

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

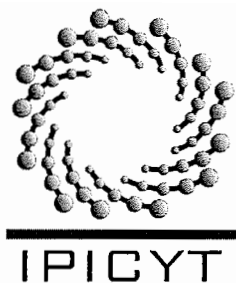
**Análisis de la expresión diferencial de genes en
hojas de Amaranto (*Amaranthus
hypochondriacus*) bajo estrés salino**

Tesis que presenta
Hugo Sergio Aguilar Hernández

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2008



Constancia de aprobación de la tesis

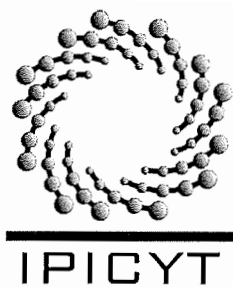
La tesis “Análisis de la expresión diferencial de genes en hojas de Amarantho (*Amaranthus hypochondriacus*) bajo estrés salino” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Hugo Sergio Aguilar Hernández** y aprobada el **10 de julio de 2008** 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
Directora de la tesis

Dr. Eduardo Espitia Range
Asesor de la tesis

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Asesor de la tesis

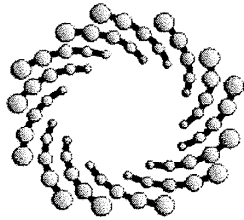
Dra. Ma. Fabiola León Galván
Asesor de la tesis



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el laboratorio de Proteómica y Expresión Génica 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.

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



IPICYT

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 047 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de julio del año 2008, se reunió a las 12:00 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
Dra. Ma. Fabiola León Galván	Sinodal externo	Proyecto de Investigación de la DBM-IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Hugo Sergio Aguilar Hernández

sobre la Tesis intitulada:

*Análisis de la Expresión Diferencial de Genes en Hojas de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*) Bajo Estrés Salino.*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé 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 10 días del mes de julio de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por aceptarme en su laboratorio, por su tiempo y dedicación.

A la Dra. Ma. Fabiola León Galván por su ayuda, instrucciones y correcciones en este trabajo.

A la Dra. Martha Leticia Santos Martínez por sus opiniones y correcciones en este trabajo.

A la M.C. Erika Patricia Briones Cerecero por su apoyo en el cultivo de los amarantos y su amistad. Especialmente a la Innombrable Dra. Cecilia Silva Sánchez.

A todos mis compañeros del laboratorio 2 presentes y ausentes.

A COPOCyT e IPICyT por la beca otorgada.

RESUMEN

El amaranto es una planta C4 por lo que realiza la fotosíntesis de una manera muy eficiente en condiciones de alta temperatura y baja disponibilidad de agua. Se cultiva como un cereal alternativo debido que se puede obtener una buena producción en suelos infértiles, semiáridos y salinos. Datos actuales demuestran que la salinidad 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. Por medio de la técnica de hibridación supresiva sustractiva (SSH), se obtuvieron genes diferencialmente expresados durante estrés salino en hojas de amaranto, generando con ello genotecas sustractivas. Para esto se emplearon hojas de plantas regadas con diferentes concentraciones de CaCl_2 , usando como control plantas regadas con la solución de 20 mM CaCl_2 y como problema las regadas con H_2O desionizada y 50 mM de CaCl_2 condiciones en las que se encuentra menor crecimiento y turgencia de la planta. Los genes diferencialmente obtenidos (sobre expresados y reprimidos en su expresión), fueron secuenciados y sujetos a un análisis bioinformático usando los algoritmos BLASTN, BLASTX y TBLASTX y comparando con la base de datos nr de GenBank, TIGR db *Arabidopsis thaliana* Genome Project, TIGR Rice Genome Annotation y Gene Ontology. De los genes aislados de las genotecas sustractivas, el 34% de función desconocida, 15% no presentaron homología, 12% estaban involucrados en fotosíntesis, 12% relacionados con la respuesta a algún tipo de estrés, 7% intervienen en la regulación de genes, 5% en la traducción de señales, 5% fueron factores de transcripción, 5% en el metabolismo, 3% en el plegamiento de proteínas y 2% en la defensa contra patógenos. La información generada nos permite dilucidar los cambios y mecanismos de respuesta al estrés salino en hojas de amaranto.

ABSTRACT

The amaranth is a plant classified as C4 that realizes the photosynthesis efficiently under conditions of high temperature and low availability of water, is cultivated as an alternate cereal due to its ability to grow very well on infertile semiarid soils, and saline conditions. Current data show that salinity affects 2% from 1500 million hectares (He) of farmlands, and 20% of the 230 million He of irrigate land. The high concentration of salt in the soil affect the growth of the plants and causes a decrease of the agricultural yield. Through of suppressive subtractive hybridization (SSH), differentially expressed genes were obtained under saline stress, generating thus a subtractive library. For this were used leaves of plants watered with different concentrations of CaCl_2 , using as control plants watered with the solution of 20 mM CaCl_2 and as problem the watered with deionized H_2O and 50 mM CaCl_2 , and him where growth and swelling are more less that the control. The genes differentially obtained, were sequenced and subject to bioinformatics analysis using the algorithms BLASTN, BLASTX and TBLASTX and comparing with the database nr of GenBank, TIGR db Arabidopsis thaliana Genome Project, TIGR Genome Annotation and Gene Ontology. Of genes isolated from subtractive library, 34% were of unknown function, 15% non reported sequence, 12% involved on photosynthesis, 12% on stress responses, 7% on regulation of genes, 5% on signaling, 5% on transcription factors, 5% on metabolism, 3% on protein folding and 2% on defense against pathogenics. The generated information gives us the guideline to explain the changes and mechanisms of response to the saline stress.

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Definición de términos y descripción de los suelos afectados por sales	9
Tabla 2. Concentración de ARN total obtenido por el método de RNAesay	23
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de expresión diferencial por RT-PCR	26
Tabla 4. Presentación del número de clonas, genes secuenciados y EST's realizados en cada una de las genotecas sustractivas de ADNc.	29
Tabla 5. Clasificación de los genes que disminuyeron su nivel de expresión con H ₂ O desionizada	31
Tabla 6. Clasificación de los genes que aumentaron su nivel de expresión con H ₂ O desionizada	31
Tabla 7. Clasificación de los genes sobre expresados con CaCl ₂ 50 mM.	33
Tabla 8. Clasificación de los genes que disminuyeron su expresión con CaCl ₂ 50 mM	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fisiología de la planta de amaranto	5
Figura 2. Esquema de la fijación de carbono en las plantas C4	6
Figura 3. Condiciones de amplificación para RT-PCR	26
Figura 4. Plantas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> regadas con diferentes soluciones	28
Figura 5. Análisis de restricción de los genes	29
Figura 6. Distribución de los genes diferencialmente expresados en hojas de amaranto bajo estrés salino.	39
Figura 7. Análisis de los genes diferencialmente expresados seleccionados de la SSH	41

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Historia	3
1.2 Producción y distribución	3
1.3 Taxonomía	4
1.4 Fisiología	4
1.5 Estrés	7
1.6 Estrés salino	8
1.7 Causas de la salinidad	10
1.8 Efectos de la salinidad en plantas	11
1.9 Tolerancia a la salinidad	12
1.10 Mecanismos de resistencia al estrés salino	13
1.10.1 Compartimentalización intracelular de iones	13
1.10.2 Síntesis de osmoprotectores	15
1.10.3 Respuesta al daño por estrés salino y su reparación	15
1.11 Estudios de salinidad en amaranto	17
1.12 Función del calcio en plantas	18

	Página
II JUSTIFICACIÓN	20
III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos específicos	21
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 Condiciones de crecimiento de plantas de amaranto	22
4.2 Tratamiento con cloruro de calcio (CaCl ₂)	22
4.3 Obtención de la genoteca sustractiva	22
4.3.1 Aislamiento de mRNA	22
4.3.2 Síntesis de ADNc	23
4.3.3 Purificación de ADNc	24
4.3.4 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)	24
4.3.5 Construcción de las Genotecas sustractivas	24
4.4 Análisis bioinformático de los EST's encontrados en las bibliotecas sustractivas	25
4.5 Análisis de expresión diferencial de algunos genes por RT-PCR	25
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Diseño del método para estresar <i>Amaranthus</i> <i>hypochondriacus</i> con diferentes concentraciones de CaCl ₂	27
5.2 Construcción de las genotecas sustractivas por el método SSH	28

	Página
5.3 Clasificación y análisis bioinformático de los genes obtenidos en las genotecas SSH	30
5.4 Distribución de los genes expresados diferencialmente en las genotecas sustractivas.	37
5.5 Análisis de expresión de los genes <i>slt</i> , <i>slt1</i> , <i>mt2a</i> y <i>ssh</i> por RT-PCR	39
5.6 Análisis del gen <i>slt</i>	41
5.7 Análisis del gen <i>mt2a</i>	43
5.8 Análisis del gen <i>ssh1p</i>	43
VI. CONCLUSIONES	45
VII. REFERENCIAS	46
VIII. APÉNDICE	61

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

El amaranto es miembro del género *Amaranthus* de la familia *Amaranthaceae* y tiene como centro de origen y diversidad el Centro y Sur de América, India y el sureste de Asia. Sin embargo, se ha reportado que un segundo centro de diversidad pudo haber estado en el este y oeste de África (Grubben y Sloten, 1981). Hace aproximadamente 5000-7000 años el amaranto era cultivado para obtener sus granos. Por eso es considerado como uno de los cultivos más antiguos (Stallknecht y Schulz-Schaeffer, 1993).

Su presencia en México data desde el año 4000 A.C en Tehuacán Puebla (Saber, 1967). Este grano fue una fuente importante de nutrientes para las civilizaciones de América Central y América del Sur como los Mayas, Aztecas e Incas (Valdés-Rodríguez *et al.*, 1993). Por ejemplo en la cultura Azteca, se ofrecía como tributo al emperador (www.prodogynet.web.mx/centeotlac); además era utilizado en la elaboración de alimentos como atole, tamales, pinole y tortillas, además de consumir las hojas como verduras. Con su semilla se preparaba una harina que al mezclarse con miel o melazas se hacía una masa llamada "tzoalli" con la cual se elaboraban figuras de ídolos utilizadas en las ceremonias religiosas, donde los sacerdotes las utilizaban como fuente de fuerza e iluminación (Becerra, 2002; Valdes-Rodríguez *et al.*, 1993). Es por eso que a la llegada de los españoles este cultivo fue prohibido llevando con ello casi al exterminio del amaranto. Pocas personas conservaron la tradición del cultivo de amaranto en pequeñas parcelas y fue hasta la década de los 80's que se redescubrió (Becerra, 2002).

1.2 Producción y distribución

El amaranto es un cultivo de origen mesoamericano que en la actualidad se encuentra distribuido en todo el mundo. Los primeros reportes de amaranto en Europa datan de los años 1700, usado como plantas ornamentales. Se consume y cultiva en diferentes regiones geográficas del mundo como son: Estados Unidos,

China, India, Nepal, África, islas del pacífico, en el Caribe, Grecia, Italia y Rusia (Saunders and Becker, 1984; Stallknecht y Schulz-Schaeffer, 1993).

El amaranto se cultiva en varios estados de la Republica Mexicana como lo son: Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala. Siendo Puebla el mayor productor con el 51% de la producción nacional. De acuerdo con las cifras del servicio de información estadística agroalimentaria y pesca, para fines del año 2005 se tenía estimado obtener unas 2,917 toneladas (ton) de amaranto y con una superficie sembrada de 2000 (Ha) (SAGARPA, 2006).

1.3 Taxonomía

El amaranto pertenece a la clase dicotiledónea, orden *Centrospermae* y familia *Amaranthaceae*. La familia *Amaranthaceae* se compone de 60 géneros y alrededor de 800 especies de plantas herbáceas anuales o perennes (National Academy of Sciences 1984; Paredes-López *et al.*, 1990). Aproximadamente 50 especies son nativas de América y otras se localizan en Europa, Asia, África y Australia. En México solo tres de ellas son cultivadas: *Amaranthus hypochondriacus*, originario de México, *Amaranthus cruentus* originario de Guatemala y el sur de México, y *Amaranthus caudatus* cuyo origen es Ecuador, Perú y Bolivia (Paredes-López *et al.*, 1990; Sauer, 1967).

1.4 Fisiología

El amaranto es una planta que produce semillas tipo cereal pero es dicotiledónea, por lo que es catalogada como un pseudocereal. Se cultiva como un cereal alternativo debido a su capacidad de crecer y dar una buena producción en suelos infértiles y condiciones semiáridas (Teutonico y Knorr, 1985; Kauffman y Weber, 1990). Es tolerante a plagas de insectos y sus semillas tienen proteínas con un alto valor nutritivo caracterizadas por un alto porcentaje de lisina y aminoácidos azufrados (Downmron, 1973; Segura-Nieto *et al.*, 1992), así como de péptidos

bioactivos con actividad de antihipertensivos y péptidos anticarcinogénicos como lo es el Lunasil (Silva-Sanchez *et al.*, 2008).

El amaranto es una planta herbácea que alcanza hasta los 3 metros de altura - como en el caso del *Amaranthus hypochondriacus* -, con hojas largamente pecioladas, oblongo-elípticas u ovales, angostadas en ambas extremidades y de color verde o rojo-morado. Las flores son pequeñas de color carmesí y se presentan en espigas muy apretadas o panículas. Algunas especies poseen espinas y, en los tallos y pecíolos se aprecia y acentúa más la coloración rojiza. Esta coloración se debe a la presencia de betalainas. Los colores de las semillas varían desde el blanco hasta el negro **Figura 1** (FAO, 2005).



Figura 1. Planta de amaranto

El *Amaranthus hypochondriacus* variedad Nutrisol es una cultivo mejorado con alto rendimiento 3.5 ton/ha, presenta pigmentación en la raíz y tallo. La inflorescencia es de crecimiento indeterminado, con ramificaciones largas. Es una variedad de ciclo vegetativo tardío, la madures fisiológica ocurre en promedio en 175 días, su altura varía de 165 – 250 cm; pertenece a la raza azteca.

El amaranto es una planta C4, al igual que el sorgo, el mijo y la caña de azúcar. Este tipo de plantas realizan la fotosíntesis de una manera muy eficiente en condiciones de alta temperatura y baja disponibilidad de agua, en comparación con las plantas C3. Al utilizar la ruta del C4 para el proceso de la fotosíntesis, la planta fija de una manera más eficaz el CO₂ disponible en el aire, concentrándolo en los cloroplastos de las células especializadas **Figura 2** (Kanai y Edwards, 1999).

Cuando las células realizan la fotosíntesis se acumula O₂ en las hojas, el cual a altas concentraciones desencadena la fotorrespiración, reduciendo la capacidad de fijación de CO₂ con la consecuente disminución de la formación de azúcares de la planta. Se cree que plantas C4 realizan muy poco la fotorrespiración, como consecuencia pueden fijar una mayor cantidad de CO₂ y convertirlo en azúcares (Leegood, 1999).

