



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
E INMUNOLOGÍA

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIOLOGO

PRESENTA

GEORGINA ANGELICA TENA GONZALEZ

"Clonación del promotor rd29A inducible por estrés abiótico y
análisis de su funcionalidad en *Nicotiana tabacum* L."

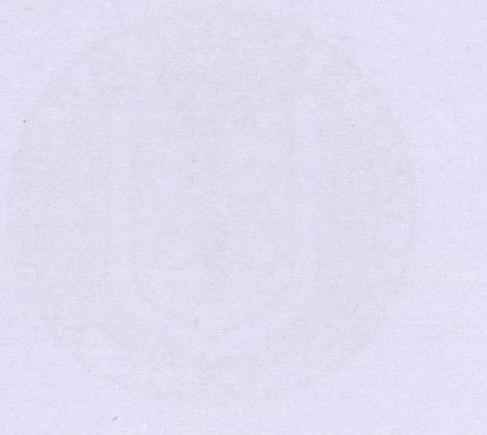
CIUDAD UNIVERSITARIA
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE DE 2004

TL
QK981
.T46
2004
c.1



1080171440

Ciencias
agropecuarias



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPASTORILES

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPASTORILES

CAMPUS SAN CARLOS

2018

EXAMEN PARCIAL

AGROPASTORILES

2018

2018

EXAMEN PARCIAL

AGROPASTORILES

2018

EXAMEN PARCIAL

AGROPASTORILES

2018

EXAMEN PARCIAL

AGROPASTORILES

2018

EXAMEN PARCIAL



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
E INMUNOLOGÍA

TESIS

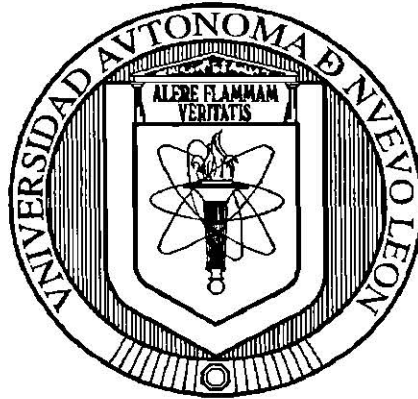
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIOLOGO

PRESENTA

GEORGINA ANGELICA TENA GONZALEZ

"Clonación del promotor rd29A inducible por estrés abiótico y
análisis de su funcionalidad en *Nicotiana tabacum* L"

CIUDAD UNIVERSITARIA
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE DE 2004



Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

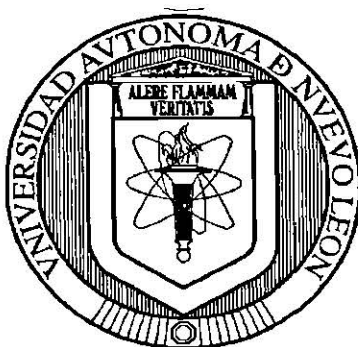
Departamento de Microbiología e Inmunología

Tesis que como requisito parcial
para optar al Título de Biólogo
presenta Georgina Angélica Tena González

**“Clonación del promotor rd29A inducible por estrés abiótico y análisis de
su funcionalidad en *Nicotiana tabacum* L.”**

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L.

Diciembre de 2004



Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Microbiología e Inmunología

Los miembros de este comité recomendamos que la presente Tesis de la **Srita. Georgina Angélica Tena González** sea aceptada como requisito parcial para optar al Título de Biólogo.

COMITÉ DE TESIS

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Presidente

M.C. María Eufemia Morales Rubio
Secretario

M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez
Vocal

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Suplente

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L.

Diciembre de 2004


“Clonación del promotor rd29A inducible por estrés abiótico y análisis de su funcionalidad en *Nicotiana tabacum* L.”

Por

Georgina Angélica Tena González

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Manipulación Genética del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con el Laboratorio de Transformación de Plantas del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, bajo la dirección de el Dr. Roberto Montes de Oca Luna, el Dr. José Luis Cabrera Ponce y la Dra. Analí Gámez Escobedo.

FIRMAS



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director Interno

Dr. José Luis Cabrera Ponce
Director Externo



Dra. Idalia Analí Gámez Escobedo
Director Externo

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L.

Diciembre de 2004

DEDICATORIA

A mis padres Jorge y Soco

A mi hermana Sandra

A mi tía Martha

A mis abuelos Benjamín y Noné, Mine y Nicolás

A mis sobrinos María e Ian, Andrea y Fernanda

A mis primos Paola, Carlos, Chema,

Kattj, Luis, Juano, Miryam, Nico,

Noé, Gely, Toño, y Alessa

A mis tíos Robe, Hilda, Carlos, Mireya,

Abraham, Luly, Norma, Manuel,

Noé, y Cuquis

A mis Ninos Paty y Juan

A las futuras generaciones de Hombres de Ciencia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Montes de Oca, por haberme dado la oportunidad de colaborar en su laboratorio, por su guía en mis experimentos y en mi formación académica, por ser un ejemplo de entrega y dedicación al trabajo. Por su sencillez y respeto, y por el apoyo incondicional que brinda a todos los que pasamos por su laboratorio.

A la Dra. Analí Gamez, (mi jefa) por ayudarme a encontrar respuestas a las mil y un preguntas que se surgen en mi cabeza, por soportar mi hiperactividad y mis “a veces”, y por darme su tiempo, sus técnicas, y sus consejos.

Al Dr. José Luis Cabrera Ponce, por abrirme las puertas de su laboratorio, brindándome tiempo, equipo, reactivos y sobre todo conocimiento y técnica. Por mostrarme otra cara de la Ciencia, y de la Percepción.

Al M.C. Juan Manuel Adame, por permitirme invadir su laboratorio, por su confianza y por las palabras de aliento que me ha dado siempre.

A la Dra. Claudia León, por adoptarme en su laboratorio, y a Toño y a Elva por su ayuda en varios de mis experimentos.

Al Dr. Jean Philippe Vielle por confiarme su fluorómetro, por sus palabras de animo y su sonrisa franca.

A Lupita, por su tiempo, y su mano de oro, a Rosy por los medios, a Laura por ser la mejor secretaria del mundo, a Quintín por el northern, a Miguel por su ayuda en la estadística. A Jaime (James Dean) Bravo por su apoyo, los chocolates y los buenos ratos

Al maestro Oscar J. Polaco, mi “gurú” académico, por las reprimendas, los jalones de orejas, las observaciones técnicas y los buenos consejos.

Gracias a mis padres Soco y Jorge, y a mi tía Martha, que han sido grandes amigos y maestros --guías excepcionales-- no solo en el campo de la ciencia (que orgullosamente ahora comparto con ellos), sino a lo largo de la vida, con lecciones cortas y consejos oportunos, y más que nada, un ejemplo extraordinario.

A mi abuelita Mine, por el amor que me brindo en su cocina y bajo su techo en los 5 años de mi carrera y en mis 26 años de vida... por esas canciones que me enseñaste a cantar, y por esas otras que fueron mis canciones de cuna, por enseñarme los números y las letras, por darme el amor a la sabiduría.

A mi hermana Sandra, simplemente por ser tú, por enseñarme a crecer sin dejar de ser niña, y por compartir conmigo toda esa magia que hay dentro de ti.

A mi abuelito Benjamín, por heredarme, no solo en los genes, el amor a las letras y a la buena plática. Por Don Arcadio, Carlitos, y aquel poeta a quienes acompañe en aventuras, tristezas y alegrías desde aquellos *Años Viejos*.

A mi tío Robe, por que en sus platicas y aventuras he forjado muchos de mis sueños. Por acompañarme y guiarme en silencio. A mis tíos Noé, Hilda, Abraham, Norma, Luly, y Manuel por todo su cariño, a mis tíos Carlos y Mireya, por tantas navidades, y a mis padrinos Paty y Juan, por su cariño y sus bendiciones de siempre. A mi prima y room-mate Kattj por 4 años inolvidables, a mi prima Paola, por su cariño y confianza, a mis primos, Noé, Nico, Carlos, Gely, Toñito, Alessandra, Juano y Miriam por estar ahí siempre, por los mejores juegos, los mejores veranos y las mejores navidades.

A mis amigos de siempre, Anayansi, Aguilar, Eloy y Luisa. Por estar siempre cerca, sin importar la distancia, por creer en mi y apoyarme desde el principio.

A mis compañeros y amigos de generación, Checo, Titi, Yanner, Maru, Jovanna, Enrique, Ruth, Sandra y Raquel (sin cuyos apuntes no me hubiera graduado a tiempo), y principalmente a Emma, Ana, Lucía, Thania, la bella Almendra y Manuel por ser más que amigos (mis ángeles guardianes) durante 5 memorables años. Y a todos aquellos con quienes compartí el pasillo de la facu, las micros, la cafeta y más de cien noches de farra.

A Pollo, Mon y Paulo, por estar ahí siempre, con una sonrisa o una palabra de aliento en el momento adecuado.

A Javier Cardona, por ese techo descuadrado, las noches en Santa Lucía y la poesía del Barrio Antiguo.

A mis compañeros y vecinos de Laboratorio en la UMG, Arnulfo, Araceli, Humberto, Ricardo, Armando, Dany, Marichu, Deyanira, Areli, Julio, Claudio, Beto, y principalmente a Jorge por su apoyo y su confianza. Y a los que estuvieron conmigo en Irapuato; a Charlotte por confiarme su casa, a Enrique, Angel, Regina, Estrella, Gina, Martha, Cesar, Ful y Paty, Pame y Marcelo, Max, a Harumi, por acogerme en tu casa, a Wilson por compartir conmigo la musica que llevas por dentro, Pime por su insustituible ayuda con el fluorómetro, a Gustavo y a Orly por los buenos momentos y las buenas charlas. Y a Silvia, por los buenos momentos durante esas dos semanas bajo su techo y en su mesa.

A todos aquellos que han moldeado (sutil o bruscamente mi vida). A Celia, al Maestro Polaco, mis maestros Adriana, Gloria Amalia, Guajardo, Libertad y Arzave. A Carl Sagan, Darwin & Wallace, Oparin, Rosalind Franklin, Ernst Myer, J.R.R. Tolkien, W. Shakespeare, J.L. Borges, Oscar Wilde, Lewis Carrol, Carl Orff, Antonio Lazcano, Michael Ende, Dr. Seuss, A. Monteroso, y José Saramago.

A Celia, Hassan y Katty por recibirme en sus vidas con los brazos abiertos.

A Yamil, por aparecer en el momento preciso y enseñarme que todo en el mundo es posible, por tu paciencia y tu amor. Por tomarme de la mano y llevarme por caminos que solo en sueños había recorrido.

Mutatis Mutandis

-Proverbio latín

**I found myself walking into Aladdin's cave,
picking up one treasure after another.**

-Mitchell Waldrob's Complexity

**Aladino cogió la lámpara con la
mano, y busco el sitio que había
que tocar precisamente... y la frotó
despacio y muy suavemente.**

**Y al punto apareció el genni, que
inclinose y con voz muy tenue, a
causa precisamente de la suavidad
del frotamiento, dijo a Aladino:
¿Qué Quieres? Habla.**

-Schahrazada, Las Mil y una Noches

**¿Cómo hizo para acumular tanto saber
antes de volverse ciego?**

-Umberto Eco, El Nombre de la Rosa

CONTENIDO

Portada	<i>i</i>
Comité de Tesis	<i>ii</i>
Dirección y Localización del Trabajo	<i>iii</i>
Dedicatoria	<i>iv</i>
Agradecimientos	<i>v</i>
Contenido	<i>ix</i>
Índice de Tablas	<i>xii</i>
Índice de Figuras	<i>xiii</i>
Abreviaturas	<i>xv</i>
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Estrés en Plantas	3
2.1.1 Estrés osmótico	4
2.1.2 Sequía	4
2.1.3 Congelamiento	5
2.1.4 Salinidad	5
2.2 Estado actual del arte	6
2.3 Genes y proteínas inducibles por estrés	7
2.4 Promotores inducidos por estrés	9
2.5 rd29A	9
3.1 IMPORTANCIA	11
3.2 ORIGINALIDAD	12
3.3 OBJETIVO	13
3.3.1 Objetivos Específicos	13

3.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1 Manejo de material vegetal	15
4.2 Amplificación de la secuencia promotora rd29A	15
4.3 Clonación del promotor rd29A en un vector de expresión en plantas	16
4.4 Cultivo de Células NT1	16
4.5 Transformación genética de células NT1 mediante Biobalística	16
4.6 Ensayos transitorios de expresión por estrés	19
4.6.1 Detección de la expresión del gen reportero	19
4.7 Ensayos de expresión por estrés en clonas estables	20
4.7.1 Determinación de la actividad específica de la β -Glucoronidasa ..	20
4.7.1.1 Ensayo Fluorométrico	21
4.7.1.2 Cuantificación de la proteína total	21
5. RESULTADOS	22
5.1 Clonación del promotor rd29A de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
5.2 Subclonación del promotor rd29A en un vector para su expresión en células vegetales	23
5.3 Inducción del promotor rd29A por estrés osmótico en ensayos transitorios	24
5.4 Ensayos en clonas estables	26
5.4.1 Cuantificación de la actividad promotora mediante Fluorometría ..	28
5.4.1.1 El promotor rd29A se induce por estrés osmótico	28
5.4.1.2 El promotor rd29A se induce por estrés a bajas temperaturas	29
5.4.1.3 El promotor rd29A se induce por estrés salino	30
5.4.1.4 El promotor rd29A responde a estrés combinados con baja temperatura	31
5.4.1.5 Comparación de la respuesta del promotor rd29A vs 35S a diferentes tipos de estrés	32

5.5 Las células NT1 pueden ser almacenadas en medio de cultivo conteniendo NaCl a 6gr/L	33
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	38
8. LITERATURA CITADA	39
ANEXO I TABLAS	43
ANEXO II PROTOCOLOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para la secuencia promotora rd29A a partir de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	15
Tabla 2. Vectores utilizados en los experimentos de biobalística para la transformación genética de células NT1	17
Tabla 3. Condiciones para los ensayos de biobalística sobre tejido foliar y células NT1 de <i>Nicotiana tabacum L.</i>	17
Tabla 4. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por estrés osmótico	44
Tabla 5. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por estrés por bajas temperaturas	45
Tabla 6. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por Salinidad	46
Tabla 7. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por estrés osmótico/salino combinado con estrés por bajas temperaturas	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema descriptivo de la transformación por biobalística	18
Figura 2. Secuencia nucleotídica de la región promotora rd29A	22
Figura 3. Amplificación y caracterización del promotor rd29A	23
Figura 4. Mapa del vector para expresión en plantas pBI-121 de Clontech Inc.	24
Figura 5. Mapa del casete de expresión pBI-rd29A	24
Figura 6. Respuesta del promotor rd29A a estrés osmótico en un ensayo de transfección transitoria	25
Figura 7. Clonas transformantes seleccionadas durante 3 semanas en Kanamicina	26
Figura 8. Ensayo de detección por X-Gluc en clonas estables	27
Figura 9. Expresión del gen de la β -Glucoronidasa (<i>Uid A</i>) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés osmótico	29
Figura 10. Expresión del gen de la β -Glucoronidasa (<i>Uid A</i>) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés por enfriamiento	30
Figura 11. Expresión del gen de la β -Glucoronidasa (<i>Uid A</i>) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés salino	31
Figura 12. Expresión del gen de la β -Glucoronidasa (<i>Uid A</i>) regulado por	

la inducción del promotor rd29A bajo estrés abióticos combinados 32

Figura 13. Expresión del gen de la β -Glucoronidasa (*Uid A*) regulado por los
promotores rd29A y 35S bajo diferentes condiciones de estrés abiótico 33

Figura 14 . Clonas transformantes mantenidas en medio con NaCl durante 2 meses 34

ABREVIATURAS

hr	Hora
min	minuto
seg	segundo
°C	grado centígrado
L	litro
g	gramo
µl	microlitro
µg	microgramo
ml	mililitro
mg	miligramo
ng	nanogramos
g/L	gramos por litro
PM	Peso Molecular
M	Molar
mM	micromolar
nm	nanomolas
pM	picomolar
rpm	revoluciones por minuto
RD	(de) Respuesta a desecación
DREB	Elemento de respuesta a desecación
CaMV 35S	Cawliflower Mosaic Virus 35S Promoter
LEA	(Proteínas) Abundantes en la Embriogénesis tardía
Hsp	Proteínas de respuesta a choque térmico
Pb	Par de base nucleotídica
Kb	Kilobase nucleotídica (1,000 bases)
Nt	Nucleótido
oligo	Oligonucleótido
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
sol	solución
GUS	β-Glucoronidasa
X-GLUC	5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucoronida
4MU	4-metilumbeliferona
MUG	4-metil umbeliferil glucoronida
Man	Manitol
Sor	Sorbitol
Sac	Sacarosa
ABA	Acido abscisico
LB	Luria-Bertani
MS	Murashige y Skooge

Clonación del promotor rd29A inducible por estrés abiótico y análisis de su funcionalidad en *Nicotiana tabacum L.*

Resumen

Día con día se identifican genes que ayudan a las plantas en condiciones de estrés abiótico. Algunos de estos genes se han transferido y probado en cultivos agrícolas con éxito. Sin embargo, ya que su expresión constitutiva podría ocasionar efectos no deseables en los cultivos, es importante que este tipo de genes únicamente se expresen en el momento del estrés. Para solucionar este problema se han identificado promotores inducibles por estrés, que permiten regular la actividad de dichos genes bajo condiciones particulares. En el presente proyecto se clonó un promotor que responde a estrés osmótico: el promotor rd29A.

