



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TESIS:

**“PROPAGACIÓN, ESTUDIO DE CAPTACIÓN DE METALES PESADOS Y ANÁLISIS
DE LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES INVOLUCRADOS EN *Suaeda edulis*.”**

PRESENTA:

LBT. Carolina Enríquez González

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTOR

Dr. José Francisco Morales Domínguez

COMITÉ TUTORAL

Dra. Cristina Garcidueñas Piña

Dr. Isidoro Rubio Franchini

Aguascalientes, Ags., Diciembre 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 **Carolina Enríquez González** con ID 687 quien realizó la tesis titulada **PROPAGACIÓN, ESTUDIO DE CAPTACIÓN DE METALES PESADOS Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES INVOLUCRADOS EN *Suaeda edulis*** y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

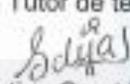
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 12 de noviembre de 2018.


Dr. José Francisco Morales Domínguez
Tutor de tesis


Dra. Cristina Garcidueñas Piña
Asesor


Dr. Isidoro Rubio Franchini
Asesor

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



CAROLINA ENRIQUEZ GONZALEZ
MAESTRIA EN CIENCIAS, AREA BIOTECNOLOGIA VEGETAL
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "PROPAGACION, ESTUDIO DE CAPTACION DE METALES PESADOS Y ANALISIS DE LA EXPRESION ALGUNOS GENES INVOLUCRADOS EN *Suaeda edulis*", 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 22 de noviembre de 2018

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p. - Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo tan arduo y lleno de dificultades es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis más sinceros agradecimientos a los miembros de mi comité tutorial: Al Dr Francisco Morales Domínguez por guiarme y darme su apoyo incondicional no sólo para realizar este proyecto, si no a lo largo de todos los años que tenemos de conocernos, por sus consejos, amistad, y comprensión. A la Dra Cristina Garcidueñas Piña por su comprensión, paciencia, por compartir conmigo su experiencia y conocimiento, por su dedicación, compromiso y sobre todo su amistad. Al Dr. Isidoro Rubio Franchinni por compartir su experiencia y conocimiento, su paciencia y apoyo incondicional.

Al Dr. Abraham Loera Muro, al Dr. Aaron Barraza Celis y al M.C. Ángel Edgardo Carrillo García por compartir su conocimiento y experiencia durante mi estancia en el laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz, Baja California Sur.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de plantas, Lili, Dani, Mariana, Josafath, Nancy, Vivian, Mario Arzate, Mario Mejía, Fany, Juan Pablo, Viviana, por su amistad y por siempre apoyarme y darme palabras de aliento cuando más lo necesite.

Muchas gracias a todos ustedes por transmitirme, inculcarme y hacer más grande el amor que tengo por la ciencia.

También quisiera agradecer a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo para la realización de mis estudios de maestría (Beca N° 766920).

DEDICATORIAS

A mis padres Sergio y Esther por nunca soltar mi mano a pesar de todos los momentos difíciles, por guiarme, por sus invaluable consejos, por el amor tan inmenso que siempre me han demostrado, por su paciencia y apoyo incondicional. Gracias por hacer de mí la persona que soy ahora.

A mis hermanas Sisi, Mariana y Susy que son mis compañeras de vida, mis mejores amigas, por siempre estar conmigo, apoyarme y aconsejarme en todo momento, por sus palabras de aliento, y cariño incondicional.

A mi esposo y mi hijo que son el motor que me impulsa a alcanzar mis metas, por su apoyo, comprensión y por el amor más puro y grande que he conocido.... Son lo mejor de mi vida. Gracias Edgar por caminar conmigo siempre.

A Enríque Sánchez por ser el hermano que me faltaba, por el apoyo y amor incondicional a lo largo de tantos años.

A mis sobrinos Kike, Dani y Fer los quiero muchísimo.

A mis amigos Victor, Gabriel Ávila y Alex Cerna por siempre apoyarme, por sus consejos, por sus palabras de aliento y por todos esos momentos invaluable e inolvidables de mi vida.

Índice

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS.....	v
ACRÓNIMOS.....	11
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1. Estrés osmótico por salinidad.....	16
2.2. Plantas halófitas.....	17
2.3. <i>Suaeda</i> sp.....	18
2.3.1. <i>Suaeda edulis</i>	19
2.4. Respuesta de las plantas a estrés abiótico.....	20
2.4.1. Vía I de señalización	21
2.4.2. Vía II de señalización	22
2.4.3. Vía III de señalización	22
2.4.4. Osmoprotectores en plantas halófitas	23
2.4.5. Pirrolina-5-Carboxilato Sintetasa (P5CS)	24
2.4.6. Proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) tipo Dehidrinas	27
2.5. Fitorremediación	31
2.6. Cultivo de tejido de plantas halófitas.....	32
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. Objetivo General	35
5.2. Objetivos Particulares	35

6.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1	Material vegetal y condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	36
6.2	Exposición del material vegetal a estrés abiótico	36
6.3	Análisis de la cantidad de sodio, cadmio y cobre en plántulas de <i>S. edulis</i> mediante espectroscopía de absorción atómica.....	36
6.4	Extracción de ADN a partir de tejido fresco de <i>S. edulis</i>	37
6.5	Amplificación de los genes <i>SeDHN</i> y <i>P5CS</i> mediante PCR	38
6.6	Purificación y secuenciación de los productos de PCR.....	38
6.7	Análisis bioinformático	39
6.8	Análisis de la expresión genética	40
6.8.1	Extracción de ARN	40
6.8.2	RT-PCR en tiempo real	40
6.9	Análisis estadístico	41
7	RESULTADOS.....	42
7.1	Análisis de la capacidad <i>S. edulis</i> de acumular sodio, cobre y cadmio	42
7.1.1	Efectos físicos en plantas expuestas a sodio, cobre y cadmio	42
7.1.2	Determinación de Cu, Cd y NaCl en <i>S. edulis</i> por espectroscopía de absorción atómica	42
7.2	Identificación de genes de <i>S. edulis</i> involucrados en la tolerancia a salinidad, Cu y Cd	43
7.3	Análisis de expresión mediante RT-PCR en tiempo real.....	46
8	DISCUSIÓN.....	49
9	CONCLUSIONES	54
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	55
III.-	A NEXOS.....	65
	ANEXO A: CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	65
	A.1. Características de los oligonucleótidos FSeDHN y RSeDHN sintetizados de acuerdo al programa DNAStar.....	65

A.2. Características de los oligonucleótidos F P5CS y RP5CS sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI.....65

A.3. Características de los oligonucleótidos FSeDHNT_r y RSeDHNT_r sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI.65

A.4. Características de los oligonucleótidos FBtub1 y RBtub165

ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS UTILIZADOS.65

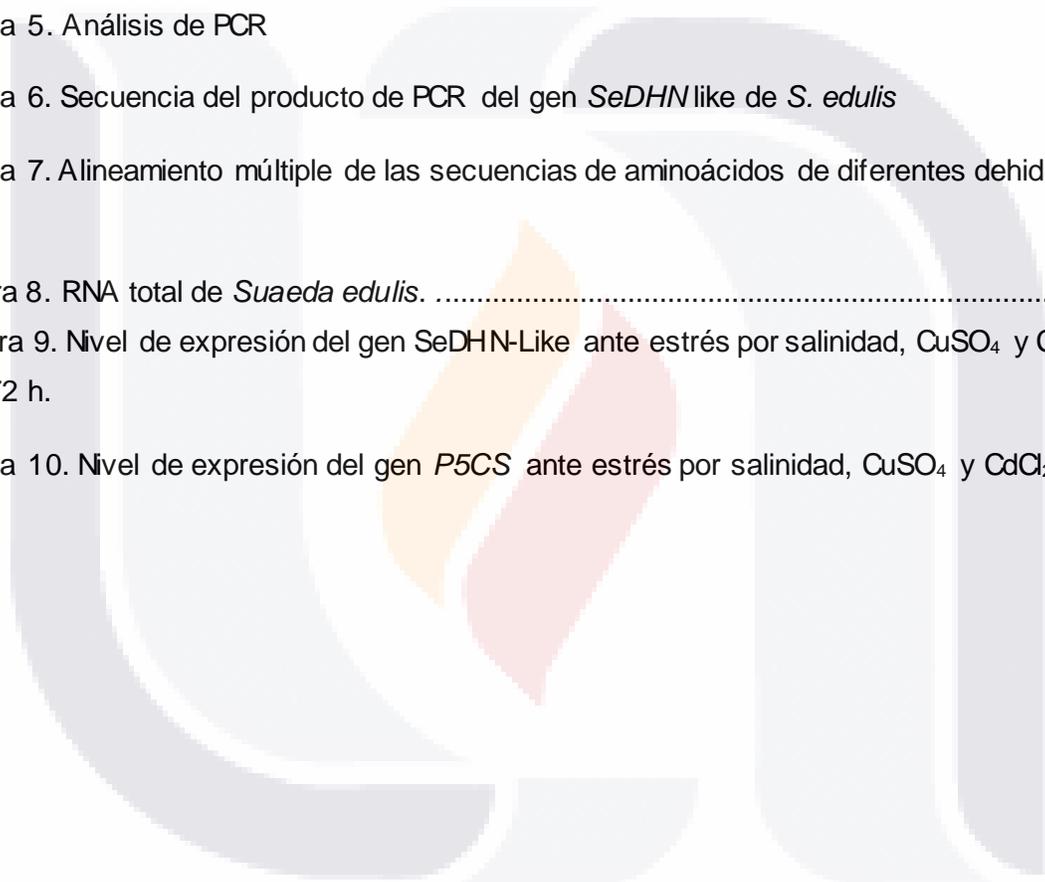
B.1. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS):65

B.2 Buffer de lisis para extracción de ADN.....67



Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo de las diferentes vías de señalización (Xiang et al., 2002).	23
Figura 2. Representación esquemática de síntesis de la prolina en diferentes orgánulos celulares (Szadabos et al.2010).....	25
Figura 3. Representación esquemática de los motivos presentes en la proteína OpsDHN1.	30
Figura 4. <i>S. edulis</i> expuesta a 100 µg /L de CdCl ₂ y CuSO ₄ a 0 y 72 h.....	42
Figura 5. Análisis de PCR	44
Figura 6. Secuencia del producto de PCR del gen <i>SeDHN</i> like de <i>S. edulis</i>	44
Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de diferentes dehidrasas	46
Figura 8. RNA total de <i>Suaeda edulis</i>	47
Figura 9. Nivel de expresión del gen <i>SeDHN</i> -Like ante estrés por salinidad, CuSO ₄ y CdCl ₂ por 72 h.	47
Figura 10. Nivel de expresión del gen <i>P5CS</i> ante estrés por salinidad, CuSO ₄ y CdCl ₂ por 72 h.	48



Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de los motivos conservados identificados para cada uno de los grupos LEA según Bies-Etheve et al., 2008.28

Tabla 2. Condiciones y oligos que se utilizaron en los PCRs.38

Tabla 3. Oligonucleótidos que se utilizaron para el RT-PCR en tiempo real.41

Tabla 4. Cuantificación de Cu, Cd y Na por espectroscopía de absorción atómica. *Datos despreciables de acuerdo al margen de error que hay en el espectrómetro.43

Tabla 5. Genes homólogos del gen *SeDHN-Like*.45



ACRÓNIMOS

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

DHN: Dehidrina

ABA: Ácido Abscísico

ADN: Ácido Desoxiribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

CdCl₂: Cloruro de cadmio

CuSO₄: Sulfato de cobre

NaCl: Cloruro de sodio

EROs: Especies reactivas de Oxígeno

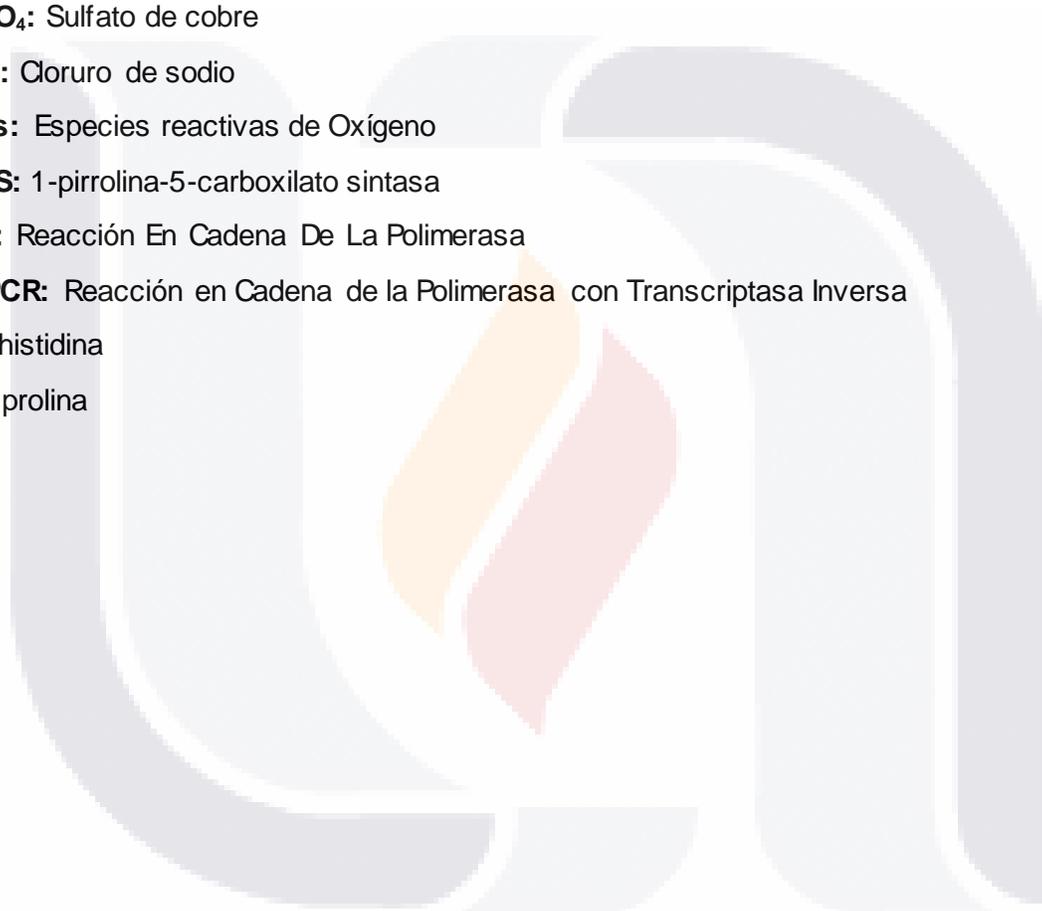
P5CS: 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa

PCR: Reacción En Cadena De La Polimerasa

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

His: histidina

Pro: prolina



RESUMEN

La salinidad y la contaminación por metales pesados es uno de los temas más importantes en la actualidad, debido a que están presentes en el agua, suelo, aire y alimentos. Este tipo de contaminantes afecta a las plantas en su crecimiento y desarrollo. Las halófitas, han desarrollado mecanismos con los cuales mantienen la homeostasis en estas condiciones de estrés, mientras la gran mayoría de las plantas de interés agrícola no tienen esta capacidad. *Suaeda edulis* es una planta halófito que es capaz de prosperar y crecer bajo estrés salino; sin embargo, se desconocen los mecanismos que utiliza para tolerar estas condiciones. En el presente trabajo se expusieron plantas in vitro de *S. edulis* a NaCl (300 y 600 mg/L), CuSO₄ (100 y 250 mg/L), CdCl₂ (100 y 250 mg/L) por 72 h, y por análisis de espectroscopía de absorción atómica se detectó que la concentración de estos aumenta en la planta conforme aumenta la concentración en el medio. Por otro lado, se identificó un gen tipo dehidrina en *S. edulis* (*SeDHN-like*) y los estudios bioinformáticos revelaron que pertenece a las proteínas LEA 2. Se realizaron estudios de expresión de *SeDHN-Like* y de 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa (*P5CS*; enzima que participa en la síntesis de la prolina), con la finalidad de saber si había una correlación entre la expresión de estos genes y los tratamientos antes mencionados; los resultados revelaron que la expresión de *P5CS* y *SeDHN-like* es mayor en las plantas expuestas a exceso de salinidad, a CuSO₄ y a CdCl₂, que a las del grupo control.

