



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

“EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE TRES
FENOTIPOS DE VIDRILLO (*Mesembryanthemum
crystallinum*) EN RESPUESTA A ESTRÉS POR
NaCl”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Agricultura Sustentable)

Presenta

CARLOS ARIEL CABADA TAVARES

La Paz, Baja California Sur, Mayo de 2013.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14 horas del día 24 del Mes de 05 del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE TRES FENOTIPOS DE VIDRILLO (*Mesembryanthemum crystallinum*) EN RESPUESTA A ESTRÉS POR NaCl."

Presentada por el alumno:

Carlos A. Cabada Tavares

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.



Dra. Gracia A. Gómez Anduro
DIRECTORA DE TESIS

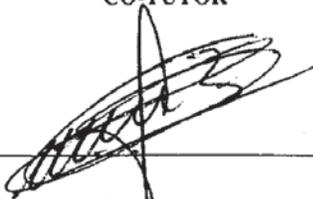
LA COMISION REVISORA



Dra. Luz E. González de Bashan
CO-TUTORA



Dr. David R. López Aguilar
CO-TUTOR



**DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO.**

COMITÉ TUTORIAL

Directora de Tesis:

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-tutora:

Dra. Luz Estela González de Bashan,
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-tutor:

Dr. David Raúl López Aguilar,
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
(Unidad Guerrero Negro).

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Dra. Luz Estela González de Bashan,
Dr. David Raúl López Aguilar,

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Dra. Luz Estela González de Bashan,
Dr. David Raúl López Aguilar,

Suplente

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez.

RESUMEN

Con la finalidad de identificar genes que se encuentran aumentando y reprimiendo sus niveles de expresión en respuesta a estrés por NaCl en vidrillo, utilizamos la metodología de microarreglos heterólogos, donde el nivel de expresión de 30,000 cDNA independientes de *Arabidopsis thaliana* fueron utilizados para medir por hibridación con ARN extraído individualmente de los fenotipos P0, P9 y P11 de vidrillo. Logramos identificar que en el fenotipo P0: 1893 genes fueron sobre-expresados (6.315%), en el fenotipo P9: 1999 genes (6.66%), mientras que para el fenotipo P11 solo el 4.61% de los genes fue sobre-expresado (1383 genes). En cuanto al número de genes reprimidos en los fenotipos P0, P9 y P11 identificamos, respectivamente; 1218, 844 y 1594 genes regulados de manera negativa. Algunos de estos genes regulados diferencialmente, ya sea positiva o negativamente, son expresados de manera única en cada fenotipo. Un análisis informático mostró que existen diferencias en algunas rutas metabólicas de interés como por ejemplo, en el metabolismo de aminoácidos solo los fenotipos de P0 y P9 aumentan el nivel de expresión de genes relacionados con el metabolismo de arginina y prolina, cuya acumulación en la planta esta relacionada con la tolerancia de la misma ante un estrés, por otro lado el fenotipo P11 disminuye los niveles de expresión de genes involucrados en dicha ruta; además entre los genes donde se esta dando un aumento en los niveles de expresión en esta ruta, encontramos genes relacionados con el metabolismo de poliaminas como la putrescina, espermidina y la espermina, cuya acumulación en la planta tiene efectos positivos en la tolerancia a diversos tipos de estrés. Por otro lado tenemos que, solo el fenotipo P11 aumenta los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de la trehalosa, un disacárido importante en la tolerancia al estrés. También se identificaron cambios en la respuesta a estrés oxidativo y en peroxisomas, donde el fenotipo P9 es quien mejor respuesta tiene. Se identificaron cambios en los niveles de expresión en genes relacionados a la respuesta a estrés osmótico, estrés salino y a transporte de iones; donde los fenotipos P0 y P9 son los que tienen una aparente mejor respuesta. Finalmente se cuantificó la expresión relativa de los genes antiporter *McNHx3* y *McNHxD* por qPCR y se obtuvo que solo los fenotipos P0 y P9 sobreexpresan dichos genes, mientras que P11 los tiene reprimidos, con lo cual, al menos con lo reportado hasta el momento, el fenotipo P11 no cuenta con un mecanismo de compartimentalización del ion Na^+ como lo hacen P0 y P9, sin embargo el fenotipo P11, aunque en menor grado, sigue tolerando el estrés por NaCl.

Palabras Claves: Vidrillo, Microarreglo heterólogo, Estrés por NaCl.



Vo. Bo. Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

ABSTRACT

With the objective of identifying genes that are increasing and suppressing expression levels in vidrillo's salt stress resistance response, we used heterologous microarray methodology, where the independent cDNA expression level of 30,000 from *Arabidopsis thaliana* was used to measure RNA hybridization extracted individually from P0, P9, and P11 vidrillo phenotypes. We identified that 1893 P0 phenotype genes were over-expressed (6.315%); 1999 P9 phenotype genes (6.66%); while only 4.61% of P11 phenotype genes were over-expressed (1383). As for the number of repressed genes in P0, P9, and P11 phenotypes identified, we found 1218, 844, and 1594 negatively regulated genes, respectively. Some of the differentially regulated genes, either positively or negatively, are expressed uniquely in each phenotype. The computational analysis showed some differences in metabolic pathways of interest; for example, in amino acid metabolism only P0 and P9 phenotypes were able to increase the expression level of genes related to arginine and proline metabolism, whose accumulation in the plant is related to abiotic stress resistance. On the other hand, P11 phenotype decreased expression levels of the genes involved in the same pathway. Also, in this metabolic route where genes were found to increase their expression levels, we found those related to polyamine resistance such as putrescine, spermidine, and spermine, whose accumulation in the plant have positive effects on tolerance to various stress types. Another thing was that only phenotype P11 increased the expression levels of genes related to the metabolism of trehalose, an important disaccharide in stress tolerance. We could identify changes in oxidative stress response in peroxisomes, where P9 phenotype had the best response. It was possible to identify changes in expression levels of the genes involved in osmotic and salt stress and ion transport responses, where P0 and P9 phenotypes were those having an apparent best response. Finally we quantified the relative expression of the antiporter genes *McNHx3* and *McNHxD* by qPCR; the results showed that only P0 and P9 phenotypes could overexpress these genes, while P11 phenotype had them suppressed. Thus at least to that reported so far, P11 phenotype does not have a mechanism for Na⁺ ion compartmentalization as P0 and P9 do; however, P11 phenotype continues to tolerate NaCl stress to a lesser extent, though.

Keywords: Vidrillo (ice plant), heterologous microarray, NaCl stress.

**A mis Padres
Y
A la memoria de mi abuela Lore.**

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR S. C.)**, por ser el centro que me permitió efectuar mis estudios de posgrado nivel maestría.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de estos estudios de maestría en ciencias.

Al **Departamento de Posgrado** del CIBNOR y todo su personal, muchas gracias por toda su disposición, eficacia y por siempre estar al pendiente de uno; especialmente a la **Lic. Osvelia Ibarra**, gracias por todo lo que ha hecho por mi y por cada palabra dada.

A la Maestra **Diana Dorantes**, por su apoyo en la edición del resumen en inglés de este documento de tesis.

Al **Laboratorio de Biología Molecular de Plantas**, por ser el lugar que me permitió desarrollar la mayor parte de mi trabajo de investigación. Un especial agradecimiento al técnico responsable de este laboratorio, el **M. C. Julio A. Hernández González**, excelente técnico y gran amigo, también al **M. C. Mario Rojas Arzaluz**. Por siempre estar allí y al **M. C. Norberto Warner Urías**. quien sin su presencia en cada estancia no habría sido igual de divertida y/o estresante según el día xD.

Así como a los laboratorios de **Patogénesis Microbiana, Biotecnología Vegetal y Microbiología Ambiental**, a sus responsables y demás personal que en ellos laboran, muy especialmente al **Dr. Felipe Ascencio Valle** y la **Dra. Martha Reyes** (Patogénesis Microbiana), al **M. C. Mario Arce Montoya** y al **M. C. Margarito Rodríguez Álvarez** (Biotecnología Vegetal) y finalmente al **Dr. Yoav Bashan** y todo su personal de **Microbiología Ambiental**. Agradezco además a la **M. C. Delia Rojas** por su asistencia técnica externa a mi grupo de trabajo, por cada consejo a través de mi paso por esta institución. A la **Unidad de Microarreglos de ADN** de la UNAM, a su responsable el Dr. Jorge Ramírez y a su personal, gracias.

Al resto de mi **Familia y Amigos**, gracias por todo su apoyo.

A todos mis **Amigos y Compañeros** de maestría y de laboratorio.

Al proyecto **SEP-CONACyT-2010-156563**.

A mi co-tutora la **Dra. Luz Estela González de Bashan** por siempre estar en disposición de ayudarme y brindarme de su conocimiento. A mi co-tutor el **Dr. David Raúl López Aguilar** por ser parte de este trabajo y al Dr. **Carlos Eliud Angulo Valadez** por todo su apoyo.

Finalmente a mi Asesora, Jefa, Mentora, Consejera y mucho más, a la **Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro**, gracias por todo; le debo más de lo que pueda expresar con palabras.

CONTENIDO.

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Daños en la planta por estrés salino.....	2
2.2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad.....	4
2.3. Uso de microarreglos para análisis de expresión global de genes en plantas...	5
2.4. Vidrillo (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>).....	6
2.5. Trabajos en vidrillo.....	7
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. OBJETIVOS.....	11
4.1. Objetivo general.....	11
4.2. Objetivos específicos.....	11
5. HIPÓTESIS.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1. Material vegetal y Bioensayo.....	12
6.2. Aislamiento del ARN Total.....	12
6.2.1. Calidad del ARN.....	13
6.2.2. Tratamiento del ARN con DNasa I.....	14
6.3. Microarreglo heterólogo.....	14
6.3.1. Transporte de ARN.....	14
6.3.2. Marcado de ARN total.....	15
6.3.3. Hidrólisis del ARN.....	15
6.3.4. Purificación del aminoallyl cDNA (aacDNA).....	16
6.3.5. Reacción de conjugación.....	16
6.3.6. Purificación del aacDNA marcado (Alexa-AcDNA).....	16
6.3.7. Hibridación en Chip de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
6.3.7.1. Pretratamiento del microarreglo.....	17
6.3.7.2. Hibridación.....	17
6.3.8. Lectura del Chip en Scanner y análisis informático.....	18
6.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	18
6.4.1. Preparación de cDNA.....	18
6.4.2. qPCR.....	19
6.5. Análisis estadístico.....	21
7. RESULTADOS.....	21
7.1. Aislamiento de ARN.....	21
7.2. Microarreglo heterólogo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22

7.2.1. Genes que aumentan su nivel de expresión.....	23
7.2.2. Genes que disminuyen su nivel de expresión.....	30
7.2.3. Anotación funcional (DAVID).....	37
7.3. Análisis de expresión de los genes <i>McNhx3</i> y <i>McNhaD</i> por qPCR.....	38
8. DISCUSIÓN.....	39
8.1. Microarreglo heterólogo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
8.2. Análisis de expresión de los genes <i>McNhx3</i> y <i>McNhaD</i> por qPCR.....	45
9. CONCLUSIONES.....	47
10. LITERATURA CITADA.....	49

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Árbol filogenético de los antiporters Na ⁺ /H ⁺ de plantas.	8
Figura 2. Evaluación de la integridad de ARN total, mediante electroforesis.....	21
Figura 3. Datos procesados de cada fenotipo de vidrillo en el software genArise.....	22
Figura 4. Diagrama de Venn del número de genes que aumentan su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrillo, así como su relación entre ellos.....	23
Figura 5. Rutas metabólicas (<i>KEGG</i>) donde se observa un aumento en los niveles de expresión en el fenotipo P0	27
Figura 6. Rutas metabólicas (<i>KEGG</i>) donde se observa un aumento en los niveles de expresión en el fenotipo P9.....	28
Figura 7. Rutas metabólicas (<i>KEGG</i>) donde se observa un aumento en los niveles de expresión en el fenotipo P11.....	29
Figura 8. Diagrama de Venn del número de genes que disminuyen su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrillo, así como su relación entre ellos.....	30
Figura 9. Rutas metabólicas (<i>KEGG</i>) donde se observa una disminución en los niveles de expresión en el fenotipo P0.	34
Figura 10. Rutas metabólicas (<i>KEGG</i>) donde se observa una disminución en los niveles de expresión en el fenotipo P9.	35
Figura 11. Rutas metabólicas (<i>KEGG</i>) donde se observa una disminución en los niveles de expresión en el fenotipo P11.	36
Figura 12. Anotación funcional de los genes que aumentan y disminuyen su nivel de expresión de acuerdo a procesos en respuesta a estrés osmótico, salino, oxidativo y transporte de iones.....	37
Figura 13. Análisis de expresión de los genes <i>McNhx3</i> y <i>McNhaD</i> evaluados mediante qPCR.....	38

LISTA DE TABLAS.

Tabla I. Características de los antiporters de vidrio.....	9
Tabla II. Mezcla A para marcado de ARN total.....	15
Tabla III. Mezcla B para marcado de ARN total.....	15
Tabla IV. Mezcla para efectuar la hibridación en el chip del microarreglo.....	17
Tabla V. Mezcla de reacción para síntesis de cDNA.....	19
Tabla VI. Características de los primers usados en las reacciones de qPCR.....	20
Tabla VII. Mezcla de reacción de muestras de qPCR.....	20
Tabla VIII. Rutas metabólicas donde se observan genes que aumentan su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrio.....	24
Tabla IX. Rutas metabólicas donde se observan genes que disminuyen su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrio.....	31

1. INTRODUCCIÓN.

La salinidad es el principal problema que afecta a la producción agrícola en el mundo (Kronzucker y Britto, 2011). La exposición de los cultivos a suelos con niveles elevados de salinidad, causa dos tipos de estrés en la planta, por una parte ocasiona deficiencia de agua en las plantas (estrés osmótico) y por otro lado un estrés iónico (toxicidad por Na^+) (Brini *et al.*, 2007 y Blumwald *et al.*, 2000). En los suelos salinos, la sal que principalmente es el NaCl, por lo que el ión Na^+ es el ión tóxico mayormente presente en suelos dañados por la salinidad. Una acumulación excesiva de este ión en el citoplasma de las células vegetales, causa problemas en la homeostasis iónica de la planta (Zhu *et al.*, 2007). Los daños ocasionados a la planta son: afectación de la actividad de enzimas citoplasmáticas, dificultad en la absorción de agua del suelo, toxicidad por iones de Na^+ , malnutrición y retraso del crecimiento, reducción en la fotosíntesis, daño ocasionado por especies reactivas de oxígeno (ERO), acumulación de metabolitos tóxicos y finalmente la inhibición de la división y expansión celular (Zhu *et al.*, 2001, Chen, 2006, Jiang *et al.*, 2006). Ello repercute en el metabolismo adecuado de la planta, así como en sus procesos fotosintéticos, lo que finalmente trae problemas en el desarrollo y crecimiento de la planta, causando al final la muerte del cultivo. Con la finalidad de mantener un balance osmótico, las plantas cuentan con varios mecanismos, por ejemplo 1) exclusión del Na^+ en las células de la raíz, o 2) absorción y compartimentalización del ión sodio en vacuolas mediante el uso de proteínas de membrana de tipo antiporter Na^+/H^+ (NHXs). La compartimentalización del ión sodio es un medio efectivo para evitar el efecto perjudicial del Na^+ en el citosol, además de contribuir a mantener el potencial osmótico, lo que se ve reflejado en el incremento de la tolerancia a la salinidad por parte de la planta (Apse y Blumwald, 2007, Tuteja, 2007, Queiros *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2011).

En el 2010, Warner-Urías *et al.* realizan un trabajo utilizando a la planta vidrillo, la cual es tolerante a sal. En dicho trabajo se evalúa la expresión del gen antiporter *Nhx2*, donde ellos concluyen que éste es inducido por el estrés con NaCl. En el mismo año Consentino *et al.* (2010) dan a conocer resultados sobre un trabajo similar al desarrollado por Warner-Urías *et al.*; no obstante, Consentino reportó entre otras cosas, que la expresión del gen *Nhx2*

(estudios hechos en la misma planta que Warner) no se ve inducida por efecto de la salinidad. Warner *et al.* (2013), efectuaron trabajos utilizando tres fenotipos de la planta vidrillo (fenotipos denominados P0, P9 y P11 e identificados por el Dr. Andrés Orduño del CIBNOR-Unidad Guerrero Negro) donde evalúan la respuesta fisiológica de cada fenotipo, así como la expresión de los genes *Nhx1* y *Nhx2* ante un estímulo por estrés con NaCl. Sus resultados muestran que existen diferencias en la respuesta fisiológica (más marcadas en el fenotipo P11 en comparación entre los fenotipos P0 y P9). Además, encuentran que solo el fenotipo P11 no expresa los genes *Nhx1* y *Nhx2* en respuesta al estrés; pese a ello, este fenotipo aun es capaz de tolerar el estrés salino.

