INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGIA APLICADA

Caracterización fenotípica de la mutante de Arabidopsis *zat18-1* en respuesta a estrés salino.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA

DENISSE TÉLLEZ MAZZOCCO.

Directores de tesis:
Dr. Miguel Angel Villalobos López
Dr. Juan Manuel Estévez Palmas

Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, 2011

SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 11 horas del día 16 del mes de Noviembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-TLAXCALA para examinar la tesis titulada:

"Caracterización fenotípica de la mutante de Arabidopsis *zat18-1* en respuesta a estrés salino."

Presentada por el alumno:

Téllez	Mazzocco	Denisse
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: B 0 8 1 1 1 3

aspirante de: Maestría en Biotecnología Aplicada

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Miguel Angel Villalobos López

Dr. Juan Manuel Estévez Palmas

Dra. Analilia Arroyo Becerra

Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala el día 6 del mes de Diciembre del año 2010, el (la) que suscribe Denisse Téllez Mazzocco alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B081113, adscrito al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Miguel Angel Villalobos López y cede los derechos del trabajo intitulado Caracterización fenotípica de la mutante de Arabidopsis *zat18-1* en respuesta a estrés salino, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ciba_mangel_ipn@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Denisse Téllez Mazzocco

Nombre y firma

ABSTRACT

Today our planet is undergoing major adverse environmental changes that cause loss of millions of crops and harvests. Environmental stresses such as salinity stress is the first to affect agriculture. The salinity is characterized by a high concentration of soluble salts such as sodium chloride, potassium sulphate, calcium, carbonates and nitrates, while sodic soils have a high concentration of Na. The origin of salinity may be due to natural causes and human activity. Physiological and metabolic adaptation to salt stress involves the interaction of several components that coordinate the expression of several genes that enable the plant to respond and adapt within these components are transcription factors, proteins that regulate the expression of multiple genes that are induced by such stress. The aim of this study was to characterize phenotypically a loss of function mutant in a transcription factor involved in the response to salt and osmotic stress in the model plant *Arabidopsis thaliana*. This mutant was generated by insertion of T-DNA. The T-DNA in this mutant falls in the promoter of a transcription factor that corresponds to a Zinc-Fingers (Zat18), the T-DNA is found with respect to the ATG 277pb above. Because germination and root length are parameters used to determine the effects of salt stress, in this work were done Germination kinetics with various concentrations of NaCl, KCl and sorbitol, we also studied the length of the root using the same stressors, showing no significant differences in the percentages of germination and root length analysis. While in the process postgerminativo Salk_027144 line 4 has a greater tolerance in concentrations of 100, 125 and 150 mM NaCl and 125 mM KCl compared with the wild plant Col 0. To evaluate other parameters that are affected with the salt stress (photosynthesis, biomass) were sown seeds of both lines metromix substrate, to reach the rosette stage began to be irrigated with various concentrations of NaCl (0, 100, 150 and 200 and 250 Mm). From a concentration of 100 mM the wild

plant begins to be affected and phenotypically photosynthesis in leaves compared to the mutant plant, where the latter begins to be affected in a concentration of 200 and 250 Mm NaCl. Based on the role of TFs (repressor and activators of transcription) and the phenotype of the mutant in the presence of Na^{+}, suggesting that the FT could run wild as a repressor. In this sense, the possible absence or reduction of Zat18 TFs in the mutant, could allow the expression of genes involved in conferring tolerance to salt stress.

RESUMEN

En la actualidad nuestro planeta está sufriendo grandes cambios ambientales desfavorables que provocan la pérdida de millones de cultivos y cosechas. Los estreses ambientales como la salinidad es de los primeros estreses en afectar la agricultura. La salinidad se caracteriza por una alta concentración de sales solubles como Cloruro de Sodio, Sulfatos de Potasio, Calcio, Carbonatos y Nitratos; mientras que los suelos sódicos presentan una alta concentración de Na^+. El origen de la salinidad puede deberse a causas naturales y a la actividad humana.

La salinidad provoca diversos efectos negativos en las plantas; sin embargo en la naturaleza se pueden encontrar especies tolerantes a este tipo de estrés (Halófitas). La adaptación fisiológica y metabólica ante el estrés salino involucra la interacción de varios componentes que coordinan la expresión de diversos genes que permiten a la planta responder y adaptarse, dentro de estos componentes se encuentran los factores de transcripción; proteínas que regulan la expresión de múltiples genes que se inducen por este tipo de estrés. El objetivo de este trabajo fue caracterizar fenotípicamente una mutante pérdida de función en un Factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés salino y osmótico en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Esta mutante fue generada por inserción de T-DNA. El T-DNA en esta mutante cae en el promotor de un factor de transcripción que corresponde a un Zinc-Fingers (*Zat18*), el T-DNA se encuentra con respecto al ATG 277pb arriba. Debido a que la germinación y la longitud de la raíz son parámetros utilizados para conocer los efectos del estrés salino; en el presente trabajo se realizaron cinéticas de germinación con diversas concentraciones de NaCl, KCl y Sorbitol; así mismo se estudio la longitud de la raíz utilizando los mismos agentes estresantes, mostrando que no existen diferencias significativas en los porcentajes de germinación y en el análisis de longitud de raíces. Mientras que en el

proceso postgerminativo la línea Salk_027144 4 presenta una mayor tolerancia en concentraciones de 100, 125 y 150 mM de NaCl y en 125 mM de KCl en comparación con la planta silvestre Col 0. Para evaluar otros parámetros que se ven afectados ante el estrés salino (Fotosintésis, Biomasa) se sembraron semillas de ambas líneas en sustrato metromix, al llegar al estado de roseta comenzaron a regarse con diversas concentraciones de NaCl (0, 100, 150 y 200 y 250 mM). A partir de una concentración de 100 mM la planta silvestre comienza a ser afectada en la fotosíntesis y fenotípicamente en las hojas en comparación con la planta mutante, donde está ultima comienza a verse afectada en un concentración de 200 y 250 mM de NaCl. Con base a la función de los FTs (represor y activadores de la transcripción) y el fenotipo de la mutante en presencia de Na^+, sugieren que el FT silvestre podría funcionar como un represor. En este sentido, la posible ausencia o reducción del FTs *Zat18* en la mutante, podría permitir la expresión de genes involucrados en conferir la tolerancia al estrés salino.

INDICE

CAPÍTULO	PÁGINA
INDICE DE TABLAS	12
INDICE DE FIGURAS	13
ABSTRACT	4
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 La salinidad.	17
1.2 Entrada de Na^+ a la célula.	21
1.3 El estrés salino.	27
1.4 Halófitas plantas tolerantes a la salinidad.	29
1.5 Mecanismos de tolerancia a la salinidad.	33
1.6 Respuestas moleculares ante el estrés.	38
1.7 Factores de transcripción Dedos de Zinc.	56
2. ANTECEDENTES.	62
3. JUSTIFICACIÓN.	67
4. OBJETIVOS.	68
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	69
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	70
6.1 Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*.	70
6.2 Identificación de la mutante Zat18 como homóciga mediante la técnica de PCR.	70
6.3 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homociga) ante estrés salino en sistema *in vitro*.	71

6.3.1 Cinética Dosis-Respuesta de germinación en NaCl. 72

6.3.2 Pruebas de germinación en NaCl. 72

6.3.3 Cinética Dosis-Respuesta longitud de raíces en NaCl. 73

6.3.4 Medición de Longitud de raíces en NaCl. 73

6.3.5 Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en NaCl. 73

6.3.6 Pruebas de germinación en KCl. 74

6.3.7 Medición de Longitud de raíces en KCl. 74

6.3.8 Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en KCl. 74

6.4 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homociga) ante estrés osmótico. 75

6.4.1 Pruebas de germinación en Sorbitol. 75

6.4.2 Medición de longitud de raíces en Sorbitol . 75

6.4.3 Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en Sorbitol. 75

6.4.4 Cinética Dosis-Respuesta de la Hormona Ácido Abscisico (ABA). 76

6.5 Evaluación fenotípica de la mutante ante estrés salino en comparación con la silvestre en sistema maceta. 76

6.5.1 Medición de Fotosíntesis 77

6.5.2 Medición de Biomasa 77

7. RESULTADOS. 77

7.1 Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana* 77

7. 2 Identificación de la mutante Zat18 como homóciga mediante la técnica de PCR. 78

7.3 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homociga) ante estrés salino en sistema *in vitro*. 80

7.3.1 Cinética Dosis-Respuesta de germinación en NaCl 81

7.3.2 Pruebas de germinación en NaCl. 81

7.3.3 Cinética Dosis-Respuesta longitud de raíces en NaCl. 82

7.3.4 Medición de Longitud de raíces en NaCl. 83

7.3.5 Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en NaCl. 84

7.3.6 Pruebas de germinación en KCl. 86

7.3.7 Medición de Longitud de raíces en KCl. 87

7.3.8 Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en KCl. 90

7.4 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homociga) ante estrés osmótico. 91

7.4.1 Pruebas de germinación en Sorbitol. 91

7.4.2 Medición de longitud de raíces en Sorbitol . 94

7.4.3 Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en Sorbitol. 94

7.4.4 Cinética Dosis-Respuesta de la Hormona Ácido Abscisico (ABA). 96

7.5 Evaluación fenotípica de la mutante ante estrés salino en comparación con la silvestre en sistema maceta. 99

7.5.1 Medición de Fotosíntesis 100

7.5.2 Medición de Biomasa 102

8. DISCUSIÓN. 103

9. CONCLUSIONES. 115

10. PERSPECTIVAS. 116

11. BIBLIOGRAFÍA. 117

12. ANEXOS. 126

INDICE DE TABLAS

NÚMERO Y NOMBRE **PÁGINA**

Tabla. 1. Estreses bióticos y abióticos presentes en plantas. 17

Tabla 2. Definición de salinidad y suelos sódicos en base a la United States Salinity Laboratory. 20

Tabla 3. Nomenclatura de los miembros de la familia HKT en plantas. 23

Tabla 4. Transportadores de K^+, Na^+ y Cl^- en plantas. 26

Tabla 5. Especies vegetales de Halófitas. 32

Tabla 6. Osmolitos que se acumulan en las plantas durante el estrés salino. 34

Tabla 7. Genes involucrados en la tolerancia al estrés salino. 39

Tabla 8. Secuencia, Organización y Localización del dominio de SLN**.** 50

Tabla 9. Cuadro Comparativo de la proporción de genes codificantes de FTs en los genomas de algunas plantas. 50

Tabla 10. Dedos de zinc C2H2 en algunas especies de plantas. 57

Tabla 11. Dedos de Zinc C2H2. 60

Tabla 12. Factores de transcripción inducidos por Na^+ en las raíces de Arabidopsis. 65

Tabla 13. Estímulos y órganos donde se induce el gen Zat18 . 107

Tabla 14. Ejemplos de represores transcripcionales que presentan motivo EAR. 111

INDICE DE FIGURAS

NÚMERO Y NOMBRE **PÁGINA**

Fig. 1. Sección transversal de hojas de *Suaeda monoica* en condiciones control y condiciones de salinidad. 30

Fig. 2. Esquema de una glándula salina en *Limonium*. 31

Fig. 3. Sección transversal de las hojas de *Avicennia marina*, mostrando las glándulas salinas. 31

Fig. 4. Diagrama de la vía SOS. 38

Fig. 5. Redes de regulación transcripcional en respuesta a estrés abiótico. 40

Fig. 6. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. 41

.

Fig. 7. Secuencia de activación de los receptores acoplados a proteínas G e inactivación del ligando al receptor. 43

Fig 8. Representación de los dominios funcionales de un factor de transcripción. 47

Fig 9. Representación del dominio de unión al DNA y el dominio de oligomerización en tres factores de transcripción. 48

Fig. 10. Estructura del tipo dedos de zinc C2H2. 57

Fig. 11. Secuencia conservada QALGGH en la familia dedos de zinc tipo C2H2. 58

Fig. 12. Subclases de los dedos de zinc. 59

Fig. 13. Estructura del T-DNA**.** 64

Fig. 14. T-DNA modificado. 65

Fig. 15. Identificación de plantas homóciga. 71

Fig. 16. Germinación de semilla de Arabidopsis thaliana. 72

Fig. 17. PCR de la línea 027144. 78

Fig. 18. PCR de la línea 142233 y 104843. 79

Fig. 19. PCR de la línea 114635. 79

Fig. 20. PCR de la línea 027144. 79

Figura. 21 Cinética Dosis-Respuesta de germinación en *Arabidopsis thaliana* en diferentes concentraciones de NaCl. 80

Fig. 22 Cinética de germinación de Columbia 0 y Salk_02744 4 en condiciones control. 81

Fig. 23 Cinética de germinación de Columbia 0 y Salk_02744 4 en condiciones de 125 mM de NaCl. 82

Fig. 24 Cinética de germinación de Columbia 0 bajo estrés salino a diversas concentraciones de NaCl. 82

Fig. 25 Cinética de germinación de Salk_027144 4 bajo estrés salino a diversas concentraciones de NaCl. 83

Fig. 26 Germinación en la planta Silvestre y Mutante a diversas concentraciones de NaCl. 83

Fig. 27 Cinética dosis-respuesta de longitud de raíces en *Arabidopsis thaliana* en diferentes concentraciones de NaCl. 84

Fig. 28 Cinética de longitud de raíces en *Arabidopsis thaliana* y Salk_027144 4 en diferentes concentraciones de NaCl. 85

Fig. 29 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 100 mM NaCl. 86

Fig. 30 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 125 mM NaCl. 86

Fig. 31 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 150 mM NaCl. 86

Fig. 32 Cinética de germinación de Col 0 bajo estrés salino a diversas concentraciones de KCl. 87

Fig. 33 Cinética de germinación de 027144 4 bajo estrés salino a diversas concentraciones de KCl. 88

Fig. 34 Germinación en la planta Silvestre y Mutante a diversas concentraciones de KCl. 88

Fig. 35 Germinación de semillas de Columbia 0 y Salk 027144 4 en diversas concentraciones de KCl. 89

Fig. 36 Cinética de longitud de raíces de 15 días en *Arabidopsis thaliana* y Salk_027144 4 en diferentes concentraciones de KCl. 90

Fig. 37 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 125 mM KCl. 91

Fig. 38 Porcentaje de germinación en la planta *Arabidopsis* Ecotipo Columbia 0 a diversas concentraciones de Sorbitol. 92

Fig. 39 Porcentaje de germinación en la planta Salk_027144 4 a diversas concentraciones de Sorbitol. 92

Fig. 40 Germinación en la planta Silvestre y Mutante a diversas concentraciones de Sorbitol. 93

Fig. 41 Germinación de semillas de Columbia 0 y Salk 027144 4 en diversas concentraciones de Sorbitol. 93

Fig. 42 Cinética de longitud de raíces en *Arabidopsis thaliana* y Salk_027144 4 en diferentes concentraciones de Sorbitol. 94

Fig. 43 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk en diversas concentraciones de Sorbitol. 95

Figura. 44 Dosis-Respuesta en la planta Arabidopsis Ecotipo Columbia en diversas concentraciones de la hormona ABA. 96

Fig. 45 Dosis-Respuesta en la planta Salk_ 027144 4 en diversas concentraciones de la hormona ABA. 97

Fig. 46 Cinética Dosis-Respuesta en la planta Arabidopsis Ecotipo Columbia y la línea Salk_027144 4 a diversas concentraciones de ABA. 97

Fig. 47 Germinación de Arabidopsis ecotipo Columbia 0 y Salk_027144 4 en diversas concentraciones de ABA. 98

Fig. 48 Evaluación fenotípica de planta silvestre y mutante ante estrés salino en sistema maceta. 99

Fig 49. Medición de Fotosíntesis en Arabidopsis ecotipo Col 0 y de la línea Salk_027144 4. 101

Fig. 50 Peso Fresco y Peso Seco de las plantas Columbia 0 y Salk_027144 4 regadas con diversas concentraciones de NaCl y control. 103

Fig. 51 Inserción del T-DNA en la línea mutante. 105

Fig. 52 Expresión en raíces de *Arabidopsis* expuestas a diversos tipos de estrés. 106

Fig. 53 Expresión en hojas de *Arabidopsis* expuestas a diversos tipos de estrés. 106

Fig. 54 Elementos en cis a los que se une el *Zat18.* 107

Fig .55 Motivo EAR en el gen At3g53600. 111

Fig. 56 Desarrollo, Órganos y Semillas de la planta Silvestre Col 0 y Salk 027144 4. 131

Fig. 57 Tricomas y Hojas de la planta silvestre Col 0 y y Salk_027144 4 en 125 mM de NaCl. 131

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La salinidad.

Las plantas están expuestas a una gran cantidad de estreses ambientales (Tabla 1) que afectan el desarrollo y crecimiento de estas. Estos estreses en condiciones extremas llegan a representar la primera causa de pérdida de cultivos y cosechas por más del 50% a nivel mundial (Bray *et al* 2000). En contraste, la perdida de cultivos por patógenos representa del 10% al 20% (Kreps *et al* 2002).

Tabla 1. Estreses Abióticos y Bióticos presentes en las plantas (Mahaja, S y Tuteja, N; 2005).

Estreses abióticos
1. Frio 2. Calor 3. Sequía 4. Radiación (Alta intensidad de luz ultravioleta y luz visible) 5. Contaminación y Químicos (metales pesados, químicos, aerosoles) 6. Estrés oxidativo 7. Ausencia de nutrientes en el suelo
Estreses bióticos
1. Patógenos (Virus, bacterias y hongos) 2. Insectos 3. Herbívoros 4. Roedores

Uno de los estreses que mas afecta el desarrollo y crecimiento de las plantas es la salinidad; La salinidad del suelo puede ser de dos tipos: suelos salinos o suelos sódicos los primeros se caracterizan por una alta concentración de sales solubles como Cloruro de Sodio, Sulfatos de Potasio y Calcio, Carbonatos y Nitratos; mientras que los suelos sódicos presentan una alta concentración de Na^{+}. El origen de la salinidad puede deberse a causas naturales, las sales pueden proceder de algunas rocas fundamentalmente de tipo

sedimentario que contienen sales como minerales constituyentes principalmente; que al ser arrastrados por el agua y el viento se depositan en los suelos y depresiones, generando mantos freáticos salinos (Szaboles, 1989). Una significativa porción de tierras de cultivo presentan salinidad debido al uso excesivo de riego artificial (con aguas de mala calidad), al cambio climático (Rengasamy, 2002) y al empleo incontrolado y mal uso de fertilizantes que al contener altos niveles de sales son potencialmente perjudiciales, tales como cloruro de potasio o sulfato de amonio.

La conductividad eléctrica ha sido el parámetro más extendido y el más ampliamente utilizado en la estimación de la salinidad. Se basa en la velocidad con que la corriente eléctrica atraviesa una solución salina, la cual es proporcional a la concentración de sales en la solución. Hasta hace unos años se expresaba en mmhos/cm, hoy en día las medidas se expresan en dS/m (dS=deciSiemens), siendo ambas medidas equivalentes (1 mmhos/cm = 1 dS/m). Por tanto la CEs refleja la concentración de sales solubles en la disolución.

En base a la CEs el United States Salinity Laboratory de Riverside establece los siguientes grados de salinidad.

- 0 - 2 Suelos normales
- 2 - 4 Quedan afectados los rendimientos de los cultivos muy sensibles. Suelos ligeramente salinos.
- 4 - 8 Quedan afectados los rendimientos de la mayoría de los cultivos. Suelos salinos.

- 8 - 16 Sólo se obtienen rendimientos aceptables en los cultivos tolerantes. Suelos fuertemente salinos.
- > 16 Muy pocos cultivos dan rendimientos aceptables. Suelos extremadamente salinos.

Se ha adoptado que la medida de la CEs se debe hacer sobre el extracto de saturación a 25°C. A una muestra de suelo se le añade agua destilada a 25°C hasta conseguir la saturación y se extrae el agua de la pasta mediante succión a través de un filtro.

Para conocer la sodicidad de un suelo se puede medir el Na^{+} en la disolución del suelo o bien en el complejo de cambio. En el primer caso se denomina razón de adsorción de sodio (RAS) y en el segundo hablamos del porcentaje de sodio intercambiable (PSI).

La razón de adsorción de sodio (RAS) se calcula a partir de las concentraciones de Na+, Ca^{2+} y Mg^{2+} en mmol / dm3 de las soluciones salinas:

RAS = concentración de Na^{+}, dividido por la raíz cuadrada de la semisuma de las concentraciones de Ca^{++} y Mg^{++}.

Mientras que el porcentaje de Na^{+} respecto a los demás cationes adsorbidos se denomina porcentaje de sodio intercambiable (PSI).

PSI = 100 x Na / CIC

siendo CIC la capacidad de intercambio de cationes (en ocasiones llamada capacidad de cambio de cationes y representada por CCC). Se considera que un suelo puede empezar a sufrir problemas de sodificación, cuando el PSI > 15%.

Siendo los suelos salinos-sódicos aquellos que tienen un a CEs mayor de 4 dS/m a 25°C y un PSI mayor de 15%, clasificándose de la siguiente manera:

- Suelos Normales: CEs < 4 dSm-1 a 25°C y PSI < 15%
- Suelos Salinos: CEs > 4 dSm-1 a 25°C y PSl < 15%
- Suelos Sódicos: CEs < 4 dSm-1 a 25°C y PSI > 15%
- Suelos Salino-Sódicos: CEs > 4 dSm-1 a 25°C y PSI > 15%

Tabla 2. Definición de salinidad y suelos sódicos en base a la United States Salinity Laboratory (USSL, 2005).

TERMINO	DEFINICIÓN	EFECTO EN LAS PLANTAS
Salinidad	Los suelos salinos presentan una alta concentración de sales solubles. Son clasificados como salinos cuando presentan un CE mayor a 4 dSm-1.	Estrés osmotico y salino inhibe el crecimiento de raíces y tallos.
Sodicidad	Presenta baja concentración de sales solubles pero un alto (PSI). Los suelos se clasifican como Sódicos cuando presentan un PSI> 15.	Efecto nocivo en el Metabolismo y nutrición de las plantas.

Más de 800 millones de hectáreas a nivel mundial son afectadas por sal, 397 millones de hectáreas son afectadas por salinidad mientras que 434 millones de hectáreas por sodicidad (FAO, 2008). De las 1500 millones de hectáreas de tierras destinadas a la agricultura, 32 millones (2%) presentan problemas de salinidad, causando la perdida de cultivos y cosechas (Zhu, 2002). La mayoría de las plantas de

interés agrícolas son sensibles a la salinidad y su producción se ve significativamente reducida cuando se cultivan en suelos salinos. No existe una evaluación precisa de las superficies de los suelos con problemas de salinidad en México, sin embargo, puede señalarse, de manera aproximada, la presencia de 3.5 millones de hectáreas afectadas en las zonas áridas y semiáridas, 1 millón en otras zonas no agrícolas, 800 000 en las áreas costeras, 1 millón en áreas agrícolas de temporal y 500 000 en zonas agrícolas de riego, lo cual totaliza unos 6.8 millones de hectáreas de suelos afectados por sales en todo el país. (SEMARNAT, 2006). Es por estas razones que el estudio y entendimiento de los mecanismos de tolerancia al estrés salino es primordial para países como el nuestro.

1.2 La entrada de Na^+ a la célula.

En un suelo salino, la elevada concentración de iones Na+ y Cl- produce una interferencia en la absorción de nutrientes (K^+, $Ca^{2+,}$ NO^3) e impide la captación de los mismos, al tiempo que el Na^+ y el Cl^- pueden alcanzar niveles citosólicos tóxicos para el metabolismo celular. El mantenimiento del equilibrio iónico de la célula frente a los cambios del medio externo, depende de las proteínas de membrana que regulan el flujo de iones, como las bombas de protones (ATPasas y pirofosfatasas), transportadores secundarios y canales iónicos (Niu et al., 1995; Maathuis y Amtmann, 1999). Uno de los factores determinantes de la tolerancia celular a la salinidad reside en la capacidad de mantener una alta relación K^+/Na^+ en el citosol. El exceso de Na^+ es censado en la superficie de la membrana por proteínas transmembranales o dentro de la célula por enzimas sensibles a este elemento (Zhu, 2003). La entrada de Na^+ en la célula es a través de canales y transportadores; proteínas que se encuentran en la bicapa lipidica de las membranas. Los transportadores son proteínas integrales que usan gradientes electroquímicos para mover moléculas entre ambos lados de la membrana; actúan como

simportes y antiportes y muchos de ellos altamente selectivos para un ion. Cada tipo de transportador puede variar dependiendo de las especies y las condiciones de crecimiento, sugiriendo que podrían trabajar en paralelo midiendo la entrada de Na^+ en las raíces. Transportadores (HKT) se han propuesto como los transportadores que juegan el mayor rol en la captación y recirculación del Na+ en la planta (Apse y Blumwald, 2007). En Arabidopsis y el Arroz la función principal de la familia de proteínas HKT es la de controlar la acumulación de Na^+ (Mäser, 2002) y determinar la tolerancia a la salinidad (Sunarpi *et al*., 2005). Sin embargo en sistemas heterólogos los TaHKT1 del trigo transportan Na^+ y $K^{+.}$ Los transportadores HKT de *Eucalyptus camaldulensis* son más permeables al Na^+ que al K^+ cuando las concentraciones de ambos elementos son iguales (Liu *et al*., 2001), mientras que el AtHKT1 de Arabidopsis es mas especifico para el transporte de Na^+ (Uozomi *et al*., 2000). Recientes estudios sugieren que los miembros de la familia HKT en el arroz y en Arabidopsis se expresan en las células del parénquima del xilema y protegen a las hojas del estrés salino, removiendo el Na^+ (Sunarpi *et al*., 2005). La familia de proteínas (HKT) están implicadas en el transporte de Na^+ en varias especies. En Arabidopsis hay un solo miembro de está familia de proteínas el AtHKT1:1 (Apse y Blumwald, 2007) y es localizado en la estela de la raíz, regula la entrada de Na^+ cuando se expresa en sistemas heterólogos como en Xenopus y en las levaduras (Uozumi *et al*., 2000). AtHKT1:1 probablemente funciona en el control de Na^+ en el xilema para su exportación al tallo (Rus *et al*., 2001). En el arroz (*Oryza sativa* L. indica) OsHKT2:1 y el OsHKT2:2 fueron identificados en base a la similitud de las secuencias que presentan con los HKT del trigo (Horie *et al*., 2001). Los transcritos de OsHKT1 y 2 se acumulan en respuesta a bajas concentraciones de K^+ pero presentan reducción por tratamientos de 30 mM de NaCl. La complementación en levadura y la expresión de ovocitos en

Xenopus indica que OsHKT1:1 funciona como transportador de Na^+ pero OsHKT2:2 actúa como simporte de Na^+ / K^+ ; se encuentran nueve miembros de estas proteínas en el arroz (Platten *et al*., 2006). En el trigo TaHKT2:1 funciona como un simporte Na^+ / K^+ y su baja regulación en la planta reduce la acumulación de Na^+ en las raíces permitiéndole tolerancia a la salinidad (Laurie *et al*., 2002).

Tabla 3. Nomenclatura de los miembros de la familia HKT en plantas (Platten *et al*., 2006).

Nombre Previo	Num. Acceso de Nucleótido	Num. de identificación de locus	Num. de Acceso a la Proteína	Nombre Actual	Especie
AtHKT1	AF237672	At4g10310	AAF68393	AtHKT1:1	*A. thaliana*
McHKT1	AF367366		AAK52962	McHKT1:1	*M. cristallinum*
McHKT2	AY231175		AA073474	McHKT1:2	*M. cristallinum*
PtHKT1				PtHKT1:1	*P. trichocarpa*
EcHKT1	AF176035		AAF97728	EcHKT1:1	*E. camaldulensis*
EcHKT2	AF176036		AAD53890	EcHKT1:2	*E. camladulensis*
SmHKT1	AY530754	Os04g51820	AAS20529	SmHKT1:1	*S. maritima*
OsHKT4	AJ491816		CAD37183	OsHKT1:1	*O. sativa*
OsHKT5	AJ506745			OsHKT1:2	*O. sativa*
OsHKT6	AJ491818	Os02g07830	CAD37185	OsHKT1:3	*O. sativa*
OsHKT7	AJ491853	Os04g51830	CAD37197	OsHKT1:4	*O. sativa*
OsHKT8	AK108663	Os01g20160	BAB93392	OsHKT1:5	*O. sativa*
TaHKT1	U16709		AAA52749	TaHKT2:1	*T. aestivum*
HvHKT1	AM000056		CAJ01326	HvHKT2:1	*H. vulgare*
PaHKT1	AB234304		BAE44385	PaHKT2:1	*P. australis*
OsHKT1	AB061311	Os06g48810	BAB61789	OsHKT2:1	*O. sativa*
OsHKT2	AB061313		BAB61791	OsHKT2:2	*O. sativa*
OsHKT3	AJ491820	Os01Gg34850	CAD37187	OsHKT2:3	*O. sativa*
OsHKT9	AJ491855	Os06g48800	CAD37199	OsHKT2:4	*O. sativa*

Otros tipos de transportadores contribuyen a la regulación de homeostasis iónica y osmótica bajo condiciones salinas estos son los LCT1 del trigo que median la captación de un ancho rango de cationes incluyendo el K^+ y el Na^+ (Amtamann *et al*., 2001). Este transportador de baja afinidad, LCT1, es más permeable al Na^+, pero su

contribución relativa a la captación de este elemento es desconocida (Schachtman *et al.*, 1997).

Los transportadores KUP/HAK/KT están involucrados en la entrada de K^+ presentando una alta y baja afinidad para este elemento (Santa-María *et al*., 1997; Vallejo *et al*., 2005). Forman una larga familia de 13 miembros en Arabidopsis (Mäser et al., 2001) 17 miembros en el arroz (Bañuelos et al., 2002) y 5 en la cebada (Santa-María *et al*., 1997) actuando en la membrana plasmática y en el tonoplasto (Navarro, 2001). Concentraciones elevadas de Na^+ inhiben el transporte de K^+ en AtKUP1 y en AtHAK5 (Rubio *et al*., 2000), mientras que el nivel de expresión del transcrito KUP2 decrece en los tallos cuando las plantas son tratadas con NaCl (Maathuis, 2006).

Los canales son proteínas integrales que crean poros o conductos hidrofílicos que comunican ambos lados de la membrana. Tienen la propiedad de poder abrir o cerrar dicho conducto según ciertas condiciones.

Dentro de estos canales se encuentran los CNGCs (canales ciclinucleótidos) y los GLRs (canales activados por glutamato), se han sugerido como canales no selectivos (NSCCs) (Tester *et al*., 2003). Estos canales muestran una alta selectividad de cationes por encima de los aniones y son los primeros mediadores de la entrada de Na^+ a las raíces de la planta (Demidchik y Maathuis, 2007). Los CNGCs (canales ciclinucleótidos) son canales activados por AMPc y GMPc (Leng *et al*., 2002). Estos canales están extensamente presentes en diversas especies de plantas; en Arabidopsis se han identificado 20 miembros CNGCs (Mäser *et al*., 2001) y a la fecha se han caracterizado siete AtCNGCs (AtCNGC 1, 2, 3, 4, 10, 19 y 20). Se expresan en todos los tejidos (Talke *et al*., 2003) y se localizan en la membrana plasmática (Arazi *et al*., 1999). El gran tamaño de estos canales indica una gran variedad de funciones

fisiológicas desde señalización celular (Very y Sentenac, 2002) y estar involucrados en la entrada de cationes a la raíz (Maathuis y Sanders 2001). Todos los caracterizados CNGCs son capaces de conducir K^+ y CNGC 2 Na^+ también. Análisis de transcriptoma revela que el nivel de transcrito de CNGC 1 CNGC 19 y CNGC 20 incrementa bajo condiciones salinas en las raíces de Arabidopsis mientras que en el tallo el nivel de transcrito de CNGC 3 Y CNGC 8 es mayor (Maathuis, 2006). Estudios electrofisiológicos han sugerido que AtCNGC1 y AtCNGC4 son igualmente permeables al K^+ y al Na^+ (Leng *et al*., 2002). Los GLRs son proteínas que interactúan con glutamato y forman canales con un alto rango de permeabilidad para K^+ como para Na^+. En Arabidopsis se han identificado 20 miembros putativos (Demidchik *et al*., 2004). La función fisiológica de estos transportadores en las plantas aun es desconocida y queda por demostrar si son capaces de formar canales iónicos funcionales (Lacombe et al., 2001).