El promotor rd29A, del gen RD29 de *Arabidopsis thaliana*, es un promotor inducible que responde a factores de estrés abiótico, como son sequía, salinidad ó bajas temperaturas. En este trabajo, dicho promotor fue clonado por PCR y subclonado en un vector de expresión en plantas. Células de tabaco, *Nicotiana tabacum L.*, de la línea celular NT1 fueron transformadas con el casete de expresión pBI-rd29A, y se midió la inducción del promotor bajo condiciones de estrés en estas células con la fluorescencia del gen reportero GUS, en ensayos transitorios y clonas estables.

Dada la facilidad de manejo de las células NT1 de tabaco, fue posible trabajar con condiciones extremas de estrés: salinidad de hasta 24 g/L, y temperaturas de -16°C . En estas condiciones encontramos respuestas de inducción del promotor aún mayores a las que obtuvimos bajo las condiciones reportadas en trabajos previos.

Los resultados obtenidos tanto en los ensayos histológicos como en los de fluorescencia, fueron consistentes con los resultados descritos en trabajos anteriores: el promotor se induce bajo condiciones de estrés osmótico, alta salinidad y frío. Adicionalmente, en el presente trabajo se reporta por primera vez que la combinación de estrés por frío y estrés osmótico o salino también induce la actividad del promotor rd29A.

A medida que se tenga un mayor conocimiento sobre los promotores inducibles y sus mecanismos de funcionamiento se puede pensar a futuro en el desarrollo de plantas cultivables genéticamente mejoradas que puedan ser sembradas y cosechadas en zonas en las que el suelo o los factores ambientales son una limitante para la agricultura.

1. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes condiciones ambientales que limitan el crecimiento y el desarrollo de las plantas; la sequía, la alta salinidad y las bajas y altas temperaturas, son todos factores de estrés para las mismas. Cuando se trata de plantas cultivadas, estos factores de estrés representan también pérdidas económicas, pues el rendimiento de los cultivos es bajo.

En el norte de nuestro país las arriba mencionadas son las condiciones normales a las que la mayoría de los cultivos se debe enfrentar, y dado que la mayor parte de las especies de plantas cultivadas no han sido seleccionadas para cumplir con las exigencias de dichos factores de estrés, la capacidad de éstas para ajustarse a esas condiciones generalmente es limitada (Grover et al., 2001).

Las plantas responden a estos tipos de estrés de diversas maneras: a nivel fisiológico, celular o molecular, mediante estructuras especialmente adaptadas, rutas metabólicas, o mediante la activación de genes. La biotecnología, mediante la transferencia de genes, permite estudiar las respuestas de dichos genes a diferentes tipos de estrés. De la misma manera se puede lograr incrementar la respuesta y tolerancia de las plantas a los mismos.

Existe una diversidad de genes que se activan bajo condiciones de estrés abiótico, estos confieren a las plantas “habilidades de supervivencia” que les permiten desarrollarse en condiciones adversas. Entre los diversos genes relacionados con el estrés en plantas, se encuentra el gen *RD29* de *Arabidopsis*, el cual es inducido en condiciones de desecación, salinidad, o de bajas temperaturas, así como en presencia de ácido abscísico. *RD29* contiene en su secuencia dos promotores inducibles por estrés: *rd29A* y *rd29B*, cada uno de los cuales es activado mediante rutas independientes.

En el presente trabajo el promotor *rd29A* fue clonado por PCR y subclonado en un vector de expresión en plantas, su funcionalidad fue evaluada en células NT1 de tabaco, (*Nicotiana tabacum L.*), en ensayos de inducción por estrés, y medida mediante la fluorescencia del gen reportero GUS.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estrés en plantas

Los ambientes cambiantes en que habitan las plantas, frecuentemente imponen limitaciones en su crecimiento y desarrollo. El estrés osmótico que se presenta en condiciones de sequía y salinidad, así como en temperaturas extremas, son condiciones ambientales que causan efectos adversos en el crecimiento de las plantas y en la productividad de los cultivos (Kasuga et al., 1999; Xiong et al., 1999).

Las plantas responden a estos tipos de estrés a niveles molecular y celular, así como a nivel fisiológico (Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002). La respuesta fisiológica a un estado de estrés se produce por cambios en la expresión celular de los genes. Se ha demostrado que éstos tipos de estrés inducen la expresión de un gran número de genes (Kasuga et al., 1999).

A nivel de la planta, los efectos comunes causados por estrés abiótico incluyen una reducción en la tasa de germinación de semillas y bajo vigor en las mismas, así como un decremento en la longitud de la raíz, enrollamiento de las hojas, reducción en la viabilidad del polen, y envejecimiento prematuro de las hojas, entre otros. Por otro lado, a nivel celular y subcelular, los cambios inducidos por estrés incluyen un incremento en la insaturación de los lípidos de membrana como respuesta al estrés por bajas temperaturas, un incremento en el nivel de diferentes osmolitos en respuesta a factores osmóticos (como deshidratación, salinidad y estrés por bajas temperaturas), una represión general de biosíntesis de proteínas en respuesta a estrés por agua y altas temperaturas, y cambios selectivos en los niveles de K^+/Na^+ en respuesta a estrés salino. Dado que la mayoría de las plantas de cultivo no han sido seleccionadas para cumplir con las exigencias de estos factores de estrés, la capacidad de éstas para ajustarse a dichas condiciones generalmente es limitada (Grover et al., 2001).

2.1.1 Estrés osmótico

El término estrés osmótico se utiliza ampliamente para referirse a situaciones en donde la disponibilidad insuficiente de agua limita el crecimiento y el desarrollo de las plantas. El estrés osmótico puede ser resultado de la sequía o de la presencia excesiva de sales en el agua. Condiciones de enfriamiento y congelamiento también pueden causar estrés osmótico debido a la reducción en la absorción de agua y a la deshidratación inducida por la formación de hielo (Zhu et al., 1997).

A excepción de las inundaciones, las principales condiciones de estrés abióticos se reducen a estrés por déficit de agua. La membrana celular sirve como una barrera impermeable a macromoléculas y a la mayoría de las sustancias de bajo peso molecular. Durante condiciones de estrés osmótico las células acumulan solutos para prevenir la pérdida de agua y para restablecer la turgencia (Rhodes, 1987, Zhu et al., 1997). Cuando las concentraciones de soluto extracelular son alteradas o se forma hielo extracelular, hay un flujo de agua de las células que causa un decremento en la turgencia y un incremento en las concentraciones de solutos intracelulares (Lichtentaler, 1995), lo que provoca presión en las membranas y macromoléculas. Limitaciones menores de disponibilidad de agua pueden causar una disminución en la tasa de fotosíntesis, pero reducciones posteriores llevan a la inhibición total de la misma (Holmberg & Bülow, 1998).

2.1.2 Sequía

Puesto que las plantas terrestres experimentan fluctuaciones constantes en la disponibilidad de agua, éstas han evolucionado adaptativamente, minan y absorben agua a través del sistema radicular, previenen la pérdida excesiva de agua por transpiración mediante cutículas y estomas en las hojas, y se ajustan fisiológica y metabólicamente para continuar su crecimiento y supervivencia en caso de estrés osmótico (Levitt, 1972).

La sequía es una de las principales condiciones de estrés ambiental que limitan el crecimiento de las plantas y la producción de cultivos. Como mencionamos, las plantas responden a la desecación a niveles fisiológico, celular y molecular (Bray, 1997; Ingram & Bartels, 1996; Iuchi et al., 2001; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997), por lo que el estrés por sequía induce la expresión de varios genes que están involucrados en la tolerancia y respuesta a estrés (Iuchi et al., 2001). Utilizando mutantes de ácido abscísico (ABA) en *Arabidopsis*, se demostró que la señal de respuesta a sequía es mediada por rutas tanto dependientes como independientes de ABA para regular la expresión de varios genes inducibles por este tipo de estrés (Iuchi, 2001).

2.1.3 Congelamiento

La tolerancia al congelamiento es una característica multigénica. Los daños provocados por congelamiento se presentan en la mayoría de las plantas y tejidos debido a la deshidratación celular severa que ocurre cuando se forma hielo. Los sistemas de la membrana celular son uno de los sitios principales en los que se producen daños por congelamiento (Thomashow, 2001).

2.1.4 Salinidad

Entre las condiciones adversas de los sistemas agrícolas, la salinidad es el factor que más ha influido sobre el establecimiento de las poblaciones humanas. La irrigación de cultivos con aguas de alto contenido salino provoca, tras la evapotranspiración, la acumulación de sales en el suelo. Así, este fenómeno convierte en improductivos a los suelos agrícolas. En la actualidad, más del 20% de los suelos cultivados y aproximadamente el 50% de las tierras irrigadas, están catalogados como potencialmente salinos (El-Hamdaoui et al., 2001).

La salinidad provoca varios efectos sobre las plantas, disminución del potencial osmótico del medio y en consecuencia del potencial hídrico del suelo, toxicidad específica, normalmente asociada con la absorción excesiva de iones Na^+ y Cl^- , y desequilibrio nutricional debido a la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales; la combinación de los efectos antes indicados provocan una reducción en el desarrollo vegetal. Como consecuencia a estos efectos primarios, frecuentemente ocurren otros tipos de estrés secundarios, como el daño oxidativo (Zhu, 2001).

Las plantas disponen de complejos mecanismos moleculares de respuesta a los efectos de la salinidad, estos incluyen biosíntesis de solutos compatibles, control del flujo hídrico, y transporte de iones para reestablecer la homeostasis (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001). Varios genes que codifican para transportadores de membrana son inducidos por deshidratación y estrés salino. Genes de la membrana plasmática, así como genes de ATPasa son inducidos por alta salinidad (Surowy y Boyer, 1991; Niu et al., 1993; Binzel, 1995; Zhu et al., 1997).

2.2 Estado actual del arte

El estrés abiótico desencadena respuestas celulares complejas. Esta complejidad hizo pensar a muchos, durante un largo tiempo, que la tolerancia a dicho tipo de estrés no podía ser manipulada experimentalmente. Afortunadamente durante los últimos años esta paradoja ha sido probada como falsa (Grover et al., 2001).

La ingeniería genética, a través del uso de la tecnología de transferencia de genes, tiene el potencial de incrementar la tolerancia de las plantas al estrés (Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Se han realizado varias investigaciones para entender los mecanismos moleculares de las respuestas de las plantas a estos tipos de estrés, particularmente en modelos de *Arabidopsis*, arroz, cebada, y soya (Datta, 2002; Hwang & Sheen, 2001; Lee et al., 2000), y se han generado cúmulos de información sobre proteínas que son específicamente inducidas en

respuesta a estrés abiótico; así mismo se han construido librerías de genes de diversas plantas, con clonas de cDNA relacionadas a estrés (Grover et al., 2001).

Las estrategias seguidas hasta el momento en el estudio de la tolerancia a sequía, incluyen tres enfoques principales: a) el examen de sistemas tolerantes, como son las semillas y las plantas siemprevivas (*Craterostigma plantagineum*); b) el análisis de mutantes de sistemas genéticos modelo (“genetic model systems”); y c) el análisis de los efectos del estrés en plantas de relevancia para la agricultura (Ingram & Bartels, 1996). Los esfuerzos anteriores para mejorar la tolerancia de las plantas a condiciones de desecación, alta salinidad y bajas temperaturas a través de técnicas de ingeniería genética han tenido un éxito limitado debido a la complejidad genética de las respuestas a dichos tipos de estrés (Cushman & Bohnert, 2000). Se han intentado varios enfoques diferentes para incrementar la tolerancia a estrés en plantas. El enfoque de más éxito hasta el momento consiste en la introducción de genes que codifican para enzimas que catalizan la conversión de un sustrato natural de las plantas en un producto con propiedades osmoprotectoras. También existen otros genes de importancia que codifican para enzimas modificadoras de membrana, proteínas inducidas por estrés y proteínas hypoxia/anoxia-reductoras (Holmberg & Bülow, 1998).

2.3 Genes y proteínas inducibles por estrés

Los estudios sobre las bases moleculares de las respuestas a estrés comenzaron cuando se descubrió que un minuto de incremento de temperatura producía un patrón alterado en el cromosoma de polietileno en *Drosophila*. Posteriormente se demostró que las condiciones de choque térmico (HS por sus siglas en inglés: Heat Shock) daban como resultado un perfil protéico alterado en las células de *Drosophila*. Poco tiempo después se reportó que el HS también induce alteraciones comparables en los perfiles protéicos de las plantas. Después de esto, las proteínas de choque térmico (HSPs) han sido detectadas y caracterizadas en varias especies vegetales. Además de los genes *hsp*, en los últimos años han sido clonados y caracterizados un gran número de genes inducidos en respuesta a bajas temperaturas, agua, salinidad y estrés anaeróbico (Grover et al., 2001).

Los productos de los genes inducibles por estrés pueden clasificarse en dos grupos: los que protegen directamente contra el estrés ambiental y los que regulan la expresión de genes en la respuesta a dicho estrés. El primer grupo incluye proteínas que probablemente funcionan protegiendo a las células de la deshidratación, como son las enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA), proteínas anticongelantes, chaperonas, y enzimas de detoxificación. El segundo grupo de productos de genes incluye factores de transcripción, cinasas, y enzimas (Kasuga et al., 1999).