ABSTRACT

Salinity and contamination by heavy metals is one of the most important issues at present, because they are present in water, soil, air and food. This type of pollutants affects the plants in their growth and development. The halophytes have developed mechanisms in which they maintain homeostasis under these stress conditions, while the vast majority of plants of agricultural interest do not have this capacity to do it. *Suaeda edulis* is a halophyte plant that is able to thrive and grow under salt stress; however, the mechanisms used to tolerate these conditions are unknown. In this work in vitro plants of *S. edulis* were exposed to NaCl (300 and 600 mg / L), CuSO₄ (100 and 250 mg / L), CdCl₂ (100 and 250 mg / L) for 72 h. Through the analysis of atomic absorption spectroscopy, it was detected that the concentration of these increases in the plant as the concentration in the meddle increases. On the other hand, a dehydrin-type gene was identified in *S. edulis* (SeDHN-like) and bioinformatic studies revealed that it belongs to the LEA 2 proteins. SeDHN-Like and 1-pyrroline-5-carboxylate synthase expression studies were carried out (P5CS, enzyme that participates in the synthesis of proline), in order to know if there was a correlation between the expression of these genes and treatments previously mentioned. The results revealed that the expression of P5CS and SeDHN is higher in plants that are exposed to excess salinity, to CuSO₄ and to CdCl₂, than to those in the control group.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población que ha tenido lugar durante los últimos años ha propiciado el desarrollo de la actividad industrial y agrícola. Debido a esto, un gran número de contaminantes químicos están siendo liberados e incorporados a los ecosistemas, y a los suelos, comprometiendo su capacidad autodepuradora. Entre los principales contaminantes se incluyen los metales pesados.

La contaminación con metales pesados es uno de los temas más importantes en la actualidad, debido a que están presentes en el agua, suelo, aire y alimentos. El sistema suelo-planta se considera un sistema abierto que se encuentra sujeto a aportes, tales como contaminantes, fertilizantes y pesticidas, y también a pérdidas, mediante lixiviación, erosión o volatilización. La incorporación de los metales pesados por las plantas se produce fundamentalmente desde el suelo, a través de las raíces, y está influenciada por varios factores entre los que destacan el tipo de suelo, la temperatura, pH, aireación, condiciones redox y fertilización, la especie vegetal, el momento del desarrollo y el sistema radicular, entre otros. Una vez que los iones metálicos han sido absorbidos, pueden moverse por toda la planta, afectando su crecimiento y desarrollo. Es importante destacar que algunas plantas, como lo son las halófitas, han desarrollado mecanismos con los cuales mantienen la homeostasis en estas condiciones de estrés, mientras la gran mayoría de las plantas de interés agrícola no tienen esta capacidad.

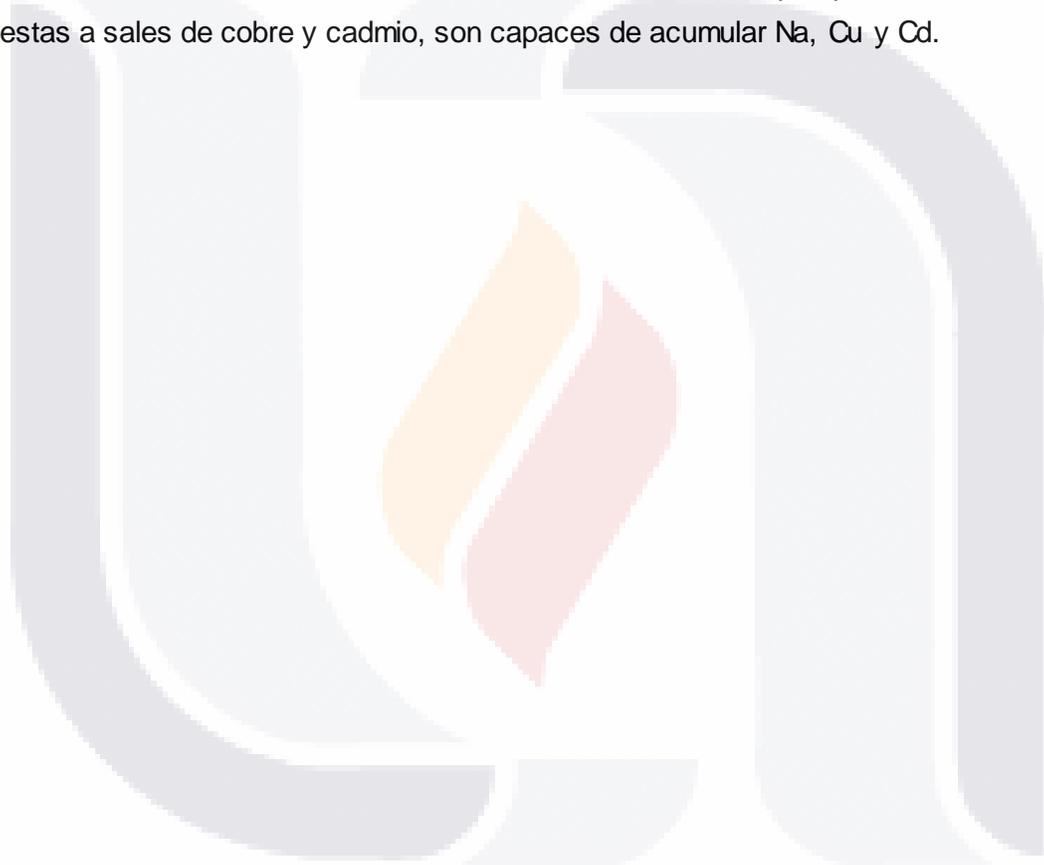
Las plantas halófitas son organismos capaces de prosperar y crecer en concentraciones altas de NaCl, ya que activan mecanismos fisiológicos para regular el potencial osmótico de las células, primordialmente para evitar la pérdida de agua y la entrada de iones tóxicos. La biosíntesis de osmoprotectores como la prolina, y de proteínas de defensa como la LEA (Late Embryogenesis Abundant) tipo dehidrina, son mecanismos que han desarrollado estas plantas para tolerar las condiciones de estrés salino.

Suaeda edulis es una planta halófitas que se encontró en el cráter del volcán Rincón de Parangueo en Valle de Santiago, Guanajuato, las características del suelo son muy inusuales teniendo un pH de 9.2 y 34.8 mg/L de NaCl.

No hay estudios moleculares y fisiológicos previos en esta planta, por lo que es de suma importancia investigar los mecanismos que utiliza para resistir condiciones tan adversas.

En este trabajo, se estudió la respuesta de *S. edulis* al estrés salino y al producido por la presencia de metales pesados. Se comparó la expresión del gen 1-pirrolina-5-

carboxilato sintasa (*P5CS*), enzima que participa en la síntesis de la prolina, y del gen *LEA*, de plantas expuestas a exceso de salinidad, a cobre y cadmio, con otras cultivadas en condiciones regulares. Además, se analizó la capacidad de esta planta de captar sodio y metales pesados (Cu y Cd) por el espectroscopía de absorción atómica. Así mismo, se identificó en un gen, que codifica para a una proteína con las características propias de las *LEA 2 (SeDHN-like)*, además del gen *P5CS*. Se observó que la expresión de ambos genes en *S. edulis* cultivadas en presencia de metales pesados y salinidad, fue mayor con respecto a las del control, aunque no hay una diferencia significativa entre tratamientos. Por su parte, los resultados de la absorción atómica mostraron que plantas de *S. edulis* expuestas a sales de cobre y cadmio, son capaces de acumular Na, Cu y Cd.



2. ANTECEDENTES

Las plantas se encuentran expuestas a cambios constantes debido a la inestabilidad de las condiciones ambientales en nuestro planeta, sin embargo, para estos organismos es crucial adaptarse y aclimatarse a estas condiciones para poder llevar a cabo de una forma óptima su crecimiento, desarrollo, aumento de biomasa, productividad. Estos cambios ambientales son percibidos por los distintos órganos de la planta, y esta información se transmite internamente mediante la modulación de la síntesis de señales que activan las respuestas de desarrollo y crecimiento vegetativo. Las respuestas de la planta dependen del genotipo y del estado de desarrollo de la misma en el momento en el cual el estrés se está presentando, una vez activadas estas respuestas, el crecimiento, así como otro tipo de funciones, se verá limitado por el aporte de nutrientes, elementos minerales, H₂O, entre otros. Bajo estas características la planta es capaz de reprimir las respuestas de crecimiento y desencadenar mecanismos de protección (Talón *et al.*, 1991).

2.1. Estrés osmótico por salinidad

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

La salinidad también afecta la fotosíntesis, principalmente a través de la reducción del área foliar, el contenido de clorofila y la conductancia estomática, y en menor extensión a través de una disminución de la eficiencia del fotosistema II. Los efectos adversos de la

salinidad pueden influir sobre el ciclo celular y la diferenciación, ya que detiene temporalmente el ciclo celular reduciendo la expresión y actividad de ciclinas y proteínas quinasa dependientes de ciclinas, lo que trae como resultado menos células en los meristemas y un crecimiento limitado (Chávez *et al.*, 2009). Casierra *et al.* (2006) reportaron que la aplicación de 100 mM de NaCl redujo el crecimiento alrededor de 50% en *Ferocactus acanthodes* y *Trichocereus chilensis* y encontraron que a pesar de que la salinidad tuvo un efecto mínimo sobre la reducción en el área foliar en las especies evaluadas, la concentración de NaCl afectó negativamente la producción de materia seca y la eficiencia agronómica en el uso del agua, lo que en conjunto sería la resultante de una tasa fotosintética reducida; la salinidad, así como las altas temperaturas y la sequía pueden causar la desnaturalización y la pérdida de funciones en numerosas proteínas; por lo que se han identificado varios grupos de proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant) en cereales (Casierra *et al.*, 2006).

Roychoudhury. (2007), creó plantas transgénicas de tabaco que expresan el gen *Rab16A*, este gen codifica para una proteína LEA tipo DHN donde la expresión del gen está controlada por un promotor inducible por la salinidad, lo que conlleva a una acumulación de la proteína en las hojas de las plantas transgénicas sometidas a este tipo de estrés. Las mismas mostraron un incremento significativo en la tolerancia a la salinidad y tasas de crecimiento sostenidas bajo condiciones estresantes. Adicionalmente mostraron un incremento en la producción de osmolitos tales como azúcares reducidos, prolina y poliaminas. También mostraron una mejor maquinaria antioxidante y un balance mineral más favorable, lo que se reflejó en los reducidos niveles de peróxido de hidrógeno y de peroxidación lipídica, menor pérdida de clorofila, así como menor acumulación de sodio y mayor acumulación de potasio; estos resultados establecen el posible papel del gen *Rab16A* en conferir tolerancia a la salinidad sin afectar el crecimiento y el rendimiento de las plantas transformadas (Chávez *et al.*, 2009).

2.2. Plantas halófitas

Las plantas halófitas son organismos capaces de prosperar y crecer en concentraciones altas de NaCl (Hellebust 1976, Flowers *et al.*, 1986). La capacidad que presentan algunas de estas plantas halófitas para resistir altas condiciones de sal se debe a dos mecanismos principales: la primera, excluyen el reservorio de sal en hojas (exclusión de sal) y la segunda es que lo compartimentan en vacuolas (compartimentación de sal), el mecanismo de exclusión salina de las hojas se lleva a cabo por la selectividad de la captación de Na⁺ y Cl⁻

por las células que se encuentran en las raíces, estas células estelares, tienen preferencia por la carga del ión de Na^+ y a través del xilema proceden a la eliminación de la sal (Flowers *et al.*, 1977). Otro mecanismo de exclusión de sal es a través de las hojas mediante estructuras como las glándulas salinas, que son organelos tubulares, en los cuales se acumulan las sales que se absorben del suelo en exceso. Las sales se introducen a la vacuola mediante transporte activo, mediante un co-transportador de antiporte de Na^+ y Cl^- , y cuando la célula colapsa, el contenido líquido de la vacuola se evapora y las sales forman una capa pulverulenta sobre la planta (Blumwald *et al.*, 1985, Tester *et al.*, 2003). La actividad antiportante sobre el estrés de salinidad se produce tanto en glicófitos como en halófitos (Flowers *et al.*, 1977). La importancia de este mecanismo en la tolerancia a la sal es apoyada porque la sobreexpresión del gen *AtNHX1*, que codifica un co-transportador de Na^+ / H^+ mejoró la tolerancia a la sal de plantas (Apse *et al.*, 1999). Las halófitas han desarrollado "controles" en las dos estrategias, ya sea para la afluencia de Na^+ en las raíces que se propone como un mecanismo importante para una menor acumulación de Na^+ , o bien para la compartimentación de Na^+ en la vacuola en comparación con los glicófitos (Wang *et al.*, 2006).

Otra estrategia de las plantas halófitas es su capacidad de acumular osmolitos, como la Glicina Betaína y la Prolina que mantienen el equilibrio osmótico interrumpido por la presencia de un desajuste de iones en la vacuola (Wang *et al.*, 2004). Las plantas halófitas pueden mantener una gran actividad metabólica incluso a concentraciones inhibitorias de Na^+ intracelular (Waisel *et al.*, 1986). Una estrategia crucial para producir cultivos tolerantes al estrés ha consistido en el uso de "extremófilos" como material de partida para los genes de tolerancia al estrés debido a su capacidad de sobrevivir y prosperar bajo regímenes ambientales extremos / fluctuantes (Banzai *et al.*, 2002)

2.3. Suaeda sp.

El género *Suaeda* Forssk. ex Scop., consiste en un aproximado de 110 especies, pertenece a la subfamilia Suaedoidae Ulbr. que a su vez pertenece a la familia Chenopodiaceae (Schütze *et al.*, 2003). Por lo general lo encontramos en zonas húmedas salinas o alcalinas y tiene una distribución cosmopolita en regiones costeras (Reed. 1979; Ferren *et al.*, 2004), así como en el interior en las partes bajas de cuencas endorreicas (Rzedowski, 1978). El género comprende hierbas anuales o perennes, subarbustos y arbustos, con tallos erguidos o postrados, glabros o pubescentes, hojas sésiles o

subésiles, alternas u opuestas, enteras, carnosas, aplanadas o semiteretes a teretes, flores inconspicuas con perianto actinomorfo o zigomorfo o irregular, de cinco segmentos, verdes, suculentos, persistentes y envolviendo al fruto, (1-2-) 5 estambres, 2-5 estigmas; flores arregladas en glomérulos en las axilas de brácteas foliares comúnmente arregladas en espigas o algunas veces racimos y utrículo con pericarpo membranáceo y semillas algunas veces dimórficas (Ferren *et al.*, 2004). *Suaeda* incluye especies polimórficas, cuya variación parece que es debida a factores ambientales, pero probablemente también a diferencias genéticas (Ferren *et al.*, 2004). Reconociendo la confusión taxonómica del género, Hopkins *et al.* (1977) sugirieron que los caracteres que son constantes y presumiblemente confiables a nivel de especie parecen ser el hábito herbáceo contra sufrutescente, el tipo de inflorescencia (incluyendo la densidad de los glomérulos), la forma de la hoja y longitud de los entrenudos, características del cáliz y tamaño de la semilla. Pedrol *et al.* (1988) indicaron que estudios de diversos autores sobre los efectos de los factores ambientales en diferentes especies de *Suaeda*, mostraron que la altura y número de los tallos, suculencia, grosor, longitud y forma de las hojas, varían según la salinidad del medio.