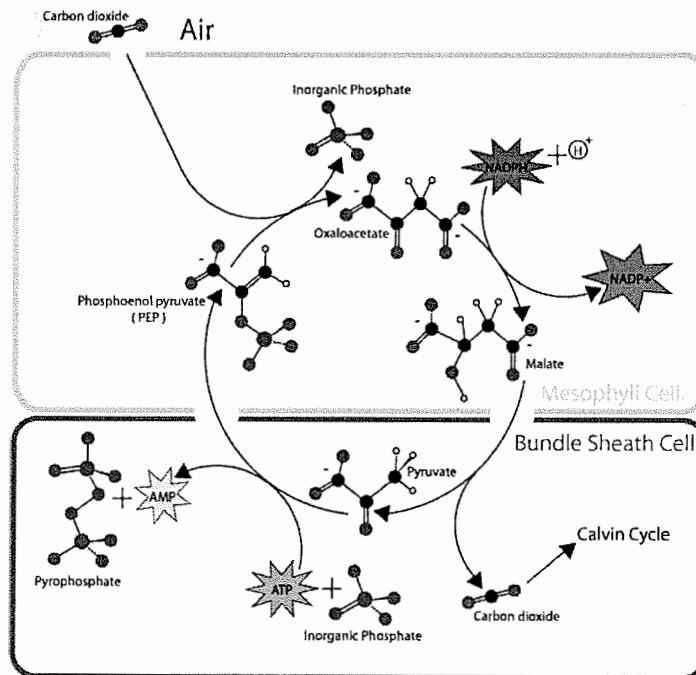


Figura 2. Esquema de la fijación de carbono de las plantas C4.

Las plantas C4, a diferencia de las C3, presentan una colaboración entre dos tejidos fotosintéticos: el mesófilo, generalmente, dispuesto en corona alrededor de los haces vasculares, y la vaina vascular, que presenta cloroplastos funcionales (Haberlandt, 1914). La primera carboxilación se produce en el mesófilo siendo realizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Dando lugar a un ácido de cuatro carbonos, que es transportado a las células de la vaina, donde es decarboxilado originándose CO_2 y un ácido C-3. El CO_2 liberado es nuevamente fijado en una segunda carboxilación por la RubisCO entrando en el ciclo reductivo de las pentosas-fosfato, sintetizándose fosfoglicerato (PGA) y posteriormente almidón y sacarosa. La molécula de C-3, se transforma en alanina o pirúvico y regresa a las células del mesófilo donde completa su conversión como aceptor primario (Gil *et al*, 1982).

La combinación de características anatómicas del amaranto y su tipo de metabolismo (C4), resulta en un incremento en la eficiencia en el uso de CO_2 bajo un rango amplio de estrés por agua y temperatura, lo que contribuye a su amplia distribución y su capacidad de adaptarse a condiciones ambientales diversas. Por todo ello el amaranto se ha utilizado como cultivo para México y el mundo, muy especialmente en zonas de temporal y semiáridas (Stallknecht y Schulz-Schaeffer, 1993).

1.5 Estrés

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: los originados por factores bióticos y los originados por factores abióticos. Ejemplos de estos tipos de estrés se describen a continuación.

Factores Bióticos:

- Patógenos: Virus, viroides, bacterias y hongos.
- Herbívoros y Plagas: Insectos, nemátodos mamíferos, etc.
- Interacciones simbióticas: Leguminosa-rizobium
- Interacciones mutualistas: Gramíneas-hongos
- Plantas: Parásitas

(Dangl y Jones, 2001; Andrade y Sadras, 2002)

Factores abióticos:

- Térmico: altas y bajas temperaturas (enfriamiento, congelamiento).
- Hídrico: agua en exceso (anegamiento) o sequía.
- Químico: sales, iones, gases, herbicidas.
- Físico: vientos, presiones altas o bajas, sonidos, electricidad, magnetismo, gravedad alta o baja.
- Radiación: infrarroja, visible, UV, ionizante.

(Jenks y Hasegawa, 2007; Chinnusamy *et al.*, 2004).

1.6 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). Los suelos salinos son una de las mayores limitaciones en la producción de los alimentos cultivables, reduciendo la capacidad de la agricultura, para sostener a una creciente población mundial (Flowers, 2004).

Más de 800 millones de hectáreas (ha) de tierra alrededor del mundo son afectadas por sal, ya sea por la salinidad (397 millones) o asociadas a la sodicidad (434 millones) (FAO, 2005), esto es, más del 6% de la superficie terrestre (Muñiz, 2005). Mucha de esta salinidad y sodicidad es natural; sin embargo, una proporción significativa de las tierras agrícolas cultivadas, podrían convertirse en suelos salinos debido a los sistemas de riego. De los 1500 millones de ha de

tierras agrícolas, 32 millones de ha (2%) están afectadas por salinidad en diversos grados. De los 230 millones de ha de tierras de riego 45 millones de ha (20%) están afectadas por la sal (FAO 2005). Las tierras agrícolas que usan sistemas de riego representan solamente el 15% del total de tierras para la agricultura, pero representan el doble de producción que las tierras de temporal. Esto es una tercera parte de los alimentos del mundo (Munns, 2005).

Los suelos salinos fueron definidos por Ponnampetuma (1984) como aquellos que contienen suficiente sal en la rizosfera 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, por ello es difícil definir que es un suelo salino. Actualmente la definición de suelo salino más aceptada es la dada por la FAO en 1997: El suelo salino es aquel que tiene una conductividad eléctrica extracto de saturación del suelo (EC_e) de 4 dS m^{-1} (decisiemen por metro) y suelos con EC_e 's que sobrepasan 15 dS m^{-1} son considerados extremadamente salinos (FAO, 1997). La Tabla 1 muestra la definición de suelos salinos, sódicos y alcalinos. Los cationes más comunes asociados con la salinidad son Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , mientras que los aniones más comunes son Cl^- , SO_4^{2-} y HCO_3^- (Dudley, 1994; Hasegawa *et al.*, 2000).

Tabla 1. Definición de términos y descripción de los suelos afectados por sales.

Termino	Definición	Descripción	Efecto en el desarrollo de la planta	Comentarios
Salinidad	Los suelos salinos tienen una alta concentración de sales solubles. Son clasificados como salinos cuando el EC_e es $\geq 4 \text{ dS m}^{-1}$.	La definición de salinidad proviene de la EC_e necesaria para reducir la producción los cultivos. Sin embargo muchos cultivos son afectados por un $EC_e < 4 \text{ dS m}^{-1}$.	Inhibición del crecimiento de la raíz y el tallo	La EC_e es la conductividad eléctrica del extracto de saturación y refleja la concentración de sal en el suelo. Una conductividad de 4 dS m^{-2} es equivalente a 40 mM de NaCl

Sodicidad	Los suelos sodicos tienen una baja concentración de sales solubles, pero un alto porcentaje de intercambio de Na^+ (ESP). Estos suelos son sodicos cuando el $\text{ESP} \geq 15\%$	Esta definición deriva del ESP al cual la degradación de la estructura de los suelos arcillosos, causada por Na^+ , obliga el desplazamiento de cationes divalentes a cargas negativas en las partículas de arcilla	Inhibición del desarrollo de la raíz	Al altas ESP las partículas de arcilla se separan, el suelo retiene poco el agua y cuando se seca se hace muy duro
Alcalinidad	Los suelos alcalinos son un tipo de suelo sódico con un pH alto. Son aquellos que tienen un $\text{ESP} \geq 15$ con un pH de 8.5 – 10	Causado por las sales de carbonato como carbonato sódico o carbonato de calcio.	La absorción de nutrientes se afecta por el pH alcalino	

1.7 Causas de la salinidad

Muchos de los suelos salinos son producto de la geología e hidrología natural de las áreas así como de la pedogénesis (formación del suelo) de los suelos. Los suelos salinos tienen rocas de origen ígneo tales como fenolitos, areniscas y rocas ígneas básicas como basálticas, entre otras, que son ricas en iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^+ causando una salinidad natural del suelo. Por otra parte, también las sales disueltas en las aguas de escorrentía, se acumulan en las depresiones y al evaporarse la solución se forman acumulaciones salinas. El enriquecimiento de sales en un suelo se puede producir, en las zonas costeras, por contaminación directa del mar, a partir del nivel freático salino y por la contribución del viento (Wanjogu *et al.*, 2001). La salinización secundaria se debe a factores humanos, principalmente al uso de agua dura y de poca calidad para el riego de cultivos, el empleo de cantidades elevadas de fertilizantes y la actividad industrial, que en ocasiones, puede acarrear situaciones serias de acumulación de determinadas sales en los suelos situados bajo su zona de influencia, por medio de la contaminación atmosférica o mediante las aguas que discurren por su cuenca hidrográfica (Ghassemi *et al.*, 1995; Flowers, 2004).

1.8 Efectos de la salinidad en plantas

La sal en el suelo inhibe el crecimiento de la planta por dos razones, primero por que reduce la capacidad de la planta para absorber agua, conduciendo a un crecimiento más lento. El segundo efecto es que la planta transpiraría mucho y eventualmente daña las células de las hojas, además de reducir su crecimiento (Munns, 2005).

Estos efectos constan de dos fases, en la primera fase el crecimiento de la planta se inhibe por efecto de la sal que esta fuera de la planta. Esta inhibe el crecimiento de las hojas y en menor medida el de la raíz (Munns, 1993). El efecto osmótico de la sal en la planta resulta en una disminución del potencial hídrico del suelo debido al aumento en la concentración de soluto en la zona de la raíz y la planta pierde turgencia (Guerrier, 1996; Ghoulam *et al.*, 2002).

En la segunda fase los efectos tóxicos se deben a la sal que esta dentro de la planta. La sal tomada se acumula en las hojas viejas llegando a acumularse una alta concentración de sales y las hojas mueren. La causa de este daño se debe probablemente a que la capacidad de acumular iones Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- en vacuolas, se ve sobrepasada. Las sales se acumulan en el citoplasma generando especies reactivas de oxígeno (ROS), 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).

La severidad del daño por sales está también mediada por las interacciones con la humedad, temperatura, radiación y la calidad del aire (Shannon *et al.*, 1994).

En resumen, la reducción inicial del crecimiento de la planta es causado por el efecto osmótico de las sales que están fuera de la raíz y la subsiguiente reducción de crecimiento es causado por la incapacidad de prevenir que las sales lleguen a niveles tóxicos en las hojas (Munns, 2005).

Se ha reportado que en hojas de algodón, frijol y *Atriplex* presentan un engrosamiento de la epidermis y el mesófilo, además las células palisade (ricas en clorofila) son alteradas en su diámetro y tamaño (Longstreth y Noble, 1979). En contraste el espesor de la epidermis, mesófilo y espacio intracelular disminuye en hojas de *Brugueira parviflora* tratadas con NaCl (Parida *et al.*, 2004). En hojas de

espinaca bajo estrés salino se encontró una disminución del espacio intracelular (Delfine *et al*, 1998) mientras que en tomate disminuye la densidad de estomas (Romero-Aranda *et al*, 2001). También la acumulación de sales en hojas causa una senescencia prematura reduciendo el suministro de CO₂, afectando la fotosíntesis y el crecimiento general de la planta.

El efecto en la fotosíntesis depende de la concentración de sal y de la planta. Existe evidencia de que a bajas concentraciones de sal se puede estimular la fotosíntesis por ejemplo en *B. parviflora* y *Gelidium coulteri* (Parida *et al.*, 2004; Macler, 1988) y a altas concentraciones de sales disminuye la fotosíntesis. La disminución del potencial osmótico de la solución en el suelo impide la transpiración y la fotosíntesis. El estrés salino induce en la planta el cierre de estomas y la subsecuente reducción de la fotosíntesis (Shani y Ben-Gal, 2005).

Lyendar y Ready (1996), atribuyen el decremento de la fotosíntesis a factores tales como:

1. La deshidratación de las células de la membrana reduce la permeabilidad a CO₂, pues las altas concentraciones de sal en el suelo y agua crea un alto potencial osmótico reduciendo biodisponibilidad del agua. La reducción del potencial hídrico causa estrés osmótico, reduciendo la fotosíntesis a nivel del transportador de electrones.
2. Reducción de CO₂ por el cierre de estoma.
3. Aumento de la senescencia inducida por salinidad
4. Cambios en la actividad enzimática por cambios en estructura citoplásmica.

1.9 Tolerancia a la salinidad

La tolerancia a la salinidad 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). Las plantas resistentes a estrés salino se han definido como aquellas que tienen la capacidad de resistir las altas concentraciones de sal en la raíz y en la hoja, sin un efecto significativo adverso (Shannon y Grieve, 1999).

Cuando existen altas concentraciones de sales el principal problema es el decremento del potencial osmótico (se hace mas 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^+ del Na^+ para mantener la homeostasis del potasio en suelos altamente salinos (Niu *et al.*, 1995). La alteración de la homeostasis del agua dentro de la planta ocasiona una reducción en su crecimiento, inhibición de la división celular y expansión de las células, además de la aceleración en la muerte celular (Munns *et al.*, 2000; Munns, 2002). La desorganización de la membrana, la producción de (ROS), la toxicidad metabólica, la inhibición de la fotosíntesis y la atenuación en la toma de nutrientes, son factores desencadenados por el estrés salino (Leister, 2005). 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 son nativas de suelos salinos llamadas (halófitas) y plantas que no lo son (glicófitas) y su sensibilidad a sales es diferente (Levitt, 1980; Shannon *et al.*, 1994). Las halófitas son plantas que crecen en presencia de altas concentraciones de sal, alrededor de 450 mM de NaCl o más (Tester y Davenport, 2003). Las glicófitas son plantas sensibles a bajas concentraciones de sal. La mayoría de los cultivos y muchas otras plantas son glicófitas y aunque su respuesta a altas concentraciones de sales podía diferir, se ha reportado evidencia, la cual sugiere que todas las plantas usan los mismos mecanismos generales de regulación y que las diferencias entre halófitas y glicófitas son más cuantitativas que cualitativas (Grenway y Munns, 1980; Zhu, 2001).

1.10 Mecanismos de resistencia al estrés salino

Una variedad de mecanismos contribuyen a la tolerancia a sales, por ejemplo la planta puede activar el crecimiento de sus células para evitar las altas

concentraciones de iones, almacenar la sal en hojas viejas o activando mecanismos para hacer frente los niveles altos de sales disueltas, como lo son la exclusión de iones Na^+ del tallo y de las hojas, manteniendo niveles altos de K^+ (Greenway y Munns, 1980; Munns *et al.*, 2000; Flowers y Hajibagheri, 2001; Zhu *et al.*, 2001). La principal diferencia entre plantas halófitas monocotiledóneas y dicotiledóneas con respecto a la estrategia de tolerancia a estrés salino, radica en el contenido de agua y el aumento del volumen vacuolar. Las dicotiledóneas pueden mantener altas concentraciones de Na^+ en sus vacuolas y requieren menos K^+ para el metabolismo citosólico, mientras que las monocotiledóneas podrían tener menor capacidad de almacenamiento de Na^+ y requerir más K^+ (Flower y Yeo, 1986; Glenn *et al.*, 1999).

