



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Perfil de expresión a nivel transcripcional en
respuesta a estrés salino en dos especies de
amaranto (*Amaranthus cruentus L.* y *Amaranthus
hypochondriacus L.*)**

Tesis que presenta

Hugo Sergio Aguilar Hernández

Para obtener el grado de

Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular

Director (Codirectores) de la Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Dr. Eduardo Espitia Rangel

San Luis Potosí, S.L.P., 23 de Noviembre de 2012



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Perfil de expresión a nivel transcripcional en respuesta a estrés salino en dos especies de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. y *Amaranthus hypochondriacus* L.)**” presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Hugo Sergio Aguilar Hernández** y aprobada el **25 de Octubre de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Dr. Eduardo Espitia Rangel

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

Dr. Ramón G. Guevara González



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de (Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular) de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y el Dr. Eduardo Espitia Rangel.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (219032) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. (N_o de matrícula 080289)



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 049 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 23 días del mes de noviembre del año 2012, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Eduardo Espitia Rangel	Presidente	INIFAP
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dr. Ramón Gerardo Guevara González	Sinodal externo	UAQ

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Hugo Sergio Aguilar Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Perfil de expresión a nivel transcripcional en respuesta a estrés salino en dos especies de amaranto (Amaranthus cruentus L. y Amaranthus hypochondriacus L.)

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Dr. Eduardo Espitia Rangel (INIFAP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 23 días del mes de noviembre de 2012.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bopilla Marín
Secretario Académico

INSTITUTO POTOSINO
DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa (IPICyT)

A M.C. Alberto Barrera Pacheco (IPICyT)

A Dr. Eduardo Espitia Rangel (INIFAP)

A mis compañeros Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular presentes
y ausentes del IPICyT

A la señora Sonia (IPICyT)

Al comité Tutorial

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
Capítulo I	1
1. Introducción	1
1.1 Generalidades del amaranto	1
1.1.1 Origen e historia del amaranto	2
1.1.2 Taxonomía y características del amaranto	3
1.1.3 Fisiología y agronomía del amaranto	4
1.1.4 Importancia del cultivo (producción y distribución)	6
1,1.5 Valor nutricional del amaranto composición del grano y hoja	7
1.2 Estrés biótico y abiótico	9
1.2.1 Estrés salino	9
2. Referencias	12
CAPITULO II	16
1. Introducción	
1.1 Efecto del estrés salino en la supervivencia de la planta, crecimiento y desarrollo	12
1.2.Función del calcio y señalización en plantas bajo estrés salino	17
1.3 Inducción de la respuesta a estrés por altas concentraciones de CaCl ₂ .	20
2. Justificación	24
3. Objetivo general	25
3.1 Objetivos específicos	25

4. Resultados	26
4.1 Identification of calcium stress induced genes in amaranth through suppression subtractive hybridization.	26
CAPITULO III	34
1. Introducción	34
1.1 Tolerancia a estrés salino	34
1.2 Adaptación de las plantas a estrés salino	35
1.2.1 Biosíntesis de Osmolitos/solutos compatibles y osmoprotectores	35
1.2.2 Absorción del agua y su transporte durante el estrés salino	36
1.2.3 Homeostasis iónica intracelular	37
1.2.4 Transporte y compartimentalización de Iones Na ⁺ y Cl ⁻	37
1.2.5 Protección y respuesta al daño por estrés oxidativo	38
1.2.6 Transducción de señales durante el estrés salino	39
1.2.7 Señalización dependiente de ABA	39
1.2.8 Comportamiento del ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico durante el estrés salino	40
1.3 Amaranto como organismo tolerante a estrés salino	41
2. Objetivo general	43
2.1 Objetivos específicos	43
3. Materiales y métodos	44
3.1 Condiciones de crecimiento de plantas de amaranto	44
3.2 Aislamiento de ARNm y síntesis de DNAc	44
3.3 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH).	45
3.4 Construcción de las Genotecas sustractivas	45
3.5 Construcción del macroarreglo	45
3.5.1 Síntesis y Marcaje de la Sonda de ADNc con fluoresceína	46
3.5.2 Comprobación del marcaje de ADNc	47
3.5.3 Hibridación y Detección de la señal	47
3.6 Cuantificación de malonildialdehido en raíz de amaranto	48
3.7 Cuantificación de ácido ascórbico en hoja y raíz de amaranto	48
4. Resultados y Discusión	49
4.1 Respuesta morfológica del amaranto a estrés salino	49
4.2 Síntesis de cDNA para la construcción de las genotecas sustractivas	51

4.3 Hibridación y amplificación por PCR para la normalización y enriquecimiento de los ADNc expresados diferencialmente.	51
4.4 Construcción de la genoteca sustractiva de los genes sobreexpresados o reprimidos en raíz de <i>A. cruentus</i> L. y <i>A. hypochondriacus</i> L.	52
4.5 Malonildialdehído como indicador de la peroxidación de lípidos de membrana	53
4.6 Comportamiento del Ácido ascórbico durante el estrés salino en raíz y hoja de amaranto	55
4.8 Aislamiento, identificación y análisis bioinformático de los genes diferencialmente expresados en plantas de <i>A. cruentus</i> L y <i>A. hypochondriacus</i> L bajos estrés salino	58
4.9 Distribución de los EST expresados diferencialmente en base a su función y proceso biológico en el que participan	66
4.10 Respuesta tiempo-específica de los ESTs expresados diferencialmente en raíz de <i>A. cruentus</i> L.	67
5. Conclusiones	75
6. Referencias	76

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>A. cruentus</i> L y <i>A. hypochondriacus</i> L.	3
Tabla 2. Producción, distribución y valor del cultivo de amaranto en México.	7
Tabla 3. Contenido de aminoácidos de la proteína de <i>A. cruentus</i> L y <i>A. hypochondriacus</i> L.	8
Tabla 4. Composición química de semilla de amaranto (por cada 100 g de muestra seca).	8
Tabla 5. Composición química de hojas de amaranto (por cada 100 g de muestra seca).	9
Tabla 6. Agentes causantes de estrés biótico y abiótico en plantas y sus efectos.	10
Tabla 7. Distribución de los suelos afectados por salinidad (en millones de hectáreas).	11
Tabla 8. Especies de amaranto mejoradas y utilizadas en México para su cultivo.	42
Tabla 9. Transcritos sobreexpresados en respuesta a estrés salino por NaCl en raíz de <i>Amaranthus cruentu</i> .L.	61
Tabla 10. Expresión diferencial de los genes inducidos por estrés salino en raíz <i>A.cruentus</i> L en diferentes tiempos después de iniciado el estrés.	70

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Esquema de la fijación de carbono en las plantas con metabolismo C4.	5
Figura 2. Vía de señalización de Ca ²⁺ actuando como segundo mensajero intracelular.	18
Figura 3. Regulación del iones Na ⁺ , homeostasis y vías de regulación activadas en durante el estrés salino.	19
Figura 4. Regulación de la homeostasis iónica por la vía de señalización SOS.	21
Figura 5. Efecto de la concentración de CaCl ₂ , en plantas de <i>A. hypochondriacus</i> L.	22
Figura 6. Efecto del estrés por CaCl ₂ en el desarrollo y en la senescencia	23
Figura 7 Estructura de la glicina-betaina.	
Figura 8. Plantas de <i>A. hypochondriacus</i> L y <i>A. cruentus</i> L en hidroponía sometidas a estrés salino con 150 mM de NaCl.	50
Figura 9. ADNc de raíz de <i>A. hypochondriacus</i> L y <i>A. cruentus</i> L.	51
Figura 10. Amplificación por PCR de los ADNc expresados diferencialmente	52
Figura 11. Análisis de restricción de las genotecas.	53
Figura 12. Concentración de Malonildialdehído (MDA) en hoja de <i>A. cruentus</i> L y raíz de <i>A. cruentus</i> L y <i>A. hypochondriacus</i> L.	55
Figura 13: Concentración de ácido ascórbico en raíz y hoja de <i>A. cruentus</i> L y <i>A. hypochondriacus</i> L.	57
Figura 14. Categorías funcionales de los genes sobre expresados en la genoteca sustractiva de <i>A. cruentus</i> bajo estrés salino	67

Abreviaturas

AcAs	Ácido ascórbico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BCIP/NBT	sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato/cloruro de tetrazolio nitro-azul
°C	Celsius
dS	<i>Decisiemens</i>
EC _e	<i>Conductividad eléctrica</i>
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ESTs	Marcador de secuencia expresada
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Gramos
GB	Glicina-betaína
ha	Hectárea
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactósido
MDA	Malonildihaldeido
mg	Miligramos
min	Minuto
mM	Minimolar
mV	Minivolts
LB	Caldo lisogenia
Pb	Pares de bases
RE	Retículo Endoplásmico
RubisCO	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOS	Salt Overly Sensitive
SSC	Citrato de sodio salino
SSH	Hibridación supresiva sustractiva
TA	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricolor acético
ton	Tonelada
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid

Resumen

Perfil de expresión a nivel transcripcional en respuesta a estrés salino en dos especies de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. y *Amaranthus hypochondriacus* L.)

La salinidad en suelo afecta el 2% de las 1500 millones de hectáreas (Ha) de tierras cultivables y al 20% de los 230 millones de Ha de tierras de riego. La alta concentración de sal en los suelos afecta el crecimiento de las plantas y ocasiona una disminución de la producción agrícola. Existen plantas que toleran y crecen en suelos salinos pero los mecanismos por los cuales estas plantas perciben y responden al estrés salino, activando la respuesta defensiva y de adaptación, no son muy claros. El amaranto, es una planta que produce semillas de alto valor nutricional y nutraceutico, por lo que en los dos últimos años el interés por su cultivo se ha incrementado en diversas partes del mundo. Desde el punto de vista agronómico, la planta de amaranto tolera la sequía y la salinidad de los suelos.

En este trabajo utilizamos dos variedades de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. y *Amaranthus hypochondriacus* L.), como modelo de estudio de la respuesta de plantas a estrés salino. El análisis de genes en respuesta al estrés salino fue llevado a cabo mediante la técnica de hibridación supresiva sustractiva (SSH), para generar genotecas sustractivas. Los resultados generados han aportado información de los mecanismos de respuesta que utiliza el amaranto para sobrevivir y tolerar el estrés salino.

PALABRAS CLAVE. Ácido ascórbico, estrés abiótico, hibridación supresiva sustractiva, macroarreglos, malonildialdehido, salinidad, sqRT-PCR.

Abstract

Transcriptomic profile in response to salinity stress in two amaranth species
(*Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus hypochondriacus* L.)

The salinity affects 2 % of the 1500 million ha of land farmed and 20% of the current 230 million ha of irrigated land. The high concentration of salt in the soil affects plant growth and causes a decrease in agricultural production. There are plants that tolerate and grow in saline soils, the mechanisms by which plants sense and respond to salt stress, activating the defense response and adaptation, are still unclear. Amaranth is a plant that produces highly nutritious seeds with nutraceutical properties, during the last years its crop was extended around the world. By other hand amaranth plant is highly tolerant to drought and soil salinity.

In the present study two varieties of amaranth (*Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus hypochondriacus* L.) were used as model to study plant salt-tolerance. Suppressive subtractive hybridization (SSH) was used to generate subtractive libraries and obtain differentially expressed genes during salt stress. Results provided information to understand the mechanisms that amaranth use to tolerate salt stress. In this study the accumulation of malondialdehyde was measured as an indicator of membrane lipid peroxidation by salt stress damage at the root of the two varieties of amaranth.

KEYWORDS. Ascorbic acid, abiotic stress, macroarray, malondialdehyde, suppression subtractive hybridization, salinity, sq-RT-PCR.

CAPÍTULO I

1. Introducción

1.1 Generalidades del amaranto

El amaranto es una planta herbácea anual que pertenece al género *Amaranthus*, es predominantemente tropical y de regiones templadas, incluye cerca de 70 especies de las cuales 40 son nativas de América y el resto se han encontrado en Australia, África, Asia y Europa. Dentro de éste género se encuentran las especies *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* que son dos de las especies más importantes para la producción del grano en México. Con un contenido de proteína de alrededor del 16%, su alta calidad biológica, el alto contenido de vitamina E, el contenido de péptidos bioactivos y su potencial agronómico como la tolerancia a sequía, estrés salino y adaptación a diversos ambientes, el amaranto se posiciona como un cultivo de alto potencial para su explotación (NAS, 1984; Espitia-Rangel *et al*, 2010) y llegar a convertirse en un cultivo básico de la misma importancia agrícola y económica como el maíz, trigo, sorgo, cebada, arroz como en el tiempo de los aztecas.

El amaranto produce granos y hojas comestibles de alto contenido de proteínas con un balance adecuado de aminoácidos esenciales, encontrándose en principalmente lisina, metionina y triptófano. Adicionalmente, el amaranto se ha empleado como planta forrajera y debido a sus colores vistosos y las formas de inflorescencia también se usan como plantas de ornato. Dado que la mayoría de los granos son gramíneas y siendo el amaranto una dicotiledónea de amplia adaptación, se convierte en una buena opción para la rotación de cultivos introduciendo mayor diversidad en campos de monocultivos (NAS, 1984; Paredes-Lopez 1990). Parte de la tolerancia a sequía del amaranto se debe a su eficiencia de fijación de CO₂ al usar la vía C₄, no presenta fotorespiración y requiere menor cantidad de agua para producir la misma cantidad de biomasa (Hauptli, 1977). La familia *Amaranthaceae* ha evolucionado, sobreviviendo a regiones cálidas, secas y con suelos salinos, la planta ha desarrollado estructuras de secreción para eliminar sales llamadas tricomas globuliformes. Se ha reportado que los

mecanismos por los cuales el amaranto evita el daño por frío y crea tolerancia a estrés salino y osmótico, involucran la reducción de la conductividad de los estomas, reducción de la pérdida de agua a través de un ajuste osmótico y síntesis de osmoprotectores como la glicina betaína (Yu-Mei *et al.*, 2004; Omami y Hammes, 2010). Sin embargo mecanismos como la captación/exclusión de iones y su compartimentalización, el ajuste energético y de metabolitos, la acumulación de enzimas antioxidantes y sobretodo el mecanismo por el cual la planta censa el estrés salino aún no han sido descritos ni caracterizados (Chinnusamy *et al.*, 2004).

1.1.1 Origen e historia del amaranto

Grubben y Sloten (1981) señalan que probablemente todas las especies para producción de grano del género *Amaranthus* tuvieron su origen en América y las especies para verdura se originaron en Asia. Pruebas arqueológicas indican que esta planta ya se cultivaba hace aproximadamente 5200 años, lo cual indica que su domesticación fue al mismo tiempo que el maíz (Mac-Neish, 1964). *A. hypochondriacus* L. y *A. cruentus* L. son dos especies empleadas para la producción de grano que se han cultivado en México desde tiempos de los Aztecas, el primero también se cultiva en los Himalaya en Nepal y en el sur de la India (Sauer, 1950 y 1967; Grubben y Sloten, 1981). El género *Amaranthus* está formado por alrededor de 70 especies, de las cuales 40 son nativas de América y solo 15 de Europa, Asia, África y Australia. El amaranto se cultivaba en el Valle de México por los Aztecas y se le daba igual importancia que el maíz y el frijol. Los Mayas de Guatemala y los Incas del Perú, Bolivia y Ecuador también cultivaban el amaranto. (Robertson, 1981).

El amaranto era empleado tanto en la alimentación como en ceremonias y ritos religiosos. Miles de toneladas de grano de amaranto eran enviadas como tributo al emperador azteca, y su importancia dentro de la sociedad y religión se hacía notar en la elaboración de panes zoomorfos (Teycen) y bebidas ceremoniales (chicha) que eran indispensables en festejos a sus dioses y en rituales de fertilidad. Esto

mismo llevó a su prohibición durante la época de la colonia por lo que decayó su cultivo (Early, 1986).

1.1.2 Taxonomía y características del amaranto

El amaranto pertenece a la familia de las amarantáceas, con 70 géneros y 850 especies. El género *Amaranthus* tiene más de 70 especies, siendo las más importantes: *Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L., *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hybridus* L., *Amaranthus tricolor* L., *Amaranthus blitum* L., *Amaranthus dubius* L. y *Amaranthus virides*. La taxonomía del amaranto se describe en la Tabla 1. Sin embargo su clasificación taxonómica es difícil debido a que la planta tiene mucha plasticidad (Espitia *et al.*, 2010). La clasificación más utilizada es la propuesta por Sauer (1950), donde el género se divide en dos subgéneros *Amaranthus* y *Acnida*. El subgénero *Amaranthus* se divide en base a su morfología (inflorescencia y la flor) en *Amaranthus* y *Blitopsis*. En la sección *Amaranthus* se incluyen otras especies: *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* (Pal, 1972).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *A. cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L.

Reino	Vegetales
División	Embryophyta siphonogama Fanerogama
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Archiclamideae
Serie	Centrospermales
Familia	Amaranthaceae
Género	<i>Amaranthus</i>
Especies	<i>cruentus e hypochondriacus</i>

Fuente: Tapia 1997.

Debido a la gran variabilidad existente dentro de cada especie usada para grano, fue necesario hacer subdivisiones llamadas razas. Las razas de *A.*

hypochondriacus son: Nepal, Mercado, Mixteco, Azteca y Picos. Las razas de *A. cruentus* son: Mexicano, Africano y Guatemalteco (Kauffman y Reider, 1984)

El amaranto es una especie anual, herbácea de colores que van del verde al morado. Su raíz presenta abundantes ramificaciones y múltiples raicillas, facilitando la absorción del agua y de nutrientes. Su tallo es cilíndrico, anguloso y ramificado, va de los 0.4 a 3.0 m, su coloración suele coincidir con el de las hojas, mientras que en otros casos su coloración es verde. Las hojas son pecioladas, sin estípulas de formas ovales, elípticas, opuestas o alternadas, nervaduras en el envés, lisas, de color verde al púrpura y de tamaño de 6.5 a 15 cm (Sumar, 1993; Tapia, 1997). La inflorescencia, de 0.5 a 0.9 m, corresponde a panojas glomeruladas, terminales, erectas o hasta decumbentes, colores del amarillo hasta el púrpura, pasando por el amarillo, anaranjado, café, rojo y rosado. La planta es predominantemente autógama, presenta flores unisexuales. La semilla es pequeña, lisa, brillante, de color blanco, dorado, rosados, púrpuras y negras (Nieto, 1990). En el grano se distinguen 4 partes importantes: episperma, endosperma, embrión (formada por los cotiledones) rico en proteínas y el perispermo rico en almidones (Irving *et al.*, 1981).

1.1.3 Fisiología y agronomía del amaranto

La planta de amaranto tiene hojas alternadas y pecioladas. La densidad estomatal en algunas especies es del 70% de la superficie epidérmica abaxial; poseen la anatomía tipo Kranz típica de las plantas con la ruta fotosintética C₄. Su tallo posee un engrosamiento secundario en donde el floema está presente dentro del xilema secundario. En cuanto a la raíz también presenta engrosamiento, alcanza una profundidad de hasta 2.4 m y se extiende 1.8 m, esto le permite tener una rápida capacidad de recuperarse después de un riego de recuperación (Kigel, 1994). Como ya se mencionó, el amaranto utiliza la vía especializada de fijación de CO₂, llamada C₄ (Figura 1). En esta ruta la primera carboxilación se produce en las células del mesófilo, el CO₂ se fija al fosfoenolpiruvato (PEP) formando ácido málico o ácido aspártico, ya en las células del haz de la vaina el CO₂ por medio de la RuBisCO carboxila a la ribulosa bifosfato formando el ácido fosfoglicérido,

comenzando con el ciclo de Calvin y la consecuente síntesis de glucosa. La función de esta vía es concentrar el CO_2 en las proximidades de la RuBisCO disminuyendo así su actividad de oxigenasa (Gil *et al.*, 1982).

