



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

El papel del gen LRX1 en la respuesta a sequía en
Arabidopsis thaliana

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Rico Rodrigo, Sara Amalia

Tutor/a: Agusti Feliu, Javier

Director/a Experimental: SIERRA ROBLES, SANTIAGO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural (ETSEAMN)



El papel del gen *LRX1* en la respuesta a sequía en *Arabidopsis thaliana*

TRABAJO DE FIN DE GRADO – Grado en Biotecnología

Alumna: Dña. Sara Amalia Rico Rodrigo

Tutor Académico: Prof. Dr. Javier Agusti Feliu

Director experimental: D. Santiago Sierra Robles

**Curso académico: 2019-2023
VALENCIA, 12 DE JUNIO DE 2023**

El papel del gen *LRXI* en la respuesta a sequía en *Arabidopsis thaliana*

Resumen:

Las extensinas LRX son proteínas extracelulares compuestas por un dominio de repetición rica en leucina (LRR) N-terminal y un dominio de extensión en su extremo C-terminal. El dominio LRR permite la interacción entre proteínas mientras que la extensión se encarga del anclaje a la pared celular. Anteriormente, se ha encontrado en nuestro laboratorio una asociación de la presencia o ausencia de polimorfismos en *LRXI* en ecotipos que habitan en zonas áridas o con pluviometría media. Además, se conoce por otros estudios con mutantes de *LRXI* en *Arabidopsis thaliana* que la actividad del gen está ligada a la morfogénesis y elongación de los pelos radiculares. Los mutantes *lrx1* generan pelos radiculares anómalos estructuralmente y presumiblemente deficientes en cuanto a su función, lo que se debe a que *LRXI* regula la formación de su pared celular. Debido a que estas estructuras están estrechamente relacionadas con la absorción de agua, este proyecto busca probar la hipótesis de que *LRXI* juega un papel relevante en la adaptación de las plantas a sequía. Para comprobar esta teoría, se ha llevado a cabo (i) una estrategia genética en la que se ha comparado la resistencia a sequía de mutantes *lrx1* y plantas silvestres (WT) y (ii) un estudio temporal del perfil de expresión del gen en condiciones de sequía. Se han diseñado diversos experimentos comparativos en condiciones normales y en condiciones de sequía inducida para llevar a cabo estos estudios. Se ha determinado que el gen *LRXI* es esencial para la aclimatación a la sequía mediante la medición de la longitud de la raíz principal y que la presencia del gen *LRXI* influye activamente en la elongación de los pelos radiculares, pero no en el número de pelos formados. Por otra parte, se ha demostrado que las primeras 72 horas en condiciones de sequía inducida por polietilenglicol al 20% la expresión de *LRXI* desciende de forma abrupta en comparación con las condiciones normales y se ha relacionado este resultado con la disminución de pelos formados en esta condición. Los resultados sugieren, por tanto, que la actividad de LRX1 podría ser clave en la adaptación a la sequía en las plantas.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, *LRXI*, sequía, pelos radiculares, adaptación.

Autora: Sara Amalia Rico Rodrigo
Tutor académico: Prof. Dr. Javier Agusti Feliu
Tutor experimental: Santiago Sierra Robles

Valencia, Junio de 2023

The role of *LRX1* in drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*

Abstract:

The extensins LRX are extracellular proteins composed of a leucine-rich repeat (LRR) domain at the N-terminus and an extension domain at their C-terminal end. The LRR domain enables protein-protein interactions, while the extension domain is responsible for anchoring to the cell wall. Previously, an association between the presence or absence of *LRX1* polymorphisms in ecotypes inhabiting arid or moderately rainy areas was found in our laboratory. Additionally, other studies with *LRX1* mutants in *Arabidopsis thaliana* have shown that the gene's activity is linked to the morphogenesis and elongation of root hairs. *LRX1* mutants exhibit structurally anomalous root hairs, presumably deficient in function, due to *LRX1*'s regulation of their cell wall formation. Given that these structures are closely related to water absorption, this project seeks to test the hypothesis that *LRX1* plays a relevant role in plant adaptation to drought. To test this theory, (i) a genetic strategy comparing drought resistance between *lrx1* mutants and wild-type plants (WT) was carried out, as well as (ii) a temporal study of the gene's expression profile under drought conditions. Various comparative experiments were designed under normal and induced drought conditions to conduct these studies. It has been determined that the *LRX1* gene is essential for drought acclimation, as evidenced by measuring the length of the primary root, and that the presence of the *LRX1* gene actively influences the elongation of root hairs, but not the number of hairs formed. Furthermore, it has been demonstrated that within the first 72 hours of drought induced by 20% polyethylene glycol, *LRX1* expression decreases abruptly compared to normal conditions, and this result has been associated with the decrease in hairs formed under this condition. The results suggest, thus, that the LRX1 function may be key for plant adaptation to drought.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *LRX1*, drought, root hairs, adaptation.

Author: Sara Amalia Rico Rodrigo
Academic tutor: Prof. Dr. Javier Agusti Feliu
Experimental tutor: Santiago Sierra Robles

Valencia, June, 2023

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de fin de grado no es solo el resultado de meses de trabajo, sino la consecuencia del esfuerzo y el aprendizaje de años, que no habría podido superar sin ciertos apoyos.

A mi familia y amigos, por tolerarme en los momentos más desafiantes y brindarme consuelo cuando lo he necesitado. Ellos siempre han estado a mi lado y les estoy profundamente agradecida por contribuir a mi desarrollo personal.

A mis compañeros de la *University of Nottingham*, que me han brindado lecciones que trascienden lo puramente académico. Es fascinante lo que puede crecer una persona en pocos meses cuando se rodea de gente positiva e inspiradora.

A todo el grupo de laboratorio, pero en especial a Paula Brunot, que no solo ha aportado el punto de partida de este proyecto, sino que me acompañó en mis primeros pasos en un laboratorio. También a Javier Agusti, que ha sabido valorarme, apoyarme y hacerme sentir una más del grupo desde que puse un pie en este instituto.

En último lugar quiero expresar mi gratitud a Santiago Sierra, por haber sido mi mentor y compañero a lo largo de estos meses. Por su seguimiento constante, por su profunda sabiduría y su inquebrantable apoyo; pero no solo eso. Santi ha sabido reconocerme y creer en mí desde que nos conocimos, convirtiéndose en algo más que un tutor, en un verdadero amigo.

Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Tendencias demográficas y desafíos del abastecimiento de alimentos.....	8
1.2. Disponibilidad hídrica y adaptación de las plantas.....	9
1.3. Papel de las extensinas en la formación de pelos radiculares.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
4.1. Material vegetal.....	16
4.2. Crecimiento de plantas.....	16
4.3. Establecimiento de las condiciones de sequía inducida.....	16
4.4. Fenotipado de mutantes lrx1-1 en sequía.....	17
4.5. Análisis de la expresión de LRX1 con el tiempo en sequía.....	18
4.6. Clonación de LRX1 en GoldenBraid.....	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1. Resultados.....	22
5.1.1. Establecimiento de las condiciones de sequía inducida.....	22
5.1.2. Fenotipado de mutantes lrx1-1 en condiciones de sequía.....	25
5.1.3. Expresión de LRX1 con el tiempo en condiciones de sequía.....	29
5.1.4. Clonación de LRX1 en GoldenBraid.....	29
5.2. Discusión.....	31
5.2.1. Establecimiento de las condiciones de sequía inducida.....	31
5.2.2. Fenotipado de mutantes lrx1-1.....	32
5.2.3. Expresión de LRX1 con el tiempo en condiciones de sequía.....	33
5.2.4. Clonación de LRX1 en GoldenBraid.....	33
6. PROYECCIÓN FUTURA.....	35
7. CONCLUSIÓN.....	36
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto del tratamiento de sequía en las propiedades fisiológicas de pasto varilla.....	10
Tabla 2. Composición del tampón CTAB.....	19
Tabla 3. Componentes empleados en cada reacción de PCR.....	20
Tabla 4. ANOVA entre las medias calculadas con los datos de mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25% de longitud de raíz principal, número de raíces laterales y peso fresco.....	22
Tabla 5. Comparación múltiple de Student-Newman-Keuls entre las medias obtenidas en mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25% de medida de longitud de raíz principal, número de raíces laterales y peso fresco.....	23
Tabla 6. ANOVA entre las medias calculadas con los datos de col-0 y <i>lrx1-1</i> en mock y PEG 20% de longitud de raíz principal, número y longitud de pelos radiculares.....	25
Tabla 7. Comparación múltiple de Student-Newman-Keuls entre las medias obtenidas en mock y PEG 20% de longitud de raíz principal, número y longitud de pelos radiculares.....	26
Tabla 8. Cebadores diseñados para la clonación en GoldenBraid.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rendimiento mundial ponderado por área observada (1961-2008) y proyección hasta 2050.....	8
Figura 2. Clases de extensinas (EXT) en su contexto celular.....	11
Figura 3. Análisis de componentes principales PC1, PC2 y PC3.....	14
Figura 4. Cronograma del experimento “Establecimiento de condiciones de sequía inducida”	17
Figura 5. Cronograma del experimento “Fenotipado de mutantes <i>lrxI-1</i> ” en sequía”.....	18
Figura 6. Diagrama del análisis de expresión de <i>LRXI</i> en el tiempo.....	19
Figura 7. Protocolo en 3 pasos de PCR.....	21
Figura 8. Distribución de las medidas obtenidas en tratamiento mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25%. (A) Longitud de raíz principal. (B) Masa de la parte aérea de las plantas.....	24
Figura 9. Distribución del número de raíces laterales en tratamiento mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25%.....	24
Figura 10. Distribución de las medidas obtenidas para <i>col-0</i> y <i>lrxI-1</i> en mock y PEG 20%. (A) Longitud de la raíz principal. (B) Número de pelos radiculares.....	27
Figura 11. Longitud de raíz en <i>col-0</i> y <i>lrxI-1</i> en condiciones mock y condiciones de estrés hídrico inducido por PEG.....	27
Figura 12. Distribución de las medidas obtenidas en <i>col-0</i> y <i>lrxI-1</i> en mock y PEG 20% para la longitud de los pelos radiculares.....	28
Figura 13. Imágenes ampliadas con lupa de la raíz de <i>col-0</i> y <i>lrxI-1</i> en mock y PEG 20%.....	28
Figura 14. Expresión de <i>LRXI</i> tras 72 horas en sequía inducida por PEG 20%.....	29
Figura 15. Regiones amplificadas por PCR. (A) Promotor de <i>LRXI</i> . (B) Región codificante (CDS) de <i>LRXI</i> dividida en tres secciones.....	30
Figura 16. Resultado de la PCR en gel de electroforesis.....	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tendencias demográficas y desafíos del abastecimiento de alimentos

La creciente población mundial y los desafíos asociados a la disponibilidad de alimentos representan uno de los mayores problemas a los que nos enfrentamos en el futuro. Se estima que la población global podría alcanzar los 9.700 millones de habitantes para el año 2050, según las proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas (United Nations, 2022). Sin embargo, la producción de alimentos actual se encuentra limitada y no puede abastecer este crecimiento de manera sostenible (Figura 1).