La exclusión o compartimentalización del ion sodio no son los únicos mecanismos propuestos para la tolerancia al estrés salino; se han propuesto mecanismos antioxidantes y también la acumulación de ciertos compuestos, como otros medios de tolerancia al estrés salino (Turkana, 2009). De esta manera, se planteó como objetivo estudiar la expresión de los genes de los transportadores antiporter *McNHX3* y *McNhaD*, además de la expresión génica global de los tres fenotipos de vidrillo (P0, P9 y P11) ante el estrés inducido por el NaCl. Donde se espera que el análisis comparativo de los tres transcriptomas, permita determinar los posibles elementos involucrados en los mecanismos moleculares que estén interviniendo, de manera alterna a mecanismos de transportadores de iones, como manera de tolerancia a la salinidad en el fenotipo P11; el cual, bajo condiciones de estrés por NaCl es capaz de sobrevivir y seguir acumulando biomasa a pesar de encontrarse reprimida la expresión de transportadores relacionados con la homeostasis iónica.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Daños en la planta por estrés salino.

El estrés por sal (NaCl específicamente) se define como el efecto adverso ocasionado por una cantidad excesiva de sal soluble presente en suelo, mientras que la tolerancia a la salinidad es la adaptación natural de la planta, que le permite mantenerse biológicamente activa en presencia de sal. La salinidad en los suelos se ha convertido en uno de los

principales problemas que enfrenta la producción agrícola, principalmente en zonas áridas y semiáridas. Aproximadamente el 8% del suelo cultivable a nivel mundial se encuentra afectado por este problema, es decir cerca de 800 millones de hectáreas, siendo el NaCl y el Na₂SO₄ las sales principalmente encontradas en este tipo de suelos (Mahajan y Tuteja, 2005, FAO, 2008, Pan *et al.*, 2008, Turkan y Demiral, 2009).

La salinidad ocasiona en la planta un desbalance en la homeostasis iónica y crea también un estado hiperosmótico, además se genera daño oxidativo y se afecta la fotosíntesis, ocasionando decremento en el desarrollo y crecimiento de las plantas o la muerte. Generalmente un suelo salino con 0.2%-0.5% de sal puede inducir estos efectos y en las áreas afectadas por salinidad encontramos valores entre el 0.6%-10% (Cuartero *et al.*, 2006).

La actividad de varias enzimas citoplasmáticas puede verse afectada debido a la presencia de iones de Na⁺, si bien estas enzimas son activas en presencia de grandes cantidades de K⁺. Por lo tanto, las plantas tolerantes a la sal dependen de la presencia de potasio y requieren de la aclimatación al ion sodio, mientras que las no tolerantes, al ser incapaces de remover el sodio, presentan un desbalance Na⁺/K⁺. Otro problema que se puede presentar, es la dificultad de la planta para absorber agua de suelos salinos, puesto que la cantidad de sal tan elevada en el suelo ocasiona un decremento en el potencial hídrico, lo que lleva a un estrés por falta de agua (estrés hiperosmótico) (Pan *et al.*, 2008). La planta puede sufrir además envenenamiento por el ión Na⁺, inactivando o reduciendo la actividad de algunas enzimas, lo que ocasiona pérdida de la integridad de la membrana celular y desbalance metabólico. Igualmente, se da un desbalance de iones al ser absorbidas altas concentraciones de Na⁺ y Cl⁻, impidiendo la absorción de K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y Li⁺ y ocasionando malnutrición en la planta y afectación del desarrollo (Chen, 2006). Con la finalidad de reestablecer la homeostasis iónica y el estrés osmótico, la planta cierra los estomas evitando la transpiración, lo que minimiza el déficit de agua en la planta y la absorción de dióxido de carbono. El cierre de estomas, trae consigo, una reducción de la fotosíntesis, así como de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) y la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RUBP carboxilasa). Por otro lado, aquellos electrones provenientes de la cadena de transporte de electrones, que no se utilizan,

reaccionan con el oxígeno para formar especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas, al generarse en exceso en la mitocondria, en los peroxisomas o en el citoplasma, pueden llegar a ocasionar daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Una de las maneras en que las plantas responden ante una acumulación excesiva de ERO, es mediante un sistema de enzimas antioxidantes y moléculas pequeñas no-enzimáticas; tales como glutatión, α -tocoferol, flavonoides, ascorbato, antocianinas, compuestos polifenólicos y carotenoides (McCord, 2000).

Finalmente tenemos que el estrés por sal puede inhibir la división y expansión celular, lo cual puede ocasionar problemas de desarrollo en la planta, así como en su crecimiento y en la diferenciación de tejidos y órganos. (Zhu *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2006).

2.2. Mecanismos de tolerancia a la salinidad

Con la finalidad de adaptarse a ambientes salinos, algunas plantas utilizan la siguiente ruta de señalización: primero, receptores de membrana sensibles en las células de la raíz generan una respuesta ante el estrés; esta señal genera mensajeros secundarios con la finalidad de comunicarse con otras células, para que se activen cinasas. Las cinasas regulan directamente la expresión de genes de respuesta o bien la expresión de factores de transcripción y así regulan la expresión de los genes de respuesta, con ello la planta puede sobrevivir ante un reto salino (Wang *et al.*, 2009). Generalmente las plantas presentan tres mecanismos para sobrevivir: primero, con la finalidad de mantener un balance osmótico las plantas pueden intentar excluir el ion Na^+ en las células de la raíz o evitan los efectos tóxicos acumulando el ión sodio en vacuolas. Los antiporter Na^+/H^+ (NHXs) son proteínas de membrana que participan con un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis iónica. Su función es la de realizar un intercambio de Na^+ por H^+ a través de la membrana vacuolar usando un gradiente electromecánico de protones que es generado por la V-H^+ adenosina trifosfatasa (V-H^+ -ATPasa) y por la V-H^+ pirofosfatasa (V-H^+ -PPasa), que componen la bomba de H^+ localizada en el tonoplasto. La compartimentalización del ión sodio provee un medio efectivo para evitar el efecto perjudicial del Na^+ en el citosol, además de contribuir a mantener el potencial osmótico, lo que se ve reflejado en el

incremento de la tolerancia a la salinidad por parte de la planta (James *et al.*, 2006, Apse y Blumwald, 2007, Muller *et al.*, 2009, Queiros *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2011). Segundo, se ha reportado que algunas plantas sintetizan y acumulan ciertos compuestos, como algunos aminoácidos, poliaminas, y ciertos carbohidratos, de esta manera reducen el estrés osmótico ocasionado en la planta, algunas plantas acumulan prolina, por ejemplo, para evitar la deshidratación celular; la naturaleza anfipática de la prolina permite que por un lado su parte hidrofóbica se una a otras proteínas, mientras que la hidrofílica, se una a moléculas de agua y de este modo evitar la deshidratación (Hoekstra *et al.*, 2001). También la inducción de genes de glicina-betaína ayuda a mantener un adecuado balance osmótico, con lo cual no se ve comprometida la actividad de ciertas enzimas cruciales en el metabolismo de la planta (Fenghua *et al.*, 1997).

Finalmente otro mecanismo utilizado por las plantas puede ser su sistema antioxidante para la prevención del daño oxidativo. Algunas plantas ante estrés por sal sobreexpresan enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa o la glutatión s-transferasa, también la superóxido dismutasa y la glutatión reductasa. La actividad antioxidante incrementa la habilidad de tolerancia de la planta e inhibe la peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados, lo cual es crucial pues con ello se mantiene la integridad y estabilidad de las membranas celulares (Jiang *et al.*, 2006).

Otros estudios sugieren que el ácido absísico pueda jugar un rol importante en la tolerancia al estrés, al ayudar a los estomas a permanecer cerrados durante el déficit de agua y también puede estar regulando la expresión de algunos genes. Algunas plantas, con la finalidad de mantener un balance nutricional durante un estrés salino, incrementan su absorción de potasio y además puede que combine metabolitos con la sal y así evitar el daño ocasionado por iones libres (Salekdeh *et al.*, 2002).

2.3. Uso de microarreglos para análisis de expresión global de genes en plantas.

Los microarreglos son una herramienta que permiten una visualización amplia de la respuesta a nivel transcripcional ante un cierto estímulo. El uso de microarreglos homólogos se ha empleado por ejemplo en estudios de monitoreo de patrones de expresión

de ciertos genes inducibles durante estrés por sequía o por bajas temperaturas (Seki *et al.*, 2001). Otro ejemplo del uso de microarreglos homólogos es el estudio de perfiles específicos de expresión en los distintos órganos de *Arabidopsis thaliana* (Ruan *et al.*, 1998). Un estudio usando un chip de olivo fue utilizado para evaluar los cambios que determinan la periodicidad en el olivo, con relación a la maduración de sus frutos y al cambio de hojas (Turktas *et al.*, 2013).

Sin embargo, no siempre es posible contar con un microarreglo de la misma especie en estudio, por lo que el uso de microarreglos heterólogos puede llegar a ser una opción. Sí bien la gama de hibridación entre especies tiene cierto potencial de riesgo solo por el hecho de ser distintas especies en si, podemos encontrar en la literatura varios estudios que muestran que el uso de microarreglos heterólogo puede llegar a proporcionar resultados confiables. Por ejemplo, se llevo a cabo un estudio relacionado con la expresión diferencial y conservada de genes durante el desarrollo, efectuado entre plantas divergentes (*Euphorbia esula* L., *Avena fatua*, *Populus*) a *Arabidopsis thaliana*, usando un microarreglo de *Arabidopsis thaliana* (Horvath *et al.*, 2003). En otro ejemplo, se comparó la expresión de genes entre *Arabidopsis thaliana* y *Arabidopsis halleri*, en respuesta a factores de acumulación de metales (Weber *et al.*, 2004). El uso de un microarreglo de tomate para análisis de comparación de la expresión de genes en *Solanaceae*, puede ser un ejemplo más del uso de microarreglos heterólogos (Moore *et al.*, 2005). Uno más, es un estudio donde se utilizó un microarreglo de tomate para evaluar la expresión de genes de papa (*Solanum tuberosum*) relacionados con el evento del *cold-induced sweetening* (Bagnaresi *et al.*, 2008). También encontramos un estudio de respuesta ante estrés por sequía en *Musa spp.* donde se utilizó un microarreglo de arroz (Davey *et al.*, 2009).

2.4. Vidrillo (*Mesembryanthemum crystallinum*).

Ya que las plantas halófitas son capaces de vivir en ambientes con condiciones de salinidad elevada, éstas representan un organismo ideal para el estudio y caracterización genética de moléculas (entre ellas antiporters NHXs). La planta vidrillo (*Mesembryanthemum crystallinum*) pertenece a la Familia *Aizoaceae* y Orden

Caryophyllales, es una planta halófila con metabolismo C3-CAM inducible por estrés (Cushman *et al.*, 2008, Niewiadomska *et al.*, 2011). Vidrillo tiene un genoma relativamente pequeño, del cual se encuentran reportadas 629 secuencias de nucleótidos, además de 28042 secuencias correspondientes a ESTs (expressed sequence tags) (NCBI-Entrez), fue propuesto como un modelo de estudio para la respuesta al estrés salino por Bohnert y Cushman en el 2001.

Actualmente se cuenta con tres fenotipos de la planta vidrillo en los laboratorios de biología molecular de plantas del CIBNOR, estos fenotipos fueron aislados y caracterizados por el Dr. Andrés Orduño de la Unidad de Guerrero Negro del CIBNOR. Los fenotipos nombrados P0, P9 y P11 se diferencian entre ellos por dos características principalmente, el color de la vaina que es rojo en P0 y amarilla en los otros dos fenotipos, y por el tipo de crecimiento, siendo este; postrado en los fenotipos P0 y P9, mientras que en P11 el crecimiento es erecto.

2.5. Trabajos en vidrillo.

El hecho de que la planta *Mesembryanthemum crystallinum* pueda ser inducida a cambiar su metabolismo de C₃ a CAM por déficit de agua o por un estrés salino, hace de esta planta un modelo para estudios moleculares (Bohnert y Cushman, 2001). Sumado a ello el hecho de que existen más de 20 bibliotecas de cDNA y una base de datos de ESTs (Bohnert *et al.*, 2001, Kore-eda *et al.*, 2004), de las cuales se han determinado tres secuencias ortólogas de NHX con respecto a *Arabidopsis thaliana*: *Nhx1* (AM746985.1), *Nhx2* (AM748092.1) y *Nhx3* (AM901401.1) y la secuencia de un ortólogo de *NhaD* (AM746986.1); NHx1 es un transportador de membrana vacuolar/prevacuolar, mientras que el transportador NHx2 es una proteína de membrana endosomal, la isoforma NHx3 tiene localización en la endomembrana y la proteína *NhaD* es considerada parte de la membrana del cloroplasto (Consentino *et al.*, 2010., Bassil *et al.*, 2011). En la **Figura 1** podemos observar un árbol filogenético de los antiporters Na⁺/H⁺ de plantas (Modificado de Consentino *et al.*, 2010).

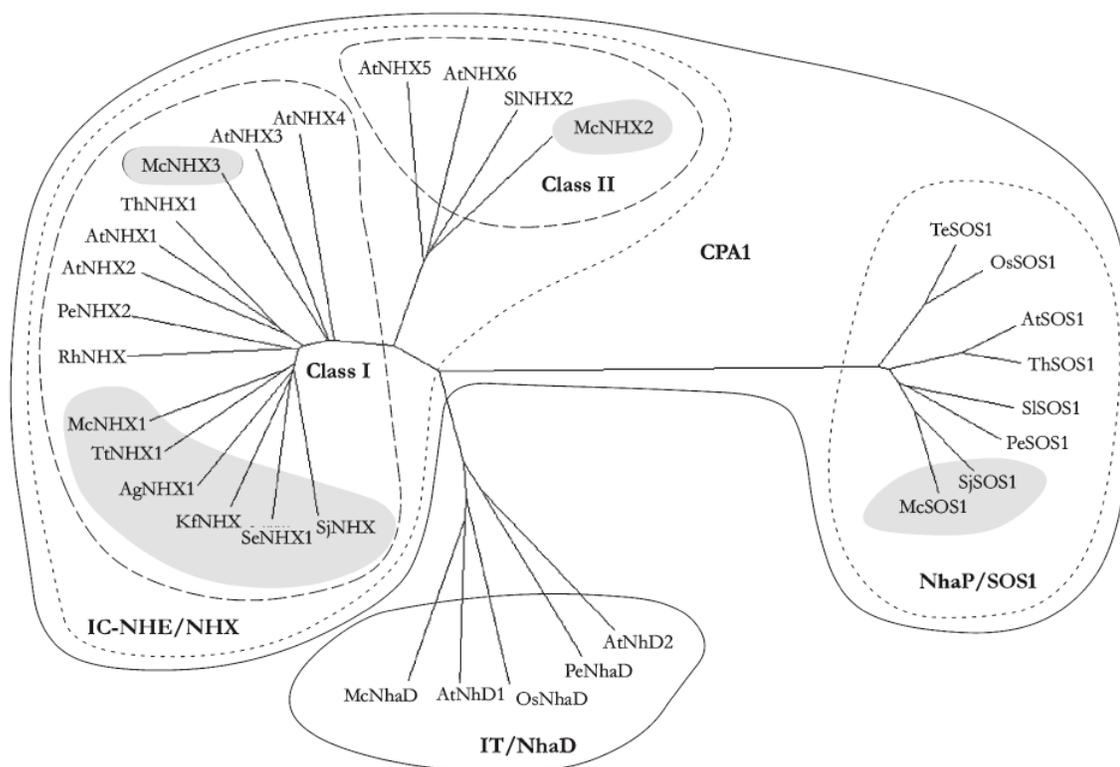


Figura 1. Árbol filogenético de los antiporters Na^+/H^+ de plantas. Alineamiento múltiple de secuencias generado usando CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) las distancias evolutivas fueron calculadas por el método de neighbour joining. Los siguientes antiporters fueron incluidos en el análisis: McNHX1, McNHX2, McNHX3, McSOS1 y McNhaD (*Mesembryanthemum crystallinum*); AtNHX1, AtNHX2, AtNHX3, AtNHX4, AtNHX5, AtNHX6, AtSOS1, AtNhaD1 y AtNhaD2 (*Arabidopsis thaliana*); RhNHx (*Rosa hybrida*); PeNHX2, PeNhaD y PeSOS1 (*Populus euphratica*); SjnHX y SjsSOS1 (*Suaeda japonica*); SINHX2 y SISOS1 (*Solanum lycopersicum*); OsSOS1 y OsNhaD (*Oryza sativa*); ThSOS1 y ThNHX1 (*Thellungiella halophila*); TeSOS1 (*Triticum aestivum*); KfNHX (*Kalidium foliatum*); TtNHX1 (*Tetragonia tetragonioides*); SeNHX1 (*Salicornia europaea*); AgNHX1 (*Atriplex gmelini*). Las proteínas de halófitas se indican con un sombreado gris.

En la **Tabla I** observamos las características de los antiporters de vidrillo (Modificada de Consentino *et al.*, 2010).