La gran mayoría de los genes inducibles por estrés pertenecen a la clase LEA (Late Embryogenesis Abundant). Estos genes se expresan de manera normal en grandes cantidades durante las últimas etapas del desarrollo de semillas en condiciones normales. Muchos de los genes LEA también se expresan en grandes cantidades cuando las plantas son expuestas a condiciones ambientales adversas. La función de los productos de estos genes aun no es clara, pero se consideran protectores celulares. Existe evidencia experimental que muestra que la sobre expresión de los genes LEA resulta en una mayor tolerancia a sequía y salinidad (Lee et al., 2000; Young-Kim, 1999), y que estos genes son inducidos por estrés osmótico resultante de sequía, alta salinidad o bajas temperaturas. La mayoría de los genes LEA responden al ácido abscísico (Skriver y Mundy, 1990; Zhu et al., 1997).

Un ejemplo de los genes del segundo grupo, los que codifican para moléculas osmoprotectoras, es el caso de los genes P5C5, que codifican para la enzima Prolina Biosintética. Estos genes son inducibles tanto por salinidad como por sequía (Young-Kim, 1999).

Para establecer las respuestas básicas de las plantas a la sequía, el examen de sistemas y de plantas de cultivo tolerantes ha sido lo más productivo. Un tipo de análisis involucra la localización de genes que se piensa son importantes, como pueden ser los que codifican para las múltiples enzimas involucradas en las rutas metabólicas inducidas por la sequía. Un segundo enfoque es el aislamiento de genes inducidos (Ingram & Bartels, 1996). Uno

de los genes que han sido aislados es el *RD29*; este gen es inducido por estrés por sequía, alta salinidad, baja salinidad y presencia de ABA (Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

2.4 Promotores inducidos por estrés

En general los promotores inducidos por estrés contienen un arreglo de elementos *cis* específicos que son reconocidos por factores de transcripción. La mayor parte del trabajo relacionado con la funcionalidad de los promotores inducidos por estrés ha sido realizado con los promotores hsp. Estos elementos fueron identificados por primera vez en el gen *hsp70* de *Drosophila*. Junto con los promotores hsp, los promotores *rd29* y *adh* han sido objeto de estudio intenso, y se ha observado que los niveles de RNAm de *rd29* cambian diferencialmente en respuesta a deshidratación, baja temperatura, estrés salino o exposición a ABA (Grover et al., 2001).

2.5 *rd29A*

En 1992, Yamaguchi-Shinozaki y colaboradores caracterizaron la expresión del gen *RD29*. Éste, es un gen de *Arabidopsis thaliana* que se induce por desecación, frío, y condiciones de alta salinidad, así como por la presencia de ácido abscísico. *RD29* contiene en su secuencia dos promotores inducibles por estrés: *rd29A* y *rd29B*, cada uno de los cuales es activado mediante rutas independientes.

Algunos genes de respuesta a deshidratación son inducidos por la hormona vegetal ABA, pero otros no (Yamaguchi-Shinozaki, 1997). El promotor *rd29A* contiene en su secuencia dos elementos *cis* de respuesta, el elemento de respuesta a ABA y el elemento de respuesta a deshidratación (también llamado DREB), y puede ser activado por estrés osmótico, alta salinidad, bajas temperaturas, o tratamiento con ácido abscísico. La transcripción del gen *RD29* en respuesta a estrés osmótico y por frío es mediada por ambas rutas, tanto

dependiente de ABA como independiente de ABA (Gilmour & Thomashow, 1991; Xiong et al., 1999; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994).

Los factores de transcripción DREB1 y DREB2 inducen la expresión de genes de tolerancia a estrés (Iuchi et al., 2001; Stockinger et al., 1997), y la sobre expresión de DREB1A activa la expresión de genes de tolerancia a estrés involucrados en rutas independientes de ABA e incrementa la tolerancia a sequía, salinidad, y congelamiento (Iuchi et al., 2001; Kasuga et al., 1999; Thomashow, 1999). En un experimento realizado por Kasuga y colaboradores en 1999, la expresión de DREB1A mediada por el promotor inducible por estrés rd29A no tuvo efectos sobre el crecimiento de las plantas pero sí condujo a una mayor tolerancia a las condiciones de estrés en comparación a la expresión del gen mediada por el promotor constitutivo CaMV.

En 2000, Kasuo Nakashima y colaboradores realizaron análisis de Northern blot de la expresión inducida por desecación y revelaron un proceso de dos pasos en la inducción del rd29A. La inducción temprana ocurre a los 20 minutos del estrés y la inducción secundaria ocurre 3 horas después del inicio de la desecación. Los análisis revelaron también que los promotores correspondientes al *RD29*, rd29A y rd29B, están localizados en tándem en una región de 8 kb del genoma de *Arabidopsis thaliana*, y que éstos codifican para proteínas hidrofílicas.

3.1 IMPORTANCIA

En el norte de México, como en varios lugares a través del mundo, la sequía y otras condiciones ambientales extremas son grandes limitantes para el desarrollo de cultivos vegetales. Puesto que la mayoría de las plantas de cultivo no están adaptadas para responder al estrés abiótico y dado que las condiciones económicas y alimentarias son cada vez más severas, es necesario buscar nuevas técnicas para incrementar la tolerancia de las plantas cultivadas a los diferentes tipos de estrés.

Existe una diversidad de genes que se activan bajo condiciones de estrés abiótico, éstos confieren a las plantas “habilidades de supervivencia” que les permiten desarrollarse en condiciones adversas. Sin embargo, cuando dichos genes se transfieren a un cultivo y se encienden permanentemente pueden ser nocivos o letales. Los promotores inducibles permiten regular la actividad de dichos genes para encenderlos o apagarlos en condiciones particulares, evitando así su sobre expresión. El promotor rd29A es uno de estos promotores inducibles, que al estar fusionado a un gen encenderá o apagará la actividad genética de acuerdo a las condiciones de estrés a las que el cultivo sea sometido ().

La rápida expansión del conocimiento de los procesos moleculares involucrados en la tolerancia a estrés, junto con la tecnología de manipulación de genes, permiten que el mejoramiento de cultivos pueda basarse en la transferencia de material genético. El desarrollo de dichas técnicas en laboratorios nacionales es de gran importancia para la agricultura local, puesto que a medida que se genere nuevos conocimientos sobre los promotores inducibles y sus mecanismos de funcionamiento, crece la posibilidad de desarrollar cultivos genéticamente mejorados que sean adecuados y productivos en zonas con características agrícolas limitadas. ()

3.2 ORIGINALIDAD

Existen pocos trabajos de transferencia de genes de resistencia a estrés en protoplastos, ninguno de los cuales reporta la transformación de células NT1 con el promotor rd29A. Aunque ha perdido su capacidad de regenerarse en planta, la línea celular NT1 es un modelo útil por su excepcional uniformidad y su rápido crecimiento (Russell et al., 1992). Por otra parte, es más sencillo trabajar con suspensiones celulares, puesto que las células NT1 pueden ser sometidas a niveles mayores de estrés a los que una planta puede ser sometida. Adicionalmente, las respuestas obtenidas a estos diferentes tipos de estrés pueden ser directamente relacionadas al promotor y no a los diversos factores fisiológicos mediante los cuales las plantas responden a las mismas condiciones de estrés aún sin la presencia del promotor.

3.3 OBJETIVO

Clonar y evaluar la funcionalidad del promotor inducible rd29A bajo condiciones de estrés en líneas celulares NT1 de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*).

3.3.1 Objetivos Específicos

1. Clonar el promotor rd29A de *Arabidopsis thaliana*.
2. Subclonar el promotor rd29A en un vector para su expresión en células vegetales.
3. Determinar en ensayos transitorios si el promotor rd29A es inducido bajo condiciones de estrés osmótico.
4. Obtener líneas celulares NT1 transformadas en forma estable con el promotor rd29A fusionado al gen reportero *Uida* (GUS).

3.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO

?
Es posible clonar y probar la actividad del promotor rd29A bajo condiciones de estrés
abiótico en líneas celulares NT1 de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.).

(Debería ser modificada la oración para
ser considerada como hipótesis)

4. METODOLOGÍA

4.1 Manejo de material vegetal.

Para clonar la secuencia promotora rd29A a partir de DNA genómico de *A. thaliana*, se procesó el tejido foliar de plántulas de Arabidopsis germinadas *in vitro* en medio MS. Las semillas fueron proporcionadas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM-Cuernavaca.

4.2 Amplificación de la secuencia promotora rd29A.

El promotor *rd29A* fue amplificado a partir de DNA genómico de Arabidopsis. Los oligos específicos Frd29Hind (5'-AAGCTTGGAGGAGCCATAGATGCA-3') y Rrd29Xba (5'-TCTAGATTTTTTCTTTCCAATAG-3') se diseñaron en base a la secuencia promotora reportada (GENEBANK acceso D13044). Estos oligos amplifican el fragmento comprendido del nucleótido 4563 al 5504, y lo flanquean con los sitios *HindIII* y *XbaI*. El producto de PCR de la reacción mostrada en la Tabla 1, se clonó en el vector TOPO TA pCR2.1^{MR} para dar lugar al plásmido TOPO-rd29. La caracterización del promotor se realizó mediante una digestión con la enzima *BglIII*, que no digiere al plásmido TOPO, pero que realiza un corte único al promotor rd29A.

Tabla 1. Componentes de reacción y condiciones de amplificación para la secuencia promotora rd29A a partir de DNA genómico de *A. thaliana*.

REACCIÓN		CONDICIONES
DNA genómico	1.0 µl	
dNTPs 10mM	1.0 µl	1x (94°C 3 min)
oligo Frd29Hind 100ng/µl	1.0 µl	35x (94°C 1 min; gradiente de 50- 52-54 y 56°C 1 min; 72°C 75 seg)
oligo Rrd29Xba 100ng/µl	1.0 µl	
Taq	1.0 µl	1x (72°C 8 min)
buffer PCR 10x	1.0 µl	
agua	42.0 µl	
Volumen	50.0 µl	

4.3 Clonación del promotor rd29A en un vector de expresión en plantas.

Para obtener un vector de expresión inducible en plantas con el promotor rd29A, dicha secuencia promotora se liberó del plásmido TOPOrd29 mediante una digestión enzimática con las endonucleasas *Hind*III y *Xba*I, y posteriormente fue fusionado en el vector de expresión en plantas pBI-121^{MR} (Clontech, Inc.), sustituyendo al promotor CaMV 35S. Este vector contiene el gen de la β -glucoronidasa (GUS) como gen reportero y el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina.

Para la amplificación de moléculas plasmídicas y los procedimientos de ligación, se llevó a cabo transformación bacteriana con las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y JM109, según el protocolo de choque térmico (Sambrook and Russell, 2001). El aislamiento de DNA plasmídico para su análisis y para el protocolo de bombardeo de micropartículas se realizó con el método de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001).

4.4 Cultivo de Células NT1

Células de *Nicotiana tabacum* L. en suspensión, línea NT1, fueron obtenidas en el laboratorio de Transformación de Plantas en el CINVESTAV-Irapuato, a cargo del Dr. José Luis Cabrera. Las células fueron cultivadas en un medio NT1 y subcultivadas una vez por semana, añadiendo 6ml del inóculo a 150 ml de medio NT1 fresco en matraces Erlenmeyer. Los matraces fueron colocados en agitación a 150rpm y a 24°C. Para el bombardeo se utilizaron células en fase logarítmica.

4.5 Transformación genética de células NT1 mediante Biobalística

Para preparar las células para biobalística, éstas fueron colectadas en un disco de papel filtro de 50mm mediante filtración al vacío. En cada filtro se colocó una alícuota de 5ml de células. Los paquetes celulares fueron sometidos a un tratamiento osmótico (placa con NT

Sacarosa 12% y NT Man-Sor 0.4%) 24 horas antes del bombardeo. Para los experimentos de transformación se emplearon los vectores descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Vectores utilizados en los experimentos de biobalística para la transformación genética de células NT1.

Vector	Características
PBI-121	Contiene el gen <i>npt II</i> que confiere resistencia a la kanamicina, y el gen <i>Uida</i> (GUS) regulado bajo el promotor constitutivo CaMV 35S.
PBI-rd29A	Contiene los mismos genes que el anterior, pero el gen reportero <i>Uida</i> es regulado por el promotor inducible rd29A de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
PWRG1515	Contiene el gen de la higromicina fosfotransferasa (<i>hpt</i>) y el gen <i>Uid A</i> bajo el promotor CaMV 35S doble y la región de la nopalina sintetasa 3' (Christou et al., 1991). Éste fue usado como control interno del experimento.

Para el manejo de los plásmidos se usaron tubos eppendorf de 1.5 ml y puntas para micropipetas GIBSON (20, 200, 1000 µl), esterilizadas en autoclave a 121 °C y 1.2 Kg/cm² de presión durante 30 minutos. El DNA plasmídico purificado fue resuspendido en agua destilada estéril y se cuantificó con un método fluorométrico y se ajustó a una concentración de 1µg/µl. El procedimiento de recubrimiento de DNA a las micropartículas de tungsteno que se utilizó corresponde al protocolo de Tomes et al. (1995) modificado por Cabrera-Ponce et al. (1997). Para el bombardeo de partículas se utilizó el sistema de Helio de alta presión PDS 1000-He (DuPont, 1991), diseñado por Stanford et al. Los detalles técnicos del sistema fueron descritos por Biorad (1991), y un esquema descriptivo de este se muestra en la figura 1. Los parámetros usados en el presente trabajo para cada experimento se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para los ensayos de biobalística sobre tejido foliar y células NT1 de *Nicotiana tabacum L.*

Presión de bombardeo	800 psi
Número de disparos por placa	1
Tamaño de las partículas	M10 (0.73 µm)
Concentración de partículas (tungsteno)	125 µg/ disparo
Concentración del DNA	1.66 µg/ disparo
Vacío	0.07 atmósferas
Distancia al blanco	7.0 cm

