



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

“Estudio de las dehidrinas y su relación con la tolerancia al estrés salino en la planta halófito *Chenopodium quinoa* Willd.”

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Alejandra Estefanía Melgar

Directora: Dra. Alicia Mercedes Zelada
Consejero de estudios: Dr. Esteban Hopp

Laboratorio de Agrobiotecnología
DFBMC-UBA/IBBEA-CONICET

Buenos Aires, 2023

Estudio de las dehidrinas y su relación con la tolerancia al estrés salino en la planta halófila *Chenopodium quinoa* Willd

Resumen

La salinización de los suelos genera cada año pérdidas económicas millonarias en la agricultura, obligando a los productores a desarrollar nuevas estrategias agrícolas. Esto se debe a que la salinidad genera estrés en las plantas, provocando cambios significativos en su metabolismo y afectando su crecimiento y desarrollo, lo que a su vez impacta negativamente en la productividad de los cultivos. Para hacer frente a la salinidad y otras condiciones desfavorables del ambiente, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos, como la acumulación de compuestos antioxidantes y de proteínas específicas involucradas en la tolerancia al estrés. Un ejemplo de estas proteínas son las dehidrinas, también conocidas como proteínas de respuesta a la deshidratación (DHNs por sus siglas en inglés, Dehydrin Proteins). Se trata de un grupo de proteínas que se encuentran en diversas especies vegetales y desempeñan un papel crucial en el desarrollo de las semillas y en la protección de las células contra el estrés ambiental, especialmente en condiciones de sequía, frío y salinidad. Estas proteínas tienen la capacidad de estabilizar las membranas celulares y de proteger las proteínas y el ADN contra el daño causado por la deshidratación. Por otro lado, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) es una especie halófila facultativa adaptada para prosperar en una amplia gama de agroecosistemas. Algunas variedades pueden crecer incluso en concentraciones de sal similar o superior a la que posee el agua de mar. Sin embargo, aún no se comprenden completamente los mecanismos moleculares subyacentes que le confieren esta tolerancia. Por esta razón, realizar un estudio de las dehidrinas de quinoa y de su relación con la salinidad podría ayudar a dilucidar los mecanismos a través de los cuales las plantas responden al ambiente, y así desarrollar estrategias biotecnológicas más eficientes para generar plantas tolerantes al estrés.

El objetivo principal de esta investigación fue la identificación y caracterización de la expresión de las dehidrinas de quinoa (CqDHNs) en respuesta al estrés salino. El propósito final consistió en utilizar estos genes como marcadores de tolerancia a la salinidad en la quinoa y como una herramienta de mejora para abordar el estrés salino en otros cultivos. Los objetivos específicos planteados y los resultados obtenidos se presentan a lo largo de tres capítulos.

Las dehidrinas contienen segmentos conservados de aminoácidos, denominados segmentos K, S, Y y F que les confieren su estructura característica y son utilizados para clasificarlas en seis subgrupos estructurales: K, SK, YK, YSK, FSK y KS. El objetivo del primer capítulo consistió en realizar un análisis estructural y filogenético de las DHNs de angiospermas con el fin de establecer criterios adecuados que aseguraran la identificación exhaustiva de estas proteínas en los genomas de plantas. La identificación preliminar de DHNs en el genoma de 56 especies representativas del clado Viridiplantae utilizando el modelo oculto de Markov (HMM) definido para las proteínas de esta familia génica (Pfam00257) nos permitió determinar una falta de sensibilidad del método para el reconocimiento de DHNs en general, y en particular aquellas con estructura KS, lo que indica una subestimación de las DHNs codificadas en los genomas

de plantas. En base a proteínas pertenecientes a los tres subgrupos estructurales KS, FSK e YSK se procedió a la construcción de tres nuevos perfiles de HMM denominados HMM-KS, HMM-F y HMM-Y. El perfil HMM-KS incrementó la sensibilidad en el reconocimiento de las DHNs y se determinó que una combinación de los perfiles HMM específicos de cada grupo es necesaria para la identificación de todos los tipos de DHNs. A continuación, se verificó la presencia de los motivos característicos de las DHNs utilizando la herramienta MEME. El análisis reveló que todas las DHNs KS poseen en la región amino-terminal un único motivo altamente conservado de 15 residuos, el cual no fue descrito anteriormente. Este motivo novedoso, al cual se denominó segmento H, fue detectado en las DHNs de especies angiospermas, gimnospermas y licofitas, sugiriendo que las DHNs HKS surgieron en las primeras plantas vasculares. Los análisis de filogenia y microsintenia indicaron que los cinco subgrupos estructurales de DHNs en angiospermas pueden ser asignados a tres grupos de genes ortólogos, caracterizados por la presencia de los segmentos H, F e Y. Finalmente, se evaluaron algunas propiedades biofísicas y bioquímicas a través de las cuales se concluyó que el carácter hidrofílico de las DHNs correlaciona con el origen filogenético de las DHNs más que con los subgrupos estructurales tradicionales.

El segundo capítulo tuvo como objetivo la identificación de la familia génica de dehidras y el análisis de su expresión órgano-específico y en respuesta al estrés salino. Mediante el uso de los perfiles HMM descritos en el primer capítulo, se identificaron 11 genes CqDHNs pertenecientes a los 3 grupos ortólogos de angiospermas. Se determinó la presencia de seis subgrupos estructurales de DHNs en el genoma de *C. quinoa*: FSK2, FSK3, Y2SK2, Y4SK2, SK y una atípica KS. Llamativamente, la dehidrina KS de *C. quinoa* no posee un segmento K conservado, sin embargo la presencia del dominio H y el análisis de microsintenia permitió identificarla como una proteína ortóloga a las DHNs KS. Llamativamente, estas mismas características fueron identificadas en las DHNs KS de las otras especies de amarantáceas analizadas. Se evaluó la expresión tejido específico de las CqDHNs y se obtuvo que los genes CqDHN1 (FSK2) y CqDHN3 (Y2SK2) se expresan de forma ubicua. En cambio, los genes CqDHN2 (FSK3) y CqDHN4 (Y4SK2 y SK2) se expresan exclusivamente en raíz e inflorescencia, respectivamente. Por otra parte, se realizaron ensayos de salinidad en plántula de tres variedades diferentes de quinoa. Estudios morfométricos y fisiológicos determinaron que Cahuil es la variedad más tolerante, siendo BO25 y Sajama los cultivares sensibles al estrés salino. Los análisis de qRT-PCR mostraron que los genes CqDHN4 aumentan su expresión a causa del estrés por sal en todas las variedades analizadas; mientras que los genes CqDHN1 disminuyen su expresión en Cahuil. Esto último es llamativo ya que la represión transcripcional de DHNs es muy inusual en estrés abiótico y existe un solo antecedente para salinidad reportado en hojas de *Beta vulgaris*, otra especie amarantácea con características halotolerantes. Un análisis *in silico* de los promotores de CqDHN1 y CqDHN4 identificó sitios de unión para CAMTA y ABF3, respectivamente. Ambos factores de transcripción están relacionados a múltiples estreses abióticos, y en particular a estrés osmótico, teniendo ABF3 un rol importante en respuestas dependientes de ABA. Consecutivamente, la función del gen CqDHN1A fue evaluada mediante sobreexpresión en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados indicaron que la sobreexpresión de CqDHN1A acorta los tiempos de germinación y favorece la elongación de la raíz en las

plantas bajo condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, el efecto positivo de CqDHN1A se pierde en condiciones de estrés salino debido a que el comportamiento de las líneas transgénicas no se diferencia significativamente de las plantas salvajes. Considerando que en Cahuil, la variedad de quinoa más tolerante al estrés salino, la expresión de CqDHN1 se regula negativamente, podemos plantear que la expresión de esta proteína en estadios tempranos del desarrollo de las plántulas podría ser negativo para su supervivencia en estrés salino. Por otra parte, estudios realizados sobre CqDHN4B mostraron que la proteína presenta cierto grado de degradación, y los ensayos preliminares de estrés no arrojaron resultados concluyentes. Se necesitarán evaluaciones adicionales para CqDHN4B que nos permitan comprender su rol en situaciones de estrés.

El tercer y último capítulo planteó como objetivo el desarrollo de un sistema de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS por sus siglas en inglés, Virus-Induced Gene Silencing) para su utilización en ensayos de genómica funcional en quinoa. Se llevó a cabo una puesta a punto del método utilizando vectores virales basados en el virus de plantas *Apple latent spherical virus* (ALSV) que portan parte de las secuencias génicas de la fitoeno desaturasa de *N. benthamiana* y de quinoa. La técnica desarrollada requiere una primera inoculación en plantas de *Nicotiana* mediante agroinfiltración con cultivos de *Agrobacterium* que portan las diferentes construcciones virales. Se preparan extractos virales utilizando las hojas locales o sistémicas, y estos se usan como inóculo para infectar hojas de quinoa mediante daño mecánico. El método se probó exitosamente en dos variedades contrastantes de quinoa, aunque con algunas diferencias en el fenotipo de infección y la susceptibilidad viral. También se analizó el efecto del tamaño de la secuencia de inserción en los vectores virales, dando como resultado diferencias en el fenotipo de blanqueamiento o clorosis, y en el impacto sobre el crecimiento de las plantas. Se confirmó la presencia del virus en las plantas infectadas y se comprobó la disminución de la expresión del gen PDS en las plantas silenciadas. En conclusión, se pudo elaborar un método fácil y rápido de VIGS en quinoa que permitirá estudiar mediante pérdida de función diversos genes relacionados a estrés. Esto es sumamente relevante ya que se trata de una especie que hasta el momento no cuenta con protocolos de transformación estable, y por ende los estudios funcionales se encuentran restringidos a ensayos de expresión heteróloga.

Palabras claves: *Chenopodium quinoa*, dehidrinas, estrés salino, VIGS.

Study of dehydrins and their relationship with salt stress tolerance in the halophytic plant *Chenopodium quinoa* Willd.

Abstract

Soil salinization generates significant economic losses in agriculture every year, forcing producers to develop new agricultural strategies. This is because salinity causes stress in plants, leading to significant changes in their metabolism and affecting their growth and development, which in turn negatively impacts crop productivity. To cope with salinity and other unfavorable environmental conditions, plants have developed different mechanisms, such as the accumulation of antioxidant compounds and specific proteins involved in stress tolerance. An example of these proteins are dehydrins, also known as dehydration response proteins or Dehydrin Proteins (DHNs for short). They are a group of proteins found in various plant species that play a crucial role in seed development and cell protection against environmental stress, especially under conditions of drought, cold, and salinity. These proteins have the ability to stabilize cell membranes and protect proteins and DNA from damage caused by dehydration.

On the other hand, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) is a facultative halophyte species adapted to thrive in a wide range of agroecosystems. Some varieties can even grow in salt concentrations similar to or higher than that of seawater. However, the underlying molecular mechanisms that confer this tolerance are not yet fully understood. Therefore, studying quinoa dehydrins and their relationship with salinity could help elucidate the mechanisms by which plants respond to the environment and develop more efficient biotechnological strategies to generate stress-tolerant plants.

The main objective of this research was the identification and characterization of quinoa dehydrin (CqDHNs) expression in response to salt stress. The ultimate purpose was to use these genes as markers of salinity tolerance in quinoa and as an improvement tool to address salt stress in other crops. The specific objectives and results obtained are presented throughout three chapters.

Dehydrins contain conserved segments of amino acids, referred to as K, S, Y, and F segments, which confer their characteristic structure and are used to classify them into six structural subgroups: K, SK, YK, YSK, FSK, and KS. The objective of the first chapter was to perform a structural and phylogenetic analysis of angiosperm dehydrins in order to establish appropriate criteria to ensure comprehensive identification of these proteins in plant genomes. The preliminary identification of dehydrins in the genomes of 56 representative species from the Viridiplantae clade using the hidden Markov model (HMM) defined for proteins of this gene family (Pfam00257) allowed us to determine a lack of sensitivity of the method for recognizing dehydrins in general, particularly those with KS structure, indicating an underestimation of dehydrins encoded in plant genomes. Based on proteins belonging to the three structural subgroups KS, FSK, and YSK, three new HMM profiles were constructed, named HMM-KS, HMM-F, and HMM-Y. The HMM-KS profile increased sensitivity in recognizing dehydrins, and it was determined that a combination of specific HMM profiles for each group is necessary for the

identification of all types of dehydrins. Subsequently, the presence of characteristic motifs of dehydrins was verified using the MEME tool. The analysis revealed that all KS dehydrins possess a highly conserved unique motif of 15 residues in the amino-terminal region, which has not been described previously. This novel motif, referred to as the H segment, was detected in dehydrins from angiosperms, gymnosperms, and lycophytes, suggesting that HKS dehydrins emerged in early vascular plants. Phylogenetic and microsynteny analyses indicated that the five structural subgroups of dehydrins in angiosperms can be assigned to three groups of orthologous genes, characterized by the presence of the H, F, and Y segments. Finally, certain biophysical and biochemical properties were evaluated, leading to the conclusion that the hydrophilic nature of dehydrins correlates with their phylogenetic origin rather than with traditional structural subgroups.

The second chapter aimed to identify the dehydrin gene family encoded in the quinoa genome and analyze the organ-specific expression and response to salt stress of CqDHNs. Using the HMM profiles described in the first chapter, eleven CqDHN genes were identified in the quinoa genome belonging to the Y-, F-, and H-orthologous groups found in angiosperms. Various analyses suggested a functional loss of the K segment in the H-type DHNs of quinoa and other amaranths. Likewise, the presence of six structural subgroups of CqDHNs (FSK2, FSK3, Y2SK2, Y4SK2, SK, and the atypical HS) was determined, with the majority having two paralogous genes (named A and B), which is consistent with quinoa's allotetraploid nature. Organ-specific expression of CqDHNs was evaluated, and it was found that the CqDHN1 (FSK2) and CqDHN3 (Y2SK2) genes are expressed ubiquitously. In contrast, the CqDHN2 (FSK3) and CqDHN4 (Y4SK2 and SK2) genes are expressed exclusively in the root and inflorescence, respectively. Furthermore, salinity tolerance analysis was conducted on seedlings of three different quinoa landraces. Physiological and morphometric studies determined that Cahuil is the most tolerant variety, while BO25 and Sajama are sensitive to salt stress. qRT-PCR analysis of salt-responsive gene expression showed that the CqDHN4 genes increase their expression due to salinity in all the studied landraces, whereas the CqDHN1 genes decrease their expression in Cahuil. Transcriptional repression of DHNs is unusual in abiotic stress, with only one precedent reported for salinity in beet leaves. *In silico* analysis of the promoters of CqDHN1 and CqDHN4 identified binding sites for CAMTA and ABF3, respectively. Both transcription factors are associated with multiple abiotic stresses, particularly osmotic stress, with ABF3 playing an important role in ABA-dependent responses. Subsequently, the function of the CqDHN1A gene was evaluated through overexpression in transgenic *A. thaliana* plants. Results indicated that CqDHN1 has a positive effect on the plant, reducing germination times and promoting root elongation rate. However, under salt stress conditions, germination and root growth are not promoted. Considering the downregulation of CqDHN1 in Cahuil, it was hypothesized that its heterologous overexpression under stress could be counterproductive for the plant. On the other hand, studies conducted on CqDHN4B revealed that the protein undergoes certain degrees of degradation, and preliminary stress tests did not yield conclusive results. Further evaluations of CqDHN4B will be necessary to better understand its role in stress situations.

The third and final chapter aimed to develop a Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) system for functional genomics assays in quinoa. The method was fine-tuned using viral vectors based on the Apple latent spherical virus (ALSV) that carry partial gene sequences of phytoene desaturase from *N. benthamiana* and quinoa. The developed technique involves an initial inoculation in *Nicotiana* plants through agroinfiltration with *Agrobacterium* cultures carrying the different viral constructs. Viral extracts were prepared using local or systemic leaves, which were then used as inoculum to infect quinoa leaves through mechanical damage. The method was successfully tested in two contrasting quinoa varieties, although some differences were observed in infection phenotype and viral susceptibility. The effect of insertion sequence size in the viral vectors was also analyzed, resulting in differences in bleaching or chlorosis phenotype and impact on plant growth. The presence of the virus in infected plants was confirmed, and the reduction in PDS gene expression in silenced plants was verified. In conclusion, an easy and fast VIGS method in quinoa was developed, allowing the study of various stress-related genes through loss of function. This is highly relevant as quinoa currently lacks stable transformation protocols, limiting functional studies to heterologous expression assays.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, dehydrins, salt stress, VIGS.

Agradecimientos

Al laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a IBBEA por brindarme el espacio. A CONICET por la beca otorgada que me permitió llevar adelante mi etapa doctoral.

A mi directora Alicia Zelada quien confió en mí para realizar esta hermosa tesis de la cual siento mucho orgullo porque fue sin dudas un trabajo de equipo entre ambas. También por la confianza para compartir conmigo otros proyectos que muy pronto estaremos abordando.

A mi familia, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mis amigas, porque fueron mi apoyo emocional siempre.

