en la compleja red de señalización, sucede que inmediatamente después de la percepción del

estímulo, se generan moléculas de señalización como segundos mensajeros, por mencionar: calcio, inositoltrifosfato y especies reactivas de oxígeno (ROS), estos mensajeros activan, corriente abajo, una cascada de señales que fosforilan a los factores de transcripción, y éstos regulan la expresión de un grupo de genes involucrados en la aclimatación al estrés (Hirayama y Shinozaki, 2010). La fosforilación por cinasa de proteínas es el mecanismo de regulación más común e importante en la transducción de las señales.

Entre los genes que se inducen durante la respuesta a estrés son las enzimas de detoxificación, enzimas pertenecientes al metabolismo de solutos compatibles, transportadores, factores de transcripción, dehidrasas, LEAs, quinasas, fosfatasa y otras proteínas involucradas en la señalización de fosfolípidos.

1.1.7 EL ÁCIDO ABCISICO EN LA SEÑALIZACIÓN

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona con destacadas funciones en la fisiología de los organismos vegetales debido a que es el principal regulador de la respuesta adaptativa ante diferentes tipos de estrés. Los niveles de ABA se incrementan ante estreses de tipo biótico y abiótico. Además, ABA también se distingue por su participación en procesos de desarrollo de las plantas como la maduración y la dormancia de las semillas (Hubart *et al.*, 2010). Por ello, entender los mecanismos que regulan las rutas en las que el ABA participa, y por las que es regulado, así como la identificación y caracterización de sus receptores y las cascadas de transducción de señales que dispara, resulta un conocimiento primordial para integrar el mecanismo de percepción y respuesta de las plantas ante condiciones de estrés en las que el ABA media, al menos parcialmente esas respuestas. ABA está involucrado en el proceso de adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés ambiental como el frío, la salinidad y la deshidratación, se sabe que durante estos estreses los niveles de ABA se incrementan en los tejidos vegetativos, lo que llevó a proponer que el ABA es uno de los mediadores de dichas respuestas (Galau *et al.*, 1986; Zeewart y Creelman, 1988; Bray, 1991). Así, los niveles de ácido abscísico en una planta serían determinantes de su comportamiento frente a una condición de estrés, estos niveles son modulados por un balance preciso entre la biosíntesis y el catabolismo de esta hormona.

En la biosíntesis de ABA se presume que hay tres rutas a seguir: la aldehído abscísico, la alcohol abscísico y la derivada de xantoxina, con excepción de ésta última en la que la conversión de xantoxina a ABA se efectúa en el citoplasma, las demás ocurren en los

plastidios. El precursor de ABA es el isopentil pirofosfato (IPP) y es producido en los plastidios vía 1-deoxipirofosfato D-xilulosa-5-fosfato (DXP) a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. A partir del cual se produce farnesil pirofosfato, geranil pirofosfato, fitoeno, ζ -caroteno, licopeno y β -caroteno. De este último se forma xantofila y zeaxantina. Luego la zeaxantina se escinde y da lugar a unidades de violaxantina, las cuales dan lugar a cis-violaxantina y neoxantina por la neoxantina sintasa y una isomerasa. Finalmente, estos compuestos generan xantonina (por la epoxicarotenoide dioxigenasa) la cual sale de los plastidios al citosol para su posterior conversión a ácido abscísico (Wasilewska *et al.*, 2008). En cuanto a la percepción celular de esta hormona, hay reportes que confirman la participación de tres proteínas miembros de las familias Pyrabactin Resistance/Pyrabactin resistance-like/Regulatory Component of ABA Receptor (PYR/PYL/RCARs), en la que las enzimas Proteína Fosfatasa 2Cs (PP2Cs) actúan como reguladores negativos y SNF1-Relacionada a proteína Kinasa 2s (SnRKs) actúan como reguladores positivos de la señalización (Guo *et al.*, 2011; Danquah *et al.*, 2013). EA nivel de membrana se sabe que el ABA es transportado a través de la membrana plasmática, al menos mediante dos vías: mediante transportadores tipo proteínas de casete de unión a ATP (ABC) y transportadores de baja afinidad a nitrato. Muchos transportadores ABC se distinguen por ser proteínas de integrales de membrana que actúan trasladando diferentes sustratos tales como lípidos, iones y hormonas (Hubbard *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2010).

La señalización por ABA en condiciones de estrés modula la expresión genes, que a la vez desencadenan una red de transducción compleja y altamente regulada, este mecanismo es conocido como dependiente de ABA. De esta forma ABA *per se* es capaz de inducir la expresión de genes de implicados en la respuesta a estrés. Por el contrario, los mecanismos que no involucran la señalización mediada por esta hormona se denomina independiente de ABA (Yamaguchi y Shinozaki, 2006). De hecho, los genes regulados de manera independiente de ABA son inducidos en condiciones de estrés pero que responden a tratamientos con ABA, lo que sugiere que dicha regulación está determinada por vías alternas a esta hormona. Además, se conocen genes que integran las vías ABA-dependientes y las ABA-dependiente y que son regulados por ambas vías. Un ejemplo de ello, es el gen *RD29A*, conocido también como *LT178* o *COR78*, el cual responde a frío y calor en mutantes ABA-deficientes (*aba*) y *aba*-insensible (*abi*). Este experimento demostró que dicho gen es regulado de manera ABA dependiente e independiente. El análisis de su promotor indica que hay secuencias conservadas denominadas ABRE (PyACGTGG/TC) que son coordinadas ABA dependientes y secuencias de 9 pb (TACCGACAT) denominadas DRE que son esenciales para la inducción del *RD29A* de manera ABA independiente. Este

mismo elemento se ha encontrado en genes que responden a sequía, y poseen el elemento CRT, que contiene el motivo A/GCCGAC que forma parte central de la secuencia DRE del promotor inducido por frío. A partir de este y otros estudios, se estableció que ABRE y DRE/CRT son los principales elementos implicados en la expresión inducible por estrés abiótico. Uno de los grupos de factores de transcripción más estudiados son los pertenecientes a la familia AP2/ERF que se unen a las secuencias DRE/CRT. Los FTs que se unen a la porción central de DRE/CRT son llamados Dehydration Response Element Binding/C-Repeat Binding factor (DREB/CBF). En especial los DREB1/CBF son inducidos por frío, mientras que los otros miembros como los DREB2 son inducidos por sequía. En la ruta dependiente de ABA, participan los factores transcripcionales tipo ABA Responsive Element Binding/ABA Binding Factor (AREB/ABF) que son zippers de leucina y actúan uniéndose a las secuencias ABRE. Ejemplos de ellos son ABF1 que responde a frío; ABF2 a sal, sequía y calor; ABF3 a sal y ABF4 que responde a sal, sequía y frío (Yoshida *et al.*, 2015).

1.1.7.1 EXPRESIÓN DE GENES DURANTE EL ESTRÉS VÍA DEPENDIENTE DE ABA

Se ha determinado que una parte importante de la respuesta fisiológica a ABA se da a través de la expresión génica *de novo* (Bohnert y Jensen, 1996). El estudio de promotores y la caracterización de las mutantes deficientes en ABA de *A. thaliana* y de maíz, apoyan la participación del ABA endógeno en la regulación de la expresión de genes durante estrés. Estos cambios en la expresión génica le pueden conferir a la planta la habilidad para responder apropiadamente al estrés y sobrevivir a dicha condición. Sin embargo, no todos los genes que se inducen bajo estrés tienen una función adaptativa, ya que muchos de estos cambios en la expresión son consecuencia de daños a nivel celular. Las plantas sometidas a déficit hídrico presentan alteraciones en procesos fisiológicos y metabólicos, como reducción en las tasas de fotosíntesis, disminución de la síntesis de proteínas totales y en las tasas de crecimiento.

Los genes inducidos durante estrés a través del ABA pueden dividirse en dos grupos. Están los que se inducen por ABA y cuya expresión es independiente de la síntesis de proteínas, es decir, donde no se requiere síntesis de proteínas *de novo* para su inducción. De otro lado, están los genes inducidos por ABA de una manera dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). La disección funcional de los promotores de los genes que responden al ABA, basada principalmente en sistemas de

expresión transitoria, ha permitido la identificación de varios elementos en *cis* involucrados en la expresión de genes por ABA (Bray, 2002; Hirayama y Shinozaki, 2007).

En la regulación transcripcional de genes por el ABA se han identificado factores que actúan tanto en *cis* como en *trans*. Los genes que son inducibles por deshidratación y que son dependientes de ABA, contienen elementos de respuesta a ABA, conocidos como ABREs (*Abscisic Acid Response Element*). Estos elementos de ADN tienen una secuencia conservada de al menos 8 nucleótidos (PyACGTGGC) y se encuentran en la región de los promotores. Un ABRE funciona como un elemento de ADN *cis* actuante involucrado en la expresión de un gen regulado por ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Los ABRE se han identificado en muchos de los genes que son inducidos por estrés, por otra parte, la caracterización de los promotores de los genes inducibles por ABA, los genes *Em* de trigo y *rab16A* de arroz, mostraron que el elemento ABRE es importante para la transcripción dependiente de ABA (Guiltinan *et al.*, 1990).

La biosíntesis de ABA se induce en situación de deshidratación y activa la expresión génica mediante dos vías. En la primera las proteínas bZIP son activadas e inducen la expresión de genes que contienen potenciales elementos de respuesta a ABA (ABREs) en sus promotores. La segunda vía requiere la biosíntesis de factores de transcripción. Los factores MYC y MYB se sintetizan en respuesta al ABA y actúan regulando de manera cooperativa la expresión de genes que contienen elementos *cis* en sus promotores que son reconocidos por estos factores. Estas dos vías parecen actuar en la respuesta lenta y adaptativa de las plantas a la deshidratación (Shinozaki y Yamaguchi, 2000).

Los patrones de expresión de los genes inducibles por estreses abióticos son complejos y muchos de ellos son inducidos también por la aplicación exógena de ABA.

1.1.7.2 EXPRESIÓN DE GENES DURANTE EL ESTRÉS VÍA INDEPENDIENTE DE ABA

Existen evidencias que indican que la expresión de algunos genes durante deshidratación es total o parcialmente independiente de ABA, por ejemplo el análisis de la expresión de genes que se inducen durante estrés hídrico, sugiere que esta se incrementa considerablemente por aplicaciones exógenas de ABA, sin embargo no hubo una correlación consistente entre los niveles de mRNA y los niveles de ABA en estas condiciones (Chandler y Robertson, 1994).

En respuesta a estrés, por ejemplo frío y sequía, la señalización independiente de ABA involucra la participación de factores que reconocen a un elemento en particular, el elemento DRE (Dehydration Responsive Element), cuya secuencia consenso es ACGTGG/TC e identificado inicialmente en el promotor del gen *rd29A* de *A. thaliana*. Los factores de transcripción que interaccionan con este elemento son miembros de la familia de factores de transcripción AP2/ERF.

1.1.8 ROL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

El sistema de control de la expresión génica es controlado, en parte, por la participación de los factores de transcripción, los cuales regulan de manera positiva o negativa la expresión espacio-temporal de los genes, encendiendo o apagándolos según su función y/o circunstancias, tales como la respuesta y tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico (ver figura 1.3). Los factores de transcripción no sólo están implicados en la regulación de los genes, sino también en la señalización celular, en el splicing del RNA, el control de siRNA y en las modificaciones estructurales de la cromatina (Phillips y Hoopes, 2008).

Los FTs se unen a grupos concretos de secuencias no codificantes cortas y conservadas que se encuentran a lo largo de cada uno de los promotores de los genes, estas secuencias se conocen como elementos (CREs). Algunos de estos elementos son comunes en los promotores de los genes. Sin embargo, otros son más específicos, lo que hace que su regulación sea más estricta.

1.1.8.1 SECUENCIAS ESPECÍFICAS DE LOS TFs

Como se mencionó anteriormente, las secuencias específicas de unión a DNA son esenciales en la regulación de la expresión genética en eucariotas, ya que ellas incrementan (*enhancers*) o disminuyen (*represores*) la tasa de transcripción debido a la estabilización o desestabilización del complejo de pre iniciación (PIC). La unión de esas secuencias específicas de los FTs al promotor del gen diana es secuencia específica y se da por el reconocimiento de los CREs (*Cis-regulated element*) de 5 a 8 pb o un poco más que comprenden una región consenso y otras regiones flanqueantes que pueden variar en un par de bases. Es preciso mencionar que la mayoría de los CREs permiten cierto grado de sustitución de pares de bases sin ocasionar la pérdida completa de la función (Huang *et al.*,

2012. Además, en el promotor de un gen puede haber uno o más copias de un elemento regulador en *cis* en especial.

Los elementos son clasificados en términos de su estructura como las secuencias *cis* y las proteínas que interactúan con ellos como factores *trans*. Las secuencias reguladoras en *cis* son fragmentos no codificantes y su localización y orientación en relación a los genes en los que se encuentran es variable (Venter y Botha 2010). Cabe mencionar que la organización de todos los eucariotas es similar y que muchos de los elementos reguladores que poseen son universales (Bilas *et al.*, 2016)

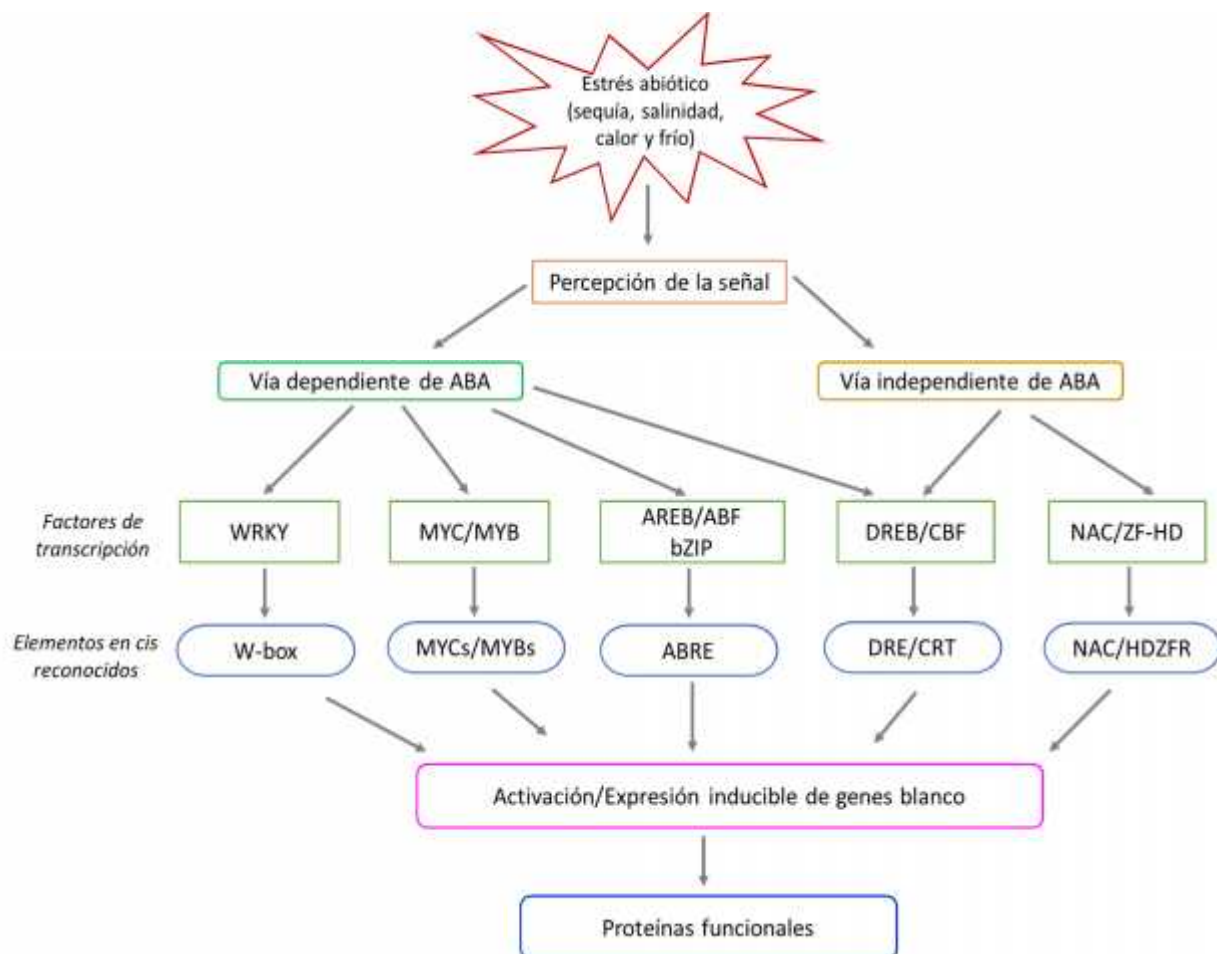


Figura 1.3. Esquema general sobre las redes de regulación transcripcional de los factores de transcripción implicados en la respuesta a estrés. Tomado y modificado de Lata *et al.*, 2011.

1.1.8.2 DOMINIOS DE UNIÓN A DNA

Los dominios de unión a DNA reconocen los CREs sobre el promotor, proporcionando especificidad y localización del gen en cuestión. Los dominios de unión tienen estructuras definidas que varían de acuerdo a cada familia de FTs. Las dominios estructurales suelen ser hélice-giro-hélice, dedos de zinc, zippers de leucina, α -hélice y hojas- β , donde las principales interacciones DNA-proteína envuelven fuerzas de van der Waals (Shivrastava y Tahirov, 2010).

1.1.9 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN PLANTAS

En las rutas de transducción de las señales, varios factores de transcripción y elementos que actúan en *cis* funcionan no solamente como inductores o interruptores moleculares para la expresión génica, sino también como puntos terminales de la transducción de señales en los procesos de señalización, así también, un solo factor de transcripción puede controlar la expresión de muchos genes blanco. A dicho grupo de genes controlados por un cierto tipo de factor de transcripción es conocido como un regulón (Tran *et al.*, 2007).

La gran diversidad de factores de transcripción y de elementos *cis* a los que se unen resulta en una fuente de una enorme complejidad de combinaciones que permite el control de la expresión específica de genes y produce una gran variedad de fenotipos fisiológicos y de desarrollo (Tiessen *et al.*, 2009). Los genomas vegetales asignan aproximadamente un 7% de las secuencias codificantes a factores de transcripción y al menos en *Arabidopsis thaliana* cerca de 1500 FTs han sido descritos y se sabe que están involucrados en la respuesta a estrés (Lata *et al.*, 2011).

En las plantas hay diferentes familias de factores de transcripción, clasificadas con base en su dominio de unión a ADN (García *et al.*, 2013).

1.1.9.1 CLASIFICACIÓN DE LOS FTs

La clasificación de las superfamilias de factores transcripcionales depende de las características de su estructura. Generalmente, el agrupamiento de las familias se realiza en función del número y arreglo de los residuos conservados en el dominio de unión (BDB) del factor de transcripción (Takatsuji, 1998). La variedad de genes que codifican para los FTs contienen motivos de unión a DNA como bZIP, MYB, MYC, AP2/ERF y dedos de Zinc

(Ambawat *et al.*, 2013). A continuación se describen las superfamilias de factores de transcripción conocidos en plantas.

1.1.9.1.1 bZIP FTs

Existe más de 75 miembros de la familia de bZIP TF en *A. thaliana*, la cual está dividida en más de 10 grupos (Jakoby *et al.*, 2002). Muchos de los bZIP TFs juegan un papel central en la señalización por (Fujita *et al.*, 2011). Por ejemplo, los factores de unión a elementos de respuesta a ABA, *ABA -responsive element (ABRE) binding proteins/factors-* (AREBs/ABFs) AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, ABF1 y ABF3 son principalmente expresados en tejidos vegetativos y, con excepción del ABF1, son reguladores clave de la señalización por ABA que responden a estrés osmótico durante la etapa de crecimiento vegetativo (Fujita *et al.*, 2011). Tanto AREB1/ABF2 como AREB2/ABF4 activan directamente la expresión del gen de respuesta a deshidratación RD29B por unión directa con el elemento ABRE, mientras que AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, and ABF3, unen y activan el promotor de la proteína de unión al elemento de respuesta a estrés *-DRE-BINDING PROTEIN 2-* (DREB2A) de manera dependiente de ABRE. En general, los bZIP están implicados en repuestas a estrés abiótico. Por ejemplo, la proteólisis de bZIP17 inducida por sal y su translocación desde el retículo endoplasmático, precede la activación de genes de respuesta a estrés salino en *A. thaliana*.

1.1.9.1.2 NAC FTs

De esta familia se han descrito 110 miembros en *A. thaliana* y 152 en soya y tabaco. Los genes NAC (NAM, ATAF y CUC) son inducidos por salinidad, sequía, frío, calor o ABA. Análisis en sus promotores indican que estos son importantes para la activación del gen ERD1 (Early Responsive to Dehydration stress 1). Los TFs del sub-grupo 3: *ANAC019*, *ANAC055* y *ANAC07* son inducidos bajo las condiciones ya mencionadas, sin embargo, también se ha observado que otros miembros se activan ante el proceso de senescencia de la planta. Experimentos con NAC, muestran que los genes *OsNAC6/SNAC2* y *OsNAC5* incrementan la tolerancia a salinidad y sequía, no obstante la productividad se ve afectada al obtener plantas con retraso en el crecimiento y bajos rendimientos (Zheng *et al.*, 2009; Takasaki *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2010).

1.1.9.1.3 WRKY FTs

La familia WRKY se diferencia por el dominio conservado de aminoácidos WRKYGQK en el extremo N-terminal junto a un motivo de dedos de zinc. Esta comprende un amplio número de FTs, los cuales están divididos en tres grupos según el número de dominios de dedos de zinc que posean (Eulgem *et al.*, 2000). Los WRKY se han relacionado mucho con la respuesta a patógenos. Sin embargo estudios recientes indican que también participan en estrés abiótico. Experimentos sobre la sobreexpresión de WRKY25 o WRKY33 (que responden a patógenos) incrementan la tolerancia a sal y su sensibilidad a ABA. Por otro lado, WRKY25, WRKY33 y los mutantes con expresión disminuida para WRKY de la familia I son más sensibles al calor en comparación con los tipo silvestre.

1.1.9.1.4 DEDOS DE ZINC FTs

La mayoría de estos factores de transcripción se caracterizan por tener el dominio Cis2His2 (C2H2) en su estructura. Están implicadas en el desarrollo y crecimiento, respuesta a fitohormonas y estrés abiótico. Análisis de expresión de los genes ZFTs muestran que su regulación y función es tejido específico (Li *et al.*, 2013). Por ejemplo, Zat10/STZ, se induce por frío y cuando se une al promotor del gen RD29A actúa reprimiéndolo. Zat10 en *Arabidopsis* promueve la tolerancia a salinidad, calor y estrés osmótico cuando es expresado constitutivamente e interviene en la regulación negativa de otros FTs, como Zat12 que desregula la expresión de los genes DREB/CBF en estrés por frío.

1.1.9.1.5 MYB FTs

Basados en el número de dominios MYB, se clasifican en 1R, 2R-3R, 3R y 4R. La denominación refiere a la repetición de residuos de triptófano regularmente espaciados que forman un clúster de triptófano en la estructura de hélice-giro-hélice. El grupo 2R-3R son específicos de plantas, encontrándose más de 100 miembros en el genoma de mono y dicotiledóneas. Estas proteínas están implicadas en diferentes estreses mediados por ABA, y hasta hace poco también se sabe que responde a la señalización por ácido jasmónico (Lindemose *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que ciertos miembros controlan parte del metabolismo secundario, participando en la regulación de la ruta de flavonoides y terpenoides, por ejemplo la sobreexpresión de *AtMYB75/PAP1* and *AtMYB90/PAP2* resulta en la acumulación de antocianinas en *Arabidopsis* (Lv *et al.*, 2014;). En condiciones de frío MYB15 es activado y se une al sitio de

reconocimiento Myb del promotor de *DREB1B/CBF1*, *DREB1C/CBF2*, y *DREB1A/CBF3* desregulando estos genes. En *Arabidopsis* cuando MYB15 es sobre-expresado, se mejora la tolerancia a sequía y salinidad (Cao *et al.*, 2013).

1.1.9.1.6 bHLH FTs

Pocos miembros de esta familia participan en la señalización por ABA y estrés abiótico. El gen bHLH92 se induce en respuesta a NaCl, manitol y frío. No obstante, su sobreexpresión resultó en una modesta tolerancia a NaCl y a estrés osmótico (Jiang *et al.*, 2009; Lindemose *et al.*, 2013).

1.1.9.1.7 AP2/ERF FTs

La familia AP2/ERF es una familia de genes específicos de plantas que incluye aproximadamente a 145 miembros en *Arabidopsis* y está compuesta de cuatro principales sub-familias: AP2, RELATED TO ABI3/VP1 (RAV), ERF y DREB. La sub-familia de proteínas DREB juegan un rol importante en la respuesta a estrés y está compuesta de seis subgrupos (A-1–A-6), las cuales actúan regulando la expresión génica vía elemento DRE/CRT, el cual actúa en *cis* (Mizoi *et al.*, 2012). El subgrupo DREB1 (A-1) está compuesto de seis miembros. El DREB1A/C-repeat-binding factor 3 (CBF3) fue identificado mediante su unión al elemento DRE/CTR en los promotores RD29A/COR78/LT178 y COR15A (Liu *et al.*, 1998; Stockinger *et al.*, 1997) y se sabe se induce por bajas temperaturas y que participa en la activación de muchos genes de respuesta a frío. El subgrupo DREB2 (A-2) consiste de ocho miembros en *Arabidopsis*. En este modelo, el gen DREB2A es regulado positivamente por ABA, mientras que tanto DREB2A como DREB2B se inducen fuertemente por sequía, sal, estrés osmótico y bajas temperatura (Liu *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2000). DREB2A se ha visto que se induce en repuesta a calor, sequía o ambos (Sakuma^a *et al.*, 2006; Sakuma^b *et al.*, 2006). En línea con lo anterior, DREB2A se une a los promotores de RD29A y del factor de choque térmico A3 (HsfA3) (Liu *et al.*, 1998).

1.1.10 SUPERFAMILIA AP2/ERF

La familia APETALA 2/Ethylen Responsive element binding Factor (AP2/ERF) se caracteriza por la presencia del dominio AP2/ERF de 60-70 aa (Ito *et al.*, 2012). Este grupo se caracteriza por ser específico de plantas e involucra 4 subfamilias: AP2, RAV, ERF y DREB

(Mizoi *et al.*, 2012), la cual se clasifican en base su estructura. La subfamilia AP2 tiene un doble dominio AP2/ERF, la subfamilia RAV un dominio AP2/ERF y un dominio B3 DNA binding y las subfamilias ERF y DREB sólo tienen un dominio AP2/ERF (Yamaguchi y Shinozaki, 2006; Shigyo *et al.*, 2006). Las funciones de los integrantes de la superfamilia AP2/ERF han sido ampliamente estudiadas, encontrándose que participan regulando activamente la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico (Xie *et al.*, 2014). La subfamilia ERF tiene afinidad por la secuencia GCC-box (AGCCGCC) y son mediadores de la respuesta mediada por etileno. Los genes pertenecientes al grupo ERF son inducidos por sequía, salinidad, bajas y altas temperaturas, según estudios hechos en tomate, soya y arroz.

1.1.10.1 SUBFAMILIA DREB

Por otra parte la subfamilia DREB ha sido una de la más estudiadas, y se sabe que son los principales factores de transcripción que intervienen en la respuesta a estrés regulando la expresión vía *cis*- acting dehydration-responsive element/C-repeat (DRE/CRT) (Sakuma *et al.*, 2002). Los dos primordiales factores de transcripción de este subgrupo son DREB1/ABF y DREB2 y fueron inicialmente caracterizados en *Arabidopsis thaliana*. En base a estudios, se ha visto que los miembros de DREB1/CBF responden principalmente a frío mientras que aquellos correspondientes a DREB2 lo hacen a sequía, calor y salinidad. En referencia a los sitios de unión, DREB1 tiene mayor afinidad por la secuencia del core A/GCCGAC, sin embargo DREB1 une mejor a A/GCCGACNT y DREB2 a ACCGAC (Mizoi *et al.*, 2012).

