



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE UN GEN TIPO DEHIDRINA EN *Mammillaria
bombycina*, INDUCIDO POR FITOHORMONAS

PRESENTA

IBQ Liliana Mercado Díaz de León

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
VEGETAL

TUTOR

Dr. José Francisco Morales Domínguez

COMITÉ TUTORAL

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Aguascalientes, Ags., Noviembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS
P R E S E N T E

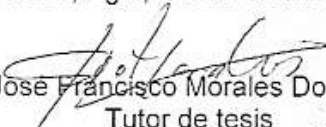
Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **LILIANA MERCADO DÍAZ DE LEÓN** con ID 97427 quien realizó la tesis titulada: **ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE UN GEN TIPO DEHIDRINA EN *Mammillaria bombycina*, INDUCIDO POR FITOHORMONAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

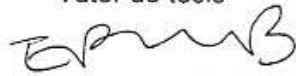
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

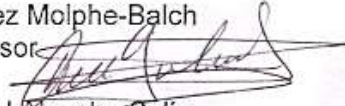
ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 9 de noviembre de 2018.


Dr. José Francisco Morales Domínguez
Tutor de tesis


Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch
Asesor


Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Asesor

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



LILIANA MERCADO DIAZ DE LEON
MAESTRIA EN CIENCIAS, AREA BIOTECNOLOGIA VEGETAL
P R E S E N T E.

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: "**ANALISIS DE EXPRESION DE UN GEN TIPO DEHIDRINA EN *Mammillaria bombycina*, INDUCIDO POR FITOHORMONAS**", 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 16 de noviembre de 2018

"Se lumen proferre"

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con número de beca 602753.

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez por ser mi guía en este proyecto, por todo su apoyo, conocimiento y paciencia.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch por todas sus enseñanzas y por despertar en mí el interés por la Biotecnología Vegetal.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por todo su apoyo y atención. Y por ser incentivo de calidad en mi trabajo.

Al Dr. Abraham Loera Muro y su equipo de trabajo por su gran apoyo y hospitalidad en su laboratorio en el CIBNOR.

A la Dra. Sandra Hernández Camacho por permitirme continuar con su proyecto.

A la Dra. Cristina Garcidueñas, al M. en C. Issac Reyes, y a Guillermo Cabral por su amable ayuda y orientación.

A mi amigo Miguel Marín por su asesoría en estadística.

A mis profesores de posgrado por todo su conocimiento.

A mis compañeros del Laboratorio 60; Nancy, Josafath, Mariana, Daniel, Carolina, Vivian, Fanny, Mario, Viviana, Juan Pablo y Mario Arzate, por su amistad y apoyo en los momentos de duda.

A mi familia y amigos, por su cariño y siempre estar presentes.

Y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, mi querida alma mater.

DEDICATORIAS

A mis padres,

Emma y Jayme, por su infinito apoyo y cariño.

A mis hermanos,

Laura y Juan Carlos, mis mejores compañeros de vida.



INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN9

2. ANTECEDENTES 11

 2.1 Cactáceas..... 11

 2.1.1 Taxonomía y clasificación 11

 2.1.2 Interés económico..... 13

 2.1.3 Metabolismo ácido de las Crassulaceas 13

 2.1.4 *Mammillaria bombycina* Quehl 1910 15

 2.2 Proteínas tipo LEA..... 17

 2.2.1 Clasificación de las proteínas tipo LEA 20

 2.2.2 Las proteínas LEA 2 o dehidrinas 22

 2.2.3 Actividad de las dehidrinas ante factores abióticos 23

 2.2.4 Actividad de las dehidrinas ante factores bióticos 25

 2.2.5 Estudios de expresión de proteínas tipo dehidrinas 25

 2.2.3.1 Gen *MabDHN* en *M. bombycina*..... 27

 2.3 Inducción de expresión de proteínas tipo dehidrinas por Fitohormonas..... 28

 2.3.1 Ácido jasmónico..... 29

 2.3.2 Etileno..... 30

 2.3.3 Ácido salicílico 32

 2.4 Otros genes relacionados a la resistencia al estrés vegetal 33

 2.4.1 Expansinas 33

 2.4.1. 1 Regulación de la expresión de expansinas por efecto del ácido indolacético (AIA) 34

3 JUSTIFICACIÓN..... 35

4 HIPÓTESIS..... 36

5 OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo general.....	36
5.2 Objetivos particulares	36
6 METODOLOGÍA	37
6.1 Esquema general de metodología para gen tipo dehidrina	37
6.2 Esquema general de metodología para identificación de gen tipo expansina	38
6.3 Obtención de material vegetal por propagación <i>in vitro</i> <i>M. bombycina</i>	39
6.4 Predicción <i>in silico</i> de la expresión génica en <i>Arabidopsis thaliana</i> inducida por fitohormonas.....	39
6.5 Análisis de expresión del gen <i>MabDHN</i> tipo dehidrina en <i>M. bombycina</i> inducido por fitohormonas.....	40
6.5.1 Inducción de la expresión del gen por Ácido Salicílico (AS)	40
6.5.2 Inducción de la expresión del gen por Ácido Jasmónico (AJ).....	40
6.5.3 Inducción de la expresión del gen por Etileno (ET)	40
6.5.4 Extracción de RNA total en <i>M. bombycina</i>	41
6.5.5 Síntesis de cDNA.....	41
6.5.6 Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR)	42
6.5.7 Análisis estadístico	43
6.6 Identificación y caracterización de un gen tipo expansina en <i>Mammillaria bombycina</i>	44
6.6.1 Extracción de DNA en <i>M. bombycina</i>	44
6.6.2 Identificación por PCR de un gen tipo expansina en <i>M. bombycina</i>	45
6.6.3 Purificación de fragmentos amplificados	45
6.6.4 Ligación del fragmento tipo expansina amplificado en el vector pGEM-t easy	46
6.6.5 Transformación genética bacteriana por choque térmico.	46
6.6.6 Extracción de plásmidos.	47

6.6.7 Verificación de la ligación mediante restricción	48
6.6.8 Secuenciación de fragmentos amplificados	48
6.6.9 Análisis <i>in silico</i> del fragmentos amplificado.....	48
6.6.9.1 Alineamiento múltiple	48
6.6.9.2 Análisis de dominios	49
6.6.9.3 Modelado 3D del fragmento de la proteína tipo expansina (MbEXP)	50
6.6.9.4 Análisis filogenético	50
7 RESULTADOS	52
7.1 Propagación <i>in vitro</i> de <i>M. bombycina</i>	52
7.2 Análisis <i>in silico</i> de un gen tipo dehidrina en <i>A. thaliana</i>	53
7.2.1 Expresión de <i>ERD10</i> de <i>A. thaliana</i> inducido por fitohormonas	53
7.2.2 Análisis de co-expresión de <i>ERD10</i> de <i>A. thaliana</i>	54
7.3 Análisis de expresión en tiempo real (qPCR) de <i>MabDHN</i> tipo dehidrina en <i>M. bombycina</i> inducido por fitohormonas.....	56
7.3.1 Expresión de <i>MabDHN</i> inducido por SA	56
7.3.2 Expresión de <i>MabDHN</i> inducido por AJ	56
7.3.3 Expresión de <i>MabDHN</i> inducido por ET.....	57
7.4 Identificación y caracterización de un gen tipo expansina en <i>M. bombycina</i>	60
7.4.1 Clonación en vector pGEM de un fragmento tipo expansina.....	61
7.4.2 Secuenciación de un fragmento del gen tipo expansina.....	62
7.4.3 Caracterización <i>in silico</i> de un fragmento tipo expansina.....	62
7.4.3.1 Análisis de dominios	63
7.4.3.2 Modelado del fragmento de la proteínas tipo expansina MbEXP.....	64
7.4.3.3 Análisis filogenético	65
8 DISCUSIÓN	66
9 CONCLUSIONES	76
10 GLOSARIO	77

11 BIBLIOGRAFÍA	78
12 ANEXOS	86
A) Preparación de medios de cultivo.....	86
A 1. Soluciones concentradas Stock para medio MS (Murashige y Skoog).....	86
A 2. Procedimiento de preparación de medio de cultivo MS.....	87
B) Soluciones Buffer para extracción de ADN.....	88
B 1. Solución Buffer de lisis para extracción de ADN de cactáceas.....	88
C) Soluciones método de extracción de plásmidos Birnboim y Doly (1979).....	88
C1. Solución Birnboim I.....	88
C2. Solución Birnboim II.....	88
C2. Solución Birnboim III.....	88
D) Secuencias de los genes de estudio.....	89
D1. Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen <i>MabDHN</i>	89
D2. Secuencia parcial de aminoácidos de ERD10 (AT1G20450) en <i>A. thaliana</i>	89
E) Características de los oligonucleótidos utilizados.....	90
E1. Características de los oligonucleótidos F <i>MabDHN</i> y R <i>MabDHN</i>	90
E2. Características de los oligonucleótidos F <i>MabCuant</i> y R <i>MabCuant</i>	90
E3. Características de los oligonucleótidos F 25S y R 25S en base a la secuencia de una región del gen 25S de jitomate.....	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>M. bombycina</i> en su estado silvestre..	17
Figura 2 . Mapa del vector pGEM®-t easy (PROMEGA).	46
Figura 3. Propagación <i>in vitro</i> de <i>M. bombycina</i> .	52
Figura 4. Expresión de <i>ERD10</i> de <i>A. thaliana</i> inducido por MeJA con respecto al tiempo..	53
Figura 5. Análisis de co-expresión de <i>ERD10</i> en <i>A. thaliana</i> con otras proteínas.	54
Figura 6. Nivel de expresión de <i>MabDHN</i> inducido por AS a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qPCR..	56
Figura 7. Nivel de expresión de <i>MabDHN</i> inducido por AJ a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qpPCR..	57
Figura 8. Nivel de expresión de <i>MabDHN</i> inducido por ET a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qPCR..	58
Figura 9. Nivel de expresión de <i>MabDHN</i> inducido por ET con pretratamiento de 24 hrs y a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qPCR..	58
Figura 10. Nivel de expresión de <i>MabDHN</i> inducido por ET a tiempos de exposición de 3, 8, 24, 27, 32 y 48 hrs analizado mediante qPCR.	59
Figura 11. Identificación por PCR de expansinas en <i>M. bombycina</i> .	60
Figura 12. Verificación de clonación por restricción con <i>EcoRI</i> del fragmento tipo expansina en el vector pGEM-t easy.	61
Figura 13. Traducción virtual de secuencia tipo expansina.	62
Figura 14. Alineamiento múltiple de genes tipo expansina en diferentes organismos.	63
Figura 15. Dominio EG45 endoglucanasa like en fragmento MbEXP de <i>M. bombycina</i> .	64
Figura 17. Estructura 3D del fragmento de la proteína putativa MbEXP de <i>M. bombycina</i> .	64
Figura 16. Dendrograma de identidad de proteínas tipo expansina.	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Secuencias de proteínas tipo expansinas homólogas a MbEXP. 49

Tabla 2. Secuencias tipo EXPA, EXPB, EXLA y EXLB. 50

Tabla 3. Expresión de *ERD10* en *A. thaliana* en respuesta a MeJA..... 54

Tabla 4 Relación de co-expresión de proteína ERD10 de *A. thaliana* con otras proteínas.
..... 55

Tabla 5. Cuantificación de productos de dna de *M. bombycina*..... 60

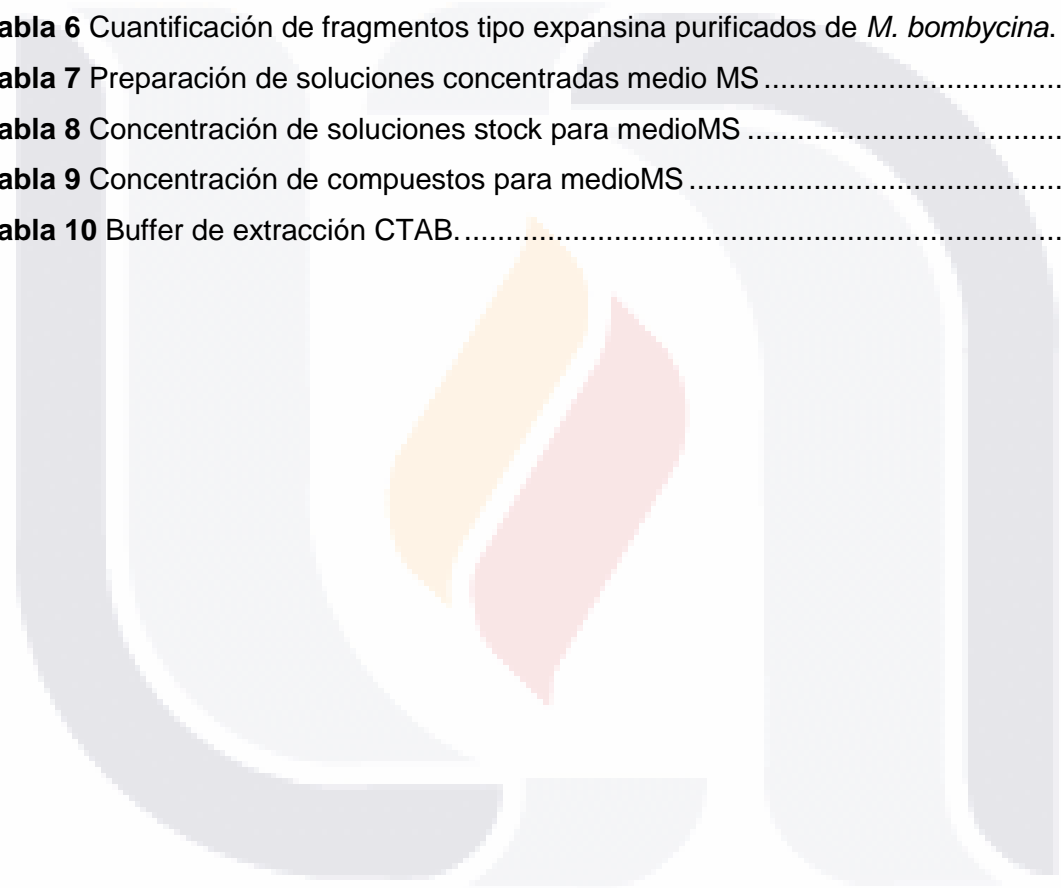
Tabla 6 Cuantificación de fragmentos tipo expansina purificados de *M. bombycina*. 61

Tabla 7 Preparación de soluciones concentradas medio MS 86

Tabla 8 Concentración de soluciones stock para medioMS 87

Tabla 9 Concentración de compuestos para medioMS 87

Tabla 10 Buffer de extracción CTAB..... 88



RESUMEN

Las cactáceas poseen gran capacidad adaptativa y resistencia ante varios tipos de estrés ambiental. Una de estas respuestas es la expresión de proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant), en especial las del tipo de dehidrinas. En *Mammillaria bombycina* se ha identificado un fragmento de un gen codificante para una dehidrina (*MabDHN*), el cual en estudios previos se ha visto incrementa su expresión ante frío y congelamiento. Por otro lado, se ha descrito que las fitohormonas tienen un papel fundamental en la inducción de genes tipo dehidrina como respuesta a factores tanto bióticos como abióticos. De acuerdo con estos antecedentes, en este trabajo se realizaron estudios bioinformáticos para predecir la expresión de *ERD10* de *Arabidopsis thaliana*, homólogo a *MabDHN*. Los resultados indican una disminución en la expresión de *ERD10* ante la presencia de Metil Jasmonato (MeJA), mientras que el análisis de coexpresión mostró una relación de *ERD10* con otras proteínas tipo dehidrinas relacionadas al frío y congelamiento. Para el análisis de expresión de *MabDHN* se utilizaron explantes de *M. bombycina* tratados con ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET). Los resultados mostraron una disminución en la expresión de *MabDHN* ante la presencia de AS y AJ a concentración de 100 μM , mientras que con ET (etefón 200 μM) se obtuvo una mayor expresión a las 24 hrs, disminuyéndose a la mitad a las 27 hrs. También, se identificó y caracterizó un fragmento de una expansina en *M. bombycina* (*MbEXP*). El análisis *in silico* de este fragmento mostró que pertenece a una proteína α -expansina-like. Las proteínas tipo expansinas tienen relevante importancia porque están relacionadas a respuestas de defensa al estrés ambiental y están involucradas a la extensibilidad de la pared celular vegetal. Hasta el momento no se han reportado genes tipo expansina en *M. bombycina*.

Palabras clave Proteínas LEA– Cactacea – Respuesta a Estrés – Fitohormonas – qPCR

ABSTRACT

The cactaceae family have an adaptive capacity and resistance against diverse environmental stress. One of their responses to stressful conditions is the expression of LEA proteins (Late Embryogenesis Abundant), especially those dehydrins-like proteins. In *Mammillaria bombycin* has been identified a fragment of a gene coding for a dehydrin (*MabDHN*), which in previous studies has been observed an increased expression under cold and freezing conditions. On the other hand, it has been described that phytohormones have a fundamental role in the induction of dehydrins-like genes as a response against biotic and abiotic factors. In this line, in this work we have performed bioinformatic studies to predict the expression of *ERD10* from *Arabidopsis thaliana*, homologous to *MabDHN*. Results shown that *ERD10* decreases its expression as effect from Methyl Jasmonate (MeJA); and through a coexpression analysis it was observed there is a relationship of *ERD10* with other dehydrins-like proteins related to cold and freezing conditions. To analyze *MabDHN* expression, it was used *M. bombycin* explants exposed to salicylic acid (AS), jasmonic acid (AJ) and ethylene (ET). The results showed a decrease in the expression of *MabDHN* in the presence of AS and AJ at 100 μ M concentration; however with ET (ethephon 200 μ M) there was a maximum expression at 24 hrs, with a decreasing in expression levels at 27 hrs. Also, it was identified and characterized gen fragment from an expansin in *M. bombicya* (*MbEXP*). The *in silico* analysis of this fragment showed that it belongs to a protein α -expansin-like. Expansin-like proteins have a huge importance because are biomolecules related to defense activity against environmental stress conditions, besides being involved in the extensibility of the plant cell wall. So far no expansin genes have been reported in *M. bombicya*.

Keywords LEA Proteins - Cactacea - Stress Response – Phytohormones – qPCR

1. INTRODUCCIÓN

Las cactáceas poseen gran capacidad adaptativa y resistencia ante varios tipos de estrés ambiental principalmente de tipo osmótico, debido a que han desarrollado mecanismos de defensa de tipo metabólico, fisiológico y génico.

Se sabe que una de las clases de proteínas que se expresan en respuestas a estímulos estresantes son las proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant) (Liu *et al.*, 2016), especialmente las del tipo II conocidas como dehidrinas, estas proteínas se caracterizan por poseer un segmento K, un segmento Y, y algunas de ellas un segmento S, además de otros Φ -segmentos menos conservados (Battaglia *et al.*, 2008). Las dehidrinas se acumulan durante la desecación de las semillas y en respuesta al déficit hídrico inducido por sequía, baja temperatura o salinidad, o todos ellos según la clase de dehidrina. Las funciones de este grupo de proteínas son muy variadas y dependen de cada una en particular, pero en general se les conoce como proteínas relacionadas a la defensa vegetal ante factores de estrés hídrico, su papel en la defensa de factores bióticos es poco conocido.

Otras de las proteínas expresadas ante estrés, son las expansinas, que están involucradas en la extensibilidad de la pared celular (Chen, *et al.*, 2017), apertura y cierre estomático, defensa ante diversos tipos de estrés vegetal tanto bióticos como abióticos, como salinidad, la sequía, el calor, el frío, el estrés oxidativo, ataque de herbívoros y microorganismos fitopatógenos (Guimaraes, *et al.*, 2017), entre otras funciones.

Existen muy pocos estudios reportados de dehidrinas y expansinas en cactáceas. Hasta la fecha se han identificado dehidrinas solo en *Opuntia streptacantha* y *Mammillaria bombycina* (Hernández-Camacho *et al.*, 2017; Ochoa-Alfaro *et al.*, 2012), esta última se considera una especie de alto valor para México al ser endémica de los estados de Jalisco y Aguascalientes. *M. bombycina* además corre grave peligro por su escasa población, limitada distribución, y su comercialización como planta de ornato, con cualquier alteración a su hábitat podría desaparecer (Manzo-Rodríguez, 2010), por lo que la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) la ha considerado una especie de protección especial (Meza-Rangel *et al.*, 2014), y debe ser protegida para evitar la pérdida de la biodiversidad mexicana.

El fragmento del gen *MabDHN* identificado por Hernández-Camacho *et al.*, (2017) en *M. bombycina* (Número de acceso en NCBI: KP720560) cuenta en su traducción virtual con 145 aminoácidos y codifica para una proteína tipo dehidrina ácida. En los estudios de expresión mostró mayor expresión por congelamiento (-20°C), por heridas y tratamiento con ABA 100 µM en 1.5 y 12 hrs, mientras que ante estrés por frío y alta salinidad no se encontraron cambios en su expresión. En este sentido se sabe que algunas fitohormonas pueden funcionar como moléculas de señalización en respuesta estímulos estresantes, actuando por si mismas o en sintonía con otras fitohormonas. Así durante el estrés, las plantas pueden sintetizar ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) o etileno (ET) para producir una red de transducción de señales y por lo tanto una compleja cascada de respuestas adaptativas que se ajuste al estímulo recibido (Memelink, 2009). Estas respuestas son manifestadas principalmente cuando la planta está en presencia de patógenos biotróficos, necrotrofos y hemibiotrofos (Díaz-Puentes, 2012).

En este trabajo se presenta un análisis de expresión del gen *MabDHN* tipo dehidrina en *M. bombycina* por qPCR inducido por AS 100 µM, AJ 100 µM y ET (Etefón 200 µM) a diferentes tiempos de exposición. Se observó una disminución en la expresión de *MabDHN* con AS y AJ en la concentración analizada, sin embargo con ET se observó una mayor expresión a las 24 y hasta las 27 hrs. Adicionalmente se reporta la identificación y caracterización *in silico* del primer fragmento tipo expansina reportado en *M. bombycina* (*MbEXP*) el cual fue clasificado como una α -expansina-like.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cactáceas

2.1.1 Taxonomía y clasificación

Las cactáceas son un grupo de especies vegetales caracterizadas por su gran especialización y adaptación al estrés principalmente de zonas semiáridas y áridas (Shishkova *et al.*, 2013), por lo que han servido de modelo para estudios anatómicos y ecológicos a pesar de su gran variabilidad morfológica y fenotípica. Estas plantas pertenecen al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Caryophyllales y familia Cactaceae (Hernández-Camacho, 2016). La familia Cactaceae se encuentra a su vez subdividida en cuatro subfamilias que son Cactoideae, Opuntioideae, Maihuenioideae y Pereskioideae, según las clasificó Shumann desde 1898, a excepción de la subfamilia Opuntioideae que fue clasificada por Burnett. Sin embargo anteriormente la familia se consideraba dividida solo en tres subfamilias; Cactoideae, Opuntioideae y Pereskioideae (Hernández-Camacho, 2016; Shishkova *et al.*, 2013). Siendo Opuntioideae y Cactoideae las subfamilias con mayor cantidad de especies representantes y características en común, por lo que se les conoce como cactus típicos (Edwards *et al.*, 2005).

Se han incluido aproximadamente 1500 a 1800 especies dentro de la familia Cactaceae (Shishkova *et al.*, 2013), en aproximadamente 127 géneros las cuales se encuentran distribuidas en el Norte y Sur de América, siendo México y en segundo lugar la región andina del suroeste y este de Brasil las zonas de mayor riqueza de especies, aunque se sabe que algunas especies han podido ser introducidas en África y Australia (Hernández-Hernández *et al.*, 2011) sólo la especie *Rhipsalis baccifera* habita el trópico asiático y africano. Esta familia se caracteriza por tener brotes cortos con espinas o areolas que son especializados y se encuentran adaptados a los climas áridos (Shishkova *et al.*, 2013).

En la subfamilia Opuntioideae, las especies se dividen en 5 tribus con aproximadamente 15 a 18 géneros distribuidos en regiones áridas, semiáridas y mésicas desde Canadá hasta América del Sur. Sus especies son de tallo suculento donde se realiza la fotosíntesis por metabolismo tipo CAM, las areolas o brotes cortos suelen tener espinas y/o pequeñas, caducas, espinas de púas llamadas gloquídios (Edwards, 2005; Shishkova *et al.*, 2013), sus hojas son pequeñas y efímeras, aunque en algunas especies pueden ser grandes y absorber gran cantidad de CO₂ para la fotosíntesis tradicional (Shishkova *et al.*,

2013), contienen células de xilema adaptadas para el almacenamiento de agua y sus ovarios son ínferos profundamente hundidos por lo que sus flores son epiginas (Edwards, 2005), contienen granos de polen poliforados con estructuras características de exine y semillas cubiertas por una estructura funicular conocida como arilo óseo (Edwards, 2005; Hernández-Hernández *et al.*, 2011).

