



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN TIPO DEHIDRINA EN
CACTÁCEAS Y ESTUDIO DE SU EXPRESIÓN EN *Mammillaria bombycina***

PRESENTA

Sandra Hernández Camacho

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

Dr. José Francisco Morales Domínguez

COMITÉ TUTORAL

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Aguascalientes, Ags., 22 de noviembre del 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

SANDRA HERNÁNDEZ CAMACHO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Aislamiento y caracterización de un gen tipo Dehidrina en Cactáceas y estudio de su expresión en *Mammillaria bombycina*"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 08 de noviembre de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p. - Archivo.

M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como cotutor designado de la estudiante **SANDRA HERNÁNDEZ CAMACHO** con ID 32805, quien realizó la tesis titulada: **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN TIPO DEHIDRINA EN CACTÁCEAS Y ESTUDIO DE SU EXPRESIÓN EN *Mammillaria bombycina***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 27 de octubre de 2016



Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Cotutor de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio de la presente, como Comité Tutorial designado de la estudiante **SANDRA HERNÁNDEZ CAMACHO** con ID 32805 quien realizó la tesis titulada: **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN TIPO DEHIDRINA EN CACTÁCEAS Y ESTUDIO DE SU EXPRESIÓN EN *Mammillaria bombycina***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 25 de octubre del 2016


Dr. José Francisco Morales Domínguez
Co-Tutor de tesis

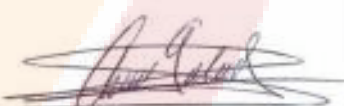
c.c.p.- M. en C. Sandra Hernández Camacho
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejo Académico
c.c.p.- Dra. Consuelo Martínez - Secretario Técnico

M EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesor designado de la estudiante **SANDRA HERNÁNDEZ CAMACHO** con ID 32805, quien realizó la tesis titulada: **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN TIPO DEHIDRINA EN CACTÁCEAS Y ESTUDIO DE SU EXPRESIÓN EN *Mammillaria bombycina***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 27 de octubre de 2016


Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

Dr. Eugenio Pérez- Molphe Balch

IBQ. Martha E. Pérez Reyes

Biol. Isaac A. Reyes Silva



Dr. Francisco Morales Domínguez

M. Cristina Garcidueñas Piña

M. Nancy Y. Meza Treviño

Dra. Virginia Herrera Martínez



Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. Mayra Esparza



Muchas gracias a todos ustedes que hicieron posible la conclusión de este trabajo de tesis, gracias por su apoyo incondicional no solo en lo laboral sino también el lo personal, ya que sin ésto no hubiera sido posible la conclusión de este posgrado y de mi crecimiento como investigadora. Gracia por el amor por la ciencia que han inspirado en mí.

También quisiera agradecer al:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. 260056) y a la SEP por el apoyo financiero al proyecto a través del PRODEP- Fortalecimiento de Cuerpos Académicos “Aislamiento y caracterización de algunos genes de respuesta a estrés en cactáceas”.

DEDICATORIAS

Este trabajo de tesis lo dedico muy especialmente a mi esposo y a mi hija que son un gran impulso para lograr mis objetivos. Gracias Abraham por el apoyo en todo momento, para poder comenzar y concluir este posgrado, y por caminar conmigo siempre.

Muchas gracias a mis padres y a mi hermana, porque siempre han estado ahí para apoyar mis desiciones, ustedes son una parte esencial en mi vida.

INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	13
1.1	Las cactáceas	13
1.2	Proteínas tipo LEA y su clasificación	17
1.3	Mecanismo de acción de las proteínas LEA	23
1.4	Las proteínas LEA 2 o dehidrinas	25
1.5	Papel de defensa de las proteínas LEA ante la presencia de diferentes tipos de estrés abiótico.	26
1.5.1	Estrés por calor	27
1.5.2	Estrés por sequía	29
1.5.3	Estrés osmótico por alta salinidad	30
1.5.4	Estrés por bajas temperaturas	31
1.6	Inducción de la expresión de los genes tipo DHN por ácido abscísico	33
1.7	Papel de las proteínas tipo dehidrina ante estrés biótico	35
1.8	Moléculas de señalización biosintetizadas en respuesta a estrés	40
1.8.1	Ácido Salicílico	41
1.8.2	Ácido Jasmónico y Etileno	42
1.9	Interacción entre el estrés biótico y abiótico en plantas.	45
1.10	El gen <i>OpsDHN1</i>	50
2	JUSTIFICACIÓN	52
3	HIPÓTESIS	54
4	OBJETIVOS	54
4.1	Objetivo general	54

4.2	Objetivos particulares	54
5	METODOLOGÍA	55
5.1	Esquema general de la metodología a seguir (etapa I).	55
5.2	Identificación de genes lea tipo dehidrina en diferentes cactáceas Selección del material vegetal	55
5.2.1	Selección del material vegetal	55
5.2.2	Diseño de oligonucleótidos para identificar el gen lea tipo dehidrina.	57
5.2.3	Extracción de ADN de cactáceas	57
5.2.4	Amplificación por PCR del gen <i>lea</i> tipo dehidrina	59
5.2.4.1	Amplificación del gen de la β -actina.	59
5.2.4.2	Estandarización de condiciones de amplificación	59
5.2.4.3	Identificación de genes LEA en diferentes cactáceas.	60
5.2.4.4	Amplificación del gen lea tipo dehidrina en <i>Opuntia ficus-indica</i> , <i>Leuchtenbergia principis</i> y <i>Mammillaria bombycina</i> .	61
5.2.5	Purificación y clonación de los fragmentos amplificados	61
5.2.5.1	Transformación genética bacteriana por choque térmico	62
5.2.5.2	Extracción de plásmidos	63
5.2.5.3	Verificación de la ligación mediante restricción y PCR.	64
5.2.6	Secuenciación de los productos amplificados y análisis in silico.	64

5.2.7	Análisis filogenético	65
5.2.8	Modelado 3D de los fragmentos de las proteínas putativas OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like.	68
5.3	Determinación del nivel de expresión del gen <i>MabDHN-like</i> ante diferentes tipos de estrés.	69
5.3.1	Esquema general de procedimientos para determinar el nivel de expresión del gen <i>lea</i> tipo dehidrina (etapa II)	69
5.4	Inducción de la expresión del gen <i>MabDHN</i> por estrés abiótico y ácido abscísico.	70
5.4.1	Inducción de la expresión del gen por frío.	70
5.4.2	Inducción de estrés por alta salinidad	70
5.4.3	Interacción de <i>M. bombycina</i> con 0.1 y 100 μ M de ABA	70
5.5	Inducción de la expresión del gen <i>MabDHN</i> por estrés biótico	71
5.5.1	Inducción de la expresión del gen por heridas	71
5.6	Inducción de la expresión del gen <i>MabDHN</i> en plantas interaccionadas con Fluridone	71
5.7	Extracción de RNA total de <i>M. bombycina</i>	72
5.8	Síntesis de cDNA	74
5.8.1	PCR semicuantitativo	74
5.8.2	qPCR	75
5.9	Análisis estadístico	76
6	RESULTADOS	77
6.1	Material vegetal seleccionado	77
6.2	Amplificación del gen <i>lea</i> tipo dehidrina	79
6.3	Escrutinio de genes tipo dehidrina en diferentes	80

	cactáceas.	
6.4	Clonación del fragmento amplificado.	83
6.5	Análisis de secuencias	84
6.6	Modelado 3D de los fragmentos de las proteínas putativas OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like.	91
6.7	Filogenia de los genes <i>lea</i> tipo dehidrina de cactáceas	95
6.8	Determinación del nivel de expresión del gen MabDHN-like ante diferentes tipos de estrés.	98
6.8.1	Extracción de RNA total de <i>M. bombycina</i>	98
6.8.2	Expresión del gen MabDHN ante estrés por frío.	98
6.8.3	Expresión del gen <i>MabDHN</i> ante estrés por alta salinidad.	100
6.8.4	Interacción de <i>M. bombycina</i> con ABA.	102
6.9	Inducción de la expresión del gen MabDHN por estrés biótico (heridas)	104
6.9.1	Inducción de la expresión del gen en plantas interaccionadas con Fluridone	105
7	DISCUSIONES	108
8	CONCLUSIONES	119
9.	GLOSARIO	121
10	BIBLIOGRAFÍA	122
11	ANEXOS	139
	Anexo A. Características de los oligonucleótidos diseñados	139
	A.1 Características de los oligonucleótidos FOpsDHN1 y ROpsDHN1 sintetizados de acuerdo	139

al programa DNASTar.	
A.2. Características de los oligonucleótidos F MabDHN y R MabDHN sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI.	139
A.3 Características de los oligonucleótidos F MabCuant y R MabCuant sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI	139
A.4. Características de los oligonucleótidos F 25S y R 25S en base a la secuencia de una región del gen 25S de jitomate.	140
Anexo B. Medios de cultivo y buffers utilizados	140
B.1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)	140
B.2 Buffer de lisis para extracción de ADN de cactáceas	142
B.3. Medio de cultivo LB	142
B.4. Buffers empleados para la extracción de plásmidos por el método Birnboim y Doly (1979)	142
B.5 Buffer de lisis para extracción de RNA de cactáceas	142
Anexo C. Secuencias de nucleótidos y proteínas obtenidas.	143
C.1 Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tipo dehidrina de <i>Opuntia ficus-indica</i>	143
C.2 Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tipo dehidrina de <i>Leuchtenbergia principis</i>	144
C.3 Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tipo dehidrina de <i>Mammillaria bombycina</i>	145
C.4 Alineamiento múltiple de nucleótidos de las dehidrinas analizadas.	146

Anexo D. Valores numericos de las gráficas mostradas.	147
D.1 Valores numéricos del grado de desordenamiento de cada uno de los aminoácidos de las proteínas analizadas.	147
D.2 Valores numéricos de la expresión normalizada del análisis de qPCR.	163
D.2.1 Resultados interacción <i>M. bombycina</i> con ABA 100µM	163
D.2.2 Resultados interacción <i>M. bombycina</i> con frío a -20°C	164
D.2.3 Resultados interacción <i>M. bombycina</i> con Heridas	165
Anexo E. Fotografías de las cactáceas utilizadas.	166
E.1 Fotografías de las tres especies de cactáceas utilizadas in vitro.	166
E.2 Brotes de <i>M. bombycina</i> utilizados para los estudios de expresión	168
12 ARTÍCULOS PUBLICADOS	169

INDICE DE TABLAS

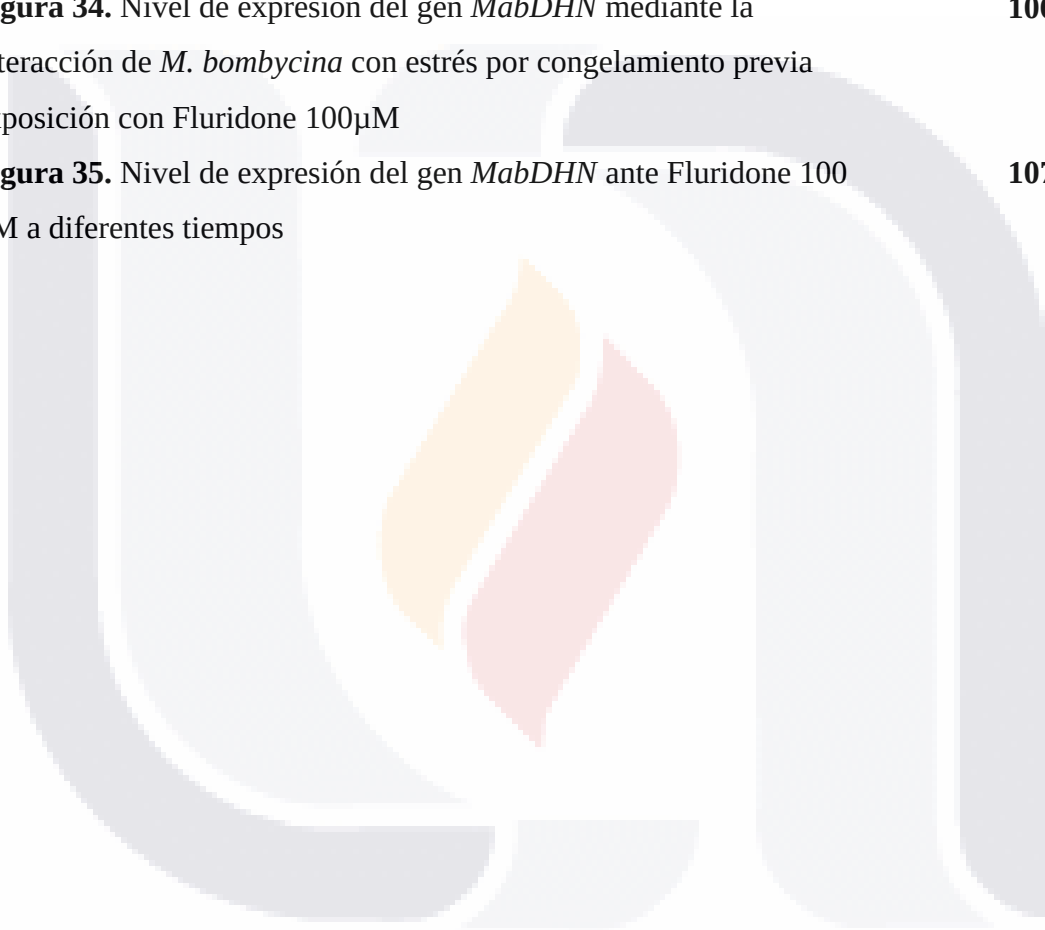
Tabla 1. Clasificación de los grupos de proteínas LEA según distintos autores	19
Tabla 2. Secuencias de los motivos conservados identificados para cada uno de los grupos LEA según la clasificación de Bies-Ethève et al. (2008)	21
Tabla 3. Material vegetal seleccionado y medio de propagación	55
Tabla 4. Secuencias parciales y totales de las proteínas tipo dehidrina homólogas a OpfiDHN- like, LepDHN-like y MabDHN-like	66
Tabla 5. Concentración y pureza del ADN de las cactáceas analizadas	77
Tabla 6. Tamaño de las secuencias parciales de nucleótidos y aminoácidos de las dehidrinas de <i>O. ficus-indica</i> , <i>L. principis</i> y <i>M. bombycina</i>	85
Tabla 7. Parámetros de las proteínas tipo dehidrina analizadas	89
Tabla 8. Predicción de la estructura secuendaria de los fragmentos de las proteínas traducidas de <i>O. ficus-indica</i> , <i>L. principis</i> y <i>M. bombycina</i>	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de acción de algunas de las proteínas LEA.	24
Figura 2. Ruta de señalización de las HSF-HSP-HSBP1	28
Figura 3. Expresión de la resistencia sistémica adquirida e inducida	39
Figura 4. Rol de las fitohormonas en la regulación entre el estrés biótico y abiótico	49
Figura 5. Representación esquemática de los motivos presentes en la proteína OpsDHN1	50
Figura 6. Mapa del vector pGEM®-T Easy	62
Figura 7. Biosíntesis y catabolismo del ácido abscísico.	72
Figura 8. Amplificación del gen <i>OpsDHN1</i> a diferentes temperaturas de alineamiento	80
Figura 9. Amplificación del gen <i>OpsDHN1</i> en diferentes géneros de cactáceas	81
Figura 10. Comprobación de la amplificación de genes similares a <i>OpsDHN1</i> en diferentes géneros de cactáceas	82
Figura 11. Amplificación por PCR de genes <i>lea</i> tipo dehidrina en diferentes cactáceas	83
Figura 12. Verificación de la ligación del fragmento del gen <i>lea</i> tipo dehidrina por PCR y restricción	84
Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de diferentes cactáceas analizadas	86
Figura 14. Análisis de motivos de las proteínas parciales de las cactáceas analizadas y de secuencias homólogas	87
Figura 15. Dominios funcionales de las proteínas tipo dehidrina de diferentes cactáceas.	88

Figura 16. Hidropatía de las proteínas tipo dehidrina	90
Figura 17. Grado de desordenamiento de las proteínas analizadas	91
Figura 18. Estructura 3D del fragmento de la proteína OpfiDHN-like	92
Figura 19. Estructura 3D del fragmento de la proteína LepDHN-like	92
Figura 20. Estructura 3D del fragmento de la proteína MabDHN-like	93
Figura 21. Estructura 3D del fragmento de la proteína OpsDHN1	93
Figura 22. Árbol consenso estricto de 32 árboles igualmente parsimoniosos de 21 proteínas tipo dehidrina incluyendo las cactáceas analizadas	96
Figura 23. Filograma del árbol 1 de los 32 árboles más parsimoniosos de 21 proteínas tipo dehidrina incluyendo las cactáceas analizadas	97
Figura 24. RNA total de <i>M. bombycina</i>	98
Figura 25. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> mediante la interacción de <i>M. bombycina</i> con estrés por Frío a 4°C	99
Figura 26. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> ante estrés por Frío a 4°C a diferentes tiempos	99
Figura 27. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> ante frío a -20°C a diferentes tiempos analizado mediante qPCR	100
Figura 28. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> mediante la interacción de <i>M. bombycina</i> con estrés por alta salinidad con 250mM de NaCl	101
Figura 29. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> ante estrés osmótico con NaCl 250mM a diferentes tiempos.	101
Figura 30. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> mediante la interacción de <i>M. bombycina</i> con 0.1 µM de ácido abscísico a diferentes tiempos	102

Figura 31. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> ante ácido abscísico a 0.1 μM a diferentes tiempos	103
Figura 32. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> ante ácido abscísico a 100 μM a diferentes tiempos analizado mediante qPCR.	104
Figura 33. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> ante estrés por heridas a diferentes tiempos analizado mediante qPCR.	105
Figura 34. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> mediante la interacción de <i>M. bombycina</i> con estrés por congelamiento previa exposición con Fluridone 100 μM	106
Figura 35. Nivel de expresión del gen <i>MabDHN</i> ante Fluridone 100 μM a diferentes tiempos	107



RESUMEN

Las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA) del grupo 2 o dehidrinas juegan un rol muy importante en la respuesta y adaptación a diferentes tipos de estrés abiótico como la deshidratación, alta salinidad y bajas temperaturas. Utilizando la técnica de PCR identificamos tres fragmentos de genes que codifican para proteínas tipo dehidrina en las especies de cactáceas *Opuntia ficus-indica* (OpfiDHN-like), *Leuchtenbergia principis* (LepDHN-like) y *Mammillaria bombycina* (MabDHN-like). El análisis bioinformático de las secuencias mostró entre el 96 y 97% de identidad con el gen OpsDHN1 (dehidrina 1) de *Opuntia streptacantha*, demostrando que los fragmentos amplificados corresponden a secuencias de genes tipo dehidrina y que los oligonucleótidos diseñados fueron efectivos para amplificar genes similares en diferentes géneros de cactáceas. El alineamiento múltiple de aminoácidos de OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like mostró que poseen tres repeticiones del segmento K conservado, así como un motivo rico en histidinas que probablemente tiene diferencias evolutivas en las subfamilias Opuntioideae y Cactoideae de la familia Cactaceae. Así mismo, se observó que cada una de estas secuencias parciales de aminoácidos corresponden a proteínas ácidas, altamente hidrofílicas y desordenadas, las cuales son características de las proteínas tipo dehidrina. El análisis filogenético usando máxima parsimonia, indica que las proteínas tipo dehidrina de las cactáceas son monofiléticas, así como las dehidrinas de otras familias de plantas. Por otro lado, se seleccionó el gen *MabDHN* de *M. bombycina* para realizar un análisis de expresión mediante la técnica de RT-qPCR. Se interactuó *M. bombycina* con diferentes tipos de estrés, encontrando que hay una sobreexpresión del gen ante estrés por congelamiento y ante heridas. Finalmente, se demostró que *MabDHN* es inducido por el ácido abscísico.

ABSTRACT

Dehydrins or Group 2 Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins play an important role in the response and adaptation to different types of abiotic stresses such as droughts, high salinity and low temperatures. Using PCR techniques, we identified three gene fragments that encoded dehydrin-like proteins in three cacti species *Opuntia ficus-indica* (OpfiDHN-like), *Leuchtenbergia principis* (LepDHN-like) and *Mammillaria bombycina* (MabDHN-like). Bioinformatic sequence analysis showed an identity between 96 and 97% with the *Opuntia streptacantha* OpsDHN1 (dehydrin 1) gene, demonstrating that the amplified fragments corresponded to dehydrin-like gene sequences, and that the designed oligonucleotides were effective for similar gene amplification in different cacti genera. Multiple amino acid OpfiDHN-like, LepDHN-like and MabDHN-like alignments showed that they possessed three repetitions of the conserved K segment, as well as a histidine rich motif, which is believed that probably evolved differently in the Opuntioideae and Cactoideae subfamilies of the Cactaceae family. Also we demonstrated that each of the three partial amino acid sequences corresponded to acidic, highly hydrophilic, and disordered protein fragments, which are characteristics of dehydrin proteins. Phylogenetic analysis using maximum parsimony, indicated that cacti dehydrins-like proteins were monophyletic, as well as those of other plant families. On the other hand, the *MabDHN* gene of *M. bombycina* was selected for expression analysis by RT-qPCR technique. *M. bombycina* was interacted with different stress type, finding that there is an overexpression of the gene with freezing and wounds. Finally was demonstrated that *MabDHN* is induced by abscisic acid.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las cactáceas

Las cactáceas pertenecen al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Caryophyllales y familia Cactaceae; ésta tradicionalmente se dividía en 3 subfamilias, sin embargo actualmente se han subdividido en 4 subfamilias que son: I. Pereskioideae SCHUMANN (Bravo, 1978; Edwards et al., 2005), II. Maihuenioideae SCHUMANN (Edwards et al., 2005), III. Opuntioideae BURNETT, y IV. Cactoideae SCHUMANN.

La familia comprende cerca de 1450 especies pertenecientes a 127 géneros; la mayor riqueza en especies se concentra principalmente en México, secundariamente en centros del suroeste Andino y en el este de Brazil (Hernández-Hernández et al., 2011). La familia es nativa del continente americano con la excepción de una especie de *Rhipsalis* que actualmente habita en África (Bravo, 1978).

En la subfamilia Pereskioideae se encuentra como género más importante a *Pereskia* MILLER que son árboles o arbustos ramosos, a veces plantas trepadoras, con hábitos semejantes al de las dicotiledóneas leñosas. Tienen espinas escasas o en nutridos fascículos en las aréolas axilares de las hojas tectrices, hojas anchas y planas deciduas, algo carnosas, flores solitarias o en inflorescencias terminales o axilares (Bravo, 1978). Este género ha sido visto como un representante de las cactáceas ancestrales por lo que un gran número de estudios se han enfocado a resolver las relaciones filogenéticas entre las especies de *Pereskia* y de *Pereskia* con otras cactáceas (Butterworth y Edwards, 2008).

La subfamilia Maihuenioideae, que antiguamente era clasificada dentro de la subfamilia Pereskioideae, la constituyen arbustos cespitosos con metabolismo C3, tiene tallos suculentos, cortos, cilíndricos o globulosos; también tiene hojas persistentes con 3 espinas por aréola, flores solitarias y apicales. Su hábitat es Argentina y Chile y el género

que constituye a esta subfamilia es *Maihuenia* PHILIPPI EX F. A. C. WEBER (Butterworth y Edwards, 2008; Cuadrado y Garralla, 2009).

La subfamilia Opuntioideae tiene cactáceas arborescentes, arbustivas y hasta rastreras, con tallos cilíndricos, claviformes casi globosos o en cladodios, más o menos ramificados. Tienen aréolas circulares elípticas, con pelos, glóquidas y espinas más o menos largas y delgadas, a veces con vaina papirácea. Las flores son diurnas o vespertinas, sésiles, una en cada areola, naciendo hacia la extremidad de los tallos y tienen fruto seco o carnoso. En México está representada por los géneros *Pereskia*, *Nopalea* y *Opuntia* (Bravo, 1978), y una de las especies más importantes es *Opuntia ficus-indica* ya que es agronómicamente importante por sus frutos y cladodios comestibles; es una cactáceas arborescentes de 3 a 5m de alto, tiene tallos cilíndricos formados por cladodios superpuestos, sus aréolas son angostas elípticas, con glóquidas y espinas agrupadas en 2 o solitarias más o menos largas y delgadas, sus flores son sésiles sin peciolo y comúnmente amarillas (CONABIO, 2008).

La subfamilia Cactoideae está formada por tallos cilíndricos, no articulados, fotosintéticos, hojas escamosas, fugaces y con aréolas con espinas y gloquidios o tricomas no punzantes y flores sésiles. En esta subfamilia se encuentra la mayor cantidad de géneros y diversidad morfológica de las cactáceas (Bravo, 1978). Dos especies importantes de esta subfamilia son *Mammillaria bombycina* y *Leuchtenbergia principis*; la primera es una *Mammillaria* endémica del estado de Jalisco y Aguascalientes, es una planta simple, globosa, con los ápices ligeramente hundidos cubiertos por lana blanca, mide 20 cm de alto x 6 cm de diámetro, tiene axilas con lana blanca abundante y cerdas, en el ápice esta lana cubre los tubérculos, las areolas son redondeadas al principio con poca lana y después son alargadas y desnudas, tiene entre 30 a 40 espinas radiales, rígidas, delgadas, dispuestas en horizontal y con forma de peine. La especie *L. principis* está caracterizada por tener tallos cilíndricos y solitarios, los tubérculos son largos y de forma triangular, festoneados en la parte inferior y planos en la extremidad de donde nacen las areolas de color gris, las espinas son delgadas y flexibles y posee flores amarillas, grandes y con forma de embudo (CONABIO, 2008).

Muchas especies de cactáceas son comercializadas como plantas ornamentales a nivel mundial y algunas de ellas son una fuente importante de alimento, dándole a esta familia de plantas una relevancia económica importante. Además de ser elementos distintivos de los biomas áridos y semiáridos, las especies de la familia Cactaceae juegan un rol ecológico importante por lo que diferentes representantes de la familia han sido estudiados como modelos anatómicos y fisiológicos de plantas (Hernández-Hernández et al., 2011). Las cactáceas son plantas con metabolismo tipo CAM, caracterizadas por fluctuaciones en el contenido de ácidos (ácido málico) en sus tejidos, así como por la apertura de los estomas durante la noche. Esta apertura en horas de la noche minimiza la pérdida de agua por transpiración, puesto que la temperatura de los tejidos es más baja y por tanto los gradientes de concentración de vapor de agua desde la hoja al aire son considerablemente menores que los valores en el día; este mecanismo de concentración de dióxido de carbono permite disminuir la probabilidad de que entre un O_2 en el sitio activo de la RuBisCO por lo que la eficiencia fotosintética es mayor. Este tipo de plantas deben hacer frente al calor extremo y a la sequía y mantener una toma neta de CO_2 durante todo el año. Tanto la temperatura como el estrés hídrico pueden influir en los procesos fisiológicos básicos de representantes de muchas especies de cactáceas, como fotosíntesis y respiración, que determinan en gran parte la cantidad de azúcares que se forman en las hojas y, posteriormente, se transportan y almacenan en el tallo y raíz. Trabajos previos en especies que presentan el metabolismo CAM, como *Agave tequilana*, *Opuntia ficus-indica* y *Stenocereus queretaronensis*, han revelado que temperaturas cálidas reducen la fotosíntesis e incrementan la respiración. El índice del flujo de CO_2 disminuye cuando la temperatura del cojín de *O. phaeacanta* aumenta. De hecho, el grado óptimo de temperatura para la fijación oscura del CO_2 por las plantas de CAM es bajo y se encuentra alrededor de los $15^{\circ}C$, aunque pueden ocurrir variaciones estacionales, por ejemplo *Agave deserti* es una planta común en los desiertos mexicanos que puede soportar heladas y años muy secos y en *Agave americana* la pérdida de agua por transpiración en un periodo de 70 días es 71 veces el aumento en el peso seco, lo que representa una muy buena eficiencia en el uso del agua. A pesar de que existen 18 familias de plantas que tienen especies CAM su fisiología se ha estudiado relativamente poco bajo condiciones naturales (Casierra et al., 2006).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A pesar de que las heladas resultan mortales para la mayoría de las especies y que es precisamente el frío el que limita la distribución de las cactáceas en muchas partes del mundo (Uhlig, 2008), existen otras cactáceas que toleran muy bajas temperaturas todo el año como *Opuntia humifusa*, que crece en el norte y sureste de Ontario, Canadá que pueden tolerar temperaturas de hasta -24°C, y *Opuntia fragilis* que crece en el norte de Alberta, Canadá y que puede sobrevivir hasta 1 hora a -40°C según experimentos realizados por Nobel y Loik (1993). Para lidiar con estos tipos de estrés, las plantas responden reprogramando su expresión génica, la cual resulta en una acumulación de osmolitos para el ajuste osmótico, sobreexpresión de rutas antioxidantes para combatir especies reactivas de oxígeno (ROS), minimizando y reparando el daño causado a los constituyentes celulares incluyendo al ADN, proteínas y membranas, manteniendo los procesos que sostienen la homeostasis celular bajo estrés.

Las relaciones filogenéticas de las cactáceas han sido estudiadas tomando en cuenta principalmente características morfológicas de las plantas. En la mayoría de las cactáceas las hojas persistentes han sido reemplazadas por espinas, y el tallo verde y suculento se ha convertido en el principal órgano fotosintético. Solo unos pocos géneros retienen las hojas persistentes por lo tanto éstas han sido tratadas como los miembros más ancestrales de la familia. La estructura floral de las cactáceas es predominada por un receptáculo epigineo o inferior, sin embargo en el género *Pereskia* hay una variación en la posición del ovario ya que es superior o hipogineo, lo que es considerado primitivo en la familia Cactaceae. No hay sinapomorfias morfológicas o anatómicas obvias que unan a la subfamilia Cactoideae, excepto posiblemente su tallo suculento y la falta de hojas persistentes y gloquidios, siendo esta última una característica derivada de la subfamilia Opuntioideae (Butterworth y Edwards, 2008). Debido a todo lo anterior numerosos estudios se han enfocado a resolver las relaciones filogenéticas de las subfamilias de las cactáceas. Edwards et al. (2005) presentó la filogenia basada en las secuencias de tres tipos de genomas (cloroplastos, mitocondrias y núcleo) de varias especies de *Pereskia* y de representantes de Opuntioideae, Maihuenioideae y Cactoideae, sin embargo Butterworth y Edwards, (2008) conjuntaron datos de varios autores para comprobar varias teorías del origen de las cactáceas donde

comprueban la hipótesis de que Pereskioideae constituye la rama basal de la división de las cactáceas y mencionan que la hipótesis propuesta por Griffith (2004) en donde propone que Opuntioideae es la rama basal no es la más cierta aunque hay evidencia estadística que no lo niega. Estudios moleculares han sustentado que las subfamilias Cactoideae y Opuntioideae aparecen como clados monofiléticos bien soportados, lo que no sucede en Pereskioideae y Maihuenioideae (Nyffeler, 2002).

Dependiendo del tipo de genes o genomas que se analicen se obtienen resultados singulares y distintos, que puedan llevar a conclusiones diferentes por lo que es importante analizar datos combinados para llegar a una conclusión (Butterworth y Edwards, 2008). Los árboles filogenéticos de cada familia definen las relaciones evolutivas de cada uno de los miembros y en cada familia cercanamente relacionada pueden existir varias isoformas de un gen indicando una posible redundancia y una función especializada (Bafeel, 2013); por otro lado las secuencias de aminoácidos alineados nos pueden indicar si hay un alto o bajo grado de conservación de un determinado gen a través de los miembros de una misma familia (Cai et al., 2013) por lo que es necesario hacer un análisis completo de las secuencias para poder emitir una hipótesis.

1.2 Proteínas tipo LEA y su clasificación

En la naturaleza existen proteínas intrínsecamente desordenadas (PINEs) que son importantes en la célula y que son determinantes para el adecuado cumplimiento de las funciones celulares basales. Recientemente, se ha encontrado que las PINEs también participan en la respuesta de los organismos a distintos estímulos o condiciones desfavorables para la célula. Una de estas proteínas son las hidrofiliinas que son proteínas no estructuradas o flexibles que participan en la respuesta a condiciones adversas; se ha encontrado que su acumulación está asociada notablemente con la exposición de las células o de los organismos a condiciones de limitación de agua. En los diferentes reinos en donde se han encontrado, están acumuladas en respuesta a una baja disponibilidad de agua en el ambiente, ya sean arqueas, bacterias, hongos, plantas, insectos, artrópodos y animales. También se acumulan en aquellas células que transitan por etapas de desarrollo que

involucran un déficit hídrico y en estructuras u órganos que pasan por estados de deshidratación severa (Reyes et al, 2008).

Las hidrofilinas en las plantas son un grupo de proteínas muy amplio y abundante, conocido como proteínas LEA (por sus siglas en inglés: Late Embryogenesis Abundant) y fueron primeramente aisladas de semillas de algodón acumuladas en la embriogénesis tardía. Subsecuentemente fueron encontradas en semillas de muchas plantas, así como también en órganos vegetativos, especialmente bajo condiciones de estrés como frío, sequía o alta salinidad (Chamoli y Verma, 2014).

Las proteínas LEA han sido agrupadas en varias familias en base a la similaridad de sus secuencias, a pesar de que no se han encontrados similitudes significativas entre los miembros de diferentes familias, sin embargo un unificador y una característica excepcional de la mayoría de las LEA es su alta hidrofiliidad, alto contenido de glicina (G), lisina (K), arginina (R), glutamina (Q) y de aminoácidos pequeños como serina (S) y alanina (A), además de la ausencia o una baja proporción de residuos de cisteína (C) y triptófano (W) (Battaglia et al., 2008). Dure et al. (1989) y otros investigadores (Baker et al., 1988) identificaron familias de proteínas LEA en base a su peso molecular y después en base a las características antes mencionadas descritas en diferentes cDNAs representativos de varias familias de plantas; en la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de sus clasificaciones (Hundertmark y Hinch, 2008), sin embargo existen otros trabajos que han clasificado a estas proteínas, como el de Battaglia et al. (2008) donde divide a las proteínas LEA en 7 grupos principales y toman como referencia la clasificación dada por Dure (1993), o las clasificaciones hechas por Bies-Ethève et al. (2008), Hundertmark y Hinch (2008) y Shih et al. (2008); todas las clasificaciones anteriores toman en cuenta proteínas LEA atípicas e hidrofóbicas y establecen nuevos grupos de clasificación.

Las proteínas del grupo LEA I tienen un alto contenido de glicinas (20%) y se encuentran en plantas exclusivamente (Wise, 2003), son proteínas desordenadas y contienen un motivo de 18 aminoácidos conservado (RKEQLGHEGYQEMGHKGG) (Bies-Ethève et al., 2008), encontrando una sola copia del motivo frecuentemente (Goyal et

al., 2005). Su peso molecular promedio es de 11.5 kDa, la mayoría son proteínas pequeñas y ácidas o neutras, la proteína Em aislada de trigo (*Triticum aestivum*) y su homólogo de algodón (D-19) son típicas de este grupo (Shih et al., 2008).

Tabla 1. Clasificación de los grupos de proteínas LEA según distintos autores.

Pfam	Bray	Dure
Dehidrina	Grupo 2	D-11
LEA_1	Grupo 4	D_113
LEA_2		LEA14; D-95
LEA_3		LEA5; D-73
LEA_4	Grupo 3, Grupo 5	D-7; D-29
LEA_5	Grupo 1	D-19
SMP	Grupo 6	D-34

Proteínas SMP: proteína de maduración de la semilla (Seed maturation protein). La clasificación se dio en base a la plataforma Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), a Bray (1993) y a Dure (1993) (Hundertmark y Hinch, 2008).

El grupo LEA 2 también conocidas como dehidrinas son las más estudiadas, su clasificación está basada en las características estructurales de la proteína como la presencia o número de copias de ciertos motivos conservados como los motivos o segmentos K, S y Y. A la fecha éstas proteínas se han dividido en 5 subclases, incluyendo Y_nSK_n , Y_nK_n , SK_n , K_n y K_nS (Kosová et al., 2013).

El grupo LEA 3 se caracteriza por tener un motivo repetido de 11 aminoácidos y su peso molecular varía de acuerdo al número de repeticiones (Shih et al., 2008), tienen una secuencia consenso que ha sido definida como $\phi \phi E/QX \phi KE/ QK \phi XE/D/Q$ (donde ϕ representa un residuo hidrofílico). En este grupo se encuentran proteínas homólogas de

organismos diferentes a las plantas como es la proteína AavLEA1 del nematodo anhidrobiótico *Aphelenchus avenae*, así como de otros nematodos y procariontes como *Deinococcus radiodurans*, *Bacillus subtilis* y *Haemophilus influenzae* (Goyal et al., 2005).

De acuerdo a Shih et al. (2008) las LEA 4 tienen un peso molecular de 12.56 kDa, no presentan dominios o motivos conservados y se las considera altamente hidrofílicas y solubles en calor; estas proteínas se aislaron del algodón y las más representativas son las denominadas proteínas LEA D-113. Las proteínas LEA 5 tienen un peso molecular promedio de 18.1 kDa, se consideran proteínas ácidas y a diferencia de las otras familias son hidrofóbicas y carecen de la función de ebullición. Las LEA 6, 7 y las LEA atípicas se fueron designando con los números consecutivos a las siguientes proteínas LEA que se iban encontrando y son proteínas que no presentan características similares a las anteriores descritas pero que fueron aisladas de la embriogénesis tardía de las semillas; su función posiblemente está relacionada con proteínas transportadoras o constituyentes de la membrana plasmática.

Desde el descubrimiento de las proteínas LEA numerosos esfuerzos se han enfocado en determinar si son realmente una estrategia adaptativa utilizada por las plantas. En especial estudios de genética funcional han utilizado la planta modelo *A. thaliana* demostrando que al anular la expresión de 1, 2 ó 3 diferentes proteínas LEA de un mismo grupo causa una deficiencia en la resistencia a sequía o a estrés osmótico, en comparación con las plantas silvestres (Reyes et al, 2008). Hundertmark y Hinch (2008) identificaron 51 proteínas LEA codificadas por distintos genes en el genoma de *A. thaliana* que pudieron ser reclasificados en 9 grupos de acuerdo al peso molecular, localización, GRAVY (gran promedio de hidropatía) y motivos. Hubo poca superposición entre los genes expresados en tejidos vegetativos y en las semillas, siendo más altos los niveles de expresión en semillas. Un trabajo similar lo realizaron Bies-Ethève et al. (2008) donde también reclasifican a las proteínas LEA de *A. thaliana* proponiendo nuevos motivos conservados, más cortos que los propuestos por otros autores, para dar una clasificación en 9 grupos también (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los motivos conservados identificados para cada uno de los grupos LEA según la clasificación de Bies-Ethève et al. (2008).