Hay varios FTs que conforman el grupo DREB2 y que responden a muchos tipos de estímulos. Especialmente DREB2A es uno de los factores que responden a deshidratación de forma ABA-independiente, así como a sequia (Figura 1.4). Las funciones de ortólogos de DREB han sido comprobado en arroz, arabidopsis, uva, tomate, cebada y maíz (Gao *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2012). Estudios demuestran que DREB2A tiene un dominio regularorio negativo (NRD) contiguo al sitio de unión a DNA y cuando este NDR es removido DREB2A se expresa de manera constitutiva que se denomina DREB CA (Sakuma *et al.*, 2006). Así mismo, la sobreexpresión de este gen no tiene ningún efecto sobre el fenotipo lo que propone que se necesita de alguna modificación postraducciona para que sea funcional (Liu *et al.*, 1998).

Los genes DREB juegan un importante papel en la tolerancia al estrés de manera ABA independiente, estos genes inducen la expresión de otros genes en respuesta al estrés. Los

primeros cDNAs aislados de proteínas de unión a DRE, como CBF1 (CRT binding factor1), DREB1A y DREB2A de arabidopsis se lograron mediante ensayos de un híbrido en levadura. A partir de entonces, un gran número de genes DREB se han aislado de varias especies de plantas.

1.1.10.2 SUBFAMILIA AP2: RAP

Se distinguen otros factores de transcripción que responden a estrés y que se han observado que confieren tolerancia en plantas transgénicas, ellos son los RAP2 (*Related to AP2*) (Lindemosen *et al.*, 2013). Se distinguen pocos genes relacionados a este subgrupo, sin embargo ya se han descrito algunos como los RAP2.1 (estrés por frío y sequía), RAP2.4 (frío, calor, salinidad, deshidratación), RAP2.4A (regulación de genes involucrados en mecanismos redox), RAP2.4B (calor, salinidad, deshidratación), adicionalmente se sabe que estos genes regulan negativamente la participación de algunos DREB (Zhu *et al.*, 2010; Mizoi *et al.*, 2012).

Un papel preponderante de los miembros AP2 sucede con la regulación de la señalización por luz. En arabidopsis, algunos genes de esta subfamilia, incluido RAP2.4 tienen niveles significativos de transcripción al ser inducidos por luz, además de participar rápidamente ante el estímulo. También RAP2.4 de arabidopsis así como los ortólogos en *Medicago truncatula*, *Zea mays*, *Gossypium hirsutum* son inducidos por estrés, como frío, y en respuesta a tratamientos de salinidad, sequía y ácido abscísico (Wang *et al.*, 2008). Por otra parte RAP2.2 fue inducido fuertemente bajo condiciones de hipoxia y oscuridad en brotes de plántulas de arabidopsis (Hinz *et al.*, 2010).

En otros estudios se ha determinado que la expresión de RAP2.6 es fuertemente inducida por patógenos como bacterias y virus, no obstante recientemente también se ha demostrado la participación de estos genes en condiciones de estrés abiótico (Zhu *et al.*, 2010).

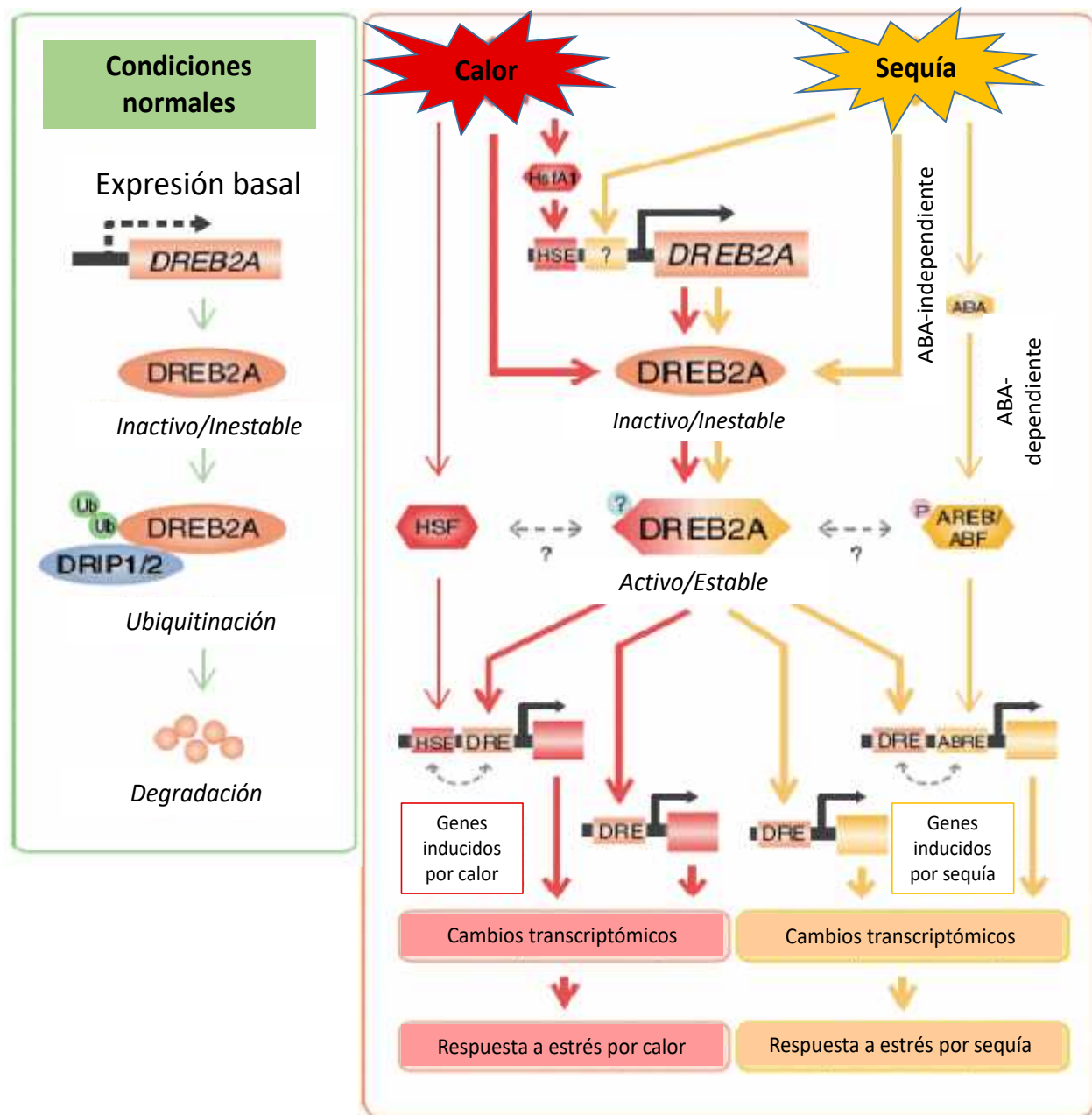


Figura 1. 4. Regulación transcripcional de DREB2A. Tomado de Mizoi et al., 2012.

1.1.11 CISGÉNICOS COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO VEGETAL

El conocimiento generado sobre las respuestas de las plantas a los diferentes tipos de estrés se ha usado en estrategias de mejoramiento genético empleando ingeniería genética, la cual en su mayor parte, se apoya en el uso de transgénicos. Sin embargo, a nivel mundial existen preocupaciones por el empleo de este tipo de organismos genéticamente modificados, por lo que se han tratado de establecer vías tecnológicas que compaginen las estrategias de mejoramiento genético convencional, las cuales son aceptadas en lo general por el público consumidor, y las bondades y potencia que ofrecen las estrategias empleadas por la ingeniería genética. De este esfuerzo, nace el paradigma basado de mejoramiento genético basado en cisgénicos, es decir, modificados con genes procedentes de plantas con capacidad de cruzarse con la planta receptora y por tanto, emparentada con ésta (Schouten, 2006).

Por otro lado, la ingeniería genética de hoy permite el control del tiempo, la especificidad del tejido y el nivel de expresión de genes introducidos para su función óptima. Esto es una consideración importante si el gen que se desea expresar requiere de ser expresado en condiciones controladas. De ahí que se considere que el descubrimiento y caracterización de promotores expresados en condiciones específicas ha permitido uno de los principales cambios en el paradigma para el mejoramiento genético de cultivos ante condiciones de estrés en años recientes (Katiyar *et al.* 1999). Los promotores más ampliamente usados en la generación de plantas transgénicas son los promotores constitutivos. Sin embargo, existen casos documentados en los que la expresión constitutiva de genes conlleva efectos indeseables. Ahora que se conocen tantos genes que se expresan en diferentes tipos de estreses y que los procedimientos de transformación genética son más o menos rutinarios, existen mejores oportunidades para diseñar y caracterizar promotores con las características deseadas.

1. 2 JUSTIFICACIÓN

En biotecnología de plantas transgénicas, la búsqueda de promotores, sobre todo aquellos que dirigen la expresión bajo una condición de estrés y/o órgano/tejido específico, resultan de interés para manipular la expresión génica. Hoy en día, los promotores más empleados en las construcciones génicas son aquellos que conducen la expresión ubicua de genes, lo que da lugar en su mayoría a la obtención de fenotipos alterados (Prabu y Prasad, 2012). Actualmente, no es muy común el uso de promotores que dirijan la expresión inducible por estrés o tejido específico con efectos mínimos o con mejoras sobre el fenotipo deseado, y mucho menos en especies de interés agrícola. Por ello, la identificación y caracterización de nuevos promotores con características inducibles bajo condiciones de estrés resulta atractivo para la generación de organismos genéticamente modificados.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se han descrito el análisis funcional de los genes RAP 2.4A y DREB2 en *Carica papaya*. Se ha observado que responden a diversos tipos de estrés (Arroyo-Herrera *et al.*, 2015; Figueroa-Yañez *et al.*, 2016), por los que se propone que sus regiones promotoras deben contener sitios de unión a factores de transcripción que regulan la expresión de estos genes en condiciones de estrés, los cuales pueden tener potencial biotecnológico.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la función de los promotores correspondientes a los genes DREB2 y RAP2.4A de *Carica papaya* bajo condiciones de estrés abiótico.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar los elementos reguladores que están presentes en los promotores putativos de DREB2 y RAP2.4A de *C. papaya*.

Evaluar la expresión de genes reporteros dirigidos por promotores putativos de los FTs DREB2 y RAP2.4A de *C. papaya* en diferentes situaciones de estrés.

1. 4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental general se describe a continuación:

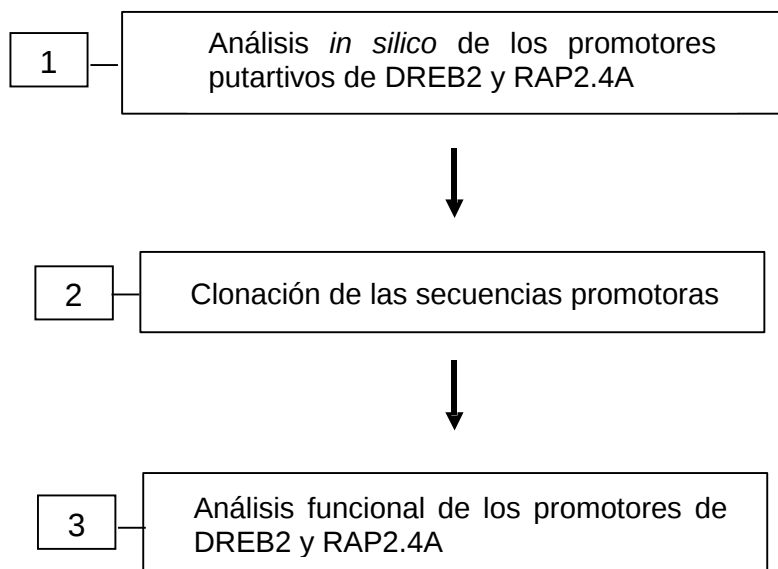


Figura 1. 5. La estrategia experimental está comprendida por tres etapas de desarrollo.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE PROMOTORES PUTATIVOS DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DREB2 Y RAP2.4A DE *Carica papaya* var. Maradol

2.1 INTRODUCCIÓN

Un promotor es definido como una secuencia de DNA en la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS). La función de un promotor está determinado por la combinación de varios accesorios que lo conforman, como elementos reguladores en *cis* y enhancers, además de la interacción de proteínas específicas (Vedel y Scoti, 2011). La división funcional de la región promotora requiere de la identificación y caracterización del promotor mínimo, así como de la localización de los sitios de unión a factores de transcripción. Por lo general, para recabar suficientes datos sobre la dirección de la expresión se considera evaluar la región comprendida entre los 1 000 pb río arriba del TSS (Toki *et al.*, 1992).

Los promotores se clasifican en constitutivos, tejido-específicos o inducibles según su patrón de expresión. Hoy en día, los promotores constitutivos más usados son el 35 S CaMV, el de ubiquitina de maíz y el de actina de arroz. Otros promotores fuertes se han aislado y probado para ser usados en las construcciones genéticas, sin embargo, dados sus efectos, pocos han sido exitosamente usados en biotecnología de transgénicos (Yutao *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013). La expresión constitutiva de algunos genes afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas hospederas. A pesar de que existen genes que pueden ser buenos candidatos para el mejoramiento genético, se han reportado casos en los que la sobre-expresión de esos genes provocan fenotipos aberrantes como en el caso de la sobre-expresión constitutiva de DREB1/CBFs (Yang *et al.*, 2010). En cambio, plantas de arroz con sobre-expresoras de DREB1A/CBF3 empleando promotores inducibles presentaron mayor fertilidad y rendimiento en condiciones de estrés comparadas con las líneas silvestres (Xiao *et al.*, 2009). En algunos casos cuando varios genes se clonan en tándem para obtener plantas transgénicas, las múltiples copias que se generan del promotor conllevan al silenciamiento de esos transgenes, de ahí que surja el interés de optar por promotores tejido específico o inducibles, los cuales representan un sistema atractivo para la elaboración de promotores sintéticos. Esta disponibilidad sugiere el potencial uso para

entender algunas rutas de señalización, así como para el desarrollo de plantas resistentes a estrés (Rushton *et al.*, 2002).

Los promotores que son inducibles, lo son por factores físicos, factores bióticos y abióticos, así como por agentes químicos. Ejemplo de ellos son los modulados por choque térmico, calor, frío, luz, metales, hormonas (por citar algunos) (Zuo *et al.*, 2000; Yamaguchi y Shinozaki, 2005).

Una estrategia para el análisis de promotores implica el uso de herramientas bioinformáticas para explorar su secuencia, y se basa en la búsqueda de secuencias conservadas de DNA referenciadas en bases de datos. De esta manera, se pueden detectar motivos descritos con una función determinada, debido a que la información recopilada en las bases de datos (Komarnytsky y Borisjuk, 2003; Yamamoto *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior, también se puede inferir la presencia de motivos a partir de un conjunto de secuencias evolutivamente relacionadas mediante algoritmos matemáticos que analizan la presencia de sitios o motivos sobre-representados y que son deducidos a partir de aquellas. En general, ambas estrategias son complementarias.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 LOCALIZACIÓN DE ELEMENTOS CIS-REGULATORIOS DE LOS PROMOTORES PUTATIVOS DE LOS GENES DREB2 y RAP2.4A

En esta sección se pretende definir la presencia de sitios de unión a factores de transcripción mediante análisis *in silico*. Esto ayudará a guiar el planteamiento de experimentos que permitirán elucidar regiones importantes en los promotores de los genes DREB2 y RAP2.4A de *C. papaya*. En general, el análisis bioinformático se resume en la Figura 2.1.

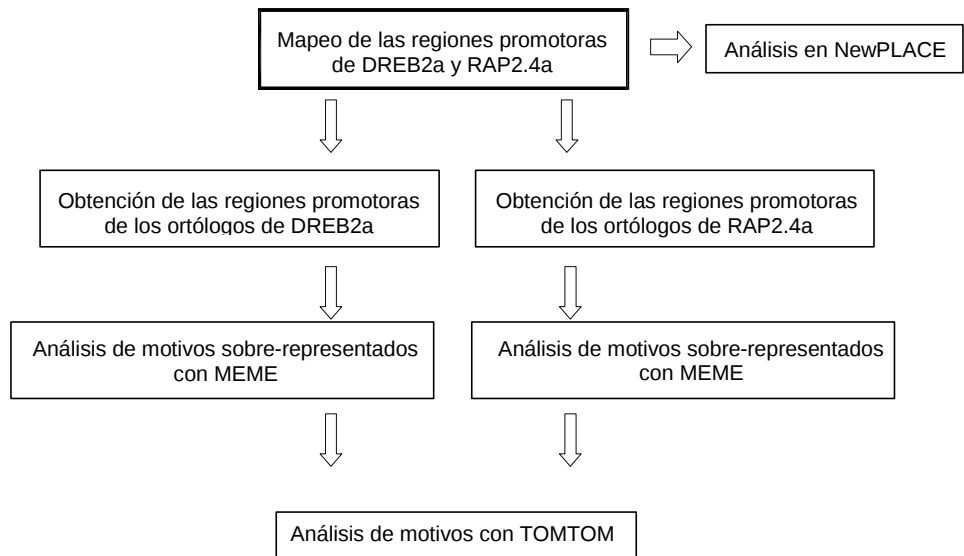


Figura 2.1. Esquema representativo de la estrategia bioinformática para inferir CREs en los promotores de DREB2a y RAP2.4a. En la estrategia se incluyó tanto un método de inferencia a priori (MEME) como a posteriori (NewPLACE).

Para obtener los promotores considerados para su caracterización se partió de las secuencias codificantes de los genes DREB2 y RAP2.4 (Cuadro 2.1) con las que se hizo un BLAST contra el navegador Phytozome contra el genoma de *C. papaya*. Una vez localizada la región codificante, se seleccionó la región de ~2000 pb río arriba del codón ATG de cada gen y se buscó una zona que permitiera generar oligonucleótidos de buena calidad.

Cuadro 2.1. Secuencia proteica de los FTs analizados en este trabajo.

Factor de transcripción	Secuencia
DREB2a	MGTFDQAPNVXSIAVDSSRKRKRSRRDGTSAETLKKWKEYNEHLASGDGG KPARKVPAKGSKKGCMKGKGGPENSRCNYRGVRQRTWGKWAEIREPNRGSRL WLGTFPTAVEAALAYDEAAKAMYGPCALLNLPHAEDLVCFGTASGSSSVATPS GSDSTTTSSHSEVCAADDIKQEFVAIPGLKKEDGQGEARNAYHPHAVIETAT PSSTMKLEAKDGDANNIKKLHSGEYHGIKGEAVDYSKDVKSEGKEDESQDYWQ TFSMDEMFDVDDLGAIDNDPLVGTGLKQEFDYPPVQVGITDSRLQSEKSSAL AYQLQNPDAKLLGSLHMEQLPSTVDYGLALLQAQEHGDNNEIDGQGFMMDM IGLEDLDF
RAP2.4a	MAATMDFCSSRPVQAGPFGDELMEALEPFIKSALSLLLSPPLSSSYQIPSC SSSYSSANDISFCPSFCPSFSTNTTQPSLYSGDCCTTSMPQPISTNAHSVHDP SALQQSGSIGLNHLTRSQMNQIQSQFHLQSQSPSLLYQYYPPQQHAFQFLSP KPVPPMKQVGSPPKPTKLYRGVRQRHWGKWAEIRLPKNTRLWLGTFTAEAA ALAYDKAAYKLRGDFARLNFNLRHRGSHIDGEFGQYKPLHSSVDAKLDAICE SLAESQKQKGVGKQHVGSKKRARRPPMEPEVEPPQAIQGSDSRTLETVKGEK NSSPSPVMTESDGSAGSSPLSEITFGEMDNEPQWSIVPENFMLQKYPSEIDW ASILS

Estas secuencias se emplearon para mapear las regiones promotoras putativas de ambos genes. Para ello, se realizó un BLAST contra el navegador PHYTOZOME (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Se seleccionaron las regiones de ~2 000 pb río arriba del marco abierto de lectura de cada gen. Este mismo procedimiento se realizó para cada una de las secuencias ortólogas tanto de RAP 2.4 como de DREB2, las cuales fueron obtenidas del trabajo de (Arroyo-Herrera *et al.*, 2015). Posteriormente, se realizó el análisis de motivos sobre- representados empleando MEME (http://meme.sdsc.edu/meme4_6_0/intro.html) y TOMTOM (<http://meme.nbcr.net/meme/doc/tomtom.html>), con el fin de localizar nuevos elementos e identificar los ya descritos, respectivamente. Además, las regiones promotoras de RAP2.4 y de DREB2 se sometieron en PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), para identificar motivos descritos previamente. Se generaron manualmente gráficos a escala para posicionar cada uno de los motivos encontrados (tanto los obtenidos por MEME como por PLACE) en los promotores de DREB2 y de RAP 2.4, eliminando los sitios redundantes. Finalmente, a partir de los motivos sobre-representados se encontró a algunos ya caracterizados los cuales participan en la regulación de metabolismo y en la respuesta a estrés.

2.2.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE DREB2A Y RAP2.4A Y SU RELACIÓN CON LOS ELEMENTOS REGULATORIOS DE SUS SECUENCIAS PROMOTORAS

Con el objetivo de evaluar la presencia de elementos regulatorios conservados en las regiones promotoras de los genes ortólogos a DREB2 y RAP 2.4a, se filtraron las secuencias proteicas de sus ortólogos y se extrajeron las regiones promotoras putativas. Las secuencias proteicas fueron tomadas de las bases de datos UNIPROT (www.uniprot.org), mientras que las secuencias promotoras se obtuvieron de las bases ENSEMBL PLANTS (<http://plants.ensembl.org>) y PHYTOZOME (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Sin embargo, antes de extraer las regiones promotoras se reconstruyeron filogenias con las secuencias proteicas para ambos genes y sus respectivos ortólogos. Para ello, primero se hizo un alineamiento múltiple de secuencias para analizar el estado de conservación de los residuos con MUSCLE, en este caso se consideró emplear especies de ambos grupos de plantas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, haciendo un total de 15 especies para DREB2 y 14 especies para RAP2.4A.

Finalmente se hizo la reconstrucción filogenética usando el programa MEGA 7.0, empleando el método de Maximum Likelihood para inferir las relaciones evolutivas de los ortólogos de DREB2 y el método de Neighbor Joining para los ortólogos de RAP2.4A, para ambos casos se usó a *Physcometrella patens* como outgroup.

2.3 RESULTADOS

Los elementos reguladores en *cis* son secuencias de DNA funcionales que por su naturaleza modular y/o combinatoria controlan de manera precisa el patrón de expresión espacio-temporal de los genes. En este sentido, la función de un promotor es normalmente determinada por la acción de múltiples elementos reguladores como los elementos en *cis*. En este trabajo mediante el empleo de herramientas bioinformáticas, se analizaron las regiones promotoras putativas de los genes DREB2 y RAP2.4A de *Carica papaya*, para ello, primeramente se usó la base de datos PLACE y PLANT CARE con el fin de ubicar aquellos motivos que tienen una función regulatoria y que han sido descritos previamente, con MEME suite se descubrieron un total de diez motivos sobre-representados, de los cuales sólo tres de ellos están caracterizados, basados en la comparación de motivos hecha por TOMTOM. Todos los motivos identificados se representaron en un esquema con barras de colores, en el que cada color representa un motivo diferente (figura 2.2). Para éste análisis, en ambos promotores el elemento ABRE (ACGTGGC) fue el más es el más sobresaliente en cuanto a frecuencia y valor estadístico (con un Valor-E < 0.05), seguido del motivo GT1 (GAAAAA) y CGCG-box (figura 2.3). En cuanto a los motivos predichos no caracterizados no se pudo asociar con algún elemento en *cis* puesto que no se encontraron reportes que lo relacionen, de tal manera que estos motivos podrían tratarse de nuevos elementos reguladores, por lo que caracterizarlos resultaría interesante.

También se reconstruyeron árboles filogenéticos con los ortólogos a las proteínas DREB2 y RAP2.4A, la inferencia se hizo con el programa MEGA 7.0 y el resultado mostró una visible separación en los grupos de monocotiledóneas y dicotiledóneas (figuras 2.4 y 2.5). En función del análisis anterior, con los promotores de los genes codificantes para estas proteínas, se hizo la búsqueda de motivos con MEME y TOMTOM para comparar las relaciones que pudiesen guardar según el tipo de motivos encontrados. Como resultado, también se encontraron diferencias entre los taxones de plantas en relación al tipo de motivos. Por ejemplo en caso de los promotores de los ortólogos de DREB2, en el grupo de las monocotiledóneas la frecuencia de motivos fue de los tipos 1, 4, 6 y 10, mientras que para el grupo de dicotiledóneas, lo fueron los motivos 2 y 4 (figura 2.6). Para los ortólogos de RAP2.4A, en monocotiledóneas los motivos más representativos fueron el motivo 1, motivo 4, motivo 6 y motivo 7, y para dicotiledóneas fueron el motivo 2, motivo 3 y el motivo 4 (figura 2.7). Cabe mencionar que al menos para este análisis, los motivos encontrados en promCpDREB2 fueron el 2, 7, 8 y 9 (figura 2.6), y en promCpRAP2.4A, los motivos 1, 2, 3 y

4 (figura 2.7), resultados que son disímiles en comparación de los motivos descubiertos al hacer el análisis de manera individual, a excepción de los motivos 3 (ABRE) y 4 (tipo MYB) del promCpRAP2.4A.

La evaluación global de motivos en los promotores de los ortólogos, conllevó a elegir los 3 primeros motivos con los valores de E más bajos y se procedió a investigar sobre su función y el tipo de factores de transcripción que los reconoce, aun si estos elementos no se ubicaran en *Carica papaya*. Para cada motivo, las descripciones se arreglaron en cuadros, para los promotores de los ortólogos de DREB2, el motivo 1 (cuadro 2.4), el motivo 2 (cuadro 2.5), el motivo 3 (cuadro 2.6), así para los ortólogos de RAP2.4A, el motivo 1 (cuadro 2.7), el motivo 2 (cuadro 2.8) y el motivo 3 (cuadro 2.9). La gran mayoría de los elementos hallados presentan un grado considerable de conservación entre los promotores ortólogos, con fines visuales, se presentan las secuencias crudas del análisis arrojado para los motivos 1, 2 y 3 de los ortólogos de DREB2 y RAP2.4 (cuadros 2.2 y 2.3, respectivamente).

No obstante, con la base de datos de PLACE, se logró reconocer otros motivos que no fueron predichos con MEME y TOMTOM, como el elemento DRE (A/GCCGAC), elementos tipo MYB (GTTAGTT), MYC, W-box ((C/T)TGAC(T/C)), GCC-box (AGCCGCC), G-box (CACGTG), MYB core (AACGG), encontrados con regular frecuencia en ambos promotores, así como el elemento de respuesta a osmolaridad (ACTCAT), el elemento de respuesta a ABA (CAAACACC) y el elemento GT-1 (GAAAAA).