A Belén, una hermana que me regaló la vida y sin cuya compañía esta etapa definitivamente no hubiera sido la misma.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
ATP	nucleótido de adenina (adenosín trifosfato)
NTP	Nucleósido trifosfato
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ADNc	ADN copia
ARNpi	ARN pequeño de interferencia
°C	Grados centígrados
L	Litro
G	Gramo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
M	Molar
µM	Micromolar
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
Ms	Milisegundo
mM	Milimolar
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro
S	Segundo
Min	Minuto
H	Hora/s
Cm	Centímetro
V	Volt
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilo Volt
Rpm	Revoluciones por minuto
x g	Aceleración equivalente a fuerza de gravedad
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés, "Open Reading Frame")
UTR	Región no codificante (del inglés, "Untranslated región")
Pb	Pares de bases
Kb	Kilobases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés "Polymerase Chain Reaction")
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (o en tiempo real)
RT	Retrotranscripción
OD	Densidad óptica (del inglés, "Optical Density")
ECL	Reactivo de detección en Western Blot (del inglés, "enhanced chemiluminescence")
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés, "Green Fluorescent Protein")
MS	Murashige y Skoog
LB	Luria Bertani
TE	Buffer Tris EDTA
TAE	Tris Acetato EDTA
TBS	Tris Buffer Salino
SDS	dodecilsulfato sódico
TCA	Ácido tricloroacético
TBA	Ácido tiobarbitúrico
BHT	Butilhidroxitolueno
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
PM	Peso molecular
pI	Punto isoeléctrico
GRAVY	Índice de hidropatía (del inglés, "grand average of hydropathy")
DPI	Días post-infiltración
DPG	Días post-germinación
DPS	Días post-siembra
35S CaMV	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (del inglés, "Cauliflower Mosaic Virus")
Tnos/NOS	Terminador de la transcripción de la nopalina sintasa
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional (del inglés, "Posttranscriptional Gene Silencing")
VIGS	Silenciamiento génico inducido por virus (del inglés, "Virus-induced gene silencing").
PDS	Fitoeno desaturasa (del inglés, "phytoene desaturase")
ALSV	virus esférico latente de la manzana (del inglés, "Apple Latent Spherical Virus")
DHN	Dehidrina
LEA	Proteína abundante de embriogénesis tardía (del inglés, "Late embryogenesis abundant")
HMM	Modelos ocultos de Markov (del inglés, "Hidden Markov Model"),
bootstrap	Método de soporte de árboles filogenéticos

Los resultados del capítulo 1 de la tesis forman parte de la siguiente publicación:

Melgar, A. E., & Zelada, A. M. (2021). **Evolutionary analysis of angiosperm dehydrin gene family reveals three orthologues groups associated to specific protein domains**. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03066-5>

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
Objetivo general	1
Objetivos específicos	1
MATERIALES Y MÉTODOS	2
1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	2
1.1. Plantas crecidas en sustrato	2
1.2. Plantas crecidas in vitro	2
2. Técnicas de microbiología	3
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	3
2.2. Conservación de clones bacterianos	4
2.3. Preparación y transformación de bacterias electrocompetentes	4
3. Técnicas de ingeniería genética	4
3.1. Aislamiento de ADN plasmídico	4
3.2. Extracción de ARN	5
3.3. Síntesis de ADNc	5
3.4. Ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)	5
3.5. Ensayos de PCR semi-cuantitativa	6
3.6. Ensayos de qPCR (PCR cuantitativa)	7
3.7. Electroforesis en geles de agarosa	7
3.8. Digestión con enzimas de restricción	7
3.9. Purificación de fragmentos de ADN	8
3.10. Clonado del gen CqDHN4B	8
3.11. Plásmidos utilizados durante la tesis	9
3.12. Secuenciación de ADN	11
4. Ensayos de agroinfiltración	11
4.1. Evaluación de la expresión de la proteína CqDHN4B salvaje	12

4.2. Evaluación de la expresión de la proteína CqDHN4B fusionada, en su extremo N- o C-terminal, a GFP	12
5. Extracción de proteínas	12
6. Ensayos de Western blot	12
6.1. Electroforesis y transferencia de proteínas	12
6.2. Tinción con colorante Ponceau	13
6.3. Inmunodetección de proteínas	13
7. Microscopía	14
8. Ensayos de expresión en plantas de quinoa	14
8.1. Estrés salino	14
8.2. Anatómico-específico	14
9. Ensayos en plantas de <i>Arabidopsis</i>	15
9.1. Ensayos en líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes de CqDHN1A	15
9.1.1. Germinación en condiciones normales	15
9.1.2. Traspaso de radículas a condiciones de estrés salino	15
9.2. Ensayos en líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes de CqDHN4B	15
9.2.1. Germinación en condiciones de estrés salino	15
9.2.2. Supervivencia de planta adulta en condiciones de estrés salino	15
10. Mediciones morfométricas	15
11. Mediciones fisiológicas	16
11.1. Enzimas	16
11.2. Malondialdehído	16
11.3. Clorofila	17
12. Ensayos de silenciamiento	17
12.1. Inoculación viral (ALSV) en <i>N. benthamiana</i> y quinoa	17
12.2. Detección sistémica del virus ALSV y evaluación de la expresión del gen PDS	18
13. Análisis estadístico	18

14. Técnicas de bioinformática	18
14.1. Identificación de las secuencias codificantes de dehidrinas	18
14.2. Alineamiento de secuencias	19
14.3. Construcción de árboles filogenéticos	20
14.4. Análisis de microsintenia	20
14.5. Estudio de secuencias promotoras	21
14.6. Análisis de propiedades fisicoquímicas	21
14.7. Predicciones de estructura, desorden y localización subcelular	21
14.8. Análisis de expresión <i>in silico</i>	22
CAPÍTULO 1: Identificación y análisis filogenético, estructural y bioquímico de la familia de las dehidrinas en angiospermas	23
INTRODUCCIÓN	24
1. Proteínas LEA	24
1.1. Dehidrinas: secuencia y arquitectura	24
1.2. Dehidrinas: estructura	25
2. Dominios aminoacídicos y perfiles de HMM: búsqueda de secuencias homólogas	26
3. Identificación de motivos <i>de novo</i> en secuencias aminoacídicas	27
4. Secuencias homólogas aminoacídicas para el estudio de relaciones filogenéticas	27
5. Relaciones filogenéticas en la familia de dehidrinas	28
RESULTADOS	30
1. Identificación de las DHNs en los genomas de especies del clado Viridiplantae	30
2. Análisis de motivos conservados en las secuencias aminoacídicas de las DHNs	31
2.1. Identificación de motivos aminoacídicos y clasificación estructural de las DHNs	31
2.2. Detección de un nuevo motivo conservado (segmento H) presente en todas las DHNs KS	34

3. Estudio filogenético de las DHNs de angiospermas	36
3.1. Definición de grupos ortólogos	36
3.2. Análisis de microsintenia	38
4. Propiedades bioquímicas de los grupos ortólogos de las DHNs	40
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	43
CAPÍTULO 2: Identificación y análisis de expresión de la familia génica de dehidrinas en <i>Chenopodium quinoa</i>	46
INTRODUCCIÓN	47
1. El estrés salino en las plantas	47
1.1. La salinidad de los suelos y su impacto en la agricultura	47
1.2. El estrés oxidativo en las plantas debido a la salinidad	47
2. Las dehidrinas y su relación con el estrés	49
3. La planta halófito <i>Chenopodium quinoa</i>	51
3.1. Generalidades	51
3.2. Importancia económica	52
3.3. Su relación con la tolerancia al estrés	53
RESULTADOS	55
1. Análisis estructural y filogenético de las dehidrinas de quinoa y otras especies amarantáceas.	55
2. Características de la familia de proteínas CqDHNs	57
3. Predicciones de estructura y desorden de las proteínas CqDHNs	58
4. Patrones de expresión de la familia génica CqDHN	60
4.1. Perfiles de expresión de los genes CqDHNs bajo estrés salino	61
4.2. Patrones de expresión de los genes CqDHNs en diferentes órganos y estadios de desarrollo de la planta	62
5. Análisis de las secuencias promotoras en las DHNs de amarantáceas	64
6. Características morfológicas y fisiológicas de las diferentes variedades de quinoa bajo tratamiento salino	68
6.1. Evaluación de caracteres morfológicos en quinoa en respuesta a la salinidad	68

6.2. Evaluación de caracteres fisiológicos en quinoa en respuesta a la salinidad	69
7. Evaluación molecular y funcional de la proteína CqDHN1A	72
7.1. Resultados previos de caracterización molecular de la CqDHN1A	72
7.2. Evaluación de localización subcelular de las construcciones GFP-CqDHN1A y CqDHN1A-GFP bajo microscopía confocal	76
7.3. Análisis de germinación y crecimiento radicular de líneas transgénicas CqDHN1A de <i>A. thaliana</i> , bajo condiciones normales	78
7.4. Análisis de germinación y crecimiento radicular de líneas transgénicas CqDHN1A de <i>A. thaliana</i> , bajo condiciones de estrés salino	79
8. Evaluación molecular y funcional de la proteína CqDHN4B	81
8.1. Aislamiento y clonado del gen CqDHN4B	81
8.2. Análisis de la expresión de la CqDHN4B salvaje y las fusiones N- y C-terminal a GFP mediante expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	82
8.3. Evaluación de localización subcelular de las construcciones GFP-CqDHN4B y CqDHN4B-GFP bajo microscopía confocal	84
8.4. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de la CqDHN4B sobre la respuesta de <i>A. thaliana</i> al estrés salino	86
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	89
1. Dehidrinas de <i>C. quinoa</i> : estructura y evolución	89
2. <i>C. quinoa</i> y dehidrinas. Rol en la respuesta al estrés salino.	90
CAPÍTULO 3: Desarrollo de un sistema de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en <i>Chenopodium quinoa</i>	97
INTRODUCCIÓN	98
1. Génesis y mecanismo de VIGS	98
2. Secuencia génica de inserción y técnicas de inoculación	99
3. Ventajas y limitaciones de VIGS	100
4. Vectores virales utilizados para VIGS	102
4.1. Vectores reportados en la literatura	102
4.2. Vectores basados en ALSV	103
RESULTADOS	104

1. Puesta a punto de la infección por ALSV en quinoa	104
2. Silenciamiento del gen PDS de quinoa	106
2.1. Análisis en dos variedades contrastantes	106
2.2. Detección sistémica de ALSV y de los transcritos del gen CqPDS	109
2.3. Efectos del tamaño de la secuencia génica de inserción sobre el silenciamiento de PDS en quinoa	110
2.4. Evaluación de la transmisión de ALSV en la progenie de plantas infectadas de quinoa	111
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	114
CONCLUSIONES GENERALES	117
PERSPECTIVAS	119
ANEXO	120
Figuras suplementarias	121
Tablas suplementarias	140
BIBLIOGRAFÍA	145

Páginas 1 a 22 eliminadas a pedido del autor.

Capítulo 1

“Identificación y análisis filogenético, estructural y bioquímico de la familia de las dehidrinas en angiospermas”

1. Proteínas LEA

Las plantas se enfrentan a diversos estreses del medioambiente los cuales pueden tener un impacto negativo sobre su crecimiento y desarrollo. Las proteínas LEA (del inglés, “Late Embryogenesis Abundant”), como su nombre sugiere, se acumulan en altos niveles durante los estadios tardíos del desarrollo de la semilla; sin embargo, la pérdida de agua intracelular como consecuencia del estrés abiótico también genera su acumulación en órganos vegetativos, sugiriendo un rol protector frente al déficit hídrico (Roberts et al., 1993).

Las LEAs pertenecen a un gran grupo de proteínas conocidas como “hidrofilinas”, caracterizadas por sus secuencias ricas en glicina y altamente hidrofílicas (Garay-Arroyo et al., 2000). En base a la similitud de secuencias, las LEAs se clasifican en 7 familias de acuerdo a Pfam que se distinguen por la presencia de diferentes motivos conservados. Las familias son LEA1, LEA2, LEA3, LEA4, LEA5, SMP y dehidrinas (DHNs), esta última es también conocida como grupo II o D11 y conforma el grupo más estudiado de las LEAs (Dure, 1993; Battaglia et al., 2008).

1.1. Dehidrinas: secuencia y arquitectura

Las dehidrinas constituyen un grupo bioquímico y evolutivamente distintivo de las LEAs. Tienen una estructura altamente modular la cual consiste en una combinación de diferentes motivos conservados, variables en número y tipo, intercalados dentro de segmentos aminoacídicos débilmente conservados. La presencia de al menos un motivo conservado rico en lisinas, denominado segmento-K, es usualmente usado como condición para definir a una proteína como dehidrina (Close et al., 1989). La secuencia canónica del segmento-K en plantas vasculares es EKKGIMDKIKEKLP. Los residuos más conservados corresponden a las Lys en las posiciones 2, 8, 10 y 12, así como también a las Gly ubicadas en las posiciones 4 y 15 (Malik et al., 2017).

Otros dos motivos conservados descritos en las DHNs son los segmentos S e Y. El segmento S tiene una longitud aproximada de 16 aminoácidos y consta de un tramo central de 6 a 7 serinas consecutivas. La región C-terminal está ocupada por residuos de Asp o Glu, mientras que el inicio del motivo contiene Leu-His-Arg como triada más frecuente. Por otro lado, el segmento Y, llamado así por la presencia de un aminoácido de Tyr en la mitad del motivo, posee una secuencia consenso descrita como D(E/Q)YGNP(V/T). Aunque la Tyr es el residuo más frecuente en la posición 3, también se puede encontrar His o Phe, con lo cual el carácter aromático en esta posición parece ser importante. Las posiciones 4 (Gly) y 5 (Asn) son altamente conservadas, seguidas por las posiciones 1 (Asp) y 6 (Pro) (Malik et al., 2017).

Los segmentos K, S e Y son la base para la clasificación general de las DHNs en los 5 sub-grupos estructurales: KnS, SKn, YnKn, YnSKn y Kn, donde n hace referencia al número de

repeticiones y cuyo rango depende del segmento en cuestión. El segmento K por definición debe estar presente en al menos una copia, sin embargo, no es poco usual encontrarlo de forma más frecuente. El segmento Y, cuando está presente, se localiza en el extremo N-terminal de la proteína, en una o varias copias en tándem; mientras que el segmento S se encuentra siempre en una única copia (Close, 1996).

Recientemente, Strimbeck (2017) describió un nuevo motivo conservado presente en un sub-grupo de DHNs con estructura SKn, al cual denominó segmento F. Este motivo (DRGLFDFLGKK) de 11 residuos fue encontrado en coníferas y en los principales grupos de angiospermas. La mayoría de las dehidrasas con arquitectura SKn contienen en su extremo amino-terminal una copia del segmento-F, con lo cual esto introdujo un nuevo sub-grupo estructural a la clasificación general: FSKn.

Estos motivos conservados (K, Y, S y F) están rodeados por secuencias menos conservadas denotadas como segmentos Phy, las cuales poseen en mayor frecuencia residuos de Gly, Thr y Glu (Malik et al., 2017).

1.2. Dehidrasas: estructura

Las DHNs poseen en sus secuencias un porcentaje muy reducido de aminoácidos hidrofóbicos. Para una proteína globular típica, estos constituyen el núcleo hidrofóbico que hace posible su plegamiento; por el contrario, en el caso de las dehidrasas, la presencia de residuos polares y cargados evita que la proteína forme una estructura estable (Graether y Boddington, 2014). Aquellas proteínas de conformación extendida, con alta flexibilidad intramolecular y escasa estructura secundaria son conocidas como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) (Tompa, 2003). Este tipo de desorden es especialmente común en proteínas involucradas en el control del ciclo celular, la regulación transcripcional y traduccional y el ensamblado de proteínas, pero también es característico de proteínas que responden al estrés (Uversky, 2002a).

La estructura prácticamente desordenada de las DHNs conlleva varias ventajas, tales como la incapacidad de desnaturalizarse. En el caso de las proteínas globulares, su desnaturalización genera la exposición de residuos hidrofóbicos en el medio acuoso, donde pueden interactuar con otros residuos hidrofóbicos de otras proteínas y formar agregados (Uversky et al., 2000). La baja hidrofobicidad y la alta carga neta permiten a las dehidrasas mantener una desestructuración bajo condiciones fisiológicas, lo que evita la desnaturalización durante la desecación o las temperaturas heladas, y además la falta de aminoácidos hidrofóbicos impide la agregación (Graether y Boddington, 2014).

Resultados que se desprenden de estudios de dicroísmo celular indicarían que las DHNs pueden formar estructuras de α -hélice, aunque estas serían transitorias, débiles e imperfectas. Por otro lado, experimentos de resonancia magnética nuclear concluyeron que estas proteínas son altamente flexibles, tal como se espera para las IDPs (Smith and Graether, 2022). Programas que predicen la formación de estructura secundaria mostraron que el segmento-K

corresponde a la zona de la proteína que tendería a formar las α -hélices (Hughes and Graether, 2011). Se sabe además que las IDPs responden a los cambios del ambiente, como a altas temperaturas, valores de pH extremos e incluso a la presencia de ligandos, adquiriendo un plegamiento parcial y aumentando la complejidad estructural de la proteína (Uversky, 2002b). En relación a esto, estudios *in vitro* señalan que el segmento K puede interactuar con membrana y diferentes ligandos, y esa interacción es la que podría favorecer la formación de α -hélices (Graether y Boddington, 2014).

2. Dominios aminoacídicos y perfiles de HMM: búsqueda de secuencias homólogas

Entre las anotaciones que caracterizan a una proteína se encuentran los dominios. Los dominios de las proteínas son unidades o motivos secuenciales y estructurales, pueden trabajar independientemente o cooperar con dominios vecinos, y diferentes ordenamientos de los mismos pueden generar funciones distintas en las proteínas. A los dominios también se los considera como porciones homólogas de secuencias codificadas en distintos contextos genéticos que se han mantenido intactas a lo largo de la evolución a nivel de secuencia (Richardson, 1981; Wang et al., 2021).

Pfam es una base de datos de familias de proteínas y dominios ampliamente utilizada que actualmente cuenta con 19632 entradas. Cada familia de dominios es definida usando un conjunto de secuencias aminoacídicas representativas las cuales son manualmente seleccionadas y alineadas, y usadas para construir un perfil basado en Modelos Ocultos de Markov (HMM) (Finn et al., 2009). Un perfil de HMM es un modelo probabilístico que modela las posiciones conservadas en cada columna de un alineamiento múltiple de secuencias (Eddy, 1998). En otras palabras, los perfiles de HMM reflejan los cambios evolutivos que ocurrieron dentro de un conjunto de secuencias relacionadas. Estos perfiles se pueden usar para buscar secuencias homólogas en cualquier base de datos de manera sensible y precisa. Cuando se analiza una nueva secuencia aminoacídica, los perfiles HMM de Pfam se usan para computar un puntaje que mide la similitud entre la secuencia y el dominio. Si el puntaje está por encima de un determinado umbral establecido por Pfam (el valor del umbral depende de cada perfil de HMM), entonces se acepta la presencia del dominio en la proteína (Finn et al., 2009).

La búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos y los alineamientos son realizados por softwares como HMMER. Desde 1998 Pfam ha usado HMMER para construir perfiles de HMM y contrastarlos contra secuencias ubicadas en bases de datos (Mistry et al., 2013). Históricamente, Pfam y HMMER se han ido desarrollando en paralelo. Las primeras implementaciones de perfiles de HMM fueron computacionalmente intensivas, incluyendo HMMER1 (1995) y HMMER2 (1998), pero actualmente, HMMER3 es más rápido que búsquedas de Blastp, incluso utilizando modelos más complejos. El algoritmo Blast desarrolla alineamientos locales, es decir, alinea y compara una o varias secuencias de interés contra secuencias ubicadas en bases de datos; mientras que los perfiles de HMM hacen las comparaciones contra modelos estadísticos (de dominios peptídicos) que son los que representan a las secuencias. Aunque Blast está programado para encontrar dominios o trectos

cortos de secuencia, los perfiles de HMM son muchos más sensibles y pueden identificar secuencias más divergentes que Blast (Madden, 2013).

3. Identificación de motivos *de novo* en secuencias aminoacídicas

Un motivo de ADN, ARN o proteína es un patrón corto conservado por la evolución. En el caso de las proteínas, estos motivos pueden representar regiones estructurales, sitios de unión a ligandos o dominios funcionales. Es decir, los motivos son una de las unidades funcionales básicas de la evolución molecular. En consecuencia, identificar y comprender estos motivos es fundamental para la construcción de modelos de procesos celulares a escala molecular (Bailey et al., 2015).