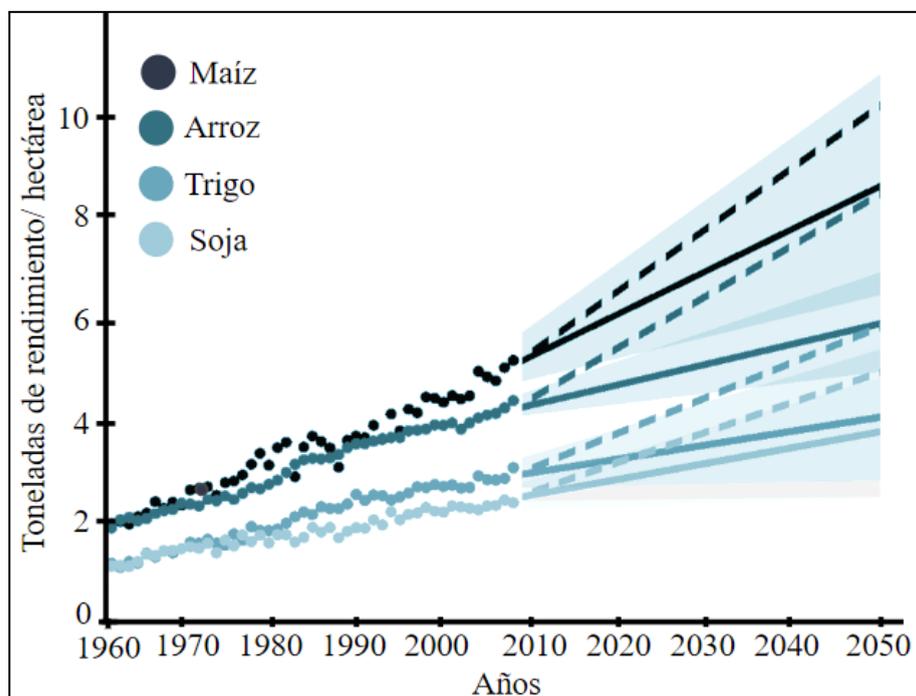


Figura 1: Rendimiento mundial ponderado por área observada (1961-2008) y proyección hasta 2050. Se representa con puntos el rendimiento ponderado y con líneas continuas las proyecciones. El sombreado muestra la región de confianza del 90% de 99 muestras. La línea discontinua representa la tendencia de mejora del rendimiento de 2,4% requerida cada año para duplicar la productividad para 2050 a partir del año 2008 (Datos obtenidos de Ray et al., 2013).

Ante esta perspectiva, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha establecido un objetivo crucial: lograr un aumento del 50% en la producción de alimentos para el año 2025, con un enfoque especial en cereales como el trigo y el maíz. Para alcanzar esta meta, es esencial implementar prácticas de intensificación agrícola sostenibles que eviten la degradación adicional de los suelos y utilicen de manera eficiente los recursos hídricos (FAO, 2018).

1.2. Disponibilidad hídrica y adaptación de las plantas

Además de estos retos, se debe considerar los estreses ambientales a los que se enfrentan las plantas, como cambios en los patrones de lluvia y temperaturas, que se espera que se intensifiquen en las próximas décadas debido al cambio climático (Karlova et al., 2021). Estos factores ambientales ejercen presión adicional sobre la producción de alimentos y requieren soluciones innovadoras y sostenibles para garantizar la seguridad alimentaria en el futuro.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), en las últimas siete décadas, la población mundial se ha triplicado, mientras que el consumo de agua se ha multiplicado por seis, principalmente debido al aumento del riego en la agricultura. De hecho, aproximadamente el 70% del agua dulce extraída anualmente se destina al riego agrícola, lo que plantea un desafío significativo en términos de disponibilidad hídrica para el desarrollo futuro (UNESCO, 2009). La mejora de la resistencia y productividad de las plantas frente a perturbaciones ambientales, especialmente la sequía, se ha vuelto crucial para satisfacer la creciente demanda de agua y garantizar la disponibilidad de alimentos (Vicente-Serrano et al., 2022).

La sequía se distingue de la aridez climática y la escasez de agua, relacionadas con la disponibilidad de agua a largo plazo, ya que se refiere a condiciones de corto plazo en las que los recursos hídricos no son suficientes para satisfacer las necesidades del entorno. Esto puede ser causado por la falta de agua, inundaciones o por suelos salinos y fríos que limitan la absorción de agua por parte de las plantas (Karlova et al., 2021). Durante la sequía se produce una tensión en el xilema que, en ausencia de una adaptación adecuada (Ye et al., 2016), incapacita el transporte de agua de la raíz a las hojas (McDowell et al., 2008). Además, la absorción de nutrientes se ralentiza (He & Dijkstra, 2014) y se altera la actividad microbiana del suelo (Pérez Castro et al., 2019; Veach & Zeglin, 2020). Asimismo, el restablecimiento del suministro de agua después de la sequía puede desencadenar estrés oxidativo adicional (Bian & Jiang, 2009).

Mientras que la sequía severa puede provocar daños irreversibles en la planta como la senescencia, la reproducción retardada o reducida e incluso la muerte; una sequía moderada puede ser superada (Sadhukhan et al., 2022). Las plantas, al ser sésiles, utilizan distintos mecanismos para cuantificar la disponibilidad hídrica y generar respuestas adaptativas que intervienen en todos los niveles de la planta (Tabla 1) (Bao et al., 2014; Koevoets et al., 2016). Algunas de estas respuestas ante una baja disponibilidad de agua son: la acumulación de osmoprotectores, el control de los estomas, la baja conductancia hidráulica del xilema, el desarrollo de raíces profundas, la fotosíntesis CAM o metabolismo ácido de las crasuláceas y el desprendimiento de hojas o reducción de su tamaño. Además, las raíces de las plantas poseen

estructuras especializadas llamadas pelos radiculares, que aumentan la superficie de absorción y son sensibles a la humedad del suelo; siendo las responsables de enviar señales químicas y eléctricas a través del sistema vascular de la planta. De esta forma, las raíces participan en la detección del ambiente y forman parte de la respuesta mediante la absorción, el almacenamiento y el transporte de agua (Kim et al., 2020). Por otra parte, estas estrategias se han consolidado de forma evolutiva en las regiones más áridas, formando poblaciones adaptadas con genes y alelos que favorecen la mayor resistencia de ciertas especies ante la escasez de agua.

Tabla 1. Efecto del tratamiento de sequía en las propiedades fisiológicas de pasto varilla. La información es presentada como media \pm desviación estándar de cuatro réplicas independientes, tras 20 días de sequía. Los resultados no significativos entre condiciones ($p < 0.01$) se encuentran marcados con el símbolo “*” (Datos extraídos de Ye et al., 2016).

Tratamiento		Control	Sequía
Tensión hídrica del suelo (MPa)		0.00 \pm 0.00	0.08 \pm 0.02
Contenido de agua relativo en la hoja		77.35 \pm 0.01	71.08 \pm 0.02
Altura de la planta (cm)	0 días en sequía*	18.31 \pm 6.18	19.08 \pm 4.97
	20 días en sequía	43.26 \pm 9.11	39.75 \pm 8.49
	Altura relativa de la planta	24.96 \pm 6.21	20.67 \pm 6.22
Fotosíntesis	Ratio fotosintético* ($\mu\text{molCO}_2/\text{m}^2/\text{s}$)	22.96 \pm 3.22	21.69 \pm 7.17
	Conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$)	0.138 \pm 0.03	0.125 \pm 0.05
	Ratio de transpiración ($\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$)	6.88 \pm 1.11	6.09 \pm 2.15
	Eficiencia de uso de agua ($\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$)	3.35 \pm 0.20	3.59 \pm 0.25

1.3. Papel de las extensinas en la formación de pelos radiculares

Los pelos radiculares desempeñan un papel crucial en la absorción de nutrientes y agua por parte de la raíz y son generados continuamente por el extremo de la misma. Los pelos radiculares son estructuras pequeñas y unicelulares, alargadas en forma de cabello, que se encuentran en la superficie externa de la raíz y aumentan considerablemente la superficie de absorción del sistema radicular. Bajo estrés hídrico leve, las raíces se dirigen hacia áreas con mayor disponibilidad de agua, alejándose de las capas superiores secas del suelo donde el estrés por calor y salinidad es más intenso (Comas et al., 2013). De esta manera, se forma una arquitectura radicular más profunda y con menos raíces laterales o axiales (Dinny, 2019; Santos Teixeira & Ten Tusscher, 2019) pero con más cantidad de pelos radiculares, mientras que los pelos de mayor edad degeneran.

Las extensinas (EXT) son una clase de glicoproteínas estructurales que contribuyen a la formación y fortaleza de los pelos radiculares. Actualmente, la función exacta de las EXT en las plantas todavía no se comprende en su totalidad. Se ha demostrado que están presentes en la pared celular de varios tejidos vegetales, como la epidermis, el parénquima y los vasos conductores. Las extensinas se subdividen en 5 subfamilias, EXT clásicos, cortos, con repeticiones ricas en leucina (LRX), quinasas receptoras tipo EXT ricas en prolina (PERK) y de homología con formina (FH-EXT) (Moussu & Ingram, 2023) (Figura 2).

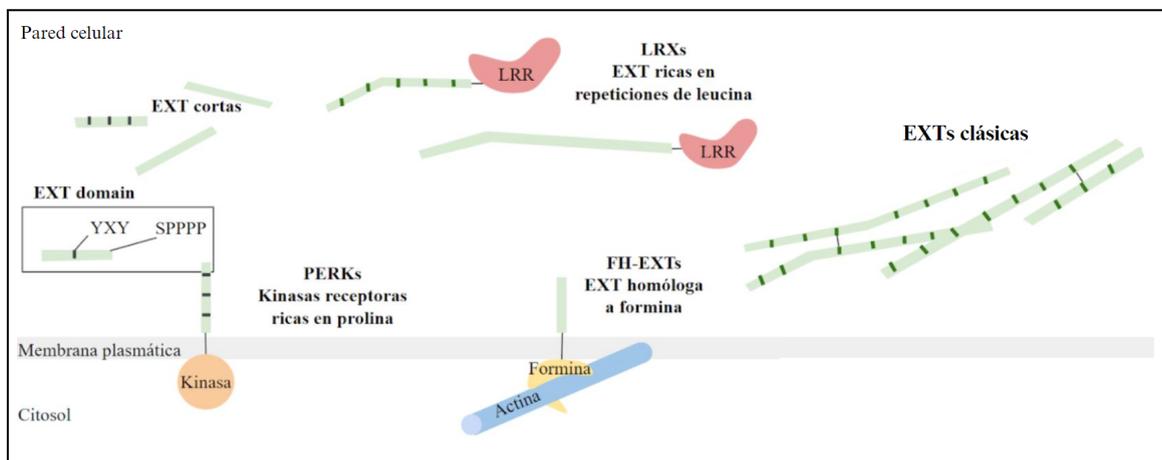


Figura 2: Clases de extensinas (EXT) en su contexto celular. La EXT clásica es capaz de formar enlaces intermoleculares (en negro) formando una red. Las EXT con repeticiones ricas en leucina (LRX) albergan un dominio LRR N-terminal. Las quinasas receptoras tipo extensina ricas en prolina (PERK) y los EXT homólogos de formina (FH) son proteínas transmembrana con el dominio EXT en la pared celular. Las PERKs son receptores con un dominio de quinasa intracelular mientras que las FH poseen una región similar a la formina la cual se prevé que interactúe con los filamentos de actina. Los motivos SPPPP y YXY están representados en verde y negro respectivamente (Moussu & Ingram, 2023).

Además de su función estructural, se ha sugerido que las extensinas pueden participar en procesos biológicos como la respuesta al estrés, la defensa contra patógenos y la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Castilleux et al., 2021). Las extensinas de la familia LRX son proteínas extracelulares que consisten en un dominio N-terminal de repetición rica en leucina (LRR) y un dominio C-terminal de extensión que se ancla a la pared celular. En *Arabidopsis thaliana*, se ha utilizado previamente mutantes de *LRXI* para demostrar su implicación en la morfogénesis y elongación de los pelos radiculares (Baumberger et al., 2001; Diet et al., 2006). Los mutantes *lrx1* presentan anomalías estructurales en estas células y posiblemente deficiencias en su función.

Dado que *LRXI* es relevante en la formación de pelos radiculares (esenciales en la absorción de agua) y que en nuestro laboratorio se ha encontrado una asociación clara de presencia o ausencia de polimorfismos en este gen en ecotipos de zonas áridas o con pluviometría media, este proyecto se centra en determinar el papel de *LRXI* en la aclimatación a condiciones de disponibilidad hídrica reducida. El objetivo a largo plazo será definir si *LRXI* ha sido relevante durante la evolución y si está implicado en la adaptación a regiones áridas.