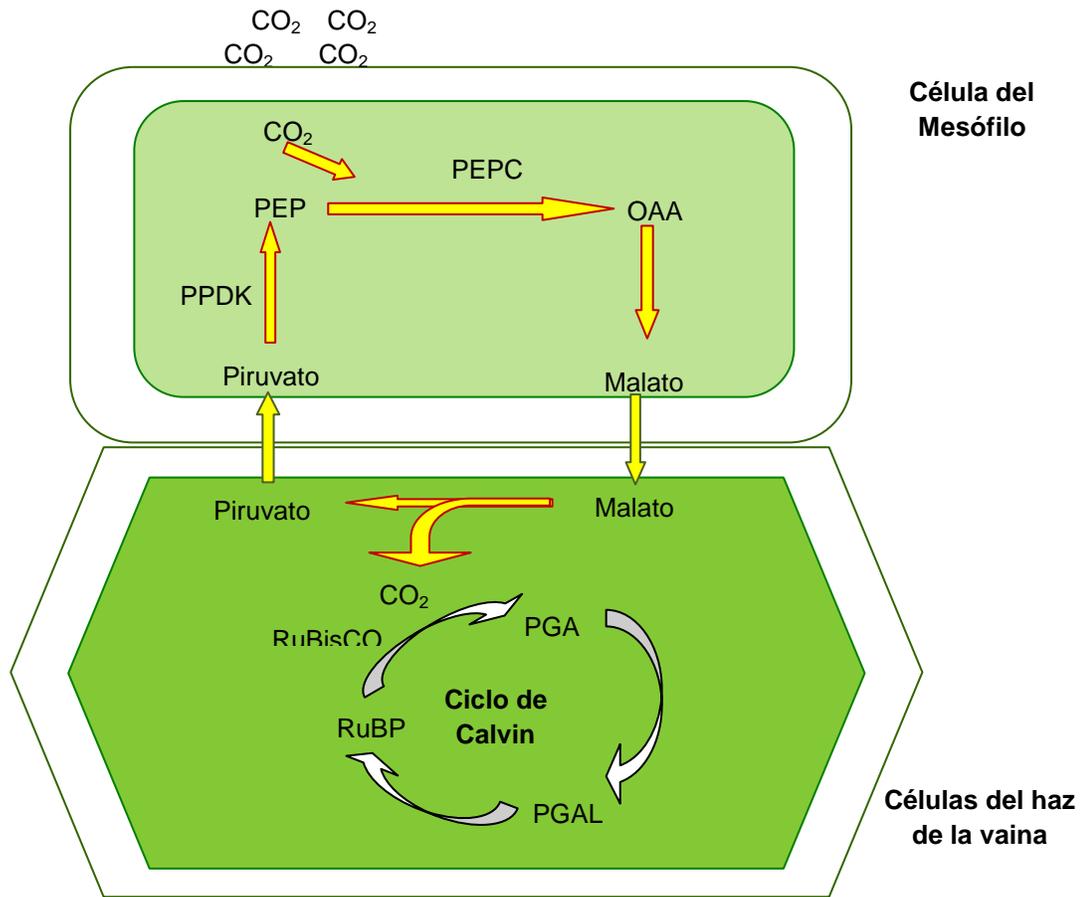


Figura 1. Esquema de la fijación de carbono en las plantas con metabolismo C_4 . El fosfoenol piruvato (PEP), fofoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), Piruvato dicinasa (PPDK), oxalacetato (OAA), 3-fosfoglicerato (PGA), gliceraldehido-3-fosfato (PGAL), ribulosa-5-fosfato (RuBP). (Modificado de Leegood, 2002).

En cuanto a su fotoperiodo las especies de amaranto son plantas sensible a la longitud del día, por ejemplo: *A. hypochondriacus* L. no florece en verano y algunas otras especies de amaranto florecen en fotoperiodos cortos (8 horas), pero no en largos (12 a 14 horas). Por el contrario *A. cruentus* L. crece en periodos largos de luz, permaneciendo por más tiempo en la etapa vegetativa.

Espitia (1992) reporta la existencia de esta variabilidad entre y dentro de las especies y señala que la sensibilidad al fotoperiodo se manifiesta en la reducción del número de hojas o en la estatura de la planta y en el acortamiento del ciclo de vida (Espitia, 1992; Kiegel, 1994).

El Amaranto es un cultivo que crece satisfactoriamente desde el nivel del mar hasta los 3200 m sobre el nivel de este, crece adecuadamente bajo temperaturas altas, su óptimo oscila en los 21°C y germina entre los 16 a 35°C. *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* son tolerantes a altas temperaturas pero son sensibles a temperaturas bajas (NRC, 1985). Las especies de amaranto se cultivan en una amplia variedad de suelos siendo el más apto para su cultivo los de tipo francos bien drenados, con un pH neutro o básico (arriba de pH 6). Algunos reportes mencionan que algunas especies de amaranto son tolerantes a salinidad y alcalinidad (Kauffman *et al.*, 1984b; NRC, 1985; Weber *et al.*, 1985). El amaranto es un cultivo que crece mejor con limitantes de agua, una baja humedad y altas temperatura, por lo que se considera como un cultivo tolerante a sequía. Por lo tanto, el amaranto se convierte en un sistema excelente para el estudio de la tolerancia a sequía y salinidad.

1.1.4 Importancia del cultivo (producción y distribución)

La nueva valoración del amaranto como cultivo, ha tomado importancia en años recientes. Tan solo de 1983 a 1986 se incrementó el área sembrada para la producción de grano, de 500 a 1500 ha. Esta tendencia continuó y a partir del 2004 volvió a crecer el número de ha destinadas a la siembra de amaranto (Espitia *et al.*, 2010). El amaranto tiene el potencial para convertirse en un cultivo básico al nivel de importancia como el maíz, sorgo, cebada, arroz, frijol y trigo, entre otros.

El cultivo de amaranto se distribuye en varios estados del país principalmente de la zona centro: Morelos, Tlaxcala, Puebla, Distrito Federal, México, Querétaro y Guanajuato. Aunque también en el sur y norte de México, Oaxaca, Guerrero, Durango, Chihuahua y San Luis Potosí. En la Tabla 2 se resumen los estados con mayor producción de amaranto en México (Barros y Buenrostro, 1997).

Tabla 2. Producción, distribución y valor del cultivo de amaranto en México.

Estados	Superficie (Ha)		Producción (Ton)	Rendimiento Ton-ha ⁻¹	Precio (\$/Ton)	Valor de la producción (\$)
	Sembrada	Cosechada				
Baja California Sur	8	3	8	2.667	2,500.0	20,000
D.F	161	161	152	0.944	2,500.0	380,000
Morelos	202	202	306	1.515	2,490.20	762,006
Puebla	286	286	346	0.860	2,183.0	755,318
Tlaxcala	160	160	277	1.371	3,992.50	1,105,922
Total Nacional	817	812	1089	1.218	2,733.10	3,023,246

Fuente: Barros y Buenrostro, 1997.

1.1.5 Valor nutricional del amaranto composición del grano y hoja

En este nuevo siglo el interés del amaranto ha incrementado debido al descubrimiento de su alto valor nutracéutico o a los reportes de los péptidos encriptados en proteínas de amaranto con actividad antihipertensiva, cáncer-preventiva y anti-diabética (Silva-Sánchez *et al.*, 2008; Barba de la Rosa *et al.*, 2009; Maldonado-Cervantes *et al.*, 2010; Velarde-Salcedo *et al.*, 2012)

El contenido de proteína del grano de amaranto es elevado y superior que el de otros cereales, El balance de aminoácidos es cercano al requerido para la nutrición humana y el cómputo aminoacídico es de hasta 85%, destacando el alto contenido de lisina, superior a otros cereales. Lo que permite una excelente complementación de aminoácidos con las proteínas de maíz, arroz y trigo (Collazos *et al.*, 1975). La Tabla 3 muestra el contenido de aminoácidos en de *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. El aceite de amaranto presenta un adecuado balance de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, contiene principalmente los ácidos oleicos y linolénico, también es una fuente de escualeno (6%) (Berganza *et al.*, 2003). En cuanto a las vitaminas el amaranto contiene tiamina, riboflavina, niacina y vitamina C. Contiene una gran cantidad de minerales principalmente calcio, magnesio y hierro esto tanto en semilla y hoja (Saunders y Becker, 1984). La Tabla 4 y 5 se muestra la composición química de la semilla y hoja de amaranto, respectivamente.

Tabla 3. Contenido de aminoácidos de la proteína de *A. cruentus* L y *A. hypochondriacus* L.

Aminoácidos	<i>A. cruentus</i> (mg de aminoácidos/ g de proteína)	<i>A. hypochondriacus</i> (mg de aminoácidos/ g de proteína)
Isoleucina	36	39
Leucina	51	57
Lisina	51	55
Metionina + Cisteína	40	47
Fenilalanina + Tirosina	60	73
Treonina	34	36
Triptófano	--	--
Valina	42	45
Histidina	24	25

Fuente: Collazos C, 1975.

Tabla 4. Composición química de semilla de amaranto (por cada 100 g de muestra seca)

Componentes (Semilla)	Contenido
Proteína (g)	12 – 19
Carbohidratos (g)	71.8
Lípidos (g)	6.1 – 8.1
Fibra (g)	3.5 – 5.0
Cenizas (g)	3.0 -3.3
Energía (kcal)	391
Calcio (mg)	130 – 164
Fósforo (mg)	530
Potasio (mg)	800
Vitamina C (mg)	1.5

Fuente: Saunders RM y Becker R, 1984; Nieto C, 1990.

Tabla 5. Composición química de hoja de amaranto (por cada 100 g de muestra seca)

Componentes (Hoja) en 100 gramos	Contenido
Materia seca (g)	13.1
Energía (g)	36
Proteína (g)	3.5
Grasa (g)	0.5
Carbohidratos totales (g)	6.5
	1.3
Cenizas (g)	2.6
Calcio (mg)	267
Fósforo (mg)	67
Hierro (mg)	3.9
Sodio (mg)	--
Potasio (mg)	411
Vitamina A (IU)	6100
Tiamina (mg)	0.08
Rivoflavina (mg)	0.16
Niacina (mg)	1.4
Vitamina C (mg)	80

Fuente: Saunders RM y Becker R, 1984; Nieto C, 1990.

1.2 Estrés biótico y abiótico

El estrés en plantas se ha definido como cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para un organismo viviente, se produce por factores ambientales externos que distan del óptimo y actúan sobre las plantas, generando una respuesta (Levitt, 1980). Se pueden distinguir básicamente dos tipos de estrés (Tabla 6): los originados por factores bióticos (Dangl y Jones, 2001; Andrade y Sadras, 2002; Hayat, 2010) y los originados por factores abióticos (Chinnusamy *et al.*, 2004; Jenks y Hasegawa, 2007; Hayat, 2010).

1.2.1 Estrés salino

La alta concentración de sal en los suelos afecta el crecimiento de las plantas y ocasiona una disminución de la producción agrícola (Liu *et al.*, 2007). La alta concentración de sales en el suelo es un problema que afecta la agricultura en todo el mundo, particularmente los cultivos de riego, este tipo de estrés afecta de manera que disminuye el potencial genético de la planta (Epstein *et al.*, 1980).

Tabla 6. Agentes causantes de estrés biótico y abiótico en plantas y sus efectos

Factor	Agente causal	Efectos
Bióticos	Insectos	Reducción de la fotosíntesis Estrés oxidativo Reducción de la producción Incremento de solutos compatibles Daño a membrana Desequilibrio iónico y redox
	Herbívoros	
	Interacciones simbióticas (Leguminosa- <i>Rizobium</i>)	
	Interacciones mutualistas	
	Plantas parasitarias	
	Nematodos	
	Bacterias	
	Virus	
	Sequia	
	Abióticos	
Temperatura (Calor y frío)		
Herbicidas y pesticidas		
Metales pesados		
Salinidad		
Radiación infrarroja e ionizante		
Electricidad, magnetismo y viento		
Estrés salino		

Fuente: Dangl y Jones, 2001; Andrade y Sadras, 2002; Chinnusamy *et al.*, 2004; Jenks y Hasegawa, 2007; Hayat, 2010.

Se estima que la salinidad afectará la mitad de las tierras cultivables para 2050 y podría ser el principal factor de la pérdida de tierras de cultivo en las próximas décadas (Wang *et al.*, 2003). De las más de 800 millones de hectáreas de tierra en todo el mundo están afectadas por una alta concentración de sal, esto equivale a más del 6% de la superficie terrestre (Rengasamy, 2002; FAO, 2008). El incremento en la salinidad en las tierras de riego se debe a los sistemas empleados y la calidad del agua, de las 230 millones de hectáreas de tierras de

riego 45 millones (20%) tienen alta concentración de sal, la Tabla 6 muestra el porcentaje y el área millones de hectáreas de los suelos salinos y sódicos (FAO, 2008). Las tierras que utilizan sistemas de riego constituyen apenas 15% del total de tierras para la agricultura, pero representan el doble de producción que las tierras de temporal, aportando una tercera parte de los alimentos del mundo (Munns y Tester, 2008).

Tabla 7: Distribución de los suelos afectados por salinidad (en millones de hectáreas).

Regiones	Área total Mha	Suelos salinos Mha	%	Suelos sódicos Mha	%
África	1,899	39	2.0	34	1.8
Asia, el Pacífico y Australia	3,107	195	6.3	249	8.0
Europa	2,011	7	0.3	73	3.6
América Latina	2,039	61	3.0	51	2.5
Medio Oriente	1,802	92	5.1	14	0.8
Norte América	1,924	5	0.2	15	0.8
Total	12,781	397	3.1%	434	3.4%

Fuente: FAO, 2008.

Según Ponnampereuma (1984), un suelo salino se define como aquél que contiene suficiente sal en la rizósfera para impedir el crecimiento de la planta. Sin embargo, el daño causado por los suelos salinos varía en cada especie, variedad, estado de crecimiento de la planta, factores del medio ambiente y la naturaleza de la sal. Actualmente se define suelo salino como aquel que tiene una conductividad eléctrica (EC_e) de 4 dS m^{-1} (decisiemen por metro) lo cual equivale aproximadamente a 40 mM de NaCl y genera una presión osmótica de aproximadamente 0.2 MPa (FAO, 1997; Munns y Tester, 2008; USDA-ARS, 2008). Comúnmente este tipo de estrés es causado por cloruros de sodio, calcio y magnesio y en menor medida por sulfatos y carbonatos (Hasegawa *et al.*, 2000).

2. Referencias

- Andrade F, y Sadras V. 2002. Plagas y cultivos. Una perspectiva fitocéntrica. En: F. H. Andrade y V. O. Sadras Eds. Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja 359-375.
- Barba de la Rosa AP, Fomsgaard IS, Laursen B, Mortensen AG, Olvera-Martínez JL, Silva-Sánchez C, Mendoza-Herrera A, De León-Rodríguez A, González-Castañeda J. 2009. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science* 49: 117-121.
- Barros C, y Buenrostro M. 1997. Amarantho, fuente maravillosa de sabor y salud. Editorial Grijalbo. Mexico, D.F. 55.
- Berganza BF, Moran AW, Rodriguez G, Coto NM, Santa Maria M, Bressani R. 2003. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Food for Human Nutrition* 58:1-6.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 55: 225-236.
- Collazos C. 1975. La composición de los alimentos peruanos: Ministerio de Salud, 5ta. Edición. Lima.
- Dangl JL, y Jones JD. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature (London)* 411: 826-833.
- Early KD. 1986. Cultivo y usos del *Amaranthus* (kiwicha) en dos centros de domesticación: México y Perú. En: V Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos. Puno, 0- 14 marzo. PISA, IID-CANADA. Puno, Perú.
- Epstein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelly DB. 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 210: 399-404
- Espitia RE, Mapes C, Nuñez C, Escobedo D. 2010. Distribución geográfica de las especies cultivadas de *Amaranthus* y sus parientes silvestres en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 427-437.
- Espitia RE. 1992. Amaranth germplasm development and agronomic studies in Mexico. *Food Reviews International* 8: 71-86.
- FAO 1997. Soil map of the World. Revised Legend. World Soil Resources Report. FAO. Rome.
- FAO. 2008. FAO Land and Plant Nutrition Management Service.
- GilF, Iriarte J, Jiménez MS. 1982. Fotosíntesis C4. Col. Maior 1. Sec. Pub. Univ. La Laguna. Tenerife.
- Grubben GJH, Sloten DHV. 1981. Genetic resources of amaranths IBPGR FAO. Rome, Italy. 57.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ, 2000. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity 51: 463-499.
- Hauptli H. 1977. Agronomic potential and meadow foam of two new crops. *California Agriculture Department* 9: 6-7.

- Irving DW, Betschart AA, Saunders RM. 1981. Morphologic studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science* 46: 1170-1173.
- Jenks MA, y Hasegawa PM. 2007. Plant Abiotic Stress. Botella. M.A., Rosado. A., Bressan. R.A y Hasegawa. P.M. Plant adaptative responses to salinity stress. Ed. Blackwell. pp. 37-70.
- Kauffman CS, Bailey NN, Volak BT, Weber LE, Volk NR. 1984. *Amaranthus* grain production guide. Rodale Reserch report NC-83-6. Rodale press, Inc. Emmaus, Pennsylvania, USA.
- Kigel J. 1994. Development and ecophysiology of *Amaranthus*. In: Paredes-López O. Ed. *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. CRC Press, Boca Raton FA. 40-73.
- Levitt J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses, Water, Radiation, Salt, and Other Stresses. Academic Press, N.Y. Vol II. 605.
- Liu N, Chen A, Zhong N, Wang F, Wang H, Xia G. 2007. Functional screening of salt stress-related genes from *Thellungiella halophila* using fission yeast system. *Physiologia Plantarum* 129: 671-678.
- Mac-Neish RS. 1964. Ancient Mesoamerican civilization. *Science* 143: 531-537.
- Maldonado-Cervantes E, Jeong HJ, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, González de Mejía E, de Lumen BO, Barba de la Rosa AP. 2010. Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides* 9: 1635-42.
- Munns R, y Tester M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- National Research Council. 1984. *Amaranth: Modern prospects for an ancient crop*. National Academy Press, Washington, DC. 80.
- National Academy of Science. 1984. *Amaranth: Modern prospects for an ancient crop*. National Academy Press, Washington D.C.
- Nieto C. 1990. El cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp) una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP, EE. Santa Catalina. Publicación Miscelánea N°52. Quito, Ecuador.
- Omami EN, Hammes PS, Robbertse PJ. 2006. Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranth (*Amaranthus* spp.) genotypes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural science* 34: 11-22.
- Pal M, y Khoshoo TN. 1972. Evolution and improvement of cultivated amaranths. V. Inability, weakness, and sterility in hybrids. *Journal of Heredity* 63:78-82.
- Paredes López O, Barba de la Rosa AP, Hernández López D, Carabez Trejo A. 1990. Amarantho: características y aprovechamiento industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D.C.
- Ponnamperuma FN. 1984. Role of cultivar tolerance increasing rice production in saline lands. In: R.C. Staples and G.H. Toenniessen (eds). *Salinity tolerance in plants: Strategies for crop improvement*. John Wiley and Sons, N.Y. 255-271.
- Rengasamy P. 2002. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42:351-61.

- Robertson KR. 1981. The General of Amarantaceae in the south eastern United States. *Journal of The Arnold Arboretum* 62: 267-314.
- Sauer JD. 1950. The grain amaranth: a survey of their history and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-616.
- Sauer JD. 1967. The grain amaranth and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-616.
- Saunders RM, y Becker R. 1984. *Amaranthus*: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. 6. Ed.Y. Pometanz. 357.
- Silva Sanchez C, Barba de la Rosa AP, León-Galván MF, de Lumen BO, De León-Rodríguez A, González de Mejía E. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1233-1240
- Sumar KL. 1993. La kiwicha y su cultivo. Centro Bartolomé de las Casas. Cusco, Perú.
- Tapia M. 1997. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. 2a Edición. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- United States Department of Agriculture- Agricultural Research Service. 2008.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Weber LE, Kauffman CS, Bailey NN, Volak BT. 1985. Amaranth grain production guide. Rodale Press Inc. Kutztown. 43.
- Yu-Mei W, Yu-Ling M, Naosuke NII, 2004. Change in Glycine Betaine and Related Enzyme contents in *Amaranthus tricolor* Under Salt Stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 30: 496-502.