Schütze *et al.* (2003), con base en los análisis moleculares realizados, propusieron una clasificación infragenérica para *Suaeda*, apoyada por caracteres morfológicos, reconociendo siete secciones. De acuerdo con estos autores, en Norteamérica se distribuyen siete especies de *S.sect. Brezia* (Moq.) Volk. in Engl. & Prantl así como seis de *S. sect. Salsina* Moq. Por su parte, Ferren y Schenk (2004) en el tratamiento taxonómico para las especies de *Suaeda* de Norteamérica, norte de México, coinciden en el reconocimiento de *S.sect. Brezia* pero reconocen *S.sect. Limbogermen* Iljin, que fue incluida en *S.sect. Salsina* por Schütze *et al.* (2003).

2.3.1. *Suaeda edulis*

S. edulis es una planta estrictamente anual de 15-110 cm de alto, erecta a ascendente, plantas de color verde, glauco o rojizo, tornándose pardas con la edad; glabras. Tallos no ramificados o 1-3 (-7) veces ramificados, en la base o a lo largo del tallo, más cortos o igualando al tallo principal; estriados con líneas de color verde, pardo o rojizo. Hojas alternas, suculentas, lineares o angostamente lanceoladas, más anchas en la base, las que sostienen ramas floríferas de 10.0-54.0 × 0.5-2.0 mm; margen membranáceo a todo lo largo, blanquecino; ápice apiculado. Inflorescencias en glomérulos axilares de 1-3 (5) flores,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a todo lo largo de las ramas o dispuestas en espigas de 1.0-3.0 cm de largo, algunas veces dando una apariencia paniculiforme por el acortamiento hacia la parte terminal de las ramas laterales; brácteas similares a las hojas superiores pero gradualmente más cortas, comúnmente, las que sostienen glomérulos angostamente lanceoladas, más anchas en la base, de 2.0-12.0 × 1.0-1.8 mm, margen membranáceo, base envolvente. Bractéolas hialinas de 0.75-1.75 × 1.0-2.5 mm, ovadas o triangulares, irregularmente eroso-dentadas con ápice agudo a caudado. Flores hermafroditas, zigomorfas, la parte más larga de 0.5-0.7 mm en antesis y de 0.8-3.0 mm en etapa madura. Segmentos del perianto suculentos, fusionados hasta la mitad, verde-glaucos, cóncavos, 1 a 3 provistos de cornículos distales, un segmento más grande con el cornículo más largo, cubriendo los dos laterales; en fruto son evidentemente nervados con alas abaxiales transversales. Estambres 2-3, 0.27-0.44 mm, exsertos. Ovario deprimido-ovoide; estigmas 2, papilosos, surgiendo del ápice atenuado del ovario. Semillas dimórficas, horizontales, negras o pardo claro, lenticulares, de 0.9-1.6 mm. $2n = 54$ (Noguez *et al.*, 2013).

S. edilis se distribuye en lagos salinos de Guanajuato, Jalisco, Michoacán, México, Distrito Federal, Tlaxcala y Puebla. Crece en suelos inundados y húmedos en pastizales halófilos con *Distichlis spicata* a intervalo altitudinal de 1,347 a 2,351 m. Se desarrolla perfectamente en cultivo en el Distrito Federal en San Andrés Mixquic, San Pedro Tláhuac, San Gregorio Atlapulco y Santiago Tulyehualco. Florece y fructifica de mayo a octubre (Noguez *et al.*, 2013).

2.4. Respuesta de las plantas a estrés abiótico

A nivel fisiológico, uno de los cambios que presentan las plantas cuando se encuentra en presencia de estrés abiótico es el cierre de los estomas, lo cual origina una disminución en la tasa de transpiración (evitando la pérdida de agua) y por consiguiente una reducción en la asimilación de CO_2 (gas necesario para llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis), lo que ocasiona una inhibición en el crecimiento de la planta (Chaves *et al.*, 2003).

La señal inicial provocada por el estrés abiótico es percibida por receptores que se encuentran en la membrana celular, que con la activación inician o suprimen una cascada de transducción de señales de las células, mediante eventos de fosforilación y desfosforilación por medio de proteínas cinasas y fosfatasas. Éstas a su vez activan factores de transcripción que inducen la expresión de grupos de genes específicos que codifican proteínas que están involucradas en la respuesta al estrés en diversos procesos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

para ayudar a las plantas a sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Xiong *et al.*, 2001; Xion *et al.*, 2003; Bartels *et al.*, 2005; Manajan *et al.*, 2005). Las cascadas de transducción de señales se dividen en tres vías de señalización como se puede observar en la Fig. 1: la vía I está mediada por la transducción de señales a través de las MAPK cinasas e involucra la producción de antioxidantes y osmolitos. La vía II está mediada por proteínas cinasas dependientes de Ca^{+2} (CDPK) e involucra la producción de diferentes tipos de proteínas como las LEAs y la vía III involucra la vía SOS (Salt Overlay Sensitive) dependiente de calcio que regula la homeostasis iónica, la cual es una vía específica para el estrés iónico (Xiong *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010).

2.4.1. Vía I de señalización

El estrés por salinidad, sequía, temperaturas extremas (frío y calor) causantes de la deshidratación y el estrés oxidativo son acompañados por la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) como los superóxidos, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos (Apel *et al.*, 2004; Sairam *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005; Brosché *et al.*, 2010). Una alta concentración de EROs inhibe la fotosíntesis, efecto debido principalmente al daño en el fotosistema II (Bartels *et al.*, 2005, Rodríguez *et al.*, 2005). Además, pueden causar peroxidación en los lípidos de las membranas, así como también la desnaturalización de proteínas y la mutación de los ácidos nucleicos (Mundree *et al.*, 2002; Majan *et al.*, 2005). Sin embargo, las plantas han desarrollado algunos mecanismos de detoxificación mediante antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasas) o no-enzimáticos (ascorbato, glutatión, flavonoides, alcaloides y carotenoides) (Xiong *et al.*, 2002; Mittler. 2002; Sairam *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2005; Bartels *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2006). Además, otros componentes, los osmolitos compatibles prolina, glutamato, glicina betaína, carnitina, manitol, sorbitol, fructanos, polioles, trehalosa, sacarosa, oligosacáridos, e iones inorgánicos como el K^+ , pueden funcionar como secuestradores de EROs. Dichas moléculas no interfieren con el metabolismo basal de las células, se acumulan en el citoplasma y en la vacuola a altas concentraciones, como respuesta a un estrés osmótico (Xiong *et al.*, 2002). Otra de las funciones de los osmolitos compatibles es mantener la turgencia celular, favorecer la estabilidad de las membranas y de las proteínas (Nuccio *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003; Barteles *et al.*, 2005). Las EROs activan la vía de las MAPKs cinasas, las cuales se encargan de realizar la transducción de señales. La cascada de las MAPKs es activada por receptores/sensores de dos

componentes acoplados a proteínas G y proteínas histidina cinasa . Esta señalización es activada en respuesta al estrés osmótico y es la responsable de la acumulación de osmolitos compatibles que son importantes para el ajuste osmótico (Munnik *et al.*, 2001; Zhu. 2002; Rodríguez *et al.*, 2005). Dicha cascada la conforman tres proteínas cinasa interrelacionadas, MAPKKK, MAPKK y MAPK que son fosforiladas y activadas en los residuos de serina y treonina por una cinasa corriente arriba. La última MAPK fosforilada se encarga de fosforilar y activar compuestos específicos como lo son los factores de transcripción encargados de inducir la respuesta celular (Xiong *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005).

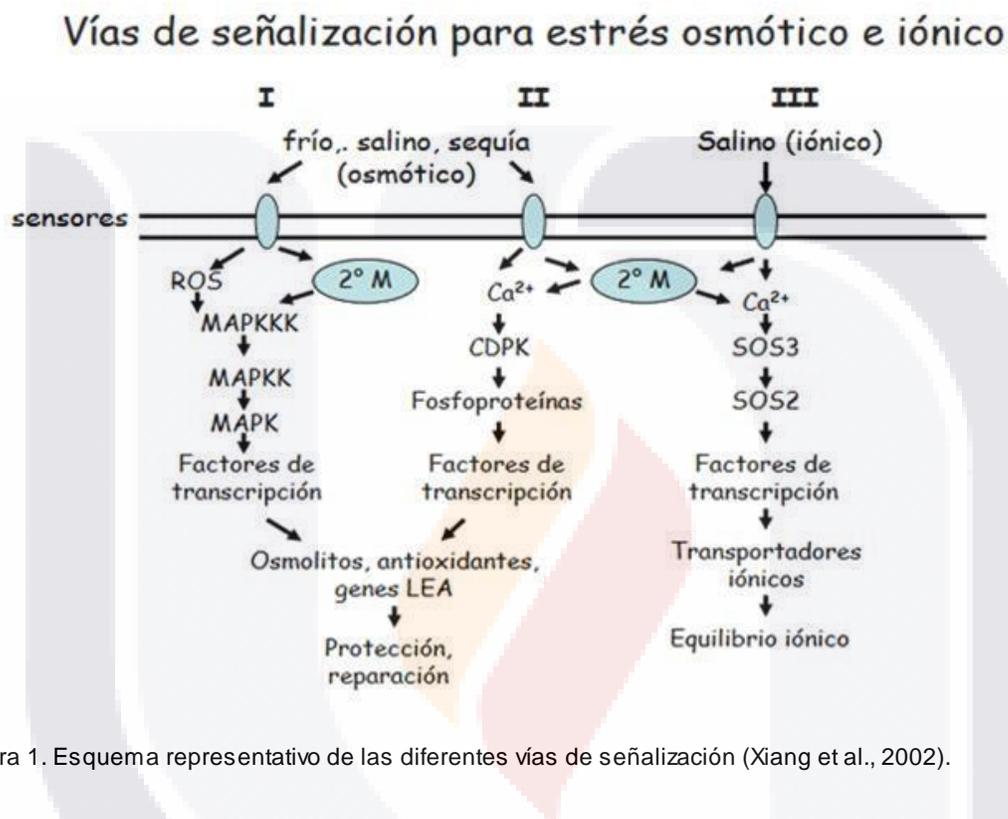
2.4.2. Vía II de señalización

En las plantas, el calcio es un nutriente esencial que se requiere para varias funciones estructurales de la pared y de la membrana celular, además de regular el crecimiento y desarrollo de la planta (White *et al.*, 2003; Hepler. 2005). Ante un estrés iónico y osmótico se induce un incremento en la concentración de iones Ca^{2+} en el citoplasma, el cual entra a través de canales iónicos permeables de la membrana plasmática y también es liberado del retículo endoplásmico (Xiong *et al.*, 2002; Bartels *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005). Las fluctuaciones de los niveles de calcio citosólico pueden ser detectados por proteínas cinasa dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), calcineurinas del tipo B (CBLs) y calmodulinas (Fig. 1) (White *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005; Bartels *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

2.4.3. Vía III de señalización

Durante el estrés salino se altera la homeostasis iónica ocasionada por un aumento extra e intracelular de Na^+ que conlleva a la activación de una señalización citoplasmática de Ca^{2+} en la cual participa la vía SOS (Salt Overly Sensitive), en donde SOS3 (proteína que se une al calcio mediante un motivo hélice-vuelta-hélice) se encarga de percibir las fluctuaciones de los niveles de Ca^{2+} citosólico provocados por el estrés. La proteína SOS3 interactúa específicamente con la proteína SOS2, que tiene actividad de serina-treonina cinasa formando un complejo necesario para la fosforilación y activación de la proteína SOS1, un antiportador Na^2/H^+ de membrana plasmática que regula la homeostasis iónica

en plantas (Sairam *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2004; Mahajan *et al.*, 2005). Por su parte, SOS4 (cinasa dependiente de piridoxal) interviene en la regulación de la homeostasis de Na⁺ y K⁺ modulando las actividades de los transportadores de iones, y está implicada en la biosíntesis del piridoxal-5-fosfato, una forma activa de la vitamina B6 (Fig. 1) (Shi *et al.*, 2002).



2.4.4. Osmoprotectores en plantas halófitas

Los osmoprotectores (también llamados solutos compatibles u osmolitos) son compuestos altamente solubles, no son tóxicos a concentraciones altas, su función principal es la de incrementar la presión osmótica en el citoplasma, además de que pueden estabilizar las proteínas y las membranas de las células cuando los niveles de sales o la temperatura del ambiente perturban la homeostasis del organismo. Los osmoprotectores juegan, por tanto, un papel muy importante en la adaptación de las células a varias condiciones ambientales adversas, como lo son los niveles altos de salinidad, sequía, frío (Yancey *et al.*, 1982). Los osmolitos se sintetizan como una respuesta metabólica al estrés

salino, e incluyen azúcares, polioles, aminoácidos y compuestos de amonio y sulfonio terciarios y cuaternarios (Chen *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción de los solutos compatibles para conferir protección a la planta en contra de los radicales libres durante las condiciones de estrés es aún desconocido. Sin embargo, estudios recientes sugieren un vínculo entre el aumento del contenido de osmolitos (por ejemplo, prolina y Glicina Betaína) en halófitas con disminución de la producción de EROs y una mejor tolerancia al estrés salino (Chen *et al.*, 2002).

2.4.5. Pirrolina-5-Carboxilato Sintetasa (P5CS)

La síntesis de prolina para la protección de estructuras subcelulares y reducción del daño oxidativo causado por los radicales libres es una respuesta metabólica general a estrés salino (Hare *et al.*, 2003). Los estudios *in vitro* mostraron que la acumulación de prolina puede ser un secuestrante de EROs y puede actuar para amortiguar el pH citosólico y equilibrar el estado redox de la célula (Matysik *et al.*, 2002).

Los tejidos que experimentan divisiones celulares rápidas y elongación, como los meristemas apicales de los brotes, acumulan un alto contenido de prolina que parece estar involucrado en la transición floral y el desarrollo embrionario. El nivel de la acumulación de prolina en las plantas varía de una especie a otra y puede ser 100 veces mayor durante el estrés que en condiciones normales de crecimiento. En las plantas, la prolina se sintetiza mediante dos rutas la del glutamato y la de la Ornitina (Lehmann *et al.*, 2011). Aunque la ruta predominante es a partir de glutamato vía D 1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por dos reducciones sucesivas catalizadas por P5C sintetasa (P5CS, EC 2.7.2.11) y P5C reductasa (P5CR, EC 1.5.1.2) (Fig. 2). P5CS es la enzima limitante de la velocidad para la síntesis de prolina y está controlada por inhibición de retroalimentación y regulación transcripcional. La eliminación de la inhibición de P5CS dio como resultado una mayor acumulación de prolina y protección de las plantas del estrés osmótico (Hu *et al.*, 1992).

Los genes para la biosíntesis de prolina se formaron primero en el citosol de las plantas y después en los cloroplastos (Verbruggen *et al.*, 2008, Miller *et al.* 2009), (Fig. 2). Bajo muchos esfuerzos, la acumulación de prolina se correlaciona con la actividad de P5CS, que es la enzima reguladora y limitante de la velocidad en la vía biosintética (Strizhov *et al.*, 1997).