Las especies de la subfamilia Cactoideae se dividen en 7 tribus (Cacteae, Cereae, Trichocereae, Notocacteae, Hylocereae, Pachycereae y Rhipsalideae) con aproximadamente 110 géneros distribuidos en regiones áridas y semi-áridas de selvas tropicales desde Canadá hasta el Sur de la Patagonia. Su hábitat produce que el crecimiento de sus raíces primarias sea dependiente del grado de estrés hídrico al que se ven sujetas (Shishkova *et al.*, 2013). Esta es la subfamilia más amplia y con mayor variedad morfológica, sin embargo, su caracterización es difícil ya que carecen de sinapomorfias claras para tribus (Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Tienen cierto parecido con la subfamilia Opuntioideae. Se caracterizan por tener tallos cortos y suculentos con espinas donde realizan su fotosíntesis por metabolismo CAM a falta de poseer hojas o ser muy reducidas, sus ovarios, al igual que Opuntioideae, son ínferos y sus flores epiginas (Edwards, 2005). Hernández-Hernández *et al.*, (2011), citan una clasificación de Gibson y Nobel (1986) en la cual dividen la subfamilia según la forma de su tallo en formas de barril, globosas y cilíndricas, donde la forma de barril abarca especies con tallos globulares o esféricos de una altura máxima de 0.5 a 2 metros; la forma cilíndrica abarca especies con tallos 10 o más veces más largos que anchos; mientras que la forma de cilindro puede además diferenciar especies según la ramificación de sus tallos, teniendo formas de columnar simple si el vástago cilíndrico no está ramificado, forma arborescente si el tronco se ramifica por encima de su base y forma arbustiva si carece de un tronco principal o tiene ramificaciones basitónicas, y además están aquellos cactus que tienen poco soporte mecánico y crecen soportados por otras plantas, a los cuales se les llama epífitas. A nivel molecular se caracterizan por la pérdida de un intrón en el gen del cloroplasto rpoC1.

Las especies pertenecientes a la subfamilia Pereskioideae son solo 17 y todas pertenecen al mismo género, *Pereskia*. Se encuentran distribuidas en bosques secos del Caribe y el Centro y Sur de América. Algunos autores consideran a esta subfamilia como los ancestros morfológicos y fisiológicos de otras subfamilias de cactáceas. Se caracterizan por ser arbustos y árboles cuyos tallos cortos y suculentos tienen capas epidérmicas e hipodérmicas poco desarrolladas, de madera fibrosa y densa, poseen hojas persistentes,

en ocasiones producidas en areolas (Edwards, 2005), algunas especies tienen ovarios súperos, pero aquellas que tienen ovarios íferos producen flores periginias, son suculentas o parcialmente suculentas (Butterworth y Wallace, 2005), por lo que almacenan menor cantidad de agua en sus tejidos que las otras subfamilias, sus hojas anchas, aplanadas y persistentes son capaces de realizar fotosíntesis C3 y en menor grado el metabolismo CAM (Shishkova *et al.*, 2013). Según datos filogenéticos, se cree que el género *Pereskia* es parafilético con tres clados principales (Edwards, 2006). Sin embargo, esta subfamilia es la que contiene una mayor diversidad ecológica, morfológica y anatómica, pues sus especies fueron clasificadas como subfamilia solo por carecer de similitudes con las dos subfamilias anteriormente mencionadas (Edwards, 2005). Las especies de la subfamilia *Maihueñoioideae* anteriormente pertenecían a la subfamilia *Pereskioideae*, sin embargo fue clasificada como una subfamilia diferente debido a su morfología y datos filogenéticos moleculares. Solo cuenta con dos especies distribuidas en regiones áridas y semiáridas de Argentina y Chile (Shishkova *et al.*, 2013).

2.1.2 Interés económico

Además de tener una fuerte importancia para estudios ecológicos por sus diversas adaptaciones a zonas áridas y semiáridas, las cactáceas también son valoradas como plantas de ornato, fuentes de alimento, bebidas, uso medicinal, aplicaciones en cosméticos, entre otras, lo que les aporta interés comercial y económico para el hombre (Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Manzo-Rodríguez, 2010).

2.1.3 Metabolismo ácido de las Crassulaceas

Las cactáceas son plantas que por naturaleza se encuentran sometidas a un estrés abiótico constante, producido por el ambiente en que se desarrollan de manera silvestre, el cual es zonas áridas y desérticas. Sin embargo, las cactáceas son parte de las plantas xerófitas, que son aquellas que han logrado adaptarse a estas condiciones y soportar la sequedad y altas temperaturas. Las xerófitas han desarrollado diversos mecanismos de adaptación como los tejidos suculentos, que son tejidos carnosos especializados en el almacenamiento de agua, pudiendo ser tallos, hojas o sistema radicular, para sobrevivir en condiciones secas y áridas. Es por esto que se les da el nombre de suculentas o crasas a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aquellas xerófitas con esta característica (Rivas-Rossi, 1996). Además, las semillas de las cactáceas soportan las sequías largos periodos de tiempo por permanecer sobre la superficie del suelo, hidratándose o deshidratándose constantemente hasta germinar, incluso aquellas que reciben menor cantidad de humedad antes de un periodo largo de deshidratación son capaces de germinar más rápidamente, además los cambios fisiológicos producidos por los periodos de deshidratación y posterior hidratación son almacenados y heredados a sus descendientes, brindando características de mayor resistencia y acumulación de biomasa a las nuevas plántulas (Dubrovsky, 1996).

Una de las características más representativas de las cactáceas como método adaptativo ante el estrés, es poseer un metabolismo conocido como Metabolismo ácido de las crassulaceas (MAC o en inglés CAM). Todas las cactáceas poseen este tipo de metabolismo, aunque es de interés mencionar que no todas las células de un individuo adquieren siempre el mismo tipo de metabolismo, esto es, en proporción la mayoría de las células de las cactáceas presentará metabolismo CAM, pero cierta porción podrá presentar otro tipo de metabolismo como el C3, existe así plantas CAM facultativas que varían su metabolismo de éste a C3 o C4 según el balance de carbono, como la especie *Portulacaria afra* L. que realizar la captación diurna de CO₂, la fotosíntesis C3, pero ante el estrés hídrico realiza el metabolismo CAM. El metabolismo CAM fue desarrollado como un sistema adaptativo por un proceso evolutivo frente al estrés osmótico producido por el clima seco y las altas temperaturas. Este metabolismo se caracteriza por mantener la apertura de los estomas durante la noche (periodo de oscuridad) y cerrarlos durante el día (periodo de luz), al contrario del metabolismo C3 y C4 (Guralnick y Gladsky, 2017). Durante la noche hay mayor humedad que durante el día, por lo que al cerrar los estomas en el día se logra una menor pérdida de agua por transpiración (Rivas-Rossi, 1996), además la temperatura de los tejidos ha disminuido en el periodo de oscuridad minimizando la evaporación del agua de los tejidos a la atmósfera, la temperatura óptima a la cual las especies con metabolismo tipo CAM pueden fijar el CO₂ durante la fase oscura es de aproximadamente 15°C (Hernández-Camacho, 2016). El dióxido de carbono es asimilado durante la noche en forma de carbonato por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de células fotosintéticas, con el cual sintetizan altas cantidades de ácido málico para ser almacenado en vacuolas, que se van acidificando entre más sea su contenido de ácido, y es esta la razón por la cual las cactáceas se caracterizan por tener vacuolas de gran tamaño y la anatomía de su mesófilo es foliar con células de parénquima esponjosas. Posteriormente, en el día el ácido

málico es descarboxilado liberando dióxido de carbono para ser utilizado por los cloroplastos en el ciclo de Calvin de la fotosíntesis (Rivas-Rossi, 1996; Guralnick y Gladsky, 2017), fijándose por la vía C3 y produciendo sacarosa y almidón, este último es almacenado en células fotosintéticas para producir fosfoenol piruvato y a su vez sacarosa durante la noche. Además de evitar la pérdida de agua, otra ventaja de este tipo de metabolismo es evitar la pérdida de CO₂ que es utilizado en la fase luminosa, debido a que los estomas se encuentran cerrados, por lo que la concentración de éste se aumenta y minimiza la probabilidad de llevarse a cabo la fotorrespiración o error de la enzima RuBisCO de tomar O₂ en su sitio activo en lugar de CO₂ (Hernández-Camacho, 2016). A pesar de todo, este mecanismo no tiene un alto rendimiento de producción pero permite a las plantas que viven en climas áridos sobrevivir.

2.1.4 *Mammillaria bombycina* Quehl 1910

El género *Mammillaria* es uno de los más representativos de la subfamilia Cactoideae por tener la mayor diversidad de especies, de las cuales una gran cantidad son endémicas de diversas regiones, por lo que se dice que el género no es monofilético (Butterworth y Wallace, 2004).

A este género se le han identificado como atributos génicos una alta diversidad pero baja diferenciación génica entre especies con relación a otras cactáceas globosas, esto puede deberse a la distribución discontinua característica de las *Mammillarias*, en el caso de *M. crucígera* y *M. napina*, los insectos que habitan la misma región que ellas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, como los himenopteros, dípteros y coleópteros, promueven una endogamia local, ya que se cree que estos insectos polinizan sus flores debido a su morfología. Además, la escases de individuos de estas especies endémicas, su aislamiento poblacional y dispersión limitada, promueve la deriva génica y la endogamia, influyendo a su vez en la estructura genética y la divergencia poblacional (Cornejo-Romero *et al.*, 2013). En general, las especies del género *Mammillaria* muestran sistemas de apareamiento mixto y autofecundación.

Mammillaria bombycina descrita por Quehl en 1910, es una cactácea silvestre mexicana endémica de los estados de Jalisco y Aguascalientes, encontrada en la parte suroeste de Aguascalientes, entre 1847 y 2417 metros de altitud, en colonias en paredes de cañadas o a ras del suelo cerca de las cañadas, particularmente en el suroeste en los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

municipios de Calvillo y Jesús María. Se ha observado que crece en zonas con suelos húmedos, asociada a musgos y encino (*Quercus rugosa*), y en zonas más secas asociada a gramíneas y otras cactáceas (Meza-Rangel *et al.*, 2014).

Morfológicamente son tubérculos verdes de forma globosa con ápices sutilmente hundidos y cubiertos con lana blanca la cual también cubre todo el tubérculo, además tiene axilas con lana blanca abundante y cerdas. Sus areolas, que son los puntos de crecimiento y desarrollo de espinas, flores, raíces y brotes, primero son redondeadas con algo de lana blanca y posteriormente son alargadas y desnudas, tiene entre 30 a 40 espinas radiales generalmente con la punta rojiza, delgadas y rígidas, dispuestas en horizontal en forma de peine. Mide aproximadamente 20 centímetros de altura con 6 centímetros de diámetro (Manzo-Rodríguez, 2010; Hernández-Camacho, 2016).

Es importante mencionar que *M. bombycina* al ser una planta endémica se considera una especie de alto valor para México y que corre grave peligro de extinción por su escasa población y limitada distribución, a cualquier alteración a su hábitat podría desaparecer (Manzo-Rodríguez, 2010), por lo tanto, la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) la ha considerado una especie de protección especial en su norma NOM-059-SEMARNAT-2010 (Meza-Rangel *et al.*, 2014), por lo que debería ser protegida como tal para evitar la pérdida de la biodiversidad mexicana.

M. bombycina es considerada una especie de alta belleza estética por su crecimiento en forma de racimo y la característica de su lana y espinas (Figura 1), por lo cual es comercializada como planta de ornato (Graham, 2014), además, se sabe que las cactáceas en México son comercializadas indiscriminadamente para su utilización en la elaboración de jugos concentrados, postres, jarabes, mermeladas y deshidratados, sin embargo, los especímenes recolectados para estos fines son comúnmente tomados directamente de su hábitat natural y rara vez son reemplazados o cultivados, lo que empobrece grandemente la población de la especie, esto puede apreciarse en la dificultad de encontrar individuos en zonas naturales, pues son los que crecen en condiciones menos visibles los que logran sobrevivir al saqueo. Aunado a la pequeña zona de distribución de esta cactácea, su baja tasa de crecimiento y sus largos ciclos de vida, su población se ve disminuida por actividades humanas como la destrucción del hábitat por asentamientos humanos, el saqueo ilegal o la introducción de animales en la zona. Según estudios, en los hábitats naturales de *M. bombycina*, la sequía de las zonas ocasiona escasez de alimento

para algunos roedores, orillándolos a consumir individuos jóvenes o semillas de algunas cactáceas silvestres entre ellas *M. bombycina* disminuyendo aún más la población de esta cactácea. Estos roedores pueden considerarse como depredadores, pues consumen al organismo vegetal como tal. Este tipo de estrés al igual que la sobreexplotación y saqueo es tan tajante que se convierte en un daño irreparable para la especie, debido a que la planta al ser extraída de su hábitat no puede mantener su ciclo reproductivo o incluso muere, dejando de lado la posibilidad de desarrollar mecanismos adaptativos de defensa (Meza-Rangel *et al.*, 2014).



Figura 1. Morfología de *M. bombycina* en su estado silvestre. Figura donada por el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la UAA, 2017.

2.2 Proteínas tipo LEA

Se sabe que el estrés es uno de los factores con mayor influencia en el desarrollo y evolución de los organismos, pero especialmente en las plantas, ya que al ser organismos fijos carentes de movilidad deben desarrollar sistemas de defensa específicos de tipo bioquímico, metabólico, fisiológico, morfológico o fenológico ante una condición identificada como estresante. Diversos estudios han identificado que una de las respuestas ante estos estímulos es la síntesis de proteínas de la embriogénesis tardía también conocidas como proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant) (Liu *et al.*, 2016), las cuales pertenecen a un tipo más general de proteínas altamente hidrofílicas conocidas como

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hidrofilinas, que a su vez pertenecen al grupo de proteínas no estructuradas o desordenadas conocidas como proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs) o proteínas no estructuradas (PINEs) por poseer alta flexibilidad estructural pudiendo adoptar diversas estructuras y reconocer de manera específica diversos ligandos (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011).

Las hidrofilinas están presentes en la mayoría de los seres vivos, acumulándose principalmente cuando una célula o un organismo es expuesto a condiciones limitadas de agua, refiriéndose a humedad ambiental, etapas de desarrollo relacionadas al déficit hídrico o estados de alta deshidratación (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011) además se caracterizan por su contenido del aminoácido glicina (Gly) superior al 6% y un índice de hidrofilicidad mayor que 1, lo que sugiere que las hidrofilinas representan una amplia adaptación al déficit hídrico (Battaglia *et al.*, 2008).

Las proteínas LEA, fueron encontradas por primera vez en 1981 por León Dure III (Battaglia *et al.*, 2008) en la etapa tardía de la embriogénesis (última etapa de maduración) de la semilla de algodón, etapa en la que se acumulan en abundancia (Liu, *et al.*, 2016), y posteriormente fueron encontradas también tejidos vegetativos sometidos a déficit hídrico producido por sequía, salinidad o congelamiento. Son proteínas altamente flexibles en solución acuosa y carecen de similitud con otras proteínas celulares (Cuevas-Velázquez Covarrubias-Robles, 2011), son estables al calor y no coagulan en ebullición (Pereyra-Cardozo *et al.*, 2014), son hidrofílicas debido a su alto contenido de aminoácidos cargados como alanina, serina / treonina y a su muy bajo contenido de aminoácidos no polares como triptófano y cisteína su distribución es a nivel subcelular estando presentes en el citosol, las mitocondrias, los cloroplastos, el retículo endoplásmico y el núcleo. Su presencia en semillas y tejidos no se limita solo a especies resistentes a la sequía, están presentes en todas las especies vegetales y en organismos anhidrobióticos como eubacterias, rotíferos, nematodos, tardígrados y artrópodos (Saucedo *et al.*, 2017). Hasta ahora, las proteínas LEA estudiadas experimentalmente han revelado un alto grado de desorden estructural en solución (Battaglia *et al.*, 2008), tienden a adquirir una estructura plegable en conformaciones α -helicoidales durante la deshidratación parcial o completa (Saucedo *et al.*, 2017) además, según la disponibilidad de agua en el medio, estas proteínas pueden adquirir diferentes conformaciones, siendo que a menor disponibilidad de agua su conformación es más definida, tomando mayor orden estructural. Este tipo de cambios también pueden ser inducidos con poli-etilen-glicol (PEG) y glicerol por incremento en la concentración

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

intracelular de las macromoléculas o amontonamiento molecular, lo que podría influir en el reconocimiento de diversos ligandos y su estabilización (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011). Otra característica es que los genes que las codifican están regulados a nivel de la transcripción y responden al ácido abscísico (ABA) (Pereyra-Cardozo *et al.*, 2014).

Las proteínas LEA pueden estar relacionadas en las respuestas vegetales ante estrés abiótico y biótico, aunque su función ante este último ha sido poco estudiada (Liu *et al.*, 2016). La expresión de proteínas LEA es indispensable para que las plantas puedan resistir al estrés hídrico según estudios con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, donde se ha visto que al anular la expresión de una o más de estas proteínas se produce un déficit en la resistencia al estrés osmótico (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011), aunque estudios recientes han comprobado que además de su importancia sobre la tolerancia al estrés osmótico y tolerancia al enfriamiento (Battaglia *et al.*, 2008), estas proteínas cuentan con otras funciones moleculares según su diversidad, sin embargo la función de la mayoría de estas proteínas aún no se conoce con claridad (Saucedo *et al.*, 2017).

El mecanismo de protección de las proteínas LEA aún no está claramente dilucidado aunque se cree que actúan como tampones de hidratación, secuestrando iones y como proteínas estabilizadoras de membranas y estructuras de cromatina (Liu *et al.*, 2016) y que funcionan como asistentes en el transporte de proteínas durante condiciones de estrés (Saucedo *et al.*, 2017). Se considera que las proteínas LEA protegen a diversas enzimas o proteínas reporteras de su desnaturalización y desactivación previniendo cambios estructurales dados por el déficit hídrico, como en el caso de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), se cree que este mecanismo de protección es por una interacción directa entre las proteínas LEA y su proteína blanco. Sin embargo, cada grupo de proteínas LEA tiene diferente eficiencia de protección sobre otras moléculas según diferentes niveles de déficit hídrico, incluso pueden proteger a diferentes tipos de moléculas o estructuras celulares. Su función de protección también puede manifestarse ante estrés de congelamiento y descongelamiento pero no ante temperaturas elevadas, lo que indica que su función está asociada a baja disponibilidad de agua y no a la temperatura (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011).

2.2.1 Clasificación de las proteínas tipo LEA

Estas proteínas se clasifican comúnmente en siete grupos diferentes según la similitud que tengan en secuencias conservadas (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011; Liu *et al.*, 2016). En general la mayoría de estas proteínas existen plegadas aleatoriamente en solución pero algunas proteínas LEA de familias particulares contienen conformaciones definidas. En una clasificación hecha por Dure (Dure *et al.*, 1981) dividió a las proteínas encontradas en la semilla del algodón en al menos seis familias según sus similitudes en secuencias de aminoácidos, donde se puede también distinguir los motivos conservados en diferentes especies pertenecientes a cada familia de proteínas LEA (Battaglia *et al.*, 2008).

El primer grupo es al que pertenecen las proteínas D-19 y D-132 del algodón, son altamente hidrofílicas por contener aminoácidos cargados como glicina (Gly), la mayoría de su conformación es en hélice superdesarrollada al azar y en menor medida una conformación helicoidal extendida, son inestables y flexibles. Son expresadas ante condiciones de limitación acuosa y por inducción con ABA en embriones y tejidos vegetativos de plantas jóvenes (Battaglia *et al.*, 2008). Se caracterizan por contener un motivo de 18 aminoácidos conservado (RKEQLGHEGYQEMGHKGG) (Hernández-Camacho, 2016).

El segundo grupo también conocido como “dehidrininas” es al que pertenece la proteína D-11 del algodón y es el más estudiado. Son altamente hidrofílicas pues tienen alta porción de aminoácidos polares y baja porción de aminoácidos no polares. Se caracterizan por poseer un motivo de 15 aminoácidos conservado (EKKGIMDKIKEKLPG) llamado segmento K (Giarola *et al.*, 2015), el cual puede encontrarse repetido desde una hasta 11 veces. También contienen un segmento Y con una secuencia consenso [V / T] D [E / Q] YGNP, el cual puede encontrarse repetido desde una hasta 35 veces en tándem en el extremo N. Además pueden contener un segmento S que es un tracto de residuos de serina (Ser) y algunos otros motivos menos conservados ricos en aminoácidos polares (Φ -segmentos) (Battaglia *et al.*, 2008).

El tercer grupo o LEA III es al que pertenece las proteínas D-7 y D-29 del algodón (Battaglia *et al.*, 2008) está caracterizado por poseer un motivo conservado de 11 aminoácidos (TAQAAKEKAGE) manifestándose principalmente como una hélice α anfipática, aunque la repetición de éste varía entre las proteínas, dando al grupo masas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

moleculares variadas. La función de este grupo de proteínas aun es desconocida, aunque se ha demostrado que la proteína ZmLEA3 puede mejorar la tolerancia del tabaco transgénico al estrés osmótico y oxidativo, la proteína LEA PM2 en soya confiere tolerancia a proteínas y enzimas ante estrés por baja o alta temperatura en recombinante de *Escherichia coli*, además se cree que estas proteínas tienen un papel en la tolerancia de las semillas ante el estrés (Liu *et al.*, 2016) y que son capaces de interactuar con las membranas durante procesos de deshidratación. Este grupo es bastante diverso, y según las diferencias en sus motivos conservados se puede subclasificar en dos subgrupos; el 3A representado por la proteína D-7 del algodón; Y el 3B representada por la proteína D-29 de algodón. El primero de ellos, el 3A, es altamente conservado en el motivo característico de las proteínas LEA III y en dos motivos más, el 3 y el 5, además contiene un motivo 4 (SYKAGETKGRKT) en la posición N-terminal y los motivos 1 y 2 (GGVLQQTGEQV y AADAVKHTLGM) en la porción C-terminal. Por otro lado, el subgrupo 3B es más variado con variaciones en su secuencia conservada en los motivos 1, 2, 3 y 4, y un motivo 5 conservado y exclusivo de este subgrupo. La expresión de las LEA III depende de la hipoxia, de altas presiones de excitación por luz alta y por acción de ABA y están distribuidas en el citosol de todos los tipos celulares (Battaglia *et al.*, 2008).

El cuarto grupo o LEA IV es al que pertenece la proteína D-113 del algodón, se caracteriza por conservar de 70 a 80 residuos de aminoácidos en su porción N-terminal que se cree forman α -hélices anfipáticas y contiene al motivo 1 con la secuencia consenso AQEKAEKMTA [R / H] DPXKEMAHK [E / K] [A / E] [K / R], mientras que su porción C-terminal es más variable. Adicionalmente muchas de estas proteínas contienen 4 motivos más. Se subclasifican según la ausencia o no de los motivos 4 y 5 en el subgrupo 4A (motivos 2 y / o 3 adyacentes al motivo 1) y el subgrupo 4B (motivos 1-3 en la porción N-terminal y en algunas los motivos 4 y / o 5 en la porción C-terminal). Se encuentran en plantas vasculares y no vasculares, acumulándose en embriones secos, tejidos vegetativos tras un déficit hídrico y ABA aunque se desconoce su función como respuesta al estrés (Battaglia *et al.*, 2008).

El quinto grupo o LEA V es al que pertenece las proteínas D-34, D-73 y D-95 del algodón e incluye a las proteínas LEA con características atípicas de hidrofobicidad y son sub clasificadas según su homología en los subgrupos 5A, 5B y 5C al cual corresponden como representante respectivamente las proteínas del algodón antes mencionado. Adoptan conformación globular al no ser solubles a ebullición. Según algunos estudios, estas

proteínas son inducidas durante la fase tardía del desarrollo de las semillas y bajo condiciones de estrés como sequía, luz UV, salinidad, frío e hinchazón (Battaglia *et al.*, 2008).

El sexto grupo o LEA VI se caracteriza por contener proteínas de pequeño tamaño (7-14 kD) altamente conservadas, la primera proteína caracterizada de este grupo fue PvLEA18 de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Se caracteriza además por tener 4 motivos, dos de ellos altamente conservados (1 y 2), donde en el motivo 1 se conserva totalmente la secuencia LEDYK y en el motivo 2 los residuos Pro y Thr en sus posiciones 6 y 7. Son proteínas muy hidrofílicas intrínsecamente no estructuradas que no coagulan a altas temperaturas y carecen de cisteína (Cys) y triptófano (Trp). La proteína PvLEA18 se expresa en granos secos, granos de polen, en respuesta a un déficit hídrico y por inducción de ABA, sin embargo, se desconoce la función clara de las proteínas LEA VI (Battaglia *et al.*, 2008).

El séptimo grupo también conocido como proteínas ASR se caracteriza por contener proteínas pequeñas estables al calor e intrínsecamente no estructuradas. Contienen 3 regiones altamente conservadas (motivos 1, 2 y 3), un cuarto motivo (motivo 5) encontrado únicamente en la proteína ASR1 y un quinto (motivo 4) en el extremo C terminal de algunas de estas proteínas. El motivo 3, ubicado en el extremo C-terminal, contiene una señal putativa de localización nuclear. Los genes de estas proteínas se expresan durante la senescencia, la maduración de los frutos y / o la maduración de las semillas y polen, además bajo condiciones de estrés como déficit hídrico, alta salinidad, bajas temperaturas y la luz limitada, o algunos de ellos inducidos por ABA (Battaglia *et al.*, 2008).