Los canales tipo Shaker (AKT, KAT, GORK, KIRC, SKOR) son localizados en la membrana plasmática y regulan el transporte de K^+, estos canales se expresan en varios tipos celulares y operan en un rango milimolar. Ambos AKT2 y AtKC1 son expresados en raíces (Pilot *et al*., 2003). KAT1 y KAT2 regulan la entrada de K^+ en las células guarda (Szyroki et al., 2001). La liberación de K^+ de los pelos radiculares y de la epidermis de la raíz es regulada por los canales GORK (Ivashikina *et al*., 2001) mientras que la liberación de K^+ en el xilema ocurre a través de los canales SKOR (Gaymard *et al*., 1998).

Tabla 4. Algunos canales y transportadores de K^+, Na^+ y Cl^- en plantas asociados con la tolerancia a la salinidad. (Modificado de Maathuis *et al*. 2003).

FAMILIA	TRANSPORTADOR	FUNCIÓN
Tipo Shaker	AKT1,AKT2,KAT1	AKT1 (Trasportador de K+ en Arabidopsis) expresado en raíces. Pero en altas concentraciones de salinidad puede transportar Na+. AKT2 y KAT1 se expresan en el floema de hojas y células guarda.
	SKOR	Impermeable al Na+. Mantiene altos niveles de K+ en raíces y tallos.
	KC01	Expresado en hojas, probablemente en el tonoplasto.
Canales no selectivos de Cationes	CNGC y GLR	Presentan permeabilidad similar al Na+ y K+ y son regulados por Ca2+.
Transportadores de K+	KUP/HAK/KT	Controlan la homeostasis de K+ en las plantas, la selectividad del K+ por encima del Na+ se desconoce.
HKT	HKT	Alta afinidad por el K+, se dividen en dos familias actuando como simportes de Na+/K+ y uniporte de Na+. Mutaciones que interumpen su función, alteran el transporte de Na+ de raíces a tallos.
Antiporter de cationes.	CHX	Su función no es bien caracterizada en plantas, pero CHX10 y CHX15 regulan la captación de Na+ en el xilema.
Antiporter de Na+	NHX1	AtNHX1 en un antiporter de Na+/H+ de la membrana del tonoplasto. Es expresado en raíces y hojas, uniporter para el Na+ en la vacuola.
Transportadores de cationes de baja afinidad	LCT1	Transportadores de cationes de baja afinidad del trigo.
Transportadores de Cl	CCC	Transportadores donde el movimiento del del Cl está acoplado con el de Na^+ y el K^+.
SOS	SOS1	SOS1 (salt overly sensitive) expresado en raíces. SOS1 importante en la salida de Na^+ de las raíces.

Bomba de protones	H+ ATPasa (AHA2)	Transporte de H^+ a través de la membrana.
	H+ Ppase (AVP1)	Transporte de H^+ a través del tonoplasto.

1.3 El estrés salino.

La salinidad impone un estrés osmótico y un estrés iónico sobre las plantas; esto es Estrés salino = estrés iónico + estrés osmótico; al acumularse el Na^+ en las hojas, provoca diversos efectos negativos, la respuesta inmediata al estrés salino es la reducción de la superficie foliar (Wang y Nil, 2000), así mismo un decremento en el peso fresco y seco de hojas, tallos y raíces (Hernández *et al*., 1995). En *Raphanus sativus* expuesta a concentraciones altas de NaCl presenta una reducción en la expansión de la hoja y por consiguiente la reducción de la intercepción de la luz. La clorofila y el contenido total de carotenos en las hojas decrece (Parida y Bandu, 2005). Un cambio estructural en la membrana genera una reducción en la permeabilidad de la membrana plasmática bajo estrés salino. Este cambio en la permeabilidad de la membrana, es provocado por un aumento en el contenido de lípidos así como también una alteración en la composición de los mismos. Los lípidos que funcionan como constituyentes estructurales de la membrana celular, incrementan a bajas concentraciones de NaCl, y decrecen a altas concentraciones (Hassanein, 1999). Whu *et al*., (1998) han analizado los cambios en la composición lipídica por NaCl en la membrana celular de la raíz y reportan que el porcentaje de esteroles y fosfolipidos decrece cuando existe un incremento de salinidad.

El estrés salino rompe la homeostasis iónica de las plantas al provocar un exceso tóxico de Na^+ en el citoplasma y una deficiencia de iones como el K^+. El sodio inhibe muchas enzimas y por eso es importante prevenir la entrada del mismo al citoplasma;

así mismo decrecen los niveles de Ca^{2+}, Mg^{2+} (Khan, 2001) elementos esenciales para la nutrición de las plantas; el estrés salino causa un déficit de agua y como resultado un estrés oxídativo con la formación de especies reactivas de oxígeno causando la muerte celular (Bohnert y Jensen, 1996). La actividad de la nitrato reductasa (NRA) en las hojas decrece en varias plantas bajo el estrés salino (Flores *et al*., 2000). La primer causa de la reducción de la (NRA) está asociada con la presencia de Cl^- en el medio externo; en *Zea mays* el contenido de nitrato en las hojas decrece, la exposición de legumbres como alfalfa, frijol y soya al NaCl resulta en un decremento en el crecimiento, asociado a la inhibición de la nodulación (Serraz *et al*., 1998).

La estructura de los tilacoides de los cloroplastos se desorganiza y el contenido de almidón decrece (Hernández, 1995). En la papa el número y profundidad de las pilas de la grana se ve afectada (Brunsen y Hecht-Buchholz, 1990). La membrana celular de los cloroplastos se muestra arrugada y no hay presencia de granas (Khavarinejad y Mostofi, 1998). Durante la fotosíntesis el estrés salino afecta la asimilación de CO_2 en la fotosíntesis, así como la función de diversas enzimas se ven afectadas como la Ribulosa bifosfato carboxilasa (RUBISCO) y fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) (Zhu y Meinzer, 1999). El transporte de electrones se ve afectado en el fotosistema II en B. parviflora y enzimas involucradas en el ciclo de Calvin se ven afectadas como la ribulosa-5-bisfosfato, ribulosa-5-fosfato isómerasa y la NADP-gliceraldehido-3-fosfato isomerasa (Reddy *et al*., 1992). Al decrecer la tasa fotosintética se generan diversos factores que provocan la deshidratación de membranas celulares reduciendo la permeabilidad del CO2, una mayor senescencia en las hojas y cambios en la actividad enzimática (Iyengar y Reddy, 1996).

El potencial de agua y el potencial osmótico de las plantas llega a ser más negativo con en el incremento de la salinidad. Los cambios significativos en el potencial

de agua por incremento de la salinidad en el suelo, genera primariamente un estrés osmótico en las plantas, las cuales pueden interrumpir sus actividades celulares normales, las plantas tienen dificultad para absorber agua y sufren EDH (estrés por déficit hídrico), influyendo sobre el crecimiento o incluso causarles la muerte. Además de los efectos hídricos, hay efectos tóxicos provocados por los propios iones.

Las plantas necesitan mantener el potencial interno hídrico más bajo en comparación con el del medio exterior manteniendo el turgor y la captación de agua para su crecimiento. La plasmólisis ocurre cuando la presión osmótica de la solución se incrementa haciendo que el protoplasto se encoja y se separa la membrana plasmática de la pared celular.

1.4 Halófitas plantas tolerantes a salinidad.

Las halófitas son plantas que sobreviven y se reproducen en concentraciones altas de NaCl, constituyendo el 1% de la flora mundial (Flowers y Colmer, 2008). Actualmente no existe una definición correcta, autores como Flowers *et al*., (1998) describen a las halófitas como plantas que son capaces de completar su ciclo de vida a concentraciones mayores de 200mM de NaCl. Otras definiciones se basan en el crecimiento de estas en ambientes con alta salinidad (Waisel, 1972) en la composición química de los tallos (Albert et al., 2000) y en su habilidad para secretar iones (Breckle, 2002). Sin embargo definiremos Halófita a aquellas especies de plantas que crecen en suelos salinos y presentan cierta tolerancia a altas concentraciones de NaCl, separándolas de las plantas glicofitas plantas sensibles a la salinidad.

Las halófitas han desarrollado un rango amplio de adaptaciones, tanto a nivel de célula, como a nivel de tejidos y de planta completa, para crecer exitosamente en

ecosistemas salinos (Flowers 1985; Lerner 1985). Algunas especies evitan la absorción excesiva de sales mediante la exclusión de éstas por las raíces y en el floema evitando a este elemento llegar a las flores y semillas internas; mientras que otras controlan los niveles de sal que ingresan a la planta a través de su almacenamiento en tejidos especializados, los cuales tienden a acumular agua como compensación al exceso de concentración salina intracelular. En otras especies se desarrollan tejidos secretores que permiten excretar el exceso de sal a la superficie del órgano (Popp 1995; Hagemeyer 1997). Todos estos mecanismos contrarrestan la toxicidad provocada por el exceso de sales. Una de las características de las halófitas es la correlación entre el consumo de iones y la suculencia de la planta. Las plantas suculentas presentan hojas gruesas, permitiendo un incremento en el tamaño de las células mesófilas y hojas con pequeños espacios intracelulares (Fig 1). Estas hojas y/u tallos suculentos les permite aislar las sales, evitando toxicidad y compensar las diferencias de presión osmótica con el suelo. Así mismo las hojas suculentas presentan una mayor cantidad de mitocondrias que les permiten una mejor adaptación; a diferencia de las plantas que carecen de este tipo de hojas y que al ser colocadas en sal presentan mitocondrias grandes evidenciando la energía extra que es necesaria en estas plantas para la compartimentación del Na^+ (Siew y Klein, 1969).

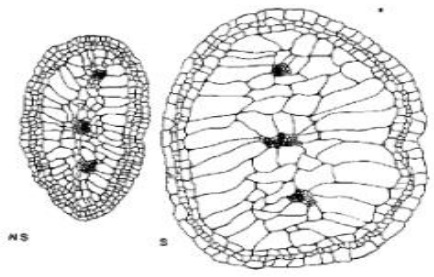


Fig. 1 Sección transversal de hojas de *Suaeda monoica* en condiciones control (NS) y condiciones de salinidad (S). (Waysel, 1972).

Muchas especies halófitas presentan glándulas de sal (Fig. 2) que tienen como función expulsar la sal de la superficie de las hojas. Una vez expulsada la sal esta puede cristalizarse con el sol o ser eliminada por la lluvia. Sin embargo la sal también puede ser liberada por la cutícula y ser transportada a las raíces vía el floema o concentrarse en los pelos radiculares (Stenlid, 1956).

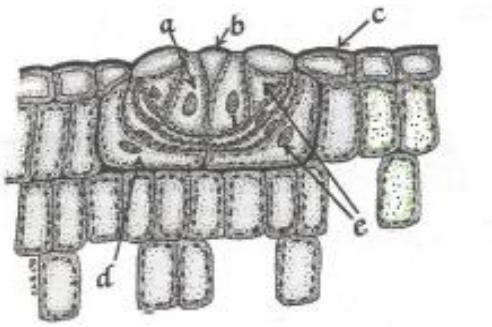


Fig. 2 Esquema de una glándula salina en Limonium. a) célula secretora, b) poro, c) cutícula, d) célula colectora y e) células accesorias.

Estás glándulas se localizan sobre la epidermis y en casi todas las partes aéreas de la planta pero tienden a concentrarse sobre las hojas (Fig. 3). Estas glándulas carecen de una vacuola central, presentan una gran cantidad de mitocondrias y otros organelos sugiriendo que ellas no actúan como células de almacenamiento pero si como células transitorias (Waisel, 1972).

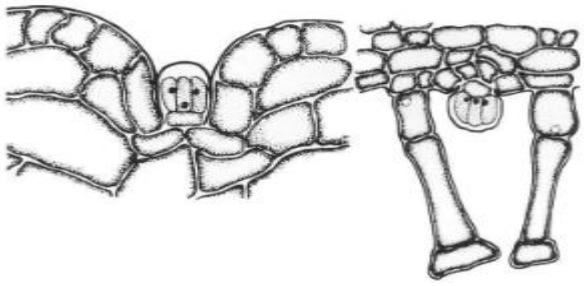


Fig. 3 Sección transversal de las hojas de *Avicennia marina*, mostrando las glándulas salinas (Waisel, 1972).

Cantidades considerables de fluido son excretadas por las glándulas, por ejemplo en *Limonium latifolum* bajo ciertas condiciones secreta arriba de la mitad de su peso en un periodo de 24 horas (Waisel, 1972). Muchos pastos tienen glándulas pequeñas que parecen secretar sal (McWhorter *et al*., 1995). Cuando varias especies dentro de la subfamilia Chloriroideaea fueron comparadas, la actividad secretora de estás glándulas fue correlacionada con la tolerancia a la salinidad en estas especies (Marcum, 1999). Sin embargo no todas las halófitas presentan glándulas secretoras, debido a que se desarrollan en ambientes salinos llegan a presentar pelos que están conformados por dos células en la superficie de la hoja, donde se acumula la sal y el agua (Tester, 2000).

El Na^+ puede ser substituido en los estomas por K^+ por ejemplo en la halófita *Aster tripolium* se encuentran cantidades elevadas de K^+ en las células guarda, este elemento permanece constante sugiriendo que en estas células deben existir mecanismos que impiden la entrada del Na^+ en esta especie que carece de glándulas secretoras de sal (Flowers, 1989).

Tabla 5. Especies vegetales de Halófitas (Aronson, 1989)

FAMILIA	NUM. ESPECIES HALÓFITAS	GÉNERO REPRESENTATIVO
Aizoaceae	52	*Mesembryatum*
Avicenniaceae	19	*Avicennia*
Brassicaceae	100	*Thellungiela*
Chenopodiaceae	381	*Atriplex* *Salicornia* *Suaeda*
Plumbaginaeae	60	*Limonium*

Poacea	143	*Distichlis* *Leptochloa* *Puccinellia* *Thinopyrum* *Spartina*
Rhizophoraceae	31	*Hordeum marinum* *Rhizophora*
Zosteraceae	18	*Zostera*

1.5 Mecanismos de tolerancia a la salinidad.

Si se produce una entrada importante de Na^+ en el citosol, la relación K^+/Na^+ fisiológica debe ser restablecida para evitar el efecto tóxico del Na^+. Diversos mecanismos que llevan a cabo las planta permiten tolerancia a la salinidad incluyendo la la acumulación selectiva, exclusión y compartimentación de iones, síntesis de solutos compatibles, inducción de enzimas antioxidantes y la inducción de hormonas.

La compartimentación es crucial en condiciones de salinidad esta se consigue en algunas especies con un sistema de transporte localizado en la membrana vacuolar (tonoplasto), que permite acumular Na^+ en la vacuola de manera activa, en contra del gradiente electroquímico del Na^+. Otros organelos como plastidos y mitocondrias pueden también acumular el Na^+. Este sistema consiste en un antiporter Na^+/H^+ (denominado NHX) que acopla la entrada de Na^+ a la salida de H^+.

La compartimentación del Na^+ en la vacuola, contribuye a disminuir el potencial osmótico y ajustar el potencial hídrico celular para permitir la absorción de agua durante el estrés salino (Glenn *et al.*, 1999). En Arabidopsis, la familia AtNHX funciona en la

compartimentación del $Na^{+;}$ AtNHX1 y AtNHX2 se localizan en el tonoplasto y se expresan constitutivamente en tallos y raíces. Estas proteínas se inducen por estrés osmótico y esta respuesta osmótica depende de hormonas como el Acido Abscisico (ABA). AtNHX1 tiene la capacidad de transportar tanto Na^{+} como K^{+}, pudiendo contribuir al balance osmótico celular en cualquier condición de crecimiento de la planta (Venema *et al.* 2002). Mientras que NaCl pero no ABA inducen la abundacia de transcrito de AtNHX5. Plantas transgénicas sobreexpresando AtNHX1 muestran una mayor tolerancia a concentraciones de 200mM de NaCl a diferencia de las plantas silvestres (Apse et al., 1999).

La acumulación de Na^{+} en la vacuola no solo permite la concentración de bajos niveles de este elemento en el citoplasma, también contribuye al ajuste osmótico; esencial ante el estrés osmótico. Este ajuste osmótico comprende la biosíntesis de diversos osmolitos que incluyen la producción de carbohidratos, compuestos nitrogenados y polioles (Tabla 6). Estos osmolitos típicamente son hidrofílicos, que sugiere podrían remplazar el agua en las superficies, complejos de proteínas, membranas y actuando en la osmoprotección, inhibiendo los efectos iónicos y la disociación de los complejos enzimáticos (Brown, 1990). Wyn Jones *et al*; 1977 los define como solutos no toxicos que incrementan en altas concentraciones en el citosol y son compatibles con las diversas actividades metabólicas.

Tabla 6 Osmolitos que se acumulan en las plantas durante el estrés salino (Sayram y Tayagi, 2004).

CARBOHIDRATOS	COMPUESTOS NITROGÉNADOS	POLIOLES
Sacarosa	Proteínas	Manitol
Fructosa	Glicina	Pinitol
Glycerol	Aspartato	
Trealosa	Betaina	

Rafinosa	Prolina	

Como se menciono anteriormente el estrés salino provoca un gran daño en las hojas, desintegración de las granas y la destrucción de las mitocondrias, Amidas como la Glicina betaina actúan estabilizando la estructura cuaternaria de las proteínas, del tilacoide y la membrana plasmática (Rhodes y Hanson, 1993). La glicina betaina es abundante en los cloroplastos donde es importante para el ajuste y protección de la membrana de los tilacoides, manteniendo la eficiencia de la fotosíntesis. Alivia los efectos adversos del déficit de agua en la absorción de $C0_{2.}$ Se ha sugerido que está amida induce la producción de vacuolas adicionales en las células de las raíces, que resulta en una mayor acumulación de Na+ en este órgano y evita su transporte al tallo. Esta amida protege a las células del estrés indirectamente a través de su papel en la transducción de señales, se ha visto que la glicina betaina puede discriminar entre el K^+ y Na^+ contribuyendo a la tolerancia del estrés salino. Algunos estudios en pastos que fueron tratados con esta amida y en plantas de Arabidopsis indican que está amida regula la expresión de varios genes, de los cuales más del 6% se encuentran relacionados con la transducción de señales (John, 2002). Dentro de estos genes se encuentran cinasas, receptores de cinasas, monodehydroascorbato peroxidasas etc. Permitiendo a algunos investigadores sugerir que la glicina betaina contribuye a la tolerancia de las plantas ante la salinidad a través de su papel en la transducción de señales (Yilmaz, 2004). La sobreproducción de esta amida en plantas transgénicas de arroz acumulo menor cantidad de Na^+ (Kishitani *et al*., 2000).

Polioles que son clasificados como aciclicos (manitol) y cíclicos (pinitol) funcionan en el ajuste osmótico y en la osmoprotección. En el ajuste osmótico, los polioles actúan facilitando la retención de agua en el citoplasma y permitiendo el secuestro de Na^+ en la vacuola, estos osmolitos protegen la estructura celular por

interactuar con proteínas o enzimas. Plantas halofitas como *M. crystallinum* acumulan gran cantidad de polioles (Sairam y Tyagi, 2004). La tolerancia a la salinidad de plantas transgénicas de *N. tabacum* que presentaban grandes cantidades de manitol fue demostrada por Tarczynski *et al*., (1993). Carbohidratos como (glucosa, fructosa, sacarosa) se acumulan bajo estrés salino (Parida *et al*., 2002). Los azucares funcionan en la osmoprotección, ajuste osmótico y en la captación de radicales. Un número de compuestos que contienen nitrógeno se acumulan en las plantas expuestas a estrés salino, incluyendo aminoácidos, amidas, poliaminas.

Estos compuestos actúan en el almacenamiento de nitrógeno, mantienen el pH, detoxificación celular y en la protección de macromoléculas (Mansour, 2000). Aminoácidos como la prolina se acumula en las hojas, tallo y raíces de *Pringlea antiscorbutica* en una mayor cantidad en el citoplasma que en la vacuola (Aubert et al., 1999). La prolina actúa en el almacenamiento de Carbono y Nitrógeno, así como en la eliminación de radicales libres (Chinnusamy *et al*., 2005). La sobreproducción de estos osmolitos en plantas como Arabidopsis, Arroz, trigo y col ha mostrado una mayor germinación, crecimiento, sobrevivencia, recuperación y fotosíntesis en altas concentraciones de estrés salino y osmótico (Chinnusamy *et al*., 2004). Esta tolerancia fue atribuida al efecto de osmoprotección y ajuste osmótico. Sin embargo poco es conocido acerca de las vías de señalización que regulan la biosíntesis de estos osmolitos en las plantas.

Uno de los efectos secundarios del estrés salino es el estrés oxídativo, para prevenirlo se lleva a cabo la liberación de enzimas antioxidantes como las catalasas (CAT), ascorbata peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR) y la superoxido dismutasa incrementan con la finalidad de una tolerancia a este tipo de estrés (Mittova *et al*., 2003). La superoxido dismutasa cataliza la conversión de aniones superoxido a

hidrogeno peróxido y agua. Se ha reportado que la sobrexpresión de está enzima permite incrementar la tolerancia de las plantas en este tipo de estrés (Bohnert, 1998).

El estrés salino también incrementa los niveles de la hormona ABA en *Citrus sinensis* (GomezCardenas *et al*., 1998). ABA inhibe los efectos negativos de la salinidad en la fotosíntesis, así como el incremento de Ca^{2+}, integridad en la membrana y regula el transporte bajo niveles altos de salinidad (Chen *et al*., 2001). El acido jasmonato también juega un rol importante en la tolerancia a la salinidad, evidencia experimental muestra que cultivos de tomates presentan altos niveles de esta hormona al ser expuestos a salinidad (Hilda *et al*., 2003).

Para la homeostasis iónica, una de las primeras respuestas en las plantas es el incremento de Ca^{+} liberado de depósitos internos (Knight, 2000) particularmente en células guarda (Schroeder, 2001) el Na^{+} activa el flujo de Ca^{+} dentro del citosol a través de la membrana plasmática y en el tonoplasto (Kliegue *et al*, 2000) el incremento de Ca^{+} es percibido por la proteína CBL4 originalmente identificada como S0S3, que es capaz de sensar la señal de Ca^{+} liberada por el estrés salino, al existir incremento de Ca^{+} se facilita la dimerización de SOS3 y su interacción con una proteína cinasa CIPK24 identificada como SOS2. SOS2 es una serina/treonina cinasa de 446 aminoácidos y se estima que tiene un peso molecular de 51kd, la actividad de esta cinasa es esencial para la tolerancia a la salinidad (Zhu *et al*., 2001). Un dominio de 21 aminoácidos es el sitio donde interacciona SOS3 con la cinasa (Guo *et al*., 2001). El complejo S0S3/SOS2 permite la fosforilación y la activación de la proteína SOS1 que presenta una región N-terminal hidrofóbica y contiene de 10 a 12 dominios transmembranales (Liu *et al*, 2000), la actividad de está proteína ha sido detectada en todos los tejidos pero presenta una mayor actividad en la epidermis de la raíz. SOS 1 funciona como un antiporter Na+

/ H+ sobre la membrana plasmática, jugando un papel crucial en la salida de Na+ en las células de la raíz (Shi et al., 2002). (Fig. 4).

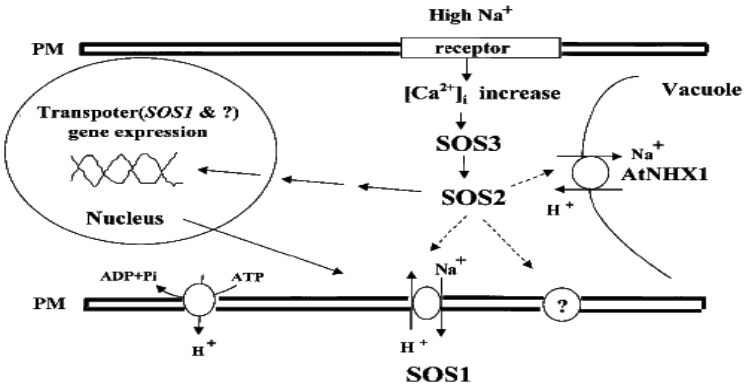


Figura 4. Diagrama de la vía SOS.

Plantas transgénicas de Arabidopsis sobreexpresando SOS1 presentan bajos niveles de Na^+ en el xilema y tallo comparadas con las plantas silvestres. Las plantas transgénicas muestran una mayor tolerancia a la salinidad en términos de su crecimiento y floración creciendo a concentraciones de 50-200mM de NaCl mientras que las plantas control se presentan necróticas (Shi *et al*., 2003). Sugiriendo que SOS1 presenta diversos roles en la tolerancia a la salinidad: la salida de Na^+ en las raíces y el almacenamiento de Na^+ en la vacuola, impidiendo su acumulación en el citoplasma y controlar el transporte del Na^+ entre raíces y hojas, así como la descarga de este elemento del xilema y floema (Zhu, 2003).

1.6 Respuestas moleculares ante el estrés.

La adaptación fisiológica y metabólica ante el estrés involucra la expresión de un gran número de genes (Tabla 7). (Shinozaki *et al*., 1998). Estos genes se clasifican dependiendo de sus funciones fisiológicas y metabólicas. La modulación transcripcional juega un papel importante en controlar la respuesta ante el estrés salino (Shinozaki

1997). Utilizando microarreglos de DNA se ha encontrado que un gran número de genes son regulados coordinadamente por diferentes señales de estrés (Seki *et al*., 2001). La inducción de genes de respuesta a estrés ocurre a nivel transcripcional y la regulación del patrón espacial y temporal de estos genes es una parte importante en la respuesta de las plantas (Rushton, 1998).

Tabla 7. Genes involucrados en la tolerancia al estrés (Winicov, 1998).

1. Componentes estructurales de la membrana celular
2. Canales
3. Trasportadores
4. Enzimas en defensa al estrés oxidativo
5. Proteinasas
6. Proteínas involucradas en la señalización
7. Factores de Transcripción
8. Enzimas detoxificantes

Diversas vías de señalización son inducidas en respuesta a diversos tipos de estrés, incluyendo la participación de compartimentos celulares específicos, tejidos y la interacción de varios componentes que coordina la expresión de diversos genes que permiten a la planta responder y adaptarse (Dowbroski, 2003). Entre estos genes se encuentran aquellos involucrados en procesos de señalización, en el control transcripcional y genes involucrados en la homeostasis y protección confiriendo la tolerancia en este tipo de estrés (Wang *et al*., 2003). (Fig 5).

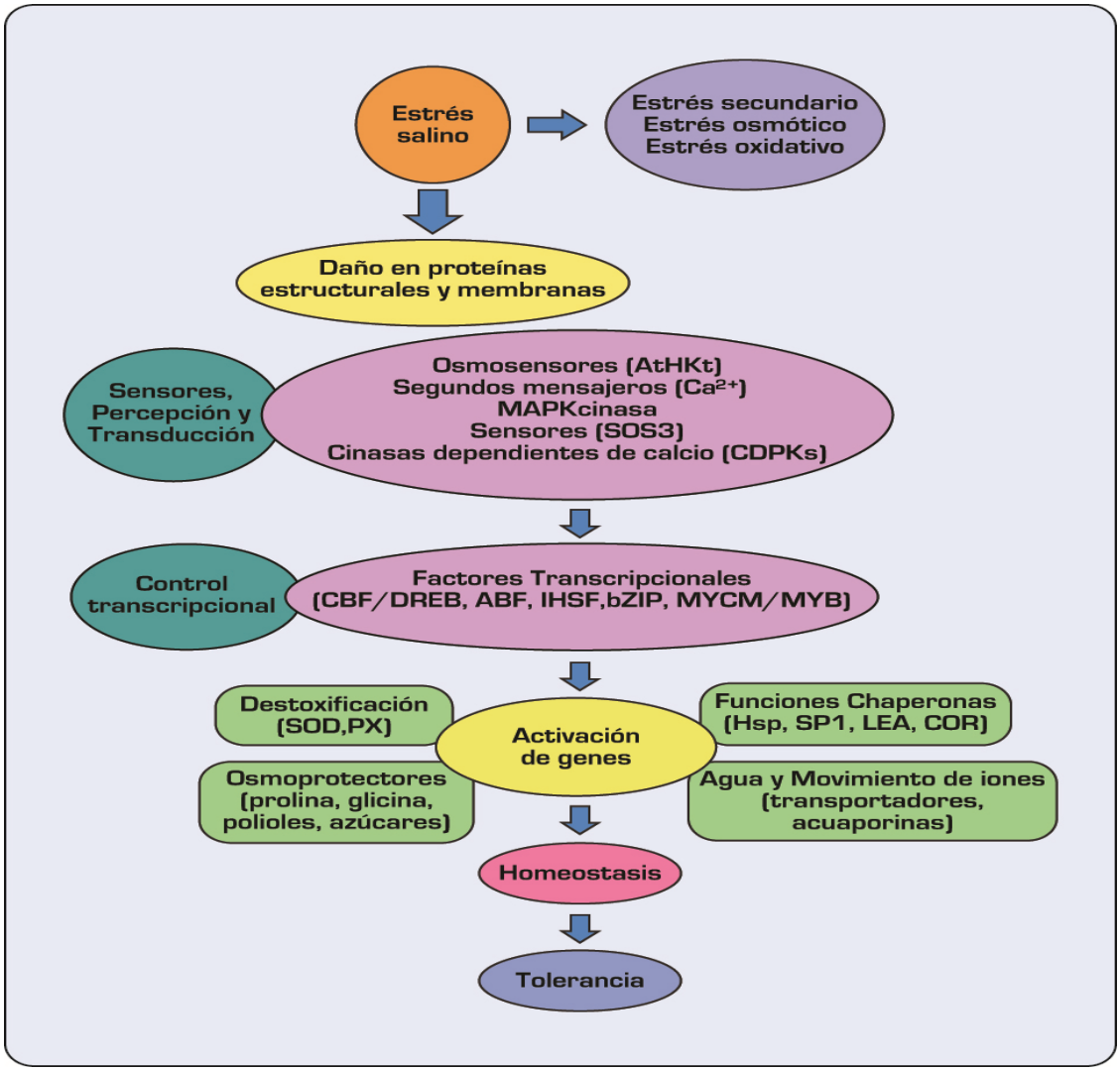


Fig 5. Redes de regulación transcripcional en respuesta a estrés abiótico (Wang *et al.*, 2003).

Las señales del medio ambiente son percibidas por receptores específicos que una vez activados transfieren al interior de la célula la información que han recogido del medio, generándose una cascada de señales intracelulares y que en muchos casos activa a factores de transcripción que regulan la expresión de múltiples genes.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen una gran familia de receptores sobre la superficie celular, con más de mil miembros, en Arabidopsis se encuentran 30 putativos genes que codifican para GPCRs (Devoto *et al.*, 1999), la

mayoría de los receptores de esta clase tienen una estructura similar, esta consiste en una cadena polipeptídica simple con siete segmentos α-hélice transmembranales que tienen una estructura tridimensional común (7TM), estos dominios están unidos entre sí por asas polipeptídicas cuatro intracelulares, el asa larga compuesta básicamente de aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6; y una cuarta asa citoplasmática puede formarse cuando el segmento C- terminal se une a la membrana por atracción lipídica a la cadena de aminoácidos, un segmento N-terminal glucosilado extracelular y el segmento C-terminal a nivel citoplasmático (Fig 6).