1.10.1 Compartimentalización intracelular de iones

Para mantener una baja concentración de Na^+ citoplásmico este es almacenado en vacuolas. La entrada es catalizada por un transportador vacuolar llamado Na^+/H^+ , la diferencia en la $[\text{H}^+]$ se establece por el bombeo de éstos a través de la ATPasa y de las pirofosfatasas (Blumwald *et al.*, 2000). Se ha reportado el aumento en los niveles de transcrito de algunos miembros de la familia de genes *Arabidopsis* *AtNHX* que codifican para transportadores vacuolares Na^+/H^+ en estrés salino (Yokoi *et al.*, 2002). La salinización también induce el bombeo primario de H^+ , llevándose a cabo tanto en plantas halófitas, como glicófitas (Maeshima, 2000). La sobreexpresión de transportadores vacuolares *NHX1* y el gen *AVP1* que codifica para una pirofosfatasa translocadora de H^+ de la vacuola incrementa la tolerancia a estrés salino en *Arabidopsis* (Gaxiola *et al.*, 2001), tomate (Zhang y Blumwald, 2001) *Brassica napus* (Zhang *et al.*, 2001). Los mecanismos por los cuales se aumenta la tolerancia a la salinidad por medio de los transportadores no están aún definidos (Apse *et al.*, 1999). Se piensa que los altos niveles de transportadores en el tonoplasto podría generar en plantas transgénicas una mayor exclusión de Na^+ del citosol (Tester y Davenport, 2003). Se sabe que la sobreexpresión de cinasas también incrementa la tolerancia y acumulación de sales (Piao *et al.*, 2001).

En la membrana de la vacuola se encuentran canales no selectivos de cationes llamados SV y FV. Se piensa que estos canales son permeables a cationes citotóxicos como: Na^+ y Ca^{2+} así como iones K^+ (Tester y Davenport, 2003).

1.10.2 Síntesis de osmoprotectores

Cuando el Na^+ se acumula en la vacuola, el potencial osmótico en el citoplasma debe estar balanceado con respecto al de la vacuola. Esto se hace a través de la síntesis y acumulación de osmoprotectores en el citoplasma que no inhiben las reacciones bioquímicas (Tester y Davenport, 2003). Los osmoprotectores son amenudo muy solubles, neutros o zwitteriónicos e incluyen metabolitos secundarios, como glicinabetaína (compuestos de amonio cuaternarios) y manitol (polioles) y metabolitos como prolinas y sacarosa (Hu *et al.*, 2000). La acumulación de osmoprotectores podría proteger a la planta de daños, manteniendo la estructura de las proteínas, reduciendo el daño por ROS, la peroxidación de lípidos y protegiendo las reacciones de transporte de electrones en la mitocondria (Chen y Murata 2002). En plantas como el maíz, existe una correlación en la producción de osmoprotectores y la tolerancia a estrés (Saneoka *et al.*, 1995). Parece probable que estos compuestos mantienen un potencial osmótico negativo en el citoplasma y protegen las proteínas y las estructuras ribosomales del deterioro causado por concentraciones elevadas de sales en el citoplasma (Tester y Davenport, 2003).

1.10.3 Respuesta al daño por estrés salino y su reparación

El incremento en la síntesis de una gran variedad de proteínas ocurre en respuesta al estrés salino. Muchas de éstas como osmotinas y deshidrinas, que tienen propiedades similares a chaperonas y al parecer están involucradas en el mantenimiento de las estructuras de las proteínas durante el estrés salino (Igram y Bartels, 1996; Campbell y Close, 1997). 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) proveniente de la cebada, confiere tolerancia a el estrés salino en el arroz

transgénico (Xu *et al.*, 1996) sugiriendo que LEA protege contra el efecto osmótico. Otro ejemplo es la sobreexpresión constitutiva en tabaco de una proteína de choque térmico proveniente de una cianobacteria halotolerante (*Aphanothece halophytica*), la cual aumenta la tolerancia a altas concentraciones de sales y reduce las concentraciones de Na^+ en el tallo (Sugino *et al.*, 1999).

Una parte importante en la respuesta al daño por estrés salino, es el de detectar tanto el estrés iónico como el estrés osmótico. Por ejemplo la hiper o hipo osmolaridad podría causar la entrada de iones, conduciendo a la activación de la traducción de señales. El Ca^{2+} está implicado como un decodificador en la cascada de señalización en respuesta a diferentes tipos de estrés (Matsumoto *et al.*, 2002; Sander *et al.*, 2002; Zhu, 2003; Hirschi, 2004). El estrés salino induce cambios en la actividad de los transportadores de calcio y en los componentes de la traducción de señales relacionados Ca^{2+} , lo que sugiere que este ion juega un papel importante en la respuesta a una alta salinidad. Por ejemplo: la actividad de los canales InsP_3 activados por calcio son inducidos por un pre-tratamiento hipotónico y se ha reportado que bajo estrés salino ocurre la transcripción de un gen que codifica para una fosfatidilinositol fosfolipasa C específica. También se ha reportado que una histidina cinasa unida a la membrana, podría actuar como un sensor de Na^+ (Mikami *et al.*, 2002). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de una proteína cinasa parecida a GSK1/shaggy incrementa la tolerancia a el estrés salino (Piao *et al.*, 2001). Es posible que el incremento directo o indirecto en la actividad de cinasas, aumente el bombeo de iones Na^+ . Por ejemplo la sobreexpresión de una cinasa Dbf2 confiere también tolerancia a estrés salino (Lee *et al.*, 1999). Existen varias cinasas y fosfatasas que probablemente se relacionan con el estrés salino entre las que se incluyen: Fosfatasas metabólicas, proteína cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), serina/treonina proteína cinasas (Halfter *et al.*, 2000), proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK), histidina cinasas (Urao *et al.*, 1999), Ca^{2+} /calmodulina activada, proteína fosfatasa serina/treonina específica (Pardo *et al.*, 1998; Kudla *et al.*, 1999).

Durante el estrés salino se ha reportado la producción de ROS causando daño oxidativo (Schwanz *et al.*, 1996). Así mismo se ha reportado un incremento en la

actividad de enzimas antioxidantes en plantas bajo estrés salino, como en cultivos de arroz y pera (Garratt *et al.*, 2002; Mittova *et al.*, 2003; Hernandez *et al.*, 1999; Fasdilla *et al.*, 1997). Los mecanismos por los cuales la salinidad afecta la respuesta de los antioxidantes aún no se conocen. Sin embargo, se ha propuesto que el Cl⁻ puede afectar al fotosistema II o que pudiera existir un cambio en la integridad de la membrana causada por una alta proporción Na⁺/Ca²⁺

Alternativamente, la disolución del potencial de membrana por el flujo de iones, podría activar una cascada de señalización que controlara la homeostasis osmótica e iónica (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2001).

1.11 Estudios de salinidad en amaranto

Existen pocos estudios sobre el efecto de la salinidad en la planta de amaranto. El amaranto pertenece a la familia *Amaranthaceae*, ésta es una de tres familias de plantas natrofilicas es decir, requieren sodio para su crecimiento. Se ha encontrado que el ión Na⁺ estimula la generación de fosfoenolpiruvato en el mesófilo de *A. tricolor* (Murata *et al.*, 1992; Brownell y Bieling, 1996). Sin embargo, un exceso de Na⁺ y otras sales conducen a la reducción en el crecimiento de la planta debido a la reducción de procesos fisiológicos y bioquímicos (Hasegawa *et al.*, 2000; Kashem *et al.*, 2000). *A. tricolor* germina a una concentración de 250 mM de NaCl (Macler *et al.*, 1990) y en cultivos de invernadero *A. tricolor* se ha encontrado que es relativamente tolerante, pues crece en una solución nutritiva de 0 a 0.06N de NaCl (EC de 0 - 6 dSm⁻¹) (Shimose *et al.*, 1991). La tolerancia a sales en *A. tricolor* se ha reportado por Wang *et al.*, (1999) y por Wang y Nii, (2000) proponiendo al amaranto como un posible cultivo para tierras afectadas por altas concentraciones de sales.

Se ha encontrado que cuando se cultiva *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. paniculados* en campo y se incrementa la concentración de sales en el agua de riego de 4 – 6 dS m⁻¹, se reduce el contenido de carbohidratos, oxalatos totales y solubles y nitratos. También se observó que si se incrementa la concentración de sales a 16 dS m⁻¹, ocurre una disminución de la transpiración de la hoja, una

disminución en la resistencia a la difusión de CO₂ y se tiene un potencial osmótico más negativo (Gaikwad y Chavan, 1998).

1.12 Función del calcio en plantas

El calcio es un nutriente esencial, como catión divalente el Ca²⁺, se requiere para funciones estructurales tanto en la pared como en la membrana celular, además tiene la función de mensajero intracelular en el citosol (Marschner, 1995). La deficiencia de calcio es rara en la naturaleza pero el exceso en los suelos afecta alrededor de 800 millones de Ha alrededor del mundo, principalmente en climas áridos y mediterráneos, los suelos calcáreos son los que contienen principalmente CaCO₃ (Jenks y Hasegawa, 2007; White y Broadley, 2003).

El calcio en solución es tomado por la raíz y liberado en el tallo por el xilema, este podría atravesar de la raíz al citoplasma a través de las células vinculadas al plasmodesmo (simplasto) o mediante el espacio entre células (el apoplasto) (White y Broadley, 2003).

Se ha reportado que una alta concentración de Ca²⁺ resulta citotóxico para la planta, es por ello que se mantienen concentraciones micromolares gracias a transportadores Ca²⁺-ATPases y H⁺/Ca²⁺ (CAX) (Sze *et al.*, 2000; Hirschi, 2001). Estas enzimas remueven el Ca²⁺ citosólico hacia el apoplasto o 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 Ca²⁺ libre y el flujo de Ca²⁺ a través de los canales de la membrana plasmática, tonoplasto y RE aumenta, se provoca el inicio de la respuesta celular (White, 2003; Sander *et al.*, 2002; Hirschi, 1999). Este aumento en el citosol de la concentración de Ca²⁺ libre es esencial para la conversión de señales, como: la luz roja, choque térmico e infección por patógenos en una respuesta biológica (Bowler y Fluhr, 2000; Sanders *et al.*, 1999). Las condiciones de estrés, como estrés salino, induce una acumulación de Ca²⁺ citosólico.

Para responder apropiadamente a las perturbaciones en la concentración de Ca²⁺ la célula activa una combinación de Ca²⁺ unido a proteínas. Estos sensores de

calcio cambian su conformación o actividad catalítica cuando se unen a Ca^{2+} e incluyen a las Calmodulinas (CaMs), proteínas parecidas a la β -calcineurina (CBLs), y proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) (White y Broadley, 2003). Muchas de estas proteínas tienen una estructura hélice-loop-hélice, la cual es muy afín a la molécula de Ca^{2+} . Durante ésta respuesta biológica el Ca^{2+} es movilizado de la vacuola para actuar como un ion de señalización intracelular (Marty, 1999).

II. JUSTIFICACIÓN

El calcio es un nutriente esencial en las plantas. Es requerido 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. Sin embargo, se ha reportado que altas concentraciones de Ca^{2+} en el citosol de la célula, resulta citotóxico para la planta, disminuyendo su crecimiento y turgencia, lo que nos indica un estrés salino.

En este trabajo se emplearon soluciones de CaCl_2 para inducir estrés salino para simular las condiciones actuales, en las que aproximadamente 800 millones de ha alrededor del mundo, principalmente en climas áridos y mediterráneos tiene altas concentraciones de Ca^{2+} .

Proponemos al *Amaranthus hypochondriacus* como planta modelo para el estudio de la variación en la expresión de genes en respuesta a estrés salino, a causa de que se ha reportado que es una planta tolerante a estrés salino, además de ser una planta C4 halófito; lo que la hace un cultivo nutritivo y cultivable en climas secos y suelos salinos.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar los genes expresados diferencialmente en hojas de *Amaranthus hypochondriacus* bajo estrés salino.

3.2 Objetivos específicos

- Construir genotecas sustractivas de amaranto variedad Nutrisol en estrés salino.
- Identificar las secuencias de los genes expresados diferencialmente en estrés salino.
- Analizar la expresión de los genes expresados y reprimidos en estrés salino.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Condiciones de crecimiento de plantas de amaranto

En este estudio semillas de *Amaranthus hypochondriacus* variedad Nutrisol se trataron con hipoclorito de sodio al 1% y se lavaron 3 veces con agua MilliQ estéril. Luego se colocaron sobre papel filtro para secar.

Las semillas se germinaron en tierra estéril (Special Blend SunGro Horticulture, Bellevue, CA) a temperatura ambiente durante 8 días. Posteriormente las plantas se transplantaron a macetas con tierra estéril (Special Blend), se seleccionaron aquéllas que presentaban igual tamaño y de 3-4 hojas. Las plantas se mantuvieron 7.4 semanas en la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas con una temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad.

4.2 Tratamiento con cloruro de calcio (CaCl₂)

El estrés salino se llevó en plantas de 2 semanas de edad germinadas y luego se colocaron en cámaras de crecimiento.

Se formaron tres grupos de plantas, regándose uno de ellos con 100 mL de una solución de CaCl₂ 20 mM, otro con CaCl₂ 50 mM y uno más con 100 mL de agua desionizada (todas las soluciones se ajustaron a pH = 6), durante un periodo de 45 días. Posteriormente se recolectaron las hojas de cada condición, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C. Los tratamientos se hicieron por triplicado.

4.3 Obtención de la genoteca sustractiva

4.3.1 Aislamiento de mARN

Las hojas se congelaron con nitrógeno líquido, se molieron hasta obtener un polvo fino utilizando mortero y pistilo. El ARN total se extrajo de 30 mg de hojas tratadas de cada una de las tres condiciones en estudio, se utilizó el kit RNAeasy (QIAGEN), 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 ARNt.

El ARN obtenido se cuantificó y se determinó su pureza a densidad óptica (D.O) de 260nm/280nm en el espectrofotómetro (Agilent), obteniéndose los datos que se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Concentración de ARN total obtenido por el método de RNAesay

Tratamiento de las hojas	D.O _{260 nm}	D.O _{280 nm}	D.O _{260/260 nm}	Concentración de ARN total (ng/μL)
Agua desionizada	0.0880	0.0432	2.03	707.52
CaCl ₂ 20 mM	0.0138	0.0070	1.96	110.95
CaCl ₂ 50 mM	0.0404	0.0200	2.01	324.82

4.3.2 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó 1.5 μg de RNA de cada una de las condiciones mencionadas (agua desionizada, CaCl₂ 20 mM y CaCl₂ 50 mM). Para la síntesis de ADNc se empleó el sistema SMARTTM PCR cDNA synthesis kit (Clontech) y la Super ScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Este sistema tiene la ventaja de aumentar la probabilidad de que los mensajeros sean retrotranscritos por añadir desoxicitidinas al extremo 5' de la primera cadena de ADN, formando un excelente molde, donde se acopla el oligo SMART IIATM (necesario para la síntesis de la segunda cadena de ADNc). Para la síntesis de la segunda cadena de ADN se necesitó optimizar el número de ciclos de PCR y las condiciones de amplificación para obtener la mayor cantidad de ADN de doble cadena. Cada

muestra se realizó por duplicado comenzando con 15 ciclos, siguiendo con 18, 21, 24, 27 y 30 ciclos, tomando en cada uno de ellos una muestra, la cual se corrió en un gel de agarosa al 1.5 %.

