



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS:

**“TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE GLOXINIA (*Sinningia speciosa*
Lodd.) CON FRAGMENTOS DE GENES *LEA* TIPO DEHIDRINA
PROVENIENTES DE CACTÁCEAS”**

PRESENTA:

Daniel Alejandro Díaz García

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTORES:

Dr. José Francisco Morales Domínguez
Dra. Ana Erika Ochoa Alfaro

ASESOR:

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

Aguascalientes, Ags., Noviembre de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

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

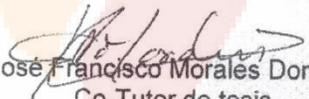
Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **DANIEL ALEJANDRO DÍAZ GARCÍA** con ID 220911 quien realizó la tesis titulada **TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE GLOXINIA (*Sinningia speciosa* Lodd.) CON FRAGMENTOS DE GENES LEA TIPO DEHIDRINA PROVENIENTES DE CACTÁCEAS** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el 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 23 de noviembre de 2018.


Dr. José Francisco Morales Domínguez
Co-Tutor de tesis


Dra. Ana Erika Ochoa Alfaro
Co-Tutor de tesis


Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe-Balch
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

DANIEL ALEJANDRO DIAZ GARCIA
MAESTRÍA EN CIENCIAS, ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

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: **“TRANSFORMACION GENETICA DE GLOXINIA (*Sinningia speciosa* Lodd.) CON FRAGMENTOS DE GENES LEA TIPO DEHIDRINA PROVENIENTES DE CACTACEAS”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

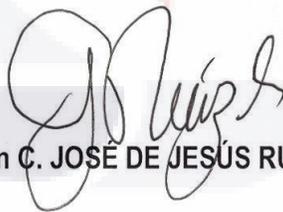
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 26 de noviembre de 2018

“Se lumen proferre”

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, especialmente a la Coordinación de la Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal o Toxicología por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. 608868) para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez, a la Dra. Ana Erika Ochoa Alfaro y al Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch por su gran apoyo, dedicación, orientación y valiosos consejos para la realización de esta investigación.

A la Dra. Aracely Rodríguez Sahagún, al Dr. Gustavo Acevedo Hernández, al Dr. Osvaldo Adrián Castellanos Hernández y al QFB Rene Isaías Loeza Román por la oportunidad de realizar parte de esta investigación en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Universidad de Guadalajara, además de la asesoría y las facilidades brindadas.

A la Dra. Cristina Garcidueñas Piña por su asesoría, apoyo y paciencia durante la realización del presente.

A mis compañeros de laboratorio, Josa, Nancy, Lili, Mariana, Caro, Fany, Juan Pablo, Mario y Vivian por su apoyo, tiempo compartido y conocimientos brindados.

A mis padres, por brindarme su apoyo incondicional, su confianza y sus constantes palabras de aliento. Por estar ahí siempre que lo necesite.

DEDICATORIA



A mis padres, con cariño, respeto y admiración.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1. Proteínas LEA	10
2.1.1. Dehidrinas.....	13
2.2. Gloxinia (<i>Sinningia speciosa</i> Lodd.).....	17
2.3. Transformación genética de plantas.....	17
2.3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> como medio de transformación genética.....	18
2.3.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. como planta modelo	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS	23
5.1. General	23
5.2. Específicos	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1. Esquema general de la metodología.....	24
6.2. Obtención de construcciones de un vector de expresión de plantas con genes parciales de dehidrinas	25
6.2.1. Extracción de ADN de cactáceas.....	25
6.2.2. Obtención de genes parciales de dehidrinas	25
6.2.3. Ligación de genes parciales de dehidrinas al vector de clonación pGEM T Easy ..	26
6.2.4. Preparación de células competentes y transformación genética de <i>Escherichia coli</i> 27	27
6.2.5. Extracción de plásmidos de células transformadas	28
6.2.6. Verificación de ligación mediante restricción	28
6.2.7. Secuenciación de los productos ligados y análisis bioinformático.....	29
6.2.8. Unión de los genes parciales <i>LepDHN</i> y <i>OpfiDHN</i>	29
6.2.9. Amplificación y purificación de los genes parciales a partir de las construcciones pGEM: <i>LepDHN</i> y pGEM: <i>OpfiDHN</i>	32
6.2.10. Restricción y purificación de los genes parciales y del vector pBI121	32
6.2.11. Ligación de <i>LepDHN</i> y <i>OpfiDHN</i> al vector de expresión en plantas pBI121 ..	32

6.2.12.	Transformación genética de <i>E. coli</i> y obtención de las construcciones.....	33
6.2.13.	Verificación de construcciones pBI121: <i>LepDHN</i> y pBI121: <i>OpfiDHN</i> mediante restricción y PCR.....	33
6.3.	Transformación genética de <i>A. tumefaciens</i> con las construcciones pBI121: <i>LepDHN</i> y pBI121: <i>OpfiDHN</i>	34
6.3.1.	Preparación de células competentes y transformación genética de <i>A. tumefaciens</i>	34
6.3.2.	Verificación de transformación de <i>A. tumefaciens</i> mediante PCR.....	35
6.4.	Transformación genética de Gloxinia y <i>A. thaliana</i> con <i>A. tumefaciens</i>	35
6.4.1.	Propagación de plantas de Gloxinia	35
6.4.2.	Preparación de <i>A. tumefaciens</i> y transformación de Gloxinia.....	36
6.4.3.	Preparación de <i>A. tumefaciens</i> y transformación de <i>A. thaliana</i>	37
6.4.3.1.	Selección de semillas transformadas de <i>A. thaliana</i>	38
6.5.	Tratamiento de temperatura de congelamiento a explantes de gloxinia presuntamente transformados con el gen <i>LepDHN</i>	39
6.6.	Verificación de transformación de explantes de gloxinia	39
6.6.1.	Verificación mediante prueba histoquímica de GUS	39
6.6.2.	Extracción de ADN de explantes de gloxinia presuntamente transformados.....	39
6.6.3.	Extracción de ADN de <i>A. tumefaciens</i>	41
6.6.4.	Verificación de transformación mediante PCR	41
7.	RESULTADOS	44
7.1.	Extracción de ADN de cactáceas	44
7.2.	Obtención de genes parciales de dehidrasas de <i>L. principis</i> y <i>O. ficus-indica</i>	44
7.3.	Ligación de genes parciales de dehidrasas al vector de clonación pGEM T Easy .	45
7.4.	Análisis de secuencias.....	45
7.5.	Unión de los genes parciales <i>LepDHN</i> y <i>OpfiDHN</i>	49
7.6.	Ligación de los genes parciales al vector de expresión en plantas pBI121.....	50
7.7.	Verificación de transformación de <i>A. tumefaciens</i> mediante PCR	51
7.8.	Transformación genética de Gloxinia y <i>A. thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	51
7.8.1.	Propagación <i>in vitro</i> de plantas de Gloxinia.....	51
7.8.2.	Transformación de explantes de Gloxinia	52
7.8.3.	Transformación de <i>A. thaliana</i> y selección	56

7.9. Análisis de la capacidad de crioprotección a condiciones de congelamiento de <i>LepDHN</i>	61
7.10. Verificación de transformación de explantes de Gloxinia	62
7.10.1. Verificación de transformación mediante prueba histoquímica de GUS	62
7.10.2. Identificación del gen <i>VirD1</i> en cepas de <i>A. tumefaciens</i>	63
7.10.3. Verificación de transformación de explantes de Gloxinia mediante PCR.....	63
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
9. CONCLUSIONES	72
10. LITERATURA CITADA.....	73
11. ANEXOS.....	81
A. Buffer de lisis para extracción de ADN de cactáceas.	81
B. Protocolo de purificación con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).....	81
C. Medio de cultivo LB.....	81
D. Soluciones empleadas para la extracción de plásmidos por el método de Birnboim y Doly (1979).	81
D.1. Birnboim I:	81
D.2. Birnboim II:.....	81
D.3. Birnboim III:	81
E. Características de los oligonucleótidos FpBI121 y RpBI121 de acuerdo con el software DNASTar	82
F. Medio de cultivo YEB	82
G. Medio Murashige y Skoog (MS).....	82
H. Solución de reacción para ensayo histoquímico del gen <i>GUS</i>	83
I. Buffer STET	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para PCR para verificación de transformación de explantes de Gloxinia, ausencia de bacteria en explantes y presencia del gen *VirD1*.....42

Tabla 2. Ensayos de transformación de Gloxinia53

Tabla 3. Ensayos de transformación de *A. thaliana*.....57



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura 3D del fragmento de la proteína *OpfiDHN*14

Figura 2. Estructura 3D del fragmento de la proteína *LepDHN*.....15

Figura 3. Vector de clonación pGEM T Easy.....27

Figura 4. Estrategia utilizada para la unión de *LepDHN* y *OpfiDHN*31

Figura 5. Vector de expresión en plantas pBI121 (Clontech)32

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de dos especies de cactáceas44

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la purificación de genes parciales de dehidrinas de dos especies de cactáceas44

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de dos construcciones con las enzimas *BamHI* y *XbaI*45

Figura 9. Traducción virtual de las secuencias obtenidas.....47

Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de las dehidrinas *LepDHN*, *OpfiDHN*, *OpsDHN*, *bdn1* y las encontradas en *A. thaliana*48

Figura 11. Grado de desorden de las secuencias analizadas.....49

Figura 12. Electroforesis del gel de agarosa de la digestión de la construcción.....50

Figura 13. Comprobación de ligación mediante restricción y PCR50

Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación un fragmento a partir del vector pBI12151

Figura 15. Plantas de Gloxinia obtenidas mediante propagación *in vitro*52

Figura 16. Explantes de hoja de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo 1 sometidos a selección.....54

Figura 17. Explantes de hoja de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo 2 sometidos a selección.....55

Figura 18. Explante de hoja de Gloxinia con callo bajo selección55

Figura 19. Explantes de hoja de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo 3 sometidos a selección.....56

Figura 20. Selección de plantas transformadas de *A. thaliana* con Silwet L-77 en medio MS con Kn (50 ng·µl⁻¹).....58

Figura 21. Selección de plantas transformadas de *A. thaliana* con Tween 20 en medio MS con Kn (50 ng·µl⁻¹)59

Figura 22. Selección de plantas transformadas de *A. thaliana* con coadyuvantes agrícolas en medio MS con Kn (30 ng·µl⁻¹).....60

Figura 23. Explantes de hoja de Gloxinia sometidos a tratamiento por frío61

Figura 24. Explantes con actividad del gen *GUS* presuntamente transformados con el vector pBI121 mediante el protocolo 1.....62

Figura 25. Explantes con actividad del gen *GUS* presuntamente transformados con el vector pBI121 mediante el protocolo 2.....62

Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación del gen *VirD1* en cepas de *A. tumefaciens*.....63

Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación de genes presentes en los explantes de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo de transformación 2 con la construcción pBI121:*LepDHN* con 20 h de cocultivo64

Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación de genes presentes en los explantes de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo de transformación 3 con la cepa GV3101 con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*64

Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación de genes presentes en los explantes de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo de transformación 3 con la cepa GV2260 con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*65

ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIA: Acido Indolacético

Amp: Ampicilina

ANA: Acido Naftalenacético

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BA: 6-Benciladenina

Cef: Cefotaxima

Cfx: Ceftriaxona

DHN: Dehidrina

His: Histidina

Kn: Kanamicina

LEA: Late Embryogenesis Abundant (Proteínas Abundantes de la Embriogénesis Tardía)

pb: Pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Rif: Rifampicina

rpm: Revoluciones por minuto

T-DNA: Ácido desoxirribonucleico de transferencia

RESUMEN

Las proteínas LEA cumplen una función como protectoras de estructuras celulares, son intrínsecamente desordenadas y se acumulan abundantemente durante la etapa tardía de la embriogénesis y en respuesta a diversos tipos de estrés. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las dehidrinas, caracterizadas por poseer regiones conservadas llamadas segmentos K. Además, pueden contener un segmento Y, S, F y regiones ricas en histidina. En este estudio, por medio de PCR se obtuvieron genes parciales de dehidrinas de *Leuchtenbergia principis* y *Opuntia ficus-indica* con un marco de lectura abierto de 501 y 504 pb, respectivamente, codificantes a tres segmentos K y una región de histidinas. Estos genes parciales se ligaron al vector de expresión en plantas pBI121, con el que se transformaron las cepas GV3101, GV2260 y EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*. Se realizaron ensayos de transformación de explantes de hoja y peciolo de gloxinia (*Sinningia speciosa*) cultivadas *in vitro* y de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Mediante prueba histoquímica de GUS y PCR se confirmó la transformación de explantes de gloxinia con las cepas GV3101 y GV2260.

ABSTRACT

LEA proteins play an important role in the protection of cellular structures; these proteins are intrinsically unordered and abundantly accumulated during late stages of embryogenesis, and in response to different types of stress. Dehydrins, a type of LEA proteins, are characterized by conserved regions called K segments. Additionally, these can contain segments Y, S and F, as well as regions rich in histidine. In this study, partial genes of dehydrins isolated from *Leuchtenbergia principis* and *Opuntia ficus-indica* were obtained using PCR. Particularly, *L. principis* and *O. ficus-indica* isolated genes consisted in fragments with an open reading frame of 501 and 504 bp, respectively, and coding sequences for three K segments and a histidine region. These partial genes were ligated to the plant expression vector pBI121, which was used further on to transform *Agrobacterium tumefaciens'* GV3101, GV2260 and EHA105 strains. Moreover, several transformation experiments were carried out using Gloxinia (*Sinningia speciosa*) leaf and petiole explants cultivated *in vitro*, as well as *Arabidopsis thaliana* plants. GUS and PCR were used to validate the transformation of gloxinia for the strains GV3101 and GV2260.

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas LEA se acumulan abundantemente durante la etapa tardía de la embriogénesis. Además, se ha detectado su acumulación en tejidos vegetativos en respuesta al déficit hídrico provocado por sequía, salinidad y congelamiento, y a la aplicación de ácido abscísico (Campos *et al.*, 2002). Cumplen una función como protectoras de estructuras y proteínas celulares. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las dehidrinas, las cuales, se caracterizan por poseer al menos una región conservada llamada segmento K, importante en la capacidad de protección de la proteína. Además, pueden contener segmentos Y, segmentos Φ , un segmento S, un segmento F y regiones ricas en histidina. De acuerdo con la presencia y disposición de estas regiones, se han clasificado en 5 subgrupos (Strimbeck, 2017; Campbell y Close, 1997).

En diversas especies vegetales se han realizado estudios sobre la importancia de estas proteínas y las regiones que las componen, sin embargo, existen pocos estudios sobre estas en cactáceas. En uno de estos estudios, se identificó el gen *OpsDHN* proveniente de *Opuntia streptacantha* del tipo SK₃, es decir, contiene un segmento S y 3 segmentos K, además de una región de 6 histidinas. Por medio de transformación, este gen se sobreexpresó en plantas de *A. thaliana* y se obtuvo una mayor tolerancia de la planta a condiciones de congelamiento (Ochoa *et al.*, 2012). Posteriormente se identificaron secuencias parciales de dehidrinas entre los que se encuentran *Leuchtenbergia principis* y *Opuntia ficus-indica*, a las cuales contienen tres segmentos K y una región de His (Hernández *et al.*, 2017).

Con base en esto, se realizaron construcciones de genes parciales de dehidrinas en un vector de expresión en plantas para ser sobreexpresados en plantas de gloxinia (*Sinningia speciosa*).

2. ANTECEDENTES

2.1. Proteínas LEA

Las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant por sus siglas en inglés) han sido identificadas en un amplio rango de especies vegetales. Además de la abundancia de estas proteínas durante la etapa tardía de la embriogénesis de la semilla, se ha encontrado su acumulación en respuesta a déficit hídrico provocado por sequía, salinidad y congelamiento, y a la aplicación de ácido abscísico (Campos *et al.*, 2002; Cuevas y Covarrubias, 2011). Estas proteínas se caracterizan por una alta hidrofiliidad y un alto contenido de Glicina (Gly) (Battaglia *et al.*, 2008). Se clasifican dentro del grupo de las hidrofílinas, pertenecientes al grupo de las PINEs o PIDs, las cuales, carecen de una estructura tridimensional bien definida debido a la abundancia de regiones intrínsecamente desordenadas (Cuevas y Covarrubias, 2011). Existe evidencia de que las proteínas LEA cumplen una función como protectoras de estructuras y proteínas celulares durante lapsos de estrés por sequía o congelamiento (Campos *et al.*, 2002). Estas proteínas pueden prevenir la agregación inducida por la desecación y las bajas temperaturas. Se ha propuesto que funcionan como chaperonas, como moléculas protectoras y actúan evitando el daño celular. Se ha sugerido que la mayoría de las proteínas LEA existen como hélice al azar, poseen estructuras desplegadas en su estructura nativa, y unas pocas existen como dímeros o tetrámeros. Son proteínas estables al calor y no coagulan en ebullición (Pereira y Quiriban, 2014; Campos *et al.*, 2002). Estas proteínas presentan un alto nivel de desorden, sin embargo, las condiciones de disponibilidad de agua inducen cambios conformacionales en estas proteínas llevándolas a adquirir un mayor orden estructural, permitiéndoles así, reconocer uno o varios ligandos para estabilizarse. Debido a esto, las proteínas LEA son capaces de prevenir cambios estructurales promovidos por los efectos del déficit hídrico en proteínas o enzimas que pudieran llegar a su desnaturalización y consecuente agregación, y que tiene como consecuencia una desactivación de estas. La capacidad protectora de las proteínas LEA de los diferentes grupos es distinta, algunas presentan una protección de casi 100% mientras que otras no muestran protección alguna (Cuevas y Covarrubias, 2011).

Battaglia *et al.*, (2008) clasificó las proteínas LEA en siete grupos de acuerdo con la similitud en la secuencia de aminoácidos, de tal forma que cada grupo se distingue por ciertos

motivos consenso distintivos. Los grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 7 corresponden a proteínas hidrofílicas, mientras que las hidrofóbicas se mantienen en el grupo 5.

El Grupo 1 está representado por proteínas que contienen una proporción muy alta de residuos cargados que contribuyen a su alta hidrofiliidad, además de un alto contenido de residuos Gly de aproximadamente 18%. Otra característica de este grupo es que tienen una estructura inestable y son bastante flexibles. Las proteínas de este grupo poseen una homología sustancial, especialmente en un motivo de 20 aminoácidos (TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]EMGRKGG[L/E]). Este motivo puede estar presente en varias copias dispuestas en tándem. En especies vegetales han sido identificados otros dos motivos conservados, un motivo N-terminal (TVVPGGTGGKSLEAQE[H/N]LAE) situado hacia el extremo amino terminal del motivo de 20 aminoácidos y un segundo motivo (D[K/E]SGGERA[A/E][E/R]EGI[E/D]IDESK[F/Y]) hacia el extremo carboxilo terminal. El peso molecular promedio de estas proteínas es de 11.5 kDa, con un rango de 6.8 a 20.3 kDa (Shih *et al.*, 2008). Cabe mencionar que este grupo de proteínas LEA es el único presente en los tres dominios taxonómicos: Bacteria, Archaea y Eukarya (Battaglia *et al.*, 2008).

Las proteínas del Grupo 2, también conocidas como dehidrinas, contienen una alta proporción de aminoácidos cargados y polares, y una baja fracción de residuos no polares e hidrofóbicos. Carecen de Triptófano (Trp) y frecuentemente de Cisteína (Cys) (Battaglia *et al.*, 2008). Contienen al menos un segmento K y algunas contienen un segmento Y. Muchas proteínas de este grupo también contienen un segmento S, segmento F (Strimbeck, 2017), segmentos Φ , y regiones ricas en His (Hara *et al.*, 2005). De acuerdo con la presencia y disposición de los diferentes motivos, Campbell y Close (1997) clasificaron estas proteínas en 5 subgrupos, Y_nSK_n , Y_nK_n , SK_n , K_n y K_nS , donde n es el número de repeticiones (Campbell y Close, 1997). El peso molecular varía de 9 a 200 kDa, de acuerdo con el número de repeticiones del segmento K (Allagulova *et al.*, 2003).

Las proteínas del Grupo 3, se caracterizan por poseer un motivo repetido de 11 aminoácidos unidos por puentes iónicos. En comparación con otros grupos, las proteínas de este grupo son muy diversas debido a los cambios dentro del motivo. Este grupo comprende 4 subgrupos, D-7, Dc8, GmPM8 y D-29, caracterizados por las diferentes secuencias

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

consenso de las repeticiones de los motivos, tales como TAGAAKEKAXE, KAKETKDAAAE, TKDYAGDAAQK y $\Phi\Phi[E/Q]X\Phi K[E/Q]K\Phi X[E/D/Q]$ (donde Φ representa un residuo hidrofílico), respectivamente. El peso molecular promedio de estas proteínas es de 25.5 kDa, (mínimo de 7.2, máximo 67.2 kDa) (Shih *et al.*, 2008). Estas proteínas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, y se presentan en semillas maduras y en respuesta a la deshidratación, salinidad y bajas temperaturas (Battaglia *et al.*, 2008).

Las proteínas del Grupo 4 están presentes en el reino vegetal, incluidas las plantas briofitas y vasculares, y son acumuladas en hojas en respuesta al déficit hídrico y a ácido abscísico. Estas proteínas se caracterizan por un motivo en la región N-terminal con la secuencia consenso AQEKA EKMTA[R/H]DPXKEMAH ERK[E/K][A/E][K/R]. Sin embargo, en muchas de ellas pueden distinguirse cuatro motivos adicionales. La presencia o ausencia de los motivos 4 y 5 definen dos subgrupos dentro de la familia. El primero de ellos (4A) se compone de proteínas pequeñas (80-124 residuos) con motivos 2 y/o 3 que flanquean al motivo 1. El segundo subgrupo comprende proteínas más largas (108-180 residuos), que además de los tres motivos en el extremo N-terminal, pueden contener los motivos 4 y 5 en el extremo C-terminal. (Battaglia *et al.*, 2008). El peso molecular promedio de estas proteínas es de 12.6 kDa, con un mínimo de 8.4 y un máximo de 18.8 kDa (Shih *et al.*, 2008).

En el Grupo 5 se mantienen todas las proteínas que contienen una proporción significativamente mayor de residuos hidrófobos, por lo que este grupo incorpora proteínas no homólogas. De acuerdo con la similitud de secuencia, Battaglia *et al.*, (2008) las clasificó como 5A, 5B y 5C, por las primeras proteínas descritas para este grupo, D-34, D-73 y D95, respectivamente. Se ha reportado que se acumulan durante la etapa tardía del desarrollo de la semilla y en respuesta a condiciones de estrés como sequía, salinidad, frío y heridas. El peso molecular promedio para estas proteínas es de 18.1 kDa, con un mínimo de 5.3 y un máximo de 38.5 kDa (Shih *et al.*, 2008).