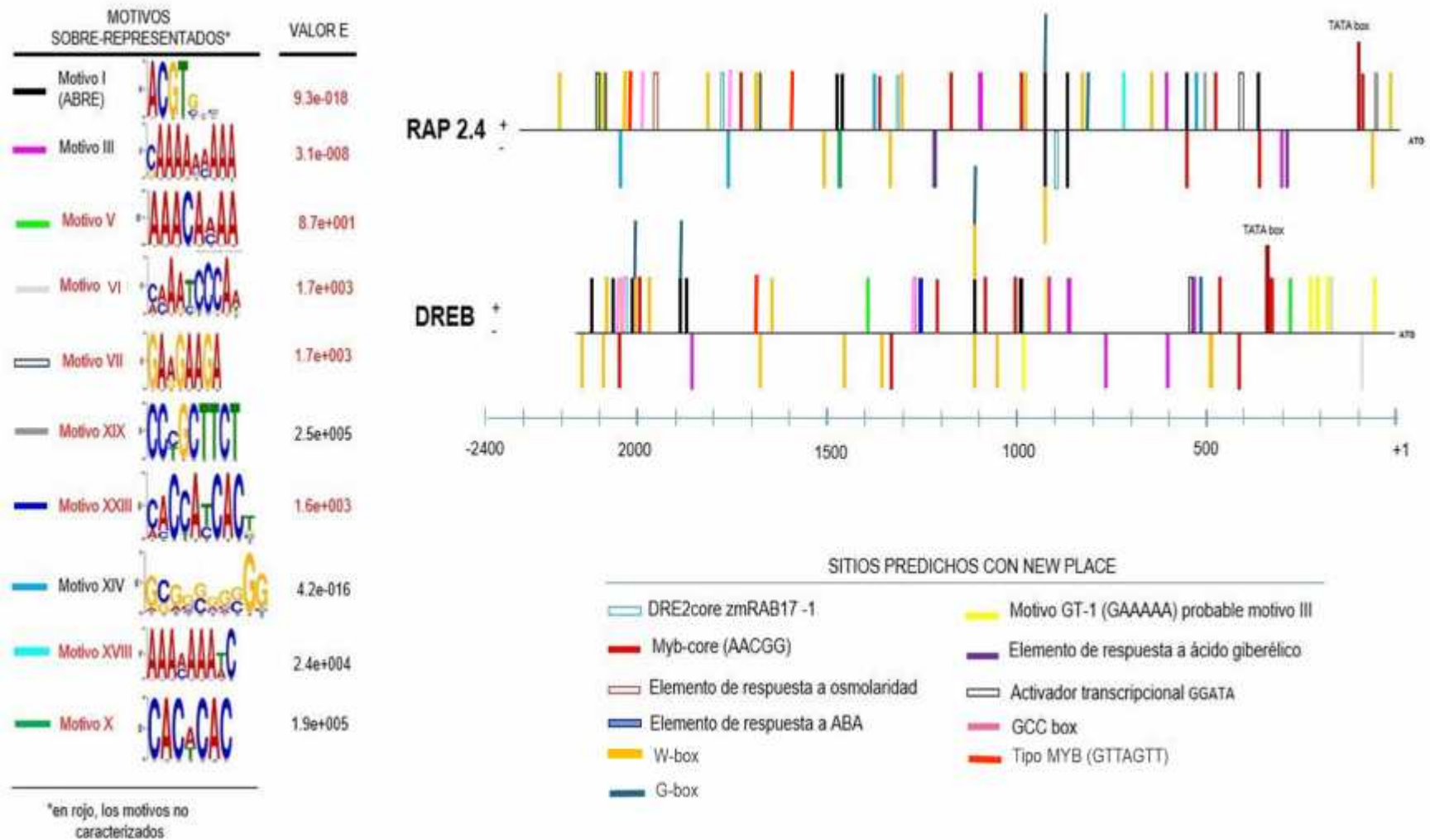


Figura 2.2 Ubicación de sitios de unión de factores de transcripción en los promotores DREB2 y Rap2.4A de *Carica papaya*. Cada color representa un motivo diferente. El análisis fue hecho con las herramientas de MEME, TOMTOM, PLACE y PLANTCARE.

MOTIVOS SOBRE-REPRESENTADOS*	FT	FUNCIÓN	ESPECIE	FUENTE
 Motivo I (ABRE)	BZR1	Brasinoesteroides ,desarrollo	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Wang <i>et al.</i> , 2013
	ABF1	ABA, frío		Choi <i>et al.</i> , 2000
	atMYB84	Metabolismo, desarrollo, estrés		Romero <i>et al.</i> , 1998
	MYC3, MYC4	Jasmonato		Fernández-Calvo <i>et al.</i> , 2011
	HMG-I/MADS	Desarrollo, floración		Riechmann <i>et al.</i> , 1996
	FLC/MADS	Floración		Deng <i>et al.</i> , 2011
 Motivo III	ATMYB2	Estrés hídrico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Urao <i>et al.</i> , 1993
 Motivo XIV	PTI4 EFR	Respuesta a Jasmonato	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Chakravarthy <i>et al.</i> , 2003

Figura 2.3. Motivos sobre-representados en las regiones promotoras de Dreb2a y Rap2.4A de *C. papaya*.

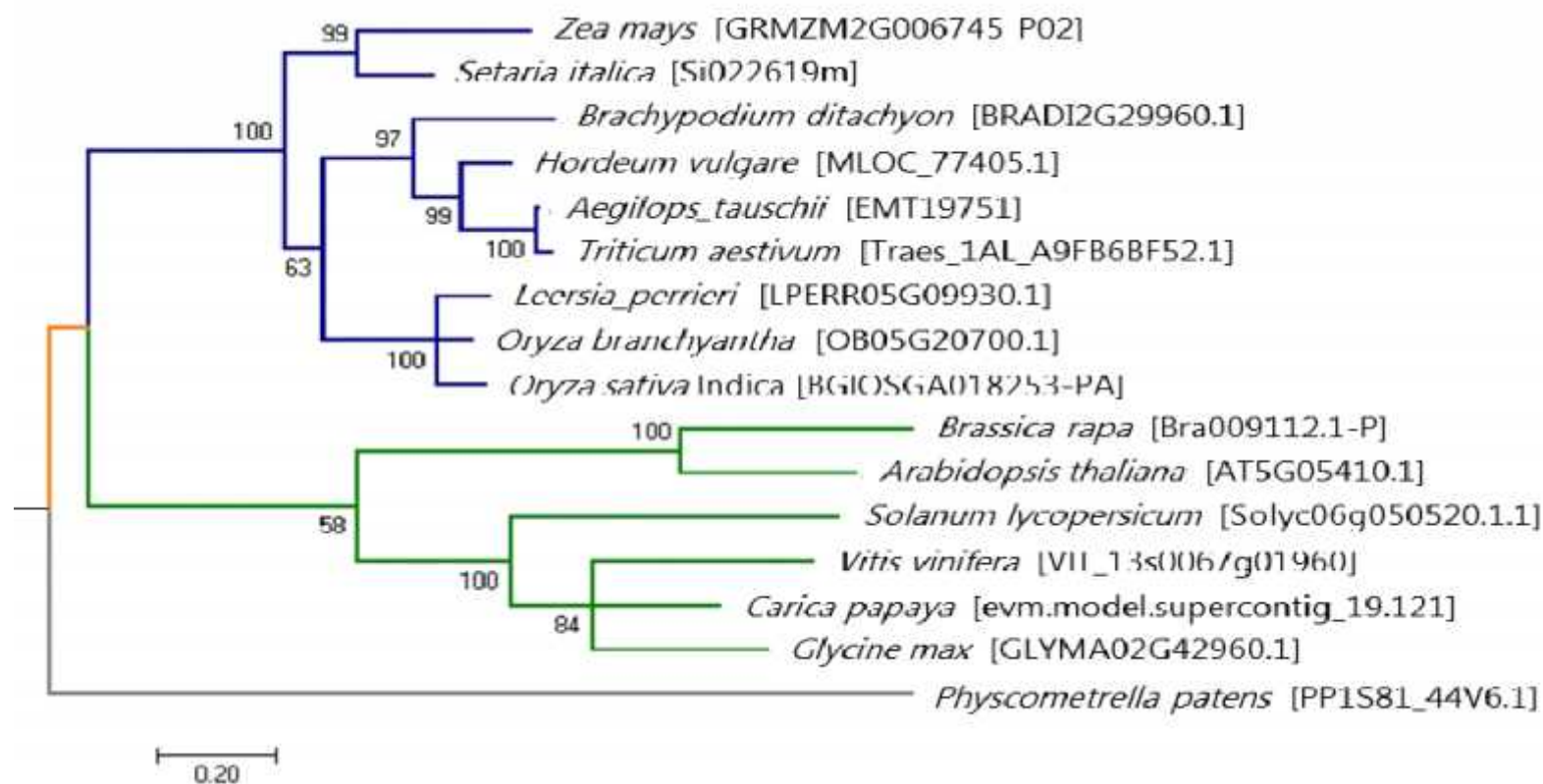


Figura 2.4. Inferencia filogenética de DREB2 de *Carica papaya* y de las secuencias proteicas ortólogas de dicotiledóneas y monocotiledóneas. La construcción se ajustó de acuerdo al método de Maximum Likelihood con el modelo Jones-Taylor-Thornton y una prueba de 1000 Bootstrap.

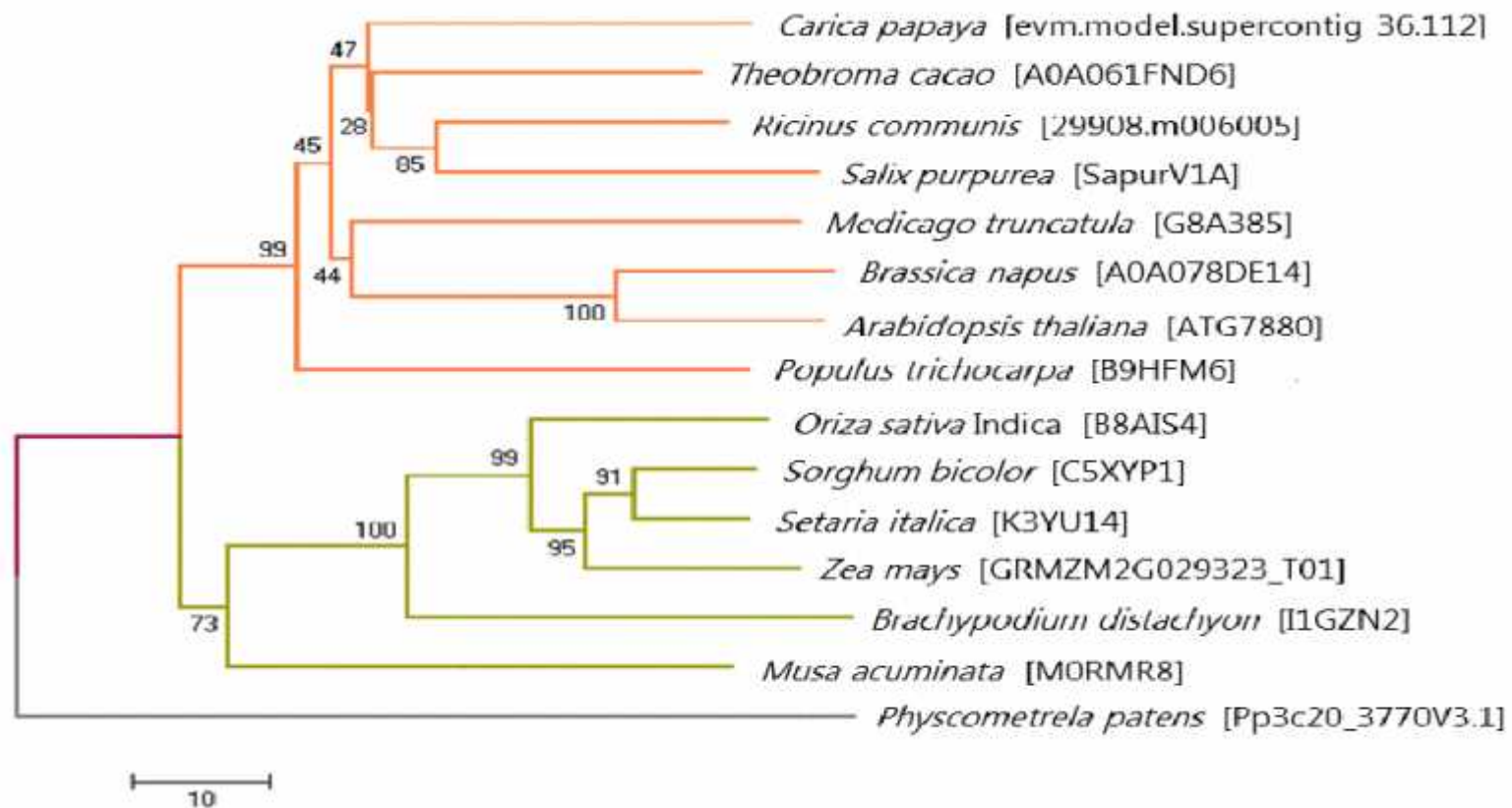
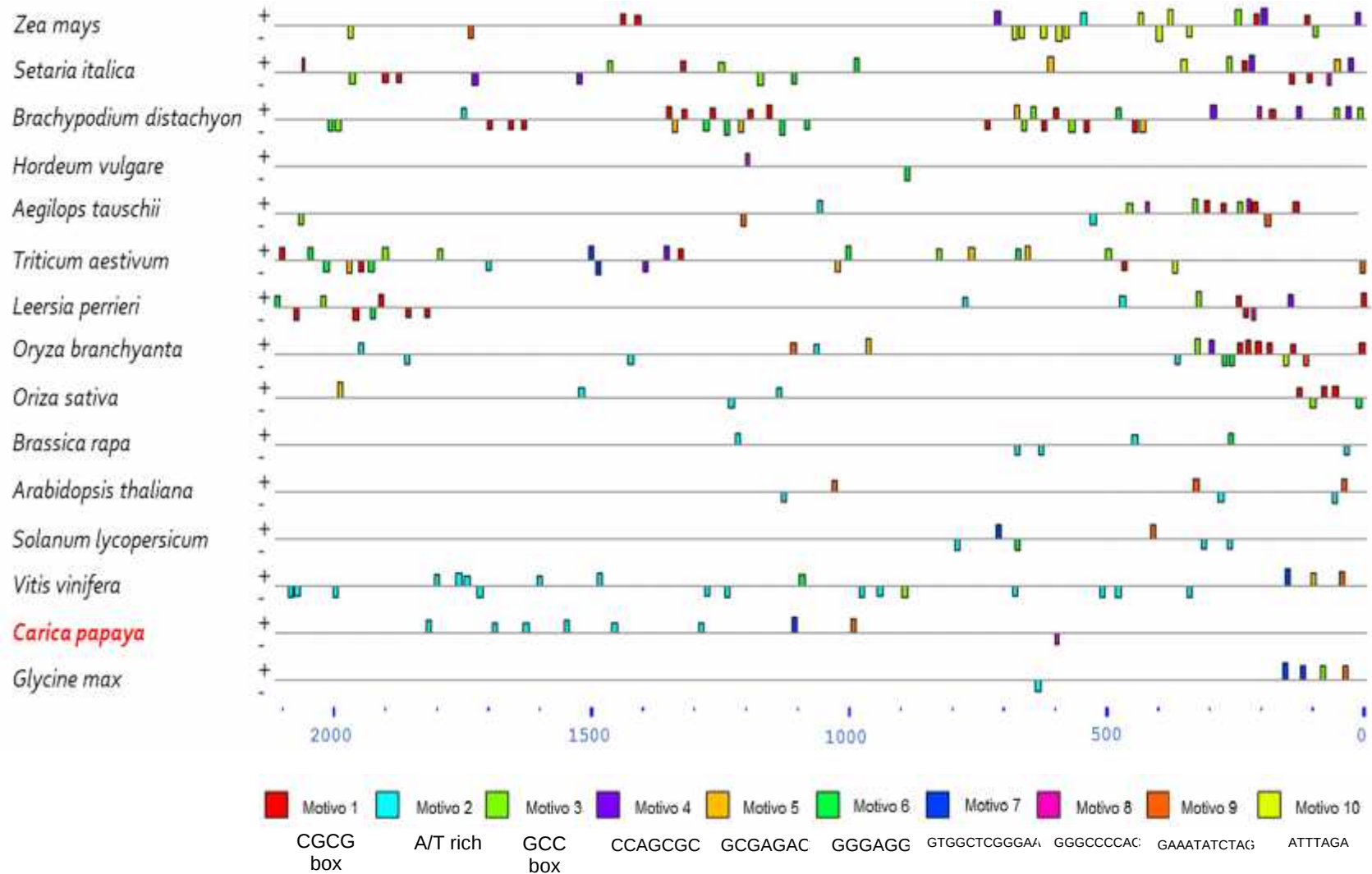
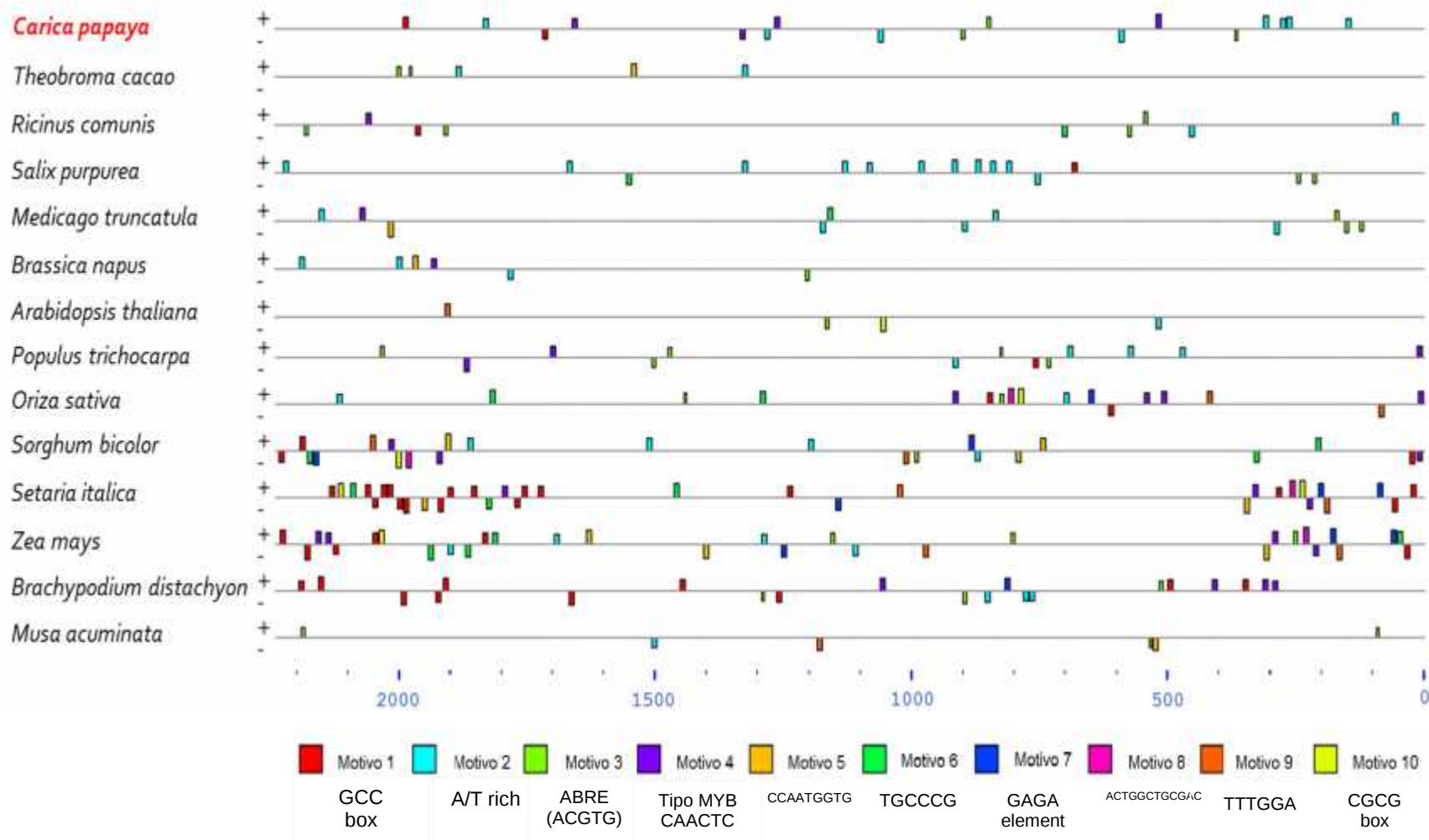


Figura 2.5. Reconstrucción del árbol filogenético para RAP2.4A de *Carica papaya* con sus respectivos ortólogos, en él se aprecia la separación diferencial de los taxones Se empleó el método de Neighbor Joining con el modelo de Sustitución y 1000 bootstrap.



2.6. Elementos reguladores encontrados en las regiones promotoras de los ortólogos de DREB2 de *Carica papaya*.



2.7. Elementos reguladores distribuidos en las regiones promotoras de los ortólogos de RAP2.4A de *Carica papaya*.

Cuadro 2.2. Elementos reguladores putativos en los promotores de los ortólogos de DREB2 de *Carica papaya*. Como muestra representativa, se consideraron los tres primeros motivos con los valores más bajos de *E*-value (<0.05) para observar la conservación de secuencias.

Motivo	Logo	E-value	Localización				
			Especie	Cadena/Comienzo	p-value	Sitios	
1		3.3e-013	<i>B. distachyon</i> +	953	1.68e-7	GGCTGGTCTC	GCAGCACC ^{0.9} CC ^{0.9} GACTATGAAA
			<i>O. brachyantha</i> +	1880	2.74e-7	CCCACCGTGA	CC ^{0.9} CC ^{0.9} CCACC ^{0.9} GCAGGTGGGC
			<i>L. perrieri</i> -	37	4.72e-7	CAGATCCGAT	CC ^{0.9} CCACC ^{0.9} CC ^{0.9} CGAGGCGTCT
			<i>L. perrieri</i> +	2104	5.55e-7	AGATCCTCGA	C ^{0.9} CCACC ^{0.9} CC ^{0.9} GATCGGGTCG
			<i>L. perrieri</i> +	202	8.60e-7	ACCTCCCTGC	CCACC ^{0.9} CC ^{0.9} CC ^{0.9} GGGCTACTCT
			<i>T. aestivum</i> +	11	8.60e-7	GTCGTCTGTTG	C ^{0.9} CC ^{0.9} TC ^{0.9} CC ^{0.9} AACCTGGGCC
			<i>B. distachyon</i> -	1662	1.01e-6	GACGAATCAG	CCAGCACC ^{0.9} CC ^{0.9} TACTTCTCA
			<i>B. distachyon</i> +	759	1.17e-6	GTAATATTTT	GCAGCACCACC ^{0.9} TCTTGGCCTC
			<i>L. perrieri</i> -	153	1.66e-6	TAGTGCCGCG	CTCCCC ^{0.9} CC ^{0.9} ATGAGACGAG
			<i>A. tauschii</i> +	1800	1.87e-6	GGGAAGTTTC	CCC ^{0.9} CACCACC ^{0.9} CACAGCTGAC
			<i>B. distachyon</i> -	1568	1.87e-6	GCAGTAGCAA	CCC ^{0.9} CC ^{0.9} CC ^{0.9} CGTACATCAC
			<i>O. brachyantha</i> +	1900	2.43e-6	CGGCAGGTGG	CCCCCACC ^{0.9} CC ^{0.9} AGATATTTTC
			<i>T. aestivum</i> -	163	3.02e-6	CGATTGCTAT	CTCCC ^{0.9} CC ^{0.9} CC ^{0.9} GTGGTCATCG
			<i>B. distachyon</i> -	1485	3.70e-6	TGCATGCCAG	CTCCC ^{0.9} CC ^{0.9} CC ^{0.9} TTGCCGAACC
			<i>B. distachyon</i> +	843	3.70e-6	GCCGCCCTCT	C ^{0.9} CC ^{0.9} CACC ^{0.9} CC ^{0.9} TTGGACTCTC
			<i>Z. mays</i> +	1897	4.17e-6	CAAAGCGAAA	CCC ^{0.9} CACCTCC ^{0.9} ATCCAGCGCA
			<i>O. brachyantha</i> +	2101	4.71e-6	AACCTAGTGG	C ^{0.9} ACCACC ^{0.9} CC ^{0.9} CC
			<i>O. brachyantha</i> +	1921	5.26e-6	GAGATATTTT	CC ^{0.9} TCCC ^{0.9} CC ^{0.9} GATCAGGAAG
			<i>A. tauschii</i> +	1973	6.35e-6	GCTATAAATA	GG ^{0.9} CCCC ^{0.9} GG ^{0.9} TGAGCGCCTG
			<i>S. italica</i> +	1874	6.35e-6	TCCTTGCAAA	GG ^{0.9} CACGACC ^{0.9} GTCCAGCGCA
			<i>A. tauschii</i> +	1893	6.93e-6	CGGGCCCCAC	GC ^{0.9} CCACC ^{0.9} CCC CGCACCGGAG
			<i>S. italica</i> +	787	6.93e-6	TCGCTCGCCT	GCACCCACACC ^{0.9} AGCCAATCTT
			<i>O. Sativa</i> +	2048	7.64e-6	AGATATTTTC	CC ^{0.9} ACC ^{0.9} CC ^{0.9} GATCAGGAAG
			<i>O. Sativa</i> +	2026	7.64e-6	CTGACATCTA	GGCCCCACC ^{0.9} CC ^{0.9} AGATATTTTC
			<i>L. perrieri</i> +	1862	7.64e-6	TTCCCCAGTG	CC ^{0.9} CC ^{0.9} CCACC ^{0.9} TGGGCCGCCC
			<i>S. italica</i> -	1965	8.45e-6	CGTCTGTGCT	GGGG ^{0.9} CCC ^{0.9} CCC ^{0.9} TCAGAGGGAG
			<i>T. aestivum</i> +	783	9.35e-6	AAGTCCATCT	CCCC ^{0.9} CC ^{0.9} CCT GTTGGAAATA
			<i>B. distachyon</i> +	1508	9.35e-6	TGGCATGCAC	CC ^{0.9} GGCAGG ^{0.9} CC ^{0.9} AGGATGATGG
			<i>B. distachyon</i> -	1376	1.03e-5	TCGTTCTGTCG	CCACCACC ^{0.9} GG ^{0.9} CATCCGTCAC
			<i>Z. mays</i> +	671	1.03e-5	TATAGGCACA	CC ^{0.9} TCACCACC ^{0.9} GAGCAGCCGA
			<i>O. brachyantha</i> +	1865	1.37e-5	CCTCCCAGAG	CCACC ^{0.9} CCCC ^{0.9} TGAGCCGCCC
			<i>B. distachyon</i> -	479	1.37e-5	ATCGATCGGA	CCAG ^{0.9} C ^{0.9} CCACC ^{0.9} TGCGTGGCTC
			<i>L. perrieri</i> -	291	1.51e-5	AAGGAGTGAG	GC ^{0.9} CCAT ^{0.9} CC ^{0.9} CCGACGCCAA
			<i>B. distachyon</i> +	1927	1.51e-5	TCGGCTGGGT	CC ^{0.9} CC ^{0.9} CCTC ^{0.9} GAAGAAGGAA
			<i>B. distachyon</i> +	917	1.65e-5	TCGCAACACA	CCC ^{0.9} CCTCCCC ^{0.9} TCGAAGCACT
			<i>B. distachyon</i> +	789	1.65e-5	TCGCAACACA	CCC ^{0.9} CCTCCCC ^{0.9} TCGAAGCACT
			<i>S. italica</i> -	1999	1.65e-5	GTATTCTGGT	GG ^{0.9} CTC ^{0.9} CC ^{0.9} CC ^{0.9} GTCCACGGGG
			<i>A. tauschii</i> +	1833	1.79e-5	TCACGCGTCC	CCAG ^{0.9} CCTCACC ^{0.9} CCACGCACCA
			<i>S. italica</i> -	210	1.79e-5	AACACTACCT	CGGG ^{0.9} CACCCCC ^{0.9} TCGGTAGGTT
			<i>B. distachyon</i> -	453	2.11e-5	TGGCTCGGAG	GCACCC ^{0.9} CC ^{0.9} CC ^{0.9} GACGTACGCT
			<i>Z. mays</i> +	699	2.11e-5	CCGAAAAGAT	GCACCAACC ^{0.9} CT ^{0.9} ATTGTCCAAA
			<i>O. brachyantha</i> +	1967	2.49e-5	CTATAAATAC	CCACCCACACCC ^{0.9} ACGGGCTCAG
			<i>S. italica</i> -	236	2.49e-5	CTGATCTCGG	CGAG ^{0.9} CCCCAC ^{0.9} C ACTAAACACT
			<i>L. perrieri</i> -	1875	2.70e-5	CCACGTGTAA	CCGGG ^{0.9} C ^{0.9} CC ^{0.9} ACGGTGGGCG
			<i>L. perrieri</i> -	254	2.70e-5	AGCTCAGTGA	CTCC ^{0.9} TC ^{0.9} CC ^{0.9} ATGTTGCGGG
			<i>B. distachyon</i> -	412	2.70e-5	CGGACGGCTC	CC ^{0.9} C ^{0.9} TC ^{0.9} CC ^{0.9} ATGCAGCAAT
			<i>Z. mays</i> +	1994	2.94e-5	ACACACGGAA	CCCACC ^{0.9} C ^{0.9} ACC ^{0.9} AACCCGTGAC
			<i>O. Sativa</i> +	1978	3.46e-5	CGAAGCTTCT	CCCCCACC ^{0.9} CAC ^{0.9} GGCTTACGTC
			<i>T. aestivum</i> -	1641	3.46e-5	TCCTTCGCCG	CCC ^{0.9} CCTC ^{0.9} CCA CGCCACGCTA