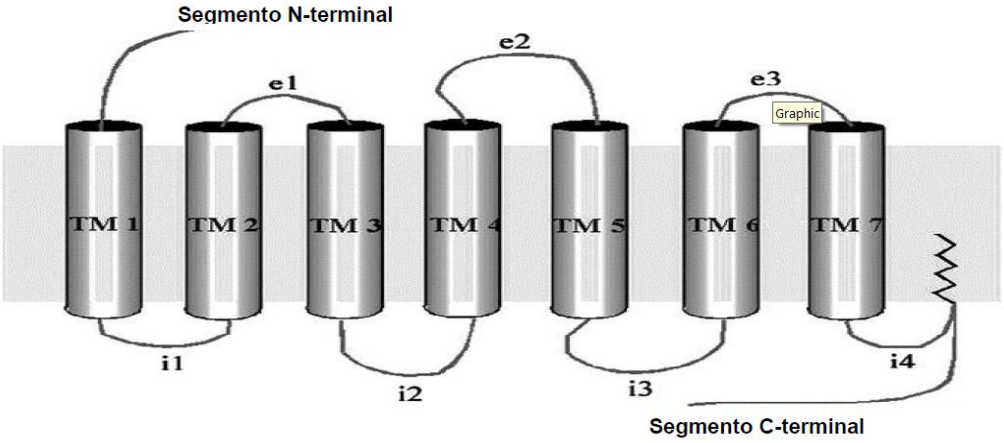


Fig 6. Estructura de los receptores acoplados a proteínas G. TM (Dominios transmembranales), i (asas internas), e (asas externas) y segmentos terminales.

Las asas extracelulares son de distinto tamaño entre los GPCRs, de las cuales e1 tiene un tamaño más estable que oscila entre 3 y 18 aminoácidos, las otras dos asas (e2 y e3) tienen mayor variabilidad en su tamaño, en contraste las asas citoplasmáticas son similares entre los GPCRs, el asa i1 consta de 5-7 aminoácidos, la i2 de 10-12 aminoácidos, de forma especial i3 que es el sitio de acople a proteína G y la cadena C- terminal cuya longitud más frecuente es de aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, que contiene

secuencias de aminoácidos adecuadas para la unión de esta C- terminal a la membrana. El que se conserven relativamente los dominios intracelulares sugiere un mecanismo común por el cual los GPCRs activan a las proteínas G. El asa (i3) parece ser el sitio de mayor interacción con la proteína G. Los siete dominios TM son diferentes en sus fases extra e intracelulares, cada uno posee entre 20 y 27 aminoácidos, primordialmente TM III el cual posee un aminoácido inmediatamente después de una cistina conservada, el cual indica el tipo de ligando para el receptor.

Cuando son activados por los ligandos apropiados los GPCRs usualmente pueden reconocer y activar más de una proteína G pero solo interactúa con un subtipo específico de las muchas y estructuralmente similares proteínas G expresadas en una célula; la información estructural codificada para reconocer el tipo de proteína G que se va a acoplar reside en las secuencias de aminoácidos. El acople a una proteína G responsable de un efecto particular sobre una vía de señalización intracelular requiere de una estructura específica de las asas citoplasmáticas y de la región C-terminal de los GPCRs.

Las proteínas G otro tipo de receptores forman una superfamilia de proteínas que se unen a GTP, esta superfamilia incluye las clásicas proteínas heterotriméricas, la cual cuando se une a GTP se encuentra en un estado activo y cuando se une a GDP esta inactiva, estas proteínas están constituidas por tres subunidades, una α, una β y una γ . Se conocen 16 diferentes subunidades α (entre 42 a 50 KDa), cinco subunidades β (entre 33 a 35 KDa) y 11 subunidades γ (entre 8 a 10 KDa). Este compuesto heterotrimérico se une a la parte interna de la membrana citoplasmática principalmente por la subunidad α la cual interactúa con grupos miristil o palmintoil de esta y la subunidad γ lo hace por medio de un grupo frenilo.

La subunidad α tiene ocupado su sitio de unión con el nucleótido de guanina GDP en la forma inactiva de la proteína G y la interacción del receptor activado con el heterotrímero promueve un cambio conformacional que facilita la liberación de la unión

a GDP y estimula la unión o enlace de GTP, de este cambio GDP-GTP se estimula la disociación del complejo del receptor a si como el desensamblaje del trímero en una subunidad α libre y un complejo βγ, la libre y activa subunidad α unida a GTP ahora puede interactuar en el plano membranal citoplasmático con efectores como lo son la adenil ciclasa y fosfolipasas; de forma similar el complejo βγ ahora puede activar canales iónicos u otros efectores.

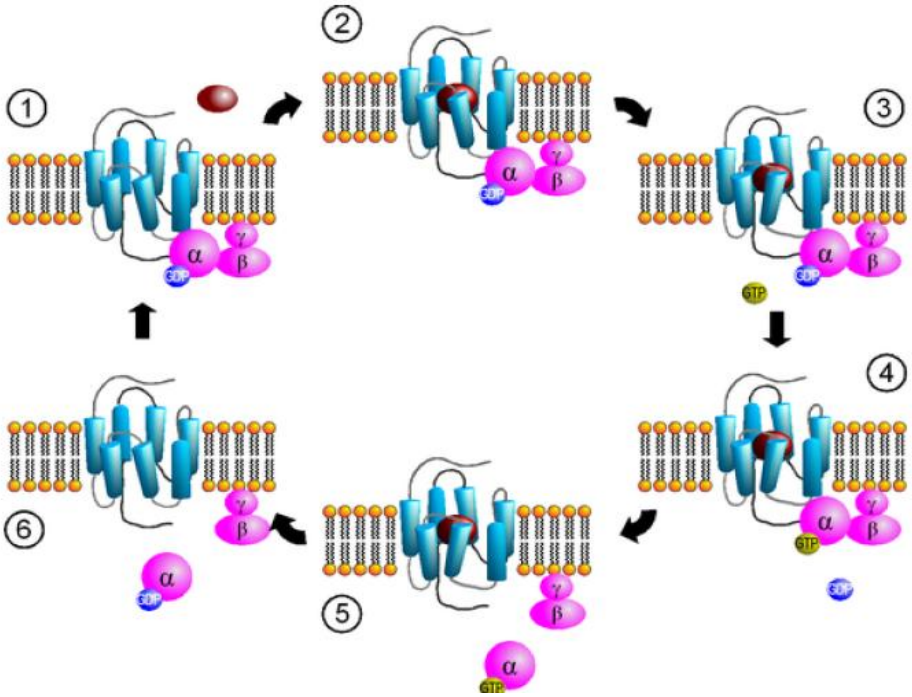


Fig 7. Secuencia de activación de los receptores acoplados a proteínas G e inactivación del ligando al receptor. 1) Unión del ligando al receptor, 2) Activación de la proteína G, 3) Union de GTP a la subunidad alfa, 4) Desacople de la unión GDP de la subunidad alfa. 5) Separación de las fracciones activas, 6) Activación por cada una de estas subunidades de las vías de señalización intracelular.

Otro tipo de receptores son los receptores ligados a cinasas, este tipo de receptores inciden principalmente sobre la transcripción génica, la mayor parte

constituidos por una sola cadena de hasta 100 residuos, con un gran dominio extracelular y uno intracelular de variadas dimensiones y funciones, este tipo de receptores con actividad tirosin cinasa (RTK) presentan cuatro dominios importantes: un dominio extracelular que se une al ligando, un dominio intracelular cinasa de tirosina, un dominio intracelular regulatorio y un dominio transmembrana. Las proteínas de RTK se clasifican en las familias de acuerdo a sus características estructurales en sus porciones extracelulares (así como también de acuerdo a la presencia o ausencia de dominios de cinasa). En base a la presencia de estos diversos dominios extracelulares los RTKs se ha subdividido en por lo menos 14 diversas familias. Muchos receptores que tienen actividad intrínseca de tirosina cinasa así como también tirosina cinasas que están asociadas a receptores de la superficie de las células contienen residuos de tirosinas, que luego de su fosforilación, interactúan con otras proteínas de la cascada de señalización intracelular. Las RTK de plantas son también responsables de respuestas a patógenos estando además involucradas en el desarrollo. Estas cinasas deberían ser constitutivas, considerando las rápidas respuestas celulares (como las respuestas a inositol-P y Ca 2+) cuando las plantas son expuestas a un estrés (Hong *et al*., 1997).

Los receptores RLKs se han encontrado en plantas y animales, estructuralmente consisten en un dominio extracelular que funciona en la unión del ligando, un dominio transmembranal y un domino cinasa intracelular. En Arabidopsis un gen que codifica para un receptor cinasa con un dominio extracelular rico en leucina RPK1 se induce una hora después por deshidratación, salinidad y bajas temperaturas (Hong *et al*., 1997).

Uno de los principios básicos en la transducción de señales es la amplificación de la señal que ocurre al pasar de un componente a otro, está amplificación se logra gracias a los segundos mensajeros, se les llama así a un grupo de moléculas pequeñas que acarrean la información codificada por los receptores. Para que una molécula pueda

funcionar como segundo mensajero en el proceso de señalamiento debe estar sometida a un reciclaje rápido y continuo; en la mayoría de los casos los segundos mensajeros tienen vida media corta y son rápidamente degradados y resintetizados. La interacción de los ligandos a sus receptores activa a proteínas efectoras que se encuentran cerca de la membrana, lo que permite catalizar la transformación de moléculas precursoras en segundos mensajeros. Uno de estos segundos mensajeros es el Ca^{2+} que se encuentra involucrado en diversos procesos de señalización intracelular (Sanders *et al*., 1999). Una de las primeras respuestas al estrés salino es el incremento de Ca^{2+} en el citosol derivado de depósitos internos (Knight, 2000). El aumento citosolico del Ca^{2+} ejerce su acción a través de estructuras que poseen alta afinidad especifica por este catión, como es el caso de la calmodulina, que es una proteína que se ha encontrado en todas las célula eucariontes y cuya función es la de ser un receptor de calcio intracelular. Es un polipéptido de 150 aminoácidos y con cuatro sitios de unión al calcio. Entre las proteínas blanco reguladas por Ca^{2+} hay varías enzimas como las dependientes de calcio (CDPKs) se encuentran implicadas como sensores de la salida de Ca^{2+} en respuesta al estrés salino. Las CDPKs presentan cuatro dominios: el dominio catalítico, el dominio auto-inhibitorio, un dominio variable y un dominio especifico para la unión de Ca^{2+}. Todas las CDPKs caracterizadas hasta el momento son activadas por Ca^{2+} (Harper *et al*., 1993). Las DPPKs caracterizadas en Arabidopsis presentan en el dominio que une al Ca^{2+} cuatro secuencias de aminoácidos. La expresión de AtCDPK1 y AtCDPK2 de Arabidopsis fueron rápidamente inducidas por salinidad y sequía (Urao *et al*., 1994). La fosfolipasa C (PLC) hidroliza a PIP2 formando dos segundos mensajeros el Inositol trifosfato (IP3) y el Diacilglicerol (DAG). El IP3 es una molécula pequeña que deja la membrana plasmática y se difunde rápidamente a través del citosol y al llegar al retículo endoplasmico libera Ca^{2+} al enlazarse a otros canales incrementado su liberación. Por

otro lado el DAG es un segundo mensajero lipídico que se ancla a la membrana plasmática por medio de las cadenas laterales hidrofóbicas de los ácidos grasos y activa a una familia de enzimas de señalización conocidas como PKC.

Las plantas tienen varias MAPK cinasas que son activadas por estrés osmótico, en la alfalfa la 46-Kd MAP cinasa llamada SIMK se activa en respuesta a estrés hiperosmotico (> 750 mM de NaCl) (Munnik, 1999) la enorme complejidad de las MAPKs cinasas puede ser vista en un estudio que muestra que al menos tres cinasas en *Arabidopsis* fueron enzimáticamente activadas por sal, frío y otras señales ambientales (Ichimura, 2000). En células de tabaco la SIPL (una MAPK) y otra proteína cinasa HOSAK fueron activadas por estrés osmótico y su activación fue independiente de Ca^{2+} y ABA (Hoyos and Zhan 2000). Estas proteínas se activan en diferentes tiempos al inicio del estrés (Mikolajczyk, 2000) y a diferentes niveles (Munnik, 1999).

Son las encargadas de transmitir señales generadas por estímulos tanto extra como intracelulares hacia el núcleo de la célula. Las cascadas de señalización llevadas a cabo por estas proteínas es probable que se conserve en los eucariontes (Xiong y Zhu, 2001). La cascada de señalización consiste en tres cinasas que se activan de forma secuencial. La MAPK cinasa cinasa cinasa (MAPKKK) fosforila a una MAPK cinasa cinasa (MAPKK). Esta MAPKK cinasa a su vez fosforila a una MAPK cinasa (MAPK) en residuos conservados de tirosina y treonina. La MAPK activa puede migrar al núcleo y activar componentes de señalización que regulan el ciclo celular, síntesis de proteínas, muerte y diferenciación celular o la activación de factores de transcripción directamente.

Los Factores de transcripción activan o inhiben la regulación de genes que se inducen por diversos tipos de estrés interactuando con ellos mismos y otras proteínas.

Los Factores de transcripción se unen en secuencias regulatorias del DNA, habitualmente en regiones promotoras ubicadas hacia el extremo 5’ de la cadena, de genes que son blanco de su acción, aumentando o a veces disminuyendo su tasa de transcripción, están compuestos de un sitio de unión al DNA, un sitio de oligomerización, un sitio de activación y una señal de localización nuclear (Fig. 8).

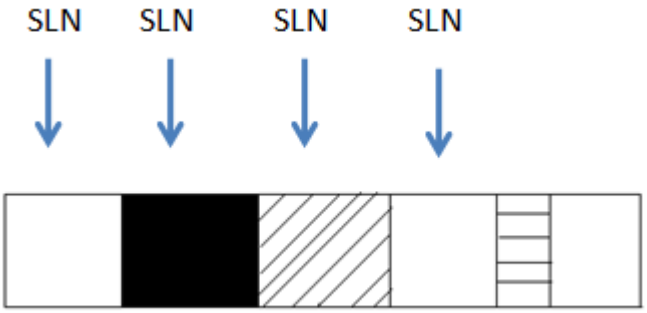


Fig 8. Representación de los dominios funcionales de un factor de transcripción. Cuadro sólido: dominio de unión al ADN; cuadro obscuro: dominio de oligomerización, cuadro escalonada: dominio de activación; cajas abiertas función inespecífica. La SLN puede variar en número y posicionarse en los diferentes dominios de activación (Liu, et al., 1999).

Dominio de unión al DNA: Presentan un dominio que funciona en el reconocimiento y unión al DNA como consecuencia de una extensa complementariedad entre la superficie de la proteína y de la secuencia reconocida; este dominio de unión presenta residuos de aminoácidos altamente conservados y que presentan una gran especificidad; por ejemplo el factor GT-2 pierde su actividad cuando una prolina es substituida por otro aminoácido. Usualmente cada factor de transcripción presenta solo un dominio de unión al DNA presentados en una o varias copias; el factor MybST1 de Solanum tuberosum y el CCA1 de Arabidopsis presentan una sola copia a diferencia de

algunos dedos de zinc C2C2 y AP2 (APETALA) que presentan dos dominios de unión al DNA (Meissener *et al*., 1997).

Dominio de oligomerización: Este dominio actúa, afectando la especificidad con el DNA, la afinidad de los factores de transcripción con la secuencia promotor y la localización nuclear (Sainz et al., 1997). Las secuencias de aminoácidos de este dominio son altamente conservadas y en combinación con la unión del DNA forman arreglos tridimensionales (Fig 9). Dentro de una misma familia de factores la longitud del dominio de oligomerización puede diferir. Esta variación en el dominio de oligomerización incrementa la versatilidad de la maquinaria transcripcional y la modulación de la expresión génica en plantas.

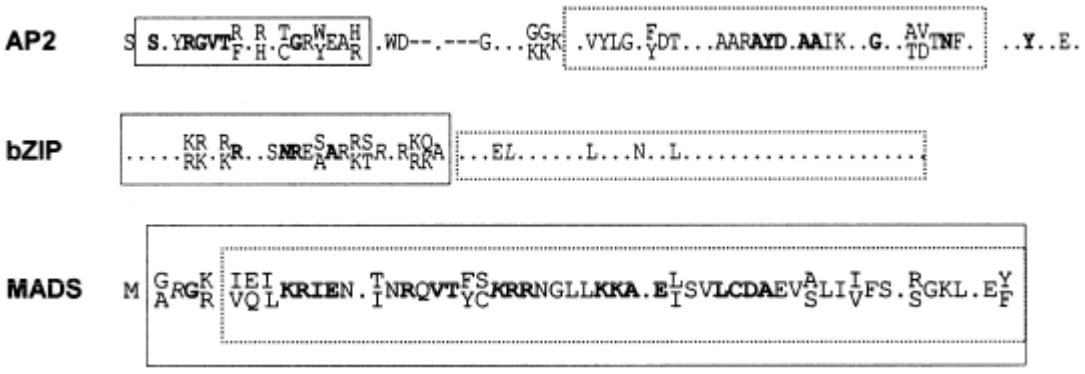


Fig 9. Representación del dominio de unión al DNA y el dominio de oligomerización en tres factores de transcripción (Liu *et al*., 1999). El domino de unión al DNA y el dominio de oligomerización pueden estar separados por varios residuos (AP2), adyacentes uno del otro (bZIP) o sobrelapados (MADS). Cajas solidas representan dominios de unión al DNA y cajas punteadas representan dominios de oligomerización.

Dominios de regulación de la transcripción: Los factores de transcripción de una misma familia generalmente presentan diferentes funciones, pueden actuar como

activadores o represores de la expresión génica. Un dominio de activación usualmente contiene de 30 a 100 residuos de aminoácidos y algunos factores llegan a presentar hasta dos dominios de activación. En los últimos años, los dominios de activación de la transcripción de las plantas superiores han sido ampliamente estudiados. Se ha revelado que dominios de activación presentan regiones enriquecidas con los aminoácidos prolina (P) y glutamina (Q) aunque estos no son necesariamente importantes para su función. Mutagenesis sitio dirigida de los dominios de activación del maíz demuestran que solo un aminoácido de once nombrado aspartato 256 es esencial. Leucina 253 también está involucrado en la activación de la transcripción (Sainz *et al*., 1997). La represión de la expresión génica puede ocurrir por competir por el mismo sitio de la región promotora, otro posible mecanismo el enmascaramiento de los dominios de regularización por dimerización de los factores, por la interacción del dominio de represión con los factores y la alteración de la estructura del DNA a través de ciertos mecanismos aún desconocidos (Quiang *et al*., 2001).

Señal de localización nuclear (SLN): Presenta una secuencia corta de aminoácidos rica en residuos de arginina (R) y lisina (K) que controla la entrada de los factores de transcripción al núcleo. Dentro de los factores de transcripción de las plantas la SLN varía en secuencia, organización y numero (Tabla 8). Puede existir sola una SLN en la que los residuos de arginina y lisina se encuentran asociados, o una sola SLN donde estos aminoácidos forman dos grupos funcionales separados por residuos no conservados lo que se llama una estructura bipartita (SB) (Lick *et al*., 1999). Otros factores presentan multiples copias que funcionan independientemente (Boulikas *et al*., 1994) y se encuentran agrupadas o dispersas dentro de la proteína. Algunos factores llegan a carecer de SLN y son importados al núcleo por dimerización de otras proteínas que poseen está señal (Goldfarb, A y Lewandowska, K 1994).

Tabla 8. Secuencia, Organización y Localización del dominio de SLN.

Tipo de SLN	Secuencia de Aminoácidos	FT	Localización de SLN
SC	KRIAEGSKKRRIKQD	HSF1 Tomate	Dominio de oligomerización
SB	RKDKQRIEVGQKRRLTM	HSF2 Tomate	Dominio de oligomerización
DB	KKCKEKFENVHKYYKRTK	GT2 Arabidopsis	Dominio N-terminal
	KRCKEKWENINKYFKKVK	GT2 Arabidopsis	Dominio C-terminal
	RKRKESNRESARRSRYRK	Opaque 2 Maíz	Región del dominio bZIP
	RRKLEEDLEAFKMTR	Opaque 2 Maíz	Cerca del dominio de activación
MC	ERSKKRSRE	bZIP Tabaco TAF-1	Región inespecífica N-terminal
	ERELKREKRKQ	bZIP Tabaco TAF-1	Región del dominio bZIP
	ARRSRLRKQ	bZIP Tabaco TAF-1	Región del dominio bZIP
MB	PAA.KRK...S...SP...VRVLRS	ZmHox2a	Región inespecífica N-terminal

La SLN contiene solo una copia (SC), solo bipartita (SB), Doble bipartita (DB), Continuos múltiples (CM) o múltiple bipartita (MB).

Tabla 9. Cuadro Comparativo de la proporción de genes codificantes de FTs en los genomas de algunas plantas (con negritas se resaltan las especies que se conoce su genoma). (Tomado de http://drtf.cbi.pku.edu.cn/).

Especie	Num. FTs	Familias FTs	% Posible FTs
Oriza sativa* ssp *japonica	2025	63	6.30%
Oriza sativa* ssp *indica	2384	63	7.40%
Populus trichocarpa	2576	64	5.70%
Arabidopsis thaliana	1996	64	7.90%
Physcomitrella pattens	1170	57	3.90%
Malus domestica	1025	68	
Lotus japonicus	457	52	
Solanum tuberosum	1341	64	

Exhiben diversas estructuras y son agrupados en diversas familias como AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC, Cys2His2 zinc-fingers and WRKY. Siendo las plantas las que presentan un mayor número de FTs y que no comparten con otros

eucariontes; por ejemplo Arabidopsis presenta más de 100 miembros, siendo las familias MYB , AP2/EREBP, y C2H2 las más numerosas (http://drtf.cbi.pku.edu.cn/).

FTs de cierre de Leucina (b-ZIP). Se denominan así por la forma de dos hélices alfa, una de cada monómero, se mantienen unidas formando un enrollamiento. Las hélices se mantienen unidas por interacciones entre las cadenas laterales hidrofóbicas de algunos aminoácidos especialmente leucinas que se extienden desde un lado de cada hélice, después del dominio de dimerización las dos hélices alfa se separan una de otra formando una Y, lo que permite a sus cadenas laterales contactar con el surco mayor de DNA. Varios b-ZIP se unen a elementos en cis conocidos como ABRE que responden a deshidratación y/o ABA. En *Arabidopsis* se encuentran 72 miembros y en el arroz 88 (http://drtf.cbi.pku.edu.cn/).

FTs tipo MYB. Forma una hélice-giro-hélice de aproximadamente 53 aminoácidos. Consta de dos hélices alfa conectadas por una corta cadena de aminoácidos que forman el giro, la hélice más próxima al extremo carboxilo se denomina hélice de reconocimiento pues se adapta al surco mayor del DNA, presenta residuos de triptófano regularmente espaciados y se une al DNA como un dimero. Los genes MYB codifican proteínas que poseen dominios de unión a DNA en el extremo amino terminal, que pueden estar compuestos de uno, dos o tres motivos semiconservados y cada motivo presenta 50-52 aminoácidos (Strake *et al*, 2001). En *Arabidopsis* se encuentran 150 miembros.

FTs tipo MYC. Poseen un dominio básico de unión a DNA tipo “hélice bucle helice” (bHLH). El subdominio HLH es la región responsable para la dimerización de la

proteína. Un motivo HLH está formado por una hélice alfa conectada por un bucle a una hélice alfa más larga, la flexibilidad del bucle permite que una de las hélices se doble y quede alineada con la otra. En *Arabidopsis* se encuentran 160 miembros.

FTs tipo ERF/AP2. Estas proteínas son una subfamilia de APETALA2 (AP2)/ proteínas que se unen a elementos de respuesta de etileno (EREBP) y que son únicos en plantas. Se estima que Arabidopsis presenta 124 ERF (Riechmann *et al*., 2000). Las proteínas ERF comparten un dominio conservado de 58-59 aminoácidos que puede unirse a dos elementos en cis: la caja GCC que se encuentra presente en varios promotores de genes que están relacionados con la respuesta a patógenos y también se une a elementos DRE involucrados en la respuesta a deshidratación y bajas temperaturas (Singh et al., 2002). Los niveles de RNA de genes específicos ERF son regulados por frío, sequía, infección por patógenos y tratamiento con etileno, muchos ERF actúan como activadores en la regulación de múltiples genes (Oñate *et al*, 2002). Estos factores han incrementado la tolerancia a la salinidad en algunas plantas; sin embargo la sobreexpresión de estos a causado efectos deletéreos (Liu *et al*., 1998).

FTs tipo WRKY. Las proteínas WRKY son una familia de factores de transcripción únicamente presente en plantas y forman una familia de 74 miembros en Arabidopsis (Robatzek y Somssich 2002). Contienen uno o dos dominios WRKY y una región de 60 aminoácidos que contiene una secuencia característica WRLYGOK. Los miembros de esta familia muestran una mayor expresión y/o unión al DNA cuando se inducen por patógenos y heridas, por ejemplo se ha revelado que 49 FTs de los 74 genes WRKY en Arabidopsis fueron regulados en respuesta por infección de patógenos (Dong *et al*., 2002). Las proteínas WRKY se unen a la caja W que se encuentra en el

promotor de genes de defensa de varias plantas, las secuencias presentes en la caja W se encuentran en grupos dentro de un promotor corto (Chen *et al*., 2002) sugiriendo que este tipo de proteínas actúan sinérgicamente con otros WRKY y/u otra clase de factores de transcripción.

Los factores de transcripción se expresan constitutivamente o al responder a algún estimulo, difiriendo en su tiempo de expresión (De Vetten, 1995). La luz, hipoxia, altas y bajas temperaturas, sequía, salinidad influyen en la expresión de los factores.

Los genes inducidos por estrés incluyen genes de respuesta temprana y genes de respuesta tardía. Los primeros son inducidos en pocos minutos y a menudo transitoriamente. Su inducción no requiere de síntesis de nuevas proteínas, ya que estos componentes de señalización serían constitutivos. En contraste, los genes de respuestas tardías son activados más lentamente (en horas) y su expresión es generalmente sostenida durante el tiempo en que el estrés se encuentra actuando. Los genes tempranos codifican factores de transcripción que activan a los genes de respuesta tardía, que constituyen la vasta mayoría de los genes inducidos por estrés

La expresión y actividad de los FTs está regulada por varios procesos incluyendo regulación transcripcional y modificaciones postraduccionales (Espenshade *et al*, 2007). En muchos casos los factores transcripcionales son sintetizados y permanecen dormantes en el citoplasma hasta que son activados a través de la interacción con otros factores (Neuman *et al*, 2007).

Entre los 89 genes "homebox" (Reichmann *et al*, 2000) reportados en Arabidopsis, 47 codifican para proteínas que son codificados por cierres de leucina (Ruberti *et al*, 1991). En Arabidopsis los HDZip clase I incluyen 17 genes entre ellos el ATHB6 actúa durante la germinación de la semilla y en el cierre de los estomas (Himmelbach *et al*, 2002). En la clase II existen nueve HDZip en esta clase los genes

ATHB2 inducen la elongación del cotiledón y se ha encontrado que regulan la morfogénesis mediante auxinas. Los HDZip clase III ATHB8 y ATHB15 están involucrados en el desarrollo vascular. Varios factores Myb y Myc que están implicados en la biosíntesis de pigmentos, AtMYB60 y R2R3-MYB que funcionan en la regulación del movimiento de los estomas; AtMYB21 en el desarrollo de la floración, mientras que la familia de factores de transcripción *APETALA1* (*AP1)* y *APETALA2* (*AP2*) están involucrados en diversos aspectos de desarrollo de las plantas. En Arabidopsis y Antirrhinum el *AP1* interviene en el desarrollo de sépalos y pétalos, pero también interviene en el propio meristemo floral. *AP2* está involucrado en el desarrollo de óvulos e incluso en hojas, así como en la respuesta de las plantas al estrés ambiental (Wenquion *et al*, 2005). FTs AtMYB60 funcionan en la regulación de los movimientos de los estomas. Mientras que el dedos de zinc Zat6 está involucrado en el desarrollo de la raíz en Arabidopsis (Devaiah *et al*., 2007). En plantas se han descrito varios factores relacionados con Myb y Myc que están implicados en la biosíntesis de pigmentos.

Miembros de la misma familia de factores de transcripción responden de una forma diferente a un mismo estimulo, así mismo genes que se inducen por algún tipo de estrés comparten los mismos factores de transcripción; por ejemplo en Arabidopsis más de la mitad de los genes inducibles por sequía también están inducidos por altos niveles de salinidad y / o por ABA, pero sólo el 10% son inducidas por el frío (Himmelbach *et al*., 2002). Como consecuencia, los diversos estreses ambientales suelen activar diversas vías de respuesta y señalización celular similares. Así mismo miembros de una misma familia no necesariamente responden al mismo estimulo, por ejemplo algunos genes de la familia bZIP son regulados por luz (Weisshaar *et al*., 1991) mientras que otros responden a auxinas y acido abscisico (98).

Entre los genes que se inducen en el estrés salino, se encuentran genes que codifican para proteínas del grupo LEA, involucradas en la protección de los componentes celulares del estrés osmótico impuesto por la salinidad.

Las proteínas LEA existen como dímeros, la parte polar de estos dímeros es capaz de secuestrar iones y contrarrestar el déficit hídrico impuesto por el estrés salino. Se ha sugerido que unen moléculas de agua y pueden actuar como chaperonas, estabilizando la superficie de las membranas. Genes que codifican para este tipo de proteínas LEA se expresan en los tejidos en respuesta a la salinidad, sequía y bajas temperaturas (Hsing *et al*., 1995).

Sobrevivir al estrés salino involucra la participación de genes que codifican para diversos transportadores que permiten la exclusión y/o compartimentación de Na^+. El Na^+ es activamente excluido del citosol y secuestrado en la vacuola, permitiendo el movimiento del agua en la célula. La salinidad también perturba los niveles de Ca^{2+} que incrementa en el citosol. Guerrero y Crossland (1993) reportan el incremento de la expresión de genes que codifican para proteínas transmembranales que actúan como canales facilitando el movimiento de agua y de pequeñas moléculas a través de la membrana.

El estrés salino también involucra la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo; en *M. crystallinum* una planta CAM modifica su metabolismo bajo el estrés salino. Estos cambios en la planta le permiten conservar agua debido a que permanecen cerrados los estomas durante el día. Así mismo la expresión de enzimas PEPCse, NADP malato deshidrogenasa y NADP málico se han reportado también en esta planta en respuesta a este tipo de estrés (Cushman *et al*., 1989). Genes que codifican para gliceraldehido- 3 -fosfato dehidrogenasa y

fosfogliceromutasa también se han reportado en *M. crystallinum* (Foresthofel *et al*., 1995).

La expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el ajuste osmótico en la biosíntesis de prolina, glicina betaina, azucares, polioles etc, se han reportado en varias plantas. P5CS está involucrada en la biosíntesis de glutamato en hojas y raíces de *Pisum sativum* en respuesta a estrés salino (Williamson *et al*., 1992). Genes que codifican para colina monooxygenasa y betaina aldehida dehydrogenasa involucradas en la conversión de glicina betaina se han observado en respuesta a salinidad en cebada, espinacas y remolacha (Rathinasabapathi *et al*., 1997). Vernon y Bonhert (1992) reportan el incremento en la actividad de metil transferasas que están involucradas en la conversión de inositol a pinitol bajo estrés salino.

Dado que los FTs controlan diversas vías de señalización involucradas en la resistencia a algún tipo de estrés, estos son considerados biotecnológicamente para la manipulación de su expresión; en algunos casos, inhibiéndola o sobreexpresandola, ya sea constitutivamente, o con la utilización de un promotor inducible con lo cual se generarán cambios en la expresión de estas proteínas afectando la señalización y en particular las respuestas a diversos estreses bióticos y abióticos (Shinosaki, 2003).