El programa MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) suite es un conjunto integrado de herramientas web para el descubrimiento y análisis de motivos (Bailey et al., 2009). Un motivo consiste en un patrón de secuencia aproximado que ocurre repetidamente en un grupo de secuencias relacionadas. MEME representa los motivos como matrices de probabilidad de letras dependientes de la posición que describen la probabilidad de cada letra posible en cada posición en el patrón. Los motivos obtenidos no contienen espacios porque no está permitido por el algoritmo. Además, el programa divide los patrones con espacios de longitud variable en dos o más motivos separados. Este software toma como entrada un grupo de secuencias a comparar y genera tantos motivos conservados entre ellas como se le soliciten. Además, utiliza técnicas de modelado estadístico para elegir automáticamente el mejor ancho, el número de ocurrencias y dar una descripción para cada motivo generado (Bailey and Elkan, 1994). De esta forma, es posible identificar un motivo "de novo" refiriéndonos a un patrón o secuencia de aminoácidos que no ha sido previamente descrito o asociado con una función conocida. Estos motivos son identificados mediante análisis bioinformáticos y estructurales, y su presencia en una proteína puede sugerir una nueva función o interacción molecular.

4. Secuencias homólogas aminoacídicas para el estudio de relaciones filogenéticas

Las secuencias aminoacídicas se utilizan frecuentemente para el análisis de relaciones evolutivas. El ADN está sujeto a cambios graduales a lo largo del tiempo, resultando en la incorporación de mutaciones, inserciones o deleciones. Sin embargo, no todas las mutaciones genéticas conducen a cambios en las secuencias peptídicas. Se podría decir que las secuencias aminoacídicas son mucho más estables que las nucleotídicas debido a que mutaciones sinónimas en el ADN no causan mutaciones en las proteínas que codifican. Las secuencias de proteínas ortólogas de dos especies que han divergido de un ancestro común diferirán ligeramente cuando ha habido poco tiempo para que ocurran mutaciones no sinónimas, mientras que cuanto más tiempo haya pasado más chances habrán de que las secuencias aminoacídicas hayan cambiado. Por lo tanto, las secuencias nucleotídicas son útiles para la comparación de genes homólogos de organismos estrechamente relacionados,

mientras que las secuencias aminoacídicas son más apropiadas para genes homólogos de organismos distantemente relacionados (Oppendoes, 2012).

El objetivo de muchos análisis filogenéticos es la reconstrucción de un árbol evolutivo que describa las relaciones de los diversos taxones entre sí. El primer paso consiste en la búsqueda y selección de las secuencias homólogas que conforman la familia a estudiar, por ejemplo, mediante el uso de perfiles de HMM en bases de datos como Pfam. Una vez obtenidas las secuencias, estas deben alinearse. En el caso de las proteínas, el alineamiento múltiple de secuencias o MSA (por sus siglas en inglés, multiple sequence alignment) básicamente tiene como objetivo posicionar residuos “homólogos” de las diferentes secuencias de manera que queden uno encima de otro. Esto constituye un paso crucial para el estudio de la evolución de las proteínas porque se supone que todas posiciones en una columna de un alineamiento múltiple derivan de un residuo ancestral común (Gabaldón, 2005). Existen varios algoritmos de MSA que combinan velocidad y precisión razonable, tales como Clustal Omega o T-Coffee. Ambos utilizan métodos de alineación progresiva donde las secuencias con la mejor puntuación de alineación se alinean primero, luego se alinean progresivamente grupos de secuencias más distantes hasta crear una alineación global. Este enfoque heurístico es necesario debido a la demanda de tiempo y memoria para encontrar la solución óptima global (Thompson et al., 1994; Notredame et al., 2000).

La aplicación de un modelo evolutivo específico que explique las sustituciones aminoacídicas observadas en el MSA, permite computar las distancias evolutivas entre las proteínas. Esta distancia evolutiva, que refleja el número promedio esperado de cambios por sitio que ha ocurrido desde que dos secuencias divergieron de su ancestro común, es utilizada por los denominados métodos de distancia para hacer inferencias filogenéticas (Gabaldón, 2005). Un posible enfoque es el de Máxima Verosimilitud. Este método intenta encontrar el árbol con la máxima probabilidad de producir la variación observada en el conjunto de datos especificado (Schadt, et al., 1998). Dicho árbol representa una hipótesis sobre la historia evolutiva que, de acuerdo con el modelo subyacente, muy probablemente habría dado lugar a los respectivos datos de secuencias (Ludwig et al., 2011).

5. Relaciones filogenéticas en la familia de dehidrinas

Usualmente, las características bioquímicas y funcionales de las DHNs son analizadas en el marco de dominios estructurales conservados, sin tener en cuenta la evolución de esta familia de proteínas. Aunque las relaciones filogenéticas de las DHNs han sido estudiadas en distintas plantas, la mayoría de esos estudios se encuentran limitados a un género o especie (Jing et al., 2016; Abedini et al., 2017; Nagaraju et al., 2018). Solo recientemente, se ha intentado comprender de forma integral la historia evolutiva de las DHNs. Un análisis filogenético y estructural de DHNs de diferentes plantas, sugiere que la DHN ancestral de espermatofitas pertenece a un grupo estructural Kn o SKn, y que las dehidrinas YSKn e YKn surgieron primero en angiospermas (Riley et al., 2019). Sin embargo, el alcance de estos resultados es limitado debido a que están basados en la construcción de árboles filogenéticos que no fueron

confirmados por grupos de sintenia. Además, en el trabajo de Artur et al (2019) propusieron que las DHNs de angiospermas están conformadas por dos grupos ortólogos relacionados con la presencia de los segmentos F e Y, a los cuales definieron como comunidad sinténica F e Y. Sin embargo, debido al enfoque bioinformático utilizado en su trabajo, subestimaron la identificación de las DHNs en los genomas de las plantas estudiadas, siendo su principal consecuencia la no detección de la mayoría de las DHNs KS.

1. Identificación de las DHNs en los genomas de especies del clado Viridiplantae

Para comprender la evolución de las DHNs con estructura KS y su relación con los otros subgrupos estructurales (YnSKn, YnKn, SKn y Kn), se desarrolló una búsqueda a nivel genómico para identificar todos los genes codificantes de DHNs en 56 especies diferentes del clado Viridiplantae, incluyendo miembros de la división Chlorophyta y del grupo Streptophyta.

La búsqueda inicial fue realizada utilizando el perfil HMM definido para las proteínas de la familia dehidrina (Pfam00257) (Mistry et al., 2021). Sorprendentemente, un primer análisis elaborado a partir de las secuencias recuperadas mostró que las DHNs con estructura KS bien conocidas, tales como la HIRD11 de *Arabidopsis thaliana* (At1g54410) (Hundertmark and Hinch, 2008) y la ZmDHN13 de *Zea mays* (Liu et al., 2017) no fueron detectadas por el algoritmo. Se estableció la hipótesis de que el perfil de Pfam00257 no tenía la sensibilidad suficiente para poder reconocer a las DHNs KS. Para superar esa limitación, se construyeron tres perfiles de HMM: uno (HMM-KS) usando secuencias de DHNs KS de genomas de angiospermas identificadas mediante búsqueda por Blastp usando HIRD11 de *A. thaliana* como consulta ("query"), y los otros dos (HMM-F y HMM-Y) basados en DHNs de angiospermas pertenecientes a los grupos ortólogos descritos recientemente (Artur et al., 2019).

Después de buscar con Pfam00257 y los perfiles HMM elaborados para cada grupo específico, se recuperó un total de 305 secuencias no redundantes de genomas de especies representativas de bryophytas (4), lycophytas (1), gimnospermas (3) y angiospermas (36) (ver <https://www.nature.com/articles/s41598-021-03066-5>). Por otra parte, no se recuperaron secuencias de los genomas de algas analizadas, sugiriendo que las DHNs podrían haber surgido en las plantas terrestres (Malik et al., 2017).

Llamativamente, el perfil HMM-KS incrementó la sensibilidad en el reconocimiento de los homólogos de las DHNs, debido a que este fue capaz de identificar un 92,2 % de las proteínas, mientras que el perfil HMM de Pfam00257 identificó un 83 %. De un total de 62 DHNs KS, únicamente 17 pudieron ser recuperadas utilizando el perfil de Pfam00257, corroborando su pobre capacidad para reconocer DHNs KS. El perfil HMM-F tuvo un mejor desempeño y pudo reconocer 24 DHNs KS, sin embargo, únicamente el perfil HMM-H fue capaz de recuperar todas las DHNs KS, dado que hubo 32 DHNs KS que fueron reconocidas exclusivamente usando el perfil HMM-KS. El perfil HMM-KS falló en el reconocimiento de 24 secuencias de DHNs que fueron identificadas por otros perfiles de HMM. Por último, todas las DHNs codificadas en los genomas no pudieron ser recuperadas por un único perfil de HMM, indicando que los perfiles HMM específicos de grupo son necesarios para una identificación completa de las DHNs en los genomas (**Figura 1.1**).

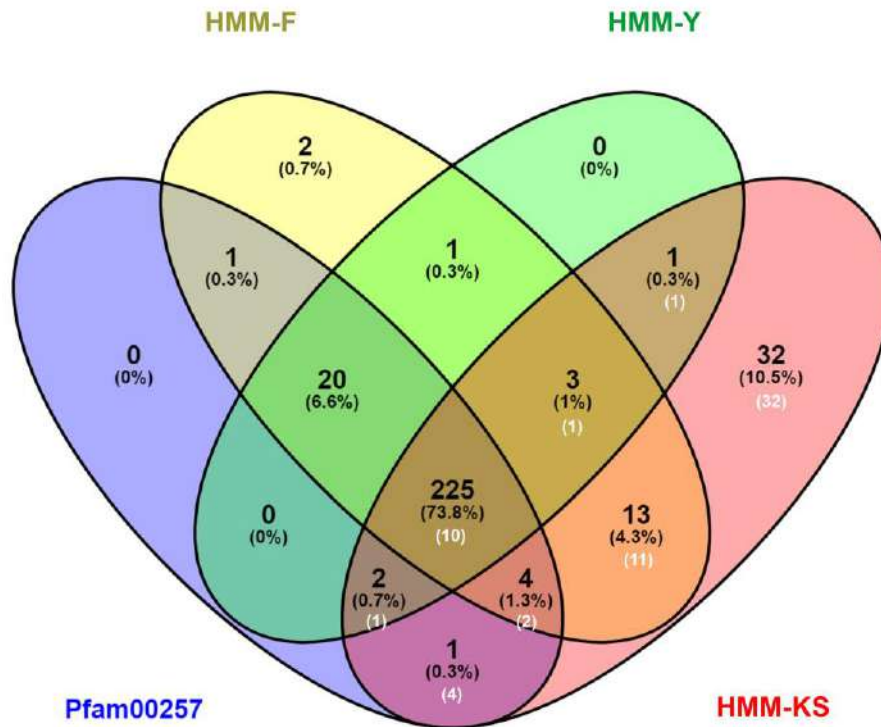


Figura 1.1. DHNs identificadas en los genomas del clado Viridiplantae por diferentes perfiles de HMM. Las secuencias recuperadas de los diferentes genomas usando los perfiles HMM-F, HMM-Y, HMM-KS y Pfam00257 se muestran mediante un diagrama de Venn. Los números blancos indican la cantidad de DHNs KS presentes en cada subconjunto.

2. Análisis de motivos conservados en las secuencias aminoacídicas de las DHNs

Para verificar la presencia de los motivos característicos de las DHNs (segmentos K, F e Y) y a fin de descubrir putativos motivos novedosos, se utilizó la herramienta MEME. (Para acceder a los resultados del MEME, ver <https://www.nature.com/articles/s41598-021-03066-5>).

2.1. Identificación de motivos aminoacídicos y clasificación estructural de las DHNs

Los motivos conservados y el número de DHNs en los subgrupos estructurales detectados se muestran en la **figura 1.2**. Por un lado, se confirmó la presencia del segmento K en 302 de 307 DHNs identificadas por búsqueda de homología basada en perfiles de HMM. El MEME no pudo reconocer el segmento K en solo unas pocas proteínas, todas pertenecientes a especies no angiospermas. Sin embargo, estas proteínas poseen un segmento K degenerado (menos conservado), y también presentan en sus secuencias otros motivos característicos de las

DHNs, indicando que se trata efectivamente de dehidrinas. Este es el caso, por ejemplo, de las DHNs de la lycophyta *S. moellendorffi* y la gimnosperma *Ginkgo biloba* (**Figura 1.3**).

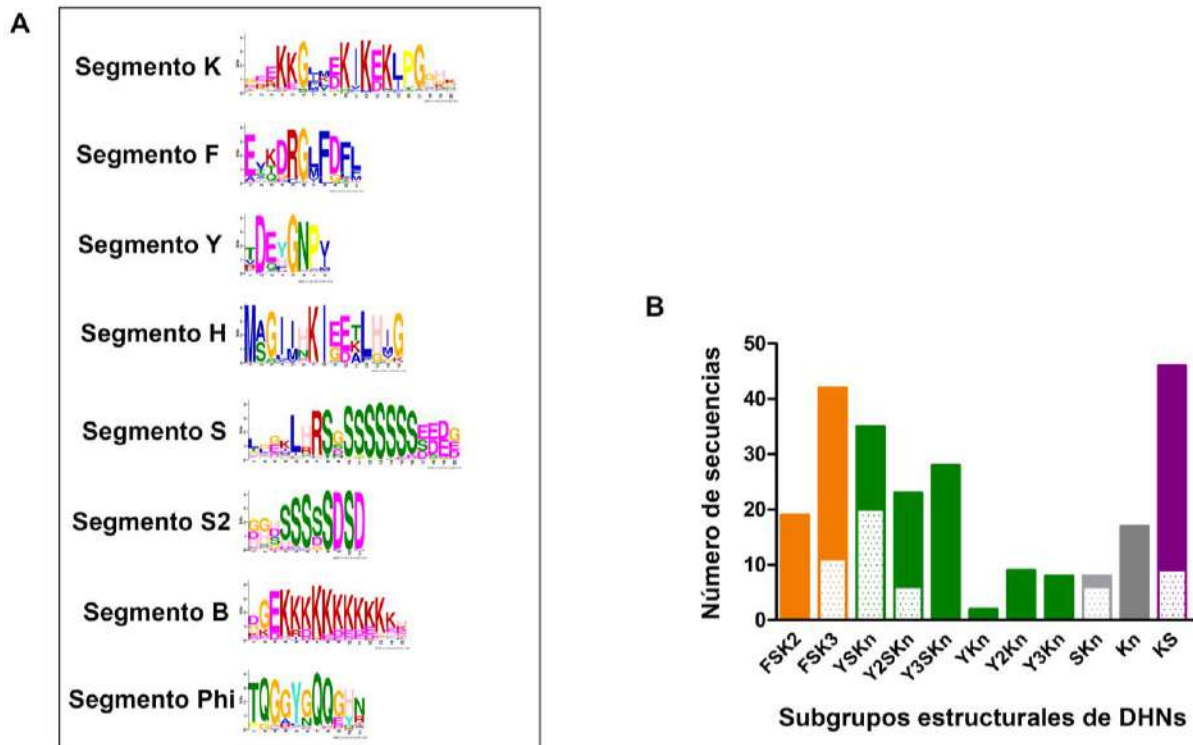


Figura 1.2. Identificación de los motivos aminoacídicos conservados y clasificación estructural de las DHNs. (A) Representación LOGO de los diferentes motivos conservados detectados por MEME. (B) Número de DHNs dentro de cada subgrupo estructural identificado. Todas las DHNs clasificadas pertenecen a 19 familias de angiospermas detalladas en la información suplementaria de Melgar and Zelada (2021). Los patrones punteado y liso indican especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas, respectivamente.

Por otro lado, se identificaron 75 DHNs que poseen un único segmento F localizado en la región amino-terminal de la proteína, las cuales fueron clasificadas dentro del subgrupo estructural FSKn. El segmento F predicho dentro de nuestra base de datos es similar al motivo descrito anteriormente por Strimbeck (2017) (**Figura 1.2 A**). Es importante destacar que aunque el perfil HMM-F falló en la identificación de DHNs FSKn en los genomas de 4 bryophytas y 1 lycophyta, estos fueron encontrados en 3 gimnospermas incluidas en este trabajo, *Picea abies*, *Picea glauca* y *G. biloba*, señalando que este grupo surgió en las espermatofitas (plantas con semilla). De acuerdo con observaciones previas (Sena et al., 2018), se registró una expansión del grupo FSKn dentro de la familia Pinaceae; mientras que en *G. biloba* se identificaron únicamente 3 DHNs, 2 con un segmento F (FSK2 y FK2) y 1 con estructura KS. En las angiospermas, el grupo FSKn está mayormente compuesto por proteínas FSK2 y FSK3. Interesantemente, en las monocotiledóneas y en la dicotiledónea basal *Nelumbo*

nucifera, así como en las angiospermas basales *A. trichopoda* y *N. colorata*, se encontraron exclusivamente DHNs FSK3 (**Figura 1.2 B; Figuras suplementarias 1.1 y 1.2**), sugiriendo que las DHNs FSK2 podrían haber surgido a partir de una forma ancestral de DHNs FSK3.

En cuanto al segmento Y, se hallaron 101 DHNs conteniendo de 1 a 3 copias del motivo por secuencia en la posición N-terminal, todas pertenecientes a angiospermas. La mayoría de las proteínas pertenecen al subgrupo YnSKn, mientras que las secuencias a las que les falta el segmento S (YnKn) representan únicamente el 15 %. Tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas se encontraron DHNs YSKn e Y2SKn, sin embargo, los subgrupos Y3SKn y las YnKn parecen estar restringidas solo a las dicotiledóneas (**Figura 1.2 B, Figuras suplementarias 1.3 a 1.5**). El segmento Phi detectado en nuestra base de datos corresponde a la región N-terminal del segmento GT definido previamente (Malik et al., 2017) y está altamente conservado en las YSKn de las monocotiledóneas.

También se identificaron 62 DHNs KS en los genomas analizados, de los cuales todos comparten un motivo en el extremo amino-terminal previamente no descrito, al cual denominamos segmento H. Llamativamente, el perfil HMM-KS pudo identificar DHNs KS en el genoma de la lycophyta *S. mollendorffi* y la gimnosperma *G. biloba*, pero no fueron identificadas DHNs de este subgrupo en las coníferas *P. abies* y *P. glauca*. Estas proteínas presentan un ordenamiento típico de los motivos KS, con un segmento K seguido de un tracto rico en lisinas (segmento B) y un segmento S característico de este subgrupo estructural (segmento S2) (**Figura 1.3**). Esta es la primera vez que las DHNs KS son identificadas en especies no angiospermas e indica que este grupo de DHNs surgió temprano durante la evolución en plantas terrestres.