2. ANTECEDENTES

Una de las líneas de trabajo principales de nuestro grupo se centra en la identificación de genes que, durante la evolución, han podido ser claves para la adaptación a condiciones ambientales cambiantes. En este marco contextual, se buscaron genes relacionados con la sequía en la población de accesiones (ecotipos) de *Arabidopsis thaliana* nativas de la península ibérica. Se escogió esta población debido a su alta variabilidad genotípica, pues esta presenta tanto accesiones relictas (más ancestrales) adaptadas a las condiciones ambientales propias de la península, como grupos de accesiones provenientes del resto de Europa. A esto se le suma la gran diversidad de ambientes presentes dentro de la península que, en conjunto con la variabilidad genética, genera unas condiciones propicias para la búsqueda de alelos implicados en procesos de resiliencia a diferentes estreses abióticos.

Para esta búsqueda se comenzó separando las 174 accesiones de la colección ibérica usando como criterio datos de pluviometría de las zonas de recogida de cada accesión. En base a esto, se separaron las accesiones en tres categorías asignando los nombres a las categorías de Sequía, Precipitación Intermedia (PI) y Precipitación Alta (PA) según el rango de precipitación promedio.

Definidas estas tres categorías se estudió el número de accesiones relictas dentro de cada una de ellas, encontrando que tanto en las categorías de Sequía como la de PI tenían una representación de más de cinco accesiones relictas, mientras que en la categoría de PA solo se encontraba una, por lo que se tomó la decisión de no usar esta última. A continuación se buscaron todos los SNPs presentes en dichas accesiones, utilizando para ello la base de datos genómicos de 1001 Genomes. A los SNPs identificados se les calculó el índice de fijación, que genera un valor entre cero y uno. Aquellos SNPs con valor igual a 1 se consideran fijados en todas las accesiones de una de las dos poblaciones y en ninguna accesión de la otra población, mientras que los que tienen un valor cercano a cero se encontrarían distribuidos en ambas poblaciones. Los SNPs que presentaron un índice de fijación igual a uno fueron seleccionados, obteniendo un total de 1561.

Dentro de esta lista de SNPs se encontraron variaciones del gen *LRXI*, el cual en las investigaciones anteriores de Baumberger et al. (2001) y Diet et al. (2006) se había identificado como un gen clave en el proceso de formación de pelos radiculares. Teniendo en cuenta el rol que tienen estas estructuras en la absorción de agua en el suelo, se escogió este gen para continuar con el análisis.

El siguiente paso en la identificación de la variación natural de *LRXI* en la población de *A. thaliana* de la península ibérica fue separar las accesiones por medio de un PCA (Figura 3), en donde se usaron como componentes las variables pluviométricas anteriormente mencionadas. Se encontraron dos haplogrupos: Haplogrupo 1 (HG1) con un total de 110 accesiones y Haplogrupo 2 (HG2) con 55 accesiones, los cuales fueron definidos por un umbral establecido en la componente 1 en el valor de 0,0. Se buscaron los SNPs significativos de cada uno de los haplogrupos (usando como criterio que estos estuvieran en al menos el 50% de las accesiones pertenecientes al haplogrupo), y se encontraron tres SNPs para el HG1 y nueve para el HG2. Cabe resaltar que los SNPs identificados en el HG1 estaban compartidos con el HG2 por lo tanto no fueron tomados en cuenta, y se consideraron los nueve restantes del HP2. Estos SNPs son mutaciones del tipo *miss-sense*, *non-sense* y cambios en el 3'UTR, y por lo que posiblemente podrían tener efectos en el fenotipo.

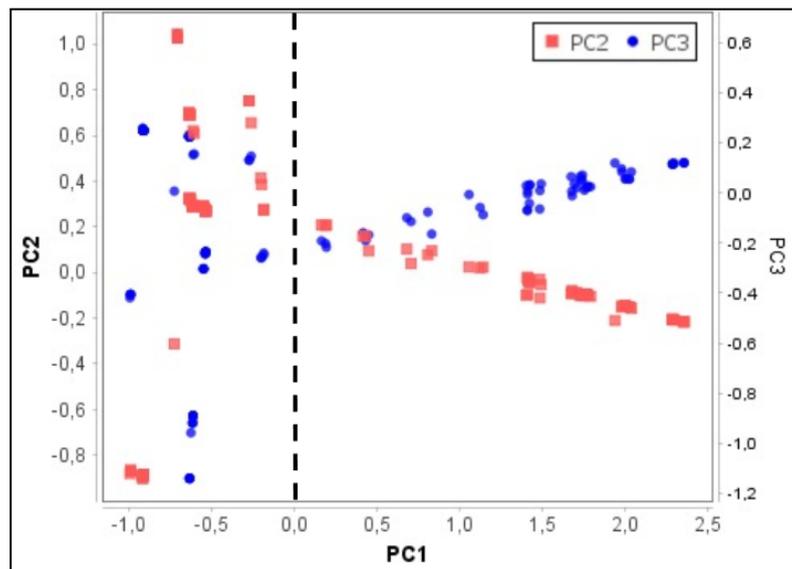


Figura 3: Análisis de componentes principales PC1, PC2 y PC3. Se utilizó el umbral 0,0 en la componente 1 como criterio de separación de los dos haplogrupos HG1 y HG2.

3. OBJETIVOS

En el marco de esta investigación, la hipótesis de partida de este proyecto es que *LRX1* juega un papel significativo en la adaptación de las plantas a condiciones de baja disponibilidad hídrica. Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis, se ha utilizado la especie *Arabidopsis thaliana* como modelo y se han llevado a cabo dos abordajes principales:

1. Comparar la resistencia a la sequía entre los mutantes *lrx1* y las plantas silvestres (WT).
2. Entender el patrón de expresión temporal del gen *LRX1* en estrés hídrico.

De esta forma, este proyecto se relaciona con los Objetivos de Desarrollo Sostenible “Agua limpia y saneamiento”, “Producción y consumo responsables” y “Acción por el clima” de la Organización de las Naciones Unidas. Se cumplen las metas 6.4., 12.2. y 13.1. respectivamente mediante el fortalecimiento del uso eficiente y sostenible de los recursos hídricos y la adaptación a los riesgos proporcionados por el cambio climático. Aumentar el conocimiento sobre la función de la extensina LRX1 en la respuesta a la sequía podría aportar información valiosa para la mejora genética de cultivos y la búsqueda de estrategias de manejo más eficientes para enfrentar el desafío climático predicho para las próximas décadas. De forma secundaria, el aumento de la productividad de los cultivos y la formación de biomasa derivados del aprovechamiento hídrico también cubren los objetivos “Hambre cero” y “Energía asequible y no contaminante”.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Las semillas mutantes *lrx1-1* de *Arabidopsis thaliana* empleadas fueron recibidas del Doctor Nicolas Baumberger (Instituto de Biología Vegetal, Universidad de Zürich, Suiza). Las semillas del ecotipo Columbia (col-0) se encontraban disponibles previamente en el laboratorio.

4.2. Crecimiento de plantas

Para la esterilización de las semillas se añadió 1 mL de etanol 70% con tritón 0,05 M a un tubo Eppendorf de 2 mL que contenía las semillas. La mezcla se incubó durante 10 minutos en un agitador. Posteriormente se sustituyó la solución por 1 mL de etanol 96%. Tras 10 minutos en el agitador, se aclararon en agua estéril. Las semillas estériles se colocaron equidistantes en placas petri cuadradas de 120 x 120 mm de 50 mL de medio mock (3 g/L de medio Murashige y Skoog, 10 g/L de sacarosa y 8 g/L de Phyto Agar, pH a 5,7) con la ayuda de palillos estériles, y se mantuvieron un mínimo de 7 días a 4°C en oscuridad, para favorecer la estratificación. Finalizado este tiempo, las semillas se pasaron a una placa nueva con medio mock para dar inicio al crecimiento vertical, donde se incubaron 7 días a 22°C y día largo (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad). Un día antes de iniciar el tratamiento se prepararon más placas con medio mock y medio PEG (mock suplementado con polietilenglicol de 8.000 Da en la concentración deseada, siguiendo el protocolo especificado por Osmolovskaya et al., (2018)) y se dejaron secar. Tras 7 días de incubación se trasladaron las plantas a las nuevas placas mock y PEG, donde se mantendrían un tiempo variable en función del experimento realizado. Toda la manipulación de plantas se produjo en una cabina de flujo laminar. La instrumentalización fue esterilizada mediante un mechero CAMPINGAZ Labogaz 206 y etanol 70%. Para el crecimiento, las placas se mantuvieron cerradas con cinta de microporo 3M de 1,25 cm. Se colocaron 12 semillas por placa a la misma altura para el crecimiento vertical y los posteriores tratamientos, manteniendo las condiciones de 22°C y día largo.

4.3. Establecimiento de las condiciones de sequía inducida

Se empleó el protocolo “Crecimiento de plantas” descrito en el apartado anterior con semillas del ecotipo col-0 de *A. thaliana*. Al séptimo día de crecimiento vertical, se pasaron las plántulas a placas con medio mock suplementado con polietilenglicol (PEG) en concentración 15%, 20% y 25%, dando inicio al tratamiento diferencial. Se empleó polietilenglicol de 8.000 Da, siguiendo el protocolo de Osmolovskaya et al. (2018). Tras 7 días de tratamiento manteniendo las condiciones de 22°C y día largo (día 14 del crecimiento), se escanearon las placas con el

escáner HP Scanjet 4850 Photo Scanner. El día 18 se pesó la parte aérea de las muestras con la balanza de precisión Equinox para determinar la cantidad de biomasa fresca (Figura 4). Se realizaron 3 réplicas de 12 plantas para cada condición descrita: mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25%.

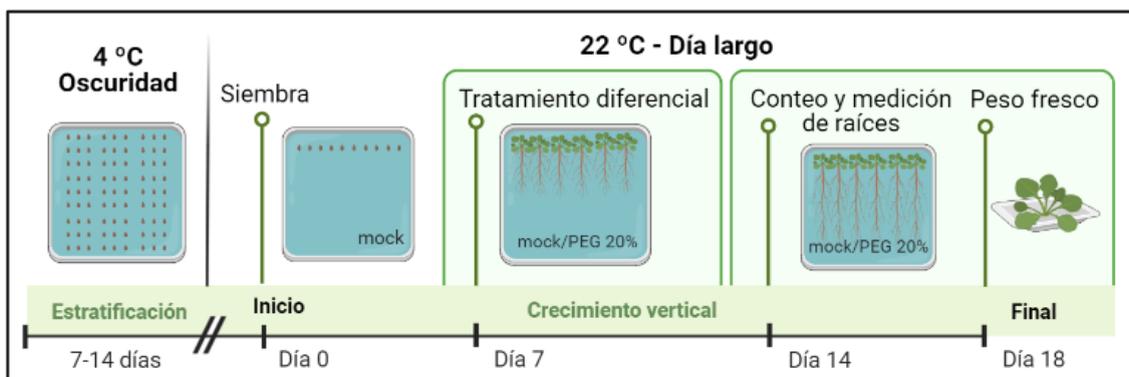


Figura 4: Cronograma del experimento “Establecimiento de condiciones de sequía inducida”. Durante el tratamiento, se trasladan las plántulas de *A. thaliana* a placas con medio mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25%. Posteriormente se realiza la recolecta de datos mediante el conteo de raíces laterales, la medición de la longitud de la raíz principal y la medida de peso fresco de masa aérea.

El escaneo se llevó a cabo a resolución 1.200 ppp, manteniendo el brillo y el contraste a 0. El conteo de raíces laterales y la obtención de la longitud de la raíz principal se realizaron utilizando el programa ImageJ. El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics.