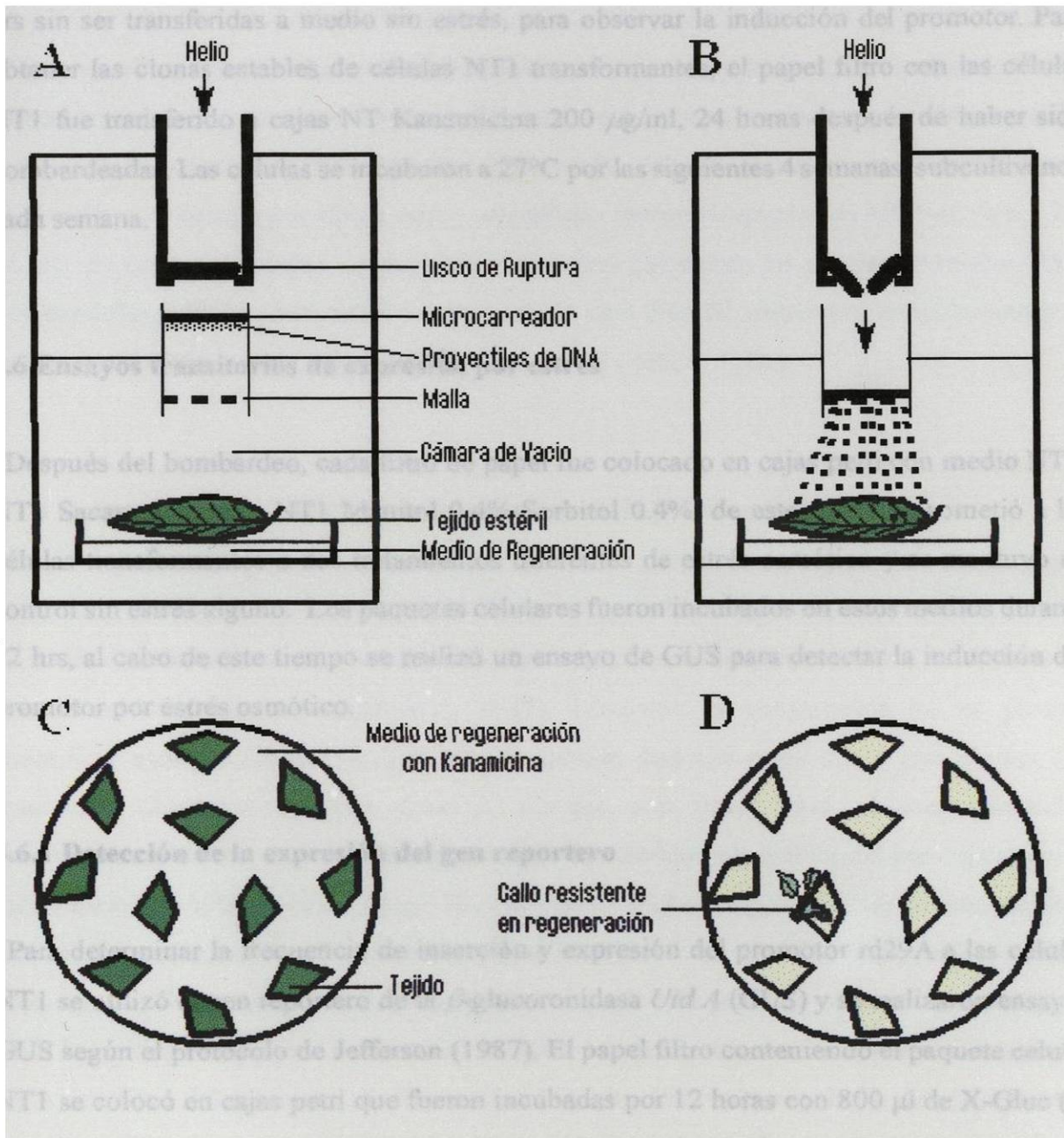


Figura 1. Esquema descriptivo de la transformación por biobalística. (A) Esquema del sistema de Helio de alta presión PDS 1000-He. (B) Ilustración de un disparo, tras perforar la membrana de Kapton el helio a alta presión desplaza el microcarreador, debido al impacto los proyectiles son disparados hacia el tejido estéril, rompiendo las paredes celulares y penetrando al interior de la célula. (C) El material bombardeado es seleccionado en un medio de regeneración con antibiótico, y (D) posteriormente se obtienen callos transformantes a partir del tejido bombardeado. El material no transformado es seleccionado y muere.

Para los ensayos transitorios las células transformadas fueron incubadas a 25-27°C por 72 hrs sin ser transferidas a medio sin estrés, para observar la inducción del promotor. Para obtener las clonas estables de células NT1 transformantes, el papel filtro con las células NT1 fue transferido a cajas NT Kanamicina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24 horas después de haber sido bombardeadas. Las células se incubaron a 27°C por las siguientes 4 semanas, subcultivando cada semana.

4.6 Ensayos transitorios de expresión por estrés

Después del bombardeo, cada filtro de papel fue colocado en cajas petri con medio NT1, NT1 Sacarosa 12%, y NT1 Manitol 0.4%-Sorbitol 0.4%, de este modo se sometió a las células transformantes a dos tratamientos diferentes de estrés osmótico y se mantuvo un control sin estrés alguno. Los paquetes celulares fueron incubados en estos medios durante 72 hrs, al cabo de este tiempo se realizó un ensayo de GUS para detectar la inducción del promotor por estrés osmótico.

4.6.1 Detección de la expresión del gen reportero

Para determinar la frecuencia de inserción y expresión del promotor rd29A a las células NT1 se utilizó el gen reportero de la β -glucuronidasa *Uid A* (GUS) y se realizaron ensayos GUS según el protocolo de Jefferson (1987). El papel filtro conteniendo el paquete celular NT1 se colocó en cajas petri que fueron incubadas por 12 horas con 800 μl de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucoronida) (Research Organics). Al terminar la incubación se realizaron observaciones y conteos de la expresión de GUS.

4.7 Ensayos de expresión por estrés en clonas estables

Una vez obtenidas las clonas estables, éstas fueron sometidas a tratamientos de estrés osmótico, salino, y por congelamiento. El tratamiento por estrés osmótico se llevó a cabo incubando las células en cajas MS Sac 12% y MS Man-Sor respectivamente por 72 hrs. Para realizar el ensayo por estrés salino, las células fueron incubadas en MS NaCl a 6, 12 y 24 g/L. El ensayo por bajas temperaturas se realizó colocando las células en medio MS e incubándolas a 4°C en oscuridad por un periodo de 3 días. El ensayo por congelamiento se realizó incubando las células a -16°C en oscuridad durante 3 días.

4.7.1 Determinación de la actividad específica de la β -Glucoronidasa

La detección de la actividad de la β -Glucoronidasa depende de la cantidad de sustrato disponible para la enzima, una vez que ésta actúa libera un producto que es fácilmente diferenciado del sustrato (Jefferson, 1987). Mediante la colorimetría no es posible cuantificar específicamente la cantidad de sustrato digerido entre una y otra clonas, los resultados obtenidos de este método, aunque son útiles para obtener resultados preliminares, no son exactos. Para determinar la actividad específica del gen reportero, el mejor método a la fecha es un ensayo fluorométrico. Dicho ensayo consiste en proporcionar un sustrato que cuando es digerido fluoresce. La fluorescencia puede entonces ser medida mediante un fluorómetro y relacionada directamente a la proteína total en la muestra, es decir la cantidad de enzima presente en la clona estudiada. La cantidad de enzima depende de la actividad del promotor mediante el cual el gen *Uid A* sea regulado. Así, la actividad específica de la β -Glucoronidasa es directamente proporcional a la inducción del promotor rd29A.

4.7.1.1 Ensayo Fluorométrico

Para determinar la actividad específica de la β -Glucoronidasa se llevó a cabo un ensayo fluorométrico según el protocolo de Jefferson (1987). Posteriormente a la inducción por estrés se añadió 500 μ l de MUG (4-metil umbeliferil glucoronida) (Sigma M-9130) a cada clona, una vez completada la reacción se midió la fluorescencia utilizando el sistema Hofer DyNA Quant 200. Los detalles técnicos de este sistema fueron descritos por Pharmacia Biotech (2001).

4.7.1.2 Cuantificación de la proteína total

Para relacionar la fluorescencia a la cantidad de enzima presente se cuantificó la proteína total en cada muestra mediante un Ensayo de Coomasie según el protocolo de León (comunicación personal).

5. RESULTADOS

5.1 Clonación del promotor rd29A de *Arabidopsis thaliana*

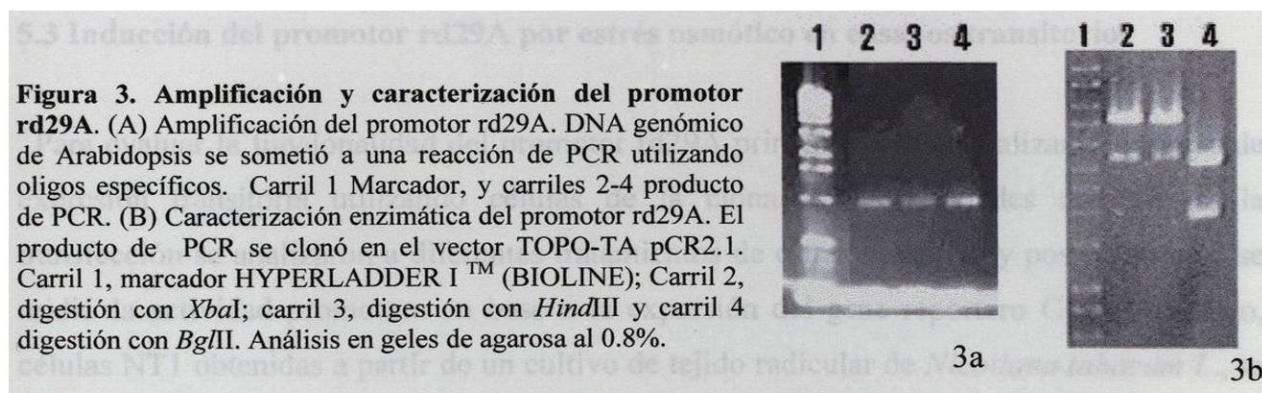
Para el análisis de la funcionalidad del promotor rd29A se realizó primero la amplificación de la secuencia promotora. Para este fin se llevó a cabo inicialmente una búsqueda de la secuencia promotora en el GENE BANK. A partir de dicha secuencia se diseñaron oligos específicos para su clonación (Figura 2). Una vez sintetizados los oligos se procedió a la amplificación del promotor a partir de DNA de tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* y se obtuvo una banda esperada de 950 bp (Figura 3A, carriles 2-4). Esta banda se purificó y se clonó en el vector TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Inc.).

```
AAG CTTGGAGGAG CCATAGATGC A
gatggaggag ccatagatgc aattcaatca aactgaaatt tctgcaagaa tctcaaacac
ggagatctca aagtttgaaa gaaaatttat ttcttcgact caaaacaaac ttacgaaatt
taggtagaac ttatatacat tatattgtaa ttttttgtaa caaaatgttt ttattattat
tatagaattt tactggtaa attaaaaatg aatagaaaag gtgaattaag aggagagagg
aggtaaacat tttcttctat tttttcatat ttccaggata aattattgta aaagtttaca
agatttccat ttgactagtg taaatgagga atattctcta gtaagatcat tatttcatct
acttcttta tcttctacca gtgaggaat aaacaatatt tagctccttt gtaaatacaa
attaattttc cttcttgaca tcattcaatt ttaattttac gtataaaata aaagatcata
cctattagaa cgattaagga gaaatacaat tcgaatgaga aggatgtgcc gtttgttata
ataaacagcc acacgacgta aacgtaaaat gaccacatga tgggccaata gacatggacc
gactactaat aatagtaagt tacatttttag gatggaataa atatcatacc gacatcagtt
ttgaaagaaa agggaaaaaa agaaaaaata aataaaagat atactaccga catgagttcc
aaaaagcaa aaaaaagatc aagccgacac agacacgcgt agagagcaa atgactttga
cgtcacacca cgaaaacaga cgcttcatac gtgtcccttt atctctctca gtctctctat
aaacttagtg agaccctcct ctgttttact cacaaatag caaactagaa aacaatcatc
aggaataaag ggtttgatta cttctatttg aaagaaaaaa atctttg
GATAACC TTTCTTTTTT TAGATCT
```

Figura 2. Secuencia nucleotídica de la región promotora rd29A. Esta secuencia se obtuvo del GENBANK con número de acceso D13044 y comprende desde el nucleótido 4563 al 5504. En amarillo se muestran los oligos específicos diseñados para la amplificación del promotor. Estos oligos amplifican al promotor rd29A y lo flanquean con los sitios *HindIII* y *XbaI*.

Las clonas resultantes se caracterizaron por digestión enzimática para comprobar que el producto de PCR clonado correspondía al promotor rd29A (Figura 3B). Para comprobar tanto la orientación de la clonación como la secuencia del producto, se realizaron digestiones individuales con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI*, ya que estos sitios fueron integrados en los primers para que flanquearan la secuencia promotora. Debido a que en el sitio de clonación estos sitios se encuentran en el mismo orden (*HindIII* – *XbaI*),

en el caso de que el producto clonado se encuentre en la orientación antisentido, las digestiones enzimáticas *Hind*III y *Xba*I liberarían un fragmento de ~1,000 pb correspondiente al producto clonado y el correspondiente al vector de ~4,000 pb; mientras que en la orientación en sentido del producto clonado se liberarían un fragmento mínimo (menor a 20 pb) imperceptible y un fragmento mayor de casi la longitud total de la construcción (~5,000 pb), como se observa en los carriles 2 y 3 de la figura 3b. De este resultado se establece que las clonas obtenidas llevan el promotor rd29A clonado en una orientación sentido. Por último, ya que el promotor rd29A contiene un sitio de restricción *Bg*III al inicio de su secuencia, mientras que el vector lleva un sitio *Bg*III ~1,000 pb río arriba del sitio de clonación, se esperaba que con el producto clonado en una orientación sentido, la digestión enzimática con *Bg*III generará un fragmento de casi 2,000 pb y uno de 3,000 pb. Como se observa en el carril 4 de la Figura 3b, la digestión enzimática *Bg*III generó los dos fragmentos esperados de 1849 bp y 3021 bp, con lo que podemos concluir que el producto clonado se encuentra en orientación sentido y corresponde a la secuencia promotora rd29A.



5.2 Subclonación del promotor rd29A en un vector para su expresión en células vegetales.

Puesto que el objetivo del presente trabajo fue analizar la actividad de regulación del promotor rd29A bajo condiciones de estrés, fue necesario unir el promotor a un gen reportero y transferir el casete de expresión a células vegetales. En base a esto se decidió

trabajar con el vector de expresión en plantas pBI-121 (Figura 4), que contiene el gen reportero *Uid A* (GUS). Para realizar la fusión de rd29A al plásmido inicialmente se liberó la sección promotora con digestión *HindIII-XbaI* del plásmido TOPO-rd29A, y se purificó mediante Fenol-Cloroformo para ligarse al vector pBI-121 sustituyendo al promotor CaMV 35S en los mismos sitios de corte, resultando el plásmido pBI-rd29A (Figura 5).

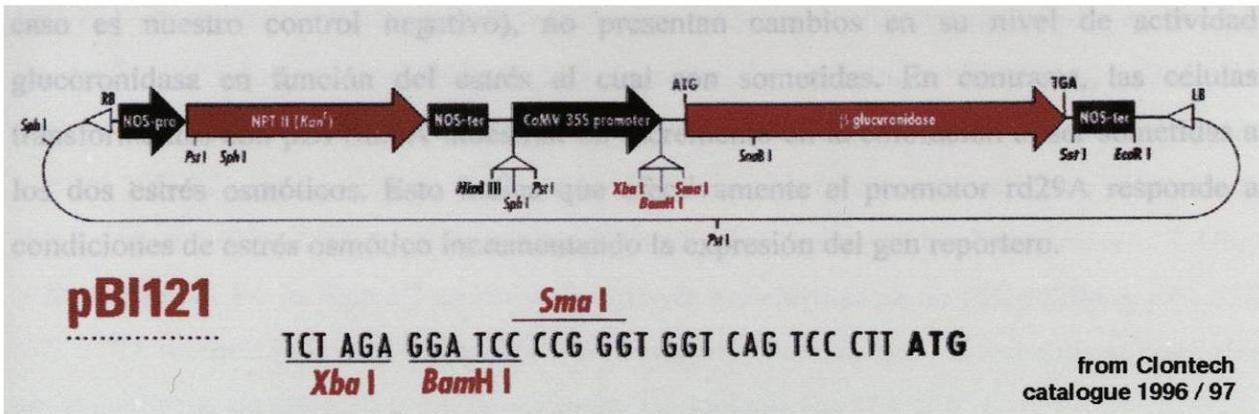


Figura 4. Mapa del vector para expresión en plantas pBI-121 de Clontech Inc. La sección ATG-TGA corresponde al gen reportero de la β-glucuronidasa *Uid A*.

5.3 Inducción del promotor rd29A por estrés osmótico en ensayos transitorios

Para evaluar la funcionalidad del promotor rd29A primeramente se realizaron ensayos de expresión transitoria utilizando células de la clona NT1, las cuales después de la transfección se analizaron a diferentes tratamientos de estrés osmótico y posteriormente se midió la actividad promotora en base a la expresión del gene reportero GUS. Para esto, células NT1 obtenidas a partir de un cultivo de tejido radicular de *Nicotiana tabacum L.*, se transformaron por biobalística con el casete de expresión pBI121-rd29A.