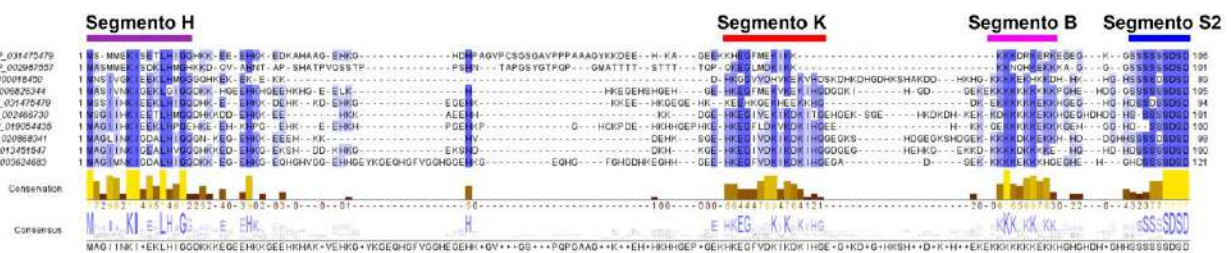


Figura 1.3. Conservación de las DHNs KS en plantas vasculares. Alineamiento múltiple de secuencias de DHNs KS (DHNs HKS) de angiospermas (*A. trichopoda*, *S. bicolor*, *N. nucifera*, *A. thaliana* y *M. truncatula*) y no angiospermas representativas (*S. moellendorffi* y *G. biloba*) desarrollado con el algoritmo T-Coffee y visualizado con Jalview. Se señalan los segmentos H, K, B y S.

En angiospermas, todas las especies analizadas poseen 1 o 2 DHNs KS, a excepción de *Glycine max* con 4 genes, *Solanum tuberosum* con 3 genes, y 2 especies de la familia Malpighiales, *Salix purpurea* y *Populus trichocarpa* con 6 y 3 genes, respectivamente. Las proteínas HK de estas especies Malpighiales son únicas debido a que contienen múltiples

repeticiones del segmento K intercaladas con secuencias ricas en glicina (segmento Phi) y el segmento S2 se encuentra ausente (**Figura suplementaria 1.6**).

Respecto a los subgrupos estructurales Kn y SKn, sus representaciones en plantas vasculares fueron menores, y en realidad, estos se encuentran relacionados filogenéticamente a otros subgrupos estructurales. Por el contrario, la mayor parte de las DHNs no vasculares que fueron identificadas en los genomas de los musgos de *P. patens* (6), *Ceratodon purpureus* (6), *Sphagnum fallax* (3) y la hepaticofita *Marchantia polymorpha* (3) pertenecen al subgrupo estructural Kn. Como excepciones se encuentran 2 DHNs atípicas que contienen múltiples motivos repetitivos que se asemejan al segmento Y, y 2 DHNs con estructura KS, todas presentes en *P. patens* (PpDHNA) (Saavedra et al., 2006) y *C. purpureus* (**Figura suplementaria 1.8**). Un análisis filogenético reveló la presencia de 5 grupos ortólogos en *P. patens* y *C. purpureus* (**Figuras suplementarias 1.7 y 1.8**), lo cual refleja la proximidad filogenética entre las familias Funariaceae y Ditrichaceae (Chang and Graham, 2014), mientras que las DHNs de *S. fallax* no se agruparon con los otros musgos. Las DHNs de la hepaticofita *Marchantia polymorpha* no muestran ninguna homología evidente con las DHNs de los musgos más allá del segmento K. La falta de sintenia no permite relacionar evolutivamente las dehidrinas de las plantas vasculares con las no vasculares.

2.2. Detección de un nuevo motivo conservado (segmento H) presente en todas las DHNs KS

El análisis con MEME identificó un motivo altamente conservado, no descrito previamente, en la región amino-terminal de todas las DHNs KS de las angiospermas analizadas. Este segmento de 15 residuos se caracteriza por poseer una combinación de aminoácidos hidrofóbicos, isoleucina (Ile) y leucina (Leu), y anfipáticos, lisina (Lys) y ácido glutámico (Glu); flanqueados por 2 glicinas (Gly) en las posiciones 3 y 15 con un grado de conservación del 91 % y 87 % en las DHNs KS, respectivamente (**Figura 1.2 A**). Tanto la Lys como la Ile tienen un alto grado de conservación (97 % ambas) en las posiciones centrales 7 y 8. Los residuos de Ile en las posiciones 4 y 5 son menos conservadas, y son frecuentemente reemplazadas por otros aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina, valina o metionina. Dos residuos de histidina (His) se encuentran en las posiciones 6 y 13, en el 56 % y 77 % de las DHNs KS, respectivamente. Las DHNs KS se caracterizan por sus secuencias enriquecidas en aminoácidos de His, como se refleja en el nombre HIRD11 para la DHN KS de *A. thaliana*, lo cual significa “dominio rico en histidinas de 11 kDa” por su sigla en inglés (Histidine-Rich Domain) (Hara et al., 2005). Dado que este novedoso motivo parece ser una marca distintiva de las DHNs KS, se propuso en este trabajo nombrarlo segmento H, para reflejar la particular naturaleza de este tipo de proteínas.

Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, del inglés intrinsically disordered proteins), como las dehidrinas, no tienen una estructura terciaria bien definida bajo condiciones nativas. Usando el software IUPred2A, se identificaron regiones desordenadas en DHNs KS (DHNs H) representativas de angiospermas (**Figura 1.4**). Resultó interesante que las regiones que se extienden a lo largo de los segmentos H y K correspondieran a las dos únicas regiones que muestran una tendencia reducida de desorden.

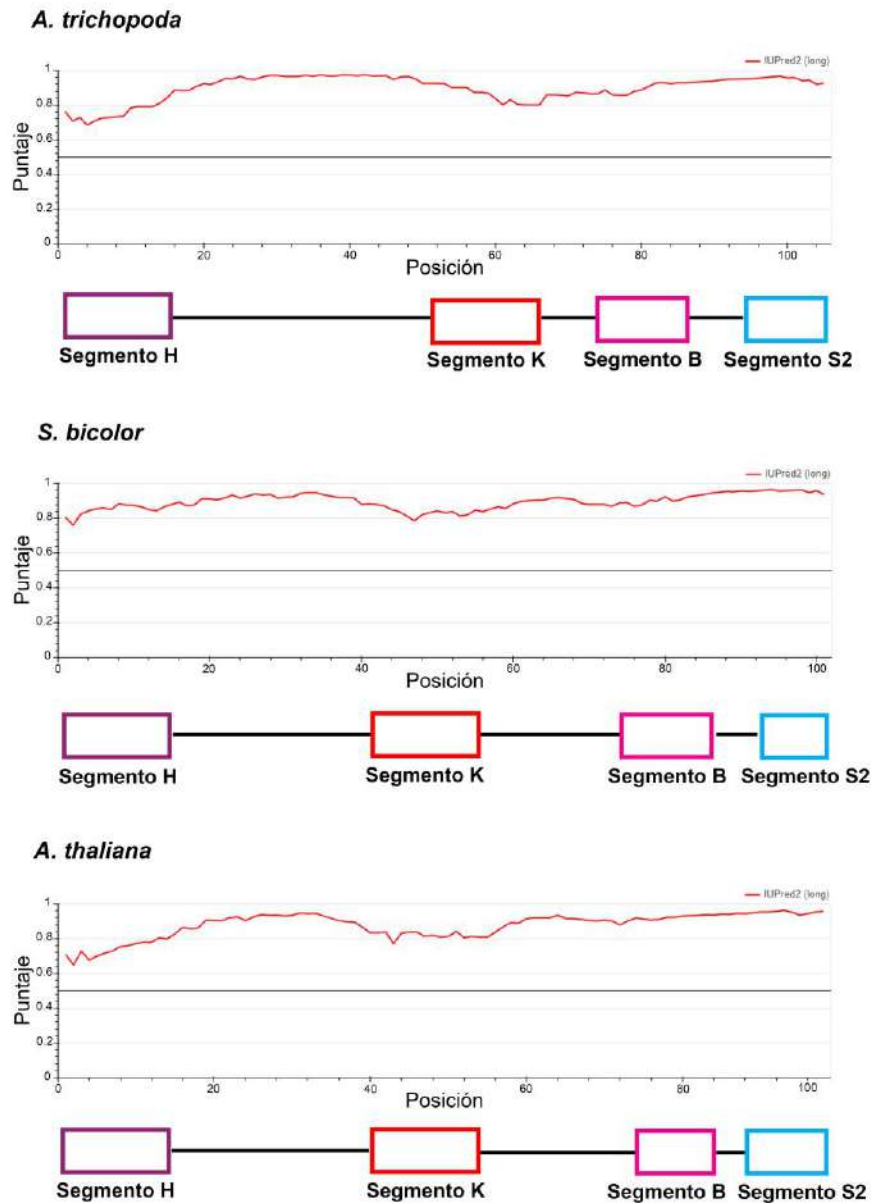


Figura 1.4. Predicción de desorden en DHNs H (KS) representativas de angiospermas. El desorden de las proteínas de *A. trichopoda*, *S. bicolor* y *A. thaliana* fue predicho usando el programa IUPred2A. Se señalan los segmentos H, K, B y S2.

Los segmentos K y S de las DHNs KS presentan algunas características particulares en comparación con las DHNs FSKn e YnSKn (**Figura 1.2 A; Figuras suplementarias 1.1 a 1.5 y 1.9**). Respecto al segmento K, la posición 13 está ocupada por Ile en casi todas DHNs KS, en lugar de la típica Lys presente en otras DHNs. Aunque la Ile y la Lys son aminoácidos generalmente conservados, existe evidencia de que estos residuos no son siempre intercambiables, afectando la afinidad y especificidad de las interacciones proteína-proteína y

proteína-membrana (Brosnan and Brosnan, 2006), lo cual podría potencialmente conducir a una diversificación funcional de las DHNs KS por modulación en el comportamiento del segmento K. En contraste a otras DHNs, aquellas con estructura KS no muestran una clara prevalencia de prolina en la posición 14, en su lugar, la His es el aminoácido más frecuente en esa posición. A pesar de estas diferencias, la estructura α -hélice predicha delimitada por los residuos conservados de Gly del segmento K se mantiene conservada en las DHNs KS (**Figura 1.4**).

En cuanto al segmento S, el cual se caracteriza por un tramo de residuos de serinas, existen diferencias en la longitud del tracto y de sus aminoácidos vecinos entre las DHNs KS y otras DHNs. El núcleo del motivo, formado por 6 a 9 residuos de serinas, generalmente termina con aminoácidos cargados negativamente, ácido aspártico o glutámico, en todos los subgrupos estructurales de DHNs. Por otro lado, la tríada Leu-His-Arg que precede al tracto de serinas, el cual es altamente conservado en todas las DHNs FSKn y en la mayoría de las YnSKn, no fue encontrada en las DHNs KS. En la **figura 1.2 A** se muestra la secuencia consenso del segmento S para las DHNs FSKn e YnSKn (segmento 1) y la encontrada para las DHNs KS (segmento S2). Se ha demostrado que el segmento S de todos los tipos de DHNs es un sitio blanco para la fosforilación por quinasas (Liu et al., 2017; Alsheikh et al., 2003; , Rahman et al., 2011), y las diferencias entre los segmentos S1 y S2 podrían resultar en diferentes especificidades de quinasas. Por ejemplo, la tríada Leu-His-Arg forma parte de la secuencia de reconocimiento para las quinasas SnRK2 (Vlad et al., 2008), las cuales se ha demostrado recientemente que fosforilan a las DHNs ERD14 y ERD10 (FSK2) de *A. thaliana* en respuesta a estrés osmótico (Maszkowska et al., 2019).

Un motivo rico en Lys de 11 residuos fue detectado consistentemente en todas las DHNs KS así como también en todas las DHNs FSK2 y en la mayoría de las DHNs FSK3 (**Figuras suplementarias 1.1, 1.2, y 1.9**). En las DHNs KS y FSKn, el motivo rico en Lys se encuentra localizado entre los segmentos S y K, mientras que en la misma posición las DHNs YKn e YSKn usualmente tienen una secuencia RRKK o RRKKK delimitada por residuos de gly, un motivo que se asemeja a las señales de localización monopartitas (Lange et al., 2007; Kosugi et al., 2009). En resumen, las DHNs KS pueden describirse mejor con una organización estructural H-K-S, siendo H el nuevo segmento detallado en este trabajo y presente exclusivamente en este grupo de DHNs.

3. Estudio filogenético de las DHNs de angiospermas

3.1. Definición de grupos ortólogos

Habiendo identificado los motivos que caracterizan al subgrupo estructural KS, se procedió a investigar las relaciones filogenéticas entre las DHNs identificadas. Se decidió utilizar únicamente DHNs de angiospermas para construir un árbol filogenético debido al escaso muestreo de otras DHNs de plantas terrestres, y por la dificultad inherente de alinear secuencias de especies más distantes, las cuales tienen estructuras de dominios más

divergentes. Se utilizó el principio de máxima verosimilitud con la herramienta IQ-TREE y la robustez estadística fue estimada con el método de bootstrap.

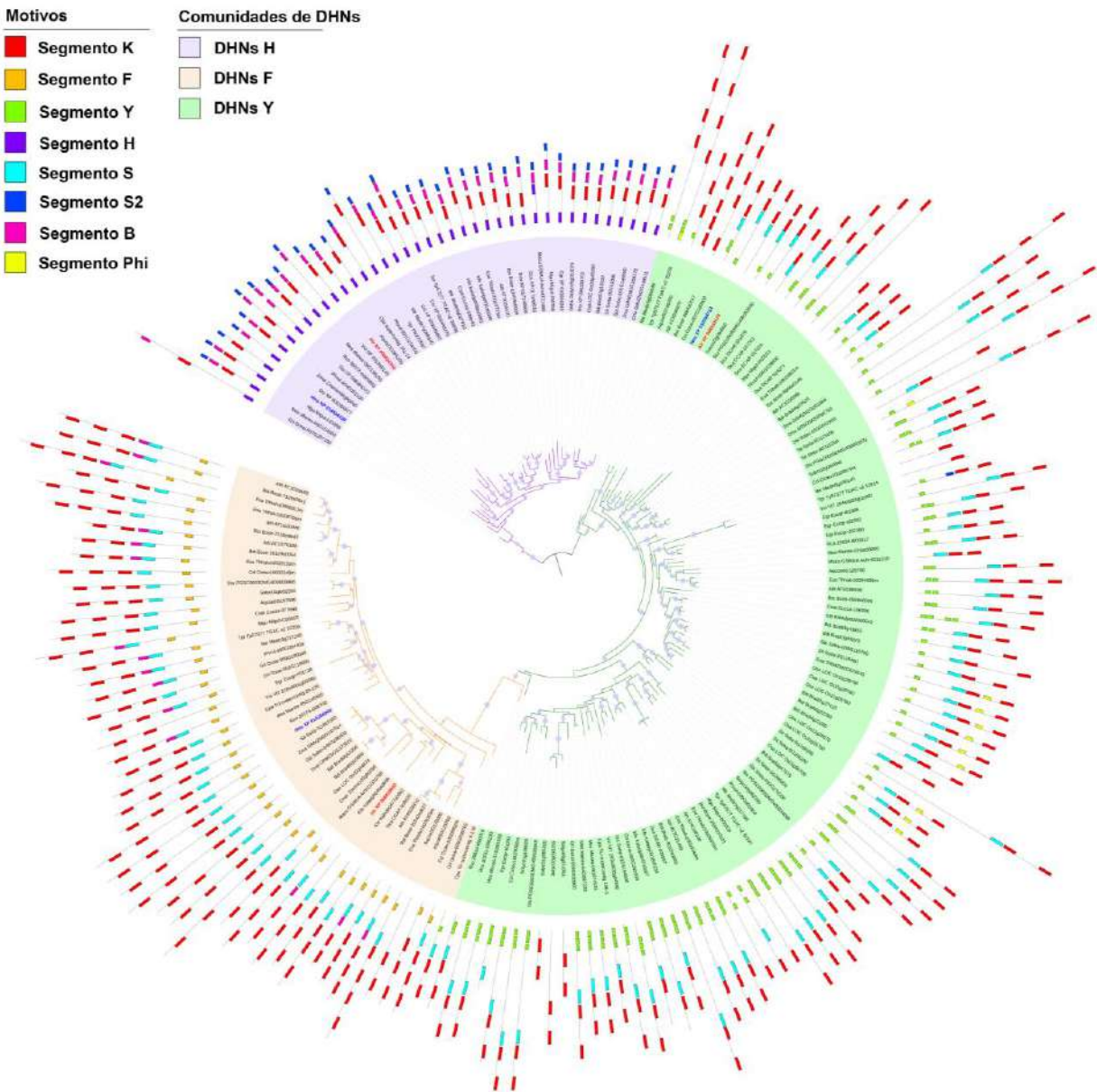


Figura 1.5. Árbol filogenético sin raíz de las secuencias aminoacídicas de las DHNs de angiospermas. Las secuencias fueron alineadas y una reconstrucción aproximada de máxima verosimilitud de las relaciones filogenéticas fue generada usando la herramienta IQ-TREE. Las ramas con soporte de bootstrap superior al 90 % son indicadas con puntos de color violeta. Los motivos de cada proteína se señalan con cajas de color, como se indica. Las DHNs de *A. trichopoda* y *N. nucifera* están marcadas con color rojo y azul, respectivamente.

Se obtuvo como resultado un árbol que posee una organización a grandes rasgos de tres ramas o grupos. Todas las DHNs KS, caracterizadas por la presencia del segmento H (DHNs H), fueron agrupadas juntas en una rama con alto soporte de bootstrap (100 %). Las otras DHNs fueron separadas en dos ramas, una que contiene a las DHNs que portan el segmento F en su mayoría (FSKn), mientras que la otra posee las DHNs que llevan el segmento Y (YnSKn, YnKn). Resultó interesante que las DHNs que contienen únicamente el segmento K o una combinación de los segmentos S y K fueron ubicadas dentro de las ramas F o Y, y no en una rama aparte, sugiriendo que dentro de las DHNs K o SK encontramos dos grupos distintos, uno con mayor similitud a las DHNs Y y otro a las DHNs F. En resumen, el árbol filogenético sugiere que las DHNs de angiospermas forman parte de tres grupos filogenéticos distintos, a los que denominamos DHN-H, DHN-Y y DHN-F. Esta conclusión se ve reforzada por lo observado en posiciones filogenéticas claves. Por ejemplo, *Amborella trichopoda* que pertenece a un grupo hermano al resto de las angiospermas (una angiosperma “basal”), posee tres DHNs, cada una perteneciente a los grupos H, F o Y. De la misma manera, las tres DHNs de *Nelumbo nucifera*, especie que corresponde a un grupo hermano de todas las dicotiledóneas, son también ubicadas dentro los grupos H, F e Y. A modo general, los resultados filogenéticos sugieren que estos tres grupos de DHNs estuvieron presentes desde el comienzo de la evolución de las angiospermas (**Figura 1.5**).

3.2. Análisis de microsintenia

Aunque el árbol filogenético descrito arriba separa las DHNs de angiospermas en tres grupos, la gran cantidad de motivos diferentes y sus disposiciones divergentes en las DHNs, hace que las secuencias sean difíciles de alinear y reduce la certeza de la reconstrucción filogenética. Dado que los análisis de sintenia de los genes ortólogos pueden dar pistas importantes sobre la evolución de los genomas y las familias génicas (Jiao et al., 2014), se desarrolló un análisis de entorno genómico (microsintenia) de los genes codificantes de DHNs para reforzar los resultados filogenéticos obtenidos.