1.7 Factores de transcripción Dedos de Zinc.

Los dedos de Zinc son proteínas en las que el zinc contribuye a la estabilidad del dominio. Estas proteínas son estructuralmente diversas y presentan un gran rango de funciones como la replicación, reparación, transcripción y traducción, metabolismo, señalización, proliferación y muerte celular. Los dedos de zinc típicamente funcionan como módulos de interacción uniéndose a ácidos nucleicos, proteínas y pequeñas moléculas.

Los dedos de zinc tipo C2H2 son los más comunes presentan un dominio que consiste de treinta aminoácidos e incluye dos residuos conservados de cisteína y dos residuos conservados de histidinas unidos a un ion de zinc tetraédricamente. Cada dedo de zinc está formado por dos β plegadas y una hélice α (Fig 10).

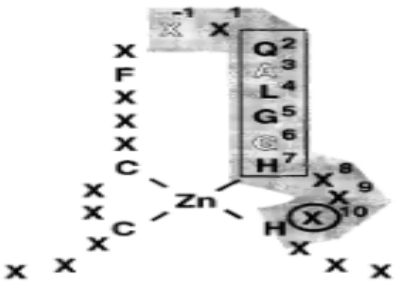


Fig. 10 Estructura del tipo dedos de zinc C2H2.

Análisis revelan que se encuentran 176 dedos de zinc tipo C2H2 en *Arabidopsis thaliana* con solo 33 de ellos conservados en otros eucariontes (Engelbrech, 2004). En la Tabla 10 se observa el número de dedos de zinc tipo C2H2 en algunas especies de plantas.

Tabla 10. Dedos de zinc C2H2 en algunas especies de plantas (Tomado de http://drtf.cbi.pku.edu.cn/).

ESPECIE	DEDOS DE ZIN C2H2
Arabidopsis thaliana	176
Oriza sativa ssp *japonica*	113
Oriza sativa ssp *indica*	94
Populus trichocarpa	81
Physcomitrella pattens	49
Malus domestica	32
Solanum tuberosum	56
Lotus japonicus	14

Los motivos Dedos de Zinc tipo C2H2 fueron descubiertos por primera vez en los ovocitos de Xenopus en el factor de transcripción TFIIIA (Miller *et al*., 1985). En

1992 se reporte el primer C2H2 en plantas que fue en Petunia ZPT2-1 (Takatzuji *et al*., 1992) posteriormente WZF1 en trigo una proteína que interactúa con los elementos en cis de las histonas de los genes (Sakamoto *et al*., 1993). Posteriormente varios dedos de zinc tipo TFIIIA se han reportado en diferentes especies de plantas incluyendo trigo, arroz y en Arabidopsis.

Los dedos de zinc tipo C2H2 en plantas se distinguen de otros eucariontes debido a que cada dedo de zinc está separado por largos espaciadores que varían en longitud y secuencias de proteína a proteína (Sakamoto *et al*., 2004) donde en levaduras y animales los C2H2 están más agrupados y separados por espaciadores que son cortos (seis a ocho aminoácidos). Presentan una secuencia conservada QALGGH (Fig. 11) que en plantas tiene como función la unión al DNA, mientras que las levaduras y animales carecen de esta secuencia conservada. Estudios recientes revelan que podrían funcionar como represores transcripcionales involucrados en la defensa y adaptación de las plantas a diversos tipos de estrés (Ciftzi, 2008).

Fig 11. Secuencia conservada QALGGH en la familia dedos de zinc de tipo C2H2.

Son clasificados en varios tipos basados en el número y orden de los residuos de cisteína e histidína que se unen al zinc (C2H2, C2C2, C2HC, C2C2C2C2). Y a su vez dependiendo del número de dedos de zinc se agrupan en subclases (Fig 12).

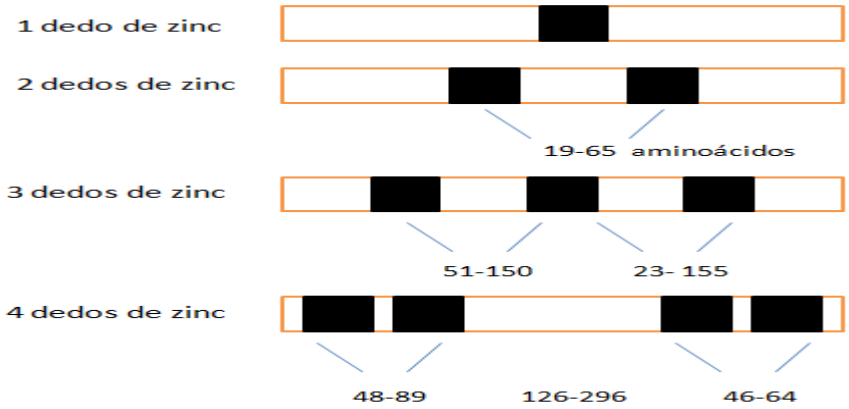


Fig. 12 Subclases de los dedos de zinc

La subclase 1 (33 miembros), la subclase 2 (20 miembros), la subclase 3 (8 miebros), la suclase 4 (2 miembros), la suclase 5 (1 miembro), siendo las subclases 1 y 2 las mas estudiadas en plantas (Yilmaz y Mittler., 2008).

La subclase 1 con 33 miembros es la más abundante, presentan solo un dominio dedos zinc C2H2. Actualmente varios miembros de está subclase se han investigado: Dos proteínas de está subclase ZFP8 (At2g41940) y GIS2 (At5g06650) son requeridas para la inducción de giberelinas en la iniciación de la maduración de tricomas. JAGGED (At1g68480) y NUBBIN (At1g13400) están involucradas en el crecimiento de las anteras y las valvas que están cerca de la región apical del gineceo que cubre los óvulos (Dinneny *et al*., 2007). Otro miembro de esta subclase es la proteína SUPERMAN (SUP AT3g23130), se ha propuesto que SUP mantiene el límite entre el tercero y cuarto vertilicio de las flores (Sakai *et al*., 1995).

La subclase 2 con 20 miembros incluyendo a Zat 5, Zat 6, Zat 7, Zat 8, Zat 10, Zat 11, Zat 12, Zat 13, Zat 14, Zat 15, Zat 16, Zat 17, Zat 18, AZF1, AZF2, AZF3, At5g04390, At1g02040, At2g26940 y At4g04404 muestran una gran homología en su primer y segundo dominio dedo de zinc. El Zat 10 se ha sugerido que se expresa en

todas los tejidos de Arabidopsis en respuesta a diferentes tipos de estrés incluyendo salinidad, altas temperaturas y frio (Mittler *et al*., 2006). El Zat 12 está involucrado en la tolerancia al frío y al estrés oxidativo en Arabidopsis (Davletova *et al*., 2005). Zat 12 es requerido para la expresión de enzimas como ascorbato peroxidasa 1 (APX1) durante el estrés oxidativo (Rizhsky *et al*., 2004), sugiriendo que la expresión de Zat 12 es esencial en el metabolismo de Arabidopsis en defensa al estrés oxidativo. Todos los AZFs están involucrados en respuesta al estrés hídrico en Arabidopsis (Sakamoto *et al*., 2000). El AZF1 responde al estrés salino y frío mientras que AZF2 es inducido por ABA y salinidad.

La subclase 3 comprende ocho proteínas, todas con tres dominios dedos de zinc, entre ellos solo el Zat1 ha sido caracterizado (Meissner, 1997). Dentro de está subclase se encuentran los ZPT3-2 y ZPT3-1 que se expresan en gametofitos masculinos (Takatsuji, 1999). Mientras que la subclase 4 ZPT4-1 y ZPT4-3 se expresan en polen y microsporas respectivamente, mientras que ZPT4-2 en las anteras.

Las proteínas SUPERMAN, AtZFP1, PetSPL3 y BcZFP1 están involucradas en el desarrollo de distintos órganos florales, probablemente a través del control de división celular y/o expansión de determinados tipos celulares. Mientras que los de la subclase STZ y Zat están involucrados en la respuesta a la tolerancia a diversos tipos de estrés (Takatsuji, 1999)

Tabla 11. Dedos de Zinc C2H2 (Tomado de Takatsuji, 1999).

PROTÉINAS	NUM. DE DEDOS	FUNCIÓN	EXPRESIÓN	ESPECIE	REFERENCIA
SUPERMAN	1	Control en la división celular en los órganos florales.	Primordios Florales	Arabidopsis	Sakai *et al.*, 1995
AtZFP1	1	Desconocido	Tejidos	Arabidopsis	Tague *et al.*, 1997
AtZFP8			Vasculares		
PetSPL3	1	Desarrollo de tallos	Brotes	Petunia	No publicado

			Axilares		
ZPT2-1	2	Union al DNA por el gen EPSPS	Petalos	Petunia	Takatsuji *et al*., 1992
ZPT2-2	2	Desconocido	Petalos Estambres Estrés	Petunia	Takatsuji *et al*., 1994
ZPT2-3	2	Desconocido	Sepalos Petalos Estrés	Petunia	Takatsuji *et al*., 1994
WZF1	2	Unión al DNA por las histonas	Todos los Tejidos	Trigo	Sakamoto *et al*., 1993
BcZFP1	2	Iniciación de la hoja	Primordio de hojas	Col	No publicado
PCP1	2	Metabolismo del carbono	Desconocido	Papa	Takatsuji *et al*., 1998
STZ	2	Tolerancia a la salinidad	Induce por Salinidad	Arabidopsis	Lippuner et al., 1996
ZPT2-4 y ZPT2-14	2	Desconocido	Varios tejidos	Arabidopsis	Takatsuji *et al*., 1998
ZAT2 y ZAT 12	2	Desconocido	Varios tejidos	Arabidopsis	Takatsuji *et al*., 1998
Pszf1	2	Desconocido	Flores	Guisante	Takatsuji *et al*., 1998
ZPT3-2	3	Gametogenesis ?	"Tapetum"	Petunia	Kobayashi et al., 1998
ZPT3-1	3	Gametogenesis ?	Microsporas	Petunia	Kobayashi et al., 1998
ZPT3-3	3	Desconocido	No determinado	Petunia	Kobayashi et al., 1998
ZAT1	3	Desconocido	Todos los tejidos	Arabidopsis	Takatsuji *et al*., 1998
ZPT4-1	4	Gametogenesis ?	Polen	Petunia	Kobayashi *et al*., 1998
ZPT4-3	4	Gametogenesis ?	Microsporas	Petunia	Kobayashi *et al*., 1998
ZPT4-2	4	Desconocido	Anteras	Petunia	Kobayashi *et al*., 1998
ZPT4-4	4	Desconocido	No determinado	Petunia	Kubo *et al*., 1998

2. ANTECEDENTES.

Actualmente los análisis genéticos y moleculares han facilitado el descubrimiento de genes que se inducen con algún tipo de estrés, mientras que la ingeniería genética ha permitido sobreexpresar o reprimir la expresión de muchos de estos genes que regulan diversas vías relacionadas con la respuesta de tolerancia a las plantas. Entre los ejemplos que podemos mencionar se encuentran la sobreexpresión del factor de transcripción DREB1A que activa de manera coordinada los genes de estrés que contienen secuencias DRE (desiccation response element) en sus promotores. En Arabidopsis la sobrexpresión del gen *DREB1A* en condiciones de estrés ambiental, produce la tolerancia de las plantas a la desecación, la salinidad y el frío (Kasuga *et al.*, 1999).). La sobreexpresión de DREB1 de Arabidopsis en tomate produjo plantas tolerantes a sequía, estrés oxidativo y bajas temperaturas (Hsieh *et al*, 2002.). El mecanismo por el cual se produce este efecto involucra el cierre estomático rápido, el aumento de la concentración de prolina y de la actividad catalasa que reduce la acumulación de agua oxigenada. Otro ejemplo el gen SNAC1 que es regulada su expresión por un factor NAC fue aislado y caracterizado en arroz, este gen se induce por sequía en las células guarda; al sobreexpresar este gen en plantas transgénicas, encontraron que el arroz transgénico resistía mejor la sequía, y que producía más semillas (entre un 22 y un 35% más) que los controles no transgénicos en el campo y una fuerte tolerancia al estrés salino, está tolerancia se observa cuando las plantas se colocan a 200 mM de NaCl, además presentan un mayor peso fresco a diferencia de las plantas control. También resultó más resistente a la sequía y más tolerante a la salinidad durante la fase vegetativa. En ningún caso se vieron afectados el crecimiento o la productividad de las plantas transgénicas, ya que no hubo diferencias (Honghong *et al*., 2000). Por otra parte también se ha

observado que al reprimir la expresión del factor AtbZIP24 en plantas transgénicas de Arabidopsis colocadas a 125 mM de NaCl por 48 horas en hidroponía, muestra un mejor crecimiento y desarrollo que podría estar relacionado con la acumulación de Cl en las raíces y hojas (Popova *et al*, 2008). Plantas de tabaco sobreexpresando el gen ERF (Tsi) muestran resistencia al ataque por patógenos y estrés osmótico (Park, 2001). Mientras que la sobreexpresión de AtWRKY6 y AtWKY18 confiere tolerancia a infección por patógenos, retraso en el crecimiento y otros fenotipos relacionados con el estrés (Robatzek, 2002). Otro FT, el WXP1 de genera tolerancia a estrés hídrico por aumento de la síntesis de ceras en las hojas, evitando de esta forma la evaporación, mientras que la sobrexepresión del FT dedos de zinc ALFIN1 activa la expresión de MsPRP2 e incrementa la tolerancia a la salinidad en plantas de *Medicago truncatula.* (Zhang et a*l*, 2004). La sobreexpresión de DREBIA en plantas transgénicas exhibe la expresión constitutiva de genes que le confieren tolerancia al frío, deshidratación y salinidad a estas plantas (Kasuga *et al*., 1999). Así como la sobreexpresión del cpm10 en plantas de Arabidopsis les confiere tolerancia a la sequía y a la salinidad (Villalobos *et al*., 2004). La generación de mutantes ha permitido el poder estudiar factores de transcripción, ya sea mutantes ganancia o pérdida de función, una de las técnicas para llevar a cabo la generación de mutantes es por medio de la transformación con *Agrobacterium*. Las especies del género *Agrobacterium* son bacterias Gram-negativas aeróbicas obligadas que viven en el suelo. Ellas son capaces de desarrollar un crecimiento saprofítico o parasítico. *A. tumefaciens* causa tumores, enfermedad que se conoce como agalla de la corona. La capacidad patogénica de estas bacterias esta asociada a la presencia de megaplásmidos (150-200 pares de bases o Kb) llamados **Ti** (inductor de tumores). Se ha demostrado que durante la patogénesis un fragmento de estos plásmidos

llamado T-DNA (transferencia de DNA) es transferido a la célula vegetal, El T-DNA contiene genes que se expresan eficientemente en la célula vegetal infectada y producen síntesis de hormonas vegetales (llamados oncogenes porque son los responsables de la proliferación anormal del tejido) y genes que provocan la síntesis de opinas (fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria). *A. tumefaciens* es el caso más estudiado y utilizado en la transformación de plantas. El T-DNA está delimitado por dos repeticiones directas imperfectas de 25 pares de bases (bp) que lo flanquean, llamadas bordes derecho e izquierdo **(**Fig. 13). Estos bordes son los únicos elementos en *cis* necesarios para dirigir el procesamiento del T-DNA.

Fig. 13 Estructura del T-DNA.

Cualquier fragmento de ADN ubicado entre estos bordes puede ser transferido a la célula vegetal. Contrariamente a lo que sucede con otros tipos de secuencias móviles de ADN, el T-DNA no codifica los productos que median su transferencia.

El T-DNA es una región relativamente grande (20 Kb) que contiene genes con secuencias regulatorias. Luego de la adhesión de la bacteria a la célula vegetal, etapa en la que están involucrados genes cromosómicos (*chv* A, *chv* B, *chv* E, *cel*, *psc* A y *att*), se produce el procesado y la transferencia del T-DNA, mediados por los genes *vir* (por virulencia) que son inducidos por azúcares y compuestos fenólicos. Se conoce con mucho detalle la etapa de la patogénesis que ocurre en la bacteria (Gelvin, 2000). La región de virulencia (de alrededor de 30 Kb) está organizada en operones esenciales para la transferencia del T-DNA (*vir* A, *vir* B, *vir* D, *vir* G) lo que permiten incrementar la eficiencia de la transformación (*vir*C, *vir* E). Este mecanismo de ingeniería genética

natural es aprovechado para la transferencia de genes de interés a las plantas, para lo cual, los oncogenes y genes de síntesis de opinas, son reemplazados por un marcador seleccionable y el gen a transferir (Fig. 14). Es importante aclarar que la mutante seleccionada no presenta un T-DNA modificado es decir, no presenta un marcador o gen a transferir.

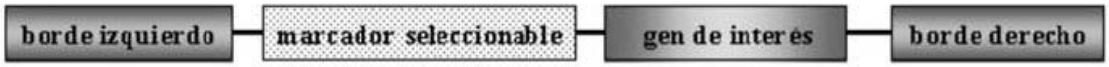


Fig. 14 T-DNA modificado.

Con el fin de conocer genes involucrados directamente en la respuesta de Arabidopsis a la salinidad, Shisong Ma *et al*., 2006 utilizando microarreglos y estudiando 1500 genes encontraron que 32 Fts son exclusivamente regulados por sodio en las raíces (Tabla 12). Estos resultados fueron publicados en bases de datos y para analizar la función de estos en la respuesta de Arabidopsis a la salinidad, nuestro enfoque es caracterizar fenotípicamente una mutante de pérdida de función generada por T-DNA y una de las colecciones que ofrece una mayor gama de mutantes es la colección SALK.

Tabla 12. Factores de transcripción inducidos por Na^+ en las raíces de Arabidopsis (modificado de Shisong Ma *et al*., 2006)

Factor	Número Genes	Factor	Número Genes	Factor	Número Genes
AP2-EREBP	9	ABI3-VP1	1	C2C2-CO	1
MYB	7	Bhlh	1	C2C2	1
WRKY	4	GRAS	1	C3H	1
Trihelix	2	HB	1	C2H2	1
AS2	2				

La caracterización de mutantes perdida de función en Factores transcripcionales que están involucrados en la regulación de genes de respuesta a estrés y en especifico a la salinidad es escasa (Mittler *et al*., 2006, Rizhsky *et al*., 2004). La caracterización y desarrollo de estas mutantes permitirá conocer con mayor detalle la expresión de muchos de estos genes abriendo la posibilidad de identificar FTs involucrados directa y exclusivamente en la respuesta de las plantas ante este tipo de estrés. Y estos FTs podrían ser candidatos en un futuro para generar plantas de interés agrícola tolerantes a estrés salino.

3. JUSTIFICACIÓN

La salinidad en México va en aumento y debido a que la salinización es un grave problema que ocasiona la perdida de millones de cultivos a nivel mundial y a que la genética clásica ha tenido sus limitaciones, la biotecnología moderna se encuentra lidiando por conferir a las plantas mayor resistencia a la salinidad mediante el uso de tecnologías de DNA recombinante.

La caracterización de mutantes pérdida de función en factores transcripcionales involucrados en la respuesta de adaptación al estrés en plantas superiores tiene un gran potencial biotecnológico; ya que, los factores transcripcionales al ser mediadores de la expresión de múltiples genes que se inducen por algún tipo de estrés, abren un panorama alentador en el control de procesos que permitan una mejor adaptación a la salinidad. Por otro lado, se podrían dilucidar las vías de transducción de señales en las que participan; ya que un análisis funcional de los mismos permitirá la identificación de elementos con los que interaccionen. O de otros, que participen en su regulación. Aunque a la fecha se han establecido las bases para el conocimiento de ciertos factores transcripcionales y para el entendimiento de su función en la respuesta a la salinidad, aun la información es muy limitada.

El propósito de está investigación es la caracterización fenotípica de una mutante perdida de función en un factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés salino utilizando a *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente una mutante pérdida de función en un Factor de transcripción involucrado en la respuesta a estrés salino y osmótico en *Arabidopsis thaliana*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

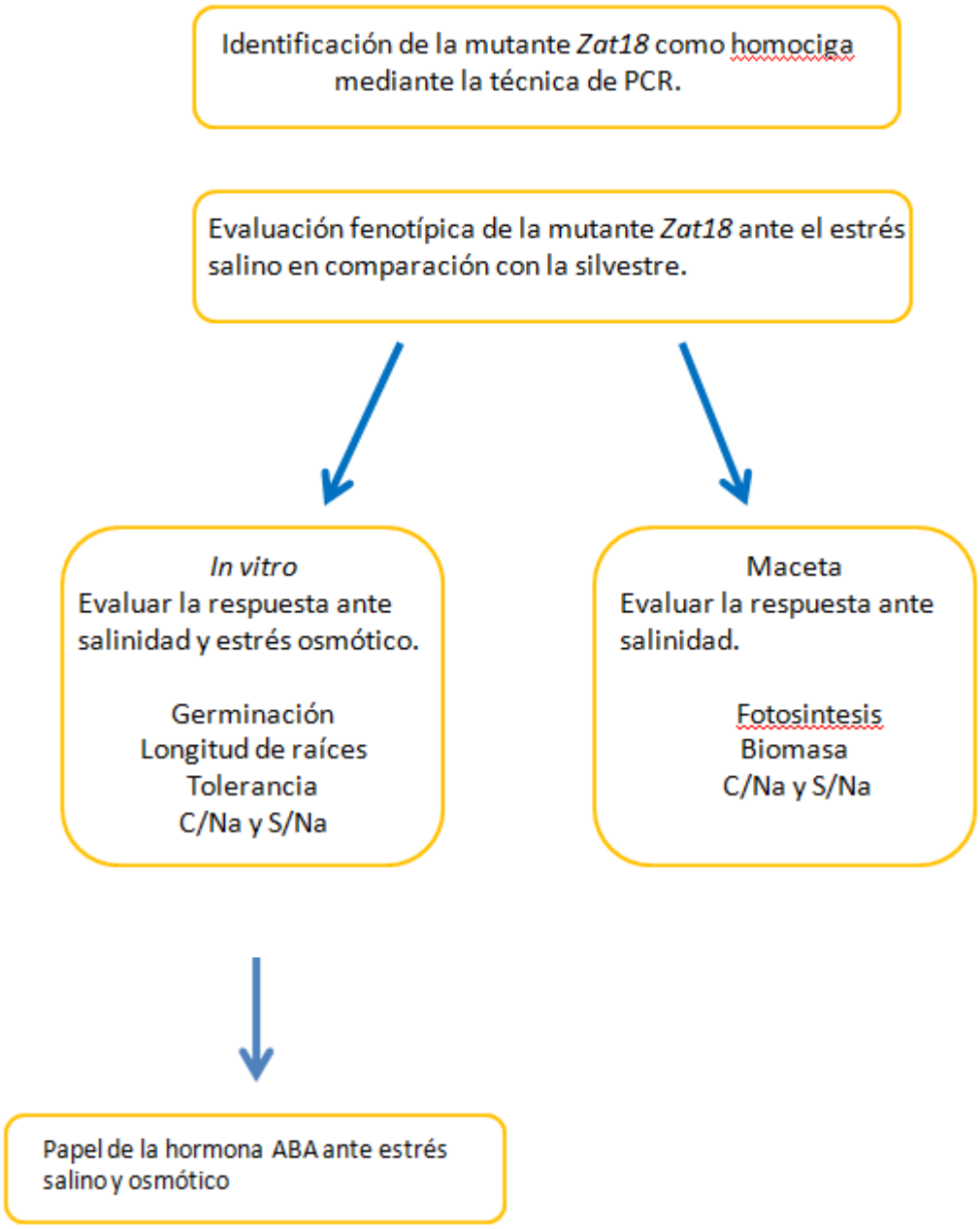
- Identificación de la mutante *Zat18* como homociga a partir de una colección de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en FTs regulados por estrés salino.
- Evaluación fenotípica de la mutante *Zat18* ante estrés salino (NaCl y KCl) en comparación con la silvestre en sistema *in vitro*.
- Evaluación fenotípica de la mutante *Zat18* ante estrés osmótico (Sorbitol) en comparación con la silvestre en sistema *in vitro*.

  - Evaluar la Germinación.
  - Medición de longitud de raíces.
  - Tolerancia.

- Evaluación fenotípica de la mutante *Zat18* ante el estrés salino en comparación con la silvestre en sistema maceta.

  - Medición de Fotosíntesis.
  - Medición de Biomasa.

5. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.



6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron utilizando cloro y etanol absoluto (Ver Anexo 1). Una vez las semillas estériles se sembraron en cajas petri, medio MS (Murashigue y Skoog, 1969) .5X 1% Sacarosa, para posteriormente ser colocadas en una bolsa y ser guardadas en el refrigerador a 4°C por tres días. Este tratamiento se denomina estratificación y tiene como fin que las semillas rompan la dormancia usualmente en frío para estimular la hibernación. Después de los tres días las cajas con semillas se colocaron en el cuarto de crecimiento con las siguientes condiciones: 23.7°C y 33% de humedad relativa.

6.2 Identificación de línea homóciga afectada en FT regulado por estrés salino y osmótico.

El primer objetivo consistió en identificar 13 líneas como homócigas a partir de una colección de mutantes de Arabidopsis afectadas en FTs regulados por estrés salino, pero debido a que el instituto donde se realizaron las mutantes perdida de función generadas por T-DNA dona una mezcla de semillas Heterocigas, Silvestres y homócigas, se realizó la técnica de PCR y el uso de dos oligonúcleotidos específicos para cada gen y un oligonucleótido del borde izquierdo del T-DNA, basándonos en un patrón de bandeo nos permite identificar la línea homociga; si obtenemos una banda de 90 pb corresponde a una planta silvestre, dos bandas de aproximadamente una de 900 y otra de 400 pb es una planta heterociga y una banda de aproximadamente 400 pb una planta homóciga, como se puede ver en la figura 15. Las semillas se sembraron en medio MS .5x 1% Sacarosa previamente esterilizadas por aproximadamente 10-15 días

(dependiendo de su crecimiento). Se tomaron una o dos hojitas, para extraer DNA genómico con un método rápido (Ver Anexo 2). El DNA genómico de cada una de las plantas, se utilizo como templado para hacer dos PCRs. Una usando los oligos específicos llamados RP y LP (posicionados en el 5 y 3´ respectivamente) específicos de cada FTs y una segunda PCR usando los oligos BP (del borde izquierdo) y el oligo RP.

Figura 15. Identificación de plantas homócigas.

6.3 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homóciga) ante estrés salino y osmótico en sistema *in vitro*.

De las trece líneas homocigas, se decidió seleccionar la línea Salk_027144 4 debido a que presento un fenotipo de mejor tolerancia al estrés salino a diferencia de las otras líneas. Posteriormente que se identifico la planta Salk_027144 4 como homóciga se evaluó la respuesta de esta planta y de la planta silvestre ante estrés salino utilizando Cloruro de Sodio (NaCl) y Cloruro de Potasio (KCl), así como estrés osmótico utilizando Sorbitol en sistema *in- vitro*, los parámetros a evaluar fueron germinación, longitud de raíces y tolerancia; mientras que en sistema maceta se evalúo estrés salino evaluando los parámetros de fotosíntesis y biomasa.

6.3.1 Cinética Dosis-Respuesta de germinación en NaCl.

Conociendo que la germinación es uno de los parámetros que se ven afectados ante el estrés salino, se realizo una cinética dosis-respuesta; se sembraron en medio MS .5X 1% sacarosa semillas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia 0 a diversas concentraciones de NaCl (0, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 mM). Esta cinética permitió establecer los parámetros de germinación de laboratorio y conocer que concentraciones se utilizarían para la evaluación del porcentaje de germinación de la planta silvestre y la planta mutante Salk_027144. Se realizaron tres replicas, sembrando 100 semillas respectivamente para cada tratamiento. Se consideró en estado de germinación a una semilla en el momento en el que la radícula fue visible y presentaba un tamaño más allá de la mitad de la semilla (Fig. 16).

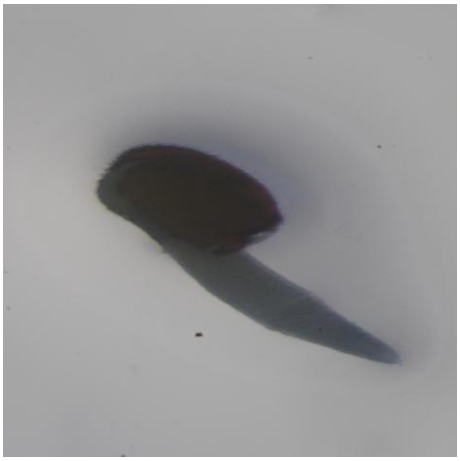


Fig. 16 Germinación de semilla de *Arabidosis thaliana*.

6.3.2. Pruebas de germinación en NaCl.

Para evaluar el efecto de la salinidad sobre el porcentaje de germinación en la planta de *Arabidopis thaliana* silvestre y la planta mutante Salk_027144 se sembraron 100 semillas en medio MS .5X 1% Sacarosa con tres replicas en presencia de Cloruro de Sodio, utilizando las concentraciones de 125, 150, 175 y 200 Mm de NaCl. Las cajas petri se mantuvieron en el cuarto de crecimiento con las condiciones anteriormente

mencionadas. A partir del siguiente día se comenzó a contar el número de semillas germinadas, terminando la cinética cuando todas las semillas de la condición control germinaron.

6.3.3. Cinética Dosis-Respuesta de longitud de raíces en NaCl.

Para evaluar el efecto de la salinidad en la longitud de la raíz, se sembraron 25 semillas en medio MS .5X 1% Sacarosa con tres replicas en presencia de Cloruro de Sodio a diversas concentraciones (0, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 mM). Las cajas Petri se sellaron con papel parafilm y se colocaron en el cuarto de crecimiento. La longitud de la raíz se midió a los 5, 10 y 15 días. Esta cinética permitió conocer las concentraciones que se utilizarían para la evaluación de la longitud de raíces entre la planta silvestre y la planta mutante Salk_027144 en NaCl.

6.3.4. Medición de longitud de raíces en NaCl.

Para evaluar el efecto de la salinidad en la longitud de la raíz, se sembraron 25 semillas en medio MS .5X 1% Sacarosa con tres replicas en presencia de Cloruro de Sodio utilizando las concentraciones (0, 50, 75 y 100 Mm). Las cajas se colocaron en el cuarto de crecimiento y la longitud de la raíz se midió a los 5, 10 y 15 días.

63.5. Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en NaCl.

Las semillas se sembraron en medio MS .5X 1% Sacarosa medio control y las concentraciones de 100, 125, 150, 175 y 200 mM de NaCl. Se sembraron 15 semillas para cada tratamiento. Las plantas se dejaron crecer por tiempo indefinido; se observo el nivel de tolerancia tanto de la planta silvestre como de planta homóciga.

6.3.6 Pruebas de germinación en KCl.

Para evaluar el efecto del KCl en la germinación de las semillas, se sembraron 30 semillas en medio MS .5X 1% Sacarosa medio control y con concentraciones de 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 mM de KCl. Se realizaron dos replicas. Las cajas petri se mantuvieron en el cuarto de crecimiento con las condiciones anteriormente mencionadas.

6.3.7. Medición de longitud de raíces en KCl.

Para evaluar el efecto del KCl en las raíces, se sembraron 25 semillas en medio MS .5X 1% Sacarosa en medio control y utilizando las concentraciones de 100, 150, 175, 200, 225 y 250 mM de KCl. Se realizaron dos replicas y las raíces fueron medidas a los días 5, 10 y 15.

6.3.8. Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en KCl.

Para evaluar el nivel de tolerancia de las plantas silvestre y mutante, se sembraron 15 semillas en medio control y utilizando las concentraciones de 100, 150, 175, 200, 225 y 250. Se dejaron durante 30 días en el cuarto de crecimiento. El medio utilizado para las pruebas de tolerancia fue MS .5X 1% Sacarosa.

6.4 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homociga) ante estrés osmótico.