Tabla I. Características de los antiporters de vidrillo. Número de aminoácidos, aa; Peso molecular en kDa, PM; Dominios transmembranales, DTMs.

Antiporter	aa	PM	DTMs previstos	Localización esperada	Complementación funcional
McSOS1	1115	127.3	12	Membrana Plasmática	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
McNhaD	577	61.5	13	Cloroplasto	<i>S. cerevisiae</i> nha1 nhx1 ena1-4 <i>Escherichia coli</i> nhaA nhaB
McNHX1	549	60.8	10	Vacuola	<i>S. cerevisiae</i> nhx1
McNHX2	556	61.6	11	Vacuola/ pre-vacuola	-
McNHX3	526	58.1	10	Endomembrana	-

En el 2010, Consentino et al., reportaron su estudio sobre la expresión diferencial de los genes del transportador antiporter Na^+/H^+ . Estos genes fueron obtenidos de la planta vidrillo cuando fue sometida a salinidad y sequía; la expresión de los genes fue evaluada en muestras de la raíz y de la hoja. Sus resultados muestran diferencias con los datos obtenidos por Warner-Urías (2010), quien encuentra aumento en los niveles de expresión de las isoformas del *Nhx2* y *NhaD* en respuesta a estrés salino y sequía, a diferencia de, lo reportado por Consentino et al., quien no detecta, expresión del gen *Nhx2*. En el 2013, Warner-Urías y colaboradores reportan las diferencias en la respuesta fisiológica de los tres fenotipos de la planta vidrillo (P0, P9 y P11) ante el estrés ocasionado por NaCl, además muestran el nivel de expresión de los genes *McNhx1* y *McNhx2* en respuesta a la salinidad. Observan diferencias entre los tres fenotipos con relación a los parámetros fisiológicos medidos (contenido de prolina, sodio/potasio, clorofilas, potencial hídrico), donde el fenotipo P11, que si bien es capaz de sobrevivir y seguir acumulando biomasa ante el estrés salino, es el fenotipo que más problemas tiene ante la salinidad en comparación con los otros dos fenotipos. Además, encuentran que este mismo fenotipo no es capaz de encender

los genes de los transportadores antiporters *Nhx1* y *Nhx2*; todo esto indica que esta planta esta adaptada para tolerar el estrés salino por otros medios distintos a los transportadores de sodio.

3. JUSTIFICACIÓN.

El identificar la expresión diferencial de genes en los diferentes fenotipos de vidrillo, nos brinda la posibilidad de conocer aquellos elementos involucrados en los mecanismos de respuesta a estrés por NaCl, con lo cual se podría comprender más sobre la tolerancia a la salinidad.

Vidrillo representa un modelo de halófitas para estudio de estrés salino debido a que, por una parte se conoce su cambio de metabolismo de C3 a CAM y la respuesta del transcriptoma al estrés salino; además se ha descrito el comportamiento de sus proteínas antiporters en respuesta a este estímulo; en este sentido, Consentino *et al.* (2010) mostraron que los transportadores NHX (a excepción del NHX2) se inducen por estrés salino. Por otra parte, la caracterización de diferentes fenotipos de la planta vidrillo hecha por el Dr. Andrés Orduño, permitió efectuar estudios de respuesta diferencial entre los fenotipos en respuesta al estrés por NaCl, con lo cual Warner-Urías *et al.* (2013) demuestran que los antiporter NHX1 y NHX2 son expresados diferencialmente en los 3 fenotipos de vidrillo, siendo el fenotipo P11 incapaz de encender dichos transportadores y que además estos fenotipos tienen respuesta fisiológica distinta ante el estrés por NaCl.

Preguntas:

¿Cuáles son las diferencias a nivel del transcriptoma entre P0, P9 y P11 que contribuyen a explicar el desempeño fisiológico de cada fenotipo como respuesta al estrés por NaCl?

¿Qué mecanismos moleculares podrían estar involucrados en la supervivencia del fenotipo P11 al estrés por NaCl a pesar de no existir la expresión de los genes *Nhx1* y *Nhx2*?

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo General.

Caracterizar y comparar las rutas involucradas en la respuesta a NaCl en 3 fenotipos de vidrillo (*Mesembryanthemum crystallinum*) mediante análisis de expresión global de genes.

4.2. Objetivos Específicos.

- 1) Caracterizar, analizar y comparar la expresión genética global de tres fenotipos de vidrillo en respuesta a estrés por NaCl.
- 2) Identificar y proponer rutas alternativas independientes de NHX1 y NHX2 para la respuesta al estrés salino en P11.
- 3) Cuantificar el nivel de expresión de los genes *McNHx3* y *McNhaD* de los transportadores antiporter Na^+/H^+ de los tres fenotipos de *M. crystallinum* en condiciones control y de estrés por NaCl.

5. HIPÓTESIS.

Si bajo condiciones de estrés por NaCl el fenotipo P11 es capaz de sobrevivir y acumular biomasa a pesar de encontrarse reprimida la expresión de transportadores involucrados en la homeostasis iónica, entonces el análisis comparativo del transcriptoma de este fenotipo, de P9 y P0, permitirá proponer posibles mecanismos moleculares que participen alternativamente en la respuesta al estrés salino en P11.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Material vegetal y Bioensayo.

Las semillas de vidrillo (*M. crystallinum*) de cada fenotipo (P0, P9 y P11) fueron donadas por el Dr. Andrés Orduño (CIBNOR-Unidad Guerrero Negro). Las semillas fueron lavadas con etanol al 70% durante 60 seg con agitación en vortex (en tubos Eppendorf de 1.5 ml), el etanol fue decantado y se adicionó hipoclorito al 3% (Agitación en vortex durante 10 min.), se retiró el hipoclorito y se efectuaron seis lavados con agua destilada estéril (agitación en vortex 1 min., cada vez). Las semillas fueron germinadas en condiciones de invernadero, en charolas que contenían como soporte vermiculita y Sunshine, se regaron las charolas durante tres semanas, cada tercer día con solución nutritiva Hoagland 0.25X estéril. Transcurrido dicho lapso de tiempo 40 plántulas de cada fenotipo fueron transferidas a cultivo hidropónico en recipientes para 10 plántulas (se utilizaron esponjas como soporte de las plántulas) con capacidad de 700 ml de solución, los cultivos fueron mantenidos durante 3 semanas más en un cuarto de cultivo con condiciones controladas de 25 °C, 1500 luxes, un fotoperiodo de 16-h luz y 8-h de oscuridad, con aireación constante; la solución Hoagland 0.25X fue reemplazada cada semana. Para el bioensayo se utilizaron 20 plántulas de cada fenotipo con 6 semanas de edad, diez plántulas como control y el resto como tratamiento. Las plántulas tratamiento fueron expuestas ante solución Hoagland 0.25X estéril con 500mM de NaCl en cultivo hidropónico (un total de seis recipientes, dos recipientes por fenotipo: control y tratamiento), las plántulas control fueron mantenidas con solución Hoagland 0.25X estéril sin NaCl. Los cultivos hidropónicos se mantuvieron durante 7 días en las condiciones controladas del cuarto de cultivo antes descritas.

6.2. Aislamiento del ARN Total.

El ARN total fue extraído a partir de tejido foliar de 5 plantas control y estresadas de cada fenotipo usando Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA.). Las muestras fueron congeladas con N₂ líquido y se homogenizaron en morteros estériles previamente enfriados a -80 °C, el

material homogéneo fue colectado en tubos Eppendorf de 2ml estériles donde se le adicionó 1ml de Trizol (por cada 200mg de tejido), las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm (durante 10 min. a 4 °C), el sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5ml donde se dejó incubar por 5 min. a temperatura ambiente (aprox. 25 °C); transcurrido ese tiempo se adicionaron 200 µl de cloroformo (por cada mililitro de Trizol empleado) agitando vigorosamente durante 15 seg.. Se dejó incubar cada muestra durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4 °C, 12000 rpm durante 15 min.. La fase acuosa de cada tubo fue transferida a uno nuevo, a cada tubo se le adicionó 0.5ml de isopropanol frío (por cada mililitro de Trizol empleado), se adicionó además 1µl de tRNA de levadura, las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, finalmente los tubos fueron centrifugados durante 15 min a 12000 rpm a 4 °C, la pastilla de ARN en el fondo del cada tubo fue lavada con 1ml de etanol al 75% (preparado con agua DEPC (dietilpirocarbonato) al 1%), se centrifugó a 7500 rpm, durante 5 minutos a 4 °C, el etanol se decantó y la pastilla de ARN total fue secada en la campana de extracción a temperatura ambiente; cada ARN total fue resuspendido en 20 µl de agua DEPC al 1%, se cuantificó la concentración de RNA total mediante el uso del espectrofotómetro (NanoDrop ND-100).

6.2.1. Calidad del ARN.

La calidad e integridad del ARN total extraído fue evaluada mediante su visualización en un gel de agarosa-formaldehído al 1%, preparado con buffer MOPS 1X (stock del buffer MOPS 10X:MOPS 0.2 M, acetato de Na 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7.0, empleando agua tratada con DEPC al 1% y esterilizado en autoclave), todo limpio con RNAsa-Zap y preparado con agua destilada estéril DEPC. Se derritió la agarosa utilizando un microondas, al enfriarse se agregó en la campana de extracción, formaldehído al 37% (final) y SYBERSafe 10000X. A 3 µg de ARN total contenidos en un x volumen, se le adicionó la misma cantidad de agua DEPC al 1% y las muestras se calentaron a 65 °C por 10 min, se mantuvieron en frío hasta ser cargadas en el gel. Previo a cargarse en el gel, a las muestras se les adicionó buffer de carga (0.75 ml de formamida deionizada, 0.15 ml de MOPS 10X, 0.24 ml de formaldehído, 0.1 ml de agua con DEPC, 0.1 de glicerol, 0.08 de azul de

bromofenol al 10%), el marcador de pares de bases utilizado fue el 0.1-10 kb RNA Ladder 1µg/µl (Invitrogen). El gel de agarosa-formaldehído fue corrido en frío a 50 V por 2-h, transcurrido este tiempo el gel fue revelado utilizando el fotodocumentador (BioDoc. ItTM Imaging System UVP).

6.2.2. Tratamiento del ARN con DNAsa I.

Para purificar el ARN total aislado, 1 µg de ARN total fué tratado con 1 U de DNAsa I (Invitrogen), más buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) y agua DEPC 1%, en un volumen de reacción de 10 µl, incubándose la misma a temperatura ambiente por un lapso de 15 min. La DNAsa se inactivó con EDTA 25mM y calor (65 °C/10 min).

6.3. Microarreglo heterólogo.

6.3.1. Transporte de ARN.

Las muestras se transportaron a temperatura ambiente precipitadas con acetato de sodio y etanol absoluto de la siguiente manera: se hicieron 6 *pools* de las muestras (2 por cada fenotipo) con una n de 5 para cada grupo control y tratamiento. A un total de 25 µg de RNA total (5 µg por cada muestra en el *pool*); contenido en 50 µl de agua DEPC al 1%, se agregó 5 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y se mezcló perfectamente en vortex, luego se adicionaron a cada muestra 138 µl de etanol 100% frío y se mezcló por inversión del tubo hasta que se homogenizó. Las muestras se conservaron a -70 °C por una noche y posteriormente se centrifugaron a máxima velocidad por 15 min. para ser enviadas a la Unidad de Microarreglos de la UNAM.

6.3.2. Marcado de ARN total.

Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X, para evaluar su integridad después del transporte hasta la unidad de microarreglos de la UNAM en la Cd. de México.

Para efectuar la reacción de marcado se hizo la siguiente Mezcla A (**Tabla II**):

Tabla II. Mezcla A para marcado de ARN total.

Reactivo	Descripción	Volumen (μ l)
ARN total	-	2
Oligo (dT)	(1 μ g/ μ l)	1
Random Primers	-	1
H ₂ O	Vol. Final 19 μ l	15

Se homogenizó con micropipeta y se incubó a 70 °C por 10 min, se colocó en hielo.

(Mezcla B):

Tabla III. Mezcla B para marcado de ARN total.

Reactivo	Descripción	Vol. (μ l)
5X RT Reaction Buffer	(SuperScript II)	8
MgCl ₂	(25 mM)	2
Aminoallyl-dNTP mix	(dATP, dCTP y dGTP 5 mM; dTTP 1.5 mM; AA-dUTP 3.0 mM).	4
DTT	(0.1 M)	4
SuperScript II Reverse Transcriptase	(200 U/ μ l)	3

Se mezcló la primer reacción con la mezcla B (**Tabla III**), se centrifugó e incubó durante 10 min a 25 °C, luego durante dos horas a 42 °C.

6.3.3. Hidrólisis del ARN.

Se añadieron 5 μ l de NaOH 1 N y 1 μ l de EDTA 0.5 M y se incubó por 10 min a 65 °C.

Posteriormente se añadieron 25 μ l de HEPES 1 M, pH 7.5.

6.3.4. Purificación del Aminoallyl cDNA (aacDNA).

Al aacDNA se le agregaron 7 μ l de acetato de sodio 3 M y 400 μ l de binding buffer, se cargo la mezcla en las columnas Qiagen y se dejaron reposar por 5 min. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 min, se lavó tres veces con 500 μ l de etanol al 80%, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. Los tubos vacíos se centrifugaron durante 1 min para remover el exceso de etanol; finalmente en un tubo nuevo se recuperó de la columna al aacDNA, esto, dos veces con 30 μ l de agua-desionizada, se dejaron reposar 2 minutos y se centrifugaron 1 min. Se secaron los pellet en el speed vac y se resuspendieron en 4.5 μ l de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9.0).

6.3.5. Reacción de conjugación.

Se disolvieron los colorantes Alexa 555 y Alexa 647 con 4.5 μ l de DMSO, mediante vortex, se agregaron los 4.5 ml del aacDNA purificado. Se mezcló sin centrifugar y se incubó a temperatura ambiente en obscuridad por una hora. Las muestras control fueron marcadas con Alexa 555, mientras que las muestras tratamiento con Alexa 647, además se hicieron experimentos SWAP, es decir los colorantes fueron invertidos, esto como control de la reacción.

6.3.6. Purificación del aacDNA marcado (Alexa-AcDNA).

Se agregaron 71 μ l de agua, más 8 μ l de acetato de sodio 3 M y 400 μ l de binding buffer, se mezcló y cargo en las columnas Qiagen, se dejó reposar por un minuto y luego se centrifugó por un minuto. Se efectuaron tres lavados con 500 μ l de etanol al 80% y se centrifugaron durante un minuto los tubos vacíos para eliminar el exceso de etanol. En un tubo nuevo se recupero de la columna el Alexa-AcDNA dos veces con 50 μ l de agua desionizada estéril (pudo haberse usado TE buffer), se dejó reposar por 2 min y se centrifugó por 1 min.

6.3.7. Hibridización en Chip de *Arabidopsis thaliana*.

6.3.7.1. Pretratamiento del microarreglo.

Las laminillas utilizadas se prehidrataron exponiendo el lado impreso al vapor de agua a 50 °C durante 10 segundos, se volteó el chip para secar y volver a exponer al vapor (3 veces), luego se fijó con dos ciclos de luz UV 0.12 J x cm², enseguida se sumergió la laminilla en agua hirviendo durante 2 minutos y de aquí se paso inmediatamente a la solución de pre-hibridación (SSC 5X, SDS al 0.1%, BSA al 1%), se incubó en agitación suave por una hora a 42 °C. Posteriormente se lavo 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se secó por centrifugación a 1500 rpm por 5 min.

6.3.7.2. Hibridación

Antes de la hibridación se efectuaron cálculos de concentración mediante el uso de un NanoDrop, esto para determinar la cantidad de Alexa-AcDNA a utilizar en cada chip (control y tratamiento) (**Tabla IV**).

Las hibridaciones se hicieron de acuerdo a la siguiente reacción:

Tabla IV. Mezcla para efectuar la hibridación en el chip del microarreglo.

Reactivo	Concentración final	Vol. µl
Alexa 555 (Control)	17 pmol	9.5
Alexa 647 (Tratamiento)	17 pmol	8.9
SSC 20X	Final 5X	17.5
SDS 1%	Final 0.1%	7.0
TE	Vol. Final 70 µl	27.1

Se efectuó una desnaturalización a 94 °C por 5 min y 30 seg a 65 °C, se agregó la mezcla al microarreglo, cubriendo la superficie con un cubreobjetos, la incubación se hizo durante toda la noche a 42 °C.

Al día siguiente se efectuaron lavados a temperatura ambiente y con agitación:

Los lavados fueron 3 durante 2 min cada uno, el primero con 50 ml de SSC 1X-SDS al 0.05%, el segundo y el tercero solo con SSC 0.06X. Finalmente la laminilla se secó por centrifugación a 1500 rpm por 5 min.

6.3.8. Lectura del Chip en Scanner y análisis informático.

La lectura de los chips (laminillas de 10 micras) se efectuaron con el Lector GenePix 4100A.