Las proteínas del Grupo 6 se distinguen por cuatro motivos, dos de los cuales, están muy conservados. En el primero de estos motivos se encuentra la secuencia LEDYK y los residuos Prolina (Pro) y Treonina (Thr) situados en las posiciones 6 y 7, respectivamente, en

el motivo 2 muestran una conservación del 100%. Estas proteínas carecen de residuos Cys y Trp. Una característica de este grupo de proteínas es su tamaño pequeño de aproximadamente 7 a 14 kDa (Battaglia *et al.*, 2008).

Las proteínas del grupo 7 contienen tres dominios altamente conservados, de los cuales, el motivo 3 contiene una señal de localización nuclear putativa y se encuentra situado dentro de la región C-terminal. Los otros dos contienen tramos de residuos de His encontrados en la región N-terminal (Battaglia *et al.*, 2008).

2.1.1. Dehidrinas

Las dehidrinas son el grupo más estudiado de las proteínas LEA. Estas se caracterizan por tener al menos un segmento K rico en Lisina (Lys), el cual consta de un motivo consenso de 15 aminoácidos (EKKGIMDKIKEKLPK). Se ha demostrado que la función del segmento K es la de unión con membranas enriquecidas con fosfolípidos aniónicos (Koag *et al.*, 2009). Adicionalmente, en este grupo también se presenta el segmento Y ([V/T]D[E/Q]YGNP) en el extremo N-terminal. Este segmento tiene secuencia similar con el sitio de unión de las chaperonas en bacterias y plantas, sin embargo, no se ha comprobado que se una a nucleótidos (Hughes *et al.*, 2013). Muchas proteínas de este grupo también contienen una extensión de residuos Serina (Ser), llamado segmento S, que en algunas proteínas se encuentra fosforilada. En diversas especies, se ha visto la presencia de un intrón dentro de este segmento (Jiménez *et al.*, 2013). Se ha reportado que este segmento es responsable de la capacidad de la unión con iones como calcio (Alsheikh *et al.*, 2003) y desempeña un papel en el transporte de la dehidrina al núcleo (Goday *et al.*, 1994). De acuerdo con estudios realizados por Hernández *et al.*, (2015), este segmento es importante para la localización nuclear, sin embargo, no es esencial. En algunas proteínas también se encuentran motivos menos conservados, conocidos como segmentos Φ , intercalados entre segmentos K, ricos en aminoácidos polares como Gly o Alanina (Ala) y Pro. De acuerdo con experimentos realizados por Hughes y Graether (2011) los segmentos Φ son importantes ya que podrían ayudar a mantener la estructura desordenada de la dehidrina. Así también, se han descrito otro tipo de segmentos menos comunes que permiten la unión de la proteína con iones

metálicos evitando que estos produzcan la formación de radicales hidroxilo en plantas expuestas a estrés hídrico; estos segmentos se caracterizan por ser regiones ricas en His (Hara *et al.*, 2005). Adicionalmente, recientemente se ha descrito otra secuencia conservada (DRGLFDLFGKK), llamada Segmento F, el cual, se cree puede formar hélices anfipáticas que podrían estar implicadas en la unión con la membrana o a proteínas. (Strimbeck, 2017).

En cactáceas existen pocos estudios de dehidrinas, por lo que solo se han identificado en algunas especies, entre ellas se encuentran *Opuntia streptacantha* (Ochoa *et al.*, 2012), y de forma parcial en *Opuntia ficus-indica* y *Leuchtenbergia principis* (Hernández *et al.*, 2017).

La dehidrina *OpfiDHN* presenta una secuencia parcial de 445 pb [número de acceso en NCBI: KP720561] traducida a 148 aminoácidos [número de acceso en NCBI: AKC92526.1]. Esta secuencia parcial presenta una serie de seis His y tres dominios repetidos formados por el segmento K conservado (Figura 1) (Hernández, 2017).

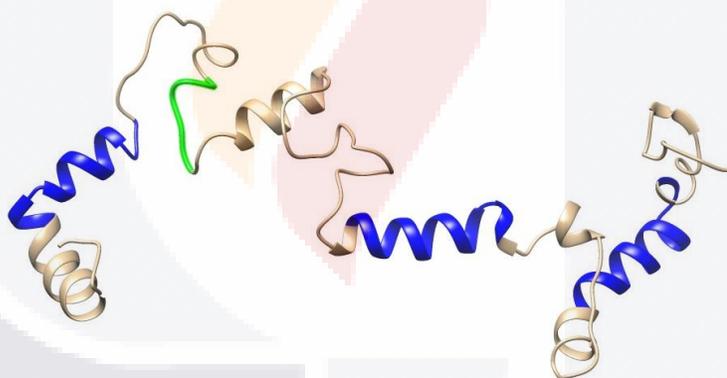


Figura 1. Estructura 3D del fragmento de la proteína *OpfiDHN*. Regiones color azul corresponden a segmentos K; región color verde indica el segmento rico en His.

La dehidrina *LepDHN* presenta una secuencia parcial de 493 pb [número de acceso en NCBI: KP720562] traducida a 164 aminoácidos [número de acceso en NCBI: AKC92527.1]. Esta secuencia presenta tres dominios repetidos formados por el segmento K conservado, además de un segmento de 3 His (Figura 2).

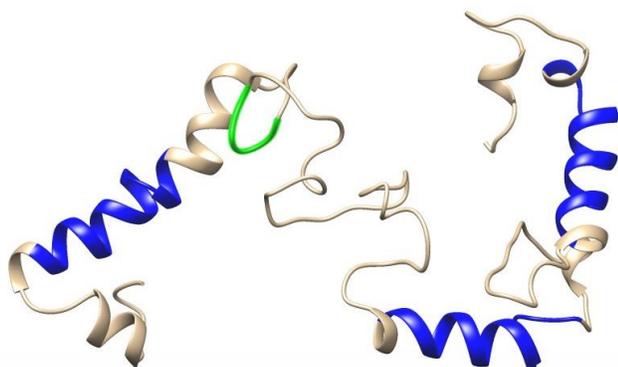


Figura 2. Estructura 3D del fragmento de la proteína *LepDHN*. Regiones color azul corresponden a segmentos K; región color verde indica el segmento rico en His.

Se han realizado diversos estudios para dilucidar los mecanismos de acción de estas proteínas, entre ellos, Reyes *et al.*, (2008) realizó experimentos con fragmentos de dehidrinas, que indican la importancia del segmento K en la capacidad de protección de la proteína en respuesta a estrés, al utilizar diversas formas truncadas de dehidrinas con dominios faltantes. Al eliminar 1, 2 y 3 segmentos K de la dehidrina ERD10, y 1 y 2 de la dehidrina RcDhn5 se redujo su capacidad protectora. Así mismo, Hughes *et al.*, (2013) probaron el efecto del tamaño de la dehidrina K₂ de *Vitis riparia* sobre su capacidad crioprotectora utilizando péptidos de uno y dos segmentos K (sin segmento Φ) y varios concatémeros (K₄, K₆, K₈ y K₁₀), concluyendo que, a mayor tamaño de la dehidrina, mayor capacidad de protección, siendo la K₁₀, la de mayor actividad protectora, y el péptido K el de menor actividad. Drira *et al.*, (2013) analizó la implicación de los dominios Y, S, K y Φ de la dehidrina DHN-5 de trigo con cuatro diferentes fragmentos de esta proteína (el primero compuesto por los segmentos Y y S; el segundo por los segmentos K1, Φ y K2; el tercero por los segmentos Φ y K2; y el ultimo solo con el segmento Φ). Determinó que el segmento K era el responsable del efecto protector a las bajas temperaturas. Con base en esto, Hara *et al.*, (2017) realizó experimentos demostrando que algunos de los residuos hidrofóbicos de estos segmentos, eran los responsables de la actividad crioprotectora.

Así mismo, ha comprobado la importancia de las regiones ricas en His en la localización nuclear (Hernández *et al.*, 2015). En experimentos realizados por Hara *et al.*, (2005), se demostró que estas regiones permiten la unión de la proteína con iones metálicos

evitando que estos produzcan la formación de radicales hidroxilo en plantas expuestas a estrés hídrico.

2.1.1.1. Las dehidrinas ante estrés abiótico

Las dehidrinas desempeñan un papel fundamental en la respuesta de la planta ante diversos tipos de estrés abiótico que causan la deshidratación celular como altas y bajas temperaturas, sequía y salinidad (Hanin *et al.*, 2011).

A pesar de que no se ha reportado la función precisa *in vivo* del tipo de dehidrina, *in vitro* se han reportado posibles funciones específicas. Por ejemplo, dehidrinas básicas Y_nSK_2 son inducidas por deshidratación o ABA. Las dehidrinas ácidas de tipo Y_nK_n , SK_n y K_n generalmente se acumulan en respuesta a la baja temperatura y las de tipo K_nS responden a deshidratación y baja temperatura (Zhu *et al.*, 2014).

Hanin *et al.*, (2011) reporta la posible función de varias dehidrinas con base en estudios previos. Entre ellos destacan las dehidrinas WCOR410 (del tipo SK_3) de trigo, P80/DHN5 (del tipo K_9) de cebada, CuCOR19 y CuCOR15 (de tipos SK_3 y SK_2 respectivamente) de cítricos, que producen un aumento de la tolerancia a estrés por frío. La DHN1 (del tipo YSK_2) de maíz aumenta la tolerancia a ABA y estrés hídrico. Las dehidrinas ERD10 y ERD14 (tipos SK_3 y SK_2 respectivamente) de *A. thaliana* generan un aumento en la tolerancia a la deshidratación. La PCA60 del durazno (tipo Y_2K_9) aumenta la tolerancia al congelamiento y la DHN5 (tipo YSK_2) de trigo produce un aumento en la tolerancia al estrés por sequía y salinidad. Las dehidrinas BjdHN2 y BjdHN3 potencian la tolerancia al estrés por metales disminuyendo la peroxidación lipídica y protegiendo las membranas celulares.

Ochoa *et al.*, (2012) transformó plantas de *A. thaliana* con el gen *OpsDHN1*. Las plantas transgénicas que sobreexpresaron esta dehidrina tipo SK_3 mostraron un aumento en la tolerancia al estrés por congelamiento. De la misma forma, Puhakainen *et al.*, (2004) logró el aumento de la tolerancia a la congelación en plantas transgénicas de *A. thaliana*, mediante la transformación con dos construcciones formadas por dos dehidrinas diferentes (*RAB18-COR47* y *LTI29-LTI30*).

Es importante destacar que el aumento de la tolerancia a los diferentes tipos de estrés abiótico por la sobreexpresión de dehidrinas no debe ser considerado como regla general (Hanin *et al.*, 2011).

2.2. Gloxinia (*Sinningia speciosa* Lodd.)

Gloxinia es una herbácea perene de la familia Gesneriaceae encontrada en Sudamérica. Inicialmente fue llamada *Gloxinia speciosa*, pero en 1877 fue transferida formalmente al género *Sinningia*. Esta especie es de gran valor ornamental por sus grandes hojas ovaladas aterciopeladas y sus flores de colores llamativos le brindan un alto valor ornamental (Xu *et al.*, 2009).

Formas silvestres de esta especie tienen flores simétricas bilaterales de color púrpura o lavanda y raramente blanca o rosada, en cambio, las variedades cultivadas tienen flores totalmente erectas, radialmente simétricas en colores que van del blanco al púrpura y al rojo y con frecuencia con patrones de corola inusuales (Zaitlin, 2012).

Esta especie ha sido objeto de estudios de transformación genética mediada por *Agrobacterium* (Kuo *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013) y de propagación *in vitro* (Xu *et al.*, 2009; Ioja y Ciulca, 2013), por lo que se han desarrollado algunos protocolos de transformación y regeneración.

2.3. Transformación genética de plantas

La transformación vegetal es un proceso de manipulación genética mediante el cual se introducen genes extraños a las células vegetales y se integran de forma estable a los genomas de las plantas (Zhang *et al.*, 2006).

No existe limitación para la transferencia de genes entre plantas de la misma especie y especies emparentadas, inclusive es posible introducir genes de especies no relacionadas evolutivamente, eliminando así, las barreras de incompatibilidad sexual y fertilidad (Vasil, 2008).

Entre los principales métodos de transformación de plantas se encuentran la transferencia de genes de forma indirecta mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y de forma directa por biobalística (Vasil, 2008). Para realizar la transformación es necesario disponer de un gen de interés flanqueado por los elementos reguladores para su expresión, como una región promotora y una terminadora (Díaz y Chaparro, 2012).

La transformación por *A. tumefaciens* está basada en la utilización de vectores, empleando su patogenicidad en plantas para la introducción de genes de interés al genoma vegetal (Veluthambi *et al.*, 2003). El método de biobalística desarrollado por Sanford *et al.*, (1987) consiste en el bombardeo a alta velocidad de microproyectiles de oro o tungsteno recubiertas de ADN (Vasil, 2008).

Las plantas que han sido modificadas genéticamente por la introducción de uno o varios genes por técnicas moleculares que les confieren al menos una nueva característica son denominadas plantas transgénicas. La obtención de estas plantas ha permitido el desarrollo de nuevas variedades de plantas de interés agrícola con características como resistencia a factores bióticos y abióticos, y aumento en calidad y rendimiento (Job, 2002). Así mismo, ha permitido la generación de vacunas y otras sustancias, y la producción de materias primas de interés industrial (Sharma *et al.*, 2002).

2.3.1. *Agrobacterium tumefaciens* como medio de transformación genética

A. tumefaciens es una bacteria aerobia facultativa, Gram negativa, que forma colonias circulares. Es causante de la enfermedad Agalla de la corona, la cual, afecta a un gran número de plantas generando importantes pérdidas económicas. Se encuentra comúnmente en la rizósfera de la planta y solo infecta el tejido al ingresar por heridas (Seleme *et al.*, 2006).

La formación de la agalla se debe a que la bacteria transfiere parte de su ADN que se integra al genoma de la planta cuando percibe ciertos compuestos fenólicos y azúcares de las células vegetales (Gelvin, 2000). Este ADN se encuentra en un plásmido, llamado plásmido Ti o inductor de tumores (Seleme *et al.*, 2006). El ADN transferido, llamado T-DNA, contiene genes que inducen la formación de tumores y la síntesis de opinas que son aprovechadas por la bacteria (Valderrama *et al.*, 2005). Esta región de ADN está delimitada

por secuencias de 25 pb de longitud, llamados borde izquierdo y derecho, necesarios para la transferencia (Gelvin, 2003).

El T-DNA es exportado de la bacteria hacia la célula vegetal por la actividad de seis grupos de genes de virulencia (genes *vir*) presentes en el plásmido Ti: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* y *virG* (Nester, 2015).

La proteína *virA* se localiza en la membrana periplásmica bacteriana. Ésta es autofosforilada en presencia de compuestos fenólicos específicos, transfiriendo un fosfato a una proteína reguladora de respuesta, la proteína *virG*, (Gelvin, 2006). Una vez fosforilada la proteína *virG* interactúa con la caja *vir*, una secuencia conservada de 12 pb localizada en la región promotora de los genes *vir* (Tzfira y Citovsly, 2000)

El operón *virB* consta de 11 marcos de lectura abiertos y codifica una estructura transmembranal que de acuerdo con su secuencia probablemente media el paso del T-DNA y otras proteínas *Vir* a la célula vegetal (Nester, 2015).

El operón *virD* consta de 5 marcos de lectura abiertos. *VirD1* y *VirD2* son endonucleasas que cortan una de las cadenas del plásmido Ti entre los bordes izquierdo y derecho, dando como resultado una cadena monocatenaria del T-DNA. La proteína *VirD2*, que contiene señales de localización nuclear, permanece unida al extremo 5' al T-DNA protegiéndolo de la degradación exonucleolítica y lo dirige hacia el núcleo de la célula vegetal (Nester, 2015).

Así también, la proteína *virD2* cuenta con una señal de translocación para el acoplamiento del T-DNA con una proteína de acoplamiento, la *virD4*, la cual, entrega la cadena monocatenaria de ADN al sistema de secreción codificado por el operón *virB* (Nester, 2015).

El operón *virC* consiste en dos marcos de lectura abiertos, *VirC1* y *VirC2*. Este operón mejora el corte específico por la endonucleasa *VirD* aumentando el número de copias de T-DNA por célula. Además de esto, recluta las cadenas de T-DNA del citosol al canal de secreción tipo IV (Nester, 2015).

El operón *virE* consta de tres marcos de lectura abiertos. *VirE2* codifica a una proteína de unión al ADN monocatenario, protegiéndolo contra la degradación por nucleasas, y mantiene la integridad del extremo 3' del T-DNA antes de la integración. El gen *virE1* codifica una chaperona que evita que la proteína *VirE2* se agregue a si misma dentro de *Agrobacterium* (Nester, 2015).

En los vectores usados actualmente, el T-DNA con los genes que inducen los tumores ha sido removido para originar vectores desarmados, con los cuales, es posible introducir genes externos a las células vegetales (Valderrama *et al.*, 2005).

La transformación de plantas bajo este sistema es ampliamente utilizada por su facilidad y amplia gama de especies vegetales susceptibles (Blanco *et al.*, 2003).

2.3.2. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. como planta modelo

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. es una planta herbácea de la familia Brassicaceae con una amplia distribución natural en América del Norte, Europa y Asia. La planta mide alrededor de 30 cm, presenta flores de 2 mm de largo, semillas maduras de 0.5 mm de longitud, hojas cubiertas de tricomas y frutos delgados conocidos como silicuas (Meinke *et al.*, 1998).

En 1943, Friedrich Laibach propuso esta planta como una especie idónea para estudios genéticos por sus características, sin embargo, fue hasta finales de 1970 cuando se empezó a explorar el potencial genético de esta planta que, hasta la fecha, sigue siendo la planta de referencia estándar para toda la biología (Koornneef y Meinke, 2010).

A pesar de que esta planta no tiene valor económico, presenta varias ventajas importantes para la investigación. Entre ellas, destaca su tamaño pequeño, lo que hace posible su crecimiento en un espacio reducido. Su ciclo de vida es relativamente corto, entre 6 y 8 semanas desde la germinación hasta la aparición de semillas maduras (Meinke *et al.*, 1998; Marsch y Folter, 2010; Koornneef y Meinke, 2010). Existen diferentes ecotipos adaptados a diferentes condiciones ambientales en diversos puntos del planeta. Es diploide con un

genoma pequeño de 125 Mb organizado en 5 cromosomas y es fácilmente transformable por *A. tumefaciens* (Marsch y Folter, 2010).

Además de las ventajas naturales que posee, la investigación de esta planta se ha visto impulsada por la disponibilidad de la secuencia de su genoma. Se estima que codifica para más de 33,000 genes (Marsch y Folter, 2010).

2.3.2.1. Transformación de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens* por inmersión floral

El método de transformación de *A. thaliana* mediante inmersión floral propuesto por Clough y Bent (1998), es una variante del método de transformación por infiltración mediante vacío (Bechtold *et al.*, 1993). Se destaca de otros métodos de transformación de plantas porque no requiere de cultivo de tejidos vegetales, requiere menos trabajo, equipo relativamente barato, pocos reactivos, no es necesaria la especialización para llevarse a cabo, es fácilmente escalable y mantiene la estabilidad genómica de las plantas transgénicas (Clough y Bent, 1998; Zhang *et al.*, 2006).

En este método, las plantas con flores de *A. thaliana* se sumergen en una suspensión de células de *A. tumefaciens* con sacarosa y un agente tensioactivo (por ejemplo, Silwet L-77) que ayuda a la bacteria a entrar a los tejidos vegetales, eliminando la necesidad del proceso de infiltración a vacío. Finalmente, la semilla producida de estas plantas se germina bajo selección para identificar las plantas transgénicas (Clough y Bent, 1998).

Experimentos realizados por Clough y Bent (1998) con diferentes ecotipos de *A. thaliana* muestran una buena eficiencia de transformación en ecotipos como Ws-0, Nd-0, No-0, Col-0; mientras que ecotipos como Ler-0, Dijon-G y Bla-2 muestran una tasa de transformación menor.

3. JUSTIFICACIÓN

Las cactáceas cuentan con una gran diversidad y son caracterizadas por su gran tolerancia a condiciones de estrés ambiental que les brinda una alta eficiencia de adaptación. Dichas condiciones inducen en la planta una serie de cambios moleculares, entre los que se encuentra la expresión de proteínas LEA, especialmente las dehidrinas. Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas por su participación en la respuesta de la planta ante diversos tipos de estrés abiótico confiriéndole a la planta una mayor tolerancia a condiciones adversas.

Se ha observado en diferentes especies vegetales, que la sobreexpresión de genes codificantes para estas proteínas, confieren a la planta un aumento de la tolerancia a diversos tipos de estrés. Así también, se ha estudiado el papel de los segmentos de estos genes en la respuesta de la planta identificando cuales de ellos son necesarios para la capacidad protectora. En cactáceas, esto toma gran importancia por ser uno de los mecanismos que les brindan la tolerancia a condiciones adversas; además, cabe resaltar que no existe información sobre la funcionalidad de genes parciales de dehidrinas de estas plantas.

Debido a esto, es importante ampliar el conocimiento sobre la estructura y funcionamiento de estas proteínas, para su posible aplicación en la generación de cultivos de interés con mayor tolerancia a condiciones adversas.

4. HIPÓTESIS

Es factible la incorporación de fragmentos de genes de dehidrasas de *Opuntia ficus-indica* y *Leuchtenbergia principis* en Gloxinia (*Sinningia speciosa*).