LEA group	Motif 1	Motif 2	Motif 3
LEA1	RKEQLGHEGYQEMGHKGG	LDE-AK-GETVVPGGTGG-S-EAQ-HLAEG-SGGQT	LST-K-GGEAEEEG-EIDESKF
LEA2	EKKG-EKIKEKLPGHH	S-SSSSSSS	G-FDFL-KK-E
LEA3	AYDKA-AKD	DKA-D-KE—A—K-KV	AQ-AQQAHE—QSAK-KTSQ
LEA4	SAKEKIS	VSHKSK-VK-SL	
LEA5	DVL—KL—DV—VTDAE-V-AELR—P—PGGVA-S—AAARLN	KPV—DAAAIQAAE-RA-G—GG-AA—Q-AA	TIGEALEA—G
LEA6	W-PDP-TGYYP—E-D-ELR—L-NNKQ	MARS—N-KI-S-F-S-LSNA-FRRG-AA-AA	I—RR—V-T
LEA7	LDK-K-F-A-KL—IP-PE	V-V-NP—IP—S—R—G-IPD-G-L	D-PVV—TIP—GEIKLP—D
LEA8	PY—LEDYK—YGA-GHQEP—G-GGGTDAPTPSG	ME—K-PPTT—E—VK—DL)	
LEA9	VEPND-VEPQQGGGGGGGGGRGGCRW GCCGWWRRCRYCCRSQAEASEVVETV	MGNL-SLVL-ALLFS-S-AV-A-TSNDATHEVKPSTEAT-AIEA	E-QK—KP

Las proteínas LEA de *A. thaliana* se encuentran codificadas por genes que tienen tanto arreglos de repeticiones en tándem como genes que son parte de pares homólogos. Los arreglos en tándem de los genes LEA se han encontrado en el genoma de *A. thaliana* entre el 28% (Bies-Ethève et al., 2008) y 33% (Hundertmark y Hinch, 2008); por otro lado entre el 24% (Bies-Ethève et al., 2008) y 43% (Hundertmark y Hinch, 2008) de los genes LEA se encuentran en pares homólogos producto de la última duplicación génica del genoma completo. Muchos de los genes en duplicado retenidos en *A. thaliana*, están envueltos en funciones regulatorias lo cual parece comprensible en cara a poder tener adaptaciones novedosas a numerosos entornos ecológicos, y se sabe que la mayoría de los pares duplicados han adquirido patrones de expresión divergentes, que probablemente adquirieron gracias a la hibridación cruzada entre los genes duplicados; de hecho, la simultánea duplicación de todos los genes de una misma ruta ofrece una oportunidad única para la interacción de los genes duplicados y así diversificar sus patrones de expresión concertada (Blanc y Wolfe, 2004). Hay otros genes LEA en *A. thaliana* que se presentan en

una sola copia probablemente porque representan a un par ancestral en donde una de las copias se perdió o a que es un gen recientemente insertado (Bies-Ethève et al., 2008).

Du et al. (2013) realizaron estudios para detectar eventos de conversión génica en múltiples genes LEA de *Prunus mume* encontrando diez eventos de conversión génica en 4 de los 8 grupos LEA analizados; la mayoría de los eventos de conversión génica (70%) fueron identificados en el grupo de las dehidrinas lo que sugiere que los eventos de conversión génica juegan un rol importante en la evolución de los genes LEA de *P. mume*, especialmente en las dehidrinas.

La presencia de proteínas LEA ha sido asociada con la tolerancia celular a la deshidratación que pueden ser causadas por congelamiento, condiciones de salinidad o sequía. En extremos casos, los organismos pueden sobrevivir ante una completa falta de agua conocida como anhidrobiosis, y aun así permanecen viables. Algunos ejemplos de organismos anhidrobiticos son microorganismos como levadura de panadería, tardígrados, rotíferos bdellideos y algunos nematodos como el *Aphelenchus avenae*, también las llamadas plantas de la resurrección, llamadas así porque cuando se encuentran en estado de desecación tienen la apariencia de muertas, pero cuando la cantidad de agua llega por arriba del 10% del normal reanudan sus procesos vitales, también la mayoría de las semillas de las plantas son altamente tolerantes a la desecación así como otros propágulos como el polen (Tunnacliffe et al, 2010). Los azúcares, especialmente los disacáridos sacarosa y trealosa, se piensa que juegan un papel muy importante en la tolerancia celular a la desecación, pero lo que es claro es que sustancias adicionales son necesarias para que la célula pueda atender la anhidrobiosis; *Aphelenchus avenae* es un nemátodo tolerante que puede sobrevivir a la completa desecación sin la acumulación de azúcares, pero muestran una potenciación de la expresión de genes que codifican para proteínas tipo LEA (Liu et al., 2011).

1.3 Mecanismo de acción de las proteínas LEA

Las proteínas LEA ayudan a proteger las proteínas celulares contra el estrés y un gran número de mecanismos han sido propuestos para explicar el funcionamiento de estas proteínas sin embargo el mecanismo preciso en cómo actúan aún no está bien dilucidado, pero una de las propuestas es que tal vez pueden llevar su función a través de la estabilización de las membranas actuando como chaperonas para prevenir la agregación y/o inactivación de las proteínas durante la deshidratación (Yang et al., 2012). Goyal et al. (2005) demostraron en su trabajo que las proteínas LEA no actúan como una clásica chaperona, donde el trabajo principal de éstas es facilitar el correcto plegamiento y ensamble de proteínas y complejos de proteínas, sino que exhiben un efecto protector sinérgico con la trealosa, llamada también chaperona química, que es un azúcar no reductor que se sabe que se acumula durante la deshidratación en plantas. Las proteínas LEA se distinguen de las chaperonas plegadoras por dos elementos principalmente, primero por su falta de estructura y después por su relativamente pobre habilidad de prevenir la agregación inducida por calor y que muchas de estas chaperonas actúan en respuesta a estrés por calor, como son las conocidas proteínas de choque térmico (Hsps) (Tunnacliffe et al, 2010).

Las proteínas LEA actúan controlando el plegamiento y la conformación de las proteínas estructurales, enzimas y membranas, preservan el agua impidiendo la desnaturalización de proteínas, renaturalizan las ya desplegadas y secuestran iones en los tejidos estresados. Además se ha demostrado que las proteínas LEA están involucradas en la protección de moléculas, tales como enzimas, lípidos y RNAm durante la deshidratación, el desarrollo y la maduración. Cuando tiene lugar una desecación natural, las semillas acumulan transcriptos y proteínas de este tipo en una concentración relativamente alta; estas proteínas LEA son inducibles por el ABA (ácido abscísico) (Chávez y González, 2009), aunque se ha demostrado que otras hormonas como ácido jasmónico (JA), metil jasmonato (MeJA) y ácido salicílico (SA) también inducen la expresión de algunas dehidrinas específicas (Yang et al, 2012; Richard et al., 2000; Siddiqui et al, 1998; Shen y Zhang, 1996).

Las proteínas LEA son altamente flexibles en solución acuosa que es una condición poco frecuente en la célula. Ante una disminución en la disponibilidad de agua y ante el consecuente incremento en la concentración intracelular de las macromoléculas (amontonamiento molecular), las proteínas LEA tenderán a adquirir una conformación más definida que les permitiría reconocer algún o algunos ligandos y de esta forma estabilizarse (Reyes et al, 2008).

Este efecto protector es evidente en ensayos *in vitro* realizados por Reyes et al. (2005) donde al deshidratar de manera progresiva una enzima reportera, ésta pierde paulatinamente su actividad; sin embargo, si antes de iniciarse la deshidratación se le agrega una proteína LEA, en una relación molar 1:1, la actividad de la enzima reportera se mantiene en un mayor nivel que cuando no es protegida por la adición de la proteína LEA. El hecho de que estas proteínas sean capaces de proteger a la enzima reportera es indicativo de que uno de los posibles mecanismos de protección sea a través de una interacción directa entre proteína LEA-proteína blanco (Figura 1).

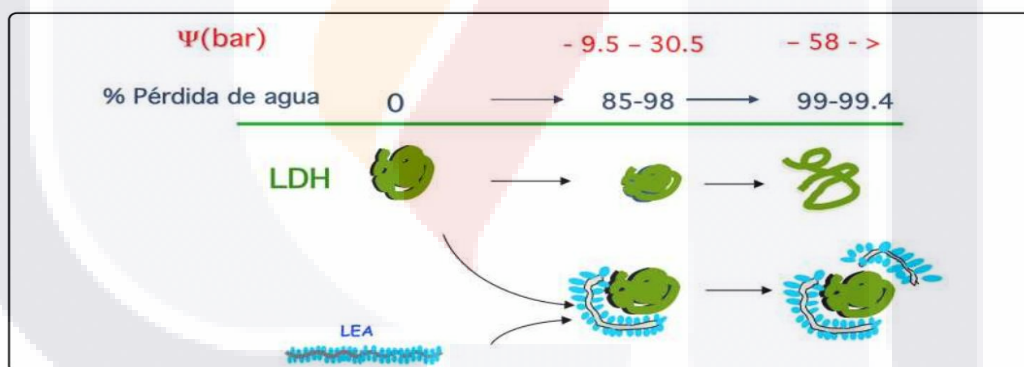


Figura 1. Modelo de acción de algunas de las proteínas LEA (Cuevas y Covarrubias, 2011). Cuando las células sufren pérdida de agua, estas condiciones pueden promover cambios conformacionales en las proteínas de mantenimiento, provocando una disminución en sus actividades catalíticas o una menor eficiencia en sus funciones; condiciones más severas, pueden llegar a inducir una pérdida total de su estructura o desnaturalización y, con ello una pérdida también total de su actividad. En condiciones en las que existe una cantidad óptima de agua, las proteínas LEA se encontrarían mayoritariamente desplegadas. Cuando la cantidad de agua disponible disminuye, se podría modificar la conformación de las proteínas LEA hacia un estado “activo”, en el que ahora serían capaces de interactuar con las proteínas de mantenimiento (u otros ligandos o blancos), previniendo así la pérdida de su estructura, y por lo tanto de su función.

Adicionalmente datos provenientes de este tipo de ensayos han indicado que la capacidad protectora de las proteínas LEA de los diferentes grupos es distinta, algunas presentan una protección de casi 100% aún bajo condiciones de pérdida de agua mayores al 98%. Sin embargo, otras proteínas LEA no muestran protección en estos ensayos; es posible que su función esté dirigida a proteger otro tipo de moléculas, como ácidos nucleicos (ADN y/o ARN), o bien algunas estructuras celulares como podrían ser de membranas o citoesqueleto (Cuevas y Covarrubias, 2011).

1.4 Las proteínas LEA 2 o dehidrinas.

Uno de los grupos más importantes y ampliamente estudiados es el grupo LEA 2 o también llamadas dehidrinas (DHNs). Su clasificación está basada en las características estructurales de la proteína como es la presencia o número de copias de ciertos motivos conservados como es el motivo o segmento K, S y Y. Todas las dehidrinas tienen al menos un segmento K (EKKGIMDKIKEKLPG) que generalmente está localizado en el extremo C- terminal de la proteína y que tienen la habilidad de formar una estructura α -hélice anfipática que tal vez juega un rol en su interacción con las membranas y proteínas en sus secciones tanto hidrofílicas como hidrofóbicas; el segmento S consiste en una serie de serinas que pueden ser modificadas a través de fosforilación y tal vez intervengan en la regulación de la conformación de la proteína y tenga actividad de unión de iones; el segmento Y (DEYGNP) está localizado cerca del extremo N- terminal y muestra homología con el sitio de unión de las proteínas a nucleótidos, parecido al de las chaperonas de varios organismos (Amara et al., 2012). También se ha identificado un segmento rico en lisinas generalmente localizado entre el segmento S y el K y se ha sugerido que puede participar en la unión de las DHNs al DNA o RNA (Yang et al., 2012). También existe un motivo menos conservado conocido como segmento ϕ que es rico en aminoácidos polares y que se encuentra intercalado entre los segmentos K y está presente en algunas dehidrinas (Battaglia et al., 2008).

Se han reportado que las dehidrinas ERD10 y ERD14 de *A. thaliana* (LEA 2) pueden ser fosforiladas en varios sitios, lo que promueve la unión a iones metálicos bivalentes; esto

tal vez puede estar relacionado con su capacidad ion- secuestrante. De los diversos iones que pueden unir, el calcio es de los más importantes debido a que se ha sugerido que existe una ruta de activación de estas proteínas por calcio. Las dehidrinas también tienen la capacidad de unirse a membranas gracias a la combinación de secuencias cortas que forman sus motivos (K, S Y y ϕ) en donde los segmentos ricos en lisina del segmento K forman una α hélice anfipática de unión lipídica. En el maíz (*Zea mays*) en las células del parénquima escutelar, se encuentran dehidrinas asociadas con áreas de membranas ricas en lípidos y cuerpos proteicos; las dehidrinas preferentemente se unen a pequeñas vesículas unilamelares compuestas de fosfolípidos ácidos a través de la α hélice anfipática helicoidal formada por el segmento K (Kovacs et al., 2008).

1.5 Papel de defensa de las proteínas LEA 2 ante la presencia de diferentes tipos de estrés abiótico.

Las proteínas LEA 2 o dehidrinas (DHN) juegan un rol importante en la respuesta y adaptación a diferentes tipos de estrés abiótico como son sequía, alta salinidad y bajas temperaturas que producen deshidratación en plantas como *A. thaliana*, *Zea mays* y *Hordeum vulgare* (Rodziewicz et al., 2014). Esto ha sido ampliamente documentado por diferentes autores como López et al. (2003) que encontraron la correlación entre la acumulación de dehidrinas en 7 cultivos de invierno de *Triticum aestivum* durante la exposición a déficit hídrico; tres de estos cultivares mostraron una sobreexpresión significativa de una dehidrina de 24 kDa en comparación con los otros. Es importante tomar en cuenta que dependiendo del tipo de dehidrina que se presente es el tipo de acción reportada, por ejemplo las dehidirinas básicas o neutras tipo Y_nSK_2 son inducidas por deshidratación, las dehidirinas ácidas o neutras tipo Y_nK_n , SK_n y K_n preferencialmente se acumulan en respuesta a bajas temperaturas y las dehidrinas tipo K_nS responden a deshidratación y a bajas temperaturas (Zhu et al., 2014).

1.5.1 Estrés por calor

Como consecuencia del cambio climático futuros episodios de altas temperaturas se esperan que ocurran más frecuentemente. El incremento de la temperatura se ha convertido en un importante tema ya que produce un gran impacto en la producción de cultivos de distintas especies. El porcentaje de germinación de semillas y la eficiencia fotosintética declina cuando las plantas se encuentran con estrés por calor. Durante el periodo del crecimiento reproductivo, la función de las células tapetal se pierde y las anteras son disfuncionales. Cuando la temperatura se incrementa, se inhibe el hinchamiento de los granos de polen durante la floración y resulta en anteras indehiscentes, una producción pobre de granos de polen, y por lo tanto reducen su fertilidad y producción. Las plantas han desarrollado varios mecanismos fisiológicos y moleculares para resistir el estrés por calor ya que las altas temperaturas afectan aproximadamente al 2% del genoma de la planta (Qu et al., 2013). Un ejemplo de esto es las plantas CAM, como las cactáceas, que se encuentran generalmente en regiones que tienen temperaturas muy elevadas durante el día y frescas en la noche, esto último favorece la apertura de los estomas y la toma de CO₂ evitando el riesgo de deshidratación (Casierra et al., 2006).

Los genes que comprenden principalmente la red de respuesta de estrés térmico en plantas pueden ser divididos en 2 grupos: el primero incluye componentes de señalización como proteínquinasas y factores de transcripción; el segundo grupo incluye genes funcionales como proteínas de choque térmico (Hsps), catalasas (CAT) y los factores de estrés por calor (Hsf), estos últimos junto con las Hsps juegan un rol central en la adquisición de termotolerancia en plantas, como se muestra en la figura 2. Las Hsf sirven como componente terminal de la transducción de señales y median la expresión de las Hsp, sin embargo no se ha logrado incrementar la termotolerancia a través de la sobreexpresión por separado de los genes Hsf o Hsp lo que sugiere que confieren resistencia solo bajo condiciones sinérgicas en la planta (Qu et al., 2013).

Existen también genes que codifican para proteínas tipo Dehidrina que son sobreexpresadas ante un aumento de temperatura como el gen *BcDh2*; la función de estas

dehidrinas ante estrés por calor no es muy clara, sin embargo se cree intervienen en la protección de la célula para evitar un daño por deshidratación (Shen et al., 2004).

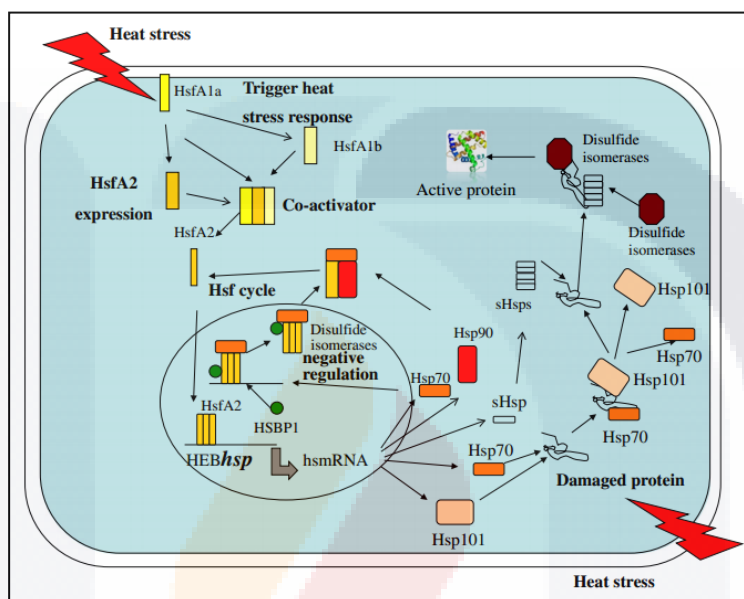


Figura 2. Ruta de señalización de las HSF-HSP-HSBP1 (Qu et al., 2013). El objetivo de HsfA1a es la respuesta a estrés por calor a través de la inducción de la expresión de HsfA1b y HsfA2, las cuales también forman coactivadores con las dos proteínas. HsfA2 induce la expresión de varios Hsps. Hsf70, Hsf 101 y sHsp participan en la reparación de las proteínas dañadas. HSBP1 y Hsp70 participan en la regulación negativa cuando la respuesta al estrés disminuyó. Durante este proceso, el homotrímero activo HsfA2 es convertido a monómeros inactivos que participan en el reciclajes de Hsfs.

1.5.2 Estrés por sequía

La falta de lluvias es uno de los problemas más frecuentes en la agricultura de todo el mundo y la sequía es una limitante para la producción de cultivos. La aplicación de altas tecnologías ha permitido demostrar que la expresión de genes y la proteómica se ve alterada también durante el estrés por sequía (Sunkar, 2010). La alta osmolaridad y bajas temperaturas también conllevan a que la planta se vea sometida a estrés hídrico y una de las principales respuestas a éste es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos (proteínas con función protectora), enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico. Los osmolitos, permiten el ajuste osmótico y facilitan la toma de agua por la planta (Moreno, 2009).

De acuerdo con los requerimientos de agua, las plantas pueden ser consideradas como hidrófitas si están adaptadas a vivir total o parcialmente sumergidas en el agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -5 a -10 bares); mesófitas si están adaptadas a un aporte moderado de agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -20 bares) y xerófitas si están adaptadas a ambientes áridos (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -40 bares). Las plantas a lo largo de su desarrollo experimentan algún grado de estrés por déficit hídrico; en los sistemas naturales un déficit de agua puede ser el resultado de bajas precipitaciones, baja capacidad de retención de agua del suelo, excesiva salinidad, temperaturas extremas frías o calientes, baja presión de vapor atmosférico o una combinación de estos factores. Las plantas han respondido al estrés hídrico desarrollando evolutivamente adaptaciones tanto a nivel morfológico como anatómico, celular y molecular, que les permiten vivir en condiciones de constante estrés hídrico (Moreno, 2009). Entre las dehidrinas que son capaces de brindar una protección ante estrés hídrico se encuentran la ERD10 y ERD14 de *Arabidopsis*, DHN1 de *Zea mays* y DHN5 de trigo, brindando protección a diferentes niveles como es a diversas moléculas y componentes celulares como membranas y a fosfolípidos de vesículas (Hanin et al., 2011).

1.5.3 Estrés osmótico por alta salinidad

La salinidad también afecta el crecimiento y producción de los cultivos porque reduce el potencial hídrico de la solución del suelo lo que hace que disminuya la disponibilidad de agua creando un desequilibrio nutritivo, dada la elevada concentración de elementos (Na^+ , Cl^-) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular. En consecuencia los diversos efectos observados a distinta escala, desde reducción de turgencia y crecimiento, hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado del estrés hídrico, toxicidad iónica y el desequilibrio nutricional (Chávez y González, 2009). En *Cereus validus* se encontró que el metabolismo CAM se inhibe en un 67% como consecuencia de la salinidad por NaCl; pero existen plantas resistentes a este tipo de estrés como los cactus de las llanuras salinas cerca de Chichiriviche, Venezuela que están expuestos a condiciones altamente salinas del suelo únicamente durante la estación seca y en esta temporada no presentan raíces activas para la absorción, por lo que no acumulan NaCl y durante el resto del año, la alta precipitación limita el estrés salino (Casierra et al., 2006).

La salinidad también afecta la fotosíntesis, principalmente a través de la reducción del área foliar, el contenido de clorofila y la conductancia estomática, y en menor extensión a través de una disminución de la eficiencia del fotosistema II. Los efectos adversos de la salinidad pueden influir sobre el ciclo celular y la diferenciación, ya que detiene temporalmente el ciclo celular reduciendo la expresión y actividad de ciclinas y proteínasquinasa dependientes de ciclinas, lo que trae como resultado menos células en los meristemas y un crecimiento limitado (Chávez y González, 2009). Casierra et al. (2006) reportó que la aplicación de 100 mM de NaCl redujeron el crecimiento alrededor de 50% en *Ferocactus acanthodes* y *Trichocereus chilensis* así como también evaluó el efecto de varias concentraciones de NaCl en el crecimiento y desarrollo de plantas del género *Furcraea* y encontró que a pesar de que la salinidad tuvo un efecto mínimo sobre la reducción en el área foliar en las especies evaluadas, la concentración de NaCl afectó negativamente la producción de materia seca y la eficiencia agronómica en el uso del agua,

lo que en conjunto sería la resultante de una tasa fotosintética reducida. Por otra parte, en plantas resistentes, una concentración de 400 a 600 mM de NaCl puede inducir que la planta halófila anual *Mesembryanthemum crystallinum* cambie de fotosíntesis C3 a CAM para poder hacer frente a este tipo de estrés.

La salinidad, así como las altas temperaturas y la sequía pueden causar la desnaturalización y la pérdida de funciones en numerosas proteínas. Se han identificado varios grupos de proteínas LEA en cereales, de las cuales las pertenecientes al grupo 2 son las proteínas solubles más eminentes, inducidas por el estrés osmótico (Casierra et al., 2006). Roychoudhury (2007) creó plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *Rab16A*, este gen codifica para una proteína tipo DHN donde la expresión del gen está controlada por un promotor inducible por la salinidad, lo que conlleva a una acumulación de la proteína en las hojas de las plantas transgénicas sometidas a este tipo de estrés. Las mismas mostraron un incremento significativo en la tolerancia a la salinidad y tasas de crecimiento sostenidas bajo condiciones estresantes. Adicionalmente mostraron un incremento en la producción de osmolitos tales como azúcares reducidos, prolina y poliaminas. También mostraron una mejor maquinaria antioxidante y un balance mineral más favorable, lo que se reflejó en los reducidos niveles de peróxido de hidrógeno y de peroxidación lipídica, menor pérdida de clorofila, así como menor acumulación de sodio y mayor acumulación de potasio. Estos resultados establecen el posible papel del gen *Rab16A* en conferir tolerancia a la salinidad sin afectar el crecimiento y el rendimiento de las plantas transformadas (Chávez y González, 2009).

1.5.4 Estrés por bajas temperaturas

Los cactus son extremadamente tolerantes a la sequía y a altas temperaturas pero relativamente sensibles a bajas temperaturas, dependiendo la especie. Sin embargo las plantas se pueden aclimatar en poco tiempo cambiando la sensibilidad de los órganos a temperaturas extremas en cuestión de días. Se ha observado que un bajo flujo de fotones fotosintéticos pueden repercutir en una baja concentración local de azúcares, lo cual puede hacer que ciertos tejidos sean más susceptibles a daño por bajas temperaturas. El daño por

congelamiento es debido generalmente a una deshidratación celular acompañada de formación de hielo extracelularmente, en ambos casos el metabolismo celular se ve interrumpido (Nobel y Zutta, 2008). Nobel y Zutta (2008) analizaron la tolerancia a distintas temperaturas en tallos y raíces en las especies *Opuntia robusta* y *Nopalea cochenillifera* observando el efecto que tiene la aclimatación a la sequía. Se presentó la muerte de la mitad de las células o temperatura letal media (LT50) de tallos y raíces cuando se expusieron 60 minutos a temperaturas de -7°C y a 57°C ; ambas tolerancias son típicas de los cactus, sin embargo cuando se aclimataron paulatinamente a altas y bajas temperaturas la muerte se dio a los 4°C y a los 65°C en ambas especies. La aclimatación envuelve muchos factores como lo demuestran Nobel y Loik (1993) en su trabajo donde observan que la aclimatación de los tallos de *Ferocactus viridescens* y *Opuntia ficus-indica* es similar a la de *N. cochenillifera* y *O. robusta*, pero el rango es mucho más amplio en especies como *Opuntia fragilis* que se extiende por norte américa hasta Alberta, Canadá, y que cuando es aclimatada puede tolerar 60 minutos a -40°C , que es aparentemente la más alta tolerancia a bajas temperaturas que se ha demostrado que existe en las cactáceas. Estos autores también observaron que la acumulación endógena de ácido abscísico (ABA) se ve modificada cuando la temperatura va bajando, mostrando que la concentración va aumentando cuando la temperatura va disminuyendo, obteniéndose cantidades de 0.4 pmol g^{-1} de peso fresco de ABA en temperaturas de 30 a 20°C , pero cuando se disminuyó la temperatura de 10 a 0°C se incrementó a 84 pmol g^{-1} de peso fresco en *O. ficus-indica* y a 49 pmol g^{-1} de peso fresco en *O. fragilis*. Estos autores también demostraron que la aplicación exógena por aspersión de ABA lograba que las plantas potenciaran su tolerancia al frío encontrándose que se incrementó la resistencia en 0.5°C en *F. viridescens*, 4.1°C en *O. ficus-indica* pero en *O. fragilis* el aumento fue de hasta 23.4°C en la tolerancia. El gen *OpsDHN1* codifica para una dehidrina SK_3 de *O. streptacanta* que se ha observado se sobreexpresa ante la presencia de frío y que la expresión se ve potenciada cuando hay un proceso de aclimatación (Ochoa et al., 2012).

1.6 Inducción de la expresión de los genes tipo DHN por ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) juega roles fisiológicos regulatorios en la iniciación y mantenimiento de la dormancia de semillas y botones florales, e influye en otros aspectos del desarrollo vegetal por interacción, usualmente como antagonista con auxinas, citocininas y giberelinas. También inhibe el crecimiento y la apertura estomática y es un elemento de respuesta importante cuando se presenta estrés de tipo abiótico. En condiciones normales el ABA llega a las hojas, difundido a través del mesófilo, que por hallarse a un pH levemente ácido ($\text{pH}=6,3$), favorece la protonación del ABA (forma ABAH), lo que incrementa su lipofilia y permite que éste difunda libremente hacia todos los elementos celulares, llegando con baja concentración a nivel de los estomas y que por lo tanto éstos se abran. Cuando las hojas están estresadas el pH del mesófilo se vuelve ligeramente básico ($\text{pH}=7,2$) de modo que el ABA se encuentra principalmente en forma aniónica y no difundirá hacia las cavidades celulares, lo que asegura que llegue a las células oclusivas estomatales en buena concentración y facilite el cierre de estas estructuras (Taiz y Zeiger, 2006).

El ABA también está involucrado en el proceso de adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés ambiental, y se ha comprobado que durante el estrés los niveles de ABA se incrementan en los tejidos vegetativos. Esta relación llevó a proponer que el ABA es uno de los mediadores de dichas respuestas y que sus niveles en la planta pueden ser determinantes del comportamiento frente a una condición de estrés. Estos niveles son modulados por un balance preciso entre la biosíntesis y el catabolismo de esta hormona. Aunque muchos genes que se expresan durante el estrés hídrico están regulados por el ABA, se ha encontrado que la expresión de algunos es total o parcialmente independiente de ABA. El análisis de la expresión de genes en diferentes plantas mutantes afectadas en la respuesta al déficit hídrico como las *aba* (bloqueadas en la síntesis de ABA) y las *abi* (insensibles a ABA) ha permitido identificar varios genes importantes en dicha respuesta. Entre las proteínas más importantes por su efecto protector potencial están las LEA y las que funcionan como antioxidantes. Durante el estrés hídrico también se induce la expresión de varios factores de transcripción que median la respuesta de genes en estrés hídrico,

algunos de los cuales se unen a secuencias específicas en la región promotora de los genes o secuencias *cis- acting* (Moreno, 2009).

Por ejemplo en el proceso de aclimatación un amplio número de genes *Cor* (respuesta a frío)/*LEA* son transcripcionalmente activados para producir la acumulación de proteínas y metabolitos que dan protección a las estructuras celulares. Las regiones promotoras de los genes de respuesta *Cor/ Lea* que responden a estrés abiótico contienen motivos de elementos regulatorios en *cis (cis-acting)* que regulan las rutas de señalización ABA dependientes e independientes. Se identificó el elemento *cis acting* ABRE (elemento de respuesta a ABA) en regiones promotoras en genes de respuesta a ABA como son los genes *LEA 2 Rab16*, *Em* (Kobayashi et al., 2012) y *wzy1-2* de trigo (Zhu et al., 2014). Se encontró que el gen *WDREB2A* (DRE: elemento de respuesta a deshidratación, B: proteína de unión tipo 2) aislado de trigo actúa como un factor de transcripción de los genes *Cor/ Lea* aumentando así la tolerancia a múltiples tipos de estrés abiótico (Kobayashi et al., 2012). Otro elementos de respuesta a sequía es el CE3 (elemento de acoplamiento) encontrado en varios promotores de genes *LEA* como *BcDh2* que actúa también como un elemento coactivador de los elementos de respuesta ABRE (Shen et al., 2004), estos elementos de respuesta tipo ABRE pueden ser encontrados en varias copias como en el gen *wzy1-2* de trigo donde está presente en 2 copias (Zhu et al., 2014).

Durante el desarrollo embrionario y en la gran mayoría de los casos indicados para diferentes tipos de estrés medioambiental, la inducción de la expresión de los genes *LEA* está mediada por el ABA. El agua, como resultado de su constante dieléctrica, mantiene *in vivo* la estructura de proteínas y fosfolípidos, y es posible que proteínas tales como la *LEA D-11* de algodón, sustituyan el agua y mantengan la estructura de proteínas y membranas en ausencia de esta (Moreno, 2009).

1.7 Papel de las proteínas tipo dehidrina ante estrés Biótico

Las plantas se encuentran en continuo contacto con distintos organismos a lo largo de su vida. Bajo condiciones naturales, interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos, sin embargo las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa (Madriz, 2002). De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados por Browning (1980) la resistencia y la avirulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. Este autor propone además que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta. Los genes que determinan la resistencia oligogénica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno. Otros autores como Keen (1992) señala que para las plantas que se desarrollan bajo condiciones naturales, la enfermedad es la excepción y no la regla, lo cual no siempre es cierto bajo las condiciones que prevalecen en la agricultura moderna.

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. La especificidad observada sirve para seleccionar la interacción que proporcione una ventaja para una de las partes (patogénesis o resistencia), o para ambos organismos (simbiosis). Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, especie y subespecie. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general son susceptibles solamente a pocos aislamientos o razas de patógenos. La virulencia es un concepto estrechamente ligado a la habilidad del patógeno de superar la resistencia de la planta. La resistencia vertical (monogénica u oligogénica) y la resistencia horizontal (poligénica) son los extremos de todo un espectro de niveles de resistencia. Sin embargo, en términos genéticos, la raza de un patógeno es virulenta si produce enfermedad y avirulenta si no produce enfermedad a un cultivar determinado. Para dividir adecuadamente la interrelación entre los dos organismos es conveniente utilizar los términos interacción compatible e interacción incompatible. Una relación compatible se refiere a una interacción entre una raza virulenta y un cultivar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

susceptible, mientras que una relación incompatible se establece cuando el hospedante es resistente y el patógeno es avirulento. Las interacciones incompatibles se caracterizan por estar mediadas por sistemas de reconocimiento que activan la expresión de mecanismos de defensa que frecuentemente están asociados a la manifestación de la reacción hipersensible. Por el contrario, en las interacciones compatibles el reconocimiento no se lleva a cabo, la respuesta de defensa no es activada y la enfermedad se establece (Madriz, 2002).

Resistencia y tolerancia son diferentes estrategias de las plantas contra las enfermedades. La resistencia consiste en evitar que los hospederos sean parasitados o en reducir el algún grado el parasitismo; la tolerancia está enfocada a reducir el impacto físico del parasitismo en los hospederos infectados donde estos mecanismos frecuentemente envuelven alguna capacidad de compensación al daño, como es la habilidad de las plantas para crecer nuevamente y/o la capacidad de reproducirse después del daño. Consideraciones teóricas predicen que en algunas circunstancias donde existen las dos, (resistencia y tolerancia) se tendrán hospederos con menos ventajas sobre los hospederos que exhiben solamente una de ellas, sin embargo la evidencia empírica ha proporcionado resultados mixtos (Medel, 2001). Aunque diferentes estudios en correlación y experimentación soportan que los rasgos de resistencia se debe a roles adaptativos, es mucho menos conocido el hecho de la evolución y mantenimiento de los rasgos de tolerancia en las plantas populares naturales (Shonle y Bergelson, 2000).

Las plantas resisten al ataque de patógenos mediante diferentes estrategias de defensa que pueden ser mecanismos constitutivos o mecanismos de defensa adquirida por factores bióticos y abióticos (Montes, 2009). Ambas preforman la naturaleza pasiva y activa respectivamente de los procesos de defensa que están envueltos en la prevención de la entrada del patógeno a la planta o de la obtención de nutrientes para su crecimiento y reproducción (Narayanasamy, 2008).

Los mecanismos constitutivos incluyen barreras físicas y químicas que pueden ser inducidos o no; entre las barreras físicas se encuentran capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras (Madriz, 2002), procesos de lignificación, suberización y

formación de calosas; pueden estar presentes en determinadas etapas o en todo el ciclo biológico de la planta o bien formarse en respuesta al inicio de un proceso infectivo. La cutícula gruesa en el caso de las plantas xerófitas, además de su papel para retener humedad, también les sirve de barrera física para impedir la entrada de hongos y bacterias, como por ejemplo una capa cerosa en la cutícula de las hojas de algunas especies de plantas, impide la formación de películas de agua en la superficie foliar después de las lluvias, lo que desfavorece la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos. Si se comparan especies xerófitas de plantas, como Opuntias y Agaves, con especies subtropicales, como el jitomate y la papa, en cuanto a diversidad de fitopatógenos las diferencias son notables ya que las especies subtropicales tienen tejidos más susceptibles a una mayor diversidad de patógenos y se desarrollan en condiciones climáticas más favorables para esos patógenos (Montes, 2009).

La defensa inducida, también conocida como **Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)**, es un sistema complejo que parte de una señal química o elicitor que desencadena la producción de enzimas del metabolismo secundario, cuyo uno de los resultados finales sería la síntesis de compuestos antimicrobianos, los cuales afectan a los patógenos, a los consumidores de las plantas y otros enemigos naturales (Montes, 2009); este mecanismo de resistencia utiliza las vías del **ácido salicílico** para activar las defensas que involucran cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes, llamados genes PR (relacionados con la patogénesis), por lo tanto el análisis de la actividad elicitora o inductora de las moléculas de superficie es importante para entender las bases moleculares para inducir la resistencia a enfermedades (Hase et al., 2006). Hay una gran correlación entre la percepción de los elicitores y la resistencia a los patógenos en las interacciones gen por gen y su reconocimiento ocurre solamente en los genotipos hospederos resistentes (Narayanasamy, 2008), lo anterior actúa de acuerdo a la hipótesis del gen por gen propuesta por Flor (1971) en la cual se evidencia la existencia de genes en la planta que confieren resistencia a una raza particular de un patógeno; este autor propone que los inductores específicos son proteínas codificadas por los genes Avr de avirulencia presentes en el patógeno y que son capaces de inducir las repuestas de defensa en cultivares

que posean los correspondientes genes R de resistencia. De esta forma, el reconocimiento tiene lugar cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes R y los correspondientes productos de los genes Avr del patógeno. Esta interacción da origen a una cascada de señales y otras vías de transducción que finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Fan et al., 2009) (Figura 3).

La RSA envuelve la producción de *novo* de fitoalexinas y proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogénesis); las primeras son muy características de la respuesta local y las proteínas PR ocurren local y sistémicamente (Heil y Bostock, 2002). La limitación de la actividad de agentes patógenos y crecimiento se le atribuye a la familia PR-2 como las β -1,3-endoglucanasas y las PR-3, -4, -8 y -11 como las endoquitinasas, las cuales actúan contra infecciones por hongos (Van Loon et al., 2006; Sánchez et al., 2012). Las quitinasas así como los inhibidores de proteinasas (PR-6), pueden también combatir nematodos e insectos herbívoros. Miembros de la familia PR-8 también poseen actividad lisosomal y tal vez la dirigen contra bacterias, mientras que las defensinas (PR-12) y tioninas (PR-13) tienen una actividad antibacterial y antifúngica de amplio espectro. Algunas proteínas de transferencia de lípidos (PR-14) tienen actividad antibacterial y antifúngica también; los miembros de la familia PR-1 y los de la PR-5, tipo α -taumantina, han sido asociadas con actividad contra oomycetes y que son capaces de generar una protección tanto ante estrés bióticos como ante estrés abiótico (Van Loon et al., 2006). En las células adyacentes a la respuesta hipersensible se observa el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina, deposición de calosa y la inducción de la síntesis de fitoalexinas (Camarena y de la Torre, 2007)

Existe otra forma de resistencia sistémica descubierta al aplicar a distintas plantas diferentes cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) tipo *Pseudomonas* sp las cuales no causan daños visibles en el sistema de raíces de las plantas; este tipo de resistencia fue denominada **Resistencia Sistémica Inducida (RSI)** que se da por inductores o elicitores provenientes de estímulos abióticos o de organismos no patógenos (Camarena y de la Torre, 2007). Según Camarena y de la Torre (2007) la RSI no causa la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis ni ácido salicílico, sino

que se utilizan las vías reguladas por el **ácido jasmónico y el etileno** (Figura 3). Sin embargo, aunque faltan más estudios, Hase et al. (2006) determinó que *Pythium oligandrum* (PO), un oomycete micopatógeno, tiene el potencial de suprimir enfermedades fúngicas y bacterianas en plantas, mediante su capacidad elicitora, activando los genes que expresan la β -1,3-glucanasa (PR-2b), quitinasa básica (PR-3b) y la proteína tipo -taumantina (PR-5b) las cuales son codificadas por genes relacionados con la patogénesis.

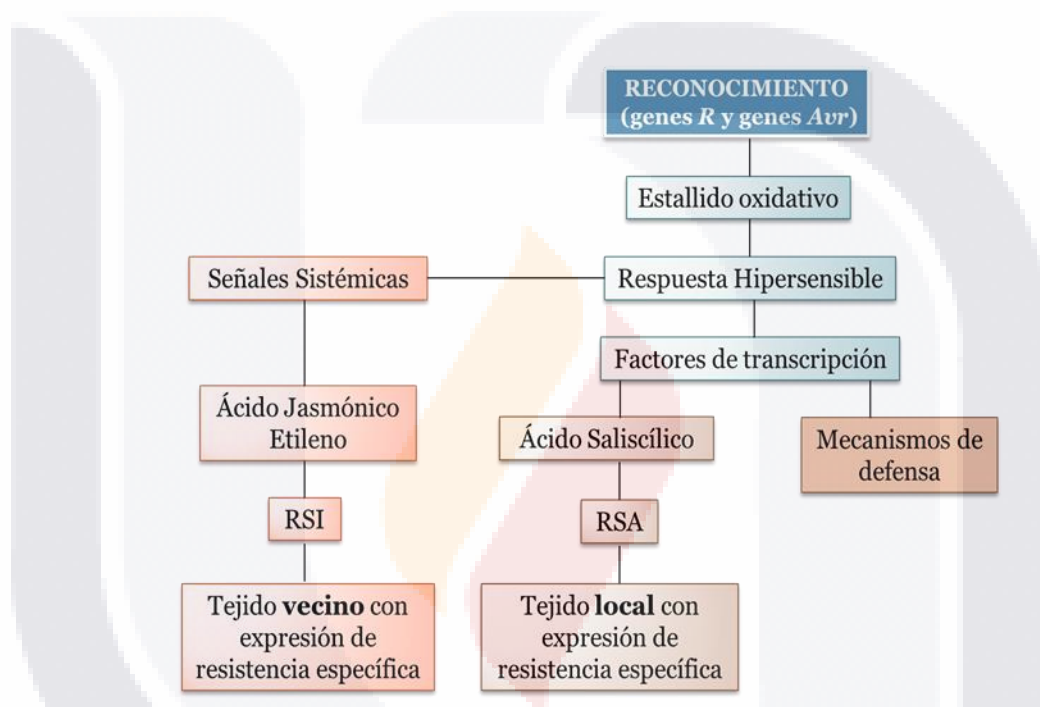


Figura 3. Expresión de la resistencia sistémica adquirida e inducida. Los genes RSA expresan proteínas relacionadas a la defensa (enzimas) y proteínas relacionadas a la patogénesis (PR). Otros mecanismos de defensa incluyen: deposición de calosa, engrosamiento de la pared celular y síntesis de fitoalexinas.