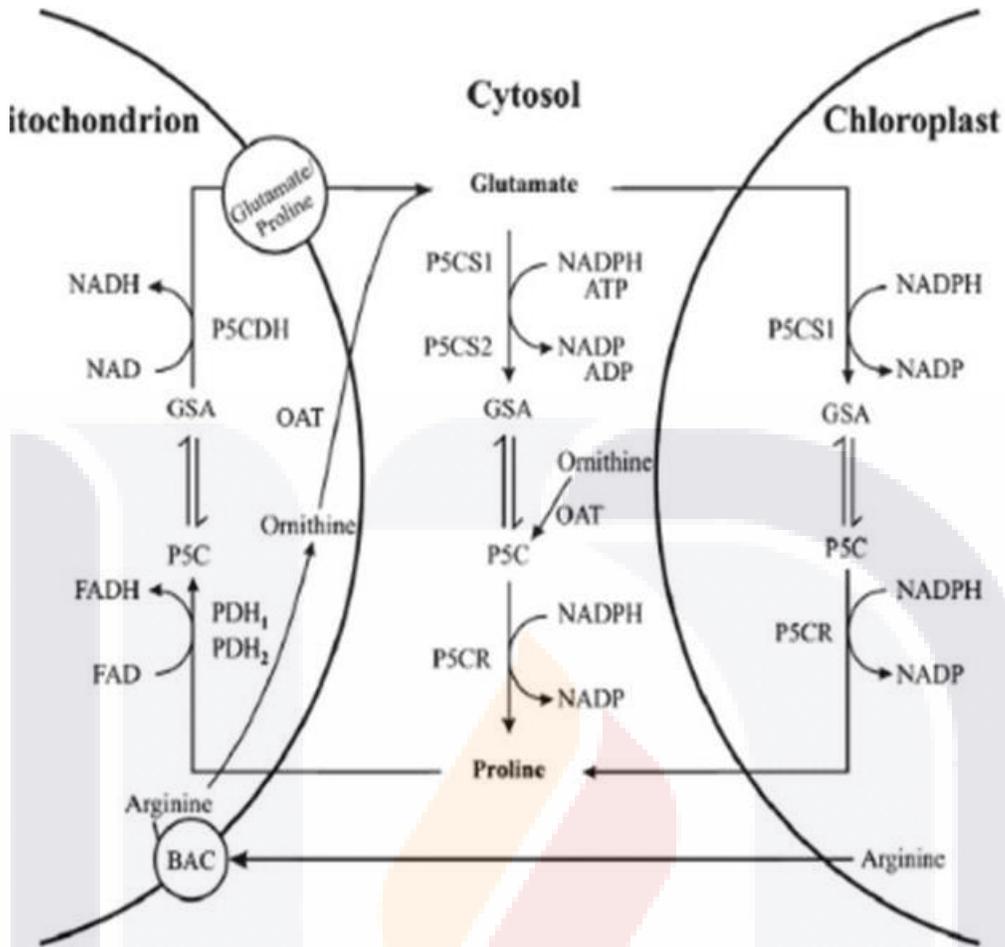


Figura 2. Representación esquemática de síntesis de la prolina en diferentes orgánulos celulares (Szadabos et al.2010).

Los genes *P5CS* fueron clonados y caracterizados a partir de varias plantas como *Arabidopsis thaliana* (Savoure et al., 1995) *Solanum lycopersicum* (Fujita et al., 1998), *Oryza sativa* (Hur et al., 2004) y *Sorghum bicolor* (Su et al., 2011). En algunas especies, estos genes muestran diferentes patrones de expresión. Por ejemplo, los genes *P5CS* tienen diferentes funciones en el desarrollo de la planta y durante la respuesta al estrés (Verbruggen et al., 2008). En *Arabidopsis*, se encontró que *P5CR* estaba codificado por un solo gen el empalme alternativo podría generar dos proteínas diferentes (Hare et al.,1997). Dos isoformas de *P5CR*, que comprenden *P5CR-1* y *P5CR-2*, se expresaron diferencialmente en cloroplastos de *Spinacea oleracea* (Murahama et al., 2001).

La segunda ruta de biosíntesis de prolina incluye ornitina como precursor que puede transaminarse a *P5C* mediante ornitina- δ -aminotransferasa (*OAT*; EC 2.6.1.13) a través de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un producto intermedio, pirrolina-2-carboxilato (Delauney et al., 1993). La ruta de la ornitina parece predominar en las mitocondrias bajo un alto suministro de nitrógeno, mientras que la ruta del glutamato actúa durante el estrés osmótico y la limitación de nitrógeno (Sánchez et al., 2001). La importancia de ornitina y OAT en la biosíntesis de prolina ha sido cuestionada, ya que el contenido de prolina no se vio afectado en los mutantes knockout de avena de *Arabidopsis*. En cambio, se sugirió que OAT facilita el reciclaje de nitrógeno a partir de arginina a través de P5C que se convierte en glutamato por P5CDH (Funck et al., 2008).

Por el contrario, el catabolismo de prolina ocurre predominantemente en mitocondrias que, involucran prolina deshidrogenasa (PDH) o prolina oxidasa (POX) que, produce P5C a partir de prolina, y P5C deshidrogenasa (P5CDH) que convierte P5C a glutamato (Fig. 2). La PDH está codificada por dos genes, mientras que se ha identificado un solo gen P5CDH en *Arabidopsis* (Ribarits et al., 2007). El PDH y el P5CDH utilizan FAD y NAD como aceptores de electrones y generan FADH y NADH, respectivamente, y liberar electrones para la respiración mitocondrial (Deuschle et al., 2004). Así, se predijo que las enzimas biosintéticas (P5CS1, P5CS2 y P5CR) estarían localizadas en el citosol y los cloroplastos, mientras que la localización mitocondrial se predijo para las enzimas, como PDH1, PDH2 y P5CDH implicados en el catabolismo de la prolina (Szabados et al., 2009). La acumulación de prolina aumenta en las plantas al transferir los genes asociados con la vía biosintética. En cactus encontraron que el estrés salino estimula la expresión de P5CS que conduce a una acumulación de prolina potenciada (Silva-Ortega et al. 2008). Se encontró que las actividades de P5CS y P5CR se incrementaron significativamente en hojas de *Morus alba* (Chaitanya et al., 2009) y tabaco (Stein et al., 2011) con un potencial hídrico de la hoja decreciente. Por el contrario, se observó que el contenido de prolina disminuye cuando se elimina el P5CS en *Arabidopsis* y se reduce la síntesis de prolina (Szekely et al., 2008). Además, la transcripción de ProDH antisensor mejora la producción de prolina en el tabaco (Stein et al 2011). En morera, la actividad de la prolina deshidrogenasa se reduce con un aumento progresivo del estrés hídrico. De manera similar, existen estudios sobre la ruta alternativa de la prolina que involucra a las enzimas ornitina transaminasas, donde se encontró que su actividad era elevada en *Morus alba* y en anacardos con bajo contenido de agua (Chaitanya et al., 2009, Rocha et al., 2012).

2.4.6. Proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) tipo Dehidrinas

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

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

También existe un motivo menos conservado conocido como segmento ϕ que es rico en aminoácidos polares y que se encuentra intercalado entre los segmentos K y está presente en algunas DHNs (Battaglia *et al.*, 2008).

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

Tabla 1. Secuencias de los motivos conservados identificados para cada uno de los grupos LEA según Bies-Etheve et al., 2008.

Grupo LEA	Motivo 1	Motivo 2	Motivo3
LEA 1	RKEQLGHEGYQEMGHKGG	LDE-AK- GETWPGGTGG-S- EAQ-HLAEG-SGGQT	LST-K-GGAEEEEG- EIDESKF
LEA 2	EKKG-EKIKEKLPGHH	S-SSSSSSSS	G-FDFL-KK-E
LEA 3	AYDKA-AKD	DKA-D-KE---A—KKV	AQ-AQQKAHE-QSAK- KTSQ
LEA 4	SAKEKIS	VSHKSK-VK-SL	
LEA 5	DVL---KL-DV-VTDAE-V- AELR-P-PGGVAS-AAARLN	KPV-DAAAIQ- AAERAG----GG-AA- QAA	TIGEALEA-----G
LEA 6	W-PDP-TGYRP---R-D- ELR—L-NNKQ	MARS-K-KI-S-F-S- LSNA-FRRG-AA-AA	I-RR—V-T
LEA 7	LKS-K-F-A-KL-IP-PE	V-V-NP---IP----S-R—G- IPD-G-L	D-PVV—TIP— GEIKLP—D

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

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

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

Las proteínas LEA 2 o DHNs juegan un rol importante en la respuesta y adaptación a diferentes tipos de estrés abiótico como son sequía, alta salinidad y bajas temperaturas que producen deshidratación en plantas como *A. thaliana*, *Zea mays* y *Hordeum vulgare* (Rodziewicz *et al.*, 2014). Esto ha sido ampliamente documentado por diferentes autores como López *et al.* (2003) que encontraron la correlación entre la acumulación de DHNs en 7 cultivos de invierno de *Triticum aestivum* durante la exposición a déficit hídrico; tres de

estos cultivares mostraron una sobreexpresión significativa de una DHN de 24 kDa en comparación con los otros. Es importante tomar en cuenta que dependiendo del tipo de DHN que se presente es el tipo de acción reportada, por ejemplo, las DHN básicas o neutras tipo YnSK2 son inducidas por deshidratación, las DHN ácidas o neutras tipo YnKn, SKn y Kn preferencialmente se acumulan en respuesta a bajas temperaturas y las dehidrinas tipo KnS responden a deshidratación y a bajas temperaturas (Zhu *et al.*, 2014).

La proteína OpsDHN1 (Dehidrina de *Opuntia streptacantha*), que es codificada por el gen *OpsDHN1*, está clasificada como una DHN ácida tipo SK3 debido a que posee un segmento S y tres segmentos K, posee una estructura secundaria altamente desarreglada en solución acuosa y tiene un alto índice de hidrofiliidad como se puede observar en la Figura 3. El gen codifica para una proteína de 248 aminoácidos con una masa molecular de 28.36 kD y tiene un marco de lectura abierto de 747 bp.

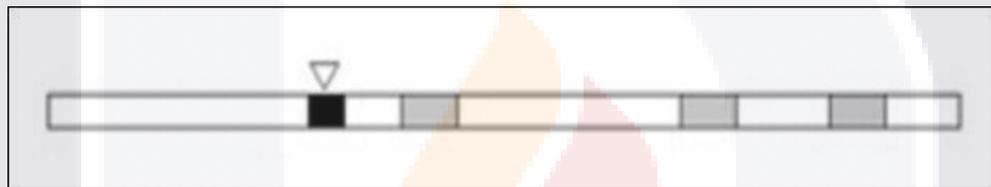


Figura 3. Representación esquemática de los motivos presentes en la proteína OpsDHN1. Segmento K (EKKGIME/DKIKEKLP, áreas grises) y segmento S (serie de residuos de serina, área en negro); el triángulo señala el sitio de inserción del intrón (Ochoa *et al.*, 2012).

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

2.5. Fitorremediación

La fitorremediación que tiene como objetivo degradar, asimilar, metabolizar o desintoxicar metales pesados, compuestos orgánicos y compuestos radioactivos por medio de la acción combinada de plantas y microorganismos con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (Kelley *et al.*, 2000).

Las fases del proceso por el cual las plantas incorporan y acumulan metales pesados son las siguientes (Navarro *et al.*, 2007):

Fase I. Implica el transporte de los metales pesados al interior de la planta y, después, al interior de la célula. La raíz constituye el tejido de entrada principal de los metales, los cuales llegan por difusión en el medio, mediante flujo masivo o por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células, debido a la presencia de grupos carboxilo, que interaccionan con las positivas de los metales pesados, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular, ya sea por vía apoplástica o simplástica (Navarro *et al.*, 2007).

Fase II. Una vez dentro de la planta, las especies metálicas son secuestradas o acomplejadas mediante la unión a ligandos específicos (Navarro *et al.*, 2007). Entre los quelantes producidos por las plantas se encuentran los ácidos orgánicos (ácidos cítrico, oxálico y málico), algunos aminoácidos (histidina y cisteína) y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metaloteínas (Navarro *et al.*, 2007). Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que tienen como sustrato al glutatión. Están constituidas básicamente por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina, unidos por enlaces peptídicos. Las metalotioneinas son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfidrilo. Tienen una marcada afinidad por las formas iónicas de Zn, Cd, Hg y Cu. (Navarro *et al.*, 2007).

Fase III. Involucra la compartimentalización y detoxificación, procesos por el cual, el complejo ligando-metal queda retenido en la vacuola (Navarro *et al.*, 2007).

La fitoextracción o fitoacumulación consiste en la absorción de metales contaminantes mediante las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas. El primer paso para la aplicación de esta técnica es la selección de las especies de planta más adecuada para los metales presentes. Una vez completado el desarrollo vegetativo de la planta el siguiente

paso es cortarlas y proceder a su incineración y traslado de las cenizas a un vertedero de seguridad. La fitoacumulación se puede repetir ilimitadamente hasta que la concentración remanente de metales en el suelo esté dentro de los límites considerados como aceptables (Kumar *et al.*, 1995). Algunas plantas empleadas para esta técnica fitocorrectiva son: *Thlaspi caerulescens* (Cd) (Begonia *et al.*, 1998); *Sedum alfredii*, *Viola baoshanensis* y *Vertiveria zizanioides* (Zn, Cd, Pb) (Reeves. 2003); *Alyssum murale*, *Trifolium nigriscens*, *Psychotria douarrei*, *Geissois pruinosa*, *Homalium guillainii*, *Hybanthus floribundus*, *Sebertia acuminata*, *Stackhousia tryonii*, *Pimelea leptospermoides*, *Aeollanthus biformifolius* y *Haumaniastrum robertii* (Ni) (Schwartz *et al.*, 2003); *Brassica juncea*, *Helianthus annuus*, *Sesbania drummondii* (Pb) (Wenzel *et al.*, 2003; Odjegba *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2004); *Brassica napus* (Cu, Pb, Zn); y *Pistia stratiotes* (Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) (; Boonyapookana *et al.*, 2005; Chandra *et al.*, 2005 y Zhuang *et al.*, 2007).

2.6. Cultivo de tejido de plantas halófitas

La propagación vegetativa de plantas mediante el uso de técnicas de cultivo *in vitro* se conoce comúnmente como micropropagación, término que hace referencia a que la cantidad de material vegetal necesaria para iniciar el cultivo es pequeña, mucho menor que en las técnicas tradicionales de propagación vegetativa, también conocidas colectivamente como macropropagación; existen diferentes opciones para realizar propagación vegetativa mediante cultivo *in vitro* por la multiplicación a partir de yemas ya existentes (apicales o axilares) (Pérez-Molphe *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

S. edulis es una planta que crece en el cráter del Volcán Rincón de Parangueo en Valle de Santiago en el estado de Guanajuato, en un suelo con pH 9.2 y 34.8 mq/L de NaCl, estas son condiciones de constante estrés para la mayoría de las plantas, que tienen un adecuado desarrollo en un rango de pH 5.0 a 7.0, y con una salinidad de 4.08 cmol/kg (Mendez García *et al.*, 2008). Estas cualidades, hacen suponer que *S. edulis* podría tener capacidad de desarrollarse también en suelos contaminados con metales pesados con potencial uso en la fitorremediación. Por lo que en este trabajo se realizó una investigación sobre la tolerancia de esta planta a altas concentraciones de salinidad y exposición de metales pesados. Además, el estudio de expresión de los genes para una dehidrina y para la pirrolina-5-carboxilato sintetasa en *S. edulis* en relación con el estrés por salinidad y metales pesados, abre la posibilidad de utilizar estos genes para mejorar la tolerancia de plantas de interés agrícola o fitorremediadoras.

4. HIPÓTESIS

Si *S. edulis* es una planta tolerante al estrés salino, podría serlo también a Cu, Cd.

La exposición de plántulas de *S. edulis* a NaCl, Cu y Cd inducirá la expresión de los genes *SeDHN* y *P5CS*.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Identificar y analizar la expresión de los genes *SeDHN* y *P5CS* en *S. edulis* cultivada *in vitro*, y analizar la capacidad de captación de metales pesados.