6.4. 1 Pruebas de germinación en estrés osmótico.

Para analizar el efecto del estrés osmótico sobre la germinación se utilizo el agente estresante Sorbitol a concentraciones de 200, 400 y 600 mM. Las cajas Petri conteniendo 30 semillas de de la planta Col 0 y la de la línea Salk_027144 4 fueron selladas con parafilm y colocadas en la cámara de crecimiento. El medio utilizado para las pruebas de germinación fue MS .5X 1% Sacarosa, con dos réplicas.

6.4.2. Medición de longitud de raíces en Sorbitol.

Para evaluar el efecto del agente estresante sorbitol en las raíces, se sembraron 25 semillas en medio MS .5X 1% Sacarosa en medio control y utilizando las concentraciones de 200, 400 y 600 mM. Se realizaron dos replicas y las raíces fueron medidas a los días 5, 10 y 15.

6.4.3. Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en Sorbitol.

Para evaluar el nivel de tolerancia de la planta Col 0 y la planta Salk_027144 4, se sembraron 15 semillas en medio MS .5X 1% Sacarosa en medio control y con las concentraciones de 200, 400 y 600 mM. Se dejaron crecer durante 30 días.

6.4.4 Cinética Dosis-Respuesta de la hormona Ácido Abscisico (ABA).

Para determinar si la hormona ABA afecta el porcentaje de germinación en la planta silvestre y mutante, se realizó una cinética dosis-respuesta con 30 semillas, utilizando diversas concentraciones de la hormona Ácido Abscisico (0, .5, 1, 2.5, 5 y 10 micromolar). La cinética se realizó en medio MS.5X 1% Sacarosa.

6.5. Evaluación fenotípica de la mutante ante estrés salino en comparación con la silvestre en sistema maceta.

Para evaluar el efecto de la salinidad en la fotosíntesis y biomasa, en plantas adultas de la especie *Arabidopsis thaliana* silvestre ecotipo Col 0 y la mutante Salk-027144 4, se sembraron en maceta utilizando como substrato Metromix. Se regaron durante cuatro semanas con agua estéril, y se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo marca (SEV MODELO MRCMFT-2660) con las siguientes condiciones: 22°C, 36% de humedad relativa, 763 x10 luxes y un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 obscuridad.

Al llegar la cuarta semana, cuando las plantas presentaban el estado de desarrollo de roseta, cinco plantas silvestres y cinco plantas mutantes fueron regadas con agua destilada, mientras que cinco plantas silvestres y cinco plantas mutantes comenzaron a regarse cada cuatro días con NaCl, incrementando la concentración de 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM y finalmente 250 mM. Tres plantas para cada tratamiento fueron evaluadas.

6.5.1. Medición de Fotosíntesis

A las plantas silvestres y mutantes se les midió fotosíntesis con ayuda del FluorPen antes de comenzar y después de terminar los tratamientos con NaCl, con el fin de comparar las plantas regadas con agua destilada y las regadas con NaCl, este experimento también permitió observar fenotípicamente los efectos del estrés salino en hojas, raíces y tamaño.

6.5.2. Medición de Biomasa.

Las raíces de las plantas que fueron regadas por las diversas concentraciones de NaCl y las plantas en condición control en el estado de roseta, se limpiaron y pesaron, con el fin de obtener el peso fresco. Mientras que para el peso seco, las raíces fueron colocadas a 70° C por un día, para posteriormente ser pesadas.

7. RESULTADOS.

7.1 Esterilización de semillas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron utilizando cloro y etanol absoluto (Ver Anexo 1). Mostrando un buen resultado en combatir la contaminación y al mismo tiempo permitió un porcentaje de germinación más rápido a partir del siguiente día en el que fueron colocadas en el cuarto de crecimiento.

7.2. Identificación de línea homóciga afectada en FT regulado por estrés salino y osmótico.

La semillas donadas por el instituto Salk son un mezcla de genotipos, por ello es importante identificar plantas homócigas que tengan la mutación en ambos alelos, además de obtener resultados homogéneos. Se llevo a cabo la identificación de plantas homócigas, utilizando dos reacciones de PCR una usando los oligos RP y LP específicos de cada FTs y una segunda PCR usando los oligos BP (del borde izquierdo) y el oligo RP. En la figura 17 se muestra una electroforesis que permite la identificación de plantas homócigas y heterocigas. En las figuras 18 y 19 se muestran los geles de algunas líneas identificadas como homócigas. Mientras que en la figura 23 se observa el gel que identifica como homociga a la línea Salk_027144 4, la línea que se selecciono para caracterizarla fenotípicamente en comparación con la planta silvestre, debido a que presento un mejor fenotipo de tolerancia a diferencia de las otras líneas Salk.

Homóciga **Heterociga**

Figura. 17 Identificación de líneas homocigas y Heterocigas.

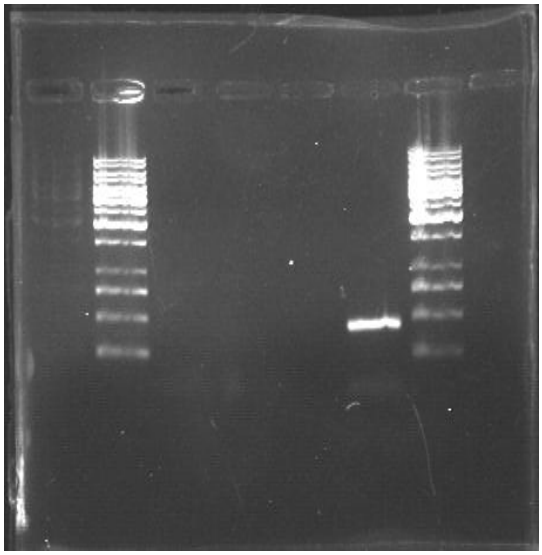


Fig. 18 PCR de las líneas 142233 y 104843

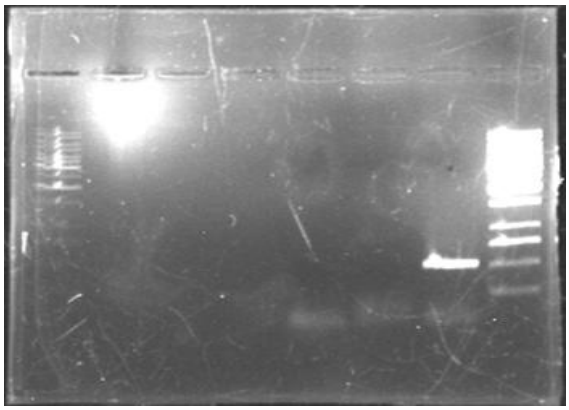


Fig. 19 PCR de la línea 114635.

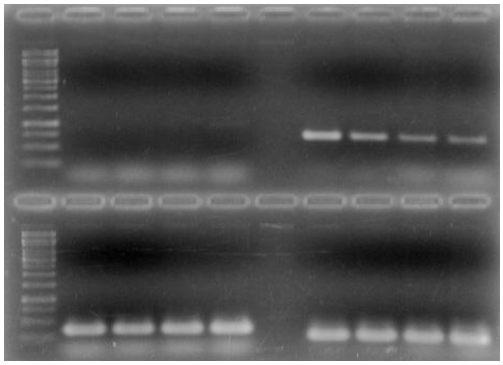


Fig. 20 PCR de la línea 027144.

7.3. Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homóciga) ante estrés salino y osmótico en sistema *in vitro*.

7.3.1. Cinética Dosis-Respuesta de germinación en NaCl.

En la cinética dosis-respuesta de la planta silvestre de Arabidopsis Ecotipo Columbia 0 (Fig. 21). Se observó que a concentraciones de 50, 75 y 100 mM de NaCl se presentan niveles altos de germinación, para concentraciones de 150 y 175 el porcentaje de germinación corresponde a un 35% y 25% respectivamente. Mientras que a una concentración de 200 mM de NaCl, se abate el porcentaje de germinación. Presenta un porcentaje de germinación del 60% a unaa concentración de 125 mM de NaCl; debido a que está concentración no se abate, ni presentan altos niveles de germinación la planta silvestre, se decidió tomar está concentración para llevar a cabo la cinética de germinación entre la plantas silvestre ecotipo Columbia 0 y la plantas de la línea Salk_027144 4.

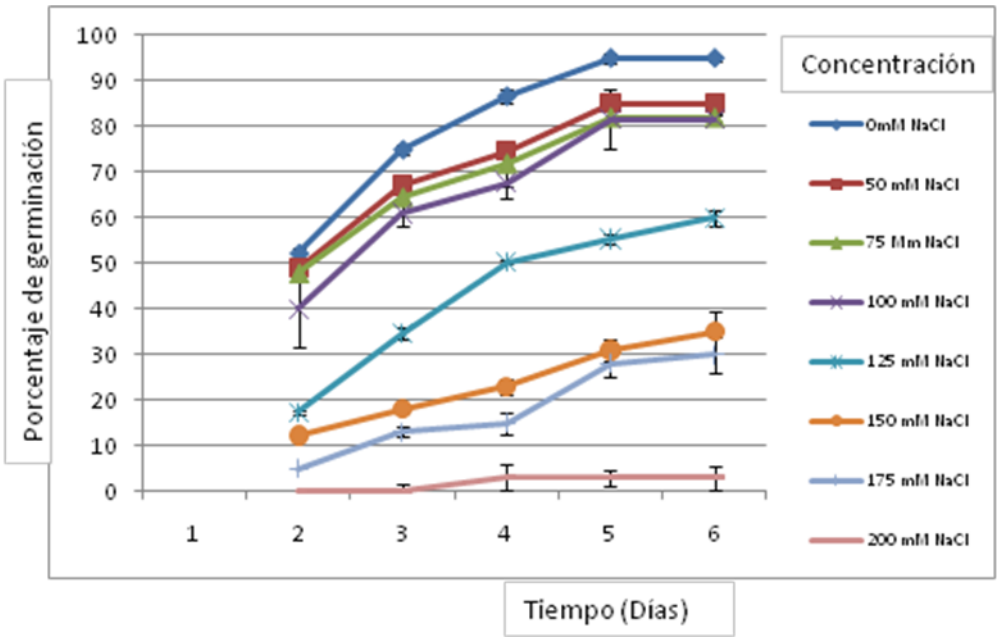


Figura. 21 Cinética Dosis-Respuesta de germinación en *Arabidopsis thaliana* en diferentes concentraciones de NaCl. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 100 semillas.

7.3.2. Pruebas de germinación en 125 mM de NaCl.

Al realizar la cinética de germinación con la planta silvestre y la planta mutante a una concentración en 125 mM de NaCl**,** no se observaron diferencias. En el medio control presentaron porcentajes de germinación del 95% y 96% para la planta silvestre y la planta mutante respectivamente (Fig 22). Mientras que a una concentración de 125 mM de NaCl, las plantas presentaron un porcentaje del 65% para la planta silvestre y del 71% para la planta mutante (Fig 23).

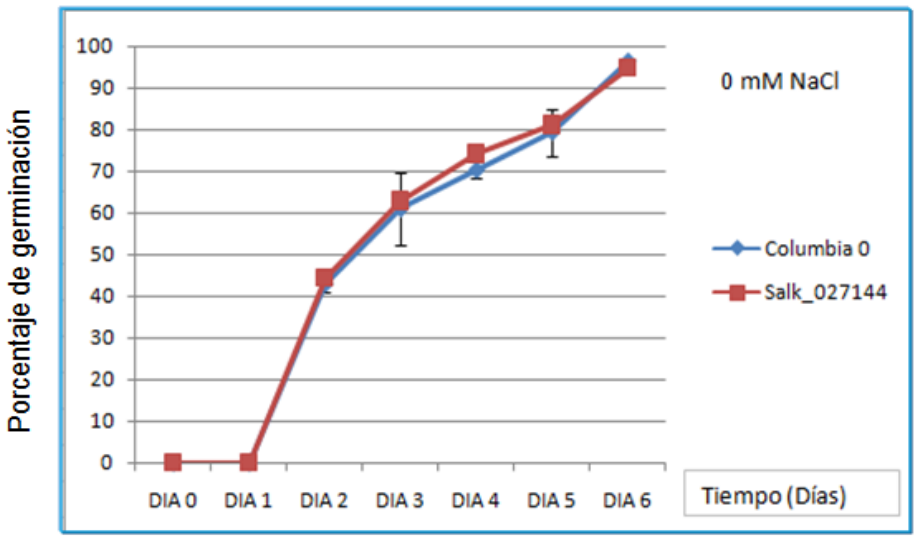


Fig. 22 Cinética de germinación de Columbia 0 y Salk_02744 4 en condiciones control. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 100 semillas.

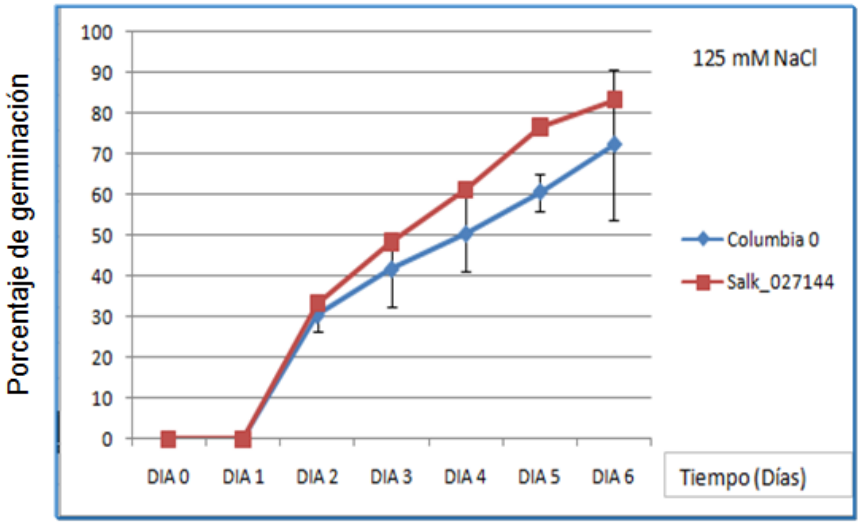


Fig. 23 Cinética de germinación de Columbia 0 y Salk_02744 4 en condiciones de 125 mM de NaCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 100 semillas.

7.3.3. Pruebas de germinación en 150, 175 y 200 mM de NaCl.

Debido a que no se presentaron diferencias en el porcentaje de germinación entre la planta silvestre en comparación con la mutante a una concentración de 125 mM de NaCl, se realizaron cinéticas incrementando las concentraciones de NaCl (150,175 y 200). La planta silvestre Ecotipo Columbia 0 presento un porcentaje de germinación del 97% en condiciones control, 43% en una concentración de 150 mM, 33% en una concentración de 175 mM y 2% en una concentración de 200 mM (Fig. 24). Mientras que la planta Salk_027144 4 presento un porcentaje de germinación del 97% para condición control, 47% en una concentración de 150 mM, 38% en una concentración de 175 mM y 4% en una concentración de 200 mM. Por lo tanto tampoco existieron diferencias utilizando estas concentraciones entre la planta silvestre en comparación con la mutante (Fig 25).

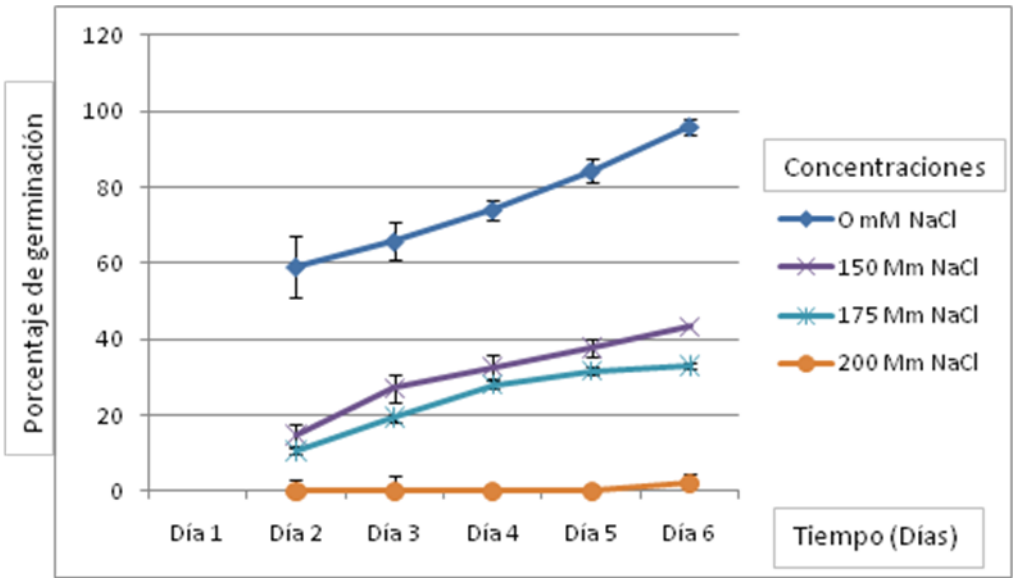


Fig. 24 Cinética de germinación de Columbia 0 bajo estrés salino a diversas concentraciones de NaCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 100 semillas.

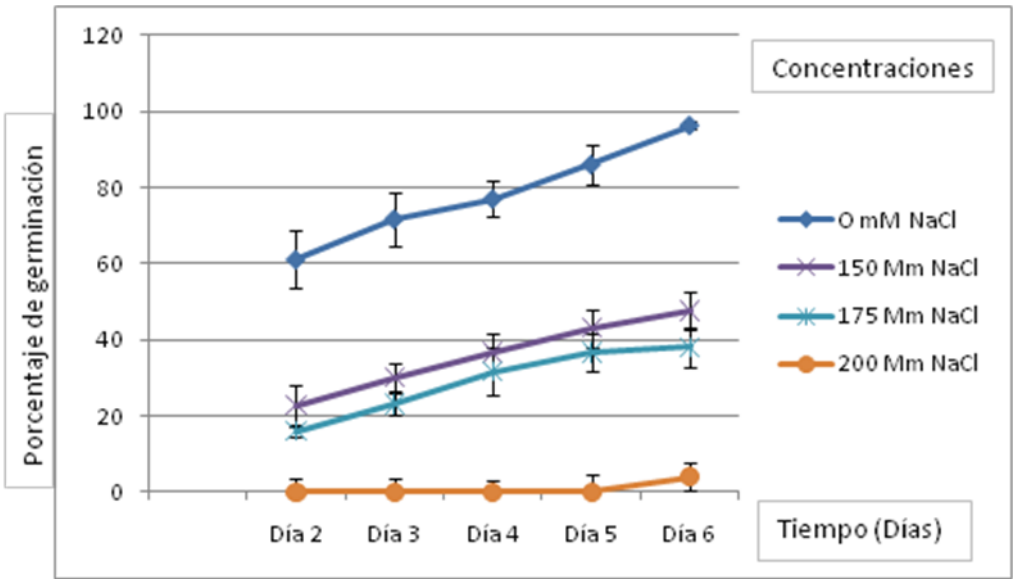


Fig. 25 Cinética de germinación de Salk_027144 4 bajo estrés salino a diversas concentraciones de NaCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 100 semillas.

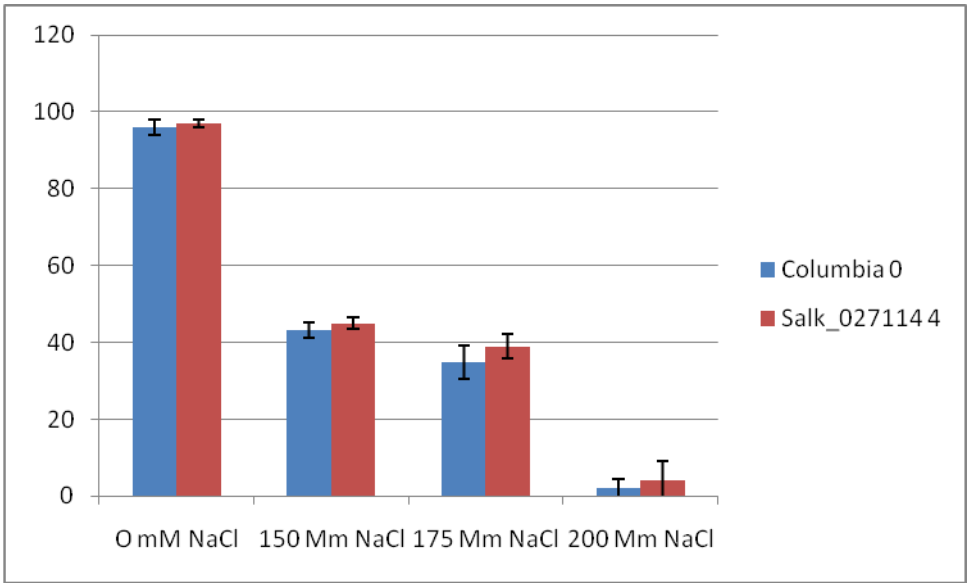


Fig. 26 Germinación en la planta Silvestre y Mutante a diversas concentraciones de NaCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 100 semillas.

7.3.4. Cinética Dosis-Respuesta de longitud de raíces en NaCl.

En la cinética dosis-respuesta de la planta silvestre de Arabidopsis Ecotipo Columbia 0, se observo que longitud de la raíz se ve afectada en una concentración de

150 mM de NaCl presentando una longitud de .4 cm, mientras que para 175 y 200 mM de NaCl, presenta longitudes de .20 y .10 cm respectivamente (Fig 27). Debido a que a concentraciones de 150, 175 y 200 mM de NaCl la longitud de las raíces es muy pequeña, se decidió solo realizar está prueba hasta una concentración de 125 mM de NaCl.

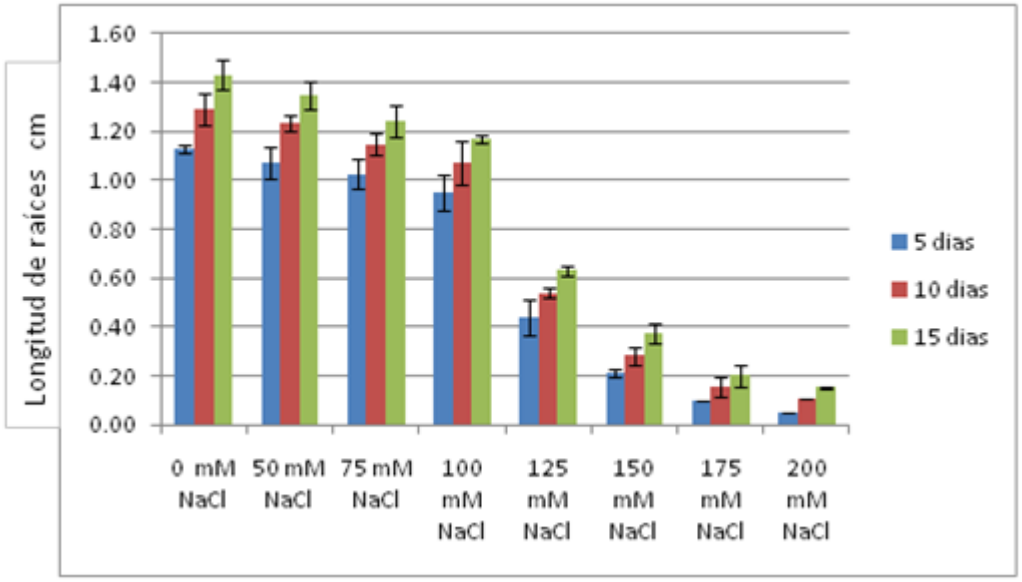


Fig. 27 Cinética dosis-respuesta de longitud de raíces en *Arabidopsis thaliana* en diferentes concentraciones de NaCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 25 semillas.

7.3.5. Longitud de raíces.

Para evaluar la longitud de raíz ante el estrés salino de la planta silvestre y mutante de *Arabidopsis* se realizó una cinética utilizando cuatro concentraciones de NaCl (0, 50, 75 y 100 mM). Se tomaron estas concentraciones basándonos en las cinéticas dosis-respuesta de longitud de raíces realizadas en la planta silvestre. Se observa que a una concentración de 50 mM NaCl la longitud de la raíz tanto de la planta silvestre como la de la mutante no se ve afectada tanto para los 5, 10 y 15 días, presentando una longitud

final de 1.33 y 1.39 centímetros respectivamente, para la concentración de 75 mM de NaCl, presenta una longitud final de 1.23 y 1.33 centímetros, mientras que para una concentración de 100 mM de NaCl presenta una longitud final de 1.14 y 1.19 centímetros, a una concentración de 125 Mm presentan una longitud de .66 y .85 para la planta silvestre y la mutante (Fig. 28).

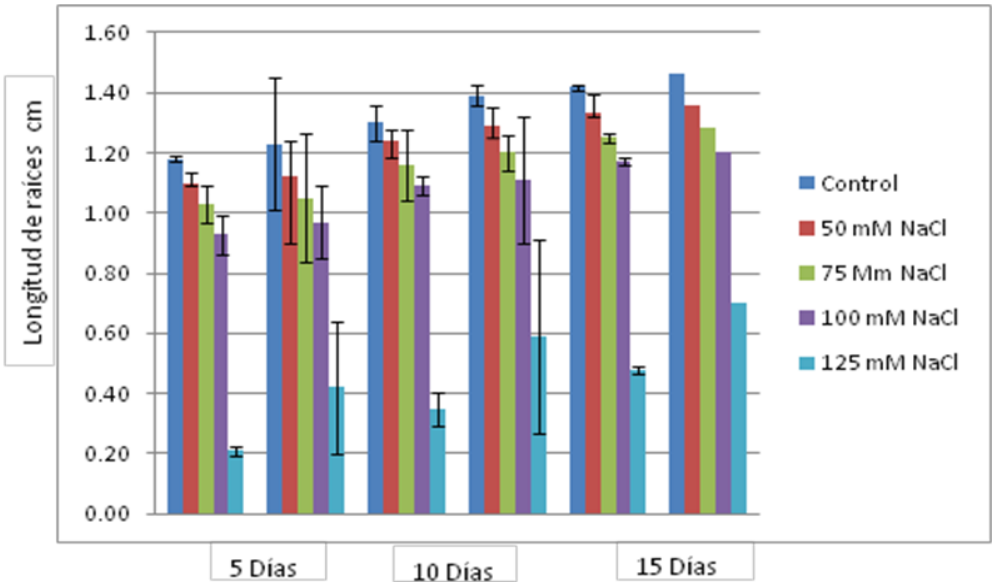


Fig. 28 Cinética de longitud de raíces en *Arabidopsis thaliana* y Salk_027144 4 en diferentes concentraciones de NaCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 25 semillas.

7.3.6. Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en NaCl.

Las semillas sembradas en medio MS .5X 1% Sacarosa medio control y las concentraciones de 100, 125, 150, 175 y 200 mM de NaCl y que se dejaron crecer por tiempo indefinido; mostraron que a concentraciones de 100, 125 y 150 mM de NaCl por 22 y 36 días respectivamente, en medio MS .5x 1% de Sacarosa, la planta mutante de la línea Salk_027144 4 mostró un mejor fenotipo de tolerancia a diferencia de la planta silvestre (Fig. 29, 30 y 31).

Columbia 0 Salk_027144 4

Fig. 29 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 100 mM NaCl (22 Días). n= 15 semillas.

Columbia 0 Salk_027144 4

Fig. 30 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 125 mM NaCl (30 Días). n= 15 semillas

Columbia 0 Salk_027144 4

Fig. 31 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 150 mM NaCl (30 Días). n= 15 semillas.

7.3.7. Pruebas de germinación en KCl.

Para evaluar el efecto del KCl en la germinación de semillas de la planta silvestre y la mutante, se sembraron 30 semillas en diversas concentraciones (0, 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 mM) de está sal. Observando que a concentraciones de 100, 125 y 150 mM no se ve afectada la germinación tanto para la planta silvestre como para la mutante (Fig 32 y 33) a una concentración de 175 mM de KCl presentaron un porcentaje del 15% para la planta silvestre y 18% para la mutante, mientras que en concentraciones de 200, 225 y 250 mM se abate la germinación para ambas plantas. Por lo tanto no existieron diferencias utilizando estas concentraciones entre la planta silvestre en comparación con la mutante (Fig 34).

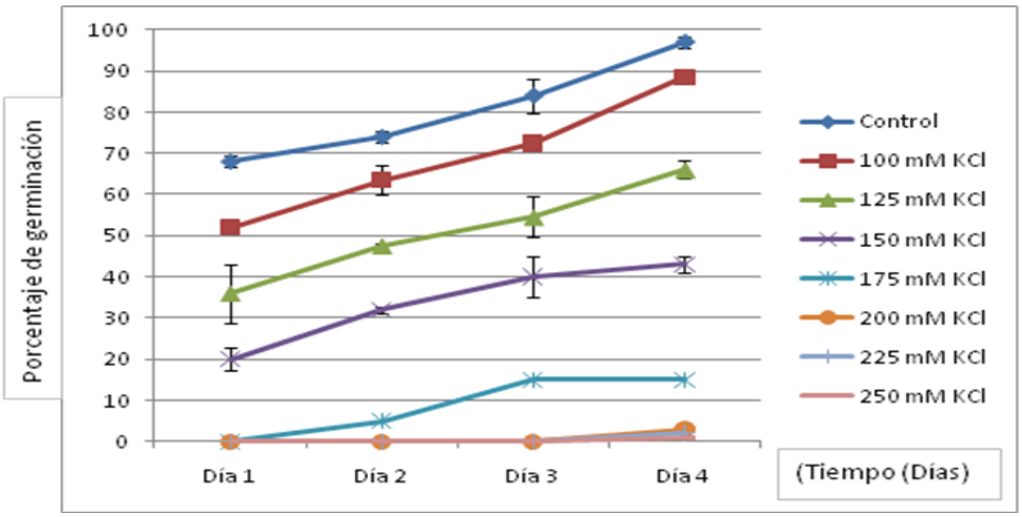


Fig. 32 Cinética de germinación de Col 0 bajo estrés salino a diversas concentraciones de KCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

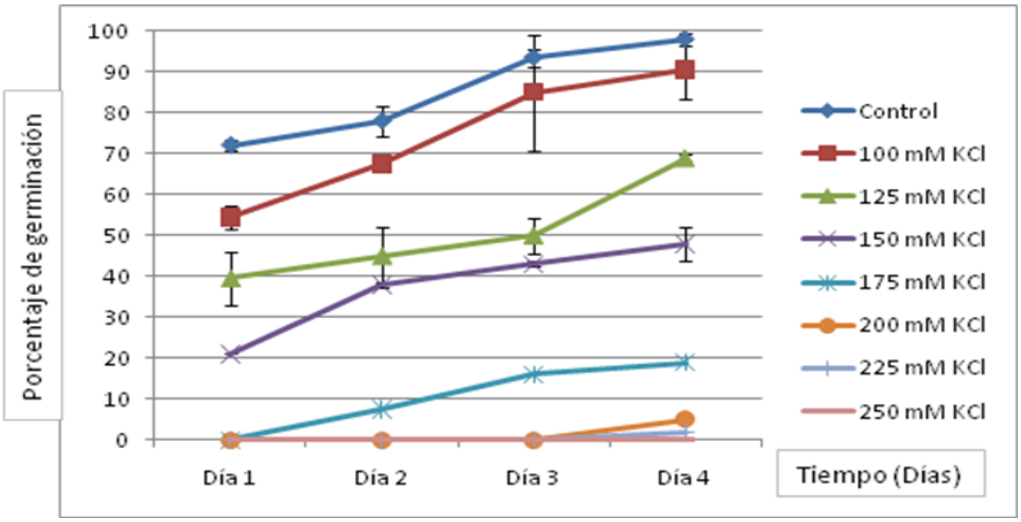


Fig. 33 Cinética de germinación de 027144 4 bajo estrés salino a diversas concentraciones de KCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

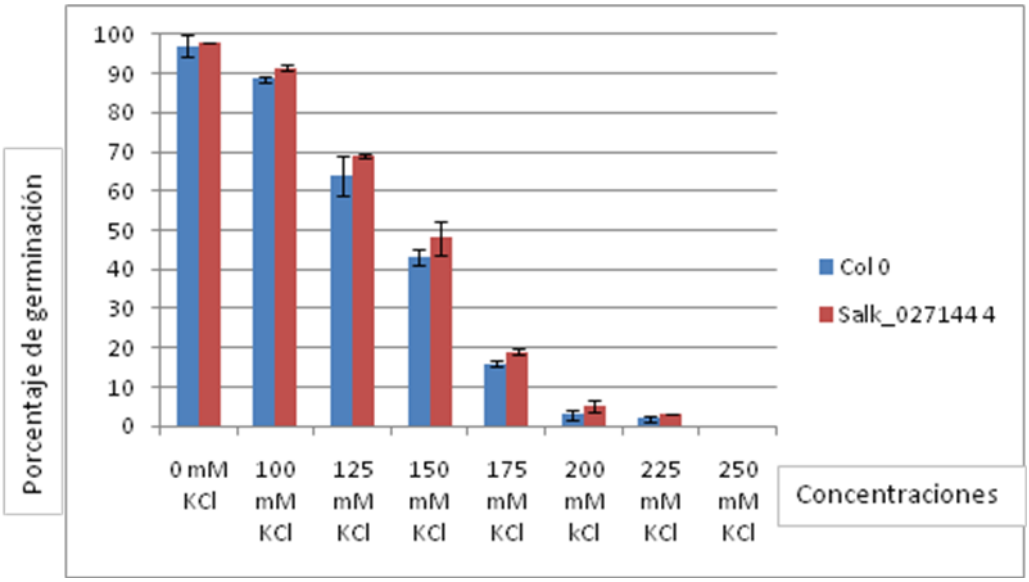


Fig. 34 Germinación en la planta Silvestre y Mutante a diversas concentraciones de KCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 30 semillas.