El estímulo elicitor se puede dar por los polímeros de azúcar que conforman la pared celular tanto de hongos como de las células vegetales, así como la muerte del tejido hospedante causada por el ataque del patógeno o por una reacción de hipersensibilidad que libera componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensa en tejidos adyacentes. Esta reacción de defensa también se puede activar de forma no específica por factores como el choque térmico, la sequía, diversas sustancias químicas y la

luz ultravioleta; este tipo de inductores abióticos activan respuestas de defensa ya que provocan heridas y daño físico en los tejidos (Agarwal y Agarwal, 2014). Se ha demostrado que algunas proteínas tipo dehidrina son sobreexpresadas ante fitohormonas que se producen cuando un estrés biótico está presente, entre estas dehidrinas se encuentra la TaDHN de *Triticum aestivum* (Shakirova et al. 2005), la BcDh2 de *Boea crassifolia* (Shen et al. 2004), la Dc3 de *Daucus carota* (Siddiqui et al., 1998).

1.8 Moléculas de señalización biosintetizadas en respuesta a estrés

Se ha descrito que en los sistemas vegetales existen tres principales fitohormonas las cuales son las responsables de varias respuestas de defensa en contra de diversos patógenos y en contra de estrés abiótico, éstas son: ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET). Estas moléculas pueden actuar sinérgica o antagónicamente en la transducción de señales para que se dé la activación de los complejos de genes de defensa en las plantas. Otros factores como las condiciones de crecimiento, tipo de tejido, edad y otras hormonas como el ABA afectan la respuesta (Memelink, 2009).

Para el caso del SA, existen evidencias de que participa en el sistema de defensa de las plantas contra el ataque por patógenos biotróficos y hemibiotróficos y que activa la RSA. El JA y el ET se asocian con la defensa ante el ataque por patógenos necrotrofos o insectos herbívoros, que intervienen para que se dé la RSI. Se ha descrito que las rutas de SA y JA/ET son mutuamente antagonistas; sin embargo, también se han reportado evidencias de interacciones sinérgicas entre estas vías, lo cual sugiere que la red de señalización activada y utilizada por la planta es dependiente de la naturaleza del patógeno, así como de su modo de ataque (Rangel et al., 2010).

1.8.1 Ácido Salicílico

El ácido salicílico (SA) es un fenol producido por las plantas, el cual posee un anillo aromático con un grupo hidroxilo; es moderadamente soluble en agua pero altamente soluble en solventes orgánicos polares. Sus propiedades físicas sugieren que el SA puede ser transportado, metabolizado y/o conjugado en las plantas. Por otra parte el SA aplicado exógenamente parece ser llevado lejos del sitio de aplicación inicial a otros tejidos de la planta donde generará una respuesta. Tiene influencia en procesos fisiológicos y bioquímicos como es la fotosíntesis, absorción de iones, permeabilidad de la membrana, actividad enzimática, floración, producción de calor, crecimiento y desarrollo de las plantas así como de germinación de semillas y defensa ante patógenos (Hayat y Ahmad, 2007).

El SA endógeno es una señal importante implicada en la activación de la respuesta de defensa de la planta ante hongos, bacterias y virus. Plantas de tabaco infectadas con el TMV (virus del mosaico del tabaco) demostraron una acumulación substancial de SA, adquirieron resistencia a infecciones posteriores y se desarrolló la resistencia sistémica adquirida (RSA) en estas plantas (Yalpani et al., 1991), lo anterior se da gracias a la señalización que el SA induce para que se dé la expresión de genes PR y la respuesta hipersensible (HR). Glass (1974) demostró que el SA y otros elicitores producidos por la entrada del patógeno es la primera señal de reconocimiento por los receptores de la membrana plasmática. La interacción entre los receptores de la membrana y los elicitores (SA) activan una cascada de reacciones que resulta en la expresión de los genes PR y la despolarización de la membrana lo cual juega un papel importante en la cadena de estas reacciones. Los cambios en la permeabilidad de la membrana por iones, un decremento en los gradientes de concentración transmembranales y la despolarización de la membrana plasmática son necesarios y suficientes para la inducción de genes de respuesta a heridas (Schaller y Frasson, 2001).

En semillas de trigo tratadas con SA se puede producir una acumulación transitoria de AIA y ABA, que es del modo en el que se acumula el efecto promotor de crecimiento en plantas. Por lo tanto este incremento del contenido de ABA tal vez contribuye en la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

preadaptación de las plantas a diferentes tipos de estrés, no solo abiótico sino también biótico, puesto que ABA tiene un rol clave en la inducción de la síntesis de un alto rango de proteínas de estrés y de proteínas PR en particular (Hayat y Ahmad, 2007). Otros experimentos demuestran la influencia de SA sobre las dinámicas de la acumulación de ABA y el nivel de la actividad de transcripción del gen que codifica para una dehidrina de trigo llamada TaDHN y según Shakirova et al. (2005) la habilidad de SA en incrementar los niveles de RNAm de ésta dehidrina, está precedido por la acumulación de ABA inducida por el SA. Estos datos indican la implicación de algunas dehidrinas en el espectro de acción protectora mediada por ABA influenciada por SA en las plantas de trigo. Sin embargo Shen et al. (2004) demostraron que la dehidrina BcDh2 es débilmente sobreexpresada al exponer a las plantas de *Boea crassifolia* a 0.1 y 0.5 mM de SA, así como también reportan elementos *cis- acting* de respuesta a SA en el promotor de este gen (W box), lo que demuestra que BcDh2 tal vez no es el principal factor de defensa ante patógenos, pero si regula algunas rutas de señalización coordinadamente.

1.8.2 Ácido Jasmónico y Etileno

El ácido jasmónico (JA) y sus derivados (JAs) constituyen una familia de oxilipinas bioactivas que regulan la respuestas de las plantas ante estímulos ambientales y de desarrollo. Estas señales moleculares afectan una gran variedad de procesos de las plantas que incluyen la maduración de la fruta, producción de polen viable, elongación de raíces, respuesta ante heridas, estrés abiótico y en la defensa contra insectos y patógenos necrotrofos (Memelink, 2009).

Se han descubierto nuevos loci involucrados en la señalización del JA y uno de ellos es el Jasmonato Intensitive 1 (JAI1/JIN1). JIN1 codifica a AtMYC2 un factor de transcripción cuya expresión es rápidamente sobreexpresada por el JA en una manera dependiente del receptor Coronatine Insensitive1 (COI1). AtMYC2 diferencialmente regula la expresión de dos grupos de genes inducidos por JA, el primer grupo incluye a los genes involucrados en

la respuesta de defensa contra patógenos y es reprimida por AtMYC2. El segundo grupo integra a los genes involucrados en la respuesta ante heridas mediada por JA y son activados por AtMYC2. Por el contrario el Factor de Respuesta (o elemento *cis-acting*) a Etileno 1 (ERF1) posiblemente regula la expresión del primer grupo de genes y reprimen al segundo; estos resultados ponen de manifiesto la existencia de dos ramas en la vía de señalización JA, antagónicamente regulado por AtMYC2 y ERF1, que son coincidentes con las respuestas alternativas activadas por JA y ET a dos diferentes tipos de estrés que son el ataque de patógenos y heridas (Lorenzo et al., 2004).

La secuencia *cis-acting* más común que medía la respuesta de genes inducidos por jasmonatos es el motivo GCC y la G-box (Memelink, 2009). El motivo GCC (GCCGCC), en el promotor del gen relacionado con la patogénesis PDF1.2, se expresa ante JA. Pero también el motivo GCC ha demostrado funcionar autónomamente como elemento de respuesta a etileno por lo tanto el gen PDF1.2 es sinérgicamente inducido por la combinación de JA y ET, aunque no todos los motivos GCC confieren inducción de expresión genética ante estos compuestos (Brown et al., 2003). La G- box (CACGTG) o secuencias parecidas a la G- box (ej. AACGTG) son también un elemento de respuesta esencialmente sensibles a jasmonatos, este elemento está presente en el promotor de muchos genes como por ejemplo en el gen inhibidor de las proteasas tipo 2 (PIN2), en el gen que codifica para la leucina aminopeptidasa de tomate (Memelink, 2009) y también se ha encontrado que es parte del promotor de algunos genes que codifican para Dehidrinasa (Zhu et al., 2013). El elemento G- box es negativamente afectado por ET por lo tanto solo responde a JAs (Memelink, 2009). Otro elemento de respuesta que se ha reportado en varios promotores de genes de dehidrinasa, con varias repeticiones, es el elemento WUN el cual es un elemento de respuesta ante heridas o daño mecánico (Shih et al., 2008).

El ET es bien conocido como un importante componente para que se desarrolle una lesión necrótica local o una reacción hipersensible y se induzca la resistencia sistémica inducida contra un amplio espectro de patógenos en plantas. La RSI en muchas especies de plantas colonizadas por *Pseudomonas fluorescens* cepa WCS417r, requieren la mediación de las rutas de señalamiento del etileno en combinación con el JA. En *Arabidopsis*

thaliana, las plantas que expresan RSA son las primeras en inducir la producción de etileno y la expresión de genes responsables después de la elicitación por la infección del patógeno, sugiriendo que el incremento de la capacidad de producir etileno tal vez contribuye a potenciar la capacidad defensiva contra los patógenos ya que induce a su vez la RSI. Por ejemplo la aplicación exógena de etileno a *A. thaliana* induce la actividad de los genes de defensa, como son las proteínas PR-1b y PDF 1.2. Pero la sobreexpresión del factor de respuesta 1 (ERF1) y 5 (ERF5) en *Arabidopsis* y tabaco confiere resistencia potenciada contra *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Fusarium oxysporum* y al virus del mosaico del tabaco. Sin embargo el rol del etileno y el etileno mediado por la transducción de señales para la activación de la respuesta de defensa no está bien establecida (Hase et al., 2006).

Recientemente se han descubierto dos elementos de respuesta a jasmonatos llamados JASE1 (5'-CGTCAATGAA-3') y JASE2 (5'-CATACGTCGTC-3') identificados en el promotor del gen *OPR1* en *Arabidopsis*; JASE1 es un nuevo motivo sin secuencias homólogas hasta ahora reportadas, mientras que JASE2 posee una secuencia central ACGT la cual es también encontrada en la G-box. El gen *OPR1* contienen los motivos JASE1/2 en su promotor, y se ha demostrado que es inducible por heridas en plantas mutantes (He y Gan, 2001). Muchos miembros de los factores de transcripción AP2/ERF (APETALA2/Ethylene Response Factor) son importantes en la expresión de genes inducidos por JA. Los dominios de las proteínas recombinantes AP2/ERF de diferentes subfamilias han demostrado unir, en estudios *in vitro*, dos elementos *cis-acting* similares; el primero es la unión de proteínas de la subfamilia ERF con la caja GCCA, la cual se ha encontrado en muchos promotores de genes de defensa a estrés biótico; el segundo son la unión de las proteínas pertenecientes a la subfamilia CBF/DREB unido con los motivos CRT/DRE (C-repeat (CRT)/dehydration-responsive element), los cuales se presentan en los promotores de los genes de respuesta a deshidratación y a bajas temperaturas (Memelink, 2009; Zhu et al., 2014).

La dehidirina Dc3 aislada de zanahoria (*Daucus carota*) es inducida también por el ácido jasmónico y etileno ya que tiene en el promotor del gen una secuencia tipo G box, además

de tener otros elementos de respuesta sensibles a etileno por lo que también es capaz de responder ante esta molécula; los resultados anteriores se demostraron en plantas que fueron bloqueadas para la producción de ácido abscísico por lo que es evidente que el gen *Dc3* puede ser inducido por estas fitohormonas además de por el ABA (Siddiqui et al., 1998). Otros genes LEA tipo 2 que son inducidos por JAs y ET son el *PgDhn1* aislado de *Picea glauca* donde Richard et al. (2000) demuestran que el JA, MeJa (metil jasmonato) y etileno, además de ABA, pueden inducir su expresión. Shen et al. (2004) reporta también que el gen *BcDh2* es inducido por MeJa, pero no realizan experimentos para demostrar si la expresión se da también ante etileno, sin embargo cuando analizan los elementos *cis-acting* del promotor encuentran elementos de respuesta a etileno (ERE). El promotor del gen *wzy1-2* también tiene elementos de respuesta que inducen la expresión del gen importantemente por MeJa y SA, y es menos expresado por ABA aunque tiene varias repeticiones de elementos de respuesta tipo ABRE (Zhu et al., 2014).

1.9 Interacción entre el estrés biótico y abiótico en plantas.

Las plantas son capaces de activar una respuesta específica y única cuando están sujetas a una combinación de múltiples estrés, y particularmente en combinaciones de estrés biótico y abiótico las rutas de señalización pueden actuar antagónicamente. La resistencia a estrés abiótico ha sido demostrada en una gran variedad de cultivos a través de la manipulación genética de factores de transcripción (TFs), proteínas LEA y proteínas antioxidantes; sin embargo no se realizan siempre pruebas de susceptibilidad a otros tipos de estrés biótico o abiótico distintos. Esto puede tener consecuencias desagradables en variedades mejoradas que pueden responder imprevisiblemente cuando se cultivan en campo (Atkinson y Urwin, 2012), un ejemplo de esto está dado por plantas transgénicas que sobreexpresan la enzima P5C necesaria para la biosíntesis de prolina y que se ha encontrado que en la combinación de estrés por desecación y por calor, las plantas acumulan sacarosa en sus células en lugar de prolina, tal vez para proteger a la mitocondria de los altos niveles de P5C potencialmente tóxicos, esto lo hace en respuesta a una

combinación específica de estrés de una manera no aditiva con efectos que posiblemente no han sido predichos en estudios anteriores de estrés individual con un enfoque integrado (Rizhsky et al., 2004).

Algunos factores de transcripción que regulan la expresión de muchos genes relacionados con el estrés han sido descubiertos, unos de estos factores de transcripción son los DREB/CBF que se unen a los elementos de respuesta *cis-acting* de deshidratación. Estos DREBs pertenecen a la familia de factores de transcripción ERF que están divididos en dos subclases DREB1/CBF y DREB2 que son inducidos por frío y por deshidratación respectivamente. Los DREBs están envueltos aparentemente también en rutas de señalización de estrés biótico. El genoma de *Arabidopsis* codifica para ~1500 factores de transcripción que se encuentran envueltos en la expresión de genes de respuesta a estrés tradicionalmente clasificados como de rutas de señalización ABA- dependientes y ABA- independientes, y de acuerdo a análisis de microarreglos hay muchas rutas de señalización que responden de manera independiente de la presencia de un estrés abiótico, donde aparecen importantemente regulados por el factor DREB/CBF. Las proteínas ERF comparten un dominio conservado de 58 -59 aminoácidos que se une a dos elementos *cis acting*, la caja GCC encontrada en muchos promotores de genes PR que le confieren respuesta a etileno y el motivo C- repetido CRT/DRE (elemento de respuesta a deshidratación) que está envuelto en la expresión de genes de respuesta a frío y a deshidratación. En arroz el gen *Os-DREB2A* fue inducido 24h después de la interacción con estrés por deshidratación y salinización (NaCl 250 mM), ABA y estrés por frío. En trigo un alelo funcional reportado como Fr-A1 juega un rol significativo en la regulación del factor de transcripción CBF (homólogo a DREB) mediado por la expresión de genes *Cor/Lea* (Agarwal et al., 2006)

Cuando la presencia de un estrés inicial o previo altera la respuesta normal de las plantas a un estrés secundario, como resultado de la respuesta de aclimatación, estos factores de estrés se dice que interactúan (Mittler y Blumwald., 2010). Sin embargo, cuando se examinan los efectos de un estrés abiótico con el impacto simultaneo de un patógeno o herbívoro, ambas interacciones se han observado dependiendo del tiempo,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

naturaleza y severidad de cada estrés. En tabaco y *Arabidopsis*, la respuesta hipersensible (HR) y los genes que median la respuesta defensiva contra *Pseudomonas syringae* y elicitores virales, se ven comprometidos en su función cuando se encuentran a altas temperaturas, permitiendo el crecimiento de estos patógenos. El estrés por desecación puede causar un detrimento en la resistencia a patógenos (Mohr y Cahill, 2003). En contraste, el estrés abiótico puede también interactuar positivamente con el estrés por patógenos ya que los patógenos pueden interferir activamente con la relación planta- agua en el orden en que la patogénesis se incrementa, por ejemplo se induce el cierre de estomas para reducir la pérdida de agua de los tejidos infectados, esto tienen un efecto positivo en la planta que le da tolerancia contra estrés abiótico. De igual forma las infecciones con virus pueden dar protección contra estrés por desecación (Atkinson y Urwin, 2012). En tabaco y arroz infectados por virus, los síntomas de desecación aparecen mucho después y las hojas mantienen sus niveles de agua por mucho más tiempo que las plantas no infectadas (Xu et al., 2008).

La superposición de conjuntos de genes que son regulados por ambos tipos de estrés, se ha identificado y se ha propuesto que se representen como un punto entre la comunicación cruzada de las cascadas de señalización. Por ejemplo las comparaciones que se han hecho de la respuesta del transcriptoma de las plantas de *Arabidopsis* a 9 diferentes tipos de estrés abióticos utilizando microarreglos, se encontró que 67 genes son comúnmente regulados por cada estrés, sugiriendo que hay un componente universal de la respuesta a cada condición. Un experimento similar se realizó para investigar la expresión de los genes del citocromo P450 en respuesta a varios tipos de estrés abiótico, patógenos y tratamientos con hormonas. Los genes identificados fueron inducidos en común por los estrés bióticos y abióticos, y por lo tanto tal vez son importantes en la regulación de la comunicación cruzada entre ambas rutas (Narusaka et al., 2004). Esto soporta la existencia de factores activados que reorganizan la expresión génica dependiendo de la naturaleza del estrés (Atkinson y Urwin, 2012).

Como se había mencionado anteriormente la respuesta al estrés abiótico está ampliamente controlada por la fitohormona ABA (ácido abscísico), mientras que la defensa

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contra diferentes tipos de estrés biótico está controlada por las rutas de señalización del antagonismo entre el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA)/etileno (ET). Sin embargo recientes investigaciones han sugerido que el ABA actúa sinérgica y antagonicamente con la señalización del estrés biótico, creando una red compleja en las rutas de señalización con una comunicación cruzada a diferentes niveles. El ABA es probable que sea central en la respuesta a los estrés simultáneos bióticos y abióticos, por ejemplo en tomates mutados con niveles de ABA reducidos muestran un incremento en la acumulación de SA que es determinante para la transcripción de proteínas de defensa como PR-1 lo que hace que se potencialice la tolerancia a *B. cinérea* (Atkinson y Urwin, 2012).

Los tratamientos con ABA reprimen la RSA porque que reprimen la inducción de SA en *Arabidopsis* y tabaco, donde también se inhibe la acumulación de componentes cruciales de defensa como ligninas y fenilpropanoides, así como también el SA puede interferir con la señalización del estrés abiótico (Figura 4) (Kusajima et al., 2010). ABA también antagoniza la señalización de defensa por JA y ET, como se ha demostrado mediante la represión de los genes de defensa como PDF1.2 por ABA. A pesar de estas observaciones, ABA puede tener un efecto positivo en los sistemas de defensa (Atkinson y Urwin, 2012). Melotto et al. (2006) encontró que ABA es necesario para la formación del ácido β -aminobutírico (BABA) el cual induce a la deposición de calosa durante la fase de defensa ante hongos patógenos.

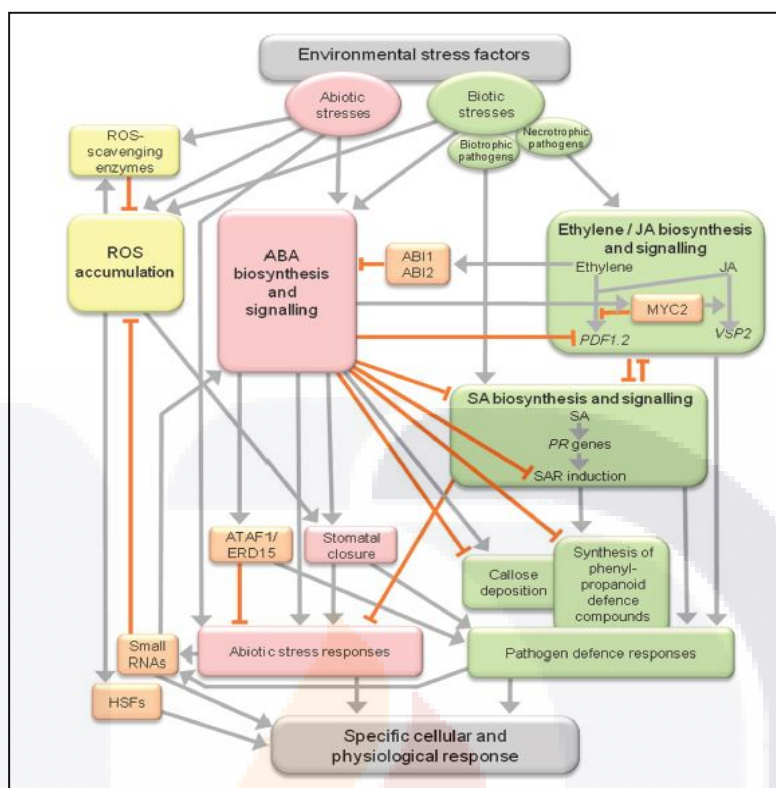


Figura 4.- Rol de las fitohormonas en la regulación entre el estrés biótico y abiótico (Atkinson y Urwin, 2012). Comunicación cruzada que ocurre entre las hormonas, factores de transcripción y otros componentes regulatorios cuando se presenta estrés biótico y abiótico. Las líneas grises muestran una inducción o una regulación positiva; las barras naranja muestran una inhibición o represión. Eventos característicos de respuesta a estrés abiótico se muestran en rosa, y los característicos de estrés biótico se muestran en verde. Los factores de transcripción y otros genes reguladores están representados por cuadros naranjas. ROS: especies reactivas de oxígeno; ABA: ácido abscísico; JA: ácido jasmónico; SA: ácido salicílico; PR: relacionado con la patogénesis; SAR: resistencia sistémica adquirida; HSF: factores de choque térmico.

Se ha propuesto un nuevo modelo para explicar el rol multifacético de ABA en la respuesta al estrés por patógenos, por lo cual la influencia de ABA depende del tiempo de infección y de la naturaleza del ataque. El modelo se refiere a tres fases distintas de la infección por un patógeno. En la primera fase ABA causa cierre de los estomas, incrementando la resistencia a la penetración por los patógenos como bacterias, lo que tiene

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un efecto positivo en la respuesta de defensa. En esta etapa ABA antagoniza con las rutas del SA, JA y ET con el fin de ahorrar recursos ya que sus efectos aún no son requeridos. En la segunda fase, la defensa post- invasión se centra en la deposición de calosa para fortalecer las paredes celulares, un proceso que es ayudado por ABA durante infecciones fúngicas, pero que se ha observado que es reprimido durante infecciones bacterianas. Durante la fase tres de la infección los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) inducen las hormonas SA, JA y ET y señales a larga distancia para regular un amplio espectro de componentes defensivos. El incremento de los niveles de ABA durante el estrés abiótico, tal vez reprime la respuesta del SA, JA y ET aún durante la fase tres. Estas hipótesis proveen un mecanismo de control del ABA sobre la señalización ante estrés biótico y abiótico, controlando así el cambio de prioridad entre la respuesta ante estrés biótico o abiótico que permite responder a las plantas a la amenaza más grave. La producción de ABA tal vez es el factor más crucial para determinar cómo las plantas responden a múltiples estrés (Atkinson y Urwin, 2012).

1.9 El gen *OpsDHN1*

La proteína *OpsDHN1*, que es codificada por el gen *OpsDHN1*, está clasificada como una dehidrina ácida tipo SK₃ debido a que posee un segmento S y tres segmentos K (figura 5), posee una estructura secundaria altamente desarreglada en solución acuosa y tiene un alto índice de hidrofiliidad (1.56). El gen codifica para una proteína de 248 aminoácidos con una masa molecular de 28.36 kD y tiene un marco de lectura abierto de 747 bp (Ochoa et al., 2012).



Figura 5. Representación esquemática de los motivos presentes en la proteína *OpsDHN1* (Ochoa et al., 2012). Segmento K (EKKGIME/DKIKEKLPG, áreas grises) y segmento S (serie de residuos de serina, área en negro); el triángulo señala el sitio de inserción del intrón.

Esta dehidrina ha sido aislada de *Opuntia streptacantha* haciéndola uno de los pocos genes *lea* descritos para cactáceas. Se ha observado que se encuentra principalmente expresada cuando se induce un estrés por frío, aunque también hay un aumento en la expresión cuando hay un estrés osmótico provocado por NaCl 250 Mm. Se comprobó que un conjunto de varios tipo de estrés no alteran la expresión de este gen, solamente es sobreexpresado cuando en las combinaciones de estrés se encuentra frío o salinidad. Al igual que otros genes tipo *lea*, el *OpsDHN1* es inducido por el ácido abscísico, y se ha observado que la expresión es mucho mayor cuando se induce un estrés por frío y se aplica ácido abscísico exógenamente al mismo tiempo, obteniendo una máxima expresión a los 6 días de inducción del estrés y va disminuyendo a los 9 días de su aplicación (Ochoa et al., 2012).

2. JUSTIFICACIÓN

Las plantas en la naturaleza tienen que enfrentarse a múltiples tipos de estrés como: sequías, temperaturas extremas, variaciones osmóticas y al ataque de patógenos y depredadores. Los genes tipo *lea* (Late Embryogenesis Abundant) se sobreexpresan en embriones de semillas y múltiples tejidos vegetativos de numerosas plantas ante un deshidratación severa causada por diversos factores ambientales como sequía o frío, observándose que éstos organismos son más resistentes al estrés hídrico.

También se ha observado que las heridas y daños provocados por insectos herbívoros o patógenos dañan los vasos vasculares produciendo una deshidratación asociada con un daño celular. En este tipo de daños se han realizado estudios recientemente donde se ha reportado la expresión de algunas proteínas LEA tipo dehidrina específicas que son inducidas por ciertas fitohormonas que se producen principalmente cuando se presenta un daño por heridas causadas por un depredador.

Las cactáceas son plantas muy importantes por su diversidad y gran resistencia al estrés ambiental, por lo que la identificación y caracterización de genes *lea* y su participación en la regulación ante distintos tipos de estrés, permitirá conocer otros posibles factores, además de los morfológicos y fisiológicos, que influyen en su éxito adaptativo a regiones tan específicas de México y que las hace plantas sumamente importantes para la biodiversidad del país. A pesar de su importancia social y económica, la diversidad genética de las cactáceas no ha sido ampliamente estudiada, encontrándose muy pocos trabajos del estudio de los genes tipo *lea* específicos en cactáceas.

Por lo tanto, es importante observar si el gen tipo *lea* a analizar es capaz de sobreexpresarse ante la presencia de fitohormonas producidas por las plantas ante estrés abiótico y biótico. Conocer qué tipo de genes son los que están involucrados en la tolerancia a estrés por frío, salinidad y deshidratación nos permitirá generar en un futuro plantas agrónomicamente importantes resistentes a varios tipos de estrés y por lo tanto con más probabilidades de éxito en el campo.

3. HIPÓTESIS

Las cactáceas poseen genes tipo *lea* que pueden ser sobreexpresados cuando se presentan diferentes tipos de estrés.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

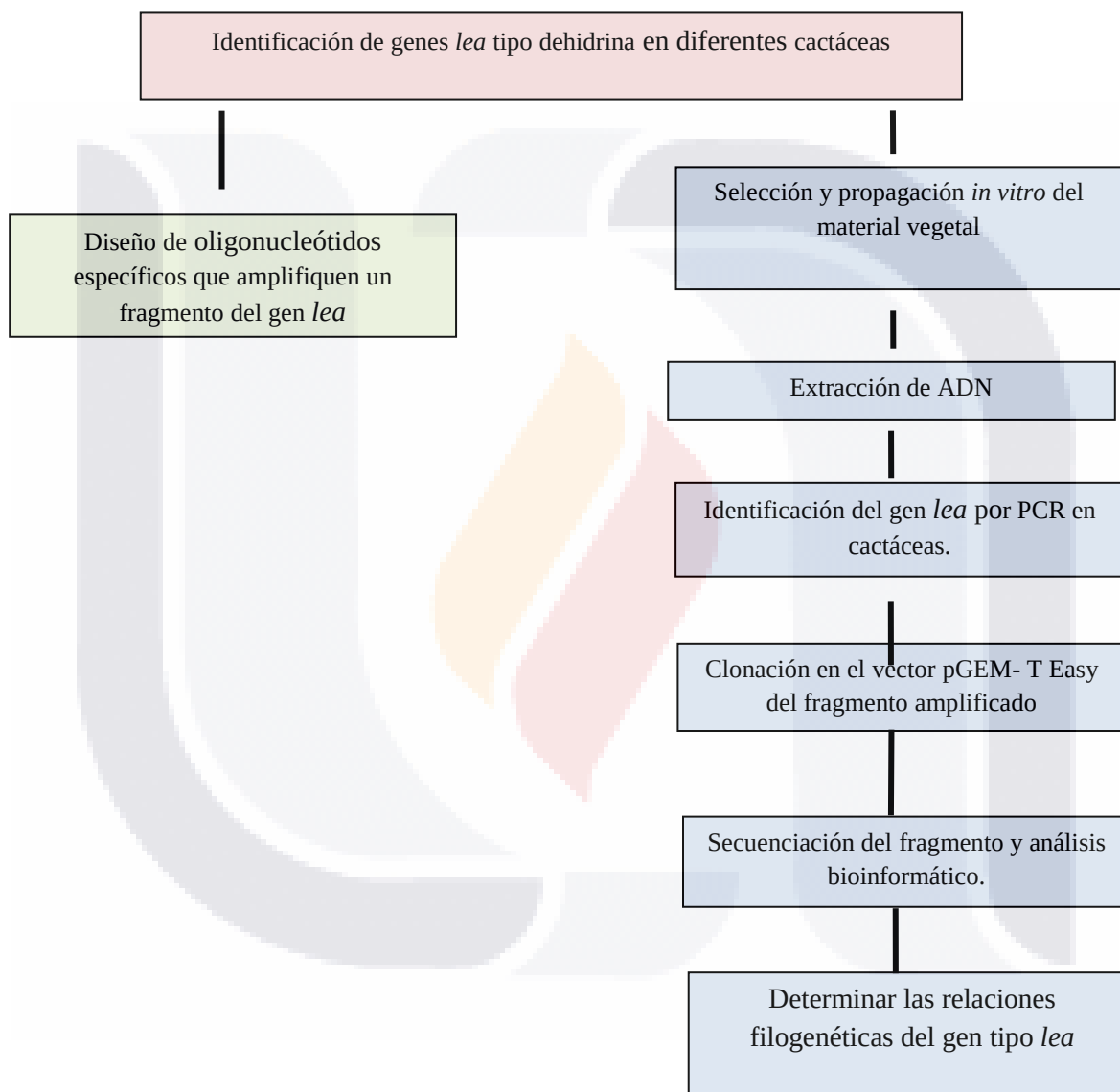
Identificar y caracterizar un gen tipo *lea* en cactáceas y determinar su nivel de expresión ante diferentes tipos de estrés.

4.2 Objetivos particulares

1. Diseñar oligonucleótidos específicos para identificar el gen tipo *lea*
2. Identificar la presencia o ausencia del gen tipo *lea* en cactáceas
3. Aislar y secuenciar un fragmento del gen tipo *lea* y análisis *in silico*
4. Determinar las relaciones filogenéticas del gen tipo *lea*.
5. Determinar el nivel de expresión del gen tipo *lea* ante varios tipos de estrés en al menos una especie de cactácea.

5. METODOLOGÍA

5.1 Esquema general de la metodología a seguir (etapa I).



5.2 Identificación de genes *lea* tipo dehidrina en diferentes cactáceas

5.2.1 Selección del material vegetal

Para la evaluación del método de extracción de ADN se seleccionaron 32 especies de géneros diferentes de cactáceas del Banco de Germoplasma *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Posteriormente se seleccionaron 3 cactáceas en base a la rapidez de su propagación y a la posibilidad de extracción de ADN con calidad óptima para la realización de análisis posteriores. El material vegetal se propagó en el medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) preparado según las especificaciones señaladas en el anexo B.1; para lograr la generación de brotes al medio MS se le agregaron las fitohormonas y concentraciones señaladas en la tabla 3.

Tabla 3: Material vegetal seleccionado y medio de propagación.

Especie	Medio de cultivo
<i>Acharagma aguirreana</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Astrophytum capricorne</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Browningia candelaris</i>	MS+ 0.5 mg/L de Topolina
<i>Carnegiea gigantea</i>	MS + 2 mg/L de BA
<i>Cephalocereus senilis</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Coryphantha potosiana</i>	MS + 2mg/L de 2iP
<i>Echinocereus triglochidiatus</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Echinomastus erectocentrus</i>	MS + 2 mg/L de BA
<i>Epithelantha micromeris</i>	MS + 0.5 mg/L de BA

<i>Escobaria chaffeyi</i> (E. dasyacantha subsp. chaffeyi)	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Ferocactus peninsulæ</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Frailea asterioides</i>	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Glandulicactus uncinatus</i>	MS + 2 mg/L de BA
<i>Isolatocereus dumortieri</i> (Stenocereus dumortieri)	MS + 2 mg/L de BA
<i>Leuchtenbergia principis</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Lophophora williamsii</i> (Lophophora decipiens)	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Mammillaria bombycina</i>	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Matucana madisoniorum</i>	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (M. oaxacensis)	MS + 5 mg/L de 2iP
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	MS + 2 mg/L de BA
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Obregonia denegrii</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Opuntia ficus- indica</i>	MS + 1 mg/L de BA
<i>Pelecyphora strobiliformis</i>	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Peniocereus greggii</i>	MS + 2 mg/L de BA
<i>Pereskia sacharosa</i>	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	MS + 2 mg/L de BA
<i>Polaskia chichipe</i>	MS + 1 mg/L de BA

<i>Stenocactus crispatus</i> (<i>S. dichroacanthus</i>)	MS + 0.5 mg/L de BA
<i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i>	MS 50% sacarosa+ 6 mg/L 2iP
<i>Turbinicarpus pseudomacrochele</i> var <i>lausseri</i>	MS + 0.75 mg/L de BA

Las plantas se cortaron en segmentos que se pusieron en contacto con el medio MS en frascos de vidrio en condiciones axénicas, para esto se tomaron las plántulas o brotes y se eliminó la parte basal y el ápice. Las especies con forma globular se cortaron longitudinalmente para obtener 2 explantes laterales, y las especies con forma columnar se cortaron en rebanadas trasversales de aproximadamente 4 mm de grosor. Los explantes laterales se inocularon con la herida hacia el medio de cultivo y los explantes trasversales se inocularon también con una de las heridas hacia el medio de cultivo manteniendo la polaridad del explante. Los frascos se incubaron a 25°C bajo luz continua hasta que se observaron brotes diferenciados que posteriormente fueron utilizados para la propagación de las plantas y para la extracción de ADN.

5.2.2 Diseño de oligonucleótidos para identificar el gen *lea* tipo dehidrina.

Se tomó como molde la secuencia de RNAm del gen *OpsDHN1* disponible en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el número de acceso HO058650 (Ochoa et al., 2012) para el diseño de los **oligonucleótidos específicos** para identificar genes *lea* tipo dehidrina en el programa DNASTar con el subprograma Primer Select 5.0 de DNASTAR, Inc.

5.2.3 Extracción de ADN de cactáceas.

La extracción de ADN de cactáceas se realizó mediante el método CTAB (Murray y Thompson, 1980) con modificaciones implementadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Las modificaciones fueron las siguientes: 300 mg de tejido fresco fueron congelados con nitrógeno líquido y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pulverizados con la ayuda de mortero, después se colocó el tejido en un microtubo de 1.5 ml cuidando que no se descongelara la muestra; posteriormente se agregó un 1 vol de buffer de lisis (anexo B.2) y se agitó fuerte por 10 min manualmente, los tubos se incubaron a 65°C por 10 min agitando constantemente; pasado este tiempo las muestras se incubaron en hielo por 5 min. Se agregaron 300µl de NaCl 1.4 M y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente, después se colocó 1 vol de fenol- cloroformo (1:1) y se agitó fuerte manualmente y se centrifugó 5 min a 12 000 rpm, posteriormente la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 1 vol de cloroformo –alcohol isoamílico (24:1), se agitó fuerte manualmente hasta que la muestra fue homogénea, se centrifugó 5 min 12 000 rpm y se transfirió la fase acuosa en un nuevo tubo; se agregó 1 vol de isopropanol, se agitó por inversión 10 veces y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se centrifugó 5 min a 12 000 rpm y se decantó para posteriormente lavar la pastilla 2 veces con 100 µl de etanol al 70% centrifugando 5 min a 12000rpm. La pastilla se secó y posteriormente se resuspendió en 50µl de agua. Las muestras de ADN se conservaron a 4°C hasta su posterior utilización.

La extracción de ADN se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV en el fotodocumentador DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet. La cuantificación de la cantidad y pureza del ADN extraído se realizó por espectrofotometría con un espectrofotómetro Thermo scientific modelo Genesys 10S UV-VIS a las longitudes de onda 260 y de 280 nm.

La concentración de ADN se dedujo con la siguiente fórmula utilizando un factor de dilución de 50:

$$\text{ADN } \mu\text{g/ml} = \frac{\text{OD 260} \times \text{Factor de dilución} \times 50 \mu\text{g/ml}}{1000}$$

Para conocer la pureza de la muestra se aplicó la siguiente operación:

$$\text{Pureza} = \text{OD 260} / \text{OD 280}$$

(Concepción et al., 2005)

5.2.4. Amplificación por PCR del gen *lea* tipo dehidrina.

La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando el kit comercial RED Taq Ready Mix PCR Reaction Mix con $MgCl_2$ (Sigma- Aldrich) y el kit Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific). Las condiciones de amplificación para cada gen se muestran en los apartados 5.2.4.1 y 5.2.4.3. Las muestras amplificadas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio y visualizadas con luz UV.

5.2.4.1 Amplificación del gen de la β -actina.

Se realizó la amplificación del gen de la β -actina como control. Los oligonucleótidos específicos amplificaron un fragmento de 740pb aproximadamente, la secuencia de oligonucleótidos utilizados es la siguiente:

Factina: 5'AACTGGGATGACATGGAGAA3' y **Ractina:** 5'ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA3'

Se utilizó la siguiente mezcla: 9.5 μ l de agua para reacción de PCR, 12.5 μ l de RED Taq Ready Mix, 1 μ l de c/ oligonucleótido (0.5 μ M) y 1 μ l de ADN (50 ng). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94°C por 5 min (predesnaturalización), 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), 50°C por 1 min (alineamiento) y 75°C por 1 min (extensión); por último 1 ciclo de 75°C por 7 min (extensión final). Se utilizó un termociclador TECHNE modelo TC-412.