4.3.3 Purificación de ADNc

El ADNc se purificó en un primer paso con fenol-cloroformo-isoamílico, precipitando con n-butanol, en seguida se utilizaron las columnas cromatográficas SMART (Clontech) para mejorar la pureza del ADNc.

4.3.4 Hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión (SSH)

La SSH se llevó a cabo siguiendo el protocolo del sistema PCR select™ subtraction kit (Clontech, 2004). Para obtener los genes que se sobre expresan a alta concentración de CaCl₂, se utilizó como control el ADNc de la condición agua desionizada y como problema ADNc de la condición CaCl₂ 50 mM. Para obtener los genes que disminuyen su transcripción a alta concentración de CaCl₂, se utilizó como control el ADNc de la condición 50 mM CaCl₂ y como problema ADNc de la condición Agua desionizada.

También se obtuvieron los genes que se sobreexpresan a bajas concentraciones de CaCl₂, donde se utilizó como control el ADNc de la condición agua desionizada y como problema ADNc de la condición CaCl₂ 20 mM. También se obtuvieron los genes que disminuyen su transcripción, utilizando en este caso como control el ADNc de la condición CaCl₂ 20 mM y como problema ADNc de la condición Agua desionizada. Todos los ADNc se digirieron con la enzima *Rsa I* 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.

4.3.5 Construcción de las Genotecas sustractivas

Para la construcción de las genotecas sustractivas de hojas de *Amaranthus hypochondriacus* variedad Nutrisol estresadas con alta concentración de CaCl₂, los fragmentos de los genes obtenidos por medio de la SSH, se clonaron en el

plásmido pGEM-T Easy (Promega). Las células competentes de *Escherichia coli* Top 10 se transformaron por choque térmico con la ligación pGEM-T Easy-productos de PCR de los genes diferenciales. Las cepas transformadas fueron

plaqueadas en cajas de Petri con LB/ampicilina (100 µg/mL)/X-gal (0.08mg/mL)/IPTG (0.1mM) y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Posteriormente se seleccionaron las colonias blancas (con inserto), estas se recuperaron y se crecieron en medio líquido LB-ampicilina (100 µg/mL), toda la noche a 37 °C. Posteriormente se realizó un ensayo con la enzima de restricción *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.

4.4 Análisis bioinformático de los EST's encontrados en las bibliotecas sustractivas

Las secuencias se analizaron en el programa **Screen sequence for vector contamination** de NCBI para retirar secuencias contaminantes. Después las secuencias se analizaron con el programa **SeqMan II** (DNASTar) para agrupar los EST's en contigs. Posteriormente fueron sujetas a un análisis bioinformático usando los algoritmos BLASTX y TBLASTX comparando con la base de datos nr de GenBank, TIGR db *Arabidopsis thaliana* Genome Project, TIGR Rice Genome Annotation y Gene Ontology, para clasificar los EST's encontrados.

4.5 Análisis de expresión diferencial de algunos genes por RT-PCR

Para corroborar la expresión diferencial de algunos de los genes, se realizó ensayo de RT-PCR. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron a partir de las secuencias de cDNA de los genes *slt1*, *slt*, *mt2a* y *ssh* encontradas en las genotecas sustractivas. Los oligonucleótidos forward y reverse fueron diseñados mediante el programa MacVector. Las secuencias se muestran en la **Tabla 3**. El gen que codifica para actina se uso como control interno. Las condiciones de amplificación se muestran en la **Figura 3**. Como templado se utilizó ADNc de

obtenido a partir de el RNA extraído de cada una de las condiciones a evaluar (Plantas regadas con: H₂O desionizada, CaCl₂ 20 mM y CaCl₂ 50mM).

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de expresión diferencial por RT-PCR.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Amplicón (pb)
SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1	slt1 forwart	5'GGGATAGTAAGAAAAATGGGGG3'	418
SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1	slt2 reverse	5'CCCAGCCATTGCTATCCCT3'	418
SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1	Slit F forwart	5'CAAGGCAAGGAGAACGAC3'	239
SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1	Slit R reverse	5'CCAGGACCAAAATCACC3'	239
Metallothionein	MT2A 1 forwart	5'GTCTTGCTGTGGAGGAAAC3'	271
Metallothionein	MT2A 2 everse	5'CTTGGCTCTGCGTCTTTC3'	271
polyphosphoinositide binding protein Ssh1p	SSH 1 forwart	5'GCAAGAGAGAACTCGCAAG3'	445
polyphosphoinositide binding protein Ssh1p	SSH 2 reverse	5'GCTGACGGACAAAAGGT3'	445

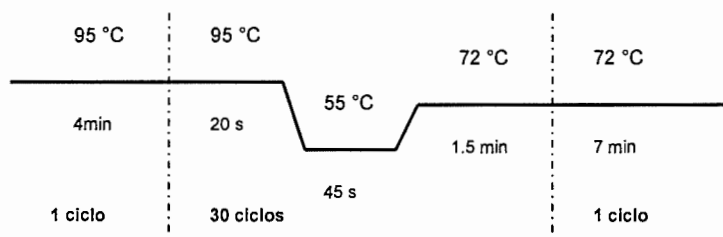


Figura 3. Condiciones de amplificación para RT-PCR

Los productos de la RT-PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % y se tiñeron con bromuro de etidio. El análisis de las bandas por densitometría se llevo acabo con el software Quantity OneTM v 4.5.0 (Bio-Rad). La intensidad de la expresión se normalizó con la expresión del gen de actina.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Diseño del método para estresar *Amaranthus hypochondriacus* con diferentes concentraciones de CaCl_2

Previo a este trabajo en nuestro laboratorio se llevó a cabo el estudio de las concentraciones de CaCl_2 en las cuales crece el amaranto morfológicamente normal y en la cual presenta daño morfológico característico causado por estrés salino. Con los datos obtenidos se planteó analizar tres concentraciones diferentes, tomando como control la planta regada con una solución CaCl_2 20 mM de y como problema las plantas regadas con agua desionizada CaCl_2 y otra con CaCl_2 50 mM de, una tomada para observar el estrés causado por la deficiencia de calcio y la otra para el analizar el estrés salino por esta sal respectivamente. La **Figura 4a** muestra el crecimiento de las plantas de amaranto tratadas con estas condiciones observándose un desarrollo normal y sin daño morfológico visible en la planta de amaranto tratada con la solución de CaCl_2 20 mM, no así en la planta regada con la solución CaCl_2 50mM, muestra un menor desarrollo de tallo con respecto a la planta control, además se observa la pérdida de turgencia, debido a la pobre captación de agua de la planta **Figura 4b**, debido a que las altas concentraciones de sales en el apoplasto de la célula, ocasiona toxicidad y desequilibrio iónico e hiperosmolaridad. Además la alta concentración de sales en el suelo (solutos) en solución ocasiona un choque hiperosmótico debido a la disminución del potencial hídrico, causando reducción del turgor y en consecuencia la expansión celular (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002).

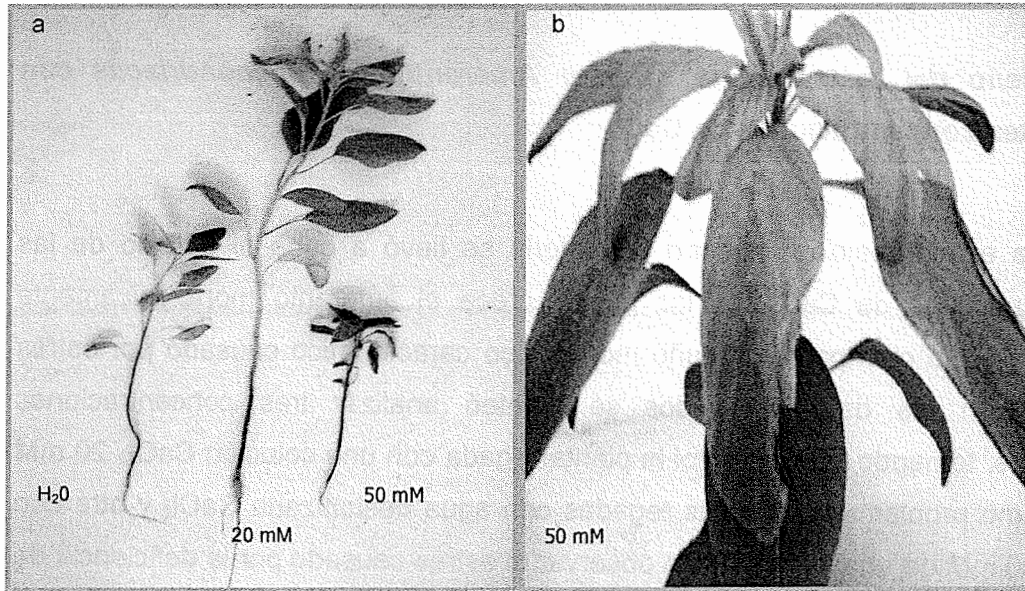


Figura 4. a) Plantas de *Amaranthus hypochondriacus* regadas con diferentes soluciones. 20mM de CaCl₂ (control) 50 mM de CaCl₂ y H₂O (problemas). b) Planta de *Amaranthus hypochondriacus* que presenta pérdida de turgencia y marchitamiento general.

5.2 Construcción de las genotecas sustractivas por el método SSH

Para la identificación de las variaciones en los niveles de expresión de los genes durante las diferentes condiciones evaluadas, se construyeron genotecas sustractivas. Obteniéndose de ellas los genes y los que se reprimen. En este trabajo se construyeron cuatro genotecas de ADNc teniéndose hasta el momento un aproximado de 84 a 336 clonas por genoteca, de las cuales se han secuenciado un total de 130 clonas. En la **Tabla 4** se detalla el número de clonas que tiene cada genoteca y el número de genes secuenciados por genoteca.

Tabla 4. Número de clonas, genes secuenciados y número de EST's de cada unas de las genotecas sustractivas de ADNc.

Genoteca	Número de clonas	Número de genes secuenciados	Número de contigs	Número de Unigenes
20 I	336	16	6	4
20 R	103	31	24	23
50 I	84	35	20	19
50 R	96	48	22	21

20I = genes reprimidos en la condición H₂O desionizada, 20IR = genes inducidos en la condición H₂O desionizada, 50I = genes inducidos en la condición 50 = mM de CaCl₂, 50IR genes reprimidos en la condición 50 mM de CaCl₂.

En la **Figura 5** se observan los genes después de ser liberados con la enzima de restricción *EcoRI* del vector de clonación pGEM-T Easy (Promega).

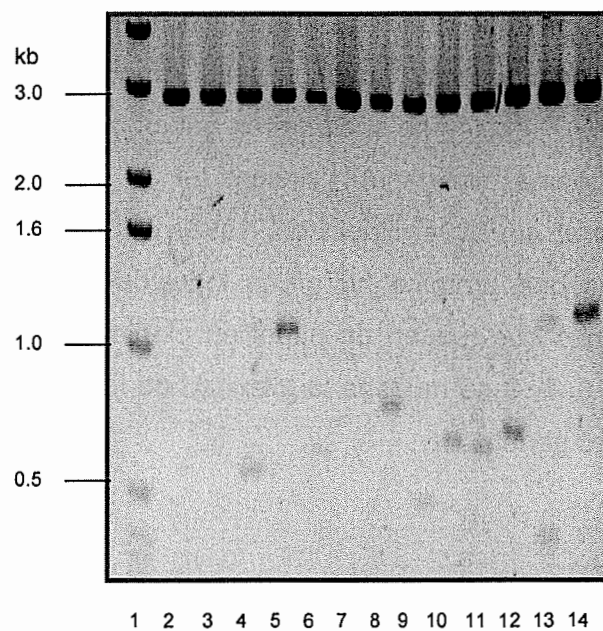


Figura 5. Análisis de restricción de las genotecas. Gel de agarosa al 1%, muestra la gama de tamaño en los genes obtenidos en las genotecas sustractivas de ADNc.

5.3 Clasificación y análisis bioinformático de los genes obtenidos en las genotecas SSH

Tomando genes de las cuatro genotecas, hasta el momento se han secuenciado 130 fragmentos. Después de analizar las secuencias en los programas **MegAlign** (DNASTar), **SeqMan II** (DNASTar) y **Screen sequence for vector contamination** (vecscreen de NCBI) para eliminar la contaminación de las secuencias por el vector y ensamblar las secuencias para formar los contigs, los genes fueron analizados usando los algoritmos Nucleotide blast, BLASTX y TBLASTX para encontrar posibles secuencias homólogas, comparando con la base de datos nr de GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/, TIGR db *Arabidopsis thaliana* Genome Project <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>, TIGR Rice Genome Annotation <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/> y Gene Ontology <http://www.geneontology.org/>. Los genes identificados en este análisis muestran que tenemos genes homólogos a **slt1** (tolerancia Sodio y Litio 1) reportado como gen que participa en la respuesta a estrés salino (Matsumoto, 2001), un gen que codifica para una proteína parecida a **Hyp-rich glycoprotein** que tiene actividad de transportador de iones Na, Ca, K. Se encontró además un gen que codifica para una posible proteína de choque térmico **DNAJ heat shock protein** (anteriormente reportada en *Arabidopsis thaliana* bajo estrés salino), también se encontraron genes que codifican para una **SAM** (S-adenosil-L-metionina sintetasa) (Vincent *et al.*, 2005), una **MT2A** (metalotioneína 2A) (Mir *et al.*, 2004; Robinson, 1993) y una **USP** (proteína de estrés universal) que es una proteína hidrofílica inducida por sal, entre otras, reportadas como proteínas que juegan un papel en plantas expuestas a estrés abiótico. En la **Tabla 5, 6, 7, 8** se muestra la totalidad de los genes identificados de cada una de las cuatro genotecas.

Tabla 5. Clasificación de los genes que disminuyeron su nivel de expresión con H₂O desionizada, encontrados en la genoteca SSH de *Amaranthus hypochondriacus*.