5. OBJETIVOS

5.1. General

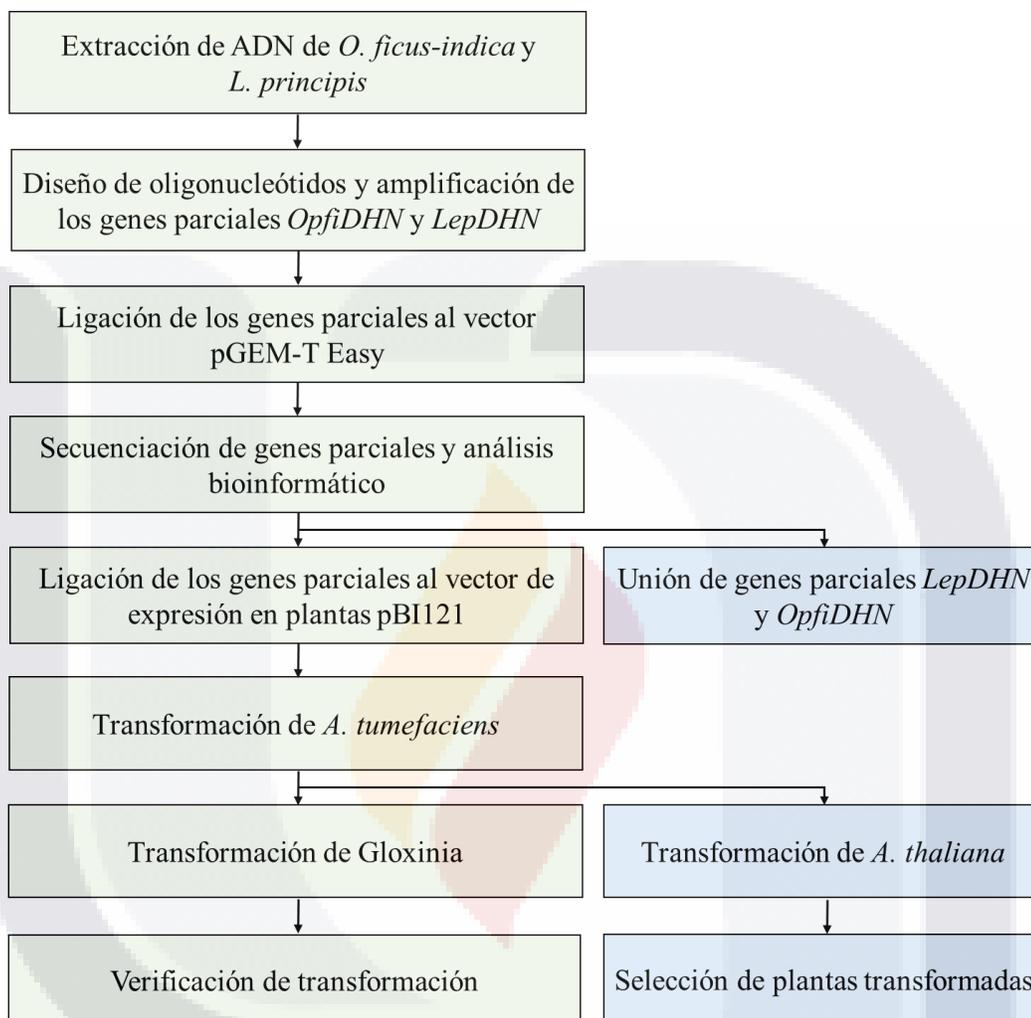
- Transformar Gloxinia (*Sinningia speciosa* Lodd.) con fragmentos de genes de dehidrasas provenientes de *Opuntia ficus-indica* (*OpfiDHN*) y *Leuchtenbergia principis* (*LepDHN*) con *Agrobacterium tumefaciens*.

5.2. Específicos

- Realizar construcciones con los genes *OpfiDHN* y *LepDHN* en el vector de expresión pBI121 en plantas.
- Transformar Gloxinia (*Sinningia speciosa* Lodd.) mediante *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones obtenidas.
- Analizar la incorporación de los genes *OpfiDHN* y *LepDHN* en plantas transformadas mediante prueba histoquímica de GUS y PCR.

6. METODOLOGÍA

6.1. Esquema general de la metodología



6.2. Obtención de construcciones de un vector de expresión de plantas con genes parciales de dehidrinas

6.2.1. Extracción de ADN de cactáceas

Las plantas *Leuchtenbergia principis* y *Opuntia ficus-indica* fueron donados por el Banco de Germoplasma *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. La extracción se realizó mediante el protocolo del CTAB (Murray y Thompson, 1980) con algunas modificaciones. Se pulverizó el tejido congelándolo a -80 °C durante toda la noche y se maceró manualmente. El tejido pulverizado se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se agregó un volumen de Buffer de lisis (Anexo A) y se agitó manualmente durante 10 min. Posteriormente, las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 min agitando constantemente y se incubaron en hielo durante 5 min. Se agregaron 300 µl de NaCl 1.4 M y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1) y se agitó vigorosamente de forma manual, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregó 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó manualmente hasta emulsificar, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregó un volumen igual de isopropanol, se mezcló 10 veces por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron dos lavados de la pastilla formada con 100 µl de etanol al 70%, centrifugando a 12,000 rpm durante 5 min. Finalmente, se secó la pastilla y se resuspendió en 30 µl de agua.

La obtención de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en un fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV de Labnet y se cuantificó mediante espectrofotometría con un nanodrop Colibrí Microvolume Spectrometer.

6.2.2. Obtención de genes parciales de dehidrinas

La amplificación de fragmentos de dehidrinas se realizó por PCR en un termociclador SelectCycler II. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes parciales, a los cuales, se les agregó un codón de inicio ATG y uno de término TAA, además

de sitios de restricción correspondientes a *Xba*I en el Forward y *Bam*HI en el Reverse para su posterior ligación al vector de expresión.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

FOpsDHN: 5'ATATCTAGAATGGAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC3'

ROpsDHN: 5'AATGGATCCTTATGAAGGGGGTTGATCACACTCCACA3'

Se utilizó el kit GoTaq DNA Polymerase (Promega) para la reacción. La mezcla de PCR utilizada fue: 2.5 μ l de Buffer 5x, 1.25 de $MgCl_2$ 1.5 mM, 0.5 μ l de cada oligonucleótido 10 μ M, 10 ng de ADN, 0.5 μ l de dNTPs 10 mM, 0.062 μ l de Taq Polimerasa (5 u· μ l⁻¹) y se llevó a un volumen de 12.5 μ l con agua destilada estéril. El programa de PCR constó de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; seguida por 30 ciclos de 3 pasos, desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 59 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1.5 min; se agregó una extensión final a 72 °C por 10 min.

Se realizó la purificación de los fragmentos amplificados por PCR mediante el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Anexo B).

Se comprobó la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV de Labnet.

6.2.3. Ligación de genes parciales de dehidrasas al vector de clonación pGEM

T Easy

Una vez purificados los genes parciales de dehidrasas, se ligaron en el vector de clonación pGEM T Easy de Promega (Figura 3), mediante la siguiente mezcla de reacción: 5 μ l de 2x Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase, 1 μ l de vector pGEM T Easy (50 ng), 3 μ l de producto de PCR purificado y 1 μ l de T4 DNA Ligase (3 u· μ l⁻¹). Se incubó a 4 °C durante 16 h.

Las construcciones obtenidas fueron nombradas pGEM:*LepDHN* y pGEM:*OpfiDHN*.

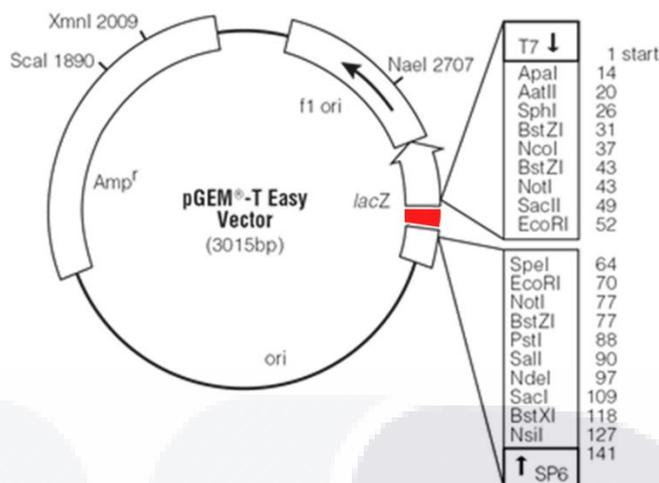


Figura 3. Vector de clonación pGEM T Easy. En rojo se indica el sitio de inserción del fragmento.

6.2.4. Preparación de células competentes y transformación genética de *Escherichia coli*

Se prepararon células competentes por tratamiento químico mediante el siguiente protocolo: Se cultivó *E. coli* DH5-*a* en medio LB (Anexo C) solido a 37 °C durante 20 h. Se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 ml de medio LB líquido y se incubó por 20 h a 37 °C. Posteriormente se cultivaron 200 µl del cultivo crecido en 10 ml de medio LB líquido y se incubó por 3 h. Pasado ese tiempo, se repartió en 10 tubos de 1.5 ml y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 s, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de CaCl₂ 0.1 M estéril y frío. Se incubó en hielo durante 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm por 20 s, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 30 µl de CaCl₂ 0.1 M estéril y frío.

La transformación bacteriana se llevó a cabo por choque térmico. Se agregaron 2 µl de las construcciones pGEM:*LepDHN* y pGEM:*OpfiDHN* a 30 µl de las células competentes previamente preparadas. Se incubaron en hielo durante 20 min, seguido por 90 s a 42 °C y nuevamente en hielo por 5 min. Se agregaron 200 µl de medio LB líquido y se incubaron a 37 °C en agitación por 45 min. Finalmente se esparció el cultivo en medio LB solido adicionado con Amp (100 ng·µl⁻¹) y se dejó en incubación a 37 °C por 18 h.

6.2.5. Extracción de plásmidos de células transformadas

La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante el protocolo de extracción alcalina propuesto por Birnboim y Doly (1979). Para esto, se tomaron colonias aisladas de bacterias *E. coli* anteriormente transformadas y se cultivaron en medio LB líquido adicionado con Amp ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y se incubaron por 18 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en agitación. Posteriormente se tomaron 1.5 ml de cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf, se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 150 μl de solución Birnboim I (Anexo D1), y se colocó en hielo durante 5 min. Pasado este tiempo se agregaron 200 μl de solución Birnboim II (Anexo D2), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 150 μl de solución Birnboim III (Anexo D3), se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante. Se añadieron 200 μl de fenol-cloroformo (1:1), se mezcló vigorosamente hasta emulsificar, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa. Se añadieron 200 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión durante 1 min y se incubó en hielo por 5 min; se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 200 μl de etanol al 70% y se secó la pastilla para finalmente resuspender en 40 μl de agua destilada estéril.

Se verificó la extracción de ADN plasmídico mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% observándolo bajo luz ultravioleta.

6.2.6. Verificación de ligación mediante restricción

Se realizó la digestión del plásmido obtenido mediante enzimas de restricción. Se utilizaron las enzimas *Bam*HI y *Xba*I (Jena Bioscience) que reconocen secuencias presentes en los extremos del inserto. Para esta reacción se preparó la siguiente mezcla: 8.3 μl de plásmido, 1 μl de Buffer Universal 10x, 0.2 μl de enzima *Bam*HI ($10 \text{ u} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), 0.2 μl de enzima *Xba*I ($10 \text{ u} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y 0.3 μl de ARNasa ($20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. La digestión se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6.2.7. Secuenciación de los productos ligados y análisis bioinformático

Las construcciones pGEM:*LepDHN* y pGEM:*OpfiDHN* fueron enviadas a secuenciar al Laboratorio de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT), San Luis Potosí, México.

Con las secuencias obtenidas se realizó una búsqueda de homólogos con el programa BLAST (Basic Alignment Search Tool) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Además, se analizó la similitud con dehidrinas presentes en *A. thaliana* y gloxinia mediante la herramienta BLAST de UniProt [<https://www.uniprot.org/blast/>] y se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos mediante la herramienta MUSCLE con el método ClustalW del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) [<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>].

Una vez comprobadas las secuencias, se realizó la traducción virtual para el análisis del marco de lectura abierto y los sitios de restricción mediante la herramienta de Análisis de secuencias de Addgene [<http://www.addgene.org/analyze-sequence/>].

Así mismo, se realizó la predicción del grado de desorden de las secuencias de aminoácidos con la herramienta IUPred2A [<https://iupred2a.elte.hu/>].

6.2.8. Unión de los genes parciales *LepDHN* y *OpfiDHN*

Adicionalmente, se realizó la unión de ambos genes parciales por medio de restricción y ligación. Para esto, se utilizaron oligonucleótidos específicos adicionando sitios de restricción para la enzima *HindIII*. Los oligonucleótidos fueron los siguientes:

FHindIII: ATAAAGCTTGAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC

RHindIII: AATAAGCTTTGAAGGGGGTTGATCACACTCCACA

Para la amplificación de los genes parciales, estos oligonucleótidos se combinaron con FOpsDHN y ROpsDHN para agregar los sitios de restricción necesarios. Para el gen parcial *LepDHN* se utilizaron los oligonucleótidos FOpsDHN y RHindIII añadiendo así, los

sitios *XbaI* y *HindIII*, y para el gen *OpfiDHN* se utilizó *FHindIII* y *ROpsDHN* agregando los sitios *HindIII* y *BamHI*.

La PCR se realizó en un termociclador SelectCycler utilizando el kit GoTaq DNA Polymerase (Promega). La mezcla utilizada fue: 2.5 μl de Buffer 5x, 1.25 de MgCl_2 1.5 mM, 0.2 μl de cada oligonucleótido 10 μM , 100 ng de ADN, 0.3 μl de dNTPs 10 mM, 0.062 μl de Taq Polimerasa (5 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y se llevó a un volumen de 12.5 con agua destilada estéril. El programa de PCR constó de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; seguida de 30 ciclos de 3 pasos, desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 59 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 90 s; se agregó una extensión final a 72 °C por 10 min.

Una vez obtenidos los fragmentos con los sitios de restricción adicionados por medio de los oligonucleótidos, se purificaron con el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se realizó digestión de ambos genes con la enzima *HindIII* mediante la siguiente mezcla de reacción: 2.5 μl de Buffer E 10x, 0.25 μl de BSA 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 20 μl de producto de PCR purificado y 0.6 μl de la enzima *HindIII* (10 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Posteriormente, se precipitó agregando 15 μl de acetato de amonio 7.5 M y 40 μl de isopropanol, se incubó por 15 min a -20 °C, se centrifugó a 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol al 70%. Finalmente se secó la pastilla y se resuspendió en 15 μl de agua inyectable.

Se realizó una reacción de ligación de ambos genes ya digeridos y purificados al vector de clonación pGEM T Easy (Promega) mediante la siguiente mezcla: 3 μl de *LepDHN*, 3 μl de *OpfiDHN*, 1 μl de vector de clonación pGEM T Easy (Promega), 7.5 μl de Buffer 2x y 1 μl de ligasa. Se dejó incubando toda la noche a 4 °C.

Se transformó *E. coli* DH5- α con la ligación pGEM:*LepDHN-OpfiDHN* por choque térmico y se comprobó la construcción mediante la extracción y digestión del plásmido con las enzimas *BamHI* y *XbaI* (Jena Bioscience). Para estas reacciones se prepararon las siguientes mezclas:

Mezcla 1: 8.3 μl de plásmido, 1 μl de Buffer Universal 10x, 0.2 μl de enzima *BamHI* (10 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 0.2 μl de enzima *XbaI* (10 $\text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y 0.3 μl de ARNasa (20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Mezcla 2: 8.5 µl de plásmido, 1 µl de Buffer Universal 10x, 0.2 µl de enzima *Xba*I y 0.3 µl de ARNasa.

Mezcla 3: 8.5 µl de plásmido, 1 µl de Buffer Universal 10x, 0.2 µl de enzima *Bam*HI y 0.3 µl de ARNasa.

Cada una de las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 min. La digestión se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo luz ultravioleta.

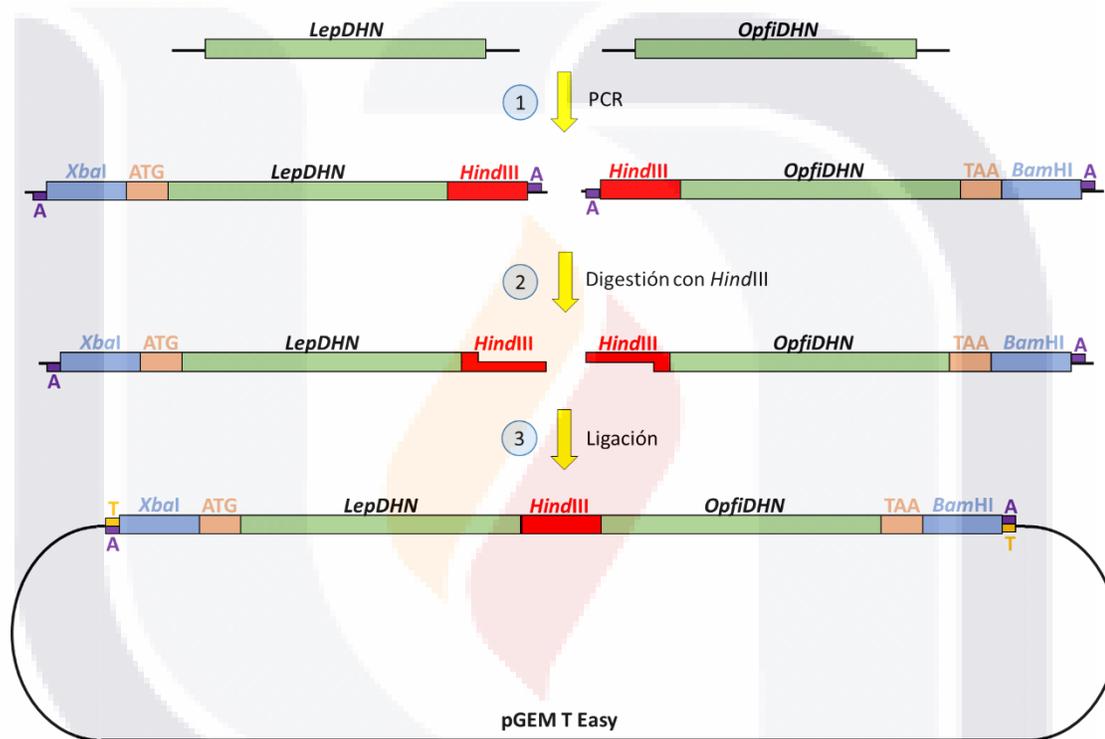


Figura 4. Estrategia utilizada para la unión de *LepDHN* y *OpfiDHN*. 1.- Se realiza PCR para adicionar los sitios de restricción *Xba*I y *Hind*III a *LepDHN*, y *Hind*III y *Bam*HI a *OpfiDHN*, obteniendo colas de A en los extremos 3' de cada una de las cadenas; 2.- Se digiere con la enzima *Hind*III ambos fragmentos para obtener extremos cohesivos; 3.- Se ligan ambos fragmentos entre sí por medio del sitio *Hind*III y al vector pGEM T Easy por medio de las colas salientes de A de los genes y T del vector.

6.2.9. Amplificación y purificación de los genes parciales a partir de las construcciones pGEM:*LepDHN* y pGEM:*OpfiDHN*

Una vez que se comprobó que los insertos ligados correspondían a los genes parciales deseados, se realizó PCR a partir de las construcciones obtenidas para ambos genes con los oligonucleótidos FOpsDHN y ROpsDHN bajo las condiciones indicadas en el Apartado 6.2.2.

6.2.10. Restricción y purificación de los genes parciales y del vector pBI121

Se realizó la digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I (Jena Bioscience) de los genes parciales obtenidos y del vector pBI121 (Figura 5) con la siguiente mezcla: 12 µl de ADN, 1.5 µl de Buffer Universal 10x, 0.5 µl de *Bam*HI (10 u·µl⁻¹) y 0.5 µl de *Xba*I (10 u·µl⁻¹). Se incubó a 37 °C por 30 min.

Una vez digeridos se realizó la purificación con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

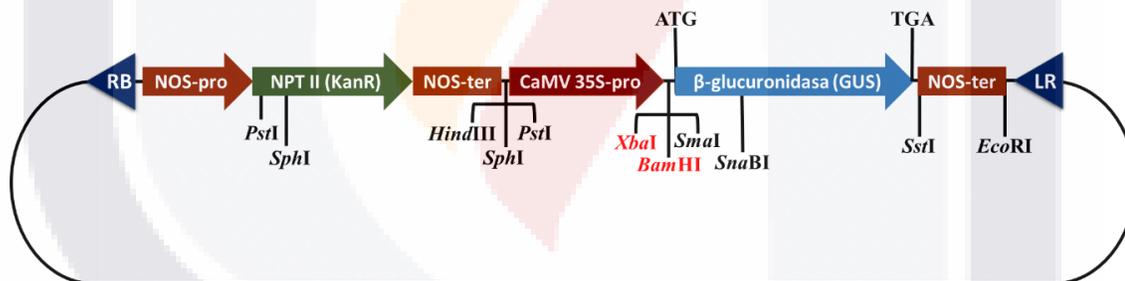


Figura 5. Vector de expresión en plantas pBI121 (Clontech). En letra roja se indica los sitios de restricción compatibles con los presentes en el inserto.

6.2.11. Ligación de *LepDHN* y *OpfiDHN* al vector de expresión en plantas pBI121

Una vez purificados los genes parciales digeridos, se ligaron al vector pBI121 mediante la siguiente mezcla de reacción: 5 µl de 2x Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase, 3 µl de vector pBI121, 1 µl de cada uno de los genes y 1 µl de T4 DNA Ligase (3 u·µl⁻¹). Se incubó a 4 °C durante 16 h.

Las construcciones obtenidas fueron llamadas pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*.

6.2.12. Transformación genética de *E. coli* y obtención de las construcciones

Se prepararon células competentes de *E. coli* DH5- α por tratamiento químico y se transformaron con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN* mediante el protocolo indicado en el apartado 6.2.4.

Una vez transformadas las bacterias, la extracción de ADN plasmídico se realizó mediante el protocolo de extracción alcalina propuesto por Birnboim y Doly (1979) tal como se describe en el apartado 6.2.5. El ADN plasmídico obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% observándolo bajo luz ultravioleta.

6.2.13. Verificación de construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN* mediante restricción y PCR

Se realizó la digestión de los plásmidos obtenidos con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I (Jena Bioscience). Para esta reacción se preparó la siguiente mezcla: 8.3 μ l de plásmido, 1 μ l de Buffer Universal 10x, 0.2 μ l de enzima *Bam*HI (10 u $\cdot\mu$ l⁻¹), 0.2 μ l de enzima *Xba*I (10 u $\cdot\mu$ l⁻¹) y 0.3 μ l de ARNasa (20 mg \cdot ml⁻¹). Se incubó a 37 °C durante 30 min.

Adicionalmente se comprobó la presencia del inserto mediante PCR. Se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir del vector pBI121 (Anexo E) con el software PrimerSelect 5.0 de DNASTar. El fragmento amplificado por los oligonucleótidos incluye un fragmento del promotor 35S, el sitio de inserción del gen y parte del gen *GUS*, por lo tanto, amplifican una secuencia de 1,239 pb a partir del vector sin inserto y de 1,743 pb y 1,746 pb a partir del vector con *LepDHN* y *OpfiDHN* respectivamente.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

FpBI121: 5' CTTACGCAGCAGGTCTCATCA 3'

RpBI121: 5' TGCCAGTTCAGTTCGTTGTT 3'

La PCR se llevó a cabo en un termociclador SelectCycler II con el kit GoTaq DNA Polymerase (Promega). La mezcla utilizada fue: 2.5 μ l de Buffer 5x, 1.25 de MgCl₂ 1.5 mM, 0.5 μ l de cada oligonucleótido 10 μ M, 0.1 μ l de cada construcción, 0.3 μ l de dNTPs 10 mM,

0.062 μl de Taq Polimerasa ($5 \text{ u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y se llevó a un volumen de 12.5 μl con agua destilada estéril. El programa de PCR constó de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; seguido por 30 ciclos de 3 pasos, desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 58 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2.5 min; se agregó una extensión final a 72 °C por 10 min.

La digestión y la PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6.3. Transformación genética de *A. tumefaciens* con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*

6.3.1. Preparación de células competentes y transformación genética de *A. tumefaciens*

La preparación de células competentes y la transformación genética de *A. tumefaciens* se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Universidad de Guadalajara a cargo de la Dra. Araceli Rodríguez Sahagún. Se utilizaron tres cepas de *A. tumefaciens*: GV3101 (pMP90), GV2260 y EHA105.