CAPÍTULO II

1. Introducción

1.1 Efecto del estrés salino en la supervivencia de la planta, crecimiento y desarrollo

El estrés salino causa en las plantas dos tipos de efectos que causan la inhibición o disminución del crecimiento, la aceleración del desarrollo, la senescencia y la muerte de la planta. El primero, el efecto osmótico, es rápido y con disminución del crecimiento por causa de la sal que esta fuera de la planta. El segundo es un efecto iónico que inhibe el crecimiento de las hojas y en menor medida el de la raíz, es un proceso lento donde se acelera la senescencia y la muerte (Munns y Tester, 2008; Munns, 1993).

El efecto osmótico en la planta es el resultado de la disminución del potencial hídrico del suelo debido al aumento en la concentración de soluto en la zona de la raíz y por lo tanto la planta pierde turgencia (Guerrier, 1996; Ghoulam *et al.*, 2002). Esta alteración de la homeostasis del agua dentro de la planta ocasiona una reducción en su crecimiento, inhibición de la división la expansión celular, por la acción directa o indirecta del ácido abscísico (Munns *et al.*, 2000; Munns, 2002; Zhu, 2007). Por otro lado, el ácido abscísico causa el cierre de estomas dando como resultado la disminución de la fotosíntesis, aumento de la fotorespiración y del estrés oxidativo. Se ha descrito que el exceso de iones sodio en la superficie de la raíz, altera la absorción de iones potasio, causando la inhibición del crecimiento, pérdida de la turgencia, el potencial de membrana y la actividad enzimática (Zhu, 2007).

En la segunda fase dado por el efecto iónico, las consecuencias tóxicas se deben al aumento de la concentración de sal dentro de la planta (iones sodio y cloro). Los iones Na^+ se acumulan en las hojas viejas ocasionando un desbalance iónico que conlleva a la muerte celular. La causa de este daño se debe probablemente a que

la capacidad de acumular iones Na^+ y Cl^- en vacuolas, se ve sobrepasada (Munns, 2005).

En esta etapa los principales efectos de la acumulación de iones Na^+ en el citoplasma de las células, incluyen la alteración en la captación de K^+ , daño a las membranas, reducción de la fotosíntesis, desbalance de nutrientes, generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), afecta el transporte de electrones, disminuye la actividad enzimática para la fijación de oxígeno y muerte celular programada (Botella *et al.*, 2005 ; Munns, 2005; Zhang *et al.*, 2012; Zhu, 2007).

El estrés osmótico e iónico, conducen a un efecto metabólico secundario, el estrés oxidativo ya que incrementan la formación de radicales como el superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical oxidrilo ($\text{OH}\cdot$) (Botella *et al.*, 2005).

Los iones Na^+ se acumulan en el citoplasma generando especies reactivas de oxígeno (EROs), que inhiben la actividad enzimática, causan daño a los lípidos de la membrana y ácidos nucleicos, además de depositarse en la pared celular y deshidratar las células (Munns, 2005; Zhu, 2007).

1.2 Función del calcio y señalización en plantas bajo estrés salino

Como catión divalente el calcio (Ca^{2+}) es un nutriente esencial que se requiere para funciones estructurales tanto en la pared como en la membrana celular, además tiene la función de segundo mensajero intracelular en el citosol (Marschner, 1995).

El calcio en solución es tomado por la raíz y liberado en el tallo por el xilema, este puede llegar al citoplasma a través de las células vinculadas al plasmodesmo (simplasto) o mediante el espacio entre células (el apoplasto) (Jenks y Hasegawa, 2007; White y Broadley, 2003). Se ha reportado que una alta concentración de Ca^{2+} resulta citotóxico para la planta, es por ello que se mantienen concentraciones micromolares gracias a transportadores Ca^{2+} -ATPases y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (CAX) (Sze *et al.*, 2000; Hirschi, 2001). Estos transportadores remueven el Ca^{2+} citosólico hacia el apoplasto o lo mantienen dentro de organelos intracelulares como vacuolas o retículo endoplásmico (RE).

Cuando en el citoplasma de la célula ocurre un incremento transitorio en la concentración de Ca^{2+} libre y el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de la membrana plasmática, tonoplasto y el RE aumenta, se provoca el inicio de la respuesta celular (White, 2003; Sander *et al.*, 2002; Hirschi, 1999). El aumento de Ca^{2+} libre en el citosol (Figura 2) es esencial para la señalización de estímulos, como la luz roja, el choque térmico y la infección por patógenos, generando una respuesta biológica (Bowler y Fluhr, 2000; Perochon, 2011; Sanders *et al.*, 1999). Las condiciones de estrés abiótico, como estrés salino, inducen la acumulación de Ca^{2+} citosólico. Este Ca^{2+} media la homeostasis del Na^+ y por ende la tolerancia a sal (Tuteja, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

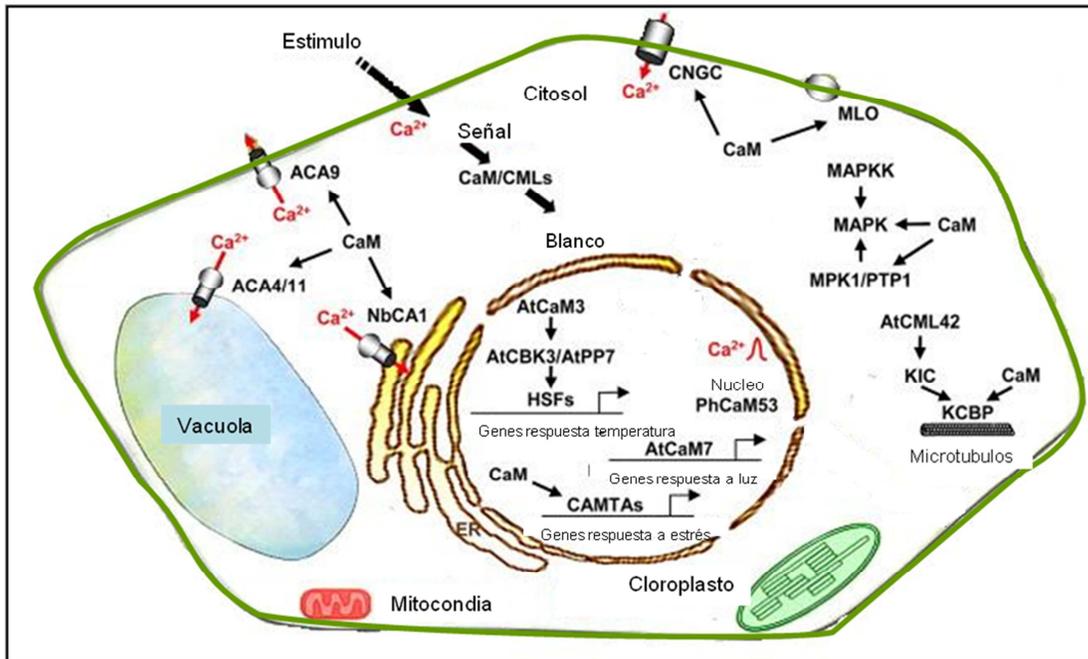


Figura 2. Vía de señalización de Ca^{2+} actuando como segundo mensajero intracelular. La señalización inicia por calmodulina (CAM) y proteínas similares a calmodulinas (CMLs). La respuesta a estímulos bióticos y abióticos, induce el aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático y se activa la transcripción de los genes de respuesta (Modificado de perochon, 2011).

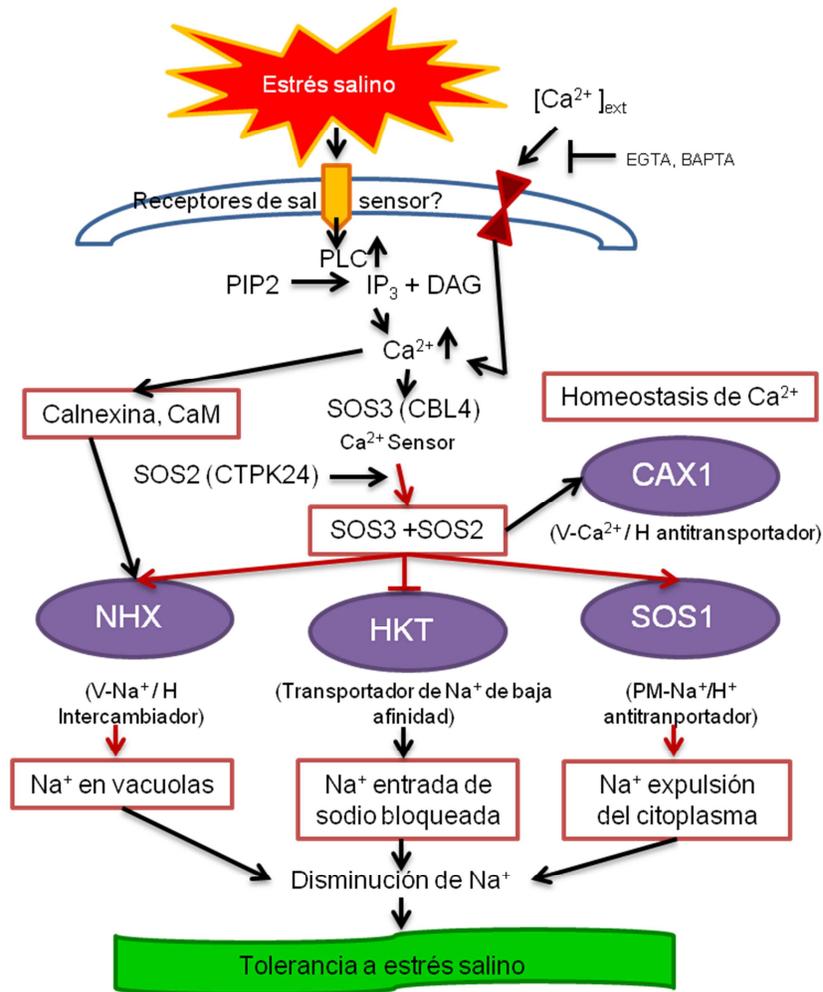


Figura 3. Regulación del iones Na^+ , homeostasis y vías de regulación activadas en durante el estrés salino. PLC=Fosfolipasa C, PIP2=fosfatidilinositol bifosfato, IP3=inositol trifosfato, DAG=Diacylglicerol, NHX =intercambiador de Na^+/H^+ , HKT= Transportador de K^+ de alta afinidad, SOS= muy sensible a sal, CAX= intercambiador de calcio. (Modificado de Tuteja, 2007).

Los eventos de señalización por calcio inician con su incremento en el citosol, en las células eucariontes es crítico restablecer los niveles basales y mantener la homeostasis del calcio para evitar los eventos de toxicidad por Ca^{2+} y terminar los eventos de señalización.

Para responder apropiadamente a esta perturbación en la concentración de Ca^{2+} la célula cuenta con tres clases de sensores (Figura 3), donde se incluyen a las

Calmodulinas (CaMs), proteínas parecidas a β -calcineurina (CBLs) y proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs). Estos sensores cambian su conformación o actividad catalítica cuando se unen a Ca^{2+} , varios reportes los sugieren como las proteínas sensores responsables de la transducción de señales (Bartels y Sunkar, 2005; Luan *et al.*, 2002; White y Broadley, 2003). En una variedad tolerante a estrés salino de arroz, se encontró que la proteína CDPK es inducida rápidamente y mantiene su expresión durante un largo periodo, en *M. crystallinum* el estrés osmótico induce a CDPK1 que interacciona con CSP1 (proteína cinasa dependiente de calcio), que es un factor de transcripción. Esta interacción sugiere que CDPKs tienen una actividad de inductor de la expresión durante el estrés osmótico y salino (Bartels y Sunkar, 2005; Kawasaki *et al.*, 2001).

Los niveles de calcio intracelular son modulados por proteínas que se unen a calcio llamadas calmodulinas que incrementan la concentración de Ca^{2+} e inducen cinasas específicas. Estas cinasas cuya activación dependen del complejo Ca^{2+} /Calmodulina son reguladas por el estrés salino, por ejemplo, la PsCCaMK es una proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina, que se sobreexpresó específicamente en la raíz en del chícharo bajo tratamiento con NaCl (Bartels y Sunkar, 2005; Pandey *et al.*, 2002)

Las Ca^{2+} -ATPasas son las enzimas encargadas de restaurar y mantener esta homeostasis. La isoforma 4 de Ca^{2+} -ATPase 4 (ACA4) es regulada por calmodulina y evidencias sugieren que esta enzima podría formar parte de la vía de señalización por calcio y solamente inducible por NaCl, confiriendo tolerancia (Bartels and Sunkar, 2005; Geisler *et al.*, 2000b).

1.3 Inducción de la respuesta a estrés por altas concentraciones de CaCl_2 .

El crecimiento, el desarrollo y la respuesta a estrés están mediados por una señalización química, siendo el Ca^{2+} uno de los principales segundos mensajeros en las rutas de señalización (Mahajan, 2008). La perturbación en los niveles de Ca^{2+} citosólico activa la respuesta a estrés (Matsumoto *et al.*, 2002), primero activando la proteína fosfatasa 2B calcineurina (PP2B), luego se transcribe el gen ENA 1 que codifica para una P-type ATPasa, responsable de la salida de Na^+

de la célula (Mendoza *et al.*, 1994). En las plantas la proteína sensora de Ca^{2+} es SOS3 (Salt Overly Sensitive), la cual es una proteína-B- parecida a calcineurina (CBL4), que se une a SOS2 (una proteína cinasa). El complejo SOS3/SOS2 activa SOS1 (anti-transportador de membrana Na^+/K^+), resultado en la salida del exceso de Na^+ , o en su compartimentalización en vacuolas y restituyendo la homeostasis iónica (Türkan y Demiral, 2009). Se ha reportado que diversos estreses abióticos tales como salinidad y estrés hídrico induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático y a su vez el Ca^{2+} dispara las respuestas celulares a estos estímulos (Figura 4) (Türkan y Demiral, 2009). Por esta razón, el estrés inducido por un exceso de Ca^{2+} se ha empleado para estudiar la respuesta a estrés en plantas.

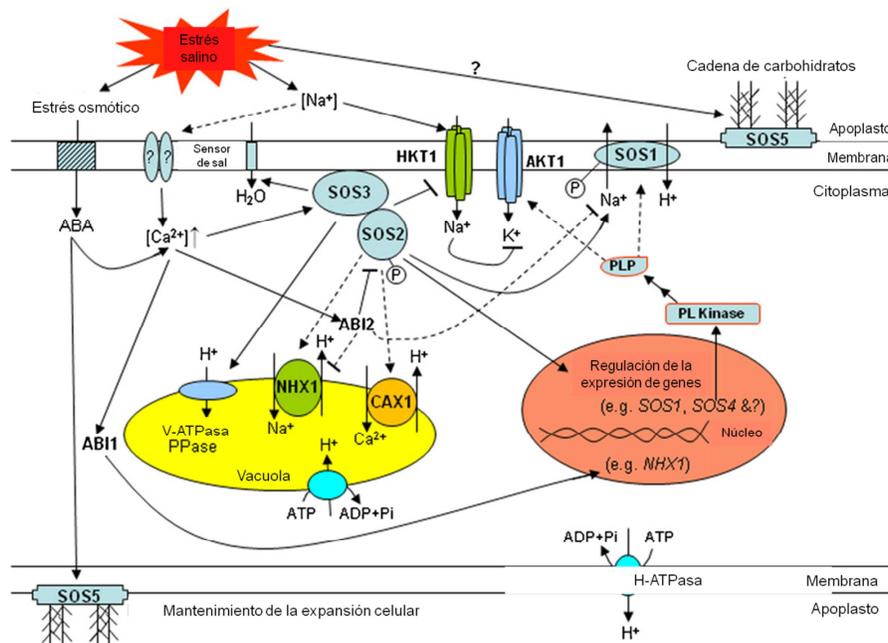


Figura 4. Regulación de la homeostasis iónica por la vía de señalización SOS. El estrés salino incrementa la concentración de Ca^{2+} , activando el complejo SOS3/SOS2, que fosforila SOS1 y regula la expresión de genes de respuesta. SOS2 activa también al anti-transportador Na^+/H^+ y a CAX1 regulando la homeostasis de Ca^{2+} . SOS4 y SOS5 participan en la regulación de Na^+ y K^+ y mantenimiento de la expansión celular, respectivamente. (Modificado de Türkan y Demiral, 2009).

La concentración de CaCl_2 para un crecimiento normal de amaranto fue determinado en un rango de 10 a 20 mM. Debajo de 10 mM y arriba de 20 mM el crecimiento de las plantas disminuyó (Figura 5). A 50 mM las plantas mostraron síntomas de clorosis, pérdida de hojas y turgencia. De estas observaciones, se determinó que la concentración de CaCl_2 para el crecimiento adecuado era de 20 mM y el estrés se logra con 50 mM CaCl_2 (Figura 6). Se ha descrito que el Ca^{2+} es absorbido pasivamente por la raíz, transportado y almacenado en las vacuolas de hojas (White PJ y MR Broadley, 2003). El efecto observado en amaranto es consistente con lo ya reportado, la pérdida de turgencia es debido a la pobre captación de agua de la planta, la alta concentración de sales en el suelo (solutos) en solución, ocasionan un choque hiperosmótico debido a la disminución del potencial hídrico, las altas concentraciones de sales en el apoplasto de la célula, ocasiona toxicidad y desequilibrio iónico e hiperosmolaridad, causando reducción de la turgencia y en consecuencia la expansión celular (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001).



Figura 5. Efecto de la concentración de CaCl_2 , en plantas de *A. hypochondriacus* L. Se observa un menor crecimiento y disminución en el número de hojas en plantas regadas con una solución mayor o menos a 20 mM de CaCl_2 .

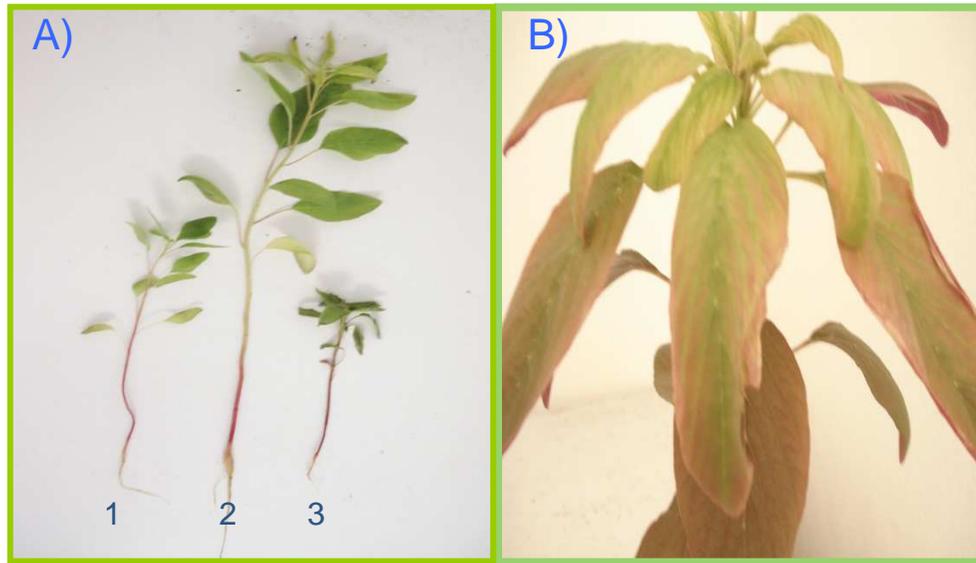


Figura 6. Efecto del estrés por CaCl_2 en el desarrollo y en la senescencia de plántulas de amaranto. A) Plántulas de *A. hypochondriacus* regadas con diferentes soluciones de CaCl_2 : 1=20mM, plantas control, 2= 50 mM, plantas estresadas por exceso de Ca^{2+} y 3=plantas regadas con H_2O , plantas estresadas por deficiencia en Ca^{2+} . B) Las hojas de las plantas estresadas con 50 mM de CaCl_2 muestran la pérdida de la turgencia y el marchitamiento general.

2. Justificación

El estrés salino es uno de los factores principales que afectan la producción y calidad de los cultivos a nivel mundial, más de una quinta parte de las tierras de cultivo se encuentran afectadas por la salinidad. La contaminación, el uso de agua con altos niveles de solutos o de fuentes freáticas ocasiona la acumulación de sales y el deterioro de las tierras de cultivo (Li *et al.* 2011).