1.6e-002

<i>O. brachyantha</i> +	1782	7.08e-8	GTTTGCTTAG	GC	CCAA	GTCTC	GCGAACCTTC
<i>L. perrieri</i> +	1784	7.08e-8	GCTTGCTTAG	GC	CCAA	GTCTC	GCGAAGCTTC
<i>S. italica</i> +	1844	7.08e-8	GTTTGCTTAG	GC	CCAA	GTCTC	TCGATCCTTC
<i>Z. mays</i> +	1861	7.08e-8	GTTTGCTTCG	GC	CCAA	GTCTC	CAGATCCTTC
<i>G. max</i> +	2025	2.94e-7	GACCAAGAAA	GC	CCAC	GTCA	CACATTTCTG
<i>A. tauschii</i> +	1778	4.36e-7	GTTTCCTTCG	GC	CCAA	GTCTC	GGGAAGTTTC
<i>B. distachyon</i> -	1539	1.21e-6	CACCATCGTT	GC	CCAA	GTCTC	GTTTCAATCC
<i>T. aestivum</i> +	210	2.15e-6	GTCTGCGTAA	GC	CCAA	GTCTC	TCCTCTCTTC
<i>S. italica</i> -	936	2.15e-6	AAGGCAGCAG	GG	CCAA	GTCTC	CCCTAAGCCA
<i>B. distachyon</i> +	1464	3.01e-6	GTGCGGAAAT	GC	CCAA	GTCTC	GTTTCGGCAAC
<i>A. tauschii</i> -	47	3.67e-6	AAGTTCGGCC	GC	CCAA	GTCTC	TGTAGCCACG
<i>B. distachyon</i> -	119	3.67e-6	GCGCCGGAGA	GC	CCAA	GTCTC	ACAGGGTGGC
<i>Z. mays</i> -	2011	4.95e-6	TTGGATTCTC	GC	CCAA	GTCTC	GGGTTGGGTC
<i>L. perrieri</i> +	90	5.47e-6	CTACGCAGCA	GT	CCAA	GTCTC	CTCGCATCTG
<i>B. distachyon</i> -	1446	5.47e-6	CCGCATTTCC	GC	CCAA	GTCTC	CGCCTCGTCA
<i>S. italica</i> +	645	6.63e-6	TCTATGCCCTT	GT	CCAA	GTCTC	CACCTAGCCG
<i>B. distachyon</i> +	2051	7.86e-6	AAGCTTCCAG	GC	CCAA	GTCTC	AGCTTACATA
<i>V. vinifera</i> -	1215	8.46e-6	TCTTTGGGGT	GC	CCAA	GTCTC	TTTCCATGTA
<i>T. aestivum</i> +	1610	8.46e-6	AACCCGCAGC	GC	CCAA	GTCTC	GACAAGCGST
<i>T. aestivum</i> +	316	9.25e-6	ACCAGCCGGA	GC	CCAA	GTCTC	CGTTTATATA
<i>A. tauschii</i> +	1864	9.25e-6	AGGCCCACGC	GG	CCAA	GTCTC	TTACATCCGG
<i>S. italica</i> -	146	9.25e-6	TACAGAAGGG	GC	CCAA	GTCTC	GCGTAGCGGC
<i>B. distachyon</i> +	2098	1.07e-5	AACCTTCCCT	GC	CCAA	GTCTC	GCGCG
<i>O. Sativa</i> l -	2005	1.33e-5	CTAGATGTCA	GT	CCAA	GTCTC	ACCGTGACGT
<i>T. aestivum</i> +	1282	1.41e-5	CCCGACCTGC	GT	CCAA	GTCTC	AAGACGGGAT
<i>A. tauschii</i> +	1651	1.61e-5	TATCGACTCA	CCCC	CCAA	GTCTC	TGGCCACATG
<i>S. italica</i> +	861	1.83e-5	ATCTTGTCAT	GGGG	CCAA	GTCTC	GTTAAAGTTT

Cuadro 2.3. Elementos reguladores descubiertos y sobre-representados para los ortólogos de RAP2.4A de *Carica papaya*. Los motivos predichos mantienen un considerable grado de conservación.

Motivo	Logo	E-value	Localización				
			Especie	Cadena/Comienzo	p-value	Sitios	
1		1.1e-019	<i>S. italica</i>	-	251	6.84e-8	CGCCCGAATC GCCC C C C C ACCCCGTGCG
			<i>Z. mays</i>	-	58	9.51e-8	AAATCGTCCG C C C C C C C C GTGGTTGCGG
			<i>Z. mays</i>	-	2197	2.02e-7	CCAGGCTTGA G C C C T G C A C C GAAGCCAAGC
			<i>S. italica</i>	-	2172	2.02e-7	CCAGGCTTGA G C C C T G C A C C GAAGCCAAGC
			<i>S. bicolor</i>	+	50	2.02e-7	GGCTTGATGA G C C C T G C A C C GAAGCCAAGC
			<i>Z. mays</i>	+	10	2.73e-7	CGCAGCGTC C C C C C C C C C ACTCTCGCCA
			<i>S. italica</i>	-	318	2.73e-7	TCCCGCGAGA C C C C C C C C C CTTCTGGTTT
			<i>B. distachyon</i>	-	246	3.58e-7	AAGGATCGCG C C C C C C C C C GGAGATGCAT
			<i>B. distachyon</i>	-	572	4.06e-7	ATGATCGTGG C C C C T G C A C C GAGCAGATC
			<i>B. distachyon</i>	+	85	5.40e-7	CCCATGCATC C C C C C C C C C CCGCACAAAT
			<i>S. italica</i>	+	221	7.75e-7	CGTCCCGGCC C A C C C C C C C TCCCTCGCG
			<i>S. bicolor</i>	-	2207	7.75e-7	TCCCGTCCGT G C C C T G C T C C C GCGGCTCGGA
			<i>S. italica</i>	+	177	8.80e-7	CGATCGCCCT C C C C T C C C C ACGCACGCGC
			<i>S. italica</i>	+	208	9.84e-7	CCTGGGCACA C C A C T G C C C C CCACGGCGCG
			<i>B. distachyon</i>	+	328	1.11e-6	GCGCGACCCA C C C C T G C C C C AACGCTATGG
			<i>S. italica</i>	+	2210	1.97e-6	ATAAAGCCCT G C C C C C C C C CTTTCTTCCC
			<i>B. distachyon</i>	-	975	2.44e-6	GCAGGTCCAA C C C C T G C C C C CTGTACACAC
			<i>B. distachyon</i>	-	314	2.98e-6	CCACGGCGTG G T C C C C C C C TCTTGGTCTGA
			<i>O. Sativa l</i>	-	1621	2.98e-6	GCGCCACTTT G C C C T G C A A C AACGCAACGC
			<i>S. italica</i>	+	384	4.50e-6	GTGCGGGCCT C C C G G T C C C CGGCCACCAA
			<i>B. distachyon</i>	+	1736	4.94e-6	GCACCACTCC G C C C G C C C C TCCCCAGCGA
			<i>S. italica</i>	-	238	4.94e-6	CGCGCGCGCA C C C C T G C C C A GGGGAGCGCG
			<i>Z. mays</i>	+	404	5.43e-6	CATCGCGCCT C A C C C C C C C ATCAATGTGA
			<i>S. bicolor</i>	-	9	5.43e-6	AAAAGGGCCT G C C C C C C C C TTTCTTCC
			<i>S. italica</i>	+	107	5.96e-6	GTGCGACACG A C C C G C A C C C CAACGGCGCG
			<i>C. papaya</i>	+	251	6.53e-6	TTTCAAGACT T G C C C C C C C GACATGCTCC
			<i>Z. mays</i>	+	190	8.64e-6	GGACCAGAAC C C C C C C T A C CGCGCTCGTG
			<i>S. italica</i>	+	998	8.64e-6	ACAGTGATGA C C C C T C C C C CTCCTCACTC
			<i>O. Sativa l</i>	+	1385	8.64e-6	CACAGTGTGG C T A C T G C A C A CCCTGTCTTG
			<i>B. distachyon</i>	+	1883	1.02e-5	GAGAGACGCC C T C C C C C C C ACCACACCAC
			<i>B. distachyon</i>	+	789	1.02e-5	TCTTCGTTCG G T C C C C C C C GTGGCGCGAC
			<i>R. communis</i>	-	274	1.02e-5	ATTTAATTTC C A C C C C C C C TGAATTCACT
			<i>S. italica</i>	+	512	1.12e-5	GGTCGTCTGC C C C C C C T C A C C GCCTCAGATA
			<i>S. italica</i>	+	482	1.12e-5	GACGTCTGCG T G C C T G C C C C GCTGTGGTGG
			<i>S. italica</i>	-	467	1.32e-5	CACGGCAGCG C A C C T G C A C A CGCTCGCCGC
			<i>S. italica</i>	+	337	1.69e-5	GCCTCTCGCG G A C C C C A C A CCACACGGAT
			<i>C. papaya</i>	-	523	1.69e-5	CTTCGTTTGC G C C C C G T T C TACCGACACA
			<i>B. distachyon</i>	+	48	1.83e-5	GTGTACCGG A C C C C C A C A GATCGAGACG
			<i>Z. mays</i>	-	115	1.83e-5	AGGTGAAGCG C A C C C C C A C TTTGGGACGG
			<i>S. italica</i>	-	191	1.83e-5	CGTCGTGTGO C C A C C C C T C GTGCGCCGAC
			<i>P. trichocarpa</i>	-	1475	2.13e-5	TAATATGGAG G C C C C C A T A C GATTTCAAAC
			<i>S. purpurea</i>	+	1552	2.13e-5	TTATCAACTG C C C C T C C C C A ACCTTATCCC
			<i>S. italica</i>	+	1948	3.12e-5	AGACCACCTA C A C C C C A C A GTGGCAGATA

2		8.4e-013							
			<i>M. truncatula</i>	-	1944	9.19e-7	TTTTTTTAT	TTTTATTTTTT	AATAATTAC
			<i>C. papaya</i>	+	1923	9.19e-7	TTTCAAGGCT	TTTTATTTTTT	TTTCGTGCT
			<i>C. papaya</i>	-	1175	9.19e-7	GGCATCATTT	TTTTATTTTTT	TTTAACTTT
			<i>C. papaya</i>	-	1643	1.84e-6	ACTCTAATTT	TTTTTTTTTTT	CTCTCTGGT
			<i>S. bicolor</i>	+	724	2.38e-6	CCATATCCCT	TTTGATTTTTT	TATTGTTGCC
			<i>S. purpurea</i>	+	1364	2.38e-6	TACATCTTGA	TTTGATTTTTT	TTTAAATTTA
			<i>S. purpurea</i>	+	1318	2.38e-6	AATCTTGATT	TTTGATTTTTT	ATAATAGCCG
			<i>B. distachyon</i>	-	1380	2.93e-6	CTTTCCTCTG	TTTTCTTTTTT	AGAAAGGGCG
			<i>S. bicolor</i>	+	375	2.93e-6	GAATTTGCC	TTTTCTTTTTT	TAATCAGGAA
			<i>A. thaliana</i>	-	1714	2.93e-6	ACAACCTAAC	TTTTCTTTTTT	AATCCACCTA
			<i>P. trichocarpa</i>	+	1543	3.47e-6	GTCGCTAGAC	TTTGTTTTTTT	ATCTTTCCAC
			<i>O. Sativa l</i>	+	1534	4.34e-6	AAAAAAACCC	TTTTATTTCTT	TTGTATATTT
			<i>S. bicolor</i>	+	1039	5.26e-6	AATTTGAGTT	TTTTATTTATT	TTGAACGTTT
			<i>S. purpurea</i>	+	1424	5.26e-6	GTCGTATATT	TTTTATTTATT	ATTTAAAAAT
			<i>T. cacao</i>	+	912	5.26e-6	GAAAGTTAGG	TTTTATTTATT	ATTTATTTAT
			<i>S. purpurea</i>	+	1255	5.80e-6	AAATTTTGAT	TCTTATTTTTT	ATTAAGTTTT
			<i>S. purpurea</i>	+	19	5.80e-6	ATTATCTTAT	TCTTATTTTTT	TACTTTGCTA
			<i>M. truncatula</i>	+	87	6.72e-6	TTGACATTG	TTTTAAATTTT	TTTTTAAGAA
			<i>S. purpurea</i>	+	1105	6.72e-6	CAATCTTGAT	TTTTAAATTTT	CAAGTATTGT
			<i>R. communis</i>	-	1780	6.72e-6	GAGTTTCTT	TTTTATTTTTT	TTGTTTGAG
			<i>M. truncatula</i>	-	1061	8.35e-6	CGGGCAGCCG	TTTTATCTTTTT	TTGTTTGTGG
			<i>S. purpurea</i>	-	1480	8.35e-6	GATTTTTTTA	TTTTATTTTTT	AGAAAGATTA
			<i>S. purpurea</i>	+	1393	8.35e-6	TAAATCTTTA	TTTTTTTTCTT	ATAATATCCG
			<i>C. papaya</i>	+	1970	8.35e-6	TCCTTTTTTA	TTTTATTTTTT	TAATTTTCGT
			<i>Z. mays</i>	-	1124	9.59e-6	ATTGGTGAGT	TTTTTTTTATT	ATATTGGTCA
			<i>P. trichocarpa</i>	+	1659	9.59e-6	TATTATATTT	TTTTTTTTATT	TTGATGGTTT
			<i>R. communis</i>	+	2176	9.59e-6	AAGAACCAGG	TTTGATTTCTT	GGTAATTTTG
			<i>B. distachyon</i>	-	1467	1.11e-5	TTCCGTGCAT	TTTTATTTTAT	TTTTATTTTT
			<i>B. distachyon</i>	-	1455	1.11e-5	TTATTTTAT	TTTTATTTTAT	TTTCATTTGG
			<i>B. napus</i>	+	238	1.16e-5	GCAAGCTGAA	TCTTTTTTTTT	TGTCAACCAA
			<i>B. napus</i>	+	49	1.37e-5	CTCACACTAT	TTTTATTTTTT	ATTCGTATTA
			<i>S. purpurea</i>	+	912	1.37e-5	CTGACCACCC	TTTTCTTTCTT	TTCTTTTCCC
			<i>S. purpurea</i>	+	570	1.37e-5	GGGGTATTTT	TTTTATTTTTT	AAATATAATG
			<i>Z. mays</i>	+	948	1.48e-5	GCTACCACGC	TTTGAAATTTT	CCCTCCACCC
			<i>S. purpurea</i>	+	1153	1.48e-5	TTATTTTGA	TTTGAAATTTT	GTGAATTTT
			<i>C. papaya</i>	+	2085	1.72e-5	TTGAAACCTC	TTTGATCTTTT	CTGTTGTAGA
			<i>P. trichocarpa</i>	+	1760	1.92e-5	TTTATTGCTA	TTTGTTTTATT	TATATAATTT
			<i>M. truncatula</i>	+	1397	1.92e-5	TCATAAAATG	TTTTTTTTTAT	ATAAACTACC
			<i>M. truncatula</i>	-	1337	1.92e-5	TAAATAAAGC	TTTTTTTTTAT	AAGCCCAATC
			<i>C. papaya</i>	-	953	1.92e-5	ACTGATGGTG	TTTGTTTTATT	TTAGTCATTT
			<i>O. Sativa l</i>	+	121	2.12e-5	GTTCATATTT	TTTCATTTTTT	CATAACTATT
			<i>Z. mays</i>	-	337	2.36e-5	CGACTCGTTT	TTTTATTATTT	AATTTGTGTC
			<i>P. trichocarpa</i>	-	1318	2.36e-5	CTAAGAGCAT	TTTTATTATTT	CCTATGCTAA
			<i>B. napus</i>	-	456	2.36e-5	GAATTTATTA	TTTTTTGTTTT	AAATGATTCTG
			<i>T. cacao</i>	+	355	2.36e-5	TTGAGTTTAT	TTTTCTTTTTT	TTGGGGTTTA
			<i>M. acuminata</i>	-	733	2.73e-5	CCTCTTTTTC	TTTGTTTTTTT	GTCTGATGAA
			<i>S. bicolor</i>	-	1363	2.81e-5	AATCATCTCG	TCTTATTTCTT	GGTCTGTTGC
			<i>C. papaya</i>	+	406	3.15e-5	CATTATAAAA	TTTTTTTTTTA	AAAAAAAAT
			<i>Z. mays</i>	+	543	3.85e-5	CTGAGGTCAA	TTTTTTTTTTT	CTAGTGAAAA
			<i>C. papaya</i>	+	1958	4.09e-5	TAGATCTGAT	TTTTCTTTTTT	TTTTATTTTTT

3

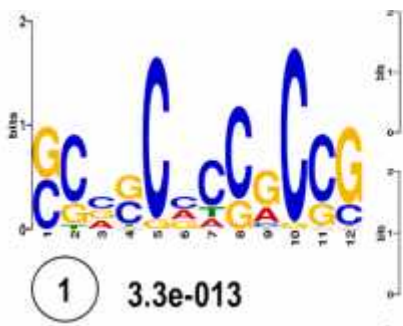


5.1e-003

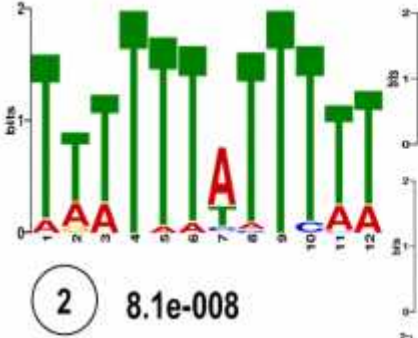
<i>B. distachyon</i>	-	1339	1.28e-6	CTTGGATGCA	ACACGTGGC	GCCACTCCTC
<i>Z. mays</i>	+	1982	1.28e-6	GACAAGGCGC	ACACGTGGC	GGATAAGGAC
<i>R. communis</i>	+	1691	1.28e-6	GCACATTATT	ACACGTGGC	AGAGATCGGA
<i>C. papaya</i>	-	1867	2.56e-6	GATTCTGAAA	ACACCTGGC	TTTCTTAGAA
<i>Z. mays</i>	+	1081	3.85e-6	AACAACCTTA	TCACGTGGC	TACGTAGACT
<i>S. bicolor</i>	-	1245	3.85e-6	GTATCACCTA	TCACGTGGC	TGTGAGGACT
<i>O. Sativa l</i>	+	795	3.85e-6	TACTATACGA	TCACGTGGC	TGTGTTGACC
<i>A. thaliana</i>	-	1072	7.29e-6	TAATTCAAAA	ACACGTGTC	TTTATATTAT
<i>B. napus</i>	-	1033	7.29e-6	TGGTAATGCG	ACACGTGTC	TTTCAAGAGT

<i>C. papaya</i> -	1335	1.84e-5	TCCGTTACCG TCACGTGCC GGTGTGCCT
<i>M. acuminata</i> -	1699	2.13e-5	AGTGGAGGGG ACACCTGGT AGCTGGTGAT
<i>P. trichocarpa</i> +	1409	2.13e-5	AACATGTGTT ACACCTGGT AGCGCATATA
<i>M. acuminata</i> +	52	2.84e-5	GCGACATTCA TCACGTGGT TTGTCGCTGC
<i>B. distachyon</i> +	1719	2.84e-5	CACGGACGAC CCACGTGGC ACCACTCCGC
<i>B. distachyon</i> -	946	2.84e-5	ACTGCGAAGG TCACGTGGT AATAACACCA
<i>R. communis</i> -	60	2.84e-5	CCTGCATGCT TCGCGTGGC TTGGTCTGAT
<i>P. trichocarpa</i> -	1501	3.63e-5	TCATTTTGCT ACACGTGCT ACTTTAATAT
<i>P. trichocarpa</i> +	764	3.63e-5	CAGTGGCCTT ACACGTGTT TGCCTTGGAT
<i>M. truncatula</i> -	2111	3.63e-5	TTGGTTGGTG ACGCGTGTG CTTGTTTATT
<i>S. purpurea</i> -	2019	3.63e-5	TAGGCTGGAT ACACGTGCT GATTGTCCCG
<i>R. communis</i> -	330	3.63e-5	CTGCTCACCA ACGCGTGCC TACTGGCTTT
<i>O. sativa</i> l +	1410	3.76e-5	TGTCCTGAGC ACACGTGGG GCATCCTCAC

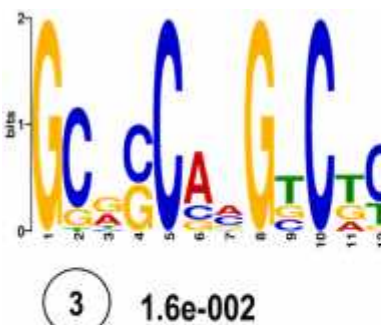
Cuadro 2.4. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 1, observado en los promotores ortólogos de DREB2.

Motivo sobre-representado	Similitud	FT	E-value	Elemento regulador en <i>cis</i> putativo	Función/Referencia
 1 3.3e-013		RAP2.6	1.53e-02	GCC box	En respuesta a patógenos y en respuesta a jasmonato y etileno (Takagi <i>et al.</i> , 2000; Brown <i>et al.</i> , 2003)
		DEAR3	1.95e-02		
		RAP2.3	3.56e-02	CGCG box	En respuesta a ácido salicílico, etileno, ácido abscísico y sequía (Merillón y Ramawat, 2011).
		ERF1	3.72e-01		
		DREB2C	1.69e+00	G box	En respuesta a luz blanca y UV, anaerobiosis, componentes fenólicos y desarrollo (Meier y Gruissen, 1994; Srivastava, 2002)
		MYB55 (2)	2.45e+00		

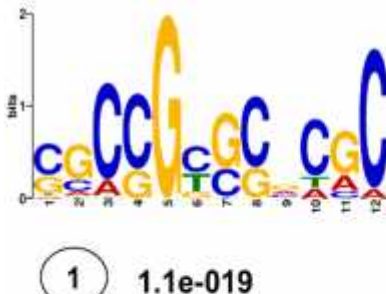
Cuadro 2.5. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 2, observado en los promotores de los ortólogos de DREB2.

Motivo sobre-representado	Similitud	FT	E-value	Elemento regulador en <i>cis</i> putativo	Función/Referencia
		AHL20 (2)	6.07e-01	A/T-rich	Actividad enhancer (Lamb <i>et al.</i> , 1996)
		YAB1	8.32e-01		
		AHL12 (2)	1.19e+00		
		ICU4	4.63e+00		
		WOX13 (2)	1.69e+00		
		RVE1 (2)	2.45e+00		

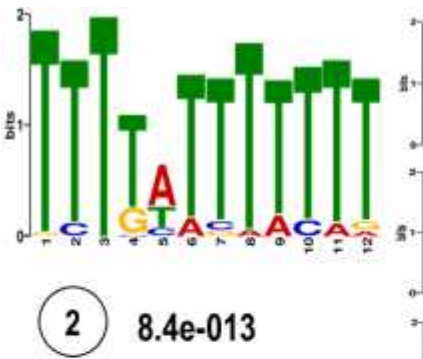
Cuadro 2.6. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 3, observado en los promotores de los ortólogos de DREB2.

Motivo sobre-representado	Similitud	FT	E-value	Elemento regulador en <i>cis</i> putativo	Función/Referencia
 3 1.6e-002	 bZIP60 (2)	6.75e-01	ACGTG (ABRE)	En respuesta a sequía, a salinidad, a ácido absícico y a señales de Ca ²⁺ (Hobo <i>et al.</i> , 1999; Shen <i>et al.</i> , 2007; Finkler <i>et al.</i> , 2007).	
	 ORA47 (2)	8.32E-01			
	 ATERF1	3.32e+00		G box	En respuesta a luz blanca y UV, anaerobiosis, componentes fenólicos y desarrollo (Meier y Gruissen, 1994; Srivastava, 2002)
	 DEAR4 (2)	3.55e+00			
	 RAP2.6	3.81e+00		GCC box	Señalización por Ca ²⁺ , en respuesta a patógenos y etileno (Singh <i>et al.</i> , 2002).
	 RAP2.3	4.08e+00			

Cuadro 2.7. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 1, observado en los promotores ortólogos de RAP2.4A.

Motivo sobre-representado	Similitud	FT	E-value	Elemento regulador en <i>cis</i> putativo	Función/Referencia
 1 1.1e-019		DEAR3	1.48e-01	GCCGAC (DRE)	En respuesta a estrés por frío, a deshidratación y a estrés osmótico (Maruyama <i>et al.</i> , 2011; Roychoudhury <i>et al.</i> , 2013).
		RAP2.6	2.95e-01		
		ORA47 (2)	4.23e-01	GCC box	Señalización por Ca ²⁺ , en respuesta a patógenos y etileno (Singh <i>et al.</i> , 2002).
		RRTF1	4.46e-01	CGCG BOX	En respuesta a ácido salicílico, etileno, ácido abscísico y sequía (Merillón y Ramawat, 2011).
		DREB2C	4.49e-01		
		ATERF1	5.44e-01	G BOX	En respuesta a luz blanca y UV, anaerobiosis, componentes fenólicos y desarrollo (Meier y Gruissen, 1994; Srivastava, 2002)

Cuadro 2.8. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 2, observado en los promotores ortólogos de RAP2.4A

Motivo sobre-representado	Similitud	FT	E-value	Elemento regulador en <i>cis</i> putativo	Función/Referencia
 28.4e-013	     	AHL20 (2) YAB1 AHL12 (3) ary AHL 25 (3) ary ICU4 DAG2	8.54e-01 9.93e-01 1.16e+00 2.01e+00 4.83e+00 6.10e+00	A/T-rich	Actividad enhancer (Lamb <i>et al.</i> , 1996)

Cuadro 2.9. Descripción de la posible función que puede desempeñar el motivo 3, observado en los promotores ortólogos de RAP2.4A.

Motivo sobre-representado	Similitud	FT	E-value	Elemento regulador en <i>cis</i> putativo	Función/Referencia
 3 5.1e-003	     	PIF3 MYC4 MYC3 bZIP60 (2) MYC2 ANAC55	1.56e-01 1.99e-01 2.78e-01 5.42e-01 5.70e-01 2.16e+00	ACGTG(ABRE) G-Box 	En respuesta a sequía, a salinidad, a ácido abscísico y a señales de Ca ²⁺ (Hobo <i>et al.</i> , 1999; Shen <i>et al.</i> , 2007; Finkler <i>et al.</i> , 2007). En respuesta a luz blanca y UV, anaerobiosis, componentes fenólicos y desarrollo (Meier y Gruissen, 1994; Srivastava, 2002)

2.4 DISCUSIÓN

La transcripción de los genes es controlada por los factores de transcripción los cuales se unen a secuencias cortas de DNA conocidas como sitios de unión a factores de transcripción o elementos reguladores en *cis*. Estos elementos usualmente son muy cortos y altamente degenerados, pero en realidad no hay un estimado en el tamaño que puedan tener los elementos regulatorios, hay autores que proponen que son secuencias entre 5 a 10 nucleótidos, entre 5 y 15 u otros concuerdan que están compuestos de 5 hasta 20 pares de bases (Korkuć *et al.*, 2014; Naqvi *et al.*, 2016), aunado a la frecuencia y variabilidad que pueden tener hacen que las predicciones se enmarquen en una situación difícil, por ello con la ayuda de las herramientas bioinformáticas se busca reducir falsos positivos durante el análisis, sin dejar de lado la sensibilidad de las predicciones. En este sentido, muchos programas están disponibles para facilitar la búsqueda de motivos, en el caso de plantas, la plataforma PLACE ha sido una de las más útiles, este tipo de algoritmo analiza una secuencia dada e identifica los posibles sitios de unión de factores de transcripción, identifica cada motivo putativo independientemente, sin considerar la asociación entre motivos para precisar algún complejo de regulación, en términos generales, se buscan regiones moduladoras por similitud de las secuencias caracterizadas en otros genes y en otros organismos (Vedel y Scotti, 2011). En este estudio, usar este algoritmo facilitó la identificación de un mayor número y diferentes clases de elementos, en comparación con MEME, sin embargo MEME permitió la predicción de motivos putativos “nuevos”.