Se utilizó el software GeneArise (del Instituto de Fisiología de la UNAM, Unidad de Microarreglos, Dr. Jorge Ramírez), con el cual se normalizaron los datos obtenidos de los microarreglos y se determinó cuales genes estaban sobreexpresados y cuales reprimidos.

Se utilizó además la base de datos de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html, Search against: *Arabidopsis thaliana*, para la identificación de las rutas metabólicas alteradas por la expresión de los distintos genes; así como la anotación funcional de los genes (DAVID, Bioinformatics Resources 6.7; Functional Annotation) <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>.

6.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés).

6.4.1. Preparación de cDNA.

A partir de las mismas muestras de ARN total que se usaron en los microarreglos, se preparó cDNA para utilizarse en las reacciones de qPCR. Para la preparación de cDNA se utilizó oligo d(T) y se partió de 1 µg de ARN total, purificado previamente con DNAsa. Las muestras se desnaturalizaron a 70 °C durante 5 min en tubos de 0.2 ml. Posteriormente

las muestras fueron colocadas en hielo y cada reacción se preparó agregando los siguiente elementos (**Tabla V**); cabe mencionar que se hace un master mix y se adicionan 9 μ l a cada tubo con ARN y oligo d(t) previamente preparado :

Tabla V. Mezcla de reacción para síntesis de cDNA.

Reactivo	Concentración	Vol. (μl)
Buffer IMPROM II	5X	4
MgCl ₂	25mM	2.5
dNTPs	10mM	1
RNA Sin	40 U/ μ l	0.5
IMPROM II	-	1
Agua DEPC	Vol. Final 9 μ l	-

Se utilizaron las siguientes condiciones para la síntesis de cDNA: 25 °C por 10 min, seguido de 60 min a 45 °C y finalmente 70 °C durante 15 min. Los cDNAs fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior uso.

Para las reacciones de qPCR se hicieron *pools* de los cDNAs sintetizados, partiendo de volúmenes iguales de cada una de las cinco muestras que componían a cada *pool* (5 muestras control, lo mismo para las tratamiento, para cada fenotipo), contando al final con 6 *pools* para efectuar las reacciones de qPCR.

6.4.2. qPCR.

A partir de las secuencias reportadas para los genes *Nhx3* y *NhaD* de vidrillo, se diseñaron secuencias específicas de primers para PCR en tiempo real (**Tabla VI**). El gen de Poliubiquitina utilizado también fue diseñado específicamente para vidrillo. En la tabla se muestran las características de cada gen.

Tabla VI. Características de los primers usados en las reacciones de qPCR.

Acceso al GenBank	Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)
AM901401.1	McNhx3qPCR132F	CGTACTACTGTTGAAGAAGATTGG	24	60.59
AM901401.1	McNhx3qPCR132R	AGAAGCGGTGTTTCATCC	18	60.22
AM746986	McNhaDqPCR100F	GGGATGTCACAACAACACTATGCTCT	24	65.1
AM746986	McNhaDqPCR100R	GGCACAGCCAAAGAAATAGCAG	22	66.7
AB571099.1	UBI1F1	CGCACCTTGGCTGACTACA	19	64
AB571099.1	UBI1R1	AACAACCAGACCATGCAACA	20	65

El área de trabajo fue esterilizada con luz UV por 15 min, se utilizaron puntas nuevas, estériles con barrera de filtro. La reacción se preparó de acuerdo a la **Tabla VII**. Cada muestra fue preparada por triplicado y los negativos por duplicados, es decir que por cada juego de primers se hicieron 20 reacciones (18 de muestra y dos controles negativos, donde por cada fenotipo se hicieron 6 reacciones, 3 para el *pool* control y 3 para el tratamiento). Además de 20 reacciones más para los primers del gen constitutivo (cuyas reacciones debían incluirse cada vez que se corriera una reacción).

Tabla VII. Mezcla de reacción de muestras de qPCR.

Reactivo	Concentración	Volumen (ml)
SsoFast Eva green Supermix	2X	5
Primer F	10mM	0.2
Primer R	10mM	0.2
cDNA	25-50ng/ml	1
H ₂ O milli Q estéril	Vol. Final 10 ml	3.6

Las reacciones fueron efectuadas utilizando el equipo Rotor-Gene 6000 series y el software 1.7 con el mismo nombre (Corbett Research) se utilizó el rotor de 72 pozos. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C por 10 min., seguido de cuarenta ciclos de 95 °C por 10 seg, 60 °C por 15 seg, 72 °C por 20 seg y finalmente 72 °C por 5 seg. Los datos de las reacciones fueron analizados con el empleo del algoritmo 2^{-DDCT} (Livak y Schmittgen, 2001), donde los cambios en la expresión de cada gen son evaluados tratamiento vs control y luego contra el gen constitutivo en este caso, poliubiquitina de vidrillo.

6.5. Análisis Estadístico

Se efectuó un análisis de varianzas (ANDEVA) de dos vías, con un nivel de significancia de $p < 0.05$, se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 7.0.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de ARN.

Con la finalidad de poder llevar a cabo los experimentos de microarreglos, una vez efectuado el bioensayo donde las plantas fueron sometidas a un estrés por NaCl, se realizó una extracción de ácidos ribonucleicos. En la **Figura 2** se muestra un gel de electroforesis, donde podemos observar la integridad de los *pools* de ARN enviados a la unidad de microarreglos de la UNAM, para su procesamiento.

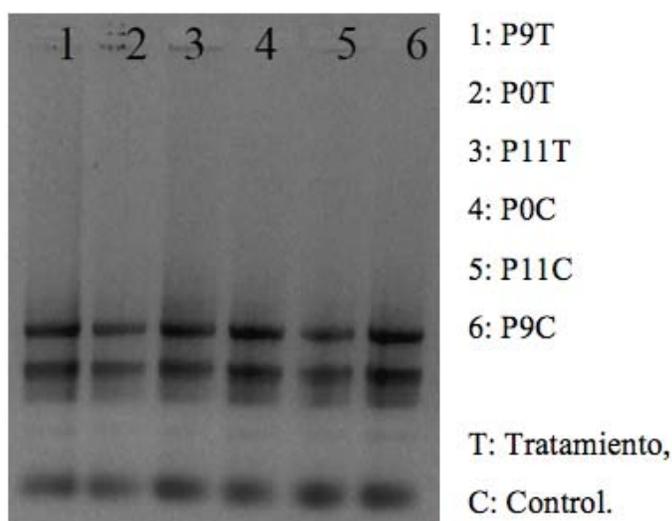


Figura 2.- Gel de electroforesis para evaluar la integridad de los *pools* de ARN total extraídos, enviados a la unidad de microarreglos de la UNAM. (P0, P9 y P11 corresponden a los fenotipos de vidrillo).

7.2. Microarreglo heterólogo de *Arabidopsis thaliana*.

Una vez efectuada la metodología de microarreglos, los chips fueron escaneados y los datos se procesaron en el software genArise para la normalización de los mismos. En la **Figura 3** podemos observar el comportamiento de los 30, 000 genes impresos en el microarreglo; el color verde del centro corresponde a aquellos genes que no muestran cambios significativos entre las muestras control y tratamiento, el color azul aquellos genes que presentan un cambio control/tratamiento, pero no con valores significativos de Zscore de 1-1.49, (los datos de Zscore son tanto positivos (genes que aumentan su nivel de expresión) o negativos (genes que disminuyen su nivel de expresión)), el color verde azulado corresponde a aquellos genes con Zscore entre 1.5-1.99 y los puntos en color blanco a aquellos genes con diferencia significativa con un valor de Zscore por arriba de 2. Donde valores tanto positivos como negativos a partir de 1.5 de Zscore, son considerados adecuados para determinar genes que se encuentran aumentando o reprimiendo su nivel de expresión con respecto a las muestras control de cada microarreglo efectuado.

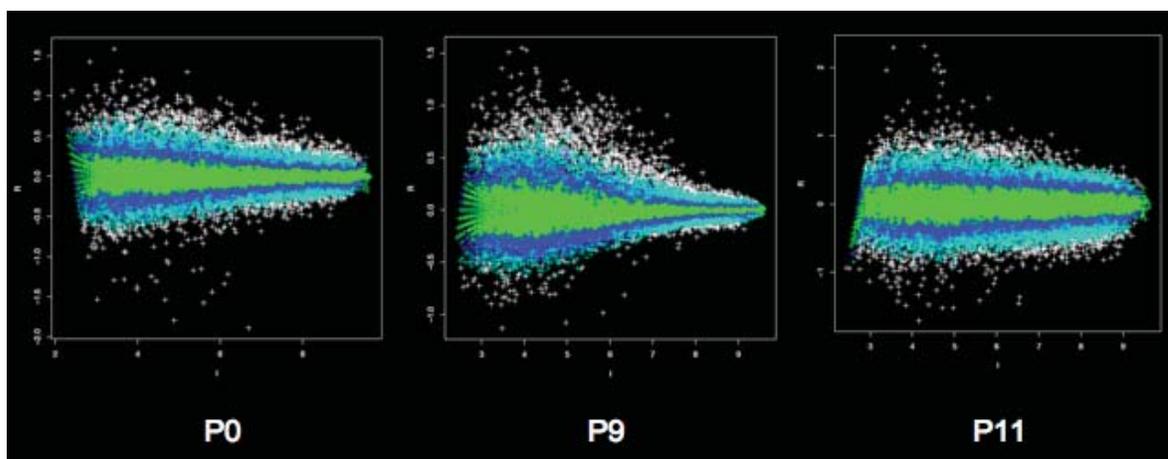


Figura 3. Datos procesados de cada fenotipo de vidrio en el software genArise.

7.2.1. Genes que aumentan su nivel de expresión.

Procesados los datos en genArise, pudo ser posible obtener los datos correspondientes a los genes cuya expresión había aumentado con relación a la muestra control (Zscore mayor de 1.5), con estos datos se obtuvo el diagrama de Venn (**Figura 4**) donde se muestra el número de genes que aumentan su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrio, así como su relación con los otros fenotipos; también se indica el porcentaje con relación al total de genes impresos en el chip.

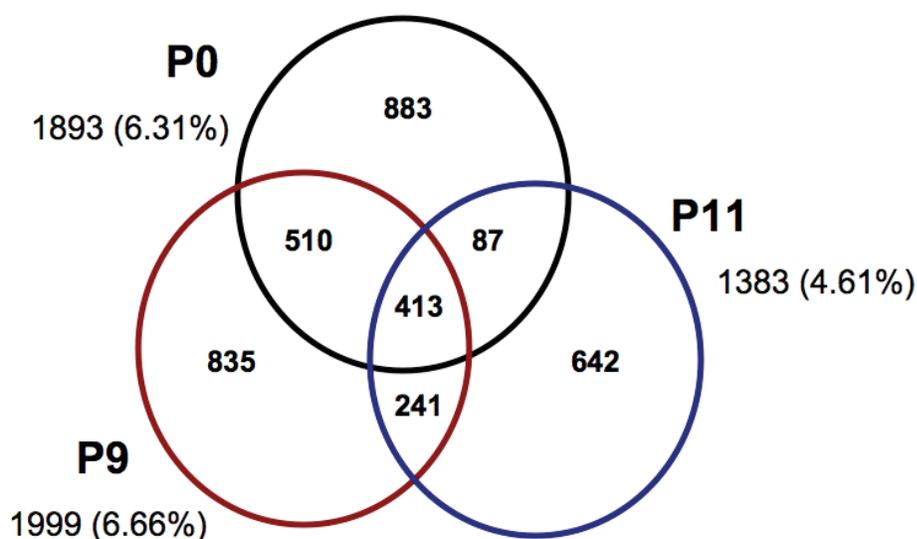


Figura 4. Diagrama de Venn del número de genes que aumentan su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrio, así como su relación entre ellos.

Los datos de cada microarreglo (Zscore mayor de 1.5) fueron analizados con KEGG con la finalidad de obtener aquellas rutas metabólicas que se encontraban participando, así como el número de genes que aumentan su nivel de expresión en cada una de ellas (**Tabla VIII**).

Tabla VIII. Rutas metabólicas donde se observan genes que aumentan su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrillo.

RUTAS METABÓLICAS	Número de genes que aumentan su nivel de expresión		
	P0	P9	P11
Vías metabólicas	52	43	38
Biosíntesis de metabolitos secundarios	28	21	18
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	15	10	5
Ribosomas	9	8	7
Transducción de señales de hormona de plantas	9	8	6
Interacción planta-patógeno	8	6	2
Spliceosoma	8	4	4
Transporte de ARN	7	7	1
Proteólisis mediada por ubiquitina	7	2	3
Biogénesis de los ribosomas en eucariotas	6	3	1
Metabolismo de purina	6	5	1
Metabolismo de glicerofosfolípidos	5	-	2
Metabolismo de cisteína y metionina	5	7	2
Ruta de mRNA surveillance	5	3	2
Metabolismo de glutatión	4	2	1
Exportación de proteínas	4	2	4
Fagosoma	4	4	3
Metabolismo de fenilalanina	4	3	3
Biosíntesis de N-glicanos	4	3	3
Ciclo del citrato (ciclo de Krebs)	3	1	2
Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano	3	1	1
Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	3	1	1
Metabolismo de Azufre	3	-	2
Fosforilación oxidativa	3	2	4
Factores de transcripción basales	3	1	3
Fijación de carbono en los organismos fotosintéticos	3	-	1
Biosíntesis de fenilpropanoides	3	2	3
Sistema de señalización de fosfatidilinositol	3	1	1
Proteosoma	3	2	1
Metabolismo de pirimidina	3	2	-
Glucólisis / gluconeogénesis	3	3	2
Degradación de ARN	3	3	2
Metabolismo de porfirina y clorofila	2	-	-
Metabolismo de amino-azúcares y nucleótidos-azúcar	2	2	2
Metabolismo de los ácidos cyanoaminos	2	-	-
Peroxisoma	2	5	1
Reparación por escisión de nucleótidos	2	1	4
Sistema de retransmisión del azufre	2	-	-

Tabla VIII. Continuación...

Biosíntesis de sesquiterpenoides y triterpenoides	2	-	-
Fotosíntesis	2	2	-
Endocitosis	2	-	3
Fotosíntesis – proteínas de antena	2	3	1
Metabolismo del ácido oxocarboxílico	2	-	-
Biosíntesis de carotenoides	2	1	1
Metabolismo de nicotinato y nicotinamida	2	-	-
Metabolismo de tirosina	2	2	-
Metabolismo del inositol fosfato	2	2	2
Biosíntesis de ubiquinona y de terpenoide-quinona	2	1	1
Metabolismo de arginina y prolina	2	1	-
Biosíntesis de alcaloides de tropano, piperidina y piridina	2	1	-
Biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI)-anchor	1	1	-
Reparación por escisión de bases	1	2	2
Biosíntesis de glicoesfingolípido – globo series	1	-	-
Interacciones SNARE en el transporte vesicular	1	3	1
Metabolismo de beta-alanina	1	1	1
Degradación de lisina	1	-	-
One carbon pool by folate	1	2	1
Metabolismo de histidina	1	-	-
Metabolismo de esfingolípidos	1	-	-
Metabolismo de éter-lípidos	1	-	-
Reparación Mismatch (genes)	1	-	1
Metabolismo de piruvato	1	-	1
Ritmo circadiano en plantas	1	-	2
Ruta de la pentosa fosfato	1	-	-
Metabolismo del almidón y sacarosa	1	1	2
Replicación del ADN	1	1	2
Metabolismo de glicerolípidos	1	-	2
Biosíntesis de folato	1	-	1
Metabolismo de glicina, serina y treonina	1	1	3
Metabolismo de selenocompuestos	1	1	-
Recombinación homóloga	1	2	2
Biosíntesis del alcaloide isoquinolina	1	1	-
Biosíntesis de esteroides	1	1	1
Metabolismo de biotina	1	3	1
ARN polimerasa	1	-	-
Metabolismo de fructosa y manosa	1	-	1
Metabolismo de ácidos grasos	1	4	1
Metabolismo del Nitrógeno	-	3	-
Biosíntesis de Terpenoides backbone	-	2	1
Biosíntesis de aminoacil-ARNt	-	2	-
Interconversiones de pentosas y glucoronato	-	2	1
Metabolismo de propanoatos	-	2	1

Tabla VIII. Continuación...

Biosíntesis de diterpenoides	-	1	-
Alargamiento de ácidos grasos	-	1	-
Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	-	1	1
Biosíntesis de brasinoesteroides	-	1	-
Degradación de limoneno y pineno	-	1	2
Transportadores ABC	-	1	-
Metabolismo del triptófano	-	1	1
Regulación de la autofagia	-	1	-
Biosíntesis de stilbenoides, diarylheptanoides y gingerol	-	1	3
Biosíntesis de flavonas y flavonoles	-	1	-
Metabolismo de ascorbato y aldarate	-	1	1
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	-	1	2
Non-homologous end-joining	-	1	-
Degradación de valina, leucina e isoleucina	-	-	2
Biosíntesis de flavonoides	-	-	1
Metabolismo del ácido alfa-linolénico	-	-	1
Biosíntesis de glucosinolato	-	-	1
Metabolismo de butanoato	-	-	1
Metabolismo de riboflavina	-	-	1
Degradación de otros glicanos	-	-	1

Con los datos de los genes que aumentan su nivel de expresión en cada fenotipo se obtuvieron las **Figuras 5, 6 y 7**, las cuales corresponden a una descripción visual de la **Tabla VIII**, de todas aquellas rutas metabólicas donde se puede ver un aumento en la expresión de genes.