El calcio es un nutriente esencial en las plantas, se requiere para varias funciones estructurales y en el citosol es útil como un mensajero intracelular, ya que coordina las respuestas de numerosos estímulos del medio ambiente (Mahajan, 2008), por lo que se ha descrito al Ca^{2+} como un segundo mensajero en la cascada de señalización de respuesta al estrés salino, siendo componentes de la fosforilación y desfosforilación de proteínas que participan en la percepción y traducción de señales que derivan en la adaptación de la planta, sin embargo es poco lo que se sabe sobre la función específica del calcio y aún menos se conoce el efecto una concentración elevada de CaCl_2 en la planta.

Varios cambios bioquímicos y fisiológicos se observan en las plantas estresadas, incluso antes de observarse algún daño físico. La variación en la expresión de genes es uno de esos cambios observables. Diferentes reportes han descrito el aislamiento de genes en respuesta a diferentes tipos de estrés como: sequía, UV-B, metales pesados, exceso de luz (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Jordan, 2002; Louie *et al.*, 2003). El análisis de genes expresados diferencialmente no sólo da información de la respuesta de la planta al estrés, también diagnostica y monitorea el rango y la intensidad del estrés (Tamaoki *et al.*, 2004)

El *A. hypochondriacus* L. debido a su resistencia natural a estrés abiótico, la convierte en planta no-modelo para el estudio de la variación en la expresión de genes en respuesta a estrés salino. Además, la planta de amaranto es capaz de almacenar grandes cantidades de Ca^{+2} en forma de oxalato de calcio, por lo tanto, es importante conocer la respuesta de la planta de amaranto a altas concentraciones de Ca^{+2} como inicio de la respuesta a estrés abiótico.

3. Objetivo general

Caracterizar los genes expresados diferencialmente en hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. bajo estrés inducido por Ca^{2+} .

3.1 Objetivos específicos

1. Construir genotecas sustractivas de *A. hypochondriacus* variedad Nutrisol bajo condiciones de estrés por Ca^{2+}
2. Identificar las secuencias de los genes expresados diferencialmente en estrés inducidos por Ca^{2+} .
3. Analizar la expresión de los genes expresados y reprimidos, empleando las técnicas de RT-PCR semicuantitativa.

4. Resultados

4.1 Identification of calcium stress induced genes in amaranth through suppression subtractive hybridization.

Journal of Plant Physiology 168 (2011) 2102–2109



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.de/jplph



Identification of calcium stress induced genes in amaranth leaves through suppression subtractive hybridization

Hugo S. Aguilar-Hernández^a, Leticia Santos^a, Fabiola León-Galván^a, Alberto Barrera-Pacheco^a, Eduardo Espitia-Rangel^b, Antonio De León-Rodríguez^a, Ramón G. Guevara-González^c, Ana P. Barba de la Rosa^{a,*}

^a IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología, Camino a la Presa San José No. 2055, Lomas 4a sección, 78216 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

^b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campus Bajío, Carretera Celaya San Miguel de Allende Km 9.5, Celaya, Gto, Mexico

^c CA de Ingeniería de Biosistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Cerro de las Campanas S/N C.P. 76010 Querétaro, Qro, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2011

Received in revised form 20 June 2011

Accepted 20 June 2011

Keywords:

Amaranthus hypochondriacus

Calcium stress

Subtractive cDNA libraries

Zinc finger protein

ABSTRACT

Calcium (Ca^{2+}) is a critical ion for the growth and development of plants and plays an important role in signal transduction pathways in response to biotic and abiotic stresses. We investigated the Ca^{2+} stress responsive-genes in amaranth leaves by using the suppression subtractive hybridization technique. Screening of the libraries generated 420 up-regulated transcripts and 199 down-regulated transcripts. The differentially expressed transcripts were associated with general stress response, transcription factors, gene regulation, signal transduction, and some other with unknown function. Selected genes were used to study their differential regulation by sqRT-PCR. Among the up-regulated transcripts, a fragment containing the motif of C3HC4-type RING-Zinc family was further characterized. The ORF of amaranth zinc finger protein (ANZnf) has a closer relationship with its ortholog from *Micnus communis* while is distantly related to the *Arabidopsis thaliana* C3HC4-type ortholog. We have identified a novel putative zinc finger protein along with other novel proteins such as the wall associated kinase, phosphoinositide binding protein, and rhomboid protease involved in response to Ca^{2+} stress in amaranth leaves.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Plants are exposed to environmental stresses such as drought, salinity and extreme temperatures. The survival and reproduction of plants under these adverse environments relies on stress perception and signal transduction to switch on adaptive responses (Chinnusamy et al., 2004). However the stress sensors and most of the signaling intermediates have not been identified and characterized to date. In addition, there is a lack of information regarding cross-talk between different stress signal transduction pathways in plants (Agarwal and Zhu, 2005; Chinnusamy et al., 2004). Stress signals result in cytosolic Ca^{2+} perturbations, which are unique and

precisely decoded by Ca^{2+} -sensing proteins to relay the signaling cascade (Mahajan et al., 2008; Tuteja and Sopory, 2008). Ca^{2+} serves as a second messenger, and has been described as a major factor in point of cross-talk signaling because it can be elicited by numerous abiotic and biotic stress signals (Agarwal and Zhu, 2005). Molecular, genetic and biochemical studies have demonstrated that Salt-Overly-Sensitive (SOS) is a novel signal transduction pathway involved in the perception and transduction of salt stress signals in plants. This pathway also emphasizes the significance of Ca^{2+} signal in restoring cellular ion homeostasis (Chinnusamy et al., 2004). The mechanisms giving rise to the changes in cytosolic Ca^{2+} levels, and the Ca^{2+} -stress induced genes are just beginning to be unraveled.

Several studies related to biotic and abiotic stresses have been reported using model plants such as *Arabidopsis thaliana*, rice, maize, and wheat (Zheng et al., 2004). Stress-tolerant species may have specific response mechanisms, that could be the key to the natural stress adaptation phenomena; hence some studies have focused on *Thellungiella halophila* (<http://thellungiella.org/>), among others halophytes (Sahu and Shaw, 2009; Wang et al., 2010). Although these halophytes exhibit tolerance to several stresses, they do not represent crops used as food and/or feed resources (Umehawa et al., 2006).

Abbreviations: ANZnf, *Amaranthus hypochondriacus* zinc finger protein; cDNA, complementary DNA; EST, expressed sequence tag; G.β.fbr-sw, *Gossypium hirsutum* fiber secondary wall; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; RACE, rapid amplification of cDNA ends; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; sqRT-PCR, semi-quantitative RT-PCR; SSH, suppression subtractive hybridization; SSH1, slingshot homolog 1 (a phosphoinositide binding protein); UspA, universal stress protein; WAK, wall associated kinase.

* Corresponding author. Tel.: +52 444 8342000x2082; fax: +52 444 8342010.
E-mail address: apbarba@ipicyt.edu.mx (A.P. Barba de la Rosa).

0176-1617/\$ – see front matter © 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jplph.2011.06.006

CAPÍTULO III

Efecto del estrés salino por NaCl en la respuesta transcripcional en hojas de amaranto (*A. cruentus* L.)

1. Introducción

El estrés iónico y osmótico son causados por la elevada concentración de sales solubles en el suelo, y las consecuencias de estos efectos podría conducir a la muerte de la planta (Glenn, 1999). El NaCl es la sal más soluble y abundante relacionada a este tipo de estrés, por lo mismo no es una sorpresa que todas las plantas presenten mecanismos encargados de regular su acumulación y de seleccionar nutrientes más importantes como K^+ y NO_3^- por encima de los iones Na^+ y Cl^- (Munns, 2005).

1.1 Tolerancia a estrés salino

La tolerancia de una planta a un estrés se define como la habilidad de la planta de crecer y completar su ciclo de vida en un sustrato que contiene altas concentraciones de sal soluble (Sacher y Staples., 1984).

Cuando existen altas concentraciones de sales el principal problema es el decremento del potencial osmótico (se hace más negativo y la energía libre del agua disminuye) y la necesidad de excluir el exceso de iones o de almacenar los en compartimentos o estructuras metabólicamente inertes. Además, se tiene la necesidad de distinguir los macronutrientes esenciales iónicos, como el K^+ y Ca^{2+} de los iones Na^+ y Cl^- , para mantener la homeostasis (Niu *et al.*, 1995). Una desregulación en la transpiración de la planta podría resultar en la acumulación de niveles tóxicos de iones en la parte aérea de la planta. Lo que lleva al cierre de estomas. Sin embargo, la diferencia de potencial hídrico entre la atmósfera y las células de las hojas, y la necesidad de fijación de carbono, lo convierte en una estrategia insostenible (Leister, 2005).

Existen plantas que toleran altas concentraciones de sal en el suelo (halófitas) y otras que no (glicófitas). Las primeras son plantas que crecen en presencia de elevadas concentraciones de sales, aproximadamente de 450 mM de NaCl o más

(Tester y Davenport, 2003). Las glicófitas son plantas sensibles a bajas concentraciones de sal.

1.2 Adaptación de las plantas a estrés salino

Los mecanismos de tolerancia se enfocan principalmente a tres categorías, recuperación de la homeostasis osmótica (tolerancia osmótica), control de los niveles internos de iones (Na^+) (homeostasis iónica) y tolerancia de las EROs. Los mecanismos efectores de la adaptación a estrés salino se categorizan en aquéllos que median la biosíntesis de osmolitos/solutos compatibles, biosíntesis de osmoprotectores, transporte de agua, homeostasis iónica, detoxificación de radicales libres y transducción de la respuesta coordinada a larga distancia (Hasegawa *et al.*, 2000).

1.2.1 Biosíntesis de osmolitos/solutos compatibles y osmoprotectores

La respuesta al cambio de potencial osmótico externo, es la acumulación de solutos “compatibles” los cuales no inhiben las reacciones metabólicas normales de la planta (Hasegawa *et al.*, 2000). La acumulación de estos osmolitos da protección a las estructuras y facilitan el ajuste osmótico. Los osmolitos más frecuentes son: azúcares simples (fructuosa y sacarosa) y complejos (trehalosa, fructanos y rafinosa), los polialcoholes (glicerol, inositol) y iones o metabolitos cargados (K^+ , glicina betaína, prolina y ectoína). Estos osmolitos reducen el potencial osmótico interno, contribuyendo a la tolerancia (Delaunev, 1993; Galinski, 1997; Hasegawa *et al.*, 2000). Debido a la naturaleza hidrofílica de los osmolitos, podrían remplazar el agua de la superficie de las proteína, complejos proteínicos o membranales, actuando así como osmoprotectores y chaperonas no enzimáticas de bajo peso molecular (Hasegawa *et al.*, 2000). Se ha reportado que bajas concentraciones de glicina-betaína (Figura 7), protege los tilacoides y la membrana plasmática en un estrés por congelación o temperaturas altas. Esto lleva a pensar que la actividad de osmoprotectores está ligada más a la concentración local en la superficie de los tilacoides y membrana, que a la cantidad absoluta en la planta (Zhao *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 2000).

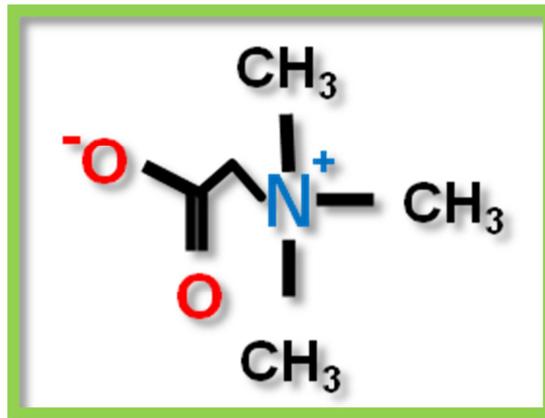


Figura 7. Estructura de la glicina-betaína.

La capacidad de acumular osmolitos puede ser un reflejo de la capacidad enzimática de la planta para continuar con varios procesos bioquímicos, siguiendo en esta idea, la ruta que conduce a la síntesis de osmolitos ó de uno en particular, podría ser más importante que la comulación de este (Hasegawa *et al.*, 2000; Bohnert *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 1998)

1.2.2 Absorción del agua y su transporte durante el estrés salino

La alta concentración de sales causa una reducción de la permeabilidad del agua en el córtex, esto reduce la permeabilidad osmótica del agua. Este cambio de la permeabilidad se refleja en un cambio de la conductividad del agua en la raíz (Hasegawa *et al.*, 2000). El estrés salino e hídrico regulan la cantidad y localización de aquaporins (AQPs) en el tonoplasto, vesículas internas y membrana plasmática, indicando la existencia de vías de señalización que regulan la entrada y salida de agua durante el estrés (Yamada, 1995; Schäffner, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000). El cambio específico en la permeabilidad del agua en plantas podría ser causado por la fosforilación de las AQP (Johansson *et al.*, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000).

1.2.3 Homeostasis iónica intracelular

Se ha demostrado que la clave para la tolerancia a salinidad es mantener niveles bajos de Na^+ en el citoplasma (Zhu, 2002). El camino más directo es el secuestro de estos iones en vacuolas. Sin embargo son varios los mecanismos utilizados por las plantas y estos deben emplearse de manera coordinada para minimizar los daños. Por ejemplo, disminuir la entrada y realizar de manera eficiente la salida de Na^+ , minimizar la concentración de sodio en el xilema o maximizar la recuperación de este antes de llegar al brote, maximizar la compartimentalización o distribución del Na^+ en hojas viejas de la planta, o incluso secretar la sal (Tester y Davenport, 2003).

1.2.4 Transporte y compartimentalización de los iones Na^+ y Cl^-

La absorción de Na^+ a través de la membrana se atribuye a los transportadores de K^+ . Los transportadores HKT1, el transportador de cationes de baja afinidad (LCT1) y los canales no selectivos de cationes son considerados como los sistemas de transporte que median la entrada de Na^+ a la célula (Amtmann *et al.*, 2001; Tester y Davenport, 2003; Zhu, 2003). Una vez que el Na^+ entra a la célula disipa el potencial de membrana, facilitando la entrada de Cl^- . Sin embargo este estado se restablece regresando al potencial negativo de -120 a -200 mV (Poole, 1988; Hasegawa *et al.*, 2000). La utilidad del Na^+ como un osmolito vacuolar en ambientes salinos, podría ser la razón por la cual las plantas no tienen sistemas que excluyen completamente al Na^+ cuando se absorbe K^+ .

Otra de las estrategias utilizadas por las plantas para hacer frente a esta entrada de Na^+ , es el uso de antitransportadores dependientes de energía, estos antitransportadores de membrana usan la fuerza motriz de los gradientes de H^+ generados por la H^+ -ATPase de membrana para expulsar el Na^+ del citoplasma de la célula (Blumwald *et al.*, 2000; Vitart *et al.*, 2001).

La compartimentalización en vacuolas de los iones Na^+ y Cl^- es un mecanismo de adaptación conservado en halófitas y glicófitas, esto probablemente se debe a que la expansión vacuolar es importante para el alargamiento celular y esta estrategia además reduce la concentración de los iones Na^+ y Cl^- en el citoplasma de la

célula (Hasegawa *et al.*, 2000). El transporte de Na^+ en vacuolas está mediado por los antitransportadores de catión/ H^+ que son dirigidos por el gradiente de H^+ generado por las enzimas H^+ -ATPase y H^+ -pirofosfatasa (Gaxiola *et al.*, 2002). En las plantas se ha encontrado que el antitransportador funciona compartimentalizando el Na^+ en vacuolas (Aspe *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000).

1.2.5 Protección y respuesta al daño por estrés oxidativo

El estrés salino causa la reducción de la fotosíntesis, incrementa la reducción de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y el cloroplasto, incrementa la fotorespiración, la oxidación de ácidos grasos, y la peroxidación de la pared celular. Estos procesos están acompañados con la rápida generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), los cuales desequilibran el balance redox de la célula provocando estrés oxidativo que daña los lípidos de membrana, las proteínas, los ácidos nucleídos y otras estructuras celulares (Parida y Das, 2005; Zhan *et al.*, 2012). Las plantas para controlar y eliminar estos EROs producen moléculas de bajo peso molecular como ácido ascórbico, glutatión y tocoferoles, también hay una respuesta enzimática incrementándose la actividad y la síntesis de las enzimas encargadas de su detoxificación, como la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa, las catalasas, el glutatión-S-transferasas y varias peroxidasas. La acción coordinada de las moléculas antioxidantes y de las enzimas en los diferentes compartimentos de la célula, recuperan el balance entre la formación y remoción de los EROs y mantienen los niveles de H_2O_2 requeridos para la señalización celular (Chinnusamy *et al.*, 2004; Munns y Tester, 2008).

El daño por estrés es revertido por la planta al incrementar la expresión de proteínas llamadas osmotinas y deshidrinas, que tienen propiedades similares a las chaperonas (Igram y Bartels, 1996). Estas proteínas generalmente son muy hidrofílicas y tienen estructuras con espirales al azar. Además se ha observado que la sobreexpresión de la proteína abundante de la embriogénesis tardía (LEA), tiene propiedades similares a las chaperonas, estas mantienen la estructura de otras proteínas durante el estrés. Se ha demostrado que las LEA de cebada,

confieren tolerancia a el estrés salino en el arroz transgénico (Ingram y Bartels, 1996; Xu *et al.*, 1996). También se ha observado que la sobreexpresión constitutiva en tabaco de una proteína de choque térmico proveniente de una cianobacteria halotolerante (*Aphanothece halophytica*) incrementa la tolerancia a altas concentraciones de sales y reduce las concentraciones de Na⁺ en el tallo (Sugino *et al.*, 1999).

1.2.6 Transducción de señales durante el estrés salino

La señalización durante el estrés salino involucra, la señalización iónica y la osmótica, para coordinar la división celular y la expansión. Las principales vías de señalización que se encienden son la vía de señalización muy sensibles a sal (SOS), la dependiente de Ácido Abscísico (ABA), la ruta de señalización por Ca²⁺, proteína cinasas, señalización vía fosfolípidos, etileno (ET), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA).

Las señales de estrés salino son percibidas por receptores/sensores y son transmitidas a través de la fosforilación de proteínas mediada por proteínas cinasas, y/o proteínas-G. Se ha encontrado que el receptor de etileno (ETR) y el factor de crecimiento transformante (TGF) son inducidos por el estrés salino en *T. aestivum* (Zhang *et al.*, 2012 Peng *et al.*, 2009). Otro ejemplo es la estimulación de proteínas-G, proteínas-G pequeñas y 3 isoformas del receptor de proteína cinasa (RPK) identificadas en *A. thaliana*, *D. salina* y *Oryza sativa* bajo condiciones de salinidad (Zhang *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Se ha reportado la activación de la señalización vía fosfolípidos en el estrés salino, incrementándose los niveles de inositol 1,3,4-trifosfato 5 y 6 cinasa, enzima necesaria para la síntesis de inositol fosfato y para la fosforilación de factores de transcripción (Ndimba *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

1.2.7 Señalización dependiente de ABA

La fitohormona ABA funciona como un mensajero en el control de agua de la planta en el estrés osmótico. Pero su función principal es la señalización celular regulando el crecimiento y el cierre de estomas durante un estrés salino/osmótico

(Munns y Tester, 2008). Se conocen dos rutas de inducción de genes mediada por ABA, estas dos ruta se diferencian en los elementos en *cis* que tienen los promotores activados por ABA (Bartels y Sunkar, 2007). Los elementos regulatorios llamados elementos de respuesta a ABA (ABRE), han sido identificados en el promotor de varios genes, el núcleo de estos elementos en *cis* es el motivo CACGTG llamado G-box, el cuál funciona como elemento regulador de la transcripción de genes de plantas y es estimulado por ABA. Esta activación ocurre debido a varias señales ambientales entre ellas el estrés salino. Existen otros elementos activados en combinación con ABRE y necesariamente activados por ABA llamados complejos de respuesta a ABA (ABRC), conformados de un elemento de acoplamiento y un elemento ABRE capaz de activarse y conferir la transcripción por ABA (Bartels y Sunkar, 2007).