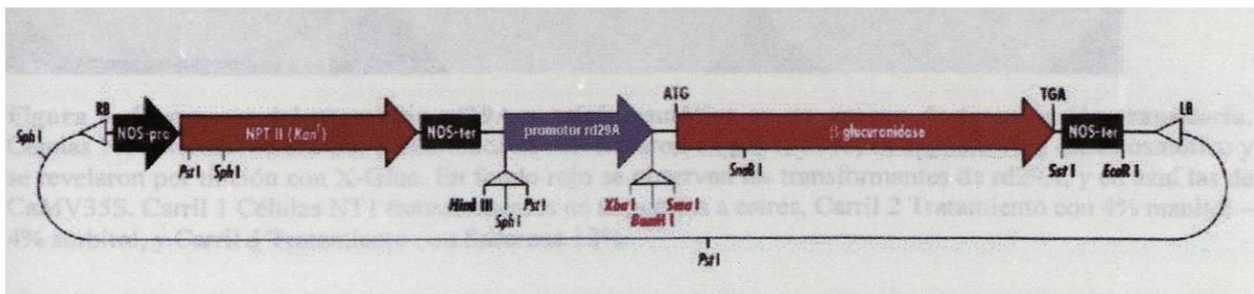


Figura 5. Mapa del casete de expresión pBI-rd29A. En morado el sitio donde se sustituyó la secuencia promotora rd29A.

Las células NT1 transformantes fueron sometidas a 2 diferentes tratamientos de estrés osmótico, uno con sacarosa y otro con manitol-sorbitol. Los resultados de la funcionalidad del promotor se registran en la Figura 6; como se observa en esta figura, las células transformadas con el plásmido pBI-121, en el cual el gen reportero GUS esta bajo la regulación del promotor constitutivo CaMV35S y que no responde a estrés (que en este caso es nuestro control negativo), no presentan cambios en su nivel de actividad glucoronidasa en función del estrés al cual son sometidas. En contraste, las células transformantes con pBI-rd29A muestran un incremento en la coloración al ser sometidas a los dos estrés osmóticos. Esto indica que efectivamente el promotor rd29A responde a condiciones de estrés osmótico incrementando la expresión del gen reportero.

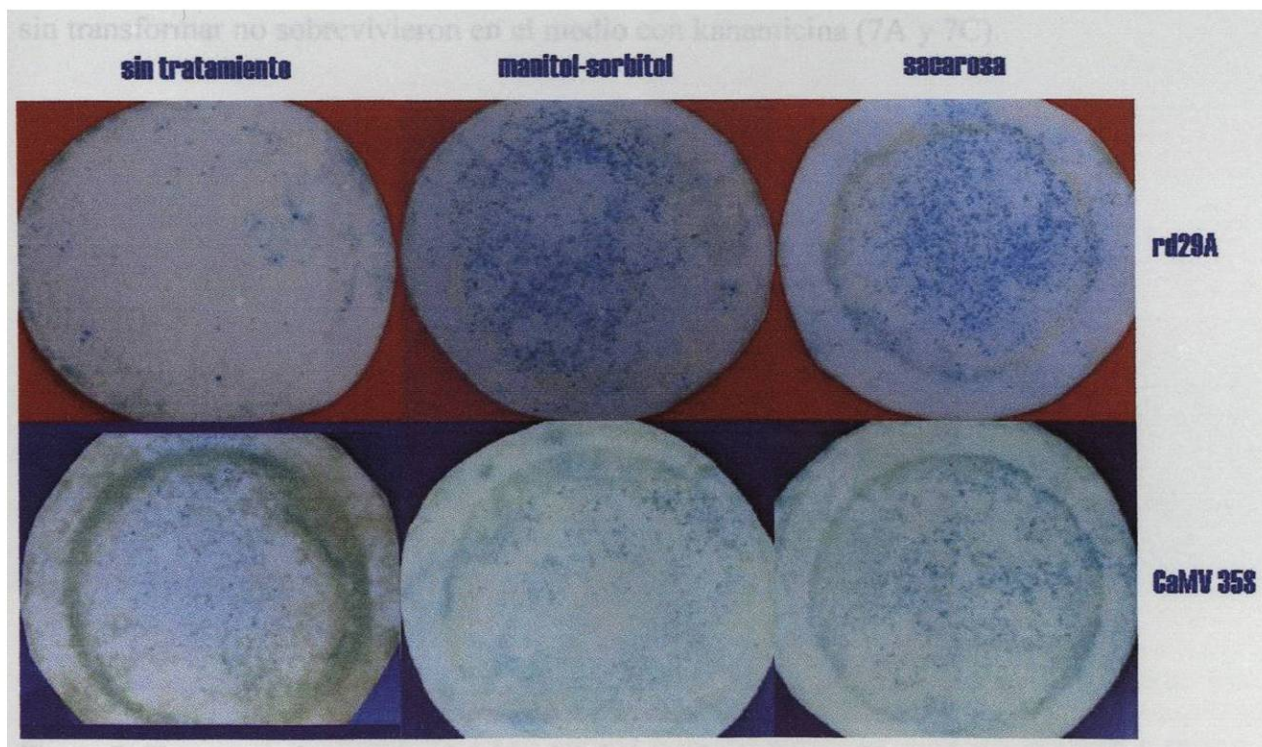


Figura 6. Respuesta del promotor rd29A a estrés osmótico en un ensayo de transfección transitoria. Células NT1 transformadas por biobalística se recolectaron en papel filtro, se expusieron a estrés osmótico y se revelaron por tinción con X-Gluc. En fondo rojo se observan las transformantes de rd29A, y en azul las de CaMV35S. Carril 1 Células NT1 transformantes no expuestas a estrés, Carril 2 Tratamiento con 4% manitol – 4% sorbitol, y Carril 3 Tratamiento con Sacarosa 12%.

5.4 Ensayos en clonas estables

Para comprobar la presencia del promotor *rd29A* en las clonas transformadas y su funcionalidad a través del tiempo se realizaron ensayos en líneas celulares NT1 transformadas de manera estable. Los paquetes celulares transformantes de pBI-*rd29A* y pBI-121 obtenidos mediante transformación por biobalística, fueron mantenidos en cultivo en medio NT1-Kanamicina 200 µg para la selección de transformantes. Al cabo de 3 semanas se obtuvo un total 77 clonas transformantes con pBI-*rd29A*, y 52 con el vector control pBI-121, que contiene el promotor 35S. Posteriormente se realizaron ensayos de inducción con diferentes condiciones de estrés abiótico y ensayos de detección con X-Gluc y fluorometría. En la figura 7 se observan clonas transformantes de pBI-*rd29A* y pBI-35S (7B y 7D, respectivamente) resistentes a kanamicina, mientras que los respectivos controles sin transformar no sobrevivieron en el medio con kanamicina (7A y 7C).

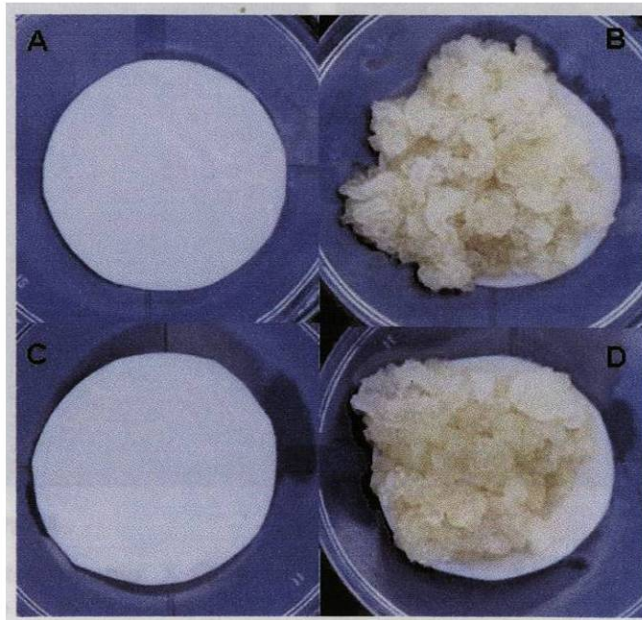


Figura 7. Clonas transformantes seleccionadas durante 3 semanas en Kanamicina. (A) Control Negativo para transformantes *rd29A*. (B) Clona NT1 transformada con el casete de expresión pBI-*rd29A*. (C) Control Negativo para transformantes CaMV 35S, y (D) Clona NT1 transformadas con el plásmido pBI-35S.

Puesto que ya existe información previa respecto a la funcionalidad del promotor *rd29A* en respuesta a la inducción por estrés abiótico, decidimos partir de los resultados obtenidos en experimentos anteriores. El primer experimento de inducción por estrés por bajas

temperaturas en células NT1 transformadas establemente se realizó exponiendo las clonas a una temperatura de 4°C en oscuridad durante tres días. Al cabo de este tiempo se aplicó el X-Gluc, sustrato de la β -glucoronidasa, y se realizó una comparación colorimétrica visual de la pigmentación por la actividad del gen reportero activado por rd29A. Los controles para cada clona se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente. Como se observa en la figura 8, la mayoría de las clonas transformantes con pBI-rd29A presentaban mayor pigmentación cuando habían sido expuestas a bajas temperaturas, mientras que las clonas de 35S no mostraban cambio, ó presentaron una disminución en la actividad del gen GUS cuando habían sido expuestas a frío.

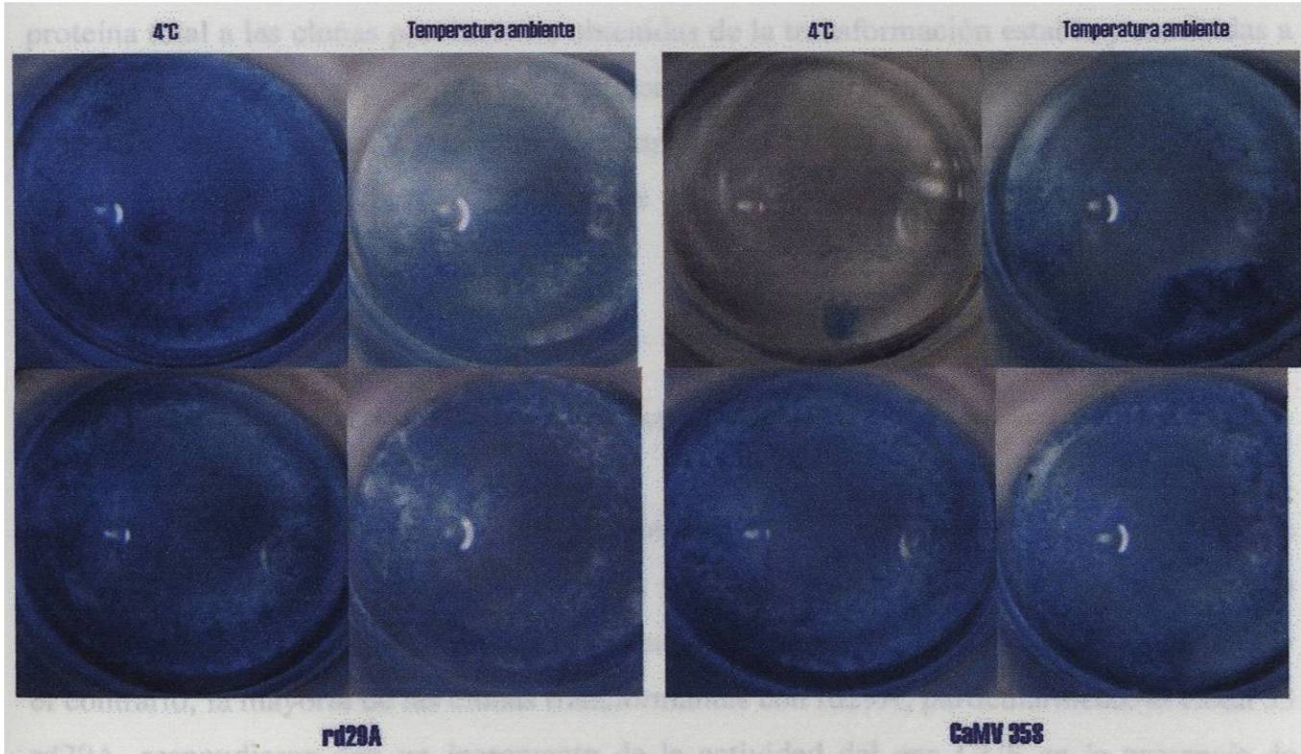


Figura 8. Ensayo de detección por X-Gluc en clonas estables. Las clonas NT1 transformadas fueron expuestas a estrés por frío durante 3 días, posteriormente se añadió 300 μ l de X-Gluc a cada muestra para observar la reacción colorimétrica. El cuadro muestra 2 clonas de rd29A y 2 de 35S expuestas a estrés y el control a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos de las inducciones por estrés en clonas transformadas de manera estable, confirman los resultados de los ensayos transitorios: la presencia de alta salinidad en los medios de cultivo (12 y 24g/L) resultan en la inducción del promotor rd29A, que activa al gen reportero GUS, expresando así una actividad mayor que la expresada bajo

regulación del promotor CaMV 35S en condiciones óptimas para éste. La exposición a bajas temperaturas (4°C, -10°C y -16°C) induce también la actividad del promotor rd29A, aunque no todas las clonas expuestas a temperaturas de -16°C presentan actividad del gen GUS.

5.4.1 Cuantificación de la actividad promotora mediante Fluorometría.

Para determinar la actividad específica de la β -Glucoronidasa en los experimentos de inducción por estrés abiótico se realizaron ensayos fluorométricos y cuantificación de proteína total a las clonas previamente obtenidas de la transformación estable y sometidas a estrés. Las gráficas que se muestran a continuación ilustran los valores de actividad específica en picomoles (pM) para algunas de las clonas transformantes. Los valores reportados en estas graficas se obtienen de las ecuaciones y las tablas contenidas en el anexo II.

5.4.1.1 El promotor rd29A se induce por estrés osmótico.

La figura 9 muestra la actividad del promotor rd29A en respuesta a inducción por estrés osmótico. Las clonas control en el carril 1, marcadas como NT1, mostraron poca o nula coloración basal, como era de esperarse ya que no portaban un gen de β -Glucoronidasa. Por el contrario, la mayoría de las clonas transformantes con rd29A, particularmente la clona 33 rd29A, respondieron con un incremento de la actividad del gen GUS en la presencia de sacarosa al 12%, lo que significa una inducción positiva del promotor bajo condiciones de estrés osmótico. Por el contrario, las clonas transformantes con CaMV 35S no mostraron una diferencia significativa de inducción de actividad de β -Glucoronidasa entre los tratamientos con y sin estrés, como era de esperarse ya que el promotor 35S es un promotor constitutivo que no responde a estrés.