4.4. Fenotipado de mutantes *lrx1-1* en sequía

Tanto el cultivo como la adquisición de imágenes globales de la placa se realizaron de forma análoga a la descrita en el apartado 4.3., utilizando en este caso plantas *col-0* y *lrx1-1*. En lugar de utilizar diferentes concentraciones de polietilenglicol, las plantas únicamente fueron tratadas en medio PEG 20%. Tras 7 días de tratamiento en PEG 20% se observaron los pelos radiculares de *col-0* y del mutante *lrx1-1* mediante la lupa Olympus SZ60 utilizando 3 aumentos (Figura 5). Se realizaron 2 réplicas de 12 plantas para cada tratamiento y tipo de semilla: *col-0* y *lrx1-1* en mock y PEG 20%.

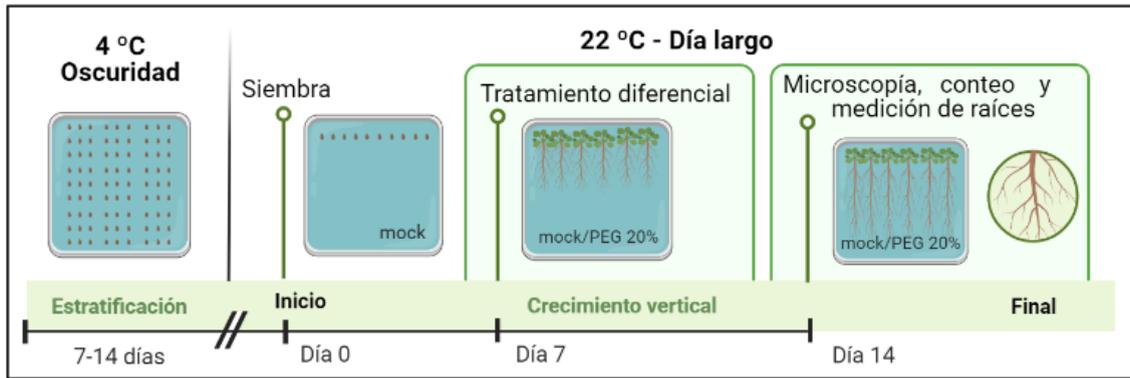


Figura 5: Cronograma del experimento “Fenotipado de mutantes *lrx1-1* en sequía”. El crecimiento está dividido en fases de siembra, tratamiento y recolecta de datos. El resultado es analizado globalmente mediante el escáner y de forma localizada en la raíz mediante lupa.

El escaneo se realizó a resolución 1.200 ppp, manteniendo el brillo y el contraste a 0. Se midió la longitud de la raíz principal de 24 plantas por tratamiento y tipo de planta utilizando el programa ImageJ. Se obtuvo también el número de pelos radiculares y la longitud de los mismos con este programa, analizando 24 imágenes de los 3 cm con pelos radiculares más próximos a cada meristemo de la raíz en cada condición. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statgraphics.

4.5. Análisis de la expresión de *LRX1* con el tiempo en sequía

Para obtener material vegetal, se siguió el protocolo “Crecimiento de plantas” con semillas del ecotipo col-0. Al séptimo día de crecimiento vertical a 22°C y día largo se pasaron 12 plantas a placas con medio mock y placas con medio PEG 20%, para comenzar el tratamiento diferencial manteniendo las condiciones de 22°C y día largo. Se extrajo ARN de la raíz de estas plantas a 3 tiempos diferentes (24h, 48h y 72h) del inicio del tratamiento, utilizando el kit Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ RNA Plant y la microcentrífuga 5418 Eppendorf, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de las muestras se midió con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y las muestras más diluidas se concentraron con la centrífuga de vacío UNIVAPO 100H Chiller, hasta igualar la concentración de todas las muestras. Se obtuvo ADN complementario de cadena simple de cada muestra mediante el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis y los cebadores CTTTGCCTTCCCTTAAATTCTGG (directo) y CAAGCAAAGATGAGCACTGTTTA (reverso). Se realizó una qRT-PCR con el termociclador de PCR cuantitativa Quant Studio 3 (Figura 6) y el gen *UBQ10* como control de expresión, amplificado con los cebadores GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG (directo) y AAAGAGATAACAGGAACGGAACATAGT (reverso). El análisis de la expresión se realizó mediante el programa Design and Analysis, de Thermofisher. Se utilizaron 3 réplicas de 24 plantas cada una para los tiempos 24 h, 48 h y 72 h en mock y PEG 20%.

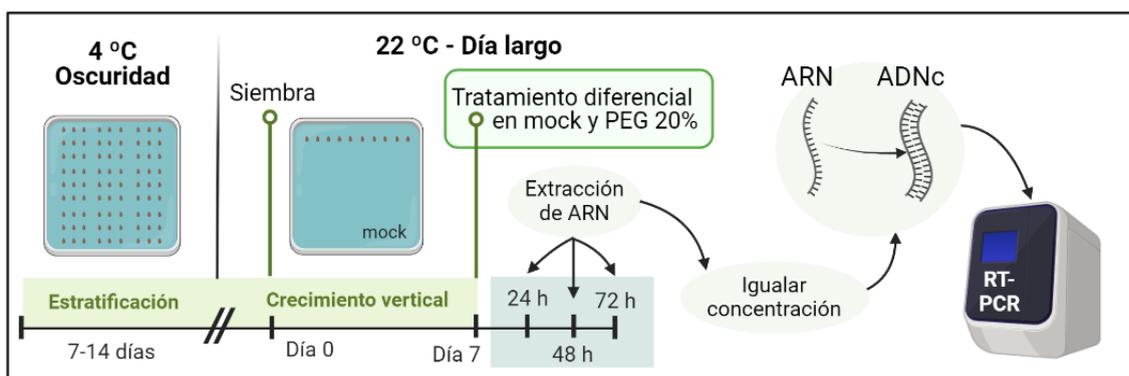


Figura 6: Diagrama para el análisis de expresión de *LRX1* en el tiempo. Se extrae el ARN de las raíces del material vegetal en PEG 20% y mock a los tiempos requeridos. Se iguala la concentración de ARN y se convierte en ADNc para realizar la qRT-PCR.

4.6. Clonación de *LRX1* en GoldenBraid

En primer lugar se realizó una extracción de ADN genómico del ecotipo col-0 de *A. thaliana*. Para ello se congelaron 2 g de tejido en nitrógeno líquido y se pulverizaron las muestras utilizando *beads* y el molino Retsch MM 400. Se añadieron 10 mL tampón CTAB (Tabla 2) a 65°C y 10 mL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 5.000 x g por 10 minutos con la microcentrífuga 5418 Eppendorf. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo, al que se añadió 0,7 volúmenes de isopropanol y se repitió el centrifugado. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 100 µL de etanol 70% para lavar el ADN y se centrifugó a 13.000 x g. Se descartó el sobrenadante de nuevo, se dejó secar el pellet y, posteriormente, este se diluyó en 50 µL de tampón TE (Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA 1 mM).

Tabla 2. Composición del tampón CTAB.

Componente	Para 10 mL de CTAB	Concentración final
Tris-HCl pH 8 2 M	0,5 mL	100 mM
NaCl 5 M	2,84 mL	1,42 M
CTAB en polvo	0,2 g	2%
EDTA 0,5 M	0,4 mL	20 mM
PVP-40 en polvo	0,2 g	2%
H ₂ O	6,253 mL	
β-Mercaptoetanol	7 µL	0,02 U/µL
Ácido ascórbico	10 mg	

El sistema GoldenBraid es una metodología desarrollada para creación de construcciones genéticas en plantas de forma eficiente y modular. Esta técnica se basa en la utilización de dos enzimas de restricción: BsmBI y BsaI, y requiere la domesticación de las secuencias utilizadas, para evitar sitios de reconocimiento de estas enzimas. Por ello, es importante el diseño de cebadores que sustituyan los codones por otros no reconocibles por estas enzimas, pero que codifiquen el mismo aminoácido. Es por ello que se diseñaron cebadores adaptados a la herramienta de ensamblaje GoldenBraid con ayuda del programa “Primer Blast” del NCBI y su calidad se comprobó en el programa “Multiple Primer Analyzer” de ThermoFisher. El ensamblaje se diseñó utilizando el software Benchling. Se emplearon estos cebadores para domesticar las secuencias y añadir regiones solapantes en los extremos (que permitan ensamblar las partes posteriormente) por lo que se realizaron 4 PCR: p*LRXI* y la región codificante (CDS) de *LRXI* dividida en 3 secciones. Se empleó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase y el termociclador Techne TC-512 (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Componentes empleados en cada reacción de PCR.

Componente	Reacción (50µL)	Concentración final
H ₂ O	32 µL	
Tampón 5X Phusion HF	10 µL	1X
NTPs (mM)	1 µL	200 µM
Cebador directo (10µM)	2,5 µL	0,5 µM
Cebador reverso (10µL)	2,5 µL	0,5 µM
Plantilla de ADN	1,5 µL	0,3 µM
ADN polimerasa Phusion	0,5 µL	0,02 U/µL

La amplificación se realizó cambiando la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión del programa de PCR en función de los cebadores empleados (Figura 7).

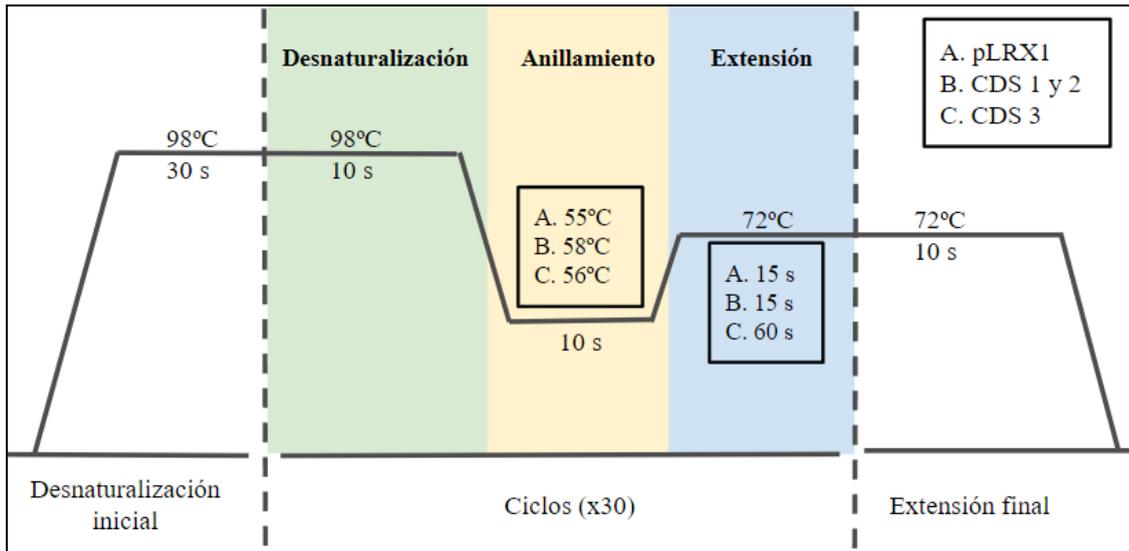


Figura 7: Protocolo en 3 pasos de PCR. La temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión se adaptaron a los cebadores utilizados y la longitud del fragmento respectivamente en cada caso.

El resultado de la amplificación se comprobó en un gel de electroforesis TAE 1X (50 mL TAE 1X, 0,75 g agarosa y 1µL de bromuro de etidio) conectado a la fuente de alimentación APELEX PS 1006 a 120 V. Para determinar los tamaños de los fragmentos amplificados se empleó el marcador de pesos moleculares GeneRuler Plus DNA Ladder de 100 pb. La observación del gel se realizó en el transiluminador ENDURO GDS Touch Gel a exposición a 120 ms, y la extracción de banda en el transiluminador LKB 2011 Macrovue UV Light, con ayuda de una cuchilla. Se purificó el ADN resultante mediante el kit Zymo Column-based Nucleic Acid Purification y se midió su concentración en el NanoDrop 2000.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Resultados

5.1.1. Establecimiento de las condiciones de sequía inducida

Para determinar la concentración de polietilenglicol apropiada que permitiese observar diferencias en los fenotipos de los experimentos programados en condiciones de medio normales y de sequía inducida, se analizó inicialmente la respuesta de las plantas en tres condiciones de sequía inducida: mock con polietilenglicol al 15% (PEG 15%), al 20% (PEG 20%) y al 25% (PEG 25%). La respuesta de las plantas a estos medios se analizó cuantificando la longitud de la raíz principal, contando el número de raíces secundarias y midiendo el peso fresco de la parte aérea de las mismas.