Recientemente, en el trabajo de Artur et al (2019) analizaron los genes correspondientes a DHNs sobre el genoma de varias especies vegetales e identificaron dos bloques (o comunidades) principales de sintenia en angiospermas, correspondientes a DHNs que contienen los motivos F (comunidad 1) e Y (comunidad 2). El análisis, sin embargo, no incluyó DHNs del grupo KS, probablemente debido a la dificultad para recuperar esas secuencias usando el perfil de Pfam00257. Para verificar si las DHNs que contienen el segmento H también forman parte de una comunidad sinténica, se compararon 40 genes alrededor de la única DHN H de la angiosperma basal *A. trichopoda* con los entornos genómicos de las DHN H de las siguientes especies: la nenúfar *Nymphaea colorata* (Zhang et al., 2020), la dicotiledónea basal *N. nucifera* (Ming et al., 2013), la leguminosa *Medicago truncatula* (Burks et al., 2018), la planta modelo *A. thaliana* (HIRD11) (Hara et al., 2011) y la monocotiledónea *Sorghum bicolor* (McCormick et al., 2018). Todas estas especies poseen un solo gen codificante de la DHN H, excepto por *M. truncatula* la cual contiene dos copias parálogas (ver <https://www.nature.com/articles/s41598-021-03066-5>). Se seleccionó *A. trichopoda* como especie base para la comparación sinténica debido a que esta planta con flores pertenece a un

linaje hermano de todas las demás angiospermas (Amborellales), no sufrió duplicaciones del genoma completo que si afectaron a otros linajes y su genoma muestra sintenia conservada con otras angiospermas (Amborella Genome Project, 2013; Seader et al., 2016). Como se muestra en la **figura 1.6**, 17 genes circundantes a la DHN H de *A. trichopoda* (LOC18421535) están también presentes alrededor del gen codificante de la DHN H de *N. colorata*, especie perteneciente al orden Nymphaeales el cual es un linaje hermano a todas las angiospermas, excepto por Amborellales (Soltis et al., 2009). Por otro lado, un número menor de genes conservados están presentes alrededor de los genes correspondientes a las DHNs H de *N. nucifera*, *A. thaliana*, *M. truncatula* y *S. bicolor* (**Figura 1.6**). La microsintenia de los genes de las DHNs H de otras angiospermas también se encuentra conservada (datos no presentados). Además, las DHNs H poseen dos exones, con toda la región codificante contenida dentro del primer exón y el segundo exón sin codificación, mientras que las DHNs F e Y suelen tener dos exones codificantes (datos no presentados). La estructura conservada exón-intrón también apunta a un origen común de las DHNs H. En conclusión, la microsintenia de los genes codificantes de las DHNs H está conservada en angiospermas, evidenciando su ortología y su origen evolutivo común.

Además del gen de la DHN H, el genoma de *A. trichopoda* contiene otros dos genes codificantes de DHNs (LOC18424350 y LOC18426770). Como se mencionó anteriormente, en nuestro árbol filogenético, el locus 18424350 fue agrupado junto con las DHNs F y el locus 18426770 con las DHNs Y (**Figura 1.5**). Curiosamente, los motivos F e Y de estas proteínas son bastante degenerados y no son fácilmente reconocidos por el software MEME. Una comparación de los entornos genómicos de los locus 18424350 y 18426770 de *A. trichopoda* con las DHNs F e Y de *N. colorata* y *N. nucifera*, las cuales tienen también únicamente tres DHNs, mostró una conservación de microsintenia alrededor de estos genes (**Tabla suplementaria 1.1**), confirmando que los locus 18424350 y 18426770 de *A. trichopoda* pertenecen a las comunidades sinténicas F e Y, respectivamente.

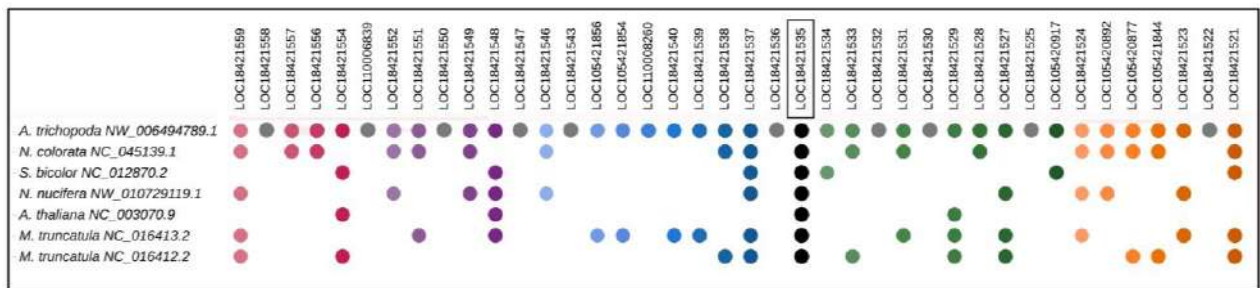


Figura 1.6. Análisis de microsintenia de los genes codificante de las DHNs H. El entorno genómico de la DHN H de *A. trichopoda* (LOC18421535) es comparada con las otras angiospermas. Las DHNs H son indicadas con círculos negros y los colores indican genes homólogos presentes en las otras especies. Los círculos grises indican genes presentes únicamente en *A. trichopoda*.

En resumen, es evidente que los genes de las DHNs de las angiospermas pueden dividirse generalmente en tres comunidades sinténicas, cada una caracterizada, entre otras cosas, por la presencia de los motivos H, F o Y. Se propuso que estos grupos ortólogos se llamen dehidrinas F (comunidad 1), dehidrinas Y (comunidad 2) y dehidrinas H (comunidad H). La presencia de únicamente tres genes de DHNs en los genomas de plantas pertenecientes a grupos que divergieron temprano durante la evolución de las angiospermas, como *A. trichopoda* y *N. colorata*, o temprano en la evolución de las dicotiledóneas, como *N. nucifera*, sugiere que los genomas de las primeras plantas con flor tenían una DHN de cada comunidad. Las posteriores duplicaciones del genomas completo en dicotiledóneas y monocotiledóneas aumentaron considerablemente el repertorio de estos genes, especialmente de aquellos codificantes para las dehidrinas F e Y.

4. Propiedades bioquímicas de los grupos ortólogos de las DHNs

Se compararon las propiedades bioquímicas y biofísicas de las DHNs de las angiospermas pertenecientes a los grupos ortólogos H, F e Y, tales como el peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI), así como parámetros relacionados al carácter hidrofílico de las proteínas.

Cada grupo ortólogo posee una distribución diferente del PM, con una mediana estadística característica. Las DHNs H son las dehidrinas más pequeñas con el rango más estrecho del PM (de 10 a 16 kDa), lo cual refleja que el número de residuos y las estructuras de los dominios son relativamente constantes en este grupo. Las DHNs F también tienen una distribución compacta del PM (de 18 a 35 kDa), mientras que las DHNs Y presentan un subgrupo principal de proteínas con un PM de 10 a 25 kDa y un número menor de DHNs con más de 30 kDa pertenecientes a las monocotiledóneas (**Figura 1.7 A**). Los altos valores de PM de este último subgrupo no se deben a un mayor número de dominios conservados Y o K, sino a la presencia de largas regiones ricas en Gly (**Figuras suplementarias 1.3 y 1.5**).

La mayoría de las DHNs H poseen valores ácidos de pI, aunque en algunas especies se encontraron isoformas neutrales y básicas. Las DHNs F tienen un perfil ácido muy homogéneo del pI, con una distribución unimodal entre 5 y 6. Por el contrario, las DHNs Y muestran una distribución bimodal que consiste en dos subgrupos principales con valores ácidos y básicos, y un subgrupo más pequeño con valores de pI más cercanos a la neutralidad (**Figura 1.7 B**). No se observó correlación entre el pI bimodal y el número de ninguno de los segmentos conservados de las DHNs, como así tampoco con el porcentaje de glicina de cada proteína.

En cuanto al contenido de glicina, tanto las DHNs F como H presentan una distribución compacta y homogénea del porcentaje de residuos de glicina. Las DHNs con el porcentaje de glicina más bajo (alrededor del 10 %) son las DHNs F (**Figura 1.7 C**). Resulta interesante que las DHNs del subgrupo estructural FSK3 se caracterizan por la presencia de muchos trectos de prolina, lo cual podría significar un papel equivalente a las glicinas en términos de ruptura en la estructura de las proteínas (**Figura suplementaria 1.2**). En las DHNs Y se observa una mayor dispersión en el porcentaje de los residuos de glicina (5 a 35 %) (**Figura 1.7 C**).

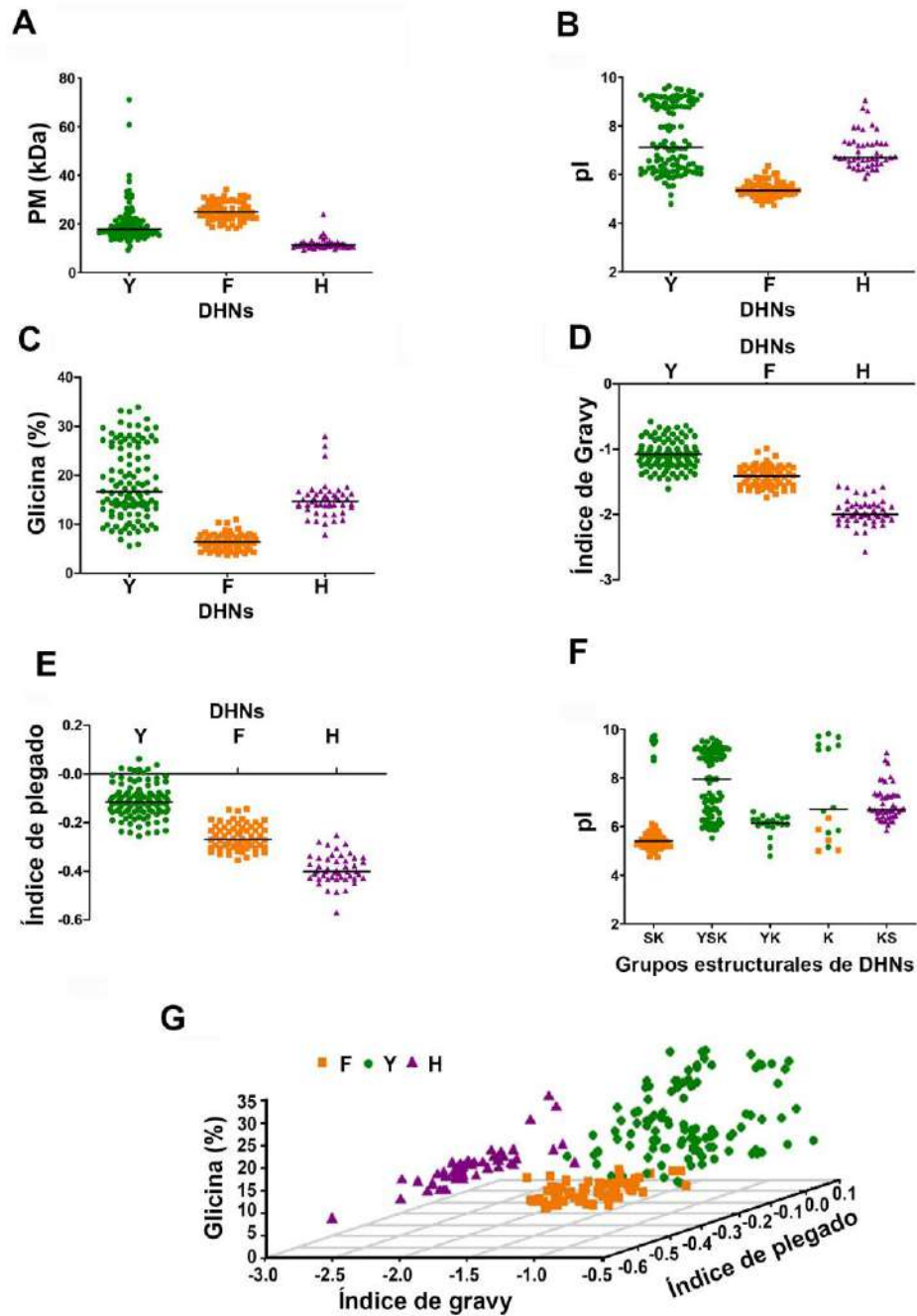


Figura 1.7. Distribución de las propiedades bioquímicas y biofísicas de las DHNs de las angiospermas. Los gráficos de dispersión muestran la distribución del peso molecular (a), del punto isoeléctrico (b y f), del contenido de glicina (c), del índice de GRAVY (d), el índice de plegado (e), y el contenido de glicina, GRAVY e índice de plegado simultáneamente (g) en los subgrupos ortólogos o estructurales de las DHNs. Los grupos ortólogos Y, F y H se indican con el código de color verde, naranja y violeta, respectivamente.

Todas las DHNs poseen un índice de GRAVY negativo, lo cual evidencia la característica hidrofílica de estas proteínas. Las DHNs Y son las proteínas menos hidrofílicas, mientras que las DHNs H son las más hidrofílicas, con valores de GRAVY entre -2,8 y -1,3. Las DHNs H atípicas de *S. purpurea* y *P. trichocarpa* (Malpighiales) son las proteínas menos hidrofílicas en este grupo, con un índice alrededor de -1,3. Las DHNs F poseen un rango intermedio de valores que solapa con los otros grupos (**Figura 1.7 D**). El índice de plegado también fue evaluado para las DHNs utilizando el programa FoldIndex (Prilusky et al., 2005). Este índice muestra en las DHNs una distribución similar al GRAVY, siendo las DHNs H las proteínas más desestructuradas, mientras que las DHNs F e Y tienen una estructura menos desordenada (**Figura 1.7 E**).

Cuando se analizó la distribución del pI en los cinco subgrupos estructurales tradicionales, notamos que el carácter bimodal observado en las DHNs con arquitectura SK y K correlaciona fuertemente con su origen evolutivo. En consecuencia, cinco de las DHNs K que presentan pI ácido son DHNs F, mientras que todas las DHNs SK y K con altos valores de pI pertenecen al grupo ortólogo de las DHNs Y (**Figuras 1.7 B y F**). Lo mismo se puede deducir de otras características (**Figura suplementaria 1.10**), sugiriendo que los grupos ortólogos son mejores indicadores de las propiedades fisicoquímicas de las DHNs que los subgrupos estructurales. Esto pone en evidencia que las regiones por fuera de los dominios conservados H, F e Y también aportan características propias a las dehidrinas pertenecientes a los distintos grupos de ortología.

Resumidamente, en términos generales, las características bioquímicas y biofísicas de las DHNs correlaciona bien con los tres grupos ortólogos (**Figura 1.7 G**). Dado que estas propiedades están probablemente relacionadas con la función de las DHNs, esto sugiere que los estudios funcionales deberían tomar en cuenta el marco filogenético descrito en este trabajo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este capítulo se presentó un marco filogenético que clarifica las relaciones de las DHNs, especialmente en angiospermas. Los puntos principales a resaltar son los siguientes: 1) las búsquedas de las dehidrinas en bases de datos genómicas de plantas debe realizarse con una combinación de perfiles HMM específicos de subgrupos estructurales para recuperar todos los tipos de DHNs; 2) las DHNs KS poseen un dominio estructural conservado nuevo, presente en el extremo amino-terminal, denominado dominio H; 3) los análisis filogenético y de sintenia muestran que todas las DHNs de angiospermas pueden subdividirse en tres grupos ortólogos, que correlacionan con la presencia de los dominios H, F o Y; 4) las DHNs tipo K y SK pueden pertenecer a distintos grupos de ortología 5) las características bioquímicas y fisicoquímicas de las DHNs correlacionan con los grupos ortólogos, indicando que el origen evolutivo de las DHNs debería tomarse en cuenta al momento de estudiar sus funciones

La reconstrucción de la evolución de las DHNs es una tarea compleja, debido a la naturaleza modular de estas proteínas, caracterizadas por la presencia de segmentos conservados cortos rodeados por secuencias menos conservadas. Por lo tanto, la combinación de la reconstrucción filogenética con los análisis de microsintenia fue crucial para determinar las relaciones evolutivas entre las DHNs. Las DHNs de angiospermas se dividen en tres grupos ortólogos (DHNs H, DHNs F y DHNs Y), las cuales pueden, en la mayoría de los casos, ser reconocidas rápidamente por la presencia de los segmentos H, F o Y. Todas las angiospermas analizadas en este trabajo poseen al menos un miembro de cada grupo ortólogo, incluyendo a *A. trichopoda* y *N. colorata*, especies pertenecientes a grupos hermanos del resto de las angiospermas, sugiriendo que las primeras angiospermas tuvieron genes codificantes de los tres tipos de DHNs. Los análisis de sintenia no pudieron extenderse a otras especies más allá de las angiospermas debido a que la tasa de pérdida sinténica en las plantas es muy rápida (Jiao et al., 2014; Zhao and Schranz, 2019).

Resultó interesante observar que las DHNs H tienen dos exones, con la región codificante completa dentro del exón 1, por lo que esta estructura exón-intrón también apunta a un origen común de estas proteínas. Se ha descrito que los intrones de los genes codificantes de las dehidrinas están frecuentemente presentes dentro de la región que codifica el segmento S (Jiménez-Bremont et al., 2013). Curiosamente, el segmento S2 de las DHNs H está localizado en el extremo C-terminal de la proteína, y el intrón se encuentra cercano al codón stop del exón 1.

Por otro lado, los análisis realizados indicaron que las DHNs H, F e Y son claramente diferenciadas unas de otras en propiedades que caracterizan a las proteínas hidrofílicas e intrínsecamente desordenadas (IDPs). Todos los subgrupos estructurales K y SK en realidad pertenecen a los grupos sinténicos F o Y, indicando que la clasificación basada solamente en la composición de los segmentos termina agrupando DHNs con propiedades fisicoquímicas muy diferentes (Malik et al., 2017).

Es importante destacar que la diversidad que poseen las DHNs no se encuentra incluida en el modelo HMM usualmente utilizado para la búsqueda de los genes de DHNs (Pfam00257). En este trabajo demostramos que la mayoría de las DHNs H no son reconocidas por este modelo, y hemos verificado la subestimación en la identificación de DHNs en los genomas completos de algunas plantas (Jing et al., 2016; Nagaraju et al., 2018; Artur et al., 2019). En el reciente trabajo de Artur et al (2019), la subestimación de las DHNs KS llevó a la definición de únicamente dos grupos de genes ortólogos (DHNs F e Y) en angiospermas, perdiendo la existencia de un tercer grupo (DHNs H). Los análisis de *genome-wide* de las DHNs también se llevaron a cabo utilizando la herramienta de Blastp, estos trabajos no fueron capaces de detectar genes ortólogos distantes como las DHNs H de *S. mollendorffi* y de *G. biloba* (Malik et al., 2017; Riley et al., 2019). En vista de esto, se propuso que los estudios que tengan como propósito la identificación de DHNs deberían usar perfiles de HMM basados en DHNs H, F e Y por separados, a fin de poder identificar a todos los miembros de esta familia de proteínas.