Para la preparación de células competentes, se cultivaron cada una de las cepas en medio YEB (Anexo F) líquido a temperatura ambiente durante 48 h. Se tomaron alícuotas de 1.5 ml de cultivo crecido en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 4,000 rpm durante 3 min a 4 °C. Se realizaron 5 lavados, para esto, una vez centrifugado, se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla agitando suavemente, se agregó 1.5 ml de agua desionizada y se centrifugó a 4,000 rpm por 3 min a 4 °C. Al finalizar los lavados, se resuspendió la pastilla en 70 μl de agua desionizada.

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó por medio de electroporación en un electroporador Eppendorf Eporator en celdas con una distancia entre placas de 2 mm, con una tensión de 2500 V, obteniendo una constante de tiempo de la curva de descarga de 5.8 ms.

Para la transformación, se agregaron 2 μl de las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN* y del vector pBi121 a las células competentes previamente preparadas para cada una de las cepas. Se mezcló suavemente y se colocó la mezcla en una celda para

electroporación. Se realizó la electroporación y se incubó en hielo durante 3 min. Posteriormente se agregaron 200 μl de medio LB líquido y se incubó a temperatura ambiente por 5 h. Finalmente, se esparcieron 100 μl del cultivo en cajas con medio LB sólido adicionado con Kn ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y Rif ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y se dejó en incubación a temperatura ambiente por 48 h.

6.3.2. Verificación de transformación de *A. tumefaciens* mediante PCR

A partir de las colonias obtenidas se realizó PCR de colonia en un termociclador MultiGen OptiMax Thermal Cycler. Se utilizó el kit de PCR de Invitrogen con los oligonucleótidos FpBI121 y RpBI121 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min; seguida por 36 ciclos de 3 pasos, desnaturalización a $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s, alineamiento a $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s y extensión a $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2.5 min; se agregó una extensión final a $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min.

Se realizó la comprobación de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se verificó con un fotodocumentador Carestream Gel Logic bajo luz ultravioleta.

6.4. Transformación genética de Gloxinia y *A. thaliana* con *A. tumefaciens*

6.4.1. Propagación de plantas de Gloxinia

Las plántulas de gloxinia (*Sinningia speciosa* Lodd.) fueron donadas por el Banco de Germoplasma *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. A partir de ellas, se separaron brotes en frascos con medio MS (Anexo G) sólido adicionado con BA ($0.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) bajo condiciones axénicas. Una vez obtenida una mayor cantidad de brotes, estos se individualizaron en frascos para su crecimiento en medio MS sólido y se establecieron a temperatura ambiente con fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

6.4.2. Preparación de *A. tumefaciens* y transformación de Gloxinia

Se utilizaron 3 protocolos de transformación. Para el primero de ellos, se cultivaron cada una de las cepas de *A. tumefaciens* a partir de un cultivo recién sembrado en 50 ml de medio YEB líquido suplementado con Kn ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) a temperatura ambiente. Una vez alcanzada una OD_{600} de 0.4 se centrifugó el cultivo crecido y se resuspendió en 50 ml de medio MS líquido adicionado con acetosiringona $100 \mu\text{M}$. Para la transformación se cortaron hojas de plantas de Gloxinia cultivadas *in vitro*, se les eliminaron los bordes y se les realizaron de 2 a 3 heridas en el envés de las hojas a lo largo de la lámina. Una vez procesados los explantes se colocaron sobre el medio con cultivo bacteriano y acetosiringona y se mantuvieron por 30 min en oscuridad. Posteriormente, se secó el exceso de bacteria y se colocaron sobre cajas Petri con medio MS sólido y se mantuvieron por 72 h en oscuridad a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Pasado este tiempo, se realizó un lavado de los explantes con medio MS líquido adicionado con Cef ($500 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) en agitación suave en oscuridad durante 45 min. Posteriormente, los explantes se colocaron sobre medio MS líquido adicionado con AIA ($2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), BA ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), Kn ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y Cef ($250 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Finalmente se transfirieron los explantes a medio MS sólido adicionado con AIA ($2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), BA ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), Kn ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y Cef ($250 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).

El segundo protocolo de transformación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Universidad de Guadalajara. Para esto, se cultivaron las 3 cepas de *A. tumefaciens* en 5 ml de medio YEB líquido adicionado con Kn ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) a temperatura ambiente y se dejó crecer por 20 h. Se centrifugó el cultivo crecido y se resuspendió en 15 ml de medio YEB líquido adicionado con Kn ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y acetosiringona $20 \mu\text{M}$, y se dejó crecer toda la noche en oscuridad. Una vez obtenida una OD_{600} de 0.8 se centrifugó a 6000 g por 5 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y se eliminó el sobrenadante. La pastilla formada fue resuspendida en 15 ml de medio MS suplementado con acetosiringona $200 \mu\text{M}$. Para la transformación se cortaron hojas y peciolas de Gloxinia cultivadas *in vitro*. A las hojas se les realizaron de 2 a 3 heridas en el envés a lo largo de la lámina. Una vez procesados los explantes, se colocaron sobre el medio con el cultivo bacteriano y acetosiringona y se colocaron en vacío por 4 min, seguido de 16 min en oscuridad. Los explantes fueron sometidos a 0 o 20 h de cocultivo. Después de esto, se realizó un enjuague de los explantes con agua destilada estéril y 3 lavados de 2 h cada uno con medio MS (50%) adicionado con Cef ($500 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Se secaron los

explantos y se colocaron sobre medio MS sólido adicionado con Cef ($200 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Después de 24 h se transfirieron los explantes a medio MS sólido adicionado con BA ($2 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), ANA ($0.1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y Kn ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y se incubaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Para el tercer protocolo de transformación, se cultivaron las 3 cepas de *A. tumefaciens* con las mismas condiciones que el protocolo 2 pero reduciendo la OD_{600} a 0.5. Los explantes se procesaron eliminando los brotes de las hojas y realizando de 2 a 3 heridas en el envés a lo largo de la lámina. Se colocaron en medio MS adicionado con acetosiringona ($200 \mu\text{M}$) y se mantuvieron por 15 min. Posteriormente se aplicó vacío por 5 min a 80 kPa, seguido por 10 min en oscuridad. Pasado este tiempo, se secó el exceso de bacteria y se colocaron sobre cajas Petri con medio MS sólido y se mantuvieron por 48 h en oscuridad a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril seguido por 3 lavados de 2 h con medio MS (50%) líquido adicionado con Cfx ($1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) en agitación suave en oscuridad. Finalmente, se secaron los explantes y se colocaron sobre medio MS sólido adicionado con BA ($1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), ANA ($0.1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), Cfx ($200 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y Kn ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y se incubaron a temperatura ambiente con fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

6.4.3. Preparación de *A. tumefaciens* y transformación de *A. thaliana*

Simultáneamente a la transformación de glloxinia, se realizaron ensayos de transformación de *A. thaliana* por inmersión floral. Para ello, se cultivaron cada una de las cepas de *A. tumefaciens* con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN* en 50 ml de medio YEB líquido suplementado con Kn ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y Rif ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a 250 rpm y se dejó crecer toda la noche. Una vez que se obtuvo una OD_{600} de 0.8 se centrifugó a 6000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante.

Se realizaron dos protocolos de transformación. Para el primero de ellos, la pastilla bacteriana obtenida fue resuspendida en 50 ml de medio MS a la mitad de concentración, adicionado con glucosa (5%) y Silwet L-77 (0.025%) o Tween 20 (0.075%). Para el segundo protocolo, se utilizó medio MS a la mitad de concentración, adicionado con glucosa (5%) y

un coadyuvante agrícola (Xtender de FIASA para la cepa GV3101, Kinetic de VALENT para la cepa GV2260 e INEX-A de COSMOCEL para EHA105) al 0.05%.

Para la transformación se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 de aproximadamente 5 semanas de edad cultivadas a una temperatura de 25 °C con fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Una vez que la planta presentó botones florales se realizó la transformación. Para el primer protocolo de transformación, se sumergió la parte aérea de la planta en el medio previamente preparado (MS 0.5x, Glucosa y Silwet L-77 o Tween 20) con la bacteria durante 10, 30 y 120 s. Para el segundo protocolo de transformación, el medio (MS 0.5x, Glucosa y Xtender, Kinetic o INEX-A) con la bacteria fue inyectado directamente en los botones florales mediante una micropipeta. Finalmente, para ambos protocolos, se colocó una bolsa de plástico sobre la planta para mantener una humedad relativa alta y se pusieron en oscuridad durante 22 h. Pasado este tiempo se quitó la bolsa de plástico y se colocó la planta a condiciones normales de crecimiento (fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad).

Siete días después de la transformación, para las plantas del primer protocolo se realizó una segunda transformación de las mismas plantas bajo las mismas condiciones.

6.4.3.1. Selección de semillas transformadas de *A. thaliana*

Después de 4 semanas aproximadamente, se colectaron las semillas obtenidas de las plantas sometidas a transformación. Se realizó la desinfección de las semillas mediante el siguiente protocolo: se hizo un enjuague con agua destilada estéril, seguido por un lavado con etanol (70%) durante 1 min agitando suavemente y un enjuague con agua. Se realizó un lavado con solución de lavado (Cloro al 50% y Tween 20 al 0.05%) durante 10 min agitando suavemente. Finalmente, se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas las semillas, se sembraron en cajas Petri con medio MS adicionado con Kn ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) para las semillas obtenidas del primer protocolo de transformación y con Kn ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) para las semillas del segundo protocolo. Se colocaron las cajas Petri a 4 °C en oscuridad por 3 días, seguido por 2 días a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se colocaron en fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

La transformación se verificó de forma visual diez días después.

6.5. Tratamiento de temperatura de congelamiento a explantes de gloxinia presuntamente transformados con el gen *LepDHN*

Debido a que el callo obtenido de los explantes de Gloxinia presentaba contaminación por bacteria, se les realizaron lavados con medio MS a la mitad de concentración adicionado con Cfx ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) tal como se realizaron en el protocolo de transformación tres de Gloxinia del Apartado 6.4.2. Debido a que no fue posible la eliminación de la bacteria, el tejido fue sometido a tratamiento por frío antes de la pérdida por contaminación. Para ello, los explantes con callo fueron sometidos a temperaturas de congelamiento para analizar la capacidad crioprotectora del gen parcial *LepDHN*. Se colocó el tejido calloso a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h, seguido por 2 h a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h. Finalmente, las plantas fueron colocadas a condiciones normales de crecimiento para su recuperación.

Se realizó la evaluación de la tolerancia de los explantes a la temperatura de congelamiento de forma visual después del tratamiento.

6.6. Verificación de transformación de explantes de gloxinia

6.6.1. Verificación mediante prueba histoquímica de GUS

La transformación de las explantes de Gloxinia se verificó mediante un ensayo de expresión del gen *GUS*. Para esto, se colocaron los explantes presuntamente transformados con cada cepa de *A. tumefaciens* con el vector pBI121 con y sin inserto, en un tubo Eppendorf y se agregó 1 ml de solución de reacción (Anexo H) y se incubó por 16 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente se realizaron lavados con etanol 70% para fijar el tejido y eliminar la clorofila.

6.6.2. Extracción de ADN de explantes de gloxinia presuntamente transformados

Previo a la extracción de ADN se realizó el lavado de los explantes para eliminar cualquier residuo de bacteria. Para ello, se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril,

seguida de dos lavados de 1 min con etanol al 70% y dos lavados con agua destilada estéril. Después se realizaron 5 lavados de 2 h cada uno a los explantes con MS líquido a la mitad de concentración adicionado con Cfx ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), y finalmente 5 enjuagues con agua destilada estéril.

La extracción de ADN de los explantes presuntamente transformados se realizó mediante el protocolo de CTAB (Murray y Thompson, 1980) con algunas modificaciones. Se pulverizó el tejido congelándolo a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante toda la noche y se maceró manualmente. Se colocó el tejido pulverizado en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 800 μl de Buffer de lisis (Anexo A) y se mezcló por inversión. Posteriormente, las muestras se incubaron a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min agitando constantemente y se incubaron en hielo durante 5 min. Se agregaron 500 μl de fenol-cloroformo (1:1) y se agitó vigorosamente de forma manual, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregaron 500 μl de fenol-cloroformo (1:1) se emulsificó y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. Se agregaron 500 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó manualmente hasta emulsificar, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se recuperó la fase acuosa. Se agregó un volumen igual de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron dos lavados de la pastilla formada con 200 μl de etanol (70%), centrifugando a 12,000 rpm durante 5 min. Finalmente, se secó la pastilla y se resuspendió en 30 μl de agua.

Cabe señalar, que la extracción de ADN de los explantes transformados con la cepa GV2260 con la construcción pBI121:*LepDHN* se llevó a cabo a partir del tejido calloso sometido a tratamiento.

La extracción de ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV de Labnet.

6.6.3. Extracción de ADN de *A. tumefaciens*

Se realizó la extracción de ADN de cada una de las cepas de *A. tumefaciens*. Para ello se creció el cultivo bacteriano en medio YEB líquido adicionado con Kn ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) durante toda la noche. Del cultivo crecido se tomaron 1.5 ml en un tubo de Eppendorf,

Para esto, se tomaron colonias aisladas de bacterias *E. coli* anteriormente transformadas y se cultivaron en medio LB líquido adicionado con Amp ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y se incubaron por 18 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en agitación. Posteriormente se tomaron 1.5 ml de cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf, se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 350 μl de Buffer STET (Anexo I). Se agregaron 25 μl de lisozima ($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y se incubó a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min, se enfrió en hielo y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se añadió un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se decantó y se lavó la pastilla con 200 μl de etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 30 μl de agua destilada estéril.

6.6.4. Verificación de transformación mediante PCR

Se realizó PCR en un termociclador SelectCycler II para comprobar la transformación, la ausencia de bacteria en los explantes de gloxinia presuntamente transformados y la presencia del gen *VirD1* en la bacteria. Se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para PCR para verificación de transformación de explantes de Gloxinia, ausencia de bacteria en explantes y presencia del gen *VirD1*

Gen (parcial)	Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
<i>nptII</i>	Fnpt	TATTCGGCTATGACTGGGCA	616
	Rnpt	GCCAACGCTATGTCCTGAT	
<i>Dehidrina</i>	FOpsDHN	ATATCTAGAATGGAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC	<i>LepDHN</i> : 510 y
	ROpsDHN	AATGGATCCTTATGAAGGGGGTTGATCACACTCCACA	<i>OpfiDHN</i> : 513
<i>Dehidrina-GUS</i>	FOpsDHN	ATATCTAGAATGGAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC	<i>LepDHN</i> : 1,836 y
	RGUS	GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA	<i>OpfiDHN</i> : 1,839
<i>*35S-Dehidrina-GUS</i>	FpBI121	CTTACGCAGCAGGTCTCATCA	<i>LepDHN</i> : 1,743 y
	RpBI121	TGCCAGTTCAGTTCGTTGTT	<i>OpfiDHN</i> : 1,746
<i>VirD1</i>	FVirD1	ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA	450
	RVirD1	GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA	

*Las cepas con el vector sin inserto amplifican la región *35S-GUS* y el fragmento esperado es de 1,239 pb.

Para la PCR se utilizó el kit GoTaq DNA Polymerase (Promega) para la reacción. La mezcla de PCR utilizada fue: 2.5 μl de Buffer 5x, 1.25 de MgCl_2 1.5 mM, 0.2 μl de cada oligonucleótido 10 nM, 0.5 μl de ADN, 0.3 μl de dNTPs 10 mM, 0.0625 μl de Taq Polimerasa ($5 \text{ u} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y se llevó a un volumen de 12.5 μl con agua destilada estéril. Se utilizó el ADN obtenido de los explantes de Gloxinia con los protocolos de transformación 2 y 3, y el obtenido de las cepas de *A. tumefaciens*. El programa de PCR constó de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; seguida por 30 ciclos de 3 pasos, desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 55 °C para los pares de oligonucleótidos Fntp y Rnpt, y FvirD1 y RvirD1, 58 °C para FpBI121 y RpBI121 y 59 °C para FOpsDHN y ROpsDHN, y FOpsDHN y RGUS por 30 s y extensión a 72 °C por 1.5 min; se agregó una extensión final a 72 °C por 10 min.

Se comprobó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV de Labnet.

7. RESULTADOS

7.1. Extracción de ADN de cactáceas

Se realizó la extracción de ADN de *L. principis* y *O. ficus-indica*. Se obtuvo ADN a una concentración de $145.87 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ para *L. principis* y de $207.91 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ para *O. ficus-indica* con una relación $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ de 1.94 y 2.06 respectivamente (Figura 6).

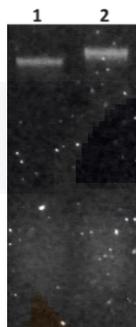


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de dos especies de cactáceas. 1.- *L. principis*; 2.- *O. ficus-indica*.

7.2. Obtención de genes parciales de dehidrinas de *L. principis* y *O. ficus-indica*

Se amplificaron los genes parciales con oligonucleótidos específicos con codones de inicio y término y sitios de restricción, obteniendo bandas de aproximadamente 500 pb (Figura 7).

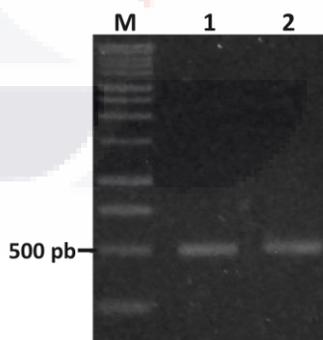


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la purificación de genes parciales de dehidrinas de dos especies de cactáceas. M.- Marcador de peso molecular 1 kb; 1.- *O. ficus-indica*; 2.- *L. principis*.

7.3. Ligación de genes parciales de dehidrinas al vector de clonación pGEM T Easy

La ligación de los genes parciales al vector pGEM T Easy se comprobó por restricción con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. Se obtuvieron bandas de aproximadamente 500 pb correspondientes a cada uno de los insertos ligados (Figura 8).

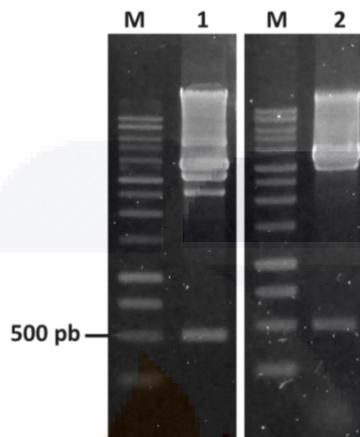


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de dos construcciones con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. M.- Marcador de peso molecular 1 kb; 1.- pGEM:*LepDHN*; 2.- pGEM:*OpfiDHN*.

7.4. Análisis de secuencias

Se obtuvieron secuencias de 501 pb y 504 pb para *LepDHN* y *OpfiDHN*, respectivamente, delimitadas por los codones de inicio y término. Se realizó la búsqueda de homólogos en la base de datos de la NCBI y se encontró que para *LepDHN* generó un 97% de identidad para la dehidrina de *L. principis* [No. de acceso AKC92527.1]. Para la secuencia obtenida de *OpfiDHN* dio un 99% de identidad con *O. ficus-indica* [No. de acceso AKC92526.1].

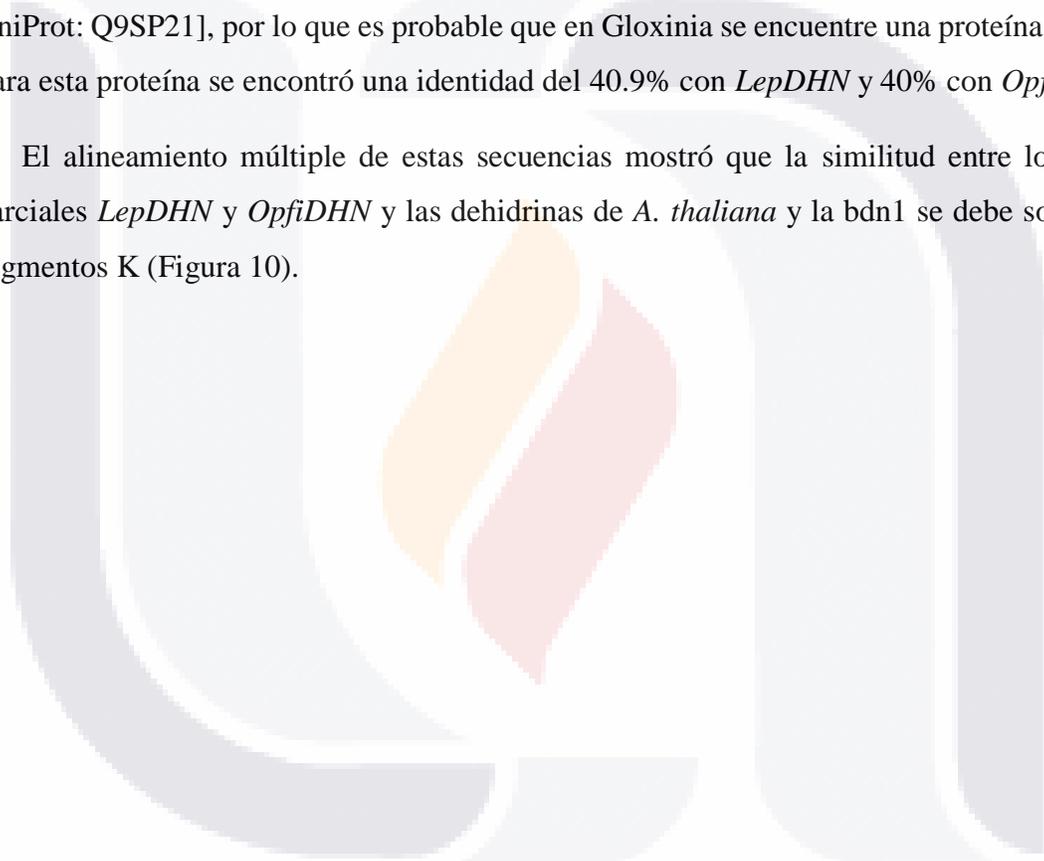
Una vez comprobado esto, se realizó la traducción virtual, obteniendo una secuencia de 166 aminoácidos para *LepDHN* y 167 aminoácidos para *OpfiDHN*, con codones de inicio y término, así como los sitios de restricción *Xba*I y *Bam*HI.

En la búsqueda de homólogos en aminoácidos se encontró una identidad del 95% y 98% de los genes parciales *LepDHN* y *OpfiDHN* con *OpsDHN* [número de acceso en NCBI: HM581971.1], respectivamente. En cuanto a la similitud con dehidrinas de *A. thaliana* se encontró para *LepDHN* un 40.2% de identidad con COR47 [número de acceso en UniProt:

P31168], 36.5% con ERD10 [número de acceso en UniProt: P42759] y 39.7% con ERD14 [número de acceso en UniProt: P42763]. Para *OpfiDHN* se encontró una identidad del 39.9% con COR47, 34.6% con ERD10 y 37.8% con ERD14. Además, se encontró para ambas secuencias putativas la presencia de 3 segmentos K y la región de 5 His para *LepDHN* y 6 His para *OpfiDHN* (Figura 9).