Contigs (EST's)	Anotación	Función	Score	E. value	Identidad
1 (1,2,9,14,15,66,95 y 98)	LOC_Os01g51430 12001.t04575 unspliced -genomic expressed protein expressed protein of unknown function green ripe-like 1 <i>Solanum tuberosum</i>	Desconocida	609	7.2 e ⁻²⁸	65%
2 (52 y 58)	NM_202565.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> unknown protein (AT3G12570) mRNA, complete cds similar to SLT1 (SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TAIR:AT2G37570.1)	Respuesta a estrés salino	170	6e ⁻³⁹	68%
3 (30 y 72)	NM_201896.2  <i>Arabidopsis thaliana</i> SLT1(SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1) (SLT1)mRNA, complete cds.	Respuesta a estrés salino	270	4e ⁻⁷¹	79%
4 (13)	gb AAG39002.1 AF213399.1  SLT1 protein [<i>Nicotiana tabacum</i>]	Respuesta a estrés salino	159	2e ⁻³⁷	56%
5 (68)	AM748496.1 <i>Vigna unguiculata</i> partial mRNA for putative 23S rRNA pseudouridine synthase (yibC gene), clone 41	Regulación de genes	82.4	1e ⁻¹²	97%
6 (73)	ref NP_001031020.1  unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] Similar to mov34 family protein	Degradación de proteínas	132	1e ⁻²⁹	69%

Tabla 6. Clasificación de los genes que aumentaron su nivel de expresión con H₂O desionizada, encontrados en la genoteca SSH de *Amaranthus hypochondriacus*.

Conting (EST's)	Anotación	Función	Score	E. value	Identidad
1 (10 y 64)	ref NP_566427.1 unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	Desconocida	159	4e ⁻⁴¹	69%
2 (43 y 54)	gb AAP23943.1 CCR protein [x <i>Citrofortunella mitis</i>]	Factor de transcripción	120	6e ⁻²⁶	49%
3 (58 y 72)	gb AAG39002.1 AF213399.1  SLT1 protein [<i>Nicotiana tabacum</i>]	Respuesta a estrés salino	140	2e ⁻³²	55%

4 (2 y 41)	sp P82010 AX2_BETVU Antifungal protein AX2	Defensa (responde a infección por hongos)	62.4	4e ⁻⁰⁹	50%
5 (66)	ref NP_567926.1 G zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein [A.thaliana]	Factor de transcripción	85.3	6e ⁻¹⁵	45%
6 (73)	AY065654.1 Pisum sativum ultraviolet-B-repressible protein mRNA, partial cds	Fotosíntesis	161	2e ⁻³⁶	77%
7 (5 y 20)	U09464.1 Medicago sativa clone pH3c130 histone H3.2 mRNA, complete cds	Regulación de genes	214	1e ⁻⁵²	84%
8 (16)	AF268027.1 Amaranthus cruentus metallothionein mRNA, complete cds	Respuesta a estrés iónico	682	0.0	100%
9 (9)	AB112476.1 Atriplex nummularia AnSIHP1 mRNA for salt-induced hydrophilic protein, complete cds.	Respuesta a estrés salino	174	3e ⁻⁴⁰	74%
10 (24)	gb ABN03968.1 UG DNAJ-like protein [Solanum lycopersicum]	Plegamiento de proteínas	94.7	2e ⁻¹⁸	46%
11 (51 y 52)	No se encontró secuencia homologa reportada	—			
12 (30)	sp O8LRM8 TCTP_WHEAT G Translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP).	Interacción con iones calcio	107	3e ⁻²²	81%
13 (96)	No se encontro secuencia homologa reportada	—			
14 (60)	gb AAA34193.1 ORF > gb AAA86424.1 heat shock protein	plegamiento de proteínas	104	9e ⁻²¹	48%
15 (26)	gb DR381373.1 UG 1048880 CERES-148 Arabidopsis thaliana cDNA clone 159018 3', mRNA sequence.	Desconocida	173	6e ⁻⁴²	83%
16 (29 y 91)	X13134.1 Spinach mRNA for photosystem I subunit V	Fotosíntesis	307	2e ⁻⁸⁰	81%
17 (15)	AF150666.1 Amaranthus hypochondriacus ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase small subunit precursor (RbcS2) mRNA, complete cds	Fotosíntesis	1077	0.0	93%

18 (59)	gb ABA95111.1 retrotransposon protein, putative, unclassified	Regulación de genes	37.7	1.9	12%
19 (98)	gb EAY75573.1 hypothetical protein OsI_003420 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]	Desconocida	205	1 ^{e-51}	58%
20 (40)	CN782050.1 EST00145 cseed Chenopodium quinoa cDNA clone S01C14 5' similar to universal stress protein (USP) At3g62550, mRNA sequence	Respuesta a estrés	416	1e ⁻¹¹²	79%
21 (1)	AB221009.1 Beta vulgaris BvSAMS1 mRNA for S-adenosyl-L-methionine synthetase, complete cds		697	0.0	90%
22 (103)	At5g48950.1 68418.m06056 thioesterase family protein contains Pfam profile PF03061: thioesterase family protein	Metabolismo (crecimiento celular)	191(34.7)	0.003	61%
23 (8)	Jacalin-like lectin domain containing protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	desconocida	56.4	4e ⁻⁰⁷	36%
24 (100)	gb J03887.1 SP1PSB1A Spinach psbI gene encoding the 10kd polypeptide of photosystem II, complete cds	Fotosíntesis	315	1 ^{e-82}	78%

Tabla 7. Clasificación de los genes sobre expresados con 50mM CaCl₂, encontrados en la genoteca SSH de *Amaranthus hypochondriacus*.

Conting (EST's)	Anotación	Función	Score	E. value	Identidad
1 (2b,10,73 y 77)	LOC_Os03g44050 12003.t03796 unspliced-genomic OsWAK27 - OsWAK receptor-like protein kinase, expressed	Traducción de señales	266(46)	8.7 ^{e-06}	58%
2 (5b,6b,7b y 81)	ref NP_566427.1 UG unknown protein [Arabidopsis thaliana]	Desconocida	191	2 ^{e-47}	62%
3 (34 y 74)	emb CAN61451.1 hypothetical protein [Vitis vinifera]	Desconocida	110	4e ⁻²³	72%
4 (9,15,33 y 39)	emb AM748496.1 Vigna unguiculata partial mRNA for putative 23S rRNA pseudouridine synthase (yibC gene), clone 41	Regulación de genes	80.6	5e ⁻¹²	95%

5 (1 y 49)	EE743832.1 CL56_CT72_CN84 Cork oak SSH library of phellem Quercus suber cDNA similar to leucine-rich repeat (LRR) family protein, mRNA sequence	Desconocida	53.6	$8e^{-04}$	94%
6 (2,4 y 83)	No se encontró posibles secuencias homologas	—			
7 (44 y 47)	No se encontró posibles secuencias homologas	—			
8 (3)	BQ589961.1 S015138-024-019-A07-SP6 MPIZ-ADIS-024-storage root Beta vulgaris cDNA clone 024-019-A07 5-PRIME, mRNA sequence.	Desconocida	149	$9e^{-33}$	93%
9 (6)	DQ372900.1 Solanum tuberosum green ripe-like 1 mRNA, complete cds	Desconocida	257	$4e^{-65}$	76%
10 (3b)	prf 1814452D Hyp-rich glycoprotein PF00520	Estrés(componente pared celular)	44.4	0.021	35%
11 (14b)	gb ABO83407.1 RNA-directed DNA polymerase (Reverse transcriptase) [Medicago truncatula]	Desconocida	43.1	0.008	35%
12 (13b)	gb EE492912.1 EX20LIB6_UP_042_E11_13APR2004_087 Brassica napus EX20LIB6 Brassica napus cDNA 5', mRNA sequence	Desconocida	210	$7e^{-51}$	75%
13 (17)	gb AF024651.1 AF024651 UG Glycine max polyphosphoinositide binding protein Ssh1p (SSH1)mRNA, complete	Traducción de señales	253	$6e^{-64}$	71%
14 (10b)	ref NM_112305.1 UEG Arabidopsis thaliana CID9 (CTC-Interacting Domain 9); RNA binding / protein binding (CID9) mRNA, complete cds	Factor de transcripción	255	$8e^{-65}$	78%
15 (5)	CQ491319.1 G.h.fbr-sw00709 G.h.fbr-sw Gossypium hirsutum cDNA, mRNA sequence	Desconocido	68	$2e^{-08}$	100%
16 (42)	ref NP_565864.1 G SLT1 (SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1)	Respuesta a estrés salino	226	$3e^{-58}$	86%
17 (46)	No se encontró secuencia homologa	—			
18 (4b)	No se encontró secuencia homologa	—			
19 (20)	No se encontró secuencia homologa	—			
20 (84)	No se encontró secuencia homologa	—			

Tabla 8. Clasificación de los genes que disminuyeron su expresión con 50mM CaCl₂, encontrados en la genoteca SSH de *Amaranthus hypochondriacus*.

Conting (EST's)	Anotación	Función	Score	E. value	Identidad
1 (2,3,7,12, 17,36,38,40, 43,51,57,58, 59,61,64,68 y 77)	sp P82010 AX2_BETVU Antifungal protein AX2 gb AAB47009.1 AX2=antifungal cysteine-rich protein [Beta vulgaris=sugar beets, leaves, Peptide, 46 aa]	Defensa (responde a infección por hongos)	54.1	8e ⁻⁰⁷	44%
2 (11,39 y 63)	ref NM_201896.2 UG Arabidopsis thaliana SLT1 (SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1) (SLT1) mRNA, complete cds	Respuesta a estrés salino	255	1e ⁻⁶⁴	79%
3 (19,30 y 65)	ref NP_179378.1 UG DNAJ heat shock protein, putative [Arabidopsis thaliana]	Plegamiento de proteínas	88.6	1e ⁻¹⁶	38%
4 (79,80 y 96)	LOC_Os04g14220 2004.t01241 unspliced-genomic disease resistance protein RPM1, putative, expressed	Desconocida	222(39.4)	0.00091	64%
5 (1 y 55)	LOC_Os03g21310 12003.t01886 unspliced-genomic ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain containing protein, expressed	Desconocida	31.9	0.15	60%
6 (8)	LOC_Os02g21009 12002.t01890 unspliced-genomic vacuolar cation/proton exchanger 1c, putative, expressed	Transportador intracelular (responde a estímulos abióticos)	36.4	0.0074	60%
7 (41)	emb CAA46150.1 U calmodulin [Oryza sativa] emb CAA74307.1 UG calmodulin [Zea mays]	Traducción de señales	288	2e ⁻⁷⁶	97%
8 (94)	Atlg20570.1 68414.m02565 tubulin family protein	Desconocida	768(121.3)	3e ⁻²⁹	71%
9 (71)	gb AAP23943.1 CCR protein [x Citrofortunella mitis]	Factor de transcripción	138	5e ⁻³¹	51%
10 (66)	At3g54890.2 68416.m06082 chlorophyll A-B binding protein / LHCl type I (CAB) identical to chlorophyll A/B-binding protein [A. thaliana]	Fotosíntesis	52.7	9.4e ⁻⁰⁹	62%
11 (44)	emb X05511.1 SOOEC2.3 Spinach mRNA 23 kDa protein of the photosynthetic oxygen-evolving complex (OEC)	Fotosíntesis	800	0.0	81%

12 (83)	No se encontró secuencia homologa	—			
13 (67,70 y 78)	sp P11898 GRP1_CHERU Glycine-rich protein HC1	Proteina transmembrana	143	1^{e-32}	54%
14 (35 y 95)	sp P42764 JIPH_ATRCA Jasmonate-induced protein homolog gb AAA86977.1 jasmonate-induced protein homolog; similar to barley jasmonate-induced protein, Swiss-Prot Accession Number P32024	Desconocida	38	0.19	30%
15 (88)	LOC_Os02g22100 12002.t01998 unspliced-genomic rhomboid family protein, expressed	Metabolismo (biosíntesis de oligosacáridos)	220(39.1)	0.0011	59%
16 (34)	ref NP_172153.1 UG PSBP-1 (OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 2); calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	Fotosíntesis	336	$4e^{-102}$	75%
17 (92)	LOC_Os10g36200 12010.t02905 unspliced-genomic metal ion binding protein, putative, expressed	Se une a metales pesados	307(52.1)	1.8^{e-05}	63%
18 (91)	dbj AB112476.1 Atriplex nummularia AnSIHP1 mRNA for salt-induced hydrophilic protein, complete cds	Respuesta a estrés salino	190	3^{e-45}	74%
19 (86)	emb CAB53034.1 U photosystem I subunit XI precursor [Arabidopsis thaliana]	Fotosíntesis	140	3^{e-32}	85%
20 (87)	gb EF122398.1 Citrus cv. Shiranuhi putative auxin-repressed/dormancy associated protein mRNA, partial cds	Desconocida	120	4^{e-24}	69%
21 (16)	ref XP_001218596.1 G conserved hypothetical protein [Aspergillus terreus NIH2624] Similar a conserved hypothetical protein que conserva los dominios:AraJ; Arabinose efflux permease [Carbohydrate transport and metabolism] y MFS_1; Major Facilitator Superfamily	Metabolismo	33.9	3.2	31%
22 (62)	ref NM_202565.1 UG Arabidopsis thaliana unknown protein (AT3G12570) mRNA, complete cds. Similar a SLT1 (SODIUM- AND LITHIUM-TOLERANT 1)	Respuesta a estrés salino	105	2^{e-19}	67%

5.4 Distribución de los genes expresados diferencialmente en las genotecas sustractivas.

Un gran número de genes que codifican para proteínas involucradas en diferentes procesos bioquímicos fueron aislados de las genotecas sustractivas.

Como se observa en la **Figura 6**, el 12% de estos genes están involucrados en la respuesta a un tipo de estrés abiótico, principalmente salino, como lo son los genes que codifican para proteínas: **MT2A, un transportador vacuolar, SLT1, AnSIHPI y USP** las cuales han sido reportadas en estrés salino, regulando alguno de ellos el desequilibrio iónico y el daño por ROS (Matsumoto, 2001; Kawasaki *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004). También se encontró que el 12% del total de genes, están involucrados en la fotosíntesis y que modificaron su expresión durante el estrés con CaCl₂, lo cual indica que esta se ve afectada, tanto por el cierre de estomas como por la producción de ROS. Se observó que genes que codifican para las proteínas como el **complejo envolvente oxígeno fotosintético, precursor de la subunidad IX del fotosistema I, proteína de unión a la clorofila A-B/LCHI tipo 1 y Rubisco** (Gao *et al.*, 2008), disminuyeron su nivel de expresión, lo que hace suponer una disminución en la capacidad de captación de CO₂ y luz, dando como consecuencia la atenuación de la fotosíntesis y por lo tanto un menor desarrollo de la planta.

En este estudio, se identificó un 3% del total de genes que codifican para proteínas como **DnaJ y proteínas de choque térmico** aumentaron su nivel de transcrito (Gao *et al.*, 2009; Bohnert, 2005) (se han reportado que aumentan su nivel de expresión cuando la planta es expuesta a condiciones de estrés como temperaturas extremas y salinidad). Estas proteínas pueden afectar la tolerancia a sal ya que en la formación y el plegamiento correcto de las proteínas (Gao *et al.*, 2008; Bohnert, 2005).