Con los datos obtenidos, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los fenotipos estudiados (Tabla 4). Para todos los fenotipos estudiados se determinó que existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 4 variables (mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25%) con un nivel del 5% de significación.

Tabla 4: ANOVA entre las medias calculadas con los datos de mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25% de longitud de raíz principal, número de raíces laterales y peso fresco. La varianza de los datos se descompone en varianza entre-grupos y dentro-de grupos. Cuando el valor-P de la prueba F es menor que 0,05 existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las variables con un nivel del 5% de significación.

	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Longitud de raíz principal (cm)	Entre grupos	30486,1	3	10162	53,99	1E-05
	Intra grupos	17315,1	92	188,207		
	Total	47801,1	95			
Número de raíces laterales	Entre grupos	298,5	3	99,5001	57,94	1E-05
	Intra grupos	157,982	92	1,7172		
	Total	456,482	95			
Peso fresco (mg)	Entre grupos	289,583	3	96,5278	4,55	5,1E-03
	Intra grupos	1950,42	92	21,2002		
	Total	2240	95			

Es por ello que, para determinar qué medias resultaron significativamente diferentes de otras se realizaron pruebas de múltiples rangos para cada fenotipo (Tabla 5).

Tabla 5: Comparación múltiple de Student-Newman-Keuls entre las medias obtenidas en mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25% de longitud de raíz principal, número de raíces laterales y peso fresco. En la columna “Diferencia” se muestra la diferencia obtenida para cada par de medias, mientras que el asterisco en la columna “Sig.” indica que esta diferencia es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Contraste	Longitud (cm)		Número de raíces		Peso fresco (mg)	
	Sig.	Diferencia	Sig.	Diferencia	Sig.	Diferencia
Mock - PEG 15%	*	9,42214	*	3,20833	*	3,20833
Mock - PEG 20%	*	15,6242	*	3,66667	*	3,55833
Mock - PEG 25%	*	47,4464	*	4,625	*	4,77083
PEG 15% - PEG 20%		6,20204		0,458333		0,35
PEG 15% - PEG 25%	*	38,0242		1,41667	*	1,5625
PEG 20% - PEG 25%	*	31,8222		0,958333	*	1,2123

Mediante la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls se observó que mediante el fenotipado de la longitud de la raíz principal y del peso fresco se distinguían 3 grupos homogéneos: (A) no afectado, (B) levemente afectado y (C) gravemente afectado. Estos grupos coincidían con los tratamientos mock; PEG 15% y PEG 20%; y PEG 25% respectivamente. El número de raíces laterales fue significativamente diferente entre el medio mock y los medios suplementados con polietilenglicol, pero no permitió diferenciar los medios suplementados entre sí.

Respecto a la distribución de los datos obtenidos para cada fenotipo, se determina una relación inversamente proporcional entre el porcentaje de polietilenglicol aplicado y la longitud de la raíz principal y el peso fresco de la parte aérea de la planta (Figura 8). A mayor porcentaje de polietilenglicol, menores fueron los valores obtenidos. Se observó que el peso fresco se veía más gravemente afectado a concentraciones bajas de polietilenglicol, mientras que la longitud de la raíz principal acentuaba su efecto a concentraciones altas de polietilenglicol.

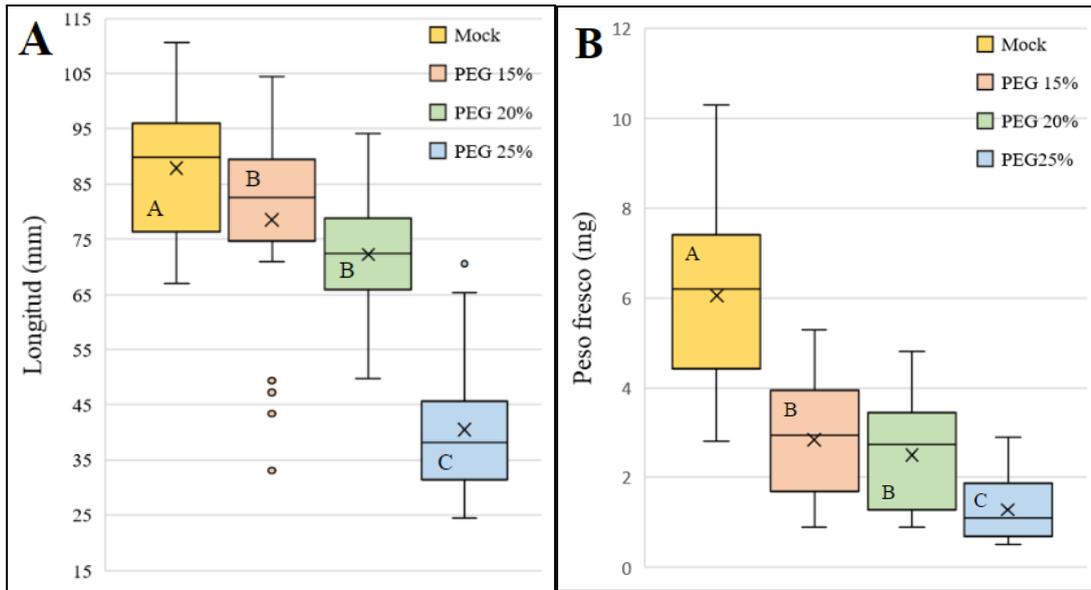


Figura 8: Distribución de las medidas obtenidas en tratamiento mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25%. (A) Longitud de la raíz principal. (B) Masa de la parte aérea de las plantas. Se distinguen 3 rangos descritos mediante comparación múltiple de Student-Newman-Keuls: no afectado o A, levemente afectado o B y gravemente afectado o C.

Respecto al conteo de raíces laterales, pese a evidenciarse un menor número de raíces en las plantas tratadas con polietilenglicol, no se pudo determinar de forma estadísticamente significativa una relación entre la concentración del mismo y la cantidad de raíces (Figura 9).

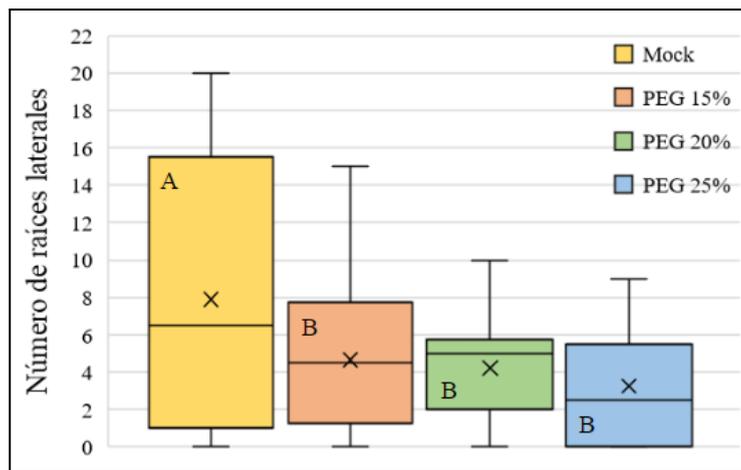


Figura 9: Distribución del número de raíces laterales en tratamiento mock, PEG 15%, PEG 20% y PEG 25%. Con estos datos se obtuvo la media, la mediana, la distribución de los cuartiles y datos anómalos. Se muestran los rangos generados mediante la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (nivel de confianza del 95%) con las letras A y B.

Como las concentraciones PEG 15% y PEG 20% presentaban un efecto leve en la longitud radicular y el peso fresco fresco, se escogió el medio suplementado con concentración 20% para preparar los medios, apoyándose en la mayor diferencia visual y promedio con el control.

5.1.2. Fenotipado de mutantes *lrx1-1* en condiciones de sequía

Con objeto de inferir la función del gen *LRX1* se examinó el fenotipo de plantas mutantes *lrx1-1* en medio control mock y condiciones de sequía inducida PEG 20%.

Se cuantificó la longitud de la raíz principal, el número promedio de pelos radiculares y la longitud de dichos pelos en col-0 y en el mutante *lrx1-1*. A partir de los datos recopilados se realizó un test ANOVA para los tres fenotipos estudiados (Tabla 6). Se determinó para estos fenotipos que existían diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las 4 variables (col-0 mock, col-0 PEG 20%, *lrx1-1* mock y *lrx1-1* PEG 20%) con un nivel del 5% de significación.

Tabla 6: ANOVA entre las medias calculadas con los datos de col-0 y *lrx1-1* en mock y PEG 20% de longitud de raíz, número y longitud de pelos radiculares. La varianza de los datos se descompone en varianza entre-grupos y dentro-de grupos. Cuando el valor-P de la prueba F es menor que 0,05 existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las variables con un nivel del 5% de significación.

	Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Longitud raíz principal (cm)	Entre grupos	26556,4	3	8852,13	52,3	1E-05
	Intra grupos	15573,1	92	169,273		
	Total	42129,5	95			
Número de pelos radiculares	Entre grupos	6205,3	3	2068,43	18,44	1E-05
	Intra grupos	8524,9	76	112,17		
	Total	14730,2	79			
Longitud de pelos radiculares (µm)	Entre grupos	1,90E+06	3	634206	41,01	1E-05
	Intra grupos	1,04E+07	672	15465,5		
	Total	1,23E+07	675			

A continuación se realizaron pruebas de múltiples rangos siguiendo el método Student-Newman-Keuls para cada fenotipo (Tabla 7). De esta forma se determinó qué pareja de medias calculadas eran significativamente diferentes entre sí.

Tabla 7: Comparación múltiple de Student-Newman-Keuls entre las medias obtenidas en mock y PEG 20% de longitud de raíz principal, número y longitud de pelos radicales. En la columna “Diferencia” se muestra la diferencia obtenida para cada par de medias, mientras que el asterisco en la columna “Sig.” indica que esta diferencia es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Contraste	Longitud (cm)		Número de pelos		Longitud de pelos (μm)	
	Sig.	Diferencia	Sig.	Diferencia	Sig.	Diferencia
Col-0 mock - Col-0 PEG	*	7,48129	*	15,05	*	118,171
Col-0 mock - <i>lrx1-1</i> mock	*	14,605		-2,45	*	76,9358
Col-0 mock - <i>lrx1-1</i> PEG	*	43,874	*	17,4	*	143,552
Col-0 PEG - <i>lrx1-1</i> mock		7,12367	*	-17,5	*	-41,2351
Col-0 PEG - <i>lrx1-1</i> PEG	*	36,3928		2,35		25,3812
<i>lrx1-1</i> PEG - <i>lrx1-1</i> PEG	*	29,2691	*	19,85	*	66,6163

Mediante la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls se observó en el fenotipado de la longitud de la raíz principal que la media entre mock y PEG 20% era significativamente diferente tanto para el control col-0 como para el mutante *lrx1-1*. Además *lrx1-1* presentaba una media significativamente diferente al control col-0 tanto en mock como en PEG 20%. La diferencia entre las plantas col-0 en estrés hídrico PEG 20% y *lrx1-1* en condiciones mock no fue significativa. El conteo del número de pelos radicales se mostro significativamente diferente para ambas plantas en mock y PEG 20%, pero no se vieron diferencias en el comportamiento de las plantas entre sí. Respecto a la longitud de dichos pelos, se determinó una diferencia significativa en la longitud de los pelos en condiciones mock para las plantas col-0 y *lrx1-1*. Asimismo, la longitud media de estos pelos en medio mock era diferente significativamente de su valor en PEG 20%. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre el control y el mutante en condiciones de sequía inducida.