En Gloxinia no se encontraron dehidrasas reportadas, sin embargo, en *Paraboea crassifolia* de la familia Gesneriaceae se encuentra la dehidrasa bdn1 [número de acceso en UniProt: Q9SP21], por lo que es probable que en Gloxinia se encuentre una proteína similar. Para esta proteína se encontró una identidad del 40.9% con *LepDHN* y 40% con *OpfiDHN*.

El alineamiento múltiple de estas secuencias mostró que la similitud entre los genes parciales *LepDHN* y *OpfiDHN* y las dehidrasas de *A. thaliana* y la bdn1 se debe solo a los segmentos K (Figura 10).



A

```

1  [XbaI] M E E E G D D E D K K R K K E K 20
1 ATATCTAGATGAGGAGGAGGAGATGACGAAGACAAGAAGAGGAAGAAGGAGAAG 60
21K E K K G L K E K I K E K L P G H H K E 40
61 AAAGAAAAGAAAGGATTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAAACTTCCAGGCACCACAAGGAA 120
41Q E E E Q E D K K K D H H H H H H D E E D 60
121 CAGGAAGAAGACAAGAGGACAAGAAAAGGATCATCATCATCATCATGATGAAGAGGAC 180
61T N I A T E K T H V E E V I Y S E P S Y 80
181 ACCAATATAGCAACAGAGAAGACCCACGTGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCTTAC 240
81P A P A P P P P H S E A E G E K K G L L 100
241 CCTGCCCGGGCCCCACCGCCACCTCATTCGGAGGCCGAAGGGGAGAAGAAGGGGCTGCTT 300
101E K I K D K L P G Q H K K A E V E H E V 120
301 GAGAAGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTTCAGCACAAGAAGGCCGAGGTCGAGCAGAGGTG 360
121V P T A T A T V A E G E A Q E K K G F L 140
361 GTCCCAACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCAGGAGAAGAAGGGGTTCTTG 420
141D K I K E K I P G F H S K A P E E D K K 160
421 GACAAGATCAAGGAGAAGATCCCTGGCTTCCACTCTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAGAAG 480
161D V E C D Q P P S * BamHI 173
481 GATGTGGAGTGTGATCAACCCCTTCATAAGGATCGATT 519
    
```

B

```

1  [XbaI] M E E E G D D E D K K R R K K E K 20
1 ATATCTAGATGAGGAGGAGGAGATGACGAAGACAAGAAGAGGAGGAAGAAGGAGAAG 60
21K E K K G L K E K I K E K L P G H H K E 40
61 AAAGAAAAGAAAGGACTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAAACTTCCAGGCACCACAAGGAG 120
41Q E E E Q E D K Q K D H H H H H H D E E 60
121 CAGGAAGAAGACAAGAGGACAAGCAAAAGGATCATCATCATCATCATGATGAAGAG 180
61D T N I A I E K I H V E E V I Y S E P S 80
181 GACACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCACGTGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCT 240
81Y P A P A P P P P H S E A E G E K K G L 100
241 TACCCTGCCCGGGCCCCACCGCCACCTCATTCGGAGGCCGAAGGGGAGAAGAAGGGGCTG 300
101L E K I K D K L P G Q H K K A E A E H E 120
301 CTTGAGAAGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTTCAGCACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCAGAG 360
121V V P T A T A T V A E G E A Q E K K G F 140
361 GTGGTCCCAACGGCCACTGCCACCGTGGCCGAGGGGGAGGCCAGGAGAAGAAGGGGTTCT 420
141L D K I K E K I P G F H S K A P E E D K 160
421 TTGGACAAGATCAAGGAGAAGATCCCTGGCTTCCACTCTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAG 480
161K D V E C D Q P P S * BamHI 174
481 AAGGATGTGGAGTGTGATCAACCCCTTCATAAGGATCGATT 522
    
```

Figura 9. Traducción virtual de las secuencias obtenidas. A, Secuencia de *LepDHN*; B, Secuencia de *OpfiDHN*. En el recuadro negro se encuentran resaltados los codones de inicio y término; en el recuadro punteado los sitios de restricción *XbaI* y *BamHI*; en el recuadro con sombreado gris se encuentran resaltados los tres segmentos K; en el recuadro con líneas diagonales se encuentra resaltado la región de His.

En cuanto a la predicción del grado de desorden de las secuencias de aminoácidos, se obtuvo un valor superior a 0.5 (Figura 11).

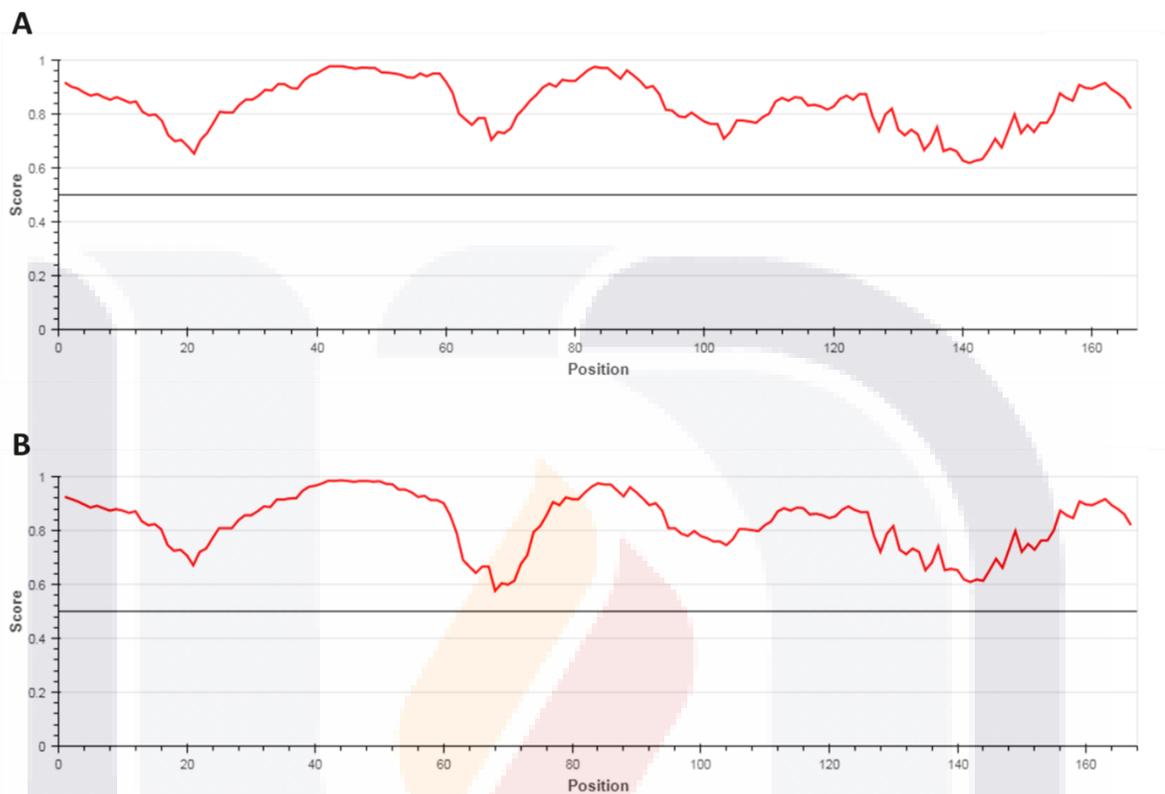


Figura 11. Grado de desorden de las secuencias analizadas. A, Grado de desorden de *LepDHN*; B, Grado de desorden de *OpfiDHN*.

7.5. Unión de los genes parciales *LepDHN* y *OpfiDHN*

Se digirió la construcción pGEM:*LepDHN-OpfiDHN* con las enzimas *Xba*I y *Bam*HI para comprobar la presencia del inserto. Al digerir con ambas enzimas a la vez, se liberó el inserto ligado de 1,000 pb aproximadamente (Figura 12).

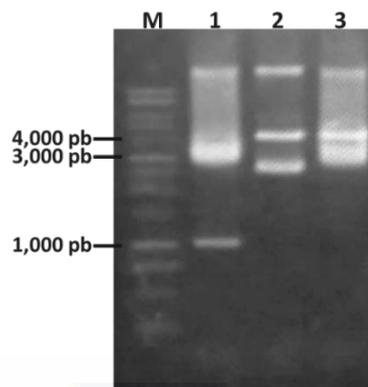


Figura 12. Electroforesis del gel de agarosa de la digestión de la construcción. M.- Marcador de peso molecular 1 kb; 1.- Digestión con *XbaI* y *BamHI* (Mezcla de reacción 1); 2.- Digestión con *XbaI* (Mezcla de reacción 2); 3.- Digestión con *BamHI* (Mezcla de reacción 3).

7.6. Ligación de los genes parciales al vector de expresión en plantas pBI121

La ligación de los genes parciales *LepDHN* y *OpfiDHN* al vector pBI121 se comprobó mediante digestión con las enzimas *XbaI* y *BamHI* obteniendo una banda por encima de las 10,000 pb correspondiente al vector pBI121 y bandas de 500pb correspondientes a cada uno de los insertos ligados (Figura 13A). Así mismo, se comprobó por medio de PCR con los oligonucleótidos FpBI121 y RpBI121, obteniendo bandas de 1200 pb para el vector sin inserto y 1700 pb aproximadamente para las construcciones realizadas (Figura 13B).

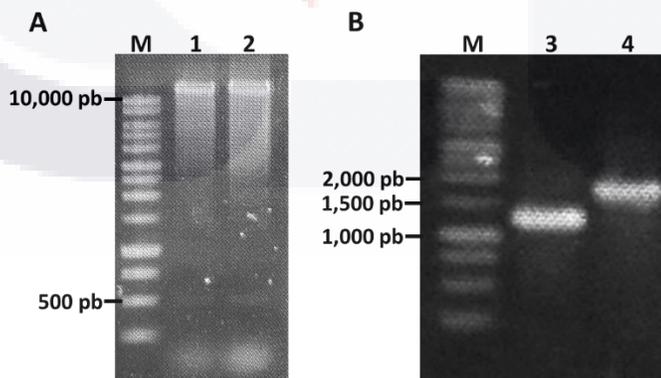


Figura 13. Comprobación de ligación mediante restricción y PCR. A, Electroforesis de digestión de las construcciones mediante las enzimas *XbaI* y *BamHI*. M.- Marcador de peso molecular 1 kb; 1.- pBI121:*LepDHN*; 2.- pBI121:*OpfiDHN*; B, Electroforesis de la PCR del vector y de la construcción, M.- Marcador de peso molecular 1 kb; 3.- pBI121; 4.- pBI121:*LepDHN*.

7.7. Verificación de transformación de *A. tumefaciens* mediante PCR

Se transformaron las cepas GV3101, GV2260 y EHA105 de *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones y se verificó por PCR usando los oligonucleótidos FpBI121 y RpBI121 la presencia del plásmido, obteniendo bandas de 1200 pb para las cepas con el vector pBI121 y de 1700 pb para las cepas con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN* (Figura 14).

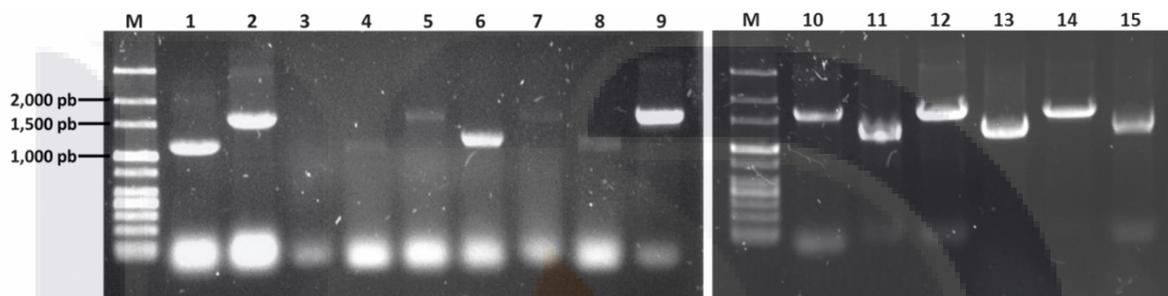


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación un fragmento a partir del vector pBI121. M- Marcador de peso molecular 100 pb; 1 y 2.- Control +; 3.- Control negativo; 4, 5, 10 y 11.- Cepa GV3101; 6, 7, 12 y 13.- Cepa GV2260; 8, 9, 14 y 15.- Cepa EHA105; 1, 4, 6, 8, 11, 13 y 15.- pBI121; 2, 5, 7 y 9.- pBI121:*LepDHN*; 10, 12 y 14.- pBI121:*OpfiDHN*.

7.8. Transformación genética de *Gloxinia* y *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens*

7.8.1. Propagación *in vitro* de plantas de *Gloxinia*

Se logró la inducción de la brotación mediante el establecimiento en medio MS adicionado con BA a una concentración de $0.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (Figura 15).

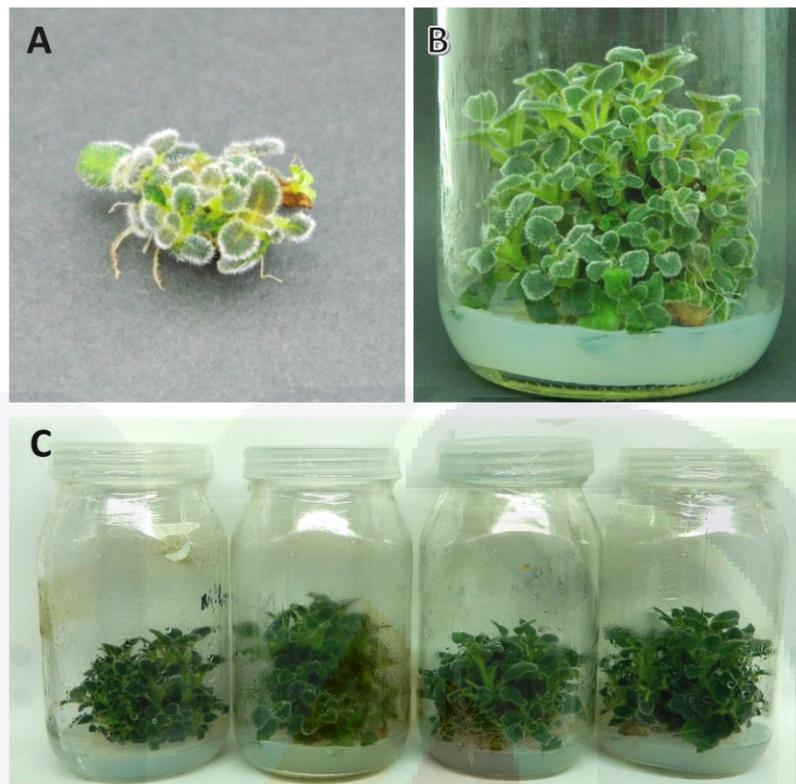


Figura 15. Plantas de Gloxinia obtenidas mediante propagación *in vitro*. A, Brotación de plantas de Gloxinia; B y C, Plantas obtenidas por micropropagación.

7.8.2. Transformación de explantes de Gloxinia

A partir de las plantas micropropagadas se obtuvieron explantes para la transformación. Los resultados obtenidos en cada una de las transformaciones se presentan en la Tabla 2. Para el primer y tercer protocolo de transformación no se logró la regeneración de planta (Figuras 16 y 19), mientras que para los explantes presuntamente transformados con el segundo protocolo (Figura 17) con la cepa GV2260 con la construcción pBI121:*LepDHN* con 20 h de cocultivo se observó generación de tejido calloso en medio MS selectivo después de 4 semanas de la transformación (Figura 18). Durante el proceso de selección, se presentó crecimiento de bacteria por lo que se realizaron lavados periódicos con medio MS a la mitad de la concentración adicionado con Cfx ($1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) para la eliminación de esta.

Tabla 2. Ensayos de transformación de Gloxinia

Protocolo de transformación	Vacío	Reguladores de crecimiento del medio de regeneración	Tiempo de cocultivo	Cepa de <i>A. tumefaciens</i>	Construcción	No. de explantes		Respuesta obtenida
						Hoja	Peciolo	
1	No	AIA (2 ng·µl ⁻¹) y BA (1 ng·µl ⁻¹)	72 h	GV3101	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	0	-
				GV3101	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	0	-
				GV3101	pBI121	10	0	-
				GV2260	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	0	-
				GV2260	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	0	-
				GV2260	pBI121	10	0	-
				EHA105	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	0	-
				EHA105	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	0	-
				EHA105	pBI121	10	0	-
2	Si	BA (2 ng·µl ⁻¹) y ANA (0.1 ng·µl ⁻¹)	0 h	GV3101	pBI121: <i>LepDHN</i>	20	20	-
				GV3101	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	45	45	-
				GV3101	pBI121	30	30	-
				GV2260	pBI121: <i>LepDHN</i>	20	20	-
				GV2260	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	45	45	-
				GV2260	pBI121	30	30	-
			20 h	EHA105	pBI121: <i>LepDHN</i>	20	20	-
				EHA105	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	45	45	-
				EHA105	pBI121	30	30	-
				GV3101	pBI121: <i>LepDHN</i>	10	10	-
				GV2260	pBI121: <i>LepDHN</i>	10	10	Callo
				EHA105	pBI121: <i>LepDHN</i>	10	10	-
3	Si	BA (1 ng·µl ⁻¹) y ANA (0.1 ng·µl ⁻¹)	48 h	GV3101	pBI121: <i>LepDHN</i>	60	45	-
				GV3101	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	60	45	-
				GV3101	pBI121	30	20	-
				GV2260	pBI121: <i>LepDHN</i>	60	45	-
				GV2260	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	60	45	-
				GV2260	pBI121	30	20	-
				EHA105	pBI121: <i>LepDHN</i>	60	45	-
				EHA105	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	60	45	-
				EHA105	pBI121	30	20	-

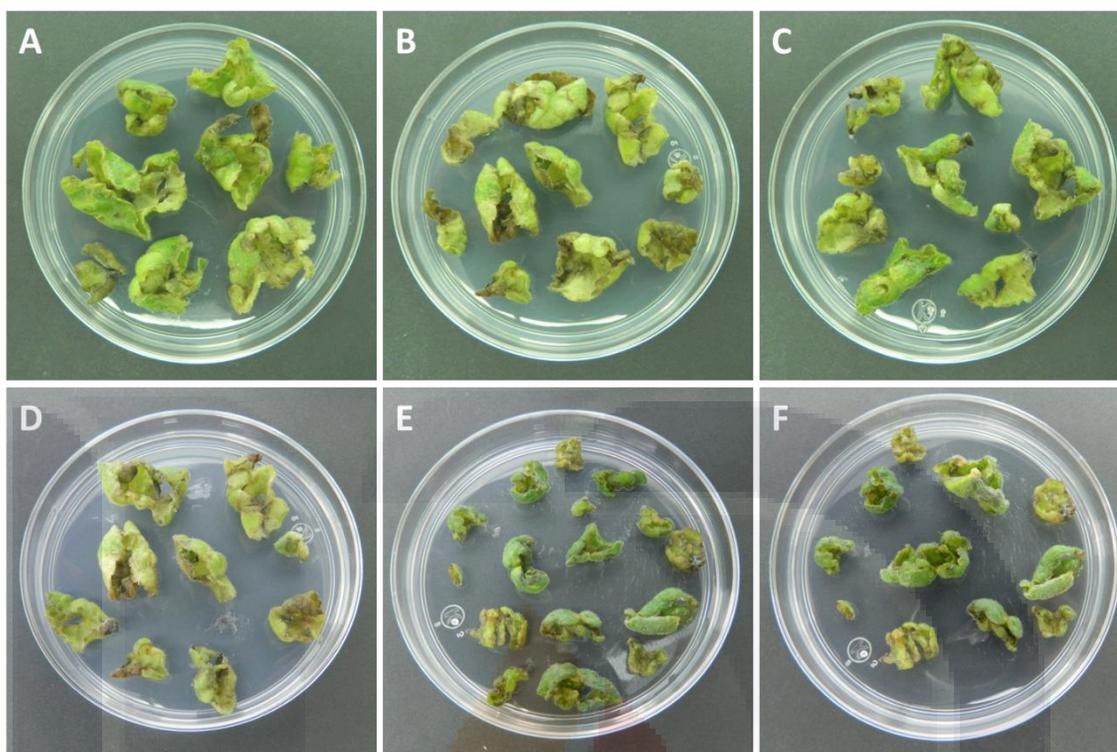


Figura 16. Explantes de hoja de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo 1 sometidos a selección. A y D, Explantes presuntamente transformados con la cepa GV3101; B y E, Explantes presuntamente transformados con la cepa GGV2260; C y F, Explantes presuntamente transformados con la cepa EHA105; A, B y C, Explantes presuntamente transformados con la construcción pBI121:*LepDHN*; D, E y F, Explantes presuntamente transformados con la construcción pBI121:*OpfiDHN*.

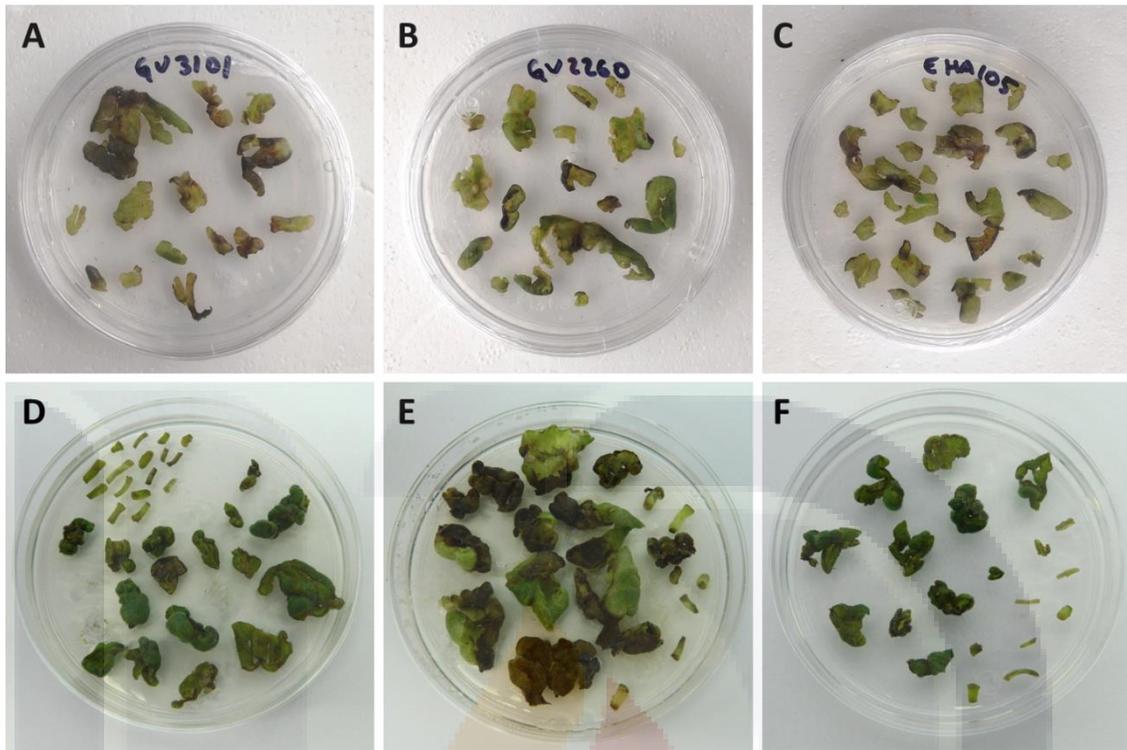


Figura 17. Explantes de hoja de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo 2 sometidos a selección. A y D, Explantes presuntamente transformados con la cepa GV3101; B y E, Explantes presuntamente transformados con la cepa GGV2260; C y F, Explantes presuntamente transformados con la cepa EHA105; A, B y C, Explantes con la construcción pBI121:*LepDHN*; D, E y F, Explantes con la construcción pBI121:*OpfiDHN*.