5.2. Objetivos Particulares

- 1.-Analizar la capacidad de *S. edulis* de acumular sodio, cobre y cadmio.
- 2.-Identificar y analizar *in silico* los genes *SeDHN* y *P5CS*.
- 3.-Analizar la expresión de los genes *SeDHN* y *P5CS* bajo tratamientos de salinidad y exposición a Cu y Cd.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal y condiciones de cultivo *in vitro*

Se seleccionaron plántulas de *S. edulis* del Banco de Germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (edificio #60). El material vegetal, se propagó a partir de yemas axilares, en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), preparado según las especificaciones señaladas en el anexo B.1. Se incubaron a 25°C en fotoperiodos de 16 h luz, 8 de oscuridad. El material vegetal fue utilizado para exponerlo a condiciones de estrés abiótico y para la obtención de ADN.

6.2 Exposición del material vegetal a estrés abiótico

Plántulas de *S. edulis* cultivadas *in vitro* de aproximadamente 130 mg en peso fueron seleccionadas para el experimento de exposición. Grupos de 6 plantas fueron incubadas en frascos con 50 ml de medio MS líquido (Anexo B1), complementado con 100 o 250 mg/ml de CuSO_4 ; 100 o 250 mg/ml CdCl_2 ; o 300 o 600 mg/ml NaCl , o en medio basal, durante 72 h en agitación continua. El material vegetal fue procesado para la cuantificación de metales y para la extracción de ARN para el análisis de expresión genética.

6.1. 6.3 Análisis de la cantidad de sodio, cadmio y cobre en plántulas de *S. edulis* mediante espectroscopía de absorción atómica

Las plántulas previamente expuestas a condiciones de CuSO_4 , CdCl_2 y NaCl Se mantuvieron en ácido nítrico por 2 semanas, se filtraron y posteriormente se calentaron por 2 h en baño de agua a ebullición, para ayudar a disolver los tejidos. Se filtró en papel whatman 1 y se añadió ácido nítrico 0.2% V/V. Las muestras se analizaron mediante espectroscopía de absorción atómica, en el equipo Pinnacle 900T, con corrector Zeeman, marca Perkin Elmer, con Autosampler AS-90Plus.

6.1.1. 6.4 Extracción de ADN a partir de tejido fresco de *S. edulis*.

Se realizó una extracción de ADN del tejido fresco mediante el método CTAB (Murray *et al.*, 1980) con modificaciones implementadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes: 2 mg de tejido congelado a -70°C por 24 h se pulverizó con la ayuda de un mortero, se colocó en un microtubo de 1.5 ml cuidando que no se descongelara la muestra; se agregaron 0.8 ml de buffer de lisis y se incubó a 65°C por 10 min agitando constantemente; pasado este tiempo las muestras se incubaron en hielo por 5 min. Se agregaron 300 µl de NaCl 1.4 M, se mezcló bien y se añadió un volumen de fenol- cloroformo (1:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó 5 min a 12 000 rpm. Posteriormente la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 1 volumen de cloroformo –alcohol isoamílico (24:1), se agitó fuertemente y se centrifugó 5 min a 12 000 rpm. Se transfirió la fase acuosa en un nuevo tubo; se agregó 1 volumen de isopropanol, se agitó por inversión 10 veces y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se centrifugó 5 min a 12 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con 100 µl de etanol al 70%. La pastilla se secó y se resuspendió en 50µl de agua. Las muestras de ADN se conservaron a 4°C.

El ADN se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV en el fotodocumentador DyNA Ligt Dual Intensity UV de Labnet. Se cuantificó y determinó la pureza del ADN extraído con el espectrofotómetro Thermo scientific modelo Genesys 10S UV -VIS a las longitudes de onda 260 y de 280 nm.

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

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

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

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

(Concepción *et al.*, 2005)

6.5 Amplificación de los genes *SeDHN* y *P5CS* mediante PCR

Las amplificaciones de los fragmentos se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando el kit comercial Hot Start Mix PCR Reaction. La mezcla de reacción consistió en: 2 µl de agua libre de nucleasas, 5µl del Mix Hot start, 1 µl de c/ oligonucleótido y 1 µl de ADN (50ng aproximadamente). Se aplicaron las condiciones de amplificación como se muestra en la Tabla 2.

Se utilizó un termociclador de gradientes de temperatura marca CORBETT Research. Las muestras amplificadas se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizadas bajo luz UV.

Tabla 2. Condiciones y oligos que se utilizaron en los PCRs.

Gen	Oligos	Condiciones de amplificación
LEA	FSeDHN 5' GAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC 3' RSeDHN 5' GAAGGGGGTTGATCACA CTCCA CA 3'	95°C/ 5 min; 30 ciclos de 95°C/ 1 min, 59°/ 1 min, 72°C/ 1 min; 72°C/ 7 min.
P5CS	FP5CS 5' CAGTTTGGATATGGCGAAGCAGAT 3' RP5CS 5' GAGCAAAACCCAACCCACGAC 3'	95°C/ 5 min; 30 ciclos de 95°C/ 1 min, 55°/ 1 min, 72°C/ 1 min; 72°C/ 7 min.
ACT	Factina: 5' AACTGGGATGACATGGAGAA 3' Ractina: 5' ATCACACTTCATGA TGGAGTTGTA 3'	94°C/ 5 min; 30 ciclos de 94°C/ 1 min, 50°C/ 1 min, 75°C/ 1 min; 75°C por 7 min.

6.6 Purificación y secuenciación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega): el producto de PCR se mezcló con un volumen igual de la solución "membrane binding", se depositó en una microcolumna colocada en un tubo de colecta, se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifugó a 16,000 g durante 1 min, se descartó el filtrado, se añadió 700µL de la solución "membrane wash" y

se centrifugó a 16,000 g por 1 min, se descartó el filtrado. Se realizó un segundo lavado añadiendo 500 μ L de la solución “membrane wash” y se centrifugó a 16,000 g por 5 min. Posteriormente para eliminar los residuos de etanol se centrifugó a 16,000 g por 1 min y se dejó la columna a temperatura ambiente por 20 min. La microcolumna se pasó a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y se le añadió 30 μ L de agua libre de nucleasas y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Para finalizar se centrifugó a 16,000 g por 1 min, se desechó la microcolumna y se almacenó el filtrado con el ADN purificado a 4°C. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT) en el estado de San Luis Potosí.

6.7 Análisis bioinformático

Se realizó una búsqueda de genes homólogos de las secuencias obtenidas en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional de información Biotecnológica (NCBI; [65 http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mediante la herramienta nucleotide blast (Blastn). Además, se hizo una traducción virtual de estas secuencias utilizando la plataforma ExPASy del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://web.expasy.org/translate/>), y con la secuencia de nucleótidos obtenida se realizó una búsqueda de proteínas homólogas con el programa BLAStx del NCBI. Se realizó un alineamiento múltiple de aminoácidos en el programa MegAlign DNASTAR 3.0 con el método ClustalW (DNASTAR, Inc.). Así mismo, se realizó una búsqueda de motivos conservados en la plataforma MEME (Motif-based sequence analysis tools; <http://meme.nbcr.net/meme/>) de Bailey y Elkan (1994) y una búsqueda de dominios funcionales con la herramienta PROSITE (Database of protein domains, families and functional sites) del servidor EsPASy del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://prosite.expasy.org/prosite.html>).

6.8 Análisis de la expresión genética

6.8.1 Extracción de ARN

Se extrajo ARN total del tejido expuesto a condiciones de estrés utilizando el kit PureZol de BioRad. Se pesaron 100 gr de tejido fresco pulverizado y se le agregó 1 ml de PureZol, se homogenizó y se dejó incubar por 24 h a 4°C, al término de ese tiempo se le agregaron 0.2 ml de cloroformo mezclándolo vigorosamente por 15 min, se dejó incubar a temperatura ambiente por 24 h, se centrifugó a 12000 RPM por 15 min a 4°C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se le adicionaron 0.5 ml de alcohol isopropílico, se incubó por 5 min a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 12000 RPM por 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet adicionando 1 ml de etanol al 70%, se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 7500 RPM por 5 min a 4°C, se adicionaron 50 µL de agua libre de RNAsa (agua tratada con DEPC) y se almacenó a -80°C.

6.8.2 RT-PCR en tiempo real

El análisis de expresión se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR) en La Paz, Baja California Sur en el laboratorio de Ecología Microbiana Molecular con el Dr. Abraham Loera Muro. La síntesis de cDNA se realizó con el kit Scientific First Strand Synthesis (Thermo Scientific): en un micro tubo libre de nucleasas se adicionó 1 µL del Buffer DNasa 10X, 1 µL de DNasa, 5 µg del templado de ARN y agua libre de nucleasas para completar 10 µL, se mezcló, y centrifugó, para después incubar a 37°C por 2 min. Se adicionaron 4 µL del Mix de Reacción 5X, 2 µL del Mix de Enzima Máxima y por último 4 µL de agua libre de nucleasas. Se mezcló y se centrifugó para después incubar a 25°C por 10 min, al término de ese tiempo se incubó a 50°C por 15 min y después a 85°C por 5 min. El producto de la síntesis se dejó a -20°C para su posterior uso. Se cuantificó en un Nanodrop 2000 Spectrophotometer de ThermoScientific. La amplificación de los transcritos se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción: 5.0 µL de SYBER Green (Mezcla maestra de RT-PCR, Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA), 0.3 µM de cada oligonucleótido, 10 ng de cDNA, 3y agua en una reacción con volumen total de 10µL. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos que se utilizaron para el RT-PCR en tiempo real.

Gen	Oligonucleótido
<i>PSe5CS</i>	FSeP5CS: 5'GCGTTGGCAGTCATTCTTT' RSeP5CS: 3'GATGTTTCATGCTGCCATTGA'
<i>SeDHN</i>	FSeDHNtr: 5'ATTAGGAGAAACTTCCAGGC3' RSeDHNtr: 3' ACGTGGATCTTCTCTATTGC5'
<i>B-Tub</i>	FSeβTub: 5' 5'GCGTTGGCAGTCATTCTTT' RSeβTub: 3' GATGTTTCATGCTGCCATTGA'

Las condiciones de amplificación del RT-PCR fueron: 95°C por 20 s, 40 ciclos de 95°C por 3 s y 59°C por 30 s. La curva Melt o de disociación se realizó por 80 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 30 s y 60°C por 15 s. La reacción se realizó en un equipo Bio Rad CFX96 Real-Time System.

6.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa STATISTICA 8.0 de Stat Soft. Inc. Se compararon los tratamientos mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tuckey (α 0.05). Los gráficos se realizaron en el programa GraphPad Prism 6.0. Todos los resultados fueron calculados de datos de al menos tres experimentos independientes y representan la media de las repeticiones \pm una desviación estándar.

7 RESULTADOS

7.1 Análisis de la capacidad *S. edulis* de acumular sodio, cobre y cadmio

7.1.1 Efectos físicos en plantas expuestas a sodio, cobre y cadmio

En las plantas expuestas a concentraciones de 100 y 250 $\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 y de CuSO_4 durante 72 h no se observan cambios drásticos en la planta solo cambió un poco de color ya que se tornó un poco etioladas (Fig. 4A y 4B). Por su parte, en las plantas expuestas a 300 y 600 $\mu\text{g/L}$ de NaCl por 72 h, se observó que las puntas de las hojas y de las raíces se ennegrecieron.

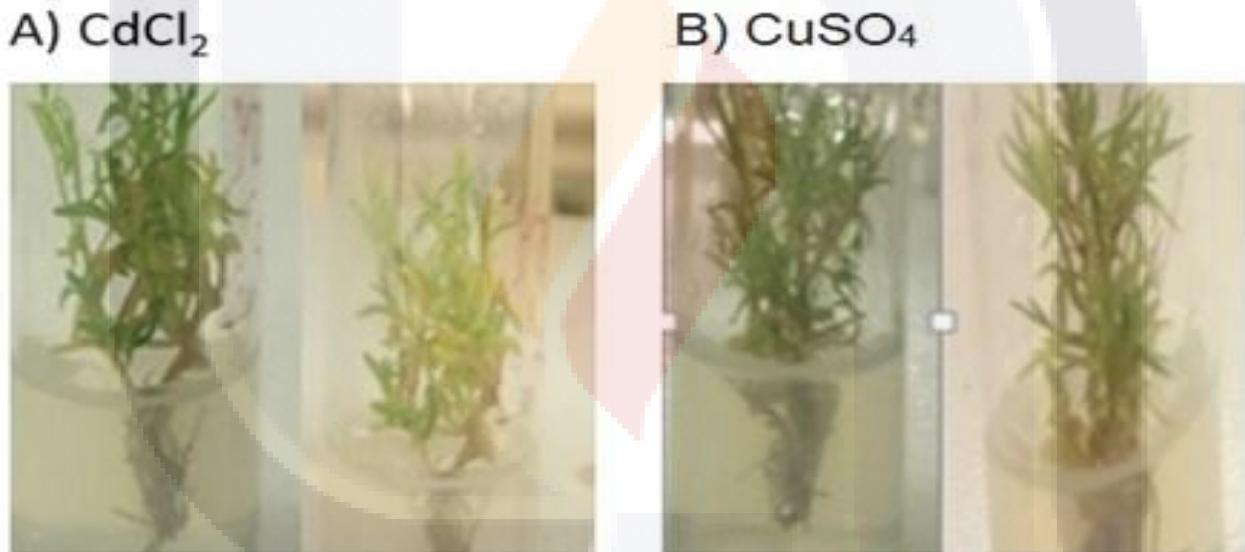


Figura 4. *S. edulis* expuesta a 100 $\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 y CuSO_4 a 0 y 72 h.

7.1.2 Determinación de Cu, Cd y NaCl en *S. edulis* por espectroscopía de absorción atómica

Mediante espectroscopía de absorción atómica se determinó el contenido de cobre, cadmio y sodio en plantas expuesta a CuSO_4 , CdCl_2 y NaCl , respectivamente. En la Tabla

4 se muestran los resultados. Las plantas de *S. edulis* expuestas a 100 y 250 µg /L de CuSO₄ acumularon 7.58 y 12.97 µg/100mg de cobre; las de 100 y 250 µg/L de CdCl₂, 12.26 y 19.57 µg /100 mg de cadmio; y las de 300 y 600 µg /L de NaCl, 3.43 y 4.39 µg /100 mg de sodio (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de Cu, Cd y Na por espectroscopía de absorción atómica. *Datos despreciables de acuerdo al margen de error que hay en el espectrómetro.