5.2.4.2 Estandarización de condiciones de amplificación.

Para corroborar que las condiciones de amplificación dadas por el programa DNASTar fueran correctas, se sometió a amplificar ADN de *Opuntia ficus-indica* que fue seleccionada como control positivo. Las pruebas de amplificación se realizaron con los oligonucleótidos FOpsDHN1 y ROpsDHN1 (secuencia en el inciso 6.2) a diferentes temperaturas de alineamiento: 55, 57, 59, 61 y 63°C. La mezcla de reacción fue: 10.5 μ l de

agua libre de nucleasas, 12.5µl de RED Taq Ready Mix, 0.5 µl de c/ oligonucleótido (0.5 µM) y 1 µl de ADN (50ng aproximadamente). Se aplicaron las siguientes condiciones de amplificación para cada prueba: 1 ciclo de 95°C por 5 min (predesnaturalización), 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), temperaturas de alineamiento de prueba (55, 57, 59, 61 o 63°C) durante 1 min y 72°C por 1 min (extensión); por último 1 ciclo de 72°C por 7 min (extensión final). Se utilizó un termociclador de gradientes de temperatura marca CORBETT Research.

5.2.4.3 Identificación de genes LEA en diferentes cactáceas.

Se utilizó ADN de las cactáceas: *Acharagma aguirreana*, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Astrophytum capricorne*, *Carnegiea gigantea*, *Echinomastus erectocentrus*, *Leuchtenbergia principis*, *Mammillaria bombycina*, *Opuntia ficus-indica*, *Pelecyphora strobiliformis*, *Pereskia sacharosa* y *Pilosocereus chrysacanthus* para la búsqueda mediante PCR del gen *lea*. Para el escrutinio se utilizaron 2 mezclas de reacción con polimerasas diferentes; a continuación se describen las condiciones de amplificación:

La mezcla utilizada fue: 7 µl de agua, 10 µl de PyroStart Fast PCR Master Mix, 0.5 µl de c/ oligo (0.5 µM) y 2 µl de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C por 1 min (predesnaturalización), 30 ciclos de 94°C por 1 seg (desnaturalización), 55°C por 15 seg (alineación) y 72°C por 10 seg (extensión); por último 1 ciclo de 72°C por 10 seg (extensión final). Se utilizó un termociclador marca CORBETT Research.

La mezcla utilizada fue: 10.5 µl de agua libre de nucleasas, 12.5 µl de RED Taq Ready Mix, 0.5 µl de c/ oligonucleótido (0.5 µM) y 1µl de ADN (50 ng aprox). Se aplicaron las siguientes condiciones de amplificación para cada prueba: 1 ciclo de 95°C por 5 min (predesnaturalización), 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturalización), temperaturas de alineamiento de prueba (55, 57, 59, 61 o 63°C) durante 1 min y 72°C por 1 min (extensión); por último 1 ciclo de 72°C por 7 min (extensión final). Se utilizó un termociclador Techne TC-312.

5.2.4.4 Amplificación del gen *lea* tipo dehidrina en *O. ficus-indica*, *L. principis* y *M. bombycina*.

Se utilizó ADN de las cactáceas *Opuntia ficus-indica*, *Leuchtenbergia principis* y *Mammillaria bombycina* para la búsqueda mediante PCR de genes *lea* tipo dehidrina. La amplificación se llevó a cabo con la mezcla Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix de Thermo Scientific. La mezcla utilizada fue: 7 µl de agua, 10 µl de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix, 0.5 µl de c/ oligonucleótido (0.5 µM) y 2 µl de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 98°C por 10 seg (predesnaturalización), 30 ciclos de 98°C por 1 seg (desnaturalización), 62°C por 5 seg (alineación) y 72°C por 15 seg (extensión); por último 1 ciclo de 72°C por 1 min (extensión final). Se utilizó un termociclador Techne TC-312. Nota: la temperatura de alineamiento utilizada es de 59°C sin embargo se hace un aumento a 63°C por indicación del protocolo dado por el fabricante.

5.2.5 Purificación y clonación de los fragmentos amplificados

La purificación de los fragmentos amplificados por PCR a partir del gel de agarosa se realizó con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y con el kit DNA Clean and ConcentratorTM- 5 (Zymo Research), siguiendo los protocolos especificados por el fabricante.

Los fragmentos purificados se clonaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 6) siguiendo las especificaciones del fabricante; a la construcción se le nombró pGEM LEA- nombre de la muestra, pGEM LEA-155 con fragmento de la muestra de *O. ficus-indica*, pGEM LEA-34 para la muestra *L. principis* y pGEM LEA-42 para la muestra de *M. bombycina*. En la figura 6 se muestra el mapa del vector con sus características.

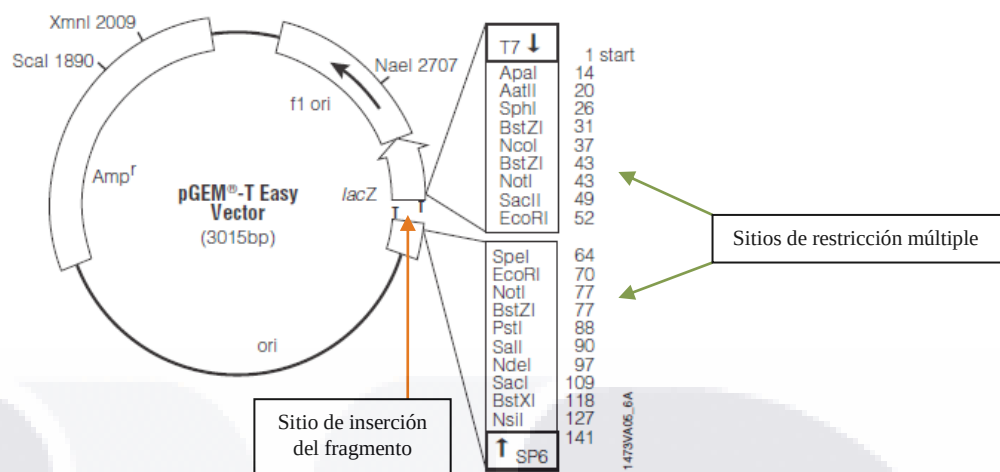


Figura 6. Mapa del vector pGEM®-T Easy. Se muestran los sitios promotores de la RNA polimerasa (T7 y SP6), el sitio de inserción del fragmento (flecha naranja) y los sitios de restricción múltiple (flechas verdes), el gen de resistencia a ampicilina (Amp), el sitio inicial para la replicación del ADN (ori) y el gen que codifica para la β -galactosidasa ($lacZ$).

5.2.5.1 Transformación genética bacteriana por choque térmico

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5- α con las construcciones pGEM LEA-155, pGEM LEA-34 y pGEM LEA-42. Para la preparación de las células competentes se siguió el siguiente protocolo: se cultivó *E. coli* en medio LB sólido a 37°C durante 20 hrs. Se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 ml de medio LB líquido, se incubó con agitación a 37°C durante 20 hrs. Posteriormente se sembró 1 ml del cultivo crecido en 10 ml de LB líquido y se incubó durante 3 hrs aproximadamente, se repartió en 10 microtubos de 1.5 ml y se incubó en hielo durante 10 min, después se centrifugaron los tubos a 12 000rpm durante 15 seg y se eliminó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió suavemente en 30 μ l de $CaCl_2$ 0.1M estéril y frío, los tubos se incubaron en hielo 10 min y nuevamente se centrifugaron a 12 000rpm, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla. Por último se resuspendió la pastilla en 30 μ l de $CaCl_2$ 0.1M con DMSO al 7% y se almacenaron hasta su uso a -70°C.

Para la transformación de las células competentes por choque térmico se siguió el siguiente protocolo: Se añadieron 50ng de construcción a 30 μ l de células competentes de *E. coli* mezclando suavemente, la muestra se incubó en hielo durante 20 min, después se calentó a 42°C por 90 seg, rápidamente se transfirieron a hielo e incubaron durante 2 min, después se añadieron 200 μ l de medio LB líquido y se incubaron a 37°C durante 45 min con agitación. Posteriormente las bacterias se sembraron en cajas con medio sólido LB adicionado con 50 mg/L de ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Las colonias crecidas en el medio de selección son las bacterias presuntamente transformadas.

5.2.5.2 Extracción de plásmidos.

La extracción de DNA plasmidico se realizó mediante el protocolo propuesto por Birnboim y Doly (1979), el cual consiste en la extracción de los plásmidos con un método alcalino. Para esto primeramente las bacterias de *E. coli* transformadas se crecieron a 37°C en medio LB líquido con ampicilina toda la noche, posteriormente se tomaron 1.5 ml del cultivo y se centrifugó a 12 000 rpm por 2 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 μ l de la solución Birnboim I (apéndice B.4), se resuspendió la pastilla con ayuda de la micropipeta y se incubó en hielo 5 min, después se añadieron 200 μ l de solución Birnboim II (apéndice B.4), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se agregaron 150 μ l de solución Birnboim III (apéndice B.4), se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo 5 min para después centrifugar a 12 000 rpm por 5 min y transferir el sobrenadante a otro tubo limpio. Se añadieron 200 μ l de fenol- cloroformo y se mezcló vigorosamente hasta emulsificar, se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min, se recuperó fase acuosa y se adicionaron 200 μ l de cloroformo- alcohol isoamílico, se agitó hasta emulsificar y se centrifugó 5 min. Se recuperó la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaron con un vol de isopropanol. Se mezcló por inversión durante 1 min y posteriormente se dejó en hilo por el mismo tiempo. Se recuperó la pastilla por centrifugación a 12 000 rpm y se eliminó el exceso de sal con un lavado de etanol al 70%. Se centrifugó 5 min a 12 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se conservó la pastilla dejándola secar por completo antes de resuspenderla en 50 μ l de agua destilada estéril; se almacenó hasta su uso a 4°C.

5.2.5.3 Verificación de la ligación mediante restricción y PCR.

Para comprobar la transformación de las bacterias con el vector más inserto de interés se realizó una digestión a los plásmidos extraídos con la enzima EcoRI (Invitrogen, No. catálogo: 15202-013) bajo las siguientes condiciones: para cada reacción se colocaron 5µl de DNA plasmídico, 2µl de Buffer para EcoRI 10X, 1µl de enzima EcoRI, 1µl de RNAsa y 6 µl de H₂O para ajustar un vol total de 10 µl. Esta mezcla se incubó por 2 hrs a 37°C y posteriormente se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. La presencia de una banda de 500pb aproximadamente nos indicó la presencia de nuestro fragmento ligado al plásmido.

El ADN plasmídico se utilizó para realizar una PCR con el fin de comprobar la presencia del fragmento. La mezcla y condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes: 7µl de agua, 10µl de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix, 0.5µl de c/ oligonucleótido (0.5 µM) y 2µl de ADN plasmídico. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 98°C por 10 seg (predesnaturalización), 30 ciclos de 98°C por 1 seg (desnaturalización), 62°C por 5 seg (alineación) y 72°C por 15 seg (extensión); por último 1 ciclo de 72°C por 1 min (extensión final). Se utilizó un termociclador Techne TC-312. Nota: la temperatura de alineamiento utilizada es de 59°C sin embargo se hace un aumento a 63°C por indicación del protocolo dado por el fabricante. La presencia de una banda de 500pb en la electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta, nos indica la presencia del fragmento deseado.

5.2.6 Secuenciación de los productos amplificados y análisis *in silico*.

Se seleccionaron los fragmentos amplificados de los genes tipo *lea* de las cactáceas *O. ficus-indica*, *Mammillaria bombycina* y *Leuchtenbergia principis* y se enviaron a secuenciar en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), Irapuato, Guanajuato, México.

La búsqueda de genes homólogos se realizó con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de información Biotecnológica (NCBI;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante la herramienta nucleotide blast (Blastn). La traducción virtual de las secuencias se realizó en la plataforma ExPASy del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://web.expasy.org/translate/>), la cual también permitió reconocer el marco de lectura abierto. La secuencia de nucleótidos se sometió a una búsqueda de proteínas homólogas con el programa BLASTx del NCBI.

Se realizó un **alineamiento múltiple** de aminoácidos en el programa MegAlign DNASTar 3.0 con el método ClustalW (DNASTAR, Inc.). Así mismo se realizó una búsqueda de **motivos conservados** en la plataforma MEME (Motif-based sequence analysis tools; <http://meme.nbcr.net/meme/>) de Bailey y Elkan (1994) y una búsqueda de **dominios funcionales** con la herramienta PROSITE (Database of protein domains, families and functional sites) del servidor EsPASy del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>).

Para conocer los diferentes parámetros de las proteínas putativas se utilizó la plataforma GPMaw lite (General Protein Mass Analysis for Windows) de Alphalyse (http://www.alphalyse.com/gpmaw_lite.html) disponible en el servidor de Expasy; el análisis de número de aminoácidos totales, peso molecular, punto isoeléctrico y GRAVY (Grand average of hydropathicity index) se realizó con la plataforma ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) de Gasteiger et al. (2005). Las gráficas de hidropaticidad de los aminoácidos se realizaron con la herramienta ProtScale de Gasteiger et al. (2005) del servidor Expasy (<http://web.expasy.org/protscale/>) en base a la escala propuesta por Kyte y Doolittle (1982) donde los autores definen los siguientes valores de hidrofobicidad para cada aminoácido: Ala: 1.800, Arg: -4.500, Asn: -3.500, Asp: -3.500, Cys: 2.500, Gln: -3.500, Glu: -3.500, Gly: -0.400, His: -3.200, Ile: 4.500, Leu: 3.800, Lys: -3.900, Met: 1.900, Phe: 2.800, Pro: -1.600, Ser: -0.800, Thr: -0.700, Trp: -0.900, Tyr: -1.300, Val: 4.200.

5.2.7 Análisis filogenético

Se realizó un alineamiento múltiple en el programa ClustalW2 de la plataforma del Instituto de bioinformática Europeo (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) utilizando

las secuencias de aminoácidos de las proteínas tipo dehidrina de *O. ficus indica*, *M. bombycina*, *L. principis* y de secuencias (parciales y totales) de dehidrinas similares de 18 especies de plantas reportadas en la plataforma UniProtKB (The UniProt Knowledgebase, <http://www.uniprot.org/uniprot/>) con la ayuda del programa FASTA del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>); las características de las secuencias se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencias parciales y totales de las proteínas tipo dehidrina homólogas a OpfiDHN- like, LepDHN-like y MabDHN-like.

Taxa	UNIPROT KB No. de Accesoión	Nombre	Tipo de secuencia	Familia
<i>Suaeda glauca</i>	H8YHV1	Dehydrin	Total	Amaranthaceae
<i>Atriplex halimus</i>	U5Y959	Dehydrin	Total	Amaranthaceae
<i>Arabidopsis thaliana</i>	F4HST2	Dehydrin ERD 10	Total	Brassicaceae
<i>Opuntia streptacantha</i>	G9B6J3	Dehydrin 1	Total	Cactaceae
<i>Pinus mugo subsp rotundata</i>	F1BQ11	Dehydrin 1 protein (Fragment)	Parcial	Pinaceae
<i>Eriobotrya japonica</i>	B8Y3W6	Dehydrin 2	Total	Rosaceae
<i>Populus canadensis</i>	A7L2U5	Dehydrin	Total	Salicaceae
<i>Populus nigra</i>	A7L2U4	Dehydrin	Total	Salicaceae
<i>Populus trichocarpa</i>	A9PA80	Dehydrin family protein	Total	Salicaceae
<i>Populus glandulosa</i>	A7L2U1	Dehydrin	Total	Salicaceae

<i>Solanum sogarandinum</i>	Q7Y1A0	25 kDa protein dehydrin	Total	Solanaceae
<i>Nicotiana tabacum</i>	Q76MG1	Dehydrin (Fragment)	Parcial	Solanaceae
<i>Capsicum annuum</i>	Q6XLQ1	Dehydrin-like protein	Parcial	Solanaceae
<i>Solanum peruvianum</i>	E5F397	Dehydrin (Fragment)	Parcial	Solanaceae
<i>Solanum chilense</i>	E5F352	Dehydrin (Fragment)	Parcial	Solanaceae
<i>Solanum tuberosum</i>	O04232	Cold-stress inducible protein	Total	Solanaceae
<i>Solanum ochranthum</i>	E5F3B1	Dehydrin (Fragment)	Parcial	Solanaceae
<i>Tamarix hispida</i>	C0KTL3	Dehydrin	Total	Tamaricaceae

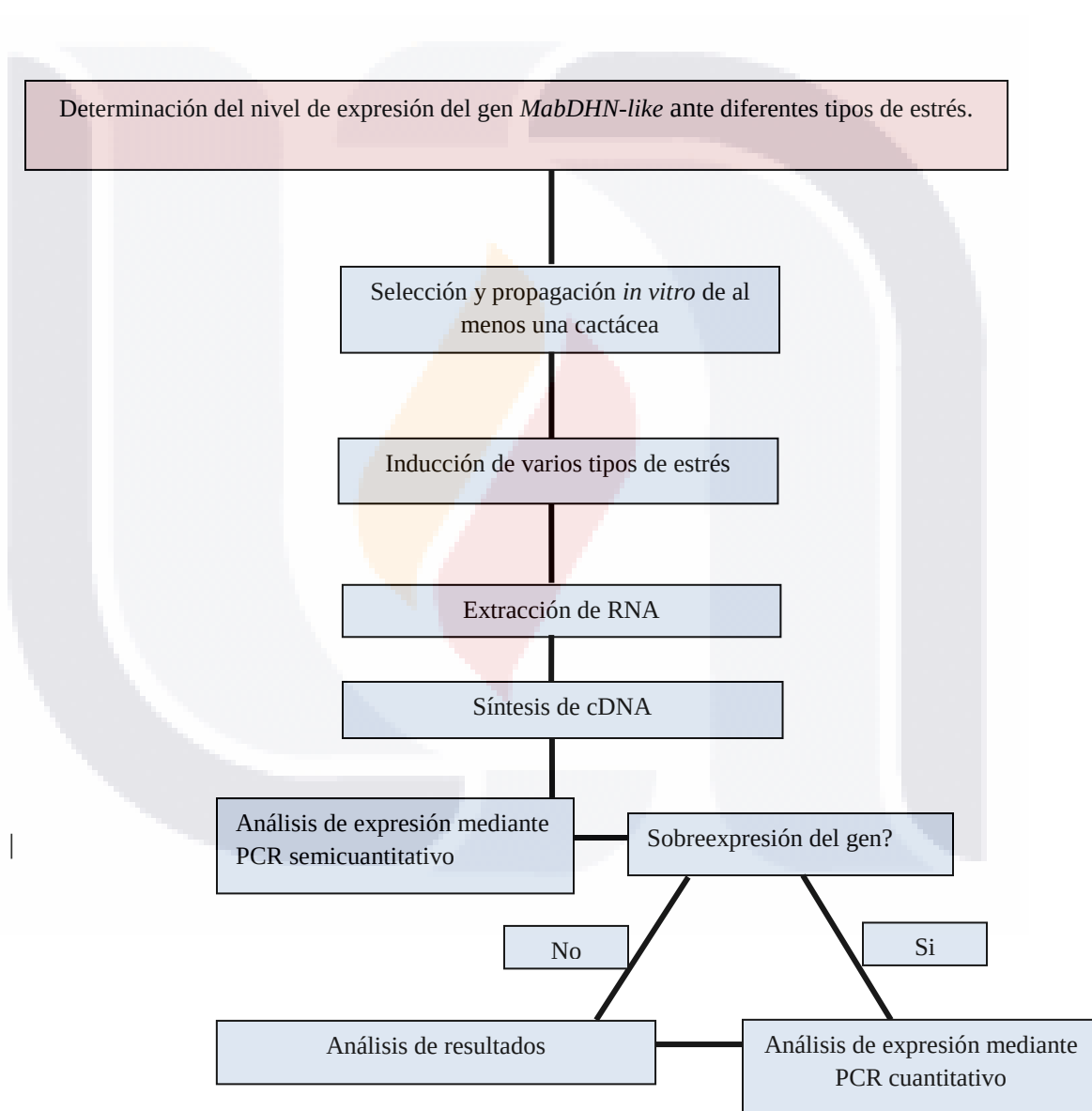
Para la construcción de los árboles filogenéticos se realizó un análisis de Máxima Parsimonia (MP) de las proteínas tipo dehidrina de 21 especies de plantas con el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Los caracteres se manejaron como desordenados y con igual peso, los Gaps fueron tratados como datos faltantes (no informativos). Los árboles del análisis de MP se construyeron en base a una búsqueda heurística usando 1 réplica de adición gradual al azar y el algoritmo de intercambio de ramas fue tipo árbol-bisección-reconexión (TBR). También se analizó el estado de los caracteres, la matriz de distancias, el árbol consenso estricto y el índice de consistencia (CI). Para estimar la solidez de los clados se realizó el análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 100 réplicas formando un árbol por cada paso, usando el algoritmo TBR de intercambio de ramas, colapsando las ramas con una longitud máxima de cero y guardando todos los árboles más cortos (MulTrees). Solo los grupos con una frecuencia de aparición >50% fueron retenidos.

5.2.8 Modelado 3D de los fragmentos de las proteínas putativas OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like.

Se llevó a cabo la predicción de la estructura 3D de los fragmentos de las proteínas putativas de las cactáceas *Opuntia ficus-indica* (OpfiDHN-like), *Leuchtenbergia principis* (LepDHN-like), *Mammillaria bombycina* (MabDHN-like) y de la proteína de referencia *Opuntia sthreptacanta* (OpsDHN-like). La predicción de la estructura 3D y de la estructura secundaria se llevó a cabo en el software Scratch protein predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), el modelado gráfico de la estructura 3D se realizó en el software Chimera 3D 4.3.

5.3 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL GEN *MabDHN-like* ANTE DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS.

5.3.1 Esquema general de procedimientos para determinar el nivel de expresión del gen lea tipo dehidrina (etapa II)



5.4 Inducción de la expresión del gen *MabDHN* por estrés abiótico y ácido abscísico.

Para demostrar la inducción de la expresión del gen *MabDHN* vía ácido abscísico (ABA) se interaccionó *M. bombycina* con diferentes tipos de estrés abiótico, además de con ABA. Para estos experimentos se utilizaron brotes completos de 2 cm de alto aproximadamente por triplicado para cada tratamiento (Anexo E.2).

5.4.1 Inducción de la expresión del gen por frío.

Se interaccionó *M. bombycina* con estrés por frío a diferentes tiempos colocando los brotes en medio MS semisólido a 4°C por 0, 12 y 72 hrs, según la metodología propuesta por Ochoa et al (2012), posteriormente las plantas se colocaron inmediatamente en N₂ líquido para posteriormente realizar la extracción de RNA.

Para inducir un estrés por congelamiento los brotes se colocaron directamente a -20°C por 0, 1, 2 y 4 hrs, posteriormente las plantas se colocaron inmediatamente en N₂ líquido para posteriormente realizar la extracción de RNA.

5.4.2 Inducción de estrés por alta salinidad

Para comprobar si la inducción de la expresión del gen se da cuando la cactácea se encuentra en interacción con un estrés de tipo osmótico, los brotes se colocaron en medio MS líquido + 250 mM de NaCl según Ochoa et al. (2012) por un periodo de 0, 12 y 24 hrs (Shen et al., 2004), posteriormente las plantas se colocaron inmediatamente en N₂ líquido para la posterior extracción de RNA.

5.4.3 Interacción de *M. bombycina* con 0.1 y 100 µM de ABA

Para comprobar si la inducción de la expresión del gen se da por la hormona ABA los brotes completos se sumergieron por 10 seg en una solución de ABA diluido en agua destilada estéril a una concentración de 0.1 µM o 100 µM con el fin de que todo el tallo estuviera en contacto con la hormona de manera exógena, posteriormente los brotes se colocaron en medio MS líquido + 0.1 µM o 100 µM de ABA por un periodo de 0 (control),

1.5, 6 y 12 hrs (Ochoa et al., 2012). Posteriormente las plantas se colocaron en N₂ líquido para la posterior extracción de RNA.

5.5 Inducción de la expresión del gen *MabDHN* por estrés biótico

Con el fin de demostrar la inducción de la expresión del gen *MabDHN* inducido por heridas que en la naturaleza podrían ser provocadas por un depredador, en los experimentos planteados se utilizaron 3 brotes completos (Anexo E.2) de 3 cm de alto aproximadamente por frasco y se interaccionaron con estrés de tipo biótico con tres repeticiones por tratamiento.

5.5.1 Inducción de la expresión del gen por heridas.

Brotes completos de *M. bombycina* de 3 cm de alto aproximadamente se seccionaron transversalmente con la ayuda de un bisturí en fragmentos de 0.5 cm de ancho, cortando previamente la base y el ápice del brote. Se dejaron a temperatura ambiente por un periodo de 10 min o 30 min antes de colocarlos en N₂ líquido para la posterior extracción de RNA. El grupo control consistió en brotes completos sin seccionar.

5.6 Inducción de la expresión del gen *MabDHN* en plantas interaccionadas con Fluridone

Primeramente se llevó a cabo una inducción de la expresión del gen mediante estrés por congelamiento a -20°C por 2 hrs, previa interacción de los brotes con MS líquido + 100 µM de Fluridone (diluido en DMSO) por un periodo de 2 y 4 días, el control negativo consistió en la colocación de los brotes por 4 días en MS líquido + DMSO; se hicieron 3 réplicas por tratamiento. Después del tiempo transcurrido los brotes se colocaron en N₂ líquido para la posterior extracción de RNA.

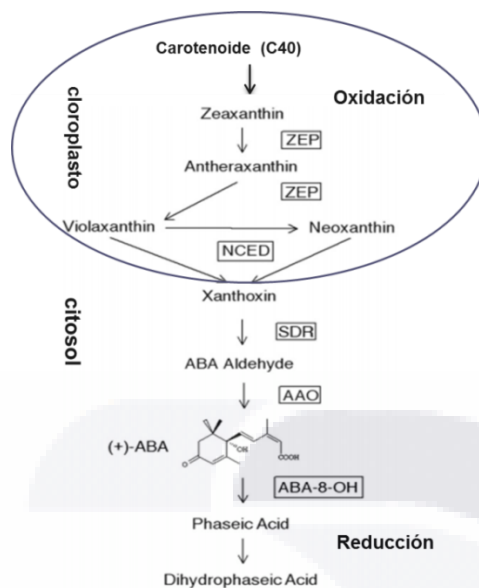


Figura 7-. Biosíntesis y catabolismo del ácido abscísico. ZEP: zeaxantina epoxidasa, NCED: 9-cis-epoxycarotenoid dioxigenasa, SDR: alcohol deshidrogenasa/reductasa, AAO: ABA aldehído oxidase.

Se ha reportado que el Fluridone es un inhibidor de la enzima fitoeno-desaturasa, la cual convierte el fitoeno en carotenoide (Figura 7) el cual es un precursor en la síntesis de ABA (Han et al., 2010).

5.7 Extracción de RNA total de *M. bombycina*

La extracción de RNA total de la cactácea *M. bombycina* se realizó en base al protocolo propuesto por Rajakani et al. (2013) con algunas modificaciones realizadas en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Se pulverizaron 300 mg de tejido fresco previamente congelado con N₂ líquido. La muestra pulverizada se homogenizó con 1 ml de buffer de lisis para extracción de RNA (Anexo B.5) precalentado a 65°C, se agitó vigorosamente por 1 min y se incubó por 15 min a 65°C mezclando cada 2 min. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó una extracción con 1 vol de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1 v/v), se agitó vigorosamente hasta que la mezcla quedó homogénea y se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min; se recuperó la fase acuosa y se realizó una segunda extracción con 1 vol de fenol-

cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) agitando hasta que la mezcla quedó homogénea, se centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min; se recuperó la fase acuosa y se realizó una tercera extracción con 1 vol de cloroformo- alcohol isoamílico (49:1 v/v), se agitó vigorosamente y centrifugó a 12 000 rpm durante 20 min; se recuperó la fase acuosa y el RNA se precipitó con Cloruro de Litio (LiCl) a una concentración final de 3 M, se dejó a 4°C toda la noche. Para recuperar la pastilla se centrifugó a 13 000 rpm por 30 min a 4°C, posteriormente se desechó el sobrenadante, se agregaron 0.5 ml de cloruro de Litio 2 M y se centrifugó 5 min a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y se conservó la pastilla para después resuspenderla con 300 µl de agua desionizada estéril tratada con DEPC y 1/10 de vol de Acetato de sodio 3 M (30 µl) y 2.5 vol de etanol absoluto (750 µl), se mezcló suavemente y se incubó a -70°C por 30 min. Después de pasado el tiempo se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 75% y finalmente se resuspendió en 30 µl de agua desionizada estéril tratada con DEPC. La integridad de la molécula de RNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%; la concentración y pureza se analizó con espectrofotómetro de luz UV a 260 y 280nm con la siguiente fórmula:

$$\text{RNA } \mu\text{g/ml} = (\text{OD } 260 \times \text{Factor de dilución} \times 40 \mu\text{g/ml}) / 1000$$

Para conocer la pureza de la muestra se aplicó la siguiente operación:

$$\text{Pureza} = \text{OD } 260 / \text{OD } 280$$

(Concepción et al., 2005)

El RNA se sometió a un proceso de degradación del DNA remanente con la enzima DNAsa (Promega, No. catálogo: M6101) utilizando 200 ng de RNA; la reacción que se llevó a cabo fue la siguiente:

RNA	200 ng
Buffer	
DNAsa	2 µl

DNAsa	1 μ l
H ₂ O	X μ l
Vol. Total	20 μ l

Se incubó a 37° por 30 min, se colocó 1 μ l de solución Stop y se incubó a 65°C por 10 min. Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de cDNA mediante RT- PCR.

5.8 Síntesis de cDNA

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) es un método altamente sensible y específico, útil para la detección de raros transcritos o para el análisis de muestras disponibles en cantidades limitadas. En esta técnica una hebra de RNA es retrotranscripta en DNA complementario (DNAc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en una PCR de punto final (Marone et al., 2001) o en un qPCR.

Para generar la síntesis de cDNA se utilizó el kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen, No. catálogo: 11146-024) el cual es un kit diseñado para analizar moléculas de RNA en un proceso de 2 pasos. En el primer paso la síntesis del cDNA se preformó con 50ng de RNA poli (A)+ unido al Oligo (dT) el cual es un oligonucleótido con poli (T) que es complementario a la terminación poliadenilada presente en el RNA mensajero de organismos eucariotas y se utiliza como primer universal para la transcripción reversa. El segundo paso consistió de la amplificación del gen de interés ya sea mediante PCR de punto final o qPCR.

5.8.1 PCR semicuantitativo

El PCR de punto final se realizó en las interacciones de Frío a 4°C, NaCl a 250 mM, ABA 0.1 μ M y Fluridone 100 μ M. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos F y R MabDHN (Anexo A.2) para amplificar el transcrito del gen tipo dehidrina y los

oligonucleótidos F y R Actina para amplificar el transcrito del gen de la β -actina como control. La amplificación se llevó a cabo con la mezcla de reacción REDTaq Ready Mix (Invitrogen, No. catálogo R2523-20RXN) donde la mezcla utilizada fue la siguiente: 9.5 μ L de agua, 12.5 μ L de REDTaq Ready Mix, 0.5 μ L de c/ oligonucleótido (0.5 μ M) y 100 ng de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C por 5 min (predesnaturalización), 30 ciclos de 94°C por 30 seg (desnaturalización), 72°C por 30 seg (alineación) y 75°C por 1 min (extensión); por último 1 ciclo de 74°C por 7 min (extensión final). Se utilizó un termociclador Techne TC-312. Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis con gel de agarosa al 1.2%.

El análisis de las imágenes se realizó en el programa ImageJ 1.49v (National Institutes of Health, USA. [<http://imagej.nih.gov/ij/>]) dónde se calculó el número de píxeles para determinar la intensidad de la banda, previamente se llevó a cabo una calibración del número de píxeles de las bandas del gen de actina (control de la cantidad de transcrito) mediante regresión lineal de cada una de las repeticiones.

5.8.2 qPCR

El PCR en tiempo real con cuantificación relativa se realizó en las interacciones de Frío a -20°C, ABA 100 μ M y heridas debido a que éstas interacciones mostraron una sobreexpresión aparente de MabDHN en el análisis por RT-PCR semicuantitativo (PCR punto final). Se utilizaron los oligonucleótidos específicos F y R MabCuant (Anexo A.3) para amplificar el transcrito del gen *MabDHN* y los oligonucleótidos F y R 25S (Anexo A.4) para amplificar el transcrito del 25S ribosomal como control, utilizando para ambos una temperatura de alineamiento de 59°C. El cDNA se ajustó en una alícuota a 100ng/ μ L con NanoDrop ND-1000-UV-Vis-spectofotómetro (NanoDropTechnologies Inc., Wilmington, USA). La amplificación de los transcritos se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción: SYBER Green (Mezcla maestra de RT-PCR, Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) 5.0 μ L, 0.3 μ M de cada oligonucleótido, 10ng de cDNA (conc. final), 3.4 μ L de agua en una reacción con volumen total de 10 μ L.

Las condiciones de amplificación del RT-PCR fueron: 95°C por 20 seg, 40 ciclos de 95°C por 3 seg y 59°C por 30 seg. La curva Melt o de disociación se realizó por 80 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min, 95°C por 30 seg y 60°C por 15seg. La qPCR se realizó en un equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time Version 2.0. Los resultados numéricos de la expresión normalizada se presentan en el anexo D.2.

5.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa STATISTICA 8.0 de Stat Soft. Inc. Se determinó la variabilidad de tres o más grupos mediante ANOVA de un factor, con un análisis pos-hoc con la prueba de Duncan (α 0.05). Los gráficos se realizaron en el programa GraphPad Prism 6.0, graficando la media de las repeticiones + la desviación estándar.

6. RESULTADOS

6.1 Material vegetal seleccionado

Fue posible la extracción de ADN en 28 especies de las 32 analizadas con el método de extracción seleccionado presentando una concentración y pureza suficiente (Tabla 5) para la realización del análisis como PCR; en las especies de la tabla 5 señaladas en amarillo no fue posible la extracción de ADN con el método seleccionado.

Tabla 5. Concentración y pureza del ADN de las cactáceas analizadas.

Especie	µg/µl de ADN	Pureza OD 260/ OD 280
<i>Acharagma aguirreana</i>	0.95	1.89
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	1.03	1.96
<i>Astrophytum capricorne</i>	0.52	1.87
<i>Browningia candelaris</i>	0.98	2.1
<i>Carnegiea gigantea</i>	1.04	1.93
<i>Cephalocereus senilis</i>	-	-
<i>Coryphantha potosiana</i>	-	-
<i>Echinocereus triglochidiatus</i>	-	-
<i>Echinomastus erectocentrus</i>	0.74	1.7
<i>Epithelantha micromeris</i>	0.20	2.3
<i>Escobaria chaffeyi</i> (<i>E. dasyacantha</i> subsp. <i>chaffeyi</i>)	0.19	2.7

<i>Ferocactus peninsulae</i>	1.01	1.7
<i>Frailea asterioides</i>	0.08	1.3
<i>Glandulicactus uncinatus</i>	0.16	2.2
<i>Isolatocereus dumortieri</i> (<i>Stenocereus dumortieri</i>)	0.57	2.1
<i>Leuchtenbergia principis</i>	0.97	1.8
<i>Lophophora williamsii</i> (<i>Lophophora decipiens</i>)	0.51	1.8
<i>Mammillaria bombycina</i>	0.91	1.8
<i>Matucana madisoniorum</i>	0.08	1.37
<i>Melocactus curvispinus</i> var <i>curvispinus</i> (<i>M. oaxacensis</i>)	0.92	2.1
<i>Myrtillocactus geometrizans</i>	1.20	2.0
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	0.26	2.1
<i>Obregonia denegrii</i>	0.30	1.75
<i>Opuntia ficus- indica</i>	0.98	1.8
<i>Pelecophora strobiliformis</i>	0.76	1.9
<i>Peniocereus greggii</i>	-	-
<i>Pereskia sacharosa</i>	0.23	1.7
<i>Pilosocereus chrysacanthus</i>	0.78	1.9
<i>Polaskia chichipe</i>	0.56	2.1
<i>Stenocactus crispatus</i> (<i>S. dichroacanthus</i>)	1.0	1.8

<i>Thelocactus hexaedrophorus</i> var <i>hexaedrophorus</i>	0.19	2.2
<i>Turbincarpus pseudomacrochele</i> var <i>lausseri</i>	1.96	1.9

En as especies marcadas con amarillo no fue posible la extracción de ADN con el método seleccionado.

Se seleccionaron las especies *Opuntia ficus- indica*, *Astrophytum capricorne*, *Leuchtenbergia principis*, *Pereskia sacharosa*, *Mammillaria bombycina*, *Pelecyphora strobiliformis*, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Pilosocereus chrysacanthus*, *Echinomastus erectocentrus* y *Acharagma aguirreana* para realizar el escrutinio de genes *lea* tipo dehidrina.

6.2 Amplificación del gen *lea* tipo dehidrina

La secuencia de los oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar los genes *lea* tipo dehidrina es la siguiente:

FOpsDHN1: 5' GAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC 3'

ROpsDHN1: 5' GAAGGGGGTTGATCACACTCCACA 3'

Las características de los oligonucleótidos sintetizados de acuerdo al programa con el que se diseñaron se muestran en el anexo A.1.

Se amplificó el fragmento de genes *lea* tipo dehidrina con todas las temperaturas de alineamiento probadas con la muestra *Opuntia ficus- indica* establecida como control positivo. En base a los resultados obtenidos en la figura 8 se eligió realizar la amplificación con una temperatura de alineamiento de 59°C ya que hubo una amplificación positiva y es la recomendada por el programa DNASTar 3.0 con el que se diseñaron los oligonucleótidos.

Se observa que conforme va aumentando la temperatura de alineamiento las bandas van disminuyendo de intensidad.

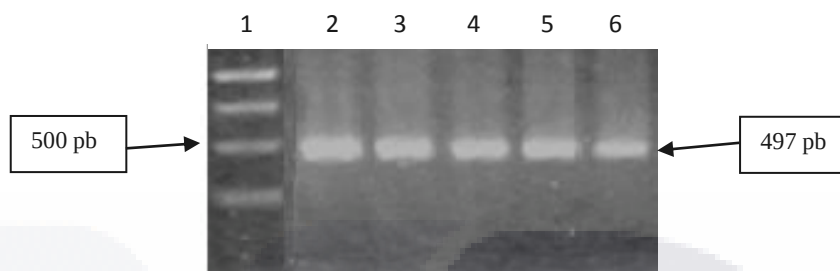


Figura 8. Amplificación del gen *OpsDHN1* a diferentes temperaturas de alineación. Se logró la amplificación de un fragmento de 497pb del gen *OpsDHN1* de *Opuntia ficus-indica* en todas las temperaturas de alineamiento probadas. Carriles: 1- MPM, 2- 55°C, 3- 57°C, 4- 59°C, 5- 61°C, 6- 63°C.

6.3 Escrutinio de genes *lea* tipo dehidrina en diferentes cactáceas.

Se obtuvo una amplificación positiva en 10 de las 11 muestras analizadas encontrando amplificación de fragmentos de distinto peso molecular a las del control (500pb aproximadamente) en algunas cactáceas. En las muestras *Opuntia ficus-indica*, *Astrophytum capricorne*, *Leuchtenbergia principis*, *Pereskia sacharosa* y *Mammillaria bombycina* se presentó un amplificando de 500pb aproximadamente; en *Pelecyphora strobiliformis* y *Ariocarpus kotschoubeyanus* se amplificó un fragmento de 400 pb aproximadamente; en *Pilosocereus chrysacanthus* y *Echinomastus erectocentrus* se obtuvo un fragmento amplificado de 300 pb aproximadamente, y en la muestra *Acharagma aguirreana* se amplificaron 2 bandas con un peso molecular de 480 y 380 pb aproximadamente (figuras 9 y 10).