Sin dudas, un punto muy importante de este trabajo consistió en demostrar que las DHNs KS poseen un motivo novedoso al que denominamos segmento H, debido a la presencia de dos residuos conservados de His. Este segmento está siempre localizado en el extremo N-terminal de las proteínas, con lo cual, las DHNs KS pueden describirse de acuerdo a una organización H-K-S de los motivos. Como se mencionó anteriormente, los análisis de filogenia y sintenia indican que las DHNs-H de las angiospermas están todas evolutivamente relacionadas. La presencia de DHNs con una organización H-K-S distintiva en *S. moellendorffi* y *G. biloba* muestra que las DHNs H aparecieron en la evolución temprana de las traqueofitas (plantas vasculares). Aunque algunas DHNs KS han sido descritas antes, este trabajo es el primero, a nuestro entender, en proveer una descripción completa de este grupo de DHNs.

Por otra parte, existe evidencia que demuestra que las dehidrasas son proteínas intrínsecamente desordenadas en solución, pero que son capaces de adoptar estructura cuando se unen a ciertos ligandos (Graether and Boddington, 2014). Nuestros análisis indican que los segmentos H y K presentes en las DHNs H de angiospermas corresponden con regiones de desorden reducido. Por otro lado, una predicción estructural de las DHNs de *A. thaliana* y *Z. mays*, obtenidas de la base de datos AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (Jumper et al., 2021) indica con baja confianza la presencia de alfa-hélices a lo largo de ambos motivos. Esto no significa que el dominio H posea una estructura helicoidal en condiciones nativas, sino que podría sugerir que esta región es capaz de formar alfa-hélices de forma transitoria en presencia de ligandos, tal como se demostró para el segmento K (Hughes and Graether, 2011; Koag et al., 2009).

El mejor miembro estudiado del grupo de las DHNs H es la proteína HIRD11 de *A. thaliana*. Esta dehidrasa se expresa de forma ubicua, con niveles relativamente altos en flores (Hara et al., 2011). AtHIRD11 se une a iones de metal y puede proteger a las proteínas del daño por metales pesados (Hara et al., 2011; Hara et al., 2016), así como reducir la generación de radicales libres (Hara et al., 2013). Yokoyama et al. (2020) recientemente mostró que los segmentos K y H (llamados K y NK1, respectivamente) de AtHIRD11 pueden proteger a las proteínas del daño por congelamiento con eficiencias similares. En consecuencia, los

segmentos K y H podrían tener roles redundantes en la actividad de las DHNs H. Se ha reportado que las DHNs pueden unirse a iones de metal *in vitro* a través de motivos ricos en histidina (Hara et al., 2005), así como una función en la localización nuclear de un tracto atípico de histidinas en la DHN SK3 de *Opuntia streptacantha* (Hernández-Sánchez et al., 2015). Aunque estos motivos ricos en histidina no se corresponden con el dominio H, será interesante evaluar las implicancias funcionales de los residuos de histidina en el segmento H en el futuro.

En conclusión, consideramos que la clasificación de las DHNs de angiospermas en tres grupos ortólogos, como se propuso en este trabajo, refleja mejor la diversidad de las dehidras y debería complementar la clasificación tradicional de seis subgrupos estructurales en el estudio de la función de estas proteínas.

Páginas 46 a 144 eliminadas a pedido del autor

BIBLIOGRAFÍA

- Abedini, R., GhaneGolmohammadi, F., PishkamRad, R., Pourabed, E., Jafarnezhad, A., Shobbar, Z. S., & Shahbazi, M. (2017). Plant dehydrins: shedding light on structure and expression patterns of dehydrin gene family in barley. *Journal of Plant Research*, 130(4), 747–763. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0941-5>
- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., & Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232(4751), 738–743. <https://doi.org/10.1126/science.3457472>
- Adhikary, D., Khatri-Chhetri, U., Tymm, F. J. M., Murch, S. J., & Deyholos, M. K. (2019). A virus-induced gene-silencing system for functional genetics in a betalainic species, *Amaranthus tricolor* (Amaranthaceae). *Applications in Plant Sciences*, 7(2), 1–9. <https://doi.org/10.1002/aps3.1221>
- Adolf, V. I., Shabala, S., Andersen, M. N., Razzaghi, F., & Jacobsen, S. E. (2012). Varietal differences of quinoa's tolerance to saline conditions. *Plant and Soil*, 357(1), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1133-7>
- Adolf, V. I., Jacobsen, S. E., & Shabala, S. (2013). Salt tolerance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Environmental and Experimental Botany*, 92, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.07.004>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Alsheikh, M. K., Heyen, B. J., & Randall, S. K. (2003). Ion Binding Properties of the Dehydrin ERD14 Are Dependent upon Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 40882–40889. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307151200>
- Álvarez-Venegas, R., Zhang, Y., & Tulsieram, L. (2010). Floración sin Vernalización en Canola de Invierno (*Brassica napus*): uso del silenciamiento inducido por virus (VIGS) para acelerar la ganancia genética Flowering Without Vernalization in Winter Canola (*Brassica napus*). *Revista Electrónica Nova Scientia*, 3, 29–50.
- Amborella Genome Project (2013). The Amborella genome and the evolution of flowering plants. *Science* (New York, N.Y.), 342(6165), 1241089. <https://doi.org/10.1126/science.1241089>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(February 2004), 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Von Heijne, G., Elofsson, A., & Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance*, 2(5), 1–14. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>
- Artur, M. A. S., Zhao, T., Ligterink, W., Schranz, E., & Hilhorst, H. W. M. (2019). Dissecting the genomic diversification of late embryogenesis abundant (LEA) protein gene families in plants. *Genome Biology and Evolution*, 11(2), 459–471. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy248>

- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. In *Physiologia Plantarum* (Vol. 85, Issue 2, pp. 235–241). <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x>
- Asada, K., Foyer, C.H., & Mullineaux, P.M. (2019). Production and Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bailey, T. L., & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 2, 28–36.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2), 1–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., & Noble, W. S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), 6–24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
- Baulcombe, D. C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(2), 109–113. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80022-3)
- Beachy, R. N. (1997). Mechanisms and applications of transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 215–220.
- Behringer, C., & Schwechheimer, C. (2015). B-GATA transcription factors – Insights into their structure, regulation, and role in plant development. *Frontiers in Plant Science*, 6(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00090>
- Bekele, D., Tesfaye, K., & Fikre, A. (2019). Applications of Virus Induced Gene Silencing (VIGS) in Plant Functional Genomics Studies. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 07(01), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000229>
- Biłas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., & Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(2), 269–287. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1057-7>
- Boas, L. V. V., Brandão, I. R., Da Silva, D. M., De Oliveira Santos, M., De Souza, K. R. D., & Alves, J. D. (2016). Antioxidant metabolism of *Chenopodium quinoa* Willd. Under salt stress. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 11(4), 281–288. <https://doi.org/10.5039/agraria.v11i4a5394>
- Boddington, K. F., & Graether, S. P. (2019). Binding of a *Vitis riparia* dehydrin to DNA. *Plant Science*, 287(March), 110172. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110172>
- Bodén, M., & Hawkins, J. (2005). Prediction of subcellular localization using sequence-biased recurrent networks. *Bioinformatics*, 21(10), 2279–2286. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti372>

- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Briesemeister, S., Rahnenführer, J., & Kohlbacher, O. (2010). Going from where to why-interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics*, 26(9), 1232–1238. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq115>
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A. M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D. C., Baker, B., & Jones, J. D. G. (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant Journal*, 39(2), 264–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02122.x>
- Brini, F., Hanin, M., Lumberras, V., Irar, S., Pagès, M., & Masmoudi, K. (2007). Functional characterization of DHN-5, a dehydrin showing a differential phosphorylation pattern in two Tunisian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties with marked differences in salt and drought tolerance. *Plant Science*, 172(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.07.011>
- Burch-Smith, T. M., Anderson, J. C., Martin, G. B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant Journal*, 39(5), 734–746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02158.x>
- Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Liu, Y., & Dinesh-Kumar, S. P. (2006). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142(1), 21–27. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084624>
- Burks, D., Azad, R., Wen, J., & Dickstein, R. (2018). Chapter 3. 1822. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8633-0>
- Burrieza, H. P., Koyro, H. W., Tosar, L. M., Kobayashi, K., & Maldonado, S. (2012). High salinity induces dehydrin accumulation in *Chenopodium quinoa* Willd. cv. Hualhuas embryos. *Plant and Soil*, 354(1–2), 69–79. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1045-y>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cai, Z. Q., & Gao, Q. (2020). Comparative physiological and biochemical mechanisms of salt tolerance in five contrasting highland quinoa cultivars. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2279-8>
- Cao, Y., Xiang, X., Geng, M., You, Q., & Huang, X. (2017). Effect of HbDHN1 and HbDHN2 genes on abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00470>
- Carthew, R. W. (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(2), 244–248. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00204-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00204-0)
- Casson, S. A., Franklin, K. A., Gray, J. E., Grierson, C. S., Whitelam, G. C., & Hetherington, A. M. (2009). phytochrome B and PIF4 Regulate Stomatal Development in Response to Light Quantity. *Current Biology*, 19(3), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.046>
- Castillon, A., Shen, H., & Huq, E. (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science*, 12(11), 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.001>

Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(9), 1482–1495. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.02.010>

Chang, Y., & Graham, S. W. (2014). Patterns of clade support across the major lineages of moss phylogeny. *Cladistics*, 30(6), 590–606. <https://doi.org/10.1111/cla.12066>

Chauhan, P., Singla, K., Rajbhar, M., Singh, A., Das, N., & Kumar, K. (2019). A systematic review of conventional and advanced approaches for the control of plant viruses. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(4), 89–98. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70414>

Choi, Y. S., Kim, Y. M., Hwang, O. J., Han, Y. J., Kim, S. Y., & Kim, J. II. (2013). Overexpression of Arabidopsis ABF3 gene confers enhanced tolerance to drought and heat stress in creeping bentgrass. *Plant Biotechnology Reports*, 7(2), 165–173. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0245-0>

Close, T. J. (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97(4), 795–803. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.970422.x>

Close, T. J., Kortt, A. A., & Chandler, P. M. (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology*, 13(1), 95–108. <https://doi.org/10.1007/BF00027338>

Corpas, F. J., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Barroso, J. B., & del Río, L. A. (2008). Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(13), 1319–1330. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.004>

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101(5), 543–553. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80864-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80864-8)

Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., & Sarhan, F. (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*, 10(4), 623–638. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.4.623>

Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5783), 68–71. <https://doi.org/10.1126/science.1128214>

Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330–335. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078204>

DePamphilis, C. W., Palmer, J. D., Rounsley, S., Sankoff, D., Schuster, S. C., Ammiraju, J. S. S., Barbazuk, W. B., Chamala, S., Chanderbali, A. S., Determann, R., Hong, M., Ralph, P., Talag, J., Tomsho, L., Walts, B., Wanke, S., Wing, R. A., Chang, T. H., Lan, T., ... Soltis, P. S. (2013). The Amborella genome and the evolution of flowering plants. *Science*, 342(6165). <https://doi.org/10.1126/science.1241089>

Diplock, A.T., Machlin, L.J., Packer, L., & Pryor, W.A. (1989). Vitamin E: Biochemistry and Health Implications.

Doherty, C. J., Van Buskirk, H. A., Myers, S. J., & Thomashow, M. F. (2009). Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21(3), 972–984. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063958>

- Dong, L., Ravelombola, W., Weng, Y., Qin, J., Zhou, W., Bhattarai, G., Zia, B., Yang, W., Shi, L., Mou, B., & Shi, A. (2019). Change in Chlorophyll Content over Time Well-differentiated Salt-tolerant, Moderately Salt-tolerant, and Salt-susceptible Cowpea Genotypes. *HortScience*, 54(9), 1477–1484. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13889-19>
- Dosztányi, Z. (2018). Prediction of protein disorder based on IUPred. *Protein Science*, 27(1), 331–340. <https://doi.org/10.1002/pro.3334>
- Dure, L. (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*, 3(3), 363–369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-19-00999.x>
- Eddy, S. R. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*, 14(9), 755–763. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.755>
- Ekgren, S. K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P., & Martin, G. B. (2003). Two MARK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant Journal*, 36(6), 905–917. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01944.x>
- Eriksson, S.K., Harryson, P. (2011). Dehydrins: Molecular Biology, Structure and Function. In: Lüttge, U., Beck, E., Bartels, D. (eds) *Plant Desiccation Tolerance*. Ecological Studies, vol 215. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19106-0_14
- Esterbauer, H. (1996). Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathologie Biologie*, 44(1), 25–28.
- Etchells, J. P., Provost, C. M., & Turner, S. R. (2012). Plant Vascular Cell Division Is Maintained by an Interaction between PXY and Ethylene Signalling. *PLoS Genetics*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002997>
- Faivre-Rampant, O., Gilroy, E. M., Hrubikova, K., Hein, I., Millam, S., Loake, G. J., Birch, P., Taylor, M., & Lacomme, C. (2004). Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiology*, 134(4), 1308–1316. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037507>
- FAO. (2009). *How to Feed the World in 2050*. Food and Agriculture Organization.
- FAO. (2022). *Global Symposium on Salt-Affected Soils: Outcome document*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb9929en>
- FAO & CIRAD. (2015). *State of the Art Report of Quinoa in the World in 2013*, by D. Bazile, D. Bertero & C. Nieto, eds. Rome.
- FAO and ITPS. (2015). *Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy.
- Finkelstein, R., Gampala, S. S. L., Lynch, T. J., Thomas, T. L., & Rock, C. D. (2005). Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-insensitive(ABI)5 and ABRE-binding factor (ABF)3. *Plant Molecular Biology*, 59(2), 253–267. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-8767-2>
- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., & Bateman, A. (2009). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL.1), 211–222. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp985>
- Flowers, T.J. (2004) Improving crop salt tolerance. *Journal of experimental botany* 55, 307-319

- Fofana, I. B. F., Sangaré, A., Collier, R., Taylor, C., & Fauquet, C. M. (2004). A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56(4), 613–624. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0161-y>
- Franklin, K. A. (2008). Shade avoidance. *New Phytologist*, 179(4), 930–944. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02507.x>
- Fridovich I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *The Journal of biological chemistry*, 264(14), 7761–7764.
- Fuentes, F. F., Bazile, D., Bhargava, A., & Martínez, E. A. (2012). Implications of farmers' seed exchanges for on-farm conservation of quinoa, as revealed by its genetic diversity in Chile. *Journal of Agricultural Science*, 150(6), 702–716. <https://doi.org/10.1017/S0021859612000056>
- 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(4), 509–525. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>
- Fujita, Y., Yoshida, T., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 147(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01635.x>
- Gabaldón, T. (2005). Evolution of Proteins and Proteomes: A Phylogenetics Approach. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 117693430500100. <https://doi.org/10.1177/117693430500100004>
- Galon, Y., Aloni, R., Nachmias, D., Snir, O., Feldmesser, E., Scrase-Field, S., Boyce, J. M., Bouché, N., Knight, M. R., & Fromm, H. (2010). Calmodulin-binding transcription activator 1 mediates auxin signaling and responds to stresses in Arabidopsis. *Planta*, 232(1), 165–178. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1153-6>
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5668–5674. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5668>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). The Proteomics Protocols Handbook. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–608. <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Gedling, C. R., Ali, E. M., Gunadi, A., Finer, J. J., Xie, K., Liu, Y., Yoshikawa, N., Qu, F., & Dorrance, A. E. (2018). Improved apple latent spherical virus-induced gene silencing in multiple soybean genotypes through direct inoculation of agro-infiltrated *Nicotiana benthamiana* extract. *Plant Methods*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0286-7>
- Ginsawaeng, O., Gorka, M., Erban, A., Heise, C., Brueckner, F., Hoefgen, R., Kopka, J., Skiryicz, A., Hinch, D. K., & Zuther, E. (2021). Characterization of the heat-stable proteome during seed germination in Arabidopsis with special focus on LEA proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158172>
- Goday, A., Jensen, A. B., Culiáñez-Macià, F. A., Albà, M. M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., & Pagès, M. (1994). The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell*, 6(3), 351–360. <https://doi.org/10.2307/3869755>
- Gordon, C. S., Rajagopalan, N., Risseuw, E. P., Surpin, M., Ball, F. J., Barber, C. J., Buhrow, L. M., Clark, S. M., Page, J. E., Todd, C. D., Abrams, S. R., & Loewen, M. C. (2016). Characterization of triticum aestivum abscisic acid receptors and a possible role for these in mediating fusarium head blight susceptibility in wheat. *PLoS ONE*, 11(10), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164996>

- Gould, B., & Kramer, E. M. (2007). Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-6>
- Graether, S. P., & Boddington, K. F. (2014). Disorder and function: A review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science*, 5(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00576>
- Groszyk, J., Kowalczyk, M., Yanushevska, Y., Stochmal, A., Rakoczy-Trojanowska, M., & Orczyk, W. (2017). Identification and VIGS-based characterization of Bx1 ortholog in rye (*Secale cereale* L.). *PLoS ONE*, 12(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171506>
- Gsponer, J., Futschik, M.E., Teichmann, S.A., Babu, M.M. (2008). Tight regulation of unstructured proteins: from transcript synthesis to protein degradation. *Science* 322(5906):1365-8.
- Guo, J., Shan, C., Zhang, Y., Wang, X., Tian, H., Han, G., Zhang, Y., & Wang, B. (2022). Mechanisms of Salt Tolerance and Molecular Breeding of Salt-Tolerant Ornamental Plants. *Frontiers in plant science*, 13, 854116. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.854116>
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r24>
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling and Behavior*, 6(10), 1503–1509. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17088>
- Hara, M., Fujinaga, M., & Kuboi, T. (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2695–2703. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri262>
- Hara, M., Kondo, M., & Kato, T. (2013). A KS-type dehydrin and its related domains reduce Cu-promoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical-reducing activities. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1615–1624. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert016>
- Hara, M., Monna, S., Murata, T., Nakano, T., Amano, S., Nachbar, M., & Wätzig, H. (2016). The Arabidopsis KS-type dehydrin recovers lactate dehydrogenase activity inhibited by copper with the contribution of His residues. *Plant Science*, 245, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.006>
- Hara, M., Shinoda, Y., Kubo, M., Kashima, D., Takahashi, I., Kato, T., Horiike, T., & Kuboi, T. (2011). Biochemical characterization of the Arabidopsis KS-type dehydrin protein, whose gene expression is constitutively abundant rather than stress dependent. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2103–2116. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0749-1>
- Hara, M., Shinoda, Y., Tanaka, Y., & Kuboi, T. (2009). DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant, Cell and Environment*, 32(5), 532–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01947.x>
- Hara, M., Terashima, S., & Kuboi, T. (2001). Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *Journal of Plant Physiology*, 158(10), 1333–1339. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00600>
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022). Plant Responses and Tolerance to Salt Stress: Physiological and Molecular Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 1–6. <https://doi.org/10.3390/ijms23094810>