Figura 18. Explante de hoja de Gloxinia con callo bajo selección. Explante presuntamente transformado con el segundo protocolo de transformación con la cepa GV2260 con la construcción pBI121:*LepDHN* con 20 h de cocultivo.

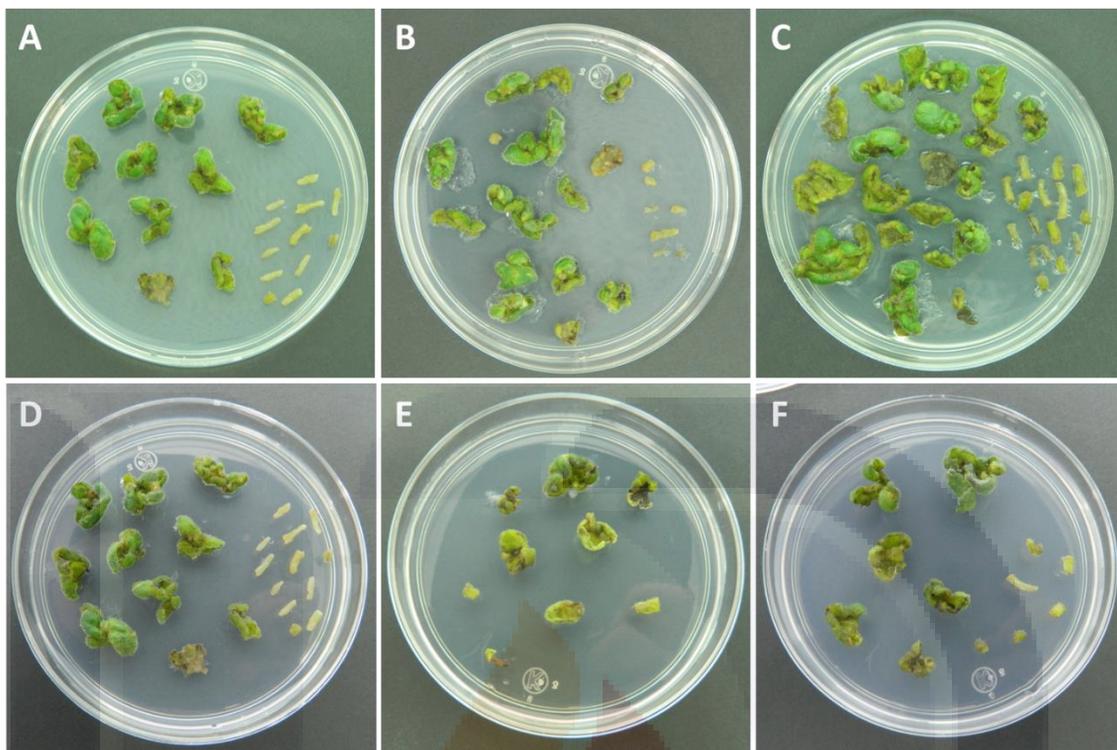


Figura 19. Explantes de hoja de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo 3 sometidos a selección. A y D, Explantes presuntamente transformados con la cepa GV3101; B y E, Explantes presuntamente transformados con la cepa GGV2260; C y F, Explantes presuntamente transformados con la cepa EHA105; A, B y C, Explantes presuntamente transformados con la construcción pBI121:*LepDHN*; D, E y F, Explantes presuntamente transformados con la construcción pBI121:*OpfiDHN*.

7.8.3. Transformación de *A. thaliana* y selección

Con las tres cepas diferentes de *A. tumefaciens* acarreando las construcciones de interés, se transformaron plantas de *A. thaliana*. En la Tabla 3 se presentan las transformaciones realizadas y los resultados obtenidos en cada una de ellas. Al someter a selección las semillas putativamente transformadas con el primer protocolo de transformación en medio MS con Kn ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), no se obtuvieron plantas resistentes a dicho antibiótico, ya que las plantas presentaron una coloración blanquecina y no se desarrollaron (Figuras 20 y 21).

Tabla 3. Ensayos de transformación de *A. thaliana*

Protocolo de transformación	Tensoactivo	Cepa de <i>A. tumefaciens</i>	Construcción	No. de plantas sometidas a transformación	Promedio de semillas obtenidas por planta	No. de plantas transformadas
1	Silwet L-77	GV3101	pBI121: <i>LepDHN</i>	60	50	0
		GV2260	pBI121: <i>LepDHN</i>	60	50	0
		EHA105	pBI121: <i>LepDHN</i>	60	50	0
2	Tween 20	GV3101	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	50	0
		GV3101	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	50	0
		GV2260	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	50	0
		GV2260	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	50	0
		EHA105	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	50	0
		EHA105	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	50	0
		Xtender	GV3101	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	50
GV3101	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	50	0		
3	Kinetic	GV2260	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	50	0
		GV2260	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	50	0
	INEX-A	EHA105	pBI121: <i>LepDHN</i>	30	50	0
		EHA105	pBI121: <i>OpfiDHN</i>	30	50	0

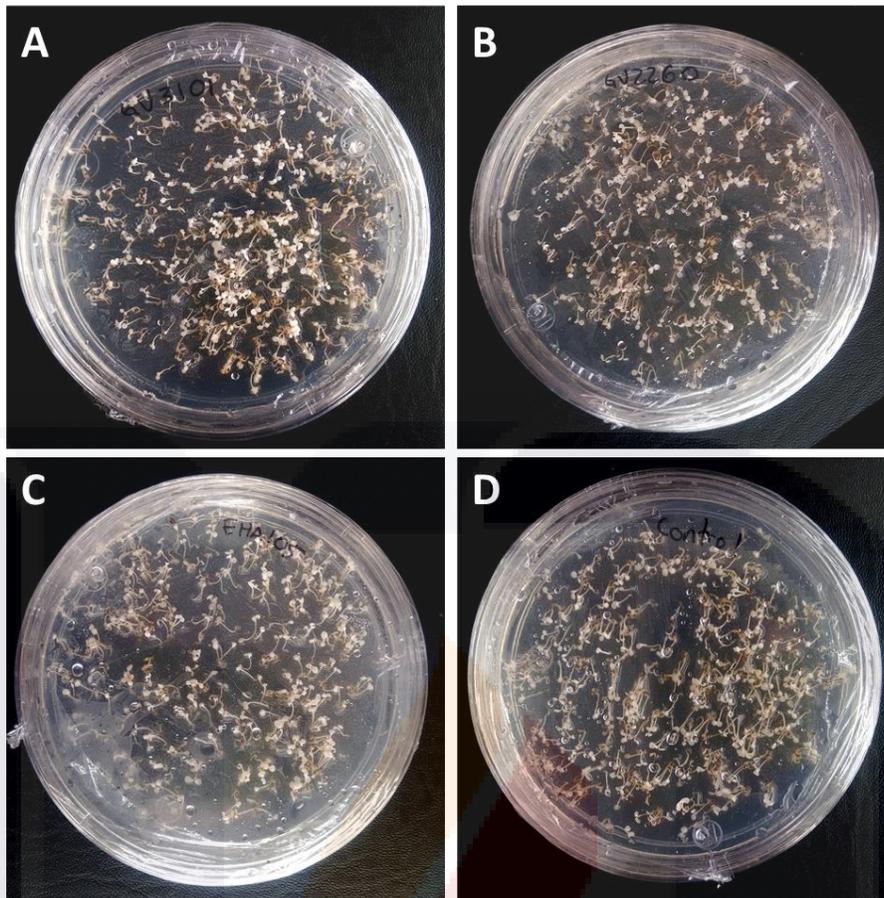


Figura 20. Selección de plantas transformadas de *A. thaliana* con Silwet L-77 en medio MS con Kn ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). A. Plantas transformadas con la Cepa GV3101; B. Plantas transformadas con la cepa GV2260; C. Plantas transformadas con la cepa EHA105. D. Control (-).

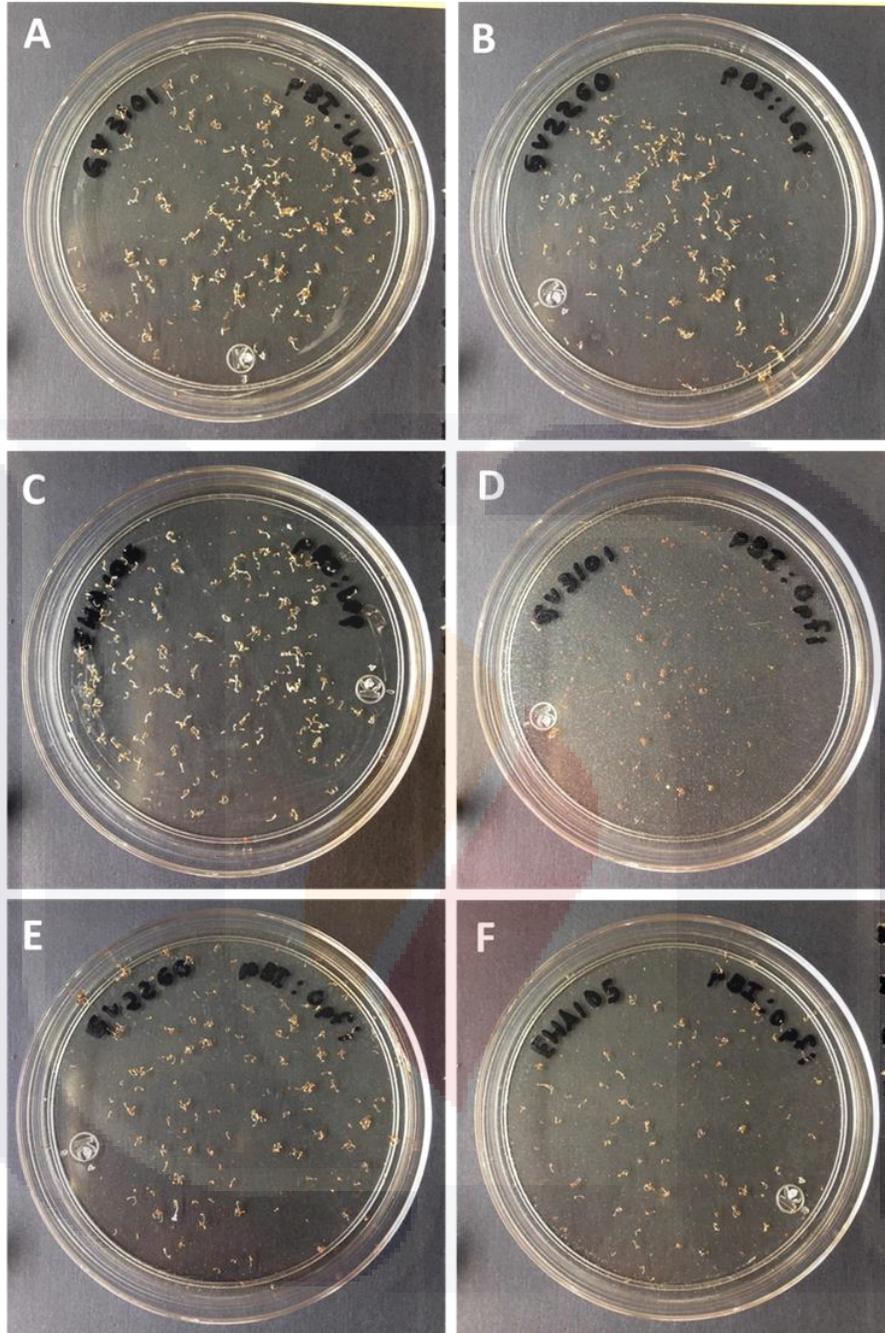


Figura 21. Selección de plantas transformadas de *A. thaliana* con Tween 20 en medio MS con Kn ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). A, B y C. Plantas transformadas con la construcción pBI121:*LepDHN*; D, E y F. Plantas transformadas con la construcción pBI121:*OpfiDHN*; A y D. Plantas transformadas con la Cepa GV3101; B y E. Plantas transformadas con la Cepa GV2260; C y F. Plantas transformadas con la Cepa EHA105.

Así mismo, en la selección con medio MS adicionado con Kn ($30 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) de las semillas obtenidas de las plantas sometidas a transformación con el segundo protocolo, tampoco se

obtuvieron plantas transformadas, ya que estas presentaron un color blanquecino y no se desarrollaron debido a que no presentaron resistencia al antibiótico (Figura 22).

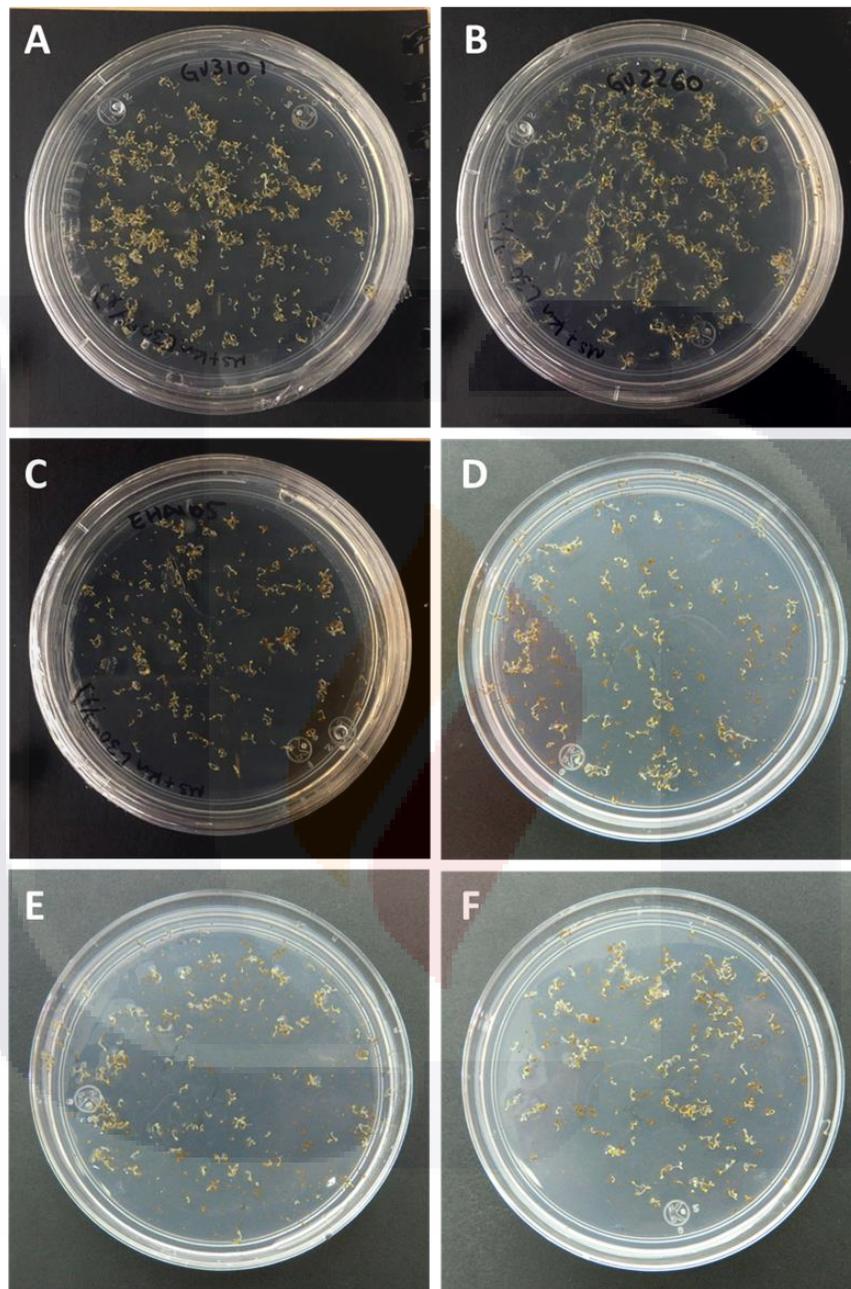


Figura 22. Selección de plantas transformadas de *A. thaliana* con coadyuvantes agrícolas en medio MS con Kn ($30 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). A, B y C. Plantas transformadas con la construcción pBI121:*LepDHN*; D, E y F. Plantas transformadas con la construcción pBI121:*OpfiDHN*; A y D. Plantas transformadas con la Cepa GV3101; B y E. Plantas transformadas con la Cepa GV2260; C y F. Plantas transformadas con la Cepa EHA105.

7.9. Análisis de la capacidad de crioprotección a condiciones de congelamiento de *LepDHN*

Debido a que no se logró el control del crecimiento bacteriano en el tejido calloso obtenido de la transformación de los explantes de Gloxinia, se sometieron a tratamiento de estrés por congelamiento para analizar la capacidad crioprotectora de la dehidrina antes de la pérdida del tejido por contaminación. Una vez descongelado se observó muerte del tejido de las hojas control (sin transformar) y del callo (Figura 23).

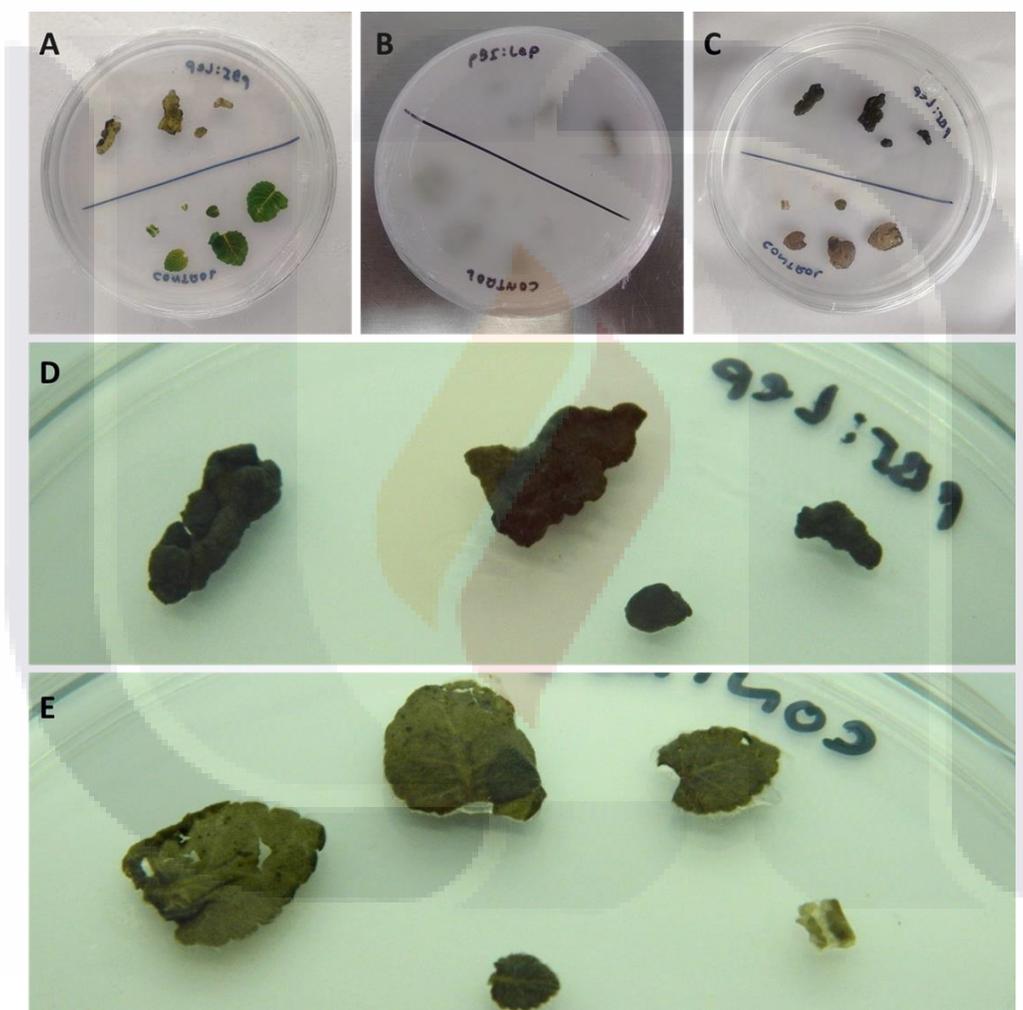


Figura 23. Explantes de hoja de Gloxinia sometidos a tratamiento por frío. A, Explantes previos al tratamiento; B, Explantes durante el tratamiento; C, Explantes después del tratamiento; D. Explantes transformados con la construcción pBI121:*LepDHN* después del tratamiento; E. Explantes control (-) después del tratamiento.

7.10. Verificación de transformación de explantes de Gloxinia

7.10.1. Verificación de transformación mediante prueba histoquímica de GUS

Mediante la prueba histoquímica de GUS se obtuvo una coloración azul en los explantes de Gloxinia presuntamente transformados con el protocolo de transformación 1 con las cepas GV3101 y GV2260 conteniendo solo el vector pBI121 sin inserto (Figura 24)

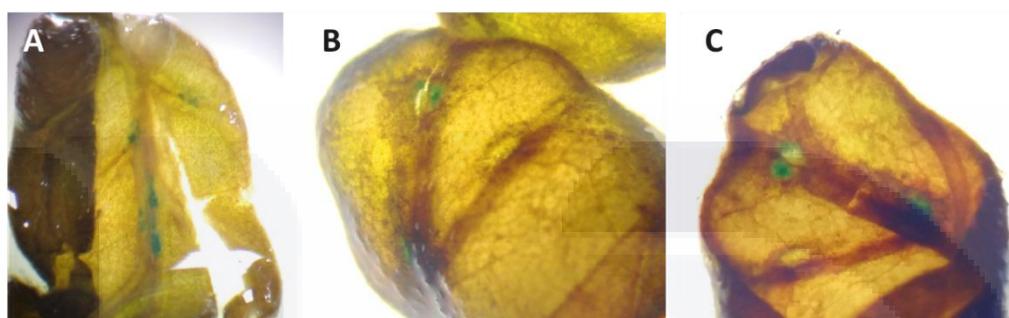


Figura 24. Explantes con actividad del gen *GUS* presuntamente transformados con el vector pBI121 mediante el protocolo 1. A, Explante presuntamente transformado con la cepa GV3101; B y C, Explante presuntamente transformado con la cepa GV2260.