Tratamiento µg /L	EN EL MEDIO (MS) µg /L	EN LA PLANTA µg/100mg
COBRE		
0	1.180 ± 0.0075	1.29
100 CuSO ₄	13.89 ± 0.0038	7.58
250 CuSO ₄	34.72 ± 0.142	12.97
CADMIO		
0	0.00 ± 0.005	0.000
100 CdCl ₂	24.45 ± 1.408	12.26
250 CdCl ₂	61.125 ± 0.96	19.57
SODIO		
0	1.08 ± 0.080	0.62
300 NaCl	5.33 ± 0.077	3.43
600 NaCl	13.32 ± 0.056	4.39

7.2 Identificación de genes de *S. edulis* involucrados en la tolerancia a salinidad, Cu y Cd

Mediante PCR, se realizó una amplificación de los genes *P5CS* y el de la proteína LEA 2 (llamado *SeDHN* like haciendo referencia a *S. edulis*), para secuenciarlos e identificarlos mediante análisis bioinformático. El producto de PCR del gen *P5CS* fue de 750 pb mientras que el de *SeDHN* like fue de 500 pb (Fig. 5). En la Figura 6 se muestra la secuencia obtenida de la amplificación del gen *SeDHN*-Like de 426 nucleótidos

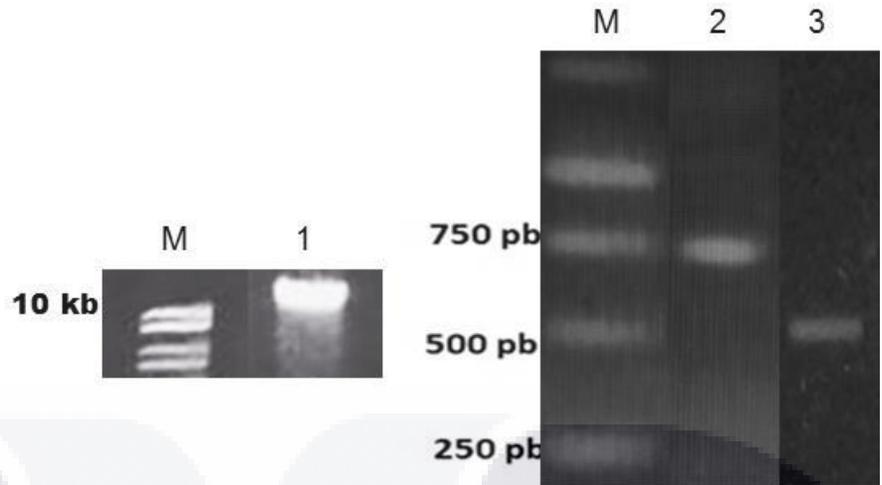


Figura 5. Análisis de PCR. Análisis electroforético en geles de agarosa: M) Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega), 1) DNA de *S. edulis*, 2) PCR de *P5CS*, 3) PCR de *SeDHN* like.

```

ACTTCAGTGTAGAGAGAAGAAGGAGGATTGAGGAGAGATTAGGAGAAACTTCC
AGGCCACCCACAAGGAACAGGAAGAAGAACAAGAGGACAAGAAAAAGGAT
CATCATCATCATGATGAAGAGGACACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCAC
GTGGAAGAGGTGATCTACTCGGATCCATCTTACCCTGCCCCGGCCCCACCGCC
ACCTCATTGGAGGCCGAAGGGAAGAAGAAGGGGCTGCTTGACAAGATCAA
GGACAAGCTGCCACGTCAGCACAAAGAAGGCCGAGGTGCGAGCAGGAGGTG
GTCCCAACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCCAGGAGAAGAT
CGGGTTCTTGAACAAGATCAAGAACAATATCCCTGGCTTCCACTCTCCTGCTCT
GAGGAGGACGATAAGGATGTGGAGTGTGATCAACCACCTTCATGATAAGTAT
    
```

Figura 6. Secuencia del producto de PCR del gen *SeDHN* like de *S. edulis*.

La comparación de la secuencias en nucleótidos en la base de dato mostró que el fragmento tienen una identidad entre el 93 y 95 % con *OpsDHN1* (No. de acceso HM581971.1), *Leuchtenbergia principis* Dehidrin (No. de acceso KP720562.1) y *Opuntia ficus indica* Dehidrin (No. de acceso KP720561.1) (Tabla 5). La traducción virtual de las tres secuencias está dada para *OpfiDHN-like* con 148 aminoácidos (número de acceso en NCBI: AKC92526.1), *LepDHN-like* con 164 aminoácidos (número de acceso en NCBI: AKC92527.1) y *MabDHN-like* con 145 aminoácidos (número de acceso en NCBI: AKC92525.1) (Tabla 5), todos con un MLA (marco de lectura abierto) de +1.

Tabla 5. Genes homólogos del gen *SeDHN-Like*.

Descripción	Max	Total	Valor	Valor e	Identidad	N° de acceso
<i>Opuntia Streptacantha</i> DHN1	649	649	95%	0.0	93%	HM581971.1
<i>Leuchtenbergia principis</i> Dehidrin	638	638	95%	5e-179	93%	KP720562.1
<i>Opuntia ficus indica</i> Dehidrin	616	616	84%	2e-172	95%	KP720561.1
<i>Mammillaria borbicina</i> Dehidrin	608	608	93%	4e-170	92%	KP720560.1

Se alinearon la secuencia de la proteína *SeDHN-Like* de *S. edulis* y las secuencias parciales de las proteínas de *Opuntia ficus-indica* tipo dehidrina (*Opfi-DHN like*), *Leuchtenbergia principis* tipo dehidrina (*Lep-DHN like*) y *Mammillaria borbicina* tipo dehidrina (*Mab-DHN like*) y *Opuntia streptacantha* (*OpsDHN like*). El alineamiento múltiple en aminoácidos mostró la similitud que comparten *OpfiDHN-like* (KP720561.1), *LepDHN-like* (KP720562.1) y *MabDHN-like* (KP720560.1) con *S. edulis SeDHN-Like*, esta similitud se presenta principalmente en los segmentos conservados para las dehidrinas como es el segmento K y un segmento rico en histidinas (H), en que *OpfiDHN-like* y *OpsDHN1* tiene 6 H; *LepDHN-like* y *MabDHN-like* tienen tres H, y *SeDHN like* cuenta con 5 H., como se muestra en el recuadro verde y en los recuadros rojos se encuentran resaltados los segmentos K como se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de diferentes dehidrasas. El recuadro verde muestra los segmentos ricos en histidina, y los recuadros rojos resaltan los segmentos K.

7.3 Análisis de expresión mediante RT-PCR en tiempo real

Se comparó la expresión genética de plantas de *S. edulis* expuestas a condiciones de estrés salino y por la presencia de metales pesados. Se realizó un análisis de expresión en tiempo real de los genes *P5CS* y *SeDHN* like. Los resultados de expresión se muestran en las Figuras 11 y 12.

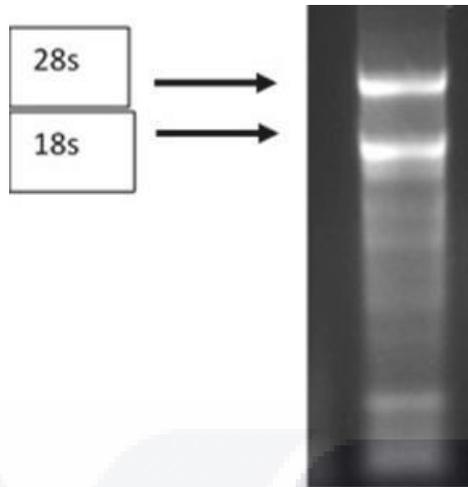


Figura 8. RNA total de *Suaeda edulis*. Se observa la presencia de dos bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del RNAr de *Suaeda edulis*.

En la Figura 9 se representa la comparación de la expresión del gen *SeDHN like*, y en la Figura 10 la expresión del gen *P5CS*. La expresión de ambos genes, de acuerdo a los resultados estadísticos, mostró diferencias significativas con respecto al control (normalizado a cero), más no entre los tratamientos en la prueba de comparación de medias con el método de Tuckey ($\alpha 0.05$).

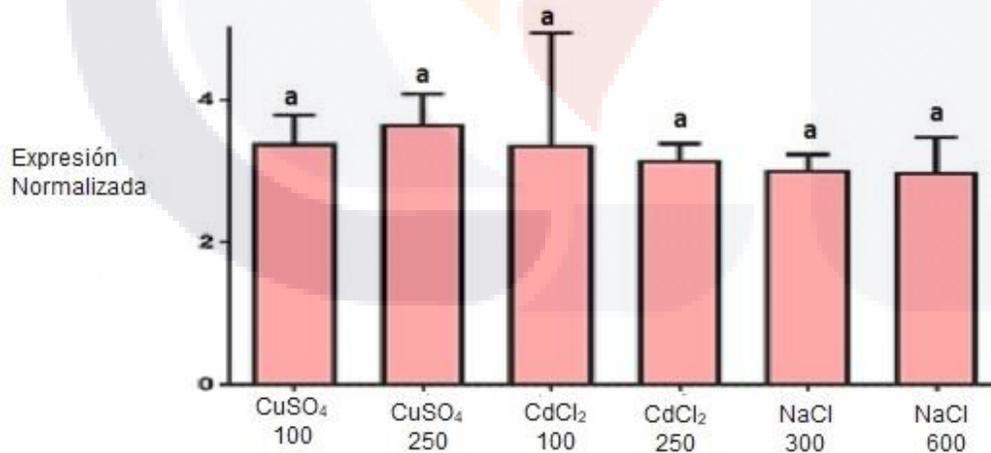


Figura 9. Nivel de expresión del gen *SeDHN-Like* ante estrés por salinidad, CuSO₄ y CdCl₂ por 72 h. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos, pero si se observa una elevada expresión si se compara con la expresión del control (normalizado a cero).

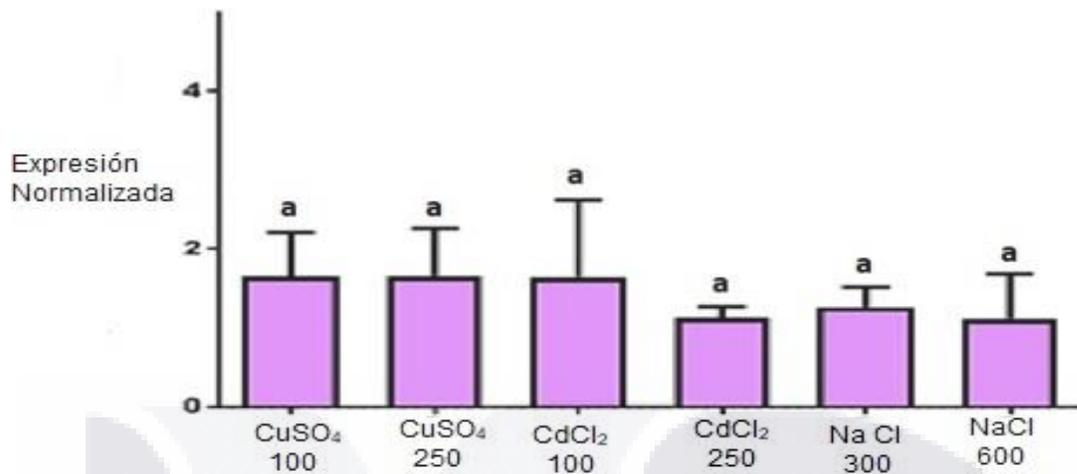


Figura 10. Nivel de expresión del gen *P5CS* ante estrés por salinidad, CuSO₄ y CdCl₂ por 72 h. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos, pero si se observa una elevada expresión si se compara con la expresión del control (normalizado a 0).

8 DISCUSIÓN

Bioacumulación de Na, Cu y Cd por *S. edulis*

Para medir la capacidad de bioacumulación de metales, plántulas de *S. edulis* fueron expuestas a CuSO_4 y CdCl_2 durante 72 h. En estas condiciones se observó que las plántulas comenzaron a cambiar su coloración, ya que el color verde de la plántula se comenzó a tornar de color amarillo (Fig. 4). Las plántulas expuestas fueron analizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica y los resultados muestran que las plántulas control de *S. edulis* contienen $1.29 \mu\text{g}/100 \text{ gr}$ de Cu, esto es debido a que el cobre es elemento esencial en los componentes del medio MS (Tabla 4) (Murashige y Skoog, 1962). Por otro lado, se observa que conforme se eleva la concentración de Cu en el medio, también se incrementa en la planta por ejemplo; de $13.89 \mu\text{g}/\text{L}$ en el medio se cuantificó en la planta $7.58 \mu\text{g}/100 \text{ gr}$ y para $34.72 \mu\text{g}/\text{L}$ en el medio y en la planta fue de $12.97 \mu\text{g}/100 \text{ gr}$. Estos resultados son similares a los de Ait *et al.* (2002) quienes evaluaron la bioacumulación y la tolerancia de Cu en maíz (*Zea mays* L.) y observaron que a mayor concentración de Cu en el medio hidropónico, se incrementa la concentración en las raíces y partes aéreas de la planta. Aunque el maíz es una glicófita, y no una halófito como *S. edulis*, también muestra una relación entre la concentración que hay en el medio y la absorbida por la planta. A la fecha no hay trabajos en *S. edulis* sobre la captación de metales, pero sí para otras halófitas. Sepúlveda *et al.* (2013) observaron que *Salicornia sp.*, cultivada en macetas con relaves con una concentración de Cu $94600 \mu\text{g}/100 \text{ gr}$, bioacumuló el metal hasta una concentración de $18200 \mu\text{g}/100 \text{ gr}$. En comparación con nuestros resultados *Salicornia sp.* tiene una mayor absorción de Cu que *S. edulis*, sin embargo hay que tener en cuenta el tiempo de exposición, ya que estas plantas siempre han estado en suelos contaminados con Cu y en nuestro trabajo las plántulas solo estuvieron en exposición por 72 h. Otro ejemplo donde se ha trabajado con plantas en suelos contaminados con Cu son los estudios de Wang *et al.* (2008) encontraron valores muy bajos de bioconcentración para Cu en la especie *Humulus scandens* con $220 \mu\text{g}/100 \text{ gr}$ en plantas que crecen en torno a minas, lo que indica que la bioacumulación depende de la eficiencia de cada especie.

Por su parte, en los estudios de absorción de Cd, en las plantas control no se encontró el metal, pero en las expuestas a una concentración en el medio de $24.45 \mu\text{g}/\text{L}$ de Cd, se cuantificaron $12.26 \mu\text{g}/100 \text{ gr}$. Entre los pocos estudios de captación de Cd en *Suaeda*, se encuentra un reporte con *S. frutescens* en donde la evaluaron como planta biorremediadora,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

para lo que fueron irrigadas por un mes con soluciones de NaCl, Cd y Cu, con el fin de analizar la respuesta de compuestos tales como glutatión, fitoquelatinas y EROs (I. Bankaji *et al.*, 2015). Estudios similares fueron realizados con *S. salsa* para analizar la captación de metales en sedimentos de descomposición en la zona del río amarillo en China, donde se diseñaron tres tratamientos de enterramiento de desechos con altos niveles de Cu, Zn, Cd, Co, Cr y Mn, en la zona intermareal del estuario del río Amarillo para determinar los efectos de los metales en los sedimentos durante la descomposición de los desechos y el efecto que tenían en la planta salsa *S. salsa*, sin embargo los resultados fueron muy inconsistentes, ya que algunas veces acumulaban algunos metales y otras veces los liberaban, esto conforme aumentaban la profundidad del entierro (Zhigao *et al.*, 2017). Así mismo con *S. vera* para verificar su uso potencial en la fitoextracción de metales del suelo y evaluar el impacto de diferentes agentes quelantes, como los ácidos orgánicos naturales en la captación y translocación de metales. En este estudio se observó que la mayor acumulación de metales ocurrió en las raíces 2733-5076 µg/100 gr (Gómez-Garrido *et al.*, 2018). Aunque nuestros resultados se realizaron *in vitro*, se ha demostrado que *S. edulis*, al igual que otras especies de *Suaeda*, es capaz de bioacumular Cu y Cd, y pudiera ser utilizada en la fitorremediación de suelos contaminados.

También se analizó la capacidad de acumulación de Na en plántulas de *S. edulis* expuesta a NaCl durante 72 h, mediante espectroscopía de absorción atómica. Los resultados mostraron que tanto las plántulas del grupo control (0.62 µg/ 100 g) como las expuesta a NaCl acumulan hasta 4.39 µg/100 gr de Na, cuando el medio contenía 13.32 µg/L. de este elemento. La acumulación de Na no fue tan alta como con Cu y Cd.