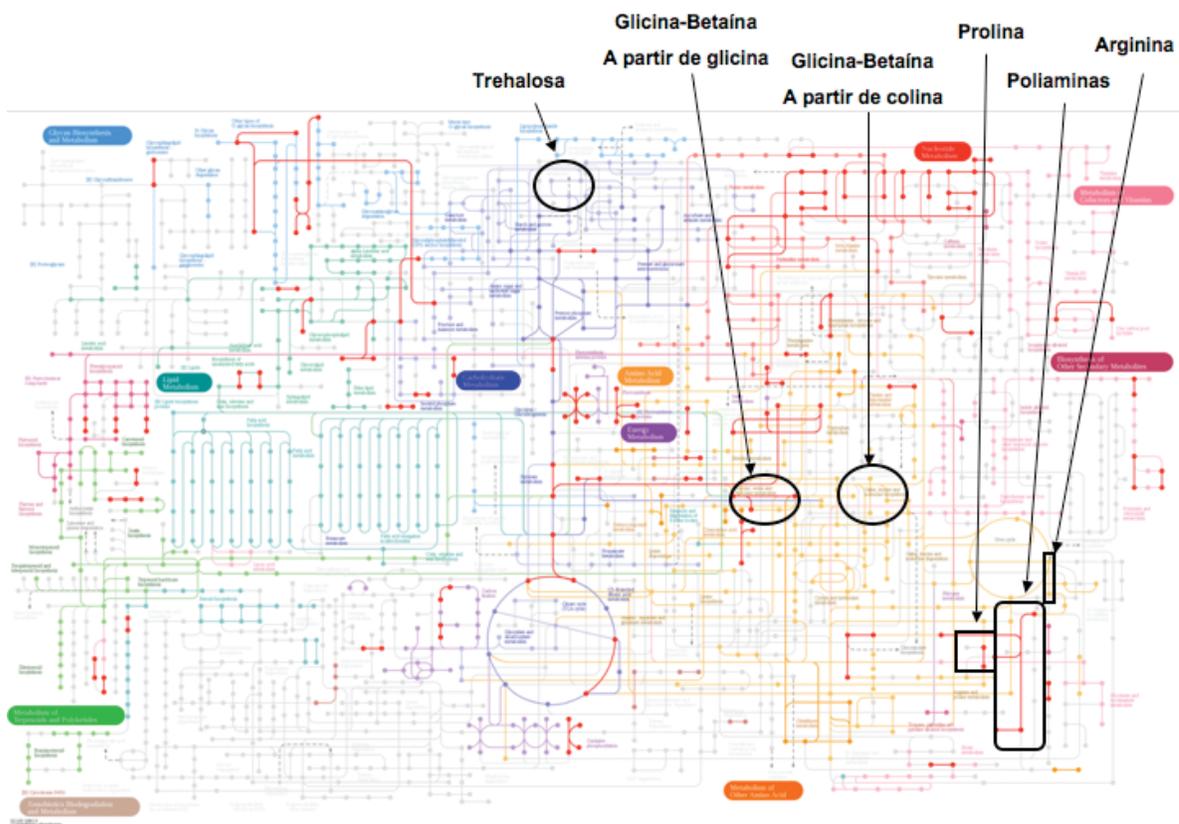


Figura 5. Rutas metabólicas (KEGG) donde se observa un aumento en los niveles de expresión en el fenotipo P0. Los genes analizados corresponden a las rutas metabólicas del carbohidrato, trehalosa; de la amina glicina-betaína (sintetizada a partir de glicina y de colina) (AT4G13890); de los aminoácido: prolina (AT2G17720) y arginina; y de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina; (AT1G70310). Los genes que aumentan su nivel de expresión se resaltan en rojo.

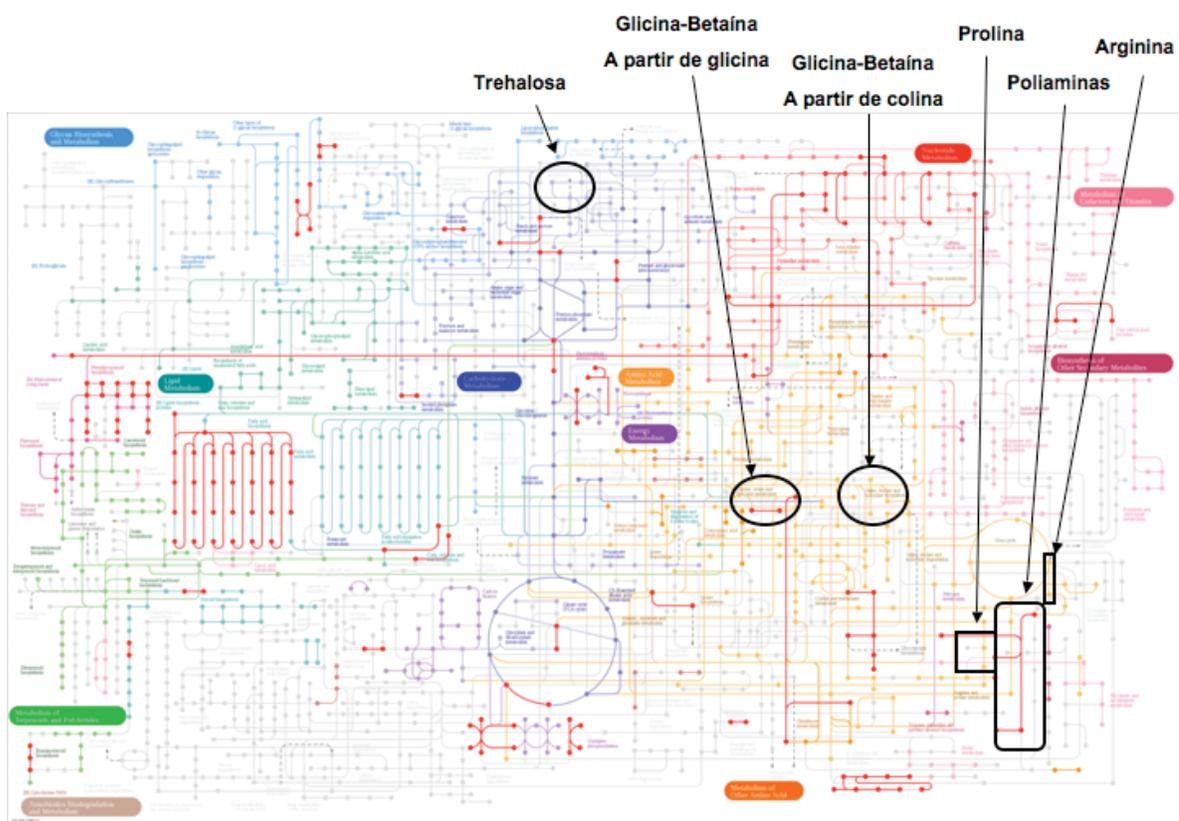


Figura 6. Rutas metabólicas (KEGG) donde se observa un aumento en los niveles de expresión en el fenotipo P9. Los genes analizados corresponden a las rutas metabólicas del carbohidrato, trehalosa; de la amina glicina-betaína (sintetizada a partir de glicina y de colina) (AT1G11860); de los aminoácido: prolina y arginina; y de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina; (AT1G23820). Los genes que aumentan su nivel de expresión se resaltan en rojo.

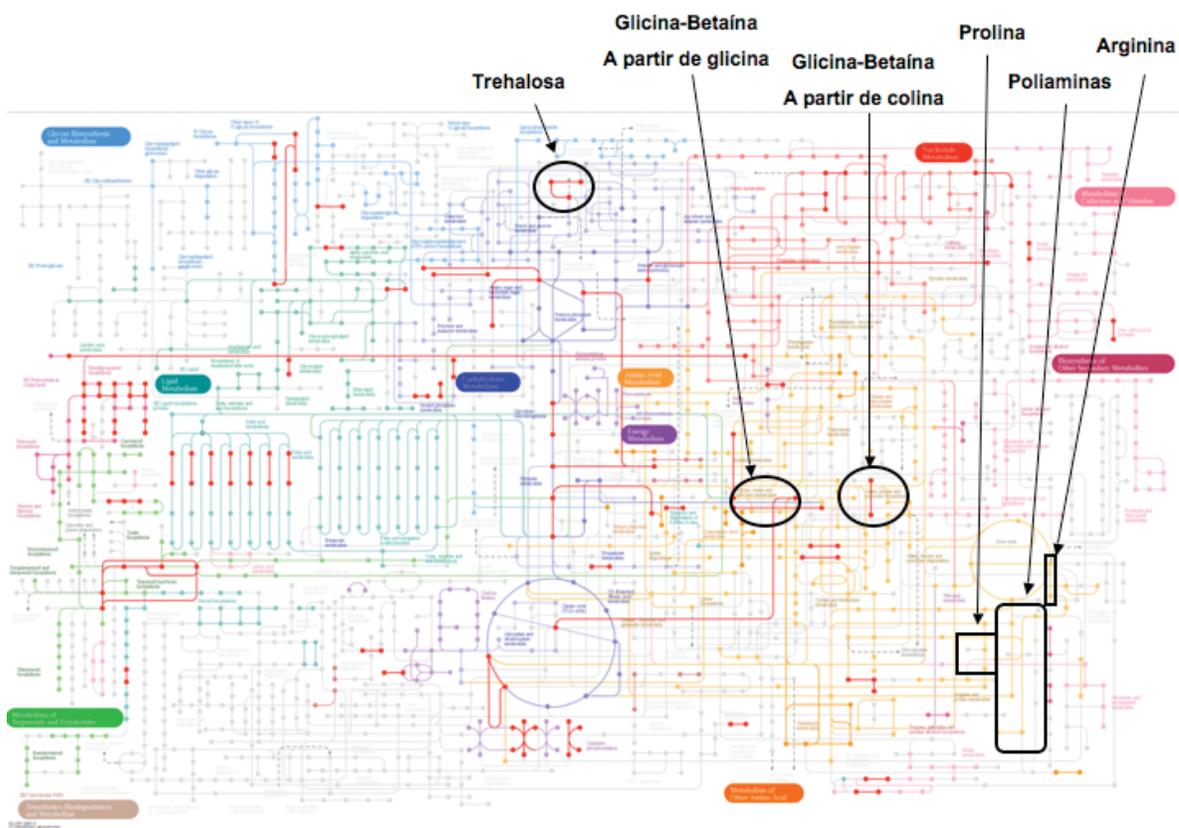


Figura 7. Rutas metabólicas (*KEGG*) donde se observa un aumento en los niveles de expresión en el fenotipo P11. Los genes analizados corresponden a las rutas metabólicas del carbohidrato, trehalosa (AT1G78580); de la amina glicina-betaína (sintetizada a partir de glicina y de colina) (AT3G48170); de los aminoácidos: prolina y arginina; y de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina. Los genes que aumentan su nivel de expresión se resaltan en rojo.

7.2.2. Genes que disminuyen su nivel de expresión.

Del mismo modo que con los genes que aumentan su nivel de expresión con los datos procesados en genArise, pudo ser posible obtener los datos correspondientes a los genes cuya expresión había disminuido con relación a la muestra control (Zscore menor de -1.5), con estos datos se obtuvo el diagrama de Venn (**Figura 8**) donde se muestra el número de genes que disminuyen su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrio, así como su relación con los genes expresados diferencialmente en los otros fenotipos; también se indica el porcentaje con relación al total de genes impresos en el chip.

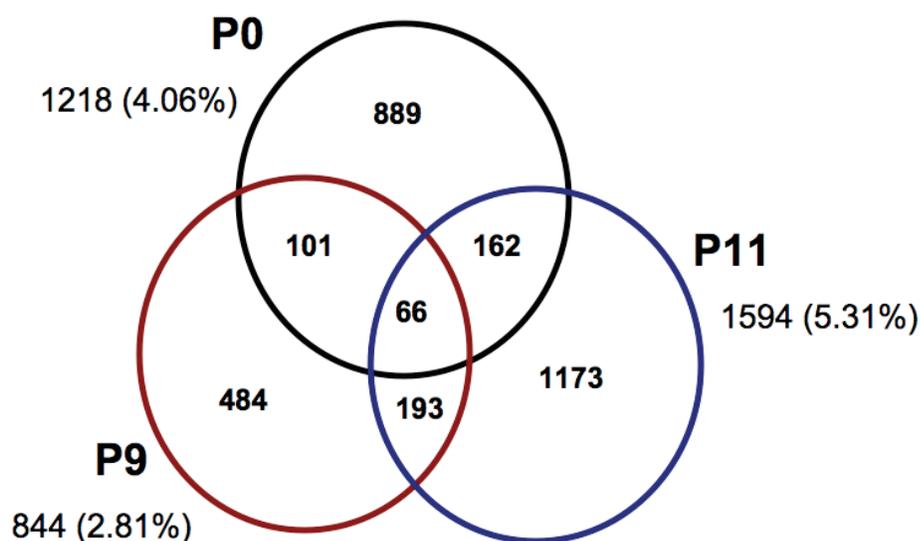


Figura 8. Diagrama de Venn del número de genes que disminuyen su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrio, así como su relación entre ellos.

Los datos de cada microarreglo (Zscore mayor de 1.5) fueron luego analizados con KEGG con la finalidad de obtener aquellas rutas metabólicas que se encontraban participando, así como el número de genes que disminuyen su nivel de expresión en cada una de ellas (**Tabla IX**).

Tabla IX. Rutas metabólicas donde se observan genes que disminuyen su nivel de expresión en cada fenotipo de vidrillo.

RUTAS METABÓLICAS	Número de genes que disminuyen su nivel de expresión		
	P0	P9	P11
Vías metabólicas	62	28	68
Biosíntesis de metabolitos secundarios	42	16	36
Spliceosoma	14	3	6
Metabolismo del almidón y sacarosa	10	2	10
Ribosoma	9	3	9
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	8	3	11
Biosíntesis de fenilpropanoides	8	2	6
Transporte de ARN	7	4	4
Metabolismo de amino-azúcares y nucleótidos-azúcar	6	-	6
Glucólisis y gluconeogénesis	6	1	6
Interacción planta-patógeno	5	4	10
Metabolismo de piruvato	5	3	1
Transducción de señales de hormonas de plantas	5	7	15
Metabolismo de purina	5	3	6
Biosíntesis de ácidos grasos	4	1	1
Interacciones SNARE en el transporte vesicular	4	1	3
Metabolismo de galactosa	4	1	3
Endocitosis	4	1	3
Proteólisis mediada por ubiquitina	4	2	10
Sistema de señalización fosfatidilinositol	4	1	1
Metabolismo de pirimidinas	4	4	3
Interconversiones de pentosas y glucoronato	4	1	3
Metabolismo del inositol fosfato	4	1	1
Metabolismo de fenilalanina	4	3	3
Ruta de ARNm surveillance	4	5	5
Biosíntesis de terpenoides backbone	3	-	1
Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano	3	1	2
Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	3	1	2
Degradación de lisina	3	1	2
Peroxisoma	3	-	9
Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	3	1	2
Fotosíntesis	3	4	-
Ruta de la pentosa fosfato	3	-	2
Metabolismo de butanoato	3	-	1
Metabolismo de triptófano	3	1	2
Proteosoma	3	1	3
Biogénesis de ribosomas en eucariotas	3	2	8
Biosíntesis de zeatina	3	-	1

Tabla IX. Continuación...

Exportación de proteínas	3	-	3
Metabolismo de fructosa y manosa	3	-	3
Ciclo del citrato (ciclo de Krebs)	2	1	1
Alargamiento de ácidos grasos	2	1	2
Metabolismo de los ácidos cianoaminos	2	-	3
Fosforilación oxidativa	2	1	3
Factores de transcripción basales	2	2	1
Fijación de carbono en los organismos fotosintéticos	2	2	2
Ritmo circadiano en plantas	2	2	3
Biosíntesis de aminoacil-ARNt	2	-	2
Fagosoma	2	1	3
ARN polimerasa	2	1	1
Metabolismo de ácidos grasos	2	-	4
Degradación de ARN	2	2	8
Metabolismo de propanoatos	2	1	1
Reparación por escisión de bases	1	2	1
Biosíntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI)-anchor	1	-	1
Biosíntesis de flavonoides	1	-	-
Metabolismo del nitrógeno	1	-	2
Metabolismo de porfirina y clorofila	1	2	3
Degradación de valina, leucina e isoleucina	1	1	1
Metabolismo beta-alanina	1	1	3
Metabolismo del ácido linoleico	1	-	1
Metabolismo de glutatión	1	3	5
Metabolismo de glicerofosfolípidos	1	2	3
Metabolismo del azufre	1	1	-
Metabolismo de histidina	1	-	1
Biosíntesis de sesquiterpenoides y triterpenoides	1	1	-
Sistema de retransmisión del azufre	1	-	-
Metabolismo de éter-lípidos	1	-	1
Biosíntesis de lisina	1	1	-
Degradación de limoneno y pineno	1	1	3
Metabolismo del ácido 2-oxocarbolílico	1	1	2
Biosíntesis de stilbenoides, diarylheptanoides y gingerol	1	1	2
Metabolismo de taurina y de hipotaurina	1	-	2
Metabolismo de ascorbato y aldarato	1	3	1
Biosíntesis de carotenoides	1	1	1
Biosíntesis de folatos	1	-	3
Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato	1	-	5
Metabolismo de nicotinato y nicotinamida	1	-	-
Metabolismo de glicina, serina y treonina	1	1	1
Metabolismo de tirosina	1	1	3
Biosíntesis de cutina, suberina y cera	1	4	1
Síntesis y degradación de los cuerpos cetónicos	1	-	-

Tabla IX. Continuación...