- Hawkins, J., & En, M. B. O. D. (2006). Neural Networks and Support Vector Machines. 4(1), 1–18.
- Hernández-Sánchez, I. E., Maruri-López, I., Ferrando, A., Carbonell, J., Graether, S. P., & Jiménez-Bremont, J. F. (2015). Nuclear localization of the dehydrin OpsDHN1 is determined by histidine-rich motif. *Frontiers in Plant Science*, 6(september), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00702>
- Hernández-Sánchez, I. E., Maruri-López, I., Molphe-Balch, E. P., Becerra-Flora, A., Jaimes-Miranda, F., & Jiménez-Bremont, J. F. (2019). Evidence for in vivo interactions between dehydrins and the aquaporin AtPIP2B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 510(4), 545–550. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.095>
- Hileman, L. C., Drea, S., De Martino, G., Litt, A., & Irish, V. F. (2005). Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). *Plant Journal*, 44(2), 334–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02520.x>
- Hill, W., Jin, X. L., & Zhang, X. H. (2016). Expression of an arctic chickweed dehydrin, CarDHN, enhances tolerance to abiotic stress in tobacco plants. *Plant Growth Regulation*, 80(3), 323–334. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0169-8>
- Hinojosa, L., González, J. A., Barrios-Masias, F. H., Fuentes, F., & Murphy, K. M. (2018). Quinoa abiotic stress responses: A review. *Plants*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/plants7040106>
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), 604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Hollung, K., Espelund, M., Schou, K., & Jakobsen, K. S. (1997). Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZip transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. *Plant Molecular Biology*, 35(5), 561–571. <https://doi.org/10.1023/A:1005815017718>
- Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberté, S., & Sarhan, F. (1995). Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal*, 8(4), 583–593. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8040583.x>
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., & Zimmermann, P. (2008). Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 2008, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2008/420747>
- Hughes, S., & Graether, S. P. (2011). Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. *Protein Science*, 20(1), 42–50. <https://doi.org/10.1002/pro.534>
- Hundertmark, M., & Hinch, D. K. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 1–22. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-118>
- Hussain, S., Niu, Q., Qian, M., Bai, S., & Teng, Y. (2015). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the dehydrin gene family in Asian pear (*Pyrus pyrifolia*). *Tree Genetics and Genomes*, 11(5). <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0938-y>
- Hwang, K., Susila, H., Nasim, Z., Jung, J. Y., & Ahn, J. H. (2019). Arabidopsis ABF3 and ABF4 Transcription Factors Act with the NF-YC Complex to Regulate SOC1 Expression and Mediate Drought-Accelerated Flowering. *Molecular Plant*, 12(4), 489–505. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.002>
- Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, M., Takahashi, H., & Yoshikawa, N. (2009). Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco,

tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virology*, 386(2), 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.039>

Islam, T., Manna, M., & Reddy, M. K. (2015). Glutathione peroxidase of *Pennisetum glaucum* (PgGPx) is a functional Cd²⁺ dependent peroxidase that enhances tolerance against salinity and drought stress. *PLoS ONE*, 10(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143344>

Ismail, A. M., Hall, A. E., & Close, T. J. (1999). Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiology*, 120(1), 237–244. <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.237>

Jacobsen, S. E., Mujica, A., & Jensen, C. R. (2003). The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. *Food Reviews International*, 19(1–2), 99–109. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018872>

Jacobsen, S.E., Quispe, H., Mujica, A. (2001). Quinoa: an alternative crop for saline soils in the Andes. In: Scientists and farmer–partners in research for the 21st century. CIP Program Report 1999–2000, 403–408.

Jarvis, D. E., Ho, Y. S., Lightfoot, D. J., Schmöckel, S. M., Li, B., Borm, T. J. A., Ohyanagi, H., Mineta, K., Michell, C. T., Saber, N., Kharbatia, N. M., Rupper, R. R., Sharp, A. R., Dally, N., Boughton, B. A., Woo, Y. H., Gao, G., Schijlen, E. G. W. M., Guo, X., ... Tester, M. (2017). The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*, 542(7641), 307–312. <https://doi.org/10.1038/nature21370>

Jensen, A. B., Goday, A., Figueras, M., Jessop, A. C., & Pagés, M. (1998). Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant Journal*, 13(5), 691–697. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00069.x>

Jeong, M. J., & Shih, M. C. (2003). Interaction of a GATA factor with cis-acting elements involved in light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(2), 555–562. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02892-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02892-9)

Jiao, Y., Li, J., Tang, H., & Paterson, A. H. (2014). Integrated syntenic and phylogenomic analyses reveal an ancient genome duplication in monocots. *Plant Cell*, 26(7), 2792–2802. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127597>

Jiménez-Bremont, J. F., Maruri-López, I., Ochoa-Alfaro, A. E., Delgado-Sánchez, P., Bravo, J., & Rodríguez-Kessler, M. (2013). LEA Gene Introns: Is the Intron of Dehydrin Genes a Characteristic of the Serine-Segment? *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(1), 128–140. <https://doi.org/10.1007/s11105-012-0483-x>

Jing, H., Li, C., Ma, F., Ma, J. H., Khan, A., Wang, X., Zhao, L. Y., Gong, Z. H., & Chen, R. G. (2016). Genome-wide identification, expression diversification of dehydrin gene family and characterization of CaDHN3 in pepper (*Capsicum annuum* L.). *PLoS ONE*, 11(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161073>

Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7(2016JULY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(August). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kalazich, J. 2015. Quínoa: un súper alimento para Chile y el mundo. *Tierra Adentro* 108. Noviembre-Diciembre.

Kamada, K., Omata, S., Yamagishi, N., Kasajima, I., & Yoshikawa, N. (2018). Gentian (*Gentiana triflora*) prevents transmission of apple latent spherical virus (ALSV) vector to progeny seeds. *Planta*, 248(6), 1431–1441. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2992-9>

Karas, B., Amyot, L., Johansen, C., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M., & Szczylowski, K. (2009). Conservation of Lotus and Arabidopsis basic helix-loop-helix proteins reveals new players in root hair development. *Plant Physiology*, 151(3), 1175–1185. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143867>

Kawamura, Y., & Uemura, M. (2003). Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant Journal*, 36(2), 141–154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01864.x>

Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., Van Der Lee, R., Bessy, A., Chèneby, J., Kulkarni, S. R., Tan, G., Baranasic, D., Arenillas, D. J., Sandelin, A., Vandepoele, K., Lenhard, B., Ballester, B., Wasserman, W. W., Parcy, F., & Mathelier, A. (2018). JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D260–D266. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1126>

Khan, N. Z., Lal, S., Ali, W., Aasim, M., Mumtaz, S., Kamil, A., & Bibi, N. S. (2020). Distribution and classification of dehydrins in selected plant species using bioinformatics approach. *Iranian Journal of Biotechnology*, 18(4), 56–66. <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.2680>

Kim, Y., Park, S., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (2013). Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. *Plant Journal*, 75(3), 364–376. <https://doi.org/10.1111/tpj.12205>

Koag, M. C., Fenton, R. D., Wilkens, S., & Close, T. J. (2003). The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology*, 131(1), 309–316. <https://doi.org/10.1104/pp.011171>

Koag, M. C., Wilkens, S., Fenton, R. D., Resnik, J., Vo, E., & Close, T. J. (2009). The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiology*, 150(3), 1503–1514. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136697>

Kobayashi, K., Kumazawa, Y., Miwa, K., & Yamanaka, S. (1996). ϵ -(γ -Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 144(2–3), 157–160. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00353-9](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00353-9)

Kolano, B., McCann, J., Orzechowska, M., Siwinska, D., Tensch, E., & Weiss-Schneeweiss, H. (2016). Molecular and cytogenetic evidence for an allotetraploid origin of *Chenopodium quinoa* and *C. berlandieri* (Amaranthaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.009>

Kon, T., & Yoshikawa, N. (2014). Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing. *Frontiers in Microbiology*, 5(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00595>

Kon, T., & Yoshikawa, N. (2015). An effective and convenient method for the delivery of apple latent spherical virus (ALSV)-based vectors into plant cells by agroinoculation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1287, 191–199. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0_14

- Kosová, K., Vítámvás, P., & Prášil, I. T. (2014). Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity - What can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Frontiers in Plant Science*, 5(JUL), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00343>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>
- Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., & Tompa, P. (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology*, 147(1), 381–390. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118208>
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., & Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein Kinases - Key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 15(12), 859–872. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0091>
- Kumagai, M. H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., & Grill, L. K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1679–1683. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1679>
- Lacomme C. (2015). Strategies for altering plant traits using virus-induced gene silencing technologies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1287, 25–41. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0_2
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5101–5105. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600026200>
- Le Gall, O., Sanfaçon, H., Ikegami, M., Iwanami, T., Jones, T., Karasev, A., Lehto, K., Wellink, J., Wetzel, T., & Yoshikawa, N. (2007). Cheravirus and Sadwavirus: Two unassigned genera of plant positive-sense single-stranded RNA viruses formerly considered atypical members of the genus Nepovirus (family Comoviridae). *Archives of Virology*, 152(9), 1767–1774. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1015-0>
- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Leivar, P., & Monte, E. (2014). PIFs: Systems integrators in plant development. *Plant Cell*, 26(1), 56–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120857>
- Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, 16(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.003>
- Lemoine, F., Domelevo Entfellner, J. B., Wilkinson, E., Correia, D., Dávila Felipe, M., De Oliveira, T., & Gascuel, O. (2018). Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data. *Nature*, 556(7702), 452–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0>
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019). NGPhylogeny.fr: New generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W260–W265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), 2–5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Li, C., Sasaki, N., Isogai, M., & Yoshikawa, N. (2004). Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Archives of Virology*, 149(8), 1541–1558. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0310-2>

- Li, C., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Yoshida, K., & Koganezawa, H. (2000). Nucleotide sequence and genome organization of Apple latent spherical virus: A new virus classified into the family Comoviridae. *Journal of General Virology*, 81(2), 541–547. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-541>
- Li, F., Guo, X., Liu, J., Zhou, F., Liu, W., Wu, J., Zhang, H., Cao, H., Su, H., & Wen, R. (2019). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the NAC transcription factor in chenopodium quinoa. *Genes*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/genes10070500>
- Li, H., Sun, J., Xu, Y., Jiang, H., Wu, X., & Li, C. (2007). The bHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 65(5), 655–665. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9230-3>
- Li, Q., Zhang, X., Lv, Q., Zhu, D., Qiu, T., Xu, Y., Bao, F., He, Y., & Hu, Y. (2017). Physcomitrella patens dehydrins (PpDHNA and PpDHNC) confer salinity and drought tolerance to transgenic arabidopsis plants. *Frontiers in Plant Science*, 8(July), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01316>
- Li, R., Guo, P., Baum, M., Grando, S., & Ceccarelli, S. (2006). Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators. *Agricultural Sciences in China*, 5(October), 751–757.
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2005). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2, 171–178. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch21>
- Lin, C. H., Peng, P. H., Ko, C. Y., Markhart, A. H., & Lin, T. Y. (2012). Characterization of a novel Y2K-type dehydrin vrdhn1 from vigna radiata. *Plant and Cell Physiology*, 53(5), 930–942. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs040>
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., & Dougherty, W. G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 5(12), 1749–1759. <https://doi.org/10.2307/3869691>
- Liu, Y., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 31(6), 777–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01394.x>
- Liu, E., & Page, J. E. (2008). Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-5>
- Liu, Y., Wang, L., Zhang, T., Yang, X., & Li, D. (2017). Functional characterization of KS-Type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07852-y>
- López-Marqués, R. L., Nørrevang, A. F., Ache, P., Moog, M., Visintainer, D., Wendt, T., Østerberg, J. T., Dockter, C., Jørgensen, M. E., Salvador, A. T., Hedrich, R., Gao, C., Jacobsen, S. E., Shabala, S., & Palmgren, M. (2020). Prospects for the accelerated improvement of the resilient crop quinoa. *Journal of Experimental Botany*, 71(18), 5333–5347. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa285>
- Ludwig, W., Oliver Glöckner, F., & Yilmaz, P. (2011). The Use of rRNA Gene Sequence Data in the Classification and Identification of Prokaryotes. In *Methods in Microbiology* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00016-4>
- Madden, T.L. (2013). Chapter 16: The BLAST Sequence Analysis Tool.
- Madhusudhan, R., Ishikawa, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Shibata, H. (2003). Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. *Physiologia Plantarum*, 117(4), 550–557. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00066.x>

- Malik, A. A., Veltri, M., Boddington, K. F., Singh, K. K., & Graether, S. P. (2017). Genome analysis of conserved dehydrin motifs in vascular plants. *Frontiers in Plant Science*, 8(May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00709>
- Manfield, I. W., Devlin, P. F., Jen, C. H., Westhead, D. R., & Gilmartin, P. M. (2007). Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the Arabidopsis GATA gene family. *Plant Physiology*, 143(2), 941–958. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090761>
- Manhães, A. M., de Oliveira, M. V., & Shan, L. (2015). Establishment of an efficient virus-induced gene silencing (VIGS) assay in Arabidopsis by Agrobacterium-mediated rubbing infection. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1287, 235–241. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0_17
- Maszkowska, J., Dębski, J., Kulik, A., Kistowski, M., Bucholc, M., Lichočka, M., Klimecka, M., Sztatelman, O., Szymańska, K. P., Dadlez, M., & Dobrowolska, G. (2019). Phosphoproteomic analysis reveals that dehydrins ERD10 and ERD14 are phosphorylated by SNF1-related protein kinase 2.10 in response to osmotic stress. *Plant Cell and Environment*, 42(3), 931–946. <https://doi.org/10.1111/pce.13465>
- McCormick, R. F., Truong, S. K., Sreedasyam, A., Jenkins, J., Shu, S., Sims, D., Kennedy, M., Amirebrahimi, M., Weers, B. D., McKinley, B., Mattison, A., Morishige, D. T., Grimwood, J., Schmutz, J., & Mullet, J. E. (2018). The Sorghum bicolor reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 93(2), 338–354. <https://doi.org/10.1111/tpj.13781>
- McKinney, H. H. (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research*, 39(8), 557–578. <http://naldc.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=IND43967734&content=PDF>
- Mehta, P. A., Rebala, K. C., Venkataraman, G., & Parida, A. (2009). A diurnally regulated dehydrin from *Avicennia marina* that shows nucleo-cytoplasmic localization and is phosphorylated by Casein kinase II in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(8), 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.008>
- Melgar, A. E., & Zelada, A. M. (2021). Evolutionary analysis of angiosperm dehydrin gene family reveals three orthologues groups associated to specific protein domains. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03066-5>
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, 523-530.
- Ming, R., VanBuren, R., Liu, Y., Yang, M., Han, Y., Li, L. T., Zhang, Q., Kim, M. J., Schatz, M. C., Campbell, M., Li, J., Bowers, J. E., Tang, H., Lyons, E., Ferguson, A. A., Narzisi, G., Nelson, D. R., Blaby-Haas, C. E., Gschwend, A. R., ... Shen-Miller, J. (2013). Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Genome Biology*, 14(5). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-5-r41>
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Mistry, J., Finn, R. D., Eddy, S. R., Bateman, A., & Punta, M. (2013). Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic Acids Research*, 41(12). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt263>

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mizuno, N., Toyoshima, M., Fujita, M., Fukuda, S., Kobayashi, Y., Ueno, M., Tanaka, K., Tanaka, T., Nishihara, E., Mizukoshi, H., Yasui, Y., & Fujita, Y. (2020). The genotype-dependent phenotypic landscape of quinoa in salt tolerance and key growth traits. *DNA Research*, 27(4), 1–12. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsaa022>
- Mohanta, T. K., Yadav, D., Khan, A., Hashem, A., Tabassum, B., Khan, A. L., Allah, E. F. A., & Al-Harrasi, A. (2020). Genomics, molecular and evolutionary perspective of NAC transcription factors. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231425>
- Montanarella Luca, Badraoui, M., Chude, Vi., Costa, I., Baptista, saurinda D. S., Mamo, T., Yemefack, M., Aulang, M. S., Yagi, K., Hong, S. Y., Vijarnsorn, P., Zhang, G. L., Arrouays, D., Black, H., Krasilnikov, P., Sobocá, J., Alegre, J., Henriquez, C. R., Mendonça-Santos, M. de L., ... McKenzie, N. (2015). Status of the World's Soil Resources. In Intergovernmental Technical Panel on Soils. <http://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf>
- Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology*, 180(3), 1246–1250. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
- Mota, A. P. Z., Oliveira, T. N., Vinson, C. C., Williams, T. C. R., Costa, M. M. do C., Araujo, A. C. G., Danchin, E. G. J., Grossi-de-Sá, M. F., Guimaraes, P. M., & Brasileiro, A. C. M. (2019). Contrasting effects of wild *Arachis dehydrin* under abiotic and biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00497>
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Réjoué, K., Sanial, M., Vo, T. A., & Vaucheret, H. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101(5), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80863-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80863-6)
- Moussa, H. , & Abdel-Aziz, S. (2008). Southern Cross Journals © 2008 Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress Helal Ragab Moussa and 2 Samir Moustafa Abdel-Aziz. *Australian Journal of Crop Science*, 1(1), 31–36.
- Munns, R. (2005). Genes and Salt Tolerance. *New Phytologist*, 167(3), 645–663.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nagamatsu, A., Masuta, C., Senda, M., Matsuura, H., Kasai, A., Hong, J. S., Kitamura, K., Abe, J., & Kanazawa, A. (2007). Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnology Journal*, 5(6), 778–790. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00288.x>
- Nagaraju, M., Reddy, P. S., Anil Kumar, S., Kumar, A., Suravajhala, P., Ali, A., Srivastava, R. K., Kavi Kishor, P. B., & Manohar Rao, D. (2018). Genome-wide in silico analysis of dehydrins in *Sorghum bicolor*, *Setaria italica* and *Zea mays* and quantitative analysis of dehydrin gene expressions under abiotic stresses in *Sorghum bicolor*. *Plant Gene*, 13(February), 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2018.01.004>
- Nakamura, K., Yamagishi, N., Isogai, M., Komori, S., Ito, T., & Yoshikawa, N. (2011). Seed and pollen transmission of Apple latent spherical virus in apple. *Journal of General Plant Pathology*, 77(1), 48–53. <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0275-9>

- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28, 131-140.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Ogata, T., Toyoshima, M., Yamamizo-Oda, C., Kobayashi, Y., Fujii, K., Tanaka, K., Tanaka, T., Mizukoshi, H., Yasui, Y., Nagatoshi, Y., Yoshikawa, N., & Fujita, Y. (2021). Virus-Mediated Transient Expression Techniques Enable Functional Genomics Studies and Modulations of Betalain Biosynthesis and Plant Height in Quinoa. *Frontiers in Plant Science*, 12(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643499>
- Oldeman, L. R., Hakkeling, R. T. A., & Sombroek, W. G. (1991). World map of the status of human-induced soil degradation : an explanatory note, 2nd. rev. ed. ISRIC.
- Opperdoes, F. R., & Lemey, P. (2012). Phylogenetic analysis using protein sequences. *The Phylogenetic Handbook*, July, 313–342. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511819049.011>
- Pacak, A., Geisler, K., Jørgensen, B., Barciszewska-Pacak, M., Nilsson, L., Nielsen, T. H., Johansen, E., Grønlund, M., Jakobsen, I., & Albrechtsen, M. (2010). Investigations of barley stripe mosaic virus as a gene silencing vector in barley roots and in *Brachypodium distachyon* and oat. *Plant Methods*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-26>
- Pandey, N., Ranjan, A., Pant, P., Tripathi, R. K., Ateek, F., Pandey, H. P., Patre, U. V., & Sawant, S. V. (2013). CAMTA 1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 14(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-216>
- Pant, P., Iqbal, Z., Pandey, B. K., & Sawant, S. V. (2018). Genome-wide comparative and evolutionary analysis of Calmodulin-binding Transcription Activator (CAMTA) family in *Gossypium* species. *Scientific Reports*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23846-w>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Peele, C., Jordan, C. V., Muangsan, N., Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., Hanley-Bowdoin, L., & Robertson, D. (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant Journal*, 27(4), 357–366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01080.x>
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Dugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S., & Jupin, I. (2008). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis* using a “one-step” TYMV-derived vector. *Plant Journal*, 56(4), 678–690. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03620.x>

Pham, V. N., Kathare, P. K., & Huq, E. (2018). Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiology*, 176(2), 1025–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01384>

Pospíšil, P., & Yamamoto, Y. (2017). Damage to photosystem II by lipid peroxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861(2), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.005>

Prilusky, J., Felder, C. E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E. H., Man, O., Beckmann, J. S., Silman, I., & Sussman, J. L. (2005). FoldIndex©: A simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics*, 21(16), 3435–3438. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti537>

Prochazkova, D., Sairam, R.K., Srivastava, G., & Singh, D.V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161, 765-771.