De acuerdo al análisis comparativo entre los promotores de los ortólogos pudo observarse que existen regiones muy conservadas entre los promotores y entre especies de los diferentes taxones, aunque para la mayoría de las regiones marcadas como motivos putativos no hay reportes, se considera que estas regiones altamente conservadas se tratan de secuencias que comparten una red de regulación similar. En este mismo contexto, aunque no todos coinciden con algún motivo ya descrito, MEME los relacionó con factores de transcripción que en están implicados en la respuesta a estrés por factores bióticos o abióticos, así como en diferentes tipos de procesos biológicos, por ejemplo en algunos promotores de los ortólogos de DREB2, cuyos elementos reguladores también se ubicaron en *C. papaya*, el motivo 2 (TAATTA) que podría asociarse al motivo AT-hook o al elemento A/T-rich, es reconocido por AHL20.2 (factor de transcripción involucrado en la defensa contra bacterias), AHL25 (involucrado en desarrollo) y YAB1 (desarrollo del meristemo apical) (Goldsmith *et al.*, 2008; Hehl *et al.*, 2016; Kloth *et al.*, 2016; Ud-Din *et al.*, 2016); el

motivo 7 (GTGGTTCC), posible elemento similar a HSF, es reconocido por los FTs LBD (regulador del desarrollo de órganos, implicado en el metabolismo del nitrógeno, en respuesta a citoquininas, auxinas y giberelinas), HSFB2 (envuelto en la respuesta al estrés por calor, como en el desarrollo del gametofito), MYB59 (estrés por sequía, estrés abiótico) (Thatcher *et al.*, 2012; Wunderlich *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2015); el motivo 8 (GGGCCCCAC), reconocido por TCP15 (implicado en desarrollo, ciclo circadiano), MYB55 (involucrado en respuesta a estrés por sequía y calor) (Mukhopadhyay y Tyagi, 2015; Casaretto *et al.*, 2016) y el motivo 9 (GAAATATCTAGA), reconocido por MYB-RVE1 (en biosíntesis de auxinas y elongación de hipocotilo), CCA1 (regulación del ciclo circadiano, participación en condiciones de estrés por frío), KAN1 (desarrollo de la hoja y regulación por auxinas) (Kwon *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Grundy *et al.*, 2015). En el caso de los promotores de los ortólogos de RAP2.4A, los motivos que también se encontraron en papaya son: el motivo 1 (GCC-box), reconocido por RAP2.6 (involucrado en la respuesta a ABA, estrés osmótico y sequía), ORA47 (envuelto en la biosíntesis de JA y ABA, estrés por daño mecánico y estrés hídrico), RRTF1 (regulación de la señalización por ROS, estrés por luz) y DREB2C (en respuesta a estrés por calor y salinidad) (Zhu *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2014; Matsuo y Oelmüller, 2015; Chen *et al.*, 2016); el motivo 2 (TTTTATT) o A/T rich, reconocido por AHL25 (involucrado en desarrollo) y YAB1 (desarrollo del meristemo apical) (Goldsmith *et al.*, 2008; Hehl *et al.*, 2016), el motivo 3 (ACGTG) o ABRE, reconocido por MYC2, MYC3 y MYC4 (señalización por JA en respuesta a patógenos, MYC2: estrés por sequía), bZIP60 (en la respuesta a estrés en retículo endoplásmico) y NAC55 (en respuesta a estrés por frío, calor, patógenos, en la señalización por ABA y JA) (Iwata *et al.*, 2008; Calvo-Fernández *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2011; Hosain *et al.*, 2016, Niu *et al.*, 2016); el motivo 4, reconocido por WOX13 (biosíntesis de ácido giberélico, diferenciación celular, estrés abiótico y biótico) (Deveaux *et al.*, 2008). También se descubrió que el motivo 2 hallado en ambos promotores se caracteriza por ser un elemento rico en A y/o T, el cual se ha observado que posee A *enhancer* (Lamb *et al.*, 1996), cabe destacar que este elemento no fue predicho cuando se analizaron las secuencias promotoras por separado.

En cuanto a los motivos determinados con NEW PLACE y PLANT CARE, análisis hecho de manera individual para el promCpDREB2 y promCpRAP2.4A, se ubicaron principalmente los elementos ABRE con la secuencia consenso ACGTG, este elemento está asociado en la respuesta a deshidratación y salinidad, así lo comprueban estudios hechos en arroz, soya y *arabidopsis* (Maruyama *et al.*, 2012). Muchos genes inducibles por ABA contienen este conservado elemento en sus regiones promotoras, y muchos autores mencionan que para

participar en la regulación por ABA, requieren de varias copias, así como de algunos elementos de acoplamiento (CE), hasta ahora los más conocidos son CE1 (TGCCACCGG) y CE3 (ACGCGTTCCTG), que son parecidos al elemento ABRE. Así también se han identificado otros elementos de acoplamiento que contienen el *core* (A/GCGT), no obstante pueden haber otros elementos de acoplamiento que prescinden de esas secuencias (Narusaka *et al.*, 2003). Al elemento ABRE se unen los factores de transcripción tipo bZIP, los cuales son inducibles por estrés osmótico, por ejemplo se ha reportado que en el promotor del gen *rd29A* (también conocido como *cor78* e *Iti78*), los FTs que se unen a sus secuencias ABRE son los AREB1, AREB2 y AREB3 (Basu *et al.*, 2014). En adición, el elemento ABRE es muy parecido al motivo G-box (CACGTG), esta secuencia está presente en muchos promotores regulados por luz, y se ha demostrado además que el elemento G-box tiene un papel en las respuestas por anaerobiosis y hormonas como el ABA, ET y JA. Estudios indican que los FTs bZIP, bHLH y NAC funcionan como reguladores de la transcripción de aquellos promotores que contienen el elemento G-box (Lee *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016).

En referencia al papel que juegan los DREB2 en la regulación de otros genes, se ha visto que DREB2A está directamente relacionado con la inducción de genes codificantes para HSFs, por lo que DREB2A tiene una regulación positiva bajo condiciones de estrés por calor, además de la que mantiene en sequía y salinidad. DREB2A reconoce a sus blancos inducidos por calor a través del reconocimiento del elemento regulador DRE en sus promotores (Yoshida *et al.*, 2008). Homólogos a DREB2A, como DREB2b también se une a este tipo de secuencia y es inducido por estrés hídrico al igual, No obstante, la variabilidad entre elementos reguladores y su interacción con los FTs sigue siendo inconcluso y pone en discordia la premisa sobre la absoluta especificidad de un factor de transcripción hacia una secuencia fija, puesto que se ha visto que DREB2A puede reconocer variantes del elemento DRE, tales como A/GCCGACNT y A/GCCGACNA/G/C, pero prefiere a ACCGAC o GCCGAC (Yamada y Spangenberg, 2010). Algo similar ocurre con DREB1A, que tiene una alta correspondencia con la variante A/GCCGACNT, y aunque este gen es inducido por frío, coinciden con DREB2A en regular a genes como COR15 (a y b) y KIN1-2, indicando la existencia de un entrecruzamiento entre la expresión de genes inducida por frío y sequía, a través del elemento DRE/CRT (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2009; Tuteja y Singh, 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que la red reguladora orquestada por DREB2A, también puede estar mediada por otros componentes como ABA y iones, al ser inducido por altas concentraciones de sal (Tsukagoshi *et al.*, 2015). Existen numerosos estudios sobre la

expresión DREB2A y su participación en condiciones de estrés en diferentes especies, pero son pocos los que tratan sobre sus promotores para inferir su regulación, en referencia al estudio del promotor de DREB2A, la información que se genera es orientada hacia la explicación del posible rol de uno o dos elementos encontrados o no se detalla de manera exhaustiva la clase de motivos encontrados y de sus relaciones. En este mismo contexto, Kim y colaboradores (2011) elaboraron versiones truncas para el promotor de AtDREB2A (de tamaño aproximado a 1800 pb río arriba del codón ATG), en la que destacan la inducibilidad de este en respuesta a ABA y salinidad y de su correlación con los elementos ABRE y CE3. Mientras que Tavakol y colaboradores (2014) consideraron tomar 1300 pb de los promotores de los genes DREB2 de *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides* y *Aegilops tauschii*, ancestros del trigo, y encontraron patrones de conservación en cuanto al tipo de elementos en cis descubiertos, algunos de esos elementos fueron muchos elementos de respuesta a ABA, de respuesta a luz y a frío, datos que les hace suponer sobre la compleja red de señalización en la que estos factores de transcripción están intrincados. En este trabajo, pese a que se encontraron algunos patrones en las secuencias conservadas entre algunas especies y papaya, si se observaron muchos más elementos de regulación diferentes o con variantes. Por lo que se propone que el estudio de un promotor debe ser abordado sistemáticamente y analizado caso por caso.

Siguiendo con la interpretación, se encontraron dos repeticiones del elemento DRE2 (ACCGAC) en promCpRAP2.4A y una repetición en promCpDREB2A (el elemento DRE2, es una variante de DRE). El elemento DRE (A/GCCGAC) o (TACCGACAT) ha sido ampliamente estudiado debido a que es una secuencia clave en la vía de señalización independiente de ABA en el estrés por sequía y se han reportado que este motivo está relacionado con varios tipos de estreses más (Scheel y Waternack, 2002). También se apreciaron elementos relacionados a DRE con sustituciones en las bases flanqueantes en dirección 5'. DRE fue primeramente identificado en el promotor del gen *rd29A* que responde a la deshidratación causada por estrés osmótico, el cual codifica para una LEA, quien es inducida durante la maduración del embrión y por varios tipos de estrés en tejido vegetativo, fungiendo finalmente como posible efector de tolerancia al estrés. Este mismo elemento es esencial para la inducción de *rd29A* a bajo condiciones de sequía, salinidad y bajas temperaturas que conducen a un estrés osmótico vía independiente de ABA. Subsecuentemente, nuevas clases de elementos DRE se han identificado como el elemento CRT (CCGAC) descubierto en genes inducibles por frío en *Arabidopsis*, actualmente se sabe que esta secuencia es de suma relevancia para la inducción de muchos genes en esas

mismas condiciones. Estudios recientes evidencian que algunos motivos DRE/CRT aunque actúan de diferente manera, pueden responder siguiendo un mecanismo ABA-dependiente, i.e. el elemento de respuesta a deshidratación 2'-DRE2 (ACCGAC)- identificado en el promotor de *rab17* de maíz, el cual interviene ABA-dependiente en la respuesta al estrés osmótico por sequía. En este mismo gen se descubrió otro elemento, indicado como DRE1 (ACCGAG), el cual tiene que ver con procesos de desarrollo celular, al regular de forma ABA-dependiente la maduración del embrión (Kizis y Pagés, 2002; Saleh *et al.*, 2005). Estudios señalan que DREB2A y DREB2B se unen a la secuencia DRE, aumentando la tasa de expresión de genes ABA-independiente en entornos estresantes. Shinwari y colaboradores en 1998, precisaron que los genes CBF/DREB1 eran inducidos por bajas temperaturas, pero no por sequía y por ABA, y por tanto regulado ABA-independiente en función del elemento CRT, esto fue hasta que Haake y colaboradores (2002) demostraran que CBF4 (a diferencia de otros CBFs) no cambia su expresión en respuesta a frío, pero si es inducible por sequía y por tratamientos con ABA, validando el hecho que CRT está inmerso en la señalización ABA-dependiente. En concordancia con lo anterior, los patrones de expresión de los genes DREB2 bajo condiciones de sequía y salinidad, muestran que DREB2 activa aquellos genes que contienen DRE/CRT y que por tanto responden a esas mismas condiciones de estrés (Haake *et al.*, 2002). Se insinúa que la presencia de elementos tipo DRE, DRE/CRT y DRE2 posiciona a DREB2 en confluencia de varias rutas de señalización al mismo tiempo bajo determinado estímulo, como el generado por sequía.

En el caso de RAP2.4, diferentes estudios apuntan que este factor de transcripción funciona como un trans-activador de genes, mediados por los elementos DRE y GCC-box (también llamado elemento ERE), interviniendo en la regulación de la expresión de genes que responden al etileno, deshidratación y luz, y se ha comprobado que es capaz de regular su expresión al unirse al elemento DRE de preferente manera en comparación a ABRE (Feng *et al.*, 2005; Dong y Liu, 2010). Lin y colaboradores (2008) demostraron que RAP2.4 es regulado positivamente por sal, sequía y daño mecánico, pero desregulado por luz. Por ejemplo, ese ha visto que actúa como un regulador positivo en la inhibición de la elongación del hipocotilo mediada por luz y como un regulador negativo en la inhibición de la elongación de la raíz mediada por etileno. Por otra parte en 2008, Shaikhali y colaboradores analizaron mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* que RAP2.4A, regula la respuesta de 2CPA (2-Cys peroxiredoxin-A, enzima antioxidante de cloroplasto) mediante el reconocimiento en el promotor de la secuencia C3-like (CACGCGATTC) en condiciones redox, así mismo, RAP2.4A impacta sobre la expresión de otras proteínas de cloroplasto que participan en la

adaptación a las variaciones ambientales. Este mismo grupo de investigación, determinó que el elemento C3-like es crucial para llevar a cabo la regulación de 2CPA, pues aunque la región promotora de este gen tiene elementos ABRE y variantes ACGTs del elemento C3 o llamado igualmente como CE3, RAP2.4A no parece tener afinidad por ellos. Son pocos los reportes con los que se cuenta, y por tanto poco se sabe sobre la regulación que media RAP2.4A en otros genes, así como de los que lo regulan. A la fecha no se tiene documentado sobre qué tipo de elementos reguladores están presentes en el promotor de RAP2.4A y de su relación con otros procesos celulares o situaciones estresantes, por lo que este trabajo hace un primer acercamiento.

Otro elemento en *cis* descubierto es el denominado GCC-Box, con la secuencia consenso AGCCGCC, y que actúa como sitio de unión de un gran número de factores de transcripción de la familia ERF, los cuales tienen un papel importante en la defensa ante patógenos mediada por JA y ET (Fujimoto *et al.*, 2000). Por otra parte el elemento CGCG-box también sugerido en este estudio, con el *core* (A/C/G)CGCG(G/T/C) es encontrado en aquellos promotores de genes que están comprendidos en la señalización por ABA, ET y luz, y en daño mecánico. Este elemento fue inicialmente identificado como un sitio de reconocimiento por la Calmodulina en los genes AtSR1-6 (CAMTAs), a su vez estos genes se inducen rápidamente y diferencialmente en condiciones de temperaturas extremas, por daño mecánico, por la señalización de hormonas como ABA, JA y SA, y por especies reactivas de oxígeno (Yang y Poovaiah, 2002).

En ambos promotores se encontraron elementos W-box (TGAC/GTCA), aunque con mayor número de repeticiones en proCpDREB2. Las W-box son reconocidas por los FTs WRKY, factores de transcripción que tienen un rol sobre los procesos de desarrollo en la planta, al igual que en situaciones de estrés (Phukan *et al.*, 2016). Por ejemplo, AtWRKY52 es capaz de conferir resistencia ante múltiples tipos de bacterias y hongos, otros similares son AtWRKY16 y AtWRKY19 (Rushton *et al.*, 2010; Chi *et al.*, 2013), por otro lado, los hay quienes participan en situaciones de estrés abiótico, como OsWRKY74 de arroz que modula el proceso de inanición por hierro y está implícito en el estrés por frío, o FcWRKY70 de *Fortunella crassifolia* envuelto en la tolerancia a sequía y síntesis de putrescina, o GmWRKY13 de soya, que participa en el estrés por sequía y salinidad (Ding *et al.*, 2016).

Otro elemento regulador relacionado con el estrés es el Motivo GT-1, identificado con la secuencia consenso GAAAAA. Se ha encontrado que este elemento tiene un rol en la

tolerancia a salinidad, sequía y resistencia a patógenos. Fue identificado originalmente en el gen de la calmodulina SCam-4, el cual es inducido bajo estrés por salinidad. Se ha reportado la presencia del Motivo GT-1 en las regiones promotoras de genes como la pirofosfatasa tipo II H⁺ de *Zea mays* y en genes NAC de *Jatropha curcas*, en todos los casos responsivos a salinidad (Park *et al.*, 2004; Nuruzzaman *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2016). Con la excepción del promotor de DREB2, se ubicó un elemento de respuesta a ABA en el promotor de RAP2.4A, a este motivo lo distingue la secuencia CAAACACC y ha sido identificado como mediador en el desarrollo de la semilla, este motivo es reconocido por factores de transcripción bZIP y con MYB, ya que el sitio de reconocimiento MYB se superpone a dicha secuencia (Agrawal y Rakwal, 2012).

Otro tipo de motivos localizados igualmente en ambos promotores fueron los MYB (AACG) y los tipos MYB (GTTTAGTT). El motivo MYB con el consenso AACG es conocido como elemento AC (ACCT/AAC/AC) y es blanco de algunas proteínas MYB, proteínas que participan activamente en la respuesta a estrés por sequía y a ABA como *AtMYB2*, también algunos otros están implicados en la respuesta por ABA y JA y en la tolerancia a sequía como *AtMYB096*, en respuesta a salinidad como *ScMYBAS1*, en respuesta a calor como *MYB55*, por citar algunos (Abe *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2009). Por otra parte los elementos MYC con el consenso CACATG, son reconocidos por factores de transcripción con el mismo nombre, y se sabe que estos actúan de manera ABA dependiente e independiente, regulando la expresión de gene durante situaciones de estrés osmótico, y se ha observado que en algunos casos tanto MYC como MYB actúan cooperativamente, esto ocurre en el caso del gen *rd22*. Al igual, los FTs MYC actúan regulando positivamente la resistencia ante patógenos mediada por señalización de JA (Alves *et al.*, 2014). En general, varios autores coinciden que aquellos genes que poseen motivos de unión del tipo bZIP, MYC, MYB, AP2/ERF y dedos de zinc se caracterizan por ser señal-inducible (Ambawat *et al.*, 2013).

Para terminar este apartado, si bien la validación del promotor en sistemas heterólogos sigue siendo un prerequisite fundamental, ya sea con fines de ciencia básica o aplicativos, este procedimiento aún mantiene ciertos inconvenientes, pues ocurre que algunos de los factores de transcripción clave en la regulación del promotor a prueba no se encuentran en el modelo heterólogo. Por esa razón hay que considerar tener el control sobre todas aquellas variables que pueden afectar sobre una adecuada interpretación de los resultados.

2.5 CONCLUSIONES

Las secuencias promotoras de los genes DREB2 y RAP2.4A de este estudio contienen varios elementos como los ABRE y W-box, principalmente, seguidos de los motivos G-box, GCC-box, CGCG-box, MYB, MYC y DRE2. La presencia de estos motivos sugiere que los factores de transcripción podrían responder a la variedad de situaciones en las que están implicados dichos sitios de unión (particularmente en estrés abiótico), según reportes comparados con otras especies, pero aún se requiere de análisis experimentales que lo comprueben.

Los promotores y elementos reguladores no están claramente definidos y son muy diversos, por lo que se insinúa que cada gen tienen un arreglo único que establece a su vez una regulación espacio-temporal única.

Finalmente, aunque describir las secuencias reguladoras que se encuentran en los promotores es fundamental para comprender de manera global su posible regulación, no es suficiente, no es del todo concluyente, por lo que también se requiere de tener un conocimiento preciso de sus interacciones con las proteínas reguladoras. La caracterización funcional de promotores mediante ensayos de expresión transitoria ha mostrado ser una estrategia rápida y de bastante utilidad que permite dar una aproximación cualitativa sobre el promotor, es decir, indica si un promotor es o no inducible, por ejemplo. En tanto que, las estrategias como EMSAs, ensayos de uno o dos híbridos y más recientemente la implementación de la técnica ChIP, permiten indagar sobre las interacciones entre DNA y proteína, pero éstas técnicas aún siguen siendo deficientes. A la vez, que la acumulación de datos aumenta gracias al desarrollo de las herramientas computacionales, es necesario que el desarrollo de las técnicas o estrategias que validen esos datos también avancen al mismo ritmo.

Se propone continuar con la caracterización de los motivos nuevos encontrados para determinar si realmente cumplen con una función.

CAPÍTULO III

AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE LAS REGIONES PROMOTORAS PUTATIVAS DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DREB2 Y RAP2.4 DE *Carica papaya* var. Maradol

3.1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día se han aislado numerosos promotores de una gran variedad de organismos, y las plantas resultan ser modelos atractivos de análisis debido al uso agrícola de muchas especies. En este marco, la búsqueda de nuevos elementos que les permitan adaptarse a condiciones adversas o mejorar su calidad ha sido uno de los objetivos de la biotecnología moderna, por ejemplo, en el contexto del aislamiento e identificación de las regiones promotoras de genes, el estudio de las secuencias regulatorias ha sido fundamental para determinar la funcionalidad promotora y su actividad en la regulación transcripcional global. Para el análisis de dichos promotores se hace uso de una gamma de herramientas bioinformáticas que implican la predicción de secuencias putativas, así como la anotación de la posible funcionalidad en bases de datos específicas. Así mismo, la rápida acumulación de datos a escala como la secuenciación de genomas, la anotación y predicción de genes, los perfiles de expresión génica y entre otros, han facilitado el descubrimiento de elementos regulatorios que permiten preguntarse y acercarse al rol que juegan en la señalización celular de las plantas (Mockler *et al.*, 2009).

El estudio de los diferentes tipos de promotores que se han identificado ha permitido profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos de regulación transcripcional, con ello, la predicción de las secuencias promotoras y sus elementos reguladores en cis se han convertido en tópicos de rutina debido a los avances recientes en transcriptómica y secuenciación de genomas vegetales. No obstante, la predicción de los elementos reguladores pueden o no ser funcionales, por lo que es sugerente demostrar su contribución a la actividad del promotor (Finer y Hernández, 2014). De ahí que la identificación y caracterización del promotor y sus elementos regulatorios representa un paso crucial para el logro del control de la expresión génica al momento de darle una aplicación biotecnológica (Naqvi *et al.*, 2016)

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de esta sección es poder aislar y clonar las regiones promotoras de los genes DREB2 y RAP 2.4 y generar las delecciones 5' de ambas porciones genómicas, todo lo cual servirá para probar la funcionalidad de los elementos regulatorios putativos presentes en estas regiones. En la Figura 1 se resume la estrategia experimental para cumplir estos propósitos.

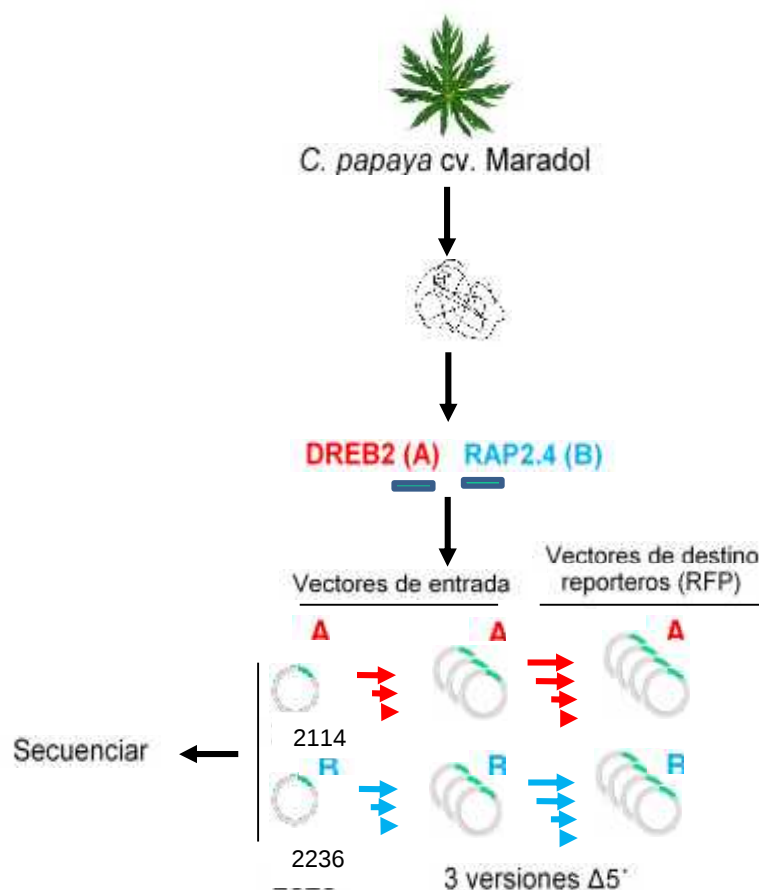


Figura 3.1. Esquema representativo de la estrategia para la elaboración de las construcciones que se emplearán a lo largo de este trabajo.

3.2.1 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO

Se tomó 200 mg de tejido foliar de una planta de 4 meses de edad de *C. papaya* var. Maradol y se le adicionó 1 mL de buffer TELT (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 63 mM, Tritón X-100 y 2.5 M de LiCl), se maceró hasta que el tejido quede totalmente homogenizado y se centrifugó a 10 000 x *g* por 5 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante se le adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1v/v) y la mezcla se agitó vigorosamente. Luego, se centrifugó a 10 000 x *g* por 5 min para separar las fases. Se tomó la fase acuosa y a esta se le añadió un volumen equivalente de etanol absoluto frío. Para precipitar los ácidos nucleicos, la mezcla se incubó por 24 h a -20 °C. Para empastillar los ácidos nucleicos, la mezcla se centrifugó a 15 000 x *g* por 10 min y 4°C. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con etanol al 70% y el pellet se resuspendió con 40 µL dH₂O libre de nucleasas. Se le adicionó 1 µL de RNasa A (1 mg/ µL) y se incubó la reacción por 1 h. La cantidad y pureza del DNA genómico se estimó por espectrofotometría a 260 nm y mediante el cociente 260/280 nm, respectivamente; su integridad se evaluó cargando el gDNA en un gel de agarosa al 1 %, en amortiguador TAE 1X (Tris 242g/L, ácido acético glacial 57.1mL/L y 100 mL EDTA 0.5 M) y revelado con bromuro de etidio.

3.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS PROMOTORES DREB2 Y RAP2.4A

Con la finalidad de aislar y poder clonar los promotores de los genes DREB2 y RAP2.4A, se diseñaron oligonucleótidos **F** 3'-ACACTCTTACAGGCGTCAGCT-3' y **R** 5'-GGAAGAGTCCACTGCAATAGAAGT-3' y para RAP2.4a, **F** 5'-AATTAATGCCCCGCAACTCA-3' y **R** 5'-AGGCTCAAGTGCTTCCATAAG-3', los cuales anillan específicamente específicos que anillan en la región ~2150 río arriba del ATG de ambos genes. Las condiciones de PCR empleadas fueron las descritas en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Mezcla de reacción de PCR para amplificar las regiones promotoras putativas.

Componente	Volumen (µL)
gDNA	1.0
Oligonucleótidos mix F y R (10 µM)	1.0
dNTPs mix (10 mM)	1.0
amortiguador Phusion HF 5x	10
DNA polimerasa Phusion HF (2 U/µL)	0.3
dH ₂ O libre de nucleasas	36.6

Para amplificar estas regiones se empleó un programa de PCR tipo *touchdown*, el cual implicó un paso de desnaturalización inicial a 98 °C durante 1 min, seguido de 10 ciclos con 10 s de desnaturalización a 98°C, 15 s en el rango de temperaturas de 69°C hasta 59°C (1°C por cada ciclo) para el alineamiento y una extensión de 1 min 25 s a 72°C y 30 ciclos más con 10 s de desnaturalización a 98°C, 15 s a 59°C para el alineamiento y una extensión de 1 min 25 s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C.

Los fragmentos amplificados fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. Finalmente, cada producto de PCR se purificó del gel de agarosa con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega® de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.2.3 CLONACIÓN DE LOS PROMOTORES PUTATIVOS EN EL VECTOR pGEM®-T Easy

Luego de purificar los amplicones, se procedió a adenilarlos ya que la polimerasa empleada deja extremos romos durante la amplificación y no pueden ser clonados en el vector pGEM®-T Easy. La composición de la reacción se detalla en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Composición de la reacción de adenilación de los amplicones obtenidos.