Identificación del gen tipo dehidrina en *S. edulis*

En lo que respecta a la identificación del gen tipo dehidrina en *S. edulis*, (*SeDHN-like*), mediante PCR se obtuvo un fragmento de 500pb (Fig. 6). La secuencia en nucleótidos tiene características similares a las del fragmento identificado por Hernandez-Camacho *et al.*, (2017), de *M. bombycina* (*MabDHN-like*), además tiene una similitud del 93 y 95% con las dehidrinas de *Opuntia streptacantha* (*OpsDHN1*), y *L. principis* (*LepDHN-like*) (Tabla 7).

En el alineamiento múltiple se confirmó que el fragmento amplificado corresponde a un segmento de un gen *lea* tipo 2 (Fig. 7). En el alineamiento con las secuencias de *SeDHN-Like*, *OpfiDHN-like*, *MabDHN-like*, *LepDHN-like* y *OpsDHN1* se observó que contienen tres

repeticiones del segmento K (Fig. 7), este es muy similar al reportado por Sun *et al.*, (2013) quien realizó una comparación de la secuencia de aminoácidos de AmDHN de *Ammopiptanthus mongolicus* con otras dehidrinas reportadas en la base de datos NCBI y encontró una región conservada EKKGIMNKIKEKLPK correspondiente al motivo o segmento K. Este segmento tiene una gran relevancia en cuanto a su función ya que cuando las proteínas están expuestas a un ambiente de deshidratación forman una α -hélice anfipática que permite su unión con otras proteínas parcialmente desnaturalizadas (Qiu *et al.*, 2014). En nuestra secuencia también, se identificó un motivo rico de 5 histidinas (H) que está presente en otras dehidrinas de plantas, que también coinciden con los resultados de Hernández-Camacho *et al.*, (2017) donde trabajaron con las cactáceas *O. ficus indica* (OpfiDHN-like), *M. bombycina* (MabDHN-like) y *L. principis* (LepDHN-like) en donde sólo encontró fragmentos de 3 Histidinas. Sin embargo, este fragmento se ha encontrado en varias especies como *Saussurea involucreta* (Qiu *et al.*, 2014), *Ricinus communis* (Krüger *et al.*, 2002), *Opuntia streptacantha* (Hernández-Sánchez *et al.*, 2015), *Sorghum bicolor* (Halder *et al.*, 2015) e híbridos de *Triticum aestivum* L. x *Thinopyrum ponticum* (Qin y Qin, 2016).

Estudios de expresión

Las plántulas expuestas a Cu, Cd y NaCl fueron analizadas mediante PCR en tiempo real para evaluar la expresión de los genes *SeDHN-LIKE* y *P5CS*. Se observó una mayor expresión de *SeDHN-LIKE* en las plántulas expuestas que en las del control (Fig. 9). Este aumento de expresión se debe posiblemente a que *SeDHN-LIKE* consta de 5 histidinas que ha mostrado unirse a iones metálicos (Qin y Qin, 2016). También Hara (2005), menciona que dos histidinas juntas en su secuencia contribuyen con una unión más fuerte con los iones metálicos que las proteínas que tienen separados estos aminoácidos en el mismo dominio. Así mismo, otros autores como Halder *et al.*, (2015) y Hara (2016) han reportado que este segmento rico en histidinas puede ayudar a recobrar la actividad de ciertas proteínas desnaturalizadas por la presencia de metales, por lo que esta acción puede ayudar a prevenir un daño fisiológico en las plantas ante estrés por metales pesados. Watson, (2006) menciona que si las condiciones de estrés hídrico se prolongan con el tiempo, se acumulan también algunas proteínas LEA que evitan la agregación de proteínas o ayudan en su plegamiento, según los aminoácidos correspondientes al segmento K de las dehidrinas. Así mismo, Rosales *et al.*, (2014) mencionan que el segmento K junto con

el segmento ϕ de la dehidrina DHN1 de *Vitis vinifera* juega un rol muy importante ante la respuesta a estrés biótico y abiótico ya que actúa como un escudo molecular de las proteínas parcialmente desnaturalizadas en lugar de como una chaperona clásica interactuando directamente con proteínas desnaturalizadas. La SeDHN-like también contiene estos segmentos K. Esto también coincide con los estudios de Selvam *et al.* (2012) quienes realizaron trabajos con *S. asparagoides* en donde identificaron una proteína LEA tipo 2 inducida por estrés salino, mencionan que la transcripción de *SaDhn* se indujo específicamente por estrés salino, postulan que la Dehidrina ejerce un papel citoprotector contra la deshidratación. Sin embargo Hernandez-Camacho (2016), menciona que no encontró un aumento de la expresión diferencial de *MabDHN* en *M. bombicyna* con el control ante NaCl 250 mM por lo que este gen no tiene un papel importante ante estrés por alta salinidad a esta concentración, pero hay que tomar en cuenta la diferencia de especies, ya que hay una gran diferencia entre una cactácea como *M. bombicyna* que no tiene actividad de las dehidrinas en presencia de salinidad y la *S. asparagoides*, que cuenta con mecanismos totalmente diferentes ante varios tipos de estrés abiótico incluidos su respuesta favorable a la salinidad (Monther *et al.*, 2014).

En los resultados de *P5CS*, se observó una expresión del gen en las plántulas expuestas a Cu, Cd y NaCl, 1.7 veces mayor que en las del control. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las plántulas tratadas con Cu, Cd y NaCl (Fig. 10). Bagdi *et al.* (2015), en estudios de la expresión del gen *P5CS* en arroz y otras plantas observaron una expresión de 1.35 veces mayor que el control cuando están en condiciones de estrés salino, estos mismos autores indican que a altas concentraciones de NaCl (4.25 mM) disminuyen la actividad de la enzima *P5CS* y que a bajas concentraciones (85 mM) se incrementan.

En estudios realizados con *S. marítima* bajo estrés salino, Binod B Sahu *et al.* (2009) observaron que la *P5CS* es una proteína importante para la adaptación salina. Así mismo Lei Zhang *et al.* (2001) en estudios con *S. salsa* tratadas con altas concentraciones de NaCl observaron una mayor expresión de *P5CS*. En otros estudios con el transcriptoma de *S. fructicosa* en tratamientos bajo condiciones de salinidad, se observó que también hay una sobre expresión de la *P5CS* (Diray-Arce *et al.*, 2015). Estudios similares se hicieron en *S.*

glauca (Hangxia-Jin *et al.*, 2016). Los estudios de expresión de *P5CS* en otras especies de Suaeda son coincidentes con los nuestros en *S. edulis*.



9 CONCLUSIONES

Se comprobó que bajo condiciones *in vitro* *S. edulis* es capaz de bioacumular Cu, Cd y Na.

Se identificó un gen tipo dehidrina en *S. edulis* (*SeDHN-like*), la traducción virtual del fragmento mostró la presencia de 2 segmentos K, y un segmento de 5 histidinas presentes en las proteínas LEA 2.

Se observó que la expresión de los genes *SeDHN-Like* y *P5CS* en plantas expuestas a Cu, Cd y salinidad fue mayor que las del control, aunque no se encontraron diferencias significativas de expresión entre los diferentes tratamientos.



10. BIBLIOGRAFÍA

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. and Barberis, R. 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*, 119: 177
- Ait A.A., Pilar B.M. y Ater M. (2002). Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil*. 239, 103–111.
- Allagulova, Ch.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., and Vakhitov, V.A., The plant dehydrins: structure and putative functions, *Biochemistry (Moscow)*, 2003, vol. 68, pp. 945–951.
- Amara, I., Odena, A., Oliveira, E., Moreno, A., Masmoudi, K., Pagès, M. y Goday, A. 2012. Insights into Maize LEA Proteins: From Proteomics to Functional Approaches. *Plant Cell Physiol*. 53(2): 312-329.
- Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A. and Blumwald E. 1999 Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**, 1256–1258.
- Arduini I., Godbold L., Onnis A. (1996). Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedling. *Physiol Plantarum*, 97, 111-117.
- Arduini C., Kettner C., Godbold L., Onnis A., Stephanie A. (1998). pH influence on growth and nutrient uptake of *Pinus pinaster* seedling. *Chemosphere* 36(4-5), 733-738.
- Armengaud P, Thiery L, Buhot N, Grenier-De March G, Savoure A. (2004) Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiol Plant* 2004;120:442–50.
- Ashraf, M, y Fooland, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59(2): 206-216.
- Bagdi DL, Shaw BP, Sahu BB, Purohit GK. (2015). Real time PCR expression analysis of gene encoding p5cs enzyme and proline metabolism under NaCl salinity in rice. *J Environ Biol*. 2015 Jul;36(4):955-61.
- Battaglia, M., Olvera, C. Y., Garcarrubio, A., Campos, F. y Covarrubias, A. A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 148: 6-24.
- Bartels D. y Sunkar R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 24, 23-58.
- Banzai T., Hershkovits G., Katcoff D. J., Hanagata N., Dubinsky Z. and Karube I. 2002 Identification and characterization of mRNA transcripts differentially expressed in response to high salinity by means of differential display in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant Sci*. 162, 499–505.
- Bhaskar Gupta, Bingru Huang. 2014. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization Hindawi Publishing Corporation

International Journal of Genomics Volume 2014, Article ID 701596, 18 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/701596>

Bies-Ethève N., Gaubier-Comella P., Debures A., Lasserre E., Jobet E., Raynal M., Cooke R. y Delseny M. (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 67, 107-124.

Begonia, G. B., Davis, C.D., Begonia, M. F. T., Gray, C. N. 1998. Growth Responses of Indian Mustard *Brassica juncea* (L.) Czern.] and Its Phytoextraction of Lead from a Contaminated Soil. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology*. 61:38-43.

Binod B Sahu, Birendra P Shaw. (2009) Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization. Published: 5 June 2009. *BMC Plant Biology* 2009, 9:69 doi:10.1186/1471-2229-9-69

Blumwald E. and Poole R. J. 1985 Na⁺/H⁺ Antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 78, 163–167.

Boonyapookana, B., Parkplan, P., Techapinyawat, S., DeLaune, RD., Jugsujinda, A. 2005. Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*). *Journal of Environmental Science and Health A*. 40:117-137

Casierra-Posada, F. y H.L. Hernández. 2006. Evapotranspiración y distribución de materia seca en plantas de mora (*Rubus* sp.) bajo estrés salino. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 9(1), 85-95.

Chan, D.Y., Hale, B.A. 2004. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *Journal of Experimental Botany* 55:2571-2579.

Chandra, P., Kulshreshtha, K. 2004. Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *The Botanical Review*. 70:313-327

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103(4):551-560

Chaitanya K. V., Rasineni G. K., Reddy A. R. (2009). Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. *Acta Physiol. Plant.* 31 437–443. 10.1007/s11738-008-0251-6 .

Chen T. H. H. and Murata N. 2002 Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 250–257

Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:12043-12048.

Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7:309-315.

Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88:1707-1719.

Concepción J., Puerta B., Claudia P. y Ureña P. 2005. *Prácticas de biología molecular*. Ed. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 100 pp

Cram W.J. 1983. Chloride accumulation as a homeostatic system: Set points and perturbations. *Journal of Experimental Botany*, 34: 1484-1502.

Dal Corso, G., Farinati, S., Maistri, S., and Furini, A., How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression, *J. Integr. Plant Biol.*, 2008, vol. 50, pp. 1268–1280.

Delauney A.J., Hu C.A., Kishor B.P., Verma D.P. Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:18673–18678.

Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunzee R., Frommer W.B. The role of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell*. 2004;16:3413–3425.

Díaz-Villaseñor E. (2006). *Transferencia de metales entresuelo y plantas de Maíz (Zea mays L.), sembradas en terrenos impactados por jales mineros en la región de Taxco, Guerrero*. Tesis maestría. UAG.

Domínguez-Solís, J.R., López-Martin, M.C., Ager, F.J., Ynsa, M.D., Romero, L.C., Gotor, C. 2004. Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal* 2:469- 476.

Dure, L. III. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* 3: 363-369.

Dure, L. III, Crouch, M., Harada, J., Ho, T. H. D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. y Sung, Z. R. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12: 475-486.

Ernst Wh, J Verkleij & W Schat (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Netherland* 41: 229-248.

Ferren W.R. y Schenk H.J. 2004. Suaeda . En: *Flora of North America Editorial Committee* Ed. *Flora of North America. North of Mexico*. Vol. 4, pp. 390-398, Oxford University Press, Nueva York.

Flowers T. J., Troke P. F and Yeo A. R. 1977 The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**, 89–121.

Flowers, T. J. & Muscolo, Adele. Introduction to the Special Issue: Halophytes in a changing world. *A o B Plants*. 7:1-5, 2015.

Funck D., Stadelhofer B., Koch W. Ornithine-delta-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biology*. 2008;8:40.

Guerinot, M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:190-198.

Gómez-Garrido, Mora Navarro, Murcia Navarro, Faz Cano. (2018). The chelating effect of citric acid, oxalic acid, amino acids and *Pseudomonas fluorescens* bacteria on phytoremediation of Cu, Zn, and Cr from soil using *Suaeda vera*. *Int J Phytoremediation*. 2018 Aug 24;20(10):1033-1042. doi: 10.1080/15226514.2018.1452189.

Goyal K., Walton L.J. y Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* 388, 151–157.

Halder, T., Agarwal, T. y Ray, S. 2015.. Isolation, cloning, and characterization of a novel *Sorghum dehydrin* (SbDhn2) protein. *Protoplasma*: 1-14.

Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., and Masmoudi, K., Plant dehydrins and stress tolerance, *Plant Signal. Behav.* , 2011, vol. 10, pp. 1503–1509.

Hangxia Jin, Dekun Dong, Qinghua Yang, Danhua Zhu. (2016). Salt-Responsive Transcriptome Profiling of *Suaeda glauca* via RNA Sequencing Zhejiang Academy of Agricultural Science, Institute of Crops and Nuclear Technology Utilization, Hangzhou Zhejiang 310021, People's Republic of China

Hara, M., Fujinaga, M., and Kuboi, T., Metal binding by citrus dehydrin with histidinerich domains, *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, pp. 2695–2703.

Hara, M., Kondo, M., and Kato, T., A KStype dehydrin and its related domains reduce Cu promoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical reducing activities, *J. Exp. Bot.*, 2013, vol. 64, pp. 1615–1624.

Hare PD, Cress WA, Van Standen J (2003) A regulatory role for proline metabolism in stimulation *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Plant Growth Regul* 39:41–50. doi:10.1023/1021835902351

Hasegawa, P, Bresa, R; Zhu, J y Bohnert, H. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

Hepler P.K. (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* 17, 2142–2155.

Hernandez-Sanchez, I.E., I. Maruri-Lopez, A. Ferrando, J. Carbonell, S.P. Graether & J.F. Jimenez-Bremont (2015). Nuclear localization of the dehydrin OpsDHN1 is determined by histidine-rich motif. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-8

Hopkins C.O. y Blackwell W.H. 1977. Synopsis of *Suaeda* (Chenopodiaceae) in North America. *Sida* 7:147-173.

Hu C-AA, Delauney AJ, Verma DPS (1992) A bifunctional enzyme (D 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9354–9358

Hundertmark M. y Hinch D.K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics* 9, 1-22.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

I. Bankaji, Caçador, N. Sleimi. (2015). Physiological and biochemical responses of Suaeda fruticosa to cadmium and copper stresses: growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes, phytochelatin, and glutathione levels. Environ Sci Pollut Res (2015) 22:13058–13069 DOI 10.1007/s11356-015-4414-x

Joann Diray-Arce, Mark Clement, Bilquees Gul, M Ajmal Khan and Brent L Nielsen. (2015). Transcriptome assembly, profiling and differential gene expression analysis of the halophyte Suaeda fruticosa provides insights into salt tolerance. Diray-Arce et al. BMC Genomics (2015) 16:353 DOI 10.1186/s12864-015-1553-x.