El 5% del total de los genes encontrados corresponden a Factores de transcripción, **C3HC4-type RING finger, CCR protein y CID9**, estos variaron en su expresión en estrés salino. Se ha reportado que algunos de estos factores están involucrados en la mediación entre la interacción proteína-proteína, otros factores con el dominio RING están implicados en una gran variedad de procesos

biológicos, entre ellos esta la de ubiquitinación de proteínas, el factor de transcripción CID9 que interactúa con el RNA y tiene motivos RRM, RBD o RNP. Existen proteínas hnRNP las cuales están involucradas en la regulación del splicing alternativo (Hatakeyama, 2003). Los resultados indican una regularización de estos factores debida al estrés salino.

La traducción de señales (5% del total de genes) y la regulación de genes (7%) son otro grupo de genes que variaron su expresión en respuesta al estrés salino. Se sabe que al ocurrir un estrés en la planta, esta detecta el estímulo y trasmite la señal hasta la maquinaria celular para activar la respuesta adaptativa. En este trabajo se encontraron genes como una calmodulina, una cinasa y una Ssh1. Se ha reportado que para responder a una apropiada perturbación en la concentración de Ca^{2+} la célula posee detectores de calcio los cuales incluyen a las calmodulinas, calcineurinas y proteína cinasas dependientes de calcio (White, 2003). Las calmodulinas se unen a diferentes proteínas implicadas en diferentes procesos fisiológicos incluyendo la propia regulación de Ca^{2+} , por lo que creemos que es debido a esto que su expresión en el estrés causado por $CaCl_2$ se ve aumentada.

Las plantas experimentan varios tipos de estrés, entre ellos el estrés por sequía, estrés salino, estrés por temperaturas extremas o estrés por un alto pH en el suelo, entre otros. La tolerancia o susceptibilidad a estos estrés abióticos es un fenómeno complejo, en parte por que puede ocurrir en diferentes estados de desarrollo de la planta y por que a menudo, más de un tipo de estrés afecta a la planta. La mayoría de los estrés abióticos afectan principalmente el crecimiento y desarrollo de la planta. El estrés salino por su parte interfiere con el desarrollo de la planta al ocasionar un estrés por sequía y toxicidad iónica, la sequía es ocasionada por que la planta es incapaz de absorber de manera eficiente agua y la toxicidad iónica es debido a la alta entrada de iones al citoplasma de la célula presentes en el agua de riego o en la tierra (Chinnusamy *et al.*, 2004). Es por esto que varios grupos de genes se ven alterados en su expresión durante este estrés salino causado por $CaCl_2$.

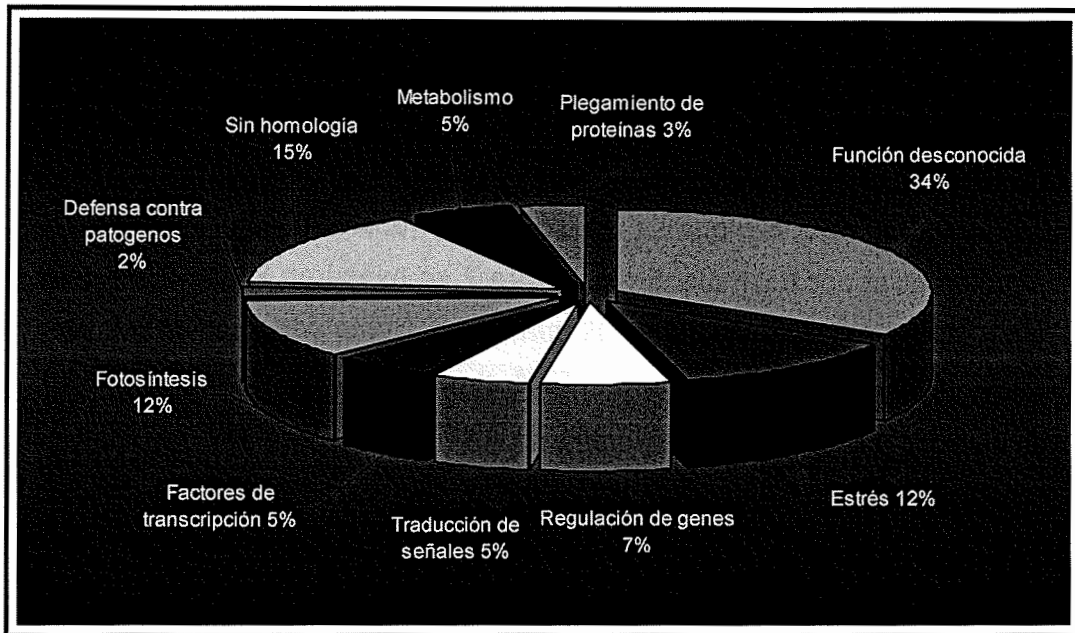


Figura 6. Distribución de los genes diferencialmente expresados en hojas de amaranto bajo estrés salino.

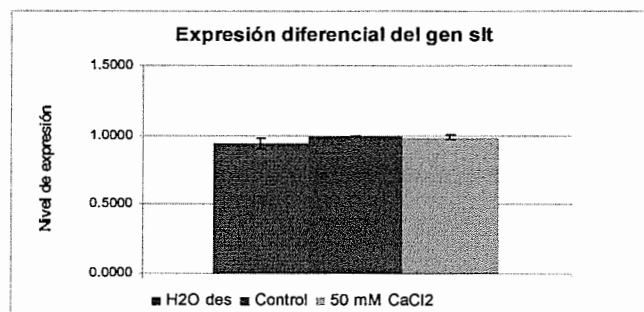
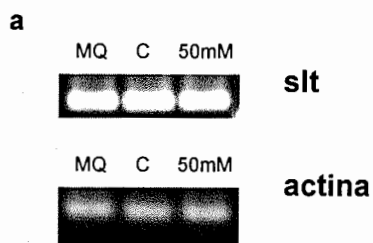
5.5 Análisis de expresión de los genes *slt*, *slt1*, *mt2a* y *ssh* por RT-PCR

La expresión de 3 diferentes genes de la genoteca sustractiva se analizaron por RT-PCR, esto con el fin de corroborar si la expresión de los genes corresponde a lo encontrado en las genotecas SSH. El análisis se realizó en los tres tratamientos, riego con H₂O desionizada, CaCl₂ 20mM o control y CaCl₂ 50mM. Se analizaron estos genes debido a que su expresión se ha reportado en respuesta a varios tipos de estrés abiótico como oxidativo, hídrico (sequía) y salino (Wong *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2001.)

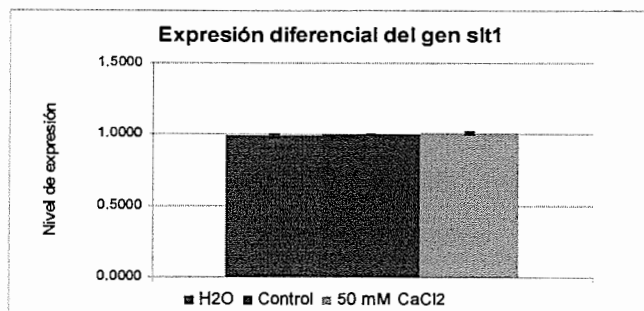
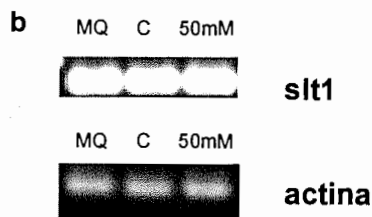
La técnica SSH (Clontech) amplifica los genes expresados diferencialmente entre dos condiciones control (driver) y problema (tester). Los niveles de enriquecimiento de un ADNc en particular depende su abundancia original y por ello esta sesgada hacia el enriquecimiento de los genes con mayores diferencias en la expresión (Desai *et al.*, 2000). Por lo tanto algunos

fragmentos de genes podrían ser eliminados o sub-clonados. Mientras que otros fragmentos del mismo gen son enriquecidos y aislados.

Por otra parte, la RT-PCR amplifica los transcritos de todas las condiciones evaluadas la única diferencia es la cantidad de producto de PCR y la intensidad de la banda en el gel. Es por ello que se realizó esta corroboración de los niveles de expresión diferencial por RT-PCR. En la **Figura 7** se muestran los resultados de los ensayos por RT-PCR de los genes *slt*, *mt2a*, *ssh*. Como control interno y para normalizar la intensidad de la banda se utilizó el gen de actina. Los histogramas muestran el nivel de expresión de cada gen en las diferentes condiciones tomando como unidad la intensidad de la banda correspondiente a la condición control. Para saber si los niveles de expresión entre las diferentes condiciones tratadas era estadísticamente diferentes se realizó el análisis de varianza (ANOVA), que sirve para determinar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos.

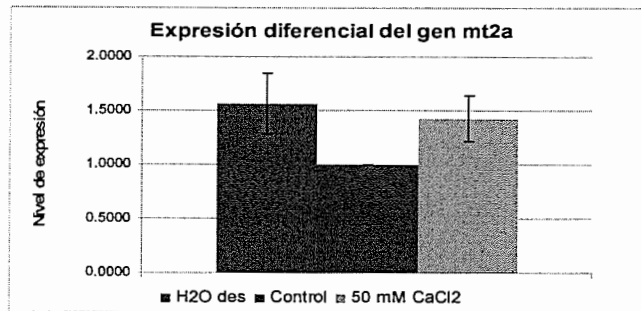
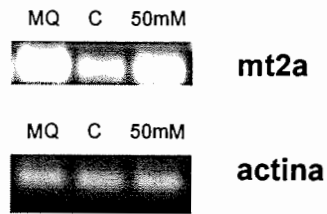


Prueba F hecha en ANOVA para H₂O des/Control valor de p=0.0733
 Prueba F hecha en ANOVA para 50 mM CaCl₂/Control valor de p=0.3745



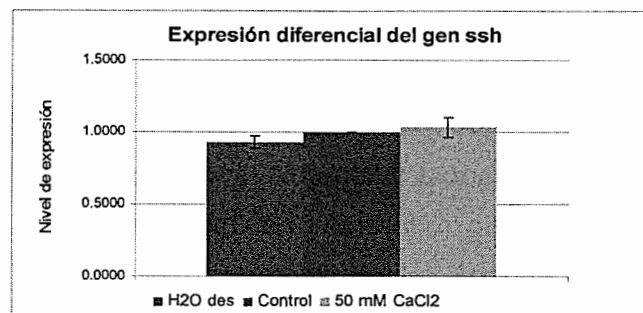
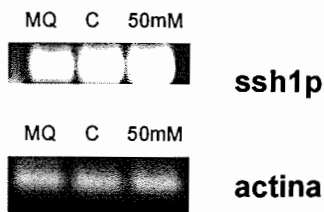
Prueba F hecha en ANOVA para H₂O des/Control valor de p=3.14
 Prueba F hecha en ANOVA para 50 mM CaCl₂/Control valor de p=0.0387

c



Prueba F hecha en ANOVA para H₂O des/Control valor de p=0.0251
Prueba F hecha en ANOVA para 50 mM CaCl₂/Control valor de p=0.0247

d



Prueba F hecha en ANOVA para H₂O des/Control valor de p=0.0502
Prueba F hecha en ANOVA para 50 mM CaCl₂/Control valor de p=0.4662

Figura 7. Análisis de los genes diferencialmente expresados seleccionados de la SSH. Las condiciones evaluadas son: H₂O desionizada (MQ), CaCl₂ 20mM (C), CaCl₂ 50mM (50mM).

5.6 Análisis del gen *slt*

En la **figura 7 a y b** por los ensayos por RT-PCR, se puede observar que la expresión del gen prácticamente es la misma en las tres condiciones. El análisis estadístico demostró que las diferencias en los niveles de expresión, entre las condiciones problema (H₂O desionizada y 50 mM CaCl₂) y la condición control, no son estadísticamente significativos.

Este gen NtSLT1 (*Nicotiana tabacum* Tolerante a Sodio y Litio) se aisló de *Nicotiana tabacum*, tiene su ortólogo en *Arabidopsis thaliana* (AtSLT1) que codifica para una proteína con función desconocida. Este gen y su ortólogo se usaron para complementar la función de una levadura mutante, deficiente del gen *cnb*. Pero

solo cuando fue truncado el N-terminal de la proteína codificada por los genes (NtSLT1 y AtSLT1), comenzando con Met-304 y Met301 respectivamente, se complementó la función en la levadura. El gen *cnb* codifica para la proteína CaN que es una Ca^{2+} /calmodulina dependiente tipo fosfatasa 2B que regula la homeostasis de Na^+ en la levadura. Esta fosfatasa modula la afinidad del transportador de K^+ , incrementa el flujo extracelular de Na^+ de la célula por la activación y la inducción transcripcional de la Na^+/Li^+ translocasa P-tipo ATPasa codificado por ENA1 (Matsumoto *et al.*, 2001).

NtSLT1 aumenta la transcripción de ENA1 dependiente de CaN y compensa la sensibilidad a la salinidad de las mutantes deficientes de TCN1 un factor de transcripción que es activado por CaN. Se ha reportado que SLT1 es una molécula reguladora que media la tolerancia a sal (Matsumoto *et al.*, 2001).

En un estudio diferente se menciona que el gen *SLT1* es expresado constitutivamente en las plantas y más aún se reporta que el homólogo de los genes NtSLT1 y AtSLT1, encontrado en arroz (*Oryza sativa* Tolerante a sodium/lithium OsSLT1), contiene en el C-terminal un dominio muy conservado característico de las pequeñas proteínas de choque térmico (smHSP) y de las α -cristalinas que son una clase de chaperona (Antoinea *et al.*, 2005). Se ha reportado que si se trunca el C-terminal de la proteína codificada por OsSLT1 del aminoácido -443 al -521, se aumenta la actividad de chaperona y también aumenta la termotolerancia en recombinantes de *Escherichia coli* (Antoinea *et al.*, 2005).

Pensamos que más que un aumento en los niveles de expresión como respuesta al estrés salino, la actividad de SLT1 parece ser modulada a través de mecanismos postraduccionales, pues como ya se ha reportado la complementación de función en levaduras mutantes, deficiente del gen *cnb*, el aumento de la actividad de chaperona y el aumento en la termotolerancia en recombinantes de *E. coli* depende de truncar sitios tanto en el N-terminal como en el C-terminal (Matsumoto *et al.*, 2001; Antoine *et al.*, 2005). Los cuales pueden funcionar como dominios autoinhibitorios de la proteína

(Matsumoto *et al.*, 2001; Antoineta *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 1998; Palmgren and Harper, 1999).

5.7 Análisis del gen *mt2a*

En la **figura 7 c** se observa como el nivel de expresión se incrementa 0.5664 y 0.4269 veces en las condiciones problema (H_2O des y 50 mM $CaCl_2$ respectivamente) con respecto a la condición control, que es lo que se esperaba, ya que como se menciona anteriormente, el estrés abiótico desencadena la acumulación de ROS y también de MTs. El análisis estadístico demostró que las diferencias en los niveles de expresión, entre las condiciones problema (H_2O des y 50 mM $CaCl_2$) y la condición control, son estadísticamente significativos.