2.2.2 Las proteínas LEA 2 o dehidrinas

Como se mencionó anteriormente, las dehidrinas, son aquellas proteínas LEA pertenecientes al segundo grupo caracterizadas por poseer un segmento K, un segmento Y, y algunas de ellas un segmento S, además de otros Φ -segmentos menos conservados (Battaglia *et al.*, 2008), el segmento S contiene sitios de fosforilación que podrían influir en la localización nuclear (Burrieza *et al.*, 2012). Debe tomarse en cuenta que el segmento K no es totalmente conservado, incluso los aminoácidos de su fragmento nuclear más conservado (Lys-Ile-Lys-Glu) pueden ser sustituidos (Cao *et al.*, 2017). Según la presencia y disposición de estos segmentos, las dehidrinas pueden clasificarse en 5 subgrupos; el

subgrupo K (sólo contienen al segmento K), el subgrupo SK (contienen el segmento S seguido por el segmento K), el subgrupo YSK-, el subgrupo YK- y el subgrupo KS (Battaglia *et al.*, 2008) los cuales varían según su masa molecular de 9 a 200 kDa (Kim *et al.*, 2013). Los genes que codifican para estas proteínas están divididos en pequeñas familias, donde cada familia tiene diferente cantidad de miembros, así, se conoce que en *A. thaliana* hay 10 genes que codifican para dehidrinas, en el arroz (*Oryza sativa*) hay 8, en la cebada (*Hordeum vulgare*) hay 13 y en *Populus* hay solo 3 (Giarola *et al.*, 2015).

Pueden encontrarse tanto en plantas no vasculares como en vasculares con y sin semilla, se acumulan durante la desecación de las semillas y en respuesta al déficit hídrico inducido ya sea por sequía, baja temperatura o salinidad, o todos ellos según la proteína, y también pueden estar presentes en la mayoría de los tejidos vegetativos durante condiciones óptimas de crecimiento pero suelen acumularse en tipos celulares específicos, existen algunas dehidrinas que están presentes bajo condiciones normales más no durante el estrés. A nivel celular la mayoría se acumula en citoplasma y en segundo lugar en el núcleo, aunque también pueden encontrarse en la membrana plasmática, las mitocondrias, la vacuola y el retículo endoplásmico. Según algunos estudios, estas proteínas se encuentran comúnmente hidratadas y de manera no estructurada, y es posible que los motivos del segmento K tengan estructuras α -helicoidales anfipáticas y protejan a las membranas. Algunos autores también suelen llamar a las dehidrinas proteínas COR (Cold Responsive) debido a que algunas de ellas suelen acumularse por estímulos de baja temperatura, aunque sería erróneo generalizar una temperatura para todas las dehidrinas, ya que cada subgrupo se comporta de manera diferente (Battaglia *et al.*, 2008).

2.2.3 Actividad de las dehidrinas ante factores abióticos

Cuando se habla de expresión de proteínas LEA tipo dehidrinas en tejidos vegetales, se debe tener en cuenta que dicha expresión estará estrechamente relacionada al estrés vegetal principalmente abiótico (Kim *et al.*, 2013). Las plantas pueden estar expuestas a estrés de tipo biótico y abiótico, en particular la respuesta al estrés abiótico en las especies vegetales se da, en general, por estímulos ambientales como la salinidad, la deshidratación, las altas o bajas temperaturas, la polución, etc., limitando el desarrollo de la planta y la productividad agrícola, causando graves daños a los tejidos o incluso la muerte (Wang *et al.*, 2017). Estos estímulos, son identificados por la planta como un estrés osmótico,

oxidativo o de pérdida de funcionalidad de membranas y proteínas; así, se ocasiona una ruptura de la homeostasis osmótica o iónica, daño de proteínas estructurales, funcionales y membranas, esto genera la percepción del estrés y la transducción de sensores de estrés osmótico, fosfolipasas, mensajeros secundarios, MAP Kinasas, sensores de Ca^{2+} , etc. Posteriormente ocurre un control transcripcional con factores de transcripción como CBFs/OREB, ABF, HSF, bZIP, etc. Generando mecanismos de respuesta por inducción génica de chaperonas, acuapurinas para transporte iónico y de agua, proteínas glicina-betaína o poliaminas para osmoprotección, o SOD y PX para detoxificación, etc. Y así poder restablecer la homeostasis celular con la protección funcional y estructural de proteínas y membranas, ocurriendo una tolerancia o resistencia al estrés (Gómez-Cadenas y García-Agustín, 2006).

La síntesis de proteínas osmoprotectoras, como las proteínas LEA, es uno de los muchos mecanismos de resistencia de las plantas al estrés (Wang *et al.*, 2017), y la sobreexpresión de proteínas tipo dehidrinas se ha visto aumenta la tolerancia a él (Kim *et al.*, 2013). Conocer las condiciones y características de su expresión génica es indispensable para dilucidar cuáles son las vías metabólicas y redes reguladoras que se activan en una planta sometida al estrés y además conocer la relación existente en la función de la proteína con sus isoformas expresadas (Giarola *et al.*, 2015). Los genes de dehidrinas muestran perfiles de expresión diferenciales durante el desarrollo y bajo estrés por deshidratación (Abedini *et al.*, 2017).

Las funciones de este grupo de proteínas son muy variadas y dependen de cada proteína particular. Algunas dehidrinas tienen la capacidad de unirse a iones, como varias dehidrinas de *A. thaliana* que se une a iones Cu^{2+} y Ni^{2+} , posiblemente por su alto contenido de pares de histidina que son afines a metales, por otro lado, las dehidrinas ácidas también poseen capacidad de unirse a calcio pudiendo talvez funcionar como tampones de calcio o tipo chaperonas dependientes de calcio ante un estrés por intoxicación metálica. Algunas otras dehidrinas han mostrado actividad crioprotectora potencializada con solutos compatibles y algunas otras están relacionadas a la latencia de brotes de algunos árboles durante el invierno (Battaglia *et al.*, 2008). Se sabe que ayudan a mantener el volumen celular evitando el colapso gracias a poseer una estructura desplegada, y poder ayudar a la acumulación de agua durante la sequía (Cao *et al.*, 2017). También se ha comprobado que pueden unirse a proteínas de membranas, ARN y ADN, lo que posiblemente permite

su interacción con otras macromoléculas celulares protegiéndolas de la deshidratación (Pereyra-Cardozo y Quiriban, 2014).

2.2.4 Actividad de las dehidrinas ante factores bióticos

El papel de las dehidrinas en la protección ante factores bióticos aún no ha sido completamente revelado. Como primer acercamiento, se sabe que algunas dehidrinas específicas son inducidas ante heridas, que podría clasificarse como un estrés biótico por mordedura de insectos herbívoros. Sin embargo, las heridas también pueden ser detectadas por la planta como un estrés abiótico por el daño celular que produce pérdida de agua y así la deshidratación del tejido. Algunas otras dehidrinas han sido relacionadas con las respuestas de defensa de varios genes PR (pathogenesis related). Sin embargo, sigue sin estar claro si las dehidrinas confieren resistencia de la planta a los patógenos, puesto que pocas de ellas tienen actividad antibacteriana. Al ser sobreexpresada la dehidrina ERD10 tipo SK3 de *Arabidopsis* en *E. coli*, inhibe el crecimiento bacteriano posiblemente debido a los segmentos K, pues se tiene la teoría de que los aminoácidos presentes en estos segmentos podrían adoptar una estructura transmembrana similar a la de algunos péptidos antimicrobianos, y así interactuar con membranas de células bacterianas causando la inhibición del crecimiento bacteriano. Aquellas dehidrinas que tuvieran actividad contra patógenos y también estuvieran relacionadas en la defensa ante factores abióticos, podrían funcionar como nodo de conexión entre las vías de señalización del estrés biótico y abiótico. Esta teoría es interesante pues las dehidrinas podrían funcionar como defensa ante infecciones bacterianas oportunistas presentes en periodos de escasez de agua en las plantas (Hanin, *et al.*, 2011).

2.2.5 Estudios de expresión de proteínas tipo dehidrinas

Varios estudios sobre expresión de las dehidrinas, han mencionado que existe una relación proporcional, aunque no lineal, con el aumento de acumulación de proteínas tipo dehidrinas en un tejido y su resistencia al estrés. Hasta ahora, se desconoce con exactitud este efecto, pero se ha relacionado con procesos como: los genes tipo dehidrina se expresan al haber salida de electrolitos a través de membranas y peroxidación lipídica; las dehidrinas están involucradas en la unión y estabilización de membranas y en el equilibrio

REDOX al ser antioxidantes; participan en el tamponado de agua; actividad parecida a la actividad de enzimas chaperonas previniendo la agregación e inactivación de proteínas por calor; la protección de enzimas para permitir que se recuperen durante estadios de estrés (Abedini *et al.*, 2017); ayudan en la eliminación de daño oxidativo provocado por salinidad y sequía, al reducir la concentración de malondialdehído proveniente de la formación de especies reactivas de oxígeno, y activación de la enzima superóxido dismutasa que cataliza radicales superóxido, mejorando así la tolerancia al estrés (Wang *et al.*, 2017); secuestro de iones metálicos como Cu^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} mediante secuencias ricas en histidina o por fosforilación de serina; pueden unirse mediante el segmento K a vesículas lipídicas que contienen fosfolípidos ácidos; y protegen de la congelación a enzimas como catalasa, lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa por su actividad crioprotectora (Ochoa-Alfaro *et al.*, 2012).

Wang *et al.*, (2017) mostraron que al sobreexpresar el gen *SmLEA* de la familia de las dehidrinas en *E. coli* y *Salvia miltiorrhiza*, aumentaba la tolerancia de estos organismos a la sequía y la alta salinidad, además que su expresión puede ser inducida con ABA. En *A. thaliana*, al sobreexpresar las proteínas tipo dehidrinas ERD10, RAB18, COR47 y LTI30, aumentaron la resistencia de la especie a la congelación y estrés por enfriamiento (Kim *et al.*, 2013). Por otro lado, en *A. thaliana* fueron cuantificados 51 genes codificantes para proteínas LEA bajo diferentes condiciones con lo que se encontró hay poca superposición en su expresión en tejidos vegetativos y semillas, en las semillas se expresa mayor porción de proteínas tipo LEA y además en las semillas hay prevalencia en la expresión del gen *LEA* constitutivo sobre otros *LEA* inducibles (Burrieza *et al.*, 2012). En *Opuntia streptacantha*, perteneciente a la familia Cactaceae se identificó el gen *OpsDHN1* que codifica para una dehidrina ácida tipo SK3, sus estudios de expresión mostraron que este gen es sobre expresado en respuesta de estímulos de estrés abiótico específicamente por bajas temperaturas, además se vio una respuesta protectora de los tejidos vegetativos ante procesos de congelación, finalmente, este gen se encuentra regulado por ABA (Ochoa-Alfaro *et al.*, 2012).

Cao *et al.*, (2017) analizaron la expresión de los genes tipo dehidrina *HbDHN1* y *HbDHN2* de *Hevea brasiliensis* en una planta transgénica de *A. thaliana* bajo varios tipos de estrés abióticos, como frío, alta salinidad, sequía, ABA, etileno y ácido jasmónico, encontrando que la sobreexpresión estos genes *HbDHN* aumenta la tolerancia a la salinidad, la sequía y el estrés osmótico, además anteriormente se conocía que dichos

genes se sobre expresan bajo estrés biótico por heridas. Otro resultado de este estudio indicó que la sobreexpresión de los genes también aumentó la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, y se redujo la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido, por lo que se cree eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS).

El antecedente directo al presente trabajo son los estudios realizados por Hernández-Camacho (2016), quien identificó y caracterizó un fragmento de gen, *MabDHN*, que codifica para una proteína tipo dehidrina en *M. bombycina*, su análisis ante diversos tipos de estrés reveló que la sobre expresión de dicho gen se ve influenciada ante el estrés ocasionado por congelamiento ($-20^{\circ}C$), aumentando su expresión tras dos hrs de exposición sin embargo no se detectan cambios tras cuatro hrs de exposición, y ante estrés biótico por heridas en los tejidos de la planta, indicando que este gen es capaz de responder tanto bajo estrés de tipo abiótico como biótico. Además se indica que el ABA es un regulador de la expresión del gen *MabDHN*, aumentándola considerablemente bajo una concentración de $100 \mu M$ de ABA y disminuyendo cuando la biosíntesis de la fitohormona es suprimida. Sin embargo ante el estrés por salinidad y por bajas temperaturas (frio) no se observó un cambio en la expresión.

2.2.3.1 Gen *MabDHN* en *M. bombycina*

El fragmento del gen *MabDHN* identificado por Hernández-Camacho *et al.*, (2017) en *M. bombycina* (Número de acceso en NCBI: KP720560) cuenta con 145 aminoácidos y codifica para una proteína tipo dehidrina por la alta similitud que muestra con el gen *OpsDHN1* encontrado en por Ochoa-Alfaro *et al.*, (2012). Presenta tres repeticiones del dominio Dehydrin 2 representado por un segmento conservado K con un motivo 1 de secuencia PEAAVEHEAEAKEKKGFLDKIKEKLPGYH y un motivo 3 de secuencia YEETEEKKGFLDKIKEKLPGH, además de poseer un fragmento rico en Histidinas, pero carece del dominio Dehydrin 1 representado por el segmento conservado S de las dehidrinas. La proteína *MabDHN* codificada es altamente hidrofílica y contiene mayor proporción de aminoácidos ácidos, por lo que se considera una dehidrina ácida. En su estructura predominan las α -Hélices y giros, pero contiene una sección de hojas β plegadas. Se cree que este gen tiene efecto protector ante la exposición de los tejidos vegetales a estrés por metales pesados ya que el fragmento de Histidinas podría activar ciertas

proteínas que son inactivadas bajo este tipo de estrés, y además podría contribuir a una fuerte unión entre iones metálicos y la proteína. Finalmente, como se mencionó con anterioridad, Hernández-Camacho, (2016) demostró la influencia de esta proteína en la protección de los tejidos vegetativos de *M. bombycina* ante el estrés por congelamiento (-20°C) que la planta identifica como estrés osmótico, también se demostró su sobreexpresión ante un estrés biótico producido por heridas, más no se ha encontrado su papel ante un estrés por frío o por alta salinidad.

2.3 Inducción de expresión de proteínas tipo dehidrinas por Fitohormonas

Las fitohormonas no tienen una acción directa en las células vegetales, sino que son identificadas por receptores celulares a los cuales se unen y activan proteínas por fosforilación para inducir una respuesta biológica. Algunas fitohormonas pueden funcionar como moléculas de señalización en respuesta a estímulos estresantes, actuando por sí mismas o en sintonía con otras fitohormonas. Así durante el estrés, las plantas pueden sintetizar ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) o etileno (ET) para producir una red de transducción de señales y por lo tanto una compleja cascada de respuestas adaptativas que se ajuste al estímulo recibido (Memelink, 2009). Estas respuestas son manifestadas principalmente cuando la planta se ve en presencia de patógenos biotróficos, necrotrofos y hemibiotrofos (Díaz-Puentes, 2012).

Por otro lado, el ABA también conocido como la hormona de estrés, es responsable de activar una cascada de señalización para la expresión de proteínas en respuesta a condiciones de estrés para que la célula sea capaz de soportar o adaptarse a éste (Cuevas-Velázquez *et al.*, 2011). Además, aunque aún no se ha dilucidado completamente el proceso de acción del ABA, se sabe que está fuertemente relacionado a la dormancia de las semillas (Bewley, 1997). Uno de los métodos para tolerar el estrés abiótico de las plantas es evitándolo, esto es, no coincidiendo en el tiempo o temporada de mayor estrés. Por ejemplo, largos periodos de sequía en una zona específica, el ABA está presente durante el inicio y el transcurso de la latencia en la mayoría de las semillas, se puede decir que es una hormona promotora de la dormancia. Está relacionado con la inhibición de la elongación de la radícula del embrión, y por lo tanto en la inhibición de la germinación. La semilla sintetiza ABA como un método preventivo de germinación en las primeras etapas

del desarrollo, una ausencia de este produciría una germinación precoz o mutantes vivíparas. El ABA produce un equivalente a la latencia durante el desarrollo de la semilla y promueve la síntesis de algunas proteínas en este periodo (Bewley, 1997). Se sabe que las semillas en general soportan la pérdida de agua celular durante la fase de maduración de su desarrollo por la acumulación de proteínas LEA (Saucedo *et al.*, 2017). Las semillas de las cactáceas soportan las sequías largos periodos de tiempo por permanecer sobre la superficie del suelo, hidratándose o deshidratándose constantemente hasta germinar, incluso aquellas que reciben menor cantidad de humedad antes de un periodo largo de deshidratación son capaces de germinar más rápidamente, además los cambios fisiológicos producidos por los periodos de deshidratación y posterior hidratación son almacenados y heredados a sus descendientes, brindando características de mayor resistencia y acumulación de biomasa a las nuevas plántulas (Dubrovsky, 1996). Cuando las semillas son sensibles a ABA pueden permanecer en estado de latencia aun cuando están maduras, se ha visto que la expresión de muchos de los genes correspondientes a latencia que codifican las proteínas que actúan para suprimir la germinación puede ser mejorada por ABA, sin embargo la relación con la expresión de proteínas tipo LEA en presencia de ABA indica que ABA puede no estar directamente asociada en la producción de un estado de latencia en la semilla como tal, sino que produce un estado de latencia como método de protección o adaptativo contra condiciones adversas como alta humedad o sequedad del suelo (Bewley, 1997).

2.3.1 Ácido jasmónico

El ácido jasmónico (AJ) pertenece al grupo de los jasmonatos, que forman una familia de oxipilinas bioactivas que son fitohormonas derivadas de ácidos grasos, particularmente del ácido α -linolénico, están presentes en la membrana lipídica de las células vegetales y son considerados como inhibidores de crecimiento, además promueven la senescencia de hojas y tallos (Eng-Sánchez, 2008), maduración de frutos, alargamiento de raíces y producción de polen. Actualmente se conoce que al ser producidos por las plantas actúan como moléculas de señalización reguladoras, y junto con un conjunto de genes de etileno brindan una respuesta defensora ante el estrés biótico causado por microorganismos necrotrofos o insectos herbívoros y estrés abiótico (Memelink, 2009). Durante el proceso de resistencia sistémica adquirida hay una acumulación local y

sistémicamente de AJ y AS de manera antagónica (Díaz-Puentes, 2012), esto es, el AS inhibe la inducción de AJ mientras que el estrés por heridas la promueve.

El estrés biótico causado por heridas está relacionado a una deshidratación de la planta en el sitio de la herida, Cao *et al.*, (2017), encontraron que la expresión de algunos genes tipo dehidrininas SK2 está relacionada con la respuesta a las heridas mecánicas en un tejido vegetal, debido a que el daño celular conlleva a una pérdida de agua causando tensión de deshidratación que funciona como señal, ellos mencionan que *Boea crassifolia* ante una herida acumula la proteína tipo dehidrina BcDh2 de tipo YnSK2, cuya expresión además está regulada por vías de señalización de AJ y AS. Según Eng-Sánchez (2008), las plantas al ser tratadas con AJ activan la expresión de genes de respuesta a patógenos o heridas mecánicas sintetizando sustancias como el inhibidor de proteasas o la polifenol oxidasa, algunas fitoalexinas como nicotina y compuestos orgánicos volátiles emitidos por hojas durante interacciones con insectos.

El motivo GCC y la G-box (CACGTG) son secuencias promotoras de respuesta a jasmonatos, el motivo GCC es promotor del gen *PDF1.2* en *A. thaliana* y es inducido sinérgicamente por AJ y ET aunque no todos los motivos GCC tienen esta inducción, mientras que el G-box se ve sobreexpresado en análisis de promotores de genes de *A. thaliana* que responden a AJ. La actividad de respuesta de estos dos promotores a jasmonatos depende de COI1 (Coronatine-insensitive protein 1) (Memelink, 2009).

2.3.2 Etileno

El etileno (ET) es una molécula gaseosa conocida como la hormona de la senescencia vegetal, este hidrocarburo sencillo es sintetizado en todos los tejidos vegetativos y al contrario de las auxinas, promueve el proceso de abscisión foliar (Sadava y Purvets, 2009). Esta fitohormona participa en varios de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Lee *et al.*, 2017) como en la maduración del fruto promoviendo la pérdida de clorofila, degradación de paredes celulares, y síntesis de mayor cantidad del mismo ET, y al ser un gas puede difundirse entre los órganos de la planta o incluso de otras plantas. También participa en el proceso de maduración de las flores y pérdida de sus pétalos, y en el proceso de crecimiento del tallo de algunas dicotiledóneas, las cuales antes de atravesar la superficie del suelo, forman un gancho apical que protege al ápice del vástago durante el crecimiento del tallo y es mantenido por el ET hasta recibir luz solar

donde se detiene la síntesis de la hormona. Además, en relación al tallo, en las plantas tratadas con ET se produce una respuesta triple en la cual inhibe el crecimiento del tallo, promueve su engrosamiento y disminuye su sensibilidad a estimulación gravitropica provocándole un encorvamiento. Sin embargo, las sales de plata, como soluciones diluidas de tiosulfato de plata, inhiben la acción del ET al interactuar con su receptor (Sadava y Purvets, 2009).

El precursor de esta fitohormona es el aminoácido metionina, del cual deriva el primer intermediario, la S-adenil metionina (AdoMet) que es sintetizada por acción de la S-adenil metionina sintasa (AdoMet sintasa), posteriormente, esta AdoMet se convierte en el segundo intermediario, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante la enzima ACC sintasas (ACS), que a su vez se convierte en ET por acción de una enzima ACC oxidasa. El paso de conversión de Ado Met a ACC es la mayor limitante en la síntesis del ET y es catalizado por toda una familia de enzimas ACC sintasas, donde se sabe que el tipo 1 de estas enzimas al ser fosforiladas por la proteína quinasa 6 que a su vez es activada por mitógeno (MPK6), aumentan su estabilidad catalítica promoviendo la síntesis de ET tras la infección por patógenos (Lee *et al.*, 2017).

La biosíntesis de ET se regula por varias señales internas y externas, la maduración de los frutos y la senescencia floral inducen su síntesis, también el ABA regula la producción de ET, reduciendo su concentración en plantas previamente tratadas con ABA, además se ha visto que la actividad de las enzimas ACC sintasas, y por lo tanto la producción de ET, está influenciada por ABA, AJ, AS y otras hormonas (Lee *et al.*, 2017), como el ácido indolacético que a altas concentraciones promueve la síntesis de etileno mientras que AS la inhibe.

Por otro lado, también se conoce que el ET tiene un papel importante en la respuesta ante el estrés, la cual puede estar relacionada a otras fitohormonas, el estrés por daños físicos, el congelamiento, y el estrés hídrico por sequía promueven su síntesis, mientras que a falta de oxígeno se inhibe. El motivo G-box presente en varios promotores que responden a jasmonatos es afectado negativamente por ET (Memelink, 2009). En general, el mecanismo de acción del ET está dado por receptores de tipo proteico como el ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4 que se han encontrado en las membranas de los tejidos vegetales y que tienen un dominio de unión a ET, en ausencia de la fitohormona, el receptor se dimeriza y se activan señales de fosforilación desde un dominio histidina hasta un

dominio receptor, posteriormente el receptor ETR activa una quinasa CTR1 del citosol que conlleva a una cascada de MAP quinases para la desactivación de la proteína transmembrana EIN2. Mientras que en presencia de ET, el receptor ETR es inactivado debido a que ETR y CTR1 no interactúan y por lo tanto la proteína EIN2 es activada y a su vez regula a los factores EIN3 y EIL1 de transcripción activando finalmente genes de respuesta a etileno (Jordán *et al.*, 2006).

2.3.3 Ácido salicílico

El ácido salicílico (AS) es un derivado del ácido benzoico, esta fitohormona es reguladora de crecimiento vegetal, retrasa la senescencia de pétalos y está relacionada en la resistencia a patógenos biotrofos y hemibiotrofos. En estudios con *A. thaliana* sobre el proceso de resistencia sistémica adquirida inducida por AS se ha encontrado que cuando la planta reconoce a un patógeno, en defensa local se activa una cascada de señalización con la acumulación de AS donde se induce su síntesis por proteínas R tipo CC-NBS-LRR específicamente las proteínas NDR1 y RIN4 y por proteínas tipo TIR-NBS-LRR específicamente las proteínas EDS1 y PAD4. El SA se acumula en citoplasma e inactiva enzimas catalasas y ascorbato peroxidasas promoviendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales a su vez promueven la expresión de genes de defensa al cambiar el estado de óxido-reducción celular, lo que ocasiona un cambio en la proteína oligomérica NPR1 a monomérica al reducirse sus residuos de cisteína. Los monómeros NPR1 interactúan en el núcleo con factores de transcripción tipo TGA y WRKY para genes de defensa induciéndolos o inhibiéndolos. Además la acumulación de ROS ocasiona que los genes relacionados a la patogenicidad sean expresados, las proteínas sintetizadas muestran actividad antimicrobiana y se almacenan en espacio intercelular y vacuolas induciendo una resistencia sistémica en el tejido periférico al punto de infección (Díaz-Puentes, 2012).

La señalización en respuesta de defensa mediada por el AS es antagónica a la mediada por el AJ, aunque algunos genes pueden ser expresados por acción de ambas fitohormonas, además también hay relación antagónica entre AS y el ABA y las auxinas, es por esto que una planta es incapaz de defenderse ante un patógeno y una plaga al mismo tiempo (Díaz-Puentes, 2012).