1.2.8 Comportamiento del ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico durante el estrés salino

El entrecruzamiento entre las rutas de señalización de ABA, JA, ET y SA es un importante proceso de transmisión de señales de las plantas para hacer frente al estrés salino. En general el JA y ET están involucrados en la respuesta a estrés por daño mecánico, por salinidad, por sequía y por patógenos causantes de la necrosis. SA está involucrado en una respuesta general de defensa a estrés y a daño por patógenos biotróficos (Takeuchi *et al.* 2011; Zhang *et al.*, 2012), pero aún no se conocen los componentes moleculares y como estos trabajan juntos para hacer frente al estrés biótico o abiótico, pero se ha descrito que de alguna manera todas las vías de señalización inducidas por diferentes tipos de estreses se entrecruzan y activan una respuesta general (Zhang *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la sal regula la síntesis de MAPKs en *A.thaliana* y en *L. sativus*. Estas MAPKs funcionan como reguladores negativos del SA y reguladores positivos de JA activando la expresión de genes dependientes de JA. Reportes mencionan que las MAPKs están involucradas en la integración de las señales dependientes de SA y JA en respuesta contra patógenos u otros tipos de estrés (Takeuchi, 2011; Zhang, 2012).

Las proteínas relacionadas con patogenicidad (PR-proteínas) son un tipo de proteínas que se expresan durante el estrés, su inducción está regulada por JA/ET o por SA. Se ha reportado que *A. thaliana* en respuesta a estrés salino expresa el gen *AtPR12* que codifica para una proteína reguladora (PR), inducida por la señalización de JA/ET y *AtPR1* es inducida por SA. En arroz la proteína OsPR10 incrementó su expresión por JA/ET pero el efecto de SA es la represión de esta proteína (Koornneef *et al.*, 2008; Zhang *et al.* 2012).

1.3 Amaranto como organismo tolerante a estrés salino

El amaranto crece en suelos poco fértiles, en medioambientes semiáridos y es capaz de crecer en suelos salinos (Macler *et al.* 1990; Shimose *et al.* 1991). Es una planta tolerante a salinidad y a sequía, se ha demostrado que las variedades *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* sobreviven en soluciones con una concentración de 200 mM de NaCl (Omami *et al.*, 2006; Huerta-Ocampo *et al.*, 2009;), por lo que se convierte en un buen modelo para el estudio de la tolerancia a estrés salino.

El amaranto es una planta dicotiledónea con un metabolismo C₄, es un cultivo alternativo debido a su capacidad de adaptarse al medioambiente, crecer y producir semillas con alto valor nutritivo y con propiedades nutraceuticas (Barba de la Rosa *et al.*, 2009). Su valor energético es mayor que otros cereales y su grano contiene un valor elevado de proteína (12 a 19 %), es rico en calcio, fósforo, potasio. Además las hojas de amaranto contienen altos niveles de calcio, potasio, Vitamina A y Vitamina C (Saunders y Becker, 1984).

A. cruentus L. es originaria de América Central y del sureste de México, la variedad de semilla clara (blancas o amarillas) es la especie más empleada para la producción de grano. Las plantas con semillas de color oscuro son utilizadas como verduras u ornato (Grubben y Sloten, 1981). *A. hypochondriacus* L. es originaria de México y fue una especie importante cultivada desde tiempos de los aztecas para la producción de grano, Actualmente se continúa cultivando en México, en Nepal y sur de la India. La semilla presenta coloraciones de color blanco, dorado, café y negro. Es usada para la producción de grano y como planta

ornamental (Sauer, 1967; Grubben y Sloten, 1981). La Tabla 6 muestra las especies, razas y variedades utilizadas en México para su cultivo.

Tabla 8. Especies de amaranto mejoradas y utilizadas en México para su cultivo.

Espece	Raza	Variedad	Características
cruentus	Mexicana	Amaranteca	Maduración precoz, uniformidad en altura y madurez, apta para cosecha mecánica, tiene un fotoperiodo neutro
cruentus	Mexicana	Dorada	Precoz para zonas tropicales, uniformidad en altura y madurez, se puede cultivar en invierno, apta para cosecha mecánica.
hypochondriacus	Azteca	Nutrisol	Alto rendimiento, semilla de color blanco, uniformidad en madurez y altura. Uso en la producción de dulces, cereales, harinas, leches, etc.
hypochondriacus	Nepal	Rojita	Precoz para valles altos, potencial para zonas de baja precipitación, semilla color marfil, madurez y altura corta. Uso en la producción de harinas, leches, atoles, etc
hypochondriacus	Mercado	Revancha	Apta para cosecha mecánica, semilla de color blanco, altura y madurez intermedia, alto rendimiento de grano y sustentabilidad del cultivo.

Fuente. Espitia et al., 2010.

2. Objetivo general

Obtener el perfil de expresión a nivel transcripcional en raíz de *Amaranthus cruentus* L. y *Amaranthus hypochondriacus* L. sometidas a estrés salino con NaCl .

2.1 Objetivos específicos

1. Montar la técnica de hidroponía para el cultivo de amaranto y determinar la concentración a la cual las dos variedades de amaranto son tolerantes a NaCl.
2. Determinar el daño causado por el estrés salino en las membranas de las células de amaranto mediante la cuantificación de malonildialdehído.
3. Construir genotecas sustractivas de raíz de *A. cruentus* L. y de *A. hypochondriacus* L. de plantas sometidas estrés salino.
4. Evaluar el patrón de expresión de los genes obtenidos en las genotecas sustractivas en raíz de *A. cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L. a diferentes tiempos posteriores al inicio del estrés.

3 Materiales y métodos.

3.1 Condiciones de crecimiento de plantas de amaranto

En este estudio utilizamos semillas de *A. cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L. del INFAP, Campus Guanajuato. Las semillas se germinaron en tierra (Special Blend SunGro Horticulture, Bellevue, CA) a temperatura ambiente durante semana y media. Posteriormente, las plántulas de 3-4 hojas verdaderas que presentaban igual tamaño fueron seleccionadas se trasplantaron al sistema de hidroponia y se mantuvieron 5 semanas en invernadero. El estrés con NaCl se aplicó para obtener una concentración final de 150 mM en el medio. Se tomaron muestras de planta completa control y plantas problema a las 0 horas, 15 min, 1, 3, 6, 12, 24 y 168 h posteriores al inicio del estrés. Las plantas se congelaron con nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.2 Aislamiento del ARNm y síntesis del ADNc

Las raíces de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* se molieron utilizando mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. El ARNm se extrajo de 0.5 g de raíz de plantas (control y problema) de 15 min de exposición al estrés. Se utilizó el kit RNAeasy (QIAGEN, Austin, Texas, USA), que permite obtener una gran cantidad de ARN y moléculas mayores a 200 pb, con lo cual se asegura un enriquecimiento de ARNm, sobre el ARNr y el ARNt. Además se utilizó el método alternativo de extracción de ARN total con cloruro de litio y empleando las columnas para aislar ARNm “Oligotex mRNA Midi kit” (QIAGEN).

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 200 ng de ARNm de cada una de las plantas en el estudio. Para la síntesis de la primera y segunda cadena de ADNc se empleó el sistema SMART™ PCR cDNA synthesis kit (Clontech, CA, USA) y la Super Script™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA, USA). Para la síntesis de la segunda cadena de ADN se optimizó el número de ciclos de PCR y las condiciones de amplificación para obtener la mayor cantidad de ADN de doble cadena.

3.3 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH).

La SSH se llevó a cabo siguiendo el protocolo del sistema PCR select™ subtraction kit (Clontech). Para obtener los genes que se sobre expresan en estrés salino con NaCl, se utilizó como control el ADNc de raíz de plantas de amaranto regadas con solución nutritiva y como problema el ADNc de la raíz de amaranto estresada con 150 mM NaCl. Para obtener los genes que disminuyen su transcripción durante el estrés salino, se utilizó como control el ADNc de la condición 150 mM NaCl y como problema ADNc de la condición regada con solución nutritiva. Todos los ADNc se digirieron con la enzima *RsaI* y el ADNc problema en cada caso fue ligado a diferentes adaptadores. Para normalizar y enriquecer los ADNc expresados diferencialmente se realizaron dos ciclos de hibridación y amplificación por PCR.

3.4 Construcción de las Genotecas sustractivas

Para la construcción de las genotecas sustractivas de hojas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* estresadas con NaCl, los fragmentos de los genes obtenidos por medio de la SSH, se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy (Promega, WI, USA). Las células competentes de *Escherichia coli* Top 10 se transformaron por choque térmico con la ligación pGEM-T-fragmento amplificado. Las cepas transformadas fueron plaqueadas en cajas de Petri con LB/ampicilina (100 µg/mL) conteniendo 0.08 mg/mL de X-gal y 0.1 mM de IPTG. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se seleccionaron las colonias blancas (con inserto), que fueron inoculadas en medio líquido LB-ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche a 37°C. Los plásmidos fueron recuperados y se realizó un ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* para comprobar que los plásmidos recuperados de cada clona contenían inserto. Las clonas positivas fueron guardadas en glicerol estéril al 60% en el ultracongelador.

3.5 Construcción del macroarreglo

Para la generación del macroarreglo se utilizaran 10 µg del ADN plasmídico que contiene los fragmentos de los genes obtenidos de la genoteca sustractiva. Se

fijaron a una membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham Biotech, NJ, USA), con la ayuda de la cámara Manifold (la membrana se marcó con un lápiz para saber su envés y su revés). La cámara se limpió con 0.1N NaOH, se enjuagó con agua estéril y se secó. Se colocaron 2 papeles 3M en el fondo de la cámara Manifold humedecidos con agua estéril, encima se colocó la membrana de nylon, marcando su extremo superior derecho y se cerró la cámara evitando dejar fugas. Las muestras se ajustaron a un volumen de 20 µL con agua MilliQ estéril y se incubaron en el termociclador a 100°C/8 min y luego 5 a 10 min en hielo. Las muestras se centrifugaron y se cargaron en la membrana aplicando vacío a la cámara (evitar tocar con la punta la membrana). Como control de hibridación se cargaron 200 ng de la condición problema o problema según sea el caso, como control de carga y positivo se utilizó el gen de actina, control inespecífico el Vector pGEM T-Easy (Promega), sin ningún fragmento y como control negativo agua MilliQ estéril (donde están resuspendidos los genes amplificados).

3.5.1 Síntesis y marcaje de la sonda de ADNc con fluoresceína

El ARN de la raíz de *A. cruentus* de las muestras control (sin estrés salino) y problema (150 mM de NaCl) se extrajo por el método de Trizol. Una vez obtenido y purificado el ADNc se tomaron 3 µg de ADNc, se llevaron a un volumen de 20 µL con H₂O MilliQ-DEPC, se desnaturalizaron en el termociclador a 100°C/10 min y se colocaron en hielo por 10 min. La siguiente mezcla de reacción fue preparada como sigue:

Agua MilliQ estéril-----	9.4 µL
Buffer enzima-----	5 µL
Mezcla de nucleótidos marcados-----	10 µL
Primer random-----	5 µL
cDNA desnaturalizado-----	20 µL (3 µg)
Enzima Klenow-----	0.6 µL (5 U/ µL)
Total-----	50 µL

La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 16 h y se termina al incubarse 10 min a 75°C y se guarda a temperatura de reacción se guarda a -20 °C en oscuridad hasta su uso.

3.5.2 Comprobación del marcaje de ADNc

Se prepararon diluciones 1:5, 1:10, 1:25 y 1:50 de los 5X nucleótidos-fluoresceína, en buffer TE (Tris-EDTA). En una membrana de nailon Hybond-N+ se colocaron 5 µL de las diluciones y 5 µL de las muestras de ADNc marcadas con fluoresceína. Una vez absorbidas, las membranas se lavaron con 2X SSC a 60 °C/15min en agitación. La fluorescencia se observó en el transiluminador y la intensidad de las muestras marcadas se comparó contra las diluciones de los nucleótidos-fluoresceína.

3.5.3 Hibridación y detección de la señal

Las membranas se pre-hibridaron a 60°C/30 min en un horno de hibridación (marca, ciudad, estado, país) con agitación constante, en bolsas de hibridación con buffer de Pre-hibridación (5X SSC, 0.1 % SDS, 5% Sulfato de dextran y 1:20 líquido de bloqueo) a razón de 0.3 mL de buffer/cm² de membrana. El ADNc marcado se desnaturalizó a 100°C/5min y se colocó en hielo por 5 min. Posteriormente se añadió al buffer de pre-hibridación 50 µL de ADNc marcado y se incubó a 60°C/16 h en el horno de incubación con agitación constante. La membrana se lavó dos veces a 60°C/15 min con 50 mL del Buffer de lavado 1 (1X SSC y 0.1 % w/v de SDS) y una vez a 60°C/15 min con el buffer de lavado 2 (0.5 X SSC y 0.1 % w/v de SDS).

Para el revelado, la membrana se incubó con buffer A pH 7.5 (100 mM Tris-HCl + 150 mM NaCl) más líquido de bloqueo (ROCHE, IN, USA) diluido 1:10, durante 1h a temperatura ambiente (TA) y con agitación constante. Posteriormente la membrana se incubó con anti-fluoresceína-AP conjugada 1:5000 en 0.5 % de BSA + 18.89 mL de buffer A + 1 mL de líquido de bloqueo durante 1 h a TA con agitación constante. El anticuerpo se removió con 3 lavados de 0.3% (w/v) Tween-20 en buffer A (2 a 5 mL/cm² de membrana) durante 10 min a TA con agitación.

Para generar la señal, se adicionó a la membrana el sustrato de la fosfatasa alcalina BCIP/NBT (140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 335 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se colocó en una superficie plana y se agitó durante 15 min. La imagen se adquirió con el fotodocumentador Kodak Co, NY, USA).

3.6 Cuantificación de malonildialdehído raíz de amaranto

El tejido (1 g) se pulverizó con un mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se colocó en un tubo centrífuga de 30 mL. El tejido se homogenizó con 5 mL de 0.5% w/v ácido tiobarbitúrico en una solución al 20 % de ácido tricloroacético (la relación que se sigue es 1 mL por cada 200 mg de tejido). Se incubó a 95°C/30 min, la reacción se detuvo al colocarla en hielo por 10 min, se centrifugó a 10000g/30min/4°C y se recuperó el sobrenadante. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro (Agilent, CA,USA) a 532 nm y a 600 nm se leyó la absorción no específica. La concentración de malonildialdehído se determinó por el coeficiente de extinción de 155 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.7 Cuantificación de ácido ascórbico en hoja y raíz de amaranto

Se trituró un gramo de tejido con 5 mL de 10% de TCA por 2 min, el tejido molido se centrifugó a 3500 rpm/15min/TA. Al sobrenadante se agregaron otros 5 mL de 10% TCA y se centrifugó a 3500 rpm/15min/TA, los sobrenadantes se mezclaron y se aforó a 10 mL con 10%TCA. De esta solución se tomó una alícuota de 0.5 mL y se le añadió 1 mL de 2,4 Dinitrofenilhidrazina-Tiourea-Sulfato de cobre, se incubó en baño maría a 37°C por 3 h. Enseguida se colocó en hielo y se añadieron 0.75 mL de H_2SO_4 al 65% de frío, se mezcló con vortex y se incubó a 30 °C en baño maría. El color formado se midió en espectrofotómetro a 520 nm. Previamente se realizó una curva estándar con ácido ascórbico (AcAs), el resultado se reportó en mg hoja o raíz/g de peso fresco.

4. Resultados y Discusión

4.1 Respuesta morfológica del amaranto a estrés salino

Se evaluó la respuesta de dos especies de amaranto crecido en hidroponia a diferentes concentraciones de NaCl (50, 100, 105, 200, 300, 400 mM), observándose que la concentración máxima de sal a la cual las dos especies de amaranto fueron tolerantes fue de 150 mM de NaCl. En las dos especies de amaranto, a concentraciones mayores a 150 mM de NaCl, se observó la presencia de daños morfológicos como la pérdida de turgencia, senescencia de hojas y disminución del tamaño de la planta, sin embargo el efecto fue más marcado en la variedad de *A. hypochondriacus*. Las plantas de amaranto con 150 mM de NaCl mostraron una ligera pérdida de turgencia al momento del inicio del estrés, pero se recuperaron a las 24 h después de la aplicación del estrés. Durante las 168 h posteriores del inicio del estrés la variedad de *A. cruentus* continuo turgente y desarrollándose de manera similar a las plantas control (Figura 8). Sin embargo la variedad de *A. hypochondriacus* evidenció signos de clorosis, marchitamiento y pérdida de hojas, Signos fisiológicos del daños por estrés salino.

La primera etapa del estrés salino (fase iónica) ocasiona la reducción de la tasa de crecimiento, disminuye la expansión celular, el crecimiento de nuevos brotes, y ocasiona la clausura de estomas. En la etapa ion-específica del estrés salino (inicia varios días ó semanas después), inicia con la acumulación de sal en hojas viejas, aumenta la senescencia, disminuye la fotosíntesis, la síntesis de carbohidratos y el crecimiento de nuevas hojas, la acumulación de Na⁺ y Cl⁻ ocasiona destrucción de la pared celular, se afecta la cadena transportadora de electrones, incrementa la fotorespiración y la producción de EROs. La acumulación de EROs en el citoplasma genera inhibición enzimática y oxidación de lípidos de membrana (Munns y Tester 2008; Zhang *et al.*, 2012). Estos efectos fisiológicos fueron observados en las plantas de amaranto, sin embargo, el efecto de recuperación, el continuo crecimiento, la aparente mínima diferencia en el tamaño de la planta problema con respecto a la planta control y la poca senescencia de hojas coincide con las observaciones fisiológicas reportadas en

las especies tolerantes a estrés salino (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns y Tester 2008).

A. hypochondriacus L.

A. cruentus L.

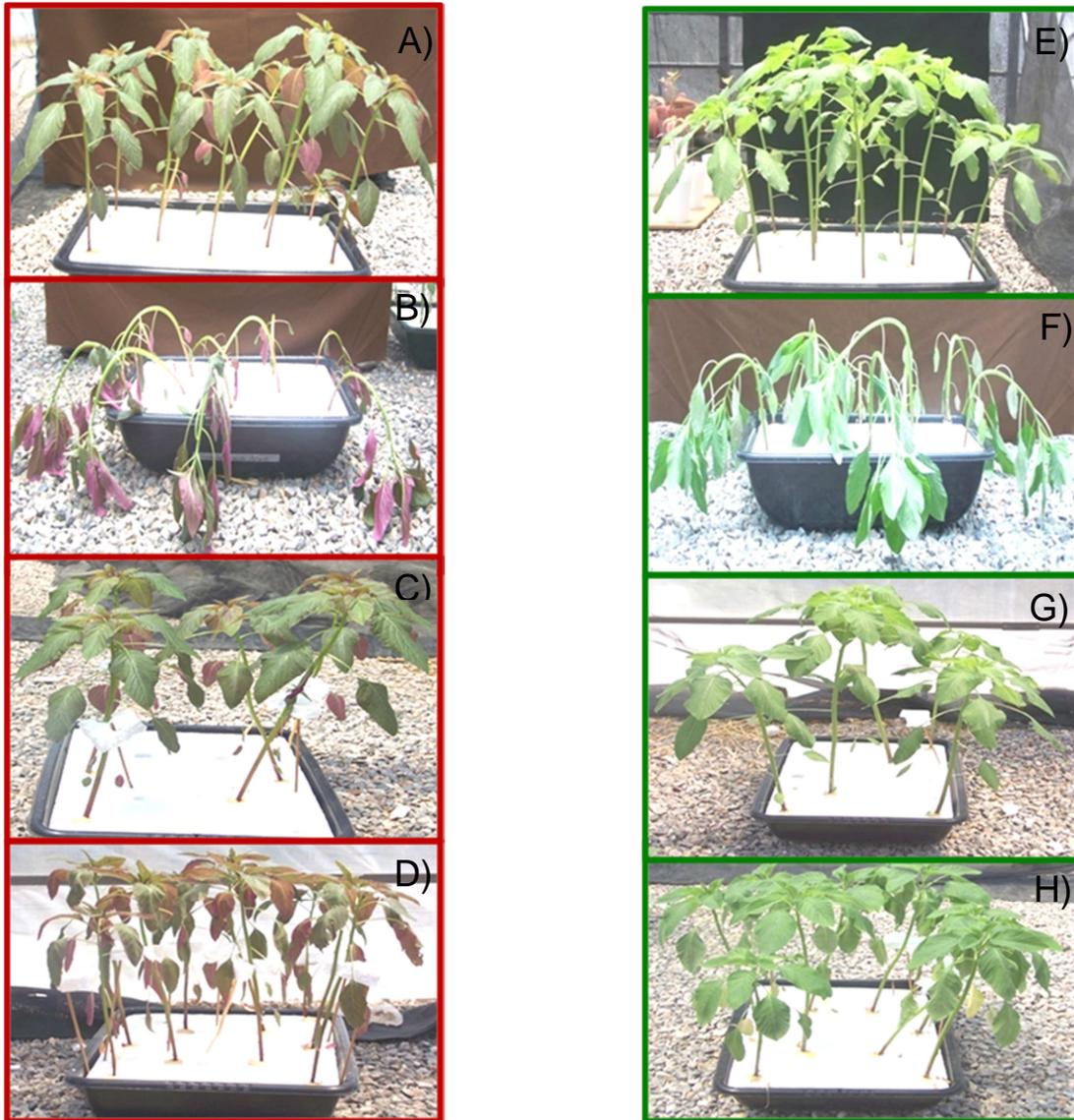


Figura 8. Plantas de *A. hypochondriacus L.* y *A. cruentus L.* crecidas en hidroponía y sometidas a estrés salino con 150 mM de NaCl. Figuras a) y e) plantas control. Figuras b) y f) se observa la pérdida de turgencia en las dos variedades de amaranto una hora después iniciado el estrés, Figuras c) y g) se observa la recuperación de la turgencia de las plantas dentro de las 24 h posteriores al inicio del estrés. Figura d) y h) plantas de amaranto a las 168 h de exposición al estrés salino.