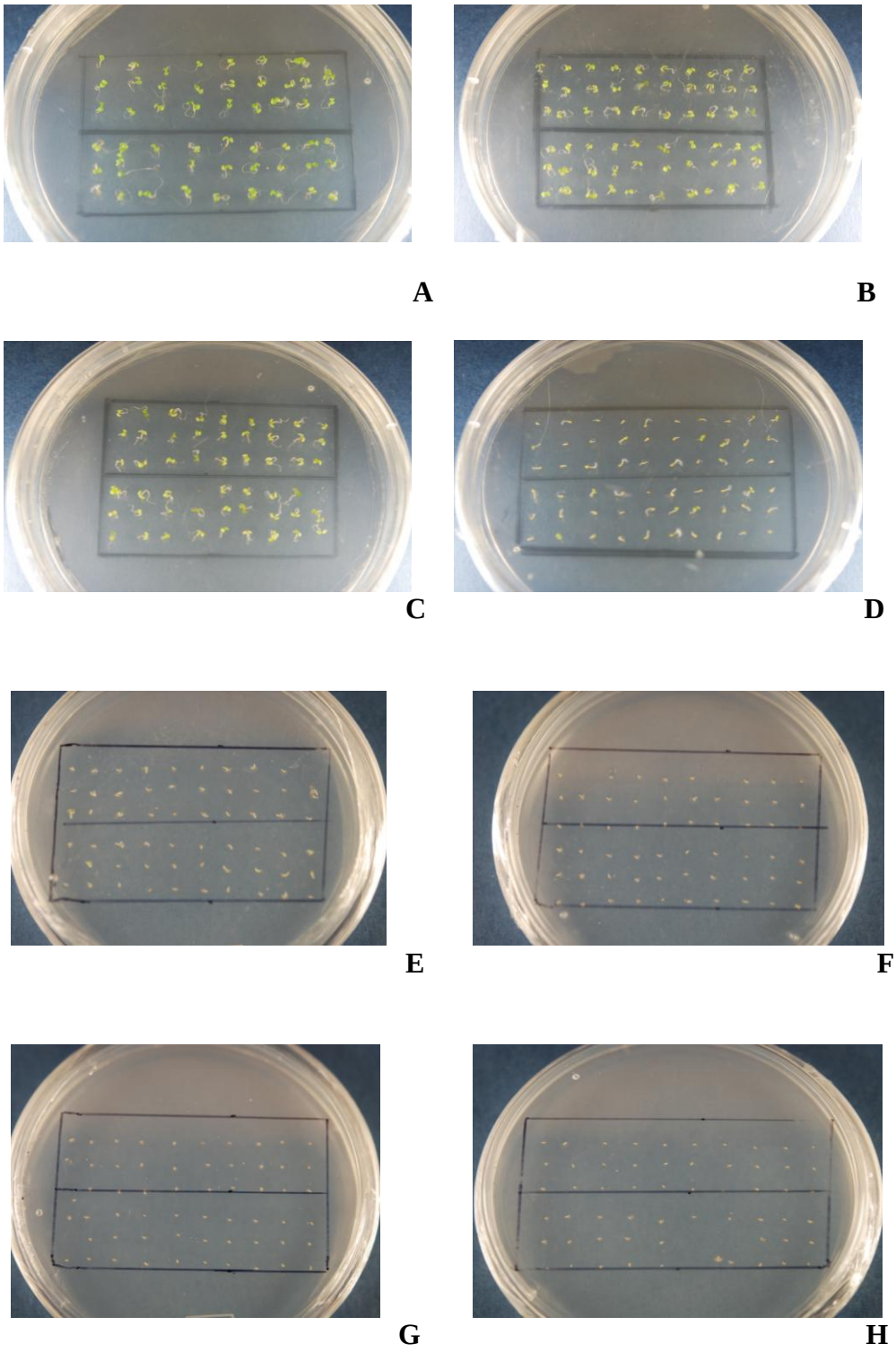


Fig. 35 Germinación de semillas de Columbia 0 (Arriba) y Salk 027144 4 (Abajo) en diversas concentraciones de KCl. Control (A), 100 mM (B), 125 mM (C), 150 mM (D), 175 mM (E), 200 mM (F), 225 mM (G), 250 mM (H).

7.3.8. Medición de longitud de raíces en KCl.

Para conocer como afecta el KCl en la longitud de las raíces, se sembraron 25 semillas de la planta silvestre y de la planta mutante en diversas concentraciones observando que a una concentración de 100 mM no se ve afectada la raíz, lo mismo sucede para una concentración de 125 mM de está sal. En una concentración de 150 mM de KCl presentan una longitud de .85 y .98 cm para la planta silvestre y para la mutante respectivamente. Mientras que a una concentración de 200 se ve significativamente afectada la longitud de la raíz, estos resultados corresponden a la longitud de la raíz para 15 días (Fig 36).

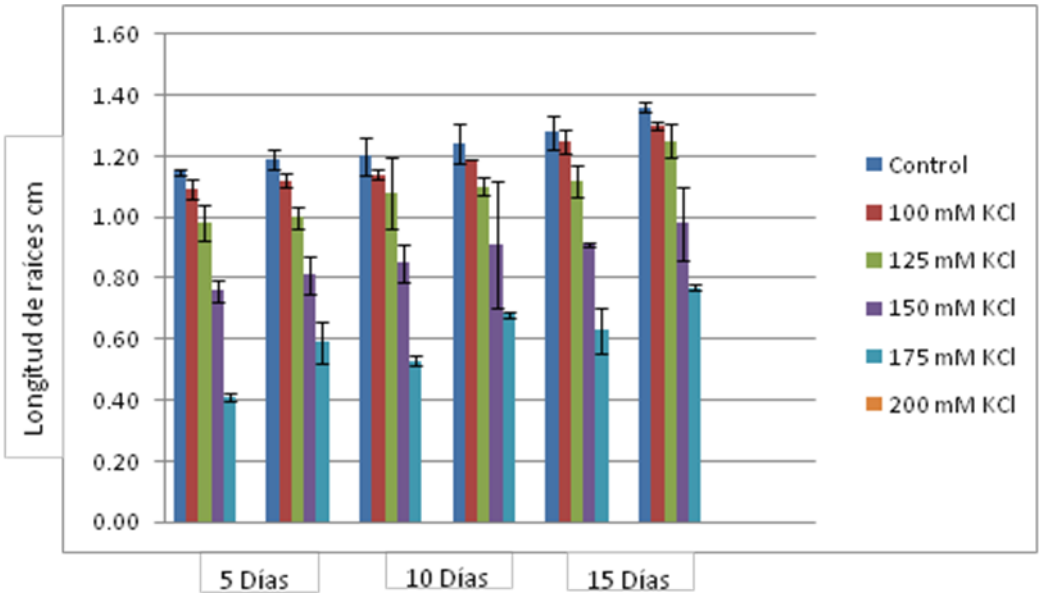


Fig. 36 Cinética de longitud de raíces de 15 días en *Arabidopsis thaliana* y Salk_027144 4 en diferentes concentraciones de KCl. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 25 semillas.

7.3.9. Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en KCl.

Las semillas de la planta silvestre y mutante fueron germinadas en diversas concentraciones de KCl (Control, 100, 125, 150, 175, 200, 225 y 250 mM). Se dejaron crecer hasta tiempo indefinido, mostrando que la planta Salk_027144 4, mostró una mejor tolerancia a una concentración de 125 mM de KCl, a diferencia de la planta silvestre Ecotipo Columbia donde está concentración afecto significativamente su desarrollo y crecimiento (Fig. 37).

Columbia 0 **Salk_027144 4**

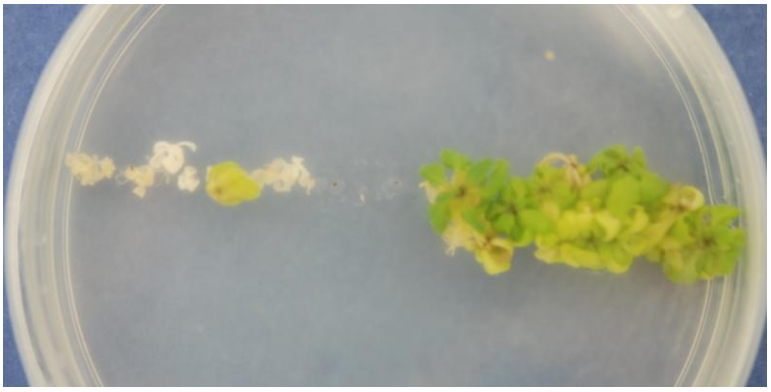


Fig. 37 Tolerancia de la planta silvestre y Mutante Salk a 125 mM KCl (33 Días). n= 15 semillas.

7.4 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homociga) ante estrés osmótico.

7.4.1 Pruebas de germinación en estrés osmótico.

Con la finalidad de determinar si la germinación de la planta silvestre Ecotipo Columbia 0 y la mutante Salk_027144 4 es sensible a estrés osmótico, se llevaron a cabo cinéticas de germinación utilizando el agente osmótico Sorbitol. En la figura 38 y 39 se observo que el porcentaje de germinación en presencia de sorbitol 200 mM fue de 27% para la planta silvestre, mientras que para la planta mutante fue de 31%; para la concentración de 400 mM fue alrededor del 15% y 18% para la planta silvestre y

mutante respectivamente, mientras que para la concentración de 600 mM, la germinación se vio afectada presentando porcentajes de germinación muy bajos. Por lo tanto no existieron diferencias utilizando estas concentraciones entre la planta silvestre en comparación con la mutante (Fig. 40).

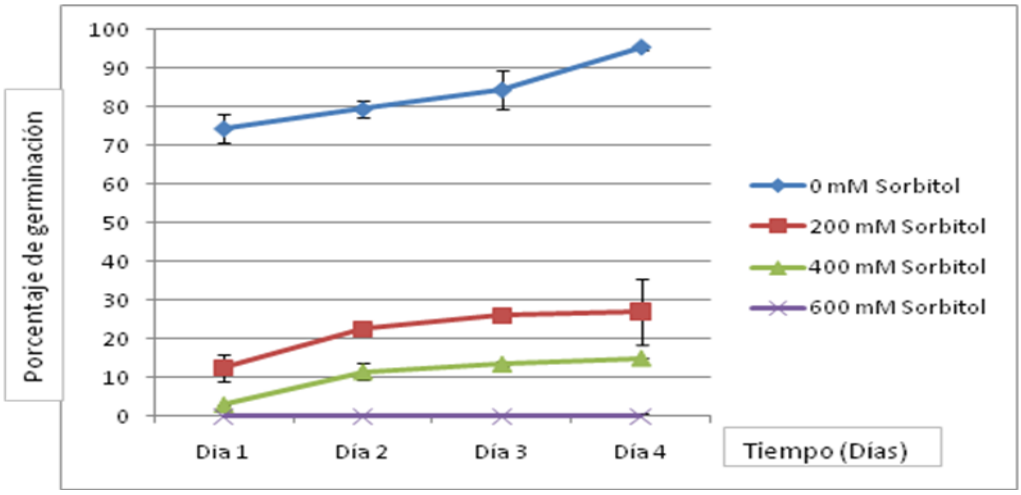


Fig. 38 Porcentaje de germinación en la planta *Arabidopsis* Ecotipo Columbia 0 a diversas concentraciones de Sorbitol. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

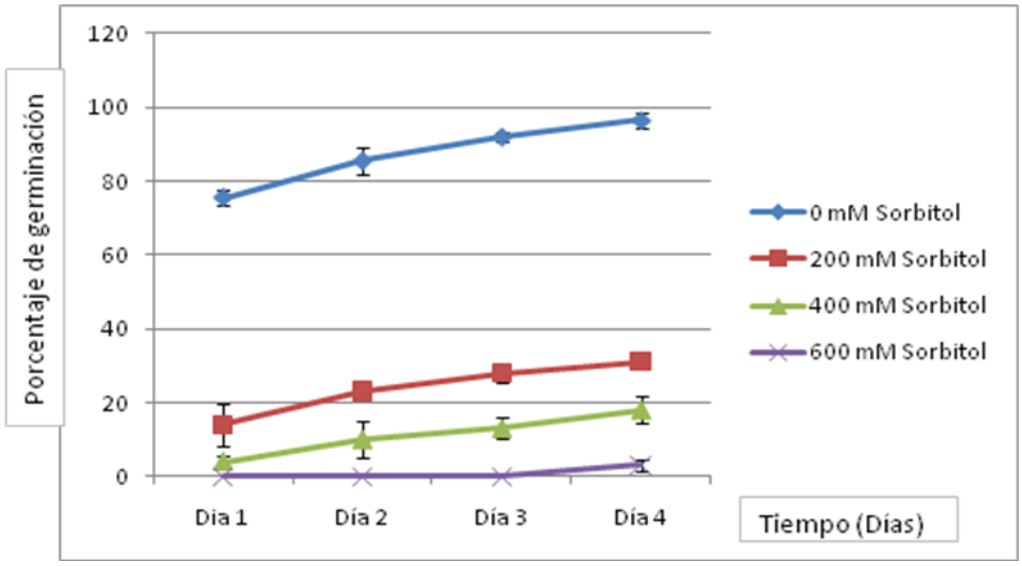


Fig. 39 Porcentaje de germinación en la planta Salk_027144 4 a diversas concentraciones de Sorbitol. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

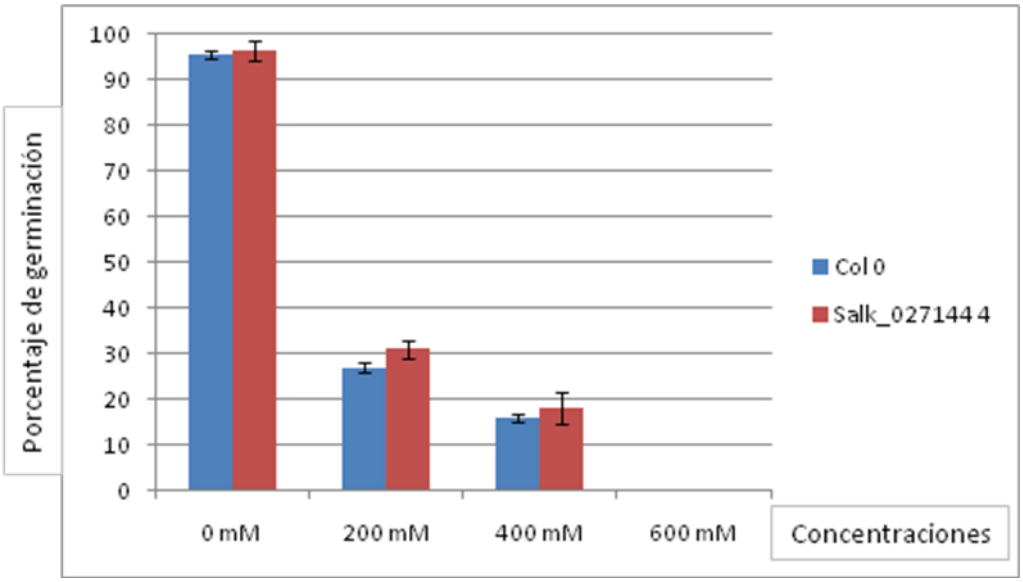


Fig. 40 Germinación en la planta Silvestre y Mutante a diversas concentraciones de Sorbitol. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

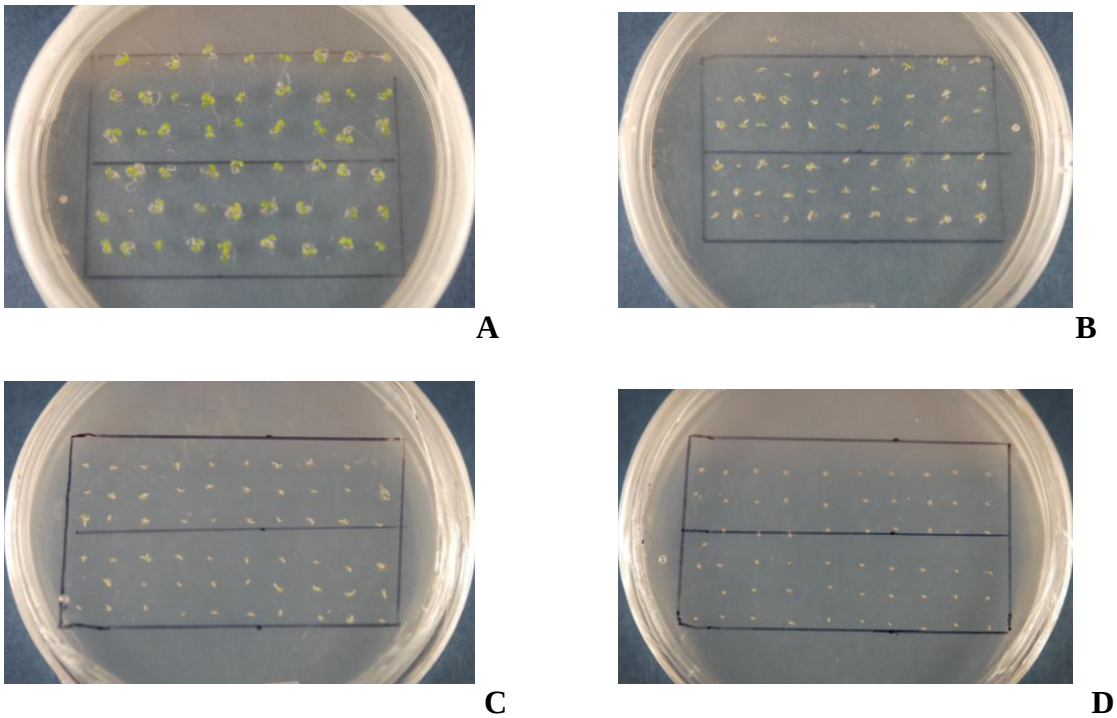


Fig. 41 Germinación de semillas de Columbia 0 (Arriba) y Salk 027144 4 (Abajo) en diversas concentraciones de Sorbitol. Control (A), 200 mM (B), 400 mM (C), 600 mM (D).

7.4.2. Medición de longitud de raíces en Sorbitol.

Para conocer el efecto del agentes osmótico sorbitol en la longitud de las raíces, se sembraron 25 semillas en diversas concentraciones de Sorbitol, observando que a una concentración de 200 mM presenta una longitud de .8 y .93 cm para la planta silvestre y para la mutante respectivamente, mientras que a una concentración de 400 mM la longitud para la planta silvestre es de .2 cm y para la mutante .33, mientras que la concentración de 600 mM fue la que más afecto la longitud de la raíz, estos resultados corresponden a la longitud de la raíz para 15 días (Fig 42).

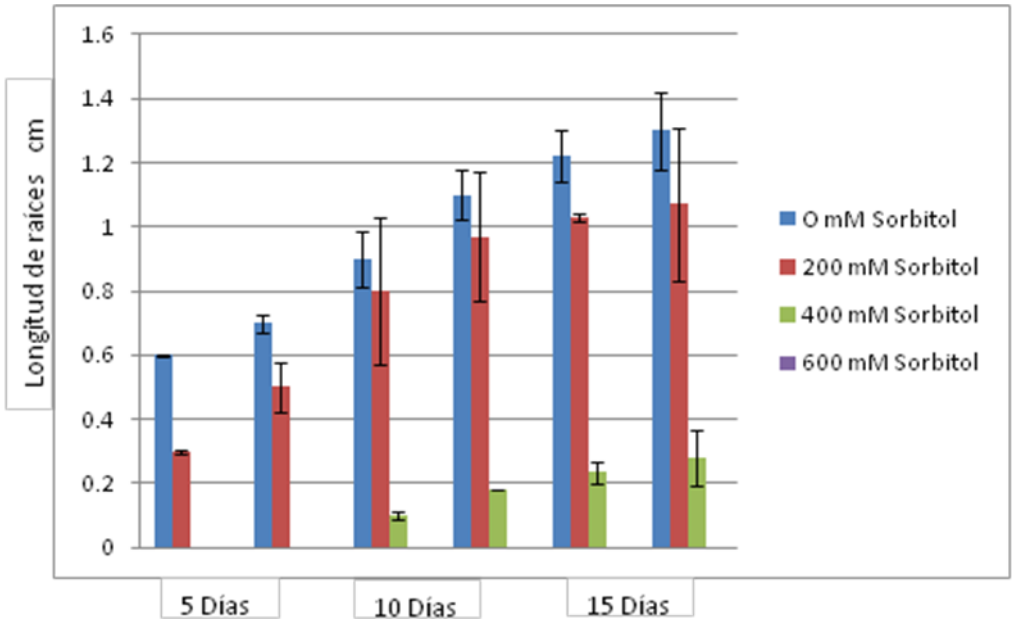


Fig. 42 Cinética de longitud de raíces en *Arabidopsis thaliana* y Salk_027144 4 en diferentes concentraciones de Sorbitol. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos con 25 semillas.

7.4.3. Nivel de tolerancia de la planta silvestre y mutante en Sorbitol.

Para conocer el nivel de tolerancia de planta silvestre y la mutante a las diversas concentraciones de Sorbitol, se pusieron a germinar semillas de ambas líneas en Sorbitol a diversas concentraciones (0, 200, 400 y 600 Mm) observando que no existieron diferencias significativas en tolerancia entre la planta silvestre y mutante en

estas concentraciones; siendo la concentración de 600 mM la que más afecto el desarrollo y crecimiento en la planta silvestre (Fig. 43).

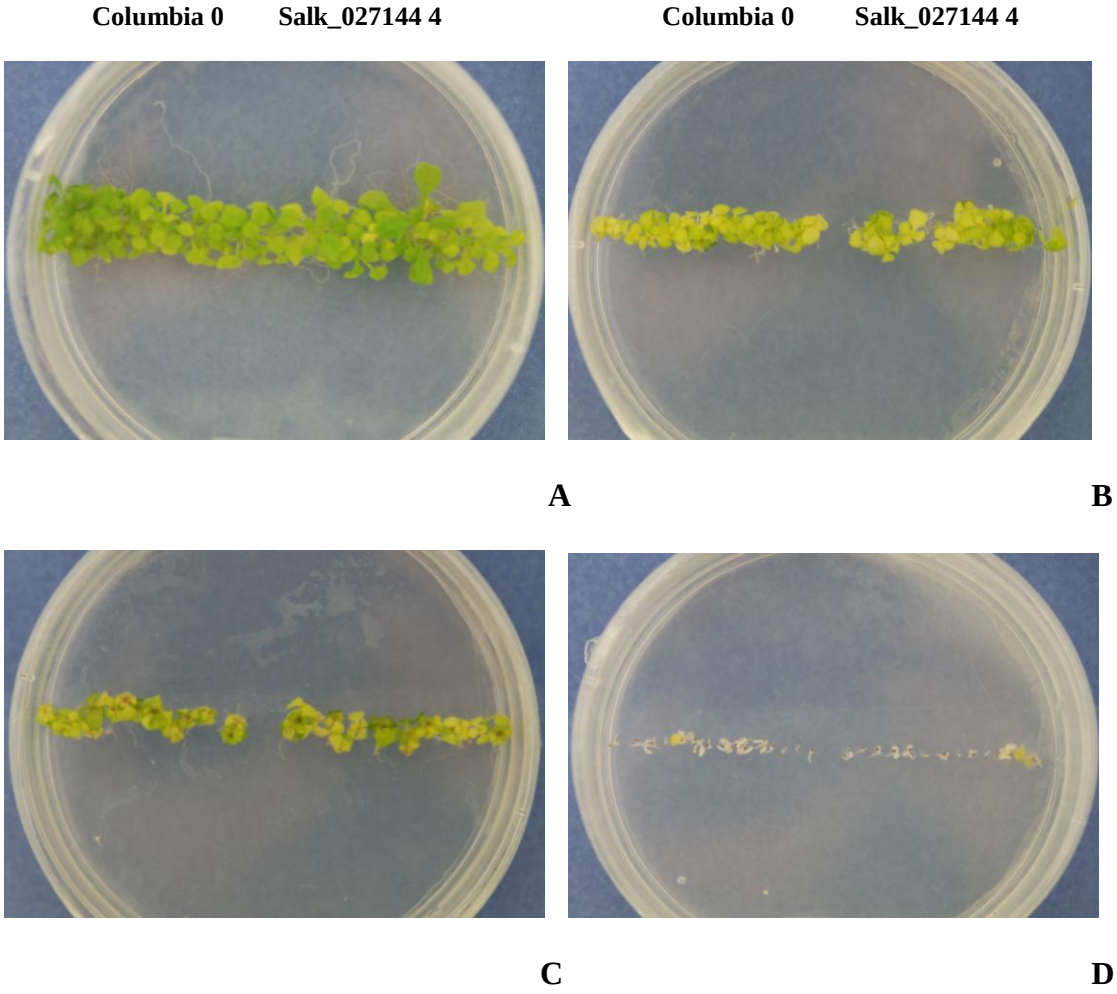


Fig. 43 Tolerancia de la planta silvestre y la Mutante Salk en diversas concentraciones de Sorbitol. n= 15 semillas. Control (A); 200 mM (B); 400 mm (C); 600 mM (D).

7.4.4 Cinética Dosis-Respuesta de la hormona Ácido Abscisico (ABA).

Debido a que en la literatura se da a conocer que plantas insensibles a la hormona ABA toleran altas concentraciones de NaCl (Quesada et al., 2002; Rugiero et al., 2004). Se llevo a cabo una cinética dosis-respuesta con el fin de conocer el efecto de está hormona en la germinación de las semillas de Arabidopsis ecotipo Columbia 0 y la línea Salk_027144 4, se utilizaron seis concentraciones de la hormona (0, .5, 1, .2.5, 5 y 10 micromolar). Se sembraron 30 semillas en medio MS.5X 1% Sacarosa y diariamente se conto el porcentaje de germinación, observando que a concentraciones de 5 y 10 micromolar de está hormona se abate el porcentaje de germinación tanto para la planta silvestre como para la mutante (Fig 44 y 45).

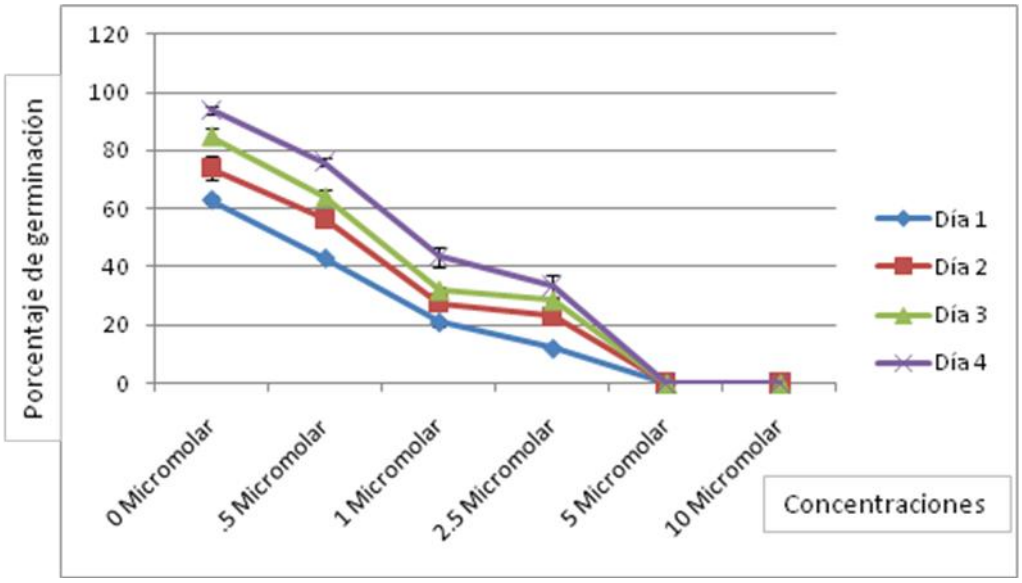


Figura. 44 Dosis-Respuesta en la planta Arabidopsis Ecotipo Columbia en diversas concentraciones de la hormona ABA. Medio .5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

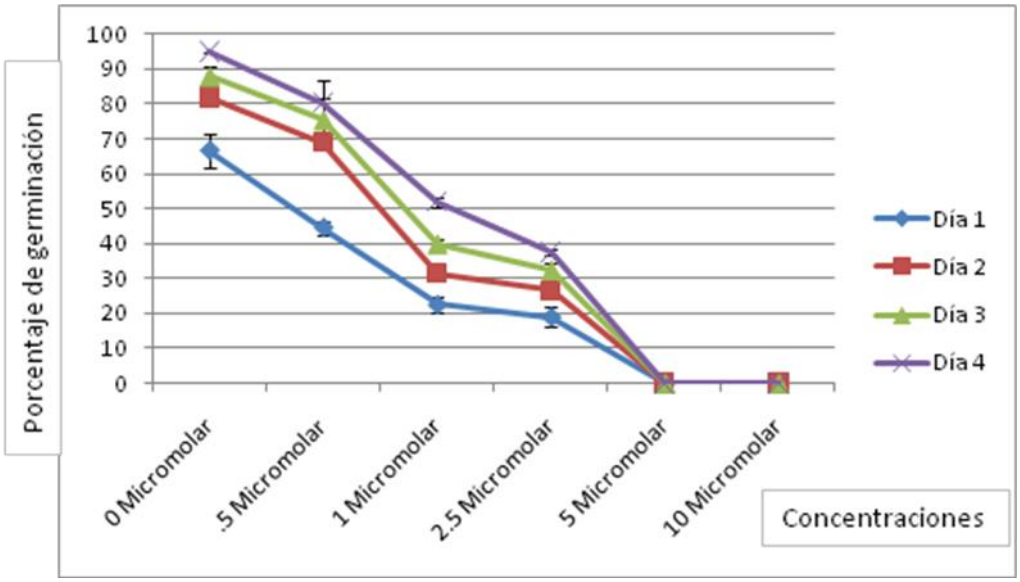


Fig. 45 Dosis-Respuesta en la planta Salk_ 027144 4 en diversas concentraciones de la hormona ABA. Medio .5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

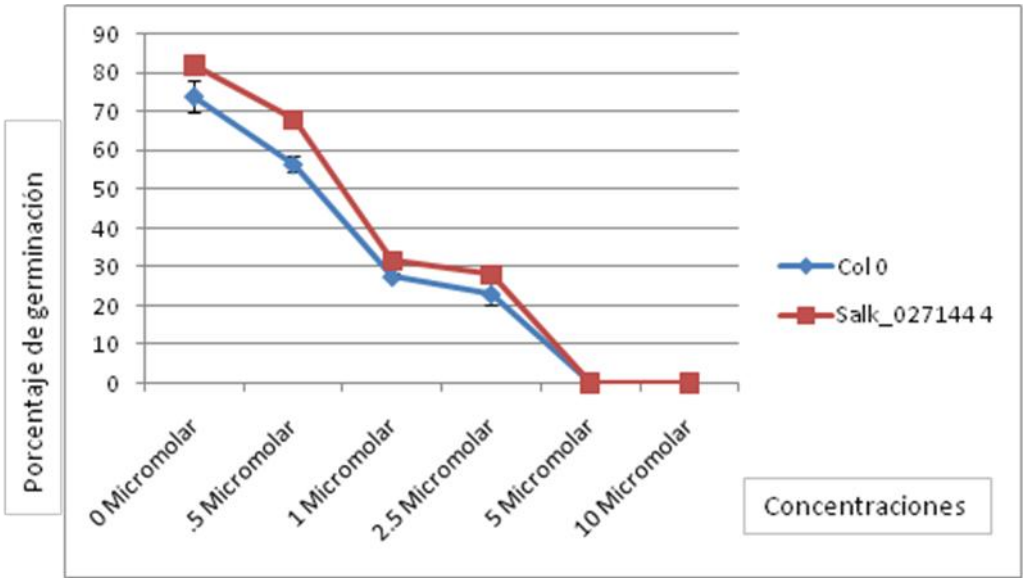


Fig. 46 Cinética Dosis-Respuesta en la planta Arabidopsis Ecotipo Columbia y la línea Salk_027144 4 a diversas concentraciones de la hormona ABA. Medio MS.5X 1% Sacarosa. Los datos corresponden al promedio de dos experimentos con 30 semillas.