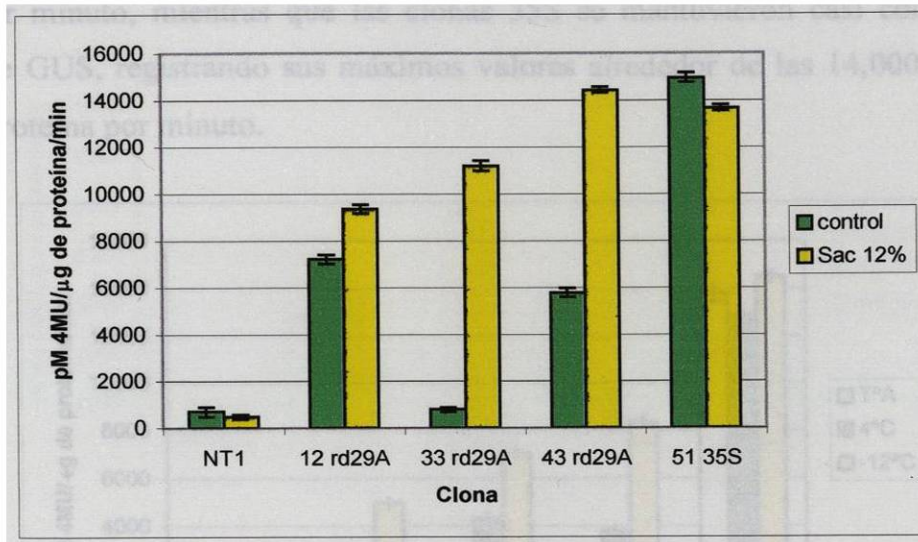


Figura 9. Expresión del gen de la β -Glucuronidasa (*Uid A*) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés osmótico. Clonas transformadas establemente con el promotor inducible por estrés (rd29A: 12, 33 y 43), promotor constitutivo (35S:51) y clonas control sin transformar (NT1), se crecieron en presencia y ausencia de estrés osmótico (sacarosa 12%). La expresión de β -Glucuronidasa se cuantificó por fluorometría.

Los valores más altos obtenidos de la actividad del gen GUS inducido por el promotor rd29A en respuesta a estrés osmótico sobrepasaron las 14,000 pM de 4MU por μ g de proteína por minuto. La mayor actividad de las clonas transformantes de 35S, es decir que expresan constitutivamente a GUS, se mantuvo también alrededor de 14,000 pM de 4MU por μ g de proteína por minuto. Esto indica que la fuerza de inducción del promotor rd29A es equiparable a la de un promotor fuerte constitutivo ya conocido como lo es el promotor 35S.

5.4.1.2 El promotor rd29A se induce por estrés a bajas temperaturas.

La respuesta del gen de la β -Glucuronidasa (*Uid A*) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés por enfriamiento se muestra en la figura 10. El control muestra baja o nula actividad de GUS, las clonas rd29A transformantes respondieron positivamente a la inducción por estrés, particularmente en temperaturas extremas de -12°C y -16°C , aunque los valores de actividad específica no sobrepasaron las 9,000 pM de 4MU por μ g de

proteína por minuto, mientras que las clonas 35S se mantuvieron casi constantes en la actividad de GUS, registrando sus máximos valores alrededor de las 14,000 pM de 4MU por μg de proteína por minuto.

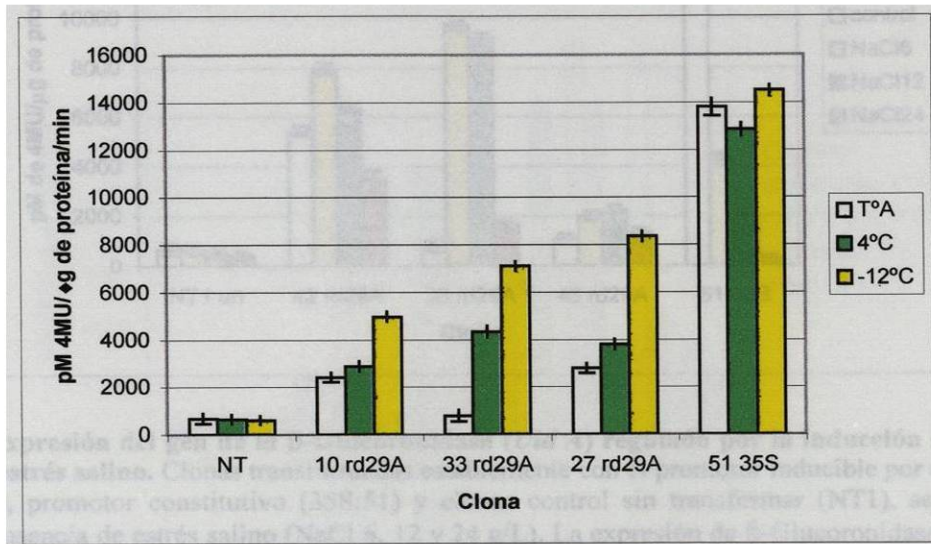


Figura 10. Expresión del gen de la β -Glucuronidasa (*Uid A*) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés por enfriamiento. Clonas transformadas establemente con el promotor inducible por estrés (rd29A: 10, 33 y 27), promotor constitutivo (35S:51) y clonas control sin transformar (NT1), se crecieron en presencia y ausencia de estrés por frío (7, 4 y -16°C). La expresión de β -Glucuronidasa se cuantificó por fluorometría.

5.4.1.3 El promotor rd29A se induce por estrés salino.

En la figura 11 se muestra la expresión del gen *Uid A* regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés salino. El control muestra baja o nula actividad de GUS, las clonas rd29A transformantes muestran inducción positiva en los tratamientos de 6 g/L y 12 g/L de NaCl, la clona 33 presentó la mayor actividad específica en la inducción por estrés salino, registrando valores de mas de 9,000 pM de 4MU por μg de proteína por minuto. Por otro lado, la exposición a 24 g/L de NaCl resultó en un decremento en la actividad de GUS. Las clonas 35S mostraron un decremento en la actividad de GUS, de acuerdo a esta observación se puede intuir que esta ocurriendo muerte celular a altos niveles de salinidad.

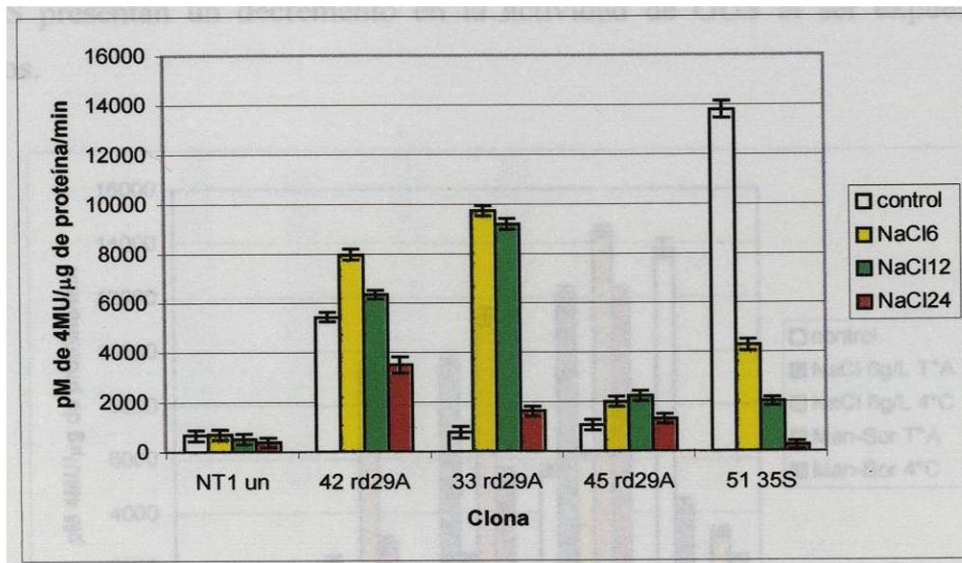


Figura 11. Expresión del gen de la β -Glucuronidasa (*Uid A*) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés salino. Clonas transformadas establemente con el promotor inducible por estrés (rd29A: 42, 33 y 45), promotor constitutivo (35S:51) y clonas control sin transformar (NT1), se crecieron en presencia y ausencia de estrés salino (NaCl 6, 12 y 24 g/L). La expresión de β -Glucuronidasa se cuantificó por fluorometría.

5.4.1.4 El promotor rd29A responde a estrés osmótico/salino combinado con estrés por baja temperatura.

Para comprobar la actividad del gen *Uid A* en respuesta a la inducción del promotor rd29A bajo estrés abióticos combinados se realizó un experimento que consistió en exponer las clonas transformantes a estrés simultáneos: cada clona fue colocada en una placa con estrés osmótico (Man-Sor) o salino (NaCl 6 g/L) y posteriormente fueron incubadas a 4°C en total oscuridad durante 4 días.

Los resultados derivados de estos ensayos, mostrados en la figura 12, indicaron que el promotor rd29A responde positivamente cuando se combina el estrés salino/osmótico con el estrés por bajas temperaturas. Aún y cuando la respuesta del promotor rd29A hacia estos tipos de estrés combinados no es acumulable sí es comparable con la respuesta del promotor hacia condiciones de alta salinidad, frío ó estrés osmótico. Por el contrario, las

clonas 35S presentan un decremento en la actividad de GUS al ser expuestas a estrés combinados.

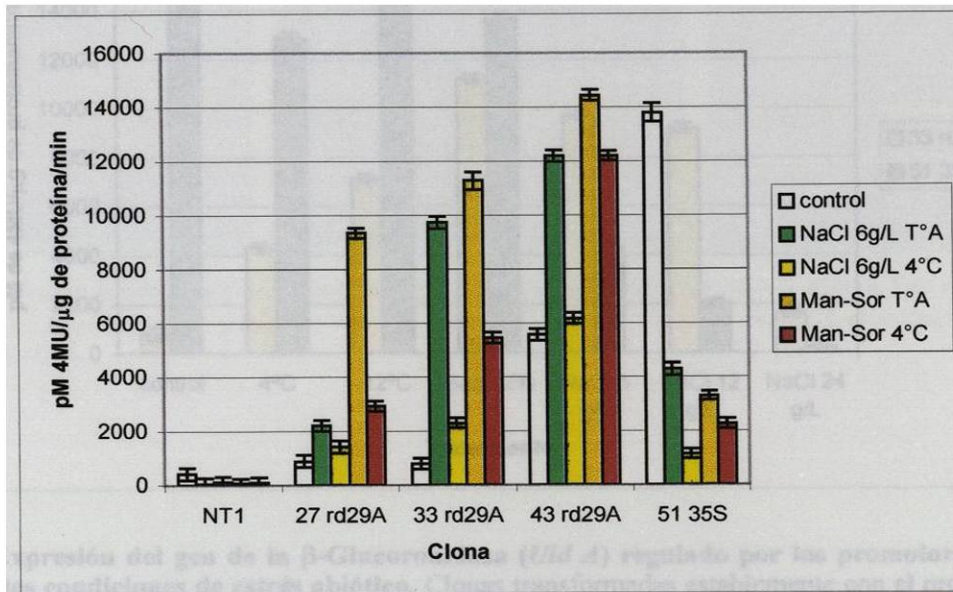


Figura 12. Expresión del gen de la β -Glucoronidasa (*Uid A*) regulado por la inducción del promotor rd29A bajo estrés abióticos combinados. El control muestra baja o nula actividad de GUS, las clonas rd29A transformantes mostraron una respuesta positiva aunque no acumulativa a la interacción de estrés por bajas temperaturas (4°C) y estrés salino/osmótico (NaCl 6g/L y manitol-sorbitol respectivamente). Las clonas 35S presentan un decremento en la actividad de GUS al ser expuestas a estrés combinados.

5.4.1.5 Comparación de la respuesta del promotor rd29A vs 35S a diferentes tipos de estrés.

La figura 13 muestra la expresión del gen *Uid A* en la clona 33 rd29A y 51 35S bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Se eligió la clona 33 por que es la que respondió positivamente a todos los estrés a los que fue expuesta. La clona 51 es la que mejor ejemplifica la actividad del promotor 35S.

La mayoría de los tratamientos inducen positivamente la actividad del promotor rd29A sobre el gen *Uid A*, por el contrario el promotor 35S no presenta cambio en su actividad cuando es expuesto a bajas temperaturas o a estrés osmótico, mientras que cuando es sometido a estrés salino se observa un decremento notable en su actividad.

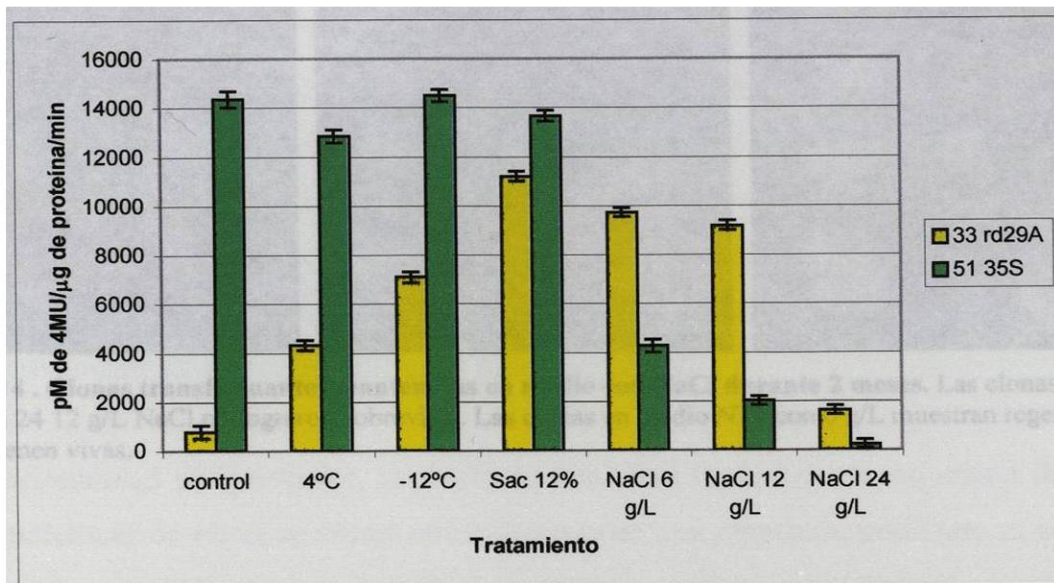


Figura 13. Expresión del gen de la β -Glucuronidasa (*Uid A*) regulado por los promotores rd29A y 35S bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Clonas transformadas establemente con el promotor inducible por estrés (33 rd29A), promotor constitutivo (51 35S) y clonas control sin transformar (NT1), se crecieron en presencia y ausencia de estrés por bajas temperaturas (4°C y -12°C), osmótico (Sacarosa 12%), y salino (6, 12 y 24 g/L NaCl). La actividad de β -Glucuronidasa se midió por fluorometría.

5.5 Las células NT1 pueden ser almacenadas en medio de cultivo conteniendo NaCl a 6gr/L.

Un resultado adicional e inesperado se obtuvo mientras se trabajaba con la inducción por estrés salino en clonas estables. Las clonas transformantes fueron sometidas a tratamientos con NaCl, para inducir al promotor rd29A, y posteriormente realizar los ensayos con el gen reportero GUS. Después de dichos ensayos, las placas con los restos de las clonas se mantuvieron en oscuridad (mejor dicho olvidadas) por aproximadamente 2 meses, tiempo en que una clona NT1 en medio normal y sin subcultivo, envejece y muere. Aunque las clonas restantes en las placas con sal se esperaban muertas, al observar las placas notamos que las clonas mantenidas en medio NT1 con 6 g/L NaCl sobrevivieron en buenas condiciones (Figura 14). De estas observaciones se concluye que el medio NT1 con 6 g/L de NaCl puede ser utilizado como un medio de almacenamiento para las células NT1.