4.2 Síntesis de ADNc para la construcción de las genotecas sustractivas

De las plantas obtenidas tanto del control como del problema se extrajo ARNm de la raíz de las dos variedades. Para la genoteca sustractiva solo se obtuvo ARNm de raíz de plantas control y problema estresados a los 15 min después del estrés salino. Para corroborar la integridad del ARNm extraído, se corrió un gel de agarosa-formaldehído las bandas correspondientes a ARNr 28S y 18S se observan en la proporción 2:1 lo que nos habla de la integridad de la preparación del ARN (dato no mostrado).

A partir de este ARN se sintetizó el ADNc (Figura 9) de hojas de raíz de amaranto de las dos variedades *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*.

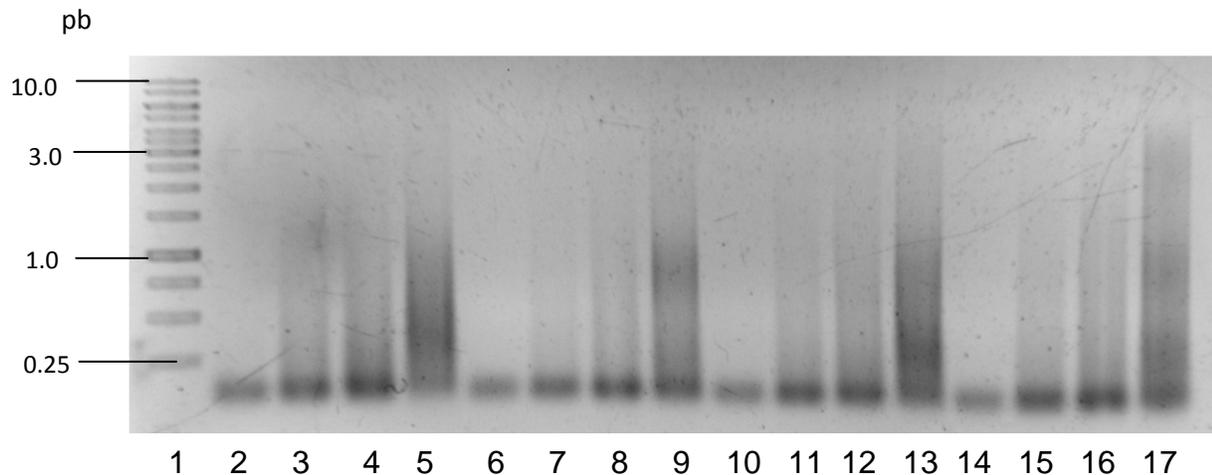


Figura 9. ADNc de raíz de amaranto. Carril 1=marcador de peso molecular, carriles 2 a 5=ADNc de raíz de *A.cruentus* crecidos con 150 mM de NaCl, carriles 6 a 9= ADNc de raíz *A. cruentus* control, carriles 10 a 13=ADNc de raíz *A. hypochondriacus* crecidos con 150 mM NaCl, carriles 14 a 17=ADNc de raíz *A. hypochondriacus* control.

4.3 Hibridación y amplificación por PCR para la normalización y enriquecimiento de los ADNc expresados diferencialmente

Para normalizar y enriquecer los ADNc expresados diferencialmente se realizaron dos ciclos de hibridación y dos ciclos de amplificación por PCR, obteniéndose los fragmentos de genes diferencialmente expresados en cada condición (Figura 10).

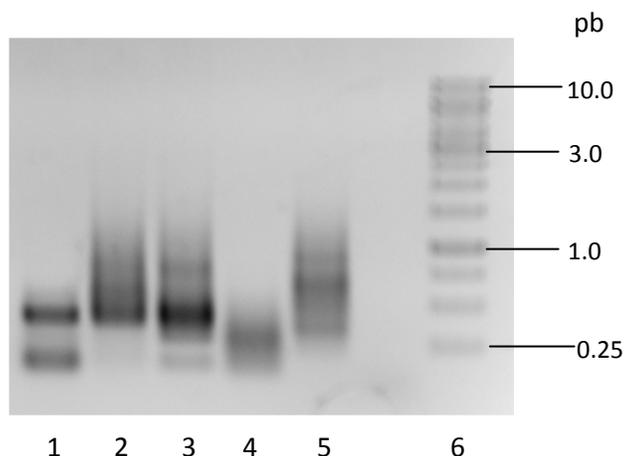


Figura 10. Amplificación por PCR de los ADNc expresados diferencialmente. Carril 1=ADNc sobreexpresado en raíz *A. cruentus* bajo 150mM NaCl, carril 2=ADNc reprimidos en raíz *A. cruentus* bajo 150 mM NaCl, carril 3=ADNc sobreexpresado en raíz *A. hypochondriacus* bajo 150 mM NaCl, carril 4=ADNc reprimidos en raíz *A. hypochondriacus* bajo 150 mM NaCl, carril 5=ADN control de la sustracción por PCR (Clontech), carril 6=marcador de peso molecular.

4.4 Construcción de la genoteca sustractiva de los genes sobreexpresados o reprimidos en raíz de *A. cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L.

Los genes obtenidos se clonaron y se seleccionaron las colonias transformadas para obtener el plásmido. En la Figura 5 se observan la digestión de diferentes clonas del plásmido (pGEM-T Easy) digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. Se observan fragmentos de 250 a 700 pb (Figura 11). Los plásmidos que mostraron insertos de diferentes tamaños se mandaron secuenciar.

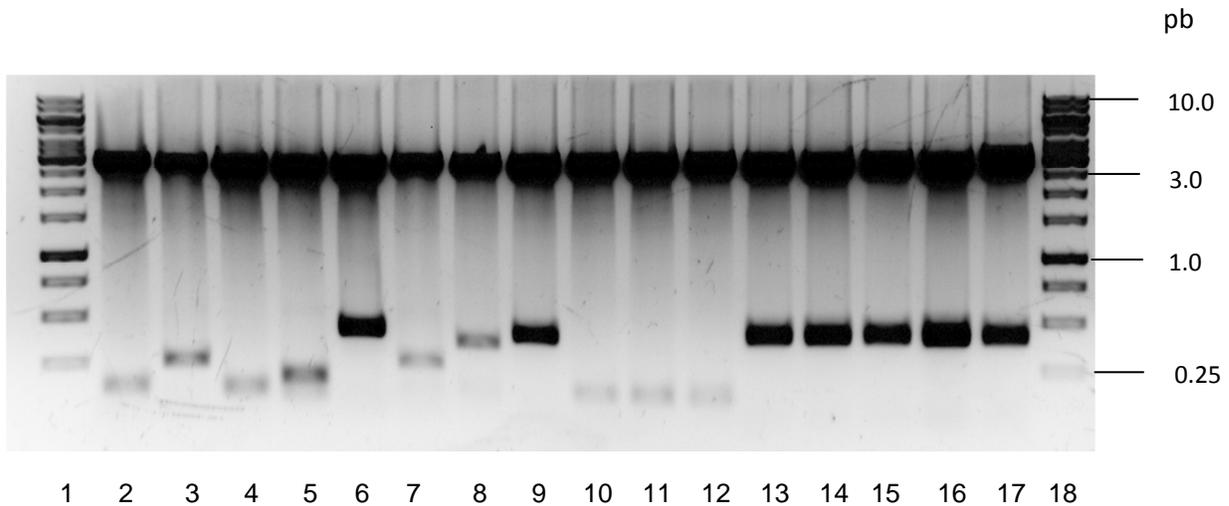
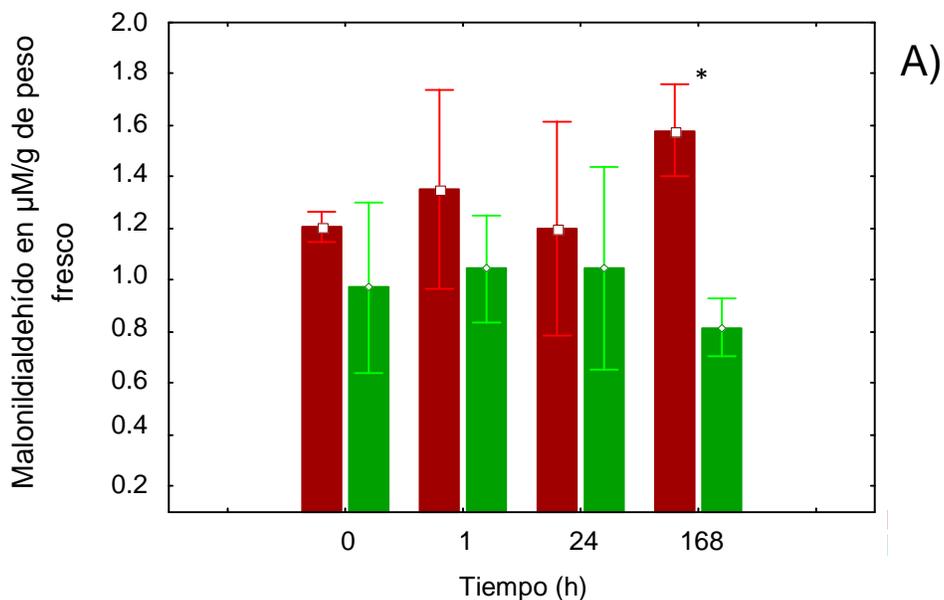


Figura 11. Análisis de restricción de las genotecas. Gel de agarosa al 1%, muestra la gama de tamaño en los genes obtenidos en las genotecas sustractivas de ADNc. Carriles 2 a 17=fragmentos de genes sobreexpresados en raíz *A. cruentus* bajo 150 mM NaCl, carril 1 y 18=marcador de peso molecular.

4.5 Malonildialdehído como indicador de la peroxidación de lípidos de membrana

Dentro de las alteraciones generadas por el estrés salino se incluye la acumulación de H_2O_2 en el citoplasma celular, el cual reacciona con Fe^{2+} generando radicales oxidrilo ($OH\cdot$) (Azevedo Neto *et al.*, 2006). Este radical altamente reactivo, oxida los lípidos de membrana y genera malonildialdehído (MDA), que es un producto final de la peroxidación de lípidos de la membrana, por lo que se considera como un indicador del daño oxidativo. Así la estabilidad de la membrana se utiliza como un indicador para diferenciar los cultivos tolerantes de los sensibles a estrés salino (Hernández y Almansa, 2002; Azevedo Neto *et al.*, 2006). Evidencias sugieren que la resistencia al daño oxidativo está relacionada con la tolerancia a estrés salino (Mittova *et al.*, 2002; Badawi *et al.*, 2004). Sin embargo, esto está descrito para hojas y es muy escasa la información sobre el efecto en la raíz, a pesar de ser el órgano directamente expuesto al estrés salino. A las 168 h, se encontró un aumento mayor de MDA en raíz de *A. hypochondriacus* que en *A. cruentus* (Figura 12B), este resultado parece coincidir con la respuesta anterior donde ésta variedad tardó más tiempo en recuperar la turgencia después del inicio del estrés, morfológicamente manifestó menor

crecimiento y la aparición de clorosis en sus hojas fue evidente, Aunque en la raíz de *A. cruentus* se observó un aumento de MDA a las 168 h (Figura 12A), la diferencia entre el control y el problema es menor que en *A. hypochondriacus*, además la producción de MDA en hojas de *A. cruentus* sometidas a estrés salino no fue estadísticamente diferencial con respecto al control (datos no mostrados), lo que sugiere que en hojas de *A. cruentus* la sobreexpresión del sistema antioxidante se activa en respuesta al estrés salino reduciendo los niveles de H_2O_2 y por consecuencia el daño a membranas (Hernández y Almansa 2002; Azevedo Neto *et al.*, 2006). Estos sugieren que la variedad *A. hypochondriacus* es más susceptible al estrés salino.



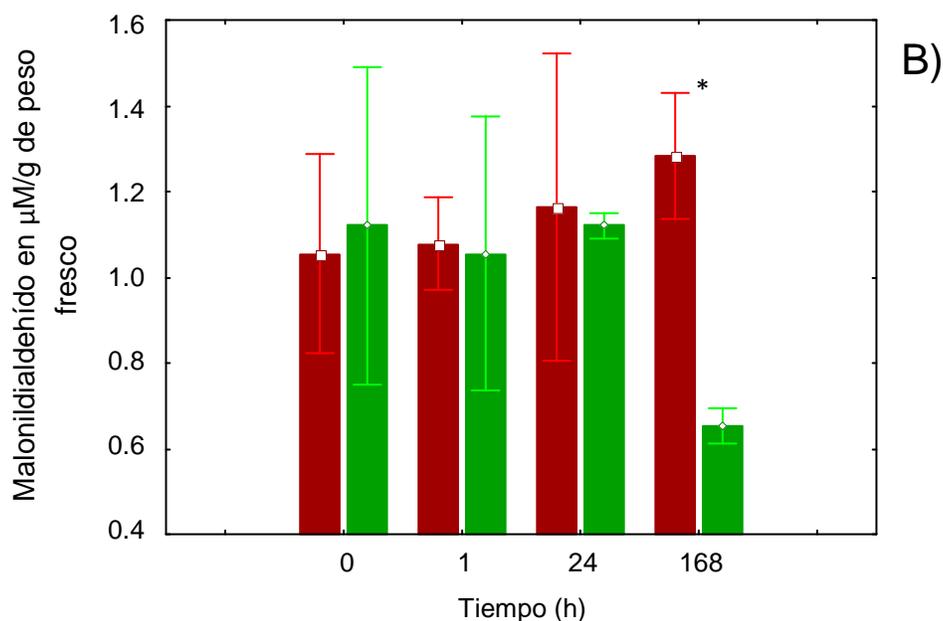


Figura 12. Concentración de Malonildialdehído (MDA) en A) raíz de *A. cruentus* y B) raíz de *A. hypochondriacus*. Las barras muestran una desviación estándar=1. El asterisco representa valores que son estadísticamente significativos entre muestra control (sin tratamiento) y problema (150 mM de NaCl). Las barras rojas corresponden a las plantas sometidas a estrés salino y las barras verdes a las plantas control.

4.6 Comportamiento del ácido ascórbico durante el estrés salino en raíz y hoja de amaranto

El ácido ascórbico (AcAs) es una sustancia clave en la respuesta antioxidante en plantas. AcAs se encarga de la detoxificación de H_2O_2 , formado por la dismutación del O_2^- y actúa de manera coordinada con el glutatión y varias enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, dehidroascorbato reductasa entre otras (Noctor y Foyer, 1998; Pignocchi y Foyer, 2003). Varios reportes mencionan una relación entre la tolerancia a estrés salino y la disminución de la peroxidación de lípidos con aumento en el nivel de AcAs total y reducido, y el incremento en la actividad de enzimas involucradas en el sistema de detoxificación (Huang *et al.*, 2005; Moradi y Ismail, 2007). Sin embargo más allá de un aumento sustancial en la concentración de AcAs total, lo que parece importar es la capacidad de la planta de mantener su producción y aumentar la

actividad enzimática. En sistemas donde la producción de AcAs disminuye o es nula la planta se muestra susceptible al estrés salino e incrementa la producción de MDA (Huang *et al.*, 2005; Moradi y Ismail, 2007).

El AcAs en hoja y raíz de las dos variedades mostró un aumento a las 168 h de exposición al estrés (Figura 13 A a D), excepto en raíz de *A. hypochondriacus* donde solo en las primeras 24 h posteriores al inicio del estrés, la concentración de AcAs fue mayor que en el control. A las 168 h tanto en el problema como en el control la concentración de AcAs fue similar (Figura 13C), Las hojas de las dos variedades de amaranto mostraron mayor concentración de AcAs (de 0.8 a 1.4 mg/g de peso fresco) que en raíz (0.09 a 0.3 mg/g de peso fresco). En ambos tejidos de *A. cruentus* L, se observó una mayor producción de AcAs en respuesta a estrés salino, que en *A. hypochondriacus* L.