2.4 Otros genes relacionados a la resistencia al estrés vegetal

Todos los procesos biológicos están modulados por una red de interacciones que incluye relaciones complementarias y antagónicas entre diferentes genes y reguladores, por lo que una respuesta de defensa contra estrés no puede ser explicada solo con la regulación de un gen particular, es necesario encontrar las relaciones de dicha respuesta con toda una ruta regulatoria.

2.4.1 Expansinas

Las expansinas son un grupo de proteínas presentes en todas las especies vegetales, y están involucradas de manera endógena en la extensibilidad de la pared celular durante la etapa de crecimiento de la planta mediante procesos no enzimáticos (Chen, et al., 2017), ya que se unen a la superficie de las microfibrillas de celulosa y debilitan enlaces no covalentes entre los polímeros de la matriz de la pared celular de xiloglucano para promover el deslizamiento de microfibrillas de celulosa (Sánchez, et al., 2004). Además están involucradas en la defensa ante diversos tipos de estrés vegetal tanto bióticos como abióticos, tal es el caso de la salinidad, la sequía, el calor, el frío, el estrés oxidativo, ataque de herbívoros y microorganismos fitopatógenos, la defensa puede ser individual o simultánea (Guimaraes, et al., 2017). Otras funciones de las expansinas es su participación en el alargamiento celular, en la abscisión, en la germinación, en el ablandamiento del tejido del fruto o incluso como mediadores de acción hormonal (Morales-Domínguez, et al., 2013).

La familia de expansinas puede ser clasificada en cuatro subfamilias; α -expansina (EXPA), β -expansina (EXPB), expansina-like α (EXLA) y expansina-like β (EXLB) (Kende, et al., 2004), siendo EXPA y EXPB las dos subfamilias más grandes, cada subfamilia comparte funciones y efectos en el desarrollo y crecimiento vegetal (Guimaraes, et al., 2017). Las expansinas se encuentran conservadas en gimnospermas y angiospermas, ya sea monocotiledóneas o dicotiledóneas, expresándose principalmente durante el crecimiento celular y la diferenciación tisular, donde cada tipo de expansinas desempeñan funciones únicas (Sánchez, et al., 2004).

Las EXPB y las EXPA tienen estructuras semejantes y muy pocas diferencias moleculares, ambas contienen un péptido señal de 20 a 30 aminoácidos de longitud, y dos dominios. El primer dominio es parecido al dominio GH45 de las glucósido hidrolasas que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contiene seis cisteínas conservadas y un motivo putativo HFD (Histidina - Fenilalanina – Aspartato) el cual forma parte del sitio catalítico de la familia de las 45 endoglucanasas. El segundo dominio es parecido al de los alérgenos del polen de pastos grupo II y se cree es un dominio de unión a polisacáridos por tener residuos conservados de Triptófano (Zhu, *et al.*, 2014).

A nivel funcional, las EXPA están posiblemente relacionadas al movimiento y separación de microfibrillas de celulosa extendiendo la pared celular, debido a que se ha visto que las EXPA inducen la disociación local y deslizamiento de xiloglucanos. Por otro lado, se cree que las EXPB pueden funcionar de manera similar a las EXPA pero en un glicano diferente como el xilano (Zhu, *et al.*, 2014). La función de EXLA y EXLB se desconoce con precisión, solo se hacen predicciones a partir de su secuencia génica (Sampedro, *et al.*, 2005).

2.4.1. 1 Regulación de la expresión de expansinas por efecto del ácido indolacético (AIA)

Las hormonas vegetales regulan la expresión de genes EXPA, como en el caso de los EXPA de tomate (*Le-EXPA1* y *Le-EXPA2*) inducidos por ET y auxina; el gen EXPA de arroz (*Os-EXPA4*) inducido por giberelina; o el EXPB de soya (*Glycine max*) (*Cim1*) inducido por citoquinina, sin embargo, la expresión de expansinas depende del tejido utilizado, los estímulos impuestos y la etapa de desarrollo del tejido (Sánchez, *et al.*, 2004).

Según estudios, la expresión de expansinas no está relacionada a la presencia de ABA (Wang, *et al.*, 2011). Por el contrario, la expresión de las expansinas si es inducida por ácido indolacético (AIA) por lo que al estar presente esta fitohormona se promueve el ablandamiento de la pared celular, una desventaja de dicho ablandamiento es que hace a la planta más vulnerable a ataques bióticos. La inducción de expansinas en presencia de AIA se ve potencializada bajo la presencia de la fitohormona brasinólida. En un estudio de expresión de 4 genes expansina de garbanzo se comprobó que los cuatro genes eran inducibles por AIA, sin embargo, su nivel de expresión variaba según el gen y el órgano del que se tratase, siendo mayormente relacionados en el crecimiento del epicotilo y la elongación del tallo (Sánchez, *et al.*, 2004).

3 JUSTIFICACIÓN

Las cactáceas se caracterizan por su gran capacidad adaptativa y resistencia ante varios tipos de estrés ambiental. Una de sus respuestas ante los estímulos estresantes, es la expresión de diversas proteínas como las de la embriogénesis tardía (LEA), particularmente las del grupo II o dehidrinas, y las expansinas.

Existen muy pocos estudios de expresión de proteínas relacionadas al estrés en cactáceas y particularmente en *M. bombycina* son casi inexistentes. Esta especie forma parte de la biodiversidad endémica de Aguascalientes y Jalisco pero está bajo protección especial por la SEMARNAT debido a su escasa población. Por lo tanto es de interés complementar la información que se tiene sobre sus genes de defensa contra estrés, particularmente la regulación de un gen tipo dehidrina ante fitohormonas y la identificación de un gen en tipo expansina. Con estos conocimientos, en un futuro y en conjunto con otros estudios, se podría utilizar los genes analizados para mejorar la resistencia de *M. bombycina*, o para insertarlos a otras especies y conferirles el mismo mecanismo de resistencia.

Es por eso que se planteó analizar la expresión en *M. bombycina* de *MabDHN* (un gen tipo dehidrina) ante el efecto de las fitohormonas ácido salicílico (100 μ M), ácido jasmónico (100 μ M) y etileno (Etefón 2 nM), para complementar los conocimientos sobre su regulación ante estímulos estresantes. Adicional se buscó identificar otro tipo de gen relacionado a la defensa vegetal contra el estrés, como uno tipo expansina, para continuar con la comprensión de la capacidad de defensa de *M. bombycina*.

4 HIPÓTESIS

Las fitohormonas ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico influirán en la expresión del gen *MabDHN* tipo dehidrina en *M. bombycina*.

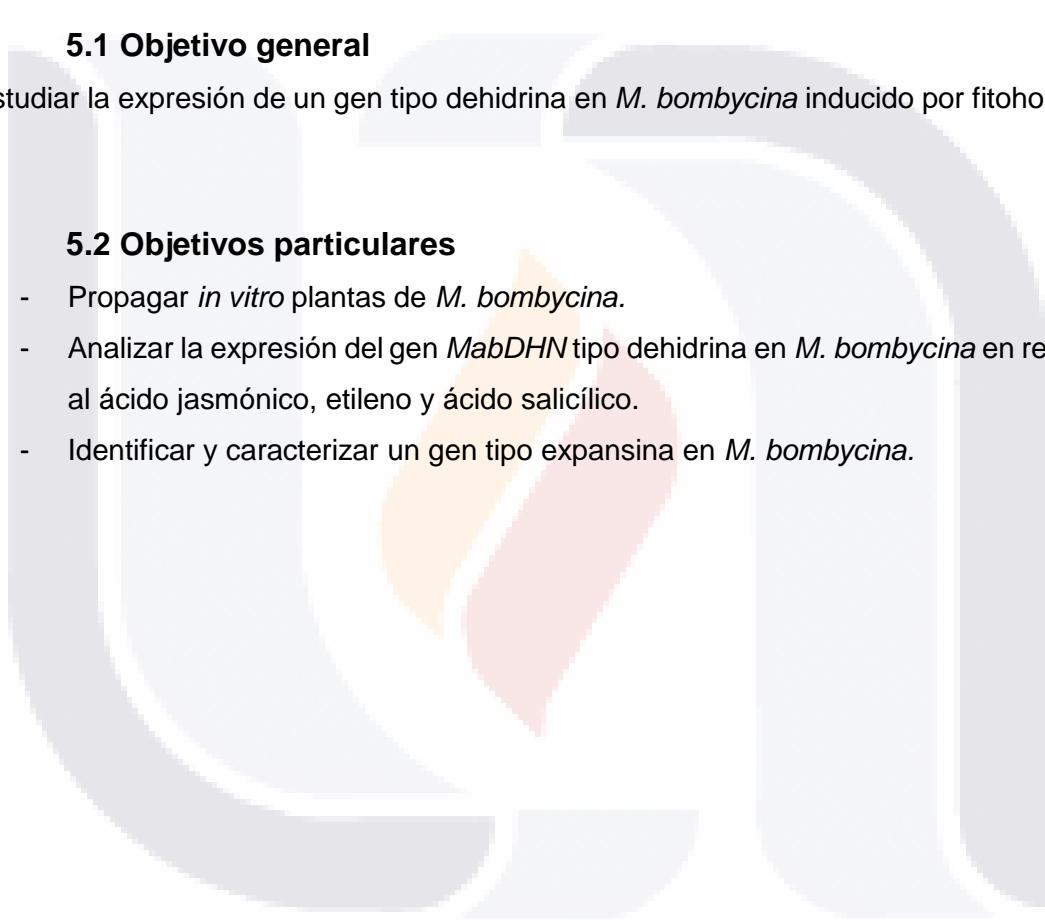
5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar la expresión de un gen tipo dehidrina en *M. bombycina* inducido por fitohormonas.

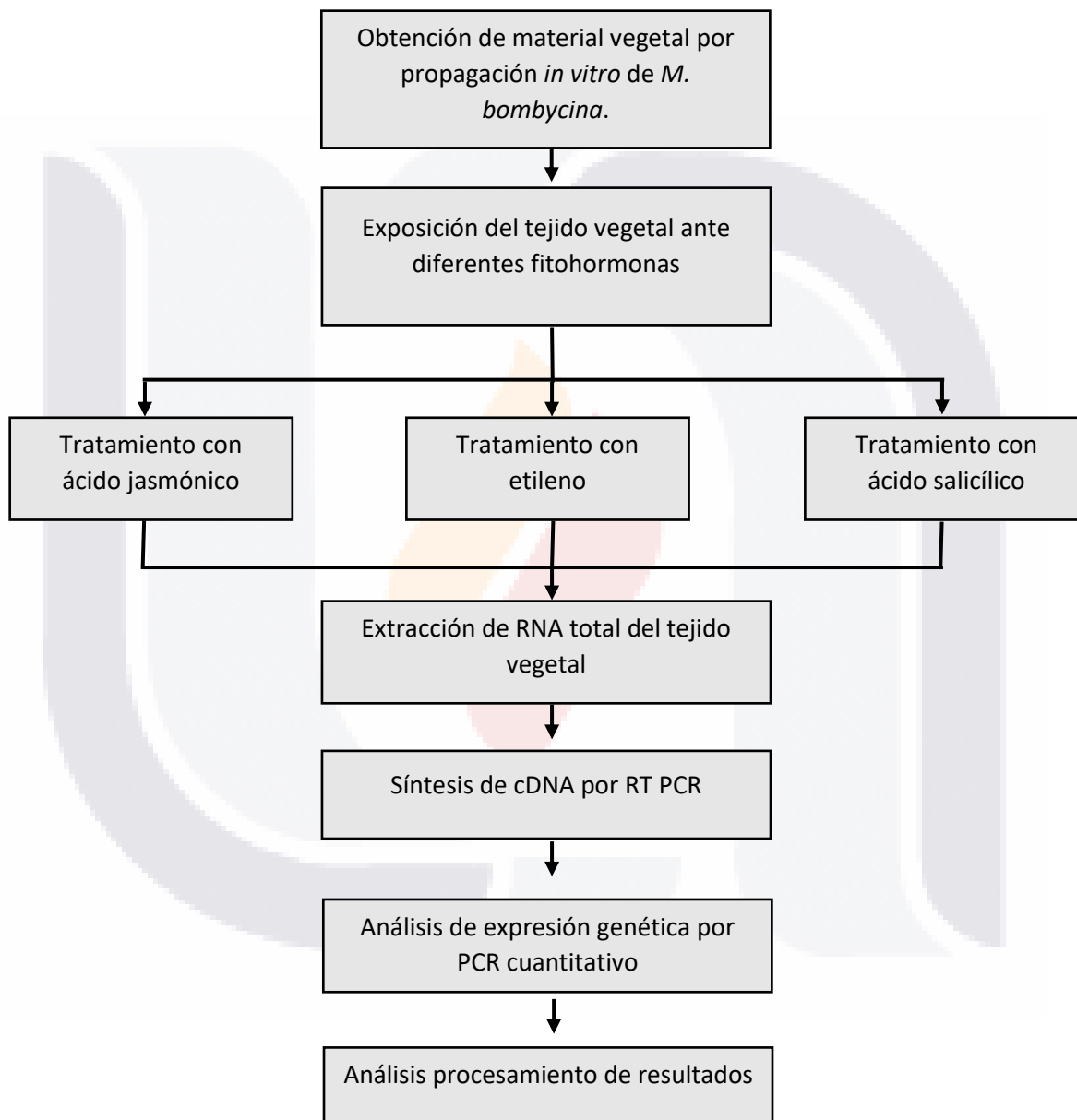
5.2 Objetivos particulares

- Propagar *in vitro* plantas de *M. bombycina*.
- Analizar la expresión del gen *MabDHN* tipo dehidrina en *M. bombycina* en respuesta al ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico.
- Identificar y caracterizar un gen tipo expansina en *M. bombycina*.

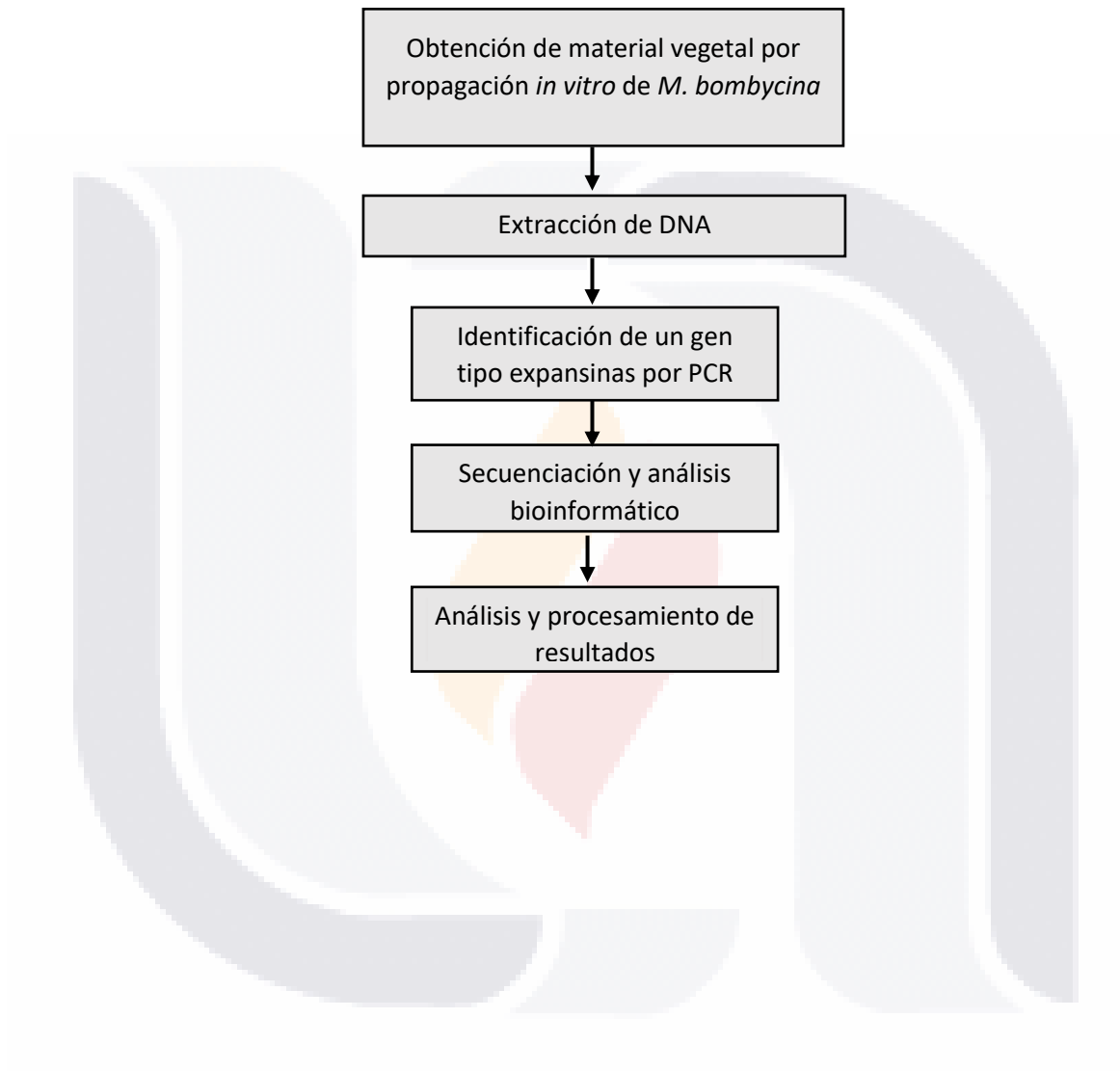


6 METODOLOGÍA

6.1 Esquema general de metodología para gen tipo dehidrina



6.2 Esquema general de metodología para identificación de gen tipo expansina



6.3 Obtención de material vegetal por propagación *in vitro* *M. bombycina*

El material vegetal fue donado por el Banco de Germoplasma *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. Las plántulas de *M. bombycina* se utilizaron como planta madre para su propagación. Los tallos se cortaron de manera transversal eliminando la parte basal pero conservando el ápice, para obtener fragmentos de aproximadamente 4 mm de grosor. Los explantes se inocularon bajo condiciones axénicas y manteniendo la polaridad del explante en frascos de vidrio con medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) preparado según indicaciones del anexo A y añadiendo 1 mg/L de la citocinina Benciladenina (BA) para lograr la generación de brotes. Los frascos se incubaron a 25°C bajo un fotoperiodo de 16 hrs luz por 8 hrs de oscuridad hasta la obtención de brotes diferenciados que se utilizaron para la extracción de RNA y DNA.

6.4 Predicción *in silico* de la expresión génica en *Arabidopsis thaliana* inducida por fitohormonas.

Como análisis predictivo *in silico* del comportamiento de la expresión de los genes de estudio se utilizó como planta modelo *A. thaliana*, y para el análisis se utilizaron como herramientas la base de datos de *A. thaliana* The Arabidopsis Information Resource (Thair) (<https://www.arabidopsis.org>) para la comparación génica; la herramienta de búsqueda de expresión de Botany Array Resource (BAR) (<http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>) particularmente la base de datos de la serie AtGenExpress Hormone para evaluar la respuesta a fitohormonas (Nawkar, et al., 2017); y la herramienta de búsqueda para la recuperación de genes y proteínas interactuantes (STRING) (<https://string-db.org>) (Shen, et al., 2017); todas públicamente disponibles.

6.5 Análisis de expresión del gen *MabDHN* tipo dehidrina en *M. bombycina* inducido por fitohormonas.

6.5.1 Inducción de la expresión del gen por Ácido Salicílico (AS)

Para el tratamiento con AS se utilizaron brotes completos de *M. bombycina* de al menos 1 cm de alto, se utilizaron 3 repeticiones biológicas independientes (Vaseva, *et al.*, 2014). Primeramente, los brotes fueron sumergidos por 10 segundos en una solución de AS para procurar el contacto de todo el tejido con la hormona de manera exógena (Hernández-Camacho, 2016) en seguida se colocaron en medio MS líquido + 100 μ M de AS, a tiempos de 3, 8 y 24 hrs (Shen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012), el grupo control fue sumergido a los mismos tiempos en medio MS líquido. La expresión tras los tratamientos fue detenida inmediatamente colocando los brotes por separado en nitrógeno líquido y macerándolos en mortero, el tejido pulverizado se almacenó a -70°C hasta la extracción de RNA.

6.5.2 Inducción de la expresión del gen por Ácido Jasmónico (AJ)

Para el tratamiento con AJ se utilizaron brotes completos de *M. bombycina* de al menos 1 cm de alto, se utilizaron 3 repeticiones biológicas independientes (Vaseva, *et al.*, 2014) (muestras y controles). Los brotes se mantuvieron en medio MS sólido, donde se rociaron con una solución de Tween 20 0.05% + AJ 100 μ M (Richard *et al.*, 2000), a tiempos de exposición de 3, 8 y 24 hrs. Los grupo control se rociaron con solución de Tween 20 0.05% sin hormona con tiempos de 3, 8 y 24 hrs. La expresión tras los tratamientos fue detenida inmediatamente colocando los brotes por separado en nitrógeno líquido y macerándolos en mortero, el tejido pulverizado se almacenó a -70°C hasta la extracción de RNA.

6.5.3 Inducción de la expresión del gen por Etileno (ET)

Para el tratamiento con ET se utilizaron brotes completos de *M. bombycina* de al menos 1 cm de alto, se utilizaron 3 repeticiones biológicas independientes (Vaseva, *et al.*, 2014) (muestras y controles). Los brotes se colocaron en frascos con algodón humedecido con solución de Tween 20 0.05% + Etefón 2 mM (Richard *et al.*, 2000) por tiempos de exposición de 3, 8 y 24 hrs, posteriormente se realizó un segundo experimento dejando los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

explantes en el frasco por 24 hrs previas para asegurar la presencia de ET, seguida de las cuales se contaron nuevamente tiempos de exposición de 3, 8 y 24 hrs. Para los grupo control el algodón se humedeció con solución de Tween 20 0.05% sin hormona con tiempos de exposición similares a las muestras. La expresión tras los tratamientos fue detenida inmediatamente colocando los brotes por separado en nitrógeno líquido y macerándolos en mortero, el tejido pulverizado se almacenó a -70°C hasta la extracción de RNA.

6.5.4 Extracción de RNA total en *M. bombycina*

La extracción de RNA total de cada muestra de *M. bombycina* se realizó utilizando el kit comercial PureZol (BloRad) con algunas modificaciones en el protocolo a fin de aumentar la eficiencia de extracción. Se colocó 1 ml del reactivo PureZol en tubos de 1.5 ml más 50 mg de tejido congelado y pulverizado. La mezcla se homogeneizó mezclando vigorosamente y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por inversión durante 15 seg, se incubó por 5 min a temperatura ambiente agitando periódicamente, y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó cuidadosamente en un tubo limpio de 1.5 ml libre de RNAsas, se añadió 0.5 ml de etanol absoluto, se mezcló cuidadosamente y se incubó a -20 °C por toda la noche para precipitar la mayor cantidad posible de RNA. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm por 10 min a 4°C, formándose una pastilla de RNA, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol 75%, se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a 4°C, se eliminó sobrenadante y se secó la pastilla por 5 min. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua tratada con DEPC y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

La integridad del RNA obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La concentración y la pureza se analizaron por espectrofotometría en NanoDrop 2000 (Thermo scientific) a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

6.5.5 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) siguiendo instrucciones del fabricante. Previamente

se dio un tratamiento con DNasa para degradar los remanentes de DNA de las muestras, la reacción se realizó para aproximadamente 200 – 600 ng de RNA de la manera siguiente:

RNA	200 – 600 ng
10X dsDNasa Buffer	1µl
dsDNasa	1µl
Agua libre de nucleasas	X µl
Volumen total	10 µl

Se incubó a 37°C por 2 min seguido de lo cual se colocó en hielo.

Posteriormente se comenzó el primer paso de la RT-PCR que consiste en la síntesis de cDNA (DNA complementario) a partir de una hebra de RNA por acción de la enzima transcriptasa inversa. Siguiendo lo recomendado por el fabricante se colocó sobre las muestras tratadas previamente la siguiente mezcla de reacción:

5M Mix de Reacción	4 µl
Mix Enzima Máxima	2 µl
Agua libre de nucleasas	4 µl

Se incubó por 10 min a 25 °C y posteriormente por 15 min a 50°C, la reacción se detuvo calentando por 5 min a 85°C. La concentración y la pureza del cDNA se analizaron por espectrofotometría en NanoDrop 2000 (Thermo scientific), con los valores obtenidos se realizaron diluciones para ajustar las muestras de cDNA a una concentración de 100ng/µL.

6.5.6 Análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qPCR)

El análisis de qPCR se realizó en el Centro de investigaciones Biológicas del noroeste (CIBNOR), S.C. en La Paz, Baja California Sur en el Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del Dr. Abraham Loera Muro. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos F y R MabCuant (Anexo E2) para amplificar el transcrito del gen *MabDHN* y los oligonucleótidos F y R 25S (Anexo E3) para amplificar el transcrito del 25S ribosomal como

control (Hernández-Camacho, 2016), con una temperatura de alineamiento de 60°C. La reacción se llevó a cabo utilizando SYBR Green (Mezcla maestra de RT-PCR, Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) de la siguiente manera:

SYBR Green Master Mix 2X	12.5 µl
Oligonucleótido Forward	0.3 µM
Oligonucleótido Reverse	0.3 µM
DNA	100 ng
Agua libre de nucleasas	X µl
Volumen total	25 µl

Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el kit: Un pretratamiento de 50°C por 20 min, desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, y 40 ciclos con una desnaturalización de 95°C por 15 seg y un alineamiento y extensión de 60°C por 60 seg. El equipo utilizado fue CFX96 TM Real-Time system C1000 Touch Thermal Cycler (BIORAD).