En relación a la distribución de los datos recopilados para cada característica observable en el mutante *lrx1-1*, se confirma un menor crecimiento de la raíz principal en el mutante, que se acentúa tanto en el control como en el mutante en PEG (Figura 10 y Figura 11). Se encontraron menos pelos radicales en las plantas en PEG, sin mostrar esta característica relación con la presencia o ausencia del gen *LRXI*.

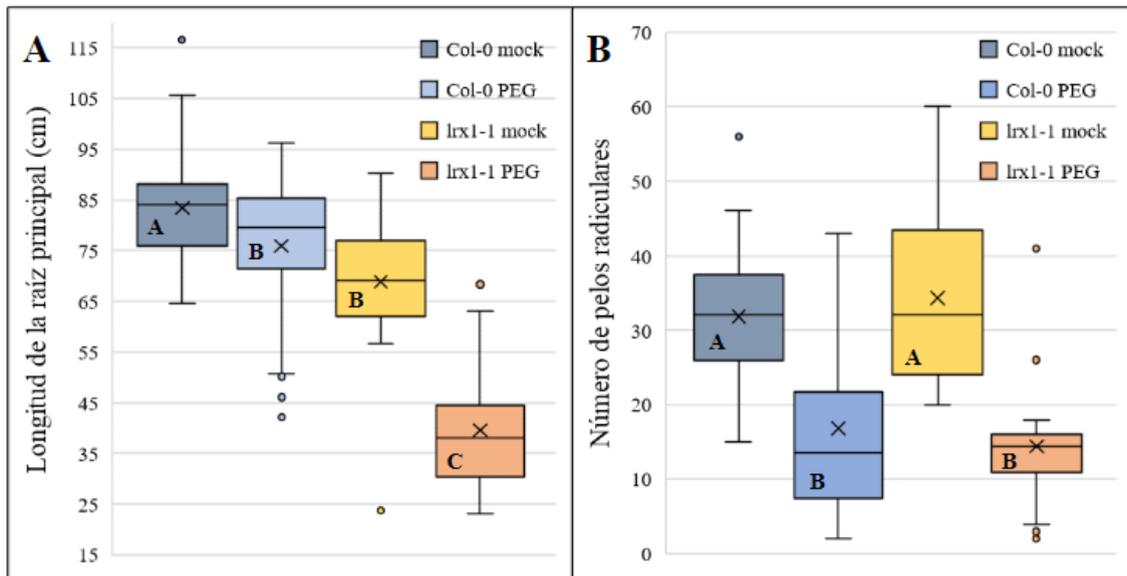


Figura 10: Distribución de las medidas obtenidas para col-0 y *lrx1-1* en mock y PEG 20%. (A) Longitud de las raíces principales. (B) Número de pelos radiculares. Se muestran los rangos generados para cada fenotipo por la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (nivel de confianza del 95%) con las letras A, B y C.

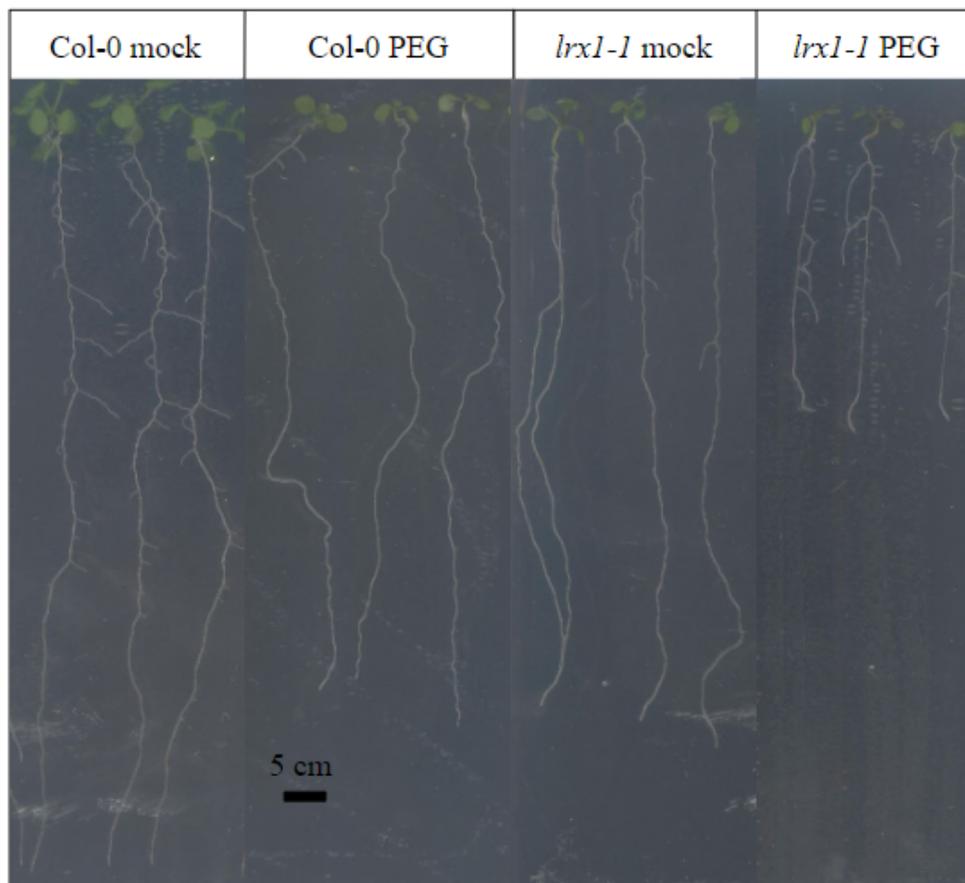


Figura 11: Longitud de raíz en col-0 y *lrx1-1* en condiciones mock y condiciones de estrés hídrico inducido por PEG.

La longitud de pelos radiculares disminuye en sequía inducida tanto en el mutante como en col-0; y es menor en el mutante en ambos medios mock y PEG 20% (Figura 12).

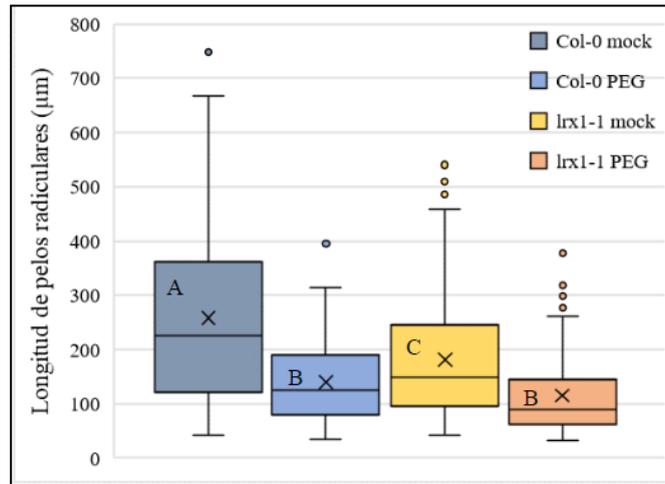


Figura 12: Distribución de las medidas obtenidas en col-0 y *lrx1-1* en tratamiento mock y PEG 20% para la longitud de los pelos radiculares. Se muestran los rangos generados mediante la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (nivel de confianza del 95%) con las letras A, B y C.

Se analizó la morfología de las raíces de los mutantes *lrx1-1* con la lupa en medio mock y PEG 20% para definir el fenotipo del mutante (Figura 13). Se observaron regiones con pelos de longitud variable y base abultada en el mutante, alternadas con otras regiones de fenotipo similar al de la planta col-0.

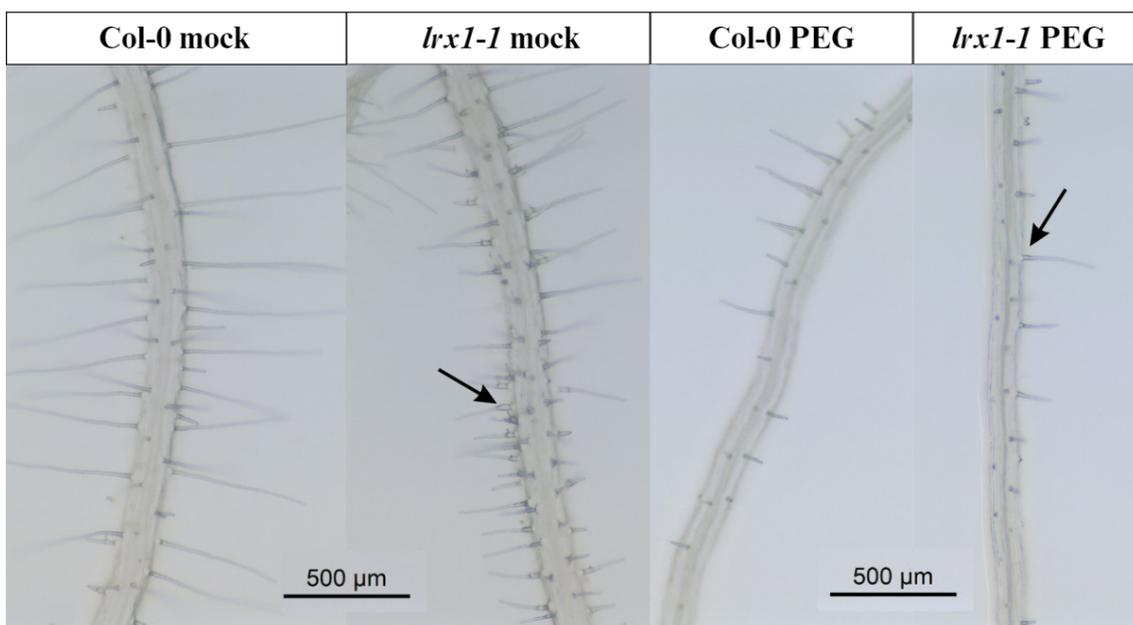


Figura 13: Raíz de col-0 y *lrx1-1* en mock y PEG 20%. Se indican ejemplos de la base abultada del pelo radicular de *lrx1-1* mediante flechas.

5.1.3. Expresión de *LRXI* con el tiempo en condiciones de sequía

El resultado de la qRT-PCR se normalizó utilizando la muestra de mock 24 horas como referencia. La expresión de *LRXI* durante los 3 primeros días de exposición a sequía disminuyó en comparación con el resultado en el control mock (Figura 14).

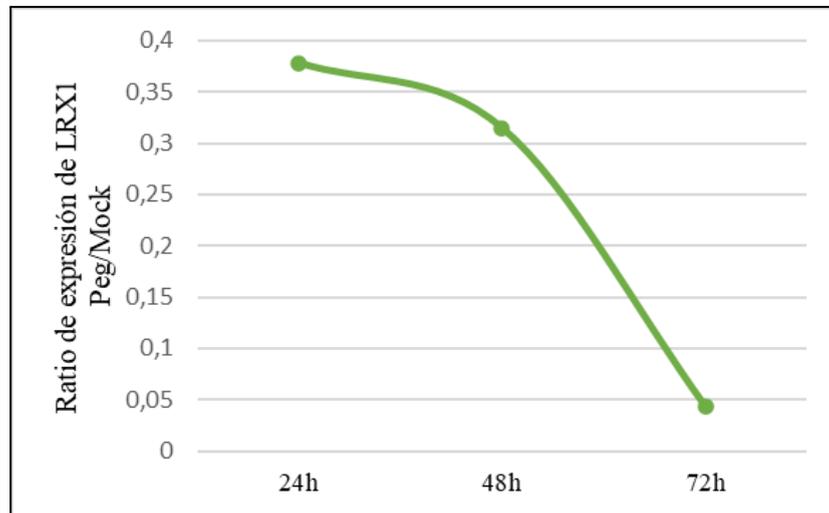


Figura 14: Expresión de *LRXI* tras 72 horas en sequía inducida por PEG 20%. El eje vertical representa el ratio de expresión del gen en PEG dividido su expresión en mock. Los datos se han normalizado utilizando el promedio de expresión de mock a 24h.