Las metalotioneínas (MTs) se han identificado en diferentes organismos, desde levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* (metalotioneínas III), cianobacterias (metalotioneínas II), mamíferos y plantas. Las metalotioneínas incrementan su acumulación en respuesta a elevadas concentraciones de iones metálicos como Cu^+ , Cd^{2+} , Ag^+ y Zn^+ (Robinson, 1993; Wong, 2004). Éstas metalotioneínas son proteínas de 4 - 8 kDa ricas en cisteínas. En las plantas las MTs están organizadas en cuatro tipos, de acuerdo a la distribución de sus cisteínas (Yu *et al.*, 1998; Cobbett y Goldsbrough, 2002). Se sabe poco en cuanto a la función de las MTs en plantas, pero se cree que están relacionadas en la regulación de metales y mecanismos de tolerancia. También están involucradas en la senescencia de tejidos como hojas, en la maduración de frutos, tejidos heridos y en el daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mir *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004). Las ROS resultan tanto de un estrés biótico como abiótico, causando severo daño celular. Se ha demostrado un alto estrés oxidativo en células de la pared celular lignificadas (Pla *et. al.* 1998). La MTs están relacionadas con un balance de ROS, ya que sus grupos tioles contribuyen a regular el estado redox.

5.8 Analisis del gen *ssh1p*

En la **figura 7 d** la expresión del gen *ssh1p* no se ve afectada en las condiciones problema, se ve un pequeño aumento en la intensidad de la banda en la condición

50 mM CaCl₂ y una disminución en la condición donde la planta fue regada solo con agua desionizada (MQ). Sin embargo, el análisis estadístico demostró que las diferencias en los niveles de expresión, entre las condiciones problema (H₂O y 50 mM CaCl₂) y la condición control, no son estadísticamente significativos. Las proteínas que transfieren fosfatidilinositol (PITPs), pueden regular una gran variedad de señales de transducción en animales y levaduras. Sin embargo, su descubrimiento en plantas es reciente. Se ha reportado la participación de una Ssh1p parecida a una (PITPs) de soya, en varios eventos de osmosensor en la señal de traducción. En plantas expuestas a un estrés hiperosmótico, la Ssh1p se fosforila, se disocia de la membrana celular, ocasionando una cascada de señalización. También se ha demostrado que la Ssh1p aumenta la actividad de las fosfatidilinositol cinasa 3 y 4, lo que ha llevado a sugerir que la función final de la Ssh1p en la señalización intracelular de las plantas es cambiar la capacidad de sintetizar fosfoinositol durante periodos de estrés osmótico (Monks. D.E. 2001), el cual está relacionado con el estrés salino.

VI. CONCLUSIONES

Al regar las plantas de *Amaranthus hypochondriacus* variedad Nutrisol con una solución de CaCl_2 50 mM, se ocasiona un estrés salino en la planta, ya que presentó una disminución de su crecimiento y pérdida de turgencia.

Se encontraron por hibridación sustractiva una sobreexpresión de genes involucrados en la respuesta a estrés salino, estrés osmótico y estrés iónico. También se encontraron genes que codifican para proteínas que actúan como chaperonas y contra un choque térmico.

Se encontraron también genes reprimidos que están involucrados en la fotosíntesis y metabolismo lo que lleva a pensar en una disminución de estas funciones en la célula, debido al estrés salino.

La ruta de respuesta por parte del Amaranto ante un estrés salino, implica una respuesta compleja y de acuerdo a los resultados obtenidos en las genotecas sustractivas, el efecto del estrés salino en la planta de Amaranto, afecta la fotosíntesis de la planta, su desarrollo y metabolismo, su homeostasis iónica, osmótica y también genera un daño a proteínas debido al desajuste iónico.

VII. REFERENCIAS

1. **Andrade. F. y Sadras. V.** 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. 2002. pp. 359-375
2. **Antoinea. W., Stewart. J.M. y de los Reyes. B.G.** The rice homolog of the sodium/lithium tolerance gene functions as molecular chaperon in vitro.
Physiologia Plantarum 2005. 125: 299–310.
3. **Apse. M.P., Aharon. G.S., Snedden. W.A. y Blumwald. E.** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*.
Science. 1999. 285: 1256-1258.
4. **Becerra. R.** El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo.
Biodiversitas 2002. 5: 1-7.
5. **Blumwald. E., Aharon. G.S. y Apse. M.P.** Sodium transport in plants.
Biochimica et Biophysica Acta (Biomembranea) 2000.1465: 140–151.
6. **Bohnert H.J.** functional genomics of plant salinity tolerance. Food products press. Plant functional genomics/Dario Leister (ed). 2005. 451-484.
7. **Bowler. C. y Fluhr. R.** The role of calcium and activated oxygens as signal for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science*. 2000. 5: 241-246.
8. **Brownell. P.F. y Bieling. L.M.** The role of sodium in the conversion of pyruvate to phosphoenolpyruvate in mesophyll chloroplasts of C4 plants.
Aust. J. Plant Physiol. 1996. 23: 171-177.

9. **Campbell. S.A. y Close. T.J.** Dehydrins: genes, proteins and association with phenotypic traits. *New Phytologist*. 1997: 137. 61-74.
10. **Chen. T.H.H. y Murata. N.** Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 2002. 5: 250–257.
11. **Chinnusamy. V., Schumaker. K. y Zhu. J.K.** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*. 2004. 55: 225-236.
12. **Cobbett. C.S. y Goldsbrough. P.B.** Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*. 2002. 53: 159–82.
13. **Dangl. J.L., y J.D. Jones.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature (London)*. 2001. 411: 826–833.
14. **Delfine. S., Alvino. A., Zacchini. M. y Loreto. F.** Consequences of salt stress on conductance to CO₂ diffusion, rubisco characteristics and anatomy of spinach leaves. *Aust. J. Plant Physiol*. 1998. 25: 395-402.
15. **Downton, W.J.S.** *Amaranthus edulis*. *World Crops*. 1973. 25: 20.
16. **Dudley. L.M.** Salinity in the soil environment. In. M. Pessaraki (ed). *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker. Ney York. 1992. pp. 13-30.
17. **Fadzilla. N.M., Finch. R.P. y Roy. H.B.** Salinity. Oxidative stress and antioxidant responses in shoot of rice. *J. Exp. Bot*. 1997. 48: 325-331.

18. **FAO.** Soil map of the World. Revised Legend. World Soil Resources Report. FAO. Rome.1997.
19. **FAO.** Global network on integrated soil management for sustainable use of sal-affected soil. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spish>. 2005.
20. **Flowers. T. J.** Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, February 2004. 396: 307 – 319.
21. **Flowers. T.J. y Hajibagheri. M.A.** Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance, *Plant Soil* 2001, **231** pp. 1–9.
22. **Flowers. T.J. y Yeo. A.R.** Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1986. 13: 75–91.
23. **Gaikwad. D.K. y Chavan. P.D.** Salinity induced changes in stomatal behaviour and water relations in tree Amaranthus species. *Am. Plant Physiol*. 1998. 12: 119-125.
24. **Gao. C., Wang. Y., Liu. G., Yang C., Jiang J. y Li H.** Expression profiling of salinity-alkali stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Tamarix hispid*. *Plant Mol Biol*. 2008. 66:245–258.
25. **Garratt. L.C., Janagoundar. B.S., Lower. K.C., Anthony. P., Power. J.B. y Davey. M.R.** Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radicle Biol. and medicine*. 2002. 33: 502-511.

26. **Gaxiola. R.A., Li. J., Undurraga. S., Dang. L.M., Allen. G.J., Alper. S.L. y Fink. G.R.** Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVPI H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2001. 98: 11444–11449.
27. **Ghassemi. F., Jakeman. A.J. y Nix. H.A.** Salinisation of land and water resources human causes extent management and case studies. CABI Publishing Wallingford.Oxon. 1995. p.p 526.
28. **Ghoulam. C., Foursy. A. y Fares. K.** Effects of salt stress on growth, inorganic ions and praline accumulation in relation to osmotic adjustment in five *sugar beet* cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 2002. 47: 39-50.
29. **Gil,F., Iriarte, J. y Jimenez, M.S.** Fotosíntesis C₄. Col. Maior 1. Sec. Pub. Univ. La Laguna tenerife. 1982.
30. **Glenn. E.P., Brown. J.J. y Blumwald. E.** Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1999. 18: 227-255.
31. **Greenway. H. y Munns. R.** Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. 1980.31: 149–19.
32. **Grubben, G.J.H. and van Sloten, D.H.** "Genetic Resources of Amaranths," Intl. Board for Plant Genetic Resources, Food and Agric. Org., Rome. 1981.
33. **Guerrier. G.** Fluxes of Na, K and Cl and osmotic adjustment in *Lycopersion pimpinellifolium* and *L. esculentum* during short and long term exposure to NaCl. *Physiol Plan.* 1996. 97: 583-591.
34. **Haberlandt G.** *Physiological Plant Anatomy* (Transl. M. Drummond), Ed. Macmillan 1914, London.

35. **Halfter. U., Ishitani. M. y Zhu. J.K.** The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000. 97: 3730-3734.
36. **Harper. J.F., Hong. B., Hwang. I., Stossard. R., Huang. J.F., Palmgren. M.G. y Sze. H.** A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 1099–1106.
37. **Hasegawa. P.M., Bressan. R. A., Zhu. J. K. y Bohnert. H.J.** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plants Physiology and Plant Molecular Biology.* 2000. 51: 463-499.
38. **Hatakeyama. S. y Nakayama. K.I.** Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *J. Biochem.* 2003. 134: 1-8.
39. **Hirschi. K.D.** The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiology.* 2004. 136: 2438-2442.
40. **Hirschi. K.D.** Vacuolar H⁺ /Ca²⁺ transport: Who's directing the traffic? *Trends in Plant Sciences.* 2001. 6: 100-104.
41. **Hirschi. K.D.** Expression of Arabidopsis CAX1 in Tobacco: Altered Calcium Homeostasis and Increased Stress Sensitivity. *Plant Cell.* 1999. 11: 2113-2122.
42. **Hu. Y.C., Schnyder. H. y Schmidhalter. U.** Carbohydrate deposition and partitioning in nelongatin leaves of wheat under saline soil conditions. *Australian Journal of Plant Physiology.* 2000. 27: 363-370.

43. **Ingram. J. y Bartels. D.** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1996. 47: 377-403.
44. **Jenks. M. A. y Hasegawa. P.M.** Plant Abiotic Stress. Botella. M.A., Rosado. A., Bressan. R.A y Hasegawa. P.M. Plant adaptative responses to salinity stress. Ed. Blackwell. 2007. pp. 37-70.
45. **Kanai. R. y Edwards. G.E.** The biochemistry of C4 photosynthesis. In: R.F. Sage and R.K. Monson (eds). C4 plant Biology. Academic press, San Diego. 1999. pp 49-87.
46. **Kashem. M.A., Itoh. K., Iwabuchi. S., Hori. H. y Mitsui. T.** Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of α -amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.) Plant Cell Physiol. 2000. 41: 399-407.
47. **Kauffman, C.S. y Webber. L.E.** Grain amaranth. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.). Advances in new crops. Timber Press, Portland, OR. 1990. p. 127-139.
48. **Kudla. J., Xu. Q., Harter. K., Gruisem., W. y Luan. S.** Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. 96: 4718-4723.
49. **Kawasaki. S., Borchert, C., Deyholos. M., Wang. H., Brazille. S., Hawaii. K., Galbraith. D. y Bohnert.H. J.** Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in rice. The Plant Cell. 2001. 13:889-905.

50. **Lee. J.H., Van-Montagu. M. y Verbruggen. N.** A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1999. 96: 5873-5877.
51. **Leegood. R.C.** Carbon dioxide concentrating mechanisms: C4 photosynthesis and crassulacean acid metabolism. *Plant biochemistry and molecular biology*, segunda edición. New York. 1999. 51-79.
52. **Leister. D.** Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *TRENDS in Genetics.* 2005. 21: 655-663.
53. **Levitt. J.** Responses of Plants to Environmental Stresses, Water, Radiation, Salt, and Other Stresses. Academic Press, N.Y. 1980. Vol II. pp. 605.
54. **Levitt. J.** Response of plants to environmental stresses. Water, Salt and other Stresses. Academic Press, N.Y. 1980. Vol I. pp 129 - 186.
55. **Liu. N., Chen. A., Zhong. N., Wang. F., Wang. H. y Xia. G.** Functional screening of salt stress-related genes from *Thellungiella halophila* using fission yeast system. *Physiologia Plantarum.* 2007. 129: 671-678.
56. **Longstreth. D.J. y Nobel. P.S.** Salinity effects on leaf anatomy. *Plant Physiol.* 1979. 63: 700-703.
57. **Ma. S. y Bohnert. H.J.** Integration of *Arabidopsis thaliana* stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biology.* 2007. 8: R49.

58. **Macler. B., Bamberg. E., Moffatt. E., Bue. H., Mior. E. y Nishioka. L.** Effect of salinity and nitrogen on growth, productivity and food value of *Amaranthus* in controlled culture. 1990. pp 129-141.
59. **Maeshima M.** Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000. 1465: 37-51.
60. **Marschner. H.** Mineral Nutrition of higher plants, 2nd ed. Academic press, London. 1995.
61. **Marty. F.** Plant Vacuolar. *Plant Cell*. 1999. 11: 587-599.
62. **Matsumoto. T. K., Pardo. J.M., Takeda. S., Bressan. R.A. y Hasegawa. P.M.** Tobacco and *Arabidopsis SLT1* mediate salt tolerance of yeast. *Plant Molecular Biology* 2001. 45: 489–500.
63. **Matsumoto. T.K., Ellsmore. A.J., Cessna. S.G., Low. P.S., Pardo. J.M., Bressan. R.A. y Hasegawa. P.M.** An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. 277: 33075-33308.
64. **Mikami. K., Kanesaki. Y., Suzuki. I. y Murata. N.** 2002. Membrane-bound histidine kinase Hik33 is a bifunctional sensor involved in perception of osmotic stress and cold in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology* 2002. 43: S54-S54
65. **Mir. G., Domenech. J., Huguet. G., Guo. Woei-Jiun., Goldsbrough. P., Atrian. S. y Molinas. M.** A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. 2004. 408: 2483–2493.

66. **Monks. D.E., Aghoram. K., Courtney. P.D., DeWald. D. B. y Dewey. R.E.** Hyperosmotic Stress Induces the Rapid Phosphorylation of a Soybean Phosphatidylinositol Transfer Protein Homolog through Activation of the Protein Kinases SPK1 and SPK2. *The Plant Cell*. 2001. 13: 1205–1219.
67. **Munns. R.** Salinity stress and its impact. In: Blum A, ed *Plant Stress*. <http://www.plantstress.com/Articles/index.asp>. 2005.
68. **Munns. R.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment*. 2002. 25: 239-250.
69. **Munns. R., Hare. R.A., James. R.A. y Rebetzke. G.J.** Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*. 2000. 51: 69-74.
70. **Munns. R.** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant cell environ*. 1993. 16: 15-24.
71. **Murata. S., Kobayashi. M., Matoh. T. y Sekiya. J.** Sodium stimulates regeneration of phosphoenolpyruvate in mesophyll chloroplasts of *A. tricolor*. *Plant Cell Physiol*. 1992. 33: 1247-1250.
72. **National Academy of Sciences.** Amaranth: Modern prospects for an Ancient Crop. *Natl. Acad. Of Sciences. Press, Washington. D.C.* 1984.
73. **Niu. X., Bressan. R.A., Hasegawa. P.M. y Prado. J.M.** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*. 1995.109: 735-742.
74. **Palmgren. M.G. y Harper. J.F.** Pumping with plant P-type ATPases. *J. Exp. Bot.* 1999. 50: 883–893.