6.5.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del análisis de expresión por qPCR fueron normalizados respecto al control y gen de referencia por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y graficados en el programa estadístico GraphPad Prism 7.07 (GraphPad Software, La Jolla California USA) graficando la media de las repeticiones biológicas con su desviación estándar. El análisis estadístico se realizó en el programa R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) mediante ANOVA de un factor y una prueba de comparación múltiple por el método de Fisher, ambas pruebas con un nivel de significancia de 0.05.

6.6 Identificación y caracterización de un gen tipo expansina en *Mammillaria bombycina*

6.6.1 Extracción de DNA en *M. bombycina*

La extracción de DNA de *M. bombycina* se realizó utilizando el método CTAB (Murray y Thompson, 1980) modificado en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aproximadamente 300 mg de tejido fresco se colocaron en un microtubo de 2.0 ml y se añadió 1 volumen de buffer de lisis (Anexo B), la muestra se trituró mecánicamente un molino mezclador de bolas MM 400 Retsch. Posteriormente las muestras se incubaron a 65°C por 10 min agitando cada 2 min, concluido el tiempo las muestras se incubaron en hielo por 5 min y posteriormente se agregaron 300µl de NaCl 1.4 M dejando reposar 10 min a temperatura ambiente. Concluido este tiempo se añadió 1 volumen de fenol- cloroformo (1:1), se agitó fuertemente de manera manual y se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se agregó 1 volumen de cloroformo –alcohol isoamílico (24:1), se agitó fuertemente de manera manual y se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm, nuevamente se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, donde se añadió 1 volumen de isopropanol, se agitó por inversión 10 veces y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm, esta vez se decantó la fase acuosa y se recuperó la pastilla, la cual se lavó 2 veces con 100 µl de etanol al 70% centrifugando cada vez por 5 min a 12000 rpm. Se eliminó por completo el etanol dejando secar la pastilla, la cual se resuspendió en 50 µl de agua. Finalmente, las muestras fueron tratadas con enzima RNAsa para eliminar residuos de RNA agregando 1 µl de enzima por tubo de muestra e incubando a 37°C por 20 min. El DNA en solución fue almacenado a 4°C para su conservación.

Para comprobar la extracción e integridad de DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizando en el fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet, posteriormente se cuantificó la concentración y pureza de la extracción por técnicas espectrofotométricas con un nanodrop Colibri Microvolume Spectrometer a longitudes de onda 260 y 280 nm.

6.6.2 Identificación por PCR de un gen tipo expansina en *M. bombycina*

Para la identificación de genes tipo expansina en *M. bombycina* se realizó la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) usando el kit comercial Paq 5000 Hotstart Agilent Master Mix en un termociclador Peltier Thermal Cycler. Se utilizaron 10 µl de Master Mix, 7 µl de agua estéril, 1 µl de producto de DNA extraído y 1 µl de cada oligonucleótido (Forward y Reverse). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 primer ciclo de predesnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos: 1) desnaturalización a 94°C por 1 min, 2) alineamiento a 50°C por 2 min y 3) extensión a 75°C por 3 min, y finalmente una extensión de 4 min a 75°C.

Se utilizaron oligonucleótidos degenerados (10 mM) probados por Herrera-Martínez en 2015 para la identificación de α -expansinas en cactáceas con un tamaño de banda aproximado de 950 pb:

ExD F-5' GSNCAYGCCNACNTTYTAYGGNG 3'

ExD R-5' YTGCCARTTYTGNCCCCARTT 3'

La amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en un fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet.

6.6.3 Purificación de fragmentos amplificados

Se realizó la purificación de los fragmentos amplificados a partir de gel de agarosa al 2% utilizando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System Promega.

La purificación de los fragmentos se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizando en el fotodocumentador de luz UV DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet, posteriormente se cuantificó la concentración y pureza de la extracción por espectrofotometría con un nanodrop Colibri Microvolume Spectrometer a longitudes de onda 260 y 280 nm.

6.6.4 Ligación del fragmento tipo expansina amplificado en el vector pGEM-t easy

El fragmento tipo expansina purificado se ligó en el vector pGEM®-T Easy (Promega) según las especificaciones del fabricante. En la figura 2 se muestra el mapa y características del vector.

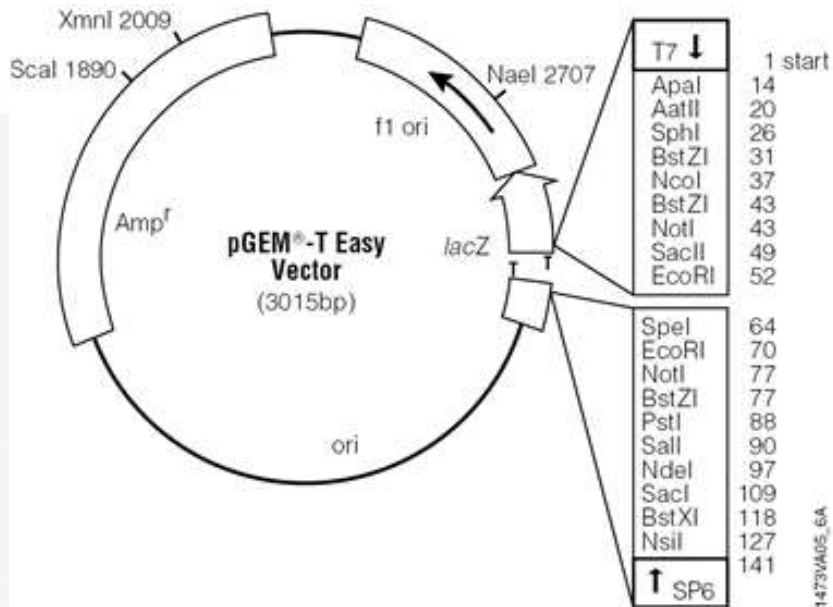


Figura 2 . Mapa del vector pGEM®-T Easy (Promega).

6.6.5 Transformación genética bacteriana por choque térmico.

Se prepararon células competentes de *Escherichia coli* DH5-α para la transformación bacteriana mediante el siguiente protocolo; se cultivó bacteria *E. coli* DH5-α en medio LB (Anexo A3) sólido a 37°C por 20 hrs, posteriormente se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 ml de medio LB líquido incubando con agitación a 37°C toda la noche. Se tomaron 0.1 ml del cultivo y se inocularon en 10 ml de medio LB líquido fresco y se incubó en agitación a 37°C durante 3 hrs hasta que comenzó a tornarse turbio el medio. Tras dicho tiempo se repartió el cultivo en 10 microtubos de 1.5 ml y se enfriaron en hielo durante 10 min, tras lo cual se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 seg, se eliminó el sobrenadante en solución con cloro y se resuspendió la pastilla suavemente con 1 ml de CaCl₂ estéril y frío. En seguida los tubos se incubaron en hielo durante 10 min, se centrifugaron a 12000 rpm por 15 seg, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla.

Finalmente la pastilla ya seca se resuspendió en 30 μl de CaCl_2 y se utilizó inmediatamente para su transformación.

La transformación por choque térmico se realizó añadiendo de 0.5 a 3 μl de plásmido por cada 30 μl de células competentes, se mezcló con suavidad y se incubó en hielo por 20 min, posteriormente se calentó a 42°C por 90 seg e inmediatamente se transfirió a hielo incubando por 5 min, a continuación se añadieron 200 μl de medio LB y se incubaron a 37°C por 45 min en agitación. Todo el cultivo obtenido se sembró mediante perlas de vidrio en una caja con medio LB sólido con ampicilina 10 mg/L, y se incubó a 37°C toda la noche.

6.6.6 Extracción de plásmidos.

Se utilizó el protocolo de Birnboim y Doly (1979) de la siguiente manera; las bacterias incubadas durante toda la noche en el punto anterior fueron aisladas colonia por colonia en medio LB líquido más 10 mg/L de ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Transcurrido este tiempo transfirió el medio a un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 12000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se eliminó en una solución de hipoclorito de sodio, mientras que a la pastilla bacteriana obtenida se le añadió 100 μl de solución Birnboim I (Anexo C1), se resuspendió con micropipeta y se incubó en hielo por 5 min, en seguida se le añadieron 200 μl de solución Birnboim II (Anexo C2), se mezcló perfectamente por inmersión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, a continuación se le añadieron 150 μl de solución Birnboim III (Anexo C3), se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo por 5 min para después centrifugar a 12000 rpm por 5 min. Posteriormente, se añadieron 200 μl de fenol-cloroformo (1:1) mezclando vigorosamente hasta emulsificar y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se adicionaron 200 μl de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1), se emulsificó y centrifugó a 12000 rpm por 5 min. La fase acuosa se recuperó en un tubo limpio y se agregó un volumen igual de isopropanol, se mezcló durante 1 min, se incubó en hielo por 20 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 200 μl de etanol al 70% y se resuspendió en 50 μl de agua destilada estéril. La muestra se almacenó a 4°C.

6.6.7 Verificación de la ligación mediante restricción

Los plásmidos purificados se sometieron a una digestión con la enzima de restricción EcoRI (Promega). Cada reacción contuvo 7 µl de DNA plasmídico, 1µl de Buffer H 10X, 0.5 µl de enzima EcoRI, 0.4 µl de RNAsa, 0.1 µl de BSA y 1 µl de agua para ajustar un volumen total de 10 µl. La mezcla se incubó por 1 hr a 37°C y posteriormente, se corrió por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, se reveló en transluminador de luz UV.

6.6.8 Secuenciación de fragmentos amplificados

Las construcciones con fragmentos amplificados o fragmentos purificados directamente del gel de agarosa fueron enviadas para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) en el IPICYT, San Luís Potosí, S.L.P.

6.6.9 Análisis *in silico* del fragmentos amplificado

6.6.9.1 Alineamiento múltiple

Para búsqueda de proteínas homólogas de expansinas se utilizó la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool [(BLASTX) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>] (Marchler-Bauer, 2015) de la base de datos del National Center for Biotechnology Information [(NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

El alineamiento múltiple de aminoácidos se realizó con la herramienta MUSCLE [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>] con el método ClustalW, los homólogos (Tabla 1) fueron seleccionados según su nivel de similitud en la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool [(BLAST) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>].

Tabla 1 Secuencias de proteínas tipo expansinas homólogas a MbEXP.

Especie	Código	Número de acceso	Tipo de expansina	Porcentaje de homología
<i>Eucalyptus grandis</i>	EgEXPA22	010064795.1	α	71
<i>Eutrema salsugineum</i>	EsEXPA23	024007168.1	α	69
<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	AlEXPA23	002875515.1	α	67
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtEXPA19	AAW29468.1	α	67
<i>Cicer arietinum</i>	CaEXLA23	012574300.1	Like α	79
<i>Spinacia oleracea</i>	SoEXLA23	021850232.1	Like α	77
<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>	BvEXLA23	010666541.1	Like α	76
<i>Quercus suber</i>	QsEXLA23	023928431.1	Like α	75
<i>Durio zibethinus</i>	DzEXLA23	022741856.1	Like α	71
<i>Manihot esculenta</i>	MeEXLA6	021603793.1	Like α	67

6.6.9.2 Análisis de dominios

El análisis de dominios conservados se realizó 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>).

6.6.9.3 Modelado 3D del fragmento de la proteína tipo expansina (MbEXP)

La predicción de la estructura 3D de la proteína MbEXP tipo expansina se llevó a cabo en la herramienta Swiss Model del Swiss Institute of Bioinformatics (<https://swissmodel.expasy.org/interactive/X86yJ7/models/>) el modelado gráfico de la estructura 3D se realizó en el software Chimera 3D 4.3.

6.6.9.4 Análisis filogenético

Con la ayuda del programa T-COFFEE (Notredame, et al., 2000), se generó un dendrograma de la secuencia en aminoácidos basado en el porcentaje de identidad de secuencias alineadas. Se comparó con secuencias homólogas encontradas correspondientes a α expansinas, β expansinas, like α expansinas y like β expansinas (Tabla 2), y como grupo externo se utilizó un PNPA de *A. thaliana* (No. de acceso 816381). Para esto se utilizó del programa FASTA del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>).

Tabla 2. Secuencias tipo EXPA, EXPB, EXLA y EXLB.

Especie	Código	Número de acceso	Tipo de expansina
<i>Eucalyptus grandis</i>	EgEXPA22	010064795.1	α
<i>Eutrema salsugineum</i>	EsEXPA23	024007168.1	α
<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	AtEXPA23	002875515.1	α
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtEXPA19	AAW29468.1	α
<i>Spinacia oleracea</i>	SoEXLA23	021850232.1	Like α

<i>Beta vulgaris</i> <i>subsp. vulgaris</i>	BvEXPA23	010666541.1	Like α
<i>Quercus suber</i>	QsEXLA23	023928431.1	Like α
<i>Triticum aestivum</i>	TaEXPB	BAD06319.1	β
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdEXPB	XP_003570032	β
<i>Sorghum bicolor</i>	SbEXPB	XP_002461928.1	β
<i>Aegilops tauschii</i> <i>subsp. tauschii</i>	AtEXLB	XP_020186300.1	Like β
<i>Ananas comosus</i>	AcEXLB	XP_020093564.1	Like β
<i>Phoenix dactylifera</i>	PdEXLB	XP_008803823.1	Like β

7 RESULTADOS

7.1 Propagación *in vitro* de *M. bombycina*

La propagación *in vitro* de *M. bombycina* fue muy lenta, ya que a los 90 días después de ser sembrados los explantes, se comenzó a notar crecimiento (Figura 3). De los 96 explantes propagados, la respuesta ante el tratamiento fue: 31% generaron plantas completas de aproximadamente 1.5 cm de alto, 31% generaron callo o brotes poco diferenciados o vitrificados, 23% generaron múltiples brotes diferenciados y 15% que fueron contaminados.

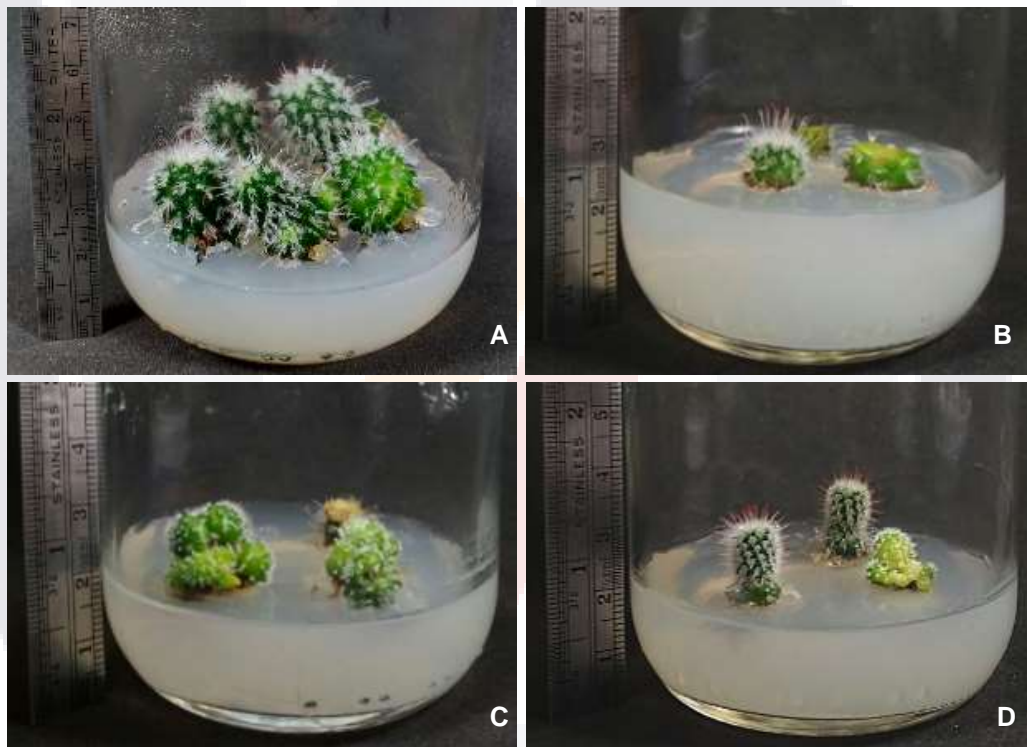


Figura 3. Propagación *in vitro* de *M. bombycina*. **A)** Plántulas madre *in vitro*; **B)** Explantes: cortes 8 mm transversales de tallo; **C) y D)** Explantes tras un periodo de incubación de 60 días a 25 °C bajo un fotoperiodo 16:8 hrs luz/oscuridad, con respuesta de formación de brotes, formación de callo (C), elongación y enraizamiento (D).

7.2 Análisis *in silico* de un gen tipo dehidrina en *A. thaliana*.

7.2.1 Expresión de *ERD10* de *A. thaliana* inducido por fitohormonas

Para predecir los niveles de expresión de *MabDHN* se utilizó como planta modelo a *A. thaliana* ya que a diferencia de *M. bombycina*, su genoma se encuentra totalmente secuenciado y cuenta con múltiples estudios de expresión reportados en las bases de datos. Al realizar la búsqueda de homólogos en la base de datos Thair, se encontró el gen *ERD10* tipo dehidrina en *A. thaliana* (Anexo D2) con identidad de 47% al gen *MabDHN* en *M. bombycina* (Anexo C1).

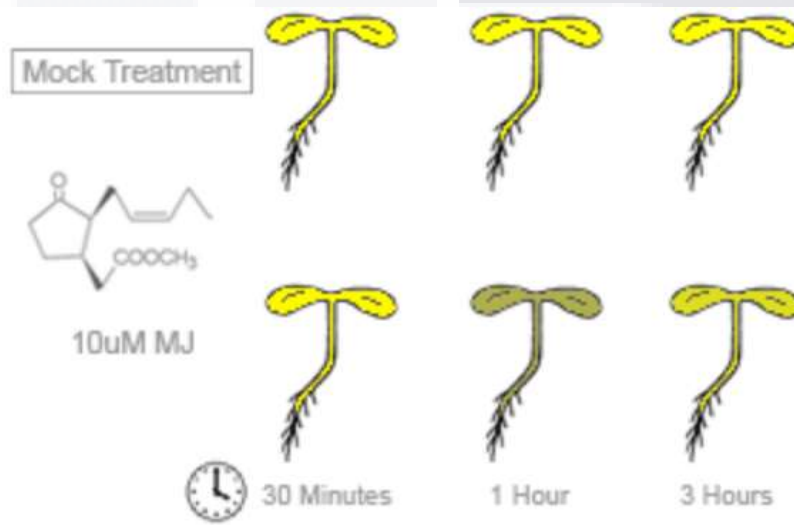


Figura 4. Expresión de *ERD10* en *A. thaliana* inducido por a MeJA con respecto al tiempo. Se compara con un control sin exposición a MeJA, el cambio de coloración indica el cambio de expresión. Información tomada de la base de datos Botany Array Resource (BAR).

En el análisis de la expresión *in silico* utilizando la plataforma BAR, no se encontraron análisis de expresión de *ERD10* inducido por AS, AJ y ET. Sin embargo, sólo se encontraron datos de expresión ante Metil Jasmonato (MeJA) en tallo y hoja, el MeJA tiene como precursor al AJ (Tabla3). En la figura 4, se observa el análisis de expresión de *ERD10* inducido por MeJA 10 mM y su expresión es muy poco con respecto al tiempo (0.06 veces más que el control), y a partir de la primera hora de exposición comenzó a disminuir la expresión (Figura 4 y la Tabla 3).

Tabla 3. Expresión de *ERD10* en *A. thaliana* en respuesta a MeJA.

MeJA (10mM)			
Tiempo (h)	0.5	1	3
AT1G20450	0.06	-0.77	-0.31

Los datos de expresión están reportados como Log2 tomados directamente de la base de datos Botany Array Resource (BAR). Se compara la expresión tras exposición a 10 mM de MeJA de tallo y hoja por 0.5, 1 y 3 hrs. Se compara con un control sin exposición a MeJA. Los valores se reportan como ratios transformados de \log_2 (tratado / control) (Nawkar, *et al.*, 2017).

7.2.2 Análisis de co-expresión de *ERD10* de *A. thaliana*.

La proteína codificada por el gen *ERD10* de *A. thaliana* se relaciona por co-expresión con 5 proteínas LEA (LT178, LT130, COR47, LEA 14, y AT2G23120), donde 3 de ellas son tipo dehidrinas (LT178, LT130 y COR47) y con cuatro proteínas relacionadas al estrés por frío que son: KIN2, COR15B, COR15A y ERD7 (Tabla 4). Este análisis mostró que *ERD10*, tiene mayor grado de coexpresion con LTI30, LTI78 y COR 47, además existe homología entre ellas al ser todas proteínas tipo dehidrina.

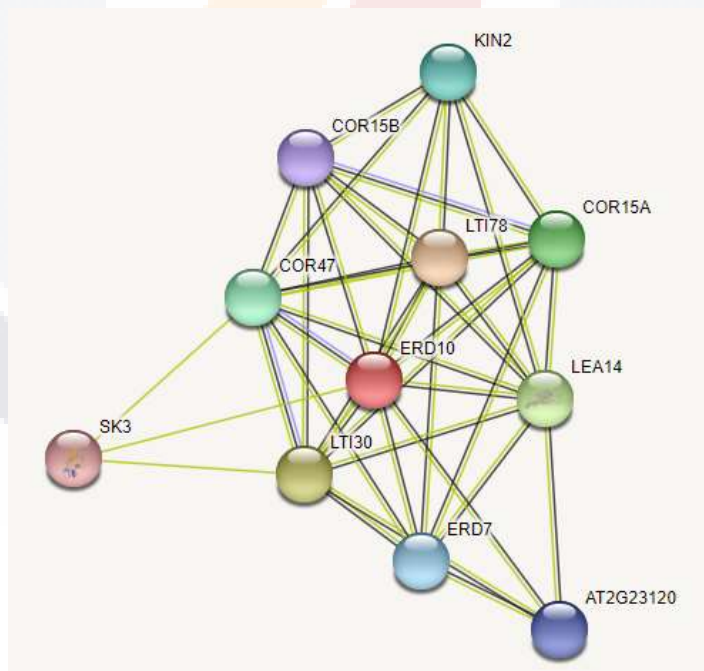


Figura 5. Análisis de co-expresión de *ERD10* en *A. thaliana* con otras proteínas. Los cirulos representan las diferentes proteínas con las que *ERD10* se relaciona y las líneas representan la relación. Las líneas amarillas significan alguna relación de función, las azules proteínas homólogas, y las negras co-expresión. *ERD10* se muestra en color rojo. Datos tomados de la herramienta para la recuperación de genes y proteínas interactuantes (STRING).

Tabla 4 Relación de co-expresión de proteína ERD10 de *A. thaliana* con otras proteínas.

Nombre clave	Tipo de proteína	Co-expresión	Homología
ERD10	Dehidrina <i>A. thaliana</i> (260 aa)	-	-
LTI78	Inducida por baja temperatura (710 aa)	+++	+
LTI30	Dehidrina Xero (193 aa)	+++	+
LEA14	LEA (151 aa)	++	-
COR15A	Proteína regulada en frío. Crioprotectora	+	-
COR47	Dehidrina COR47 (265 aa)	+++	++
KIN2	Proteína inducida por estrés KIN2 (66 aa)	+	-
ERD7	Proteína temprana en la deshidratación (452 aa)	++	-
AT2G23120	LEA grupo 6 (83 aa)	++	-
COR15B	Proteína regulada en frío. Crioprotectora	+	-
SK3	SKP1-like 3; Participa en la ubiquitinación y la posterior degradación proteasomal de las proteínas diana.	-	-

Código: + Poca relación con ERD10; ++ Mediana relación con ERD10; +++ Mucha relación con ERD10. Información tomada de la herramienta de búsqueda para la recuperación de genes y proteínas interactuantes (STRING).

7.3 Análisis de expresión en tiempo real (qPCR) de *MabDHN* tipo dehidrina en *M. bombycina* inducido por fitohormonas

7.3.1 Expresión de *MabDHN* inducido por SA

Los análisis de expresión mediante qPCR, mostraron que la expresión de *MabDHN*, inducido por AS, disminuyó con diferencia significativa al control, esta disminución de la expresión tuvo relación al tiempo de exposición, puesto que a las 8 hrs se observó una mayor disminución que se conservó hasta las 24 hrs (Figura 6).