En la figura 9 se observa la amplificación positiva a con la mezcla RED Taq Ready Mix en las muestras: *O. ficus-indica*, *Leuchtenbergia principis*, *Pilosocereus chrysacanthus*, *Mammillaria bombycina*, *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Acharagma aguirreana*, *Pereskia sacharosa*.

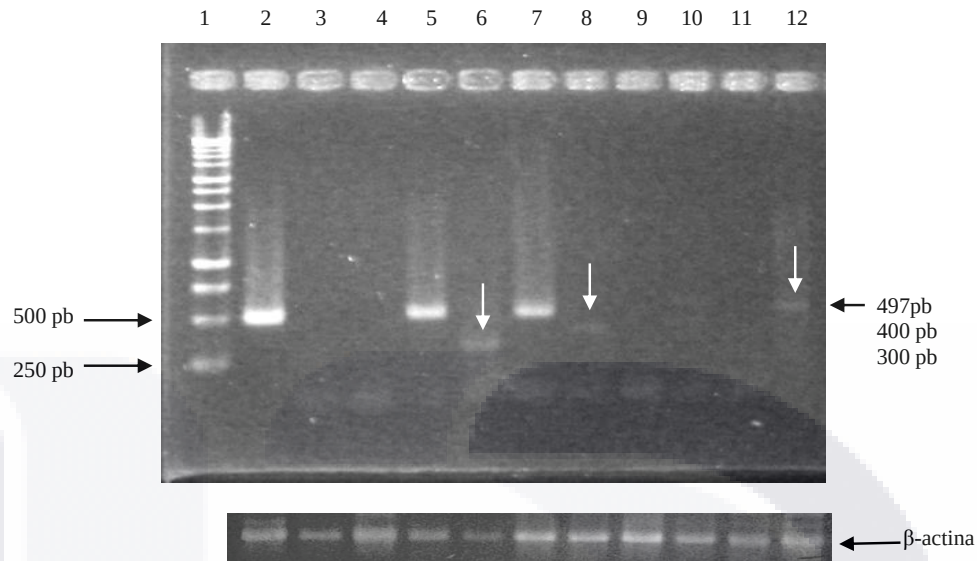


Figura 9. Amplificación del gen *OpsDHN1* en diferentes géneros de cactáceas. Se obtuvo una amplificación positiva en las muestras *O. ficus-indica*, *L. principis*, *P. chrysacanthus*, *M. bombycina*, *A. kotschoubeyanus*, *A. aguirreana*, *P. sacharosa*. Carriles: 1-. MPM, 2-. *O. ficus-indica*, 3-. *C. gigantea*, 4-. *A. capricorne*, 5-. *L. principis*, 6-. *P. chrysacanthus*, 7-. *M. bombycina*, 8-. *A. kotschoubeyanus*, 9-. *P. strobiliformis*, 10-. *A. aguirreana*, 11-. *E. erectocentrus*, 12-. *P. sacharosa*. Como control de amplificación se utilizó el gen de la β -actina.

Para comprobar la presencia de bandas amplificadas con los oligos específicos diseñados en todas las cactáceas se realizó una amplificación de las muestras con la mezcla PyroStart Fast PCR Master Mix en donde se observó una amplificación positiva en muestras en las que no había habido amplificación con la mezcla comercial antes probada; estas muestras fueron la *Astrophytum capricorne*, *Pelecophora strobiliformis* y *Echinomastus erectocentrus* (figura 10), comprobando así la presencia del gen. La cactácea *Carnegiea gigantea* no presentó amplificación con ninguna de las mezclas utilizadas, sin embargo hacen falta más pruebas para determinar la ausencia del gen *OpsDHN1*.

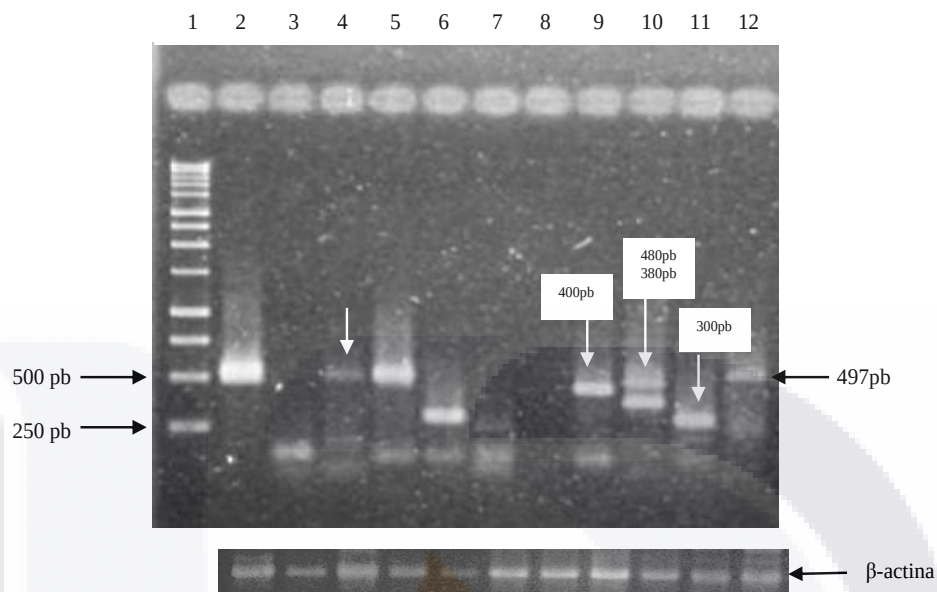


Figura 10. Comprobación de la amplificación del gen *OpsDHN1* en varias cactáceas diferentes. Amplificación positiva en las muestras *O. ficus-indica*, *L. principis*, *P. chrysacanthus*, *M. bombycina*, *A. kotschoubeyanus*, *A. aguirreana*, *P. sacharosa*, *A. capricorne*, *P. strobiliformis* y *E. erectocentrus*. Carriles: 1-. MPM, 2-. *O. ficus-indica*, 3-. *C. gigantea*, 4-. *A. capricorne*, 5-. *L. principis*, 6-. *P. chrysacanthus*, 7-. *M. bombycina*, 8-. *A. kotschoubeyanus*, 9-. *P. strobiliformis*, 10-. *A. aguirreana*, 11-. *E. erectocentrus*, 12-. *P. sacharosa*. Como control de amplificación se utilizó el gen de la β -actina.

El análisis de PCR mostró que genes homólogos al *OpsDHN1* están presentes en distintos géneros de cactáceas. Se obtuvieron patrones de amplificación similares en las muestras *O. ficus indica*, *L. principis* y *M. bombycina* con los oligonucleótidos diseñados como se observa en la figura 11. Las bandas amplificadas se aislaron y purificaron para su posterior secuenciación.

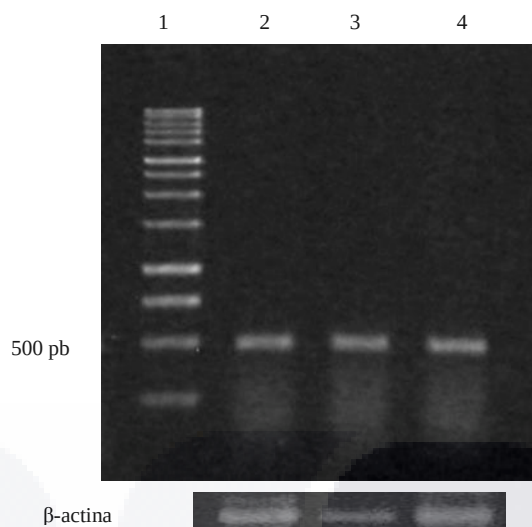


Figura 11. Amplificación por PCR de genes *lea* tipo dehidrina en diferentes cactáceas. Se observa la amplificación de una banda de 500 pb aproximadamente con los oligonucleótidos diseñados. Carriles: 1-. MPM, 2-. *O. ficus indica*, 3- *L. principis*, 4-. *M. bombycina*. Como control de amplificación se utilizó el gen de la β -actina.

6.4 Clonación del fragmento amplificado.

Se clonó el fragmento de aproximadamente 500 pb amplificado por PCR de *O. ficus indica* y de *L. principis* en el vector pGEM-T easy. Lo anterior se comprobó mediante la amplificación del fragmento específico por PCR (figura 12-A) y por restricción del ADN plasmídico con la enzima EcoRI (figura 12-B).

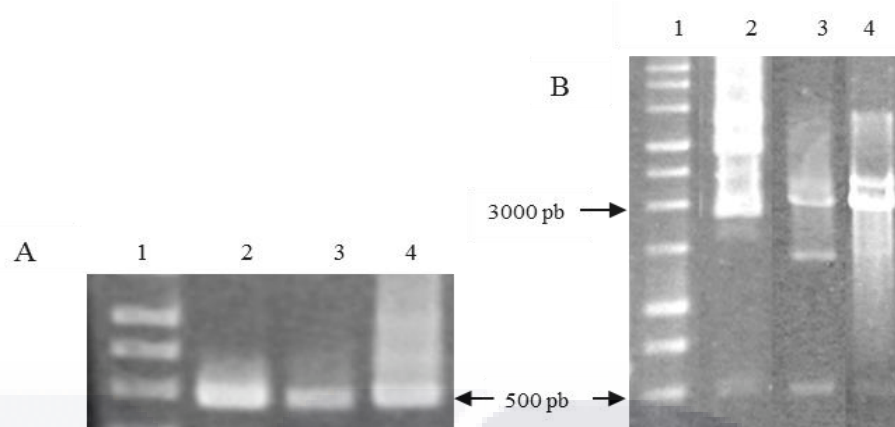


Figura 12. Verificación de la ligación del fragmento del gen lea tipo dehidrina por PCR y restricción. **A:** amplificación positiva por PCR del fragmento del gen *lea* de 500pb a partir de ADN plasmídico; carriles: 1-.MPM; 2- pGEM- *L. principis*; 3-. pGEM- *O. ficus indica*; 4-. pGEM- *M. bombycina*. **B:** Restricción del ADN plasmídico con EcoRI observando la liberación de un fragmento de 500pb correspondiente al gen *lea* ligado al vector; carriles: 1-.MPM; 2- pGEM- *L. principis*; 3-. pGEM- *O. ficus indica*; 4-. pGEM- *M. bombycina*.

6.5 Análisis de secuencias

La secuencias parciales de los nucleótidos de las cactáceas obtenidas por PCR fueron depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para la secuencia de *O. ficus indica* el número de acceso es KP720561 y se le nombró *OpfiDHN-like*, para *L. principis* el número de acceso es KP720562 y se le nombró *LepDHN- like* y para *M. bombycina* el número de acceso es KP720560 y fue nombrada *MabDHN- like*. La comparación de las tres secuencias en nucleótidos y de la traducción virtual con otras secuencias homólogas en la base de datos (alineamiento múltiple de nucleótidos en anexo C.4) mostró que los tres fragmentos tienen una identidad entre el 97 y 98 % con *OpsDHN1* (No. de acceso HM581971.1) (Tabla 6). La traducción virtual de las tres secuencias está dada para *OpfiDHN-like* con 148 aminoácidos (número de acceso en NCBI: AKC92526.1), *LepDHN- like* con 164 aminoácidos (número de acceso en NCBI: AKC92527.1) y *MabDHN- like* con 145 aminoácidos (número de acceso en NCBI: AKC92525.1) (Tabla 6), todos con un MLA (marco de lectura abierto) de +1. El

alineamiento múltiple en aminoácidos mostró la similitud que comparten OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like con OpsDHN1. Esta similitud se presenta principalmente en los segmentos conservados para las dehidrininas como es el segmento K y un segmento rico en histidinas (H) formado por una serie de seis H en OpfiDHN-like y en OpsDHN1; LepDHN-like y MabDHN-like solamente presentan tres H formando este motivo (Figura 13).

Tabla 6. Tamaño de las secuencias parciales de nucleótidos y aminoácidos de las dehidrininas de *O. ficus-indica*, *L. principis* y *M. bombycina*.

Espece	Número de nucleótidos secuenciados y número de accesión	Número de aminoácidos traducidos y número de accesión	Porcentaje de identidad de aminoácidos (%)	Alineamiento de aminoácidos con la proteína OpsDHN1	Expect value
<i>O. ficus-indica</i>	445 (KP720561)	148 (AKC92526.1)	97	81- 228	1e-89
<i>L. principis</i>	493 (KP720562)	164 (AKC92527.1)	96	81- 246	2e-99
<i>M. bombycina</i>	435 (KP720560).	145 (AKC92525.1)	96	99- 245	2e-86

Numero de accesión de las secuencias depositadas en el NCBI

En la búsqueda de motivos conservados en las secuencias de las cactáceas analizadas y en secuencias homólogas de diferentes plantas, se observó que todas presentan al menos 2 motivos o segmentos K; esto se puede apreciar en la Figura 14 donde existe un motivo 1 (verde) con la secuencia PEAAVEHEAEAKEKKGFLDKIKEKLPGYH y como motivo 3 (rojo) con la secuencia YEETEEKKGFLDKIKEKLPGH. También se observa que está presente un motivo 2 (azul) en todas las secuencias completas más no en las parciales (EESGNVESTDRGLFDLFGKKEEEKPQHAH) y se encuentra siempre al principio de la proteína (Figura 14).

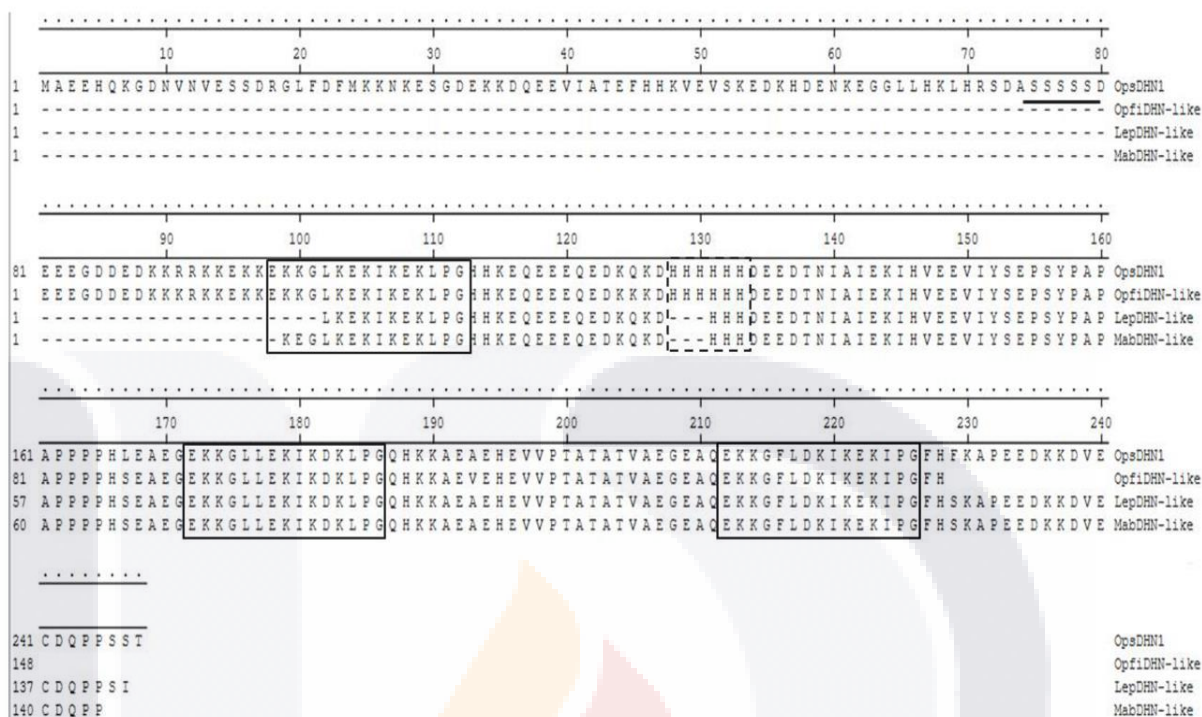


Figura 13-. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de diferentes cactáceas analizadas. Se alinearon la secuencia de la proteína completa tipo dehidrina de *Opuntia streptacantha* (OpsDHN1) y las secuencias parciales de las proteínas de *Opuntia ficus-indica* tipo dehidrina (Opfi-DHN like), *Leuchtenbergia principis* tipo dehidrina (Lep-DHN like) y *Mammillaria bombycina* tipo dehidrina (Mab-DHN like); las secuencias de las cactáceas se compararon con la proteína completa de la dehidrina ERD10 de *Arabidopsis thailiana* (*Arabidopsis* DHN). En el recuadro negro se encuentra resaltado el segmento K; subrayado se encuentra resaltado el segmento S de las dehidrinas, en el recuadro punteado se encuentra resaltado un motivo rico en histidinas (H).

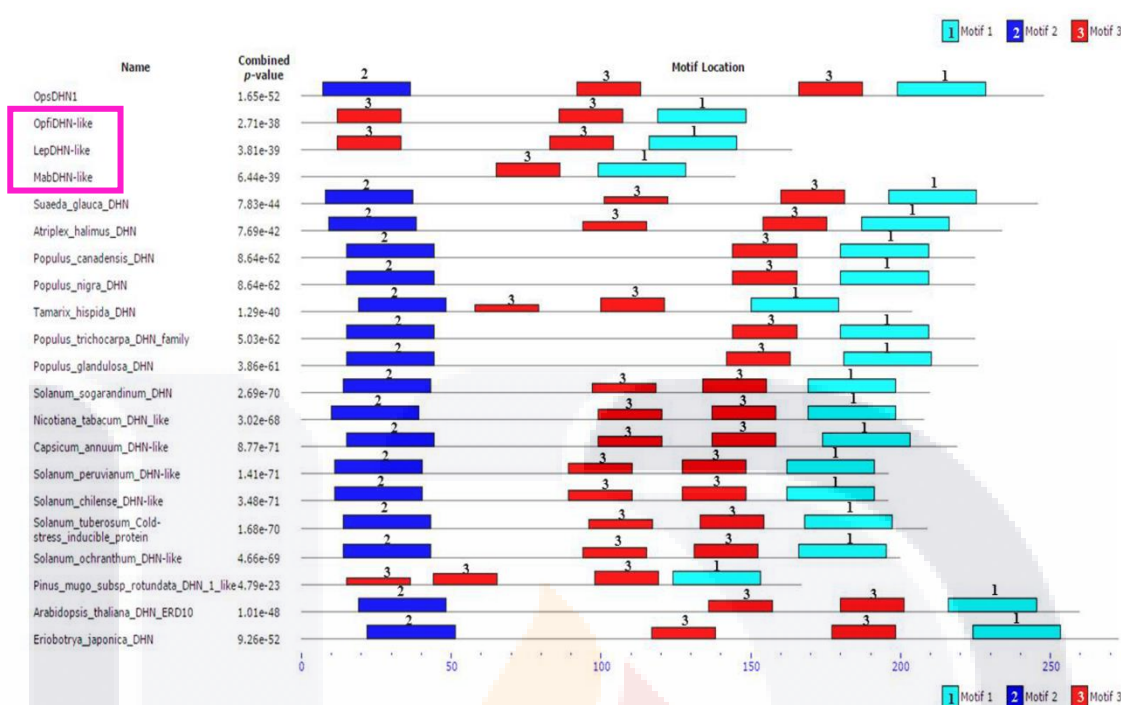


Figura 14-. Análisis de motivos de las proteínas parciales de las cactáceas analizadas y de secuencias homólogas. En la figura se encuentran representados los motivos y su número encontrados en 21 proteínas de diferentes familias de plantas. Los recuadros verdes representan al motivo 1 (PEAAVEHEAEAKEKKGFLDKIKEKLPGYH) los recuadros azules representan al motivo 2 (EESGNVESTDRGLFDFLGKKEEEKPQHAH), los recuadros rojos representan al motivo 3 (YEETEEKKGFLDKIKEKLPQH); las repeticiones de recuadros del mismo color son repeticiones de un mismo motivo en una secuencia dada.

Se obtuvo la representación gráfica de los dominios de las cactáceas en estudio incluyendo la OpsDHN1 como punto de comparación. En la Figura 15 se observa que OpsDHN1 contiene 2 dominios distintos: un dominio Dehydrin 1 que está formado por el motivo S de las dehidrinas conservado y un dominio Dehydrin 2 que está formado por el segmento K conservado. De igual forma se observa que en las secuencias parciales OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like (Figura 15) no presentan el dominio Dehydrin 1 y si tres repeticiones del dominio Dehydrin 2.

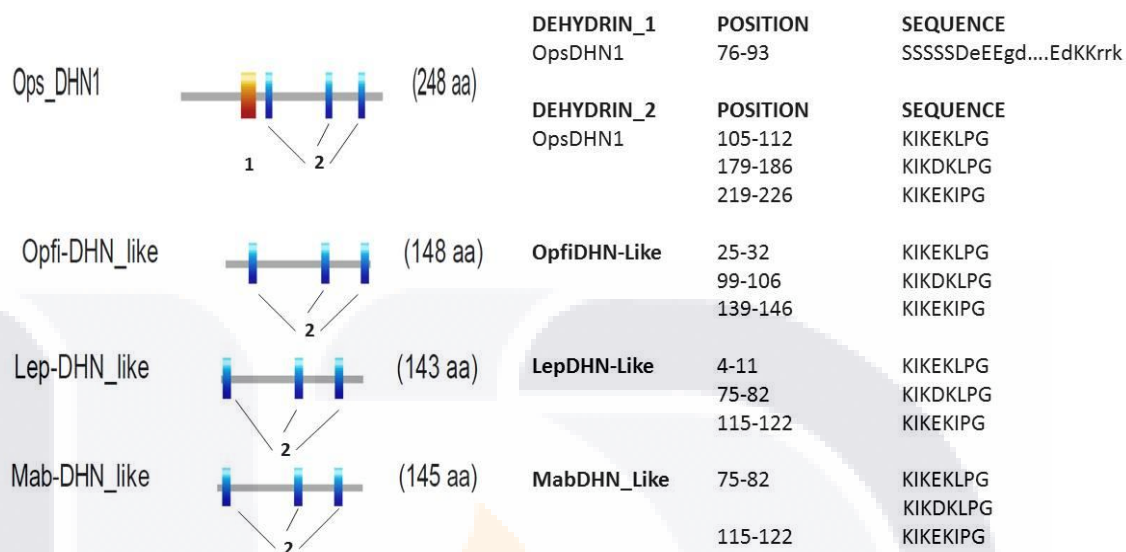


Figura 15. Dominios funcionales de las proteínas tipo dehidrina de diferentes cactáceas. Se observa la representación gráfica de los dominios funcionales de las proteínas tipo dehidrina, así como la posición y descripción de los aminoácidos que lo componen. El dominio Dehydrin 1 representado por el número 1; el dominio Dehydrin 2 representado por el número 2.

Para el estudio de las características de los aminoácidos presentes en las proteínas putativas y de la OpsDHN1 (Tabla 7), se observa que todas tienen un número mayor de aminoácidos ácidos que básicos; de igual forma se puede ver que en el Gran promedio de hidropatía de los aminoácidos (GRAVY) los resultados son negativos, entre -1.331 a -1.624, indicando que las proteínas son altamente hidrofílicas. Lo anterior se confirma con la gráfica de los valores de hidropatía (Figura 16) donde se observa que la mayoría de los aminoácidos caen en una puntuación menor a 0.

Tabla 7. Parámetros de las proteínas tipo dehidrina analizadas.

Parámetros	OpfiDHN-Like	LepDHN-Like	MabDHN-Like	OpsDHN1
aa ¹ totales	148	143	145	248
No. aa ácidos (E ² , D ³)	39	37	37	66
No. aa básicos (K ⁴ , R ⁵)	31	23	24	46
GRAVY ⁶	-1.624	-1.331	-1.37	-1.53
kD	17.02	16.61	16.36	28.6
Isoelectric Point	5.92	5.22	5.23	5.43

aa¹= amino ácidos; E²= ácido glutámico; D³= ácido aspártico; K⁴= lisina; R⁵= arginina; GRAVY⁶= Gran promedio de hidropaticidad. Los parámetros fueron obtenidos con la plataforma ProtParam del servidor ExPASy y con GPMW del servidor AlPhalyse lite, en base a la secuencia de la proteína virtual.

También se realizó el análisis del grado de desordenamiento de las secuencias de aminoácidos, observando que la mayoría de éstos tienen una disposición de desordenamiento por arriba del valor 0.5 (Figura 17).

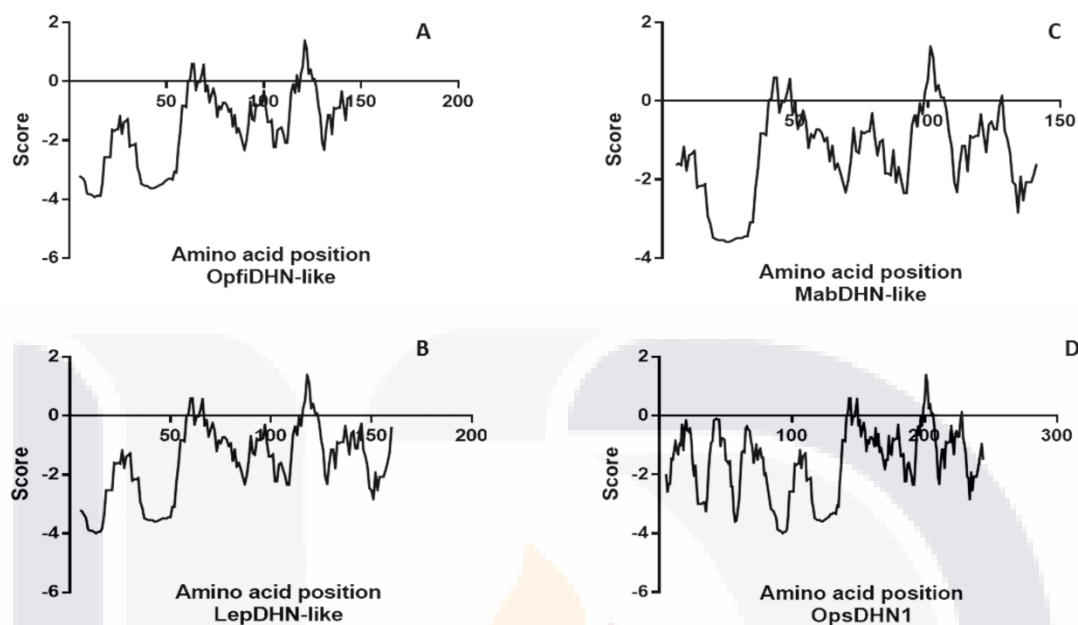


Figura 16. Hidropatía de las proteínas tipo dehidrina. Los valores graficados de las proteínas putativas OpfiDHN-like, LepDHN-like, MabDHN-like y de la proteína de referencia OpsDHN1 se obtuvieron en base a la escala Hphob / Kyte y Doolittle (1982) en la plataforma ProtScale Tool de Expasy. A: Hidropatía de OpfiDHN-like; B: Hidropatía de LepDHN-like; C: Hidropatía de MabDHN-like; D: Hidropatía de OpsDHN1

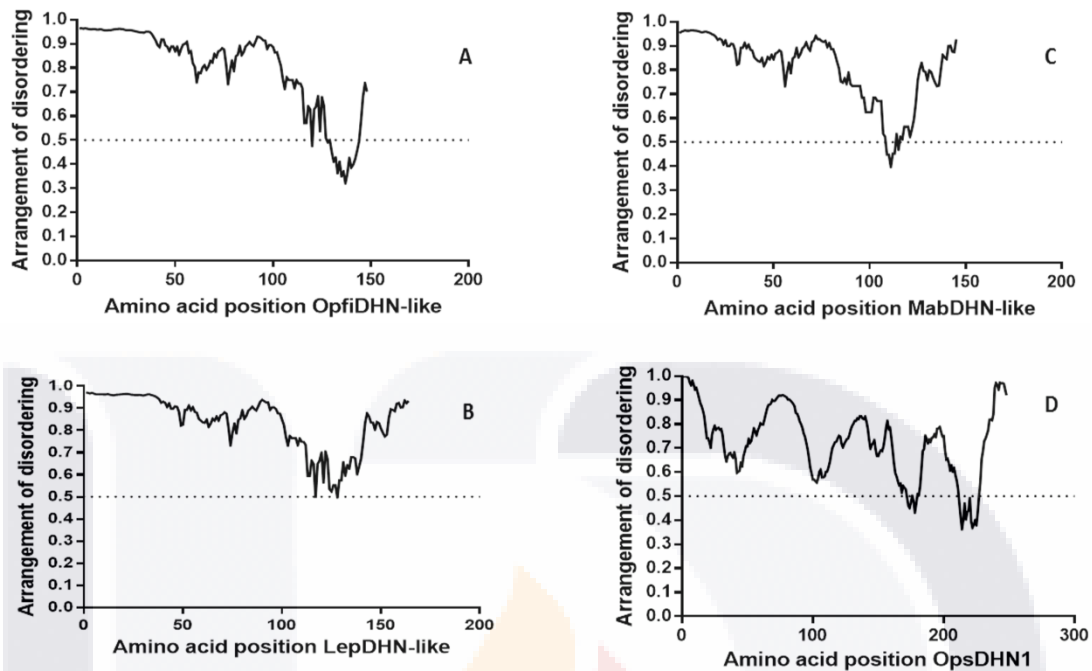


Figura 17. Grado de desordenamiento de las proteínas analizadas. Se realizó el análisis de desordenamiento de las proteínas putativas OpfiDHN-like, LepDHN-like, MabDHN-like y de la proteína de referencia OpsDHN1. El análisis de los parámetros se realizó con la plataforma Disprot (Sickmeier et al., 2006). A: Grado de desordenamiento de OpfiGHN-like; B: Grado de desordenamiento de LepDHN-like; C: Grado de desordenamiento de MabDHN1; D: Grado de desordenamiento de OpsDHN1.

6.6 Modelado 3D de los fragmentos de las proteínas putativas OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like.

Se llevó a cabo una predicción del modelado de los fragmentos de las proteínas putativas de OpfiDHN-like, LepDHN-like, MabDHN-like y de la proteína de referencia OpsDHN-like; en las figura 18, 19, 20 y 21 se presenta la estructura 3D de éstas proteínas putativas.

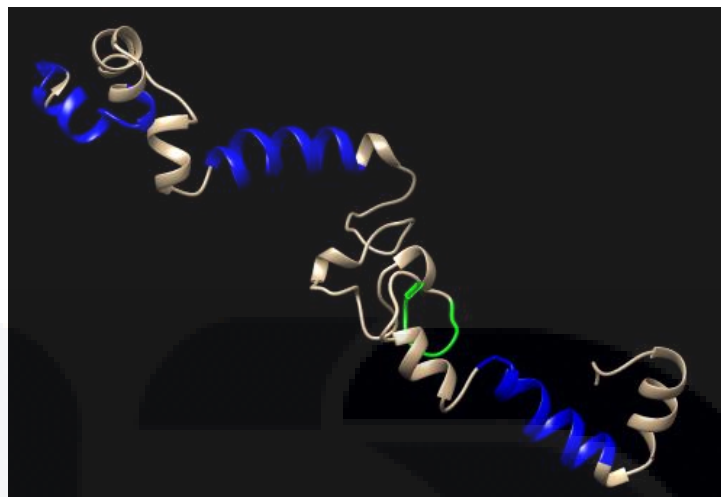


Figura 18. Estructura 3D del fragmento de la proteína OpfiDHN-like. En azul se presenta la sección de la proteína correspondiente al segmento K; en verde la sección correspondiente al segmento rico en histidinas.

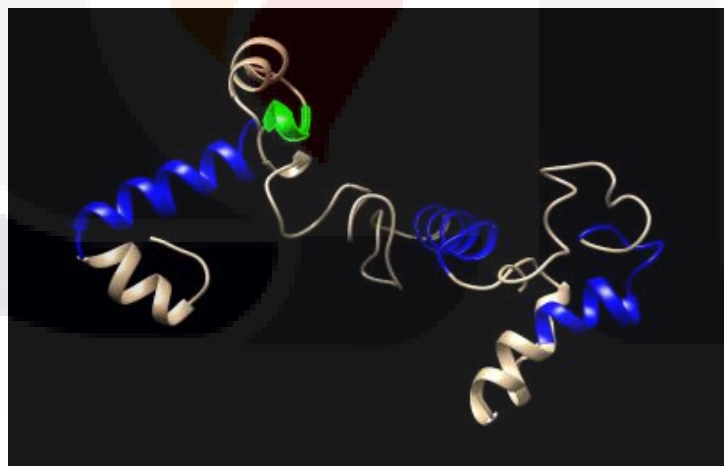


Figura 19. Estructura 3D del fragmento de la proteína LepDHN-like. En azul se presenta la sección de la proteína correspondiente al segmento K; en verde la sección correspondiente al segmento rico en histidinas.

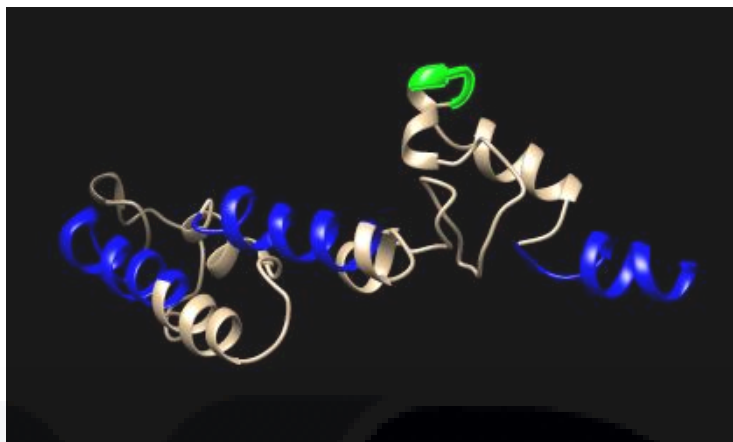


Figura 20. Estructura 3D del fragmento de la proteína MabDHN-like. En azul se presenta la sección de la proteína correspondiente al segmento K; en verde la sección correspondiente al segmento rico en histidinas.

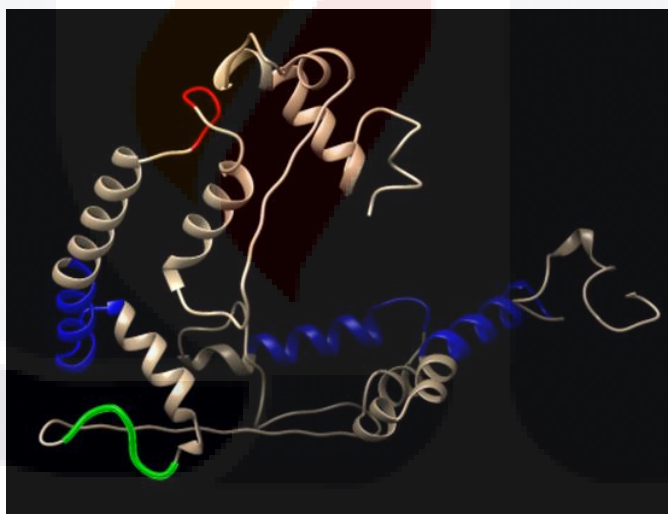


Figura 21. Estructura 3D del fragmento de la proteína OpsDHN1. En azul se presenta la sección de la proteína correspondiente al segmento K; en verde la sección correspondiente al segmento rico en histidinas; en rojo la sección correspondiente al segmento S.

En la Tabla 8 se presenta la predicción de la estructura secundaria de los fragmentos de las proteínas donde se observa que todos los fragmentos tienen al menos una sección de la proteína constituidas por Hojas β plegadas (E); las demás estructuras encontradas en todos los fragmentos son α-Hélices y Giros.

Tabla 8.- Predicción de la estructura secundaria de los fragmentos de las proteínas traducidas de las cactáceas *O. ficus-indica*, *L. principis*, *M. bombycina* y *O. streptacantha*.

Estructura	Secundaria	de	CCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHTTCHHHHHHHHHCTTCCCCCECCCC CTCCCEEEEECCTTCCCEEEEEEEEEEEEEECTTCCCCCCCCCCCCC CCTTHHHHHHHHHHHHHHCTTCCCCHHHHECCCCCCCCCCCCCTTCH HHHHHHHHHHHHHHHCTTCC
Estructura	Secundaria	de	CCCCCCTTSTCCCCHHHHHHHHTTCHHHHHHHHHCTTCCCHHHHHHHHTC HHHHHCTHHCTTCEEEEEEEEEEEEEECTTCCCCCCCCCCCCCTTCT HHHHHHHHHHHHHTCTTCCCCCHHHECCCCCCCCCCCCCTSCCHHHH HHHHHHHHHHCTTCCCCCCHHHCTCEECSSCCCC
Estructura	Secundaria	de	CCCHHHHHHHHHHCTTCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCTTCEEEEEEE EEEEEEEECSCCCCCCCCCCCCCHHTTCHTHHHHHHHHHHTCTTCC CCCHHHHHECCCCCCCCCCCCCTTCHHHHTCHHHHHHHHHCTTCCCT CCTTCCCCEECCSCC
Estructura	Secundaria	de	CCHHHTCEECCCCEEECCCHHHHHHHHHHHHTCCCCCCHHEEEEE HHHTEEEECCCCCCHHHCCCHHHHHHHHHCCCTCCCCCCCCCCCCCT CHHHHHHHHHHCCTTTCHHHHHEHCTTCEEEEEECTHCHHHHHE EEECCCCCCCCCEEEEEEECEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHH HHHHHHHHHHCTTCCCCCTTCCCCCCCCCCCCCCCCCTTCHHHHHHHH HHHHHHHHCTTCCCCCCTHHTTCCCCCSCCCC

Abreviaturas: H= α-Hélice, E= Hoja Beta plegada, T= Giro, S= curva, C= el resto.

6.7 Filogenia de genes *lea* tipo dehidrina de cactáceas

En el análisis filogenético realizado con Máxima Parsimonia (MP) el total de los caracteres del *ingroup* fue de 338, de los cuales 82 caracteres son variables y 159 son parsimoniosamente informativos; la matriz de distancias (proporciones de la divergencia del total de aminoácidos, excluyendo gaps y sitios polimórficos) tuvo una variación desde 0.00444 a 0.76744. La búsqueda heurística identificó 32 árboles más parsimoniosos de 765 pasos (CI= 0.852). El árbol consenso estricto (Figura 22) presenta el clado C formado por 2 subclados con un 91% de soporte de bootstrap (SBP), donde en el primer subclado se encuentran las dehidrinas de la familia Cactaceae con un 100% de SBP; el subclado hermano está formado por la familia Amaranthaceae con un 100% de SBP y por la dehidrina de *Tamarix hispida*. Cercanamente relacionado se encuentra la dehidrina de *Eriobotrya japónica* y el clado B conformado por dehidrinas de la familia Salicaceae con un 100% de SBP.

En la figura 23 se presenta el filograma del árbol 1 de los 32 árboles más parsimoniosos con el número cambios totales por encima de las ramas. Se tiene la formación de los clados A y B, donde las cactáceas se encuentran agrupados en clado B en primero de los dos subclados que lo forman; se observa la agrupación de LepDHN-like y MabDHN-like por un lado y a OpfiDHN-like y OpsDHN1 por el otro, con un número de cambios totales respecto a su ancestro más cercano mucho mayor en estos últimos. Cercanamente relacionadas a las cactáceas se encuentran las dehidrinas de plantas pertenecientes a la familia Amaranthaceae y Tamaricaceae. En el clado A se tienen dos subclados donde se agrupan las dehidrinas de la familia Solanaceae, Salicaceae y Rosaceae.