Proost, S., Bel, M. Van, Vanechoutte, D., Van De Peer, Y., Inzé, D., Mueller-Roeber, B., & Vandepoele, K. (2015). PLAZA 3.0: An access point for plant comparative genomics. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D974–D981. <https://doi.org/10.1093/nar/gku986>

Qadir, M., Quillérou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R.J., Drechsel, P. et al. 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum*, 38(4): 282–295.

Rahman, L. N., Smith, G. S. T., Bamm, V. V., Voyer-Grant, J. A. M., Moffatt, B. A., Dutcher, J. R., & Harauz, G. (2011). Phosphorylation of Thellungiella salsuginea dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 facilitates cation-induced conformational changes and actin assembly. *Biochemistry*, 50(44), 9587–9604. <https://doi.org/10.1021/bi201205m>

Ramegowda, V., Mysore, K. S., & Senthil-Kumar, M. (2014). Virus-induced gene silencing is a versatile tool for unraveling the functional relevance of multiple abiotic-stress-responsive genes in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 5(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00323>

Ratcliff, F., Harrison, B. D., & Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5318), 1558–1560. <https://doi.org/10.1126/science.276.5318.1558>

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M., & Baulcombe, D. C. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal*, 25(2), 237–245. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x>

Reeves, W. M., Lynch, T. J., Mobin, R., & Finkelstein, R. R. (2011). Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Molecular Biology*, 75(4–5), 347–363. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9733-9>

Richard Strimbeck, G. (2017). Hiding in plain sight: the F segment and other conserved features of seed plant SKn dehydrins. *Planta*, 245(5), 1061–1066. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2679-7>

Richardson J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in protein chemistry*, 34, 167–339. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60520-3](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60520-3)

Riley, A. C., Ashlock, D. A., & Graether, S. P. (2019). Evolution of the modular, disordered stress proteins known as dehydrins. *PLoS ONE*, 14(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211813>

Rinne, P. L. H., Kaikuranta, P. L. M., Van Der Plas, L. H. W., & Van Der Schoot, C. (1999). Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): Production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta*, 209(4), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s004250050740>

- Roberts, J. K., DeSimone, N. A., Lingle, W. L., & Dure, L. (1993). Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell*, 5(7), 769–780. <https://doi.org/10.2307/3869614>
- Rorat, T. (2006). Plant dehydrins - Tissue location, structure and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(4), 536–556. <https://doi.org/10.2478/s11658-006-0044-0>
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Ruiz, K. B., Aloisi, I., Del Duca, S., Canelo, V., Torrigiani, P., Silva, H., & Biondi, S. (2016). Salares versus coastal ecotypes of quinoa: Salinity responses in Chilean landraces from contrasting habitats. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.010>
- Ruiz, K. B., Biondi, S., Oses, R., Acuña-Rodríguez, I. S., Antognoni, F., Martínez-Mosqueira, E. A., Coulibaly, A., Canahua-Murillo, A., Pinto, M., Zurita-Silva, A., Bazile, D., Jacobsen, S. E., & Molina-Montenegro, M. A. (2014). Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 349–359. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0195-0>
- Ruiz, K. B., Rapparini, F., Bertazza, G., Silva, H., Torrigiani, P., & Biondi, S. (2017). Comparing salt-induced responses at the transcript level in a salares and coastal-lowlands landrace of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Environmental and Experimental Botany*, 139(May), 127–142. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.003>
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., & Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant Journal*, 45(2), 237–249. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02603.x>
- Sakuraba, Y., Jeong, J., Kang, M. Y., Kim, J., Paek, N. C., & Choi, G. (2014). Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5636>
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101(1), 7–12. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.7>
- Scandalios, J.G., Guan, L., & Polidoros, A.N. (1997). Catalases in Plants: Gene Structure, Properties, Regulation, and Expression. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34, 343-406.
- Schadt, E. E., Sinsheimer, J. S., & Lange, K. (1998). Computational advances in maximum likelihood methods for molecular phylogeny. *Genome Research*, 8(3), 222–233. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.222>
- Schmöckel, S. M., Lightfoot, D. J., Razali, R., Tester, M., & Jarvis, D. E. (2017). Identification of putative transmembrane proteins involved in salinity tolerance in chenopodium quinoa by integrating physiological data, RNAseq, and SNP analyses. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01023>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schöb, H., Kunz, C., & Meins, F. (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: A simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular and General Genetics*, 256(5), 581–585. <https://doi.org/10.1007/s004380050604>

- Schöb, H., Kunz, C., & Meins, F. (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: A simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular and General Genetics*, 256(5), 581–585. <https://doi.org/10.1007/s004380050604>
- Schuller, D. J., Ban, N., Van Huystee, R. B., McPherson, A., & Poulos, T. L. (1996). The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4(3), 311–321. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00035-4)
- Seader, V. H., Thornsberry, J. M., & Carey, R. E. (2016). Utility of the *Amborella trichopoda* expansin superfamily in elucidating the history of angiosperm expansins. *Journal of Plant Research*, 129(2), 199–207. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0772-1>
- Seibel, N. M., Eljouni, J., Nalaskowski, M. M., & Hampe, W. (2007). Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Analytical Biochemistry*, 368(1), 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.05.025>
- Sena, J. S., Giguère, I., Rigault, P., Bousquet, J., & Mackay, J. (2018). Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression. *Tree Physiology*, 38(3), 442–456. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx125>
- Shao, H., Wang, H., & Tang, X. (2015). NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: Progress and prospects. *Frontiers in Plant Science*, 6(OCTOBER), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00902>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shen, J., Lv, B., Luo, L., He, J., Mao, C., Xi, D., & Ming, F. (2017). The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice. *Scientific Reports*, 7(January). <https://doi.org/10.1038/srep40641>
- Shi, G., Hao, M., Tian, B., Cao, G., Wei, F., & Xie, Z. (2021). A Methodological Advance of Tobacco Rattle Virus-Induced Gene Silencing for Functional Genomics in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.671091>
- Shin, S. Y., Park, M. R., Kim, H. S., Moon, J. S., & Lee, H. J. (2023). Virus-induced gene silencing shows that LATE FLOWERING plays a role in promoting flower development in soybean. *Plant Growth Regulation*, 99(2), 229–239. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00899-6>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(539). <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh, D. K., Lee, H. K., Dweikat, I., & Mysore, K. S. (2018). An efficient and improved method for virus-induced gene silencing in sorghum. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1344-z>
- Singh, J., Reddy, P. S., Reddy, C. S., & Reddy, M. K. (2015). Molecular cloning and characterization of salt inducible dehydrin gene from the C4 plant *Pennisetum glaucum*. *Plant Gene*, 4, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.08.002>
- Skorupa, M., Gołbiewski, M., Domagalski, K., Kurnik, K., Abu Nahia, K., Złoch, M., Tretyn, A., & Tyburski, J. (2016). Transcriptomic profiling of the salt stress response in excised leaves of the halophyte *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *Plant Science*, 243, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.11.007>

- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2016). The role and regulation of ABI5 (ABA-insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 7(DECEMBER2016), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01884>
- Smith, M. A., & Graether, S. P. (2022). The Disordered Dehydrin and Its Role in Plant Protection: A Biochemical Perspective. *Biomolecules*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/biom12020294>
- Soltis, P. S., Brockington, S. F., Yoo, M. J., Piedrahita, A., Latvis, M., Moore, M. J., Chanderbali, A. S., & Soltis, D. E. (2009). Floral variation and floral genetics in basal angiosperms. *American Journal of Botany*, 96(1), 110–128. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800182>
- Soulages, J. L., Kim, K., Arrese, E. L., Walters, C., & Cushman, J. C. (2003). Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiology*, 131(3), 963–975. <https://doi.org/10.1104/pp.015891>
- Szabolcs, I. 1979. Review on Research of Salt Affected Soils. *Natural Resources Research XV*. Paris, UNESCO.
- 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(3), 173–183. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0557-0>
- Tanaka, A., & Tsuji, H. (1981). Changes in Chlorophyll a and b Content in Dark-Incubated Cotyledons Excised from Illuminated Seedlings. *Plant Physiology*, 68(3), 567–570. <https://doi.org/10.1104/pp.68.3.567>
- Tanaka, R., & Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(8), 968–976. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.01.002>
- Teresa Ruiz, M., Voinnet, O., & Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 10(6), 937–946. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.6.937>
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503–527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg058>
- Thomas, C. L., Jones, L., Baulcombe, D. C., & Maule, A. J. (2001). Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant Journal*, 25(4), 417–425. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2001.00976.x>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tompa, P. (2003). Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *BioEssays*, 25(9), 847–855. <https://doi.org/10.1002/bies.10324>
- Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, 16(9), 2481–2498. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022699>
- Tripathy, B. C., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 7(12), 1621–1633. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>

- Turnage, M. A., Muangsan, N., Peele, C. G., & Robertson, D. (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis. *Plant Journal*, 30(1), 107–114. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01261.x>
- Unver, T., & Budak, H. (2009). Virus-induced gene silencing, A post transcriptional gene silencing method. *International Journal of Plant Genomics*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/198680>
- Uversky, V. N. (2002). Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science*, 11(4), 739–756. <https://doi.org/10.1110/ps.4210102>
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., & Fink, A. L. (2000). Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 41(3), 415–427. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20001115\)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7)
- Vaghchhipawala, Z., Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2011). Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 678, 65–76. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-682-5_6
- Vavilin, D. V., Ducruet, J. M., Matorin, D. N., Venediktov, P. S., & Rubin, A. B. (1998). Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 42(3), 233–239. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00076-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00076-1)
- Vlad, F., Turk, B. E., Peynot, P., Leung, J., & Merlot, S. (2008). A versatile strategy to define the phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates. *Plant Journal*, 55(1), 104–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03488.x>
- Walley, J. W., Coughlan, S., Hudson, M. E., Covington, M. F., Kaspi, R., Banu, G., Harmer, S. L., & Dehesh, K. (2007). Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel cis-element. *PLoS Genetics*, 3(10), 1800–1812. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030172>
- Wang, J. E., Gong, Z. H., Li, D. W., & Zhang, Y. L. (2013). Optimization of virus-induced gene silencing in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 2492–2506. <https://doi.org/10.4238/2013.July.24.4>
- Wang, Y., Zhang, H., Zhong, H., & Xue, Z. (2021). Protein domain identification methods and online resources. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1145–1153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.041>
- Wang, Y., Chai, C., Khatabi, B., Scheible, W. R., Udvardi, M. K., & Saha, M. C. (2021). An Efficient Brome mosaic virus-Based Gene Silencing Protocol for Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12(June), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.685187>
- Wang, Z., Su, G., Li, M., Ke, Q., Kim, S. Y., Li, H., Huang, J., Xu, B., Deng, X. P., & Kwak, S. S. (2016). Overexpressing Arabidopsis ABF3 increases tolerance to multiple abiotic stresses and reduces leaf size in alfalfa. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.020>
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2- A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Welin, B. V., Nylander, M., & Palva, E. T. (1994). Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 77613(1), 131–144. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7948863

- Welner, D. H., Deeba, F., Lo Leggio, L., & Skriver, K. (2016). NAC Transcription Factors: From Structure to Function in Stress-Associated Networks. In *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00013-0>
- Wroblewski, T., Tomczak, A., & Michelmore, R. (2005). Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 3(2), 259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x>
- Xu, D., Qu, S., Tucker, M. R., Zhang, D., Liang, W., & Shi, J. (2019). Ostkpr1 functions in anther cuticle development and pollen wall formation in rice. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1711-4>
- Xu, J., Zhang, Y. X., Wei, W., Han, L., Guan, Z. Q., Wang, Z., & Chai, T. Y. (2008). BjDHNs confer heavy-metal tolerance in plants. *Molecular Biotechnology*, 38(2), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-9005-8>
- Yamagishi, N., & Yoshikawa, N. (2009). Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with apple latent spherical virus vectors. *Plant Molecular Biology*, 71(1–2), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9505-y>
- Yang, Y., Sun, X., Yang, S., Li, X., & Yang, Y. (2014). Molecular cloning and characterization of a novel SK3-type dehydrin gene from *Stipa purpurea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 448(2), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.075>
- Yokoyama, T., Ohkubo, T., Kamiya, K., & Hara, M. (2020). Cryoprotective activity of Arabidopsis KS-type dehydrin depends on the hydrophobic amino acids of two active segments. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 691(May), 108510. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108510>
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, 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 Environment*, 38(1), 35–49. <https://doi.org/10.1111/pce.12351>
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant Journal*, 61(4), 672–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x>
- Young, A.J. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 83, 702-708.
- Yu, J., Yang, X. D., Wang, Q., Gao, L. W., Yang, Y., Xiao, D., Liu, T. K., Li, Y., Hou, X. L., & Zhang, C. W. (2018). Efficient virus-induced gene silencing in *Brassica rapa* using a turnip yellow mosaic virus vector. *Biologia Plantarum*, 62(4), 826–834. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0803-6>
- Yu, Z., Wang, X., & Zhang, L. (2018). Structural and functional dynamics of dehydrins: A plant protector protein under abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 16–18. <https://doi.org/10.3390/ijms19113420>
- Yuan, X., Wang, H., Cai, J., Li, D., & Song, F. (2019). NAC transcription factors in plant immunity. *Phytopathology Research*, 1(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s42483-018-0008-0>
- Zang, Z., Wang, Z., Zhao, F., Yang, W., Ci, J., Ren, X., Jiang, L., & Yang, W. (2021). Maize Ethylene Response Factor ZmERF061 Is Required for Resistance to *Exserohilum turcicum*. *Frontiers in Plant Science*, 12(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.630413>

- Zhang, C., & Ghabrial, S. A. (2006). Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology*, 344(2), 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.046>
- Zhang, D., Zhang, Z., Unver, T., & Zhang, B. (2021). CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *Journal of Advanced Research*, 29, 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.10.003>
- Zhang, H., Zheng, J., Su, H., Xia, K., Jian, S., & Zhang, M. (2018). Molecular cloning and functional characterization of the dehydrin (IpDHN) gene from ipomoea pes-caprae. *Frontiers in Plant Science*, 9(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01454>
- Zhang, J., Yu, D., Zhang, Y., Liu, K., Xu, K., Zhang, F., Wang, J., Tan, G., Nie, X., Ji, Q., Zhao, L., & Li, C. (2017). Vacuum and co-cultivation agroinfiltration of (germinated) seeds results in tobacco rattle virus (TRV) mediated whole-plant virus-induced gene silencing (VIGS) in wheat and maize. *Frontiers in Plant Science*, 8(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00393>
- Zhang, J., Huang, Q., Zhong, S., Bleckmann, A., Huang, J., Guo, X., Lin, Q., Gu, H., Dong, J., Dresselhaus, T., & Qu, L. J. (2017). Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization. *Nature Plants*, 3(June), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.79>
- Zhang, L., Chen, F., Zhang, X., Li, Z., Zhao, Y., Lohaus, R., Chang, X., Dong, W., Ho, S. Y. W., Liu, X., Song, A., Chen, J., Guo, W., Wang, Z., Zhuang, Y., Wang, H., Chen, X., Hu, J., Liu, Y., ... Tang, H. (2020). The water lily genome and the early evolution of flowering plants. *Nature*, 577(7788), 79–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1852-5>
- Zhang, L., Wu, M., Teng, Y., Jia, S., Yu, D., Wei, T., Chen, C., & Song, W. (2019). Overexpression of the glutathione peroxidase 5 (RcGPX5) gene from *rhodiola crenulata* increases drought tolerance in *salvia miltiorrhiza*. *Frontiers in Plant Science*, 9(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01950>
- Zhao, T., & Eric Schranz, M. (2019). Network-based microsynteny analysis identifies major differences and genomic outliers in mammalian and angiosperm genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(6), 2165–2174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801757116>
- Zhu, X., Wang, B., Wei, X., & Du, X. (2022). Characterization of the CqCAMTA gene family reveals the role of CqCAMTA03 in drought tolerance. *BMC Plant Biology*, 22(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03817-0>
- Zinsmeister, J., Lalanne, D., Terrasson, E., Chatelain, E., Vandecasteele, C., Ly Vu, B., Dubois-Laurent, C., Geoffriau, E., Le Signor, C., Dalmais, M., Gutbrod, K., Dörmann, P., Gallardo, K., Bendahmane, A., Buitink, J., & Leprince, O. (2016). ABI5 is a regulator of seed maturation and longevity in legumes. *Plant Cell*, 28(11), 2735–2754. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00470>
- Zulfiqar, S., Farooq, M. A., Zhao, T., Wang, P., Tabusam, J., Wang, Y., Xuan, S., Zhao, J., Chen, X., Shen, S., & Gu, A. (2023). Virus-Induced Gene Silencing (VIGS): A Powerful Tool for Crop Improvement and Its Advancement towards Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5608. <https://doi.org/10.3390/ijms24065608>