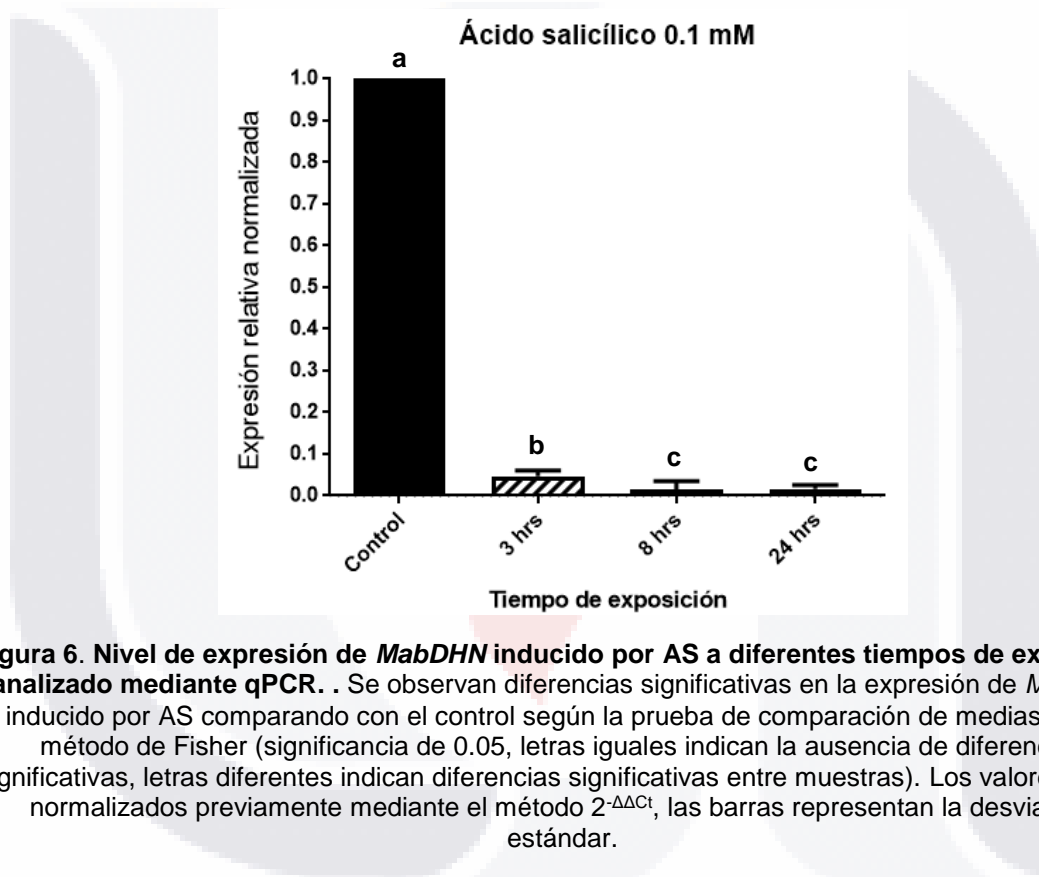


Figura 6. Nivel de expresión de *MabDHN* inducido por AS a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qPCR. . Se observan diferencias significativas en la expresión de *MabDHN* inducido por AS comparando con el control según la prueba de comparación de medias con el método de Fisher (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras). Los valores fueron normalizados previamente mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, las barras representan la desviación estándar.

7.3.2 Expresión de *MabDHN* inducido por AJ

Los análisis de expresión mediante qPCR, mostraron que la expresión de *MabDHN*, inducido por AJ, disminuyó con diferencia significativa al control. El nivel de disminución de la expresión tuvo relación con el tiempo de exposición, a las 8 hrs se observó la mayor disminución de la expresión mientras que a las 24 hrs la expresión volvió a ser similar que a las 3 hrs (Figura 7).

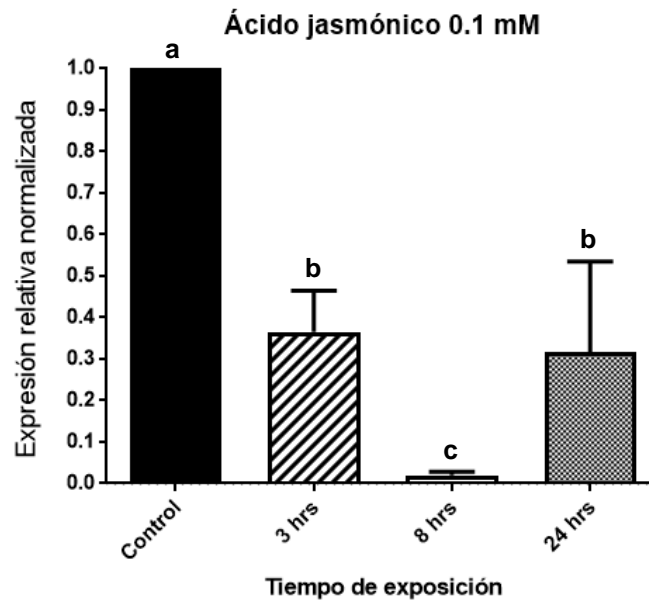


Figura 7. Nivel de expresión de *MabDHN* inducido por AJ a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qPCR. Se observan diferencias significativas en la expresión de *MabDHN* inducido por AJ comparando con el control según la prueba de comparación de medias con el método de Fisher (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras). Los valores fueron normalizados previamente mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, las barras representan la desviación estándar.

7.3.3 Expresión de *MabDHN* inducido por ET

Los análisis de expresión mediante qPCR, mostraron que la expresión de *MabDHN* inducido por ET no tuvo diferencias significativas respecto al control en las primeras horas de exposición (3 y 8 hrs), mientras que a las 24 hrs se observó una mayor expresión del gen, casi 20 veces mayor que el control (Figura 8).

Continuando con el análisis, en el segundo experimento con ET, se observó que hubo un incremento en la expresión de *MabDHN* en las primeras 3 hrs de exposición, mientras que a partir de las 8 hrs la expresión del gen disminuyó sin mostrar diferencias significativas con respecto al control (Figura 9).

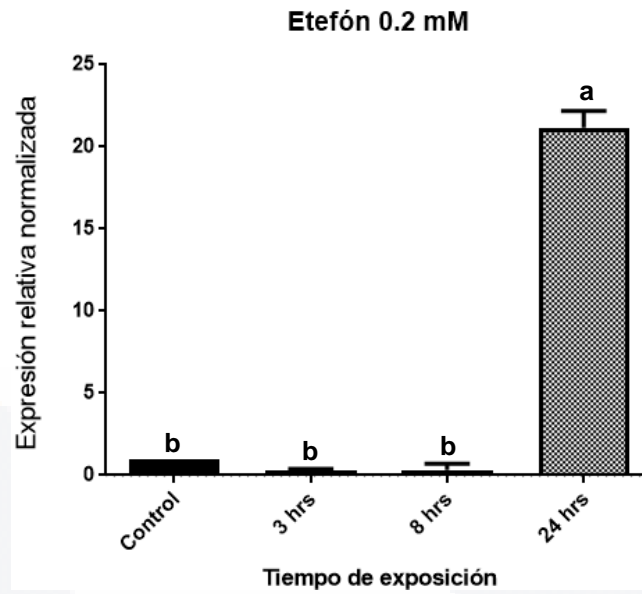


Figura 8. Nivel de expresión de *MabDHN* inducido por ET a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qPCR. Se observan diferencias significativas en la expresión de *MabDHN* tras exposición de 24 hrs con ET comparando con el control según la prueba de comparación de medias con el método de Fisher (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras). Los valores fueron normalizados previamente mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, las barras representan la desviación estándar.

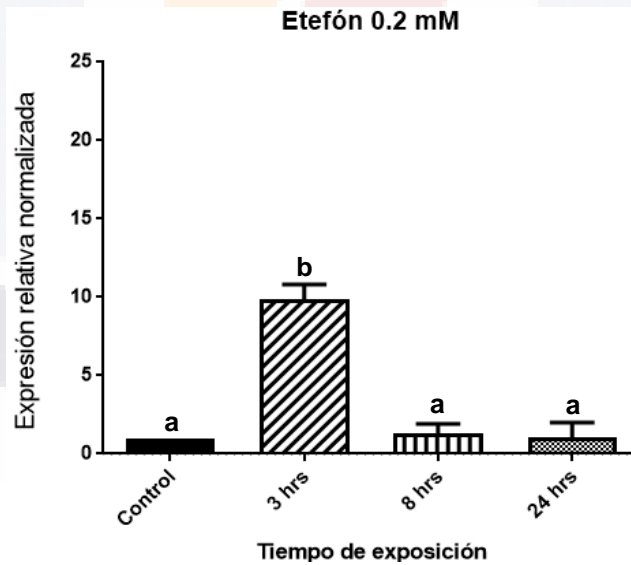


Figura 9. Nivel de expresión de *MabDHN* inducido por ET con pretratamiento de 24 hrs y a diferentes tiempos de exposición analizado mediante qPCR. Se observan diferencias significativas en la expresión de *MabDHN* a las 3 hrs de exposición con ET comparando con el control según la prueba de comparación de medias con el método de Fisher (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras). Los valores fueron normalizados previamente mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, las barras representan la desviación estándar.

La figura 10 muestra una comparación de los resultados de expresión de *MabDHN* inducido por ET de forma continua. La expresión de *MabDHN* aumentó a partir de las 24 hrs mostrando un aumento aproximado 20 veces más que el control, sin embargo, a las 27 hrs la expresión fue 10 veces más que el control, posterior a ese tiempo la expresión del gen disminuyó hasta llegar al estado basal sin diferencias significativas con el control.

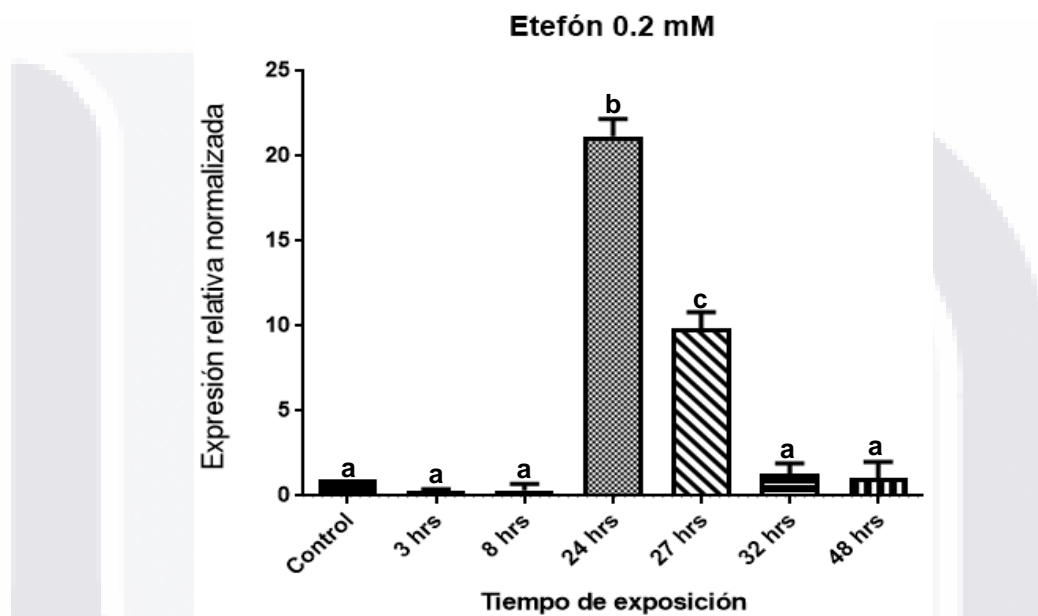


Figura 10. Nivel de expresión de *MabDHN* inducido por ET a tiempos de exposición de 3, 8, 24, 27, 32 y 48 hrs analizado mediante qPCR. Se observan diferencias significativas en la expresión de *MabDHN* inducido por ET, a las 24 hrs y 27 hrs de exposición comparando con el control según la prueba de comparación de medias con el método de Fisher (significancia de 0.05, letras iguales indican la ausencia de diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras). Los valores fueron normalizados previamente mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, las barras representan la desviación estándar.

7.4 Identificación y caracterización de un gen tipo expansina en *M. bombycina*

Se extrajo DNA con concentración y pureza adecuadas para su utilización como molde de amplificación por PCR de un fragmento de un gen de expansinas. En la tabla 5 se muestran los promedios de los datos obtenidos tras la cuantificación de 4 repeticiones de extracción de DNA.

Tabla 5. Cuantificación de productos de DNA de *M. bombycina*

Concentración (ng/μl)	Pureza (OD260/OD280)
785.85	1.97

Con los oligonucleótidos utilizados se amplificaron dos fragmentos con peso molecular de aproximadamente 1000 pb y 750 pb (figura 11^a).

La purificación de ambos fragmentos por separado (Figura 11B) fue con una eficiencia en concentración y pureza adecuadas para que fueran ligados en el vector de clonación (tabla 6).

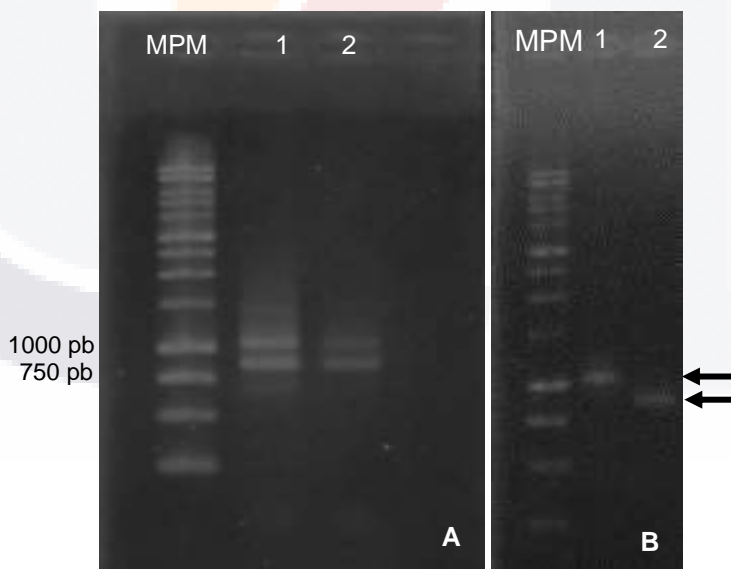


Figura 11. Identificación por PCR de Expansinas en *M. bombycina*. **A)** PCR Expansinas: MPM: Marcador de peso molecular 1Kb Promega; 1 y 2 PCR expansinas en *M. bombycina* una banda de peso aproximado de 1000 pb y otra de peso aproximado de 750 pb. **B)** Purificación de bandas Expansinas con el kit Wizard SB Gel and PCR Clean – Up Promega; MPM: Marcador de peso molecular 1Kb Promega; 1 banda de peso aproximado de 1000 pb; 2 banda de peso aproximado de 750 pb

Tabla 6 Cuantificación de fragmentos tipo expansina purificados de *M. bombycina*.

Banda	Concentración (ng/μl)	Pureza 260/280
1 (1000pb)	31.11	1.85
2 (750 pb)	44.12	1.71

7.4.1 Clonación en vector pGEM de un fragmento tipo expansina

Se clonó en el vector pGEM-T easy el fragmento de aproximadamente 750 pb. La ligación se comprobó mediante restricción del DNA plasmídico con la enzima EcoRI en el cual se liberó el fragmento de tamaño correspondiente al gen de interés (Figura 12).

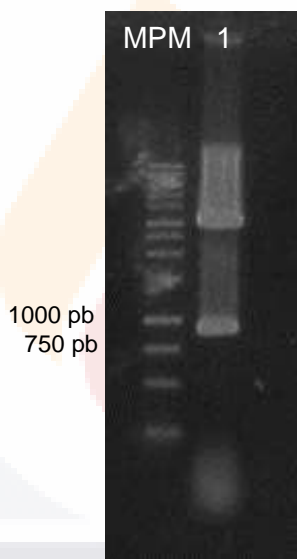


Figura 12. Verificación de clonación por restricción con EcoRI del fragmento tipo expansina en el vector pGEM-T easy. Carriles: MPM: Marcador de peso molecular 1Kb Promega; 1 pGEM con inserto de un fragmento tipo expansina (800- 900 pb).

7.4.2 Secuenciación de un fragmento del gen tipo expansina

La secuenciación del fragmento tipo expansina fue de 615 nucleótidos. Mediante estudios bioinformáticos se observó que en el extremo 5' a partir del aminoácido 2 al 92 corresponde a un exón, seguida de un intrón del aminoácido 93 al 178, otro exón del aminoácido 179 al 340 y por último parte de un intrón del aminoácido 341 al 615 (Figura 13A) La traducción virtual de la parte codificante consta de 83 aminoácidos (Figura 13B) y se le denominó MbEXP.



Figura 13. Traducción virtual de secuencia tipo expansina. A) Secuencia putativa de 615 nucleótidos correspondiente al fragmento *MbEXP*, en rojo se indican los oligos utilizados mientras que los recuadros verdes indican los exones presentes en la secuencia. **B)** Traducción virtual de 83 aminoácidos de la región codificable del fragmento *MbEXP*.

7.4.3 Caracterización *in silico* de un fragmento tipo expansina

El alineamiento múltiple de *MbEXP* se realizó con las 10 proteínas de mayor identidad, como las *EXPA 23* de espinaca (*Spinacia oleraceae*) (77% identidad), remolacha azucarera (*Beta vulgaris sbsp. vulgaris*) (76% identidad), garbanzo (*Cicer arietinum*) (76% identidad) y alcornoque (*Quercus suber*) (75% identidad).

En la parte superior de la figura 14 se indican las secuencias en aminoácidos y su posición en el alineamiento, en la parte inferior de la figura se muestran barras anchas que indican el nivel de conservación entre las regiones alineadas, la región reportada en la figura 14 es la de mayor grado de conservación en todo el alineamiento.

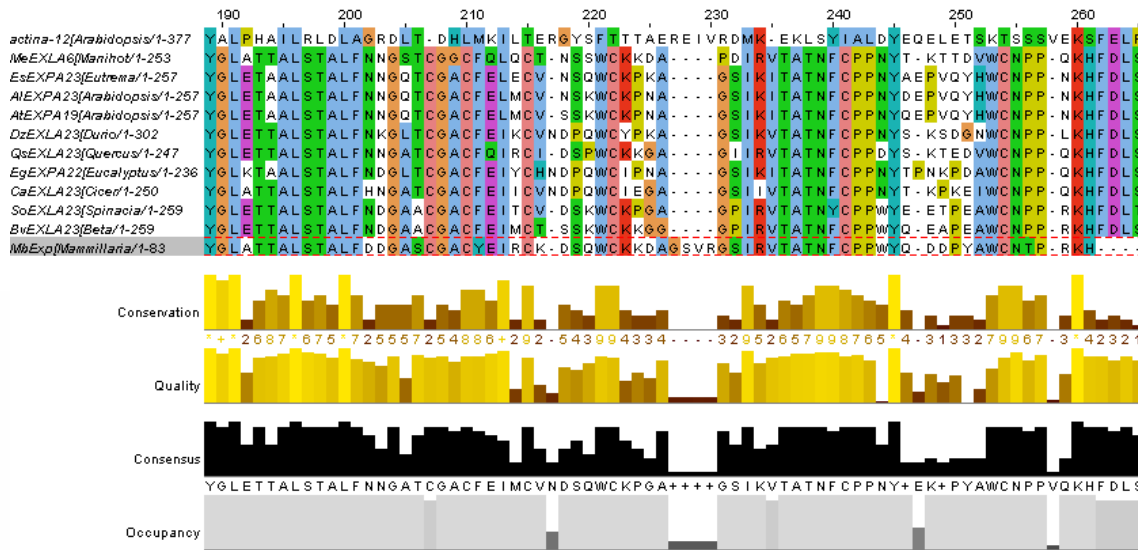


Figura 14. Alineamiento múltiple de genes tipo expansina en diferentes organismos. Las secuencias homologas se obtuvieron mediante la base de datos NCBI [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] y el alineamiento fue realizado con la herramienta MUSCLE [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>]. Las barras amarillas indican las secuencias de aminoácidos conservadas

7.4.3.1 Análisis de dominios

La secuencia putativa MbEXP presentó el dominio estructural conservado tipo DPBB presente en todas las expansinas, y cuatro de los seis residuos conservados de cisteína (C) (Marcados en rosa en la Figura 14) de la región N- terminal, sin embargo, no presentó el motivo HFD (Histidina – Fenilalanina- Ácido aspártico) altamente conservado en expansinas (posición 261) ya que nuestra secuencia se trunca en la Histidina que es el primer aminoácido del motivo HFD (Figura 14).

También, presentó el dominio EG45 parecido al de las endoglucanasas 45 (Expansin_EG45), un dominio funcional o catalítico para hidrólisis de los enlaces hidrógenos entre los polisacáridos de la pared celular, y 2 de los 3 puentes disulfuro formados por residuos de cisteína (Figura 15).

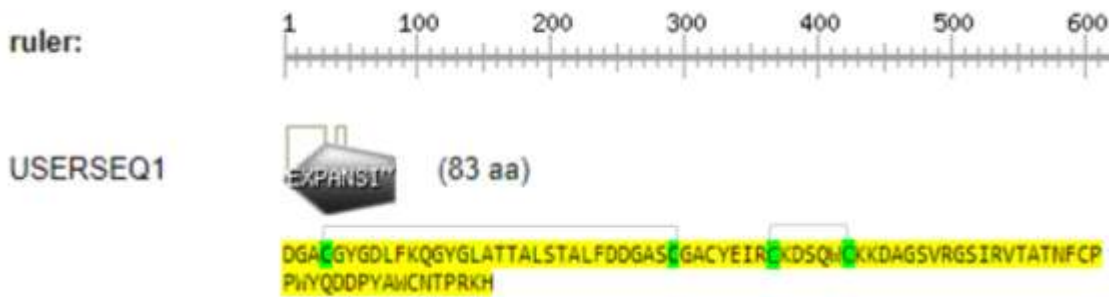


Figura 15. Dominio EG45 endoglucanasa like en fragmento MbEXP de *M. bombicyna*. En la parte superior de la figura se muestra la posición de la secuencia de aminoácidos a manera de regla con la posición del dominio, en la parte inferior de la figura se muestra la secuencia del dominio en amarillo, las cisteínas se indican en verde. La búsqueda de dominio realizó con la herramienta prosite.expasy (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>).

7.4.3.2 Modelado del fragmento de la proteínas tipo expansina MbEXP

Se obtuvo un modelado estructural putativo del fragmento MbEXP tipo expansina, tomado de la estructura EXPB del maíz del PDB. En la figura 17, se observa la estructura y en azul se indica la posición del dominio EG45 like encontrado.

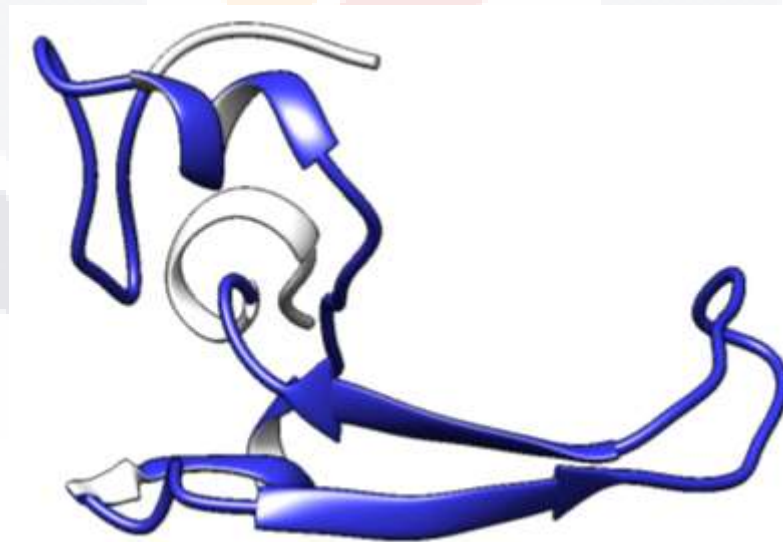


Figura 16. Estructura 3D del fragmento de la proteína putativa MbEXP de *M. bombicyna*. En azul se presenta la sección de la proteína correspondiente al dominio EG45, en blanco se representa parte de dos intrones.

7.4.3.3 Análisis filogenético

El dendrograma mostró la formación de cuatro grupos: EXPA, EXPB, EXLA y EXLB, además del grupo externo de PNP-A de *A. thaliana* (No. de acceso 816381). Los grupos EXPA y EXLA se encuentran claramente diferenciados de EXPB y EXLB. El fragmento putativo MbEXP se encontró en el grupo de las EXPA y EXLA, mostrando relación con secuencias correspondientes a EXPA de *A. thaliana* y *E. salsugineum*. Y correspondientes a EXLA de betabel (*B. vulgaris subsp. Vulgaris*), espinaca (*S. oleracea*) y encino (*Q. suber*) (Tabla 2, Figura 16). El fragmento putativo MbEXP se clasificó como una EXLA debido a que se desconoce su secuencia completa.