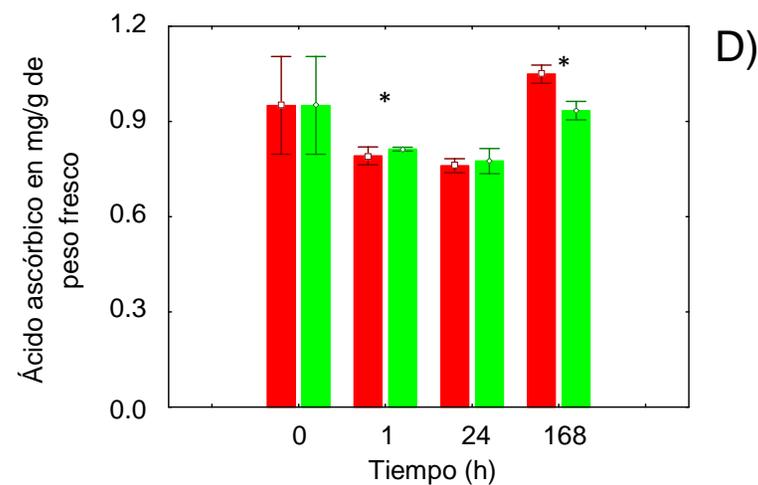
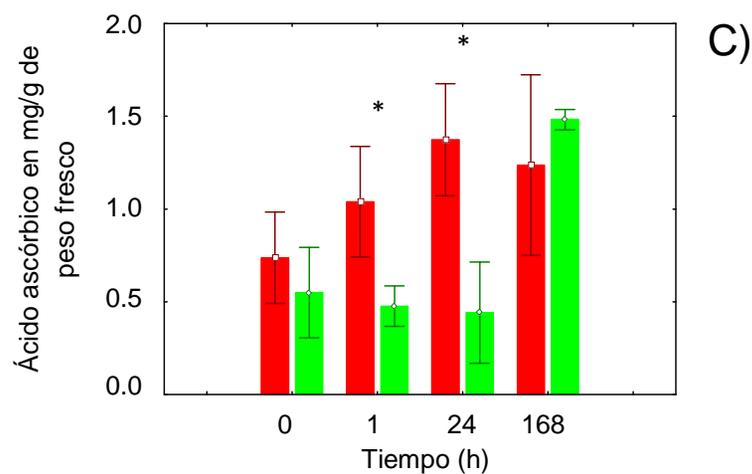
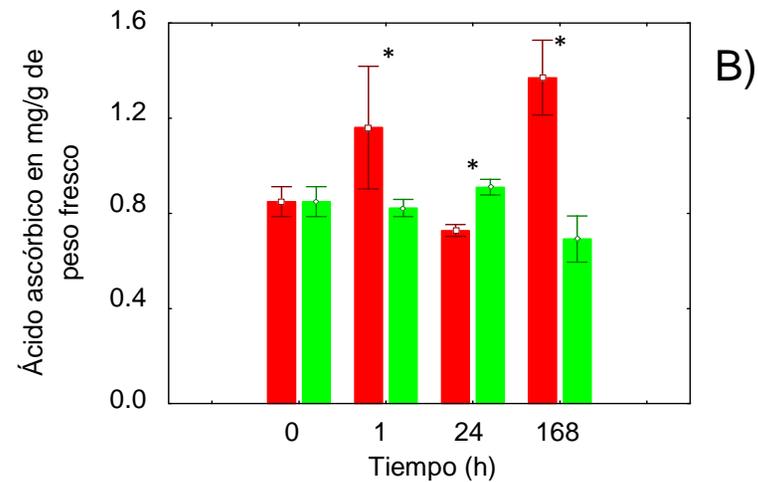
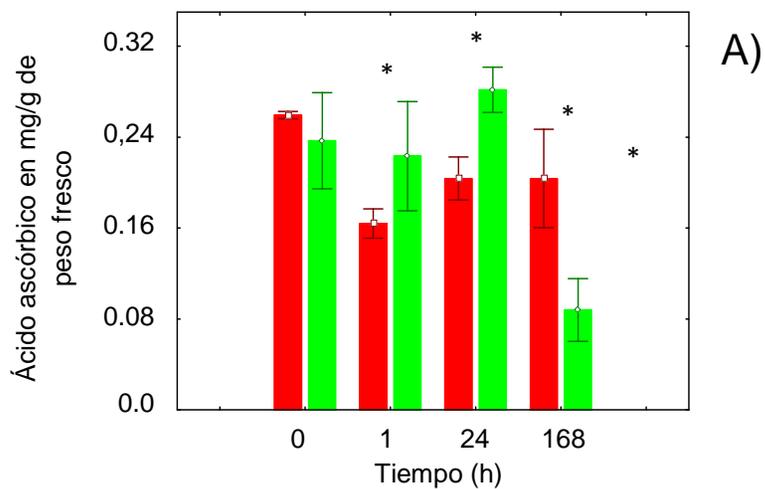


Figura 13: Concentración de ácido ascórbico en A) raíz y B) hoja de *A. cruentus* L y C) raíz y D) hojas de *A. hypochondriacus* L. El asterisco representa valores que son estadísticamente significativos entre muestra control (sin tratamiento) y problema (150 mM de NaCl). Con una $p < 0.05$. Las barras rojas representan a las plantas problemas y las barras verdes a las plantas control.

4.8 Aislamiento, identificación y análisis bioinformático de los genes diferencialmente expresados en plantas de *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* bajos estrés salino.

Debido a que *A. cruentus*, presentó morfológicamente menor daño y menor pérdida en la producción de biomasa, con respecto a la variedad de *A. hypochondriacus*, se decidió trabajar con la variedad en apariencia más resistente. Aun así se cuenta con las genotecas sustractivas de genes sobreexpresados y reprimidos para *A. cruentus* L. y para *A. hypochondriacus* de raíz de plantas bajo estrés salino. La secuenciación, la identificación y el análisis bioinformático de los genes se enfocó en los ESTs obtenidos de la raíz de *A. cruentus* sometidos a estrés salino cuyo nivel de expresión aumentó.

Para eliminar de las secuencias las contaminaciones con el vector de clonación y ensamblarlas formando los contigs, se analizaron con los programas **vector contamination** (vecscreen de NCBI) y **CodonCode Aligner 4.0.3**, obteniendo un total de 43 secuencias únicas.

La búsqueda de secuencias homologas de los ESTs obtenidos se realizó usando los algoritmos BLAST y BLASTX, se comparó con la base de datos de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL-EBL (<http://www.ebi.ac.uk/ena/search/#Search>), TIGR (http://blast.jcvi.org/euk-blast/plantta_blast.cgi) y UniProt (<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/2012040942MSA1X1XQ?alignment=1>).

Los ESTs con un E-value $\geq 1 \times 10^{-5}$ fueron considerados como “significativamente similares” y en base al proceso biológico y/o función molecular descrita en Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>), se clasificaron en 9 categorías (Tabla 1). Del grupo de ESTs que presentaron homología con genes ya descritos, predominaron aquéllos que codifican para proteínas relacionadas con el transporte de grupos metilo, ATP, iones o macromoléculas entre células o fuera de ellas. Uno de estos transportadores es el Biopolymer Transport Protein (ExbD/ToIR) el cual está descrito principalmente en bacterias y poco se sabe sobre su función en plantas, sin embargo en bacterias son un grupo de proteínas unidas a membrana

que se encarga de la absorción de Fe^{3+} y de la vitamina B12 (Wiggerich *et al.*, 1997; Kampfenkel y Braun, 1992). Las proteínas ExbD/ToIR están involucradas en el transporte dependiente de TonB, que está relacionado con la transducción de señales de la superficie de la célula al citoplasma (Wiggerich *et al.*, 1997).

También se encontraron genes relacionados con la transducción de señales, metabolismo, respuesta a estrés, biosíntesis, desarrollo y crecimiento celular, traducción, proteínas hipotéticas o de función desconocida y sin ningún hit. Constituyendo estas dos últimas categorías el 48.9 % del total de los ESTs reportados (Figura 6). Lo cual podría representar que su secuencia aún no es caracterizada o su función es desconocida, abriendo el interés en su caracterización.

Dentro de los genes reportados encontramos uno que codifica para una carbohidrato cinasa (FGGY). Esta familia de cinasas tienen actividad de fosfotransferasa, están involucradas el metabolismo y la fosforilación de carbohidratos, catabolizan la fosforilación del glicerol, se localizan en el cloroplasto de la célula (Sadava y Moore, 1987).

Es importante entender cómo la planta percibe y activa la cascada de señalización que permite darle una mejor respuesta y tolerancia a estímulos como el estrés salino, pues de ello depende el mejoramiento y sobrevivencia durante este tipo de estrés (Mahajan *et al.*, 2008). Dentro del grupo de genes de señalización encontramos una auxina-reprimida de 12.5 kDa (Tabla 7). Esta proteína regula la acción de la hormona auxina que a su vez regula varios procesos biológicos como la división celular, la elongación, la abscisión, la morfogénesis y la expresión de genes que participan en el crecimiento de raíces laterales (LAX3), factores de transcripción de la familia HD-Zip, AP2/EREBP, AS2-like, MYB-like y Zinc finger-like (Reddy y Poovaiah, 1990; Chapman y Estelle, 2009). La auxina-reprimida tiene un peso de 12.5 kDa y se ha encontrado en respuesta a estrés por temperatura (Reusch *et al.*, 2008).

Otra proteína con dominio de diguanilato ciclasa (GGDEF) también fue reprimida. La GGDEF es una proteína implicada en la biosíntesis de exopolisacáridos, la formación de biopelículas y en la regulación de la expresión de genes, el dominio

GGDEF está involucrado en la síntesis e hidrólisis de c-di- GMP y en la hidrólisis de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Ryjenkov *et al.*, 2005).

Tabla 9. Transcritos sobreexpresados en respuesta a estrés salino por NaCl en raíz de *A. cruentus* L.

No. Clona	No. de acceso	Anotación	Fuente	E.value (score)	Identidad (%)	Cobertura (%)
Transporte						
6,12,16,21,22,27,31,34,54,59,60,61,68,69,70,83,86,92,96,97,111,119,125,134,146,148,15,155,158,161,162,165,167	CP002102.1	Biopolymer transport protein ExbD/ToIR	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	2e ⁻²⁵ (125)	77	40
283	XP_003530906.1	Probable methyltransferase PMT19-like	<i>Glycine max</i>	3e ⁻⁰⁵ (30.4)	44%	69%
3	CP000250.1	Molybdopterin binding protein	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	3e ⁻⁹	85	55
77 y 345	B4WA34	RND transporter, HAE1 family	<i>Brevundimonas</i> sp. BAL3	2.0 e ⁻⁷	96.0	95.6
5,8,13,14,15,23,26,28,36,37,38,39,40,41,42,44,45,50,51,63,64,67,76,85,91,104,109,114,116,118,127,136,156,159,164,168,171,172,173 y 175	CP002102.1	Biopolymer transport protein ExbD/ToIR	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC	3e ⁻²³ (118)	77	41

174	CP002102.1	Biopolymer transport protein ExbD/TolR	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	$4e^{-25}$	91	89
357	Q05606	Biopolymer transport protein exbD	<i>Arthrobacter siderocapsulatus</i> (127)	$4.0e^{-7}$	59	34.45
396	B4WAG4	Transport energizing protein, ExbD/TolR family	<i>Brevundimonas</i> sp. BAL3	$3e^{-24}$ (241)	98	40.5
b42 y b46	gb AES58577.1 	ATP synthase subunit alpha	<i>Medicago truncatula</i>	$6e^{-23}$ (87.4)	66	48
Transducción de señales						
1,9,10,11 y 29	gb EGF96283.1 	Diguanilate cyclase GGDEF domain protein	<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568	$6e^{-7}$ (52.8)	76	82
b19 y 313	XM_002509400.1 	Auxin-repressed 12.5 kDa protein	<i>Ricinus communis</i>	$3e^{-16}$ (93.3)	86	23
139	CP002102.1	cobalt chelatase, pCobS small subunit	<i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264	$1e^{-15}$	82	61
294	gb ADM35971.1 	RING zinc finger protein	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	$3e^{-119}$ (338)	100	72
Metabolismo						
2 y 6	gb CP000758.1 	carbohydrate kinase FGGY	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	$2e^{-79}$ (304)	94	89

276	TA22068_3055	L-arabinose isomerase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4.0e ⁻⁵⁰ (1247)	86	99.4
79 y 282	A6X1R9	Carbohydrate kinase FGGY	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2.0e ⁻²⁴ (289)	95	98.9
Respuesta a estrés						
b66284,b-22,l-138	BAJ11784.1	Dehydration responsive protein	<i>Corchorus olitorius</i>	2e ⁻⁶¹ (242)	82	43
272	ABH09321.1	Cell wall-associated hydrolase	<i>Medicago truncatula</i>	6e ⁻¹⁸ (209)	43	66.5
178, 202, 303 y 462	ES323069	Putative DnaJ protein	<i>Medicago sativa</i>	4.2e ⁻⁰⁵ (259)	79	53
		Diguanylate cyclase GGDEF domain protein	<i>Brevundimonas diminuta ATCC 11568</i>	7e ⁻⁰⁵	82	52.4
446	TA42539_3847	Proline-rich protein	<i>Glycine max</i>	6.0e ⁻¹⁵ (484)	65	68.9
Biosíntesis						
38	TA788_3747	Cobalamin biosynthesis protein	<i>Fragaria x ananassa</i>	2.3e ⁻¹⁹ (582)	97	26
139, 295 y 427	TA788_3747	Cobalamin biosynthesis protein	<i>Fragaria x ananassa</i>	7.9e ⁻¹⁹ (570)	100	65.5
Desarrollo y crecimiento celular						
b10	TA3426_64093	Actin-1-like	<i>Triphysaria versicolor</i>	6.1e ⁻²⁰ (587)	81	90.2

Transducción						
218, 270 y 442	gb EU161550.1 	small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	<i>Podocarpus neriifolius</i>	1e-73	87	56
Proteínas hipotéticas o función desconocida						
b3	BU983255	Unknow protein	<i>Hordeum vulgare</i>	5.8e ⁻⁰⁵ (257)	71	42.2
b20	TA40341_3635	Hypothetical protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	3.5e ⁻¹² (412)	90	90.3
b34	BJ279543	Hypothetical protein	<i>Triticum aestivum</i>	6.2e ⁻²⁸ (761)	80	61.6
b36	gb EU558534.1 	Transposon-insertion display band	<i>Arabidopsis lyrata</i>	1e ⁻²³ (118)	68	32
b45	CA638136	Hypothetical protein	<i>Triticum aestivum</i>	7.6e ⁻⁰⁶ (277)	82	45
47	Desconocida	Desconocida	Desconocida			
b51	CK605622	Hypothetical protein	<i>Glycine max</i>	1.8e ⁻²² (642)	75	59.6
b67 y b74	AU165135	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa </i>	1.2e-78 (1888)	96	85.8
154	AES58606.1	Mitochondrial protein, putative	<i>Medicago truncatula</i>	9e ⁻²⁵	60	70
160	NP_001142771.1 	uncharacterized protein	<i>Zea mays</i>	0.018 (34.7)	34	49

268	BJ279543	Hypothetical protein	<i>Triticum aestivum</i>	$2.7e^{-63}$ (1544)	94	100
275	DN781195	Hypothetical protein	<i>Gossypium hirsutum</i>	$1.7e^{-55}$ (1373)	93	81.81
301 y b73	EL610373	Hypothetical protein	<i>Medicago sativa</i>	$6.6e^{-57}$ (1404)	90	82.9
473	CO223554	hypothetical protein	<i>Picea sitchensis</i>	$3.6e^{-7}$ (306)	59	97.4
No hit						
21		No Hit				
29		No Hit				
30		No Hit				
32		No Hit				
52		No Hit				
455		No hit				
470		No Hit				

4.9 Distribución de los EST expresados diferencialmente en base a su función y proceso biológico en el que participan

Los ESTs expresados diferencialmente en raíz de *A. cruentus* se pueden reunir en 3 grupos: el primer grupo (51.1%) engloba a los genes que tienen una alta similitud con genes ya reportados. El grupo dos (32.6%) involucra homólogos de proteínas hipotéticas o de función desconocida y el grupo 3 (16.3%) incluyen ESTs que no mostraron ninguna homología. En general las plantas responden al estrés salino aumentando la expresión de proteínas y su actividad metabólica (Zhang *et al.*, 2012), Sin embargo en las plantas tolerantes a estrés salino las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, respuesta a estrés, transporte y membrana, transducción de señales y síntesis de proteínas (traducción), incrementan su expresión (Witzel *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Se ha reportado que las proteínas involucradas con la señalización/regulación de hormonas como el represor de auxina, están relacionadas con la transducción de señales como el RING zing-finger, y las proteínas involucradas en la elongación y crecimiento celular como las hidrolasas asociadas a pared celular confieren a la planta tolerancia al estrés (Davletova *et al.*, 2005; Singh y Prasad, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

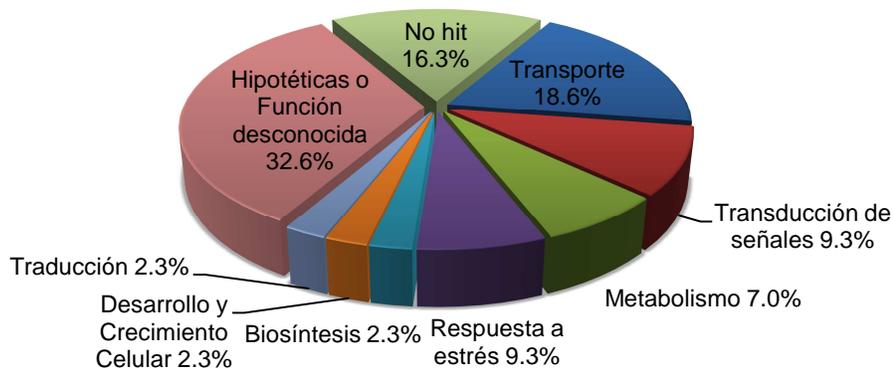


Figura 14. Categorías funcionales de los genes sobre expresados en la genoteca sustractiva de *A. cruentus* L bajo estrés salino. La clasificación está basada en su función biológica.

4.10 Respuesta tiempo-especifica de los ESTs expresados diferencialmente en raíz de *A. cruentus* L.

La duración del tratamiento con NaCl se llevó a diferentes tiempos: 0.25, 1, 24 y 168 h después de iniciado el estrés salino, el ARNm de las muestras se utilizó para generar las sondas marcadas con fluoresceína. Algunas de las clonas que contenían los fragmentos de los genes sobreexpresados en raíz de *A. cruentus* descritos anteriormente, fueron colocados en las membranas para su hibridación con las muestras tomadas a los diferentes tiempos. Este estudio ayudó tanto para validar los datos de la genoteca sustractiva como para evaluar la evolución del perfil de expresión de los genes en la raíz.

El nivel de expresión de los 22 genes evaluados varió con respecto al tiempo, una posible proteína mitocondrial (AES58606.1) aumentó su nivel de expresión a la hora después del inicio del estrés disminuyendo drásticamente a las 24 y 48 h, no así en las plantas control. ExbD/ToIR que son proteínas relacionadas en el transporte y transducción de señales (Wiggerich *et al.*, 1997), tuvo su pico de expresión entre la primera hora manteniéndose hasta las 24 h, para después disminuir, este resultado podría indicar una mayor importancia en la primera fase

del estrés salino (choque osmótico), ya que en los tiempos posteriores (168 h) su nivel de expresión se reduce y se mantiene similar al encontrado en las plantas control. La proteína en respuesta a deshidratación son proteínas inducidas por el estrés salino, por estrés hídrico, pero no por calor o frío, Su activación está relacionada con la hormona ABA (Yamaguchi-Shinozaki, y Shinozaki, 1993; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). En la raíz de amaranto bajo estrés salino su expresión aumentó dentro de los primeros 15 min, manteniendo un nivel aún por encima de los niveles de la planta control después de la primera hora, sin embargo su expresión parece disminuir a las 24 h. Posteriormente su expresión aumentó de nuevo a las 168 h (con respecto a la planta control). Esto podría hablar de su posible importancia durante el inicio de las dos fases del estrés salino (osmótico e iónico) y no sólo en la fase osmótica.

La respuesta a estrés salino incluye una amplia transcripción de genes como las proteínas ricas en prolina, hidrolasas asociadas a la pared celular y proteínas posibles tipo DnaJ. De estos genes, es interesante observar que la proteína DnaJ, presentó un aumento en su expresión al inicio del estrés salino, sin embargo este aumento decayó en la primera hora, sin embargo 24 h después iniciado el estrés su nivel de transcrito comenzó a incrementar nuevamente, llegando a obtener un nivel similar al inicial después de 168 h. Se ha reportado que esta familia de proteínas tienen una actividad de chaperonas, su dominio J promueve la hidrólisis del ATP y es sobreexpresada durante el estrés abiótico (Cheetham y Caplan, 1998; Liu y Howell 2010; Vanderauwera *et al.*, 2007).

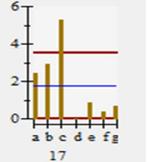
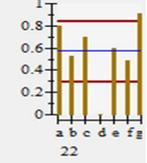
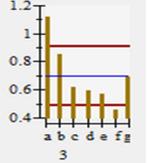
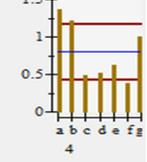
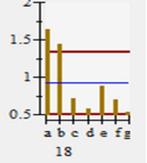
Aún existen un alto número de transcritos que se reportan como proteínas de función desconocida, hipotéticas o sin hit contra las bases de datos. La identidad y caracterización de estos genes, posiblemente necesarios para superar el estrés salino y conferir tolerancia en plantas, no han sido descritos (Kawasaki *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009). Sin embargo podrían ser una fuente de nuevas proteínas relacionadas con la tolerancia a estrés salino. Un inicio de esta caracterización es la evaluación de su perfil de expresión con respecto al tiempo. En este trabajo encontramos que al menos dos proteínas hipotéticas incrementan su nivel de transcrito hasta en 1.5 veces más, en los primeros 15 min posteriores

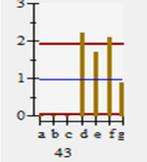
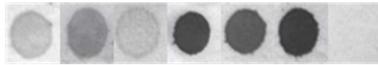
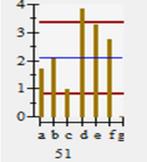
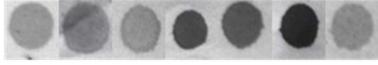
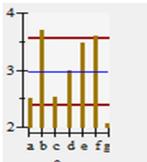
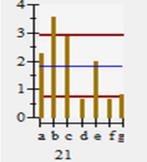
al inicio del estrés. Una de estas proteínas (DN781195) mantuvo un nivel de expresión del transcrito por encima del control durante aproximadamente una hora, pero a las 24 h su expresión disminuyó a la del control y volvió a aumentar a las 168 h. Esta diferencia en la expresión podría indicar que ambos transcritos responden a la primera fase del estrés salino, pero sólo uno de ellos incremento su nivel de expresión en la fase más tardía de este estrés, cuando el desequilibrio iónico se manifiesta.