Componente	Volumen (µL)
Amplicón (50 ng/µL)	5.0
Amortiguador Go Flexi Taq (5x) Promega®	4.0
dATP (10 mM)	0.4
MgCl ₂ (50 mM)	0.6
Go Flexi taq (5 U/µL) Promega®	1.0
dH ₂ O libre de nucleasas	9.0

La reacción se dejó a 72°C durante 30 min. Posteriormente, los amplicones adenilados se ligaron en vector tal y como se indica en el Cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Composición de la reacción de ligación de los fragmentos en el vector pGEM®-T Easy.

Componente	Volumen (μL)
Amplicón (50 ng/μL)	5.0
Amortiguador Rapid Ligation 2x	1.0
Vector pGEM®-T Easy (50 ng/μL)	0.5
T4 DNA Ligasa Promega®	1.0
dH2O libre de nucleasas	2.5

Posteriormente, se transformaron células calcio competentes de *E. coli* DH5α con las construcciones obtenidas. Para ello, las células se descongelaron en hielo, se les adicionó 150 ng de la ligación y se incubaron por 30 min, seguido por un choque térmico a 42°C por 50 s e inmediatamente se transfirieron a hielo por 5 min. Luego, se le adicionó 0.5 mL de medio LB líquido y se dejaron crecer por 1 h a 37°C y 200 rpm. Finalizado este tiempo se plaquearon 100 μL del cultivo en medio semisólido LB adicionado con ampicilina (100 mg/mL), X-gal (20 mg/mL) e IPTG 100 mM. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias.

3.2.4 ELIMINACIÓN DEL PROMOTOR 35 S DEL VECTOR pH7RWG2

Para analizar la función de los promotores, se pretende emplear el vector pH7RWG2, al cual se le removió el promotor 35S. En la Figura 3.2 se presenta el esquema del vector.

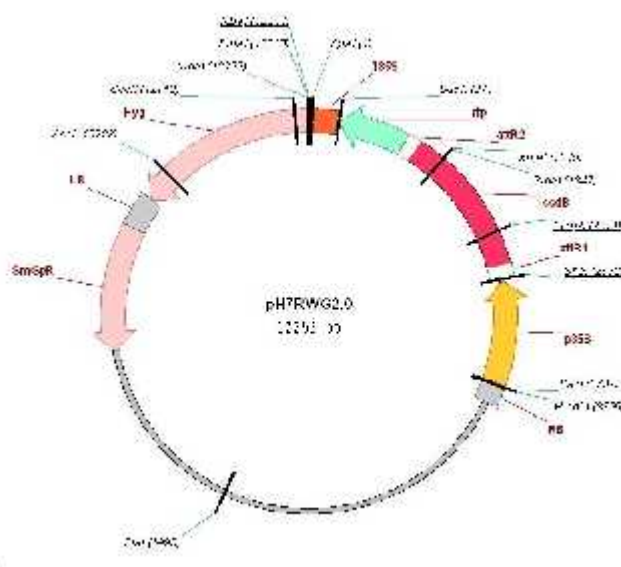


Figura 3.2. Esquema del vector pH7RWG2 en el que se muestra la disposición del casete Gateway entre el 35S y la RFP.

De esta manera, para poder ser usado en este trabajo, se decidió eliminar el promotor 35S, de tal suerte que quedase disponible para ser usado como vector de destino, para probar promotores. Así que, se procedió a eliminar este promotor. Para ello se realizó una digestión doble del pH7RWG2 con SpeI y HindIII, de acuerdo al Cuadro 3.4.

Cuadro 3.4. Composición de la reacción para digerir el vector pH7RWG2 con SpeI y HindIII.

Componente	Volumen (μL)
Vector pH7RWG2 (50 ng/μL)	2.0
Amortiguador Multicore 10x (Promega)	2.0
SpeI (5U/ μL) (Promega)	1.0
HindIII (5U/ μL) (Promega)	1.0
dH2O libre de nucleasas	14.0

Posteriormente, para poder religar el vector, se procedió a hacer los extremos romos. Para tal fin, el vector linealizado, se purificó mediante con el paquete Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega® y se eluyó en 6 μL de agua libre de nucleasas. El eluato se trató con la T4 DNA Polimerasa, para eliminar los extremos cohesivos. Esto se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Mezcla de reacción para eliminar los extremos cohesivos en el vector pH7RWG2 tratado con SpeI y HinIII, usando la T4 DNA polimerasa.

Componente	Volumen (μL)
Vector pH7RWG2 digerido y purificado	6.0
Amortiguador T4 DNA ligasa 10x (NEB)	2.0
dNTPs (1 mM)	1.0
T4 DNA polimerasa (5U/ μL) (NEB)	1.0
dH2O libre de nucleasas	10.0

La mezcla se incubó por 30 min a 12°C y luego se paró calentándola a 65 °C, tras lo cual se agregó 1 μL de T4 DNA ligasa (5 U/μL). Esta reacción se puso a reaccionar por 16 h a 4°C. Finalmente, la reacción completa se usó para transformar células de *E. coli* DH5α. La transformación se puso a crecer en medio LB+Amp (100 mg/mL) y las clonas transformantes se analizaron por digestión para corroborar la eliminación del promotor. Para ello, se prepararon minipreparaciones por lisis alcalina de dos colonias tomadas al azar y un control completo y se dirigieron con de acuerdo con la siguiente reacción (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6. Composición de la mezcla de reacción de las clonas seleccionadas para confirmar la pérdida del 35 S.

Componente	Volumen (μL)
Vector (50 ng/μL)	2.0
Amortiguador Multicore 10x (Promega)	2.0
SmaI (5U/ μL) (Promega)	1.0
dH2O libre de nucleasas	15.0

Además se realizó una doble digestión (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7. Composición de la mezcla de reacción del control (pH7RWG2 vacío) para demostrar la presencia del promotor 35 S.

Componente	Volumen (μL)
Vector (50 ng/μL)	2.0
Amortiguador Multicore 10x (Promega)	2.0
HindIII (5U/ μL) (Promega)	1.0
XbaI (5U/ μL) (Promega)	1.0
dH2O libre de nucleasas	14.0

La mezcla se incubó por 1 h y la mezcla se resolvió en un gel de agarosa al 1%. Finalmente se reveló con bromuro de etidio.

3.2.5 CLONACIÓN DE LOS PROMOTORES PUTATIVOS EN EL VECTOR pDONR 221

Luego de confirmar la correcta clonación de los fragmentos en el vector pGEM®- T Easy, estos se amplificaron con primers con los sitios attb: Primer attB1-pGEM **F** 5´ -GGGG A CAA GTT TGT ACA AAA AAG CAG GCT TAT AGG GCG AAT TGG GCC CGA C- 3, primer attB2-Dreb2a **R** 5´ -GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TC GGA AGA GTC CAC TGC AAT AGA AGT- 3´ y el primer attB2-RAP2.4a **R** 5´-GGGG ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TC AGG CTC AAG TGC TTC CAT- 3´. Las condiciones y composición de las reacciones de amplificación fueron las mismas que las empleadas en la primera amplificación de los fragmentos.

Una vez obtenidos los fragmentos, estos se purificaron a partir de banda usando el kit Minelute® Gel Purification de Qiagen, según la descripción del fabricante. Luego, los amplicones se emplearon para efectuar la recombinación BP en el vector de entrada pDONR™ 221 de Invitrogen. Las especificaciones de la reacción se dictan en el cuadro 3.8.

Cuadro 3.8. Composición de la reacción BP usada para insertar los amplicones en el vector pDONR 221.

Componente	Volumen (µL)
Vector pDONR 221 (150 ng/µL)	1.0
Amortiguador TE, pH 8	5.0
Producto de PCR attb (100 ng/ µL)	1.0
BP clonasa II	1.0

Las reacciones se dejaron incubando a 25 °C durante 12 horas.

Luego de lo anterior se transformaron en células de *E. coli* XL Blue por choque térmico bajo las condiciones anteriormente también anteriormente mencionadas. La selección de las clonas transformantes se hizo en medio semisólido con kanamicina (50 µg/mL).

3.2.6 RECOMBINACIÓN DE LOS PROMOTORES PUTATIVOS EN EL VECTOR BINARIO pH7RWG2-35 S

Los promotores clonados en pDNOR™ 221 fueron recombinados en el vector pH7RWG2 sin el promotor CAMV35S, por lo que fue denominado como pH7RWG2 -35 S. La composición de las reacciones manejadas se indica en el cuadro 3.9.

Cuadro 3.9. Composición de la reacción de recombinación en el vector de destino.

Componente	Volumen (μL)
Vector pH7RWG2 (150 ng/μL)	1.0
Amortiguador TE, pH 8	3.0
Vector de entrada (150 ng/ μL)	5.0
LR clonasa II	1.0

Las reacciones se dejaron incubando a 25 °C durante 12 horas y luego se transformaron células de E.coli XL Blue con el protocolo ya descrito. La selección se hizo en placas con medio LB adicionado con Espectinomicina (100 μL/mL).

3.2.7 TRANSFORMACIÓN DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS CON LAS CONSTRUCCIONES EN EL VECTOR BINARIO

Para transformar *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones de interés se usó la cepa EHA105 portador del plásmido pCH32 (este plásmido confiere resistencia a tetraciclina y a su vez posee dos genes *vir* (*vir*-E y *vir*-G), los cuales incrementan la virulencia y como consecuencia mejoran la transferencia del T-DNA, así como la expresión de la construcción de interés).

Primeramente se usaron alícuotas de 75 μl de células quimiocompetentes a los que se adicionó 1 μg de DNA plasmídico de cada construcción y se incubaron durante 15 min en hielo. Luego se sumergieron en nitrógeno líquido por 5 minutos, se sacaron y dispusieron en hielo por 30 segundos a 1 min en hielo, luego fueron incubados a 37 °C por otros 5 minutos, fueron sacados y se les adicionó 0.5 mL de medio YEP, se incubaron por 4-5 horas en agitación constante de 200 rpm, a 28 °C y en oscuridad. Luego, los cultivos fueron centrifugados a 4 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y con el remanente de medio se resuspendió la pastilla y se plaquearon en medio YEP semisólido con 100 mg/mL de rifampicina, 15 mg/mL de tetraciclina y 100

mg/mL de espectinomicina para seleccionar. Las placas fueron dispuestas a 28 °C y oscuridad durante dos días y medio.

3.2.8. DELECCIONES EN EL EXTREMO 5´ DE LAS REGIONES DE LOS PROMOTORES DE RAP 2.4 Y DREB2

Con la finalidad de definir regiones regulatorias de relevancia funcional en las regiones promotoras de DREB2 y RAP2.4, se propone realizar experimentos de deleciones en el extremo 5´ de las mismas. El objetivo de esto es poder ubicar, por pérdida de función, la o las zonas que poseen sitios de regulación importantes para los promotores. La propuesta se esquematiza en la Figura 3.3.

3.2.9. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS

La secuenciación de los fragmentos clonados en los diferentes sistemas de plásmidos se realizó mediante secuenciación por Sanger en el Instituto de servicios genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV. Las secuencias obtenidas se visualizaron empleando el editor Chromas 2.4.4, y se compararon y analizaron haciendo alineamientos en el software MEGA 7.

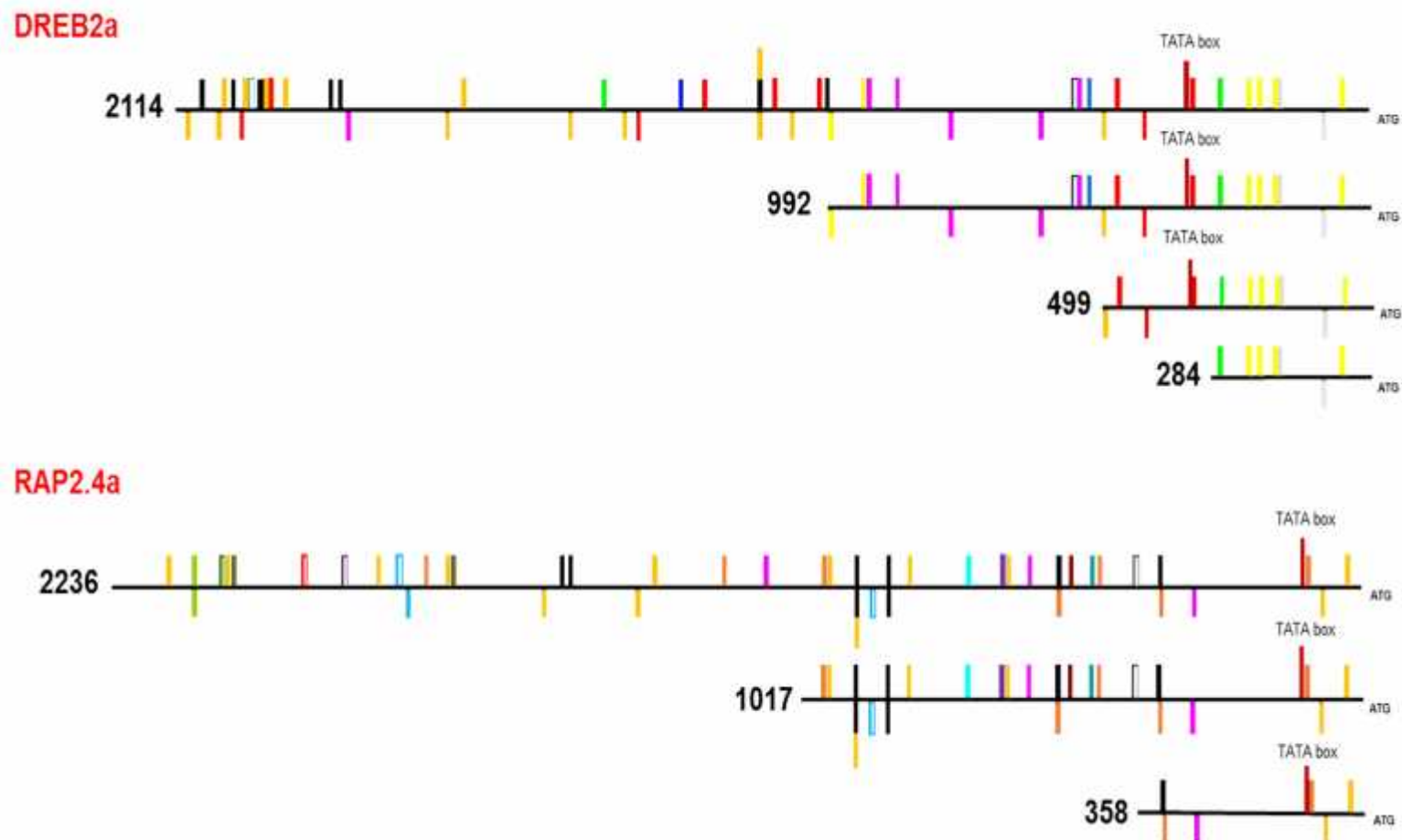


Figura 3.3 Esquema representativo de los experimentos de delecciones 5' de las regiones promotoras de los genes DREB2 y RAP 2.4A, para ser probados en análisis funcionales.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 AISLAMIENTO DE gDNA DE *Carica papaya* Y CLONACIÓN DE PROMOTORES

Para proceder con el aislamiento de las regiones promotoras, primero es imprescindible contar con gDNA de buena calidad. Así que después de aislarlo y purificarlo, se visualizó en un gel de agarosa. El resultado se presenta en la figura 3.4.



Figura 3.4. Análisis de integridad del gDNA de *Carica papaya* aislado de hoja.

Después de lo anterior, se procedió a amplificar las regiones promotoras putativas de los genes DREB2 y RAP2.4a, para clonarlas en el vector pGemT Easy. El resultado se presenta en la figura 3.5.

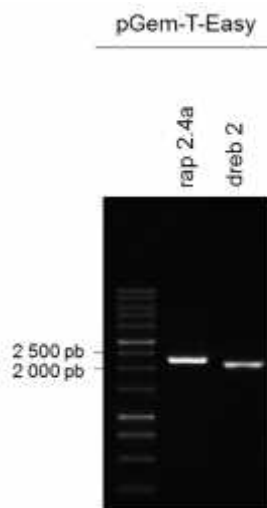


Figura 3.5. Amplificación de las regiones promotoras putativas de los genes RAP2.4 y DREB 2 clonados en pGem T-easy.

A partir de la clonación anterior se procedió a realizar las delecciones del promotor DREB2, empleando para ello enzimas de restricción. En la figura 3.6 y 3.7 se presenta la imagen de la confirmación con PCR de las delecciones del promotor DREB2 y RAP2.4a, respectivamente.

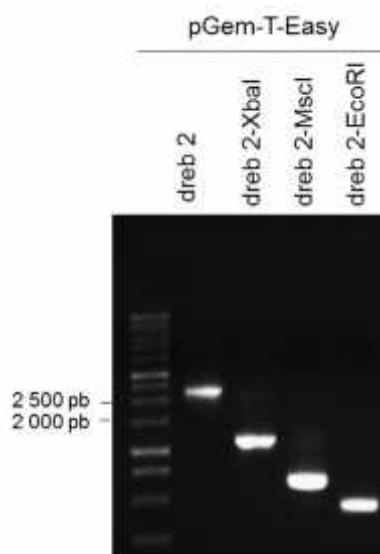


Figura 3.6. Confirmación por PCR de las delecciones hechas para DREB 2 clonados en pGem T easy., empleando los primers attB1-pGEM F y attB2-Dreb2a R.

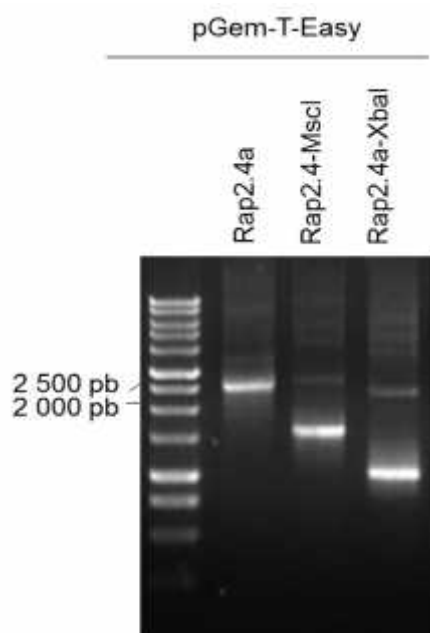


Figura 3.7. Confirmación por PCR de las delecciones hechas para RAP2.4a clonados en pGem T-easy, empleando los primers attB1-pGEM F y attB2-RAP2.4a R.

3.4 DISCUSIÓN

Con base a la funcionalidad reportada de los genes *DREB2A* y *RAP2.4A* en *Arabidopsis thaliana* y otras especies, como su participación en la regulación génica durante situaciones de estrés por sequía y salinidad (*DREB2A*), y sequía (*RAP2.4A*) (Kim *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2008), se planteó el aislamiento de los promotores de los genes ortólogos de *Carica papaya*. *Carica papaya* es un cultivo de importancia económica que posee ciertas ventajas de estudio debido a sus características morfológicas y fisiológicas, así como por el tamaño de su genoma, el cual es pequeño y está completamente secuenciado, representando de esta manera un buen modelo para el estudio de frutales. A pesar de que se han estudiado funcionalmente algunos genes en papaya como licopeno beta-ciclasa implicado en la ruta de carotenoides (Devitt *et al.*, 2010), genes implicados en desarrollo y determinación del sexo, como los MADS-box (Lee *et al.*, 2014), genes asociados a maduración del fruto y senescencia como el gen de la aminociclopropanocarboxilato oxidasa (ACC oxidasa) (Litz, 2005), muy poco se conoce acerca de los factores de transcripción y su participación en la regulación transcripcional, sobre todo ante condiciones de estrés. Hasta ahora, se han identificado los siguientes: WRKY (Pan y Jiang 2014), MADS-box (Fabi *et al.*, 2012), CBF (Zhu *et al.*, 2013), C2H2 (Pan y Jiang 2014), NAC (Fu *et al.*, 2016) y AP2/ERF (Arroyo-Herrera *et al.*, 2016; Figueroa-Yañez *et al.*, 2016).

La relevancia de este estudio radica en que hasta ahora no se cuentan con datos relacionados sobre la funcionalidad de los promotores de *DREB2* y *RAP2.4A* y su participación en la regulación transcripcional bajo condiciones de estrés abiótico, aunque recientemente ya se han caracterizado estos genes mediante su sobreexpresión, llegando a la conclusión de que ambos miembros AP2/ERF participan en la tolerancia a bajas y altas temperaturas (Arroyo-Herrera *et al.*, 2016; Figueroa-Yañez *et al.*, 2016). Con el objetivo de aislar los promotores, se consiguieron los fragmentos con tamaños de ~2.1 Kb y ~2.2 Kb para *DREB2* y *RAP2.4A*, respectivamente, con ello, la elección del tamaño se consideró en función de que las secuencias reguladoras generalmente se localizan dentro de las primeras 1000 pares de bases río arriba a partir del TSS, sin embargo dichas secuencias también pueden encontrarse cientos e inclusive miles de bases más arriba, y aunque hoy en día se cuenta con plataformas para la predicción de promotores, sigue siendo un problema conocer cuál es el tamaño exacto del promotor involucrado en la regulación in vivo, así como el definir el tamaño ideal para caracterizar su funcionalidad (Song *et al.*, 2000; Kristiansson *et al.*, 2009).

En cuanto a la parte experimental, los productos de PCR obtenidos se visualizaron en una única banda correspondiente al peso estimado para cada amplicón. La amplificación de los promotores se hizo usando una enzima de alta fidelidad para evitar la acumulación de mutaciones que pudiesen afectar la funcionalidad de las secuencias. Posteriormente, de acuerdo al arreglo de las secuencias reguladoras presentes en los promotores se hicieron un total de 7 versiones truncas con cortes puntuales, 4 para DREB2 (2114 pb, 992 pb, 499 pb y 284 pb) y 3 para RAP2.4A (2236 pb, 1017 pb y 358 pb), es importante mencionar que los principales elementos reguladores en *cis* que determinaron el lugar de corte fueron los motivo ABRE (representado en barras negras) y WRKY (representados en barras doradas), ya que fueron los más sobre-representados, de esta forma, la delección de un promotor implica una serie de construcciones que comprenden varias secciones de la región promotora fusionada a un gen reportero, lo que permite la identificación específica de los elementos en *cis* que participan en la regulación del gen bajo una circunstancia dada. Así mismo las delecciones se hicieron con la intención de conocer cuál puede ser la secuencia mínima para conferir actividad al promotor y determinar cuál o cuáles elementos son los que definen su funcionalidad. Lo anterior tiene miras al incursionamiento del desarrollo de cisgénicos mediante la elaboración de promotores sintéticos, ya que los beneficios que ofrece esta tecnología permite aprovechar el uso de los promotores endógenos de especies agrícolas con el objetivo de hacerlas más aptas ante condiciones de estrés.

Tales variantes de los promotores se clonaron primeramente en el sistema p GEM-T Easy para facilitar el almacenamiento y reproducción del amplicón en futuras sub-clonaciones, Las versiones de cada promotor fueron sub-clonadas luego en el vector de entrada p DONR 221 y finalmente en el vector de expresión PH7RWG2-35S. Cada una de las versiones que fueron secuenciadas no presentaron mutaciones, el análisis se hizo mediante alineamiento de las construcciones secuenciadas con la secuencia deposita en el portal de PHYTOZOME (<https://phytozome.jgi.doe.gov>).

3.5 CONCLUSIONES

Se aislaron a partir de DNA genómico los promotores de los genes *DREB2* y *RAP2.4A* íntegros y con el tamaño esperado de ~2.1 Kb y ~2.2 Kb, respectivamente.

Las regiones promotoras completas y sus versiones aisladas no presentaron mutaciones en sus secuencias, las cuales son idénticas a la secuencia de referencia anotada en la base de datos PHYTOZOME. Estas fueron clonadas en el vector de expresión PH7RWG2 -35S.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS PROMOTORES PUTATIVOS DE DREB2 Y RAP2.4A.

4.1 INTRODUCCIÓN

La elección y uso del promotor adecuado es importante para garantizar su aceptación en el mejoramiento vegetal. La regulación transcripcional de los genes es estricta, y está dada por los elementos cis-regulatorios de sus promotores, por lo que su identificación ha permitido discernir que estos se encuentran muy conservados entre muchas especies vegetales. El estudio de las secuencias regulatorias in silico y la expresión de genes reporteros, permite evaluar la posible funcionalidad de los promotores nativos, según sea la sensibilidad de respuesta a las diferentes estímulos a los que la planta pueda estar expuesta. De esta manera, más tarde resultado de su estudio, los promotores pueden ser utilizados eficientemente en sistemas de expresión heterólogos, según sea el caso.

El estudio de promotores, resulta esencial para comprender la regulación de la expresión génica en las plantas. El aislamiento de las secuencia promotoras y el análisis de sus elementos son críticos a la hora de emplearlos para probar transgenes, proteínas y otras secuencias no codificantes. Aunque los promotores aislados pueden mantener su funcionalidad nativa en plantas transgénicas, estos se deben estudiar cuidadosamente para considerarlo como promotor candidato. De este modo, la función de un promotor normalmente es determinado por la acción combinatoria de múltiples elementos reguladores. La introducción del ADN foráneo es afectado por su localización en el genoma así como por el fondo genético del organismo hospedero (Wang *et al.*, 2013).

Los promotores empleados en Biotecnología, según sus características pueden clasificarse en cuatro grupos:

Promotores constitutivos

Estos promotores se expresan a niveles constantes en todos los tejidos y en todo momento. No obstante hay pocos promotores que realmente se expresan de manera constitutiva. De manera más estricta los promotores de este tipo dirigen la expresión en muchos tipos de tejido y bajo diferentes tipos de condiciones. Son comúnmente usados para evaluar

transgenes y generalmente provienen de virus y de genes housekeeping de plantas. Uno de los más ampliamente utilizados es el CAMV35S del virus del mosaico de la coliflor (Comei et al., 1990; Ni et al., 1995; Potenza et al., 2004). El uso de promotores constitutivos puede ser necesario cuando se requiere que la expresión del transgen se dé durante todo el ciclo de vida de la planta. A pesar de ello, la alta tasa de sobreexpresión de ciertas proteínas puede alterar el fenotipo del individuo, causando ya sea afectando su desarrollo y crecimiento, generando una morfología anormal, alteración del metabolismo, entre otros (Dey et al., 2015)

Promotores espacio temporales

Este tipo de promotores provee de un control más preciso, pues restringe la expresión de los genes y transgenes a ciertas células, tejidos, órganos o etapa de desarrollo. Una gama de promotores espacio temporales se encuentra disponibles. Ejemplo de ello, son los específicos de semillas, ya que en ellas puede promoverse la expresión de componentes farmacéuticos o generarse el desarrollo de semillas con mejor calidad nutrimental. Otro ejemplo es el potencial uso de promotores de frutos, ya que con ello puede incrementarse la calidad poscosecha de los frutos e incluso producir anticuerpos o vacunas. Promotores que caen en este grupo son de los genes expansina y la poligalacturonasa en fruto, la esporamina y la β -amilasa en tuber (Finer y Hernández, 2013).

Promotores inducibles

Son aquellos que responden a los estímulos ambientales proporcionando una precisa regulación de la expresión génica mediante el control externo. Esta clase de promotores tienen un amplio espectro de aplicaciones, sobre todo en la agricultura, ya sea en la activación de genes que responden a estrés biótico o abiótico. A su vez, este grupo puede dividirse en tres grupos según los factores que dirigen la inducción, estos son: endógeno regulados (hormonas vegetales), físico regulados (factores externos como luz, calor, patógenos o daño mecánico) y químico regulados (que responden a cualquier componente químico externo no vegetal) (Roa-Rodríguez, 2007).