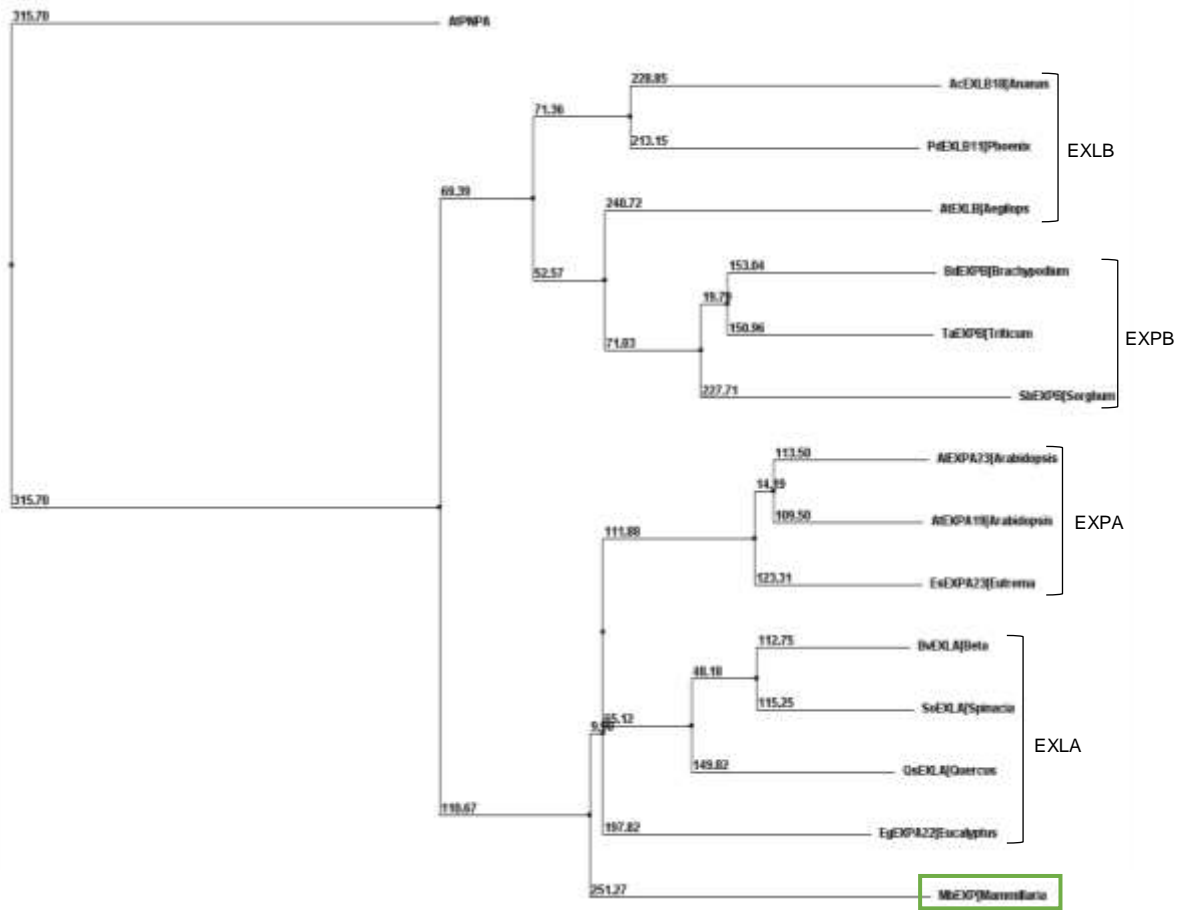


Figura 17. Dendrograma de identidad de proteínas tipo expansina. Se muestra la relación entre EXPA (EXPA y EXLA), EXPB (EXPB y EXLB), con el fragmento putativo MbEXP de *M. bombicyna* en el recuadro verde. Los números indican la longitud de la rama de linaje según su modificación evolutiva. El análisis fue realizado con el programa T-COFFEE (Notredame, *et al.*, 2000) según el método del vecino más próximo.

8 DISCUSIÓN

En México se encuentra una amplia variedad de cactáceas, de las cuales el 78% aproximadamente son endémicas de diversas regiones (Retes-Pruneda, *et al.*, 2007). Este tipo de plantas son por excelencia modelos de resistencia ante condiciones adversas, dando al país gran riqueza a nivel de germoplasma vegetal. Los mecanismos adaptativos de cactáceas ante estrés pueden ser de tipo fisiológico, morfológico o genético. En este último aspecto, se ha visto presente la expresión de genes tipo dehidrininas (Battaglia *et al.*, 2008). Las dehidrininas se relacionan con la capacidad de resistencia de las plantas a la deshidratación generalmente causada por factores abióticos, aunque también se les ha encontrado relación en su expresión por inducción con fitohormonas como AS, AJ y ET, que funcionan como moléculas de señalización en defensa a factores especialmente bióticos.

Hernández-Camacho (2016), identificó y aisló el gen *MabDHN* que codifica para una dehidrina ácida en *M. borbicaya*, además analizó su expresión ante estrés osmótico por congelamiento (-20°C), estrés tipo biótico por heridas y tratamiento con ABA 100 µM en 1.5 y 12 hrs, donde se notó aumento de expresión, mientras que ante estrés por frío y alta salinidad no se encontraron cambios en su expresión. Por lo tanto, nuestro trabajo se enfoca en estudiar el efecto en la expresión de *MabDHN* de las principales fitohormonas presentes en las rutas de señalización ante estímulos estresantes.

Primeramente se buscó la obtención de material vegetal suficiente por propagación *in vitro*, se logró generar brotes en los explantes por activación de areolas con la fitohormona natural BA (Retes-Pruneda, *et al.*, 2007). Se ha comprobado que las citocininas ayudan a diferenciar el tejido calloso en tejidos específicos como brotes (Bhojwani, *et al.*, 2013). Estos brotes fueron subcultivados para la generación de una planta completa con raíz y elongación considerable. El tiempo fue un factor limitante en la experimentación, debido a que la tasa de crecimiento del género *Mammillaria* es baja. Respecto a esto, Retes-Pruneda, *et al.*, (2007), mencionan que aún bajo condiciones *in vitro* y comparada con otros géneros de cactáceas se necesita el doble de tiempo para su desarrollo. La formación de brotes se observó después de 60 días posteriores a ser puestos en el medio de cultivo. La elongación y desarrollo como planta completa se obtuvo después de 120 días (Figura 3), esto sin contar que cerca del 31% de los brotes generó tejido calloso, tejido vitrificado o

brotes con características morfológicas no convencionales, lo que concuerda con los autores antes mencionados.

Para tener una noción más amplia del comportamiento de la expresión de *MabDHN* inducido por diferentes fitohormonas, se realizó un análisis *in silico* utilizando un gen modelo de *A. thaliana* (*ERD10*), el cual codifica para una dehidrina ácida (Hanin, *et al.*, 2011) con similitud del 47% con *MabDHN* de *M. bombycina*, esta similitud es debida a que ambas poseen tres grupos funcionales correspondientes a segmentos K. El análisis *in silico* con *ERD10* fue debido a que existen más estudios de expresión en dehidrinas de *A. thaliana* que de cactáceas, y estos se encuentran reportados en una base de datos (Thair) que hace comparaciones de todos los resultados de expresión de genes en *A. thaliana* reportados hasta el momento.

El resultado de este análisis mostró que no existen estudios de expresión de *ERD10* inducido por AS, AJ y ET, sólo se pudo encontrar la expresión por inducción con Metil Jasmonato (MeJA) en tallo y hoja, el cual tiene como precursor al AJ (Tabla 3). Los resultados de expresión *in silico* de *ERD10* inducido por MeJA 10 mM mostraron un pequeño cambio con respecto al tiempo, y a partir de la primera hora de exposición comenzó a disminuir la expresión (Figura 4 y Tabla 3). Este análisis predictivo concuerda con nuestros resultados utilizando AJ, ya que no se observó expresión de *MabDHN* (Figura 7).

El estudio de co-expresión *in silico* reveló que *ERD10* se relaciona con 5 proteínas LEA; donde 3 de ellas son tipo dehidrinas y con otras 4 proteínas relacionadas al estrés por frío (Figura 5, Tabla 4). Las proteínas LT178 y COR 47 (Figura 5) presentan actividad de defensa contra el congelamiento (Mantyla, *et al.*, 2005; Vladan, *et al.*, 2013) y como se mencionó anteriormente, *MabDHN* aumenta su expresión ante congelación (-20 °C) (Hernández-Camacho, 2016). Aunque se sabe que bajo un estímulo estresante la planta reacciona de diversas maneras para defenderse y desencadena la expresión de una amplia gama de genes (Liu *et al.*, 2016), la co-expresión de las dehidrinas se da con proteínas muy similares a ellas, no se encuentra una alta variación en grupos de proteínas (Figura 5, Tabla 4), incluso las dehidrinas al acumularse bajo estímulos de baja temperatura suelen llamarse también proteínas COR (Cold Responsive) (Battaglia *et al.*, 2008). Este análisis es muy interesante debido a que se sabe que algunas dehidrinas actúan de manera sinérgica para mejorar la tolerancia vegetal (Hanin, 2011). Por lo que en un futuro podrían realizarse otros

trabajos que relacionen el nivel de funcionalidad en la defensa, producido por la co-expresión de *MabDHN*, con otras dehidrinas o proteínas COR, homólogas a las relacionadas con ERD10.

La defensa vegetal ante el estrés consta de dos etapas, una primaria inmediata y una secundaria o retardada. Se ha encontrado que muchas dehidrinas actúan en la segunda etapa. El AS, AJ y ET funcionan como moléculas de señalización en respuesta estímulos estresantes principalmente de tipo biótico como patógenos biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos (Díaz-Puentes, 2012). No se ha revelado aun la función exacta de la defensa ante estrés biótico por parte de las dehidrinas (Hanin *et al.*, 2011). Sin embargo, existen genes dehidrina que son inducibles ante estrés biótico como abiótico, tal es el caso de los genes dehidrina *DHN1* y *DHN2* de *Vitis yeshanensis*, donde la primera responde ante estrés por deshidratación y ante contaminación de *Erysiphe necator*, agente causante del mildiu polvoriento de la vid, mientras que *DHN2* sólo responde ante factores abióticos (Yang *et al.*, 2012).

Los resultados del análisis de expresión por qPCR mostraron que *MabDHN* es un gen no constitutivo puesto que su expresión cambia ante diversos estímulos estresantes y fitohormonas. Además, es importante tener en cuenta que el ABA es un regulador de la expresión de *MabDHN*, aumentándola considerablemente bajo una concentración de 100 μ M de ABA y disminuyendo cuando la biosíntesis de la fitohormona es suprimida (Hernández-Camacho, 2016).

El primer tratamiento estudiado fue con explantes de *M. bombicyna* en presencia de AS a 100 μ l en medio MS líquido con tiempos de exposición de 3, 8 y 24 hrs, esto fue debido a que se encontraron reportes de dehidrinas que responden a tiempos de exposición similares (Shen *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2012). Como control se utilizaron plantas en medio MS sin exposición a AS. Los resultados mostraron que la expresión de *MabDHN*, inducido por AS, disminuyó con diferencia significativa al control. La disminución de la expresión se relacionó con el tiempo de exposición ya que se incrementó a las 8 hrs y se conservó hasta las 24 hrs (Figura 6). Estos resultados no concuerdan con los reportados por otros autores ya que se menciona que tratamientos con AS 100 μ M aumentaron la expresión de genes tipo dehidrina dentro de las primeras 24 hrs de exposición (Shen *et al.*, 2004). Otro ejemplo es el caso del gen *DHN2* de *Vitis vinífera* que alcanzó una expresión 20 veces más que los niveles basales en tratamiento con 100 μ M de AS a las 8 hrs de exposición (Yang *et al.*,

2012). Experimentos en el gen *Lti30* tipo dehidrina (Kn) de *A. thaliana* revelaron aumento de expresión por inducción con AS 0.25 mM en plantas sometidas a estrés por sequía (Hanin *et al.*, 2011) pero una disminución de la expresión del gen por inducción con AS >0.25mM bajo el mismo estrés. Estos resultados indican que AS se encuentra relacionada a la regulación génica ante estrés abiótico por sequía. Por otro lado, AS inhibe la vía de transducción de señal octadecanoide, dada por compuestos derivados del ácido graso octadecanoide ácido α -linolénico, entre los que se encuentra el AJ (Shen *et al.*, 2004). Por lo anterior, AS puede regular negativamente genes de respuesta ante heridas, característica que concuerda con lo descrito por Hernández-Camacho (2016) y por lo que posiblemente *MabDHN* desempeñe un papel de regulación negativa ante una resistencia sistémica adquirida ante un factor estresante.

El segundo tratamiento hormonal probado fue con explantes de *M. bombycina* tratados con AJ 100 μ M diluido en Tween 20 con tiempos de exposición de 3, 8 y 24 hrs. Los resultados mostraron disminución en la expresión de *MabDHN* inducido por SA, esta disminución fue dependiente al tiempo de exposición. A las 8 hrs se observó la mayor disminución de la expresión, mientras que a las 24 hrs la expresión vuelve a ser similar que a las 3 hrs (Figura 7). El AJ está relacionado a la respuesta ante estrés por heridas y respuestas de defensa y se ha visto que influye en la expresión de genes tipo dehidrina inducibles por ABA, sin embargo, los papeles de AJ y ABA en las vías de transducción de señales se encuentran separados (Shen *et al.*, 2004).

Al contrario de otros estudios moleculares de genes tipo dehidrina, *MabDHN* disminuyó su expresión ante AJ. Una comparación directa es lo reportado por Richard *et al.*, (2000) quienes observaron 3 veces más expresión respecto al control del gen *PgDhn1* en *Picea glauca* con tratamientos de AJ 100 μ M y 8 hrs de exposición. Al igual que *MabDHN*, *PgDhn1* aumentó su expresión por heridas por lo que AJ podría estar regulando su expresión ante la defensa del gen ante heridas. Estas comparaciones crean incertidumbre en el papel de AJ en la regulación de *MabDHN* ante heridas y estrés por congelamiento, pues indican regulación negativa por parte de la fitohormona. Por otro lado, Yang *et al.*, (2012) encontraron que el gen *DHN1* de *V. vinifera* y *V. yeshanensis* aumentó su expresión tanto en presencia de AJ y AS como de una infección por *E. necátor*, mientras que el gen *DHN2* de la misma especie y que no es inducible ante *E. necátor*, mostró una muy inferior expresión ante AJ y AS a comparación que *DHN1*, por lo tanto la inducción por AJ y AS está relacionada a la inducción por factores bióticos.

El efecto de AS y AJ se han visto en la regulación del estrés causado por heridas pudiendo acumular proteínas tipo dehidrina (Cao *et al.*, 2017), sin embargo, este tipo de estrés puede ser detectado por la planta como un estrés por deshidratación. Por lo tanto, los genes dehidrina encendidos sí podrían ser regulados por AS y AJ (Hanin *et al.*, 2011) pero no se asegura que tengan función propiamente ante estrés biótico.

El tercer tratamiento se realizó con explantes de *M. bombycina* tratados con ET tratando las plantas de *M. bombycina* con ácido 2-cloroetilfosfónico conocido comúnmente como Etefón a 200 μ M. El etefón es un precursor de etileno, que al estar en solución acuosa a pH 5 o superior se hidroliza liberando etileno además de ion Cl^- y ion fosfato, el Etefón también puede ser absorbido y metabolizado por hojas y tallos (Cho, *et al.*, 1988). Los tiempos de exposición del tratamiento con etileno fueron de 3, 8 y 24 hrs. Se encontraron diferencias significativas entre la expresión del gen con respecto al tiempo de exposición y el control a las 24 hrs. Se observó que en las primeras horas de exposición; 3 y 8 hrs, la expresión no mostró diferencia significativa respecto al control (Figura 8). Por lo tanto, se realizó un segundo experimento en el cual los explantes fueron sometidos a un pretratamiento de 24 hrs con la solución de Etefón 2 a mM. Transcurridas las 24 hrs se expusieron nuevamente los explantes a tiempos de 3, 8 y 24 hrs. A las primeras 3 hrs de exposición se observó aumento de expresión de *MabDHN* aproximadamente 10 veces superior al control (Figura 9). Mientras que a las 8 y 24 hrs de exposición, la expresión volvió a su estado basal al no observarse diferencias significativas con respecto al control (Figura 9).

Si se consideran los resultados de ambos experimentos con Etefón a 2 mM como tiempos de exposición continuos puede apreciarse que a las 24 hrs hubo un aumento de expresión de *MabDHN* aproximadamente 20 veces más que el control y a las 27 hrs la expresión disminuyó a la mitad. Posterior a las 27 hrs, la expresión disminuyó hasta que a las 32 hrs volvió a su estado basal (Figura 10). Cao *et al.*, (2017) reportaron que los genes tipo dehidrina *HbDHN1* y *HbDHN2* de *Hevea brasiliensis* en una planta transgénica de *A. thaliana* en tratamiento con etileno 1.5%, aumentaron su expresión desde las 3 hrs teniendo un pico máximo a las 6 y 12 hrs de exposición y reduciendo a las 24 hrs. La expresión de algunos genes tipo dehidrina aumentan la actividad de enzimas ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, y reducen la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido, por lo que se cree eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cao *et al.*, 2017). Mientras que el AS como molécula de señalización para

la función antagonista induce a la formación de ROS y produciendo una defensa sistémica adquirida (Díaz-Puentes, 2012) por lo que el AS podría funcionar también como antagonista en los efectos de proteínas tipo dehidras inducibles por ET.

Debe recordarse que las dehidras, al igual que el resto de las proteínas LEA tienen funciones y comportamientos muy variados, incluso tratándose de dehidras de la misma especie y con alta homología, por lo que el comportamiento es dependiente en ocasiones de la propia proteína particular (Yang *et al.*, 2012). Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo corresponden a plantas cultivadas bajo condiciones *in vitro* lo que podría ejercer un efecto diferencial en el comportamiento de *MabDHN* comparado con plantas cultivadas bajo otras condiciones como las reportadas en la mayoría de los artículos anteriormente citados.

En el caso de *MabDHN* en *M. bombycina* cultivada *in vitro*, tuvo una regulación negativa en su expresión inducido por AJ y AS a 100 μ M dentro de un rango de 3 a 24 hrs de exposición. Mientras que al ser inducido por ET (Etefón 2 mM), tuvo una regulación positiva dentro de las 24 a las 27 hrs de exposición. Lo anterior puede indicar que además del papel de protección contra tipos de estrés abiótico dependientes de ABA encontrado por Hernández- Camacho (2016), dicho gen podría no tener un papel directo en la defensa contra factores estresantes de tipo biótico, puesto que los genes tipo dehidra con respuesta a estrés biótico reportados en otros estudios, son también regulados positivamente por AJ o AS en conjunto con ABA. Además, el AJ y el ET tienen respuesta complementaria en la activación de genes de defensa contra patógenos pero tienen una respuesta antagonista como moléculas de señalización ante heridas o daños mecánicos (Jordán *et al.*, 2006). En este sentido, la inducción con ET de *MabDHN* podría funcionar en conjunto con ABA en la defensa del estrés por heridas que como se dijo anteriormente, la planta puede detectar como estrés por deshidratación en la zona de corte.

Por otro lado, se buscó complementar el conocimiento de genes de defensa ante estrés en *M. bombycina*. Se decidió buscar la identificación de un gen tipo expansina, puesto que están involucradas en varios procesos de defensa ante estrés (Guimaraes, *et al.*, 2017), además generan una respuesta de apertura o cierre estomático (Wang, *et al.*, 2011).

No existen reportes hasta el momento de genes tipo expansinas en *M. bombycina* por lo que se identificó utilizando oligonucleótidos probados previamente en cactáceas con

resultados positivos (Herrera-Martínez, 2015). Se obtuvo la amplificación por PCR de dos fragmentos, uno con un tamaño de aproximadamente 1000 pb y un segundo de aproximadamente 750 pb (Figura 11, Tabla 6). La amplificación de dos bandas puede ser debido a que corresponde a una familia multigénica conformada por EXPA y EXPB (Kende, *et al.*, 2004). Por lo tanto, se pudo estar amplificando dos miembros de esta familia, o en su defecto tratarse de fragmentos inespecíficos amplificados. El fragmento de mayor interés fue el de 750 pb, debido a que en estudios previos de cactáceas de los géneros *Pereskia* y *Opuntia* fragmentos similares fueron caracterizados positivamente como genes tipo expansina (Herrera-Martínez, 2015). Por lo tanto dicho fragmento fue clonado en el vector pGEM para su secuenciación y caracterización (Figuras 12) obteniéndose una secuencia de 615 pb el cual es pequeño comparado con otras expansinas con pesos característicos de entre 1000 a 1500 pb dependiendo de las regiones no codificantes (Sánchez *et al.*, 2004).

La traducción *in silico* del fragmento secuenciado reveló una secuencia putativa codificante de 83 aminoácidos (Figura 13) y presentó identidad (75- 77%) con EXLA y con EXPA, es importante mencionar que el análisis no indicó identidad con algún otro tipo de proteínas. Por lo que la secuencia putativa fue denominada como MbEXP y es el primer fragmento tipo expansina reportado en *M. bombicyna*.

En el fragmento putativo MbEXP se encontró el dominio DPBB que es un dominio estructural conservado en una amplia variedad de proteínas entre las que se encuentran las expansinas (Ludidi *et al.*, 2002). El plegamiento de las expansinas está muy relacionado a su función no catalítica al formarse un plegamiento tipo β -barril de seis hebras con una ranura para la unión de sustrato los residuos de triptófano del dominio C-terminal y se posicionan de manera que la proteína interactúa con puentes de hidrógeno de glucanos separándolos (Sampedro, *et al.*, 2005).

Dentro del fragmento putativo MbEXP se encontraron dos intrones que podrían corresponder a los presentes en otras expansinas en la región N- terminal, el primero en la posición 93 a 178 es también encontrado en Péptidos Natriuréticos de Plantas (PNP). El segundo intrón encontrado en la secuencia a partir de la posición (Figura) podría corresponder a un intrón característico de expansinas encontrado cerca de ambos dominios funcionales (EG45 / Sitio de unión a celulasa) (Ludidi *et al.*, 2002).

Se encontró el dominio EG45 parecido a las endoglucanasas de la familia 45 (EG45), presente en expansinas hacia el N-terminal. Este dominio en la mayoría de las expansinas consta de aproximadamente 120 residuos (Yennawar *et al.*, 2006), sin embargo MbEXP al ser un fragmento de 83 aminoácidos no contiene el dominio completo. El dominio catalítico EG45 da una función de hidrólisis de pared celular por contener tres pares de residuos de cisteínas altamente conservadas que generan puentes disulfuro capaces de unirse a carbohidratos (Ludidi *et al.*, 2002). EG45 también está presente en PNP), y tiene una secuencia muy parecida al encontrado en expansinas, pues se piensa surgieron de un ancestro común de moléculas endoglucanasas primitivas, sin embargo en la evolución los PNP perdieron este dominio catalítico mientras que las expansinas lo conservaron (Ludidi *et al.*, 2002).

El fragmento putativo MbEXP presentó sólo cuatro residuos conservados de cisteína, característicos de la región N-terminal de las expansinas. No se encontró el motivo HFD completo en la secuencia putativa MbEXP, el cual forma parte del sitio catalítico del motivo EG45 parecido al de las endoglucanasas 45, este motivo lo presentan la mayoría de las expansinas a diferencia de los PNP que no lo presentan (Ludidi *et al.*, 2002).

El segundo dominio de las expansinas no se encontró en el fragmento putativo MbEXP (Figura 14), este dominio es parecido al grupo 2 de los alérgenos del polen, tiene actividad de unión a celulosa (CBD) y consta de aproximadamente 90 residuos en posición C-terminal con residuos conservados de triptófano (W) (Sánchez *et al.*, 2004; Yennawar *et al.*, 2006) y no se encuentra en PNP.

La estructura putativa encontrada mostró un fragmento con estructura β -plegada (Figura 17) que podría pertenecer al dominio EG45 parecido a las endoglucanasas caracterizado por formar una estructura de β - barril de seis cadenas flanqueado por bucles cortos y hélices α (Yennawar *et al.*, 2006), sin embargo al ser un fragmento incompleto de gen tipo expansina, no se consiguió predecir la estructura completa.

Basado en los análisis anteriores, no es posible clasificar al fragmento putativo MbEXP como una EXPA o una EXPB, ya que la diferencia entre proteínas EXPA y EXPB es muy poca a nivel estructural y molecular pues ambas poseen un péptido señal y los dos dominios de expansinas, el EG45 parecido al de las 45 endoglucanasas con el motivo putativo HFD y el CBD con residuos conservados de Triptófano (Zhu, *et al.*, 2014). Las principales diferencias en secuencias EXPA y EXPB depende de la ubicación de los motivos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y las organizaciones exón-intrón característico de cada grupo (Zhu, *et al.*, 2014), esta diferencia se da principalmente en la región C-terminal con diferencia de posición del motivo CBD. Sin embargo, el fragmento putativo MbEXP corresponde únicamente a la posición N-terminal de la secuencia donde las diferencias entre EXPA y EXPB son menores (Sampedro, *et al.*, 2005).