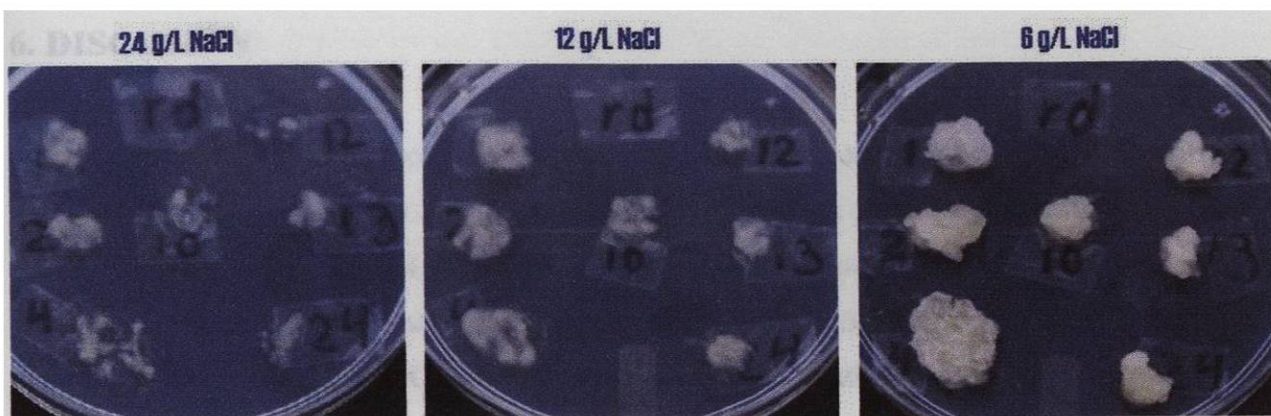


Figura 14 . Clonas transformantes mantenidas en medio con NaCl durante 2 meses. Las clonas en medio NT1 con 24 12 g/L NaCl no lograron sobrevivir. Las clonas en medio NT1 con 6 g/L muestran regeneración y se mantienen vivas.

6. DISCUSIÓN

Con el propósito de contar con un promotor inducible por estrés, el cual pudiese utilizarse para la inducción específica de genes durante condiciones adversas, decidimos clonar el promotor del gen RD29 de *A. thaliana*, el cual se induce por estrés abiótico. En base a las secuencias reportadas para este gen se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación del promotor rd29A mediante PCR. La caracterización con enzimas de restricción ~~nos indicó~~ ^{ind} que efectivamente habíamos amplificado dicho promotor.

La funcionalidad del promotor, es decir, su habilidad de inducir la expresión de un gen bajo condiciones de estrés se comprobó utilizando un gen reportero, midiendo su capacidad de inducir la expresión del gen de la β -glucoronidasa. Al aplicar los tratamientos por estrés osmótico o por temperatura ~~comprobamos~~ ^{se probó} que ~~realmente~~ ^{al} la secuencia regulatoria clonada ~~en este trabajo~~ del gen rd29A responde ~~a~~ ^{al} estrés.

En los experimentos de respuesta a estrés osmótico encontramos que algunas de las clonas analizadas presentaron una expresión basal elevada (ej: clona 12, Figura 9) mientras que en otras la expresión basal fue menor y pudo apreciarse mejor el efecto de inducción como respuesta a estrés osmótico, tal es el caso de las clonas 33 y 43 (Figura 9). Es posible que en las clonas que muestran una expresión basal alta el casete de expresión rd29A-GUS se haya insertado cercano a un promotor constitutivo y dicho promotor esté incrementando la expresión basal de estas clonas.

Dada la facilidad de manejo de las células NT1 fue posible trabajar con niveles de estrés extremos: salinidad de hasta 24 g/L y temperaturas de hasta -12°C . La respuesta del promotor a estrés por bajas temperaturas se observa en la figura 10. Los resultados de estos experimentos muestran que el promotor es inducido por frío e incluso por congelamiento, observándose una buena inducción a 4°C y una inducción aún mayor a -12°C . La expresión del gen de la β -glucoronidasa bajo regulación del promotor constitutivo control se mantiene dentro de los mismos niveles, indicando que las bajas temperaturas no son un factor que ~~afecta~~ ^e la actividad del promotor 35S.

En el caso de la inducción del promotor rd29A en respuesta a estrés salino, la mayor inducción se observó a 6 g/L (Figura 11); a 12 g/L aún se observa una buena inducción, sin embargo a 24 g/L los niveles de inducción son cercanos a una expresión basal. A estas concentraciones de salinidad, la pérdida de turgencia y acumulación de solutos alteran la función celular, y por lo tanto, este decremento de la expresión a concentraciones mayores (12 y 24 g/L) puede deberse a una alteración fisiológica general, ya que como se observa en la expresión del promotor constitutivo control (35S), los niveles de expresión a esta concentración salina se redujeron considerablemente. El decremento en la actividad de GUS resultante de la exposición de la clona a 24 g/L de NaCl puede incluso ser ocasionada por muerte celular.

El término estrés osmótico se refiere a condiciones de baja disponibilidad de agua, éstas pueden ser resultado de la sequía o de la alta salinidad en el agua, incluso condiciones de enfriamiento y congelamiento pueden causar estrés osmótico debido a la reducción en la absorción de agua y a la deshidratación inducida por la formación de hielo (Zhu et al., 1997). Puesto que las principales condiciones de estrés abióticos se reducen a estrés por déficit de agua, la combinación de factores de estrés debería inducir de manera positiva al promotor rd29A, para demostrar esta premisa se realizaron experimentos combinando estrés por bajas temperaturas con estrés osmótico/salino. En 1999 Xiong *et al.* reportaron una interacción negativa entre estrés por bajas temperaturas y estrés osmótico/salino, los resultados obtenidos en esta tesis a partir de los ensayos histológicos y fluorométricos revelan por el contrario una interacción positiva no acumulativa de dichos tipos de estrés en la inducción del promotor rd29A en la línea celular NT1 de *Nicotiana tabacum L.* La figura 12 ilustra estos resultados. La respuesta más elevada se obtiene al inducir el promotor a estrés osmótico/salino a temperatura ambiente, sin embargo la respuesta a la combinación de los dos tipos de estrés es considerablemente mas elevada que la expresión basal, incluso en el caso de la clona 43, la respuesta a la combinación de estrés osmótico (manitol-sorbitol) con bajas temperaturas (4°C) es igual a su respuesta a la inducción por NaCl a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos, tanto en los ensayos histológicos como en los de fluorescencia, fueron consistentes con los resultados descritos en trabajos anteriores: el promotor se induce bajo condiciones de estrés osmótico, alta salinidad y frío. Así mismo en este trabajo se encontró que la combinación de estrés por frío y estrés osmótico o salino induce también la actividad del promotor rd29A. Estos últimos resultados no han sido reportados en trabajos previos.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron líneas celulares NT1 transformadas de manera estable con el promotor rd29A fusionado al gen reportero *uidA* (GUS).

El promotor rd29A es inducido bajo condiciones de estrés osmótico en líneas celulares NT1 de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), en ensayos de expresión transitoria y estable.

El medio NT1 con 6 g/L de NaCl puede ser utilizado para almacenar al menos por 2 meses células NT1.

El promotor rd29A responde positivamente aunque de manera no acumulativa a la combinación de estrés salino/osmótico con estrés por bajas temperaturas.

8. LITERATURA CITADA

Binzel, M. L. (1995). NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato. *Physiol. Plant*, **94**: 722-728.

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

Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.*, **2**: 28-54.

Cabrera-Ponce, J. L., L. López, N. Assad-García, C. Medina-Arévalo, A. M. Bailey y L. Herrera-Estrella. (1997). An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*, **16**: 255-260.

Christou, P., T. Ford, M. Kofron. (1991). Production of transgenic rice (*Oryza Sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*, **9**: 957-962.

Cushman, J. C. & H. J. Bohnert. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current opinion in Plant Biology*, **3**: 117-124.

Datta, S. K. (2002). Recent developments in transgenics for abiotic stress tolerance in rice. *JIRCAS Working Report*, 45-53.

El-Hamdaoui, A., I. Bonilla, y L. Bolaños (2001). Salinidad: Efectos del estrés salino sobre la fijación de nitrógeno en leguminosas.
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/salinidad.htm

Gilmour S. J. & M. F. Thomashow. (1991). Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.*, **17**: 1233-1244.

Grover, A., A. Kapoor, O. S. Lakshmi, S. Agrarwal, Ch. Sahi, S. Katiyar-Agarwal, M. Agarwal, and H. Dubey. (2001). Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Current Science*, **80**: 206-216.

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

Holmberg, N. & L. Bülow. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Elsevier Science*, **3(2)**: 61-66.

Hwang, I. & J. Sheen. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokin signal transduction. *Nature*, **413**: 383-389.

Ingram, J. & D. Bartels. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 377-403.

Iuchi, S., M. Kobayashi, T. Taji, M. Naramoto, M. Seki, T. Kato, S. Tabata, Y. Kakubari, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **27**(4): 325-333.

Jefferson, R.A. (1987). Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Mol. Biol. Reporter*, **5**(4): 387-405.

Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*, **17**: 287-291.

Lee, P. F., Y. C. Hsing, and T. H. Chow. (2000). Promoter activity of a soybean gene encoding a seed maturation protein, GmPM9. *Bot. Bml. Acad. Sin.*, **41**: 175-182.

León, C. (2002). Comunicación personal.

Levitt, J. (1972). Responses of Plants to Environmental Stresses. *Academic Press, New York*.

Lichtentaler, H. K. (1995). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology.*, **148**: 4-14.

Nakashima, K., Z. K. Shinwari, Y. Sakuma, M. Seki, S. Miura, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molec. Biol.*, **42**: 657-665.

Niu, X., M. L. Narasimhan, R. A. Salzman, R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa. (1993). NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte, *Plant Physiol.*, **103**: 713-718.

Russell, J. A., M. K. Roy, and J. C. Sanford. (1992). Major improvements in biolistic of suspension-cultured tobacco cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **28P**: 97-105.

Rhodes, D. (1987). Metabolic responses to stress in *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Vol. 12, Physiology of Metabolism, Stumpf, P. K., et al., Eds., *Academic Press, New York*, pp. 201-241.

Sambrook J. & D.W. Russell (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. Volúmenes 1-3. Cold Spring Harbor, New York, USA. Tercera Edición.

Shinozaki, K. & K. Yamaguchi-Shinozaki. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 217-223.

Shinozaki, K. & K. Yamaguchi-Shinozaki. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, **115**: 327-334.

Shinozaki, K. & K. Yamaguchi-Shinozaki. (1992). Molecular Cloning and Characterization of 9 cDNAs for Genes That Are Responsive to Desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence Analysis of One cDNA Clone That Encodes a Putative Transmembrane Channel Protein. *Plant Cell Physiol.*, **33(3)**: 217-224.

Skriver, K. & J. Mundy. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, **2**: 503-512.

Surowy, T. K. & J. S. Boyer. (1991). Low water potentials affect expression of genes encoding vegetative storage proteins and plasma membrane proton ATPase in soybean. *Plant Mol. Biol.*, **16**: 251-262.

Stockinger, E. J., S. J. Gilmour and M. F. Thomashow. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **94**: 1035-1040.

Thomashow, M. F. (2001), So What's New in the Field of Plant Cold Acclimation? Lots!. *Plant Physiology*, **125**: 89-93.

Thomashow, M. F. (1999). Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **50**: 571-599.

Tomes, D. T., M. C. Ross, y D. D. Songstad. (1995). Direct DNA transfer into intact Plant Cells via Microprayeclite Bombardment. En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Springer Lab Manual. *Springer-Verlag* Berlin Heidelberg, Germany. pp 197-213.

Yamaguchi-Shinozaki, K., M. Kasuga, Q. Liu, K. Nakashima, Y. Sakuma, H. Abe, Z.K. Shinwari, M. Seki, and K. Shinozaki. (2002). Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*, 1-8.

Yamaguchi-Shinozaki, K. & K. Shinozaki. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high salt stress. *Plant Cell*. **6**: 251-264.

Yamaguchi-Shinozaki, K. & K. Shinozaki. (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, **236**: 331-340.

Yamaguchi-Shinozaki, K. & K. Shinozaki. (1992). A novel Arabidopsis DNA binding protein contains the conserved motif of HMG-box protein. *Nucleic Acid Research*. **20(24)**: 6737

Young-Kim, S. (1999). Stress Responsive Gene Expression. *BioWave*. BRIC. Korea.

Xiong, L., M. Ishitani, and J. K. Zhu. (1999). Interaction of Osmotic Stress, Temperature, and Abscisic Acid in the Regulation of Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **119**: 205-211.

Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science.*, **6**: 66-71.

Zhu, J. K., P. M. Hasegawa, and R. A. Bressan. (1997). Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **16(3)**: 253-277.

ANEXO I

TABLAS

Abs 1: Valor de absorción del tubo 1 del ensayo de Coomasie para cuantificación de proteína.

Abs 2: Valor de absorción del tubo 2 del ensayo de Coomasie para cuantificación de proteína.

Prom Abs: Promedio de absorciones = $(\text{Abs 1} + \text{Abs 2})/2$

Prot total: Proteína total $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de muestra = $[(\text{Prom Abs} - 0.071)/0.047]/5$

Prot usada: Proteína usada por ensayo, en μg = $(\mu\text{l de extracto crudo} * \text{Prot total})/\text{Factor de dilución}$

Factor de dilución = 5.2

Lectura: lectura del fluorómetro, fluorescencia de 4MU para cada clona o control.

pM 4MU/mg prot/min: Picomoles de 4MU por microgramo de proteína por minuto

pM 4MU/mg prot/min = $[(\text{lectura}/\text{prot usada})/\text{tiempo total de reacción}] * 1000$

Tiempo total de reacción: 120 minutos

Clona: Clona utilizada en el experimento, NT corresponde al control, el número de la etiqueta es el número de identificación de la clona, la etiqueta rd indica una clona transformante con el promotor inducible rd29A, 35S corresponde a una clona transformante con el promotor constitutivo CaMV 35S.

Trat: Tratamiento al que fue expuesta la clona.

Tabla 4. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por estrés osmótico.

Abs 1	Abs 2	Prom Abs	Prot Total	Prot Usada	Lectura	pM 4MU/ μ g prot/min	clona	Trat
0.668	0.499	0.5835	2.181	8.388	815.000	809.699	NT1	
0.46	0.435	0.4475	1.602	6.162	330.000	446.282	NT1	Sac
18.59	15.76	17.175	1.374	5.285	4142.5	6532.327	10 rd	
14.74	17.19	15.965	1.2772	4.912	2287.5	3880.559	10 rd	Sac
11.27	10.93	11.1	0.888	3.415	2960	7222.222	12 rd	
15.34	15.46	15.4	1.232	4.738	5320	9356.061	12 rd	Sac
11.82	12.38	12.1	0.968	3.723	3025	6770.833	43 rd	
12.29	9.93	11.11	0.8888	3.418	5920	14431.443	43 rd	Sac
0.433	0.438	0.4355	1.551	5.966	192.500	268.901	24 rd	
0.438	0.44	0.439	1.566	6.023	230.000	318.229	24 rd	Sac
0.527	0.512	0.5195	1.909	7.340	1837.500	2086.051	33 rd	
0.62	0.642	0.631	2.383	9.165	12330.000	11210.759	33 rd	Sac
14.95	17.29	16.12	1.2896	4.960	8902.5	14957.157	51 35S	
21.61	21.1	21.355	1.7084	6.571	10785	13678.003	51 35S	Sac
0.557	0.554	0.5555	2.062	7.930	10980.000	11539.009	58 35S	
0.613	0.63	0.6215	2.343	9.010	20125.000	18613.949	58 35S	Sac
0.521	0.51	0.5155	1.891	7.275	2437.500	2792.112	58 35S	Sac
0.505	0.496	0.5005	1.828	7.029	3070.000	3639.445	58 35S	

Tabla 5. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por estrés por bajas temperaturas.