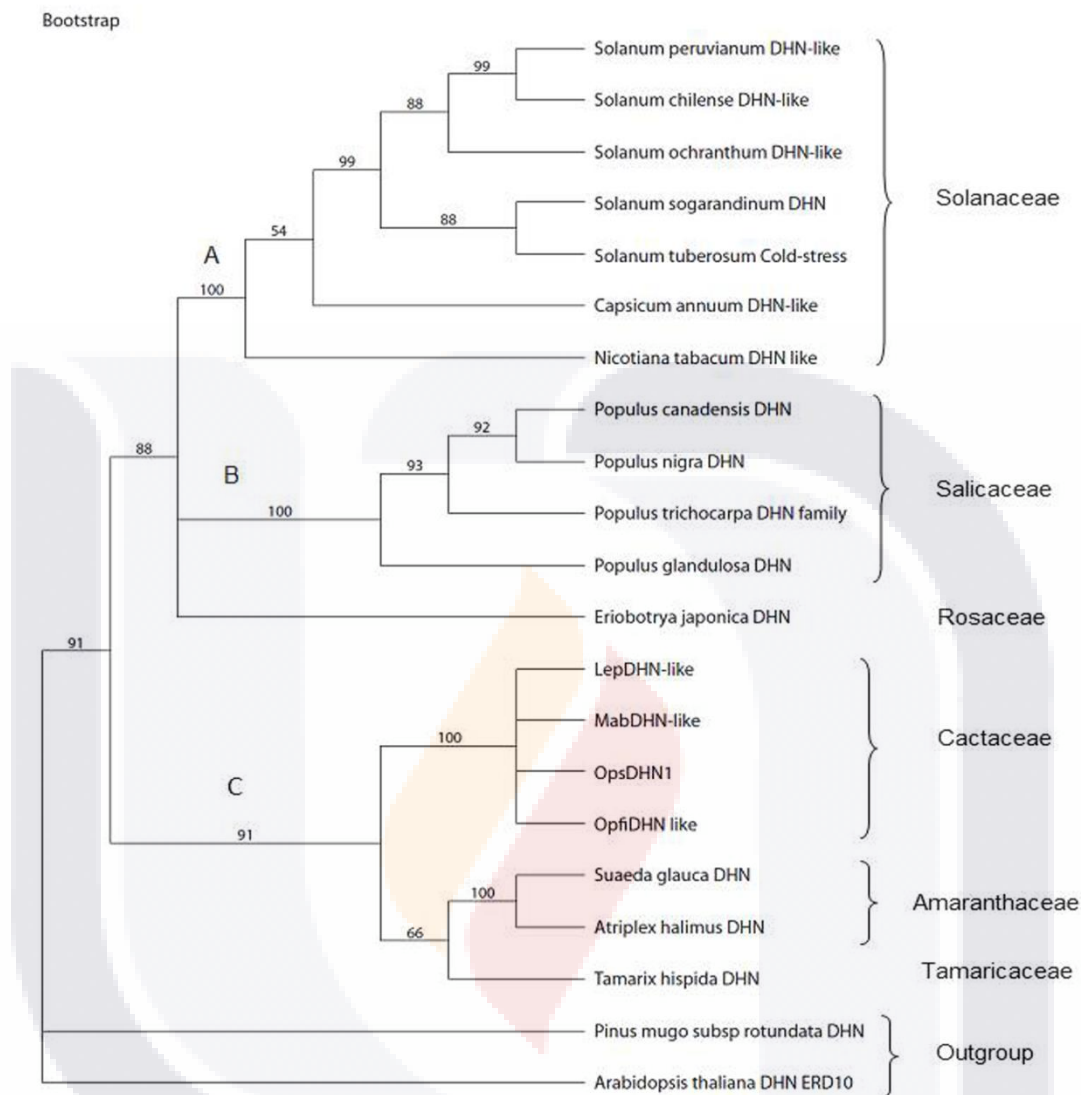


Figura 22. Árbol consenso estricto de 32 árboles igualmente parsimoniosos de 21 proteínas tipo dehidrina incluyendo las cactáceas analizadas. El cladograma se obtuvo con el programa PAUP* versión 4.0b10 con el criterio de parsimonia con el método de búsqueda heurístico utilizando como grupo externo *Arabidopsis thaliana* DHN ERD10. Los valores del Bootstrap están dados en base a los grupos más parsimoniosos retenidos bajo la regla de la mayoría del 50% y los valores se presentan por arriba de las ramas.

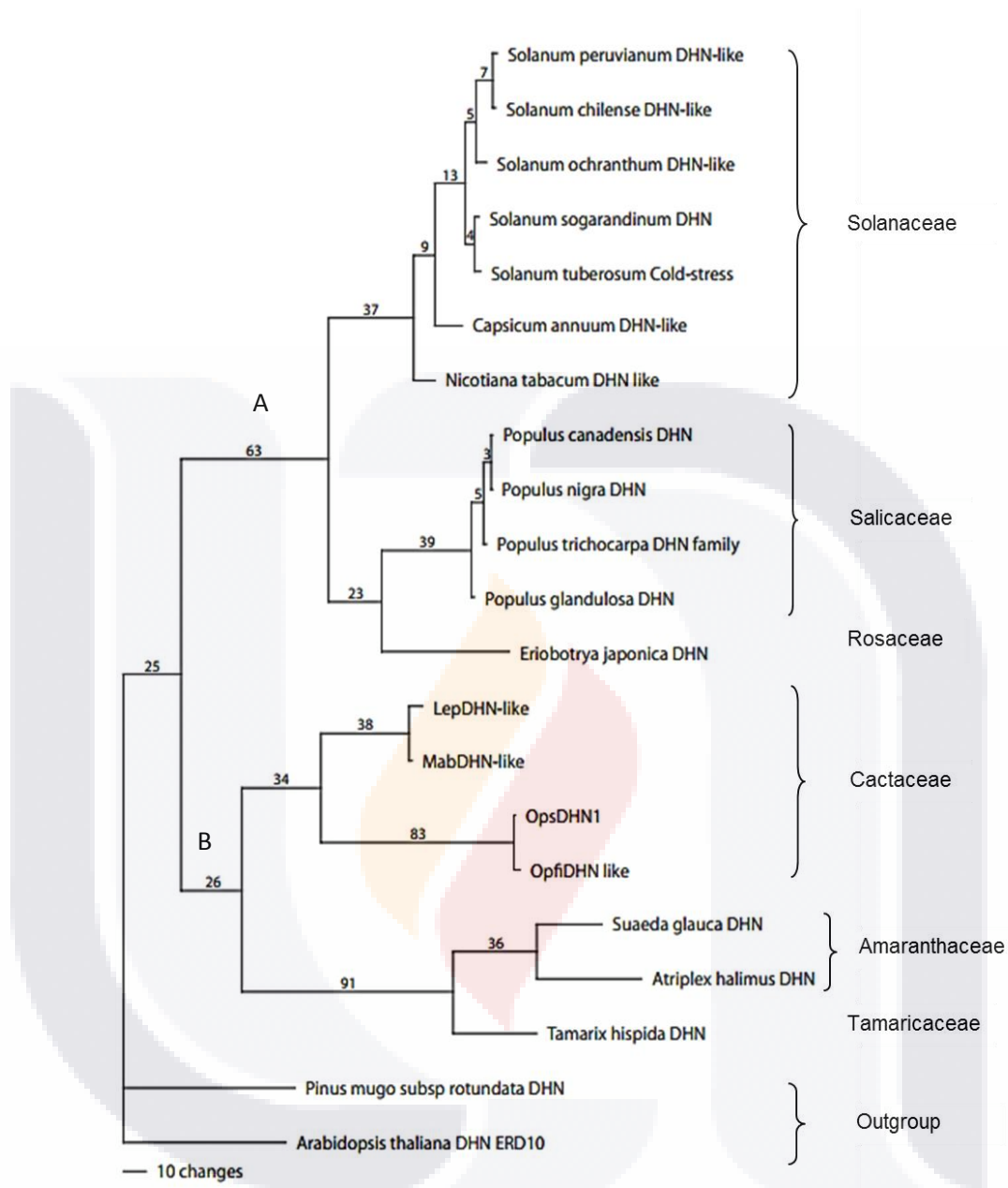


Figura 23. Filograma del árbol 1 de los 32 árboles más parsimoniosos de 21 proteínas tipo dehidrina incluyendo las cactáceas analizadas. El filograma se obtuvo con el programa PAUP* versión 4.0b10 con el criterio de parsimonia con el método de búsqueda heurístico utilizando como grupo externo *Arabidopsis thaliana* DHN ERD10. Se presenta el número de cambios totales sobre cada una de las ramas.

6.8 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL GEN *MabDHN-like* ANTE DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS.

6.8.1 Extracción de RNA total de *M. bombycina*

Se realizó la extracción del RNA total de la cactácea *M. bombycina* observando en la Figura 24 las bandas correspondientes a las subunidades del RNA ribosomal 28S y 18S perfectamente marcadas y en suficiente concentración para la posterior realización de la técnica RT-PCR donde se utilizaron 50 ng de RNA total (concentración final).

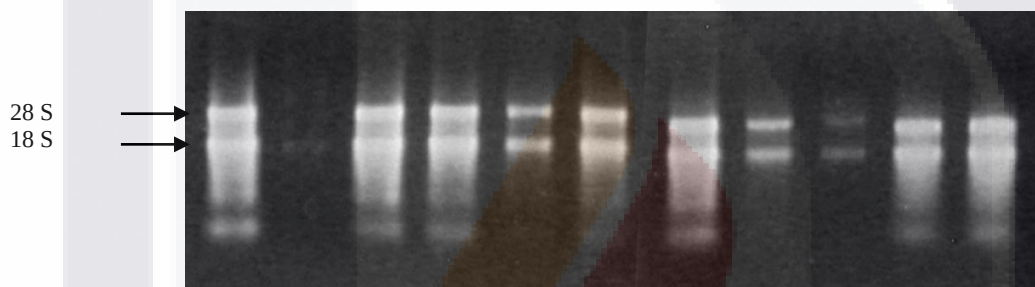


Figura 24.- RNA total de *M. bombycina*. RNA extraído mediante el método de Rajakani et al. (2013) con modificaciones. Se observa la presencia de dos bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNAr. Todos los carriles corresponden a RNA total de *M. bombycina*.

6.8.2 Expresión del gen *MabDHN* ante estrés por frío.

Se determinó el nivel de expresión del gen *MabDHN* interaccionando las plantas de *M. bombycina* con estrés por frío a 4°C a 0 hrs (control), 12 y 72 hr. En la Figura 25 se observa que no hay un claro incremento en la expresión del gen y acuerdo a los resultados estadísticos no se encontraron diferencias significativas en la expresión entre el control y las interacciones (Figura 26).

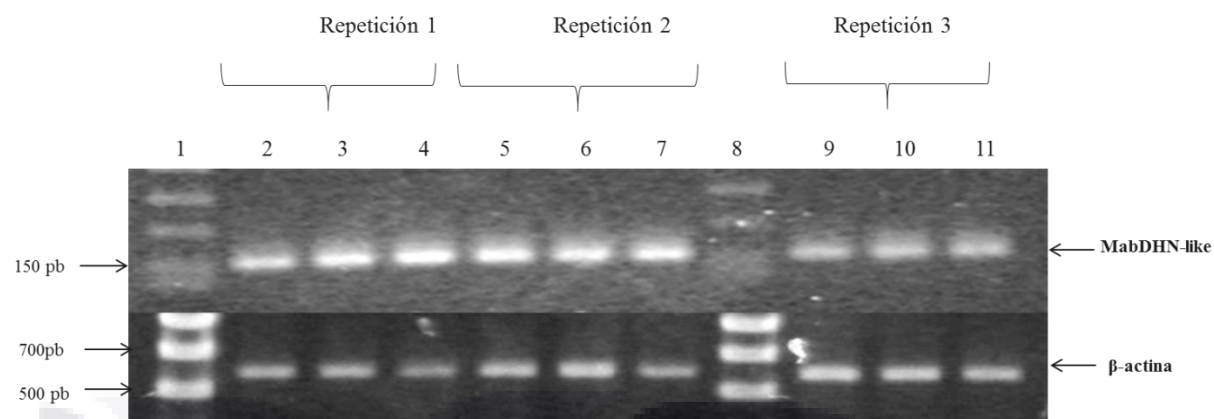


Figura 25. Nivel de expresión del gen *MabDHN* mediante la interacción de *M. bombycina* con estrés por Frío a 4°C. En los carriles superiores se muestra la amplificación del gen MabDHN-like y en los inferiores la amplificación del gen β -actina. La homogenización de la cantidad de transcrito se realizó en base al gen β -actina. Carriles: 1-. MPM, 2-. 0 hrs, 3-. 12 hrs, 4-. 72 hrs (Repetición 1) 5-. 0 hrs, 6-. 12 hrs, 7-. 72 hrs, (Repetición 2), 8-. MPM, 9-. 0 hrs, 10-. 12 hrs, 11-. 72 hrs (Repetición 3).

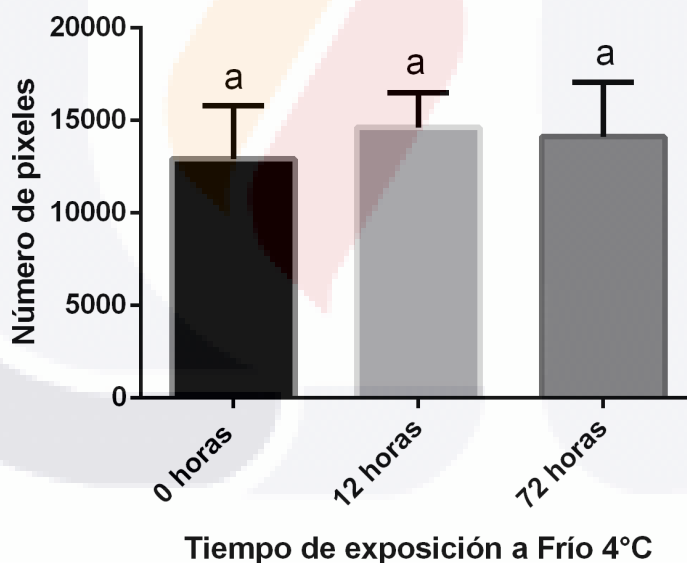


Figura 26. Nivel de expresión del gen *MabDHN* ante estrés por Frío a 4°C a diferentes tiempos. No se observan diferencias significativas en la interacción con Frío a 4°C entre el Control (0hrs) y la interacción de 12hrs y 72hrs en la prueba de comparación de medias con el método de Duncan (α 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas, la barras representan la desviación estándar).

Para observar si la expresión del gen se da con una temperatura de congelamiento en un periodo de tiempo corto, se interaccionaron las plantas con un estrés por congelamiento a -20°C por 1, 2 y 4 hrs analizando la expresión mediante qPCR. En la figura 27 se observa un aumento de la expresión del gen con diferencias significativas respecto al control en la interacción de 2 horas, por lo que se puede decir que la expresión se ve potenciada bajo éstas condiciones; a las 4 horas disminuye la expresión de *MabDHN* de forma similar al control.

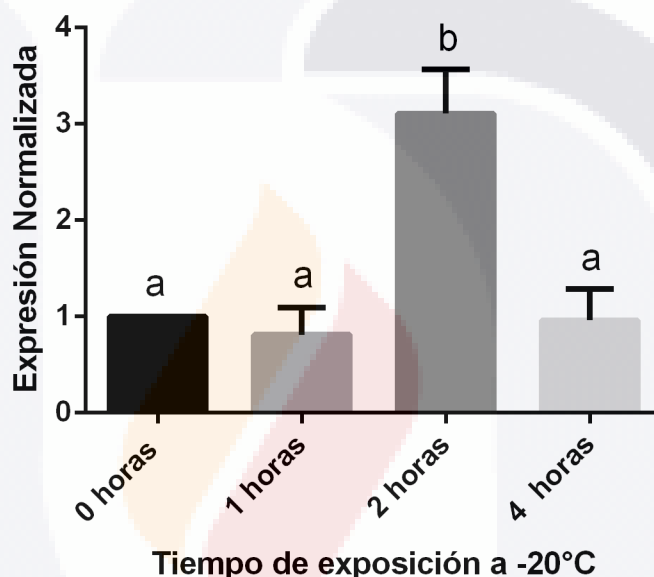


Figura 27. Nivel de expresión del gen *MabDHN* ante frío a -20°C a diferentes tiempos analizado mediante qPCR. Se observan diferencias significativas en la interacción con frío a -20°C entre el Control (0hrs) y la interacción a 2 horas en la prueba de comparación de medias con el método de Duncan (α 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras, las barras representan la desviación estándar).

6.8.3 Expresión del gen *MabDHN* ante estrés por alta salinidad.

En la interacción de *M. bombycina* con una alta concentración de sal (NaCl 250mM) a 0hrs (control), 12hrs y 17días, no se observa un incremento de la expresión del gen en comparación con el control ya que la intensidad de las bandas de la amplificación del gen *MabDHN* son similares (Figura 28). De acuerdo a los resultados estadísticos no se

encontraron diferencias significativas en la expresión del gen entre el control y las interacciones (Figura 29).

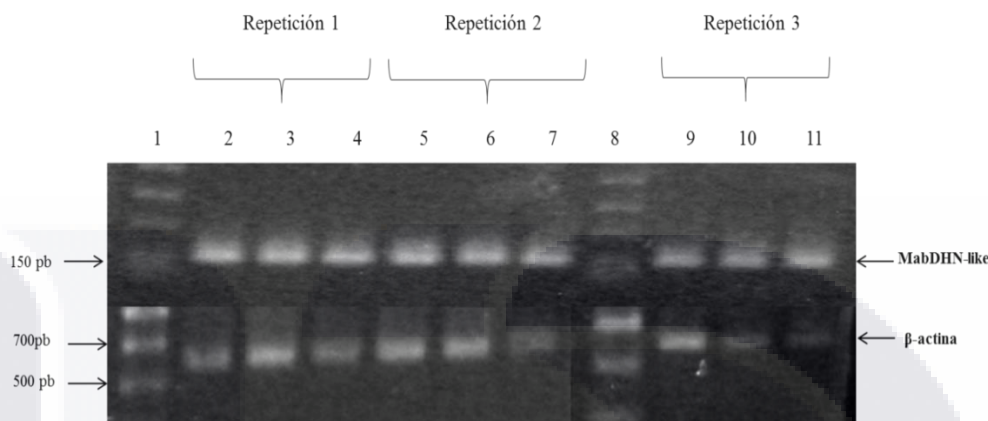


Figura 28. Nivel de expresión del gen *MabDHN* mediante la interacción de *M. bombycina* con estrés por alta salinidad con 250mM de NaCl. En los carriles superiores se muestra la amplificación del gen MabDHN-like y en los inferiores la amplificación del gen β-actina. La homogenización de la cantidad de transcrito se realizó en base al gen β-actina. Carriles: 1-. MPM, 2-. 0hrs, 3-. 12 hrs, 4-. 17 días (Repetición 1) 5-. 0 hrs, 6-. 12 hrs, 7-. 17 días, (Repetición 2), 8-. MPM, 9-. 0 hrs, 10-. 12 hrs, 11-. 17 días (Repetición 3).

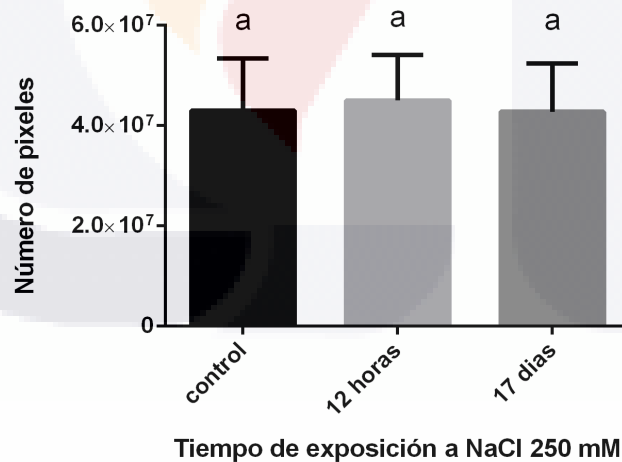


Figura 29. Nivel de expresión del gen *MabDHN* ante estrés osmótico con NaCl 250mM a diferentes tiempos. No se observan diferencias significativas en la interacción con NaCl a 250mM entre el Control (0hrs) y la interacción a las 12hrs y 17 días en la prueba de comparación de medias con el método de Duncan (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras, las barras representan la desviación estándar).

6.8.4 Interacción de *M. bombycina* con ABA.

Para comprobar si la expresión de *MabDHN* es inducida por ácido abscísico (ABA) y a que concentración, se interaccionó *M. bombycina* primeramente 0.1 μM de ABA, observando en la figura 30 que no hay cambio en la expresión del gen *MabDHN* a ningún tiempo a esta concentración. Lo anterior se comprueba con el análisis estadístico del número de pixeles que se muestra en la Figura 31, donde no se observan diferencias significativas en el nivel de expresión del gen.

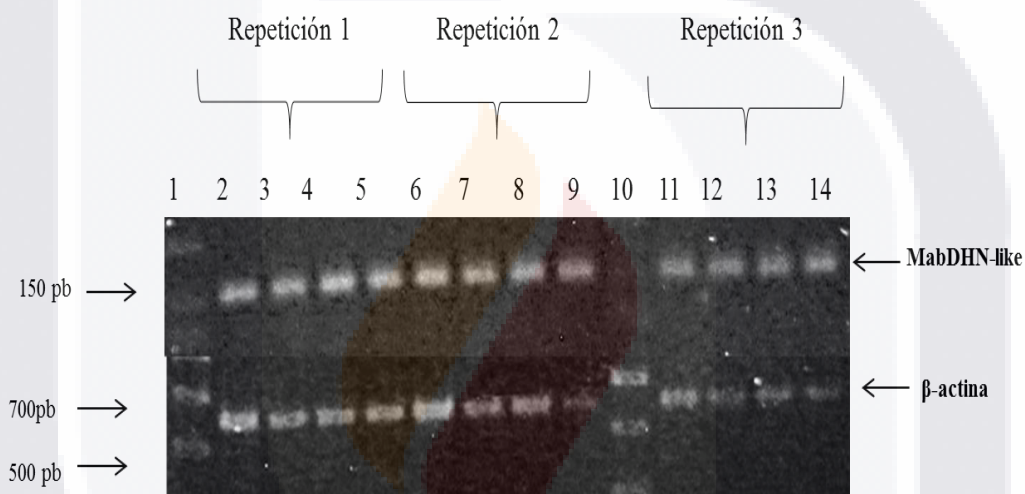


Figura 30. Nivel de expresión del gen *MabDHN* mediante la interacción de *M. bombycina* con 0.1 μM de ácido abscísico a diferentes tiempos. En los carriles superiores se muestra la amplificación del gen *MabDHN-like* y en los inferiores la amplificación del gen β -actina. La homogenización de la cantidad de transcrito se realizó en base al gen β -actina. Carriles: 1-. MPM, 2-. 0 hrs, 3-. 1.5 hrs, 4-. 6 hrs, 5-. 12 hrs, (Repetición 1) 6-. 0 hrs, 7-. 1.5 hrs, 8-. 6 hrs, 9-. 12 hrs. (Repetición 2) 10-. MPM, 11-. 0 hrs, 12-. 1.5 hrs, 13-. 6 hrs, 14-. 12 hrs. (Repetición 3).

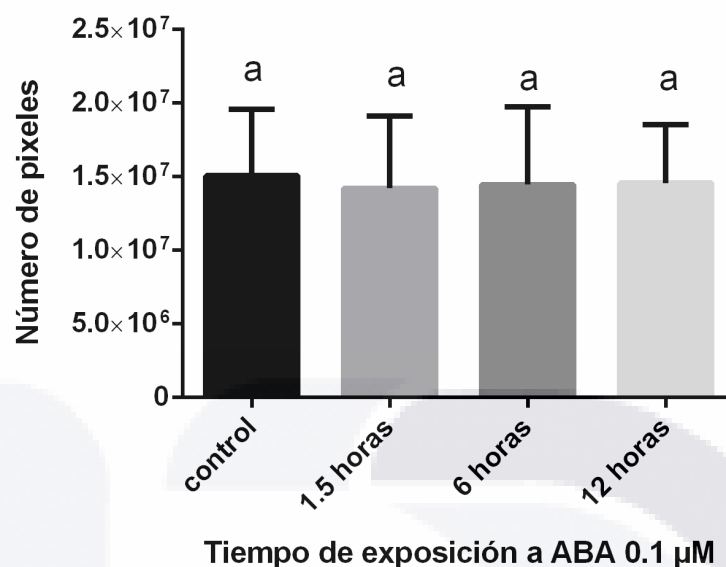


Figura 31. Nivel de expresión del gen *MabDHN* ante ácido abscísico a 0.1 μ M a diferentes tiempos. No se observan diferencias significativas en la interacción con ABA a 0.1 μ M entre el Control (0hrs) y la interacción a las 1.5 hrs, 6 hrs y 12 hrs en la prueba de comparación de medias con el método de Duncan (α 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras, las barras representan la desviación estándar).

Posteriormente se interaccionó *M. bombycina* con 100 μ M de ABA y el análisis mediante qPCR indica que hay un aumento de la expresión del gen de manera significativa en comparación al control ante estas condiciones, siendo más alta en las interacciones de 1.5 y 12 hrs. Lo anterior demuestra que este gen es inducido por ABA.

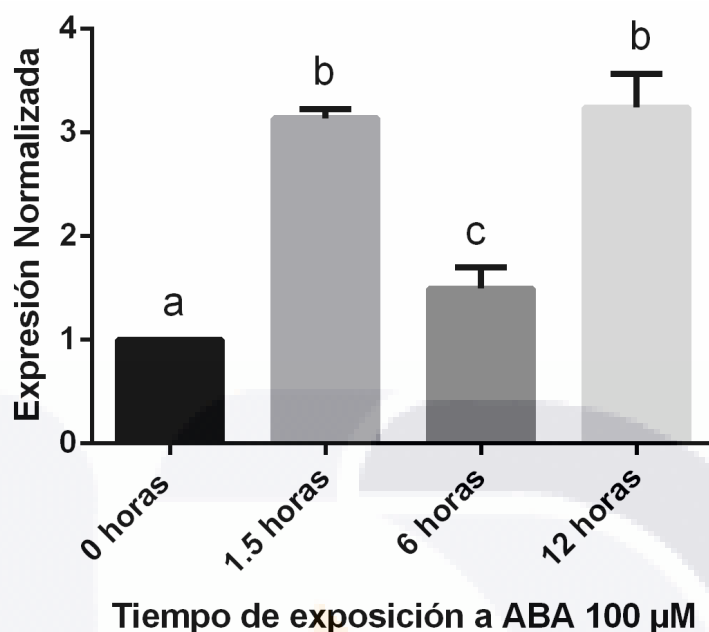


Figura 32. Nivel de expresión del gen MabDHN ante ácido abscísico a 100 μ M a diferentes tiempos analizado mediante qPCR. Se observan diferencias significativas respecto al Control (0hrs) en las interacciones de 1.5 hrs, 6 hrs y 12 hrs en la prueba de comparación de medias con el método de Duncan (α 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras, las barras representan el error estándar).

6.9 Inducción de la expresión del gen *MabDHN* por estrés biótico (heridas).

Por otro lado se determinó mediante qPCR si la expresión del gen *MabDHN* aumenta en tiempos cortos (menos de 1hr) por una interacción de estrés por heridas (estrés biótico). Se observa en la Figura 33 que hay un aumento significativamente mayor en la interacción con heridas a los 10 minutos y vuelve a descender la expresión a los 30 minutos estadísticamente similar al control.

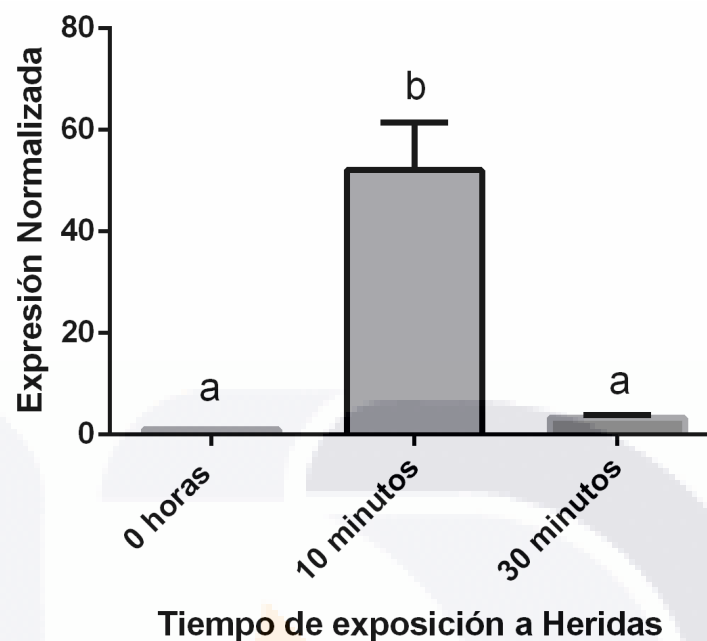


Figura 33. Nivel de expresión del gen *MabDHN* ante estrés por heridas a diferentes tiempos analizada mediante qPCR. Se observan diferencias significativas con el Control (0hrs) en la interacción a 10 minutos en la prueba de comparación de medias con el método de Duncan (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras, las barras representan la desviación estándar).

6.9.1 Inducción de la expresión del gen en plantas interaccionadas con Fluridone

Los resultados obtenidos revelan que hay una disminución significativa (Figura 34) de la cantidad de transcrito del gen *MabDHN*- like en las plantas interactuadas con 100 μ M de Fluridone por un lapso de 4 días e interactuadas con estrés por congelamiento con respecto al control, lo que indica un probable disminución de la fitohormona ABA. En la interacción de *M. bombycina* con Fluridone por 2 días + 2hrs a -20°C (Figura 35) hay un aumento de la expresión del gen (con una significancia de 0.05) ante el estrés por congelamiento lo que indica que el Fluridone en este lapso de tiempo aún no es capaz de disminuir la biosíntesis de ABA.

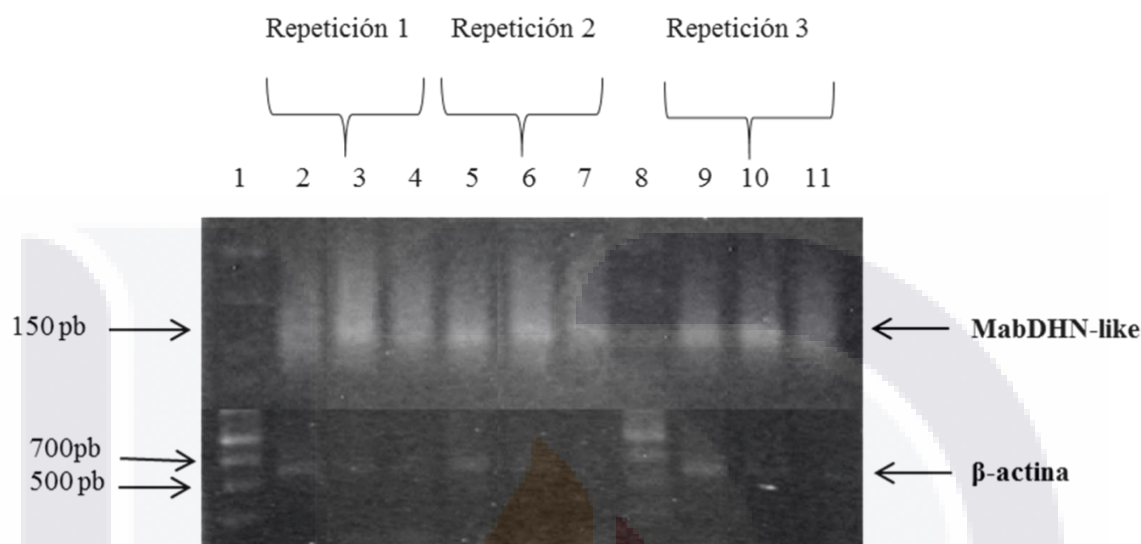


Figura 34. Nivel de expresión del gen MabDHN mediante la interacción de *M. bombycina* con estrés por congelamiento previa exposición con Fluridone 100μM. En los carriles superiores se muestra la amplificación del gen MabDHN-like y en los inferiores la amplificación del gen β-actina. La calibración de la cantidad de transcrito se realizó en base al gen β-actina. Carriles: 1-. MPM, 2-. Control (MS+DMSO) a T.A., 3-. Fluridone 100μM de Fluridone por 2 días+ 2hr a -20°C, 4-. MS+ Fluridone 100μM por 4 días + 2 hrs a -20°C (Repetición 1), 5-. Control (MS+DMSO) a T.A., 6-. MS+ Fluridone 100μM por 2 días + 2 hrs a -20°C, 7-. MS+ Fluridone 100μM por 4 días + 2 hrs a -20°C, (Repetición 2), 8-. MPM, 9-. Control (MS+DMSO) a T.A., 10-. MS+ Fluridone 100μM por 2 días + 2 hrs a -20°C, 11-. MS+ Fluridone 100μM por 4 días + 2 hrs a -20°C (Repetición 3).

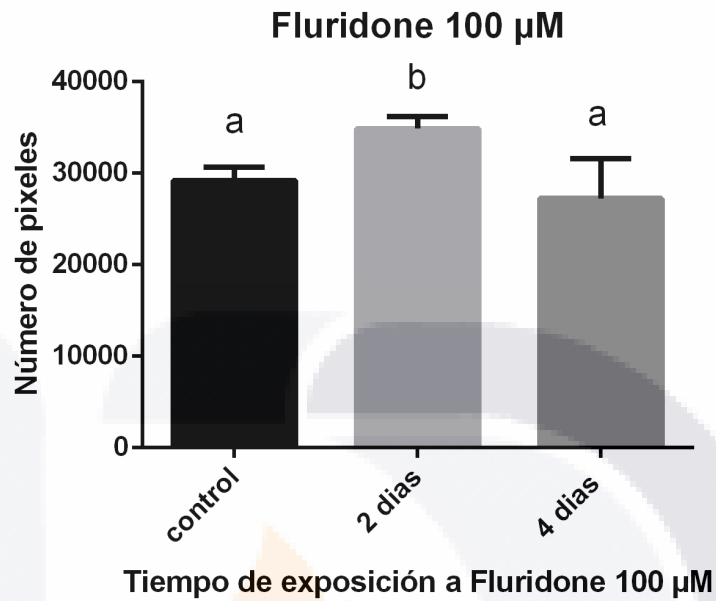


Figura 35. Nivel de expresión del gen MabDHN ante Fluridone 100 µM a diferentes tiempos. Se observan diferencias significativas entre el Control (0hrs) y entre la interacción a los 2 y a los 4 días en la prueba de comparación de medias con el método de Duncan (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras, las barras representan la desviación estándar).

7. DISCUSIONES

Las dehidrinas (proteínas abundantes de la embriogénesis tardía del grupo 2) se encuentran frecuentemente expresadas durante la embriogénesis tardía del desarrollo de las semillas, otorgándoles la habilidad de ser tolerantes a la desecación; también se ha demostrado que las dehidrinas se acumulan significativamente en tejidos vegetativos con restricción de agua jugando un rol importante en la tolerancia de las plantas a deshidratación mediante una ruta ABA-dependiente (Qin y Qin, 2016). Las cactáceas son plantas altamente resistentes a la deshidratación causada por distintos factores abióticos como es sequía y frío, y se sabe que las proteínas tipo dehidrina tienen un papel importante en esta tolerancia (Gorelick et al., 2015).

En este trabajo se caracterizaron segmentos de proteínas tipo dehidrina en cactáceas de diferentes subfamilias. Para poder lograrlo primeramente se extrajo ADN de 32 especies de cactáceas con el fin de probar la eficacia del método utilizado (Hernández-Camacho et al., 2017 en prensa) obteniendo ADN de buena calidad en solamente 28 de ellas (Tabla 5); de estas especies se seleccionaron 10 para realizar el escrutinio del gen tipo *lea* mediante PCR utilizando distintas polimerasas (Polimerasa Fast y Taq Polimerasa) con distinta sensibilidad para amplificar muestras con un bajo número de copias de fragmento específico. Se encontraron bandas de entre 300 y 500 pb en 9 de las 10 cactáceas analizadas (Figuras 8, 9 y 10), indicando que genes similares al OpsDHN1 se encuentran presentes en diferentes géneros de plantas ya que los oligonucleótidos utilizados son específicos para genes tipo dehidrina. Las cactáceas pertenecientes a las subfamilias Pereskioideae (*Pereskia sacharosa*) y Opuntioideae (*O. ficus-indica*) presentan una banda amplificada de 500 pb aproximadamente (Figuras 9 y 10). En cactáceas de la subfamilia Cactoideae se tienen bandas amplificadas de 500 pb en *A. capricorne*, *L. principis* y *M. bombycina* solamente (Figuras 9 y 10), las cactáceas restantes de este subfamilia tienen otros patrones de amplificación. La subfamilia Cactoideae agrupa el mayor número de especies y de diversidad en formas de crecimiento y por lo tanto esta diversificación conlleva también cambios en su genoma y por lo tanto en su proteoma para poder hacer frente a los diversos

ambientes (Edwards et al., 2005) lo que puede explicar estos distintos patrones de amplificación con los mismos oligonucleótidos.

En el presente estudio se describieron por primera vez genes tipo dehidrina en *O. ficus indica*, *M. bombycina* y *L. principis*; la primera cactácea tiene importancia agronómica (CONABIO, 2008) y las últimas cactáceas, aunque pertenecen a la misma subfamilia (Cactoidea) tienen una gran diferencia de formas entre ellas (Anexo E.1) y tienen importancia ornamental (CONABIO, 2008). En la búsqueda de secuencias homólogas mediante un análisis de BLAST en la plataforma de NCBI, se encontró que los fragmentos de *O. ficus indica* (OpfiDHN-like), *M. bombycina* (MabDHN- like) y *L. principis* (LepDHN- like) (Figura 11) comparten una identidad de entre el 96 y 97% con la dehidrina 1 de *Opuntia streptacantha* (OpsDHN1) (Tabla 6) que tiene una secuencia completa de cDNA (accesión de NCBI no. HO058650) de 905 pb incluyendo 76 pb de la región UTR-5' y 82 pb de la región UTR-3', el fragmento genómico de éste gen tiene 1,139 pb de longitud incluyendo parte de las regiones 5', así como la región codificante entera, la cual está interrumpida por la inserción de un intrón de 234pb dentro de la secuencia que codifica el segmento S (Ochoa-Alfaro et al., 2012); el gen OpsDHN1 fue utilizado como gen de referencia. Mediante los resultados de identidad antes mencionados se confirma que los fragmentos amplificados corresponden a secuencias de genes LEA 2, y que los oligonucleótidos diseñados son efectivos para la amplificación de genes homólogos en diferentes géneros de cactáceas (Figura11).