5.1.4. Clonación de *LRXI* en GoldenBraid

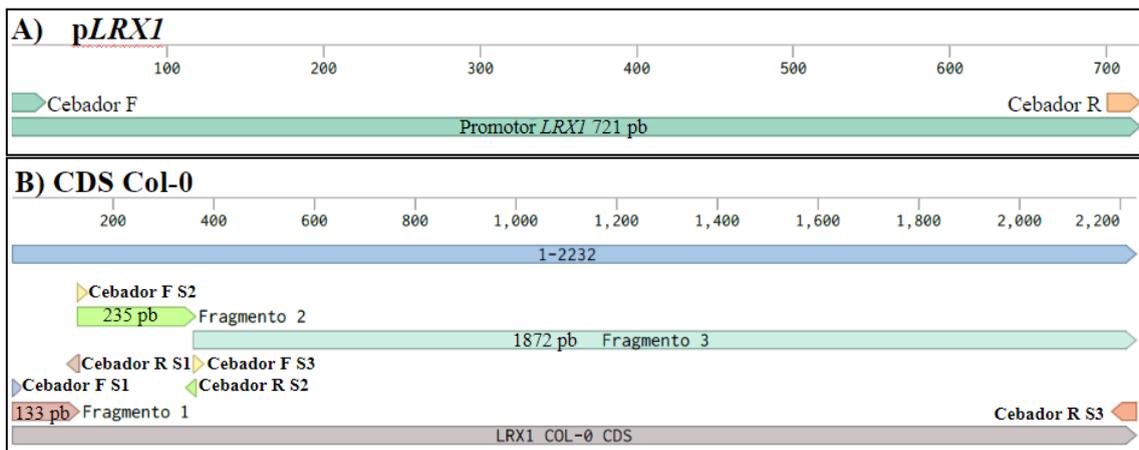
En primer lugar, se diseñó el módulo de clonación compatible con GoldenBraid, que consistía en una unidad transcripcional compuesta por el promotor p*LRXI* (A1-B2), la región codificante de *LRXI* (CDS) (B3-B4) y el terminador TNOS (B5-C1). Además, la CDS se dividió en 3 secciones de acuerdo a la domesticación para anular los sitios de corte internos de las enzimas BsaI y BsmBI. Por tanto, para el promotor y la CDS se diseñaron 4 pares de cebadores (Tabla 8), que incluían regiones solapantes para unirse entre sí y reemplazaban los sitios de corte de las enzimas mencionadas por codones sinónimos. El terminador TNOS (B5-C1) ya estaba disponible y preparado en el laboratorio para la clonación en GoldenBraid.

Tabla 8: Cebadores diseñados para la clonación en GoldenBraid. Todos los cebadores presentan una región solapante para encajar con la sección contigua amplificada. Se representa el cebador directo como “F” y el reverso complementario como “R”.

		Cebadores	
pLRX1		F	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGAGCAAGGAGTCACTTATTTCTG
		R	GCGCCGTCTCGCTCACATTTGCTTATGGGTCAAGAAACCC
CDS LRX1	Sección 1	F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGTTGTTCCCTCCTCTTCG
		R	GCGCCGTCTCGTAAGACGTTTGTCTACTTTGATATC
	Sección 2	F	GCGCCGTCTCGCTTAAGTTTCGAGAACCCGAAG
		R	GCGCCGTCTCGGAAGACCTAGCTCGGAAGCC
	Sección 3	F	GCGCCGTCTCGCTTCTCTCTGATCTCGTCT
		R	GCGCCGTCTCGCTCACGAACCGTAGTAAGACGGAGGAGG- AGGAGGAGATGCATCATATGAAACGCTTGGC

Con estos promotores se esperaba la obtención de un amplicón de 721 pb para el promotor y de tres amplicones para la región codificante, de tamaños 133 pb, 235 pb y 1872 pb para las secciones 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 15).

Figura 15: Regiones amplificadas por PCR. (A) Promotor de *LRX1*. (B) Región codificante (CDS) de *LRX1* dividida en tres secciones.



El resultado se analizó mediante la visualización del ADN en un gel de electroforesis. Posteriormente, se cortó la banda con el tamaño adecuado para extraer el ADN y proceder a su secuenciación (Figura 16).

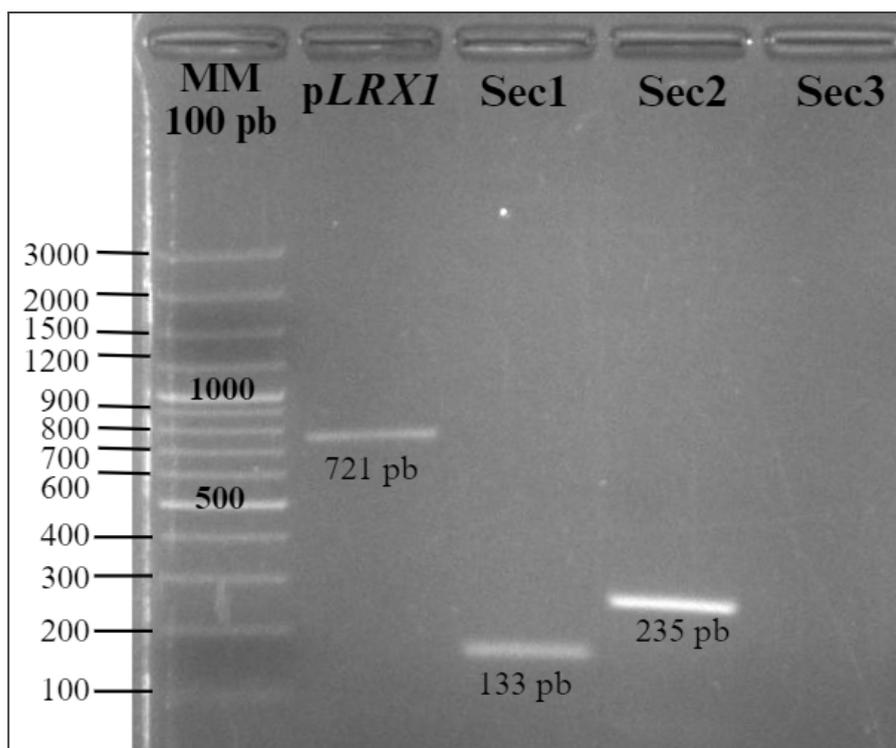


Figura 16: Resultado de la PCR en gel de electroforesis. En el carril MM 100 pb se encuentra el marcador de pesos moleculares.

5.2. Discusión

5.2.1. Establecimiento de las condiciones de sequía inducida

A la vista de los resultados (Figura 8A y Figura 9), se observa un fenotipo contrario al esperado en sequía. El polietilenglicol, que forma enlaces de hidrógeno con el agua secuestrándola, genera estrés osmótico que no promueve el crecimiento del sistema radicular en busca de agua, sino que produce un estrés de gravedad suficiente para que la planta entre en estado de estancamiento. Entre los principales efectos del polietilenglicol que podrían inhibir el metabolismo destacan (i) la reducción del potencial hídrico por la retención de agua, (ii) el gradiente osmótico generado en consecuencia y (iii) la inducción del estrés oxidativo (Osmolovskaya et al., 2018). De esta forma se sugiere que cuando las plantas experimentan sequía inducida por polietilenglicol a las concentraciones propuestas en este experimento, limitar el crecimiento de la raíz principal les permite minimizar la pérdida de agua y energía a través de la transpiración, reduciendo la superficie de absorción expuesta al suelo seco. Las plantas priorizan así la supervivencia a largo plazo en lugar del crecimiento a corto plazo, que causaría la elongación de la raíz en busca de fuentes de humedad. Al igual que se detuvo el crecimiento y la formación de raíces, la masa del tallo y las hojas de estas plantas era prácticamente despreciable (Figura 8B), dirigiendo todos los recursos al mantenimiento y la

supervivencia. Por tanto, al no darse el resultado esperado, se ha advertido de forma lateral la variedad de respuestas que tienen las plantas a las condiciones de sequía (Lozano et al., 2020). Una posibilidad sería repetir los experimentos considerando una concentración de polietilenglicol todavía menor al 15% para investigar si, al reducir el estrés al que se han sometido las plantas, se percibe el efecto de elongación radicular.

A la hora de escoger la concentración idónea de polietilenglicol para los tratamientos, la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls (Tabla 5) permitió distinguir 3 grupos utilizando los datos de la longitud de la raíz principal y el peso fresco: no afectados (mock), levemente afectados (PEG 15% y 20%) y gravemente afectados (PEG 25%). Gracias a estas agrupaciones se pudo descartar como medio de cultivo aquel que tuvo un efecto desmesurado en la planta (PEG 25%). Puesto que, con los métodos propuestos, no se ha encontrado una razón arbitraria para escoger entre los medios PEG 15% y PEG 20%, que se adecuaban a los requisitos presentando un efecto leve en la longitud de raíz principal y peso fresco, se escogió el medio infiltrado con concentración 20% apoyándose en la mayor diferencia visual y promedio con el control mock. De esta forma, se establecieron las condiciones de sequía inducida que aseguraron observar resultados en los posteriores experimentos.

5.2.2. Fenotipado de mutantes *lrx1-1*

En primer lugar, se realizaron experimentos comparativos entre el control *col-0* y el mutante *lrx1-1*. En este caso se analizó la longitud de la raíz principal y el número de pelos radiculares. Es destacable que la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls mostró que no había diferencia significativa entre la longitud media de las plantas *col-0* en PEG 20% y las plantas *lrx1-1* en mock (Tabla 7). De esta forma, la única ausencia del gen *LRXI* generó en la planta un estrés comparable al de la ausencia de agua en el medio en lo que respecta a la elongación de la raíz principal. Esto se puede entender ya que se sabe que el gen *LRXI* codifica una extensina, esencial para la elongación de los pelos radiculares (Vissenberg et al., 2020), y que probablemente esté implicado en la absorción de agua de la planta .

Asumiendo que la reducción de la longitud de la raíz es un efecto lateral de la deficiencia en la adquisición de agua, se investigó primeramente el número de pelos radiculares del mutante. De esta forma, se planteó la hipótesis de si el gen *LRXI* está relacionado con la cantidad de pelos radiculares que se forman. Al encontrar que no había disparidad entre el número de pelos radiculares del mutante y el control se investigó la superficie de absorción de los mismos, utilizando como medida indirecta su longitud. En este caso, sí se observó una menor superficie de absorción en mock para la planta *lrx1-1*. De esta forma se puede razonar que el desarrollo correcto de la morfología de los pelos radiculares mediante la actividad de este gen es necesario para mantener la absorción de agua requerida para un crecimiento óptimo de la planta.

Asimismo, al no haberse observado las mismas tendencias en PEG para la longitud de la raíz y la de los pelos radiculares (Figura 10A y Figura 12), se intuye que *LRXI* puede influir también en la composición de la pared celular de los pelos radiculares, potenciando la asimilación de agua. De esta forma, el efecto de la ausencia de *LRXI* en la pared celular (y no solo la disminución de la superficie de absorción) es el que agrava la situación de estrés de la planta *lrx1-1* en PEG que se refleja en forma de longitud de raíz principal.

Seguidamente se buscó el fenotipo previamente descrito en condiciones mock para el mutante *lrx1-1* (Baumberger et al., 2001; Diet et al., 2006), que consistía en pelos radiculares notablemente más cortos con bases abultadas. Durante el primer fenotipado se caracterizó el mutante (Figura 13), del cual se descubrió que se presentaba parcialmente en las plantas evaluadas: coexistían regiones con pelos radiculares normales y de fenotipo mutante, mostrando una irregularidad a lo largo de la raíz no descrita en la literatura. Por otra parte, se complementó la información hallada del mutante observándolo en medio PEG 20%, simulando la sequía. Los pelos radiculares del mutante mantenían la base abultada, pese a no diferenciarse en longitud de col-0.