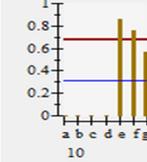
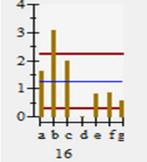
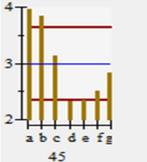
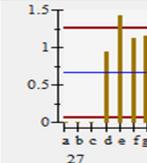
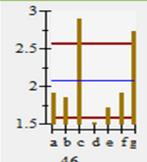
Se ha reportado que la expresión de proteínas que contienen el motivo RING zinc-finger tienen un papel central en varios procesos celulares que incluyen la regulación transcripcional, la transducción de señales y la recombinación. El dominio RING-finger de estas proteínas media las interacciones proteína-proteína y ubiquitinación regulando proteínas blanco que participan en diversos aspectos de la regularización en las plantas (Takatsuji, 1998; Ma *et al.*, 2009;). Reportes demuestran que la expresión de RING zinc-finger mejora el crecimiento y la tolerancia al estrés salino e hídrico (Sakamoto *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2010; Aguilar-Hernandez *et al.*, 2011). Sin embargo en nuestros datos preliminares, encontramos que la expresión de este gen, no varía durante las primeras 24 h posteriores al inicio del estrés con respecto al control. No obstante a las 168 h, el nivel de transcrito parece disminuir en las plantas con estrés salino. En nuestro estudio anterior, un homólogo de este gen fue sobreexpresado en hojas de amaranto bajo estrés por CaCl_2 (Aguilar-Hernández *et al.*, 2011). Podría ser que esta proteína RING zinc finger presente una expresión tejido específica, ya que es sobre regulado sólo en la hoja de amaranto y no en su raíces. Este comportamiento sea reportado para otros zinc finger (AZF1, AZF2, AZF3) de *A. thaliana* bajo estrés salino (Sakamoto *et al.*, 2004). Sin embargo aún no está totalmente entendido el porqué de estas variaciones en la expresión.

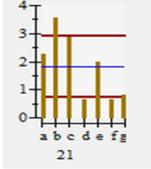
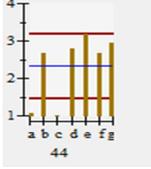
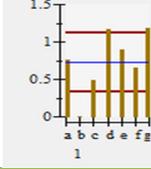
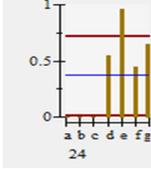
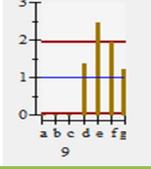
Tabla 10. Expresión diferencial de los genes inducidos por estrés salino en raíz *A.cruentus* L en diferentes tiempos después de iniciado el estrés. El ARNm fue aislado de la raíz de plantas de amaranto control (solución nutritiva) y problema (150 mM NaCl), las muestras problema fueron tomadas al tiempo 0, 15 min, 1, 24 y 168 h, las muestras control solo se tomaron a las 0, 24 y 168 h. Como gen de referencia se utilizó el gen de actina. Como control negativo se uso Agua MilliQ estéril y el plasmido pGEM T-easy.

No acceso	Anotación	Proceso Biológico	Componente celular	Función molecular	Tiempo / Tipo de muestra						Nivel de expresión	
					0h	15min	1h	24h	168h	24hc		168hc
Transporte												
CP002102.1	Biopolymer transport protein ExbD/TolR	Transporte de proteínas	Proteína integrada a membrana	Transportador								
CP002102.1	Biopolymer transport protein ExbD/TolR	Transporte de proteínas	Proteína integrada a membrana	Transportador								
XP_003530906.1	Probable methyltransferase PMT19-like	Desconocida	Proteína integral de membrana de retículo endoplásmico	Actividad de metiltransferasa								

B4WAG4	Transport energizing protein, ExbD/ToIR family	Transporte de proteínas	Proteína integral de membrana	Transportador		
B4WA34	RND transporter, HAE1 family	Desconocida	Proteína integrada a membrana	Transportador		
Traducción de señales						
CP002102.1	Cobalt chelatase, pCobS small subunit	Catabolismo de ATP	Desconocida	Ligasa/Unión a ATP		
gb ADM35971.1	RING zinc finger protein	Ubiquitinación de proteínas	Proteína integral de membrana	Unión a Zinc		
Metabolismo						
A6X1R9	Carbohydrate kinase FGGY	Metabolismo de carbohidratos	Desconocida	Actividad de cinasa/fosfotransferasa		

TA22068_305 5	L-arabinose isomerase	Catabolismo de Arabinosa/Metabolismo de carbohidratos	citoplasma	Actividad de L-arabinosa isomerasa/L-fucosa isomerasa/Unión a iones metálicos		
Respuesta a estrés						
BAJ11784.1	Dehydration responsive protein	Respuesta a estrés salino	Núcleo	Unión a DNA/Factor de transcripción		
ES323069	Putative DnaJ protein Diguanylate cyclase GGDEF domain protein	Proteína de plegamiento/respuesta a calor. Organización de la pared celular/señal de traducción intracelular/señal de traducción por fosforilación	Proteína integral de membrana	Unión a ATP/Metales-zinc Actividad de sensor de dos componentes/Ligasa fósforo-oxígeno		
ABH09321.1	Cell wall-associated hydrolase	Respuesta a estrés salino	Desconocida	Actividad de hidrolasa		

TA42539_384 7	Proline-rich protein	Transporte de lípidos	Desconocida	Desconocida		
Biosíntesis						
TA788_3747	Cobalamin biosynthesis protein	Síntesis de cobalamina	Proteína integral de membrana	Desconocida		
TA788_3747	Cobalamin biosynthesis protein	Desconocida	Desconocida	Desconocida		
Transducción						
gb EU161550.1	small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	Desconocida	Desconocida	Desconocida		
Proteínas hipotéticas o función desconocida						
AES58606.1	Mitochondrial protein, putative	Desconocida	Desconocida	Desconocida		

DN781195	Hypothetical protein	Desconocida	Desconocida	Desconocida		
EL610373	Hypothetical protein	Desconocida	Desconocida	Desconocida		
NP_001142771.1	Uncharacterized protein	Desconocida	Desconocida	Desconocida		
-----	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida		
-----	No hit	Desconocida	Desconocida	Desconocida		

5. Conclusiones

En el presente estudio, se construyeron genotecas sustractivas que contiene los genes diferencialmente expresados en raíz de *A. cruentus* L. y *A. hypochondriacus* L. bajo estrés salino. Un total de 222 ESTs fueron secuenciados y analizados, obteniendo finalmente 43 secuencias únicas. Además se evaluó la respuesta tiempo-específica de los ESTs expresados diferencialmente en raíz de *A. cruentus* y el daño producido por el estrés salino a las membranas.

Este estudio no solo proporcionó la anotación de un conjunto de genes que responden al estrés salino en raíz de amaranto, tenemos además que su expresión en la mayoría de ellos varía con respecto al tiempo y podrían estar involucrados en una respuesta tiempo específica.

6. Referencias

- Aguilar-Hernández HS, Santos L, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, Espitia-Rangel E, De León-Rodríguez A, Guevara-González RG, Barba de la Rosa AP. 2011. Identification of calcium stress induced genes in amaranth leaves through suppression subtractive hybridization. *Journal of Plant Physiology*. 168: 2102-2109.
- Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, Sanders, D, Schachtman DP. 2001. The wheat cDNA LCTI generates hypersensitivity to sodium in salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology*. 126: 1061-1071.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science*. 285:1256-58.
- Azevedo-Neto AD, Prico JT, Eneas-Filho, Braga de Abreu CE, Gomes-Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 56: 235-241.
- Badawi GH, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kawano N, Tanaka K, Tanaka K, 2004. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts *Plant Science* 166: 919-928.
- Barba de la Rosa A.P, Fomsgaard IS, Laursen B, Mortensen AG, Olvera-Martínez JL, Silva-Sánchez C, Mendoza-Herrera A, De León-Rodríguez A, González-Castañeda J. 2009. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science* 49: 117-121.
- Bartels D, Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58.
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. 2000. Sodium Transport en plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 140-151.
- Bohnert HJ, Shen Bo. 1999. Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* 78: 237-60.
- Botella MA, Rosado A, Bressan RA, Hasegawa P. 2005. Plant adaptive to salinity stress. En: *Plant Abiotic Stress* (Jenks MA , Hasegawa PM eds.). ISBN 1-4051-2238-2. Blacwell Publishing Ltd. Oxford.UK pp. 37-70.
- Bowler C, Fluhr R. 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* 5: 241-246.
- Cao YR, Chen SY, Zhang JS. 2008. Ethylene signaling regulates salt stress response: An overview. *Plant Signaling and Behavior* 10: 761-763.
- Chapman EJ, Estelle M. 2009. Mechanism of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annual Review of Genetics* 43: 265-85.
- Cheetham ME, Caplan AJ, 1996. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperones function. *Cell Stress and Chaperones* 3: 28-36.

- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 55: 225-236.
- Darwish E, Testerink C, Khalil M, El-Shihy O, Munnik T. 2009. Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant Cell Physiol* 5: 986-997.
- Delauney AJ, Verma DPS. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* 4:215-23
- Ford CW. 1984. Accumulation of low molecular weight solutes in water stress tropical legumes. *Phytochem* 23: 1007-15
- Gaxiola RA, Fink GR, Hirschi KD. 2002. Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology* 129: 967-973.
- Geisler M, Axelsen K B, Harper JF, Palmgren MG. 2000. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 52-78.
- Ghoulam C, Foursy A, Fares K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and praline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 47: 39-50.
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18: 227-55.
- Guerrier G. 1996. Fluxes of Na, K and Cl and osmotic adjustment in *Lycopersion pimpinellifolium* and *L. esculentum* during short and long term exposure to NaCl. *Physiologia Plantarum* 97: 583-591.
- Grubben GJH, Sloten DHV. 1981. Genetic resources of amaranths IBPGR FAO. Rome, Italy. 57.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ, 2000. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Hernández JA, Almansa MS, 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Plant Physiology* 115: 251 - 257.
- Hirschi K. 2001. Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic? *Trends in Plant Science* 6: 100-104.
- Hirschi KD. 1999. Expression of *Arabidopsis* CAX1 in Tobacco: Altered Calcium Homeostasis and Increased Stress Sensitivity. *The Plant Cell* 11: 2113-2122.
- Huang C, He W, Guo J, Chang X, Su P and Zhang L. 2005. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental Botany* 56: 3041-3049.
- Huerta-Ocampo JA, Briones-Cerecero EP, Mendoza-Hernández G, De León-Rodríguez A, Barba de la Rosa AP. 2009. Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *International Journal of Plant Sciences* 170: 990-998.
- Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Jenks MA, Hasegawa PM. 2007. Plant Abiotic Stress. Botella. M.A., Rosado. A., Bressan. R.A y Hasegawa. P.M. Plant adaptative responses to salinity stress. Ed. Blackwell. pp. 37-70.
- Jordan BR. 2002. Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Functional Plant Biology* 29: 909-916.

- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P. 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10: 451-59.
- Kampfenkel K, Braun V. 1992. Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *Journal of Bacteriology* 174: 5485-5487.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ, 2001. Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice. *The Plant Cell* 13: 889-905.
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CM. 2008. Kinetics of salicylatemediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology* 147: 1358-1368.
- Leister D. 2005. Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in Genetics* 21: 655-663.
- Li D, Zhang Y, Hu X, Shen X, Ma L, Su Z, Wang T, Dong J. 2011. Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* under salt stress identified a novel CBF transcription factor MtCBF4 that plays an important role in abiotic stress responses. *BMC Plant Biology* 11: 109
- Liu JX, Howell SH, 2010. Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control and Its Relationship to Environmental Stress Responses in Plants. *The Plant Cell* 22: 2930-2942.
- Louie M, Kondor N, Dewitt JG. 2003. Gene expression in cadmium-tolerant *Datura innoxia*: detection and characterization of cDNAs induced in response to Cd²⁺. *Plant Molecular Biology* 52: 81-89.
- Louis P, Galinski EA. 1997. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *E. coli*. *Microbiology* 143: 1141-49.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepción M, Yalovsky S, Gruissem W. 2002. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 14: S389-S400.
- Ma K, Xiao J, Li X, Zhang Q, Lian X. 2009. Sequence and expression analysis of the C3HC4-type RING finger gene family in rice. *Gene* 444: 33-45.
- Macler B, Bamberg E, Moffatt E, Bue H, Mior E, Nishioka L. 1990. Effect of salinity and nitrogen on growth, productivity and food value of *Amaranthus* in controlled culture 129-141.
- Mahajan S, GK Pandey, N Tuteja 2008. Calcium and salt stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 471: 146-158.
- Marschner H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. (San Diego: Academic Press).
- Matsumoto TK, Ellsmore AJ, Cessna SG, Low PS, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM. 2002. An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 33075-33080.
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 8792-96.

- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* 109: 735-742.
- Moradi F, Ismail AM. 2007. Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice. *Annals of Botany* 99: 1161-1173.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-81.
- Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-63.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment* 25: 239-250.
- Munns R, Hare RA, James RA, Rebetzke GJ. 2000. Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 51: 69-74.
- Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environment* 16: 15-24.
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M, 2002. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Plant Physiology* 115: 393-400.
- Ndimba BK, Chivasa S, Simon WJ, Slabas AR. 2005. Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 16: 4185-4196.
- Nelson DE, Shen B, Bohnert HJ. 1998. Salinity tolerance-mechanisms, models, and the metabolic engineering of complex traits. In *Genetic Engineering, Principles and Methods*, ed. JK Setlow, 20:153-76. New York: Plenum
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Omami EN, Hammes PS, Robbertse PJ. 2006 Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranth (*Amaranthus* spp.) genotypes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural science* 34: 11-22.
- Pandey GK, Reddy VS, Reddy MK, Deswal R, Bhattacharya A, Sopory SK. 2002. Transgenic tobacco expressing *Entamoeba histolytica* calcium binding protein enhanced growth and tolerance to salt stress. *Plant Science* 162: 41-47.
- Pang QY, Chen SX, Dai SJ, Chen YZ, Wang Y, Yan XF. 2010. Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research* 5: 2584-2599
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349.
- Peng ZY, Wang MC, Li F, Lv HJ, Li CL, Xia G M. 2009. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular & Cellular Proteomics* 8: 2676-2686.
- Perochon A, Aldon D, Galaud JP, Ranty B. 2011. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie* 93: 2048-2053.
- Pignocchi C, Foyer CH. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 379-389.

- Poole RJ. 1988. Plasma membrane and tonoplast. In *Solute Transport in Plant Cells and Tissues*, ed. DABaker, JHall, pp. 83-105. New York: Wiley & Sons.
- Reusch TBH, Veron AS, Preuss C, Weiner J, Wissler L, Beck A, Klages S, Kube M, Reinhardt R, Bornberg-Bauer E, 2008. Comparative Analysis of Expressed Sequence Tag (EST) Libraries in the *Seagrass Zostera marina* Subjected to Temperature Stress. *Marine Biotechnology* 10: 297-309.
- Rodrigues FA, de Laia ML, Zingaretti SM. 2009. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science* 176: 286 -302.
- Ryjenkov DA, Tarutina M, Moskvina OV, Gomelsky M, 2005. Cyclic Diguanylate Is a Ubiquitous Signaling Molecule in Bacteria: Insights into Biochemistry of the GGDEF Protein Domain. *Journal of Bacteriology* 187: 1792-1798.
- Sacher RF, Staples RC. 1984. Chemical microscopy for study of plants in saline environments. In R.C. Staples and Toenniessen G.H. John Wiley & Sons. N.Y. 17-35.
- Sadava D, Moore K. 1987. Glycerol metabolism in higher plants: Glycerol kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 143: 977-983.
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. *Arabidopsis* Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions. *Plant Physiology* 136: 1-13.
- Saunders RM, Becker R. 1984. *Amaranthus*: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology*. Vol. 6. Ed. Y. Pometanz. 357.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. 2002. Calcium at the crossroad of signaling. *Plant Cell* 14: S401-S417.
- Schäffner AR. 1998. Aquaporin function, structure, and expression: Are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204: 131-39.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 217-223.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115: 327-334.
- Sholpan Davletova, Karen Schlauch, Jesse Coutu, Ron Mittler. 2005. The Zinc-Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 847-856.
- Singh A, Prasad R. 2009. Salt stress effects growth and cell wall bound enzymes in *Arachis hypogaea* L. seedlings. *International Journal of Integrative Biology* 7: 117-123.
- Sugino M, Hibino T, Tanaka Y, Nii N, Takabe T, Takabe T. 1999. Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* acquires resistance to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Science* 137: 81-88.
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF. 2000. Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 433-462.
- Tamaoki M, Matsuyama T, Nakajima N, Aono M, Kubo A, Saji H. 2004. A method for diagnosis of plant environmental stresses by gene expression profiling using a cDNA macroarray. *Environmental Pollution* 131: 137-145

- Takeuchi K, Gyohda A, Tominaga M, Kawakatsu M, Hatakeyama A, Ishii N, Shimaya K, Nishimura T, Riemann M, Nick P, Hashimoto M, Komano T, Endo A, Okamoto T, Jikumaru Y, Kamiya Y, Terakawa T, Koshihara T. 2011. RSOsPR10 expression in response to environmental stresses is regulated antagonistically by jasmonate/ethylene and salicylic acid signaling pathways in rice roots. *Plant Cell Physiology* 52: 1686-1696.
- Tester M, Davenport R. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
- Tian ZD, Zhang Y, Liu J, Xie CH. 2010. Novel potato C2H2-type zinc finger protein gene, stZFP1, which responds to biotic and abiotic stress, plays a role in salt tolerance. *Plant Biology* 12: 689-97.
- Türkan I, Demiral T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9.
- Tuteja N. 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Methods in Enzymology* 428: 419-438.
- Vanderauwera S, De Block M, De Steene NV, De Cotte BV, Metzlauff M, Breusegem FV. 2007. Silencing of poly(ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 15150-15155.
- Vitart V, Baxter I, Doerner P, Harper JF. 2001. Evidence for the role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. *Plant Journal* 27: 191-201.
- White PJ, MR Broadley. 2003. Calcium in Plants. *Annals of Botany* 92: 487-511.
- Wiggerich HG, Klauke B, Plin RK, Priefer UB, Pühler A. 1997. Unusual Structure of the tonB-exb DNA Region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: tonB, exbB, and exbD1 Are Essential for Ferric Iron Uptake, but exbD2 Is Not. *Journal of Bacteriology* 179: 7103-7110.
- Witzel K, Weidner A, Surabhi GK, Borner A, Mock HP. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany* 12: 3545-3557.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110: 249-257.
- Yamada S, M Katsuhara M, W Kelly W, CB Michalowski CB, HJ Bohnert HJ. 1995. A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7: 1129-42.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 238: 17-25.
- Yang X, Tu L, Zhu L, Fu L, Min L, Zhang X 2008. Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and microarray. *Journal of Experimental Botany* 59: 3661-3674.
- Zhang H, Han B, Wang T, Chen S, Li H, Zhang Y, Dai S. 2012. Mechanisms of Plant Salt Response: Insights from Proteomics. *Journal of Proteome Research* 11: 49-67.

- Zhao Y, Aspinall D, Paleg LG. 1992. Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycine betaine against effects of freezing. *Journal of Plant Physiology* 140: 541-43.
- Zhu JK. 2007. Plant Salt Stress. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-3.
- Zhu JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.
- Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.