Las aplicaciones de este tipo de sistema van desde el incremento en la producción de proteínas recombinantes, análisis funcional de genes letales y la producción de marcadores para la obtención de plantas libres de transgenes. Ejemplo de este grupo son el promotor de

los genes de arroz OsNCED3 y Wsi18, implicado en la síntesis y señalización de ABA, después de los tratamientos con ABA, sequía y salinidad en arroz (Yi *et al.*, 2011). El uso de promotores inducibles proporcionan un mejor control en la sobre-expresión del gen en cuestión, así como la reducción de fenotipos negativos (Moore *et al.*, 2006)

Promotores sintéticos

Los promotores sintéticos están compuestos de una única combinación de secuencias puntuales, el cual puede contener específicos elementos reguladores. Estos difieren notablemente del promotor nativo. La construcción de un promotor sintético puede incluir enhancers, activadores o represores río arriba de la secuencia central del promotor. Ejemplo de este el promotor del gen DR5 auxina, el cual es un eficiente promotor que contiene repeticiones en tandem del elemento TGTCTC y ha sido usado para estudiar los mecanismos de respuesta a auxinas.

Por otra parte, la caracterización de funcionalidad de los promotores en cuestión se realiza mediante ensayos que pueden ser de tipo transitorios o permanentes (obtención de plantas transgénicas) que requieren del uso de proteínas reporteras, de las cuales las más ampliamente usadas son la β -glucuronidase (GUS) y la verde fluorescente (GFP), sin embargo hoy en día, también se usan variantes de la GFP, mejorada como la EGFP u otras versiones como la proteína roja fluorescente (RFP), la azul (BFP), la amarilla (YFP), entre otras (Tsien *et al.*, 2005).

Para tal caso, el empleo de la ingeniería genética ha resultado útil para introducir rasgos deseables a los cultivos. El éxito en las tecnologías en la transferencia de genes para el mejoramiento vegetal demanda el uso de promotores apropiados (Lu *et al.*, 2007; Naqvi *et al.*, 2015).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 1 se describe la estrategia que se empleará para analizar la funcionalidad de los promotores analizados y sus respectivas delecciones.

4.2.2 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE

4.2.2.1 ACONDICIONAMIENTO HIDROPÓNICO DE *Lactuca sativa*

Plantas de *Lactuca sativa* fueron puestas en condiciones de hidroponia. Se usó una solución nutritiva (Maxigrow 1.25 g/L) empleando agua purificada y se mantuvo en oxigenación continua mediante una bomba de aire.

4.2.2.2 PREPARACIÓN DE CULTIVOS DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS CEPA EH105

Se analizó la expresión transitoria de la RFP bajo la delección de ~ 2100 pb correspondiente al promotor de DREB2a y el promotor completo de ~ 2200 pb de RAP2.4a en hojas de *Lactuca sativa*. Para ello, células de *A. tumefaciens* cepa EHA105 se transformaron con las diferentes versiones generadas para ambas construcciones. Posteriormente las hojas de *Lactuca sativa* se transformaron mediante agroinfiltración. El procedimiento para llevar a cabo la agroinfiltración consistió en picar una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* e inocularla en 4 mL de medio LB líquido suplementado con tetraciclina 15 mg/mL, espectinomicina 100 mg/mL, rifampicina, 100 mg/mL y acetosiringona 100 mM. Se dejó incubar en oscuridad durante 2.5 días a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en agitación a 180 rpm. Pasado el tiempo, se inició un nuevo cultivo con 50 mL de medio en matraces con capacidad de 250 mL, usando las mismas condiciones anteriormente mencionadas, esto por un lapso de 18 horas aproximadamente. Luego, se volvió a iniciar otro cultivo con 48 mL de medio LB fresco y adicionado con los respectivos requerimientos. Se empleó como preinóculo un volumen de 2 mL del cultivo anterior para tener un volumen final de 50 mL, este último cultivo se dejó también bajo las mismas condiciones descritas arriba.

Se crecieron los cultivos, se midió la densidad óptica a 600 nm y se consideró usar los cultivos en un rango de 0.7 a 1.0 de absorbancia. Una vez conocido este dato se estableció ajustar los cultivos a una densidad óptica final de 0.25 para ser usados en la infiltración. El cultivo fue centrifugado a $4\,000 \times g$ durante 10 min, se dejó durante 1 hora empastillado y se volvió a centrifugar nuevamente de la misma manera. Se descartó el sobrenadante y se

resuspendió con un volumen de 50 mL de buffer MES 1 M; pH 5.6, MgCl₂ 1 mM y acetosiringona 100 mM (MMA), para obtener una concentración final de 10 mM de MES, 10 mM de MgCl₂ y 100 µM de acetosiringona. La resuspensión se hizo por inversión. Las suspensiones se dejaron incubando a temperatura ambiente por 2 horas en oscuridad.

4.2.2.3 INFILTRACIÓN DE HOJAS DE *Lactuca sativa*

Transcurrido el tiempo, se procedió a infiltrar hojas jóvenes y maduras de *Lactuca sativa* usando jeringas de 1 mL de capacidad. Para ello, se presionó ligeramente sobre el punto a infiltrar en la cara abaxial de la hoja y se infiltró a lo largo de la hoja de tal manera que los cultivos infiltraran completamente la hoja. Para estas pruebas se empleó un Mock (simulador), que consistió en infiltrar únicamente con la solución de resuspensión MMA.

Las plantas se acondicionaron nuevamente en hidroponia con nueva solución nutritiva y se dejaron en oscuridad a una temperatura de 25 °C ± 2 °C, durante 3 días.

4.2.2.4 TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE DREB Y RAP

Posterior a este tiempo, se hicieron círculos de 2 cm de diámetro con sacabocados y se dispusieron en tratamientos de estrés por salinidad y déficit hídrico, usando NaCl 150 mM y PEG 8000 al 10%, respectivamente. Así mismo para cada construcción agroinfiltrada se usó su respectivo control, que consistió en disponer los círculos en agua destilada. La manera en que se realizó este ensayo fue como sigue; primeramente, los círculos se colocaron en medio de dos capas de papel filtro (en forma de “sándwich”) y estos se sumergieron en las soluciones NaCl, PEG o agua destilada, según el caso, hasta quedar completamente empapados; luego de manera individual se envolvieron con film autoadherible con el fin de evitar la pérdida de agua. Finalmente, se dejaron incubando por 24 horas a temperatura ambiente y oscuridad.

Después, los círculos de hoja fueron a vistos al microscopio de fluorescencia Axio Scope A1 de Carl Zeiss para detectar la fluorescencia de la proteína roja fluorescente. Las muestras fueron excitadas a 530 nm y las imágenes fueron capturadas con la cámara digital Axiocam MRc5 acoplada al equipo y visualizadas con el software ZEN 2.

4.3 RESULTADOS

Para comparar la regulación de la actividad de promCpDREB2 y promCpRAP2.4A, se implementaron ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración en *Lactuca sativa*. Este método fue seleccionado para evitar los largos periodos de espera de regeneración que implican las transformantes estables. Ambos, promCpDREB2 y promCpRAP2.4A se fusionaron con el gen reportero RFP en el vector pH7RWG2-35S (el promotor del 35S fue eliminado) y a través de agroinfiltraciones con *Agrobacterium* fueron infectadas hojas de lechuga.

Ambos, promCpDREB2 y promCpRAP2.4A mostraron tener actividad inducible ante condiciones simuladas de estrés por salinidad y sequía, al activar la expresión de la proteína roja fluorescente (figura 4.1). Se alude que el tipo de elementos reguladores encontrados en sus promotores, hacen posible la expresión de la proteína reportera.

Para este experimento las hojas más jóvenes localizadas en la porción media de la planta fueron las que permitieron una uniforme y mejor infiltración. Cabe mencionar que las concentraciones de los agentes estresantes para estos ensayos fueron idóneos para generar una respuesta de estrés, que se corroboró con la funcionalidad positiva de los promotores, en tanto que no se observó expresión de la RFP para los controles negativos ni mocks (simuladores) usados.

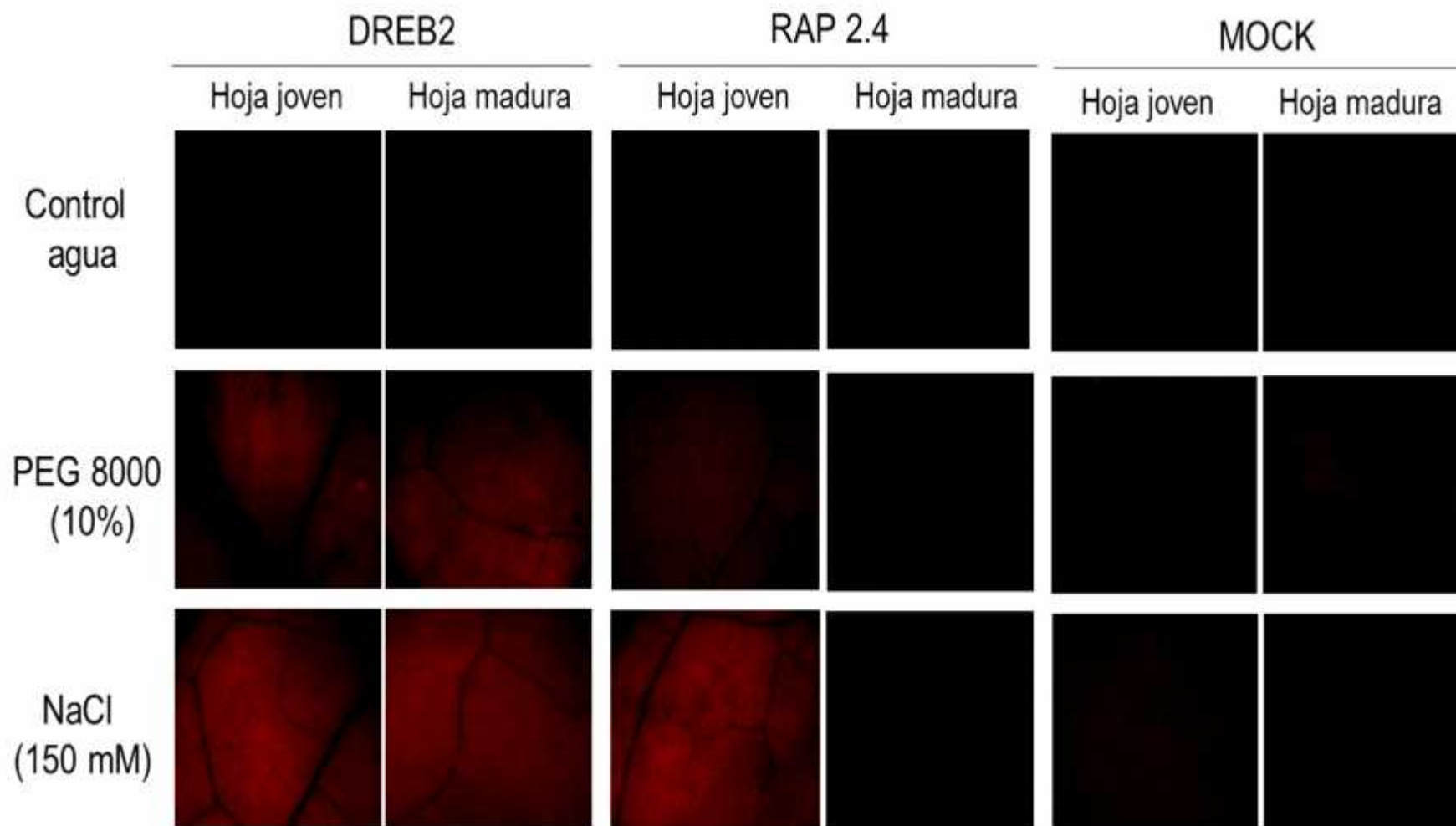


Figura 4.1. Expresión de la proteína roja fluorescente en hojas de *Lactuca sativa* por inducción de los promotores putativos de DREB2 y RAP2.4A, bajo condiciones simuladas de estrés por sequía y salinidad.

4.4 DISCUSIÓN

Los ensayos de expresión transitoria son una herramienta rápida y conveniente para investigación básica en plantas. Esta estrategia provee la manera de analizar eficiente y en poco tiempo la funcionalidad de genes y promotores (Hellens *et al.*, 2005; Lee y Yang, 2006). Además este tipo de pruebas han demostrado ser útiles para evaluar la actividad de las construcciones antes de llevar a cabo una transformación estable. En esta etapa del trabajo se realizaron los ensayos de expresión transitoria de las versiones completas de DREB2 Y RAP2.4A fusionados a RFP para probar el carácter inducible de tales promotores bajos condiciones de estrés.

Mediante microscopía de fluorescencia se detectó la expresión de la proteína roja fluorescente para ambas construcciones, en respuesta a sequía y salinidad 24 horas post-tratamiento, en comparación al mock usado y a los controles correspondientes. Este resultado sugiere que ambos promotores contienen elementos *cis* reguladores que están respondiendo ante este tipo de estímulos y que son responsables de conducir la expresión de la RFP, en este contexto, la intensidad de la expresión del reportero depende de la secuencia promotora *per se* y de los elementos reguladores que le acompañan, de tal manera que los factores de transcripción en la célula se unen al promotor e influyen directamente sobre la expresión del gen reportero (Titarelli *et al.*, 2009). Para interpretar este hecho, se sugiere la posibilidad de que los motivos ABRE son las secuencias reguladoras clave involucradas en respuesta al estrés por deshidratación en *DREB2* y *RAP2.4*, al menos para el promotor de *DREB2A* de *Arabidopsis*, Kim y colaboradores en 2011, constatan que los elementos ABRE (PyACGTG/TC) son importantes para la actividad del promotor en respuesta al estrés por deshidratación y salinidad, conforme a esto, aunque inicialmente la secuencia ABRE fue identificada como un elemento implicado en la señalización por ácido abscísico, ese mismo grupo de trabajo insinúa que ABRE puede recibir señales por ácido abscísico. Además mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, ellos comprueban que el promotor de *DREB2A* es blanco de al menos 3 miembros de la familia AREB/ABF: *AREB1*, *AREB2* y *ABF3*. Por otra parte, al ser ABRE considerado como un elemento G-box, se alude que este mismo podría ser blanco de otras familias de factores de transcripción como los bZIP, bHLH, así como de las familia MYB o WRKY, si bien se sabe pueden mediar la expresión de *DREB2A*, se desconoce cómo es el mecanismo por el que actúan (Sibérel *et al.*, 2001; Banerjee y Roychoudhury, 2015).

Es importante mencionar que la deshidratación es uno de los principales tipos de estrés que sufren las plantas, ocasionada por salinidad y sequía, que causan a su vez un desbalance osmótico caracterizado por la pérdida de agua y disminución de la turgencia en el tejido vegetal, así como la acumulación momentánea de Ca^{2+} en citoplasma, el cual también representa una especie de sensor para la señalización del estrés. A nivel molecular, se tiene documentado que el estrés por deshidratación dispara la biosíntesis de ABA, el cual es una respuesta imprescindible ante esta condición, por lo que se sugiere que las secuencias ABRE (ACGT) en el promotor de *DREB2* (con una frecuencia de 3) y en el promotor de *RAP2.4A* (con una frecuencia de 4) de papaya pueden ser reguladas por señales de ABA, lo que plantea su regulación en ambas vías, de manera ABA dependiente e independiente. Lo anterior al menos para *DREB2A*, puede soportarse con el dato que la aplicación exógena de ABA puede inducir una leve pero significativa expresión, pero no así para *RAP2.4* (Liu *et al.*, 1998; Lin K *et al.*, 2008), así también, otros estudios han identificado la participación de otros miembros de la familia AP2/ERF en ambas rutas de señalización (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Este supuesto también puede considerarse y replantearse para CpRAP2.4Ap, ya que el gen también tiene una regulación positiva bajo condiciones de estrés salino y por sequía (Lin *et al.*, 2008; Figueroa-Yañez *et al.*, 2016).

Otro elemento cis que ha sido reportado para la regulación del promotor de *DREB2A* es el motivo DRE/CRT, DRE (A/GCCGAC) ó (TACCGACAT) y CRT (TGGCCGAC), el cual se sabe que participa en la regulación ABA independiente (Saléh y Pagés, 2003). No obstante, en los promotores de estudio sólo se identificaron de manera manual dos secuencias con la descripción **GATGACAT** y **GCTGACAT** en promCpDREB2 y dos con la secuencia **CACGACAT** y **CCCAGACAT** en promCpRAP2.4Ap, si bien estas secuencias podrían ser suficientes para su reconocimiento, podrían así, considerarse elementos relacionados a DRE, ya que según reportes, *DREB2A* (inducido por sequía) así como *DREB1A* de *arabidopsis* (inducido en respuesta a frío) se unen exclusivamente a la secuencia DRE, activando la transcripción de forma DRE-dependiente (Nakashima *et al.*, 2000). También se identificó el motivo DRE2 (ACCGAC) (uno en el promotor *DREB2* y dos en *RAP2.4A*), el cual es muy parecido al motivo CRT, no obstante, el elemento CRT fue identificado originalmente en los promotores de los genes *rd29A* y *cor15A* de *arabidopsis*, como implicado en respuesta a frío, salinidad y sequía pero no a ABA (Baker *et al.*, 1994). En el caso de maíz, se identificaron dos elementos DRE en el promotor del gen *rab17*, de los cuales denominaron a uno como DRE2. DRE2 participa en condiciones de estrés por sequía y es inducido por ABA, lo que refiere un rol diferente comparado con *arabidopsis* (Kizis y

Pagés, 2002). Si bien, los core de los motivos DRE de CpDREB2Ap y CpRAP2.4Ap varían en las bases flanqueantes, cabe la posibilidad que este elemento también sea regulado por ambas vías, ABA dependiente e independiente manera, y de no ser así, sería interesante evaluar los promotores de otros genes que contengan este tipo de secuencias, con o sin variabilidad entre ellas, para determinar cómo ocurre su regulación.

Por ejemplo, Shen y colaboradores en 2004, concluyen que al menos para las ACGT-boxes, que se han demostrado su papel en respuesta a ABA, sigue siendo un rompecabezas el averiguar cómo es que las secuencias similares pueden tener un control específico en función de una señal fisiológica o una condición ambiental determinada. Para explicar lo anterior, este mismo autor propone dos modelos, el primero, en el cual las bases flanqueantes de la secuencia core son los que disponen de la respuesta a una señal y por ende de la especificidad del promotor. Para el caso de las ACTG-boxes, hicieron ensayos EMSA con extractos nucleares y elementos ACGT con bases flanqueantes heterogéneas y observaron que hay cambios en los patrones de unión, lo que sugiere que efectivamente la variabilidad de las bases flanqueantes pueden dirigir la especificidad del promotor con sus interactores. En el segundo, propone la existencia de elementos acopladores (secuencias cortas adyacentes al core) que pueden jugar un rol importante en la especificidad del promotor ante una condición en particular. Ejemplo de ello son los acopladores CE1 (encontrado a 44 pb del core ABRE en el promotor de *HV22*) y CE3 (del promotor de *HVA1*), ambos en cebada (Hobo *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2004). Siguiendo este contexto, se identificaron un total de 9 ACTG-boxes en CpDREB2p y 7 ACTG-boxes en CpRAP2.4Ap. Estudios en varios promotores demuestran que todas la mayoría de las proteínas de unión a la caja ACTG pertenecen a la familia bZIP (Jakoby *et al.*, 2002), por tanto, se especula que los factores de transcripción pertenecientes a este grupo pueden estar regulando significativamente la actividad del promCpDREB2 y del promCpRAP2.4A.

Otra clase de elementos reguladores que se encontraron en alta frecuencia en promCpDREB2 y promCpRAP2.4A fueron los motivos W-box con el core (TGAC/GTCA). Trabajos reportan la afinidad de unión de las proteínas WRKY a las W-box, así que los genes que contienen este tipo de elementos son probables blancos de los factores WRKY, incluyendo los genes WRKY mismos (Eulgem *et al.*, 2000; Sandermann, 2013). Los miembros pertenecientes a este grupo exclusivo de plantas participan en respuesta variedad de estreses abióticos y bióticos, como estrés oxidativo, radiación, sequía, calor, salinidad, luz, frío, así como durante la invasión por patógenos (Banerjee y Roychoudhury,

2015). La incidencia de este tipo de elementos indica el posible rol que los factores WRKY ejercen sobre *promCpDREB2* y *promCpRAP2.4A* en la célula, bajo los tratamientos usados.

Además, en el promotor de *RAP2.4A* de *Carica papaya* se localizó un elemento de respuesta a ABA, conocido como B-box (CAAACACC) y un elemento de respuesta a osmolaridad, denominado *PRE* (ACTCAT) (Ezcurra *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 2002). Se ha demostrado que B-box actúa como mediador de la respuesta a ABA en semillas, y que este elemento interactúa con varias proteínas, incluidas las bZIPs y quizás con factores de la familia MYB (Ganesh *et al.*, 2012). Se tiene documentado que la prolina (osmolito que protege a las membranas y a los componentes subcelulares de daño oxidativo) induce la expresión de genes que tienen elementos de respuesta a prolina (*PRE*, *ACTCAT*) en sus promotores, esto en respuesta a estrés salino (Satoh *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2008; Yaish, 2015).

También se reconocieron elementos tipo MYC y MYB, aunque en menor frecuencia. El elemento MYC está formado por el core (CACGTG), que también es denominado G-box, el cual puede tener variantes como (ACATG), y está implicado en , mientras que el elemento MYB representado con las siguientes secuencias (CGGTCA/TAAGT/CAAGT/GTTAGTT) (o bien llamadas MBS-boxes, son reconocidas por proteínas que llevan el mismo nombre: MYB), parece ser más versátil, sin embargo, tal o cual afinidad tenga la proteína hacia una determinada secuencia depende de la condición bajo la que se encuentre el promotor. No obstante, en arroz las MBS boxes fueron encontradas en los promotores de cinco genes y se observó que la inducibilidad por sequía de dichos genes está asociada con los sitios de unión a MYB (Pandey *et al.*, 2015).

Otra clase de motivos hallados fueron los GCC-like boxes (AGCCGCC) y CGCG-boxes (A/C/G/CGCG/C/G/T), se sabe que los motivos GCC son activos en una serie de promotores que dirigen la expresión de genes implicados en la respuesta a patógenos mediada por jasmonato, en la señalización por luz y a sequía. El motivo CGCG, está asociado con la señalización por calcio durante el estrés por deshidratación, como también por la señalización de ABA, etileno, SA e inclusive en la señalización por gravedad (Datta y Muthukrishnan, 1999; Hirt y Shinozaki, 2004; Cho y Choi *et al.*, 2009; Merillón y Ramawat, 2011). Aunque las secuencias suelen ser muy parecidas, la sustitución de bases flanqueantes es la que determina qué clase de trans factor ha de unírsele, que está en función a su vez del tipo de estrés que se trate.

Tanto en promCpDREB2 como en promCpRAP2.4A se descubrieron una variedad de elementos que no se encuentran caracterizados, encontrándose de 1 a 3 motivos de cada tipo a lo largo de las regiones promotoras. Es posible que alguno de estos motivos desconocidos tenga algún rol puntual sobre la funcionalidad del promotor bajo algún tipo de estrés. Podría asociarse la idea de que exista la posibilidad de que alguno de ellos participe en las condiciones de salinidad y sequía dadas para los ensayos hechos en este trabajo, lo anterior con el patrón observado: la gran mayoría de elementos ya caracterizados están implicados en respuesta a salinidad y sequía. Resulta interesante continuar con los análisis experimentales para conocer de qué manera esos elementos desconocidos podrían regular la actividad del promotor, así como averiguar qué tipo de trans proteínas pueden interactuar con ellas.

En los últimos años, muchos genes estrés-inducibles de un gran número de especies vegetales se han clonado y caracterizado. Los genes de la familia AP2/ERF han sido uno de ellos, debido a su versatilidad en cuanto a su participación en condiciones de estrés. La sobre-expresión de estos genes se ha probado en modelos como tabaco, arroz, y trigo, mejorando la respuesta ante el estrés. Sin embargo muchas de las secuencias reguladoras en cis de los promotores estrés-específicos son reconocidos por los factores de transcripción apropiados para esa condición, por lo que expresar un gen de manera constitutiva generalmente conlleva a la obtención de organismos anormales. En términos de ejemplificación, la sobre-expresión de DREB1A dirigida por el promotor constitutivo del 35S genera fenotipos con anomalías morfológicas en condiciones normales, a diferencia, cuando DREB1A es sobre-expresado con el promotor inducible del gen rd29A, se observa un fenotipo vigoroso y bastante tolerante a las condiciones de estrés (Hong *et al.*, 2006). Otro ejemplo es el correspondiente a la sobreexpresión de trehalosa en arroz, el cual es regulado por un promotor inducible por ácido abscísico, la regulación mediada por este promotor confiere a la planta tolerancia a salinidad, sequía y frío, y menor daño oxidante (Gerg *et al.*, 2002).

4.5 CONCLUSIONES

Para el análisis in vivo de promCpDREB2 y promCpRAP2.4A, se adaptó una serie de ensayos que permitieron el análisis eficiente de la expresión transitoria de la proteína roja fluorescente mediada por *Agrobacterium* en hojas de *Lactuca sativa*.

De acuerdo a los resultados mostrados, se sugiere que el promotor de DREB2 y el promotor de RAP2.4A son promotores inducibles en respuesta al estrés por salinidad (simulada con NaCl) y por sequía (simulada con PEG 8000).

Los elementos regulatorios en *cis* que pueden influir significativamente en la regulación de tales promotores son principalmente los motivos ABRE, DRE y ACTG-boxes, los cuales se encontraron en alta frecuencia en ambos promotores. Por otra parte, los motivos W-box, MYC, MYB y CGCG-boxes encontrados, son sitios de unión a proteínas que participan activamente bajo situaciones de estrés por deshidratación y otras, proteínas que pueden actuar de manera dependiente e independiente a ABA y regular a DREB2 y RAP2.4A.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de cuatro versiones del promotor del gen DREB2 y de tres versiones del promotor del gen RAP2.4A. Se evaluó la funcionalidad de las versiones completas de cada promotor mediante la transformación transitoria de hojas de *Lactuca sativa* y se determinó su carácter inducible bajo condiciones simuladas de salinidad y sequía a través de la expresión de la proteína roja fluorescente.

El empleo de herramientas bioinformáticas y bases de datos como MEME suite, TOMTOM, PLACE y PLANT CARE, permiten dar una idea de la composición y de la funcionalidad de los elementos regulatorios de los promotores. Para ambos promotores los motivos más sobre-representados fueron los elementos ABRE, G-BOX, CGCG-box, MYB, MYC, en menor medida pero no menos importantes, los DRE, Elementos de respuesta a ABA, a osmolaridad, GT-1, por mencionar algunos. Dado que en su mayoría, los elementos reguladores en *cis* de estos promotores están relacionados con la respuesta al estrés, se plantea que tanto CpDREB2 y CpRAP2.4A participan en una red de regulación bastante amplia y compleja, en la que además de su autorregulación, su transcripción también es controlada por factores de transcripción de las familias bZIP, NAC, MYB, WRKY, CAMTA e inclusive AP2/ERF. Dado que los dominios de unión a DNA reconocen estos elementos que generalmente son degeneradas, es claro que los factores de transcripción no únicamente se unen a las secuencias consenso, sino que al igual pueden unirse a las secuencias que varían en una, dos o más bases de esas secuencias.

Finalmente, el análisis funcional de los factores de transcripción permite generar mayor información sobre las redes regulatorias involucradas en respuestas al estrés abiótico y la coincidencia entre diferentes rutas de señalización durante el estrés. Por esta razón se puede considerar a los factores de transcripción como elementos claves e indispensables para el entendimiento de las bases moleculares que modulan las respuestas bioquímicas y fisiológicas de las plantas, así como de los mecanismos de resistencia/tolerancia, bajo una condición estresante. De esta manera, los factores de transcripción AP2/ERF, que son exclusivos de las plantas, tienen el potencial de ser estudiados con miras a ser aprovechados en el mejoramiento genético de los cultivos, no sólo sus genes, sobre todo de

sus promotores, ya que en el caso de los genes inducibles, que mejor que los promotores con los elementos adecuados para ser reconocidos por los factores de transcripción apropiados.

5.2 PERSPECTIVAS

Caracterizar las versiones trucas de cada promotor para atribuir y/o descartar la funcionalidad de los motivos encontrados bajo condiciones de salinidad y sequía, así como encontrar el promotor mínimo. Inclusive considerar la caracterización de los promotores ante situaciones de estrés distintas como temperaturas extremas, hipoxia o ante patógenos, así como de las fitohormonas señalizadoras por patógenos como ácido jasmónico y ácido salicílico, puesto que los motivos descubiertos indican que la actividad transcripcional de DREB2 y RAP2.4A de *Carica papaya* podría ser inducida también por este tipo de estreses.