Abs 1	Abs2	Prom Abs	Prot Total	Prot usada	Lectura	pM 4MU/ μ g prot/ min	Clona	Trat
0.616	0.61	0.6105	2.2957	8.8298	15028.0	14183.052	2 rd	T ^o A
0.78	0.69	0.7325	2.8149	10.8265	19020.0	14639.985	2 rd	4 ^o C
0.764	0.78	0.7715	2.9809	11.4648	17096.0	12426.429	2 rd	-12 ^o C
0.583	0.57	0.578	2.1574	8.2979	2588.0	2599.060	4 rd	T ^o A
0.596	0.69	0.641	2.4255	9.3290	2716.0	2426.135	4 rd	4 ^o C
0.659	0.65	0.6555	2.4872	9.5663	3540.0	3083.747	4 rd	-12 ^o C
0.702	0.69	0.695	2.6553	10.2128	2960.0	2415.278	10 rd	T ^o A
0.841	0.84	0.8405	3.2745	12.5941	4344.0	2874.360	10 rd	4 ^o C
0.787	0.84	0.812	3.1532	12.1277	7224.0	4963.860	10 rd	-12 ^o C
0.672	0.64	0.654	2.4809	9.5417	9456.0	8258.456	12 rd	T ^o A
0.642	0.73	0.6835	2.6064	10.0245	9600.0	7980.408	12 rd	4 ^o C
0.841	0.82	0.8325	3.2404	12.4632	10628.0	7106.268	12 rd	-12 ^o C
0.579	0.62	0.5995	2.2489	8.6498	14076.0	13561.079	25 rd	T ^o A
0.636	0.61	0.6225	2.3468	9.0262	13944.0	12873.654	25 rd	4 ^o C
0.733	0.67	0.702	2.6851	10.3273	20344.0	16415.985	25 rd	-12 ^o C
0.664	0.67	0.6645	2.5255	9.7136	3244.0	2783.044	27 rd	T ^o A
0.632	0.66	0.646	2.4468	9.4108	4296.0	3804.139	27 rd	4 ^o C
0.776	0.79	0.784	3.0340	11.6694	11684.0	8343.763	27 rd	-12 ^o C
0.37	0.33	0.349	1.1830	4.5499	432.0	791.223	33 rd	T ^o A
0.748	0.68	0.716	2.7447	10.5565	5496.0	4338.574	33 rd	4 ^o C
0.749	0.78	0.766	2.9574	11.3748	9692.0	7100.494	33 rd	-12 ^o C
0.544	0.53	0.536	1.9787	7.6105	4972.0	5444.251	42 rd	T ^o A
0.517	0.52	0.518	1.9021	7.3159	4616.0	5257.972	42 rd	4 ^o C
0.681	0.76	0.721	2.7660	10.6383	8324.0	6520.467	42 rd	-12 ^o C
0.558	0.55	0.556	2.0638	7.9378	8080.0	8482.612	43 rd	T ^o A
0.756	0.78	0.767	2.9617	11.3912	11472.0	8392.471	43 rd	4 ^o C
0.858	0.86	0.8575	3.3468	12.8723	10128.0	6556.694	43 rd	-12 ^o C
0.627	0.64	0.6355	2.4021	9.2390	4468.0	4030.038	45 rd	T ^o A
0.767	0.79	0.7805	3.0191	11.6121	4116.0	2953.813	45 rd	4 ^o C
0.779	0.77	0.7765	3.0021	11.5466	8056.0	5814.099	45 rd	-12 ^o C
0.676	0.67	0.6705	2.5511	9.8118	16244.0	13796.336	51 35s	T ^o A
0.887	0.88	0.8835	3.4574	13.2979	20512.0	12854.187	51 35S	4 ^o C
0.796	0.74	0.7695	2.9723	11.4321	19888.0	14497.218	51 35S	-12 ^o C
0.599	0.63	0.614	2.3106	8.8871	20000.0	18753.837	58 35S	T ^o A
0.845	0.85	0.848	3.3064	12.7169	20000.0	13105.963	58 35S	4 ^o C
0.757	0.75	0.752	2.8979	11.1457	20000.0	14953.500	58 35S	-12 ^o C
0.426	0.43	0.426	1.5106	5.8101	792.0	1135.944	61 35S	T ^o A
0.541	0.55	0.544	2.0128	7.7414	732.0	787.970	61 35S	4 ^o C
0.57	0.58	0.577	2.1532	8.2815	824.0	829.157	61 35S	-12 ^o C

Tabla 6. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por Salinidad.

Abs 1	Abs 2	Prom Abs	Prot Total	Prot usada	Lectura pM	4MU/ μ g prot/min	clona	Trat
0.383	0.385	0.384	1.332	5.123	377.5	614.091	NT1	
0.434	0.413	0.4235	1.500	5.769	257.5	371.944	NT1	
0.396	0.453	0.4245	1.504	5.786	5530.0	7965.182	42 rd	6
0.13	0.123	0.1265	0.236	0.908	692.5	6353.116	42 rd	12
0.158	0.152	0.155	0.357	1.375	5570.0	33762.599	42 rd	24
0.379	0.408	0.3935	1.372	5.278	6162.5	9729.425	33 rd	6
0.273	0.284	0.2785	0.883	3.396	3745.0	9189.538	33 rd	12
0.163	0.168	0.1655	0.402	1.547	302.5	1629.872	33 rd	24
0.342	0.534	0.438	1.562	6.007	5297.5	7349.620	25 rd	6
0.61	0.526	0.568	2.115	8.134	6147.5	6297.992	25 rd	12
0.468	0.413	0.4405	1.572	6.047	1270.0	1750.045	25 rd	24
0.792	0.715	0.7535	2.904	11.170	5740.0	4282.222	51 35S	6
0.787	0.762	0.7745	2.994	11.514	2792.5	2021.106	51 35S	12
0.688	0.603	0.6455	2.445	9.403	280.0	248.158	51 35S	24
0.767	0.774	0.7705	2.977	11.448	7302.5	5315.496	58 35S	6
0.715	0.733	0.724	2.779	10.687	3197.5	2493.201	58 35S	12
0.651	0.638	0.6445	2.440	9.386	927.5	823.456	58 35S	24
0.696	0.662	0.679	2.587	9.951	1800.0	1507.401	35 rd	
0.649	0.65	0.6495	2.462	9.468	1847.5	1626.077	35 rd	6
0.648	0.643	0.6455	2.445	9.403	2092.5	1854.537	35 rd	12
0.53	0.547	0.5385	1.989	7.651	1007.5	1097.295	35 rd	24
0.713	0.724	0.7185	2.755	10.597	1975.0	1553.057	44 rd	
0.713	0.729	0.721	2.766	10.638	880.0	689.333	44 rd	6
0.716	0.695	0.7055	2.700	10.385	1967.5	1578.858	44 rd	12
0.67	0.644	0.657	2.494	9.591	910.0	790.685	44 rd	24
0.766	0.856	0.811	3.149	12.111	1562.5	1075.099	45 rd	
0.83	0.81	0.82	3.187	12.259	2947.5	2003.697	45 rd	6
0.797	0.816	0.8065	3.130	12.038	3237.5	2241.233	45 rd	12
0.784	0.728	0.756	2.915	11.211	1770.0	1315.657	45 rd	24
0.875	0.837	0.856	3.340	12.848	2360.0	1530.743	51 35S	
0.829	0.854	0.8415	3.279	12.610	3545.0	2342.629	51 35S	6
0.785	0.798	0.7915	3.066	11.792	3182.5	2249.026	51 35S	12
0.677	0.674	0.6755	2.572	9.894	727.5	612.769	51 35S	24
0.913	0.865	0.889	3.481	13.388	5182.5	3225.863	52 35S	
0.832	0.907	0.8695	3.398	13.069	3062.5	1952.815	52 35S	6
0.738	0.752	0.745	2.868	11.031	755.0	570.357	52 35S	12
0.845	0.768	0.8065	3.130	12.038	1637.5	1133.597	52 35S	24

Tabla 7. Actividad específica de la β -Glucoronidasa en ensayos de inducción por estrés osmótico/salino combinado con estrés por bajas temperaturas.

Abs 1	Abs2	Prom Abs	Prot Total	Prot usada	Lectura	pM 4MU/ μ g prot/ min	clona	Trat
0.692	0.415	0.5535	2.0532	12.8324	36.0	46.756	NT1	T ^o A NaCl 6
0.488	0.552	0.5200	1.9106	11.9415	44.0	61.411	NT1	T ^o A Man Sor
0.263	0.325	0.2940	0.9489	5.9309	44.0	123.647	NT1	4 ^o C NaCl 6
0.326	0.433	0.3795	1.3128	8.2048	44.0	89.379	NT1	4 ^o C Man Sor
0.59	0.76	0.6750	2.5702	16.0638	2128.0	2207.859	27 rd	T ^o A NaCl 6
0.34	0.31	0.3250	1.0809	6.7553	3788.0	9345.722	27 rd	T ^o A Man Sor
0.27	0.176	0.2230	0.6468	4.0426	344.0	1418.246	27 rd	4 ^o C NaCl 6
0.162	0.238	0.2000	0.5489	3.4309	604.0	2934.160	27 rd	4 ^o C Man Sor
0.379	0.408	0.3935	1.372	5.278	6162.5	9729.425	33 rd	T ^o A NaCl 6
0.4	0.374	0.3870	1.3447	8.4043	5688.0	11280.000	33 rd	T ^o A Man Sor
0.258	0.362	0.3100	1.0170	6.3564	876.0	2296.904	33 rd	4 ^o C NaCl 6
0.369	0.384	0.3765	1.3000	8.1250	2660.0	5456.410	33 rd	4 ^o C Man Sor
0.404	0.324	0.3640	1.2468	7.7926	5700.0	12191.126	43 rd	T ^o A NaCl 6
0.264	0.403	0.3335	1.1170	6.9814	6048.0	14438.400	43 rd	T ^o A Man Sor
0.187	0.175	0.1810	0.4681	2.9255	1084.0	6175.515	43 rd	4 ^o C NaCl 6
0.231	0.271	0.2510	0.7660	4.7872	3504.0	12199.111	43 rd	4 ^o C Man Sor
0.477	0.442	0.4595	1.6532	10.3324	888.0	1432.381	51 35S	T ^o A NaCl 6
0.469	0.476	0.4725	1.7085	10.6782	2112.0	3296.438	51 35S	T ^o A Man Sor
0.327	0.32	0.3235	1.0745	6.7154	464.0	1151.578	51 35S	4 ^o C NaCl 6
0.448	0.4	0.4240	1.5021	9.3883	1272	2258.130	51 35S	4 ^o C Man Sor

ANEXO II

PROTOCOLOS

Transformación por Choque Térmico (Sambrook & Russell, 2001)

1. Cepa + DNA, mezclar agitando suavemente.
2. Incubar en hielo por 30 minutos.
3. Choque térmico en baño maría (42 °C) por 40 segundos.
4. Poner inmediatamente en hielo por 2 minutos.
5. Añadir 1 ml de medio LB sin antibiótico.
6. Incubar en agitación (200 rpm) a 37 °C durante 40 min.
7. Plaquear 100 µl en placa LB con antibiótico para selección, incubar a 37 °C durante toda la noche (de 8-12 hrs máximo!).
8. El resto del ml se puede guardar a 4 °C y es viable para uso por 5 días.

Extracción de DNA a pequeña escala por Lisis Alcalina (Sambrook & Russell, 2001)

1. Crecer una colonia transformante en 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección a 37 grados C 200 rpm durante toda la noche.
2. Transferir la muestra a tubo eppendorf. Centrifugar a máxima velocidad por 20 segundos.
3. Eliminar sobrenadante.
4. Resuspender pastilla en 100 µl de sol. BirnBoim I. Mezclar por vortex.
5. Añadir 200 µl de sol. BirnBoim II. Mezclar por inversión.
6. Añadir 150 µl de sol. BirnBoim III. Mezclar por inversión.
7. Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
9. Precipitar con un volumen de isopropanol frío (450 µl).
10. Incubar a -20 °C durante 30 minutos.
11. Centrifugar a 4°C máxima velocidad durante 12 minutos.
12. Lavar pastilla con 1 ml de etanol al 70%.
13. Centrifugar durante 2 minutos a temperatura ambiente (máxima velocidad).

14. Eliminar etanol. Secar al aire.
15. Resuspender en 30 μl de H_2O destilada estéril.

Preparación proyectiles de biobalística (Cabrera-Ponce, 1997)

1. Pesar 60 mg de partículas de tungsteno.
2. Resuspender en 2 ml de HNO_3 (0.1N) y sonicar por 20 minutos.
3. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante y aplicar 1 ml de etanol concentrado, sonicar brevemente hasta homogenizar.
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 2 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante, resuspender en 1 ml de agua desionizada estéril.
7. Tomar 4 alícuotas de tungsteno de 250 μl , resuspender en 750 μl de agua desionizada estéril en cada uno de los tubos.
8. La concentración final de tungsteno en cada uno de los tubos es de 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
9. Almacenar a -20°C .

Protocolo Biobalística (Tomes, 1995)

1. Mezclar:
 - 60 μl de tungsteno (tomado a partir de la alícuota de 750 μl)
 - 5 μl de DNA
 - 50 μl de CaCl_2 (2.5 M)
 - 20 μl de espermidina base libre (0.1 M)
 - NOTA: esta preparación sirve para 6 disparos.
2. Sonicar hasta observar homogéneo las partículas.
3. Centrifugar por 10 segundos a 10,000 rpm.
4. Lavar con 400 μl de etanol concentrado.
5. Centrifugar por 10 segundos a 10,000 rpm.
6. Eliminar sobrenadante y resuspender en 75 μl de etanol concentrado.
7. Sonicar brevemente.
8. Aplicar 10 μl de la mezcla en las membranas de kapton (macrocarreadores).

Soluciones stock para la calibración del fluorómetro

4MU solución stock A

1mM (100 ml)

19.8 mg de 4-metilumbeliferona (sal sódica), (PM = 198.20)

Aforar en 100 ml agua destilada. Guardar a 4 °C y proteger de la luz.

Ensayo Fluorométrico

Los pasos 7, 8 y 9 deben ser realizados con el mismo intervalo de tiempo entre ellos para cada muestra, aproximadamente 1 minuto por muestra. Las muestras deben ser mantenidas en hielo. El buffer MUG (500 µl en tubo eppendorf) se incuba en baño maría a 37°C previamente al ensayo. La reacción con MUG debe estar siempre a 37°C. El buffer STOP (900 µl en tubo eppendorf) debe estar listo antes de comenzar el ensayo.

1. Congelar muestra en Nitrogeno líquido.
2. Macerar en homogenizador.
3. Añadir 100 µl de buffer de Lisis y mezclar en homogenizador. La mezcla debe permanecer congelada.
4. Continuar hasta terminar todas las muestras. Mantener las muestras procesadas en hielo mientras se termina la maceración de todas las muestras.
5. Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm.
6. Recuperar sobrenadante a tubo nuevo.
7. Tomar 15 µl del extracto y añadirlo a 500 µl de buffer MUG previamente templado.
8. Mezclar por vortex.
9. Tomar 100 µl de la mezcla y depositarlos en 900 µl de buffer STOP. Mezclar bien por vortex.

10. Repetir para cada muestra, mantener en oscuridad y verificar en fluorómetro.

Ensayo de Coomasie (León, comunicación personal)

11. Hidrolizar muestra toda la noche (30 μ l extracto de proteína + 30 μ l NaOH 2 M).
12. 10 μ l muestra + 25 μ l H₂O destilada estéril.
13. Ajustar el espectro al blanco (35 ml H₂O destilada estéril).
14. Medir absorbancia a 600nm.