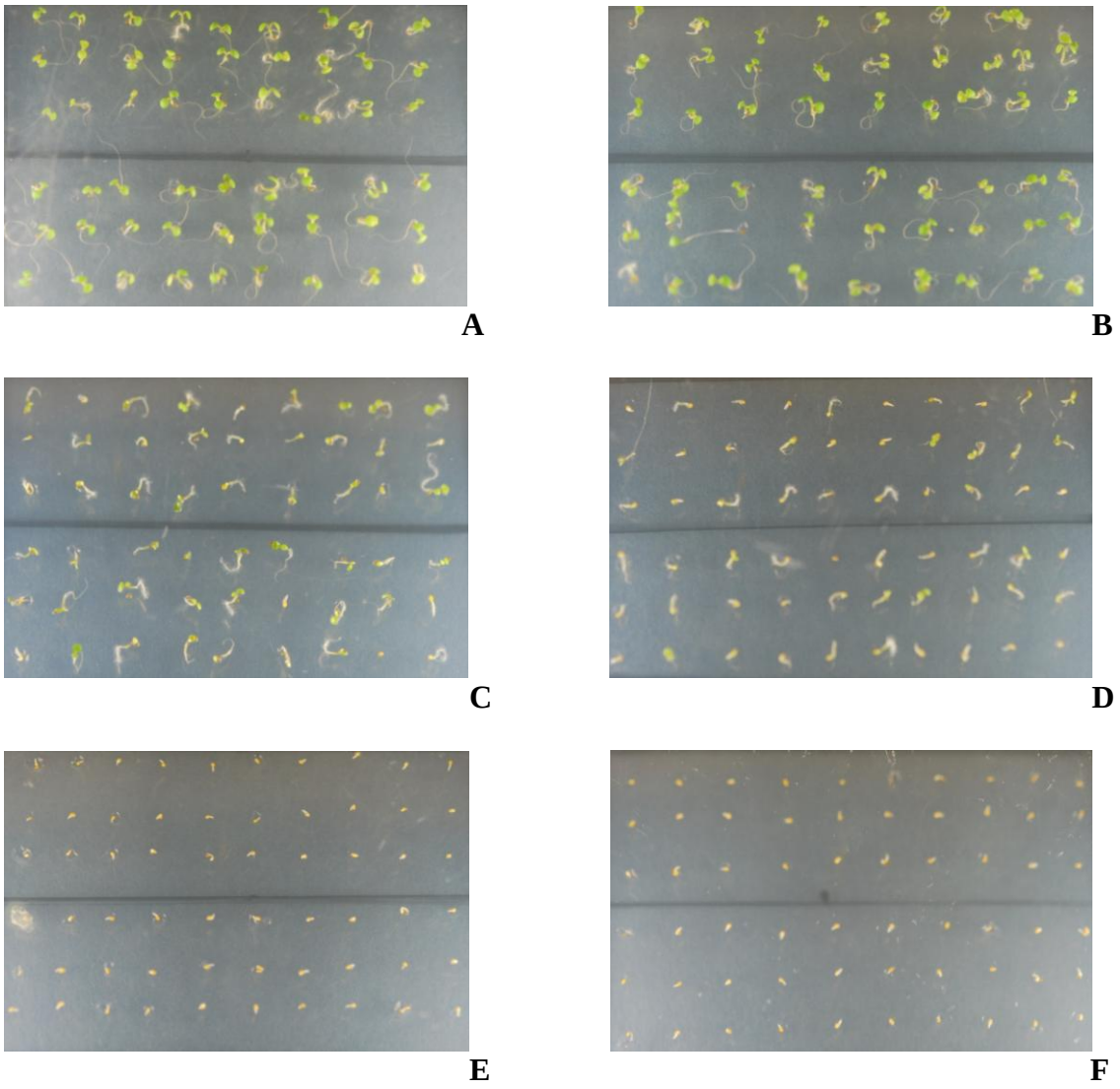


Fig. 47 Germinación de Arabidopsis ecotipo Columbia 0 (Arriba) y Salk_027144 4 (Abajo) en diversas concentraciones de ABA. Control (A), .5 Micromolar (B), 1 Micromolar (C), 2.5 Micromolar (D), 5 Micromolar (E), 10 Micromolar (F).

7.5 Evaluación fenotípica de la mutante ante estrés salino en comparación con la silvestre en sistema maceta.

Para conocer el efecto del estrés salino en las plantas adultas de 4 semanas; presentando el estado de desarrollo de roseta, cinco plantas del Ecotipo Columbia 0 y cinco de de la línea Salk_027144 4 fueron regadas con diversas concentraciones de NaCl cada cuatro días incrementando las concentraciones de 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM y finalmente 250 mM de está sal. Los resultados mostraron que a concentraciones de 50 mM no se ve observo ningún efecto de está sal para ambas líneas, a una concentración de 100 mM empezaron a observarse algunos efectos como perdida de color en las hojas y marchitamiento en las plantas silvestres, no así para las plantas de la línea Salk. Mientras que a una concentración de 150 mM las plantas silvestres se marchitaron totalmente, siendo tres plantas de la línea Salk las que aún presentaron hojas verdes y no se vieron afectadas, fueron las concentraciones de 200 y 250 mM de NaCl las que afectaron a las plantas Salk (Fig. 48).

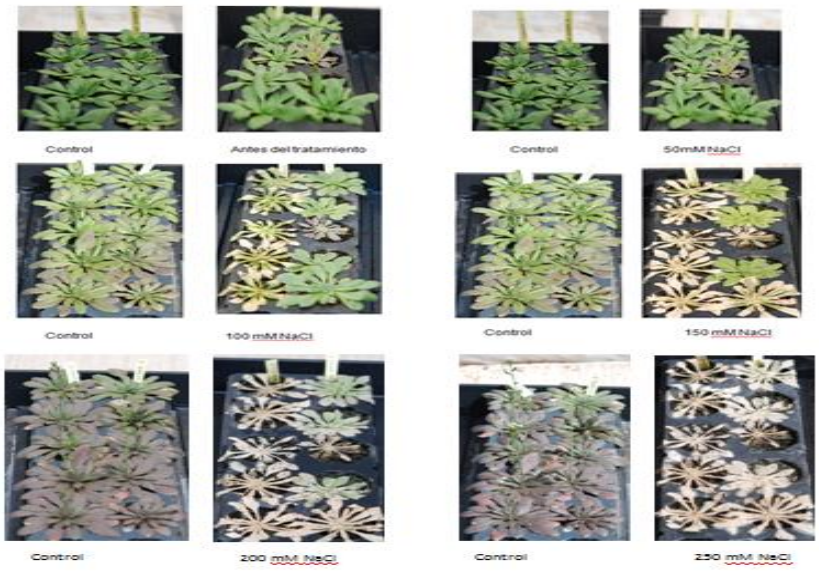


Fig. 48 Evaluación fenotípica de planta silvestre y mutante ante estrés salino en sistema maceta.

7.5.1 Medición de Fotosíntesis

Uno de los procesos que se ven afectados en las plantas ante estrés salino es la fotosíntesis, para evaluar como la salinidad afecta este proceso, se midió la fotosíntesis en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia y en plantas de la línea Salk en condiciones control y en las que recibieron los tratamientos de NaCl. Los resultados muestran que en una concentración de 100 mM se empieza a observar el efecto de está sal en la fotosíntesis de las plantas silvestres, no así para las plantas mutantes, el mismo efecto sucede para las concentraciones de 150, 200 y 250 mM. Mientras que en las plantas mutantes la fotosíntesis no se ve afectada en una concentración de 150 mM. (Fig. 49).

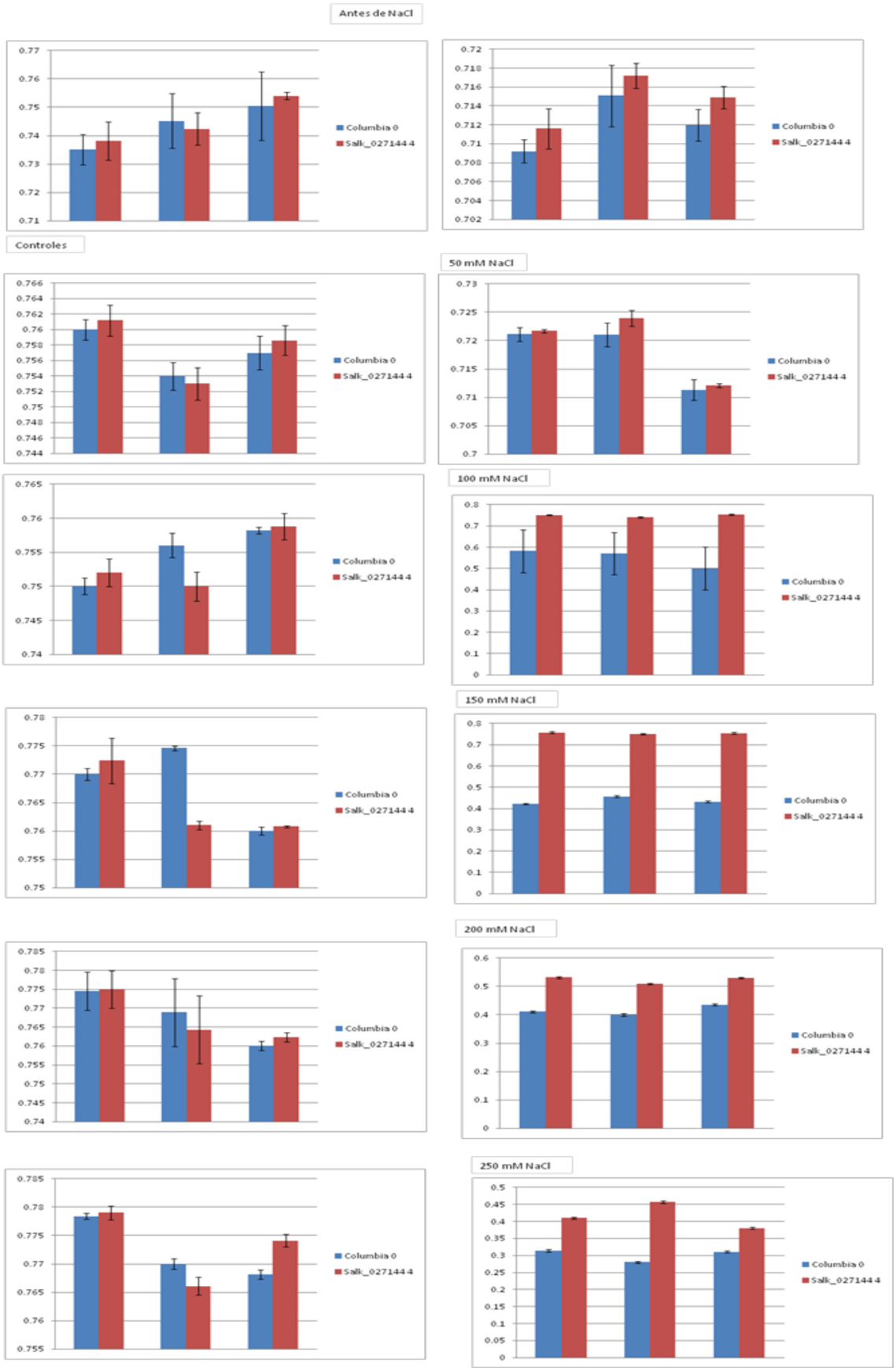
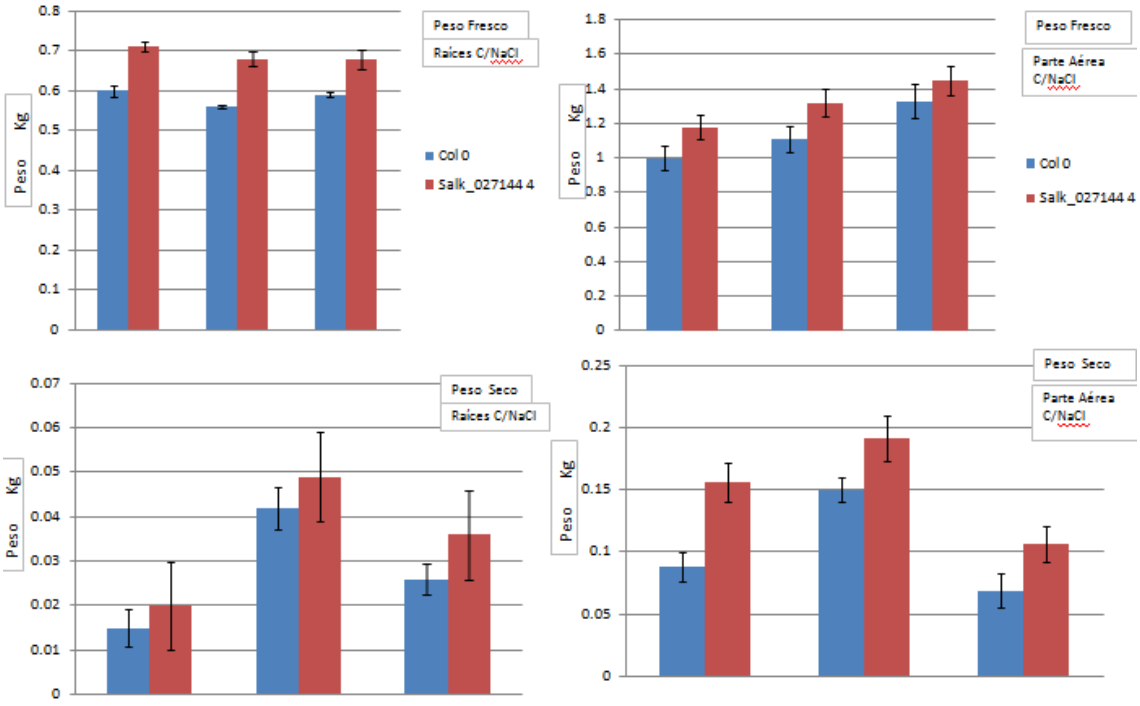


Fig 49. Medición de Fotosíntesis en Arabidopsis ecotipo Col 0 y de la línea Salk_027144 4.

7.5.2 Biomasa

En la medición de la biomasa, se observo un mayor peso fresco de la raíces y no asi para la parte aérea en los diversos tratamiento de sal para la planta mutante en comparación con la silvestre. Para el tratamiento control no existieron diferencias significativas en el peso fresco de las raíces y la parte aérea para la planta mutante y l planta silvestre. Para el peso seco se observo un mayor peso de las raíces y parte aérea en los diversos tratamiento de sal para la planta mutante en comparación con la silvestre, mientras que en los tratamientos control no existieron diferencias significativas en raíces y parte aéreas para ambas plantas. (Fig 50).



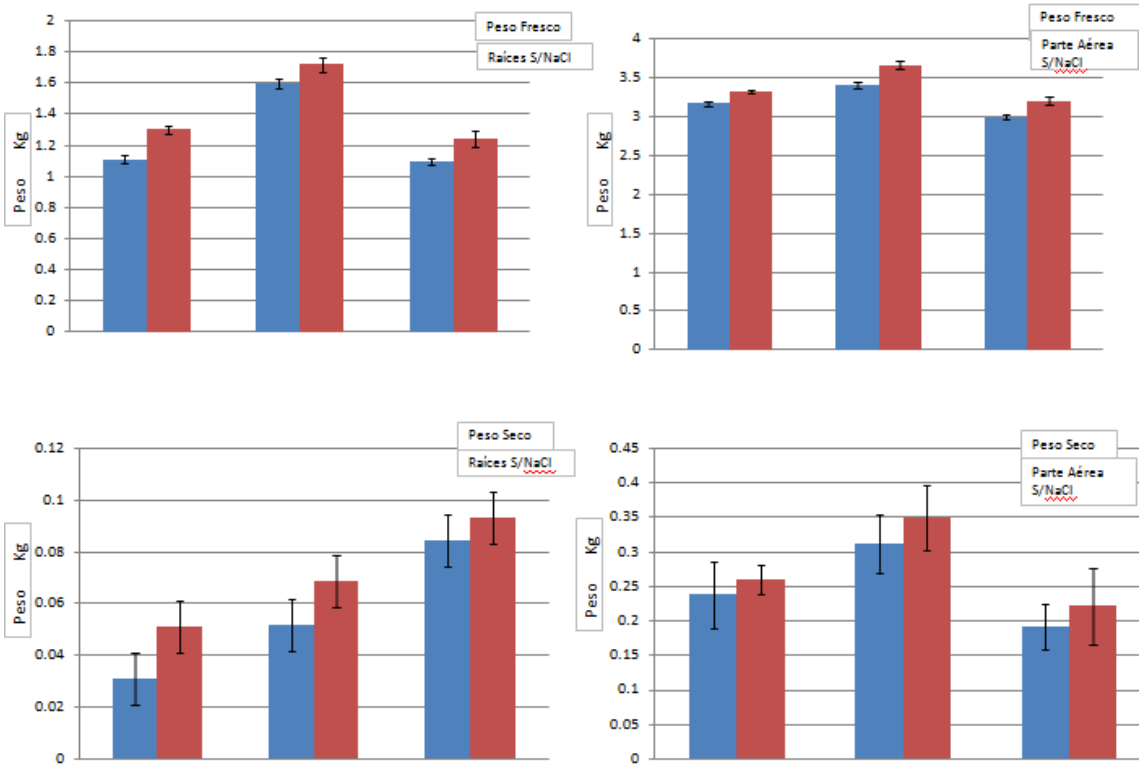


Fig 50. Peso Fresco y Peso Seco de las plantas Columbia 0 y Salk_027144 4 regadas con diversas concentraciones de NaCl y control.

8. DISCUSIÓN.

8.1 Desinfección de semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Es conveniente desinfectar las semillas antes de sembrarlas para evitar contaminación por hongos y bacterias y así mismo no desarrollen enfermedades las plantas una vez que haya germinado. Existen en el mercado multitud de productos químicos que pueden utilizarse para desinfectar las semillas, desde fungicidas y bactericidas. Así mismo existen diversas técnicas que permiten la desinfección de estas, la mayoría de ellas comprenden el lavado de las semillas con Hipoclorito de Sodio, Etanol, Cloro, así como diversos detergentes.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 y las de la línea Salk, fueron esterilizadas con ayuda de Etanol absoluto y Cloro al 50%, para después recibir ocho lavados con agua estéril con el fin de limpiar las semillas de estos compuestos, que podrían afectar la germinación. Está técnica permitió un cultivo aséptico y una germinación más rápida. Una vez germinadas las semillas se colocaron durante dos días en 4°C (Estratificación), las semillas necesitan ser afectadas por temperaturas bajas para poder germinar. En la naturaleza esto se produce al llegar el invierno. Después de uno o varios periodos hibernales, las semillas consiguen la germinación**.**

Después de dos días de estratificación las cajas petri con las semillas se colocaron en la cámara de crecimiento, para posteriormente realizar la extracción de DNA y llevar a cabo las cinéticas de porcentaje de germinación con los diversos tratamientos de estrés salino y osmótico.

8.2. Identificación de línea homóciga afectada en FT regulado por estrés salino y osmótico.

La línea Salk_027144 4 fue elegida por presentar una mayor tolerancia ante estrés salino a diferencia de las otras líneas, es por ello que se decidió estudiarla. Está línea fue identificada como homociga al presentar una banda de aproximadamente 400 pb, la banda característica de una planta homóciga.

En esta mutante el T-DNA cae en el promotor de un factor de transcripción que corresponde a un Zinc-Fingers (*Zat18*), el T-DNA se encuentra con respecto al ATG 277pb arriba (Fig 51).

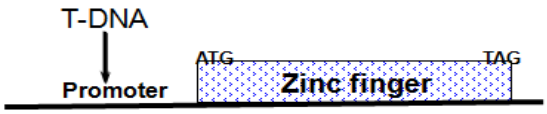


Fig. 51 Inserción del T-DNA en la línea mutante.

El gen AT3g53600 codifica un miembro de la familia de dedos de Zinc, de la subfamilia C1-2i que contiene 20 miembros, los miembros de este subgrupo presentan una gran homología entre el primero y segundo domino de los dedos de zinc (Vias). Este gen se encuentra en el cromosoma dos de *Arabidopsis thaliana* presenta 175 aminoácidos y un peso molecular de 20147.1 KD. Presenta una gran homología con el gen AT2g37430 (*Zat 11*) gen que se encuentra en el cromosoma dos de *Arabidopsis thaliana* presenta 178 aminoácidos y un peso molecular de 20230.3. El Zinc-Fingers (*Zat18*) se induce por diversos tipos de estrés tanto en hojas como en raíces (Fig. 52 y 53).

Expresión

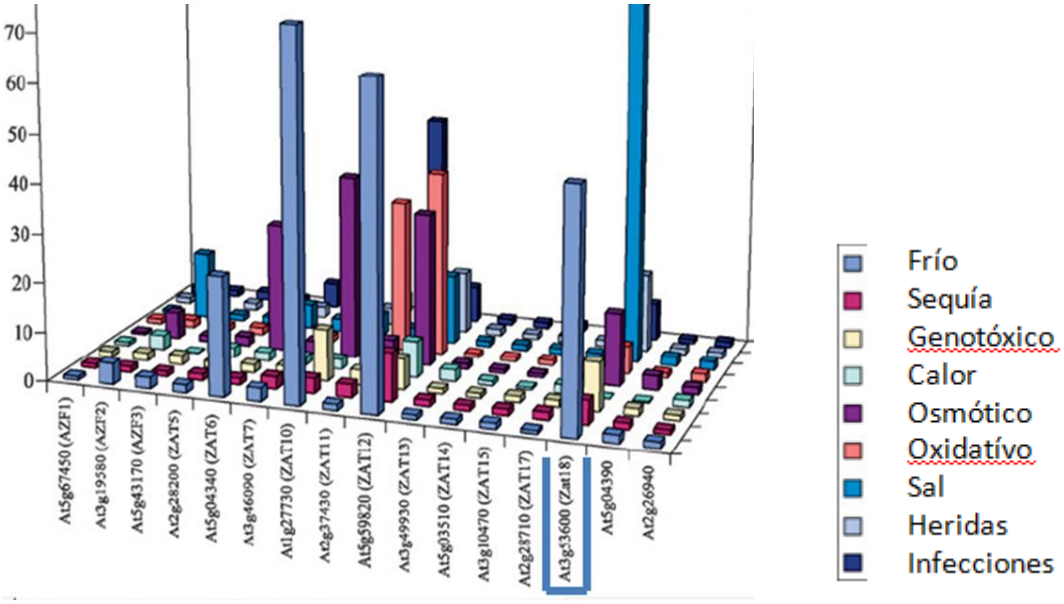


Fig. 52 Expresión en raíces de *Arabidopsis* expuestas a diversos tipos de estrés (www.geneinvestigator.ethz.ch).

Expresión

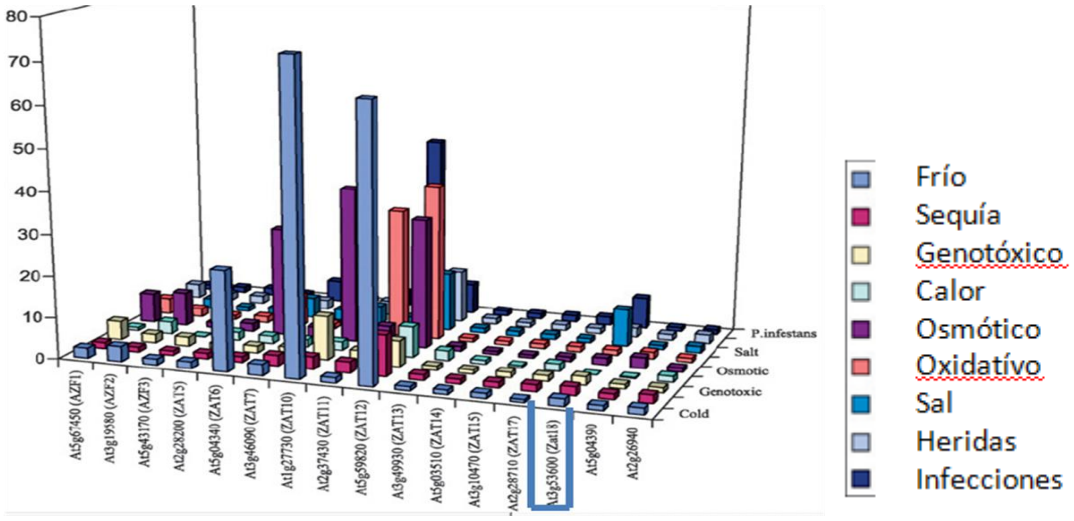


Fig. 53 Expresión en hojas de *Arabidopsis* expuestas a diversos tipos de estrés (www.geneinvestigator.ethz.ch).

La base de datos Geneinvestigator da a conocer que el *Zat18* presenta altos niveles de expresión en diversos estímulos y órganos donde se inducen (Tabla 13).

Tabla 13. Estímulos y órganos donde se induce el gen Zat18 (www.geneinvestigator.com).

Estímulo	Concentración	Horas	Órgano donde se induce
NaCl	150 mM		Raíces
NaCl	200 mM	24	Hojas adultas
Cicloheximida	10 micromolar	3	Semillas
Metil jasmonato	10 micromolar	1 a 3	Semillas
Ácido salicílico	.30 mM		Hojas adultas
Benzodiatizol	2 micromolar	24	Flores
Manito	300 Mm		Raíces
ABA	10 micromolar	1	Plantas de dos semanas
Sequía		24	Plantas de dos semanas

El factor *Zat18* se une a varios elementos en cis, en la figura 53 se muestran algunos.

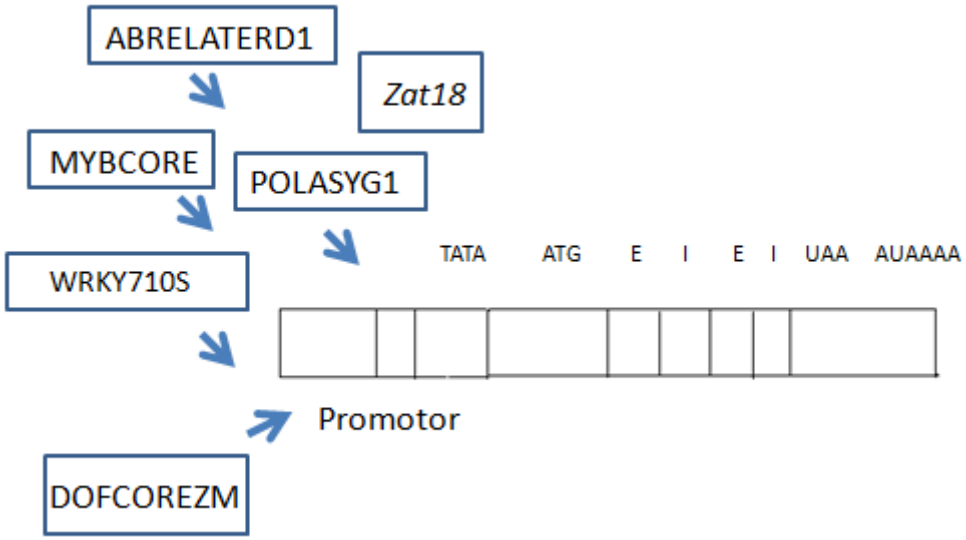


Fig. 54 Elementos en cis a los que se une el *Zat18*. (E= exón, I= intrón) (www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html).

8.3 y 8.4 Evaluación fenotípica de la planta silvestre y mutante (homóciga) ante estrés salino y osmótico.

En Condiciones naturales una alta concentración de NaCl en el medio inhibe la germinación debido al aumento de la concentración de iones ocasionando un efecto tóxico, así como la reducción del potencial hídrico del suelo, induciendo una menor capacidad de absorción del agua e inhibiendo el porcentaje de germinación. El déficit hídrico provoca una menor difusión del agua a través del tegumento, se reduce la actividad enzimática, un menor desenvolvimiento meristemático y atraso en la radícula (Falleri, 1994).

La salinidad afecta las funciones de la membrana y las paredes celulares (Madhavi *et al*., 2007). El NaCl afecta la permeabilidad de las membranas plasmáticas e incrementa el flujo de iones externos y el flujo de solutos citosólicos en las células de las plantas. El NaCl también causa endurecimiento de la pared celular y un aumento de la conductividad hídrica de la membrana plasmática. Estos efectos sobre las funciones de las membranas y paredes celulares pueden afectar el potencial del citosol y la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas. La reducción de la germinación bajo condición salina puede deberse al hecho de que la latencia se incrementa en las semillas de los cultivos bajo estrés salino (Madhavi *et al*., 2007).

La disminución del porcentaje de germinación así como el aumento en el número de días para que ocurra la germinación ha sido reportada en diversas especies de gramíneas., Silva *et al*, (2007) encontraron que el porcentaje de germinación de semillas de cebada disminuyó al elevar las concentraciones de NaCl debido a que la salinidad afectó la integridad de la membrana. Uno de los órganos que se ve más afectado por altas concentraciones de salinidad es la raíz, como principal órgano de absorción de

agua y iones, la cual tiene gran importancia en la respuesta a corto y largo plazo al estrés salino. Las características anatómicas y morfológicas de la raíz pueden tener gran influencia en la capacidad de adaptación a la salinidad (Reinhardt y Rost, 1995; Maggio *et al.*, 2001). En el maíz, la salinidad redujo la longitud e incrementó el diámetro de las raíces. Además, estimuló la suberización de la hipodermis y la endodermis y la formación de la banda de Caspari en células endodérmicas más próximas al ápice o la formación de estructuras atípicas para la especie como la rizodermis con engrosamiento de paredes (Phyton *et al*., 2003). La respuesta más común a la salinidad se relaciona con modificaciones en la pared celular y cambios en las cantidades relativas de los tejidos radicales. Induce el adelgazamiento y la menor ramificación en las raíces de las plantas sensibles, provocando un aumento en el espesor de las paredes celulares.