Así mismo, para el protocolo de transformación 2 la prueba histoquímica de GUS resultó positiva para los explantes transformados con las 3 cepas conteniendo el vector pBI121 (Figura 25).

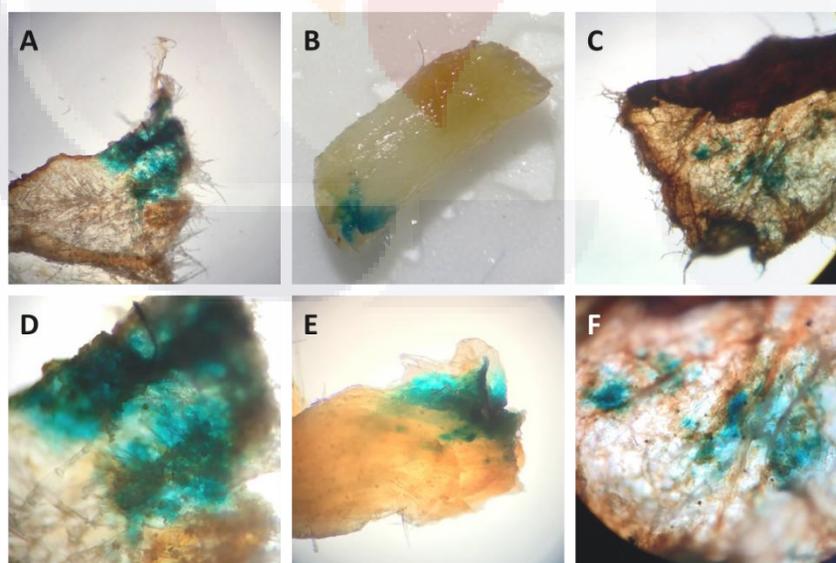


Figura 25. Explantes con actividad del gen *GUS* presuntamente transformados con el vector pBI121 mediante el protocolo 2. A y D, Explantes presuntamente transformados con la cepa GV3101; B y E, Explantes presuntamente transformados con la cepa GV2260; C y F, Explantes presuntamente transformados con la cepa EHA105.

7.10.2. Identificación del gen *VirD1* en cepas de *A. tumefaciens*

Se obtuvieron bandas de aproximadamente 450 pb con los oligonucleótidos utilizados para el gen *VirD1* en las cepas GV3101 y GV2260 para ambas construcciones y para el vector sin inserto. No se logró la amplificación de este gen para la cepa EHA105 (Figura 26).

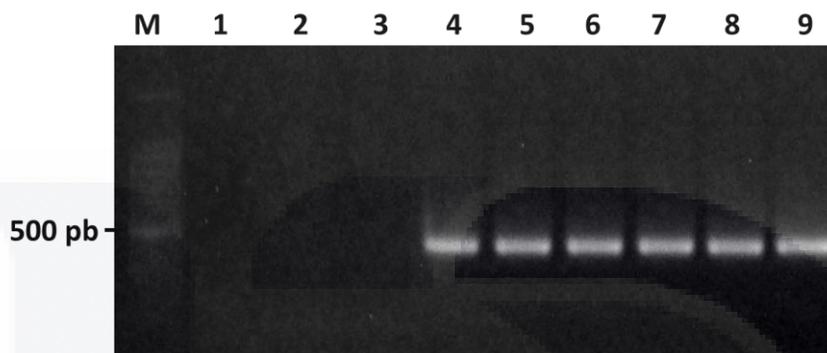


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación del gen *VirD1* en cepas de *A. tumefaciens*. M, Marcador de peso molecular 100 pb; 1, 2 y 3 Cepa EHA105; 4, 5 y 6, Cepa GV3101; 7, 8 y 9, Cepa GV2260; 1, 4 y 7, Cepa con construcción pBI121:*LepDHN*; 2, 5 y 8, Cepa con construcción pBI121:*OpfiDHN*; 3, 6 y 9. Cepa con el vector pBI121.

7.10.3. Verificación de transformación de explantes de Gloxinia mediante PCR

Para el ADN obtenido de los explantes de Gloxinia sometidos a transformación con el protocolo de transformación 2 con las cepas GV3101 y GV2260 se obtuvieron bandas de aproximadamente 600 pb para los oligonucleótidos para el gen *nptII*, 500 pb para la dehidrina, 1800 pb para Dehidrina-*GUS* y de 1700 pb para 35S-Dehidrina-*GUS* solo para la construcción pBI121:*LepDHN* con cocultivo de 20 h, mientras que para *VirD1* no se obtuvo banda correspondiente (Figura 27). Para los explantes en que el cocultivo fue de 0 h, no se amplificó ninguno de los genes. Para la cepa EHA105 tampoco se logró amplificar ninguno de estos genes.

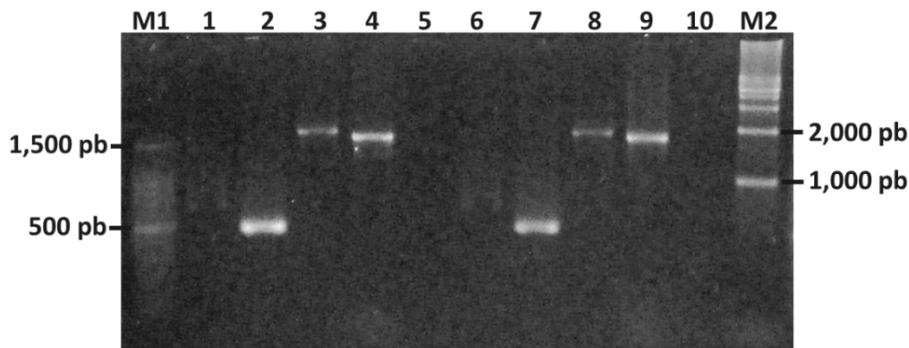


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación de genes presentes en los explantes de *Gloxinia* presuntamente transformados con el protocolo de transformación 2 con la construcción pBI121:*LepDHN* con 20 h de cocultivo. M1, Marcador de peso molecular 100 pb; M2 Marcador de peso molecular 1 kb; 1-5, GV3101; 6-10, GV2260; 1 y 6. Gen *nptII*; 2. *LepDHN*; 7. *OpfiDHN*; 3. *LepDHN-GUS*; 8. *OpfiDHN-GUS*; 4. *35S-LepDHN-GUS*; 9. *35S-OpfiDHN-GUS*; 5 y 10. Gen *VirD1*.

Para el protocolo de transformación 3 se obtuvieron bandas correspondientes a *nptII*, dehidrina, Dehidrina-*GUS* y *35S*-Dehidrina-*GUS* para los explantes transformados con las cepas GV3101 y GV2260 con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*, mientras que para *VirD1* no se obtuvo banda correspondiente (Figuras 28 y 29). Al igual que en el protocolo anterior, no se logró la amplificación a partir de los explantes sometidos a transformación con la cepa EHA105.

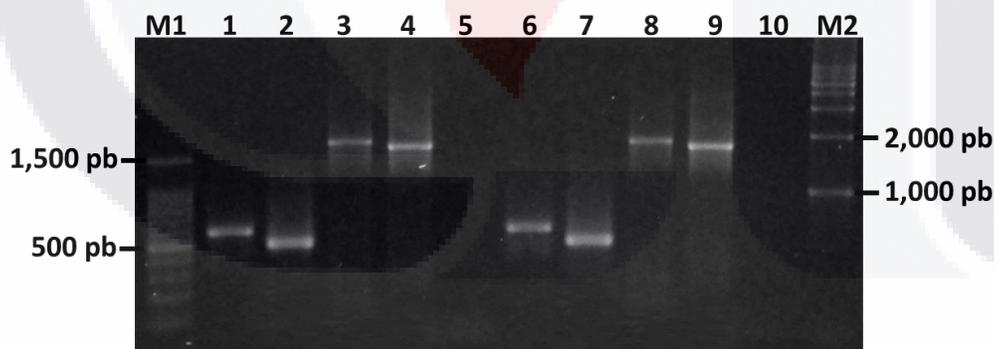


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación de genes presentes en los explantes de *Gloxinia* presuntamente transformados con el protocolo de transformación 3 con la cepa GV3101 con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*. M1, Marcador de peso molecular 100 pb; M2 Marcador de peso molecular 1 kb; 1 y 6. Gen *nptII*; 2. *LepDHN*; 7. *OpfiDHN*; 3. *LepDHN-GUS*; 8. *OpfiDHN-GUS*; 4. *35S-LepDHN-GUS*; 9. *35S-OpfiDHN-GUS*; 5 y 10. Gen *VirD1*.

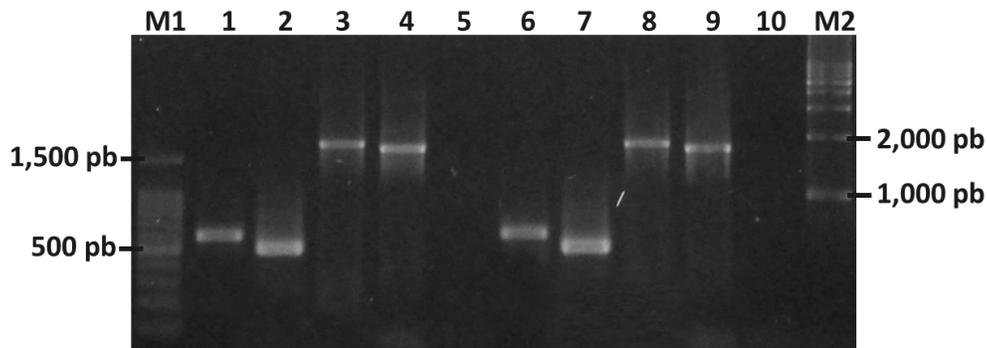
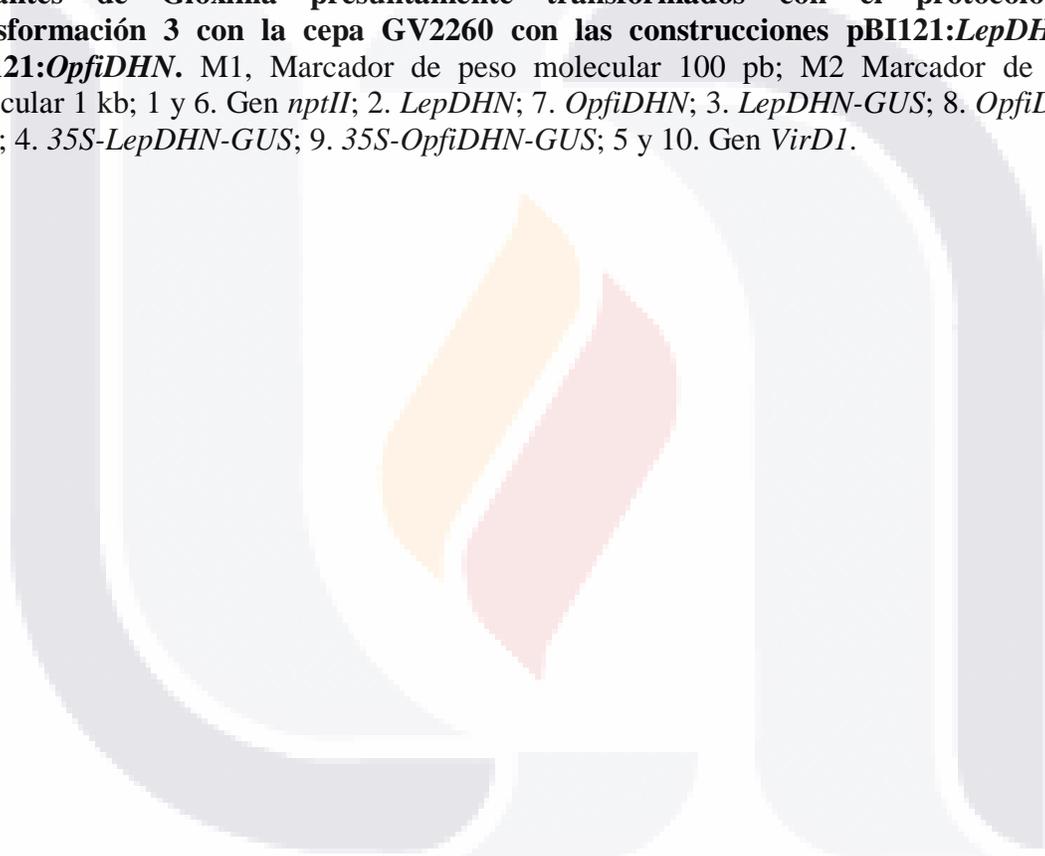


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa de la identificación de genes presentes en los explantes de *Gloxinia* presuntamente transformados con el protocolo de transformación 3 con la cepa GV2260 con las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*. M1, Marcador de peso molecular 100 pb; M2 Marcador de peso molecular 1 kb; 1 y 6. Gen *nptII*; 2. *LepDHN*; 7. *OpfiDHN*; 3. *LepDHN-GUS*; 8. *OpfiDHN-GUS*; 4. *35S-LepDHN-GUS*; 9. *35S-OpfiDHN-GUS*; 5 y 10. Gen *VirD1*.



8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las dehidrinas son proteínas que se expresan constitutivamente a niveles bajos, sin embargo, su expresión puede elevarse ante condiciones de estrés por sequía, frío y salinidad. Estas proteínas se han clasificado de acuerdo con la presencia y disposición de los segmentos K, Y, S y F (Close, 1996; Strimbeck, 2017). En cactáceas, Ochoa *et al.*, (2012) identificaron la dehidrina *OpsDHN* proveniente de *O. streptacantha*. Este gen es del tipo FSK₃ y presenta una secuencia completa de 1,139 pb con un intrón de 234 pb dentro del segmento S. Posteriormente, se identificaron genes parciales de dehidrinas de 3 especies de cactáceas más, *L. principis*, *O. ficus-indica* y *Mammillaria bombycina* (Hernández *et al.*, 2017).

En este trabajo se obtuvieron los genes parciales *LepDHN* y *OpfiDHN* por medio de PCR provenientes de dos de estas cactáceas. Se cree que estos genes parciales pertenecen al grupo FSK₃, debido a la alta identidad que comparten con el gen *OpsDHN*, por lo que se espera que el fragmento faltante contenga un segmento F y un segmento S. El gen parcial *LepDHN* tiene un marco de lectura abierto de 501 pb que codifica a una proteína de 166 residuos de aminoácidos. El gen parcial *OpfiDHN* cuenta con un marco de lectura abierto de 504 pb que codifica para una proteína de 167 residuos de aminoácidos (Figura 9)

En las secuencias obtenidas de los genes de ambas cactáceas, se observó la presencia de tres segmentos K, tal como Hernández *et al.*, (2017) lo reportaron. Estos segmentos son de gran importancia en la capacidad protectora de la proteína ya que en condiciones de estrés hídrico pueden formar α -hélices anfipáticas que permite la unión con membranas y proteínas (Reyes *et al.*, 2008; Driria *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Así mismo, se encontró una región de 6 His para *O. ficus-indica* y para *L. principis* se encontraron 5 His a pesar de que anteriormente se habían reportado solo 3 His (Hernández *et al.*, 2017). Esta región podría jugar un papel importante, pues se ha visto que participa en la unión a iones metálicos reduciendo la toxicidad de los metales en las células vegetales ante condiciones de estrés hídrico (Hara *et al.*, 2005). Aunado a esto, Hernández *et al.*, (2015) sugiere que los motivos ricos en His juegan un rol en la localización nuclear.

En la Figura 10 se muestra que las regiones de aminoácidos compartidas entre *LepDHN* y *OpfiDHN* y las dehidrinas ERD10, ERD14 y COR47 de *A. thaliana* y *bdn1* de la familia

Gesneriaceae son los segmentos K, por lo que la identidad presentada solo se debe a estas regiones.

La predicción del grado de desorden de IUPred2 genera un valor entre 0 y 1 para cada residuo basado en la estimación de energía, lo que corresponde a la probabilidad de que el residuo sea parte de una región desordenada. Regiones con residuos de aminoácidos con valores superiores a 0.5 son considerados desordenados (Mészáros *et al.*, 2018). En las secuencias de aminoácidos analizadas se obtuvieron valores superiores a 0.5 para ambos genes parciales, por lo que son considerados proteínas desordenadas (Figura 11). Esta característica es de gran importancia ya que se cree que de esto depende su capacidad de protección (Hughes *et al.*, 2013). Esta condición evita que se desnaturalice ante condiciones de desecación o a temperaturas de congelamiento, ya que no tienen una estructura que perder (Graether y Boddington, 2014).

Una vez comprobado esto, se ligaron al vector de expresión en plantas pBII21 y se transformaron las cepas GV3101, GV2260 y EHA105 de *A. tumefaciens*. De acuerdo con Kuo *et al.*, (2018) EHA105 es la cepa más adecuada para la transformación de Gloxinia. Con estas cepas se realizaron ensayos de transformación de plantas de gloxinia y *A. thaliana*.

Gloxinia es una especie de gran valor ornamental, sin embargo, existen pocos estudios sobre transformación genética. Entre estos estudios se encuentra el realizado por Kuo *et al.*, (2018), quien transformó plantas de Gloxinia mediante las cepas GV3101 y EHA105 con el vector pCAMBIA2301, para la estandarización de un protocolo de transformación y regeneración; así mismo, Zhang *et al.*, (2008) y Li *et al.*, (2013) transformaron gloxinia con la cepa EHA105 con el vector pCAMBIA13011. Una vez transformados los explantes, comúnmente se regenera el tejido mediante el uso de reguladores de crecimiento. La aplicación exógena de auxinas y citoquininas en cantidades iguales inducen la generación de callo, mientras que la aplicación en una mayor proporción de auxina que de citoquinina induce la generación de raíces y una mayor proporción de citoquinina que de auxina induce la generación de brotes (Ikeuchi *et al.*, 2013). Particularmente en Gloxinia, Ioja y Ciulca (2013) reportan la generación de brotes a partir de explantes de hojas cultivadas en medio MS adicionado con BA ($2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y ANA ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). En esta investigación, solo se obtuvo la generación de callo a partir de los explantes presuntamente transformados. Xu *et al.*, (2009)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

obtuvieron resultados similares, quienes a una concentración de $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de BA y $0.2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ de ANA reportaron la aparición de tejido calloso. Esto podría ser explicado por Ikeuchi *et al.*, (2013), quienes indican que en la naturaleza las heridas o infecciones por patógenos pueden generar este tipo de respuesta. Kuo *et al.*, (2018) informan que la regeneración de explantes transformados de Gloxinia puede ser inducida a partir de hojas y peciolo en presencia de BA ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) y ANA ($0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). A diferencia de esto, en los explantes aquí transformados y cultivados bajo la misma concentración de reguladores de crecimiento, no se logró la regeneración, lo cual, pudo ser consecuencia del daño ocasionado por los lavados con antibiótico realizados para la eliminación de la bacteria. Se ha reportado el efecto negativo del uso de antibióticos sobre la regeneración, tal es el caso de los β -lactámicos como Cefotaxima y Ceftriaxona que pueden tener una actividad biológica importante sobre las plantas causando una pérdida en el balance hormonal inhibiendo la generación de brotes (Nauerby *et al.*, 1997; Tran y Sanan, 2015).

En cuanto a la transformación de *A. thaliana*, esta se llevó a cabo por inmersión floral o “floral dip”. Este sistema de transformación fue desarrollado por Clough y Bent (1998) como una alternativa a la transformación mediante vacío. Este protocolo presenta ventajas, sin embargo, la eficiencia de transformación se ve reducida. Años más tarde, se propusieron modificaciones para aumentar su eficiencia. La transformación realizada se llevó a cabo tomando en cuenta algunas de estas modificaciones; la primera de ellas fue el tiempo en que se sumergió la planta en el cultivo bacteriano para su transformación, ya que se mantuvieron sumergidas por 10, 30 y 120 s. De acuerdo con Clough y Bent (1998) basta de 3 a 5 s, mientras que otros autores mencionan desde 10 s (Zhang *et al.*, 2006) hasta 5 min (Mara *et al.*, 2010). La segunda de las variantes fue la sustitución de Silwet L-77 por Tween 20, ya que se ha reportado que es posible la transformación con este reactivo (Das y Joshi, 2011). Así también, se sustituyó Silwet L-77 por coadyuvantes de uso agrícola tomando como base lo reportado por Mireautl *et al.*, (2014) quienes de esta forma lograron aumentar la eficiencia de transformación. Otra variante realizada fue la propuesta por Martínez *et al.*, (2004), quienes propusieron inyectar directamente el cultivo bacteriano por medio de una micropipeta en el botón floral en lugar de que este sea sumergido. A pesar de estas condiciones de transformación, no se logró la obtención de plantas de *A. thaliana* transformadas, por lo cual, los posteriores análisis se llevaron a cabo solo en gloxinia.

La transformación de los explantes de gloxinia se comprobó por medio de prueba histoquímica de GUS. En otros estudios, se ha reportado el uso del vector pBI121 eliminando el gen GUS para insertar el gen de interés (Molina *et al.*, 2009; Kumari *et al.*, 2013). En este caso, el gen GUS no fue eliminado, sin embargo, éste no fue funcional en las construcciones con dehidrininas. Esto podría deberse a que ambos genes se encuentran bajo el control del mismo promotor y terminador. Para solucionar este problema se han desarrollado estrategias que permiten expresar dos o más proteínas dentro del mismo ARNm como la inserción de sitios IRES (Internal Ribosome Entry Site por sus siglas en inglés) entre dos genes permitiendo la traducción del segundo gen independiente de la estructura cap (Xu *et al.*, 2014); o péptidos 2A (Szymczak *et al.*, 2012), intermedios entre dos genes bajo un mismo marco de lectura abierto, que se autoescinde para dar lugar a dos proteínas. A diferencia de esto, en la prueba de GUS realizada con el vector pBI121 sin inserto, si se presentó una coloración azul, que en caso de que este pertenezca al tejido, podría indicar la transformación estable de los explantes.

Los genes *Vir* situados dentro del plásmido Ti son importantes para la transferencia del T-DNA a las células vegetales. Particularmente, el gen *VirD1* es necesario para la incisión de los bordes izquierdo y derecho del T-DNA (Gelvin, 2003). Este gen se identificó por medio de PCR en las cepas GV3101 y GV2260, pero no en la cepa EHA105 (Figura 25), por lo que no es apta para ser utilizada para la transformación. Esto podría responder la cuestión del porque no se logró la transformación de plantas de *A. thaliana*, al menos, en aquellas plantas que fueron transformadas con esta cepa.

Un reto importante en la transformación por *A. tumefaciens*, es la eliminación de la bacteria. Para esto, se ha sugerido la disminución de la densidad bacteriana en el medio de inoculación. De esta forma, al reducir la cantidad de bacteria, es posible evitar el sobrecrecimiento, además de que la respuesta de defensa de la planta es menor, permitiendo una mayor eficiencia de transformación (Zhang y Finer, 2016). En este trabajo, a pesar de la reducción de la densidad bacteriana en el protocolo de transformación 3 de gloxinia, no se logró la eliminación total de la bacteria.