El alineamiento múltiple de la secuencia de OpfiDHN-like, MabDHN- like y LepDHN-like con OpsDHN1 (Figura 13) evidencia la presencia de tres repeticiones del segmento K, similar a lo encontrado por Sun et al. (2013) quien realizó una comparación de la secuencia de aminoácidos de AmDHN de *Ammopiptanthus mongolicus* con otras dehidrinas reportadas en la base de datos NCBI y encontró una secuencia conservada EKKGIMNKIKEKLPG correspondiente al motivo o segmento K similar al encontrado en nuestras secuencias (Figura 13). Este segmento es extremadamente importante cuando las proteínas están expuestas a un ambiente de deshidratación ya que pueden formar una α -hélice anfipática que permite su unión con otras proteínas parcialmente desnaturalizadas

(Qiu et al., 2014). Por otro lado, en los aminoácidos putativos OpfiDHN-like, MabDHN-like y LepDHN-like se identificó un motivo rico en histidinas (H) que ha sido encontrado también en dehidrinas de otras especies de plantas como *Saussurea involucrata* (Qiu et al., 2014), *Ricinus communis* (Krüger et al., 2002), *Opuntia streptacantha* (Hernández-Sánchez et al., 2015), *Sorghum bicolor* (Halder et al., 2015) e híbridos de *Triticum aestivum* L. x *Thinopyrum ponticum* (Qin y Qin, 2016). Según algunos autores (Hara et al., 2005; Qin y Qin, 2016) este segmento-H ha demostrado unirse con iones metálicos y según Hara et al. (2005) dos H juntas en su secuencia contribuye con una unión más fuerte con los iones metálicos que las proteínas que tienen separadas estas H en el mismo dominio; así mismo otros autores (Halder et al., 2015; Hara et al., 2016) han reportado que este segmento rico en H puede ayudar a recobrar la actividad de ciertas proteínas como la LDH desnaturalizada por metales, por lo que esta acción puede ayudar a prevenir un daño fisiológico en las plantas ante estrés por metales pesados. Nuestros resultados demuestran que la traducción virtual de OpfiDHN-like, MabDHN-like y LepDHN-like tienen de 3 a 6 H juntas (Figura 13), sugiriendo que pueden jugar un rol importante ante la protección contra altas concentraciones de iones metálicos o incluso en la estabilización de estos iones, sin embargo se necesitan estudios bioquímicos para confirmar esta hipótesis. Hernández-Sánchez et al. (2015) demostraron que la delección de regiones que contienen el motivo rico en histidinas y serinas en la proteína OpsDHN1 afecta su localización nuclear; el motivo rico en histidinas de OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like tal vez está involucrado en la misma función ya que son proteínas muy similares a la OpsDHN1.

El análisis de motivos conservados (Figura 14) identificó al menos dos repeticiones del segmento K (representados como motivo 1 y 3) en los fragmentos putativos de nuestras cactáceas y en todas las secuencias de dehidrinas homólogas (Tabla 4) y que ha sido encontrado también en *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium* sp, y *Pisum sativum* mediante alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos (Robertson and Chandler, 1992). También en éste análisis se reveló la presencia de un motivo rico en K y E (representado como motivo 2) en la mayoría de las proteínas homólogas, lo que le permite a las dehidrinas interactuar con moléculas de DNA (Tunnacliffe and Wise, 2007). Un motivo

similar ha sido reportado recientemente en la proteína ShDHN de *Solanum habrochaites* (Liu et al., 2015), sin embargo en OpfiDHN-like, LepDHN-like y MabDHN-like no se observa el motivo 2 así como tampoco el segmento S, posiblemente porque son secuencias parciales, y ya que son similares a OpsDHN1 entre un 96 y 97% en su secuencia peptídica (Tabla 6) es muy probable que estos motivos se encuentren ausentes porque no se tiene la secuencia completa.

En el análisis de dominios funcionales (Figura 15) los fragmentos de nuestras proteínas mostraron tener tres repeticiones del dominio Dhydrin 2 que se encuentra formado por el segmento K de las dehidrinas; este dominio también ha sido nombrado dominio K en otras dehidrinas y se ha encontrado que es similar al dominio de unión a lípidos de las proteínas (Ismail et al., 1999; Bravo et al., 1999). Estos dominios Dhydrin 2 los podemos observar en las estructuras 3D de los fragmentos OpfiDHN-like (Figura 18), LepDHN-like (Figura 19) y MabDHN-like (Figura 20) señalados como segmentos K.

La escala de hidropatía propuesta por Kyte y Doolittle (1982) ha sido usada por muchas plataformas bioinformáticas para determinar el gráfico de la carga hidropática (C-H) de las secuencias de aminoácidos. Este simple gráfico C-H separa en gran medida a las Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs) de las proteínas estructuradas (Huang et al., 2014). La figura 16 muestra que OpfiDHN-like, MabDHN-like y LepDHN-like son proteínas hidrofílicas ya que de acuerdo con la escala de Kyte y Doolittle (1982) entre más pequeña es la hidropatía y el valor GRAVY (Tabla 7), más hidrofílica es la proteína. La propiedad hidrofílica de las proteínas LEA 2 se debe a un alto número de aminoácidos cargados y polares, a un bajo número de aminoácidos no-polares, los cuales son en su mayoría hidrofóbicos y también a la ausencia de triptófano (W) y cisteína (C), lo cual es la razón de que también sean llamadas hidrofílicas (Battaglia et al., 2008; Reyes et al., 2005). Las hidrofílicas son capaces de interactuar con el agua y con otras pequeñas moléculas polares /cargadas, y esto puede compartir un rol fisiológico común en la tolerancia a la deshidratación (Jaspard and Hunault, 2014). En una solución acuosa, las proteínas LEA hidrofílicas tienen un alto grado de desordenamiento en su estructura, por lo que son consideradas IDPs (Proteínas Intrínsecamente Desordenadas) (Mouillon et al., 2006). La

mayoría de las proteínas LEA son IDPs y poco se conoce acerca de su mecanismo de acción molecular, sin embargo en ensayos *in vitro* con varias proteínas LEA sugieren un rol en la desecación y/o agregación por congelamiento o en la protección a membranas (Jaspard and Hunault, 2014). Concerniente a este parámetro, la secuencia putativa de los aminoácidos de nuestras secuencias tienen un alto grado de desordenamiento (por arriba de 0.5) (Figura 17) que según Radivojac et al. (2007) establecen que los aminoácidos que se encuentran por encima del valor 0.5 conforman secciones de proteínas intrínsecamente desordenadas.

Las dehidrinas pueden ser clasificadas como neutras, ácidas o básicas, dependiendo de su secuencia de aminoácidos (Alsheikh et al., 2005). Cuando nuestras secuencias fueron comparadas con la de OpsDHN1, la cual es ácida (Ochoa-Alfaro et al., 2012), se pudo observar que nuestras proteínas corresponden a dehidrinas ácidas también basándonos en el alto contenido de residuos de E y D (entre 37 y 39 de los 143 y 148 residuos de aminoácidos totales) (Tabla 7).

Las proteínas se desnaturalizan a medida que van perdiendo su estructura natural o conformación nativa; con ello pierden su función, esto es debido a que la falta de agua hace que se disminuya la formación de puentes de hidrógeno, que son uniones que estabilizan la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, siendo estas estructuras requisitos básicos para que las proteínas puedan cumplir con sus funciones (Grajales, 2005). En el modelado 3D de los aminoácidos de los fragmentos de las proteínas analizadas (figuras 18, 19, 20 y 21) se observa que los aminoácidos correspondientes al segmento K de las dehidrinas se encuentran dentro una estructura α -Hélice; según Watson (2006) debido a que las cadenas laterales hidrófilas (solubles en agua) se extienden desde un lado de la hélice y las cadenas laterales hidrófobas (no soluble en agua) se extienden desde el lado opuesto, la estructura helicoidal general es “anfipática”, lo anterior concuerda con la característica principal que tiene el segmento K de las dehidrinas el cual es formar una hélice anfipática que según Rosales et al. (2014) éste segmento K junto con el segmento ϕ de la dehidrina DHN1 de *Vitis vinifera* juega un rol muy importante ante la respuesta a estrés biótico y abiótico ya que actúa como un escudo molecular de las proteínas

parcialmente desnaturalizadas en lugar de como una chaperona clásica interactuando directamente con proteínas desnaturalizadas (Rosales et al., 2014).

En el modelado 3D de las proteínas MabDHN-like y LepDHN-like (figuras 19 y 20) el segmento rico en H se encuentra formando parte de un giro y parte de una α -Hélice, en OpfiDHN-like y OpsDHN1 (Figuras 20 y 23) este segmento H se encuentra mayormente formando parte de un giro de la proteína. La similitud de la estructura secundaria de la proteína de los miembros de la misma subfamilia se hace evidente también en la tabla 8, ya que hay una sección en la que los miembros de la subfamilia Opuntioideae tienen más de un segmento de estructuras Hoja Beta plegadas y los miembros de la subfamilia Cactoideae tienen solamente una sección rica en Hoja Beta plegadas. Esta estructura es hidrófoba y muy estable que puede llegar a resultar de una ruptura de los enlaces de hidrógeno durante la formación de la hélice alfa; los grupos R de esta estructura están posicionados sobre y bajo el plano de las láminas (Voet et al., 2007).

El árbol consenso estricto, construido de 32 árboles más parsimoniosos, mostró la presencia de 3 clados (A, B y C), en donde OpfiDHN-like, OpsDHN1, LepDHN-like y MabDHN-like forman un subclado monofilético dentro del clado C; todas las otras familias analizadas presentan también este arreglo monofilético (Figura 22). En el alineamiento múltiple de los aminoácidos (Figura 13) se observaron algunas diferencias en el motivo rico en histidinas. En los miembros de la subfamilia Opuntioideae (OpfiDHN-like y OpsDHN1) se presentó este motivo formado por 6 H, mientras que solamente se presentaron 3 H en los miembros de la subfamilia Cactoideae (LepDHN-like y MabDHN-like). La pérdida de estas H tal vez se debe a un mecanismo adaptativo inducido por presión selectiva de un nicho ecológico específico ocurrido cuando se produjo la diversificación de las diferentes subfamilias y especies; según Hernández-Hernández et al. (2014) las altas tasas de diversificación que caracterizan géneros ricos en especies como *Opuntia*, *Mammillaria* y *Echinocereus* podrían estar asociados con su expansión geográfica durante la reciente aridificación de América del Norte (particularmente con la expansión del desierto de Chihuahua) durante el Mioceno. Se ha demostrado que la aridificación puede dar forma a la evolución en cuanto a rasgos funcionales (Livshultz et al., 2011).

La pérdida o delección de una región de un gen ya ha sido utilizada para diferenciar a las subfamilias Opuntioideae y Cactoideae y reconocerlas como monofiléticas anteriormente por diversos autores (Wallace and Dickie, 2002; Griffith and Porter, 2009; Nyffeler, 2002; Wallace and Cota, 1994, Hernández-Hernández et al., 2011). Sin embargo en el árbol consenso estricto (Figura 22) no se puede observar la separación de estas subfamilias probablemente porque es necesaria una secuencia más completa o el número de cambios no es suficiente para aseverar una posible evolución usando estas dehidrinas como modelo. El filograma del árbol 1 más parsimonioso (Figura 23) si es posible observar esta separación de las subfamilias apareciendo como más ancestrales los miembros de Opuntioideae y como más derivados los miembros de Cactoideae. Las dehidrinas de las cactáceas se encuentran cercanamente relacionados con las de la familia Amaranthaceae (*Sueda glauca* DHN y *Artiplex halimus* DHN) y Tamaricaceae (*Tamarix hispida* DHN) (Figura 22 y 23); estas tres familias de plantas son evolutivamente cercanas porque todas pertenecen al orden de los Caryophyllales (Cronquist, 1981; The Angiosperm Phylogeny Group, 2009).

De los tres fragmentos de proteínas caracterizados en este estudio se seleccionó el gen tipo dehidrina *MabDHN* de *M. bombycina* con el fin de confirmar si aumenta su expresión cuando la planta se encuentra ante un estrés que es capaz de provocar una deshidratación como se ha reportado para otras dehidrinas con anterioridad (Zhang et al., 2013); se seleccionó *M. bombycina* ya que tiene importancia ecológica puesto que es una especie endémica de Aguascalientes y Jalisco y actualmente se encuentra bajo severas presiones por la destrucción de su hábitat, su largo y lento ciclo de vida y su colecta ilegal como planta de ornato, por lo que se encuentra sujeta a protección especial (NOM-059-ECOL-2001) (Meza, 2011), además de que no hay estudios moleculares en *M. bombycina* hasta el momento.

La extracción de RNA se realizó de manera satisfactoria (Figura 24) ya que se obtuvo RNA total de buena calidad y en suficiente cantidad para realizar los estudios de expresión mediante RT-PCR; analizando primero el cDNA obtenido de todas las interacciones mediante PCR de punto final (de manera semicuantitativa) y solamente las interacciones

que mostraron tener una sobreexpresión del gen y en las que los resultados no fueron concluyentes del todo (datos no mostrados), se sometieron a un análisis de qPCR, la cual es una técnica utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma relativa el producto de la amplificación del cDNA en éste caso, y que se ha utilizado en la cuantificación de la expresión de otras dehidrinas (Vaseva et. al, 2014). Primeramente se sometió a *M. bombycina* a frío a 4°C por 12 y 72 horas y no se observó una expresión diferencial con el control (Figura 25 y 26); otros autores interactuaron diversas plantas a 4°C por periodos más largos que los utilizados por nosotros (72 horas) como por ejemplo Vaseva et al. (2014) interactúa las plantas de *Trifolium repens* (clavo) por un periodo de 31 días, Tommasini et al., (2008) interactúa *Hordeum vulgare* por 5 días y Ochoa-Alfaro et al. (2012) interactúa *O. streptacantha* por 17 días obteniendo una sobreexpresión del gen *OpsDHN1*. Lo anterior nos indica que la sobreexpresión de *MabDHN* no es inmediata en plantas *in vitro* y se da lentamente conforme la planta necesita comenzar el proceso de aclimatación al frío el cual es un factor importante para la sobrevivencia de las plantas en las estaciones de bajas temperaturas ya que esto involucra la inducción de mecanismos de defensa que incluyen la acumulación de diferentes crioprotectores moleculares como son las dehidrinas (Vaseva et al., 2014); se ha observado una correlación entre la acumulación de proteínas tipo dehidrina y la adquisición de la tolerancia al congelamiento en un plazo corto (7 a 21 días) en estudios de aclimatación al frío en *H. vulgare* (Kosová et al., 2014).

Al someter a *M. bombycina* a estrés por congelamiento a -20°C (Figura 27) el estudio por qPCR reveló que hay una expresión mayor que el control en la interacciones de 2 horas haciendo evidente que esta cactácea aumenta la expresión del gen *MabDHN* para evitar una deshidratación celular ante un estrés tan fuerte y rápido como fue el inducido en el estudio, teniendo en cuenta que en condiciones naturales en el hábitat de esta planta es difícil que se llegue a -20°C (la temperatura media anual en Aguascalientes es de 17°C y en Jalisco de 20.5°C (www.inegi.org.mx) y que en el estudio no se llevó a cabo un proceso de aclimatación, el cual si se daría en un hábitat natural y les ayudaría a soportar una helada sin sufrir grandes daños por periodos más prolongados. El estrés por frío que usualmente precede al congelamiento en los ambientes naturales induce importantes cambios en la

composición del citoplasma y de las biomembranas como por ejemplo, se induce un ajuste osmótico del citoplasma con la acumulación de solutos compatibles de bajo peso molecular, compuestos altamente solubles como son los monosacáridos, oligosacáridos, alcoholes de azúcar, poliaminas y prolina; estos compuestos bajan el potencial hídrico de los compartimentos celulares y previene la formación de cristales de hielo intracelulares disminuyendo el umbral de la temperatura de congelación del citoplasma (Kosová et al., 2007). En la misma interacción a -20°C a las 4 horas la sobreexpresión baja de forma similar al control (sin diferencias estadísticamente significativas) (Figura 27); la formación de cristales de hielo intracelulares causan un daño irreversible en las estructuras celulares y son usualmente letales para la célula por lo que la planta comienza a morir (Kosová et al., 2007) y la expresión génica comienza a disminuir, lo que probablemente comenzó a suceder. Previamente se ha reportado que plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan la dehidrina SK₃ de *O. streptacantha* (OpsDHN1) muestran una mayor tolerancia a estrés por congelamiento (2 h a -15 °C) (Ochoa-Alfaro et al., 2012) y que ésta dehidrina actúa formando dímeros de la proteína viéndose afectada si se deletan las regiones que contienen el segmento K y la región rica en histidinas, haciendo evidente la importancia de estos motivos en la protección ante frío (Hernández- Sánchez et al., 2014). Estos segmentos también están presentes en *MabDHN* y podrían estar desempeñando un papel similar. Por otro lado en *Arabidopsis thaliana* se han detectado cuatro dehidrinas (COR47, LTI29, ERD14, LTI30) que se sobreexpresan principalmente ante estrés por frío siendo algunas de ellas como LTI30 y COR47 expresadas específicamente ante este estrés y no ante salinidad o deshidratación (Nylander et al., 2001). De igual forma en este estudio no se encontró un aumento de la expresión diferencial de *MabDHN* con el control ante NaCl 250 mM (Figuras 28 y 29) por lo que este gen no tiene un papel importante ante estrés por alta salinidad a esta concentración.

La sobreexpresión de *MabDHN* inducida por ABA se comprobó al interactuar plantas de *M. bombycina* con ABA de forma exógena a una concentración de 100 µM mediante un análisis de qPCR (Figura 32) donde se observó un incremento en la expresión del gen con respecto al control en las interacciones de 1.5, 6 y 12 horas, siendo significativamente más

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

alta la expresión a las 1.5 y 12 horas. Los genes más ampliamente reportados que son regulados por ABA son los genes LEA por ejemplo los genes *Osem*, *SalT*, *Rab16* y *Rab25* de arroz, *Em* y *Rab15* de trigo, *Rab17* y *Rab28* de maíz, *Rab18* de *Arabidopsis*, *HVA1* y *HVA22* de cebada, *LE16*, *LE4* y *TAS14* de tomate, *CDeT27-45* de *Craterostigma plantagineum*, entre otros (Roychoudhury et al., 2013). La dehidrina de referencia OpsDHN1 también demostró ser sobreexpresada por ABA aplicado exógenamente a una concentración de 0.1µM a las 1.5 horas (Ochoa-Alfaro et al., 2012); sin embargo en MabDHN no se observó un aumento en la expresión con 0.1µM de ABA en ninguno de los tiempos (Figura 30 y 31) en comparación con el control.

Las dehidrinas son proteínas de plantas intrínsecamente desordenadas que se acumulan durante la embriogénesis tardía de las semillas y en respuesta a estrés abiótico (Banerjee y Roychoudhury, 2016) sin embargo se ha demostrado que algunas dehidrinas son capaces de sobreexpresarse ante un estrés de tipo biótico (Yang et al., 2012). Para determinar si *MabDHN* es capaz de sobreexpresarse ante este tipo de estrés se interaccionó *M. bombycina* con un estrés por heridas que es generalmente un tipo de estrés provocado por un depredador en un medio natural (Lorenzo et al., 2004). Se comprobó mediante qPCR que hay una fuerte sobreexpresión del gen *MabDHN* a los 10 minutos de realizada la herida con diferencias estadísticamente significativas, lo que nos indica que este gen puede estar influyendo de manera importante para impedir que haya una deshidratación en la planta cuando ocurre un daño celular por un depredador. Se ha demostrado que tanto el ácido jasmónico (JA) (Lorenzo et al., 2004; Pieterse et al., 2012) como el etileno (Barrera-Ortiz et al., 2012), fitohormonas que se inducen ante un estrés por heridas, pueden interactuar antagónicamente con la expresión de genes inducidos por ABA (Lorenzo et al., 2004; Pieterse et al., 2012), como son las dehidrinas (Roychoudhury et al., 2013), sin embargo en otros estudios también se ha comprobado que el JA junto con ABA están implicado en la inducción de la defensa de la planta ante insectos herbívoros (Vos et al., 2015; Thaler y Bostock, 2004), activando genes inducidos por estas fitohormonas.

En este estudio ya se comprobó que *MabDHN* es inducido por ABA y ante un estrés de tipo abiótico, sin embargo las rutas de señalización de las plantas ante un estrés de tipo

biótico son muy complejas (Asselbergh et al., 2008) y en este trabajo no se realizaron estudios para demostrar si ante un estrés por heridas en *M. bombycina* hay una inducción o una represión de ABA por lo que es necesario en el futuro realizar estudios de expresión del gen *MabDHN* en plantas ABA deprimidas e interaccionadas con otras fitohormonas que se expresan ante estrés biótico como son JA, ET o SA. En base a lo anterior y debido a que no hay estudios previos acerca la utilización de sustancias inhibidoras de ABA en cactáceas se realizó un experimento para determinar el tiempo en el que el herbicida acuático llamado Fluridone (1-methyl-3-phenyl-5-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)-4-pyridone) es capaz de disminuir la biosíntesis de ABA endógeno en la planta; este tipo de experimentos han sido utilizados en múltiples estudios del papel regulatorio del ABA en diferentes plantas (Zhang et al., 2012; Siddiqui et al., 1998; Rajasekaran et al., 1987; Chen et al., 2006). Se colocaron plantas de *M. bombycina* en un medio de MS + Fluridone 100 μ M a diferentes tiempos y posteriormente se interaccionaron los brotes con frío a -20°C por 2 horas para inducir la expresión de *MabDHN*, obteniendo una probable disminución de la biosíntesis de ABA endógeno en la interacción de los brotes por 4 días con el Fluridone debido a que se observó una expresión del gen *MabDHN* similar a la del control sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 34 y 35). El Fluridone es un inhibidor establecido de la biosíntesis de carotenoides y por lo tanto de la biosíntesis de ABA ya que la biosíntesis de esta fitohormona comienza con la oxidación de un carotenoide llamado Carotenoide C40 en el cloroplasto (Xiong y Zhu, 2003). Se ha reportado que el Fluridone es un inhibidor de la enzima fitoeno-desaturasa, la cual convierte el fitoeno en carotenoide (Han et al., 2010). En la interacción de los brotes con Fluridon a los 2 días se observa que la expresión de *MabDHN* es mayor que la del control, lo que indica que la cantidad de ABA endógeno es alta y suficiente para inducir la sobreexpresión del gen tipo dehidrina ante un estrés por congelamiento, como ya se comprobó en experimentos anteriores (Figura 27 y 32). En general los inhibidores de la biosíntesis de fitohormonas, como el ABA, son herramientas efectivas para estudiar la regulación del crecimiento de las plantas y su respuesta rápida ante estrés ambiental de un modo rápido, condicional, reversible y de manera dependiente de la dosis (Kitahata et al., 2005); de esta manera comprobamos una vez más que *MabDHN* depende de ABA para expresarse y deja la puerta abierta para la realización de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

experimentos posteriores para comprobar el papel de ABA ante la inducción de diferentes genes y funciones fisiológicas en cactáceas.



8. CONCLUSIONES

- Se identificaron fragmentos de genes tipo dehidrina en *Opuntia ficus-indica*, *Leuchtenbergia principis* y *Mammillaria bombycina*, las secuencias en nucleótidos de éstos fragmentos se depositaron en la plataforma del NCBI.
- La traducción virtual de los fragmentos de los genes tipo dehidrina de *O. ficus-indica*, *L. principis* y *M. bombycina* mostraron la presencia de 2 segmentos K, propio de las proteínas LEA 2, y un segmento rico en histidinas.
- El análisis de parámetros de los fragmentos traducidos OpfiDHN-like, MabDHN-like y LepDHN-like mostraron que son péptidos ácidos, altamente hidrofílicos e intrínsecamente desordenados.
- El árbol consenso estricto demostró que las dehidrinas de diferentes géneros de cactáceas tienen un origen monofilético por lo que este tipo de proteínas son altamente homólogas entre familias.
- Los representantes de la subfamilia Cactoideae presentan una delección de 3 histidinas en su secuencia de aminoácidos parcial y los representantes de la subfamilia Opuntioideae no la tienen, siendo esto una probable relación evolutiva entre subfamilias.
- En los análisis de expresión del gen *MabDHN* de *M. bombycina* se observó una sobreexpresión en la interacción con estrés por frío (-20°C) por lo que podemos decir que el papel principal de este gen es la protección de la cactácea ante un estrés por bajas temperaturas.
- Se comprobó que la expresión de *MabDHN* es mediada por el ácido abscísico.
- Se demostró que el gen *MabDHN* se sobreexpresó al interactuar *M. bombycina* con un estrés de tipo biótico ocasionado por Heridas.
- Se observó una probable disminución de ABA endógeno al interactuar los brotes de *M. bombycina* con el herbicida Fluridone por un periodo de 4 días.
- No se observó una sobreexpresión de *MabDHN* diferente a la del control en otras interacciones con estrés abiótico (NaCl a 250mM, frío a 4°C) y con otras concentraciones de ABA (0.1 µM).

9. GLOSARIO

LEA: Late embryogenesis abundant (Proteínas abundantes de la embriogénesis tardía).

DHN: Dehidrina

ABA: Ácido Abscísico

JA: Ácido Jasmónico

ET: Etileno

PCR: Reacción En Cadena De La Polimerasa

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas.

Ala: alanina

Arg: arginina

Asn: asparagina

Asp: ácido aspártico

Cys: cisteína

Gln: glutamina

Glu: ácido glutámico

Gly: glicina

His: histidina

Ile: isoleucina

Leu: leucina

Lys: lisina

Met: metionina

Phe: fenilalanina

Pro: prolina

Ser: serina

Thr: treonina

Trp: triptófano

Tyr: tirosina

Val: valina.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, P. K. P., Agarwal, P., Reddy, M. K. y Sopory, S.K. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 25: 1263-1274.
- Agarwal, P. y Agarwal, P. K. 2014. Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling. *Molecular Biology Reports* (2014) 41: 599-611.
- Amara, I., Odena, A., Oliveira, E., Moreno, A., Masmoudi, K., Pagès, M. y Goday, A. 2012. Insights into Maize LEA Proteins: From Proteomics to Functional Approaches. *Plant Cell Physiol.* 53(2): 312-329.
- APG III (The Angiosperm Phylogeny Group). 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., y Höfte, M. 2008. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (6): 709-719.
- Atkinson, N. J. y Urwin, P. E. 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* 63 (2): 695-709.
- Bafeel, S. O. 2013. Phylogeny of the Plant Salinity Tolerance Related HKT Genes. *International Journal of Biology* 5 (2): 64- 68.
- Bailey, T. L. y Elkan, Ch. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press. Menlo Park, California. 28-36 pp.

- Baker, J.C., Steele, C. y Dure, L. III. 1988. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11: 277-291.
- Banerjee, A. y Roychoudhury, A. 2016. Group II late embryogenesis abundant (LEA) proteins: structural and functional aspects in plant abiotic stress. *Plant Growth Regulation* 79 (1): 1-17.
- Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R., López-Bucio, J. y Beltrán-Peña, E. 2012. Bases moleculares de la señalización del ácido abscísico y el etileno en plantas. *Ciencia Nicolaita* 56: 20-34.
- Battaglia, M., Olvera, C. Y., Garcíarrubio, A., Campos, F. y Covarrubias, A. A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 148: 6-24.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., y Bhattarai, T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences*, 32 (3): 501-510.
- Bies-Ethève, N., Comella, P. G., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R. y Delseny, M. 2008. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 67:107-124.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Blanc, G. y Wolfe, K. H. 2004. Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during *Arabidopsis* Evolution. *The Plant Cell* 16, 1679-1691.
- Bravo, H. H. 1978. Las cactáceas de México. 2° Ed. UNAM. México. 550 p
- Bravo, L. A., Close, T. J., Corcuera, L. J. y Guy, C. L. (1999). Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 106 (2): 177-183.

- Brown, R. L., Kazan, K., McGrath, K. C., Maclean, D. J. y Manners, J. M. 2003. A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 1020-1032.
- Browning, J A. 1980. Genetic protective mechanism of plant-pathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance. En Harris, MK. Ed. *Biology and Breeding for resistance to arthropods and pathogens in agricultural plants* .Texas Agric. Sta. College Station, TX. 52-75 p
- Butterworth, Ch. y Edwards, J. E. 2008. Investigating *Pereskia* and the earliest divergences in Cactaceae. *Haseltonia* 14: 46-53.
- Cai, X., Zhang, H., Mipam, T. D. 2013. Unique variations of SRY gene result in distinct patrilineal phylogeny of *Capra hircus* and other domestic Bovidae. *Animal Science Papers and Reports* 30 (3): 219-227.
- Camarena G. G. y de la Torre A. R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13 (2): 157-162.
- Casierra, P. F., Pérez, W. A., y Portilla, F. 2006. Relaciones hídricas y distribución de materia seca en especies de fique (*Furcraea* sp.) cultivadas bajo estrés por NaCl. *Agronomía colombiana* 24 (2): 280- 289.
- Chamoli, S., y Verma, A. K. 2014. Targeting of Metabolic Pathways for Genetic Engineering to Combat Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, en Gaur, R. K. y Sharma, P. (eds). 2014. *Approaches to Plant Stress and their Management*. Ed. Springer India.
- Chávez, L. y González, M. 2009. Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. *Instituto tecnológico de educación avanzada* 105 (4): 231-256.

- Chen, Q. L., Guo, Y., Jiang, Y., & Tu, P. 2016. Mechanism of fluridone-induced seed germination of *Cistanche tubulosa*. Pakistan journal of Botany 48 (3): 971-976.
- Chen, Y., Ji, F., Xie, H., Liang, J. y Zhang, J. 2006. The Regulator of G-Protein Signaling Proteins Involved in Sugar and Absciscic Acid Signaling in Arabidopsis Seed Germination. Plant Physiology 140: 302–310.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes (IMAE), Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). 2008. La Biodiversidad en Aguascalientes: Estudio de Estado. México. 385 pp
- Concepción J., Puerta B., Claudia P. y Ureña P. 2005. Prácticas de biología molecular. Ed. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 100 pp
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press.
- Cruz, E. M. A. y Arias, S. 2013. Filogenia del género *Disocactus* (Cactaceae). Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas 10: 9-8.
- Cuadrado, G. A. y Garralla, S. S. 2009. Palinología de los géneros *Maihuenia* (Maihuenioideae) y *Pereskia* (Pereskioideae), Cactaceae, de Argentina. Bonplandia 18 (1):5-12.
- Cuevas, V. C. L. y Covarrubias, R. A. A. 2011. Las Proteínas desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 14 (2): 97-105.
- Du, D., Zhang, Q., Cheng, T., Pan, H., Yang, W. y Sun, L. 2013. Genome-wide identification and analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes in *Prunus mume*. Molecular Biology Reports 40: 1937–1946.

- Dure, L. III, Crouch, M., Harada, J., Ho, T. H. D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. y Sung, Z. R. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12: 475-486.
- Dure, L. III. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* 3: 363-369.
- Edwards, E. J., Nyffeler, R. y Donoghue, M. J. 2005. Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany* 92: 1177- 1188.
- Fan, J., Hill, L., Crooks, C., Doerner, P. y Lamb, C. 2009. Absciscic Acid Has a Key Role in Modulating Diverse Plant-Pathogen Interactions. *Plant Physiology* 150: 1750–176
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Frohman, M. A, Dush, M. K., Martin, G. R. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8998–9002.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. y Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press pp. 571-607
- Glass, A. D. 1974. Influence of phenolic acids upon ion uptake and Inhibition of potassium absorption. *Journal of Experimental Botany* 25: 1104-1113.
- Gorelick, R., Drezner, T. D., & Hancock, K. (2015). Freeze-Tolerance of Cacti (Cactaceae) In Ottawa, Ontario, Canada. *Madroño*, 62(1), 33-45.

- Goyal, K., Walton, L. J. y Tunnacliffe, A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* 388: 151–157.
- Grajales, M. O. 2005. *Apuntes de Bioquímica Vegetal. Bases Para Su Aplicación Fisiológica*. UNAM. México. 173 pps.
- Griffith, M. P. 2004. What did the first cactus look like? An attempt to reconcile the morphological and molecular evidence. *Taxon* 53: 493–499.
- Guruprasad, K., Reddy, B.V.B. y Pandit, M.W. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design & Selection* 4: 155-161.
- Halder, T., Agarwal, T. y Ray, S. 2015.. Isolation, cloning, and characterization of a novel *Sorghum dehydrin* (SbDhn2) protein. *Protoplasma*: 1-14.
- Han, W., Zhang, H. y Wang y M. H. 2010. Fluridone affects quiescent centre division in the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche. *BMB reports* 43(12): 813-817.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S. y Masmoudi, K. 2011. Plant dehydrins and stress tolerance, versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior* 6 (10): 1503-1509
- Hara, M., Fujinaga, M. y Kuboi, T. 2005. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal of Experimental Botany* 56: 2695-2703
- Hara, M., Monna, S., Murata, T., Nakano, T., Amano, S., Nachbar, M., y Wätzig, H. 2016. The *Arabidopsis* KS-type dehydrin recovers lactate dehydrogenase activity inhibited by copper with the contribution of His residues. *Plant Science* 245: 135-142.

- Hase, S., Shimizu, A., Nakaho, K., Takenaka, S. y Takahashi, H. 2006. Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. Plant Pathology 55: 537–543
- Hayat, S. y Ahmad, A. (eds.). 2007. Salicylic Acid – A Plant Hormone. Ed. Springer. India. 1-14 pp.
- He, Y. y Gan, S. 2001. Identical promoter elements are involved in regulation of the OPR1 gene by senescence and jasmonic acid in Arabidopsis. Plant Molecular Biology 47: 595–605.
- Heil, M. y Bostock, M. 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. Annals of Botany 89 (5): 503-51
- Hernández-Camacho, S., Pérez-Molphe-Balch, E., Alpuche-Solís, A. G. y Morales-Domínguez J. F. 2017. Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *phyton International Journal of Experimental Botany* (86): en prensa.
- Hernández-Hernández T., Hernández, H. M., De-Nova, J.A., Puente, R., Eguiarte L.E. y Magallón, S. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). American Journal of Botany 98: 44-61.
- Hernandez-Sanchez, I. E., Martynowicz, D.M., Rodriguez-Hernandez, A. A., Perez-Morales, M. B., Graether, S. P. y Jimenez-Bremont, J. F. 2014. A dehydrin-dehydrin interaction: the case of SK₃ from *Opuntia streptacantha*. Frontiers in Plant Science 520 (5): 1-11.
- Hundertmark, M. y Hinch, D. K. 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics 9:118-140.

- Ismail A. M., Hall A. E., y Close, T. J. 1999. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergency of cowpea. *Plant Physiology* 120: 237- 244
- Jiménez, B. J. F., Maruri, L. I., Ochoa, A. A. E., Delgado, S. P., Bravo, J. y Rodríguez, K. M. 2013. LEA Gene Introns: is the Intron of Dehydrin Genes a Characteristic of the Serine-Segment?. *Plant Molecular Biology Reporter* 31: 128-140
- Keen, N. 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Molecular Biology* 19: 109-122
- Kitahata, N., Saito, S., Miyazawa, Y., Umezawa, T., Shimada, Y., Min, Y. K. y Asami, T. 2005. Chemical regulation of abscisic acid catabolism in plants by cytochrome P450 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(14): 4491-4498.
- Kobayashi, F., Ishibashi, M. y Takumi, S. 2012. Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. *Transgenic Research* 17: 755–767
- Kosová, K., Vítámvás, P. y Prášil, I. T. 2007. The role of dehydrins in plant response to cold. *Biol Plant* 51: 601-617.
- Kosová K., Vítámvás, P., Prášilová, P. y Prášil. I.T. 2013. Accumulation of WCS120 and DHN5 proteins in differently frost-tolerant wheat and barley cultivars grown under a broad temperature scale. *Biologia Plantarum* 57 (1): 105-112.
- Kosová, K., Vítámvás, P., y Prášil, I. T. 2014. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity–what can LEA-II proteins tell us about plant stress response?. *Frontiers in plant science* 343 (5): 1-6.
- Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z. y Tompa, P. 2008. Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *Plant Physiology* 147: 381–390

- Krüger, C., Berkowitz, O. Udo, W. S., y Hell, R. 2002. A Metal-binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus communis* L. *Journal of Biological Chemistry* 277 (28): 25062- 25069.
- Kusajima, M, Yasuda M, Kawashima A, Nojiri H, Yamane H, Nakajima M, Akutsu K y Nakashita H. 2010. Suppressive effect of abscisic acid on systemic acquired resistance in tobacco plants. *Journal of General Plant Pathology* 76: 161–167.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157 (1): 105-32.
- Liu, Y., Chakrabortee, S., Li, R., Zheng, Y., y Tunnacliffe, A. 2011. Both plant and animal LEA proteins act as kinetic stabilisers of polyglutamine-dependent protein aggregation. *FEBS Letters* 585: 630–634
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Drieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L. y Darnell, J. 2005. *Biología celular y molecular*. 5° ed. Ed. Médica Panamericana. España. 973 pps.
- Loik, M. E. y Nobel, P. S. 1993. Exogenous abscisic acid mimics cold acclimation for cacti differing in freezing tolerance. *Plant Physiology* 103: 871–876.
- López, C. G., Banowitz, G. M. Peterson, C. J. y Kronstad, W. E. 2003. Dehydrin Expression and Drought Tolerance in Seven Wheat Cultivars. *Crop Science* 43: 577- 582.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez, S. J. J., y Solano, R. 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate Regulated Defense Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 1938–1950.
- Madriz, O. K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas* 63: 22 - 32

- Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L. y Scambia, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures Online* 3 (1): 19-25
- Medel, R. 2001. Assessment of correlational selection on tolerance and resistance traits in a host plant -parasitic plant interaction. *Evolutionary Ecology* 15(1): 37-52
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. y He, S. Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980
- Memelink, J. 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70: 1560–1570.
- Merodio, C. y Escribano, M. I. 2003. Maduración y post-recolección de frutos y hortalizas. Ed. CSIC - CSIC Press. España: 448 pp.
- Meza N.M.V. 2011. Segundo informe referente a la realización de la asesoría número INE/ADA-026/2011 denominada “cactáceas mexicanas: usos y amenazas”. http://www.inecc.gob.mx/descargas/con_eco/2011_Cact_mex_usos_amenazas.pdf.
- Mittler, R. y Blumwald, E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology* 61: 443–462
- Mohr, P. G. y Cahill, D. M. 2003. Absciscic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology* 30: 461–469
- Montes, B. R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología* 29: 73-82
- Moreno, F. L. P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico: una revisión. *Agronomía Colombiana* 27 (2): 179-191
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473- 497.

- Murray, M. G. y Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8 (19)
- Narayanasamy, P. 2008. Chapter 3: Genetic Resistance of Crops to Diseases. In: Narayanasamy, P. 2008. *Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management*. Ed. Springer Science and Business Media B.V: 23 – 131.
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Nakajima M, Enju A y Shinozaki K. 2004. Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 55: 327–342.
- Nobel, P. S. y Loik, M. E. 1993. Freezing tolerance and water relations of *Opuntia fragilis* from Canada and de United States. *Ecology* 74: 1722- 1732.
- Nobel, P. S. y Zutta, B. R. 2008. Temperature tolerances for stems and roots of two cultivated cacti, *Nopalea cochenillifera* and *Opuntia robusta*: Acclimation, light, and drought. *Journal of Arid Environments* 72: 633–642
- Nyffeler R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL- trnF sequences. *American Journal of Botany* 89 (2): 312-326.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T. y Welin, B.V., 2001. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 45 (3): 263-279.
- Ochoa-Alfaro A. E., Rodríguez-Kessler M., Pérez-Morales M. B., Delgado-Sánchez P., Cuevas-Velázquez C. L., Gómez-Anduro G. y Jiménez-Bremont J. F. 2012. Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta* 235: 565–578.

- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., y Van Wees, S. C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. Annual review of cell and developmental biology, 28: 489-521.
- Qi, Y., Tsuda, K., Nguyen, L. V., Wang, X., Lin, J. Murph, A. S., Glazebrook, J., Thordal Ch. H. y Katagiri, F. 2001. Physical association of *Arabidopsis* hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. Journal of Biological Chemistry 286 (36): 31297–31307
- Qin, Y. X., y Qin, F. 2016. Dehydrins from wheat x *Thinopyrum ponticum* amphiploid increase salinity and drought tolerance under their own inducible promoters without growth retardation. Plant Physiology and Biochemistry 99: 142-149.
- Qiu, H., Zhang, L., Liu, C., He, L., Wang, A., Liu, H. L. y Zhu, J. B. 2014. Cloning and characterization of a novel dehydrin gene, SiDhn2, from *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. Plant Molecular Biology 84: 707-718
- Qu, A. L., Ding, Y. F., Jiang, Q. y Zhu, C. 2013. Molecular mechanisms of the plant heat stress response. Biochemical and Biophysical Research Communications 432: 203–207
- Quehl, L. 1910. *Mamillaria bombycina* Quehl, n. sp. Monatsschr Kakteenk 20: 149 pp
- Rajakani, R., Narnoliya, L., Sangwan, N. S., Sangwan, R. S. y Gupta, V. 2013. Activated charcoal-mediated RNA extraction method for *Azadirachta indica* and plants highly rich in polyphenolics, polysaccharides and other complex secondary compounds. BMC Research Notes 6 (125): 2- 10.
- Rajasekaran, K., Hein, M. B., y Vasil, I. K. 1987. Endogenous Absciscic Acid and Indole-3-Acetic Acid and Somatic Embryogenesis in Cultured Leaf Explants of *Pennisetum purpureum* Schum. Plant Physiology 84, 47-51.

- Rangel, S., Castro M. E., Beltran, P. E., Reyes, C. H. y García, P. E.. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 12 (2): 90- 95.
- Reyes, J. L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D. T. y Covarrubias, A. A. 2008. Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant, Cell and Environment* 31, 1781-1790.
- Reyes, J. L., Rodrigo, M. J., Colmenero, F. J. M., Gil1, J. V. Garay, A. A., Campos, F., Salamini, F., Bartels, D. y Covarrubias, A. A. 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell and Environment* 28: 709-718.
- Richard, S., Morency, M. .J., Drevet, C., Jouanin, L. y Seguin, A. 2000. Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Molecular Biology* 43: 1–10
- Rizhsky, L., Liang, H. J., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. 2004. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134: 1683–1696.
- Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A. y Stobiecki, M. 2014. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1–19.
- Rosales, R., Romero, I., Escribano, M. I., Merodio, C., Sanchez-Ballesta, M. T. 2014. The crucial role of Φ - and K-segments in the *in vitro* functionality of *Vitis vinifera* dehydrin DHN1a. *Phytochemistry* 108: 17-25.
- Roychoudhury, A., Paul, S., y Basu, S. 2013. Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports* 32(7): 985-1006.

- Roychoudhury, A., Roy, C. y Sengupta, D. N. 2007. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous lea gene Rab16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Reports* 26 (10): 1839-1859.
- Schaller, A. y Frasson, D. 2001. Induction of wound response gene expression in tomato leaves by *ionophores*. *Planta* 212: 431-435.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. y Fatkhutdinova, D. R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164: 317-322.
- Shen, Q. P.N. y Zhang, T. H. Ho. 1996. Molecular nature of abscisic (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8: 1107–1119.
- Shen, Y., Tang, M. J., Hu, Y. L. y Lin, Z. P. 2004. Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Science* 166: 1167-1175.
- Shih, M. D., Hoekstra, A. F. y Hsing, Y. C. 2008. Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Advances in Botanical Research* 48: 211-255.
- Shonle, I. y Bergelson, J. 2000. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* 54: 778-788
- Sickmeier M, Hamilton JA, LeGall T, Vacic V, Cortese M.S et al. 2007. DisProt: the database of disordered proteins. *Nucleic acids research* 35 suppl 1: D786-D793
- Siddiqui, N. U., Chung, H. J., Thomas, T. L. y Drew, M.C. 1998. Absciscic acid dependent and independent expression of the carrot late embryogenesis abundant class gene Dc3 in transgenic tobacco seedlings. *Plant Physiol* 118: 1181–1190.

- Sun, J., Nie, L., Sun, G., Guo, J. y Liu, Y. 2013. Cloning and characterization of dehydrin gene from *Ammopiptanthus mongolicus*. Mol. Biol. Rep. 40: 2281–2291
- Sunkar, R. 2010. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. Seminars in Cell and Developmental Biology 21: 805–811.
- Sunohara, M., Kawakami, M., Kage, H., Watanabe, K., Emoto, N., Nagase, T., Ohishi, N. y Takai, D. 2011. Polymerase reaction without primers throughout for the reconstruction of full-length cDNA from products of rapid amplification of cDNA ends (RACE). Biotechnol Lett 33: 1301–1307.
- Suttle, J. C., Lulai, E. C., Huckle, L. L., Neubauer, J. D. 2013. Wounding of potato tubers induces increases in ABA biosynthesis and catabolism and alters expression of ABA metabolic genes. Journal of Plant Physiology 170: 560-566.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), v. 4.0 beta 10. Sunderland: Sinauer Associates.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. USA. 1338 pp
- Thaler, J. S. y Bostock, R. M. 2004. Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. Ecology 85: 48-58.
- Tommasini, L., Svensson, J. T., Rodriguez, E. M., Wahid, A., Malatrasi, M., Kato, K., Wanamaker, S., Resnik, J. y Close, T. J. 2008. Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). Functional and integrative genomics 8 (4): 387-405.
- Tunnacliffe, A. y Wise, M. J. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. Naturwissenschaften. 94: 791–812
- Tunnacliffe, A., Hinch, D. K., Leprince, O. y Macherel, D. 2010. LEA Proteins: Versatility of Form and Function, en Lubzens E., Cerda, J., Clark, M. (eds.). Dormancy and Resistance in Harsh Environments, Topics in Current Genetics 21. Ed. Springer Science and Business Media. 296 pp.

- Uhlig, M. 2008. Cactus y otras suculentas. Ed. Hispano Europea. Estados Unidos de América. 128 pp.
- Van Loon, L. C., Rep, M. y Pieterse, C. M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Vaseva, I. I., Anders, I., Yuperlieva-Mateeva, B., Nenkova, R., Kostadinova, A. y Feller, U. 2014. Dehydrin expression as a potential diagnostic tool for cold stress in white clover. *Plant Physiology and Biochemistry* 78: 43-48.
- Voet, D., Voet, J. G., y Pratt, C. W. 2007. Fundamentos de Bioquímica. 2º ed. Ed. Médica Panamericana. España. 1260 pps
- Vos, I. A., Moritz, L., Pieterse, C. M. y Van Wees, S. C. 2015. Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. *Frontiers in plant science* (6): 639.
- Watson, J. D. 2006. Biología molecular del gen. España. Ed. Médica Panamericana. 776 pps.
- Wise, M. J. 2003. LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatic* 4: 52-63.
- Xiong, L. y Zhu, J. K. 2003. Regulation of Absciscic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology* 133: 29-36.
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J. P., Feldman, T., Sumner, L. W. y Roossinck, M. J. 2008. Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist* 180: 911-921.
- Yalpani, N., Schulz, M., Davies, M. P., y Balke, N. E. 1992. Partial purification of an inducible uridine-5'-diphosphate glucose: salicylic acid glucosyltransferase from oat roots. *Plant Physiology* 100: 457-463.

- Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., Singer, S. D. y Wang, Y. 2012. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology* 12 (140): 2- 17.
- Zhang, H. M., Zhang, L. S., Liu, L., Zhu, W. N. y Yang, W. B. 2013. Changes of dehydrin profiles induced by drought in winter wheat at different developmental stages. *Biologia plantarum* 57 (4): 797- 800.
- Zhang, L., Gao, M., Hu, J., Zhang, X., Wang, L. y Ashraf, M. 2012. Modulation role of abscisic acid (ABA) on growth, water relations and glycine betaine metabolism in two maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3189-3202.
- Zhu, W., Zhang, D., Lu, X., Zhang, L., Yu, Z., Lv, H. y Zhang, H. 2014. Characterisation of an SKn-type dehydrin promoter from wheat and its responsiveness to various abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology Reporter* 32: 664–67.

11. ANEXOS

ANEXO A. CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

A.1. Características de los oligonucleótidos FOpsDHN1 y ROpsDHN1 sintetizados de acuerdo al programa DNASTar.

Secuencia: **FOpsDHN1:** 5' GAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC 3'

ROpsDHN1: 5' GAAGGGGGTTGATCACACTCCACA 3'

52.9% de GC, dTm de 2.5 °C, Temperatura de alineamiento de 58.8 °C, la longitud del fragmento es de 497 pb.

A.2. Características de los oligonucleótidos F MabDHN y R MabDHN sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI.

Secuencia: **FMabDHN** 5' CCGGCCCCACCGCCACCTCATTC 3'

RMabDHN 5' GGGCCTCCCCCTCGGCCACAGT 3'

75.6% de GC, dTm de 2 °C, Temperatura de alineamiento de 72.2 °C, la longitud del fragmento es de 157 pb.

A.3. Características de los oligonucleótidos F MabCuant y R MabCuant sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI.

Secuencia: **FMabCuant** 5' TTAAGGAGAACTTCCAGGC 3'

RMabCuant 5' ACGTGGATCTTCTCTATTGC 3'

45% de GC, dTm de 0.1 °C, Temperatura de alineamiento de 55 °C, la longitud del fragmento es de 115 pb.

A.4. Características de los oligonucleótidos F 25S y R 25S en base a la secuencia de una región del gen 25S de jitomate.

Secuencia: **F25S** 5' CGTAAGGCGTAAGGAAGCTG 3'

R25S 5' TCGGAGGGAACCAGCTACTA 3'

55% de GC, dTm de 2°C, Temperatura de alineamiento de 59 °C, la longitud del fragmento es de 249 pb.

ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS UTILIZADOS.

B.1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS):

Preparación de las soluciones concentradas para el medio MS:

Solución	Reactivo	Cantidad
SOLUCION A Concentración: 1000X. Volumen: 50 mL	Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	22.0 g
SOLUCION B. Concentración: 1000X. Volumen: 50 mL	Yoduro de potasio (KI) Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	41.50 mg 1.25 mg
SOLUCION C. Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL	Fosfato monobásico de K (KH_2PO_4) Ac. bórico (H_3BO_3) Molibdato de sodio (NaMoO_4)	3.40g 0.124 g 0.005 g
SOLUCION D. Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL	Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	7.40 g 0.340 g 0.172 g 0.50 mg

	Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	
SOLUCION E. Concentración: 200 X. Volumen: 100 mL	Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) EDTA disódico (Na_2EDTA)	0.557 g 0.745 g
SOLUCION F. Concentración 100 X. Volumen: 100 mL	Glicina Piridoxina HCl Ac. nicotínico Tiamina HCl Mio inositol	20.00 mg 5.00 mg 5.00 mg 1.00 mg 1.00 g
Observaciones	En la Solución E Disolver ambos componentes por separado, para lo cual puede requerirse calor. Agregar poco a poco la solución de Fe a la de EDTA y aforar. Debe de quedar de color amarillo sin precipitados. Almacenar estas soluciones en frascos limpios (lavados y enjuagados con agua destilada) y en refrigeración.	

Para preparar 1 litro de medio MS se agregan las siguientes cantidades de las soluciones anteriormente preparadas:

SOLUCION	VOLUMEN
A	mL
B	1
C	1
D	2.5
E	2.5
F	5
	10

Posteriormente se pesan y añaden 30.0 g de sacarosa, 1.90 g de Nitrato de potasio y 1.65 g de Nitrato de amonio. Se ajusta el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N. Se afora a 1 L con agua destilada y se añaden 8 g/L de Agar como gelificante. El gelificante se disuelve calentando el medio en horno de microondas y agitando posteriormente. El medio se distribuye en frascos de cultivo (dependiendo de su capacidad) se tapan y esterilizan a 121 °C por 20 min.

B.2 Buffer de lisis para extracción de ADN de cactáceas

CTAB al 2%, NaCl al 1.4 M, EDTA al 20 mM, Tris HCl pH8 al 100 mM, β -mercaptoetanol al 2%. NOTA: El β -mercaptoetanol se agrega hasta que se vaya a utilizar el buffer.

B.3. Medio de cultivo LB

0.5% de Extracto de Levadura, 1% de peptona de caseína, 0.5% de NaCl; si se requiere medio sólido se agrega 1.3% de agar bacteriológico.

B.4. Buffers empleados para la extracción de plásmidos por el método Birnboim y Doly (1979)

BIRNBOIM I: Tris HCL pH8 al 25 mM, EDTA pH8 al 10mM, glucosa al 50mM (esterilizar y almacenar a 4°C)

BIRNBOIM II: NaOH 0.2 N, SDS 1%. Preparar al momento o guardar máximo 1 semana a temperatura ambiente.

BIRNBOIM III: 60ml de acetato de potasio al 5M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5ml de agua destilada.

B.5 Buffer de lisis para extracción de RNA de cactáceas

CTAB al 2% p/v, NaCl al 2.5 M, EDTA al 50 mM, Tris HCl pH8 al 200 mM, PVPP (polivinilpolipirrolidona) al 1.5%, β -mercaptoetanol al 3%. NOTA: El β -mercaptoetanol se agrega hasta que se vaya a utilizar el buffer.

ANEXO C. SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS Y PROTEÍNAS OBTENIDAS.

C.1 Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tipo dehidrina de *Opuntia ficus-indica*

Secuencia parcial de nucleótidos del gen tipo dehidrina de *Opuntia ficus indica* (**OpfiDHN-like**). Se tienen 445 nucleótidos secuenciados; número de accesoión en NCBI: KP720561.

GAGGAGGAGGGAGATGACGAAGACAAGAAGAAGAGGAAGAAGGAGAAGAAA
GAAAAGAAAGGATTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAACTTCCAGGCCACCACA
AGGAACAGGAAGAAGAACAAGAGGACAAGAAAAAGGATCATCATCATCATCA
TCATGATGAAGAGGACACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCACGTGGAAGAG
GTGATCTACTCGGAGCCATCTTACCCTGCCCCGGCCCCACCGCCACCTCATTCG
GAGGCCGAAGGGGAGAAGAAGGGGCTGCTTGAGAAGATCAAGGACAAGCTGC
CAGGTCAGCACAGAAGGCCGAGGTCGAGCACGAGGTGGTCCCAACGGCCAC
TGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCAGGAGAAGAAGGGGTCTTGGACAAG
ATCAAGGAGAAGATCCCTGGCTTCCACT

Secuencia de la proteína traducida Opfi-DHN-like. Se tienen 148 aminoácidos traducidos, número de accesoión en NCBI: AKC92526.1

>*OpfiDHN_like*

EEEGDDEDKKKRKKEKKEKKGLKEKIKEKLPGHHKEQEEQEDKKKDH
HHDEEDTNIAIEKIHVEEVIYSEPSYPAPPPPHSEAEGEKKGLLEKIKDKLPQHK
KAEVEHEVPTATATVAEGEAQEKKGFLDKIKEKIPGFH

C.2 Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tipo dehidrina de *Leuchtenbergia principis*

Secuencia parcial de nucleótidos del gen tipo dehidrina de *Leuchtenbergia principis* (**Lep-DHN like**). Se tienen 493 nucleótidos secuenciados, número de acceso en NCBI: KP720562

GAGGAGGAGGGAGATGACGAAGACAAGAAGAGGAGGAAGAAGGAGAAG
AAAGAAAAGGAAGGATTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAACTTCCAGGCCACC
ACAAGGAGCAGGAAGAAGAACAAGAGGACAAGCAAAAGGATCATCATCATGA
TGAAGAGGACACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCACGTGGAAGAGGTGATC
TACTCGGAGCCATCTTACCCTGCCCCGGCCCCACCGCCACCTCATTTCGGAGGCC
GAAGGGGAGAAGAAGGGGCTGCTTGAGAAGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTC
AGCACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCACGAGGTGGTCCCAACGGCCACTGCCAC
CGTGGCCGAGGGGGAGGCCAGGAGAAGAAGGGGTTCTTGGACAAGATCAAG
GAGAAGATCCCTGGCTTCCACTCTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAGAAGGATGT
GGAGTGTGATCAACCCCCTTCAATCA

Secuencia de la proteína traducida Lep-DHN-like. Se tienen 164 aminoácidos traducidos, número de acceso en NCBI: AKC92527.1

>LepDHN-like

EEEGDDEDKKRRKKEKKEKEGLKEKIKEKLPGHHKEQEEQEDKQKDHHHDE
EDTNIAIEKIHVEEVIYSEPSYPAPAPPPPHSEAEGEKKGLLEKIKDKLPGQHKKAEA
EHEVVPTATATVAEGEAQEKKGFLDKIKEKIPGFHSKAPEEDKKDVECDQPPSI

C.3 Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tipo dehidrina de *Mammillaria bombycina*

Secuencia parcial de nucleótidos del gen tipo dehidrina de *Mammillaria bombycina* (**Mab-DHN like**). Se tienen 435 nucleótidos secuenciados, número de accesoión en NCBI: KP720560.

```
AAAGAAGGATTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAACTTCCAGGCCACCACAA
GGAGCAGGAAGAAGAACAAGAGGACAAGCAAAAGGATCATCATCATGATGAA
GAGGACACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCACGTGGAAGAGGTGATCTACTC
GGAGCCATCTTACCCTGCCCCGGCCCCACCGCCACCTCATTCGGAGGCCGAAG
GGGAGAAGAAGGGGCTGCTTGAGAAGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTGGTCA
GCACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCACGAGGTGGTCCCAACGGCCACTGCCACT
GTGGCCGAGGGGGAGGCCCAGGAGAAGAAGGGGTTTTTGGACAAGATCAAGG
AGAAGATCCCTGGCTTCCACTTTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAGAAGGATGTG
GAGTGTGATCAACCCCCT
```

Secuencia de la proteína traducida **Mab-DHN-like**. Se tienen 145 aminoácidos traducidos, número de accesoión en NCBI: AKC92525.1.

>MabDHN-like

```
KEGLKEKIKEKLPGHHKEQEEQEDKQKDHHHDEEDTNIAIEKIHVEEVIYSEP
SYPAPAPPPPHSEAEGEKKGLLEKIKDKLPGGQHKKAEEAEHEVVPTATATVAEGEA
QEKKGFLDKIKEKIPGFHFKAPEEDKKDVECDQPP
```

C. 4 Alineamiento múltiple de nucleótidos de las dehidrininas analizadas.

	460	470	480	490	500	510	520	
456	CATCGTTAAAAATTTATCAAGGACTATGGTAAACAGTTGAAGATCGGAGAGTTTTTTGGGGTCTCTAA	OpsDHN1 gen						
1	-----	OpfiDHN-like						
1	-----	LepDHN- like						
1	-----	MabDHN- like						
	530	540	550	560	570	580		
521	TTCCACATGTGAATTGATTITGCAGTCTGATGAGGAGGAGGGGAGATGACGAAGACAAGAAAGAGGAG	OpsDHN1 gen						
1	-----	OpfiDHN-like						
1	-----	LepDHN- like						
1	-----	MabDHN- like						
	590	600	610	620	630	640	650	
586	GAAAGAGGAGAGAAAGAAAGAAAGGATTGAAGGAGAGAAGATTAAAGGAGAAACTTCCAGGCCACCC	OpsDHN1 gen						
36	GAAAGAGGAGAGAAAGAAAGAAAGGATTGAAGGAGAGAAGATTAAAGGAGAAACTTCCAGGCCACCC	OpfiDHN-like						
36	GAAAGAGGAGAGAAAGGAGAGAGGAGGGCCCTGAAGGAGAGAAGATCAAGGAGAGAGCTGCCCGGCCACCC	LepDHN- like						
1	-----	MabDHN- like						
	660	670	680	690	700	710		
651	ACAAGGAGCAGGAAAGAAAGAAACAAGAGGAGACAAGCAAAAGGATCATCATCATCATCATCATGATGAA	OpsDHN1 gen						
101	ACAAGGAGCAGGAAAGAAAGAAACAAGAGGAGACAAGCAAAAGGATCATCATCATCATCATCATGATGAA	OpfiDHN-like						
101	ACAAGGAGCAGGAGGAGGAGGAGCAGGAGGAGACAAGCAGAGAGGACCCACCC-----ACGACGAG	LepDHN- like						
47	ACAAGGAGCAGGAAAGAAAGAAACAAGAGGAGACAAGCAAAAGGATCATCATC-----ATGATGAA	MabDHN- like						
	720	730	740	750	760	770	780	
716	GAGGACACCAATATAGCAATAGAGAAAGATCCACGTGGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCTTTA	OpsDHN1 gen						
166	GAGGACACCAATATAGCAATAGAGAAAGATCCACGTGGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCTTTA	OpfiDHN-like						
157	GAGGACACCAACATCGCCCATCGAGAAAGATCCACGTGGGAGGAGGTGATCTACAGCGAGCCAGCTA	LepDHN- like						
103	GAGGACACCAATATAGCAATAGAGAAAGATCCACGTGGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCTTTA	MabDHN- like						
	790	800	810	820	830	840		
781	CCCTGCCCGGGCCCCACCGCCACCTCATTTGGAGGCGGAAGGGGAGAAAGAGGGGCTGCTTGAGA	OpsDHN1 gen						
231	CCCTGCCCGGGCCCCACCGCCACCTCATTTGGAGGCGGAAGGGGAGAAAGAGGGGCTGCTTGAGA	OpfiDHN-like						
222	CCCCGCCCGGGCCCCCCCCCCCCCCCCACAGCGAGGCGGAGGGCGAGAAAGAGGGCTGCTTGAGA	LepDHN- like						
168	CCCTGCCCGGGCCCCACCGCCACCTCATTTGGAGGCGGAAGGGGAGAAAGAGGGGCTGCTTGAGA	MabDHN- like						
	850	860	870	880	890	900	910	
846	AGATCAAGGACAAGCTGCCAGGT---CAGCACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCACGAGGTGGTCCCA	OpsDHN1 gen						
296	AGATCAAGGACAAGCTGCCAGGT---CAGCACAAGAAGGCCGAGGTTCGAGCACGAGGTGGTCCCA	OpfiDHN-like						
287	AGATCAAGGACAAGCTGCCCGGC---CAGCACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCACGAGGTGGTGGCC	LepDHN- like						
233	AGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTGGTCAGCACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCACGAGGTGGTCCCA	MabDHN- like						
	920	930	940	950	960	970		
908	ACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCCCAGGAGAAAGAGGGGTTTTTTGGACAAGATCAA	OpsDHN1 gen						
358	ACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCCCAGGAGAAAGAGGGGTTCTTTGGACAAGATCAA	OpfiDHN-like						
349	ACCGCCACCGCCACCGTGGCCGAGGGCGAGGCCCCAGGAGAAAGAGGGCTTCTTTGGACAAGATCAA	LepDHN- like						
298	ACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCCCAGGAGAAAGAGGGGTTTTTTGGACAAGATCAA	MabDHN- like						
	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
973	GGAGAAGATCCCTGGCTTCCACTTTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAGAAGGATGTGGAGTGTGATC	OpsDHN1 gen						
423	GGAGAAGATCCCTGGCTTCCACT	OpfiDHN-like						
414	GGAGAAGATCCCCGGCTTCCACAGCAAGGCCCGGAGGAGGACAAGAAGGACGTGGAGTGCAGCC	LepDHN- like						
363	GGAGAAGATCCCTGGCTTCCACTTTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAGAAGGATGTGGAGTGTGATC	MabDHN- like						
	1050	1060	1070	1080	1090	1100		
1038	AACCCCTTTCATCAACTTAATTAAATTATGGCTAATGCATGTTTAATTATTGTTAATTTATTTTGG	OpsDHN1 gen						
445		OpfiDHN-like						
479	AGCCCCCAGCATC	LepDHN- like						
428	AACCCCT	MabDHN- like						

D.1 Valores numéricos del grado de desordenamiento de cada uno de los aminoácidos de las proteínas analizadas.

Número aa.	Secuencia MabDHN- like	Desordenamiento MabDHN-like	Secuencia LepDHN- like	Desordenamiento LepDHN-like
1	K	0.953851	E	0.97179
2	E	0.958513	E	0.970825
3	G	0.961778	E	0.967282
4	L	0.964244	G	0.97019
5	K	0.963199	D	0.967116
6	E	0.962933	D	0.964142
7	K	0.964455	E	0.963821
8	I	0.964178	D	0.96395
9	K	0.96389	K	0.963688
10	E	0.962725	K	0.962927
11	K	0.961084	R	0.962968
12	L	0.958164	R	0.964309
13	P	0.957254	K	0.962145
14	G	0.958977	K	0.9606
15	H	0.959655	E	0.959112
16	H	0.956078	K	0.96105
17	K	0.953796	K	0.961718
18	E	0.949121	E	0.963174
19	Q	0.945301	K	0.964159
20	E	0.937511	E	0.964686
21	E	0.925541	G	0.965214

22	E	0.930481	L	0.965214
23	Q	0.925541	K	0.964151
24	E	0.90631	E	0.962137
25	D	0.922598	K	0.961229
26	K	0.898741	I	0.960814
27	Q	0.898741	K	0.960814
28	K	0.909572	E	0.960924
29	D	0.907166	K	0.959187
30	H	0.88368	L	0.958292
31	H	0.822358	P	0.960629
32	H	0.825979	G	0.96287
33	D	0.892644	H	0.963652
34	E	0.892644	H	0.960432
35	E	0.912724	K	0.95795
36	D	0.89155	E	0.954205
37	T	0.90513	Q	0.949134
38	N	0.884243	E	0.941088
39	I	0.880062	E	0.925541
40	A	0.853141	E	0.930481
41	I	0.844744	Q	0.925541
42	E	0.837279	E	0.90631
43	K	0.834296	D	0.922598
44	I	0.84934	K	0.898741
45	H	0.816633	Q	0.898741
46	V	0.831582	K	0.909572
47	E	0.853937	D	0.907166

48	E	0.844641	H	0.88368
49	V	0.863221	H	0.822358
50	I	0.844761	H	0.825979
51	Y	0.869074	D	0.892644
52	S	0.873081	E	0.892644
53	E	0.881682	E	0.912724
54	P	0.876352	D	0.89155
55	S	0.814902	T	0.90513
56	Y	0.732979	N	0.884243
57	P	0.789556	I	0.880062
58	A	0.830407	A	0.853141
59	P	0.787637	I	0.844744
60	A	0.848366	E	0.837279
61	P	0.854214	K	0.834296
62	P	0.891048	I	0.84934
63	P	0.852777	H	0.816633
64	P	0.866154	V	0.831582
65	H	0.889242	E	0.853937
66	S	0.896906	E	0.844641
67	E	0.914577	V	0.863221
68	A	0.891882	I	0.844761
69	E	0.880565	Y	0.869074
70	G	0.916386	S	0.873081
71	E	0.921925	E	0.881682
72	K	0.941943	P	0.876352
73	K	0.927551	S	0.814902

74	G	0.927551	Y	0.732979
75	L	0.920633	P	0.789556
76	L	0.917085	A	0.830407
77	E	0.921053	P	0.787637
78	K	0.895463	A	0.848366
79	I	0.912041	P	0.854214
80	K	0.886832	P	0.891048
81	D	0.886832	P	0.852777
82	K	0.864976	P	0.866154
83	L	0.835674	H	0.889242
84	P	0.807892	S	0.897235
85	G	0.75186	E	0.908328
86	G	0.74752	A	0.897344
87	Q	0.765552	E	0.890557
88	H	0.741786	G	0.908365
89	K	0.788994	E	0.929457
90	K	0.741786	K	0.938396
91	A	0.733878	K	0.932651
92	E	0.733878	G	0.927332
93	A	0.733878	L	0.926761
94	E	0.733878	L	0.892567
95	H	0.733878	E	0.90477
96	E	0.684562	K	0.90477
97	V	0.684562	I	0.897316
98	V	0.625747	K	0.876864
99	P	0.625747	D	0.876768

100	T	0.625747	K	0.850815
101	A	0.625747	L	0.824168
102	T	0.684562	P	0.770214
103	A	0.684562	G	0.731787
104	T	0.67098	Q	0.775345
105	V	0.67098	H	0.765552
106	A	0.67098	K	0.765552
107	E	0.535242	K	0.765552
108	G	0.523724	A	0.733878
109	E	0.448074	E	0.764126
110	A	0.448074	A	0.748714
111	Q	0.398284	E	0.748714
112	E	0.45283	H	0.733878
113	K	0.45283	E	0.593544
114	K	0.53363	V	0.593544
115	G	0.469807	V	0.66371
116	F	0.523191	P	0.648539
117	L	0.512825	T	0.500351
118	D	0.564319	A	0.648539
119	K	0.564319	T	0.66371
120	I	0.564892	A	0.700815
121	K	0.522522	T	0.564764
122	E	0.555577	V	0.704327
123	K	0.594502	A	0.67098
124	I	0.663245	E	0.535242
125	P	0.758798	G	0.523724

126	G	0.80221	E	0.553063
127	F	0.829949	A	0.553063
128	H	0.796329	Q	0.497937
129	F	0.792182	E	0.57418
130	K	0.759113	K	0.57418
131	A	0.797979	K	0.656253
132	P	0.791954	G	0.596135
133	E	0.767305	F	0.643011
134	E	0.747904	L	0.628057
135	D	0.732547	D	0.679555
136	K	0.735097	K	0.679555
137	K	0.800096	I	0.673941
138	D	0.862898	K	0.601836
139	V	0.852815	E	0.637291
140	E	0.845166	K	0.673426
141	C	0.900792	I	0.748932
142	D	0.901451	P	0.833491
143	Q	0.876353	G	0.877741

Numero de aa.	Secuencia OpfiDHN- like	Desordenamiento OpfiDHN-like	Secuencia OpsDHN1	Desordenamiento OpsDHN1
1	E	0.963466	M	0.998
2	E	0.964224	A	0.999
3	E	0.962719	E	0.999

4	G	0.964462	E	0.997
5	D	0.963236	H	0.993
6	D	0.961273	Q	0.973
7	E	0.960809	K	0.962
8	D	0.961566	G	0.98
9	K	0.9613	D	0.965
10	K	0.95897	N	0.945
11	K	0.959184	V	0.951
12	R	0.960796	N	0.931
13	K	0.95761	V	0.91
14	K	0.956008	E	0.888
15	E	0.955738	S	0.875
16	K	0.956808	S	0.858
17	K	0.957421	D	0.835
18	E	0.958851	R	0.789
19	K	0.960309	G	0.742
20	K	0.961555	L	0.741
21	G	0.962359	F	0.725
22	L	0.962359	D	0.702
23	K	0.961102	F	0.756
24	E	0.958855	M	0.778
25	K	0.956903	K	0.794
26	I	0.957306	K	0.777
27	K	0.957306	N	0.783
28	E	0.955426	K	0.785
29	K	0.953338	E	0.777

30	L	0.951613	S	0.78
31	P	0.949629	G	0.756
32	G	0.947757	D	0.71
33	H	0.94718	E	0.668
34	H	0.946006	K	0.645
35	K	0.950256	K	0.667
36	E	0.950256	D	0.678
37	Q	0.949219	Q	0.68
38	E	0.940862	E	0.669
39	E	0.928306	E	0.661
40	E	0.913985	V	0.682
41	Q	0.894984	I	0.657
42	E	0.886484	A	0.597
43	D	0.918411	T	0.602
44	K	0.918411	E	0.605
45	K	0.893482	F	0.64
46	K	0.887857	H	0.625
47	D	0.869826	H	0.667
48	H	0.888613	K	0.686
49	H	0.888613	V	0.709
50	H	0.869943	E	0.708
51	H	0.888171	V	0.739
52	H	0.854577	S	0.722
53	H	0.878493	K	0.73
54	D	0.8969	E	0.757
55	E	0.900514	D	0.783

56	E	0.908929	K	0.769
57	D	0.863141	H	0.754
58	T	0.869804	D	0.775
59	N	0.819311	E	0.787
60	I	0.804331	N	0.804
61	A	0.740035	K	0.799
62	I	0.781175	E	0.798
63	E	0.778839	G	0.819
64	K	0.80199	G	0.842
65	I	0.811484	L	0.864
66	H	0.793255	L	0.88
67	V	0.805946	H	0.881
68	E	0.82942	K	0.886
69	E	0.822983	L	0.901
70	V	0.857585	H	0.896
71	I	0.844761	R	0.897
72	Y	0.869074	S	0.905
73	S	0.873081	D	0.912
74	E	0.881682	A	0.919
75	P	0.876352	S	0.919
76	S	0.814902	S	0.919
77	Y	0.732979	S	0.921
78	P	0.789556	S	0.919
79	A	0.830407	S	0.915
80	P	0.787637	D	0.912
81	A	0.848366	E	0.902

82	P	0.854214	E	0.903
83	P	0.891048	E	0.898
84	P	0.852777	G	0.892
85	P	0.866154	D	0.885
86	H	0.889242	D	0.875
87	S	0.897235	E	0.847
88	E	0.908328	D	0.844
89	A	0.897344	K	0.831
90	E	0.890557	K	0.811
91	G	0.908365	R	0.8
92	E	0.929457	R	0.785
93	K	0.928992	K	0.762
94	K	0.922798	K	0.748
95	G	0.914412	E	0.723
96	L	0.913981	K	0.697
97	L	0.878384	K	0.662
98	E	0.894972	E	0.62
99	K	0.894972	K	0.597
100	I	0.886706	K	0.57
101	K	0.863368	G	0.57
102	D	0.865073	L	0.563
103	K	0.836218	K	0.557
104	L	0.808728	E	0.575
105	P	0.753515	K	0.602
106	G	0.712953	I	0.611
107	Q	0.761481	K	0.578

108	H	0.749807	E	0.578
109	K	0.749807	K	0.582
110	K	0.749807	L	0.602
111	A	0.716428	P	0.603
112	E	0.74994	G	0.621
113	V	0.73574	H	0.642
114	E	0.73574	H	0.675
115	H	0.716428	K	0.702
116	E	0.570477	E	0.714
117	V	0.570477	Q	0.725
118	V	0.640116	E	0.727
119	P	0.628305	E	0.741
120	T	0.476181	E	0.752
121	A	0.628305	Q	0.749
122	T	0.640116	E	0.717
123	A	0.682415	D	0.704
124	T	0.539072	K	0.718
125	V	0.677764	Q	0.728
126	A	0.642761	K	0.738
127	E	0.508692	D	0.74
128	G	0.491202	H	0.756
129	E	0.499212	H	0.778
130	A	0.45142	H	0.793
131	Q	0.411616	H	0.802
132	E	0.427843	H	0.814
133	K	0.363856	H	0.814

134	K	0.409516	D	0.825
135	G	0.351027	E	0.821
136	F	0.369489	E	0.834
137	L	0.321455	D	0.833
138	D	0.36276	T	0.824
139	K	0.426062	N	0.821
140	I	0.385906	I	0.831
141	K	0.398964	A	0.811
142	E	0.422194	I	0.782
143	K	0.456757	E	0.736
144	I	0.49569	K	0.698
145	P	0.58157	I	0.714
146	G	0.681032	H	0.721
147	F	0.736073	V	0.734
148	H	0.701319	E	0.695
149			E	0.668
150			V	0.667
151			I	0.683
152			Y	0.691
153			S	0.688
154			E	0.708
155			P	0.743
156			S	0.785
157			Y	0.814
158			P	0.78
159			A	0.786

160			P	0.744
161			A	0.693
162			P	0.638
163			P	0.597
164			P	0.583
165			P	0.562
166			H	0.546
167			L	0.553
168			E	0.515
169			A	0.544
170			E	0.535
171			G	0.53
172			E	0.495
173			K	0.46
174			K	0.451
175			G	0.475
176			L	0.502
177			L	0.48
178			E	0.432
179			K	0.468
180			I	0.509
181			K	0.505
182			D	0.542
183			K	0.612
184			L	0.689
185			P	0.696

186			G	0.752
187			Q	0.739
188			H	0.72
189			K	0.736
190			K	0.727
191			A	0.744
192			E	0.745
193			A	0.758
194			E	0.747
195			H	0.781
196			E	0.783
197			V	0.789
198			V	0.768
199			P	0.75
200			T	0.751
201			A	0.693
202			T	0.653
203			A	0.656
204			T	0.638
205			V	0.607
206			A	0.628
207			E	0.604
208			G	0.617
209			E	0.588
210			A	0.565
211			Q	0.529

212			E	0.47
213			K	0.413
214			K	0.364
215			G	0.404
216			F	0.47
217			L	0.404
218			D	0.434
219			K	0.441
220			I	0.493
221			K	0.395
222			E	0.369
223			K	0.382
224			I	0.4
225			P	0.38
226			G	0.433
227			F	0.5
228			H	0.558
229			F	0.655
230			K	0.688
231			A	0.73
232			P	0.74
233			E	0.757
234			E	0.775
235			D	0.819
236			K	0.82
237			K	0.816

238			D	0.842
239			V	0.951
240			E	0.971
241			C	0.964
242			D	0.944
243			Q	0.973
244			P	0.97
245			P	0.971
246			S	0.968
247			S	0.943
248			T	0.92

D.2 Valores numéricos de la expresión normalizada del análisis de qPCR.

D.2.1 Resultados qPCR interacción *M. bombycina* con ABA 100µM

ABA 100µM	Expresión normalizada	Promedio	Desv. Est.
Control	1	1	0
	1		
	1		
1.5 horas	3.18545454	3.13854684	0.08500005
	3.1897573		
	3.04042868		
6 horas	1.42758297	1.49612205	0.2023233
	1.33697103		
	1.72381215		
12 horas	3.337098	3.24130107	0.32416271
	2.88003592		
	3.50676929		

D.2.2 Resultados qPCR interacción *M. bombycina* con frío a -20°C

Frío -20°C	Expresión Normalizada	Promedio	Desv. Est.
Control	1	1	0
	1		
	1		
1 hora	0.62289564	0.81288904	0.2825774
	1.13761791		
	0.67815357		
2 horas	3.23034137	3.10889623	0.45666314
	3.49256036		
	2.60378697		
4 horas	1.20306618	0.96239355	0.32533952
	1.0918638		
	0.59225068		

D.2.3 Resultados qPCR interacción *M. bombycina* con Heridas

Heridas	Expresión Normalizada	Promedio	Desv. Est.
Control	1	1	0
	1		
	1		
10 minutos	57.0972769	52.1082103	9.33162252
	57.8847768		
	41.3425774		
30 minutos	3.29746064	3.28331296	0.52988877
	3.80598622		
	2.74649203		

Anexo E. FOTOGRAFÍAS DE LAS CACTÁCEAS UTILIZADAS.

E.1 Fotografías de las tres especies de cactáceas utilizadas *in vitro*.



Ejemplares de *Mammillaria bombycina* *in vitro*



Ejemplares de *Opuntia ficus-indica* in vitro.



Ejemplares de *Leuchtenbergia principis* in vitro.

E.2 Brotes de *M. bombycina* utilizados para los estudios de expresión



Brotes completos de *M. bombycina* utilizados en los estudios de expresión génica.

12. ARTÍCULOS PUBLICADOS

ΦΥTON

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY
REVISTA INTERNACIONAL DE BOTANICA EXPERIMENTAL

ISSN 0031 9457

Founded 1951 by Fundada en 1951 por

Miguel Mario Raggio & Nora Moro de Raggio

Editor-in-Chief: Dr. Carlos A. Basso

Publicada por/ Published by: FUNDACIÓN RÓMULO RAGGIO

Director General: Dr. Mario Miguel Raggio

Gaspar Campos 861, 1638 Vicente López (BA) ARGENTINA

TEL: 54-11-4796-1456 / TELFAX: 54-11-4791-0868

www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/ / fund_r_raggio@hotmail.com

FECHA: 24.01.2016

José Francisco Morales Domínguez, e-mail: jfmoral@correo.uaa.mx

Departamento de Química

Universidad Autónoma de Aguascalientes

Av. Universidad No. 940, Ciudad Universitaria

C.P. 20131; Aguascalientes

Ags., México.

De nuestra mayor consideración:

Tenemos el agrado de informarle que el manuscrito **“Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti”**

por los autores: **Sandra Hernández-Camacho, Eugenio Pérez-Molphe-Balch, Ángel G. Alpuche-Solís y José Francisco Morales-Domínguez** ha sido aceptado para publicación en el Volumen 86 (2017) de ΦΥTON INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY.

Saludamos a Ud. muy atentamente,

Alejandra Krüsemann de Raggio

Por los Editores de ΦΥTON