Metabolismo de biotina	1	-	1
Biosíntesis de ubiquinona y otros terpenoides-quinona	1	-	1
Metabolismo de cisteína y metionina	1	1	4
Biosíntesis de glicosfingolípidos- globo series	-	1	-
Metabolismo de esfingolípidos	-	1	-
Biosíntesis de glucosinolatos	-	1	1
Reparación por escisión de nucleótidos	-	1	1
Reparación mismatch (genes)	-	1	-
Replicación de ADN	-	1	-
Metabolismo de glicerolípidos	-	1	2
Recombinación homóloga	-	1	-
Biosíntesis del alcaloide isoquinolina	-	1	1
Biosíntesis de alcaloides de tropano, piperidina y piridina	-	1	2
Metabolismo de arginina y prolina	-	-	9
Metabolismo de riboflavinas	-	-	3
Biosíntesis de N-glicanos	-	-	3
Metabolismo del ácido alfa-linolénico	-	-	2
Metabolismo del ácido araquidónico	-	-	2
Fotosíntesis – proteínas de antena	-	-	1
Transportadores ABC	-	-	1

Con los datos de los genes que disminuyen su nivel de expresión en cada fenotipo se obtuvieron las **Figuras 9, 10 y 11**; las cuales corresponden a una descripción visual de la **Tabla IX**, de todas aquellas rutas metabólicas donde se puede ver una disminución en la expresión de genes.

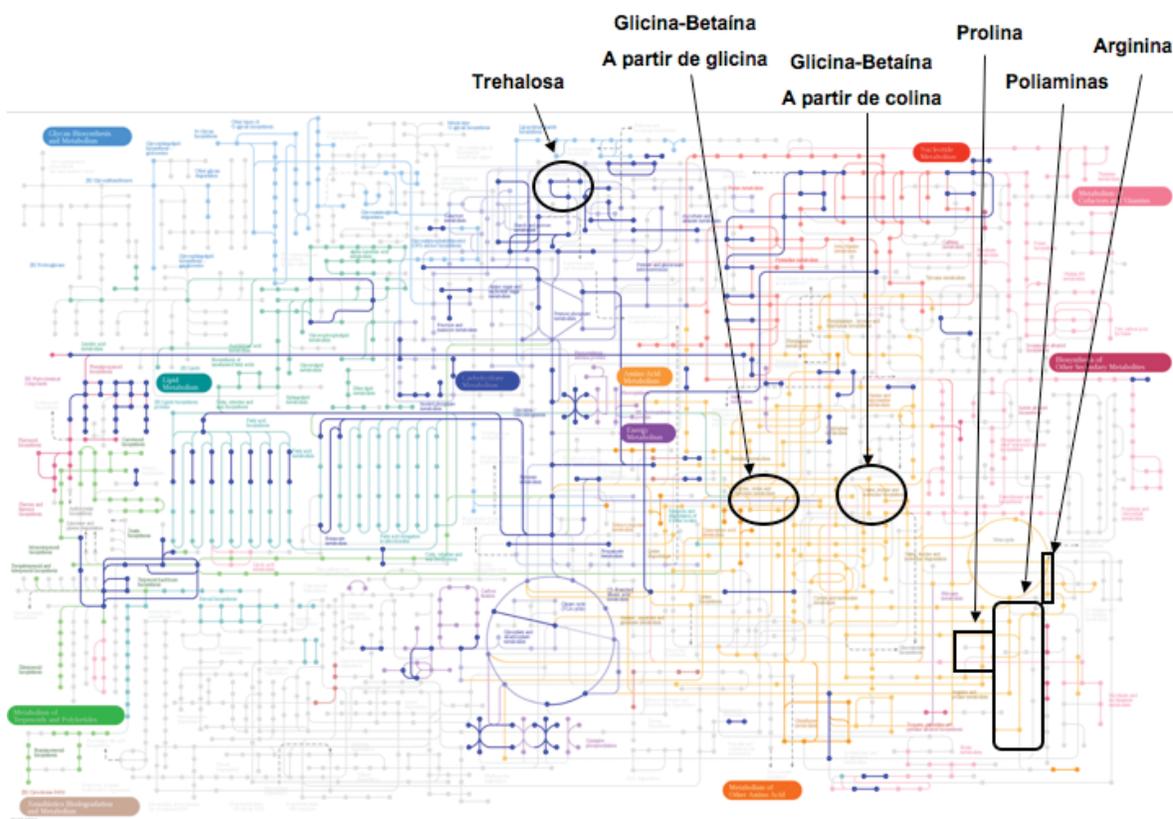


Figura 9. Rutas metabólicas (KEGG) donde se observa una disminución en los niveles de expresión en el fenotipo P0. Los genes analizados corresponden a las rutas metabólicas del carbohidrato, trehalosa (AT1G06410); de la amina glicina-betaina (sintetizada a partir de glicina y de colina); de los aminoácidos: prolina y arginina; y de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina. Los genes que disminuyen su nivel de expresión se resaltan en azul.

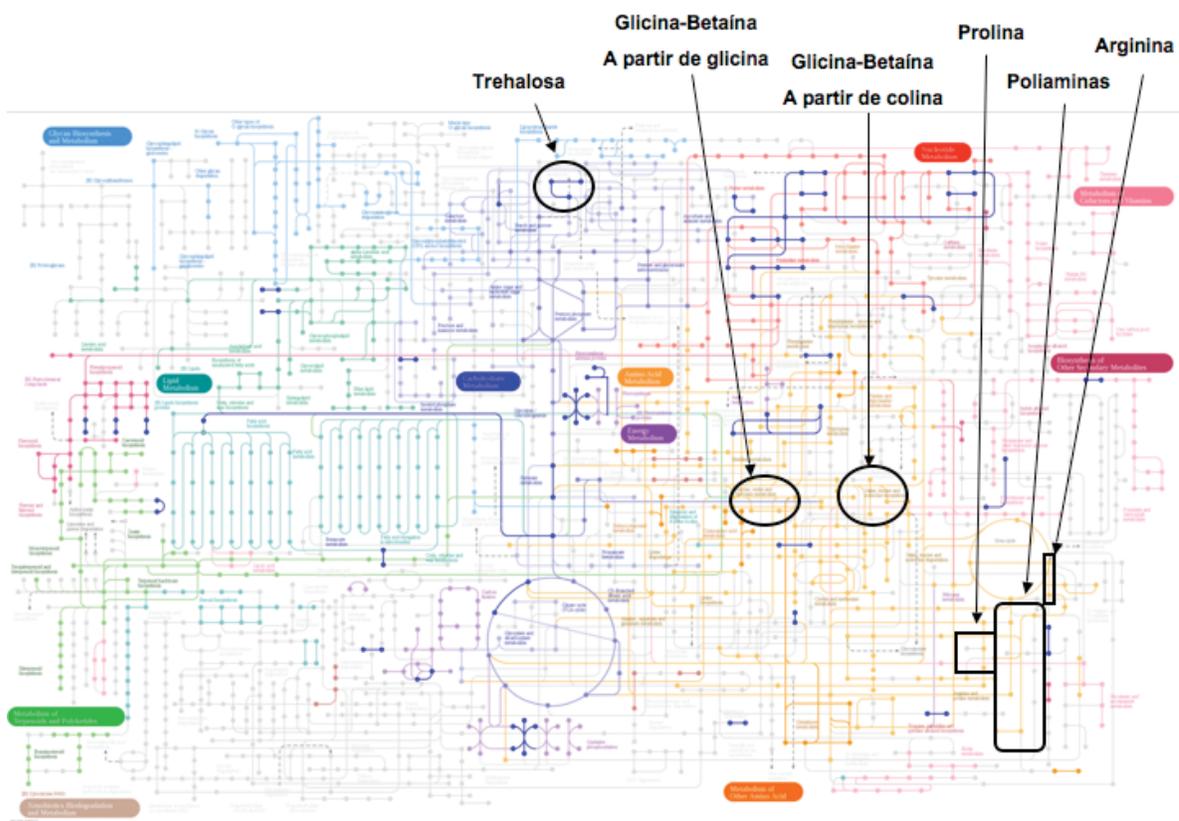


Figura 10. Rutas metabólicas (KEGG) donde se observa una disminución en los niveles de expresión en el fenotipo P9. Los genes analizados corresponden a las rutas metabólicas del carbohidrato, trehalosa (AT1G70290); de la amina glicina-betaina (sintetizada a partir de glicina y de colina); de los aminoácidos: prolina y arginina; y de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina. Los genes que disminuyen su nivel de expresión se resaltan en azul.

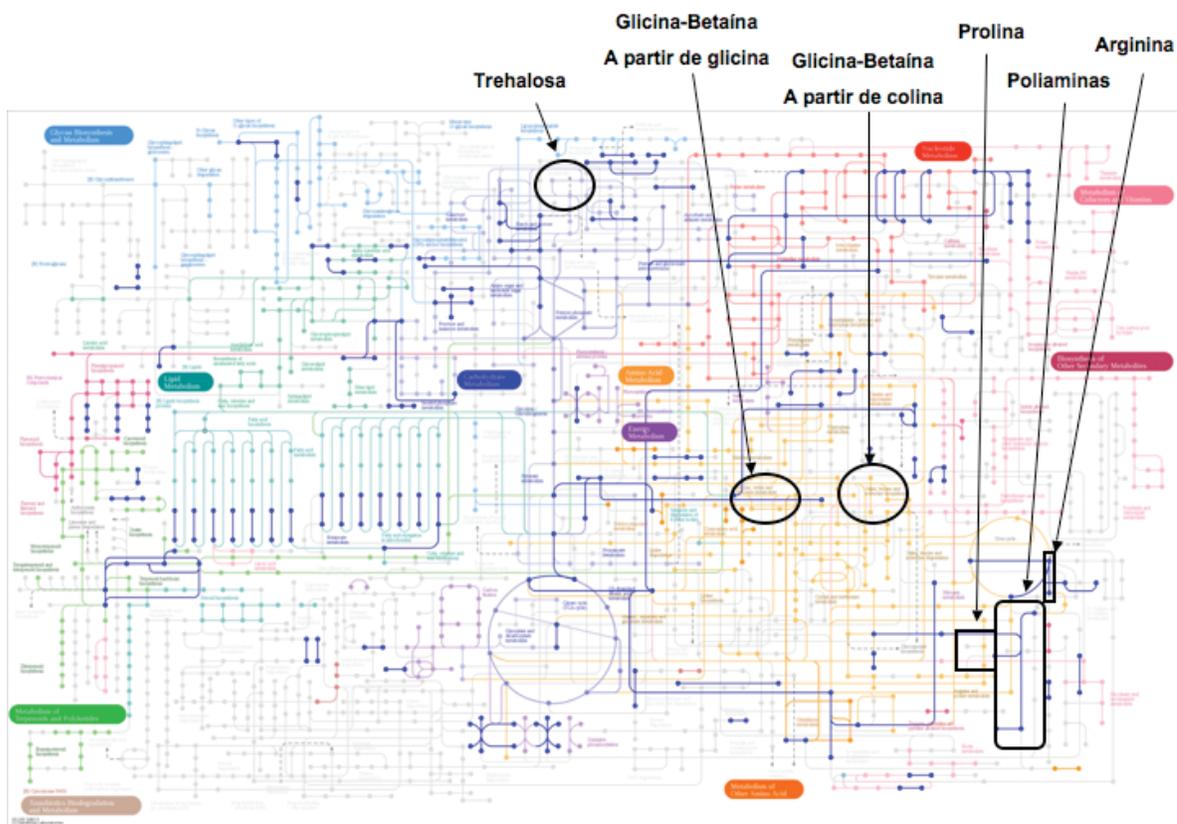


Figura 11. Rutas metabólicas (*KEGG*) donde se observa una disminución en los niveles de expresión en el fenotipo P11. Los genes analizados corresponden a las rutas metabólicas del carbohidrato, trehalosa; de la amina glicina-betaína (sintetizada a partir de glicina y de colina); de los aminoácido: prolina y arginina (AT4G34710); y de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina; (AT5G19530). Los genes que disminuyen su nivel de expresión se resaltan en azul.

7.2.3. Anotación funcional (DAVID).

Se efectuó un análisis con DAVID con la finalidad de identificar, de todos los genes con Zscore mayor a 1.5 o menor a -1.5, a aquellos genes que participan en procesos de respuesta a estrés osmótico, salino, oxidativo y transporte de iones. En la **Figura 12** se muestra el número de genes que están aumentando o disminuyendo su nivel de expresión dentro de cada proceso en cada fenotipo evaluado.

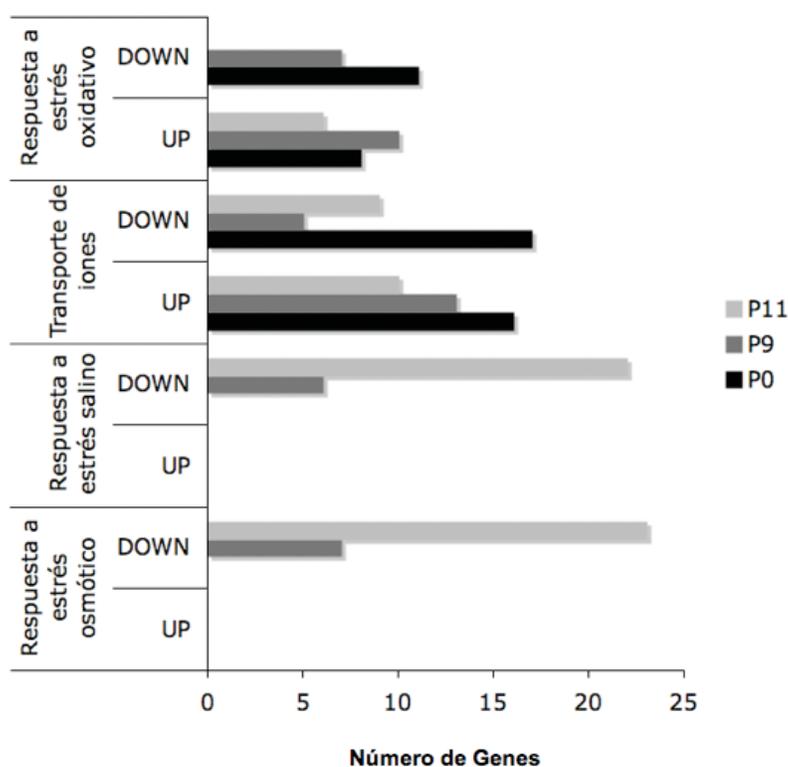


Figura 12. Anotación funcional de los genes que aumentan y disminuyen su nivel de expresión de acuerdo a procesos en respuesta a estrés osmótico, salino, oxidativo y transporte de iones.

7.3. Análisis de expresión de los genes *McNhx3* y *McNhaD* por qPCR.

Se determinaron los niveles de expresión de los genes *McNhx3* y *McNhaD* en cada fenotipo, mediante qPCR. El análisis mostró que los fenotipos P0 y P9 aumentan el nivel de expresión de ambos genes (*McNhx3* y *McNhaD*), con relación al gen endógeno Poliubiquitina de vidrio; mientras que el fenotipo P11 se mostró incapaz de aumentar el nivel de expresión de los dos genes analizados con respecto al gen de Poliubiquitina. Lo anterior se observa en la **Figura 13**, donde los valores que sobrepasan la línea (situada en el valor de expresión relativa) indican genes que inducen su expresión por efecto del estrés. Las barras de error representan la desviación estándar \pm DE ($n=5$). Las letras arriba de cada barra indican las diferencias significativas con un valor de significancia de $p<0.05$.