Por tal motivo, se genera la interrogante de si la coloración azul obtenida en la prueba histoquímica de GUS pertenece al tejido vegetal o realmente fue generada por contaminación

de *A. tumefaciens*. Para responder a esta cuestión, se realizó la amplificación de diversos genes presentes en el T-DNA y del gen *VirD1* a partir de ADN genómico obtenido de los explantes. Los resultados obtenidos en las Figuras 26, 27, 28 y 29 indican que, si se logró la transformación de los explantes, a excepción de aquellos que no se mantuvieron bajo cocultivo. De acuerdo con Zhang y Finer (2016) este factor es uno de los factores importantes durante la transformación, pues ya que reportan que para la transformación de girasol es necesario un tiempo de cocultivo de hasta 15 días. Específicamente en Gloxinia, se ha reportado que basta con 5 días (Kuo *et al.*, 2018), sin embargo, en este trabajo, se logró la transformación con solo 20 h de cocultivo.

En el tejido calloso generado a partir de los explantes de Gloxinia se detectó la presencia de bacteria. Aún después de realizados los lavados, no se logró eliminar la bacteria, por lo que se optó por someter a tratamiento los explantes para analizar la capacidad de crioprotección del gen parcial *LepDHN* antes de la pérdida del tejido por la contaminación presentada. A causa del poco callo generado, solo se realizó un tratamiento mediante temperaturas de congelamiento. Después de realizar el tratamiento y una vez descongelado se observó la muerte del tejido. Esto podría indicar que el gen parcial *LepDHN* no es funcional bajo las condiciones aplicadas, sin embargo, existen diversos factores que pudieron generar esta respuesta. En cuanto a factores externos al tratamiento que pudieron influir se encuentra el daño generado por la contaminación y el daño y estrés provocado por los lavados realizados. Con relación al tratamiento, el tiempo en que se mantuvieron los explantes a temperatura de congelamiento pudo haber sido mayor a la capacidad de protección de la proteína. Anteriormente Hernández (2016) identificó la sobreexpresión del gen *MabDHN* bajo una temperatura de -20°C , así mismo, Ochoa *et al.*, (2012) reportaron la funcionalidad del gen completo *OpsDHN* al someter plantas de *A. thaliana* transformadas a temperaturas de -15°C durante 2 h.

Existen estudios donde se ha visto que el fragmento K es quien brinda la protección de la proteína, tal como el realizado por Yang *et al.*, (2015), quienes analizaron formas truncadas de la dehidrina WZY2 del tipo YSK₂ proveniente de trigo. Al eliminar los segmentos Y y S pero manteniendo los segmentos K, obtuvieron resultados similares en la capacidad de protección ante frío y sequía comparado con la forma completa de la proteína. Entre otros

estudios que corroboran esto se encuentra el realizado por Drira *et al.*, (2016), que al analizar la sobreexpresión de diversas formas truncadas de la dehidrina DHN-5 de trigo encontró que los segmentos K aún en ausencia de otros segmentos brindan la protección. Debido a esto, no se descarta la posibilidad de que los genes aquí utilizados puedan llegar a ser funcionales.



9. CONCLUSIONES

Se amplificaron genes parciales de dehidrasas de las especies *Leuchtenbergia principis* y *Opuntia ficus-indica*.

La traducción virtual de los fragmentos amplificados de *LepDHN* y *OpfiDHN* mostró la presencia de 3 segmentos K, y una región de 5 y 6 His, respectivamente

Se realizaron las construcciones pBI121:*LepDHN* y pBI121:*OpfiDHN*, con las cuales se transformaron las cepas GV3101, GV2260 y EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Por medio de PCR con oligonucleótidos específicos para *nptII*, dehidrasas y T-DNA se comprobó la transformación de explantes de hoja de gloxinia a partir de 20 h de cocultivo con las cepas GV3101 y GV2260.

Por medio de inmersión floral no se lograron obtener plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana*.

10. LITERATURA CITADA

Allagulova, C. R., Gimalov, F. R., Shakirova, F. M., Vakhitov, V. A. (2003). The plant dehydrins: Structure and putative functions. *Biochemistry*. 68(9): 945-951.

Alsheikh, M. K., Heyen, B. J., Randall, S. K. (2003). Ion binding properties of the Dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 278(42): 40882-40889.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-410.

Battaglia, M., Olvera C., Y., Garcarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*. 148(1): 6-24.

Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Ser III. Sciences de la Vie*. 316: 1194-1199.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7(6): 1513-1523.

Blanco, M., Valverde, R., Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*. 27(1): 19-28.

Campbell, S. A., Close, T. J. (1997). Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *The New Phytologist*. 137: 61-74.

Campos A., F., Cruz G., F., Torres E., A., Sánchez J., M., Colmenero F., J. M., Smith E., C., Covarrubias R., A. A., Vázquez R., J. M. (2002). Expresión de genes codificantes para proteína, Abundantes en Embriogénesis Tardía (LEA), durante el osmoacondicionamiento de semillas de maíz y frijol. *Agrociencia*. 36: 461-470.

Close, T. J. (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*. 97: 795-803.

Clough, S. J., Bent, A. f. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16(6): 735-743.

Cuevas V., C. L., Covarrubias R., A. A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 14(2): 97-105.

Das, P., Joshi, N. C. (2011). Minor modifications in obtainable *Arabidopsis* floral dip method enhances transformation efficiency and production of homozygous transgenic lines harboring a single copy transgene. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2: 59-67.

Díaz G., C., Chaparro G., A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Actualidad y Divulgación Científica*. 15(1): 49-61.

Drira, M., Hanin, M., Masmoudi, K., Brini, F. (2016). Comparison of full-length and conserved segments of wheat dehydrin DHN-5 overexpressed in *Arabidopsis thaliana* showed different responses to abiotic and biotic stress. *Functional Plant Biology*. 43: 1048-1060.

Drira, M., Saibi, W., Brini, F., Gargouri, A., Masmoundi, K., Hanin, M. (2013). The K-segments of the wheat dehydrin DHN-5 are essential for the protection of Lactate Dehydrogenase and β -Glucosidase activities *in vitro*. *Molecular Biotechnology*. 54: 643-650.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792-1797.

Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51(1): 223-256.

Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated plant transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(1): 16-37.

Gelvin, S. B. (2006). *Agrobacterium* virulence gene induction. En Wang, K. (Ed.), *Agrobacterium* protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2da Edición. Nueva Jersey. pp. 77-84.

Goday, A., Jensen, A. B., Culiáñez M., F. A., Albà, M. M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., Pagès, M. (1994). The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *The Plant Cell*. 6(3): 351-360.

Graether, S. P., Boddington, K. F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science*. 5(576): 1-12.

Hanin, M., Brini, F., Chantal, E., Toda, Y., Takeda, S., Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance. Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*. 6(10): 1503-1509.

Hara, M., Endo, T., Kamiya, K., Kameyama, A. (2017). The role of hydrophobic amino acids of K-segments in the cryoprotection of lactate dehydrogenase by dehydrins. *Journal of Plant Physiology*. 210: 18-23.

Hara, M., Fujinaga, M., Kuboi, T. (2005). Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *Journal Experimental Botany*. 56(420): 2695-2703.

Hernández C., S. (2016). Aislamiento y caracterización de un gen tipo dehidrina en cactáceas y estudio de su expresión en *Mamillaria bombycina* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes. México. 169 p.

Hernández C., S., Pérez Molphe B., E., Alpuche S., A. G., Morales D., J. F. (2017). Identification and evolutionary relationships of a partial gene sequences from dehydrin group in three species of cacti. *Phyton*. 86: 151-162.

Hernández S., I. E., Maruri L., I., Ferrando, A., Carbonell, J., Graether, S. P., Jiménez B., J. F. (2015). Nuclear localization of the dehydrin *OpsDHNI* is determined by histidine-rich motif. *Frontiers in Plant Science*. 6(702): 1-8.

Hughes, S. L., Schart, V., Malcolmson, J., Hogarth, K. A., Martynowicz, D. M., Tralman B., E., Patel, S. N., Graether, S. P. (2013). The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of Dehydrins. *Plant Physiology*. 163: 1376-1386.

Hughes, S., Graether, S. P. (2011). Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. *Protein Science*. 20(1): 42-50.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*. 25: 3159-3173.

Ioja-Boldura, F., Ciulca, S. (2013). Assessment of “in vitro” propagation potential for some gloxinia (*Sinningia speciosa*) genotypes. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 17(3): 7-11.

Jiménez B, J. F., Maruri L., I., Ochoa A., A. E., Delgado S., P., Bravo, J., Rodríguez K., M. (2013). LEA gene introns: is the intrón of dehydrin genes a characteristic of the serine-segment? *Plant Molecular Biology Reporter*. 31(1): 128-140.

Job, D. (2002). Plant biotechnology in agriculture. *Biochimie*. 84: 1105-1110.

Koag, M. C., Wilkens, S., Fenton, R. D., Resnik, J., Vo, E., Close, T. J. (2009). The K-Segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiology*. 150(3): 1503-1514.

Koornneef, M., Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*. 61: 909-921.

Kumari, P., Kant, S., Zaman, S., Mahapatro, G. K., Banerjee, N., Sarin, N. B, (2013). A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. *Transgenic Research*. 23: 99-107.

Kuo, W. H., Hung, Y. L., Wu, H. W., Pan, Z. J., Hong, C. Y., Wang, C. N. (2018). Shoot regeneration process and optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Sinningia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 134 (2): 301-316.

Li, X., Bian, H., Song, D., Ma, S., Han, N., Wang, J., Zhu, M. (2013). Flowering time control in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*) by manipulation of miR159 expression. *Annals of Botany*. 111: 791-799.

Liu, Y., Wang, L., Zhang, T., Yang, X., Li, D. (2017). Functional characterization of KS-type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress. *Scientific Reports*. 7(7361): 1-10.

Mara, C., Grigorova, B., Liu, Z. (2010). Floral-dip transformation of *Arabidopsis thaliana* to examine *pTSSO2:: β -glucuronidase* reporter gene expression. *Journal of Visualized Experiments*. 40: 1-3.

Marsch M., N., Folter, S. (2010). *Arabidopsis thaliana*: Un “pequeño” gran genoma. *Genómicas Hoy*. 7: 5-8.

Martínez T., M., Limones B., V., Cabrera P., J. L., Herrera E., L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22: 63-70.

Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*. 282(5389): 662.

Mészáros, B., Erdos, G., Dosztányi, Z. (2018). IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research*. 46(W1): W329-W337.

Mireault, C., Paris, L. E., Germain, H. (2014). Enhancement of the *Arabidopsis* floral dip method with XIAMETER OFX-0309 as alternative to Silwet L-77 surfactat. *NRC Research Press*. 92: 523-525.

Molina, I., Weber, K., Dos Santos, D. Y., Ohlrogge, J. (2009). Transformation of a Dwarf *Arabidopsis* mutant illustrates gibberellin hormone physiology and the function of a Green Revolution gene. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 37(3): 170-177.

Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 8(19): 4321-4325.

Nauerby, B., Billing, K., Wyndaele, R. (1997). Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*. 123(1-2): 169-177.

Nester, E. W. (2015). *Agrobacterium*: nature’s genetic engineer. *Frontiers in Plant Science*. 5(730): 1-16.

Ochoa A., A. E., Rodríguez K., M., Pérez M., M. B., Delgado S., P., Cuevas V., C. L., Gómez A., G., Jiménez B., J. F. (2012). Functional characterization of an acidic SK₃ dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta*. 235: 565-578.

Pereira C., M., Quiriban, A. (2014). Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. SEMIÁRIDA Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam. 24(1): 55-67.

Puhakainen, T., Hess, M. W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P., Palva, T. (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. Plant Molecular Biology. 54: 743-753.

Reyes, J. L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D. T., Covarrubias, A. A. (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. Plant, Cell & Environment. 31(12): 1781-1790.

Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D., Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. Particulate Science and Technology. 5(1): 27-37.

Seleme, F., Gonzalez V., C., Di Barbo, G., Pernasetti, S., Batallán, S. (2006). Agalla de la corona en plantas de olivo (*Olea europea* L.) causada por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Thownsend) Conn. en la Provincia de la Rioja. Revista del CIZAS. 7(1-2): 55-63.

Sharma, K. K., Sharma, H. C., Seetharama, N., Ortiz, R. (2002). Development and deployment of transgenic plants: Biosafety considerations. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant. 38: 106-115.

Shih, M. D., Hoekstra, F. A., Hsing C., Y. I. (2008). Late Embryogenesis Abundant Proteins. Advances in Botanical Research. 48: 211-255.

Strimbeck, G. R. (2017). Hiding in plain sight: the F segment and other conserved features of seed plant SK_n dehydrins. Planta. 245(5): 1061-1066.

Szymczak W., A. L., Vignali, K. M., Vignali, D. A. (2012). Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. Cold Spring Harbor Protocols.

The UniProt Consortium. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic Acids Research. 45(D1): D158-D169.

Tran, T. N., Sanan M., N. (2015). Effect of antibiotics on callus regeneration during transformation of IR 64 rice. Biotechnology Reports. 7: 143-149.

Tzfira, T., Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*. 1(4): 201-212.

Valderrama F., A. M., Arango I., R., Afanador K., L. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 58(1): 2569-2585.

Vasil, I. K. (2008). A short history of plant biotechnology. *Phytochemistry Reviews*. 7: 387-394.

Velunthambi, K., Gupta, A. K., Sharma, A. (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science*. 84(3): 368-380.

Xu, L., Wang, G., Wang, W., Lv, X., Li, Q., Yan, A. (2014). Development of a prokaryotic-like polycistronic expression system based on a virus-originated internal ribosome entry site (IRES) in industrial eukaryotic microorganisms. *Royal Society of Chemistry*. 93: 51615-51618.

Xu, Q., Hu, Z., Li, C., Wang, X., Wang, C. (2009). Tissue culture of *Sinningia speciosa* and analysis of the *in vitro*-generated *tricussate whorled phyllotaxis (twp)* variant. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 45: 583-590.

Yang, E., Zhang, L., Lv, Hui., Li, H., Zhang, Y., Yang, X., Yu, J. (2015). The K-segments of wheat dehydrin WZY2 are essential for its protective functions under temperature stress. *Frontiers in Plant Science*. 6(406): 1-9.

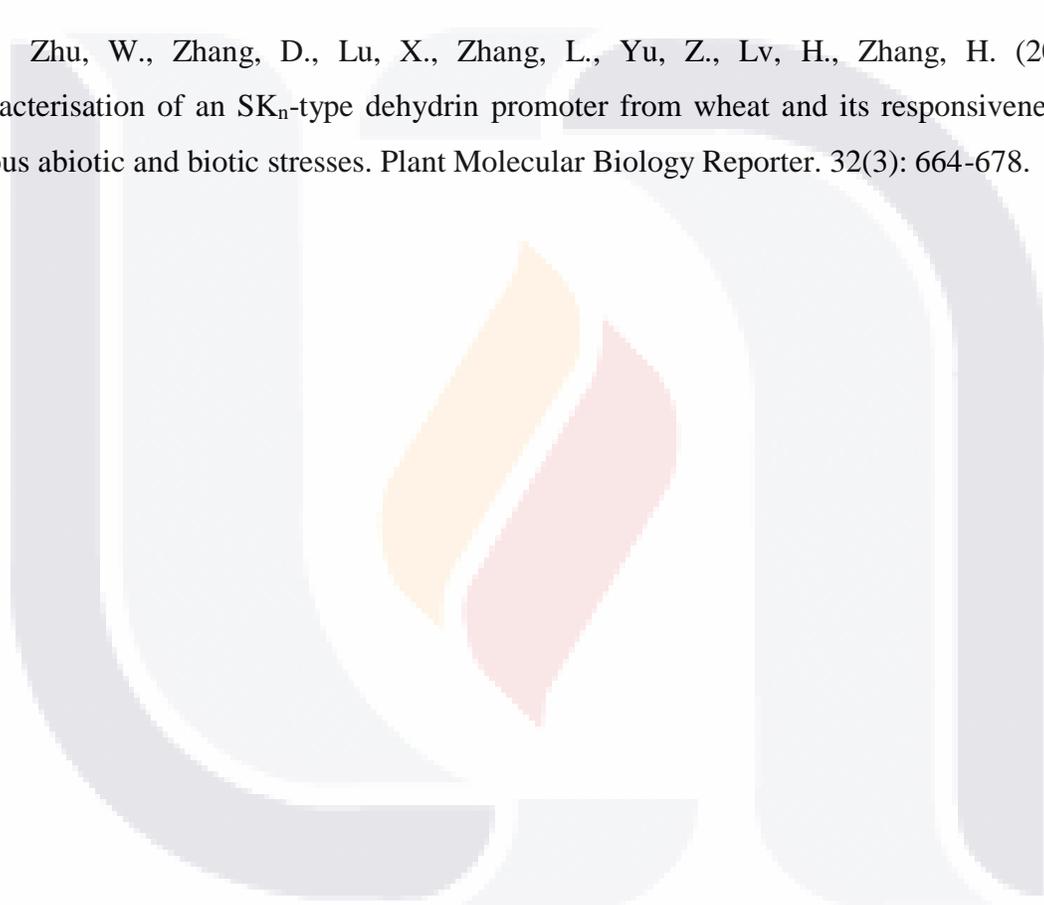
Zaitlin, D. (2012). Intraspecific diversity in *Sinningia speciosa* (Gesneriaceae: Sinningieae), and possible origins of the cultivated florist's gloxinia. *AoB Plants*. 2012: pls039.

Zhang, M. Z., Ye, D., Wang, L. L., Pang, J. L., Zhang, Y. H., Zheng, K., Bian, H. W., Han, N., Pan, J. W., Wang, J. H., Zhu, M. Y. (2008). Overexpression of the cucumber *LEAFY* homolog *CFL* and hormone treatments alter flower development in gloxinia (*Sinningia speciosa*). *Plant Molecular Biology*. 67: 419-427.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., Chua, N. H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*. 1(2): 1-6.

Zhang, Z., Finer, J. J. (2016). Low *Agrobacterium tumefaciens* inoculum levels and a long co-culture period lead to reduced plant defense responses and increase transgenic shoot production of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*. 52: 354-366.

Zhu, W., Zhang, D., Lu, X., Zhang, L., Yu, Z., Lv, H., Zhang, H. (2014). Characterisation of an SK_n-type dehydrin promoter from wheat and its responsiveness to various abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*. 32(3): 664-678.



11. ANEXOS

A. Buffer de lisis para extracción de ADN de cactáceas.

CTAB al 0.3%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris HCl pH8 0.1 M, β -mercaptoetanol al 2.4%.

B. Protocolo de purificación con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Se agrega 10 μ l por cada 10 mg de Membrane Binding Solution a los productos de PCR. Se transfiere a la columna, se incuba por 1 min y se centrifuga a 16,000 g por 1 min. Se agregan 700 μ l de Membrane Wash Solution, se centrifuga a 16,000 g por un min y se elimina la solución que pasa a través de la columna. Se agregan 500 μ l de Membrane Wash Solution, se centrifuga a 16,000 g por 5 min y se elimina la solución que pasa por la columna. Posteriormente se centrifuga por 1 min y se deja secar para eliminar cualquier residuo de etanol. La columna se coloca sobre un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se agrega de 30 a 50 μ l de agua libre de nucleasas y se incuba por 1 min. Finalmente, se centrifuga a 16,000 g por 1 min. Se desecha la columna y se almacena el purificado a -20 °C.

C. Medio de cultivo LB

Peptona de caseína al 1%, NaCl al 1%, Extracto de levadura al 0.5%. Para medio solido se agrega 1.3% de agar bacteriológico.

D. Soluciones empleadas para la extracción de plásmidos por el método de Birnboim y Doly (1979).

D.1. Birnboim I:

Tris HCl pH8 25 mM, EDTA pH8 10 mM, Glucosa 50 mM.

D.2. Birnboim II:

NaOH 0.2 N, SDS 1%.

D.3. Birnboim III:

60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial, 28.5 ml de H₂O.

E. Características de los oligonucleótidos FpBI121 y RpBI121 de acuerdo con el software DNASTar

Secuencia:

FpBI121: 5' CTTACGCAGCAGGTCTCATCA 3'

RpBI121: 5' TGCCAGTTCAGTTCGTTGTT 3'

52.4% y 45% de GC para FpBI121 y RpBI121 respectivamente, dTm de 2.5 °C, temperatura optima de alineamiento de 55.2 °C, largo del producto 1239 pb.

F. Medio de cultivo YEB

0.5% de extracto de carne, 0.5% de peptona de caseína, 0.5% de sacarosa, 0.1% de extracto de levadura y 0.05% de MgSO₄-7H₂O. Se ajusta pH a 7.0.

G. Medio Murashige y Skoog (MS)

Para la preparación del medio se utilizan las siguientes soluciones concentradas:

Solución	Concentración	Reactivo	Cantidad
Solución A (50 ml)	1000x	Cloruro de calcio (CaCl ₂ - 2H ₂ O)	22.000 g
Solución B (50 ml)	1000x	Yoduro de potasio (KI)	41.500 mg
		Cloruro de cobalto (CoCl ₂ - 6H ₂ O)	1.250 mg
Solución C (50 ml)	400x	Fosfato monobásico de K (KH ₂ PO ₄)	3.400 g
		Ac. Bórico (H ₃ BO ₃)	0.124 g
		Molibdato de sodio (NaMoO ₄)	0.005 g
Solución D (50 ml)	400x	Sulfato de magnesio (MgSO ₄ - 7H ₂ O)	7.400 g
		Sulfato de manganeso (MnSO ₄ - H ₂ O)	0.340 g
		Sulfato de zinc (ZnSO ₄ - 7H ₂ O)	0.172 g
		Sulfato de cobre (CuSO ₄ - 5H ₂ O)	0.500 mg
Solución E (100 ml)	200x	Sulfato ferroso (FeSO ₄ - 7H ₂ O)	0.557 g
		EDTA disódico (Na ₂ EDTA)	0.745 g
Solución F (100 ml)	100x	Glicina	20.000 mg
		Piridoxina HCl	5.000 mg
		Ac. nicotínico	5.000 mg
		Tiamina HCl	1.000 mg
		Mio inositol	1.000 g

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

Solución	Volumen (ml)
A	1
B	1
C	2.5
D	2.5
E	5
F	10

Posteriormente se agrega sacarosa (3%), Nitrato de potasio (0.19%) y Nitrato de amonio (0.165%). Se ajusta el pH a 5.7 y se afora a 1 litro. Para medio MS solido se agrega Agar (0.8%).

H. Solución de reacción para ensayo histoquímico del gen *GUS*.

Componente	Volumen (μ l)	Concentración
Buffer de fosfatos 1M	100	100 mM
EDTA 0.25 M	40	10 mM
Ferrocianuro de Potasio 5 mM	100	0.5 mM
Ferricianuro de Potasio 5 mM	100	0.5 mM
Triton 10%	10	0.10%
X-gluc 40 mM	50	2.0 mM
Agua destilada	600	

I. Buffer STET

Sacarosa al 8%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, Triton X-100 al 5%.