Kabata-Pendias, A. 2000. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton. USA. pp. 365, 413.

Kaur N. y Gupta A.K. (2005) Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. Current Science 88, 1771-1780.

Kant S., Kant P., Raveh E., Barak S. 2006. Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*. Plant Cell And Environment. ;29:1220–1234.

Kelley, C., Gaither, K. K., Baca - Spry, A., Cruickshank, B. J. 2000. Incorporation of phytoremediation strategies into the introductory chemistry laboratory. Chem Educator. 5:140-143.

Kruger, C., O. Berkowitz, U.W. Stephan & R. Hell 2002. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of Ricinus communis L. Journal of Biological Chemistry.

Kumar, P. B. A. N., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I. 1995. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. Environmental Science & Technology. 29:1239-1245

Lambers, H., S. Chapin & T. Pons. 2008. Plant physiological ecology. Springer. New York. 604 p.

Lehmann, J., et al. 2011 Biochar Effects on Soil Biota-A Review. Soil Biology and Biochemistry, 43, 1812-1836.

Lei Zhang, Xiu-Ling Ma, Quan Zhang, Chang-Le Ma, Ping-Ping Wang, Yu-Fei Sun, Yan-Xiu Zhao, Hui Zhang. (2001). Expressed sequence tags from a NaCl-treated Suaeda salsa cDNA library. Key Laboratory of Plant Stress Research, Department of Biology, Shandong Normal University, Jinan, 250014, China Received 9 November 2000; received in revised form 24 January 2001; accepted 19 February 2001. Received by J.A. Engler

López-González J.J, Fuentes-Rodríguez J.M., & Rodríguez-Gómez A. 1997. Industrialización de la tuna Cardona (*Opuntia streptacantha*). Journal of the Professional Association for Cactus Development 2, 169-175.

López, C. G., Banowitz, G. M. Peterson, C. J. y Kronstad, W. E. 2003. Dehydrin Expression and Drought Tolerance in Seven Wheat Cultivars. *Crop Science* 43: 577- 582.

Madan, S; Nainawatee, H; Jain, R y Chowdhury, J. 1995. Proline and proline metabolizing enzymes in in vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress, *Annals of Botany* 76: 51-57.

Manajan S. y Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139-158.

Matysik J, Alia A, Bhalub B, Mohanty P (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr Sci* 82:525–532

Méndez-García, T., Palacios-Mayorga, S., & Rodríguez-Domínguez, L.. (2008). Análisis de suelo, foliar y de calidad del agua para el cultivo del aguacatero. *Terra Latinoamericana*, 26(1), 75-84.

Miller G., Honig A., Stein H., Suzuki N., Mittler R., Zilberstein A. Unraveling Δ 1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:26482–26492.

Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* 7, 405-410. Mittler R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11, 15-19.

Monther Taha SADDER, Abdullah Abdulaziz AL-DOSS. 2014. Characterization of dehydrin AhDHN from Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus*). *Turk J Biol* (2014) 38: 469-477 © TÜBİTAK doi:10.3906/biy-1310-63

Munnik T. y Meijer J.G. (2001) Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Letters* 498, 172-178.

Murahama M., Yoshida T., Hayashi F., Ichino T., Sanada Y., Wada K. Purification and characterization of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase isoenzymes, indicating differential distribution in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant and Cell Physiology*. 2001;42:742–750.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473- 497.

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

Munns, R. y Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.

Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar-Alonso, I., López-Moya, J. R. 2007 Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 16:10-25)

Nessner V, Esposito E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soil polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*, 28:61-89

Noguez-Hernández ,Carballo-Carballo, Flores-Olvera. 2013. *Suaeda edulis* (Chenopodiaceae), una nueva especie de lagos salinos del centro de México. *Botanical Sciences* 91 (1): 19-25, 2013

Nuccio M.L., Rhodes D., McNeil S.D. y Hanson A.D. (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion Plant Biology* 2, 128- 134

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

Odjegba, V. J., Fasidi, I. O. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: Implications for phytoremediation. *Ecotoxicology*. 13:637-646.

Padmavathamma P, Li L. 2007. Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants. *Water, Air, & Soil Pollution*, 184:105-126.

Park, S., Cheng, N.H., Pittman, J.K., Yoo, K.S., Park, J., Smith, R.H., Hirschi, K.D. 2005. Increased Calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis* H⁺/Ca²⁺ transporters. *Plant Physiology* 39:1194-1206.

Paz-Ferreiro J, Lu H, Fu S, Méndez A, Gascó G. 2014. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review. *Solid Earth*, 5:65-75

Pedrol J. y Castroviejo S. 1988. A propósito del tratamiento taxonómico y nomenclatural del género *Suaeda* Forsskal ex Scop. (Chenopodiaceae) en "Flora Iberica". *Anales Jardín Botánico de Madrid* 45:93-102.

Pérez-Molphe-Balch E, Dávila-Figueroa CA (2002) In vitro propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 73-78.

Qin, Y. X., y Qin, F. 2016. Dehydrins from wheat x *Thinopyrum ponticum* amphiploid increase salinity and drought tolerance under their own inducible promoters without growth retardation. *Plant Physiology and Biochemistry* 99: 142-149.

Qiu, H., Zhang, L., Liu, C., He, L., Wang, A., Liu, H. L. y Zhu, J. B. 2014. Cloning and characterization of a novel dehydrin gene, *SiDhn2*, from *Saussurea involucreta* Kar. et Kir. *Plant Molecular Biology* 84: 707-718

Raghavendra A. S., V. K. Gonugunta, A. Christmann y E. Grill (2010) ABA perception and signaling. *Trends in Plant Science* 15: 395-401.

Rajendran, K; Tester, M. y Roy, S. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell and Environment* 32(3): 237-249.

Reed C.F. 1979. Chenopodiaceae. En: Correll D.S. y Johnston M.C. Eds. *Manual of the Vascular Plants of Texas*, pp. 527-551, Texas Research Foundation, Austin.

Reyes-Agüero J.A., Aguirre J.R. y Valiente-Banuet A. (2006) Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments* 64, 549–585.

Roychoudhury, A., Roy, C. y Sengupta, D. N. 2007. Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *lea* gene *Rab16A* from rice during high salt and water

deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Reports* 26 (10): 1839-1859.

Rodríguez M., Canales E. y Barrás-Hidalgo O. (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotecnología aplicada* 22. 1-10.

Rosales, R., Romero, I., Escribano, M. I., Merodio, C., Sanchez-Ballesta, M. T. 2014. The crucial role of ϕ - and K-segments in the *in vitro* functionality of *Vitis vinifera* dehydrin DHN1a. *Phytochemistry* 108: 17-25.

Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K., Wojakowska, A. y Stobiecki, M. 2014. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 1–19.

Rzedowski J. y Equihua M. 1978. Atlas Cultural de México: Flora. Secretaria de Educación Pública, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Grupo Editorial Planeta, México, D.F. Sánchez O. 1978. La Flora del Valle de México. Editorial Herrero, México, D.F.

Sairam R.K. y Tyagi A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86, 407-421.

Salt, D.E., Wagner, G.J. 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *Journal of Biological Chemistry* 268:12297-12302.

Shah, K., Nongkynrih, J.M. 2007. Metal hyperaccumulator and bioremediation. *Biologia Plantarum* 51:618-634

Schütze P., Freitag H. y Weising K. 2003. An integrated molecular and morphological study of the subfamily Suaedoideae Ulbr. (Chenopodiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 239 :257-286.

Shakirova, F.M., Avalbaev, A.M., Bezrukova, M.V., and Kudoyarova, G.R., Role of endogenous hormonal system in the realization of the antistress action of plant growth regulators on plants, *Plant Stress*, 2010, vol. 4, pp. 32–38.

Shi H. y Zhu J.K. (2002) SOS4, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129, 585–593.

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

Silva-Ortega C. O., Ochoa-Alfaro A. E., Reyes-Agüero J. A., Aguado-Santacruz G. A., Jimenez-Bremont J. F. (2008). Salt stress increases the expression of P5CS gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol. Biochem.* 46 82–92. 10.1016/j.plaphy.2007.10.011

Selvam Ayarpadikannan, Eunsook Chung, Chang-Woo Cho, Hyun-Ah So, Soon-Ok Kim, Joo-Min Jeon, Myoung-Hae Kwak, Seon-Woo Lee, Jai-Heon Lee. 2012 Exploration for the salt stress tolerance genes from a salt-treated halophyte, *Suaeda asparagoides*. *Plant Cell Rep.* 2012 Jan; 31(1): 35–48. Published online 2011 Aug 28. doi: 10.1007/s00299-011-1137-4

Sepúlveda B.A., Pavez O, Tapia M. (2013). Uso De *Salicornia* Sp. En La Fitorremediación De Relaves. Xxv Encuentro Nacional De Tratamiento De Minérios E Metalurgia Extrativa &

Viii Meeting Of The Southern Hemisphere On Mineral Technology, Goiânia - Go, 20 A 24 De Outubro 2013

Soto C, Gutiérrez S, Rey A, González, E. 2010. Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo, NOVA 8:195-205

Spain, A. 2003. Implications Of Microbial Heavy Metals Tolerance in the Environment. Reviews In Undergraduate Research, 2:1-6.

Su J., Wu R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. Plant Science. 2004;166:941–948.

Suzuki N. y Mittler R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126, 45–51.

Strizhov N., Abraham E., Okresz L., Blickling S., Zilberstein A., Schell J., Koncz C., Szabados L. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 1997;12:557–569.

Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 2010;15:89–97

Schwartz, C., Echevarria, G., More I, J. L. 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*. 249: 27-35

Székely, G., Abrahám, E., Csépló, A., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L. (2008). Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant Journal* 53:11–28

Talón, M., Tad, F.R., Zeevaart, J.A.D. (1991) Cellular changes induces by exogenous and endogenous giberellins in the shoot tips of the long-day plant *silene armeria*. *Planta* 185:487-493

Thomine, S., Wang, R., Ward, J., Crawford, N., Schroeder, J. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:4991-4996.

Tunnacliffe A., Lapinski J. y McGee B. (2005) A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* 546, 315–321.

Verbruggen N., Hua X.J., May M., VanMontagu M. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: Evidence for a negative transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:8787–8791.

Wang W., Vinocur B. y Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.

Wang X., Liu Y., Zeng G., Chai L., Xiao X., Song X. y Min Z. (2008). Pedological characteristic of Mn tailings and metal accumulation by native plants. *Chemosphere*. 72, 1260–1266.

Wang Z. L., Li H. P., Fredricksen M., Gong Z. Z., Kim C. S., Zhang C. Q. *et al.* 2004b Expressed sequence tags from *Thellungiella halophila*, a new model to study plant salt tolerance. *Plant Sci.* 166, 609–616.

Wang B., Davenport R. J., Volkov V. and Amtmann A. 2006 Low unidirectional sodium influx into root cells restricts net sodium accumulation in *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57, 1161–1170.

Watson, J. D. 2006. *Biología molecular del gen.* España. Ed. Médica Panamericana. 776 pps.

Wenzel, W. W., Unterbrunner, R., Sommer, P., Sacco, P. 2003. Chelate- assisted phyto extraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant and Soil.* 249:83-96.

White P.J. y Broadley M.R. (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* 92, 487- 511.

Xiong L. y Zhu J.K. (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum* 112,152-66.

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

Xiong L., Schumaker K.S. y Zhu J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14, 165-183.

Xion L. y Yang Y. (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15, 745–759.

Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., Singer, S. D. y Wang, Y. 2012. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology* 12 (140): 2-17.

Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D. and Somero G. N. 1982 Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 24, 1214–1222.

Zhigao Sun, Xiaojie Mou, Dangyu Zhang, Wanlong Sun, Xingyun Hu, Liping Tian. (2017) Impacts of burial by sediment on decomposition and heavy metal concentrations of *Suaeda salsa* in intertidal zone of the Yellow River estuary, China. *Marine Pollution Bulletin* 116 (2017) 103–112

Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 247-273.

Zhu, W., Zhang, D., Lu, X., Zhang, L., Yu, Z., Lv, H. y Zhang, H. 2014. Characterisation of an SKn-type dehydrin promoter from wheat and its responsiveness to various abiotic and biotic stresses. *Plant Molecular Biology Reporter* 32: 664–67.

Zhuang, P., Yang, Q. W., Wang, H. B., Shu, W. S. 2007. Phytoextraction of Heavy Metals by Eight Plant Species in the Field. *Water, Air, & Soil Pollution.* 184:235-242.

Zhuang, P., Ye, Z. H., Lan, C. Y., Xie, Z. W., Shu, W. S. 2005. Chemically assisted phytoextraction of heavy metal contaminated soils using three plant species. *Plant and Soil.* 276:153-162.

III.- ANEXOS

ANEXO A: CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

A.1. Características de los oligonucleótidos FSeDHN y RSeDHN sintetizados de acuerdo al programa DNASTar.

Secuencia: **FSeDHN**: 5' GAGGAGGAGGGAGATGACGAAGAC 3'

RSeDHN: 5' GAAGGGGGTTGATCACA CTCCACA 3'

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

A.2. Características de los oligonucleótidos F P5CS y RP5CS sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI.

Secuencia: **FP5CS** 5' CAGTTTGGATATGGCGAAGCAGAT 3'

RP5CS 5' GAGCAAAACCCAA CCCACGAC 3'

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

A.3. Características de los oligonucleótidos FSeDHNTTr y RSeDHNTTr sintetizados de acuerdo al programa Primer design del NCBI.

Secuencia: **FSeDHnCuant** 5' TTAAGGAGAAACTTCCAGGC 3'

RSeDHNCuant 5' ACGTGGATCTTCTCTATTGC 3' 140

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

A.4. Características de los oligonucleótidos FBtub1 y RBtub1

Secuencia: F2Btub

Rbtub

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

ANEXO B. MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS UTILIZADOS.

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

Preparación de las soluciones concentradas para el medio MS:

SOLUCIÓN	REACTIVO	CANTIDAD
SOLUCION A Concentración: 1000X. Volumen: 50 mL	Cloruro de calcio (CaCl ₂ -2H ₂ O)	22.0 g
SOLUCION B. Concentración: 1000X. Volumen: 50 mL	Yoduro de potasio (KI) Cloruro de cobalto (CoCl ₂ -6 H ₂ O)	41.50 mg 1.25 mg
SOLUCION C. Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL	Fosfato monobásico de K (KH ₂ PO ₄) Ac. bórico (H ₃ BO ₃) Molibdato de sodio (NaMoO ₄)	3.40g 0.124 g 0.005 g
SOLUCION D. Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL	Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O) Sulfato de manganeso (MnSO ₄ -H ₂ O) Sulfato de zinc (ZnSO ₄ -7H ₂ O) Sulfato de cobre (CuSO ₄ -5 H ₂ O)	7.40 g 0.340 g 0.172 g 0.50 mg
SOLUCION E Concentración: 200 X. Volumen: 100 mL	Sulfato ferroso (FeSO ₄ -7H ₂ O) EDTA disódico (Na ₂ EDTA)	0.557 g 0.745 g
SOLUCION F. Concentración 100 X. Volumen: 100 mL	Glicina Pridoxina HCl Ac. nicotínico Tiamina HCl Mio inositol	20.00 mg 5.00 mg 5.00 mg 1.00 mg 1.00 g
Observaciones	<p>En la Solución E Disolver ambos componentes por separado, para lo cual puede requerirse calor. Agregar poco a poco la solución de Fe a la de EDTA y aforar. Debe de quedar de color amarillo sin precipitados.</p> <p>Almacenar estas soluciones en frascos limpios (lavados y enjuagados con agua destilada) y en refrigeración.</p>	

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

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

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

B.2 Buffer de lisis para extracción de ADN

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