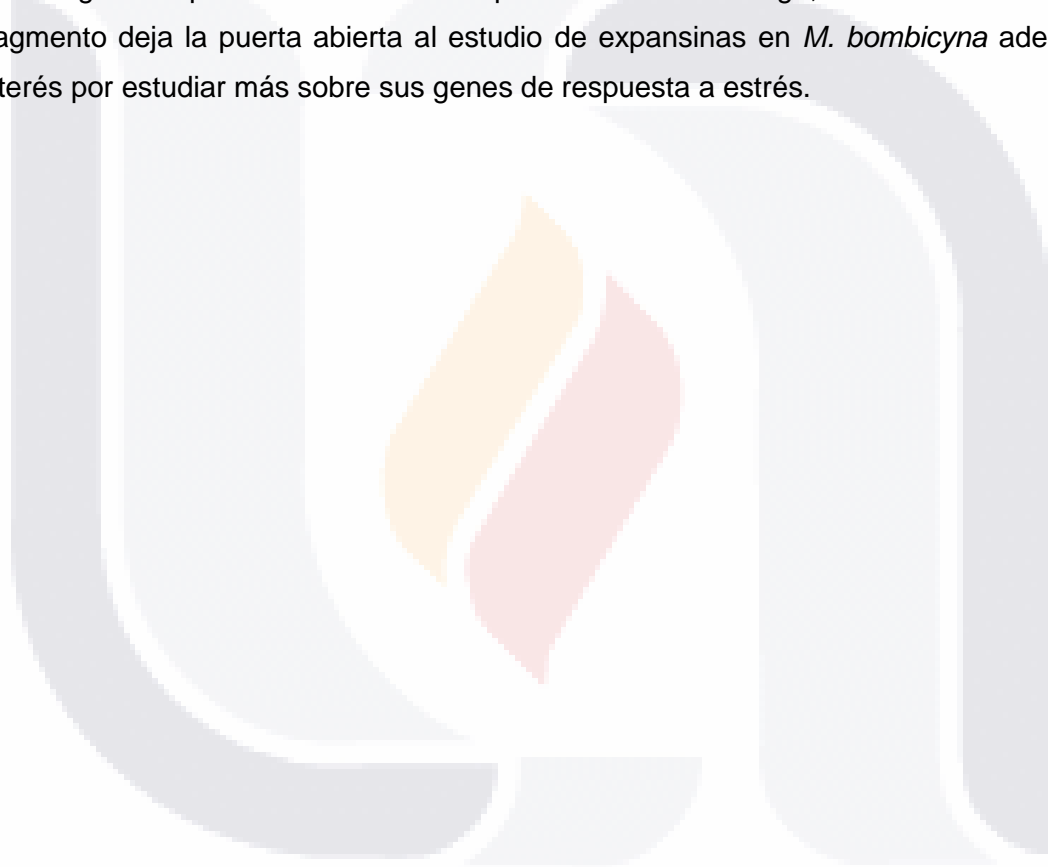
Por lo tanto se realizó un análisis filogenético donde se compararon los cuatro grupos expansina: EXPA, EXPB, EXLA y EXLB (Reyes-Silva, *et al.*, 2013). El dendrograma fue construido a partir de un alineamiento local (Tabla 2) que corresponden sólo a la región presente en MbEXP para disminuir errores en la clasificación. Como grupo externo se utilizó la proteína PNP-A de *A. thaliana* (No. de acceso 816381), en el dendrograma puede observarse divergencia entre PNP-A y el resto de las proteínas (Figura 16), incluidas MbEXP. Los números en el dendrograma indican la longitud de la rama de linaje según su modificación evolutiva (Figura 16), puede observarse una mayor longitud en la rama de PNP-A a diferencia del resto de las expansinas analizadas entre ellas, indicando lejanía entre PNP y expansinas a partir de su ancestro común. Estos resultados sugieren que MbEXP posee un ancestro común con proteínas PNP pero es poco probable que corresponda a una, a pesar de conocerse hasta ahora sólo su región C-terminal donde comparte el dominio EG45 con proteínas PNP.

Por otro lado, en el dendrograma, los grupos EXPA y EXLA se encuentran claramente diferenciados de EXPB y EXLB (Figura 16). Según la nomenclatura de Kende, *et al.*, (2004), aquellas proteínas filogenéticamente relacionadas a las primeras expansinas encontradas en pepino, se les llama EXPA, mientras que aquellas proteínas filogenéticamente relacionadas al grupo I de los alérgenos del polen, se les llama EXPB. El fragmento putativo MbEXP se encontró en el grupo de las EXPA y EXLA, mostrando identidad con secuencias correspondientes a EXPA de *A. thaliana* y *E. salsugineum*, y correspondientes a EXLA de betabel, espinaca y encino (Tabla 2, Figura 16).

Puede observarse que dentro de las EXPA se incluyeron especies de la familia brassicaceae, sin embargo AtEXP19 y la AtEXP23 de *A. thaliana* se encuentran dentro de un mismo linaje a diferencia de EsEXP23 de *E. salsugineum* que está dividida por un nodo de las otras EXPA por pertenecer a otra especie de la misma familia. Por otro lado, dentro de las EXPLA se incluyeron de la familia amaranthaceae la BvEXLA de betabel y SoEXLA de espinaca y de la familia fagaceae la QsEXLA de encino. Dentro del alineamiento no

fueron incluidas otras expansinas pertenecientes a la familia cactaceae, lo que posiblemente crea la divergencia entre MbEXP y el resto de las EXPA con una mayor longitud en su rama de linaje, al no tener una relación evolutiva tan cercana (Hernández-Camacho, 2016) (Tabla 2, Figura 16).

Por todo lo anterior, es posible que MbEXP corresponda a una proteína EXPA, sin embargo debido a que se desconoce su secuencia completa se clasificó como una EXLA. Sería necesario en un futuro realizar más estudios para dilucidar la secuencia completa de este fragmento putativo hasta ahora tipo EXLA. Sin embargo, la identificación de este fragmento deja la puerta abierta al estudio de expansinas en *M. bombicyna* además del interés por estudiar más sobre sus genes de respuesta a estrés.



9 CONCLUSIONES

Se logró la obtención de material vegetal suficiente por propagación *in vitro* utilizando BA siguiendo el protocolo descrito por Retes-Pruneda, *et al.*, 2007.

La expresión de *MabDHN* tipo dehidrina en *M. bombycina* es regulada negativamente por las fitohormonas AS y AJ 100 μM en un lapso de 3 a 24 hrs en *M. bombycina* bajo condiciones *in vitro*.

La presencia de ET a 2 μM regula positivamente la expresión de *MabDHN* en *M. bombycina* con un pico máximo a las 24 hrs que disminuye a las 27 hrs de exposición, bajo condiciones *in vitro*, previo y posterior a ese tiempo no presenta cambios en la expresión.

Se identificó un fragmento de un gen para expansinas en *M. bombycina* denominado *MbEXP*. Este fragmento contiene el dominio N-terminal EG45 parecido a las endoglucanasas y cuatro de los seis residuos de cisteína característicos de las expansinas. Y según el análisis *in silico* fue clasificado como una EXLA.

10 GLOSARIO

ABA: Ácido Abscísico

AIA: Ácido Indol Acético

AJ: Ácido Jasmónico

AS: Ácido Salicílico

BA: Benciladenina

C: Cisteína

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas

CBD: Dominio con actividad de unión a celulosa

DHN: Dehidrina

ET: Etileno

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

PCR: Reacción En Cadena De La Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

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

11 BIBLIOGRAFÍA

- Abedini, R., GhaneGolmohammadi, F., PishkamRad, R., Pourabed, E., Jafarnezhad, A., Shobbar, Z.S., Shahbaz, M. (2017). Plant dehydrins: shedding light on structure and expression patterns of dehydrin gene family in barley. *Plant Research*. 1-17.
- Battaglia, M., Olvera, C. Y., Garciarrubio, A., Campos, F. y Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 148 (1): 6-24.
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 27, 343-350.
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* .7.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*. 9: 1055-1066.
- Bhojwani, S.S., Dantu, P. K., (2013) *Tissue Culture: An Introductory Text*. Plant Science, USA.
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Research*. 45, D313-D319.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Burrieza, H.P., Koyro, H.W., Tosar, L.M., Kobayashi K., Maldonado, S. (2012). High salinity induces dehydrin accumulation in *Chenopodium quinoa* Willd. cv. Hualhuas embryos. *Plant Soil*. 354: 69.
- Butterworth C.A., Wallace R.S. (2005). Molecular phylogenetics of the leafy cactus genus *Pereskia* (Cactaceae) *Systematic Botany*. 30:800–808.
- Butterworth, C. A., Wallace, R.S., (2004). Phylogenetic studies of *mammillaria* (cactaceae)—insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap. *American Journal of Botany*. 91(7): 1086-1098.

- Cao, Y., Xiang, X., Geng, M., You, Q., & Huang, X. (2017). Effect of *HbDHN1* and *HbDHN2* Genes on Abiotic Stress Responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 8: 470.
- Chen, L.J., Zou, W.S., Wu, G. *et al.* (2017). Tobacco alpha-expansin EXPA4 plays a role in *Nicotiana benthamiana* defence against Tobacco mosaic virus. *Planta*. 1-14
- Cornejo-Romero, A., Vargas-Mendoza, C. F., Valverde, P., Rendón-Aguilar, B. (2013). Estructura genética y filogenética en cactáceas. *Cact Suc Mex*. 58 (1): 4-28.
- Cuevas-Velázquez, C. L., Covarrubias-Robles, 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. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 14(2): 97-105.
- Díaz-Puentes, L. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*. 10(2): 257-267.
- Dubrovsky, J.G. (1996). Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti and its ecological implication. *American Journal of Botany*. 83: 624–632.
- Dure, L., Greenway, S.C., Galau, G.A. (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry* 20: 4162–4168
- Edwards E.J., Donoghue, M.J. (2006). *Pereskia* and the origin of the cactus life-form. *American Naturalist*. 167:777–793
- Edwards, E.J., Nyffeler, R., Donoghue, M.J. (2005). Basal cactus phylogeny: implication of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany*. 92:1177–1188.
- EMBL-EBI. (2017). European Molecular Biology Laboratory. Cambridgeshire <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
- Eng-Sánchez, F. (2008). Jasmonatos: compuestos de alto valor para la agricultura. Parte I. Actividad biológica y ruta biosintética del ácido jasmónico en plantas. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 51-59.

- Giarola, V., Challabathila, D., Bartels, D. (2015). Quantification of expression of dehydrin isoforms in the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum* using specifically designed reference genes. *Plant science*. 236: 103-115.
- Gómez-Cadenas, A., García-Agustín, P. (2006). Fitohormonas: metabolismo y modo de acción. *Publicacions de la Universitat Jaume I. España*. 8: 335.
- Graham, C. (2014). *Cacti and Succulents: An illustrated guide to the plants and their cultivation*. Croeood. EUA. 192 páginas.
- Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*. 30, S162-S173.
- Guimaraes, L.A., Mota, A.P.Z., Araujo, A.C.G. (2017). Genome-wide analysis of expansin superfamily in wild *Arachis* discloses a stress-responsive expansin-like B gene. *Plant Molecular Biology*. 94 (1-2): 79-96.
- Guralnick, L.J., Gladsky, K. (2017). Crassulacean acid metabolism as a continuous trait: variability in the contribution of Crassulacean acid metabolism (CAM) in populations of *Portulacaria afra*. *Evolution Plant Biology, Ecology*. 3(4).
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., & Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling & behavior*, 6(10), 1503-9.
- Hernández-Camacho, S. (2016). Aislamiento y caracterización de un gen tipo dehidrina en cactáceas y estudio de su expresión en *Mammillaria bombycina*. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
- Hernández-Camacho, S., Pérez-Molphe-Balch, E., Alpuche-Solís, A.G., Morales-Domínguez, J.F. (2017). Identification and evolutionary relationships of partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *Journal of experimental botany*. 86:151- 162.
- Hernández-Hernández T., Hernández H.M., De-Nova J.A., Puente R., Eguiarte L.E., Magallon, S. (2011). Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae) *American Journal of Botany*. 98:44–61.

- Herrera-Martínez, V. (2015). Identificación y estudio de expresión de dos genes relacionados con la abertura y cierre de estomas en *opuntia ficus-indica* y *pereskia sacharosa* (cactaceae). (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
- Hulo N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuche, B.A., de Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P.S., Sigrist, C.J.A. (2008). The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res.*36 (Database issue):D245-9. <http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/>
- Jordán, M., Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. Ediciones Universidad de la Serena. Chile. 16: 1 – 28.
- Kende, H., Bradford, K.J, Brummell, D.A., Cho, H., Cosgrove, D.J., Fleming, A.F., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S., Rose, J.K.C., Voesenek, L.A.C.J. (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology* 55: 311–314.
- Kim, I.S., Kim, H.Y., Kim, Y.S., Choi, H.G., Kang, S.H., Yoon, H.S. (2013). Expression of dehydrin gene from Arctic *Cerastium arcticum* increases abiotic stress tolerance and enhances the fermentation capacity of a genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* laboratory strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (20): 8997–9009.
- Lee, H.Y., Chen, Y., Kieber, J.J., Yoon, G.M. (2017). Regulation of the turnover of ACC Synthases by phytohormones and heterodimerization in *Arabidopsis*. *The plant journal*. 1-45.
- Liu, Y., Liang, J., Sun, L., Yang, X., & Li, D. (2016). Group 3 LEA Protein, ZmLEA3, Is Involved in Protection from Low Temperature Stress. *Frontiers in Plant Science*. 7:1011
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 24(4): 402- 408

- Ludidi, N.N., Heazlewood, J.L., Seoighe, C., Irving, H. R., Gehring, C.A. (2002) Expansin-Like Molecules: Novel Functions Derived from Common Domains. *Journal of Molecular Evolution*. 54: 587-594.
- Mantyla, E., Lang, V., & Palva, E. T. (1995). Role of Abscisic Acid in Drought-Induced Freezing Tolerance, Cold Acclimation, and Accumulation of LT178 and RAB18 Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*. 107(1): 141-148.
- Manzo-Rodríguez, S.M. (2010). Propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis* var. *coahuilensis* (Broedeker) Moran y *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto a partir de semilla para su conservación. (Tesis de maestría). Institución de Enseñanza e Investigación de Ciencias Agrícolas. México.
- Marchler-Bauer, A. *et al.* (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database." *Nucleic Acids Res.* 37(D)205-10.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=7V5V8A6D015&mode=all>
- Marchler-Bauer, A. *et al.* (2011). "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins." *Nucleic Acids Res.* 39(D)225-9.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=7V5V8A6D015&mode=all>
- Marchler-Bauer, A. *et al.* (2015). "CDD: NCBI's conserved domain database." *Nucleic Acids Res.* 43(D)222-6.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=7V5V8A6D015&mode=all>
- Marchler-Bauer, A., Bryant, S.H. (2004). "CD-Search: protein domain annotations on the fly." *Nucleic Acids Res.* 32(W)327-331.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=7V5V8A6D015&mode=all>
- Memelink, J. (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*. 70: 1560–1570
- Meza-Rangel, E., Tafoya, F., Lindig-Cisneros, R., Sigala-Rodríguez, J.J., Pérez-Molphe-Balch, E. (2014). Distribución actual y potencial de las cactáceas *Ferocactus histrix*,

Mammillaria bombycina y *M. perezdelarosae* en el estado de Aguascalientes, México. *Acta Botánica Mexicana*. 108: 67

Morales-Domínguez, J.F., Soria-Guerra, R. E., Alpuche-Solís, A.G., Garcidueñas Piña, C. (2013). Expresión de una -expansina implicada en la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Investigación y Ciencia*. 21 (58): 5-11

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).

Nawkar, G.M., Maibam, P., Park, J.H. *et al.* (2017). *In silico* study on *Arabidopsis* BAG gene expression in response to environmental stresses. *Protoplasma* 254: 409-421.

Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Molecular Biology*. 302(1): 205 – 17.

Ochoa-Alfaro, A.E., Rodríguez-Kessler, M., Pérez-Morales, M.B., Delgado-Sánchez, P., Cuevas-Velazquez, C.L., Gómez-Anduro, G., Jiménez-Bremont, J.F. (2012). Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta*. 235(3): 565-578.

Pereyra-Cardozo, M. Quiriban, A. (2014). Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. *SEMIÁRIDA*. 24(1): 55-67.

Retes-Pruneda, J.L., Valadez-Aguilar, M. L., Pérez-Reyes, M. E. y Pérez-Molphe-Balch, E. (2007). Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 81: 9-16.

Reyes-Silva, A. I., Núñez-Palenius, H. G., Hernández-Guzmán, G. H., Alpuche-Solís, A. G., Garcidueñas-Piña, C., Morales-Domínguez, J. F. (2013). Ripening-related cDNAs in guava fruit (*Psidium guajava* L.). Characterization and expression analysis. *Revista Filogenética Mexicana*. 36(2): 117 – 125.

- Richard, S., Morency, M.J., Drevet, C. (2000). Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Molecular Biology*. 43 (1): 1-10.
- Rivas-Rossi, M. (1996). *Cactáceas y suculentas del Jardín Botánico Lankester*. EUNED. 88 páginas.
- Sadava, D., Purves, W.H., (2009). *Life: The science of biology*. 8° Edición. Ed. Médica Panamericana. México. 1251 páginas.
- Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*. 6(12), 242.
- Sánchez, M.A., Mateos, I., Labrador, E., Dopico, B. (2004). Brassinolides and IAA induce the transcription of four α -expansin genes related to development in *Cicer arietium*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42(9): 709-716.
- Saucedo, A.L., Hernández-Domínguez, E.E., de Luna-Valdez, L.A., Guevara-García, A.A., Escobedo-Moratilla, A., Bojorquéz-Velázquez, E., Barba de la Rosa, A.P. (2017). Insights on Structure and Function of a Late Embryogenesis Abundant Protein from *Amaranthus cruentus*: An Intrinsically Disordered Protein Involved in Protection against Desiccation, Oxidant Conditions, and Osmotic Stress. *Frontiers in Plant Science*. 8: 497.
- Shen, Y., Tang, M.J., Hu, Y.L., Lin, Z.P. (2004). Aislamiento y caracterización de un gen similar a la deshidrina de la *Boea crassifolia* tolerante a la sequía. *Plant Science*. 166: 1167-1175.
- Shen, P., Zhang, H., Su, Z., Wang, S., Xu, H. (2017). *In silico* analysis of tumor necrosis factor α - induced protein 8-like-1 (type 1) protein. *Plos one*. 10(7).
- Shishkova, S., Las Peñas, M. L., Napsucialy-Mendivil, S., Matvienko, M., Kozik, A., Montiel, J., Patiño, A., Dubrovsky, J.G. (2013). Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Annals of Botany*. 112(2): 239–252.
- Cho, G. H., Kim, D. I., Pedersen, H., & Chin, C.-K. (1988). Ethephon Enhancement of Secondary Metabolite Synthesis in Plant Cell Cultures. *Biotechnology Progress*, 4(3), 184–188.

- Vaseva I.I., Anders I., Feller, U. (2014). Identificación y expresión de diferentes subclases de deshidrina involucradas en la respuesta a la sequía de *Trifolium repens*. *J. Plant Physiol.* 171: 213-224.
- Vladan, B., Jan, S., Jürgen, S., Carsten, K. (2013). Dehydrins (LTI29, LTI30, and COR47) from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Escherichia coli* protect thylakoid membranes during freezing. *Journal of the Servian chemical Society.* 78 (8): 1149–1160.
- Wang, H., Wu, Y., Yang, X., Guo, X., Cao, X. (2017). SmLEA2, a gene for late embryogenesis abundant protein isolated from *Salvia miltiorrhiza*, confers tolerance to drought and salt stress in *Escherichia coli* and *S. miltiorrhiza*. *Protoplasma.* 254:685–696.
- Wang, Y.H., Gehring, C., Irving, H.R. (2011). Plant Natriuretic Peptides are Apoplastic and Paracrine Stress Response Molecules. *Plant and Cell Physiology.* 52 (5): 837–850.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303
- Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., Singer, S. D., 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.
- Yennawar, N.H., Li, L.C., Dudzinski, D.M., Tabuchi, A., Cosgrove, D.J. (2006). Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a beta-expansin and group -1 pollen allergen from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 103:14664-14671.
- Zhu, Y., Wu, N., Song, W., Yin, G., Qin, Y., Yan, Y., & Hu, Y. (2014). Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies. *BMC Plant Biology.* 14: 93.

12 ANEXOS

A) Preparación de medios de cultivo

A 1. Soluciones concentradas Stock para medio MS (Murashige y Skoog)

Tabla 7 Preparación de soluciones concentradas medio MS

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN	CONTENIDO	CANTIDAD
A	1000 X	50 mL	Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	22.000 g
			Yoduro de potasio (KI)	41.500 g
B	1000 X	50 mL	Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	1.250 mg
			Fosfato monobásico de K ($\text{KH}_2 \text{PO}_4$)	3.400 g
C	400X	50 mL	Ac. bórico ($\text{H}_3 \text{BO}_3$)	0.124 g
			Molibdato de sodio (NaMoO_4)	0.005 g
			Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	7.400 g
D	400X	50 mL	Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.340 g
			Sulfato de zinc Zn ($\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.172 g
			Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	0.50 mg
			Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0.557 g
E	200 X	100 mL	EDTA disódico ($\text{Na}_2 \text{EDTA}$)	0.745 g
			Glicina	20.00 mg
F	100 X	100 mL	Piridoxina HCl	5.00 mg
			Ac. nicotínico	5.00 mg
			Tiamina HCl	1.00 mg
			Mio inositol	1.00 g

NOTA: Para la solución E se disuelven ambos componentes por separado, calentando de ser necesario y posteriormente se agrega lentamente la solución de Fe a la de EDTA y se afora, la solución debe quedar de color amarillo sin precipitados.

A 2. Procedimiento de preparación de medio de cultivo MS

Para la preparación de 1 L de medio de cultivo.

- 1) En un vaso de precipitados o matraz de 1 L colocar 850 mL de agua destilada y agregar las siguientes cantidades de las soluciones stock concentradas:

Tabla 8 Concentración de soluciones stock para medio MS

Solución	Volumen (mL/L)
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

- 2) En seguida añadir los siguientes compuestos, procurando agitar hasta disolver:

Tabla 9 Concentración de compuestos para medio MS

Solución	Cantidad (g/L)
Sacarosa	30.0 g
Nitrato de potasio	1.90 g
Nitrato de amonio	1.65 g

- 3) Una vez disueltos los componentes, ajustar el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N
- 4) Añadir 10 g/L de Agar como gelificante. Agitar.
- 5) Disolver el gelificante calentando el medio poco a poco y agitando constantemente hasta clarificar.
- 6) Distribuir el medio en frascos de cultivo de vidrio, taparlos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 min.
- 7) Sellar los frascos con el medio estéril y almacenarlos hasta su uso.

A 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) Soluciones Buffer para extracción de ADN

B 1. Solución Buffer de lisis para extracción de ADN de cactáceas.

La solución buffer contiene:

Tabla 10 Buffer de extracción CTAB.

Contenido	Concentración
CTAB	0.3%
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
Tris HCl pH 8	0.1 M
β mercaptoetanol	0.3%

NOTA: El β - mercaptoetanol es añadido justo antes de la utilización del Buffer bajo condiciones de esterilidad.

C) Soluciones método de extracción de plásmidos Birnboim y Doly (1979).

C1. Solución Birnboim I

25 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM glucosa (estéril). Almacenar a 4°C.

C2. Solución Birnboim II

NaOH 0.2 N, SDS 1 %. Preparar al momento o guardar hasta 1 semana a temperatura ambiente. Para 1 ml de solución: mezclar 20 μ l de NaOH 10 N con 880 μ l de agua y añadir 100 μ l de SDS 10 %.

C2. Solución Birnboim III

60 ml 5 M Acetato de potasio, 11.5 ml Ác. Acético glacial y 28.5 ml de agua.

D) Secuencias de los genes de estudio.

D1. Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen *MabDHN*

Secuencia parcial de nucleótidos del gen *MabDHN*.

Cuenta con 435 nucleótidos secuenciados, número de accesoión en NCBI: KP720560 (Hernández-Camacho, 2016).

AAAGAAGGATTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAACTTCCAGGCCACCACAAGGAGCAG
 GAAGAAGAACAGAGGACAAGCAAAAGGATCATCATCATGATGAAGAGGACACCAATA
 TAGCAATAGAGAAGATCCACGTGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCTTACCCTG
 CCCC GGCCCCACCGCCACCTCATTCCGAGGCCGAAGGGAGAAGAAGGGGGCTGCTT
 GAGAAGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTGGTCAGCACAAAGAAGGCCGAGGCCGAGCA
 CGAGGTGGTCCCAACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCAGGAGAAG
 AAGGGGTTTTTGGACAAGATCAAGGAGAAGATCCCTGGCTTCCACTTTAAGGCTCCT
 GAGGAGGACAAGAAGGATGTGGAGTGTGATCAACCCCCT

Secuencia de la proteína traducida MabDHN.

Cuenta con 145 aminoácidos traducidos, número de accesoión en NCBI: AKC92525.1.

>MabDHN-like

KEGLKEKIKEKLPGHHKEQEEQEDKQKDHHHDEEDTNIAIEKIHVEEVIYSEPSYPAPAP
 PPPHSEAEGEKKGLLEKIKDKLPGGQHKKAEEAEHEVVPTATATVAEGEAQEKKGFLDKIK
 EKIPGFHFKAPEEDKKDVECDQPP

D2. Secuencia parcial de aminoácidos de ERD10 (AT1G20450) en *A. thaliana*

>AT1G20450

MAEYKNTVPEQETPKVATEESSAPEIKERGMFDLKKKEEVKPQETTTLASEFEHKTQIS
 EPESFVAKHEEEH KPTLLEQLHQKHEEEENKPSLLDKLHR SNSSSSSSSDEEGEDGE
 KKKKEKKKKVIVEGDHVKTVEEENQGVMDRIKEKFP LGEKPGGDDVPVVTMPAPHSVED
 HKPEEEEEKGFMDKIKEKLPGH SKKPEDSQQVNTTPLVETATPIADIPEEKKGFM D K I K E K
 LPGYHAKTTGEEEEKKEKVS D

E) Características de los oligonucleótidos utilizados

E1. Características de los oligonucleótidos F MabDHN y R MabDHN

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.

E2. Características de los oligonucleótidos F MabCuant y R MabCuant

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.

E3. 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