5.2.3. Expresión de *LRXI* con el tiempo en condiciones de sequía

El resultado de la qRT-PCR se muestra como ratio entre PEG y mock (Figura 14). Según el resultado de la qRT-PCR, existe un descenso muy abrupto de la expresión de *LRXI* durante las primeras 72 horas de exposición en sequía. En sequía inducida por polietilenglicol, donde ya se ha comentado que se observa un estancamiento del crecimiento de la planta, es comprensible que haya una disminución inicial de la expresión del gen, ya que se detiene la elongación de los pelos. Además, dado que el ratio es menor que 1, la expresión en PEG es menor que en mock, lo que se podría relacionar con el menor número de pelos radiculares que se forman en estas condiciones (Figura 10B), pues hay menos células que expresen el gen. De esta forma, se confirma que la transcripción del gen no es constitutiva en el sistema radicular de *A. thaliana*, sino que depende del estrés hídrico de la misma.

Sea como sea, estos resultados no eximen otros tipos de regulación de la expresión génica, pues es posible que a nivel traduccional o epigenético se produzcan otros cambios que no se han podido ver en este ensayo, y que en combinación dirijan de forma precisa y dinámica el control del gen en respuesta a las señales internas y externas.

5.2.4. Clonación de *LXXI* en GoldenBraid

Respecto a la elección del sistema GoldenBraid, este sistema específico de plantas permite el ensamblaje multiparte (como el que se busca en este experimento) mediante una gramática de 4 nucleótidos añadida por cebadores al final o inicio de cada parte (Sarrion-Perdigones et al., 2011). Este método modular aprovecha las cualidades de las enzimas tipo IIS, caracterizándose por no dejar residuos de ADN entre las partes, ser reutilizable y estar estandarizado. Su fácil manejo y disponibilidad en el laboratorio han sido puntos claves a la hora de escogerlo.

A la vista de los resultados (Figura 16), la ausencia de banda en el carril de la sección 3 de la CDS en el gel sugiere que ha habido un error en la PCR. Esto puede ser debido a un error en el diseño de los cebadores o al programar el protocolo, por lo que se debe volver al rediseño para (i) verificar los cebadores comprobando la complementariedad entre ellos y la secuencia de ADN objetivo; y (ii) optimizar las condiciones de la PCR disminuyendo la temperatura de anillamiento o realizando gradientes de temperatura para hallar la óptima para el par de cebadores empleado. Si es necesario, se considera el diseño de nuevos cebadores.

Esta tercera sección será la única restante para poder integrar todas las partes en plásmidos pUPD2 gracias a las secuencias solapantes añadidas por los cebadores. Todas las partes se podrán ensamblar con el terminador en el plásmido de destino pDGB α , dando la secuencia por domesticada y preparada para la clonación.

6. PROYECCIÓN FUTURA

La comprensión de los mecanismos moleculares y genéticos que subyacen a la respuesta de las plantas a la sequía es esencial para desarrollar estrategias efectivas de mejora de cultivos. En este contexto, el papel de *LRXI* ha surgido como un componente clave en la respuesta de las plantas a la sequía. Sin embargo, a pesar de los avances en esta investigación, todavía hay muchas incógnitas sobre cómo contribuye exactamente *LRXI* a la adaptación de las plantas al estrés hídrico.

Para continuar la investigación, la clonación de *LRXI*, de su promotor o del conjunto mediante GoldenBraid (un sistema de clonaje modular) permite llevar a cabo una serie de estrategias que aportarán más lucidez sobre su función e importancia. La generación de líneas sobreexpresoras (*p35s:LRXI*) utilizando promotores constitutivos se podrá emplear para evaluar el efecto directo de la sobreexpresión del gen e incluso comparar con los ensayos ya realizados con los mutantes *knock-out lrx1-1*. Si el fenotipo es realmente favorable se podrá aplicar a la mejora de cultivos. Además, con este enfoque se puede comparar el perfil de expresión génica a un control e identificar los genes regulados por *LRXI*.

Por otra parte, la construcción *pLRXI:GUS* podría facilitar un análisis temporal y espacial en tejidos y etapas del desarrollo específico. El resultado se podría complementar en condiciones de sequía inducida para evaluar el comportamiento y la regulación del promotor ante el estrés.

Volviendo a los antecedentes, donde se agruparon distintas accesiones en función de si se encontraban en regiones áridas o de precipitación intermedia, se pueden aplicar las técnicas de clonación GoldenBraid aprovechando la modularidad del sistema. Complementando un mutante *lrx1-1* con el gen extraído de las accesiones (*pLRXI_{col-0}:LRXI_{acc}*) se devuelve la funcionalidad del gen, permitiendo inferir el efecto de la variante de *LRXI* de la accesión al compararlo con el mutante. Esta estrategia reduccionista ignora otros efectos epistáticos que puede tener el gen con el fondo genético, pero es válida para reunir información alrededor de la incógnita que lo rodea y encontrar SNPs de valor para incrementar la adaptación a sequía. A partir de esta base, se podría complementar con todas las clonaciones ya mencionadas para analizar también las accesiones de mayor interés.

7. CONCLUSIÓN

Respondiendo a la cuestión de si *LRXI* juega un papel significativo en la adaptación de las plantas a condiciones de baja disponibilidad hídrica, se ha concluido que existe un fenotipo en mutantes *lrx1-1* que no existe en plantas silvestres y que la expresión de *LRXI*, esencial para el correcto desarrollo de los pelos radiculares de la planta, afecta a la adquisición de agua.

Se ha determinado que las plantas silvestres son sensiblemente más resistentes a la sequía mediante la medición de la longitud de la raíz principal y que la morfología o elongación de los pelos se ve influenciada directamente por la presencia del gen *LRXI*. Su expresión no influye en el número de pelos formados. Por otra parte, se ha demostrado que las primeras 72 horas en condiciones de sequía inducida por polietilenglicol al 20% la expresión de *LRXI* desciende de forma abrupta en comparación con las condiciones normales. Se ha relacionado este resultado con la disminución de pelos formados en esta condición y se ha razonado que se debería repetir el ensayo en unas condiciones más permisivas de estrés, que proporcionasen una respuesta adaptativa de los pelos radiculares. Por último, cabe mencionar el experimento de clonación que se ha comenzado en este trabajo y del cual se espera que habilite múltiples formas de abordar la implicación del gen en la adaptación a la sequía en los proyectos venideros. En todo caso, los resultados sugieren que la función *LRX1* podría ser determinante en la adaptación de las plantas a regímenes de baja disponibilidad de recursos hídricos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAO, Y., AGGARWAL, P., ROBBINS, N. E., STURROCK, C. J., THOMPSON, M. C., TAN, H. Q., THAM, C., DUAN, L., RODRIGUEZ, P. L., VERNOUX, T., MOONEY, S. J., BENNETT, M. J., & DINNENY, J. R. (2014). Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(25).
- BAUMBERGER, N., RINGLI, C., & KELLER, B. (2001). The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, *15*(9).
- BIAN, S., & JIANG, Y. (2009). Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae*, *120*(2).
- CASTILLEUX, R., PLANCOT, B., VICRÉ, M., NGUEMA-ONA, E., & DRIOUICH, A. (2021). Extensin, an underestimated key component of cell wall defence? En *Annals of Botany* (Vol. 127, Número 6).
- COMAS, L. H., BECKER, S. R., CRUZ, V. M. V., BYRNE, P. F., & DIERIG, D. A. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, Número NOV).
- DIET, A., LINK, B., SEIFERT, G. J., SCHELLENBERG, B., WAGNER, U., PAULY, M., REITER, W. D., & RINGLI, C. (2006). The *Arabidopsis* root hair cell wall formation mutant *lrx1* is suppressed by mutations in the *RHM1* gene encoding a UDP-L-Rhamnose synthase. *Plant Cell*, *18*(7).
- DINNENY, J. R. (2019). Developmental responses to water and salinity in root systems. En *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 35).
- FAO. (2018). The future of food and agriculture—Alternative pathways to 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. *Food and Agriculture Organization*.
- HE, M., & DIJKSTRA, F. A. (2014). Drought effect on plant nitrogen and phosphorus: A meta-analysis. *New Phytologist*, *204*(4).
- KARLOVA, R., BOER, D., HAYES, S., & TESTERINK, C. (2021). Root plasticity under abiotic stress. *Plant Physiology*, *187*(3).

- KIM, Y., CHUNG, Y. S., LEE, E., TRIPATHI, P., HEO, S., & KIM, K. H. (2020). Root response to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 4).
- KOEVOETS, I. T., VENEMA, J. H., ELZENGA, J. T. M., & TESTERINK, C. (2016). Roots withstanding their environment: Exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Número AUG2016).
- LOZANO, Y. M., AGUILAR-TRIGUEROS, C. A., FLAIG, I. C., & RILLIG, M. C. (2020). Root trait responses to drought are more heterogeneous than leaf trait responses. *Functional Ecology*, 34(11).
- MCDOWELL, N., POCKMAN, W. T., ALLEN, C. D., BRESHEARS, D. D., COBB, N., KOLB, T., PLAUT, J., SPERRY, J., WEST, A., WILLIAMS, D. G., & YEPEZ, E. A. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? En *New Phytologist* (Vol. 178, Número 4).
- MOUSSU, S., & INGRAM, G. (2023). The EXTENSIN enigma. En *The Cell Surface* (Vol. 9).
- OSMOLOVSKAYA, N., SHUMILINA, J., KIM, A., DIDIO, A., GRISHINA, T., BILOVA, T., KELTSIEVA, O. A., ZHUKOV, V., TIKHONOVICH, I., TARAKHOVSKAYA, E., FROLOV, A., & WESSJOHANN, L. A. (2018). Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Número 12).
- PÉREZ CASTRO, S., CLELAND, E. E., WAGNER, R., SAWAD, R. AL, & LIPSON, D. A. (2019). Soil microbial responses to drought and exotic plants shift carbon metabolism. *ISME Journal*, 13(7).
- SADHUKHAN, A., PRASAD, S. S., MITRA, J., SIDDIQUI, N., SAHOO, L., KOBAYASHI, Y., & KOYAMA, H. (2022). How do plants remember drought? En *Planta* (Vol. 256, Número 1).
- SANTOS TEIXEIRA, J. A., & TEN TUSSCHER, K. H. (2019). The Systems Biology of Lateral Root Formation: Connecting the Dots. En *Molecular Plant* (Vol. 12, Número 6).
- SARRION-PERDIGONES, A., FALCONI, E. E., ZANDALINAS, S. I., JUÁREZ, P., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A., GRANELL, A., & ORZAEZ, D. (2011). GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7). G
- UNESCO (2009). El agua en un mundo en constante cambio. *Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos*.

- UNITED NATIONS (2022). World Population Prospects: The 2022 Revision, Key Findings and Advance Tables. *United Nations*, 53(9).
- VEACH, A. M., & ZEGLIN, L. H. (2020). Historical Drought Affects Microbial Population Dynamics and Activity During Soil Drying and Re-Wet. *Microbial Ecology*, 79(3).
- VICENTE-SERRANO, S. M., PEÑA-ANGULO, D., BEGUERÍA, S., DOMÍNGUEZ-CASTRO, F., TOMÁS-BURGUERA, M., NOGUERA, I., GIMENO-SOTELO, L., & EL KENAWY, A. (2022). Global drought trends and future projections. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 380(2238).
- VISSENBERG, K., CLAEIJS, N., BALCEROWICZ, D., & SCHOENAERS, S. (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in Arabidopsis. En *Journal of Experimental Botany* (Vol. 71, Número 8).
- YE, Z., SANGIREDDY, S., OKEKEOGBU, I., ZHOU, S., YU, C. L., HUI, D., HOWE, K. J., FISH, T., & THANNHAUSER, T. W. (2016). Drought-induced leaf proteome changes in switchgrass seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8).