75. **Paredes-López. O., Barba de la Rosa. A.P., Hernandez-López. D. y Carabez Trejo, A.** Amaranto: características y aprovechamiento industrial. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. D.C. 1990.
76. **Pardo. J.J., Reddy. M.P., Yang. S., Maggio. A., Huh. G.-H., Matsumoto. T., Coca. M.A., Paino-D'Urzo. M., Koiwa. H., Yun. D.-J.** Stress signaling through Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. 95: 9681-9686.
77. **Parida. A.K., Das. A.B. y Mitra. B.** Effects of SALT on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. Trees-Struct. Funct. 2004. 18: 167-174.
78. **Piao. H.L., Lim. J.H., Kim. S.J., Cheong. G.-W. y Hwang I.** Constitutive overexpression of AtGSK1 induces NaCl Stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis. Plant Journal. 2001. 24: 305-314.
79. **Ponnamperuma. F.N.** 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. 1984. pp: 255-271.
80. **Robinson. N. J., Tommey. A.M., Kuske. C. y Jacksonp. J.** review article Plant metallothioneins. Biochem. J. 1993. 295: 1-10.
81. **Romero-Aranda. R., Soria. T. y Cuartero. J.** Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. Plant Science. 2001. 160: 265-272.

82. **SAGARPA** 2006.
83. **Sacher. R.F. y Staples . R.C.** Chemical microscopy for study if plants in saline environments. In R.C. Staples and Toenniessen G.H. John Wile y Sons. N.Y. 1984. 17-35.
84. **SAGARPA**, 2006.
85. **Sanders. D., Pelloux. J., Brownlee. C. y Harper. J.F.** Calcium at the crossroads of signaling. *The Plant Cell*. 2002. S401-S417.
86. **Sanders. D., Brownlee. C. y Harper. J.F.** Communicating with calcium. *Plant Cell*. 1999. 11:691-706.
87. **Saneoka. H., Nagasaka. C., Hahn. D.T., Yang. W-J., Premachandra. G.S., Joly. R.J. y Rhodes. D.** Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and containing maize lines. *Plant Physiology*. 1995. 107: 631-638.
88. **Sauer, J.D.** The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Mo. Bot. Gard*. 1967. 54:103-137.
89. **Saunders. R.M y Beciker. R.** Amaranthus: a potential food and feed resource. In *Adv. Cereal Sci. Technol. Vol. VI. Ed. Y. Pometanz. P. 357.*
90. **Segura-Nieto. M., Vázquez-Sánchez. N., Rubio-Velázquez. H., Olguh-Martinez. L. E., Rodriguez-Nester. C. E. y Herrera-Estrella. L.** Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Seed Proteins. *J. Agric. Food Chem*. 1992. 40: 1553-1558.
91. **Serrano. R. y Rodriguez-Navarro. A.** Ion Homeostasis during salt stress in plants *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001. 4: 399-404.

92. **Schwanz. P., Picon. C., Vivin. P., Dreyer. E., Guehi. J.M. y Polle. A.** Responses of antioxidative systems to drought stress in pendunculata oak and maritime pine as modulated by elevated CO₂. *Plant Physiol.* 1996. 110: 393-402.
93. **Shani. U. y Ben-Gal. A.** long-term response of grapevines to salinity osmotic effects and ion toxicity. *Am. J. Enol. Vitic.* 2005. 56: 148-154.
94. **Shannon. M.C. y Grieve. C.M.** Tolerance of vegetables crops to salinity. *Scientia Hortic.* 1999. 78: 5-38.
95. **Shannon. M.C., Grieve. C.M. y Francois. L.E.** Whole-plant response to salinity. In: R.E. Wilkinson (ed). *Plant-environment Interactions.* Marcel Dekker. N.Y. 1994. pp: 199-244.
96. **Shimose. N., Sekiya. J., Kimura. O. y Suzuki. I.** Salt tolerance of amaranth, mugwort, eggplant and perilla. *Jap. J. Tropical Agric.* 1991. 35: 16-19.
97. **Stallnecht, G.F. y Schulz-Schaeffer. J.R.** Amaranth rediscovered. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *New crops.* Wiley, New York .1993. p. 211-218.
98. **Sugino. M., Hibino T., Tanaka. Y., Nii. N. y Takabe. T.** Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* acquires resistance to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Science* 1999. 146: 81-88.
99. **Talame. V., Ozturk. N. Z., Bohnert. H. J. y Tuberosa. R.** Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany.* 2007. 2: 229-240.

100. **Tester. M. y Davenport R.** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 2003. 91: 503–527.
101. **Teutonico, R.A. y Knorr, D.** Nondestructive method for oxalate determination of cultured *Amaranthus tricolor* cells. *J. Agric. Food Chem.* 1985. 33: 60.
102. **Urao. T., Yakubov. B., Satoh. R., Yamaguchi-Shinozaki. K., Seki. B., Hirayama. T. y Shinozaki. K.** A transmembrane Hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell.* 1999. 11:1743-1754.
103. **Valdes-Rodríguez, S., Segura-Nieto, M., Chagolla-Lopez, A., Vargas-Cortina, A., Martinez-gallardo, N. y Blanco-Labra, A.** Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol.* 1993. 103:1407-1412.
104. **Wang. Y., Mengy. Y., Ishikawa. H., Hibino. T., Tanaka. Y., Nil. N. y Takabe. T.** Photosynthetic adaptation to salt stress in three-color leaves of C4 plant *A. tricolor*. *Plant Cell Physiol.* 1999. 40: 668-674.
105. **Wang. Y. y Nii. N.** Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic. Sci. Biotechmol.* 2000. 75: 623-627.
106. **Wanjogu. S.N., Muya. E.M., Gicheru. P.T. y Waruru. B.K.** Soil degradation: Management and rehabilitation in Kenya. Proceedings of the FAO/ISCW expert consultation on Management of Degraded Soil in Sounthern and Eastern Africa (MADS-SEA) 2nd. 2001.

107. **White. P.J. y Broadley. M.R.** Calcium in Plants. *Annals of Botany*. 2003. 92: 487-511.
108. **Wong. H.L., Sakamoto. T., Kawasaki T., Umemura K. y Shimamoto K.** Down-Regulation of Metallothionein, a Reactive Oxygen Scavenger, by the Small GTPase OsRac1 in Rice. *Plant Physiology*. 2004. 135: 1447–1456.
109. www.prodogynet.web.mx/centeotlac.
110. **Xu. D., Duan. X., Wang. B., Hong. B., Ho. T. y Wu. R.** Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA 1 from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plan Physiology*. 1996. 110: 249-257.
111. **Yokoi. S., Quintero. F.J., Cubero. B., Ruiz. M.T., Bressan. R.A., Hasegawa. P.M. y Pardo. J.M.** Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant Journal*. 2002. 30: 529-539.
112. **Yu L.H., Umeda. M., Liu. J.Y., Zhao. N.M. y Uchimiya. H.** A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene*. 1998. 206: 29–35.
113. **Zhang H-X, Blumwald E.** Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 2001. 19: 765–768.
114. **Zhang H-X, Hodson JN, Williams JP, Blumwald E.** Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2001. 98: 12832–12836.

115. **Zhu. J-K.** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology.* 2003. 6: 441–445.

116. **Zhu. J.K.** Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci.* 2001. 6: 66-71.

VIII. APENDICE

Buffer TAE 50X 200 mL

487.2 g Tris-base
3.72 g EDTA
11.42 mL de Acido acético glacial

Buffer TAE 1X 1000 mL.

Para 1L, se mide 20 mL del buffer stock TAE 50X y se mezcla con 980 mL de agua destilada.

Etanol al 70 % (%v/v).

Medir 70 mL de etanol y aforar a 100 mL con agua destilada.

Gel de agarosa al 1.5 %.

Para 50 mL de agarosa pesar 0.75 g de agarosa y disolver en 50 mL de TAE 1X, llevar a ebullición en el microondas hasta disolverse completamente, enfriar y añadir 20 μ L de bromuro de Etidio [25 mg/mL].

Gel de agarosa al 0.8 %.

Para 50 mL de agarosa pesar 0.4 g de agarosa y disolver en 50 mL de TAE 1X, llevar a ebullición en el microondas hasta disolverse completamente, enfriar y añadir 10 μ L de bromuro de Etidio [25 mg/mL].

Glicerol al 70 %.

En un frasco de vidrio colocar 70 mL de glicerol y aforar a 100 ml con agua MilliQ.

Ampicilina (100 mg/mL) 5 mL

500 mg de Ampicilina

Disolver en 5 mL de Agua MilliQ estéril, esterilizar por filtración y guardar a -20 °C

X-gal (50 mg/mL)

200 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Disolver en 4 mL de N,N-dimethyl-formamide y aguardar a -20 °C

IPTG (200 mM)

0.48 g IPTG

Añadir 10 mL de agua MilliQ, esterilizar por filtración y guardar a -20 °C

LB líquido.

Pesar 25 g de Luria Broth y disolver en 1 L de agua MilliQ. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Nota: Luria Broth Base es de la casa comercial Invitrogen. Formulación en 1L: 10 g de Peptona SELECT 140, 5 g de extracto de levadura SELECT y 10 g de NaCl.

LB sólido.

Pesar 25 g de Luria Broth, 15 g de agar y disolver en 1 L de agua MilliQ. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. El medio a un líquido se vierte en cajas de petri y una vez sólido se guarda a 4°C.

Nota: Luria Broth Base es de la casa comercial Invitrogen. Formulación en 1L: 10 g de Peptona SELECT 140, 5 g de extracto de levadura SELECT y 10 g de NaCl.

LB líquido más antibióticos.

Pesar 25 g de Luria Broth y disolver en 1 L de agua MilliQ. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Permitir que la mezcla se encuentre a temperatura ambiente para posteriormente añadir los antibióticos en condiciones de esterilidad.

LB sólido más antibiótico.

Pesar 25 g de Luria Broth, 15 g de agar y disolver en 1 L de agua MilliQ. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez que el LB mas el agar se enfrié

pero sin solidificarse aun, añadir los antibióticos en condiciones de esterilidad. Posteriormente se vierte en cajas de petri y se guarda a 4⁰C.

Solución de Birboim I.

Tomar 2.5 mL de solución stock de Tris 1M, 2 mL de solución stock de EDTA 0.5 M y 1 mL del stock de glucosa 1 M, se afora a 100 mL con agua destilada estéril. Almacenar a 4⁰C.

Solución de Birboim II.

Tomar 20 mL de una solución de NaOH 0.2N, 10 mL de una solución de SDS al 1% y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución de Birboim III.

Pesar 24.6 g de acetato de sodio para una concentración 3M, aforar a 100 mL con agua destilada estéril. Al final ajustar el pH a 4.8 con ácido acético.

Solución RF1.

Pesar 2.4 g de RbCl, 1.98 g de MnCl₂·4H₂O y 0.30 g de CaCl₂. Agregar 30 mL de glicerol, aforar a 200 mL con agua MilliQ y esterilizar en autoclave. Finalmente agregar 6 mL de acetato de potasio 1M pH 7.5. Nota: después de la esterilización manejar en condiciones de esterilidad.

Solución RF2.

Pesar 0.24 g de RbCl, 2.2g de CaCl₂, agregar 30 mL de glicerol y aforar a 200 mL con agua MilliQ y esterilizar en autoclave. Finalmente agregar 4 mL de MOPS 0.5M. Nota: después de la esterilización manejar en condiciones de esterilidad.

Solución de SDS al 10 %.

Pasar 20 g de SDS y colocar en un frasco de vidrio, aforar a 100 mL con agua MilliQ. Nota: el uso de SDS requiere de mascarilla, guantes y lentes ya que es irritante para piel, ojos y nariz.

Buffer FA 10X

200 mM MOPS

50 mM Acetato de sodio

10 mM EDTA

Ajustar pH a 7.0 con NaOH y aforar con agua MilliQ estéril – DEPC

Buffer de corrida 1 L

100 mL de MOPS 10X

20 mL Formaldehida al 37%

880 mL Agua MilliQ estéril - DEPC

Agarosa desnaturalizante al 1.2 %

0.96 g Agarosa

8 mL de MOPS 10X

2.4 mL Formaldehida al 37%

69.6 Agua MilliQ estéril – DEPC

Se funde la agarosa con el agua, se deja enfriar a ≈ 40 °C, se agrega el MOPS 10X, formaldehida al 37% y 18 μ L bromuro de etidio (25 mg/mL).

Buffer de carga para RNA 5X

16 μ L de solución saturada de azul de bromofenol

80 μ L de EDTA 500 mM pH 8

720 μ L de Formaldehida al 37%

2 mL de Glicerol al 100%

3.08 mL de Formamida

4 mL MOPS 10X

Ajustar con Agua MilliQ estéril – DEPC

Guardar a 4 °C es estable por 3 meses.

Buffer de pre-hibridación 40 mL

10 mL de SSC 20X

400 µL de SDS 10X

2 g de Dextrán sulfato

2 mL de Líquido de bloqueo

25.6 mL de Agua MilliQ estéril

Buffer A 1 L

100 mM de Tris-HCl

300 mM de NaCl

Ajustar pH a 9.5

Solución de lavado 1

SSC a 1X

SDS al 0.1 %

Solución de lavado 1

SSC al 0.5 X

SDS al 0.1 %

Buffer A + líquido de bloqueo 100 mL

10 mL de Líquido de Bloqueo

90 mL de Buffer A

Proteger de la Luz y guardar a 4 °C

Solución de tween 20 al 0.3%

600 µL de tween 20

Aforar a 200 ml con Buffer A

Solución de bloqueo B 50 mL

46 mL de Buffer A

4 mL de Líquido de Bloqueo

Proteger de la Luz y guardar a 4 °C

Solución con anti-fluoresceína 50 mL

0.25 g de BSA

10 µL Anticuerpo Anti-fluoresceína

20 mL de Buffer A

Proteger de la Luz y guardar a 4 °C

Fenol-Cloroformo-Isoamilico 500 mL

250 Fenol equilibrado Ultrapuro

240 Cloroformo

10 Alcohol isoamilico

Proteger de la Luz y guardar a 4 °C

Solución Stock de CaCl₂ 1 M

294.04 g de Cloruro de calcio

Disolver en Agua MilliQ y aforar a 2 L y ajustar pH a 6

Agua DEPC 1 L

999 mL de Agua destilada estéril

1 mL de Dietil pirocarbonato (DEPC)

Solución de Etanol DEPC 1 L

998 mL de Etanol

2 mL de Dietil pirocarbonato (DEPC)