La planta silvestre Ecotipo Columbia 0 presento un porcentaje de germinación del 43% en una concentración de 150 mM, 33% en una concentración de 175 mM y 2% en una concentración de 200 mM, mientras que la planta Salk_027144 4 presento un porcentaje de germinación del 47% en una concentración de 150 mM, 38% en una concentración de 175 mM y 4% en una concentración de 200 mM, por lo tanto no existieron diferencias en el porcentaje de germinación en las diversas concentraciones de NaCl entre la planta silvestre ecotipo Columbia 0 y la Salk_027144 4; comparando está ultima con las mutantes NN4, NN23, NN69, NN143, la mutante Salk_027144 4 presento un menor porcentaje de germinación a una concentración de 175 mM de NaCl, debido a que estás mutantes presentaron un porcentaje de germinación entre el 59% y 65%, mientras que a una concentración de 200mM se abatió la germinación para la mutante Salk_027144 4 no así para las mutantes NN23 que a la misma concentración presentaron un porcentaje de germinación del 88% (Chege N., 1999). En una concentración de 150 mM de NaCl las mutantes RS17, RS19 y RS20 germinan 80, 30 y

70% respectivamente, mientras que la mutante Salk_027144 4 con una misma concentración presenta un porcentaje de germinación del 47%. Las mutantes de Arabidopsis RS17 y RS19 son mutantes que presentan un porcentaje del 20% en una concentración de 200 mM de NaCl (Saleki *et al*., 1993), mientras que en la mutante Salk_027144 4 se abate la germinación en está misma concentración, pero a diferencia de la mutante RS20 que tolera una concentración de 75 mM de NaCl, la mutante Salk_ 027144 4 tolera hasta una concentración de 150 mM de NaCl. Las mutantes salobreño con excepción de sañ2 germinan en concentraciones de 200 mM de NaCl y sañ1 en concentraciones de hasta 300 mM de NaCl (Quesada *et al*., 2000).

Con la sal KCl las mutantes RS17, RS19 y RS20 presentan porcentajes de germinación similares a la silvestre donde a concentraciones de 150 mM de está sal se abate la germinación, mientras que la mutante Salk_027144 4 en esta misma concentración presenta un porcentaje de germinación del 48% y sigue germinado hasta 175 mM de KCl. Las mutantes salobreño a excepción de sañ5 son más sensibles a KCl que al NaCl, sin embargo las mutante sañ1-4 y sañ3-1 presentaron porcentajes de germinación del 25.6 % y 44.7% respectivamente en una concentración de 125 mM KCl donde la mutante Salk_027144 4 presento un porcentaje del 69%. Siendo la sal KCl la que más afecto el porcentaje de germinación a partir de concentraciones mayores de 200 mM tanto para la planta silvestre como para la mutante y lo mismo sucedió para la concentración 600 mM de Sorbitol. La planta Salk_027144 4 en el desarrollo postgerminativo presenta una mayor tolerancia a concentraciones de 100, 125 150 mM de NaCl así como 125 mM de KCl, mientras que en el agente osmótico sorbitol no se observaron diferencias.

Con base a la función de los FTs (represor y activadores de la transcripción) y el fenotipo de la mutante en presencia de Na^+, sugieren que el FT silvestre podría

funcionar como un represor. En este sentido, la posible ausencia o reducción del FTs *Zat18* en la mutante, podría permitir la expresión de genes involucrados en conferir la tolerancia al estrés salino, genes que codifican para proteínas como transportadores, aminoácidos, amidas, polioles y azúcares etc. Y presentan un dominio llamado EAR que le podría estar confiriendo la represión, este dominio se encuentra en el carboxilo terminal (Fig. 55). El motivo EAR fue primeramente identificado en las proteínas AP2/ERF y los dedos de zinc tipo C2H2.

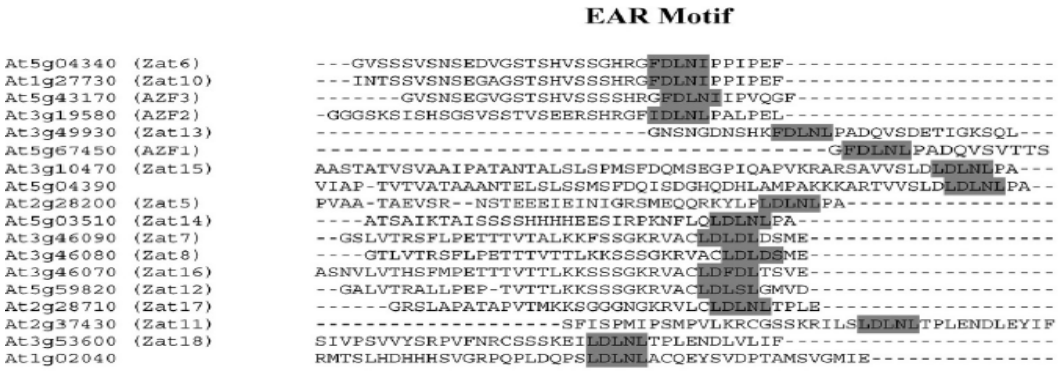


Fig 55. Motivo EAR en el gen At3g53600.

Tabla 14. Ejemplos de represores transcripcionales que presentan motivo EAR.

Represor EAR	Especie	Motivo EAR	Función
NIMIN1	*Arabidopsis*	LDLNL	Defensa
NRR	Arroz	LDLNV	Defensa
AtERF4	*Arabidopsis*	LDLNL	Defensa
AtERF7	*Arabidopsis*	FDLNL	Estrés por sequía
ERF3	*Arabidopsis*	FDLNL	Defensa (Heridas)
ZAT12	*Arabidopsis*	LDLSL	Estrés oxidativo y frío
ZAT10	*Arabidopsis*	FDLNI	Estrés salino, frío y sequía
AZF2	*Arabidopsis*	IDLNL	Estrés por sequía
NbCD1	Tabaco	LDLNL	Muerte celular
AtMYB4	*Arabidopsis*	PDLNL	Estrés por UV
AUX/IAA	*Arabidopsis*	LXLXL	Auxinas
HSI2	*Arabidopsis*	IDLNS	Señalización de azúcares
ZFT1	Tabaco	FDLNI	"Spermine signaling"
ZCT1	*Catharanthus roseus*	LDLNL	Metabolismo secundario

ZCT2	*Catharanthus roseus*	LDLNL	Metabolismo secundario
ZCT3	*Catharanthus roseus*	FDLNL	Metabolismo secundario
ZPT2-3	Petunia	FDLNI	Tolerancia a salinidad

Miembros de este grupo incluyen a *Zat6, Zat7, Zat10, Zat 12*, estos FTs se encuentran involucrados en la respuesta a diversos tipos de estrés. En las plantas, varios factores de transcripción se ha demostrado que actúan como represores. AtMYB4 es un represor transcripcional, su dominio de represión se ha localizado en la región C-terminal (Jin *et al*., 2000). Sin embargo, la represión de diversos dominios, secuencias conservadas, o regiones esenciales para la represión no se han caracterizado en detalle. El motivo EAR es esencial para la represión y se conserva en algunas familias de factores de transcripción (Otha *et al*., 2001) dentro de estos FTs se encuentran los tipo dedos de Zinc.

El dedos de Zinc *Zat10* se une al promotor RD29A y reprime su expresión (Lee *et al*., 2002). Transgénicas creadas por RNA de interferencia estudiando al *Zat10* son tolerantes al estrés salino y osmótico (Mittler *et al*., 2006). Se ha sugerido que el *Zat12* reprime la expresión de otros factores de transcripción CBF1, CBF2 y CBF3 en respuesta a estrés (Vogel *et al*., 2005). La sobreexpresión de un represor EAR llamado NIMIN1 que regula la expresión del gen PR-1 en Arabidopsis eleva la susceptibilidad a patógenos, al suprimir a NIMIN1, el gen PR-1 se expresa constitutivamente (Weigel *et al*., 2005). Así mismo al sobreexpresar el dominio EAR del Zinc Finger *Zat12* resulta en la represión de varios transcritos (Vogel *et al*., 2005). Sin embargo cuando existe una mutación en el dominio EAR de este Zinc Finger muestra tolerancia al estrés por calor, (Davletova, *et al*., 2005). Mostrando que la fusión de este motivo a diferentes dominios del DNA podría reprimir la transcripción de varios genes y sugiriendo que estos

dominios podrían actuar como represores de la expresión génica en plantas (Hiratsu, *et al*, 2003). En el arroz un dedos de zinc ZFP182 carece de este motivo EAR, al sobreexpresarlo confiere tolerancia a plantas transgénicas de arroz (Huang *et al*., 2007). Para confirmar que las regiones C-terminal que contiene el motivo EAR son los dominios de la represión, estudiando a ZAT10 y ZAT11, construyeron mutantes suprimiendo el dominio 174/224 y la región 189/224 que contenían el motivo EAR, la represión de la transcripción fue abolida por completo, los polipéptidos que carecían de la región C-terminal no se vieron reprimidos en su expresión, sino que la activó. Estos resultados indican que las proteínas que presentan un motivo EAR funcionan como represores (Massuru *et al*., 2001).

Los esfuerzos que deben realizarse para aislar y caracterizar las proteínas que interactúan con el dominio de la represión EAR podrían aclarar el mecanismo de la represión y los posibles roles de los represores en el control de la expresión génica. Estudiar represores que presentan el motivo EAR ayudaría a entender los mecanismos que regulan la transcripción en plantas.

La fitohormona Acido Abscisico (ABA) es una reguladora de procesos importantes como son el desarrollo de la semilla, dormancia y posterior germinación y también interviene en la respuesta adaptativa de tejidos vegetativos frente a estreses ambientales de sequía, salinidad y frío. Altas concentraciones de Ácido Abscisico afectan el porcentaje de germinación de las semillas impidiendo la absorción del agua bajo estrés osmótico, así mismo bajo estrés salino los niveles de ABA endógeno aumentan (Ober y Setter., 1992). Las mutantes salobreño sañ 5 son mutantes que germinan en un porcentaje de 100% en una concentración de 2.5 micromolar concentración que afecta los porcentajes de germinación en la planta silvestre Columbia

0, a diferencia de la planta Salk_027144 4 que presentan un porcentaje de germinación del 39%.

8.5 Evaluación fenotípica de la mutante ante estrés salino en comparación con la silvestre en sistema maceta.

Quing *et al*., 2008, sobreexpresando el factor ZJFP252 del maíz un factor perteneciente a la familia dedos de zinc, obtuvieron un mayor peso fresco cuando se regaron con 100 mM de NaCl, a diferencia de la plantas control. La mutante Salk_027144 4 presento un mayor peso fresco en una concentración de 150 mM de NaCl a diferencia de la Columbia 0. Los niveles de fotosíntesis son menores cuando las plantas se encuentran en estrés salino. La salinidad afecta la fotosíntesis de las plantas produciendo un menor peso en el área foliar, tallos y raíces lo que ocasiona la muerte de las plantas y su baja producción. Los cambios macroscópicos que se observan bajo condiciones de salinidad, como reducción del área foliar y de la relación parte aérea/raíz, entre otros cambios también reflejan el ajuste necesario para recuperar el balance hídrico. Con el modelo *Arabidopsis* se descubrió la vía de regulación de la homeostasis iónica bajo estrés salino por clonación de los genes sensibles al exceso de salinidad. Surge la necesidad de hallar un organismo de estudio que sea naturalmente tolerante a la salinidad (halófilas y xerófilas) con los procesos originales y mecanismos únicos de tolerancia, pero con sutiles diferencias en la regulación, que den la importancia en las variaciones en la tolerancia o la sensibilidad a la salinidad.

9.CONCLUSIONES

- No existen diferencias en el porcentaje de germinación en las diversas concentraciones de NaCl, KCl y Sorbitol en la planta Arabidopsis thaliana ecotipo Columbia y la planta Salk_027144 4.

- No se observaron diferencias en la longitud de las raíces en la planta Arabidopsis thaliana y la mutante Salk_027144 4 en las diversas concentraciones de NaCl, KCl y Sorbitol.

- En el desarrollo postgerminativo la mutante Salk_027144 4 presenta una mejor tolerancia en concentraciones de 100, 125 y 150 mM de NaCl y en 125 mM de KCl, mientras que no se observaron diferencias en Sorbitol.

- En concentraciones de 5 y 10 micromolar de la hormona Ácido Abscísico se abate la germinación en la planta silvestre y mutante.

- Concentraciones de 100, 150, 200 y 250 mM de NaCl afectan la fotosíntesis en la planta silvestre en comparación con la planta mutante Salk_027144 4 en el sistema maceta.

- La mutante Salk_027144 porta una inserción de T-DNA en la región promotora de un factor de transcripción tipo Zinc-Finger (*Zat18*).

- La posible ausencia del FTs *Zat18* en la mutante, podría permitir la expresión de genes involucrados en conferir la tolerancia al estrés salino en la planta mutante.

10.PERSPECTIVAS.

- Conocer el nivel de expresión del factor de transcripción Zinc-Finger (*Zat18*), lo que podría aclarar si su posible ausencia confiere tolerancia a la planta mutante.

- Conocer si la interrupción del Zat18 es el responsable del fenotipo de la mutante.

- Determinar si la planta mutante en comparación con la silvestre presenta una mayor acumulación de aminoácidos u osmolitos que le estén permitiendo una mayor tolerancia ante estos tipos de estrés.

11.REFERENCIAS.

Apse, M y Blumwald, E. 2007. Na^+ transport in plants. FEBS Lett 581:2247-2254.

Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H. 1999. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni2 tolerance and Pb hypersensitive in transgenic plants. Plant J 20: 171-182.

Boulikas, T. 1994. Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. J. Cell. Biochem. 55: 32-58.

Bray, E.A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stress. In: W. Gruissem, B. Buchannan and R. Jones (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1158–1249.

Bohnert, H.J., Nelson D.E. & Jensen R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell 7:1099–1111.

Chege, N. 1993. Physiological and Genetic characterization of T-DNA insertion Mutants of Arabidopsis thaliana that are Tolerant to Salt. Ontario, Canada.

Chinnusamy V. & Zhu Jian-Khang. (2004). Plant salt tolerance. Published by Springer, pp.241-251.

Davlotova, S; Schlauch, K; Coutu, J y Mittler, R. 2005. The zinc finger Protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis 139:847-856.

Demidhik, V., Davenport R y Tester M. 2002 Nonselective cation channels in plants. Annu Rev Plant Biol 53:67-107.

Epenshade, P and Hughes, A. 2007. Regulation of sterol synthesis in eucaryotes. Annu. Rev. Genet 41:401-42

FAO. (2008). FAO land and Plant Nutrition Management Service. http://www.fao.org/ag/agl/spush.

7.

Flowers, T y Colmer, T. 2008. Salinity tolerance in halophytes. New Phytologist 179: 945-963.

Flowers, T J and Flowers, S A. 2005. Why does salinity pose surch a difficult problem for plant breeders. Agricultural Water Management 78: 15-24.

Gilroy, S; Read, N D and Trewavas, A J. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inosito trisphosphate initiates stomatal clousure. Nature 343: 769-771.

Gleeen, E.P.; Brown, J.J. y Bluman, E. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. Critical Reviews in Plant Science, 18: 227-255.

Goldfarb, A.N. & Lewandowska, K. (1994) Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner. Exp. Cell Res. 214, 481-485.

Guiltinan, M.J. & Miller, L. (1994) Molecular characterization of the DNA-binding and dimerization domains of the bZIP transcription factor, EmBP-1. Plant Mol. Biol. 26, 1041-1053.

Harper, J., Binder, B y Susman M. 1993. Calcium and lipid regulation of Arabidopsis protein Kinase expressed in Escherichia coli. Biochemistry 33:7278-72-87.

Hasegawa P.M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. (2000). Plant Cellular and molecular responses to high salinity. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51: 463-499.

Hornberg, C and Weiler, E. 1984. High affinity binding sites for ABA on the plasmalemma of Vicia guard cells.Nature 310: 321-324.

Huang H., Tudor M., Su T., Zhang Y., Hu Y y M H. 1996. DNA binding properties of two Arabidopsis MADS domain proteins; binding consensus and dimer formation. Plant Cell 8: 81-94.

Jenks M. A. & Hasegawa P. M. Plant Abiotic Stress. India. Blackwell Publishing Ltd. 2005. 270 pp. ISBN-13: 978-14051-2238-2.

Karam B S; Foley R C y Sanchez O L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. Current Opinion in Plant Biology. 5: 430-436.

Katagiri, F., Seipel, K. & Chua, N.-H. (1992) Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. Mol. Cell. Biol. 12, 4809-4816.

Kazzan, K. 2006. Negative regulation of defense and stress genes by EAR-motif containing repressors. Trend Plant Sci, 11 109-112.

Klinge, B., UÈ berlacker, B., Korfhage, C. & Werr, W. (1996) ZmHox: a novel class of maize homeobox genes. Plant Mol. Biol. 30, 439-453.

Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF. 2002. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic and cold stress. Plant Physiology 130, 2129–2141.

Leung J., Giraudat J**.** (1998). Abscisic acid signal transduction. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49:199-222.

Liansen L., White M y MacRae T. 1999. Transcription factors and their genes in higher plants. Eur. J. Biochem. 262: 247-257.

OverLiu, W.,D.J. Fairbairn,R.J.Reid, andD.P. Schachtman. 2001.Charac- expression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enterization of two*HKT1*homologues from *Eucalyptus camaldulensis* hances the growth of transgenic tobacco seedlings

during stress. that display intrinsic osmosensing capability. Plant Physiol. 127: 988–991.

Maathius, F.J.M. y Amtman, A. 1999. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. Annals of Botany, 84: 123-133.

Mahdavi, B. & Modarres Sanavy, S.A.M 2007.Germination and seedling growth in grasspea (*Lathyrus sativus*) cultivars under salinity conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 273-279

Mahajan, S y Narendra, T. 2005. Cold, Salinity and drought stresses: An Overview. Archives of Biochemistry and Byophysics 444: 139-158.

Maathius F., Filatov V., Herzyk P., Axelesn K., Chen S., Green B., Madagan L., Sanchéz R., Forde B., Palmgren M., Williams L., Sanders D y Amtamannn A. 2003. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple genes families in the response to cation stress. Plant Journal 35:675-692.

Meissner, R. & Michael, A.J. 1997. Isolation and characterization of a diverse family of Arabidopsis two and three-fingered C2H2 zinc finger protein genes and cDNAs. Plant Mol. Biol. 33, 615-624.

Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytologist. 167:645-663.

Neumann, M and Naumann, M. 2007. Beyond IkappaBS: alternative regulation of NF-KappaB activity. FASEB J 21:2642-2654.

Oliver, M; Dowd, S; Zaragoza, J; Mauget, S and Payton, P. 2004. The rehydration transcriptome of the desiccation tolerant bryophyte Tortula ruralis: transcript classification and analysis. BMC Genomics 5:89.

Oñate-Sánchez L and Singh KB. Identification of Arabidopsis ethylene.responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. Plant Physiol 2002. 128: 1313-1322.

Olsson, A. 2005. HDZip I Transcription Factors in Arabidopsis thaliana. Acta Universitatis Upsaliensisis Upsala.

Otha, M; Matsui, K; Hiratsu, K and Takagi, M. 2001. Repression domains of class II ERF transcripcional repressors share an essential motif for active repression. Plant Cell 12, 393-404.

Park JM; Park CJ, Lee SB and Shin R. 2001 Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2type transcription factor enhances resistence against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. Plant Cell: 13, 1035-1046

Pei, Z; Murata, Y; Benning, G; Thomine, S; Klusener, B; Allen, G; Grill, E and Schroeder, J. 2000. Calcium chanels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. Nature 406: 731-734.

Phyton B; Perreta M y Vegetti A. 2003. Variaciones anatómicas en la raíz de Pappophorum philippianum inducidas por salinidad. Cátedra Morfología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral, Kreder 2805, S3080HOF Esperanza, Pcia. Santa Fe, Argentina.

Platen D; Cotsaftis O; Berthomieu P; Bonhert H; Romola J; Faibairn D; Tomoaki H; Leigh R; Lin H; Luan S; Mäser P; Pantoja O; Navarro A; Schactman D; Schroeder J; Sentenac H; Uozumi N; Very A; Zhu Jk; Tester M. 2006. Nomenclature for HKT transporters, key determinats of plant salinity tolerance. Trends in Plant Science 11: 372-374.

Povova O, Yang Oksoon and Dietz Karl. 2008. Differential transcript regulation in Arabidopsis thaliana and the halotolerant Lobularia maritime indicates genes with potencial function in plant salt adaptation. Gene 423:142-148.

Quesada, V; Ponce, M y Micol, J. 2002. Genetic Analysis of Salt-Tolerant Mutants in Arabidopsis thaliana. Genetics 154: 421-436.

Quiang L; Guiyou Z y Shouyi C. 2001. Structure and Regulatory function of plant transcription factors. Chinese Science Bulletin 46: 1-8.

Rengasamy, P. 2002. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: on orview Aust. Exp. Agric 42:351-61.

Riechmann, J.L., Heard J., Martin, G; Reuber, L; Jiang, C. –Z; Keddie, J; Adam, L Pineda, O; Ratcliffe, O; Samaha, J; R. R; Creelman, R; Pilgrim, M; Broun, P; Zhang, J Z; Ghandehari, D; Sherman,B. K; Yu, G L. 2000. *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes Science 290:2105-2110.

Robatzek S, Somssich IE: 2006. Targets of ATWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. Genes Dev 16:1139-1149

Rock, C. 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. New Phytol 148: 357-396.

Rodriguez M; Canales E y Barras H O. 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotecnología Aplicada 22: 1-10.

Rus, A.M.; Yokoi, S.; Sharkuu, A.; Reddy, M.; 2001a. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na^+ entry into plant roots. Proceedings National Academy of Sciences USA, 98:14150-14155.

Saleki, R; Young, P y Lefebvre, D. 1993. Mutants of Arabidopsis thaliana Capable of germination under saline conditions. Plant Physiology 101: 839-845.

Sakamoto, H; Maruyama, K; Sakuma, Y; Meshi, T; Masaki, I; Shinozaki, K. 2004. Arabidopsis Cys2/His2 Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold and High-Salinity Stress Conditions. Plant Physiology 136: 2734-2746.

Santa M, G.; Rubio, F.; Dubcosky J. y Rodríguez-Navarro, A. 1997. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter. Plant Cell, 9: 2281-2289

Seaman, J. Mechanisms of salt tolerance in halophytes: can crop plants resistance to salinity be improved? APS 402 Dissertion.

Sergey S y Cuin T. 2007. Potassium transport and plant salt tolerance. Physiology Plantarum. 133:651-669.

Shi, H., B.-H. Lee, S.-J. Wu, and J.-K. Zhu. 2003. Overexpression of Xiong, L., and Y. Yang. 2003. Disease resistance and abiotic stressa plasma membrane Na_/H_ antiporter improves salt tolerance in tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid–*Arabidopsis.* Nature Biotechnol. 21:81–85.

Shi, H., F.J. Quintero, J.M. Pardo, and J.-K. Zhu. 2002. The putative Xiong, L., B.-H. Lee, M. Ishitani, H. Lee, C. Zhang, and J.-K. Zhu. plasma membrane Na_/H_ antiporter SOS1 controls long-distance 2001b. *FIERY1* encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase Na_ transport in plants. Plant Cell 14:465–477.

Singh K., Foley R C. & Oñate-Sánchez L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. Current Opinion in Plant Biology 5; 430-436.

Stepien, P and Johnson, G, N. 2009. Contrasting Responses of Photosynthesis to Salt Stress in the Glycophyte Arabidopsis and the Halophyte Thellungiella: Role of the Plastid Terminal Oxidase as an Alternative Electron SinkPlant Physiology 149:1154-1165.

Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (1999). Molecular responses to drought stress. En: Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K Molecular (eds) Responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants". RG Landes, TX, pp 11–28.

Shisong Ma; Qingqiu, Gong and Bohner, Hans J. 2005. Disecting salt stress pathways. Journal of Experimental Botany 57: 1097-1107.

Szaboles, I. 1989. Salt-Afected Soils. Boca Raton, FL: CRC Press.

Takatsuji, H. 1998. Zinc finger proteins: the classical zinc finger emerges in cotemporany plat science. Plant Molecular Biology 39: 1073-1078.

Tester, M y Davenport R. 2003. Na+ tolerance and Na+ transport in higher plants. Ann Bot 91:503-527.

Thomson,W; Faraday, C D and Omoss J W. 1988. Salt gland. In: Baker, D A, Hall, J.L. (Eds). Solute Transport in Plant Cell and Tissue. Longman Scientific and Technical, Harlow, pp 498-537.

USDA-ARS. 2008. Research Databases. Bibliography on Salt tolerance. George E. Brown, fr. Salinity Lab. US Dep. Agric., Res. Serv. Riverside, CA. http:// www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908.

Uozomi, N., Kim, E., Rubio, F., Yagamuchi, T., Muto, S., Tsuboi, A., Bakker, E., Nakamura, T., Sxhroeder, J. 2000. The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na+ currents in Xenopus laevis oocytes and Na^+ uptake in Saccharomyces cerevisiae. Plant Physiol 122:1249-1259.

Venema, K.; Quintero, F.J.; Pardo J.M. y Donaire, J.P. 2002. The *Arabidopsis* Na+/H+ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na+ and K+ transport in reconstituted liposomes Journal of Biological Chemistry (en prensa).

Weigel, R; Pftizner, U and Gates, C. 2005. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. Plant Cell 17: 1279-1291.

Xiong, L y Zhu, J. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell and Environment 25: 131-139.

Xiong, L; SchumaKer, K; Zhu, J.K. 2002. Cell signaling during cold, drought, salt stress. The Plant Cell 25:123-130.

Yanagisawa, S. 1998. Transcription Factors in Plants: Physiological Functions and Regulation of Expression. J Plant Ress. 111: 363-371.

Yilmaz, S; Morshy, M; Song, L; Coutu, A; Krizek, B; Lewis, M; Warren, D; Cushman, J; Connely, E; Mittler, R. 2007. The EAR motif of the Cys/Hys type Zinc Finger Protein Zat7 plays a Key Role in the Defense Response of Arabidopsis to Salinity Stress. The journal of biological biochemistry 282: 9260-9268.

Yokotani, N; Ichikawa, T; Kondou, Y; Matusi, M; Hirochika, H; Iwabuchi, M and Oda K. Expression of rice heat stress transcription factor OsHsfa2 enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*.

Zhu, J. 2000. Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance using Arabidopsis. Plant Physiology. 124:941-948.

Zhu, J. 2002. Salt and Drought stress signal transduction in Plants. Annu. Rev. Plant Biol 53:247-273.

CITAS DE INTERNET

(http://datf.cbi.pku.edu.cn/)

www.arabidopsis.org.

www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html

www.geneinvestigator.ethz.ch

12.ANEXOS

ANEXO 1

ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS DE ARABIDOPSIS
(Trabajar en campana de flujo laminar)

1) En un eppendorf poner la cantidad de semillas a esterilizar.
2) Anadir a las semillas 500ul de etanol absoluto (no usar alcohol industrial) incubar 1 min como máximo.
3) Pulso de 20 sec en la centrifuga, sacar lo más posible de alcohol con la ayuda de una pipeta.
4) Añadir cloro al 50%. Agitar suavemente en vortex durante 7 min (Si se usan muchos tubos puede tomar de dos en dos y darles pulsos cortos en el vortex, alternando el orden de los tubos para que al final todos hayan sufrido más o menos el mismo tratamiento de agitación).
5) Sacar el cloro con previo pulso en la centrifuga (20 sec) y eliminando el cloro con pipeta.
6) Lavar las semillas con 500 microlitros de agua estéril y vortexeando suavemente (dos o tres pulsos).
7) Repetir el lavado con agua estéril por lo menos ocho veces hasta que el olor a cloro haya desaparecido.
8) Añadir 100 ml de agua estéril y sembrar las semillas en cajas Petri con medio apropiado. Ayudarse con una pipeta de 20 microlitros y puntas amarillas estériles cuyas puntas se hayan recortado con bisturí previamente al autoclaveo.
9) Colocar las cajas con semillas estériles dentro de una bolsa y guardarlas en el refri (4°C) por lo menos tres días. (Este tratamiento se llama estratificación: incubation of sedes in moist conditions to break dormancy, usually in cold to stimulate overwintering; la estratificación es particularmente importante cuando se realizan cinéticas de germinación).
10) Al final del tratamiento de estratificación las cajas se transfieren a la cámara de crecimiento.
11) Checar el porcentaje de germinación diariamente.

ANEXO 2

Protocolo de Extracción de DNA de Arabidopsis.

1) Una vez que las plantas presentan el segundo para de hojas verdaderas, se les corta una o dos hojas.
2) Estas dos hojas son maceradas con un pistilo.
3) A la muestra macerada agregar 400 microlitros de Buffer de Extracción.
4) Centrifugar 13000 rpm por 2-3 minutos.
5) Pasar 300 microlitros a un tubo nuevo.
6) Agregar 300 microlitros de isopropanol, mezclar y dejar 2 minutos a temperatura ambiente.
7) Centrifugar 13000 rpm por 5-7 minutos.
8) Tirar el sobrenadante
9) Lavar la pastilla con etanol al 70% , centrifugar y tirar el sobrenadante.
10) Dejar secar la pastilla 3-5 minutos y resuspenderla en 10 o 20 microlitros de agua (Dependiendo de la cantidad de DNA).

BUFFER DE EXTRACCIÓN.

	Para 50 ml
1M Tris Ph 7.5	10 ml
4 M NaCl	3.12 ml
.5 M EDTA	2.5 ml
10% SDS	2.5 ml
DH_20	31.9 ml

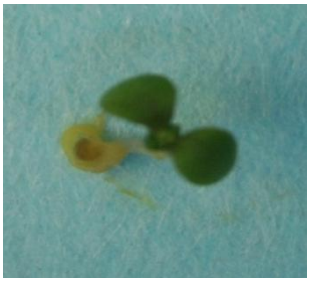
ANEXO 3

Comparación morfológica de la planta silvestre Col 0 y Salk_027144 4.

Debido a que la mutante Salk_027144 4 en su desarrollo postgerminativo presenta una mejor tolerancia a concentraciones de 125 y 150 mM de NaCl y a una concentración de 125 mM de KCl en comparación con la planta silvestre, se observaron diversas órganos de ambas plantas, con el objetivo de encontrar si en algún momento del desarrollo de la planta mutante y la planta silvestre se observaran diferencias que pudieran estar generando una tolerancia en la planta mutante.

No se observaron diferencias en el desarrollo y las inflorescencia, no así para las silicuas donde la planta mutante Salk_027144 4 es más delgada y larga a diferencia de la planta silvestre, también se observaron diferencias en las raíces, en la forma de las semillas y en la abundancia de los tricomas (Fig. 56).

Columbia 0 Salk_027144 4



A B

C D

E

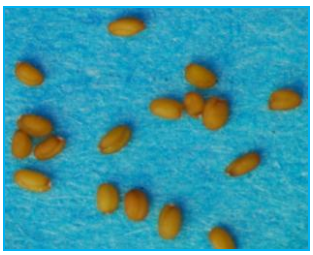
F

G

H

I

J



K

L

M

Fig 56. Desarrollo, Órganos y Semillas de la planta Silvestre Col 0 y Salk 027144 4. Cotiledones (A y B), Segundo par de hojas verdaderas (C y D), Mayor número de hojas (E y F), Raíces (G y H), Inflorescencias (I y J), Semillas (K y L) y Silicuas (M).

Donde se observo una mayor diferencia fue al sembrar las plantas ante 125 mM de NaCl. La planta silvestre presento un menor número de tricomas en las hojas a comparación de la planta mutante. Así mismo las hojas de la planta silvestre se vieron severamente afectadas (Fig 57).

A

B

Fig. 57 Tricomas y Hojas de la planta silvestre Columbia 0 (A) y la planta Salk_027144 4 (B) en 125 mM de NaCl.