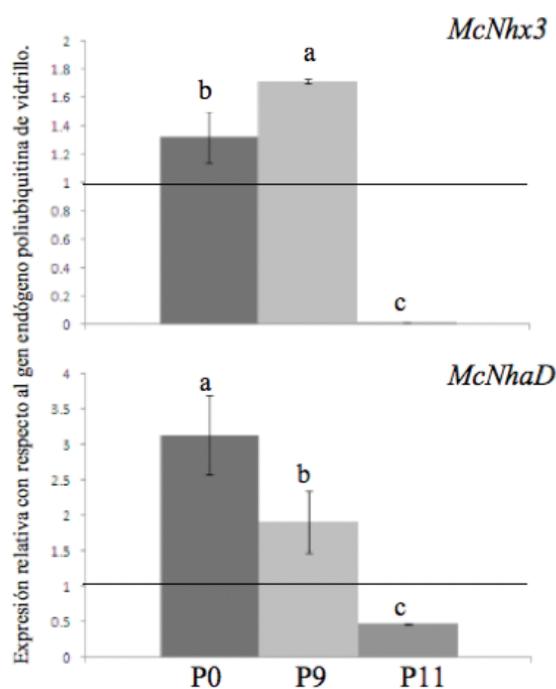


Figura 13. Análisis de expresión de los genes *McNhx3* y *McNhaD* evaluados mediante qPCR. Cuantificados a partir de muestras de hojas de las plantas de vidrio de tres fenotipos con 7 semanas de edad y con exposición a 500mM de NaCl. Los niveles de expresión relativa fueron calculados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y normalizados con el gen de poliubiquitina. Los valores que sobrepasan la línea de 1, indican genes que inducen su expresión por efecto del estrés. Los barras representan la desviación estándar \pm DE ($n=5$). Las letras de arriba de cada barra indican las diferencias significativas con un valor de significancia de $p<0.05$.

8. DISCUSIÓN.

8.1. Microarreglos heterólogos de *Arabidopsis thaliana*.

Los microarreglos heterólogos de *Arabidopsis thaliana*, fueron capaces de identificar entre un 4.61% - 6.66% (1383-1999 genes) de genes que aumentaban su nivel de expresión en los tres fenotipos; mientras que el 2.81% - 5.31% (844-1594 genes) de genes se encontraban disminuyendo su nivel de expresión por efecto del estrés ocasionado por NaCl. De las distintas rutas metabólicas en donde se observan diferencias ocasionadas por el estrés, en relación a la ruta metabólica del metabolismo del almidón y la sacarosa, el fenotipo P11 de vidrillo es el único que aumenta el nivel de expresión de un gen relacionado con la síntesis del carbohidrato trehalosa: el gen con número de acceso en TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>), AT1G78580, corresponde al gen de la trehalosa-6-fosfato sintasa (EC 2.4.1.15). Mientras que los genes que aumentan su nivel de expresión en los fenotipos P0 y P9 en esta misma ruta metabólica, con acceso en TAIR: AT5G15470 y AT4G39210 (correspondientes a los fenotipos P0 y al fenotipo P9 respectivamente) son genes que no se encuentran relacionados con la síntesis de trehalosa en la planta. En cuanto a los genes que disminuyen su nivel de expresión dentro de la ruta metabólica del metabolismo del almidón y la sacarosa tenemos que tanto el fenotipo P0 como el fenotipo P9 disminuyen la expresión de los genes AT1G06410 (en el fenotipo P0) y AT1G70290 (en el fenotipo P9); ambos genes codifican enzimas putativas de la trehalosa-6-fosfato sintasa. El fenotipo P11 no disminuye la expresión de ningún gen relacionado con la síntesis de trehalosa.

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-[1,1]- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor, compuesto por dos glucosas unidas mediante enlaces tipo α , α -1. Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Elbein, 1974). Ésta azúcar funciona tanto en protección contra estrés como de almacenamiento de carbohidratos (Goddijn y van Dun, 1999). En concentraciones elevadas ésta azúcar puede actuar como un osmolito y un estabilizador de proteínas y membranas (Paul *et al*, 2008). La biosíntesis de la trehalosa ha sido mejor estudiada en *Escherichia coli* y en *Saccharomyces cerevisiae*, mediante la

expresión heteróloga de genes involucrados en la ruta metabólica de la trehalosa (Iordachescu e Imai, 2008); dicho proceso involucra dos pasos, los cuales son catalizados primeramente por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y luego por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP). Trehalosa-6-fosfato es formado a partir de glucosa-6-fosfato y de uridina-5-difosfoglucosa por TPS para luego ser desfosforilado por TPP para finalmente obtener trehalosa (Paul *et al.*, 2008).

La expresión transgénica de genes de la biosíntesis de trehalosa mostró que el metabolismo incrementado de trehalosa es capaz de regular de manera positiva la tolerancia a estrés abiótico. Los estudios heterólogos en *E. coli* y *S. cerevisiae*, mostraron que el aumento de la expresión de genes de TPS y TPP incrementan la tolerancia ante estrés por sequía, por salinidad, y bajas temperaturas (Iordachescu e Imai, 2008). A su vez la sobre-expresión de diferentes isoformas de trehalosa-6-fosfato sintasa del arroz confieren un incremento en la tolerancia a estrés salino, sequía y/o a bajas temperaturas (Li *et al.*, 2011). Algunos estudios mostraron incremento en la tolerancia a estrés salino, estrés por bajas temperaturas y a estrés por sequía al sobre-expresar genes del metabolismo de trehalosa aún cuando no se observaron incrementos en el contenido de trehalosa (Panikulangara *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2008). Un estudio muestra que al transformar plantas de alfalfa con un gen quimérico de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) que codifica para la TPS y la región carboxi-terminal de TPP, las plantas transgénicas exhiben tolerancia ante diversos tipos de estrés abiótico (sequía, temperaturas altas y bajas y a salinidad), al usarse el promotor constitutivo 35S las plantas sufrían de alteraciones morfológicas (enanismo moderado), mientras que al utilizar un promotor inducible por estrés (RD29A), las plantas transgénicas de alfalfa eran capaces de acumular cantidades de biomasa significativas además de tolerar ante el estrés ocasionado (Suárez *et al.*, 2009). Todos estos estudios muestran evidencia de que el incremento del metabolismo de la trehalosa (aunque el rol que juega la trehalosa 6 fosfato y la trehalosa, permanecen aun sin elucidarse por completo) puede regular de manera positiva la tolerancia durante distintos tipos de estrés abióticos, entre ellos el estrés por salinidad.

Las aminas como la glicina-betaína (GB) también han sido estudiadas en cuanto a su papel en la respuesta ante estrés abiótico en plantas. La glicina-betaína es un compuesto de amonio cuaternario que puede ser encontrado en diversas plantas, aunque, la distribución de

la misma en la planta es un poco escasa (Cromwell y Rennie, 1953). Se ha observado que las plantas que son capaces de producir GB de manera natural, al ser afectadas por algún tipo de estrés abiótico; ya sea por bajas temperaturas, sequía o calor, estimula el acumulación de GB (Rhodes y Hanson, 1993; Chen y Murata, 2011). La glicina-betaína puede ser sintetizada a partir tanto de colina como de glicina. Ensayos transgénicos con genes involucrados en la ruta metabólica de la biosíntesis de GB muestran que plantas que no acumulan GB de manera natural (como *Arabidopsis thaliana* y otros cultivos), incrementan su capacidad de tolerancia ante algún estrés abiótico. La sobreexpresión de los genes involucrados en la síntesis de GB a partir de colina, tales como colina oxidasa (EC 1.1.3.17), colina deshidrogenasa (EC 1.1.99.1) y betaína aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.8) y de síntesis de GB a partir de glicina; glicina sarcosina metiltransferasa (EC 2.1.1.156) y dimetilglicina metiltransferasa (EC 2.1.1.157) (los dos en *Aphanothece halophytica*), incrementa la tolerancia ante estrés abiótico (Hayashi *et al.*, 1997, Alia *et al.*, 1998, Sakamoto *et al.*, 1998; 2000, Holmstrom *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2004, Waditee *et al.*, 2005, Bansal *et al.*, 2011). En especies de plantas tolerantes a salinidad, la GB puede llegar a acumularse a niveles importantes y actuar como un osmolito (Rhodes y Hanson, 1993). Ha sido propuesto que la glicina-betaína actúa protegiendo el fotosistema II; estudios transgénicos donde se ha dirigido la transformación hacia cloroplastos, muestran que el efecto se incrementa en respuesta al estrés abiótico en contraste a cuando la transformación es dirigida al citoplasma (Parker *et al.*, 2007), otros roles que se han propuesto es que la GB actúa estabilizando membranas y en respuesta al daño oxidativo (Chen y Murata, 2011).

En la ruta metabólica de la glicina, serina y treonina se observa que el fenotipo P11 es capaz de aumentar los niveles de expresión de un gen que codifica para una enzima que en condiciones *in vitro* puede funcionar como una betaína aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.8), (AT3G48170). En esta ruta metabólica, el fenotipo P0 solo aumenta los niveles de expresión en un gen que codifica para una enzima involucrada en el metabolismo de la glicina (AT4G13890: glicina hidroximetiltransferasa) y el fenotipo P9 aumenta los niveles de expresión del gen con número de acceso: AT1G11860, relacionado con una enzima aminometiltransferasa, involucrada en el metabolismo de la glicina. Ninguno de los genes

que disminuyen su nivel de expresión en la ruta metabólica de la glicina, serina y treonina en cada uno de los fenotipos, se encuentra relacionado directamente con el metabolismo de la glicina-betaína; en esta ruta metabólica el fenotipo P0 disminuye los niveles de expresión de un gen que codifica para una enzima tipo semialdehído deshidrogenasa (AT1G14810), el fenotipo P9 disminuye los niveles de expresión de un gen que codifica para una amino-primaria oxidasa (AT2G42490) y el fenotipo P11 lo hace con el gen para la triptófano sintasa cadena beta (AT5G38530).

La acumulación de aminoácidos ha sido observada en varios estudios de plantas que han sido sometidas a distintos tipos de estrés abióticos (Barnett y Naylor, 1966, Handa *et al.*, 1983, Fougere *et al.*, 1991, Brosche *et al.*, 2005, Sánchez *et al.*, 2008, Lukan *et al.*, 2010). Desde 1966 (Barnett y Naylor, 1966) la capacidad de las plantas de acumular prolina ha sido correlacionada con la tolerancia al estrés (Singh *et al.*, 1972, Stewart y Lee, 1974). Se le atribuye a la prolina la capacidad de osmo-protector, de actuar ante especies reactivas de oxígeno como antioxidante, y como estabilizador de estructuras proteicas y protegiendo a la célula de daños causados por el estrés (Hare y Cress, 1997, Szabados y Savoure, 2010). Se ha visto que la prolina es acumulada en varias plantas como respuesta a estrés salino, metales pesados y sequía. La prolina es sintetizada tanto en citoplasma como en cloroplasto a partir de glutamato.

El microarreglo mostró que en la ruta metabólica de la arginina y la prolina, los fenotipos P0 y P9 son los únicos fenotipos capaces de aumentar los niveles de expresión de genes, mientras que el fenotipo P11 no reveló ningún cambio en aumento de expresión. Por otro lado en esta ruta metabólica solo para el fenotipo P11 se encontraron genes que disminuían su nivel de expresión, ni el fenotipo P0 ni el fenotipo P9 disminuyen la expresión génica en la ruta del metabolismo de arginina y prolina. Warner y colaboradores (2013) evaluaron el contenido de prolina en los tres fenotipos de vidrillo (P0, P9 y P11) sin encontrar diferencias significativas por efecto del estrés por NaCl. El contenido de prolina se determina como consecuencia del balance entre su síntesis y su catabolismo, mientras es sintetizado en el citoplasma o cloroplasto a partir de glutamato, es degradada en la mitocondria de nuevo hasta glutamato. Si bien el estrés estimula la producción de síntesis de prolina, cuando la planta se encuentra en la etapa de recuperación del estrés se induce la

degradación de la prolina (Szabados y Savoure, 2010). La pyrrolina-5-carboxilada (P5C), quien al ser reducida por la P5C reductasa produce prolina, puede ser producida (ruta alternativa) a partir de ornitina (en lugar de a partir de glutamato), mientras la ornitina es sintetizada a partir de arginina (Millar *et al.*, 2009, Krasensky y Jonak, 2012).

Los genes que se regulan de manera diferencial en la ruta de arginina y prolina en los fenotipos P0 y P9 corresponden respectivamente a la enzimas espermidina sintasa 2 (AT1G70310) y a la espermidina sintasa 1 (AT1G23820), en los dos casos, genes aumentan su nivel de expresión. En el fenotipo P11 unos de los genes que disminuye su nivel de expresión es el gen que codifica para una arginina descarboxilasa 2 (AT4G34710) y el gen correspondiente a la termoespermina sintasa ACAULIS5 (AT5G19530).

En las plantas, las poliaminas (PA) más comunes son la putrescina, espermidina y espermina; la putrescina es producida a partir de arginina por la arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19) o a partir de ornitina por acción de la enzima ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17), para luego ser convertida mediante la espermidina sintasa (EC 2.5.1.16) a espermidina, la cual finalmente es transformada en espermina, por la espermina sintasa (EC 2.1.5.22). Tanto la espermidina como la espermina son substratos para la enzima poliamina-oxidasa la cual cataliza la conversión a putrescina. Se ha descrito que las poliaminas se encuentran involucradas en la respuesta a diversos tipos de estrés abiótico al actuar como protectoras de membranas y en respuesta a estrés oxidativo, aunque a la fecha no se conoce exactamente como lo hacen (Groppa y Benavides, 2008, Hussain *et al.*, 2011). Plantas mutantes deficientes de arginina descarboxilasa 1 o 2 muestran una disminución significativa en la tolerancia a estrés abiótico (Urano *et al.*, 2004, Cuevas *et al.*, 2008). Plantas donde se sobre-expresó a la enzima espermidina sintasa fueron más tolerantes a estrés por sequía, por bajas temperaturas y a estrés salino (Kasukabe *et al.*, 2004).

El estrés salino ocasiona problemas tipo osmóticos y iónicos (Brini *et al.*, 2007 y Blumwald *et al.*, 2000), si bien no se encontraron genes que estuvieran aumentando sus niveles de expresión en cuanto a la respuesta a estrés osmótico y al estrés salino, si se encontraron genes que están disminuyendo sus niveles de expresión en los fenotipos P9 y P11, mayormente en este último, lo que sugiere que este fenotipo es el más susceptible ante

estrés salino; lo cual puede ser también concluido con los estudios fisiológicos efectuados por Warner *et al.*, (2013).

Ante estrés por sal, algunas plantas sobreexpresan enzimas antioxidantes como la glutathion peroxidasa o la glutathion s-transferasa, también la superóxido dismutasa y la glutathion reductasa. La actividad antioxidante incrementa la habilidad de tolerancia de la planta e inhibe la peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados, lo cual es crucial pues con ello se mantiene la integridad y estabilidad de las membranas celulares (Jiang *et al.*, 2006). En respuesta ante estrés oxidativo, el fenotipo P9 muestra un número mayor de genes que aumentan su nivel de expresión en el peroxisoma, sin disminuir alguno. En este fenotipo se aumenta el nivel de expresión de la enzima superóxido dismutasa (Cu-Zn) (AT5G18100), de la catalasa 3 (AT5G36940) y la peroxidasa 47 (AT4G33420), aunque funcionalmente disminuyen otras enzimas con actividad antioxidante. En el fenotipo P11 se disminuye el mayor número de genes en el peroxisoma, pero en cuanto a la anotación funcional en respuesta a estrés oxidativo no se encontraron genes disminuidos, ya que los genes disminuidos en el peroxisoma no tienen importancia a nivel funcional y se identificaron en cuanto a anotación funcional a la peroxidasa 69 (AT5G64100) y a la superóxido dismutasa Mn (AT3G10920) como genes que aumentan su nivel de expresión. El fenotipo P0 aumenta tres peroxidases (AT2G18140, AT3G28200, AT4G37530) y otras enzimas con actividad en respuesta a estrés oxidativo; pero además disminuye los niveles de expresión de otras peroxidases (AT2G24800, AT4G16270, AT5G24070) y otros genes más relacionados a estrés oxidativo. En el peroxisoma el número de genes que aumentan o disminuyen su nivel de expresión en el fenotipo P0 son 2 y 3 respectivamente, pero ninguna enzima antioxidante identificada con algún cambio en su nivel de expresión.

Finalmente la exposición a niveles excesivos de sodio puede llegar a inhibir por completo la actividad de varias enzimas (Yu *et al.*, 2012). En respuesta a estrés por salinidad se observó que en cuanto a transporte de iones solo los fenotipos P0 y P9 aumentan los niveles de expresión de proteínas antiporter Na^+/H^+ . En el fenotipo P0 encontramos al NHX8 (cuya mayor similitud en relación a vidrio es con la secuencia del gen *SOS1*) y en el fenotipo P9 al NHX6 (cuya mayor similitud en relación a vidrio es con la secuencia del gen *Nhx2*)

umentando sus niveles de expresión, en el fenotipo P11 no se encontró el aumento de expresión de ningún antiporter NHXs.

Se han propuesto varias vías en relación a la tolerancia del estrés salino, la exclusión y compartimentalización del ion sodio, la actividad antioxidante y la acumulación o síntesis de ciertos metabolitos; con los resultados obtenidos podemos observar diferencias en los tres fenotipos en su respuesta al estrés salino.