Por otra parte, considerar la evaluación de los motivos conservados e identificados con sus respectivas variantes, ya que según reportes, las bases flanqueantes de los consensos de los elementos regulatorios están estrechamente relacionadas con la especificidad de reconocimiento por parte de los factores de transcripción. Así también, profundizar en el análisis de los motivos putativos no caracterizados, debido a que pueden tener una función relevante durante condiciones de estrés o procesos biológicos determinados.

El propósito de este proyecto es dar lugar al uso de promCpDREB2 y promCpRAP2.4A como promotores inducibles, ya que este tipo de promotores permitirían dirigir la expresión de un determinado gen ante estímulos específicos. Aún más resultaría atractivo usar estos promotores para el mejoramiento genético de *Carica papaya*, y así generar cultivos completamente cisgénicos.

BIBLIOGRAFÍA

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*. 9: 1859-1868.

Agarwal K, Jha B. (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*. 54 (2):201-212.

Agrawal G & Rakwal R. (2012). Chapter 11. Network of seed storage proteins regulation in cereals and legumes. *Seed development: OMIC technologies toward improvement of seed quality and crop yield: OMICS in seed biology*. Springer Science & Business Media. Pp: 196-197.

Alves M, Dadalto S, Gonçalves A, de Souza Gilza, Barros V, Fieto L. (2014). Factor Functional Protein-Protein Interactions in Plant Defense Responses. *Proteomes*. 2: 85-106. doi:10.3390/proteomes2010085

Allison L. (2011). Transcription in eukaryotes. *Fundamental Molecular Biology*. 672. <http://doi.org/10.1002/anie.198702181>

Ambawat S, Sharma P, Yadav N. (2013). MYB transcription factor genes as regulator for plant responses an overview. *Physiology Molecular Biology Plants*. 19: 307-321.

Arroyo-Herrera A, Figueroa-Yañez L, Castaño E, Santamaría J, Pereira-Santana A, Espadas-Alcocer Jorge, Sanchez-Teyer F, Espadas-Gil F, Alcaraz L, López-Gómez R, Calderón-Sánchez L, Rodríguez-Zapata L. (2015). A novel Dreb2-type gene from *Carica papaya* confers tolerance under abiotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 125 (1): 119-133.

Banerjee A & Roychoudhury A. (2015). WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2015/807560.

Basu S, Roychoudhury A, Sengupta D. (2014). Deciphering the role of various cis-acting regulatory elements in controlling SamDC gene expression in rice. *Plant Signal & Behavior*. doi: 10.4161/psb.28391.

Bilas R, Szafran K, Hnatuszko-konka K. (2016). Cis -regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. <http://doi.org/10.1007/s11240-016-1057-7>.

Butler F & Kadonaga T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Development*. 16(20): 2583–2592. <http://doi.org/10.1101/gad.1026202>.

Calvo.Fernández P, Fernández-Barbero C, Jiménez-Ibanez C, Geerinck S, Feckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla J, Pauwels L, Witters E, Puga M, Paz-Ares, Goossens A, Raymond P, De-Jaeger G, Solano R. The *Arabidopsis* Bhlh transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell*. 23 (12): 10.1105/tpc.110.080788.

Casaretto J, El.kereamy A, Zeng B, Stiegelmeier S, Chen X, Bi Y, Rothstein S. (2016). Expression of OsMYB55 in maize activates stress-responsive genes and enhances heat and drought tolerance. 17: 10.1186/s12864-016-2659-5.

Cao Z, Zhang S, Wang R, Zhang R, Hao Y. (2013). Genome Wide Analysis of the Apple MYB Transcription Factor Family Allows the Identification of MdoMYB121 Gene Confering Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Plos One*. 8: 1-13.

Chen H, Hsieh E, Cheng M, Chen M, Chen C, Hwang S, Lin T. (2016). ORA47 (octadecanoic-responsive domain transcription factor 47) regulates jasmonic acid and abscisic acid biosynthesis and signaling through binding to a novel cis-element. *New Phytologist*. Doi: 10.1111/nph.13914.

Chen Z, Wang J, Ye X, Li H, Ji X, Li Y., ... An M. (2013). A novel moderate constitutive promoter derived from poplar (*Populus tomentosa* carriére). *International Journal of Molecular Sciences*. 14(3), 6187–6204. <http://doi.org/10.3390/ijms14036187>.

Chi Y, Yang Y, Zhou Y, Zhou J, Fan B, Yu Q., *et al.* (2013). Protein-protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. *Molecular Plant*. 6: 287–300. doi: 10.1093/mp/sst026.

Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J. (2003). Molecular genetics perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*. 55: 225-236.

Cho E & Choi Y. (2009). Functional mechanism of calmodulin for cellular responses in plants. *Journal of Life Science*. 19 (1): 129-137.

Dai X, Wang Y and Zhang H. (2016). OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *Journal Experimental. Botany*. 67: 947–960.

Datta S & Muthukrishnan S. (1999). Chapter 9. Signal transduction and pathogen –induced PR gene expression. *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press. P:198.

Deveaux Y, Toffano-Nioche C, Claisse G, Thareau V, Morin H, Lauf P, Moreau H, Kreis M, Lecharny A. (2008). Genes of the most conserved WOX clade in plant effect root and flower development in *Arabidopsis*. *BioMed Central Evolutionary Biology*. doi:10.1186/1471-2148-8-291.

Danquah A, Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. (2013). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advance*, doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.006.

Ding, J, Yan Y, Li X, Li X, Wu R, Zheng J. (2015). Transcription factor WRKY46 modulates the development of *Arabidopsis* lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. *Plant Journal*. 84: 56–69. doi: 10.1111/tpj.12958.

Dong C & Liu J. (2010). The *Arabidopsis* EAR-motif-containing protein RAP2.1 functions as an active transcriptional repressor to keep stress responses under tight control. *BioMed Central*. 10: 10.1186/1471-2229-10-47.

Dutt M., Dhekney S., Soriano L., Kandel R., Grosse J. (2014). Temporal and spatial control of

gene expression in horticultural crops. 1: 14047. doi:10.1038/hortres.2014.47.

Fabi J, Seymour G, Graham N, Broadley M, May S, Lajolo f, Cordenunsi B, do Nascimento J. (2012). Analysis of ripening-related gene expression in papaya using an *Arabidopsis*-based microarray. BMC Plant Biology. BMC Plant Biology. 12(242):1-19.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Feng X, Liu D, Pan Y, Gong W, Ma G, Luo J, Deng X, Zhu Y. (2005). An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* AP2/EREB transcription factors gene family. Plant Molecular Biology. 59: 853-868.

Finer J, Hernandez-García C. (2014). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. Plants Science. 217-218: 109-119.

Figuerola-Yañez L, Pereira-Santana A, Arroyo-Herrera A, Rodríguez-Corona U, Sánchez-Teyer F, Espadas-Alcocer J, Espadas-Gil Francisco, Barredo-Pool F, Castaño E, Rodríguez-Zapata LC. (2016). RAP2.4a is transported through the phloem to regulate cold and heat tolerance in Papaya Tree (*Carica papaya* cv. Maradol): implications for protection against abiotic stress. Plos One. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165030>.

Fu C, Han Y, Fan Z, Chen J, Chen W, Lu W, Kuang J. (2016). The papaya transcription factor CpNAC1 modulates carotenoid biosynthesis through activating phytoene desaturase genes CpPDS2/4 during fruit ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64(27): 5454-5463.

Eulgem T, Rushton P, Robatzek S, Somssich I. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends in Plant Science. 5: 199-206.

Fujimoto S, Ohta M, Usui K, Hinshi H, Takagi M. (2000). *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors acts as transcriptional activators of repressors of GCC box-mediated gene expression. Plant Cell. 12 (3): 393-405.

Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*.124: 509-525.

Garg A, Kim J, Owens G, Ranwala P, Choi D, Kochian V, Wu J. (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99: 15898-15903.

Goldshmidt A, Alvarez P, Bowman J. Eshed V. (2008). Signal derived from YABBY gene activities in organ primordial regulate growth and portioning of *Arabidopsis* shoot apical meristems. *The plant cell*. 20 (5): 1217-1230.

Golldack D, Lüking I, Yang O. (2011). Plant tolerance to draught and salinity: Stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*. 30: 1389-1391.

Guo J, Yang X, Weston D, Chen J. (2011). Absciscic acid receptors: Past, present and future. *Journal of. Integrative Plant Biology*. 53: 469–479.

Grundy J, Stoker C, Carré I. (2015). Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers Plant Sciene*. doi: 10. 3389/fpls.2015.00648.

Hehl R, Norval L, Romanov A, Bülow. (2016). Boosting AthaMap database content with data from protein binding microarrays. *Plant Cell Physiology*. 57 (1): 10.1093/pcp/pcv156.

Hellens, R.P., Allan, A.C., Friel, E.N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M.D., Karunairetnam, S., Gleave, A.P. and Laing, W.A. (2005) Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*. 1: 13.

Hinz M., Wilson I, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis E, Sauter M, Dolferus R. (2010). *Arabidopsis* RAP2.2: An ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant physiology*. 153: 757-772.

Hirt H & Shinozaki K. (2004). Chapter 1. Molecular responses of higher plant to dehydration. Plant responses to abiotic stress. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. New York. P: 16.

Hobo T, Asada M, Kowiyama Y, Hattori T. (1994). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. The Plant Journal. 19 (6):679-689.

Hossain M, Wani S, Bhattachajee, Burritt D, Tran L. (2016). Chapter 4. Plant molecular adaptation and strategies under drought stress. Drought stress tolerance in Plants. Springer International Publishing. 978-3-319-28899-4.

Huang T, Harrar Y, Lin C, Reinhardt B, Newell N, Talavera-Rauh F, Hokin S, Barton M, Kerstter RA. (2014). Arabidopsis KANADI1 acts as a transcriptional repressor by interacting with specific cis-element and regulates auxin biosynthesis, transport, and signaling in opposition to HD-ZIP III factors. Plant Cell. 26 (1): 246-262.

Hubbard K, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff E, Schroeder J. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. Genes & Development, 24: 1695- 1708.

Huang J, Sun S, Xu D, Lan H, Sun H, Wang Z, Bao Y, Wang J, Tang H, Zhang H. (2012). TFIIIA-type zinc finger protein confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic rice (*Oriza sativa* L.). Plant Molecular Biology. 80: 337-350.

Ito T, Rampim M, Polido P, Souza S. (2012). Fatores de transcrição da família AP2/ERF e resposta em plantas aos estresses abióticos. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR 5(2):207-214.

Iwata Y, Fedoroff N, Koizumi N. (2008). *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. Plant Cell. 20 (11): 3107-3121.

Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science. 7: 106-111.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.

Jensen MK, Kjaersgaard T, Nielsen MM, Galberg P, Petersen K, O'Shea C, Skriver K. (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: Structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemistry Journal*. 426, 183–196.

Jiang Y, Yang B, Deyholos M. (2009). Functional characterization of the *Arabidopsis bHLH92* transcription factor in abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics*. 282: 503–516.

Kang J, Hwang U, Lee M, Kim Y, Assmann S, Martinoia E, Lee Y. (2010). PDR type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 2355-2360.

Kanhere, A., & Bansal, M. (2005). Structural properties of promoters: Similarities and differences between prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 33(10), 3165–3175. <http://doi.org/10.1093/nar/gki627>

Kilian J, Peschke F, Berendzen KW, Harter K, Wanke, D. (2012). Prerequisites, performance and profits of transcriptional profiling the abiotic stress response. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1819: 166–175.

Kim J, Mizoi J, Yoshida T, Fujita Y, Nakajima J, Ohori T, Todaka D, Nakashima K, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2011). An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*. 52(12): 2136-2146.

Kizis D & Pagès M. (2002). Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in ABA-dependent pathway. 30 (6): 679-689.

Klot K, Wiegiers G, Lange J, van Haarst J, Kruijer W, Bouwmeester H, Dicke MM. (2016). AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Journal Experimental Botany*. 67 (11): 3383-3396.

Knight H, Zarka D, Okamoto H, Tomashow F, Knight M. (2004). Absciscic acid induces CBF genes via the CRT promoter element. *Plant Physiology*. 135 (3): 1710-1717.

Komarnytsky S and Borisjuk S (2003) Functional analysis of promoter elements in plants. *Genetic Engineering*. 25: 113-141.

Korkuć P, Schippers J, Walther D. (2014). Characterization and identification of cis-regulatory elements in *Arabidopsis* based on single-nucleotide polymorphism information. *Plant Physiology*. 164 (1): 181-200.

Kristiansson E, Thorsen M, Tamás M, Nerman O. (2009). Evolutionary forces act on promoter length: identification of enriched *cis*-regulatory elements. *Molecular Biology and Evolution*. 26 (6): 1299-1307.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

Kwon Y, Kim J, Nguyen H, JikamarY, Kamiya Y. Hong S, Lee H. (2013). *Journal Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/ert223.

Lata C, Yadav A, Prasad M. (2011). Chapter 10. Role of plant transcription factor in abiotic stress tolerance. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. INTECH OPEN. Doi: 10.5772/23172.

Latchman DS. (1997). Transcription factors: an overview. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 29: 1305-1312.

Lee J, Yang J, Chiu T, Chen J, Chen C, Chang S. (2014). Isolation and characterization of the papaya MADS-boxes E-class genes. CpMADS1 y CpMADS3, and TM6 lineage gene CpMADS2. *Genetic and Molecular Research*. 13 (3); 5299-5312.

Lee M and Yang Y. (2006) Transient expression assay by agroinfiltration of leaves. In *Arabidopsis* Protocols (Salinas, J. and Sanchez-Serrano, J.J., eds), pp. 225–229. New York: Humana Press.

Levine M, Tjian R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*. 424: 147-151.

Li C, Ng Y, Fan L (2015). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany*. 114: 80–91.

Li W, He M, Wang J, Wang P. (2013). Zinc finger protein (ZFP) in plants-A review. *Plant Omics Journal*. 6: 474-480.

Li Y, Liu X, Li S, Chen G, Zhou X, Yang W, Chen R. (2015). Isolation of a maize ZmCI-1B promote and characterization of its activity in transgenic maize and tobacco. *Plant Cell Reports*. 34 (8): 1443-1457.

Lin R, Park H, Wang H. (2008). Role of *Arabidopsis* RAP2.4 in regulating light-and ethylene-mediated developmental process and drought stress tolerance. *Molecular Plant*. 1 (1): 42-57.

Lindemose S, O'shea C, Jensen M, Skriver K. (2013). Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 5842-5878.

Litz R. Biotechnology of fruit and nut crops. (2005). Chapter 6. *Carica papaya* Papaya. CABI editor. ISBN 0851990665. Pág. 181.

Liu JX, Srivastava R, Che P, Howell SH. (2007). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant Journal*. 51: 897–909.

Liu L, Xu W, Hu X, Liu H, Lin Y. (2016). W-box and G-box elements play important roles in early senescence of rice flag leaf. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep20881.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10: 1391–1406.

Liu W & Stewart C. (2016). Plant synthetic promoters and transcription factors. *Current Opinion in Biotechnology*. 37: 36–44. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.001>

Liu Y, Yin J, Xiao M, Mason A. S, Gao C, Liu H, ... Fu D. (2013). Characterization of Structure, Divergence and Regulation Patterns of Plant Promoters. *Journal of Molecular Biology Research*. 3(1): 23–36. <http://doi.org/10.5539/jmbr.v3n1p23>.

Lu S, Gu H, Yuan X, Wang X, Wu AM, Qu L, Liu JY. (2007) The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissue-specific and inducible expression in transgenic *Arabidopsis*. *Transgenic Res*. 16:177-191.

Luo H, Wu Y, Kole C. (2014). Chapter 9. Tissue culture, genetic transformation, and improvement of switchgrass through genetic engineering. *Compendium of bioenergy plant: switchgrass*. Taylor & Francis Group. New York. P: 269.

Lv Q, Cheng R, Shi T. (2014). Regulatory network rewiring for secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana* under various conditions. *BMC Plant Biology*. 14: 1-12.

Mackee J, Mackee T. (2009). Capítulo dieciocho: Información genética. *Bioquímica: las bases moleculares de la vida*. 4a Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores S. A. de C. V. Pág. 713.

Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara, Nakajima M, Kawashima M, *et al.* (2008). *Arabidopsis* transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiology*. 49: 1135–1149.

Matsuo M & Oelmuller R. (2015). Redox responsive transcription factor1 is involved in age-dependent and systemic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*. Doi: 10.1080/15592324.2015.1051279.

Mazzucotelli E, Mastrangelo A, Crossati C, Guerra D, Stanca A Cattivelli L. (2008). Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science*. 174: 420-431.

Merillón J & Ramawat K. (2011). Chapter 16. Pathogen-responsive cis-element. *Plant defense: biological control*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. Volume 12. P: 371-373.

Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1819: 86-96.

Mockler T, Priest H, Filichkin S. (2009). Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 643-649.

Mukhopadhyay P & Kumar. (2015). OsTCP19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4 mediated pathways. *Scientific Reports*. 5: 10.1038/srep09998.

Murayama K, Todaka D, Mizoi J, Yoshida T, Kidokoro S, Satoko M, Takasaki H, Sakurai T, Yamamoto Y, Yoshiwara K, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2011). Identification of cis-acting promoters elements in cold and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice and soybean. *DNA Research*. 9 (1):37-49.

Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*. 42: 657–665.

Naqvi R, Mubeen H, Raza S. (2016). Role of plant promoters and their cis regulatory elements in gene expression regulation. *European Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research*. 1: 347-352.

Niu F, Wang C, Yang J, Guo X, Wu F, Yang B, Deyholos M, Jian K. (2016). Functional characterization of NAC55 transcription factors from oilseed rape (*Brassica napus* L.) as a novel transcriptional activator modulating reactive oxygen species accumulation and cell death. *Plant Molecular Biology*. 92 (1-2): 89-104.

Niu Y, Figueroa P, Browse J. (2010). Characterization of JAZ-interacting Bhlh transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/erq408.

Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z, Yamaguchi-Shinozaki K. (2003). Interaction of two cis elements, ABRE and BRE in ABA dependent expression of. *The plant Journal*. 34 (2): 137-148. DOI: 10.1046/j.1365-3113.2003.01708.x.

Pan L and Jiang L. (2014). Identification and expression of the WRKY transcription factor of *Carica papaya* in response to abiotic and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*. 41(3): 1215-1225.

Pandey S, Reddy C, Yaqoo U, Kumar Y, Arora S, Kaul T. (2015). In silico analysis of cis acting regulatory elements CAREs in upstream regions of ascorbate glutathione pathway genes from *Oryza sativa*. *Biochemistry and Physiology*. 4 (2): 1-7.

Phillips T and Hoopes L. (2008). Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education*. 1: 119.}

Poovaiah T & Yang B. (2002). A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *The Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M207941200.

Porto MS, Pinheiro PN, Batista GL, Cavalcanti dos Santos R, de Albuquerque Melo Filho P, de Lima LM. (2014). Plant promoters: an approach of structure and function. *Molecular Biotechnology*. 56:38–49.

Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C. (2004) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell & Development Biology Plant*. 40:1–22.

Phukan U, Jeena G, Shukla R. (2016). WRKY transcripthon factors: molecular regulation and stress response in plants. *Frontiers in Plant Science*. Doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00760>.

Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2011). Achievements and Challenges in Understanding Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance. *Plant Cell Physiology*. 52: 1569-1582.

Qiu D, Xiao J, Xie W, Chen H, Li X, Wang S. (2009). Exploring transcriptional signaling mediated by OsWRKY13, a potential regulator of multiple physiological process in rice. *BioMed Central Plant Biology*. doi: 10.1186/1471-2229-9-74.

Rachez C, Freedman L. (2001). Mediator complexes and transcription. *Current Opinion Cell Biology*. 13: 274-280.

Recillas F & Escamilla M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación genética. *Mensa*. XXVIII: 173–201.

Reyes Y, Mazorra C, Núñez M. (2008). Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cultivos tropicales*. 29 (4): 67-75.

Roa-Rodríguez C (2003) Promoters used to regulate gene expression. *CAMBIA Intellectual Property*, Canberra.

Rushton J, Somssich E, Ringler P, Shen J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Science*.15: 247–258. doi: 10.1016/j.tplants.2010.02.006.

Rushton P, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich I (2002) Synthetic Plant Promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant cell*. 14: 749-762.

Sandermann H. (2013). Chapter 6. Transcriptional regulators of stress responses. *Molecular ecotoxicology of plants*. 1st edition. Springer-Verlag Heidelberg. P:164.

Satoh R, Nakashima K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2002). ACTCAT, a novel cis-acting element for proline-and hipoosmolarity-responsive expression of the ProDHgene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 130 (2): 709-719.

Shen Q, Casaretto J, Zhang P, Ho D. (2004). Functional definition of ABA-response complexes: the promoter units necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Molecular Biology*. 54: 111-124.

Shrivastava T, Tahirov TH. (2010). Three-dimensional structures of DNA-bound transcriptional regulators. *Methods in Molecular Biology*, 674: 43-55.

Sib  rel Y, Doireau P, Gantet P. (2001). Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanism. *European Journal Biochemistry*. 268 (22): 5655-5666.

^aSakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006). Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell*. 18: 1292–1309.

^bSakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 18822–18827.

Song C, Je J, Hong J, Lim C. (2014). Ectopic expression of *Arabidopsis* dehydration-responsive element-binding factor DREB2C improves salt stress tolerance in crucifers. *Plant Cell Reports*. 33 (8): 1239-1254.

Song P, Heinen J, Burns T, Allen R. (2000). Expression of two tissue-specific promoters in Transgenic cotton plants. *The Journal of Cotton Science* 4:217-223.

Stegmaier P, Kel AE, Wingender E. Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome Informatics*. 15: 276-286.

Takatsuji H. (1998). Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 54: 582-596.

Thatcher L, Kazan K, Manners. (2012). Lateral organ boundaries domain transcription factors. *Plant Signal & Behavior*. 7 (12): 1702-1704.

Thomashow MF. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94: 1035–1040.

Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. (2010). The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 284: 173–183.

Tiessen A, Gómez F, Trejo L, López A, Padilla D, Vargas E, Palacios N. (2009). *Fundamentos y metodologías innovadoras para el mejoramiento genético de maíz*. 1a edición. Capítulo: 6. Factores de transcripción. Fundación Ciencia Activa. Editor: Axel Tiessen. pp.153-188.

Titarelli A, Santiago M, Morales A, Meisell L, Silva H. (2009). Isolation and functional characterization of cold-regulated promoters, by digitally identifying peach fruit cold-induced genes from a large EST dataset. 9:121. doi: 10.1186/1471-2229-9-121.

Toki S., Takamatsu S., Nojiri C., Ooba S., Anzai H., Iwata M., Christensen A., Quail P., Uchimiya H. (1992). Expression of a Maize Ubiquitin Gene Promoter-bar Chimeric Gene in Transgenic Rice Plants. *Plant Physiology*. 100: 1503-1507.

Tomovic, A. (2009). Computational analysis of promoters and DNA-protein interactions. *BMC Bioinformatics*.

Tsien R, Shaner N, Steinbach P. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*. 2 (12): 905-909.

Tsukagoshi H, Sazuki T, Nishikawa K, Agarie S, Ishiguru S, Higashiyama T. (2015). RNA-seq analysis of the response of the halophyte, *mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) to high salinity. *Plos One*. 10(2): e0118339. doi:10.1371/ journal.pone.0118339.

Tuteja N & Singh S. (2012). Chapter 6. Role of DREB-like proteins in improving stress tolerance of transgenic crops. *Plant acclimation to environmental stress*. Springer-Verlag New York. ISBN 1461450012, 9781461450016.

Uberti-Manassern, Lucero L, Viola I, Vegetti A, González D. (2012). The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *Journal Experimental Botany*. 63 (2): 809-823.

Ud-Din A, Rauf M, Ghafoor S, Khattak M, Hameed M, Shah H, Muhammad K, Rehman A, Inamullah. (2016). Efficient use of artificial micro-RNA to downregulate the expression of genes at the post-transcriptional level in *Arabidopsis thaliana* A. *Genetic Molecular Research*. 1 (2): <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027439>.

Udvardi MK., Kakar K, Wandrey M, Montanari O, Murray J, Andriankaja A, Zhang JY, Benedito V, Hofer JM, Chueng F, *et al.* (2007). Legume transcription factors: Global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiology*.144: 538–549.

Vedel V & Scotti I. (2011). Promoting the promoter. *Plant Science*. 180(2): 182–189. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.09.009>.

Wang G, Zhang S, Lian Y, Liu Y, Wang X, Liu Y. (2013), Characterization of maize *Wip1* promoter in transgenic plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 23872-23892; doi:10.3390/ijms141223872.

Wang H, Lin R, Park H. (2008). Role of *Arabidopsis* RAP2.4 in regulating light and ethylene mediated developmental processes and drought stress tolerance. *Molecular Plant*. 1 (1): 42-57.

Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson. (2003). JA: Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular*

Endocrinology. 17: 1901-1909.

Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei N, Leung J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant*. 1: 198–217.

Weigel NL, Moore NL. (2007). Steroid Receptor Phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Molecular endocrinology*. 21 (10): 2311-2319.

Wunderlich M, Grob-Hardt R, Schöff F. (2014). Heat shock factor HSFB2a involved in gametophyte development of *Arabidopsis thaliana* and its expression is controlled by a heat inducible long non-coding antisense RNA. *Plant Molecular Biology*. 85 (6): 541-550.

Xiao BZ, Chen X, Xiang CB, Tang N, Zhang QF, Xiong LZ (2009) Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Molecular Plant*. 2: 73–83.

Yaish M. (2015). Proline accumulation is a general response to abiotic stress in the date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.). *Genetics and Molecular Research*. 14 (3): 9943-9950.

Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*. 6: 251–264.

Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Science*. 10: 88-94.

Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 781-803.

Yamaguchi-Shinosaki K & Shinozaki K. (2009). DREB regulons in abiotic stress responsive gene expression in plants. *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Doi: 10.1007/978-0-387-79144-9_2.

Yamamoto Y, Ichida H, Matsui M, Obokata J, Sakurai T, Satou M, Seki M, Shinozaki K, Abe T (2007) Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics*. 8: 1-23.

Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y (2010). Narrowing down the targets: Towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Molecular Plant*. 3: 469–490.

Yang Y, Yang G, Liu S, Guo X, Zheng C. (2003). Isolation and functional analysis of a strong specific promoter in photosynthetic tissues. *Science in China*. 46 (6): 651-660.

Yamaguchi K, y Shinozaki K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses, *Annual Review of Plant Biology*. 57: 781–803.

Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K., Mogami J, Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi K (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell and Enviroment*. 38: 35–49.

Yutao Y, Guodong Y, Shijuan L, Xingqi G, Chengchao Z. (2003). Isolation and functional analysis of a strong specific promoter in photosynthetic tissues. *Science in China Series C, Life Sciences*. 46(6): 651-660.

Xie X. , Shen S., Yin X., Xu Q., Sun C., Grierson D., Ferguson I., Chen K. (2014). Isolation, classification and transcription profiles of the AP2/ERF transcription factor superfamily in citrus. *Molecular Biology Reports*. 41: 4261- 4271.

Zhang S, Lian Y, Liu Y, Wang X, Liu X, Wang G (2013). Characterization of a Maize *Wip1* Promoter in Transgenic Plants. *International Journal of Molecular Science*. 14, 23872-23892.

Zheng, X, Chen, B, Lu, G, Han B (2009) Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research*. 379, 985–989.

Zhu Q, Zhang J, Gao X, Tong J, Xiao L, Li W, Zhang H. (2010). The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene*. 457: 1-12.

Zhu X, Li X, Chen W, Lu W, Mao J, Liu T. (2013). Molecular cloning characterization and expression analysis of *CpCBF2* gene in harvested papaya fruit under temperature stresses. *Electronic Journal of Biotechnology*. doi:10.2225/vol16-issue4-fulltext-1.

Zuo J., Chua N. (2000). Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Current Opinion in Biotechnology*. 11: 146–151.