8.2. Análisis de expresión de los genes *McNhx3* y *McNhaD* por qPCR.

Consentino y colaboradores reportan en el año 2010 su estudio de expresión de los antiporters Na^+/H^+ de vidrillo en respuesta a estrés por NaCl. En su estudio muestran como es el comportamiento de cada uno de los antiporters que hasta la fecha están reportados para la planta vidrillo (*McSOS1*, *McNHX1*, *McNHX2*, *McNHX3* y *McNhaD*); ellos encuentran que todos los genes son sobreexpresados a excepción del *McNHx2*. Warner *et al.*, en el año 2013 evaluaron la actividad de los genes *McNhx1* y *McNhx2* en los tres fenotipos disponibles de la planta de vidrillo (P0, P9 y P11). Sus resultados muestran que el fenotipo P11 es incapaz de activar los genes *McNhx1* y *McNhx2*, a diferencia de los otros dos fenotipos que si logran sobreexpresan dichos genes en respuesta al estrés por NaCl. Por lo cual se sugiere que pudiera haber una pérdida en los elementos que regulan la expresión de estos genes en el fenotipo P11 o los mismos genes no son funcionales. Por otro lado los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los genes *McNhx3* y *McNhaD* por qPCR, muestran como los fenotipos P0 y P9 son capaces de sobre-expresar ambos genes como respuesta al estrés por NaCl; no obstante el fenotipo P11 es incapaz de expresar los dos genes como respuesta al estímulo ocasionado por el NaCl. Estos resultados junto con los obtenidos por Warner y colaboradores en el 2013, sugieren que el fenotipo P11 es incapaz de almacenar al ion sodio en vacuolas (*McNHX1* y *McNHX2*), en compartimientos pre-vacuolares (*McNHX2*), en la endomembrana (*McNHX3*) y en el cloroplasto (*McNhaD*) (Consentino *et al.*, 2010), donde estos procesos de almacenaje han sido propuestos como uno de los mecanismo de tolerancia a estrés salino (Bassil *et al.*, 2011a). En *Arabidopsis thaliana* se han reportado 8 proteínas con función antiporters Na^+/H^+ , algunas de ellas son

isoformas como por ejemplo: *AtNhx5* y *AtNhx6* (cuya similitud en la secuencia corresponde al gen *McNHX2*), donde solo el silenciamiento de ambos genes muestra un efecto en la sensibilidad al estrés salino (Bassil *et al.*, 2011b). Análisis filogenéticos realizados con secuencia de aminoácidos de distintos transportadores de la familia NHXs, indican que *McNhx3* pertenece a la clase I, junto con genes de *Arabidopsis thaliana*: *AtNhx3*, *AtNhx4*, *AtNhx1* y *AtNhx2*, también se encuentra en esta clase el gen de Vidrillo *McNhx1*, y otros genes de *Suaeda japonica*, *Salicornia europaea*, entre otros. Mientras que el gen *McNhxD* comparte similitud con un grupo formado por los genes de *Arabidopsis thaliana* *AtNhD1* y *AtNhD2*, y dos genes más de la familia de *NhaD* pertenecientes a las plantas *Oryza sativa* y *Populus euphratica* (Consentino *et al.*, 2010). Esto bien sugiere que pudiera ser posible que en el fenotipo P11 existan más isoformas de proteínas antiporter NHXs aun sin caracterizar o bien que exista algún tipo de afección que impida el adecuado funcionamiento de las proteínas antiporter hasta ahora reportadas para vidrillo.

9. CONCLUSIONES.

El fenotipo P11 aumenta el nivel de expresión del gen que codifica para la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa. Mientras que los fenotipos P0 y P9 disminuyen los niveles de expresión del gen de la trehalosa-6-fosfato sintasa. Genes relacionados con la síntesis del carbohidrato: trehalosa.

El fenotipo P11 es capaz de aumentar el nivel de expresión del gen que codifica para la enzima betaína aldehído deshidrogenasa, gen involucrado en la síntesis de la amina: glicina-betaína a partir de colina. No se observaron genes relacionados directamente con la síntesis de glicina-betaína disminuyendo su nivel de expresión en este fenotipo.

Los fenotipos P0 y P9 aumentan los niveles de expresión de los genes: glicina hidroximetiltransferasa (en el fenotipo P0) y del gen que codifica para una aminometiltransferasa (en el fenotipo P9), que pueden estar involucrados en la síntesis de la amina: glicina-betaína a partir de glicina. No se observaron genes relacionados directamente con la síntesis de glicina-betaína disminuyendo su nivel de expresión en ninguno de los dos fenotipos.

Los fenotipos P0 y P9 son los únicos fenotipos donde se identificaron cambios en el aumento de los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo de arginina y prolina. Por otro lado en esta ruta metabólica, solo para el fenotipo P11 se encontraron genes que disminuían su nivel de expresión.

Solo los fenotipos P0 y P9 aumentan los niveles de expresión de la enzima espermidina sintasa 2 y 1 (respectivamente). A la vez que el fenotipo P11 disminuye el nivel de expresión de los genes que codifican para una arginina descarboxilasa 2 y el gen correspondiente a una termoespermina sintasa. Genes involucrados en la síntesis de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina.

El fenotipo P9 es el que muestra mejor respuesta ante el estrés oxidativo ocasionado como efecto de la salinidad, al aumentar el nivel de expresión de un número mayor de genes relacionados con el peroxisoma y antioxidantes, a la vez que no disminuye el nivel de expresión de otros genes.

Los fenotipos P0 y P9 son los únicos que en cuanto a lo relacionado con transportadores de iones se logro identificar genes que aumentan los niveles de expresión relacionados con transportadores antiporte Na^+/H^+ .

Los fenotipos P0 y P9 son capaces de sobre-expresar los genes *McNHx3* y *McNhaD*, sin embargo el fenotipo P11 es incapaz de expresar estos genes.

Se sugiere que el fenotipo P11 es capaz de sobrevivir y seguir acumulando biomasa en presencia de estrés salino, de manera independiente a la compartimentalización de sodio por los transportadores antiporters *McNHx1*, *McNHx2*, *McNHx3* y *McNhaD*; debido a la biosíntesis del carbohidrato; trehalosa, a la síntesis de la amina; glicina-betaína a partir de colina y quizás por su respuesta al estrés oxidativo.

10. LITERATURA CITADA.

- Alia, Hayashi H, Sakamoto A, Murata N. 1998. Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *The Plant Journal* 16, 155–161.
- Apse MP, Blumwald E. 2007. Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* 58:2247–2254.
- Bagnaresi P, Moschella A, Beretta O, Vitulli F, Ranalli P, Pierdomenico P. 2008. Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening, *BMC Genomics* 9 (176),
- Bansal KC, Goel D, Singh AK, Yadav V, Babbar SB, Murata N. 2011. Transformation of tomato with a bacterial codA gene enhances tolerance to salt and water stresses. *Journal of Plant Physiology* 168, 1286–1294.
- Barnett NM, Naylor AW. 1966. Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiology* 41, 1222–1230.
- Bassil E, Ohto MA, Esumi T, Tajima H, Zhu Z, Cagnac O, Belmonte M, Peleg Z, Yamaguchi T, Blumwald E. 2011a. The *Arabidopsis* intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *The Plant Cell* 23, 224–239.
- Bassil E, Tajima H, Liang Y-C, a Ohto M, Ushijima K, Nakano R, Esumi T, Coku A, Belmonte M, Blumwald E. 2011b. The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ Antiporters NHX1 and NHX2 Control Vacuolar pH and K⁺ Homeostasis to Regulate Growth, Flower Development, and Reproduction. *The Plant Cell* 23, 3482–3497.
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP. 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:140–151.
- Bohnert HJ, Cushman JC. 2001. The ice plant Cometh: Lessons in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*. 19:334-346
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA, Masmoudi K. 2007 Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 58, 301–308.
- Brosche M, Vinocur B, Alatalo ER, Lamminmäki A, Teichmann T, Ottow EA, Djilianov D, Afif D, Bogeat-Triboulot MB, Altman A, Polle A, Dreyer E, Rudd S, Paulin L, Auvinen P, Kangasjärvi J. 2005. Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biology* 6, R101.

- Chen, JM. 2006. Research advance in the tolerance of plant to salt, Jiangsu, *Journal Of Agricultural Science* 34, 248–254.
- Chen TH, Murata N. 2011. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment* 34, 1–20.
- Cosentino C, Fischer-Schliebs E, Bertl A, Thiel G, Homann U. 2010. Na⁺/H⁺ antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves and roots of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytologist* 186, 669–680.
- Cromwell BT, Rennie SD. 1953. The biosynthesis and metabolism of betaines in plants. 1. The estimation and distribution of glycinebetaine (betaine) in *Beta vulgaris* L. and other plants. *Biochemical Journal* 55, 189–192.
- Cuartero J, Bolarin MC, Asins MJ, Moreno V. 2006. Increasing salt tolerance in tomato, *Journal of Experimental Botany*, 57, 1045–1058.
- Cuevas JC, Lopez-Cobollo R, Alcazar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A. 2008. Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology* 148, 1094–1105.
- Cushman JC, Tillett RL, Wood JA, Branco JM, Schlauch KA. 2008. Large-scale mRNA expression profiling in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, performing C3 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism (CAM). *Journal of Experimental Botany* 59, 1875–1894
- Davey M, Graham N, Vanholme B, Swennen R, May S et al. 2009. Heterologous oligonucleotide microarrays for transcriptomics in a non-model species; a proof-of-concept study of drought stress in *Musa*. *BMC Genomics* 10 (436).
- Elbein AD. 1974. The metabolism of α,α -trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 30, 227–256.
- FAO, 2008. Agricultura Mundial: Hacia 2015/2030. Informe Resumido. Roma. 97 p.
- Fenghua L, Yan G, Dongmei G, Gang X, Zhenghua C, Shouyi C. 1997. Salt tolerance of transgenic plants with BADH cDNA, *Acta Genetica Sinica* 27, 151–155.
- Flowers TJ, Colmer TD. 2008, Salinity tolerance in halophytes. *New Phytology* 179, 945–963
- Fougere F, Le Rudulier D, Streeter JG. 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 96, 1228–1236.

- Ge LF, Chao DY, Shi M, Zhu MZ, Gao JP, Lin HX. 2008. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta* 228, 191–201.
- Goddijn OJM, van Dun K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science* 4, 315–319.
- Groppa MD, Benavides MP. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34, 35–45.
- Handa S, Bressan RA, Handa AK, Carpita NC, Hasegawa PM. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water-stress. *Plant Physiology* 73, 834–843.
- Hare PD, Cress WA. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21, 79–102.
- Hayashi H, Alia, Mustardy L, Deshnum P, Ida M, Murata N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *The Plant Journal* 12, 133–142.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends in Plant Science* 6, 431–443.
- Holmstrom KO, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B. 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* 51, 177–185.
- Horvath DP, Schaffer R, West M, Wisman E. 2003. *Arabidopsis* microarrays identify conserved and differentially expressed genes involved in shoot growth and development from distantly related plant species. *The Plant Journal* 34, 125–134.
- Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH. 2011. Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances* 29, 300–311.
- Iordachescu M, Imai R. 2008. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 1223–1229.
- James, RA, Munns R, von Caemmere S, Trejo C, Miller C, Condon TA.. 2006. Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ in salt affected barley and durum wheat, *Plant Cell & Environment* 29, 2185–2197.

- Jiang Y, Lu YJ, Zhu SJ. 2006. Advance in studies of the mechanism of salt tolerance and controlling of salt damage in upland cotton *Cotton Science* 18, 248–254.
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S. 2004. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45, 712–722.
- Krasensky J, Jonak C. 2012. Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* 63, 1593-1608.
- Kronzucker HJ, Britto DT. 2011. Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist* 189, 54–81.
- Kore-eda S, Cushman MA, Akselrod I, Bufford D, Fredrickson M, Clark E, Cushman J. 2004. Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Gene* 341, 83–92
- Li HW, Zang BS, Deng XW, Wang XP. 2011. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234, 1007–1018.
- Lugan R, Niogret MF, Leport L, Guegan JP, Larher FR, Savoure A, Kopka J, Bouchereau A. 2010. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal* 64, 215–229.
- Mahajan S, Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139–158.
- McCord JM. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine* 108, 652–659.
- Miller G, Honig A, Stein H, Suzuki N, Mittler R, Zilberstein A. 2009. Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26482–26492.
- Moore S, Payton P, Wright M, Tanksley S, Giovannoni J. 2005. Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany* 56, 2885–2895.
- Muller IS, Gilliam M, Jha D, Mayo GM. 2009. Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2163–2178.

- Niewradomska E, Bilger W, Gruca M, Mulisch M, Miszalski y Krupinska K. 2001. CAM-related changes in chloroplastic metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum* L., *Planta* 233, 275-285.
- Pan R, Wang XJ, Li NH. 2008. *Plant Physiology*, Beijing: Higher Education Press.
- Panikulangara TJ, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Stransky H, Schoffl F. 2004. Galactinol synthase1. A novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136, 3148–3158.
- Park EJ, Jeknic Z, Sakamoto A, DeNoma J, Yuwansiri R, Murata N, Chen TH. 2004. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *The Plant Journal* 40, 474–487.
- Park EJ, Jeknic Z, Chen TH, Murata N. 2007. The codA transgene for glycinebetaine synthesis increases the size of flowers and fruits in tomato. *Plant Biotechnology Journal* 5, 422–430.
- Paul MJ, Primavesi LF, Jhurrea D, Zhang YH. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology* 59, 417–441.
- Queiros F, Fontes N, Silva P, Almeida D, Maeshima M, Geros H, Fidalgo F. 2009. Activity of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *Journal of Experimental Botany* 60, 1363–1374.
- Rhodes D, Hanson AD. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 357–384.
- Ruan Y, Gilmore J, Conner T. 1998. Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *The plant Journal* 15, 821-833.
- Sakamoto A, Alia, Murata N. 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology* 38, 1011–1019.
- Sakamoto A, Valverde R, Alia, Chen TH, Murata N. 2000. Transformation of *Arabidopsis* with the codA gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. *The Plant Journal* 22, 449–453.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J. 2002 A Proteomic approach to analyzing drought and salt responsiveness in rice. *Field Crops Research*. 76, 199–219.

- Sánchez DH, Siahpoosh MR, Roessner U, Udvardi M, Kopka J. 2008. Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. *Physiologia Plantarum* 132, 209–219.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozak Y, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* 13, 61–72.
- Shabala S, Cuin TA. 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* 133, 651–669.
- Singh TN, Aspinall D, Paleg LG. 1972. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: potential metabolic measure of drought resistance. *Nature New Biology* 236, 188–190.
- Stewart GR, Lee JA. 1974. Role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 120, 279–289.
- Suárez R, Calderón C, Iturriaga G. 2009. Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalosa. *Crop Science* 49, 1791–1799.
- Szabados L, Savoure A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 89–97.
- Türkana I, Demiral T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environmental and Experimental Botany* 67, 2–9.
- Turktas M, Inal B, Okay S, Erkilic EG, Dundar E, Hernández P, Dorado G, Unver T. 2013. Nutrition metabolism plays an important role in the alternate bearing of the olive tree (*Olea europaea* L.), PLoS ONE 8: e59876. doi:10.1371/journal.pone.0059876
- Tuteja N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology* 428, 419–438.
- Urano K, Yoshida Y, Nanjo T, Ito T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2004. *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 369–375.
- Waditee R, Bhuiyan MN, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T, Suzuki S, Takano J, Jagendorf AT, Takabe T. 2005. Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102, 1318–1323.

- Wang W, Pan ZJ, Pan QB. 2009. Studying progress in salt_tolerant characters of crops, *Acta Agriculturae Jiangxi* 21, 30–33.
- Warner N, Vazquez R, Angulo C, Gómez G. 2013. Caracterización fisiológica de tres fenotipos de *Mesembryanthemum crystallinum* y análisis de la expresión de los genes antiporte *McNhx1* y *McNhx2* durante el estrés salino. CIBNOR, La Paz, B.C.S., México 1-69pp.
- Weber M, Harada E, Vess C, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S. 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant Journal* 37, 269–281.
- Wu GQ, Xi JJ, Wang Q, Bao AK, Ma Q, Zhang JL, Wang SM. 2011. The ZxNHX gene encoding tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought. *Journal of Plant Physiology* 168, 758–767.
- Yu S, Wang W, Wang B. 2012. Recent progress of salinity tolerance research in plants. *Russian journal of Genetics* 48, 497–505.
- Zhu J, Fu X, Koo YD, Zhu JK, Jenney FE Jr, Adams MW, Zhu Y, Shi H, Yun DJ, Hasegawa PM, Bressan RA. 2007. An enhancer mutant of *Arabidopsis* salt overly sensitive 3 mediates both ion homeostasis and the oxidative stress response. *Molecular and Cell Biology* 27, 5214–5224.
- Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance, *Trends in Plant Science* 2, 66–71.